

イネミトコンドリアに存在する  
プラスミド様DNAの分子生物学的研究

鹿内 利治

1992

## 目次

緒言 .....	1
第1章 イネミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA の諸性質 .....	8
第1節 B1~B4 のクローン化 .....	9
第2節 B1~B4 とミトコンドリア主ゲノム DNA の相同性 .....	15
第3節 B1~B4 の一次構造の決定 .....	20
第2章 転写産物の解析 .....	35
第1節 B1 転写産物の解析 .....	35
第2節 B3 転写産物の解析 .....	40
第3章 プラスミド様 DNA と核 DNA の相同性 .....	44
第1節 B1 相同配列 .....	44
第2節 B4 相同配列 .....	51
第3節 B2 相同配列 .....	63
結語 .....	71
謝辞 .....	73
文献 .....	74

## 緒言

### 高等植物のミトコンドリアゲノムの特徴

ミトコンドリアはエネルギーを生産するための細胞内小器官であるが、葉緑体同様、独自のゲノムを有し、その発現システムを持っている。ミトコンドリアゲノムはミトコンドリアを構成するタンパク質、RNAのうち一部のみをコードしており、その他の要素は核の遺伝情報に依存していることが、分子生物学的解析により明らかになっている。

ミトコンドリアゲノムのサイズは生物種により著しく異なっている。最もコンパクトなのは哺乳類のもので約16 kbp<sup>1) 2) 3)</sup>であるが、無脊椎動物も含めて動物のミトコンドリアゲノムは、だいたいこれに近い値を有する<sup>4) 5)</sup>。原生動物<sup>6)</sup>やコウボ<sup>7)</sup>、糸状菌の類<sup>8)</sup>ではゲノムサイズは20~100 kbpと大きくなり、種間でのサイズの差も大きい。高等植物ではさらにこの傾向が強まり、マスクメロンに至っては2400 kbpのミトコンドリアゲノムを有することが知られている<sup>9)</sup>。

一般にミトコンドリアゲノムは単一の環状分子より成るが、高等植物の場合は複雑な複数の分子で構成されている点で特徴的である。*Brassica campestris*のミトコンドリアゲノムは、全てのDNA配列を一通り備えた218 kbpのマスターサークルと呼ばれる単一の環状分子を想定することができるが、実際にはゲノム内に存在する2 kbpの反復配列を介した分子内相同組換えにより、135 kbpと83 kbpの2つのサブサークルに分断されていることが報告されている<sup>10)</sup>。tripartite構造と呼ばれるこのようなゲノム構成は、*Brassica nigra*、*Raphanus sativa*<sup>11)</sup>やハウレンソウ<sup>12)</sup>等でも報告されている。またコムギ<sup>13)</sup>やトウモロコシ<sup>14)</sup>等では、ゲノム内に多数の反復配列が存在し、分子内、分子間の相同組換えにより、マスターサークルがさらに複雑なサブサークルに分断されている。例外的なのはシロガラシで、208 kbpの単一環状分子によりゲノムが構成

されている<sup>15)</sup>。

哺乳類のミトコンドリアゲノムが約16 kbp と非常にコンパクトな構造であるのに対して、高等植物のミトコンドリアが大きく膨れ上がった原因の一つとして、他のオルガネラゲノムの配列をゲノム内に取り込む性質を挙げることができる。トウモロコシのミトコンドリアゲノムに12 kbp の葉緑体ゲノム由来の配列が見つかった以来、多数の葉緑体ゲノム由来の配列がミトコンドリアゲノムに存在することが明らかになっている<sup>16)17)</sup>。一方、同じ高等植物においても葉緑体ゲノムはかなりコンパクトな構造を取っており、他のオルガネラゲノム由来の配列を見いだすことはできない<sup>18)</sup>。

#### 細胞質雄性不稔とミトコンドリア DNA

細胞質雄性不稔は  $F_1$  種子生産にとって非常に有用な形質であり、ミトコンドリアゲノムにコードされていると考えられている。そのため高等植物のミトコンドリアゲノムの研究において、細胞質雄性不稔を引き起こす遺伝子の解明に多大な感心が払われてきた。

トウモロコシの S 型細胞質雄性不稔は遺伝的に不安定で、しばしば稔性回復の突然変異を引き起こす。この S 型雄性不稔トウモロコシのミトコンドリアに S1、S2 と呼ばれる線状のプラスミド様 DNA が存在し<sup>19)</sup>、その消失が稔性の回復と同時に起きることから、S1、S2 は細胞質雄性不稔と関連があるものと考えられてきた<sup>20)</sup>。しかしながら現在では、稔性の回復が S1、S2 の消失によって直接引き起こされるのではなく、S1、S2 がミトコンドリア主ゲノムに組み込まれる際に生じるゲノムの再編成に起因しているのではないかと考えられている<sup>21)22)</sup>。

一方トウモロコシの T 型細胞質雄性不稔は、プラスミド様 DNA の関与を想像させるような遺伝的な不安定さは見られないが、ミトコンドリア内で 13 kDa のペプチドが特異的に合成されることが知られている<sup>23)</sup>。このペプチドは、回復遺伝子の存在下で

発現が押さえられていることから、細胞質雄性不稔と関連があるものと考えられてきた<sup>24)</sup>。タンパク質レベルの仕事に少し遅れて、13 kDa のペプチドをコードすると思われる遺伝子 *urf13-T* が、細胞質雄性不稔株で特異的に転写される領域として単離され、その構造が決定された<sup>25)</sup>。その結果、*urf13-T* は *atp6*、*rm26* 及び葉緑体の tRNA<sup>ARG</sup> 遺伝子とそれぞれホモロジーを持つ複数の配列がキメラ状につながった異常な構造を取ることが明らかになった。

T 型細胞質雄性不稔トウモロコシは、T トキシンと呼ばれるカビ毒に対して感受性であることが知られている。培養細胞において選抜された T トキシン耐性突然変異株は、同時に稔性が回復しており、*urf13-T* が消失し、さらに 13 kDa のペプチドの発現も押さえられていた<sup>26) 27)</sup>。また、*urf13-T* 遺伝子内にフレームシフトを引き起こすような塩基脱落が起こっている植物でも稔性が回復しており、T トキシンに対して耐性を示した<sup>28)</sup>。これらの結果から *urf13-T* にコードされる 13 kDa のペプチドは、雄性不稔及び T トキシンに対する感受性を引き起こし、その発現は回復因子により押さえられることが明らかになった。

ベチュニアでは、細胞融合により得られた植物の稔性及びミトコンドリア DNA 制限酵素切断パターンの対比から、*pcf* と名付けられた遺伝子が細胞質雄性不稔の発現に関与していることが示されている<sup>29)</sup>。*pcf* は *atp9*、*coxII* 及び *urfS* と呼ばれる未同定 ORF とそれぞれホモロジーを持つ領域から成り、キメラ構造を取っているという点でトウモロコシの *urf13-T* と共通である。同様なキメラ構造を持つ遺伝子はイネの細胞質雄性不稔株でも報告されている<sup>30)</sup>。

このように細胞質雄性不稔を引き起こす遺伝子は単一ではなく、それぞれの植物においてミトコンドリアゲノム上に蓄積された変異が、雄性不稔という共通の形質として表現されるものと考えられる。

## プラスミド様 DNA

高等植物のミトコンドリアには、プラスミド様 DNA と呼ばれる線状、環状の低分子 DNA が存在する場合がある。プラスミド様 DNA は糸状菌のミトコンドリアにも存在するが、構造やゲノム上にコードされる遺伝子から判断して、高等植物のものとは別の起源を持つものと考えられる<sup>31)</sup>。

高等植物のミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA の研究は、トウモロコシの S1、S2 と細胞質雄性不稔との関連を中心に進められてきた。そのため、他のプラスミド様 DNA の研究においても、細胞質雄性不稔との関連に多大な感心が払われてきたが、直接的な関連を示す結果は得られていない。しかしながらその過程で得られた結果は、プラスミド様 DNA の起源、機能について考察するとき有益である。

表 1 は、現在まで研究が行われてきたプラスミド様 DNA をまとめたものである。高等植物のプラスミド様 DNA はその諸性質から判断して、線状のものと環状のものに大別することができる。線状のプラスミド様 DNA で最も研究の進んでいるのはトウモロコシの S1、S2 である。S1、S2 はその両端に 208 塩基より成る逆位反復配列が存在し<sup>32) 33)</sup>、DNA の 5' 末端には複製の際プライマーとして働くと考えられるタンパクが共有結合している<sup>34)</sup>。このような特徴はアデノウイルスやΦ29ファージでも見られ、S1、S2 がウイルスを起源とする可能性を示唆している。また S1、S2 には 4 種類の ORF が存在するが、そのうち S1 に存在する ORF2 はウイルス型の DNA ポリメラーゼと<sup>35)</sup>、S2 に存在する ORF1 はコウボミトコンドリアの RNA ポリメラーゼと<sup>36)</sup>それぞれホモロジーを持つことが報告されており、S1、S2 の主ゲノム DNA からの独立性を示唆する結果と考えられる。S1 の配列中で驚くべき点は、葉緑体 DNA 上の遺伝子 *psbA* の一部を有する点で、ミトコンドリアのプラスミド様 DNA がどのようなメカニズムで葉緑体 DNA の配列を取り込んだのか興味深い<sup>37)</sup>。

S1、S2 に極めて類似した特徴を持つのが、同じトウモロコシのミトコンドリアに存

在する 2.3 kbp の線状プラスミド様 DNA である<sup>38)</sup>。このプラスミド様 DNA もやはりゲノムの末端に逆位反復配列を有し、そのうち 170 塩基は S1、S2 と共通である<sup>39)</sup>。また DNA の 5' 末端にタンパクが共有結合している点<sup>34)</sup>、さらには葉緑体 DNA の配列の一部 (tRNA<sup>Pro</sup> 及び tRNA<sup>Trp</sup> 遺伝子) を含んでいる点<sup>40)</sup> でも共通である。S1 にコードされている *psbA* と相同な配列は、実際にはミトコンドリア内で機能を持つものではないと考えられているが、この 2.3 kbp プラスミド様 DNA にコードされる tRNA<sup>Trp</sup> 遺伝子は、ミトコンドリア内で正常に機能していると考えられている。プラスミド様 DNA にコードされる遺伝子がミトコンドリアの機能に必須であると考えられるのはこの例だけで、このことは 2.3 kbp プラスミド様 DNA がすべてのトウモロコシのミトコンドリアに存在していることと関連があるものと思われる<sup>40)</sup> (但し T 型雄性不稔株では、ややサイズの小さい 2.1 kbp のプラスミド様 DNA が存在している<sup>39)</sup>)。

DNA に複製に関与すると考えられるタンパクが共有結合しており、葉緑体ゲノムと相同性を有するという特徴は、*Brassica campestris*<sup>41) 42) 43)</sup> 及び *Sorghum bicolor*<sup>44) 45)</sup> の線状プラスミド様 DNA でも報告されており、線状のプラスミド様 DNA に共通する特徴と考えることができる。

一方、環状のプラスミド様 DNA においても、細胞質雄性不稔植物を中心に多くのものが発見されている (表 1)。比較的解析が進んでいるものは、トウモロコシ、テンサイ、ソラマメのものであるが、細胞質雄性不稔との関連は明らかになっていない。また、解析の過程で明らかになってきた環状プラスミド様 DNA の諸性質は、線状のものとは異なっており、その起源、機能を考えるには情報が乏しい。

本研究では、イネのミトコンドリアに存在する環状のプラスミド様 DNA B1~B4 の諸性質を明らかにし、線状のプラスミド様 DNA あるいは他の植物の環状プラスミド様 DNA との比較を行った。さらにいくつかの環状プラスミド様 DNA に共通に見られる核ゲノムとの相同性について詳細な解析を行い、オルガネラ間の遺伝情報の転移について考察を行った。

表1 高等植物のミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA

植物名		サイズ (kbp)	参考文献
線状プラスミド様 DNA			
<i>Zea mays</i>	S line	6.2 (S1)	19) 32)
		5.2 (S2)	19) 33)
	R line	7.5 (R1)	46)
		5.5 (R2)	46)
	N、C、S line	2.3	38) 39) 40)
T line	2.1	39)	
<i>Zea diploperennis</i>		7.5 (D1)	47)
<i>Sorghum bicolor</i>		5.4 (D2)	47)
		5.7 (N1)	45)
<i>Oryza sativa</i>		5.3 (N2)	45)
		1.09	48)
<i>Brassica campestris</i>		11.3	41)
<i>Brassica napus</i>		11.3	41)
<i>Beta maritima</i>		10.4	49)
環状プラスミド様 DNA			
<i>Zea mays</i>	N、C、S、T line	1.95	50) 51) 52)
	C line	1.5	50)
	C line	1.4	50) 53)
<i>Sorghum bicolor</i>		2.3	54)
		1.7	54)
<i>Oryza sativa</i>		2.1 (B1)	55) 56)
		1.5 (B2)	55) 57)
		1.5 (B3)	57)
		0.97 (B4)	58)
<i>Beta vulgaris</i>		1.6 (McA)	59) 60)
		1.45 (McB)	59)
		1.4 (McC)	59) 61)
		1.3 (McD)	59) 60)

<i>Vicia faba</i>	1.7 (plasmid-1)	62) 63)
	1.7 (plasmid-2)	62) 63)
	1.5 (plasmid-3)	62) 63)
<i>Helianthus annuus</i>	1.45 (P1、pIT)	64) 65) 66)
	1.8 (P2)	64) 67)
	1.8 (P3)	64)
<i>Lupinus albus</i>	1.4 (K2)	68)
	1.2 (K1)	68)

サイズ欄の ( ) 内は、文献に示されたプラスミド様 DNA の名称を示す。

## 第1章 イネミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA の諸性質

高等植物のミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA の研究は、育種上重要な形質である細胞質雄性不稔との関連に対する興味から進められてきた。その過程で、特にトウモロコシの S1、S2 を中心に進められてきた線状のプラスミド様 DNA の解析において、その起源、機能を考えるうえで重要な情報が得られてきた。その一つは、線状のプラスミド様 DNA の構造上の特徴であり、ウイルスとの関連を想像させるものである<sup>32) 33) 34) 35) 36)</sup>。もう一つの特徴は、線状のプラスミド様 DNA が葉緑体 DNA の配列を有する点である<sup>37)</sup>。ミトコンドリアのプラスミド様 DNA がどのようなメカニズムで葉緑体 DNA の配列を取り込んだのか、ミトコンドリアゲノムの進化を考える上でも興味深い問題である。

イネにおけるプラスミド様 DNA の研究も、やはり細胞質雄性不稔との関連についての興味から始まっている<sup>55) 69)</sup>。イネの細胞質雄性不稔株は、日本稲台中65号にインド稲 Chinsurah BoroII を繰り返し戻し交雑することによって得られた。BT line と呼ばれるこの細胞質雄性不稔イネのミトコンドリアに2種類のプラスミド様 DNA が発見され、B1、B2 と名付けられた<sup>55)</sup>。さらにこのBT line に日本稲 A-58 を繰り返し戻し交雑することにより得られたのが、細胞質雄性不稔株 A-58 CMS である。A-58 CMS のミトコンドリアには B1~B4 の4種類の環状プラスミド様 DNA が存在する<sup>56)</sup>。この B1~B4 を材料に、情報の乏しい環状のプラスミド様 DNA の起源、機能に関する情報を得ることを目的とし、本章では特にその構造上の特徴を他のプラスミド様 DNA と比較を行った。

## 第1節 B1~B4 のクローン化

### 1-1-1 材料と方法

**材料** イネ (*Oryza sativa*) 細胞質雄性不稔株 A-58 CMS 及び日本稲 A-58 の種子よりカルスを導入し、 $2 \times 10^{-5} M$  の 2,4-D を含む Linsmaier-Skoog (LS) 培地<sup>70)</sup> で液体培養を行なった<sup>71)</sup>。

**ミトコンドリア DNA の抽出** 約 200g の培養細胞をナイロンメッシュで集め、乳鉢と乳棒を用いて、抽出バッファー<sup>\*</sup> (後述) 中で海砂を加えてすりつぶした。3層のガーゼを用いてろ液をしばらくとり、残渣は再び抽出バッファーと海砂を加えてすりつぶした。ろ液を RPR9-2 ローター (日立) で 3,500rpm、10分間遠心し、上清を回収した。さらに上清を RPR20-2 ローター (日立) で 13,000rpm、10分間遠心を行い、ミトコンドリアを沈殿させた。沈殿を少量の抽出バッファーに懸濁し、低速及び高速の遠心を繰り返した。得られた沈殿を 30ml の DNase バッファー<sup>\*\*</sup> に懸濁し、DNaseI (ベーリンガー) を終濃度  $50 \mu g/ml$  になるよう加え、氷上で1時間処理を行った。遠心でミトコンドリアを回収し、洗浄バッファー<sup>\*\*\*</sup> に懸濁後、さらに遠心を行なった。この洗浄操作をもう一度繰り返し、沈殿を少量の抽出バッファーに懸濁後、不連続ショ糖密度勾配液<sup>\*\*\*\*</sup> に上層した。このサンプルを SW28 ローター (Beckman) で 25,000rpm、1時間遠心を行ない、1.3M と 1.45M ショ糖液の境界に集まったミトコンドリアのバンドを回収した。得られた溶液に3倍容の希釈バッファー<sup>\*\*\*\*\*</sup> を加え、遠心でミトコンドリアを沈殿させた。以上の操作はすべて 4℃ で行った。この沈殿を少量の Lysis バッファー<sup>\*\*\*\*\*</sup> に溶解し、ProteinaseK (ベーリンガー) を 0.012% (w/v) になるよう加え、65℃、10分間の後、37℃、1時間の処理を行った。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) 処理を2回行い、エタノール沈殿で DNA を回収した。沈殿を TE バッファー<sup>\*\*\*\*\*</sup> に溶解し、RNaseA (シグマ) を  $100 \mu g/ml$  になるよう加え、

37℃、1時間処理を行った。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）処理を2回行ない、エタノール沈殿でDNAを回収した。

*抽出バッファー	0.4 M	シヨ糖
	50 mM	Tris-HCl (pH8.0)
	3 mM	EDTA
	1 mM	$\beta$ -メルカプトエタノール
	0.1%	牛血清アルブミン
**DNase バッファー	0.4 M	シヨ糖
	50 mM	Tris-HCl (pH7.5)
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
***洗浄バッファー	0.4 M	シヨ糖
	50 mM	Tris-HCl (pH8.0)
	20 mM	EDTA
****シヨ糖密度勾配液	1.0 M、1.3 M、1.45 M	シヨ糖を含む抽出バッファー それぞれ8 mlを重層する
*****希釈バッファー	0.4 M	シヨ糖
	50 mM	Tris-HCl (pH8.0)
	3 mM	EDTA
*****Lysis バッファー	50 mM	Tris-HCl (pH8.0)
	20 mM	EDTA
	2 %	Sarkosyl
*****TE バッファー	10 mM	Tris-HCl (pH8.0)
	1 mM	EDTA

電気泳動 プラスミド様DNAを分離する目的で、制限酵素処理を行わないミトコンドリアDNA 10 $\mu$ gを試料とし、0.8%アガロースゲル（25×30×0.5cm）で電気泳動を行った。また制限酵素処理を行ったミトコンドリアDNAの場合は、1 $\mu$ gを試料とした。泳動はTBEバッファー（50 mM Tris、50 mM ホウ酸、1 mM EDTA）を用いて、定電圧（65V）で一晩行った。これを1 $\mu$ g/mlのエチジウムブロマイド溶液で染色後、UV照射下で観察した。

プラスミド様DNAの回収 A-58 CMSより抽出したミトコンドリアDNA 100 $\mu$ gを試料として、0.8%の低融点アガロースゲル（BRL）で電気泳動を行った。エチジウ

ムブロマイド溶液で染色後、UV照下で分離したB1～B4のバンドを切り出した。B2、B3のバンドは近接したため、同時に切り出しを行った。切り出したゲルに、5倍容の20 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTAを加え、65℃で10分間加温してゲルを融解させた。フェノール処理を2回、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）処理を1回行い、アガロースを除去した。水層を2-ブタノールで濃縮後、エタノール沈殿でプラスミド様DNAを回収した。

制限酵素地図の作成 約20 ngのプラスミド様DNAを種々の制限酵素（ベーリンガー、宝酒造、ニッポンジーン、東洋紡）で切断し、非切断のプラスミド様DNAとともに1.2%アガロースゲルで泳動した。切断が確認された酵素については、他の酵素と組み合わせて処理を行ない、簡単な制限酵素地図を作成した。

プラスミド様DNAのクローン化 アガロースゲルより回収されたB1をEcoRIで切断し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）処理を2回行った後、エタノール沈殿を行った。一方、プラスミドベクターpBR328をEcoRIで切断し、アルカリフォスファターゼ（宝酒造）で脱リン酸化後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）処理を2回行ない、エタノール沈殿を行った。得られたB1及びベクター各々約20ngをライゲーションキット（宝酒造）を用いて連結した。宿主には大腸菌（*E. coli*）DH-1株を用い、形質転換を行なった。得られたアンピシリン耐性のコロニーの一部を、クロラムフェニコールを含む培地に移植し、インサートを含むクロラムフェニコール感受性のコロニーを選抜した。こうして得られたクローンからアルカリ法<sup>72)</sup>によりプラスミドDNAを単離し、適当な制限酵素で切断することにより、B1がクローン化されたことを確認した。

同様な手法を用いて、BglIIで各々1箇所切断されたB2、B3混合物をpUC18またはpUC19のBamHIサイトに、StuIで1箇所切断されたB4をpUC19のSmaIサイトに導入を行なった。但し、宿主として大腸菌（*E. coli*）JM109株を用い、インサートを含むクローンの選抜は、IPTG及びX-galを含む培地上で形成されるコロニーの色によ

って行った。B2、B3を含むクローンはクローン化後、制限酵素切断パターンの違いから分類した。

### 1-1-2 結果と考察

インド稲 Chinsurah Boro II の細胞質を有するイネ細胞質雄性不稔株 A-58 CMS のミトコンドリアゲノムは、日本稲 A-58 のものとは一部異なることが、*Eco*RI 及び *Xho*I による制限酵素切断パターンの比較から明らかになった (図1、レーン1~4)。また制限酵素による処理を行わないミトコンドリアDNA 10 $\mu$ g を泳動したところ、4本のプラスミド様DNAに由来するバンドが、高分子のミトコンドリア主ゲノムDNAから明瞭に分離し、B1~B4と名付けられた (図1、レーン6)。一方、日本稲 A-58 のミトコンドリアにはプラスミド様DNAは存在しなかった (図1、レーン5)。またエチジウムブロマイドで染色されたB1~B4のバンドの強さと A-58 CMS のミトコンドリアゲノムのサイズ<sup>73)</sup> から判断して、B1~B4 と主ゲノムDNAとの存在比は、およそ1:1であることが明らかになった。

高等植物のプラスミド様DNAは、トウモロコシのS1、S2に代表される線状のものと、環状のものに大別される。B1~B4は以下に示す電気泳動的挙動から、閉環状のDNAであることが明らかになった。

(1) アガロースゲルの単一バンドより回収したプラスミド様DNAをそのまま再度泳動すると、一部が開環状となり移動度が減少する。

(2) B1~B4をそれぞれ1箇所切断する制限酵素で処理すると、処理を行わないものより移動度が減少する。

B1~B4が環状のプラスミド様DNAであることが明らかになったので、簡単な制限酵素地図を作成し (図2)、それぞれを1箇所切断する制限酵素サイトを見だし、プラスミドベクターにクローン化を行った。B1は*Eco*RI及び*Stu*Iで2.1 kbpの単一

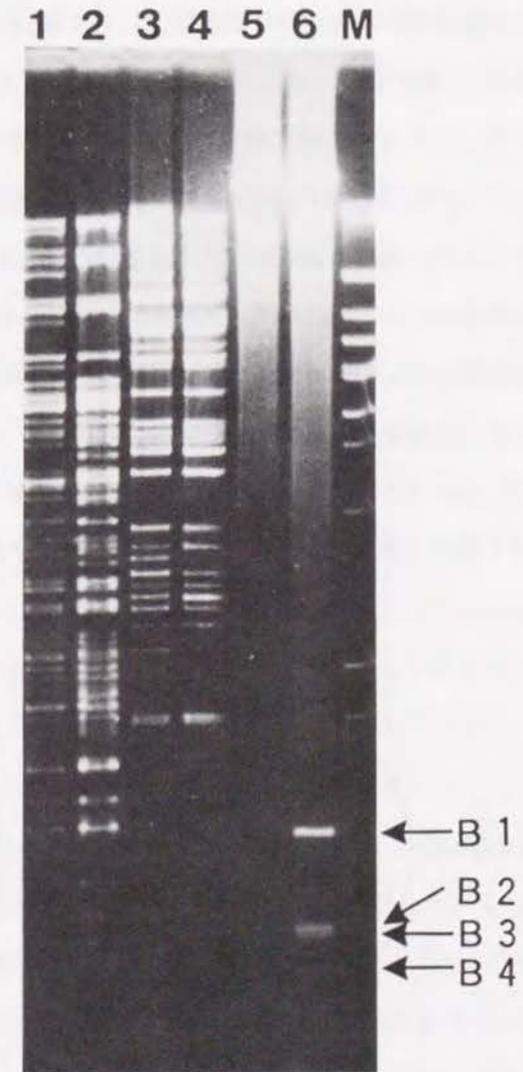


図1 A-58 CMS と A-58 ミトコンドリア DNA のアガロース電気泳動による比較  
A-58 ミトコンドリア DNA (レーン 1,3,5)、A-58 CMS ミトコンドリア DNA (レーン 2,4,6) を *Eco*RI (レーン 1,2)、*Xho*I (レーン 3,4) で切断後、あるいは制限酵素処理を行わないで (レーン 5,6) 泳動した。レーン 1~4 は 1  $\mu$ g、レーン 5、6 は 10  $\mu$ g の DNA を用いた。レーン M はマーカーとして使用した  $\lambda$  ファージ DNA *Eco*RI 分解物 + *Hin* dIII 分解物である。

断片に切断された。また *Xho*I 及び *Hae*III で 2 本の断片に切断され、それぞれの断片のサイズの和は 2.1 kbp になった。そこで *Eco*RI を B1 を 1 箇所切断する酵素として選び、プラスミドベクター pBR328 の *Eco*RI サイトにクローン化を行った (pRmB1)。

B2、B3 はサイズが近いから同時に回収されたが、両者とも *Bgl*II で 1.5 kbp の単一断片に切断された。また *Hae*III は B2 を 3 箇所、*Xba*I は B3 を 2 箇所それぞれ切断することが明らかになり、断片のサイズの和は 1.5 kbp となった。そこで B2、B3 を 1 箇所切断する酵素として *Bgl*II を選び、pUC18 及び pUC19 の *Bam*HI サイトにクローン化を行った (pRmB2、pRmB3)。

最後に B4 は *Stu*I 及び *Xho*I でそれぞれ 0.97 kbp の単一断片に切断された。そこで B4 を *Stu*I で 1 箇所切断し、pUC19 の *Sma*I サイトにクローン化を行った (pRmB4)。

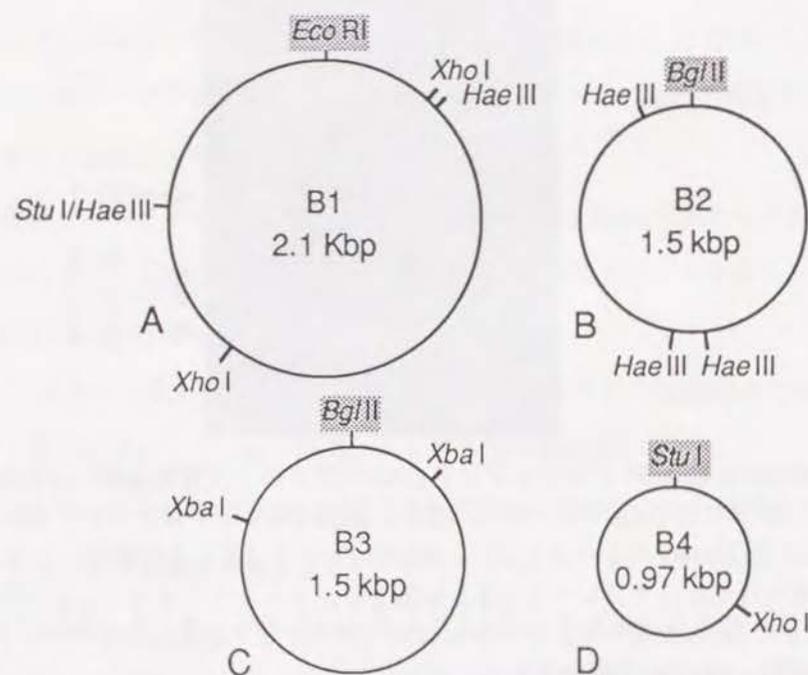


図2 A-58 CMS のミトコンドリアに存在した B1~B4 を直接解析することにより得られた簡単な制限酵素地図 (A~D) (■) はクローン化の際用いた制限酵素サイトを示す。

## 第2節 B1~B4 とミトコンドリア主ゲノムDNAの相同性

トウモロコシの線状プラスミド様 DNA S1、S2 は、ミトコンドリア主ゲノム DNA に相同配列が存在し、相同組換えによりしばしば主ゲノム DNA に取り込まれる<sup>21) 22)</sup>。B1~B4 は環状のプラスミド様 DNA で S1、S2 とは形態が異なるが、S1、S2 で見られるようなエピソーム様の挙動をとる可能性があるかどうか、B1~B4 と主ゲノム DNA との相同性を調べた。またプラスミド様 DNA を持たない日本稲のミトコンドリアでは、B1~B4 の配列が主ゲノム DNA に存在しているかどうか同時に解析を行った。

### 1-2-1 実験方法

**プローブの作製** pRmB1 を *Eco*RI、pRmB2~pRmB4 をそれぞれ *Eco*RI+*Hin*dIII で切断し、電気泳動で分離後、インサートを回収した。インサートのラベルはランダムプライミング法<sup>74)</sup>により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (アマシャム) を用いて行った。反応にはランダムプライミングラベリングキット (ペーリンガー) を使用した。

**サザンハイブリダイゼーション** A-58 CMS 及び A-58 のミトコンドリア DNA 1  $\mu$ g を制限酵素で切断した。制限酵素はプラスミド様 DNA を切断しないもの及び切断するものを数種類用いた。これらの試料を切断を行わないミトコンドリア DNA とともに、0.8% のアガロースゲルで電気泳動を行い、サザン法<sup>75)</sup>により DNA をナイロンメンブレン (Gene Screen Plus、NEB) に移行させた。トランスファー及び DNA の固定方法は NEB 社のマニュアルに従った。このメンブレンをハイブリダイゼーション溶液<sup>(後述)</sup>中で 42°C、数時間プレインキュベーションを行った後、<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブを熱処理の後加え、一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、洗浄液 1<sup>\*\*</sup>で 2 回 (室温、5 分間)、洗浄液 2<sup>\*\*\*</sup>で 2 回 (65°C、30 分間)、洗浄液 3<sup>\*\*\*\*</sup>で 2 回 (室温、30 分間) メンブレンを洗浄した。メンブレンを乾燥後、オー

トラジオグラフィーを行った。

*ハイブリダイゼーション溶液	50%	ホルムアミド	
	10%	デキストランサルフェート	
	1%	SDS	
	0.2%	ウシ血清アルブミン	
	0.2%	ポリビニールピロリドン (30K)	
	0.2%	フィコール	
	50 mM	Tris-HCl (pH7.5)	
	100 μg/ml	変性サケ精巢DNA	
	**洗浄液 1	60 mM	Tris-HCl (pH8.0)
		2 mM	EDTA
300 mM		NaCl	
***洗浄液 2	洗浄液 1 に SDS を 1% になるよう加えたもの		
****洗浄液 3	6 mM	Tris-HCl (pH8.0)	
	0.2 mM	EDTA	
	30 mM	NaCl	

#### 1-2-2 結果

図3はクローン化されたB1の配列をプローブとした、A-58 CMS及びA-58のミトコンドリアDNAに対するサザンハイブリダイゼーションの結果である。プローブは、B1そのものである閉環状のプラスミド様DNAにハイブリダイズしており、さらに高分子側に数本のシグナルが検出された。これらのシグナルは、図1におけるプラスミド様DNAと主ゲノムDNAの間に存在する薄いバンドに対応するものと考えられ、B1が2つ、3つとつながった多量体に起因することが、以下に示す観察から明らかになった。

- (1) 非切断及びB1を切断しない *Hin*dIII 切断を行った場合で、ハイブリダイゼーションのパターンが同一である(図3、レーン1、3)。
- (2) B1を切断する *Eco*RI、*Xho*I、*Hae*III で処理を行うと、非切断のレーンで見られたシグナルがすべて消失し、B1の制限酵素地図より予測されるシグナルが

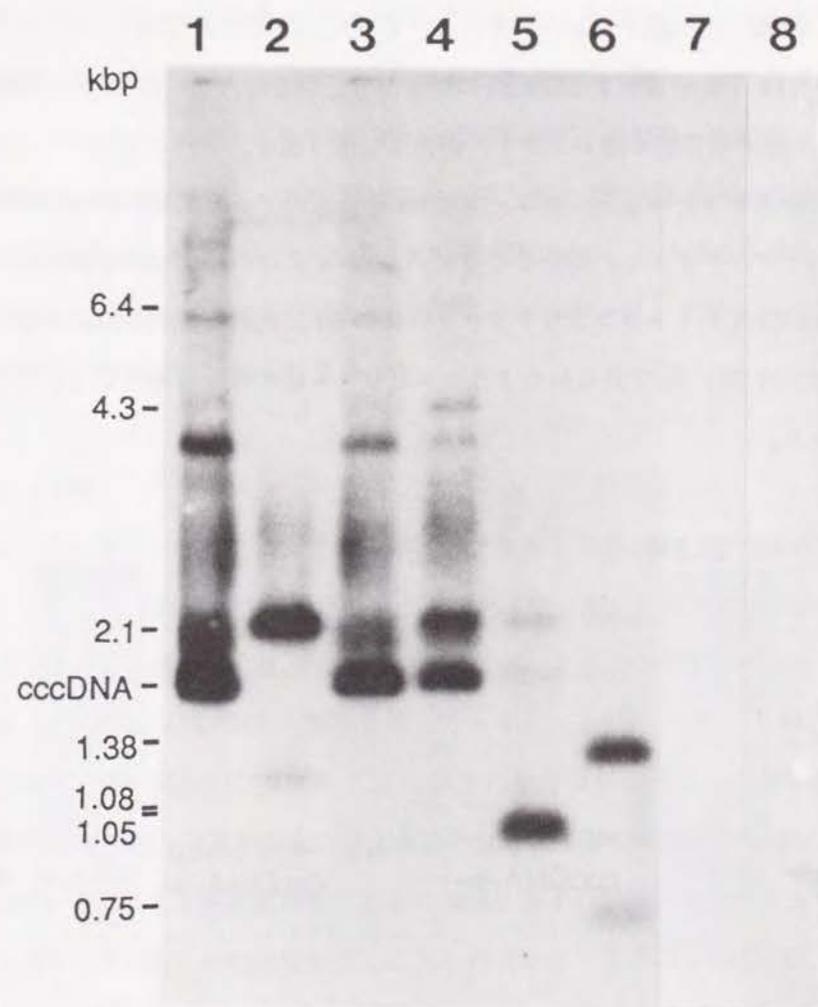


図3 B1をプローブとしたミトコンドリアDNAに対するサザンハイブリダイゼーション A-58 CMS (レーン1~6) 及びA-58 (レーン7,8) のミトコンドリアDNAをそのまま (レーン1,7) あるいは *Eco*RI (レーン2,8)、*Hin*dIII (レーン3)、*Hin*cII (レーン4)、*Xho*I (レーン5)、*Hae*III (レーン6) で切断し泳動した。但し *Hin*cII については部分分解を行った。

出現した(図3、レーン2、5、6、)。

(3) B1を1箇所切断する *HincII* により部分分解を行うと、B1のサイズである 2.1 kbp の整数倍に薄いシグナルが出現した(図3、レーン4)。

以上の結果をまとめると、プローブは B1 そのものである閉環状 DNA とその多量体  
にのみハイブリダイズし、高分子の主ゲノム DNA にはハイブリダイズしなかった。  
即ち A-58 CMS のミトコンドリア主ゲノムには B1 に相同な配列が存在せず、B1 にト  
ウモロコシの S1、S2 で見られたようなエピソーム様の性格は考えにくいことが明ら  
かになった。

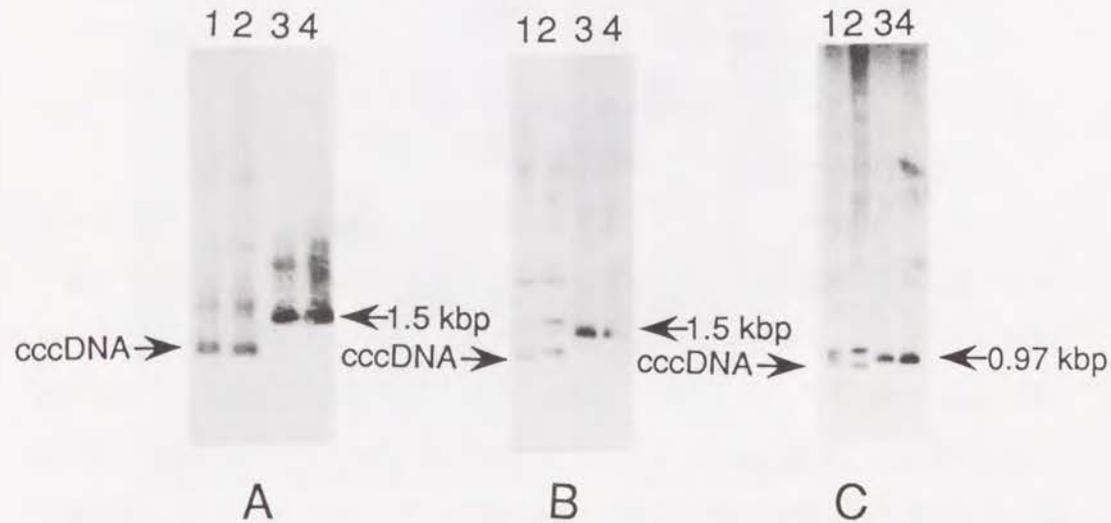


図4 B2~B4をプローブとしたミトコンドリア DNA に対するサザンハイブリダイゼーション A) B2をプローブとした A-58 CMS ミトコンドリア DNA に対するサザンハイブリダイゼーション 制限酵素未処理(レーン1)及び *EcoRI* (レーン2)、*BglII* (レーン3)、*EcoRV* (レーン4)で切断したミトコンドリア DNA を泳動した。 B) B3をプローブとした A-58 CMS ミトコンドリア DNA に対するサザンハイブリダイゼーション 各レーンは A) と同じ処理を行っている。 C) B4をプローブとした A-58 CMS ミトコンドリア DNA に対するサザンハイブリダイゼーション 制限酵素未処理(レーン1)及び *EcoRI* (レーン2)、*StuI* (レーン3)、*XhoI* (レーン4)で切断したミトコンドリア DNA を泳動した。

一方、プラスミド様 DNA の存在しない日本稲 A-58 のミトコンドリア DNA を用いて同様な解析を行ったところ、シグナルは検出されなかった(図3、レーン7,8)。このことから A-58 のミトコンドリアは、B1 の配列を欠くことが明らかになった。

同様な結果が、B2(図4 A)、B3(図4 B)、B4(図4 C)でも得られており、B1で見られた特徴は、イネのすべての環状プラスミド様 DNA についてあてはまることが明らかになった。またプラスミド様 DNA 間でのホモロジーは、サザンハイブリダイゼーションのレベルでは検出されなかった。

### 1-2-3 考察

A-58 CMS のミトコンドリアに存在する環状のプラスミド様 DNA B1~B4 は、ミトコンドリア主ゲノムとの相同性を欠くことが明らかになった。このことは、トウモロコシの線状プラスミド様 DNA S1、S2 が主ゲノム DNA と相同性を有するという事実と反するが、プラスミド様 DNA 一般を見渡してみると、主ゲノム DNA と相同性を持つ例は稀であり、特に環状のプラスミド様 DNA での報告はない。S1、S2 が細胞質雄性不稔の発現と何らかの関連があるのではないかと考えられていたため、環状のプラスミド様 DNA においても細胞質雄性不稔との関連に多くの議論がなされてきた。しかしながら主ゲノム DNA と相同性を欠くこれらのプラスミド様 DNA が、S1、S2 で見られたようなエピソーム様の挙動をとることにより、雄性不稔の発現又はその回復に関与しているというモデルは考えにくいものであろう。

B1~B4 はミトコンドリア主ゲノムとホモロジーを欠いたため、それがミトコンドリア主ゲノムから切り出されたものである可能性は否定された。このことは、B1~B4 がミトコンドリア内で自己複製していることを示唆している。実際、ソラマメの環状プラスミド様 DNA で複製中間体と思われる分子が電子顕微鏡による観察でつかまっております<sup>76)</sup>、イネのプラスミド様 DNA でも同様な写真がとられている<sup>77)</sup>。またトウモロコシの培養細胞を用いたパルスラベルの実験によって、1.9 kbp の環状プラスミド様

DNA が、葉緑体 DNA とともにミトコンドリア主ゲノム DNA、核 DNA に先んじて複製が行われるという興味深い結果が得られている<sup>78)</sup>。

日本稲 A-58 のミトコンドリア DNA を用いたサザンハイブリダイゼーションの結果から、A-58 のミトコンドリアは、B1~B4 の配列を全く欠くことが明らかになった。この事実は、イネではプラスミド様 DNA の配列がミトコンドリアの正常な機能発現に必須ではないのか、あるいは B1~B4 の有している機能が別のゲノムによって補われていることを示唆している。トウモロコシの 2.3 kbp のプラスミド様 DNA は、唯一ミトコンドリアの機能にとって必須な遺伝子をコードしていることが明らかになっているが、このプラスミド様 DNA は、すべてのトウモロコシのミトコンドリアに存在していることが明らかになっている<sup>39)</sup>。B1~B4 が何らかの機能を持つかどうかという議論は別にして、多くのイネがこれらのプラスミド様 DNA の一部あるいはすべてを欠くことは事実である。

### 第3節 B1~B4 の一次構造の決定

未知の DNA の機能を推測するには、その一次構造を決定し、既知のものと比較するというのが有力な手段である。高等植物のプラスミド様 DNA で、一次構造の決定されたものはそれほど多くない。線状のプラスミド様 DNA では、トウモロコシの S1、S2<sup>32) 33)</sup> 及び 2.3 kbp のプラスミド様 DNA<sup>40)</sup> の一次構造が決定されており、線状のプラスミド様 DNA の起源、機能を考えるうえで、重要な情報が得られている。環状のプラスミド様 DNA においても、トウモロコシ<sup>52) 53)</sup>、テンサイ<sup>60) 61)</sup>、ソラマメ<sup>63)</sup>、ヒマワリ<sup>65) 66) 67)</sup> 等の植物を材料にプラスミド様 DNA の一次構造の決定が行われているが、得られた結果に対する判断は、線状のプラスミド様 DNA の場合ほど単純ではない。つまり配列としても、構造的にもプラスミド様 DNA 間で若干の類似性がある

ものの、既知の DNA 配列との明確な関連が得られていないのである。

本研究では、イネの 4 つのプラスミド様 DNA B1~B4 を材料に一次構造の決定を行い、これらのプラスミド様 DNA が、トウモロコシの 2 つの環状プラスミド様 DNA と多数の相同配列を持つことを明らかにした。その結果から、単子葉植物における環状プラスミド様 DNA の進化についてモデルを示し、環状のプラスミド様 DNA 一般について、その起源、機能を考察した。

#### 1-3-1 方法

B1~B4 配列の M13 へのサブクローニング pRmB1 を *Eco*RI で切断し、電気泳動で分離後、B1 の配列をアガロースゲルから回収した。このインサートを *Alu*I、*Hae*III、*Hinc*II、*Hpa*II、*Rsa*I、*Sau*3AI、*Taq*I、*Xho*I で切断し、適当な制限酵素により切断した M13 mp18 又は mp19 にサブクローニングを行った。pRmB4 は *Eco*RI + *Hinc*III で切断し、B4 の配列を回収した。インサートを *Alu*I、*Hae*III、*Hinc*II、*Rsa*I、*Sau*3AI、*Taq*I、*Xho*I で切断し、適当な制限酵素で切断した M13 mp18 又は mp19 にサブクローニングを行った。pRmB2 及び pRmB3 は、*Eco*RI + *Hinc*III で切断し、M13 mp18 にサブクローニングを行った。クローニングの際、宿主として大腸菌 (*E. coli*) JM109 を用いた。

ディレーションクローンの作製 B2 及び B3 の一次構造の決定は Exonuclease III を用いたディレーションの系<sup>79)</sup> を使って行った。B2 及び B3 の配列がクローン化された M13 mp18 を B2 の場合は *Pst*I + *Xba*I、B3 の場合は *Pst*I + *Sal*I によりそれぞれ切断し、Exonuclease III により 1~10 分間ディレーションをかけた。Mung Bean Nuclease 及び Klenow Fragment により平滑化を行い、セルフライゲーションにより環状化させたファージ DNA を、*E. coli* JM109 に導入した。形成したブランクよりアルカリ法<sup>72)</sup> により RF DNA を抽出し、インサートの長さを調べて、シーケンスに適当なクロー

ンを選抜した。

**一次構造の決定** それぞれの方法により得られたファージクローンより一本鎖 DNA を抽出し<sup>80)</sup>、サンガー法<sup>81)</sup>により一次構造の決定を行った。反応には M13 シークエンスキット (宝酒造) 及び [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (アマシヤム) を用いた。泳動は 42% 尿素を含む 6% アクリルアミドゲル (40×20×0.04cm) で、TBE バッファーを用いて行った。

### 1-3-2 B1 の一次構造

B1 は 2,135 bp より成り、その GC 含量は 44.2% で、高等植物のミトコンドリアゲノムの平均 (46~48%)<sup>82)</sup> よりやや低いことが明らかになった (図 5)。また反復配列などの特徴的な構造は存在しなかった。

B1 の配列を GenBank のシークエンスライブラリーとホモロジー検索を行ったところ、トウモロコシのミトコンドリアに存在する 1.9 kbp の環状プラスミド様 DNA<sup>52)</sup> と相同性を持つことが明らかになった。相同性を持つ領域は 4 箇所 (a、b、c、e) で、a、b、c の 3 領域では相同配列に非相同配列が介在していた。領域 a では、2 つの相同配列 (a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>) に 19 塩基からなる配列が介在しているが、トウモロコシでは TCTTT の 5 塩基が介在していた。領域 b 及び c はそれぞれ 3 つの相同配列と 2 つの介在する非相同配列から成っており、領域 c の介在配列はそれぞれ 67、80 塩基と長かった。また相同配列 e は、比較的相同性が低かった。各相同領域の相対的な位置関係は極めてよく保存されており、イネとトウモロコシのプラスミド様 DNA が密接に関連しているものであることが明らかになった (図 6)。また配列 f は、トウモロコシの別の環状プラスミド様 DNA である 1.4 kbp DNA<sup>53)</sup> と弱い相同性を示した配列である。

B1 にタンパクをコードする遺伝子が存在する可能性があるかどうか、ORF (open reading frame) の解析を行った。6 つのすべてのフレームに多くの終止コドンが出現し、長い ORF を見いだすことはできなかった。最も長い ORF は、相同領域 c 近傍に存在

```
TTCAGGATTGGCTAAGGCTCTAGCCATTAATGTGACTGGGGTTGATCCAAGGGCTGGTCTCATGGTTTT 70
GACTAGGTGTTTTCTCAATTTCTGATCATATTTCTGTCTGTTATAACCCCCAAAATACGCTAACTCGCAG 140
CTCGAAGTTCCCAGTTACATGGGCAACCCCTACTACTATACATAGGGTGTGAAGAGACGGACAACAATAG 210
TCTTTCTCTGCTTTCACTCGAGCCAACTAAGTGTCTTTCTAGGATTGGCCCCAAAGCCATACTATGGTCA 280
CAACGGTAACCCCTCGATTTAGTTTATCCAATCAATCGAGAGGCAGCATCTCTATCAATTACTCGGATC 350
GGCAACCTCGGTCTGGAATGTGGACTTCACTGACCAGCCGCCTCTTAGTCCACACCCAACTTGAAGTG 420
a1 TTATTGATTCGTTAGTAACCTTCGCCATCCTAATACCCGAGACTGTAGTGTCTAAGTTGGTTAAAGCCC 490
a2 TCGTCTCCTGGGATGCCCGGCTGGTCGGGCAAGTATTAGTAAAACGGCTCCGCGCAATCAATAACTACCC 560
TGCTTAGGTATGAGCTTCCAAGTCCGAATCCTTTTGTCTCAAGTCTGCCTTGGTAATGTGACCACACAT 630
CCTTTGATGATGGAAGTGTGTTTCCCAACAATCCACCCCGAATCCTAGTTGGAGTAATGTATCCCTAC 700
ATACTATCGCGTAATGTAATCGGGTTCAGATCATACTCAATGAGGGTGGCTAGTATCCCGAAACTT 770
TGAAGAACATGAGTTAAGTAGTTCATTCCCTGGTTTCGCCACCAGTCAAAACGCCCTAAAACCCAGTA 840
e GTTTTCTCGATCACCATTCTACGATTTTATTTCCACCTGTTTTAGAACACATAAATTGTGCTACCCCTAA 910
GAGTTTATCACTAAAATCAAGAATTTATTTATGACCTGTAAGTTGCCCTATAAAAAGTAGATGTTAGTA 980
f CCCGACTAAAAGGAGGGAATCAAAATAAAGGTAAGCTCTCAATTAATAAATAAAGCTATCGTTACTTT 1050
GTTAAGGTATATTGCCCGTAGCGAGGTTAAGGTAACCCCTTGACCGAGTGAAGGCGAGCCCGGTAAGC 1120
ACTAAGTGTATTGGCTAGCTTGTACTTTATTAGCTATCAAGTGTGTTGATGTACCAATTACTTTATTGTGT 1190
CAACTAGTTTATTGAATGCAAAGGTAATCCCTCGATAATTGATTAATTATCAAGAAAGAGAATTAGTT 1260
b1 ACCCTCCTTCCCTCGAGCTGAGCTATTTCTGTGATTCAATCGTATGCACGAGGGCTGCTCTCTCTCT 1330
b2 GCTCTATCTCCCGACAGGATGAAAGTCTGTAATCTTTGGGTTTTGTAGTCAATGGAATGAGCGGAGG 1400
b3 GAGACACATCCTCCATCAAAGGTGTGTGTGCCGTAGCGAGTGAATGGCTGGTTCGGTCTAGTCGT 1470
ATAGAACGGGTTGAGTTCTTTTTACTGAGTCTTTCCGAGGCTGGAAGTGTTCCTTACAGTTTCTTTTCC 1540
GAAGGAAAAGTCAAGTACTATAAACTAGTACTAAGTCCAAGAAGAAGGGTGAAGGAGGAGGGGAT 1610
TAGCCCGATCCACTTGAGGGGAGGAAGGCCCTTCCCTCCCTACTAATAGTACCAATTCATAATTCCTATTC 1680
GTAATAAATTCATATTTTGGAAAAATATGAAAATAATTATCTTTATTCTAGTTCCTTAAAACCCCTT 1750
c1 TCCGTGCCACTCCTTTCTGTTCCACTCATCAACATTGTTGGATGCCAAAGACTTTGACGAAGACTTTCCG 1820
TACCTGTATTTCTGTCCGGTATGACGTCCGTTTCTGTGCGGCATAGCGTGCCCGAGTGGCCACAGTTGCT 1890
c2 AGGCTGTTGAGAGTCTCTCCGACCCCGCTAGGCATCTCCCGCTAATGCCACGGGCTGCTTCAAGAAA 1960
CGGGTGTGTTGGTTCCAATCATTCTTGGTTTGGTTCTCGGCACCAAGCCAATCCCATTCTTTCCGCT 2030
c3 GCTGACCCCTTCTTCTTCCCTACCTTTTAAACCCCTGAGTACCCCAAGTCAAGTACAAGGCATACG 2100
TGCTCCTTAATATGCTTGCTCCTCTTTTCTTGA 2135
```

図 5 B1 の一次構造 下線を引いた配列 (a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub>, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub>, e) はトウモロコシの 1.9 kbp DNA との相同配列である。その内 b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>3</sub>, e (■) は B3 にも保存されている。波線を引いた配列 (f) はトウモロコシ 1.4 kbp DNA との相同配列。

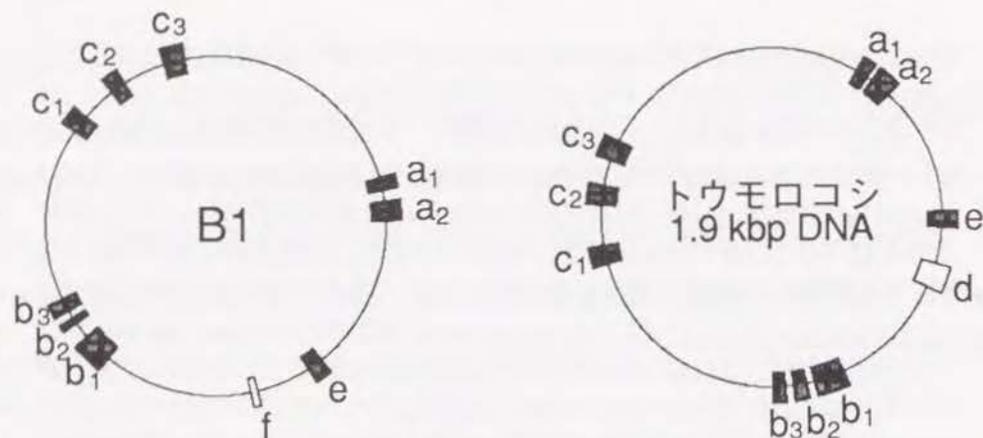


図6 B1 とトウモロコシ 1.9 kbp DNA の間の相同配列 あみかけされたボックスは相同配列の位置を示す。ボックスのラベルは図5のものに対応する。

するオーバーラップする2つのORF (1,793→2,035、2,014→1,732、図5)である。塩基配列より推定されるアミノ酸配列をNBRF (National Medical Research Fundation) のシークエンسライブラリーとホモロジー検索を行ったが、いかなる配列とも類似していなかった。

### 1-3-3 B2の一次構造

B2は1,546 bpより成り、そのGC含量は42.8%とかなり低いことが明らかになった(図7)。またB1同様、反復配列等の特徴的な構造は見られなかった。

B2の配列をGenBankのシークエンスライブラリーとホモロジー検索を行ったところ、トウモロコシのミトコンドリアに存在する1.4 kbpの環状プラスミド様DNA<sup>53)</sup>と相同性を持つことが明らかになった。B2の配列中トウモロコシのプラスミド様DNAと70~80%の相同性を持つ領域が2箇所(k<sub>1</sub>、k<sub>2</sub>)、50~70%の比較的低い相同性を持つ領域が4箇所(h、i、j、l)存在した。

B1とトウモロコシ1.9 kbp DNAの場合と異なり、B2とトウモロコシ1.4 kbp DNAで

は、相同配列間に介在する非相同配列の長さにかんがりの変異が見られる(図8)。この変異を引き起こしたメカニズムの一つとして、分子内の相同組換えが考えられる。B2の配列k<sub>1</sub>及びjには短い反復配列が存在し、トウモロコシの1.4 kbp DNAでは相同組換えによって介在する配列が脱落したものと考えられる(図9)。またトウモロコシ1.4 kbp DNAでは、配列lとhの間にB2には存在しないB1と相同なf、B3と相同なg/b<sub>1</sub>、B4と相同なdの3つの配列が存在し、別の配列の挿入あるいは脱落が起こったと考えられる(図8)。

```

TCTCTATCTTGTAGTGGAGTGTAGAGTAAAGATATACCGGAGTGGAGTGCAAGAAGGTTATAGGGGAGTG 70
TGGCGCCCGCTTCCCCGCTTTCGTCTCGGTTGAAAAACAAAAGTGTGCTTGTCTTTGTTCAATTCAAGTA 140
k1 GTGCTTTAGCCCTCGAATCTATAGCGAAAGAGTTAGCTCAACCTATCTACTACTACCCCTGGAAAGGGGT 210
GTGCGTGGTATACCGGTTACGACTCCCTCGAAGTGGAGCCATTTTCATGATTTTGAATCAAAGAAAGTT 280
CCATACTTTTTTATCCCGGATGGAGCCAACGTCGCTTTCGCTTTCCGAGCACAATTTCTTCTGGAAAA 350
k2 ATATCCAGTGGCATATCCCATCTAGCTCTGGGAATCTTTCCACAACCAGCGCCTTCTTGTCCCATGAAGT 420
l TCAAGTCTCTAACCTGTTCTTCCCGGGAATGTCCTTCGCTTCGAACTCGAAGTCAGAGTTTTCCGTTAT 490
CCGATGGGGCGATTTTATGGATAGGTTCCGATGGCAGTCTCTCAAGCTAGCCTATCGACAAGATCAGGGAA 560
CAACTACTGTTGCCTCAACGGGTTTCGCTGGTCACTTTAACAGTTTTTAAAGCAGGCATTTTCGTGGTTCT 630
CGTCATATAAACAGTCACTACTGCGTATTTTCATGATTAATCTATTGCTGAAGGAACCTTTTCGTCAGT 700
h TTTCTTAAACAAAAGGTACCCGGTGTCTAGCGCATTTCTGTTAAGAGAAAGTACCCCTTGTAGGCCTTCT 770
CTATTTTGCAGGTTTGACCTAGTCCCTTTATGTTTCGTAACCTTAAATGAAAAAGGCCTGAGATGCCCTCT 840
ATCGAGCGATATAACGACGGTGTCTATTTTTAGGTACACGTGTTTTTGAAGAAAGCACTTTTAAAAAGG 910
AAAGTAGTAAATGAAAATACTCAATTAATAAATCCTAAATTATCTGTGCCATTGAATTATGAAAGTAA 980
ACACTGAAAGTTTACCACTTACAAAAGTAAATGTAAGTACTACCGACTAAAAGGAGGAAATCCAATTAGAGGT 1050
i GTAAACTCTTTTCTTTCTATCGAGTAGATTCCCTTTTATTTATAAATAGTAACTAACGAATAGATAAT 1120
TAGTATCCCTCATATAATTAGTACTAGCTGTTCTTCATTAATGGTACGTGATTTACGAGGGGCTCTGC 1190
TTCGCTCTATCCACCTCCCGGGTGTATGAAAAATCTTAAAGAAATAAATCATGCGGTACTTCTTGT 1260
j TTTAATCACTCTTCTTTCTCCCGGAACTGGGGAAGAACCCCTTCTGAAAAGGAATGGAGGTCTATCTTT 1330
ACTCGAGTGCACGAGAGATAGAGATCGAAGACCGCTGTGCTTGGGGACGAGGGACTCACTCAACCT 1400
CAAAGTTGAGGGAATCCCGAAGCCTCGGAATCTAGCGTTAGCGTAAGCCGAGGTACCAGAGGATAGCCT 1470
TTAGGATATCCGTCGGTAGGAGATATGAGTCGTTAGAGCAGATATCTCCGTGATCCCTTCCACAGCTAAA 1540
CGTAGA 1546

```

図7 B2の一次構造 下線を引いた配列はトウモロコシ1.4 kbp DNAとの相同配列を示す。k<sub>1</sub>、k<sub>2</sub>はh、i、j、lより高い相同性を示した。あみかけした配列はk<sub>1</sub>及びjに存在した短い反復配列を表す。

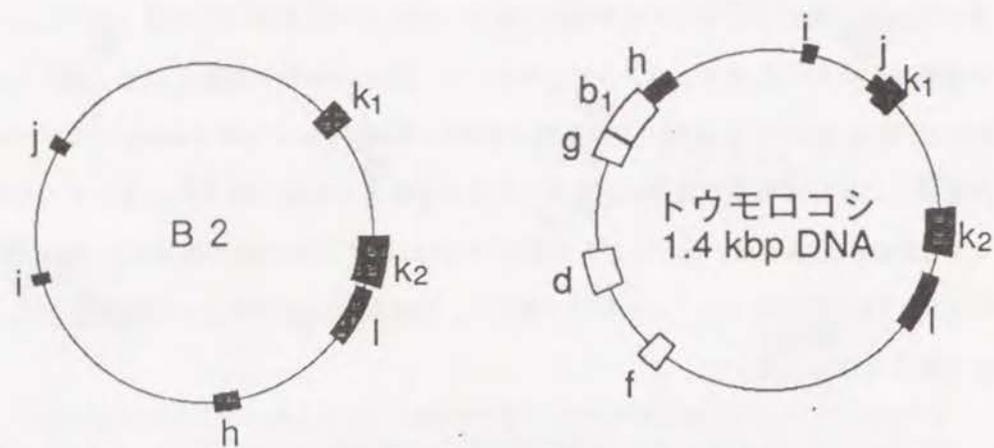


図8 B2とトウモロコシ1.4 kbp DNAの間の相同配列 あみかけされたボックスは相同配列の位置を示す。ボックスのラベルは図7のものに対応する。

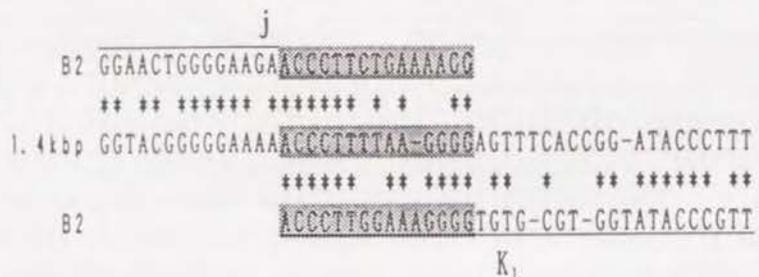


図9 反復配列を介した分子内相同組換え トウモロコシ1.4 kbp DNAでは配列j及びk<sub>1</sub>に存在する短い反復配列(あみかけした配列)を介した分子内相同組換えにより、介在する配列が脱落したものと考えられる。

#### 1-3-4 B3の一次構造

B3は1,514 bpより成り、GC含量は42%で、イネのプラスミド様DNAの中で一番低いことが明らかになった(図10)。またB3には、他のプラスミド様DNAでは見られなかった逆位反復配列が存在した。この反復配列は非相同な配列によりそれぞれ4つに分断されており特徴的である。

サザンハイブリダイゼーションでは、イネのプラスミド様DNA間には相同性が検出されなかったが、一次構造の比較からB3はB1とトウモロコシ1.9 kbp DNA間の相同配列のうちb<sub>1</sub>、c<sub>2</sub>、c<sub>3</sub>、eの4つの配列を有することが明らかになった(図11)。このことからB3はB1及びトウモロコシ1.9 kbp DNAと同一のグループに属すると考えられる。しかし配列b<sub>1</sub>の上流に着目すると、B3の配列は、B1やトウモロコシ1.9 kbp

TCTGGTACAGTCTCAAGTAGTATCTGCCATAGACTTTTGATATCATCATCAAAGCAATTAAGATCAATC	70
AACTGGATTACCCTCGAGAAAAAAGCTATACGAGGAAAGAACAGTTTACTGATGGGTTGTTCCCTTG	140
AACTGGGCTGAGGGTTGAATTCAGGGTGTGAAAAGTGGTTTTCTAGAAAAGTCTTCCCTAGGAAC	210
C <sub>3</sub> TCTAAAAAGTATTAATGATCCATAGGTTAGAGTTAAAAAGGCAGGCAACAAGAAGGCGGTCACCGGTTGT	280
TGGAATAGAGGGTGGTCTCTCTCACGAAGACCAAGTGAATCAGGACATCTTGTGAGTACCTTGATCCA	350
C <sub>2</sub> GCAACAGCTCTGACGTAACCGGGAGGGTACGAGTCCGGGTCAGGTAAGGACAGGTTGGAATGTGAA	420
TCTTTCTTAACTGCAAGTACTGCCCTGATCAAGTTCAGGACAGAGCAGCAGCCGACCGAACCATTGT	490
CATACCGGAGGAACAAAAGGGGTTCAATTTAGGTATGAAAGGGAAGGATTAGCTTTGTTCCAGGGGAT	560
AGCATCGGAAAAGAGAAATTTAATTTTGTACTACTTTATTTAATAAAAGGAATAAGATTATTCTCTCTAA	630
AAAATTTTCTCCCTCGAAGCTAAAGACTAGATTGAAGTAGCAACATCAGAGAAAGGAGCTTTTCTTCA	700
CACGAATCCCGCGATCAACGAGTTCATCGAGTGGATGGCACCCTCGACCGGGAGATTACGGACTGATAA	770
b <sub>1</sub> TGCACTTCACTCTTATCTCCCTTCCACTTTCCGTAATAAACTTTTCCCTCCGGGAGATAAGAGTGAAGG	840
g GAGGAGCCCTCGCCCGAGGGGTCTCAATTCATGTGTATTCGTAATAAGGATTAATAAAAGAACTAT	910
GTCTAATACAGATACAGATACTGAAAAGACCCCTCTATCAAATCTATAGAGTCTTTAATAAAAGAGGCAGA	980
CTCTAATATCACAACACAATCCACCTAGCAATAGTACTTCTAATAGCACTGTACCTTTATCGAGAAAGCC	1050
TCCCTTCCCGGAGAAGGAGTCTTCCCTTCCCTTCCATTCCACAATGCAAAGTAGATTACAACCTGGAATC	1120
TACCTATTATTAGGCACTGGTACAGATCACATATAATTTTATGGATTGGACTCCTCTAATAATGCATAC	1190
e AACTAATAATAATGCGTGGAACTAATATCGTAGAATGGTATCGAGAGCACCTGCTGAGAATCTAGACTA	1260
TTCACTTTTCTGAAAACCTCTAGTCAACCCCTACTCCATAAAAAATAAGGGAATCGATTAATGTTTT	1330
CGGGACAGAGACCACCCATCAGACAGTATGTCGGGCGTATCACCCTTAACAGTTCAAAGTCCAACTA	1400
ATCGGTTTCTCTAATGACTAGATTTATCAAGAGTCTGTTCCCGGTAATACTTGGTTATAGCTAATCCGA	1470
CCCAGGAGACAATGGAAGCTGGATTCTAGCATCCTAACTAGA	1514

図10 B3の一次構造 下線を引いた配列(b<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub>, e)はB1及びトウモロコシ1.9 kbp DNAとの相同配列。配列g(■)はトウモロコシ1.4 kbp DNAとの相同配列である。二重線は逆位反復配列を示す。

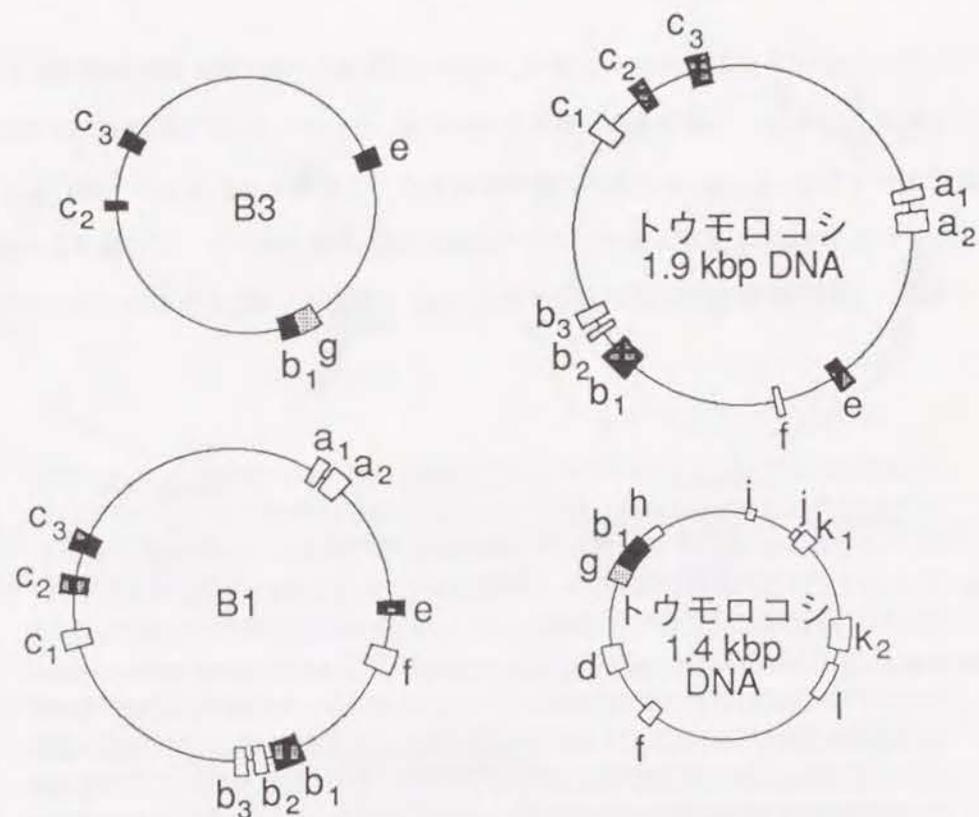


図11 B3、B1 及びトウモロコシ 1.9 kbp DNA、1.4 kbp DNA の間の相同配列  
あみかけしたボックスは各プラスミド様 DNA 間で保存されている配列の位置を示す。  
ボックスのラベルは図10のものに対応する。

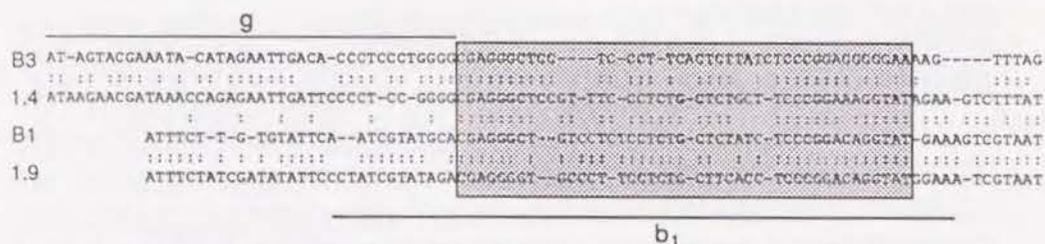


図12 プラスミド様 DNA 間の相同組換え 図11から明らかなように、B3 は B1  
及びトウモロコシ 1.9 kbp DNA と同一のグループに属すると考えられる。しかし配  
列 b<sub>1</sub> の上流に着目すると、B3 の配列は他のグループに属すると考えられるトウモ  
ロコシ 1.4 kbp DNA の配列と相同性を示した。このことから b<sub>1</sub> 内のボックスに囲ま  
れた相同配列が、プラスミド様 DNA 間の組換えに関与したことが考えられる。

DNA とではなく、B2 と密接な関連を持つと考えられるトウモロコシ 1.4 kbp DNA に  
類似していることが明らかになった (図12)。

### 1-3-5 B4 の一次構造

最小のプラスミド様 DNA である B4 は 969 bp より成り、GC 含量は 49.8% で、4 つ  
のプラスミド様 DNA の中で最も高かった (図13)。B4 には不完全ながら反復配列が  
存在し、配列内には小さな逆位反復配列を見いだすことができる。このような構造は、  
他の植物のプラスミド様 DNA でも見いだすことができるが<sup>52) 61)</sup>、イネのプラスミド  
様 DNA では B4 のみに存在した。またこれ以外の領域でも、B4 内には stem and loop  
構造をとることができるような配列が多数存在し、特徴的である。

トウモロコシの2つのプラスミド様 DNA 1.9 kbp DNA と 1.4 kbp DNA の間には b<sub>1</sub>、  
d の2つの相同配列が存在したが、そのうち d は、両プラスミド様 DNA と密接な関連  
を持つと考えられる B1、B2 には存在しなかったが、B4 に存在していた (図14)。

### 1-3-6 考察

イネの4つのプラスミド様 DNA の間には、B1 と B3 の間に短い相同配列が存在し  
ただで、広範囲にわたる相同性は見られなかった。このことからイネの場合は、テ  
ンサイ<sup>60)</sup> やソラマメ<sup>63)</sup> の環状プラスミド様 DNA の場合のように、単純な相同組換え  
によってプラスミド様 DNA の種類が増えてきたわけではないことが明らかになった。

B1 と B3 を除いて一見無関係に思える B1~B4 が、トウモロコシの2つのプラスミ  
ド様 DNA との比較により、密接に関連したものであることが明らかになった。B1 は  
トウモロコシの 1.9 kbp DNA と多数の相同配列を有し、共通の祖先を持つものと考え  
られる。同じ関係が、B2 とトウモロコシの 1.4 kbp DNA の間に存在するが、こちら  
の場合の方が相同組換え等により変異が見られる。B3 は、B1 とトウモロコシ 1.9 kbp

CCTTCTCGGCCTTTTTTCTCAATACACGTATCCCGTACAGGTGACACCGGTGTAACACCGCTAACTCT 70  
 TCCTAACAAACGGGACTAGCCTCCTTACAACAAGAACCTCCGCAGTTTCTTTACTCCGATAAGTACTCCC 140  
 TTCCCAAGGAAGTACTTATCTCACTTCCACGAAAACATTCAACATTAGTTTTCTTTGCTCCGAGGAATC 210  
 CTACCTTCCCAAAGGTAGAATCCCTCTCACTTTAAAACACTAGGGTTTTGGTACTAAAAAACGACTG 280  
 GTTCCGGGCTCGCCTCTTCGAGGGGCTCCGCCTCGTGGACAACTCGCTCCGGGTCTTACCCACCTCG 350  
**d**AGTCCAATCTCGGGTGGCGGCTTAGGCAATACCCTATTCACTAGACCCGAATCCATAAATGCATAACTGAT 420  
 GGCAGCTTCGATAACTGTCATTGGCATAACCGCATACTATACGTCCAGTCAAGGTTCCGGATCGAGGGAA 490  
 AGACACATGTGCATGACATGACAAAACGTGATATTTCACTGTGTTTCACTAGTAACTCGTTCCCTCACTACAAA 560  
 GAAACCTTCATCTAGTTGACTTGAACCCGATTCAACTCAACTCGATTTCCGGTTTTGAATAAATCACTG 630  
 ATGGACGGAAGGGAGCGGGGCTGCTCCCTTCTATGAAAGACCCGAGCTTACTGGGATGATACCCCTT 700  
 GAGGGGGGATCATTCAAGTAAGGGAGGGAATACACGCGCACACGCATCCGCGTGTGCGCTCGCGCGTAA 770  
 TAGAACCGCTGCCATGCCGCGACCAATAGATCACGTGCCATACGCATGCCACATCACCCGCGCGTGC 840  
 ACGTGCCTGACGCGGAGGGACAATACTAGTTATGCTTACAGAAATGCGATATTTCCGATTTCAAATC 910  
 GGTTAGGTGTCAAAGTACCTAAACCTCACTAAACCTATGCTATAGCTTCGAAAAACAGG 969

図13 B4の一次構造 配列d (黒いボックス) はトウモロコシ 1.9 kbp 及び 1.4 kbp DNA との相同配列。下線を引いた配列は不完全ながら反復配列を示す。各反復単位内には小さな逆位反復配列が存在する。

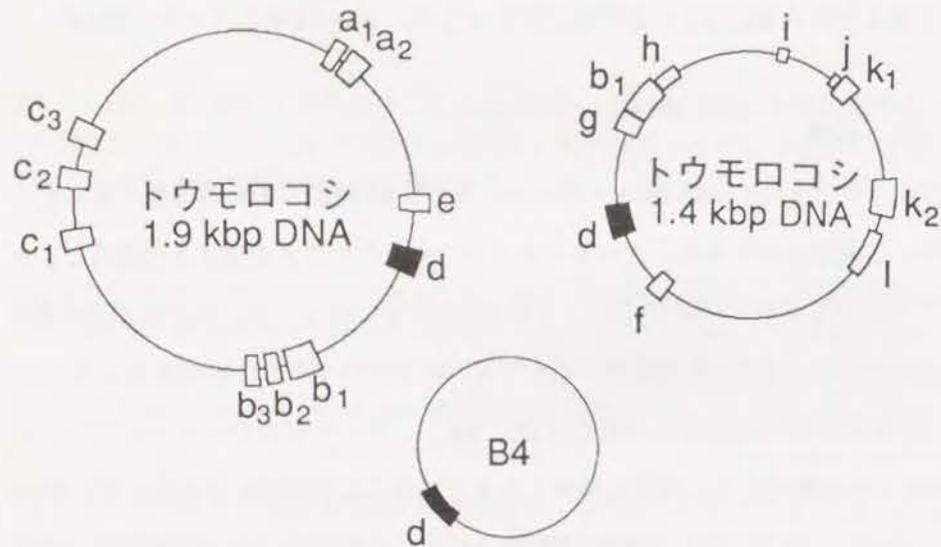


図14 B4及びトウモロコシ 1.9 kbp DNA、1.4 kbp DNA 間の相同配列 黒のボックスは3つのプラスミド様DNA間で保存されている配列d (図13)を示す。

DNAの相同配列のうち一部を有するため、同一のグループに属すると考えられるが、さらにトウモロコシ 1.4 kbp DNA との相同配列も有しており、プラスミド様DNAの進化の早い時期に、プラスミド様DNA間の組換えによって生じた可能性が高い。最後にB4は、トウモロコシの2つのDNAの間の相同配列を有していた。

以上の結果から、イネとトウモロコシにおけるプラスミド様DNAの関係をまとめたものが図15である。トウモロコシにおいては、プラスミド様DNAの祖先と考えられるものから、1.9 kbp と 1.4 kbp の2つのプラスミド様DNAに配列が別れて進化したと考えられる。一方、イネでは類似した経路でB1とB2に配列が別れ、さらに配列dをB4が分担した。またイネの進化の過程で、プラスミド様DNA間の組換えによりB3が生じたものと考えられる。

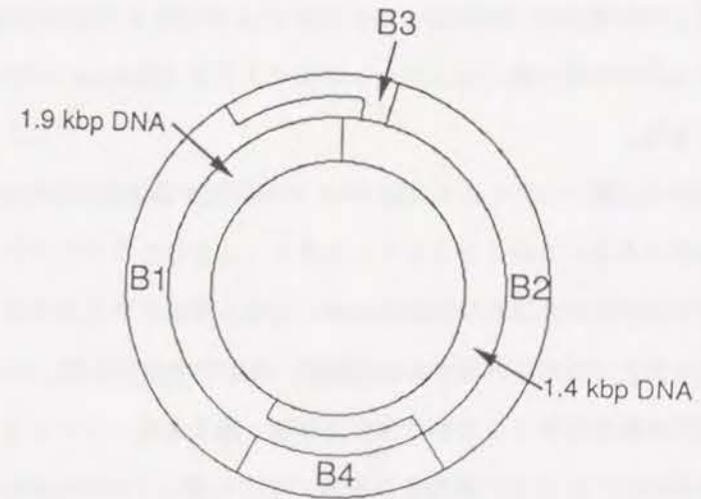


図15 イネとトウモロコシのプラスミド様DNAの一次構造の比較から判断される関係 内側の輪はトウモロコシのプラスミド様DNA、外側の輪はイネのプラスミド様DNAの配列を表している。トウモロコシでは2つのプラスミド様DNAに別れて分れて存在している配列が、イネでは4つのプラスミド様DNAに分れて存在している。

同じ単子葉植物のプラスミド様 DNA では、ソルガムの環状プラスミド様 DNA がトウモロコシの1.9 kbp DNA と弱い相同性を持つことが、サザンハイブリダイゼーションにより示されている<sup>54)</sup>。しかし単子葉植物のプラスミド様 DNA が双子葉植物のものと同様性を持つ例はない。B1~B4 は単子葉植物に存在するプラスミド様 DNA のグループに属すると考えられる。

環状のプラスミド様 DNA では、ゲノム内に反復配列が存在し、さらに反復配列内に逆位反復配列が存在する例が報告されている<sup>52) 61)</sup>。類似した構造が、イネでは B4 に存在していた。これらの配列がいかなる意味を持つのか明らかではないが、B1、B2、B3 はこのような配列を欠くため、プラスミド様 DNA にとって必須なものではないようである。また B3 には逆位反復配列が存在しており、各反復単位は4つの保存配列とそれに介在する3つの非保存配列から構成されていた。このような構造は、他の環状プラスミド様 DNA では見ることはできない。環状のプラスミド様 DNA で見られたこのような構造上の特徴には、線状プラスミド様 DNA の逆位反復配列のような一般性を見いだすことができず、構造的な面から環状プラスミド様 DNA の起源を議論することは困難である。

異なる植物種間で、環状のプラスミド様 DNA の相同性が塩基配列レベルで比較されたのは初めての例である。このことにより、イネとトウモロコシでプラスミド様 DNA の進化が推測されたが、それ以外にもいくつかの点で、環状プラスミド様 DNA の性質が明らかになった。プラスミド様 DNA の起源、機能を推測する際、ゲノム上にコードされる遺伝子の働きを知ることが、有力な情報と成りえる。トウモロコシの線状プラスミド様 DNA S1、S2 に自己複製及び転写に関する遺伝子がそれぞれコードされていたことから、ゲノムの構造上の特徴と合わせて、線状のプラスミド様 DNA がウイルスに由来する可能性が議論されている<sup>35) 36)</sup>。しかしながら、イネのプラスミド様 DNA も含めて環状のプラスミド様 DNA で、それらに対応するような長い ORF の存在は報告されていない。また一次構造の決定された環状プラスミド様 DNA において

短い ORF の存在が指摘されているが、それらが実際意味を持つ可能性が低いことが、イネとトウモロコシのプラスミド様 DNA の配列の比較から示唆された。B1では相同配列 c を含む領域に、オーバーラップする2つの短い ORF を見いだすことができる。しかしながら、B1と相同性を有するトウモロコシの1.9 kbp DNA では、塩基配列としては保存されているものの、塩基の脱落により ORF としては保存されていない。一方、トウモロコシ1.9 kbp DNA でも短い ORF の存在が報告されており、その3'側は相同配列 b を含む<sup>52)</sup>。しかしながらイネの B1 では、対応する領域に ORF を見いだすことはできない。もしこれらの ORF が実際意味を持つものであるとすると、生物種を越えて保存されているはずである。B2、B3、B4 においても、同様に長い ORF を見いだすことができず、少なくともイネとトウモロコシのプラスミド様 DNA では、タンパクをコードする遺伝子の存在は考えにくい。またその他の双子葉植物のプラスミド様 DNA においても、DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼをコードすることが可能な長い ORF は少なくとも存在しておらず、その意味で環状のプラスミド様 DNA は、線状のプラスミド様 DNA と比べてメインゲノムからの独立性が希薄であると考えられることができる。

一次構造の解析からは、イネのプラスミド様 DNA の機能を推測することが可能となるような情報は得られなかった。イネとトウモロコシのプラスミド様 DNA において、保存されている配列の相同性は高く、非相同領域では配列の類似性が見られないことから、これらの相同配列が何らかの機能を持つために選択的に保存されてきたことが考えられる。しかしながら、多くのイネやトウモロコシがこれらのプラスミド様 DNA を欠くことは事実であり、その機能はミトコンドリアにとって必須なものではない可能性が高い。

日本稲は一般に、ミトコンドリアに B1~B4 の配列を欠くが、細胞融合によってそのミトコンドリアに、プラスミド様 DNA を導入することが可能である。日本稲フジミノリと A-58 CMS を材料に非対称融合を行ったところ、核ゲノムはフジミノリに由

来し、ミトコンドリアゲノムは両者の複雑な混合型となりB1~B4を含む融合産物が得られている<sup>83)</sup>。しかしながら、その再生個体は日本稲に酷似し、B1~B4が再生個体の表現型に与えた影響は不明である<sup>84) 85)</sup>。

## 第2章 転写産物の解析

DNAにコードされる配列の最も基本的な機能は、RNAに転写される際の鋳型としての働きであろう。転写されたRNAはタンパクに翻訳されるか、あるいはそのままRNAとして機能する。高等植物のミトコンドリアに存在するプラスミド様DNAの機能を考える上で、それらに転写産物が存在するかどうかは興味深い問題である。

トウモロコシS型細胞質雄性不稔株のミトコンドリアに存在する線状プラスミド様DNA S1、S2には転写産物が存在し、そのゲノム上にコードされているORFは、タンパクに翻訳されていると考えられている<sup>86)</sup>。一方、前章で述べたように、環状のプラスミド様DNAでは、S1、S2に見られるような長いORFは存在しない。しかしながら、テンサイ、ソラマメ、トウモロコシ等の環状プラスミド様DNAで、転写産物が存在することが報告されている<sup>53) 60) 61) 63)</sup>。

本章では、イネの環状プラスミド様DNAを材料に、転写産物の解析を行った。さらにB1、B3に関して転写領域の解析を行い、相同性を有するトウモロコシのプラスミド様DNAの転写産物との比較を行った。

### 第1節 B1 転写産物の解析

本節では、最もサイズの大きいプラスミド様DNAであるB1を材料に、転写産物の解析を行った。B1はトウモロコシのミトコンドリアに存在する1.9 kbpの環状プラスミド様DNAと密接に関連していることが、一次構造の解析から明らかになっている。そこで、B1の転写産物とトウモロコシのプラスミド様DNAで報告されている転写産物について比較を行い、一次構造の類似性が、転写産物として意味を持つ可能性があ

るかどうか検討を行った。

### 2-1-1 実験方法

ミトコンドリア RNA の抽出 第1章のミトコンドリア DNA の抽出方法に従い、ミトコンドリアを単離した。但し、DNase 処理とそれに伴う洗浄操作は省略した。単離されたミトコンドリアを Lysis バッファーに溶解し、0.012% の proteinase K で 65°C、15分間、さらに 37°C で 2 時間の処理を行った。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) 処理を 2 回行い、エタノール沈殿で核酸を回収した。

得られた核酸を少量の TE バッファーに溶解し、1ml の核酸溶液に対して 1g の割合で CsCl を加えた。この溶液を 1.7 M の CsCl 溶液に上層し、Beckman SW55 ローターで 32,000 rpm、16時間、20°C の遠心を行った。mtRNA は沈殿として回収され、TE バッファーに溶解後、エタノール沈殿により混入する CsCl を除去した。

ノーザンハイブリダイゼーション 10 $\mu$ g の mtRNA に 2.7 $\mu$ l の 6M glyoxal、8 $\mu$ l の DMSO、1.6 $\mu$ l の 0.1M リン酸バッファー (pH7.0) を加え、H<sub>2</sub>O により 16 $\mu$ l に容量を合わせた。サンプルを 50°C で 1 時間インキュベートし、電気泳動の試料とした。また RNase による分解を確認する目的で、mtRNA を 100 $\mu$ g/ml の RNaseA (シグマ) で 37°C、2 時間の処理を行い、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) 処理を 2 回行った後、glyoxal 処理を行い、同時に泳動した。またマーカーとして、*E. coli* 由来の 16S 及び 23S の rRNA を用いた。

電気泳動は 0.01M のリン酸バッファー (pH7.0) を用い、50V で 5 時間行った。泳動後、マーカー及び mtRNA サンプルを含むレーンの一部を切り出し、50mM NaOH で 20 分間、200mM CH<sub>3</sub>COONa (pH 4) で 10 分間、100mM Tris-HCl (pH7.5) で 30 分間処理を行い glyoxal を除いた後、エチジウムブロマイドで染色した。

トランスファー及びハイブリダイゼーションは、第1章のサザンハイブリダイゼーションの方法と同様に行った。但しトランスファーの際、20 $\times$ SSC を使用した。

転写領域の決定 図16 B に示すように、B1 の配列を *Eco*RI、*Hinc*II 及び *Sca*I により p11、p12、p13 に 3 分割し、それぞれをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。

一本鎖特異的プローブによるノーザンハイブリダイゼーション 転写の方向を決定する目的で、*Eco*RI で切断した B1 を M13mp18 にクローン化した。得られたクローンの中から、B1 をそれぞれ異なる方向にクローン化したものを選び出し、一本鎖のファージ DNA を抽出した。この DNA をそれぞれランダムプライミング法<sup>74)</sup> の鋳型として用いて、一本鎖特異的プローブを作製した (図 16B、R、L)。

### 2-1-2 結果

図16 は、B1 の転写産物の解析結果をまとめたものである。mtRNA は、CsCl 遠心により精製を行っているが、プラスミド様 DNA の混入を完全に防ぐことには成功していない。一般にこの問題を解決するためには、RNase フリーの DNaseI の使用、あるいはアルカリ処理の RNA に対する効果を見たりするなどの対策がとられている。本研究では、RNase 処理を行ったサンプルを同時に泳動することで、RNA に由来するシグナルを混入するプラスミド様 DNA に由来するものから区別した。

B1 をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションにより、RNase 処理により消失する 3 本のシグナルが検出された (図16 A、レーン 1,2)。マーカーの移動度より計算したそれぞれの RNA のサイズは、1300、1050、650 ヌクレオチドであった。

転写領域を決定する目的で、B1 を 3 分割したプローブにより、それぞれノーザンハイブリダイゼーションを行った (図 16 A、レーン 3,4,5 及び B)。1300 ヌクレオチドの RNA は p11 及び p12 に、1050 ヌクレオチドの RNA は p11 のみがハイブリダイズした。さらに p11 内での転写領域を絞り込む目的で、約 250 塩基の *Eco*RI - *Xho*I 断片をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行ったが、1300 及び 1050 ヌクレオチドの両方の RNA にハイブリダイズした (データ省略)。また最も小さい 650

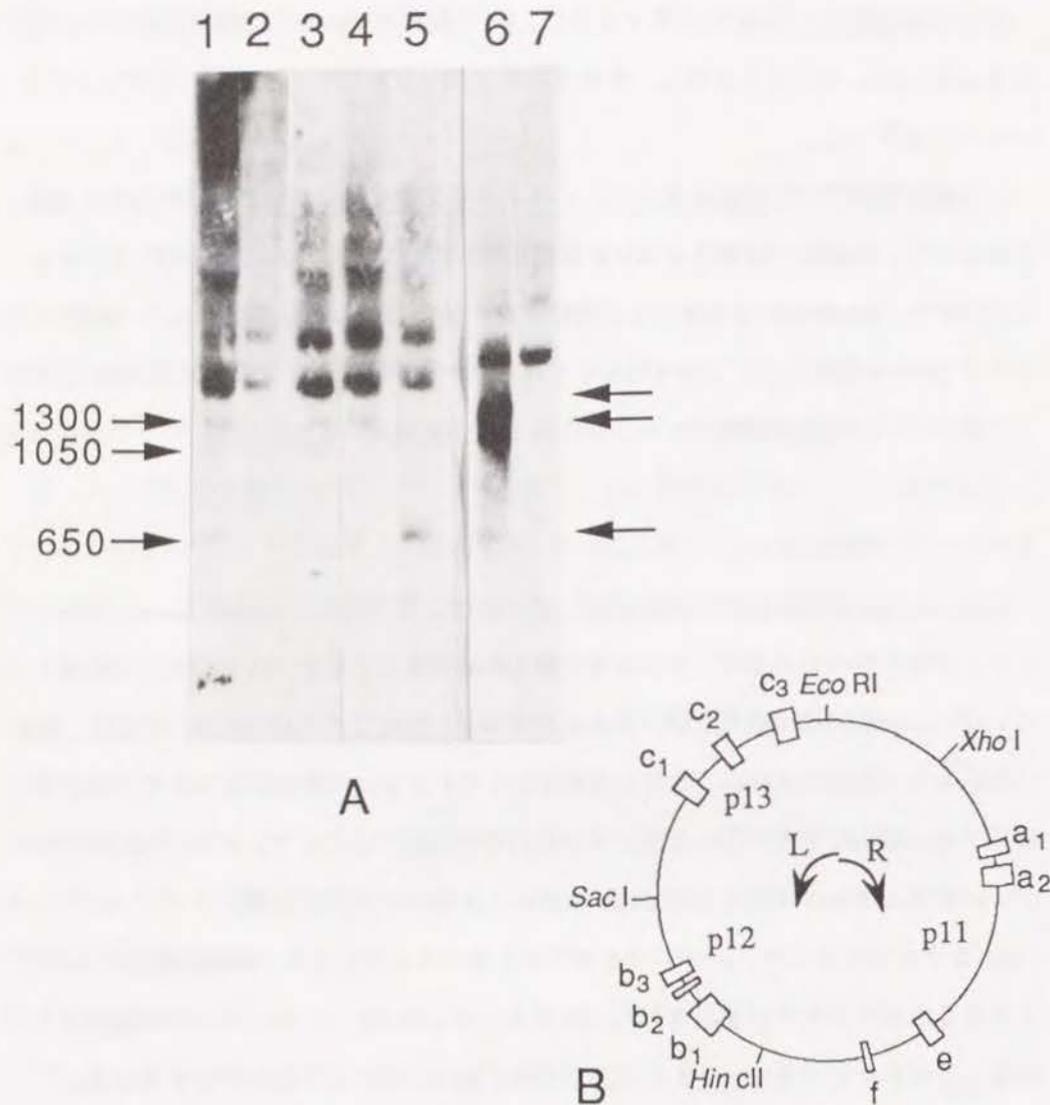


図16 B1 転写産物の解析 A) A-58 CMS ミトコンドリア RNA に対するノーザンハイブリダイゼーション B1 の全配列 (レーン 1、2)、p11 (レーン 3)、p12 (レーン 4)、p13 (レーン 5)、一本鎖特異的プローブ R (レーン 6)、L (レーン 7) をそれぞれプローブとして使用した。但し、レーン 2 は RNase 処理を行った RNA を泳動した。B) ノーザンハイブリダイゼーションに用いたプローブ 転写領域を決定する目的で B1 を *EcoRI*、*HincII*、*ScaI* で p11、p12、p13 に 3 分割し、それぞれをプローブにノーザンハイブリダイゼーションを行った。また転写の方向を決定する目的で、M13 を用いて一本鎖特異的プローブ (R、L) を作製した。

ヌクレオチドの RNA は p13 が強くハイブリダイズし、p11 及び p12 が弱くハイブリダイズした。

さらに転写の方向を決定する目的で、一本鎖特異的プローブによるノーザンハイブリダイゼーションを行った (図 16 A、レーン 6,7 及び B)。その結果、すべての転写産物が R の方向の転写産物であることが明らかになった。また RNase により消失しなかったシグナルは両方のプローブがハイブリダイズし、混入したプラスミド様 DNA に由来するものであることが確認された。

### 2-1-3 考察

ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、B1 には 1300、1050、650 ヌクレオチドの 3 種類の転写産物が存在することが明らかになった。このうち長い 2 つの RNA は、どちらも 250 塩基の *EcoRI*-*XhoI* 断片内に転写開始点が存在するため、同一のプロモーターから転写され、異なる転写終結点を持つ RNA であることが示唆された。また残る 650 塩基の RNA は、分割プローブを用いた実験の結果から、p13 の直前から転写が始まり、p11 に入ってからすぐのところまで転写が終結していることが明らかになった。以上の結果から判断すると、B1 にはプロモーターが最低 2 箇所存在することが考えられるが、1300 と 650 ヌクレオチドの RNA が連続した長い RNA として転写された後に、2 つの RNA に切断されるという可能性を否定することはできない。この場合、B1 の全長に近い長さの前駆体 RNA が存在するはずであるが、プラスミド様 DNA の混入によるシグナルのため、そのような RNA が存在するかどうか確認することはできなかった。

B1 はトウモロコシの 1.9 kbp のプラスミド様 DNA と密接に関連したものであることが、一次構造の比較により明らかになっている。このトウモロコシのプラスミド様 DNA にも、転写産物が存在することが報告されている<sup>53)</sup>。残念ながらその転写領域は明らかになっていないが、相同配列に着目すると、B1 とトウモロコシのプラスミド

様 DNA で、転写の方向は同一であると判断することができる。したがって2つのプラスミド様 DNA で保存されていた配列は、同一方向の RNA に転写されていることが明らかになった。このことは2つのプラスミド様 DNA に存在した転写産物が、何らかの働きを持つことを示唆している。第1章において、イネ及びトウモロコシの環状プラスミド様 DNA には、タンパクをコードする遺伝子の存在が考えにくいことを述べた。タンパクに翻訳される可能性の低いこれらの RNA の機能を議論するためには、より多くの情報が必要である。

一次構造の比較から、イネとトウモロコシのプラスミド様 DNA の間には多くの相同配列が存在し、それらが何らかの働きを持つため保存されてきた可能性が示唆された。タンパクをコードする可能性の低いこれらの相同配列の機能として、両プラスミド様 DNA における、転写調節領域としての働きが考えられる。しかしながらこれらの相同配列は、B1 に関しては、転写産物の内部に存在していた。そのためこれらの配列の機能として、転写開始点の上流に位置するタイプのプロモーターとしての働きは、考えにくいものであることが明らかになった。

## 第2節 B3 転写産物の解析

前節では B1 に転写産物が存在し、B1 と密接に関連したプラスミド様 DNA であるトウモロコシの 1.9 kbp DNA にも、同一方向の転写産物が存在することを述べた。B3 は、一次構造の比較から B1 及びトウモロコシ 1.9 kbp DNA と関連すると思われる領域を持つことが明らかになっている。そこで B3 の転写産物について B1 と同様な解析を行い、関連する2つのプラスミド様 DNA との比較を行った。また残る B2、B4 についても転写産物が存在するかどうか解析を行った。

### 2-2-1 実験方法

ノーザンハイブリダイゼーション mtRNA の抽出及びノーザンハイブリダイゼーションは、前節の方法に従って行った。ハイブリダイゼーションは、B3 の配列をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションと同じ条件で行った。さらに B2、B4 の配列をプローブとして、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。

転写領域及び転写方向の決定 B3 の配列を図17B に示すように、*Bgl*II、*Sca*I を用いて p31、p32、p33 に3分割し、それぞれをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。また B1 の場合同様、M13mp18 を用いて一本鎖特異的プローブを作製し、転写方向の決定を行った。

### 2-2-2 結果及び考察

図17A に示すように、ノーザンハイブリダイゼーションにより、B3 には 950、840 ヌクレオチドのシグナルと、さらにそれよりややサイズの大きい弱いシグナルが検出された(図17A、レーン1,2)。これらのシグナルはすべて、p31、p32 をプローブとした際に検出され、p33 は非転写領域であることが明らかになった(図17A、レーン3,4,5)。また転写の方向は、すべて図17B に示された R の方向であることが明らかになった(図17A、レーン6,7 及び B)。

以上の結果から、B3 に存在した B1 及びトウモロコシ 1.9 kbp DNA との相同配列である  $c_2$ 、 $c_3$  及び e は転写されており、さらに転写の方向は関連する2つのプラスミド様 DNA と同一であることが明らかになった。またトウモロコシ 1.4 kbp DNA との相同配列は、転写されていないことが判明した。トウモロコシ 1.4 kbp DNA には転写産物が存在することが報告されているが<sup>53)</sup>、この領域が非転写領域であることは、B3 がプラスミド様 DNA 間の組換えによって生じたという仮説を支持するものかもしれない。

B3 には3種類の転写産物が存在するが、B1 の長い2つの転写産物同様、転写領域

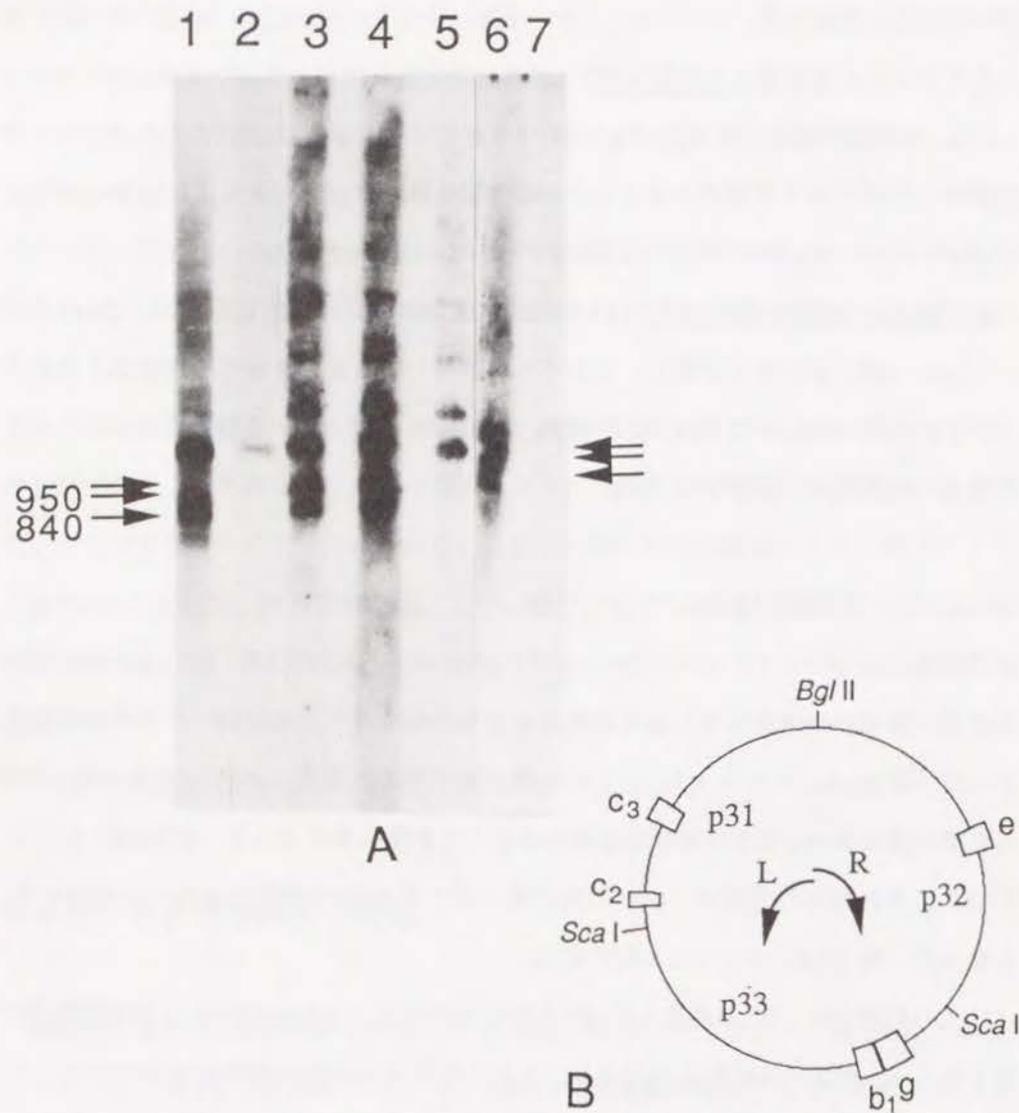


図17 B3 転写産物の解析 A) A-58 CMS ミトコンドリア RNA に対するノーザンハイブリダイゼーション B3 の全配列 (レーン1、2)、p31 (レーン3)、p32 (レーン4)、p33 (レーン5)、一本鎖特異的プローブ R (レーン6)、L (レーン7) をそれぞれプローブとして使用した。但し、レーン2は RNase 処理を行ったミトコンドリア RNA を泳動した。B) ノーザンハイブリダイゼーションに用いたプローブ 転写領域を決定する目的で B3 を Bgl II、Sca I で3分割し、それぞれをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。また転写の方向を決定する目的で、M13 を用いて一本鎖特異的プローブ (R、L) を作製した。

がオーバーラップしていた。このことは B1 の場合同様、共通の転写開始点より転写が開始し、異なる終結点で終了したか、あるいは転写後の RNA の切断により異なる長さの RNA 種が生じたことが考えられる。

さらに、残る B2 及び B4 に転写産物が存在するかどうか調べる目的で、同様なノーザンハイブリダイゼーションを行った (図18)。両者をプローブにした場合でシグナルが得られ、転写産物が存在することが明らかになった。

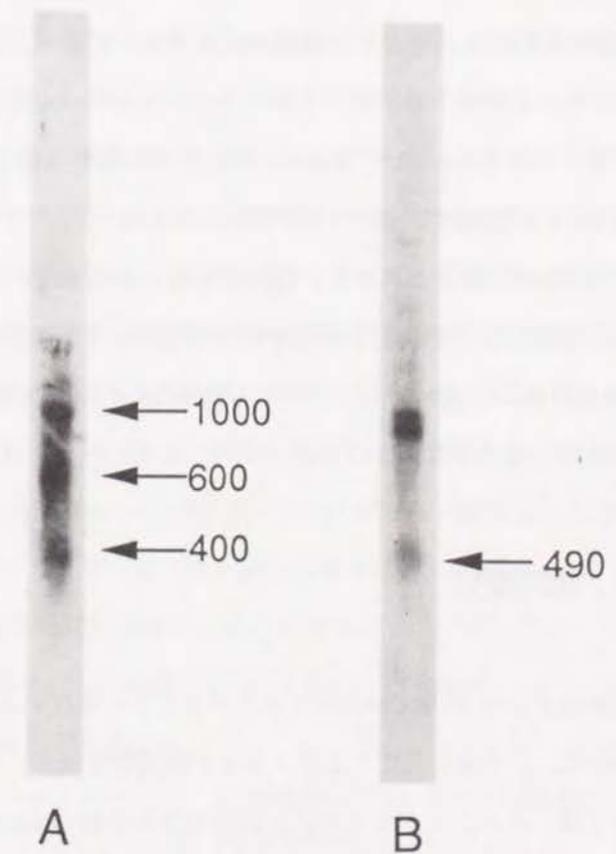


図18 B2 及び B4 転写産物の解析 B2 (A) 及び B4 (B) の配列をプローブとして A-58 CMS ミトコンドリア RNA に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った。

### 第3章 プラスミド様 DNA と核 DNA の相同性

高等植物のミトコンドリアゲノムは、他のオルガネラゲノム由来の配列を数多く取り込んでいることが報告されている<sup>16) 17) 87) 88) 89) 90) 91) 92) 93)</sup>。同様な特徴をプラスミド様 DNA についても挙げる事が可能である。トウモロコシの S1<sup>37)</sup> 及び 2.3 kbp<sup>40)</sup> の線状プラスミド様 DNA さらに *Brassica* の線状プラスミド様 DNA<sup>43)</sup> は、いずれも葉緑体 DNA の配列を有することが報告されている。トウモロコシの場合、プラスミド様 DNA に存在する配列は、明らかに葉緑体起源のものであり、したがって配列の転移は、葉緑体からミトコンドリアのプラスミド様 DNA への方向のものと判断される。

環状のプラスミド様 DNA では、葉緑体 DNA との相同性は報告されていないが、一部のものが核 DNA と相同性を持つことが知られている<sup>52) 53) 67)</sup>。しかしながら、線状のプラスミド様 DNA の場合と異なり、相同性を有する核 DNA の配列が明らかになっていないため、転移の方向を決定することはできなかった。本研究では、イネのプラスミド様 DNA を材料に、核ゲノムに存在する相同配列の解析を行い、オルガネラ間での配列の転移の方向及びそのメカニズムについて考察した。

#### 第1節 B1 相同配列

イネ細胞質雄性不稔株 A-58 CMS のミトコンドリアに存在する環状のプラスミド様 DNA B1 ~ B4 は、ミトコンドリア主ゲノムとの相同性を欠き、また A-58 やフジミノリ等の日本稲では、ミトコンドリアゲノムにプラスミド様 DNA の配列を全く欠くことが明らかになった(第1章)。プラスミド様 DNA の配列がイネにとって必須のものであるならば、日本稲ではその配列は、ミトコンドリア以外のゲノムに存在している可能性が高い。実際、トウモロコシの環状プラスミド様 DNA で、核ゲノムとの相

同性が報告されている<sup>52) 53)</sup>。

本節では、最もサイズの大きいプラスミド様 DNA である B1 を材料に、A-58 CMS の核ゲノムにその相同配列が存在するかどうか、サザンハイブリダイゼーションにより解析を行った。さらに、ミトコンドリアに B1 の配列の存在しない日本稲を材料に、同様な解析を行った。

#### 3-1-1 材料と方法

**実験材料** イネ細胞質雄性不稔株 A-58 CMS 及び日本稲 A-58 に加えて、同様な手法により日本稲フジミノリ及び H-105 の種子より懸濁培養細胞を作出した。

**核 DNA の抽出** イネの懸濁培養細胞をナイロンメッシュを用いて集め、抽出バッファー<sup>(※)</sup> 中で海砂と共に、乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。4層のガーゼ、さらに2重のミラクロスで濾過後、10,000×g、4℃、10分間の遠心を行った。沈殿した粗核分画を過飽和ショ糖液<sup>\*\*</sup>に懸濁し、Beckman SW28 ローターで 25,000 rpm、4℃、2時間の遠心を行った。表面にフィルム上に浮上した核を回収し、2M ショ糖液<sup>\*\*\*</sup>に懸濁し、さらに10,000×g、4℃、20分間の遠心を行い沈殿として核を回収した。得られた核を 9 ml の 50mM Tris-HCl(pH7.5) - 10mM EDTA に懸濁し、1 ml の 20% SDS を加えて核を溶解させた。さらに 100 µg/ml になるように Proteinase K (ペーリンガー) を加え、37℃ で 2 時間処理を行った。最後にフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) 処理を 2 回行った後、2 倍容のエタノールを加え、出現した繊維状の DNA をすくいあげた。

\*抽出バッファー 10 mM MES バッファー(pH6.0)  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
3 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 M ショ糖

\*\*過飽和ショ糖液 200g のショ糖を100℃にした100ml の 1 mM CaCl<sub>2</sub> に溶かし、4℃に一晩おいたもの

\*\*\* 2 M ショ糖溶液 34.2g のショ糖を 50ml の 1 mM CaCl<sub>2</sub> に溶かしたもの

ゲノミックサザンハイブリダイゼーション 10 $\mu$ gの核DNAと1 $\mu$ gのミトコンドリアDNAをEcoRIで分解し、0.8%のアガロースゲルで分離後、第1章の方法に従い、B1の配列をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った。

### 3-1-2 結果

イネのプラスミド様DNAは、ミトコンドリア主ゲノムとの相同性を欠くことが明らかになったが、他のオルガネラゲノムと何らかの関係を持つ可能性があるのか調べる目的で、B1の配列をプローブとして、A-58 CMS 及び A-58 の核DNA とサザンハイブリダイゼーションを行った。核DNAをオルガネラDNAの混入なく抽出することは困難であるため、混入するプラスミド様DNAを配慮する目的で、使用する制限酵素としてB1を切断するものを選んだ。また同じ制限酵素で切断したミトコンドリアDNAを同時に泳動し、プラスミド様DNAに由来するシグナルから区別した。プローブは、混入するプラスミド様DNAにハイブリダイズしているが、それ以外にも数本のシグナルが検出され、A-58 CMSの核ゲノムにB1と相同な配列が存在することが明らかになった(図19、レーン1,2)。

日本稲A-58は、A-58 CMSと同一の核ゲノムを有し、ミトコンドリアにプラスミド様DNAが存在しないため、核DNA抽出の際に、ミトコンドリアDNAの混入を配慮する必要がない。A-58のハイブリダイゼーションのパターンは、A-58 CMSのパターンより、プラスミド様DNAの混入によると考えられるシグナルを除いたものに等しい。したがってA-58 CMSとA-58の核ゲノムは、B1相同配列に関して同一であることが明らかになった(図19、レーン3,4)。

トウモロコシのS1は、葉緑体DNAの配列を持つことが知られている。そこでB1をプローブとして、イネ葉緑体DNAに対してサザンハイブリダイゼーションを行ったが、シグナルは検出されなかった(データ省略)。したがってゲノミックサザンハイブリダイゼーションで検出されたシグナルは、核DNAに混入した葉緑体DNAに因

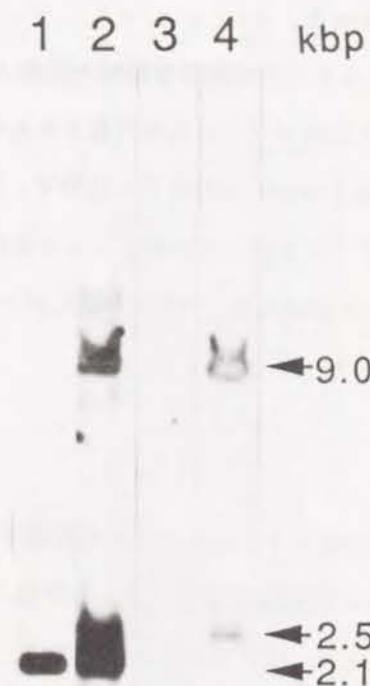


図19 B1をプローブとした核DNAサザンハイブリダイゼーション A  
ミトコンドリアDNA(レーン1)、核DNA(レーン2)及びA-58のミ  
トコンドリアDNA(レーン3)、核DNA(レーン4)をEcoRIで切断して泳動し  
たミトコンドリアDNA、10 $\mu$ gの核DNAを使用した。

ゲノミックサザンハイブリダイゼーション 10 $\mu$ gの核DNAと1 $\mu$ gのミトコンドリアDNAをEcoRIで分解し、0.8%のアガロースゲルで分離後、第1章の方法に従い、B1の配列をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った。

### 3-1-2 結果

イネのプラスミド様DNAは、ミトコンドリア主ゲノムとの相同性を欠くことが明らかになったが、他のオルガネラゲノムと何らかの関係を持つ可能性があるのか調べる目的で、B1の配列をプローブとして、A-58 CMS 及び A-58 の核DNA とサザンハイブリダイゼーションを行った。核DNAをオルガネラDNAの混入なく抽出することは困難であるため、混入するプラスミド様DNAを配慮する目的で、使用する制限酵素としてB1を切断するものを選んだ。また同じ制限酵素で切断したミトコンドリアDNAを同時に泳動し、プラスミド様DNAに由来するシグナルから区別した。プローブは、混入するプラスミド様DNAにハイブリダイズしているが、それ以外にも数本のシグナルが検出され、A-58 CMSの核ゲノムにB1と相同な配列が存在することが明らかになった(図19、レーン1,2)。

日本稲A-58は、A-58 CMSと同一の核ゲノムを有し、ミトコンドリアにプラスミド様DNAが存在しないため、核DNA抽出の際に、ミトコンドリアDNAの混入を配慮する必要がない。A-58のハイブリダイゼーションのパターンは、A-58 CMSのパターンより、プラスミド様DNAの混入によると考えられるシグナルを除いたものに等しい。したがってA-58 CMSとA-58の核ゲノムは、B1相同配列に関して同一であることが明らかになった(図19、レーン3,4)。

トウモロコシのS1は、葉緑体DNAの配列を持つことが知られている。そこでB1をプローブとして、イネ葉緑体DNAに対してサザンハイブリダイゼーションを行ったが、シグナルは検出されなかった(データ省略)。したがってゲノミックサザンハイブリダイゼーションで検出されたシグナルは、核DNAに混入した葉緑体DNAに因

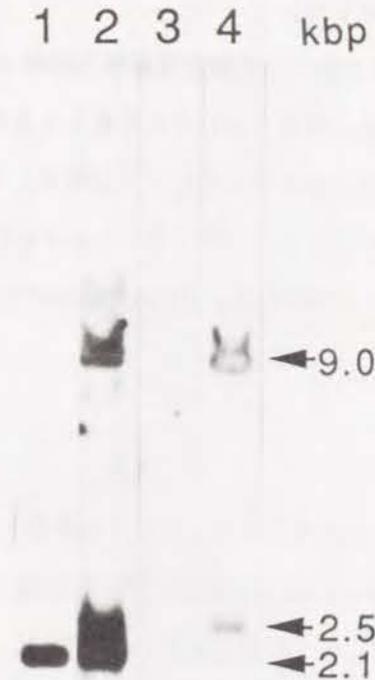


図19 B1をプローブとした核DNAサザンハイブリダイゼーション A-58 CMSのミトコンドリアDNA(レーン1)、核DNA(レーン2)及びA-58のミトコンドリアDNA(レーン3)、核DNA(レーン4)をEcoRIで切断して泳動した。1 $\mu$ gのミトコンドリアDNA、10 $\mu$ gの核DNAを使用した。

るものではないことが明らかになった。

日本稲 A-58 及び同一の核ゲノムを有する細胞質雄性不稔株 A-58 CMS の核ゲノムに存在した B1 相同配列は、A-58 の核ゲノムにのみ存在するものなのか、あるいは広く日本稲一般に存在するものであるのか明らかにする目的で、日本稲フジミノリ及び H-105 を材料に、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、すべてのイネで A-58 と同じパターンが得られ、B1 相同配列が日本稲の核ゲノムに一般的に存在することが明らかになった (図 20)。

### 3-1-3 考察

イネ細胞質雄性不稔株 A-58 CMS のミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA B1 は、ミトコンドリア主ゲノムとの相同性を欠くが、日本稲の核ゲノムにその相同配列が存在することが明らかになった。核ゲノムとの相同性は、B1 と密接な関連が一次構造の解析により示されたトウモロコシ 1.9 kbp DNA でも報告されており<sup>32)</sup>、これらのプラスミド様 DNA にとって本質的な特徴と考えることができる。

ミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA の相同配列が、核ゲノムに存在したという事実を説明するには、3つの解釈を考えることができる。その一つは、プラスミド様 DNA の配列が核ゲノムに転移した結果、相同配列が生じたというものであり、もう一つは逆に、核ゲノムの配列がプラスミド様 DNA の起源であるという考え方である。どちらの場合も、高等植物では一般に見られるオルガネラ間の配列の転移を想定している。トウモロコシの線状プラスミド様 DNA S1<sup>37)</sup> 及び 2.3 kbp DNA<sup>40)</sup> では、プラスミド様 DNA と葉緑体 DNA 間での配列の転移が報告されているが、この場合はプラスミド様 DNA に存在している配列は、葉緑体の機能にとって必須な遺伝子に対して相同なものであり、転移の方向は明確である。しかしながら、イネのプラスミド様 DNA の場合、一次構造の解析からは核ゲノムに存在する既知の配列との相同性は検出されておらず、サザンハイブリダイゼーションの結果だけでは、転移の方向を議

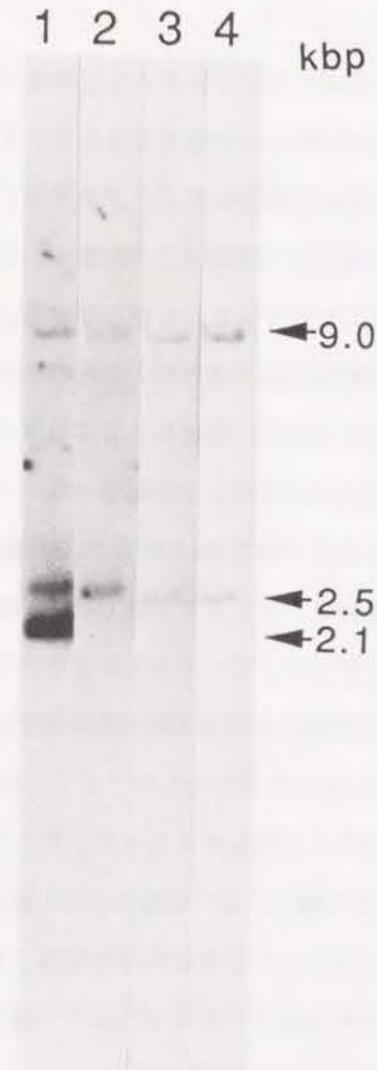


図 20 B1 をプローブとした日本稲核 DNA に対するサザンハイブリダイゼーション A-58 CMS (レーン 1)、A-58 (レーン 2)、フジミノリ (レーン 3)、H-105 (レーン 4) の核 DNA を *Eco*RI で切断し、B1 の配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

論することはできない。

残る一つの可能性は、ウイルスゲノムのような外来の配列が、ミトコンドリアと核の両方のゲノムに別々に入ったという考え方である。イネのプラスミド様 DNA が、ミトコンドリア主ゲノムとの相同性を欠き、プラスミド様 DNA の配列を全く持たないイネが存在するという事実は、プラスミド様 DNA の配列が外から入ってきたというモデルにより説明することができる。しかしながら、ミトコンドリアと核の両方の配列が、そのような外来配列の取り込みによるものなのか、あるいは片方のゲノムで外来配列の取り込みが起こった後、前述の2つのモデルで考えたような、オルガネラ間の配列の転移が起こったものなのか、明確ではない。

ミトコンドリアにプラスミド様 DNA の存在する細胞質雄性不稔株 A-58 CMS の核ゲノムに存在した相同配列は、プラスミド様 DNA を持たない日本稲 A-58 の核ゲノムにも存在し、サザンハイブリダイゼーションの結果から、両者に存在する B1 相同配列は同一と判断された。したがって A-58 CMS の核ゲノムに存在する B1 相同配列は、少なくとも核置換前に A-58 に存在したものであり、核置換後に B1 の配列が核ゲノムに転移したものではないことが明らかになった。また他の日本稲フジミノリ、H-105 を用いた実験から、A-58 の核ゲノムに存在した B1 相同配列は、日本稲に広く存在するものであり、その起源が少なくとも日本稲の起源にまで遡ることが示唆された。

日本稲では一般に、ミトコンドリアにプラスミド様 DNA が存在しないが、その核ゲノムにはプラスミド様 DNA の相同配列が存在した。プラスミド様 DNA に何らかの機能があるとすると、ミトコンドリアに B1 ~ B4 の存在しない日本稲では、核ゲノムに存在する相同配列がその機能を補っていることが考えられる。しかしながら、A-58 CMS の細胞質が由来するインド稲 Chinsurah Boro II をはじめ、インド稲と日本稲の共通の祖先種にあたる *Oryza rufipogon*、アフリカで栽培されている *Oryza glaberrima*、さらにはその野生種にあたる *Oryza barthii* の核ゲノムにも、プラスミド様 DNA の有無にかかわらず、B1 ~ B4 に対する相同配列が存在することが報告されている<sup>94) 95)</sup>。

## 第2節 B4 相同配列

前節では、イネの核ゲノムにプラスミド様 DNA に対する相同配列が存在することが示された。これらの配列が、プラスミド様 DNA とどのような関係にあるものなのかを明らかにする目的で、核ゲノムに存在する相同配列をクローン化し、一次構造の決定を行った<sup>96)</sup>。植物材料としては、ミトコンドリアにプラスミド様 DNA が存在しないため、ライブラリー作製の際、ミトコンドリア DNA の混入を配慮する必要のない日本稲フジミノリを選んだ。またプラスミド様 DNA としては、サイズが最も小さくかつサザンハイブリダイゼーションの結果から、核ゲノムに存在する相同配列のコピー数が比較的少ないと判断される B4 を選んだ。

### 3-2-1 実験方法

核 DNA の抽出 フジミノリの懸濁培養細胞より第1節の方法に従い、核 DNA を抽出した。

ゲノミックサザンハイブリダイゼーション 30 $\mu$ g のフジミノリ核 DNA を *Bam* HI で完全分解し、0.7% のアガロースゲルで泳動した。第1章の方法に従い、B4 の配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

ゲノミックライブラリーの作製 フジミノリの核 DNA を *Sau* 3AI で部分分解した後、ショ糖密度勾配遠心により 15~23 kbp の DNA 断片を回収した。この DNA をファージベクター EMBL3 の *Bam* HI サイトにライゲーションし、インヴィトロパッケージングを行ってライブラリーを作製した。

ブランクハイブリダイゼーション 30万のライブラリーを *E. coli* P2392 を宿主として6枚のプレートにまき、ニトロセルロースのメンブレンにトランスファーした。このメンブレンを 0.4 N NaOH、1.5 M NaCl を浸した濾紙上に5分間置き、続いて 0.5 M

Tris-HCl (pH8.0)、1.5M NaCl で5分間中和後、2×SSC で洗浄し、80℃で2時間変性した DNA を固定した。ハイブリダイゼーション及び洗浄は、サザンハイブリダイゼーションと同じ条件で行った。

サブゲノミックライブラリーの作製 フジミノリ核 DNA を *Bam* HI で完全分解し、アガロースゲル電気泳動及び NaCl 密度勾配遠心により、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより明らかになっている、B4 相同領域を含むサイズの断片を分画した。得られた画分に B4 相同領域が含まれることをサザンハイブリダイゼーションにより確認した後、ファージミド BlueScript II の *Bam* HI サイトに導入し、形質転換を行った。宿主は *E. coli* HB101 を用い、一部 *E. coli* ER1647 を用いた。また形質転換は ER1647 を用いた場合はエレクトロポレーション<sup>97)</sup> により行った。

コロニーハイブリダイゼーション 50万のサブライブラリーをニトロアセテートのメンブレン上にまき、レプリカを2枚とった。このメンブレンを 150 μg/ml のクロラムフェニコールを含む LB 培地に移し、さらに12時間培養を行った。このメンブレンを10% SDS を浸した濾紙上に5分間置き、続いて0.5 N NaOH、1.5 M NaCl 上に10分間、さらに0.5 M Tris-HCl (pH8.0)、1.5 M NaCl 上に10分間、最後に2×SSC 上に5分間置いた。80℃で1時間 DNA の固定を行い、0.1% SDS を含む 6×SSC で洗浄後、ブランクハイブリダイゼーションと同じ条件でハイブリダイゼーションを行った。

一次構造の決定 得られた B4 相同領域を含むクローンの制限酵素地図を作成し、サザンハイブリダイゼーションにより B4 相同領域をさらに絞り込んだ。一次構造の決定は、サンガー法<sup>81)</sup> により行った。

### 3-2-2 結果

日本稲フジミノリは、ミトコンドリアにプラスミド様 DNA が存在しないばかりでなく、ミトコンドリアゲノムに B4 と相同な配列が存在しない。また葉緑体ゲノムにも B4 に相同な配列が存在しないため、核ゲノムに存在する B4 相同配列のクローン化

の際、他のオルガネラ DNA の混入を考える必要がなく好都合である。

図 21 は、B4 をプローブとしたフジミノリ核 DNA *Bam* HI 分解物に対するサザンハイブリダイゼーションの結果を示しており、5本のシグナルが検出された。B4 の配列中には *Bam* HI サイトが存在しないため、フジミノリの核内には B4 相同領域が5箇所存在することが考えられた。しかし一次構造の解析の結果から、3.3 kbp (A) 及び > 23 kbp (A') の2つのシグナルは、塩基置換によって B4 相同配列内に *Bam* HI サイトが生じたため、1つの B4 相同配列が2つの断片に切断された結果生じたものであることが明らかになった。このことからフジミノリの核ゲノム内には、A (3.3 kbp + >23 kbp)、B (4.6 kbp)、C (3.8 kbp)、D (3.6 kbp) の4箇所の B4 相同領域が存在することが明らかになった。

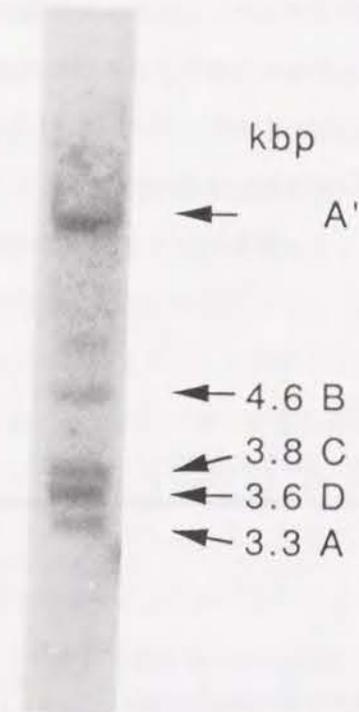


図 21 B4 をプローブとした核 DNA サザンハイブリダイゼーション フジミノリ核 DNA を *Bam* HI で切断し B4 の配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。フジミノリの核ゲノム内に B4 相同領域が4箇所 (A ~ D) 存在することが明らかになった。

それぞれの B4 相同領域をクローン化し、その一次構造を決定する目的で、フジミノリ核 DNA を抽出し、*Sau* 3AI で部分分解を行い、ファージベクター EMBL3 を用いてゲノミックライブラリーを作製した。30 万のライブラリーをスクリーニングしたところ、401 ~ 407 の 7 つの陽性クローンが得られた。それぞれのクローンからファージ DNA を抽出し、制限酵素地図を作成した。図 22 A は 401 ~ 405、407 によってクローン化された領域の制限酵素地図である。6 つのクローンに共通する領域があり、同一の B4 相同領域をクローン化したものであることが明らかになった。さらにこれらのファージ DNA を *Bam* HI で切断後、B4 の配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。いずれのクローンでもプローブは、3.3 kbp の断片とアームを含む断片にハイブリダイズした。このアームを含む断片は、おそらく >23 kbp の断片の一部をクローン化したものと考えられる。したがってこれらのクローンは、A のシグナルに対応する B4 相同領域をクローン化したものであることが明らかになった。一方 406 は、他のクローンと制限酵素地図が異なり（図 22 B）、サザンハイブリダイゼーションにより B のシグナルに対応する B4 相同領域をクローン化したものであることが明らかになった。

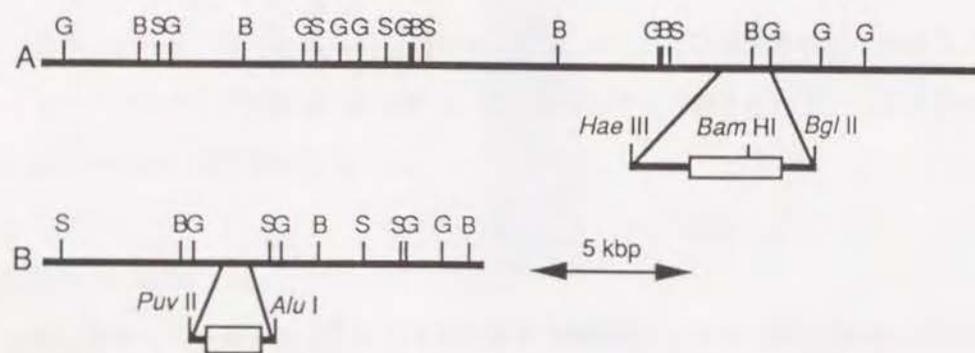


図 22 B4 相同領域 A 及び B の制限酵素地図 B: *Bam* HI, G: *Bgl* II, S: *Sal* I ボックスは B4 相同配列を表す。

領域 A に存在する B4 相同配列を明らかにする目的でクローン 401 を選び、サザンハイブリダイゼーションによりさらに B4 相同領域を 1.4 kbp の *Hae* III-*Bgl* II 断片まで絞り込み、一次構造の決定を行った。図 23 は、決定された一次構造を示しており、配列が 2 重になっている部分が B4 相同配列で、下段は対応する B4 の配列を示している。核の配列に 15 塩基の挿入があるものの、約 650 bp の B4 相同配列が連続的に存在し、85% の相同性を示した。興味深いのは、相同配列の外側に 2 塩基の置換があるものの、17 塩基より成る反復配列が存在していた点である。

同様な解析をクローン 406 についても行った。B4 相同領域を 0.6 kbp の *Pvu* II-*Alu* I 断片まで絞り込み、一次構造の決定を行った。図 24 は決定された一次構造を示しており、約 250 bp の B4 相同配列が連続的に存在し、94% の相同性を示した。相同領域の外側には領域 A で見られたような特徴的な配列は見られなかった。

イネのゲノムサイズから計算して、30 万のライブラリーは、シングルコピーの配列をクローン化するにも十分な大きさと考えられる。領域 A に関しては 6 つの陽性クローンが得られているにもかかわらず、C 及び D の領域に対応するクローンは得られていない。したがって何らかの理由で、これらの配列はライブラリーに入りにくいものであると考えられる。残るこれらの配列をクローン化する目的で、フジミノリ核 DNA *Bam* HI 分解物から 3.3~4.6 kbp のサイズの断片を含む領域を回収し、ファージミド BlueScript II を用いてサブライブラリーを作製した。B4 をプローブとして 30 万のサブライブラリーをスクリーニングしたところ、6 つの陽性クローンが得られた。得られたクローンの制限酵素地図を作成したところ、クローン 415 は領域 A、クローン 414 は領域 B の *Bam* HI 断片をそれぞれクローン化したものであることが明らかになった。残る 4 クローン (411、413、416、417) は、3.6 kbp の *Bam* HI 断片がクローン化されており、D のシグナルに対応する B4 相同領域をクローン化したものであった。





### 3-2-3 考察

ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果から、フジミノリの核ゲノムには B4 に相同な配列を含む領域が 4 箇所存在することが明らかになった。そのうち A 及び B の領域は、EMBL3 を用いて作製されたゲノミックライブラリーより、領域 D の配列は BlueScript II を用いて作製されたサブライブラリーよりクローン化された。しかしながら 30 万のゲノミックライブラリー、さらに 50 万のサブライブラリーをスクリーニングしたにもかかわらず、領域 C の配列をクローン化することはできなかった。この領域の配列は、何らかの理由で特にライブラリーに入りにくいものであると考えられる。

図 27 は B4 の一次構造であり、フジミノリの核ゲノムに存在した領域が示されている。いずれの領域も B4 の配列の一部のみを含んでおり、またすべての領域を合わせても、B4 の全配列をカバーすることはできなかった。残る C のシグナルに対応する領域に、B4 の全配列が含まれる可能性があるのかどうか調べる目的で、B4 の配列中で A、B、D の領域に含まれなかった配列 (160 bp の Ava I-Apa LI 断片、図 27) をプローブとしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行ったが、シグナルは検出されなかった (データ省略)。したがって領域 C に存在する B4 相同配列は、少なくともプローブとして用いた配列を欠くことがわかり、フジミノリの核ゲノム内には B4 の全配列を含む領域がないことが明らかになった。また B4 の配列中には、フジミノリの核ゲノムに全く存在しない領域があることが判明した。この事実は、核ゲノムの配列が B4 の起源であるのではなく、B4 の配列の一部が核ゲノムに転移したものであることを強く示唆している。

核ゲノム配列中で構造上注目すべきは、領域 A の相同配列の外側に 17 塩基より成る反復配列が存在した点である。この反復配列は、多くのトランスポーザブルエレメントに見られるように、B4 の配列が核ゲノムに挿入した際に形成されたことが考えられるが、他の領域では相同配列の境界にこのような反復配列は見られなかった。また

```

CCTTCTCGGCCCTTTTTTCTCAATACACGTATCCCGGTACACGTGACACCGGTGTAACACCGGTAACCTCT 70
TCCTAACACCGGACTAGCCTCCTTACAACAAGAACCCTCCGAGTTTCTTTACTCCGATAAGTACTCCC 140
TTCCCAAGGAAGTACTTATCTCACTTCCACGAAAACATTCAACATTAGTTTTCTTTGCTCCGAGGAATC 210
CTACCTTCCCAAAGGTAGAATCCCTCTCACTTTAAAACACTAGGGTTTTGGGTAATAAAAAACGACTG 280
GTTTCGGGCTCGCCTCTTCGAGGGGCTCCGCTCGTGGACAACCTCGCTCCGGGTCTTACCCACCCTCG 350
AGTCCAATCTCGGGTGGGGCTTAGGCATACCCTATTCACTAGACCCGAATCCATAAATGCATAACTGAT 420
GGCAGCTTCGATAACTGTCATTGGCATACCGCATACCTATACGTCAGTCAAGGTTCCGGGATCGAGGGAA 490
AGACACATGTGCATGACATGACAAAACGTGATATTTCACTGTGTTCACTAACTCGTCCCTCACTACAAA 560
GAAACCTTTCATCTAGTTGACTTGAACCCGATTCACCTCACTCGATTTCGGGTTTTGAATAAATCACTG 630
ATGGACGGAAGGGAGCGGGGCTGCTCCCTTCTATGAAAGACCCGAGCTTACTGGGATGATACCCCTT 700
GAGGGGGGATCATTCAAGTAAGGAGGGAATACACGGCACACGCATCCGCGTGTGCGCTCGCGGTAA 770
TAGAACCGGTGCGCATGCGCCACCAATAGATCACGTCCGCATACGCATCGGCACATCACCCGCGCGTGC 840
ACGTGCGCGTGACGGCGAGGGACAATACTAGTTATGCTTACAGAAATGCGATATTTGCGATTTCAAATC 910
GGTTTAGGTGTCAAAGTACCTAAACCTCACTAAACCTATGCTATAGCTTCGAAAACAGG 969

```

図 27 B4 の配列で核ゲノムに存在した領域 ボックスで囲まれた配列は領域 A に、下線を引いた配列は領域 B に、あみかけした配列は領域 D にそれぞれ存在した。' ' は、プローブとして用いた Ava I-Apa LI 断片を示す。

*Oryza sativa* の祖先種に当たる *Oryza rufipogon* の一部の核ゲノムには、B4 の配列の挿入を受けていないのにこの反復配列が存在することが報告されている<sup>94)</sup>。これらの事実から考えて、この反復配列は B4 の配列の挿入のメカニズムとは特に関係がないものと判断される。

構造の決定された 3 つの B4 相同領域で、領域 D は比較的短い B4 相同配列が、3 箇所に分断されて存在していたという点で興味深い。これらの配列は B4 上でも連続したものではなく、また 3 つの配列の順番も異なっている。類似した構造は、ホウレンソウの核ゲノムに挿入した葉緑体 DNA の配列でも報告されている<sup>95)</sup>。しかしこの場合、3 つの葉緑体 DNA 由来の配列は、核ゲノム内で連続して存在しており、イネの場合のように相同配列に介在するような配列は存在していない。これらの事実から判断して、領域 D に存在した 3 つの B4 相同配列は、独立に核ゲノムに挿入したもの

と考えられる。オルガネラゲノム間の配列の転移は数多く報告されているが<sup>(99) 100) 101)</sup>、3つの配列が独立に同一領域に転移したという事実は興味深い。この領域が外来配列を受け入れやすい特殊な場所であることが考えられる。

現在までオルガネラ間での転移が確認された配列は、すべて転写されている配列に由来しているため、RNAを介したオルガネラ間での配列の転移モデルが考えられている<sup>88)</sup>。第2章で述べたようにB4にも転写産物が存在し、このモデルに矛盾するものではない。フジミノリの核ゲノムに存在したB4相同配列の多くは、配列内に stem and loop 構造を組むことができる部分が存在する。この構造が逆転写の際プライマーとして働いた可能性が考えられる。

### 第3節 B2相同配列

前節では、フジミノリの核ゲノムに存在するB4相同配列は、すべてB4の配列の一部のみを含み、またB4には核ゲノム上に存在しない配列があることが明らかになった。この事実は、B4の配列の一部が核ゲノムに転移した結果、B4相同配列が生じたという考えを支持している。

B2相同配列は、フジミノリの核ゲノム内でのコピー数がB4相同配列より多いことが、サザンハイブリダイゼーションにより明らかになった。本節では、このB2相同配列をゲノミックライブラリーよりクローン化し、サザンハイブリダイゼーションによりB2の全配列を含む領域があるかどうか解析を行い、B4相同配列の解析で得られた仮説がB2相同配列についてもあてはまるかどうか検討を行った。

#### 3-3-1 実験方法

ゲノミックサザンハイブリダイゼーション 10 $\mu$ gのフジミノリ核DNAをBam HIで切断し、0.8%アガロースゲルで分離後、第1章の方法に従い、B2の配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

ブランクハイブリダイゼーション 60万のゲノミックライブラリーより、第2節の方法に従い、B2の配列をプローブとしてスクリーニングを行った。

クローンの分類 得られたクローンからファージDNAを抽出し、Bam HIで切断後、B2の配列をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブがハイブリダイズする断片の違いにより、得られたクローンの分類を行った。またB2をBgl II及びSca Iで3分割し、それぞれをプローブとしてファージDNAに対するサザンハイブリダイゼーションを行い、各相同領域にB2の配列のどの部分が存在するのか解析を行った。

### 3-3-2 結果

図 28 は *Bam* HI で切断したフジミノリ核 DNA に対して、B2 をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った結果である。濃淡に差のあるシグナルが最低 8 本検出され、フジミノリの核ゲノムに B2 相同配列が多数箇所存在し、その数は B4 の場合より多いことが明らかになった。

60 万のフジミノリゲノミックライブラリーをスクリーニングしたところ、多数の陽性クローンが得られた。その数は B4 をプローブとした場合より明らかに多く、このことは B2 相同配列のコピー数が B4 相同配列のコピー数より多いことを反映していると考えられる。得られた陽性クローンよりファージ DNA を抽出し、B2 をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションにより解析を行った。表 2 は、プローブがハイブリダイズした *Bam* HI 断片により分類を行った結果を示している。この解析により、少なくとも 7 箇所 (A~G) の B2 相同領域をクローン化したことが明らかになった。得られたクローンで B2 がハイブリダイズする *Bam* HI 断片と、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションのシグナルを対応させたところ、B4 相同配列の場合同様ライブラリーに含まれない配列があることが明らかになった (図 28)。

クローン化された配列のなかに B2 の全領域を含むものがあるかどうか調べる目的で、B2 を図 29 に示すように *Bgl* II 及び *Sca* I で P21、P22、P23 に 3 分割し、それぞれをプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った。B 及び C にグループ分けされたクローンは、分割されたプローブのハイブリダイゼーションのパターンの違いから、それぞれ異なる 2 つの B2 相同領域 (B1、B2 及び C1、C2) をクローン化したものであることが明らかになった。また領域 E を除く領域では、シグナルの得られなかったプローブがあることから、B2 の全領域を含まないことが明らかになった。

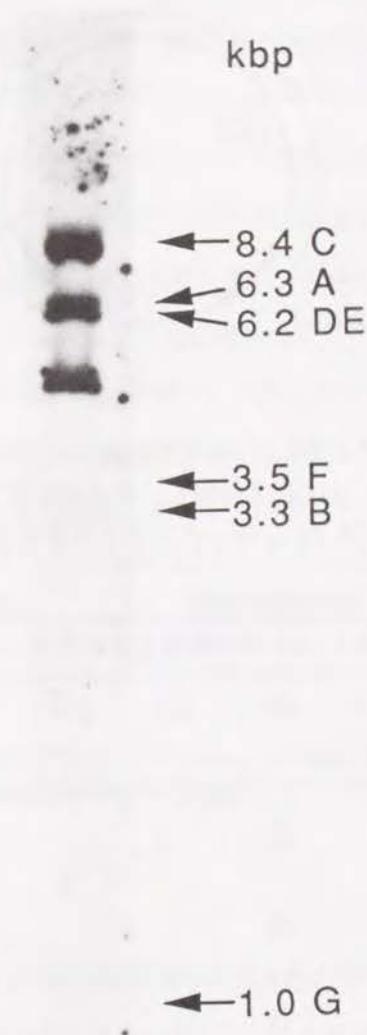


図 28 B2 をプローブとした核 DNA サザンハイブリダイゼーション フジミノリ核 DNA を *Bam* HI で分解し、B2 の配列をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った。A ~ G はゲノミックライブラリーよりクローン化された領域に対応するシグナルを示す。

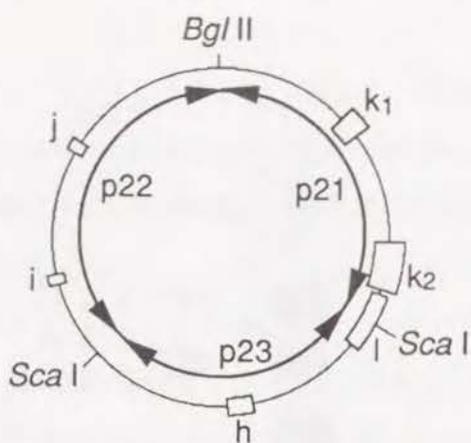


図29 サザンハイブリダイゼーションに用いたプローブ B2の配列を *Bgl* II 及び *Sca* I により p21、p22、p23 に3分割し、それぞれをプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った(表2)。ボックスはトウモロコシ 1.4 kbp DNA との相同配列を表す。

表2 B2 相同領域を含むクローンの分類

領域	B2 がハイブリする <i>Bam</i> HI 断片(kbp)	p21	p22	p23	クローン
A	6.3	○			204 217
B1	3.3			○	202
B2	3.3	○			206 230
C1	8.4	○	○		207
C2	8.4	○			211
D	6.2	○	○		209
E	6.2	○	○	○	224 226
F	3.5	○	○		219
G	1.0	○	○		223

領域名 (A ~ G) は図28のそれぞれのシグナルに対応する。p21~p23 のプローブは図29に示されている。丸印はプローブがハイブリダイズしたことを示す。

B2を分割した3つのプローブがすべてハイブリダイズした領域Eが、B2の全領域を含む可能性があるかどうか調べる目的で、領域Eの制限酵素地図を作成し、さらにB2の配列をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行い、B2相同領域を絞りこんだ。図30は領域Eにグループ分けされたクローン224及び226に共通して存在した領域の制限酵素地図である。サザンハイブリダイゼーションにより、B2相同領域を絞り込んだところ、0.3 kbpの *Hin* cII - *Kpn* I断片及び1.1 kbpの *Hin* cII - *Acc* I断片にそれぞれB2相同配列が存在することが明らかになった。このことはB4相同領域Dの場合のように、B2の配列の一部が同一領域内に分散して存在していることを示している。またプローブがハイブリダイズした断片のサイズから、それぞれの配列がB2の全領域を含まないことは明らかである。

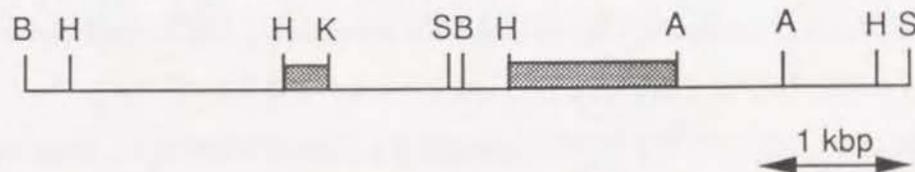


図30 B2 相同領域Eの制限酵素地図 A: *Acc* I, B: *Bgl* II, H: *Hin* cII, K: *Kpn* I, S: *Sal* I ボックスはB2相同領域を含む断片を表す。

### 3-3-3 考察

フジミノリの核ゲノムには、B4相同配列よりコピー数の多いB2相同配列が存在していることがゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果から明らかになった。またその際観察されたシグナルの濃淡は、それぞれの領域が異なる長さのB2相同配列を有していることを反映しているものと考えられる。ゲノミックライブラリーよりクローン化されたB2相同配列は9種類で、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果と対応させたところ、クローン化されていないB2相同配列があることが明らかになった。したがってB4相同配列の場合の様に、ゲノム全体について議論することはできないが、得られたすべてのB2相同配列はB4の場合同様、B2の配列の一

部のみを含むものであった。

以上の結果から判断して、少なくとも B2 と B4 の場合は、プラスミド様 DNA の全長を含むような配列が核ゲノムに存在し、それがプラスミド様 DNA の起源になっているというモデルは考えにくいものであることが明らかになった。したがって核ゲノムに存在する相同配列が、プラスミド様 DNA に由来するのか、あるいは核ゲノム及びプラスミド様 DNA の配列が、共通の外来配列に由来するという 2 つの可能性を考慮することが可能となった。後者のモデルは、日本稲においては、核ゲノムのみで外来配列の挿入が起こったと考えることで、日本稲のミトコンドリアに一般にプラスミド様 DNA が存在しないという事実を説明することができる。しかしながら、門脇らにより報告されているように、原産地に近い地域で栽培されてきたイネが、4 つのプラスミド様 DNA を持つ傾向が強いという事実を考え合わせると、日本稲の祖先のミトコンドリアにもプラスミド様 DNA が存在したと考えるのが妥当なようである<sup>71)</sup>。

前節で触れたが、フジミノリの核ゲノムに存在した B4 相同配列 A は、*Oryza sativa* の祖先種に当たる *O. rufipogon* の一部には存在していたものの、*O. rufipogon* でも遠縁となるものや、*O. barthii*、*O. glaberrima* 等の種では、B4 相同配列の挿入を受けない形で存在していることが福知らにより示されている<sup>94)</sup>。この事実は、日本稲の祖先となった *O. rufipogon* で、B4 の配列が核ゲノムに挿入したことを強く示唆しており、その配列の由来はミトコンドリアのプラスミド様 DNA である可能性が極めて高い。

以上の考察から、プラスミド様 DNA と核ゲノムに存在する相同配列との関連についてまとめたものが図 31 である。第 1 章において、イネとトウモロコシのプラスミド様 DNA の配列の類似性から、それらが密接に関連したものであることが明らかになった。これらのプラスミド様 DNA が、イネとトウモロコシの祖先に当たる植物ですでに存在していたのか、あるいはイネとトウモロコシのそれぞれの祖先に当たる植物において、別々に関連した配列の取り込みが起こったかは明らかではない。しかしながら、双子葉植物の環状プラスミド様 DNA と単子葉植物のものでは、配列上の類

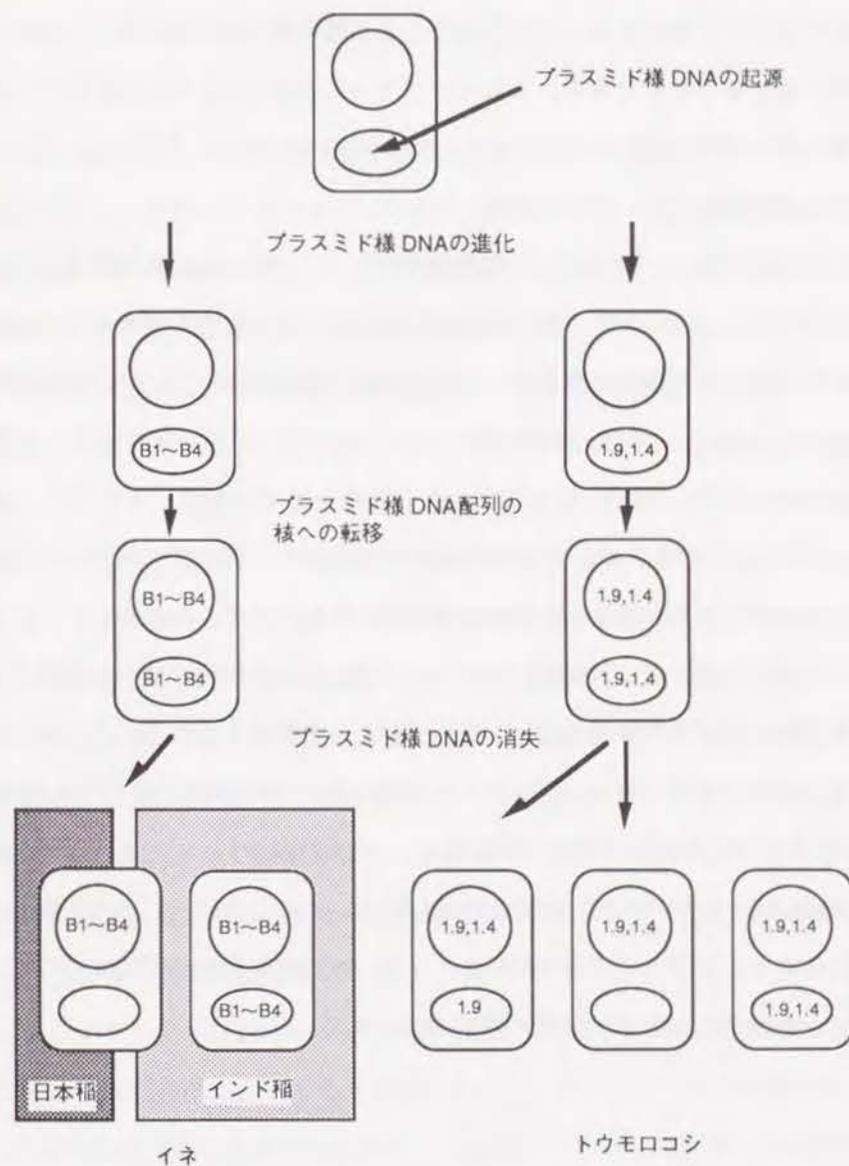


図 31 プラスミド様 DNA の配列の核への転移 円は核ゲノム、楕円はミトコンドリアゲノムを表す。B1~B4 はイネのプラスミド様 DNA、1.9、1.4 はトウモロコシのプラスミド様 DNA をそれぞれ表す。両植物で第 1 章に示したプラスミド様 DNA の進化の後、配列の一部が核ゲノムに転移した。さらに日本稲、一部のインド稲及びトウモロコシでプラスミド様 DNA の消失が起こったものと考えられる。

似性が見られないという事実を考えると、少なくとも単子葉植物の分化後にこれらの配列が生じたと考えることができる。これらのプラスミド様 DNA の起源に当たる配列は、第1章で述べたように、イネとトウモロコシの祖先に当たる植物において、それぞれの進化を経て現在の形になったと考えられる。

本章で得られた結果から、核ゲノムに存在するプラスミド様 DNA に対する相同配列は、ミトコンドリアのプラスミド様 DNA の配列が核に転移したものと考えられる。その時期は両者の配列の相同性の高さから、B1～B4 が現在の形になってからと判断される。実際、*O. rufipogon* では、すでに核ゲノムへの配列に転移の度合いに、品種間で差があるようである<sup>94)</sup>。現在、日本稲やインド稲の一部でミトコンドリアにプラスミド様 DNA が存在していないが、これらのイネでは配列の一部が核に転移した後に、ミトコンドリアのプラスミド様 DNA の消失が起こったものと考えられる。

一方トウモロコシにおいても同様に、プラスミド様 DNA の配列の核への転移と、ミトコンドリアでのプラスミド様 DNA の消失が起こったと考えられる。このように、配列的に関連を持つと考えられる、イネとトウモロコシの2つの植物のプラスミド様 DNA において、その配列の核ゲノムへの転移と、一部の植物のミトコンドリアでのプラスミド様 DNA の消失という同一の現象が見られた。このことは、これらの現象が単子葉植物に存在するプラスミド様 DNA にとって、本質的な機能に関連することを示唆しており、今後その生物学的意味の解明が望まれる。

## 結語

本研究では、イネのミトコンドリアに存在する4つの環状プラスミド様 DNA の一次構造を決定し、それらがトウモロコシの2つの環状プラスミド様 DNA と多くの相同配列を有することを明らかにした。異種植物間で、環状プラスミド様 DNA の類似性が一次構造のレベルで比較されたのは初めての例であり、それによってイネとトウモロコシにおけるプラスミド様 DNA の進化を考察することが可能となった。さらに両者に共通する特徴をトウモロコシの S1、S2 に代表される線状のプラスミド様 DNA と比較を行ったところ、環状のプラスミド様 DNA では、ウイルスとの関連を示唆するようなミトコンドリア主ゲノムからの独立性が希薄であることが明らかになった。

イネとトウモロコシのプラスミド様 DNA で保存されている配列の相同性は高く、また両者に存在することが明らかになった転写産物も、この保存されている配列を同一方向で含んでいる。この事実は、プラスミド様 DNA あるいはその転写産物が何らかの機能を持つことを示唆している。しかし日本稲のミトコンドリアには、プラスミド様 DNA の配列が全く存在しないことが明らかになり、プラスミド様 DNA がいかなる機能を持つものなのか、またその機能はミトコンドリアにとって本質的なものなのか、今後解明の望まれる問題である。

イネのプラスミド様 DNA はミトコンドリア主ゲノムとの相同性を欠くが、核ゲノムにその相同配列が存在することが明らかになった。これらの相同配列とプラスミド様 DNA の関係を明らかにする目的で、日本稲フジミノリの核ゲノムに存在するプラスミド様 DNA のクローン化と一次構造の決定を行った。その結果、フジミノリの核ゲノムには B4 の全配列を含む領域がないこと、また B4 には核ゲノムに存在しない配列があることが明らかになった。さらに B2 相同領域についても解析を行ったところ、B4 の場合と同様な結果が得られた。このことから、核ゲノムに存在するプラスミド

様 DNA に対する相同配列は、プラスミド様 DNA の配列が核ゲノムに転移したことにより生じたことが明らかになった。

## 謝辞

本研究は、京都大学農学部農芸科学化山田康之教授のもとに行ったものであり、その御指導、御鞭撻に対して深く感謝の念を捧げます。研究活動全般にわたり貴重な御助言、御指導をいただきました佐藤文彦博士、橋本隆博士をはじめとして分子細胞育種学講座の方々に心より御礼申し上げます。また共同研究者として終始御助力いただきました楊志琦博士、福知正子氏、Valery G. Kossykh 博士に心より感謝いたします。

塩基配列のコンピューター解析をはじめ、適切なアドバイスをいただきました大山莞爾教授ならびに植物分子生物学講座の皆様に深く感謝いたします。

最後に、研究を遂行するにあたり終始変わらぬ御支援をくださった株式会社ニチレイ専務取締役伊東克博士に御礼申し上げます。

## 文献

1. S.Anderson, A.T.Bankier, B.G.Barrell, M.H.L.de Bruijn, A.R.Coulson, J.Drouin, I.C.Eperon, D.P.Nierlich, B.A.Roe, F.Sanger, P.H.Schreier, A.J.H.Smith, R.Staden & I.G.Young (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465
2. M.J.Bibb, R.A.Van Etten, C.T.Wright, M.W.Walberg & D.A.Clayton (1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26, 167-180
3. S.Anderson, M.H.L.De Bruijn, A.R.Coulson, I.C.Eperon, F.Sanger & I.G.Young (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *J.Mol.Biol.* 156, 683-717
4. J.F.H.Wong, D.P.Ma, R.K.Wilson & B.A.Roe (1983) DNA sequences of the *Xenopus laevis* mitochondrial heavy and light strand replication origins and flanking tRNA genes. *Nucl.Acids Res* 11, 4977-4995
5. D.O.Clary & D.R.Wolstenholme (1984) The *Drosophila* mitochondrial genome, in Oxford Surveys on Eukaryotic Genes. vol.1
6. L. Simpson (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu.Rev.Microbiol.* 41, 363-382
7. M.de Zamaroczy & G.Bernardi (1985) Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast - a review. *Gene* 37, 1-17
8. T.A.Brown, R.B.Waring, C.Scazzocchio & R.W.Davies (1985) The *Aspergillus nidulans* mitochondrial genome. *Curr.Genet.* 9, 113-117
9. B.L.Ward, R.S.Anderson & A.J.Bendich (1981) The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (*Cucurbitaceae*). *Cell* 25, 793-803
10. J.D.Palmer & C.R.Shields (1984) Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* 307, 437-440
11. J.D.Palmer & L.A.Herbon (1986) Tricircular mitochondrial genomes of *Brassica* and *Raphanus*: reversal of repeat configurations by inversion. *Nucl.Acids Res.* 14, 9755-9764
12. D.B.Stern & J.D.Palmer (1986) Tripartite mitochondrial genome of spinach: physical structure, mitochondrial gene mapping, and locations of transposed chloroplast DNA sequences. *Nucl.Acids Res.* 14, 5651-5666
13. F.Quetier, B.Lejeune, S.Delorme & D.Falconet (1985) Molecular organization and expression of the mitochondrial genome of higher plants. In Encyclopedia of Plant Physiology 18, 25-86 (Berlin: Springer-Verlag)
14. D.M.Lonsdale, T.P.Hodge & C.M.R. Fauron (1984) The physical map and organization of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. *Nucl.Acids Res.* 12, 9249-9261
15. J.D.Palmer & L.A.Herbon (1987) Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr.Genet.* 11, 565-570
16. D.B.Stern & D.M.Lonsdale (1982) Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12-kilobase DNA sequence in common. *Nature* 229, 698-702
17. D.B.Stern & J.D.Palmer (1984) Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81, 1946-1950
18. K.Shinozaki, M.Ohme, M.Tanaka, T.Wakasugi, N.Hayashida, T.Matubayashi, N.Zaita, J.Chunwongse, J.Obokata, K.Yamaguchi-shinozaki, C.Ohto, K.Torazawa, B.Y.Meng, M.Sugita, H.Deno, T.Kamogashira, K.Yamada, J.Kusuda, F.Takaiwa, A.Kato, N.Tohdoh, H.Shimada & M.Sugiura (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5,2043-2049

19. D.R.Pring, C.S.Levings III, W.W.L.Hu & D.H.Timothy (1977) Unique DNA associated with mitochondria in the "S" - type cytoplasm of male-sterile maize. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.* 74, 2904-2908
20. C.S.Levings III, B.D.Kim, D.R.Pring, M.F.Conde, R.J.Mans, J.R.Laughnan & S.J.Gabay-Laughnan (1980) Cytoplasmic reversion of *cms-S* in maize: association with a transpositional event. *Science* 209, 1021-1023
21. C.L.Schardl, D.M.Lonsdale, D.R.Pring & K.R.Rose (1984) Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes. *Nature* 310, 292-296
22. C.L.Schardl, D.R.Pring & D.M.Lonsdale (1985) Mitochondrial DNA rearrangements associated with fertile revertants of S-type male-sterile maize. *Cell* 43, 361-368
23. B.G.Forde, R.J.C.Oliver & C.J.Leaver (1978) Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 75, 3841-3845
24. B.G.Forde & C.J.Leaver (1980) Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 77, 418-422
25. R.E.Dewey, C.S.Levings III & D.H.Timothy (1986) Novel recombination in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* 44, 439-449
26. W.H.Rottmann, T.Brears, T.P.Hodge & D.M.Lonsdale (1987) A mitochondrial gene is lost via homologous recombination during reversion of CMS T maize to fertility. *EMBO J.* 6, 1541-1546
27. L.K.Dixon & C.J.Leaver (1982) Mitochondrial sensitivity to *Drechslera maydis* T-toxin and the synthesis of a variant mitochondrial polypeptide in plants derived from maize tissue cultures with Texas male-sterile cytoplasm. *Theor.Appl.Genet.* 63, 75-80
28. R.P.Wise, D.R.Pring & B.G.Gengenbach (1987) Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T)-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 84, 2858-2862
29. E.G.Young & M.R.Hanson (1987) A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50, 41-49
30. K.Kadowaki, T.Suzuki & S.Kazama (1990) A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. *Mol.Gen.Genet.* 224, 10-16
31. F.E.Nargang (1985) Fungal mitochondrial plasmids. *Experimental Mycology* 9, 285-293
32. M.Paillard, R.R.Sederoff & C.S.Levings III (1985) Nucleotide sequence of the S-1 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *EMBO J.* 4, 1125-1128
33. C.S.Levings III & R.R.Sederoff (1983) Nucleotide sequence of the S-2 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80, 4055-4059
34. R.J.Kemble & R.D.Thompson (1982) S1 and S2, the linear mitochondrial DNAs present in a male sterile line of maize, possess terminally attached proteins. *Nucl.Acids Res.* 10, 8181-8190
35. E.V.Kuzmin & I.V.Levchenko (1987) S1 plasmid from *cms-S*-maize mitochondria encodes a viral type DNA-polymerase. *Nucl.Acids Res.* 15, 6758
36. E.V.Kuzmin & I.V.Levchenko (1988) S2 plasmid from *cms-S*-maize mitochondria potentially encodes a specific RNA polymerase. *Nucl.Acids Res.* 16, 4177

37. R.R.Sederoff, P.Ronald, P.Bedinger, C.Rivin, V.Walbot, M.Bland & C.S.Levings III (1986) Maize mitochondrial plasmid S-1 sequences share homology with chloroplast gene *psbA*. *Genetics* 113, 469-482
38. R.J.Kemble, R.E.Gunn & R.B.Flavell (1983) Mitochondrial DNA variation in races of maize indigenous to Mexico. *Theor.Appl.Genet.* 65, 129-144
39. P.Bedinger, E.L.de Hostos, P.Leon & V.Walbot (1986) Cloning and characterization of a linear 2.3 kb mitochondrial plasmid of maize. *Mol.Gen.Genet.* 205, 206-212
40. P.Leon, V.Walbot & P.Bedinger (1989) Molecular analysis of the linear 2.3 kb plasmid of maize mitochondria: apparent capture of tRNA. *Nucl.Acids Res.* 17, 4089-4099
41. J.D.Palmer, C.R.Shields, D.B.Cohen & T.J.Orton (1983) An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus *Brassica*. *Nature* 301, 725-728
42. L.Erickson, W.D.Beversdorf & K.P.Pauls (1985) Linear mitochondrial plasmid in *Brassica* has terminal protein. *Curr. Genet.* 9, 679-682
43. T.Turpen, S.J.Garger, M.D.Marks & L.K.Grill (1987) Molecular cloning and physical characterization of a *Brassica* linear mitochondrial plasmid. *Mol.Gen.Genet.* 209, 227- 233
44. D.R.Pring, M.F.Conde, K.F.Schertz & C.S.Levings III (1982) Plasmid-like DNAs associated with mitochondria of cytoplasmic male-sterile *Sorghum*. *Mol.Gen.Genet.* 186, 180-184
45. C.D.Chase & D.R.Pring (1986) Properties of the linear N1 and N2 plasmid-like DNAs from mitochondria of cytoplasmic male-sterile *Sorghum bicolor*. *Plant Mol.Biol.* 6, 53-64
46. A.K.Weissinger, D.H.Timothy, C.S.Levings III, W.W.L.Hu & M.M.Goodman (1982) Unique plasmid-like mitochondrial DNAs from indigenous maize races of Latin America. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79, 1-5
47. D.H.Timothy, C.S.Levings III, W.W.L.Hu & M.M.Goodman (1983) Plasmid-like mitochondrial DNAs in diploperennial teosinte. *Maydica* 28, 139-149
48. K.Kadowaki & K.Harada (1989) Differential organization of mitochondrial genes in rice with normal and male-sterile cytoplasms. *Japan J.Breed.* 39,179-186
49. P.Saumitou-Laprade, G.Pannenbecker, F. Maggouta, R.Jean & G.Michaelis (1989) A linear 10.4 kb plasmid in the mitochondria of *Beta maritima*. *Curr.Genet.* 16, 181-186
50. R.J.Kemble & J.R.Bedbrook (1980) Low molecular weight circular and linear DNA in mitochondria from normal and male-sterile *Zea mays* cytoplasm. *Nature* 284, 565-566
51. J.E.Carlson & R.J.Kemble (1985) Variable presence of the 1.94 kb mitochondrial plasmid in maize S cytoplasm and its relationship to cytoplasmic male sterility. *Plant Mol.Biol.* 4, 117-123
52. S.R.Ludwig, R.F.Pohlman, J.Vieira, A.G.Smith & J.Messing (1985) The nucleotide sequence of a mitochondrial replicon from maize. *Gene* 38, 131-138
53. A.G.Smith & D.R.Pring (1987) Nucleotide sequence and molecular characterization of a maize mitochondrial plasmid-like DNA. *Curr.Genet.* 12, 617-623
54. C.D.Chase & D.R.Pring (1985) Circular plasmid DNAs from mitochondria of *Sorghum bicolor*. *Plant Mol.Biol.* 5, 303-311
55. H.Yamaguchi & H.Kakiuchi (1983) Electrophoretic analysis of mitochondrial DNA from normal and male sterile cytoplasms in rice. *Jpn.J.Genet.* 58, 607-611

56. T.Shikanai, Z.Q.Yang & Y.Yamada (1987) Properties of the circular plasmid-like DNA B1 from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. *Plant Cell Physiol.* 28, 1243-1251
57. T.Shikanai, Z.Q.Yang & Y.Yamada (1989) Nucleotide sequence and molecular characterization of plasmid-like DNAs from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. *Curr.Genet.* 15, 349-354
58. T.Shikanai & Y.Yamada (1988) Properties of the circular plasmid-like DNA, B4, from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. *Curr.Genet.* 13, 441-443
59. A.Powling (1981) Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugarbeet with normal and male sterile cytoplasm. *Mol.Gen.Genet.* 183, 82-84
60. C.M.Thomas (1986) The nucleotide sequence and transcription of minicircular mitochondrial DNA's associated with male-fertile and cytoplasmic male-sterile lines of sugarbeet. *Nucl.acids Res.* 14, 9353-9370
61. B.M.Hansen & K.A.Marcker (1984) DNA sequence and transcription of a DNA minicircle isolated from male-fertile sugar beet mitochondria. *Nucl.Acids Res.* 12, 4747-4756
62. I.D.Nikiforova & V.I.Negruk (1983) Comparative electrophoretical analysis of plasmid-like mitochondrial DNAs in *Vicia faba* and in some other legumes. *Planta* 157, 81-84
63. J.A.Wahleithner & D.R.Wolstenholme (1987) Mitochondrial plasmid DNAs of broad bean: nucleotide sequences, complex secondary structures, and transcription. *Curr.Genet.* 12, 55-67
64. P.Leroy, S.Bazetoux, F.Quetier, J.Delbut & A.Berville (1985) A comparison between mitochondrial DNA of an isogenic male-sterile (S) and male-fertile (F) couple (HA89) of sunflower. *Curr.Genet.* 9, 245-251
65. C.Perez, B.Dujon, P.Heizmann & A.Berville (1988) Sequence of a mitochondrial plasmid of sunflower (*Helianthus annuus*) and its relationship to other mitochondrial plasmids. *Plant Sci.* 58, 59-69
66. D.Crouzillat, L.Gentzbittel, L. de la Canal, C.Vaury, A.Perrault, P.Nicolas & G.Ledoigt (1989) Properties and nucleotide sequence of a mitochondrial plasmid from sunflower. *Curr.Genet.* 15, 283-289
67. L.de la Canal, D.Crouzillat, M.C.Flamand, A.Perrault, M.Boutry & G.Ledoigt (1991) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a mitochondrial plasmid from a cytoplasmic male-sterile line of sunflower. *Theor.Appl.Genet.* 81, 812-818
68. R.M.Goraczniak & K.Augustyniak (1989) Characterization and sequence of lupin mitochondrial plasmid-like DNA. *Curr.Genet.* 16, 469-471
69. S.Nawa, Y.Sano & T.Fujii (1985) Analysis of mitochondrial DNA in cytoplasmic male-sterile rice. *Rice Genet.Newsletter* 3, 98-99
70. E.M.Linsmaier & F.Skoog (1967) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant* 18, 100-127
71. Y.Yamada, Z.Q.Yang & D.T.Tang (1986) Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 5, 85-88
72. T.Maniatis, E.F.Fritsch & J.Sambrook (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
73. K.Yamato, Y.Ogura, T.Kanegae, Y.Yamada & K.Ohyama (1992) Mitochondrial genome structure of rice suspension culture from cytoplasmic male-sterile line (A-58 CMS): reappraisal of the master circle. *Theor.Appl.Genet.* 83, 279-288
74. A.P.Feinberg & B.Vogelstein (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* 132, 6-13

75. E.M.Southern (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98, 503-517
76. J.A.Wahleithner & D.R.Wolstenholme (1988) Origin and direction of replication in mitochondrial plasmid DNAs of broad bean, *Vicia faba*. *Curr.Genet.* 14, 163-170
77. K.Kadowaki, K.Yazaki, T.Osumi, K.Harada, M.Katsuta & M.Nakagahra (1988) Distribution of mitochondrial plasmid-like DNA in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) and its relationship with varietal groups. *Theor.Appl.Genet.* 76, 809-814
78. A.G.Smith, P.S.Chourey & D.R.Pring (1987) Replication and amplification of the small mitochondrial DNAs in a cell suspension of Black Mexican Sweet maize. *Plant Mol.Biol.* 10, 83-90
79. C.Yanisch-Perron, J.Vieira & J.Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19vectors. *Gene* 33, 103-119
80. 田仲可昌 (1984) 植物遺伝子工学マニュアル 講談社サイエンティフィック
81. F.Sanger, S.Nicklen & A.R.Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 74, 5463-5467
82. D.R.Pring & D.M.Lonsdale (1985) Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA. *Int.Rev.Cytol.* 97, 1-46
83. Z.Q.Yang, T.Shikanai & Y.Yamada (1988) Asymmetric hybridization between cytoplasmic male-sterile (CMS) and fertile rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts. *Theor.Appl.Genet.* 76, 801-808
84. Z.Q.Yang, T.Shikanai, T.Mori & Y.Yamada (1989) Plant regeneration from cytoplasmic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor.Appl.Genet.* 77, 305-310
85. K.Mori (1991) Expression of male sterility and transmission of plasmids in CMS cytoplasm in rice. Third International Workshop on Rice Molecular Biology 43
86. P.L.Traynor & C.S.Levings III (1986) Transcription of the S-2 maize mitochondrial plasmid. *Plant Mol.Biol.* 7, 255-263
87. K.P.lams, J.E.Heckman & J.H.Sinclair (1985) Sequence of histidyl tRNA, present as a chloroplast insert in mtDNA of *Zea mays*. *Plant Mol.Biol.* 4, 225-232
88. W.Schuster & A.Brennicke (1987) Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequences in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA? *EMBO J.* 6, 2857-2863
89. W.Schuster & A.Brennicke (1987) Plastid DNA in the mitochondrial genome of *Oenothera*: Intra- and interorganellar rearrangements involving part of the plastid ribosomal cistron. *Mol.Gen.Genet.* 210, 44-51
90. E.Moon, T.H.Kao & R.Wu (1988) Rice mitochondrial genome contains a rearranged chloroplast gene cluster. *Mol.Gen.Genet.* 213, 247-253
91. H.Wintz, H.C.Chen & D.T.N.Pillay (1988) Presence of a chloroplast-like elongator tRNA<sup>Met</sup> gene in the mitochondrial genomes of soybean and *Arabidopsis thaliana*. *Curr.Genet.* 13, 255-260
92. H.Wintz, J.M.Grienenberger, J.H.Weil & D.M.Lonsdale (1988) Location and nucleotide sequence of two tRNA genes and a tRNA pseudo-gene in the maize mitochondrial genome: evidence for the transcription of a chloroplast gene in mitochondria. *Curr.Genet.* 13, 247-254
93. J.M.Nugent & J.D.Palmer (1988) Location, identity, amount and serial entry of chloroplast DNA sequences in crucifer mitochondrial DNAs. *Curr.Genet.* 14, 501-509

94. 福知正子 (1991) イネミトコンドリアに存在するプラスミド様 DNA の転移について 京都大学修士論文
95. W.Sakamoto, K.Kadowaki, N.Kishimoto, M.Yano, A.Saito & S.Tano (1991) RFLP analysis of nuclear DNAs homologous with mitochondrial plasmid-like DNAs in cultivated rice. *Theor.Appl.Genet.* 82, 179-184
96. M.Fukuchi, T.Shikanai, V.G.Kossykh & Y.Yamada (1991) Analysis of nuclear sequences homologous to the B4 plasmid-like DNA of rice mitochondria; evidence for sequence transfer from mitochondria to nuclei. *Curr.Genet.* 20, 487-494
97. W.J.Dower, J.F.Miller & C.W.Ragsdale (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl.Acids Res.* 16, 6127-6145
98. W.Y.Cheung & N.S.Scott (1989) A contiguous sequence in spinach nuclear DNA is homologous to three separated sequences in chloroplast DNA. *Theor.Appl.Genet.* 77, 625-633
99. D.L.Whisson & S.Scott (1985) Nuclear and mitochondrial DNA have sequence homology with a chloroplast gene. *Plant Mol.Biol.* 4, 267-273
100. E.Pichersky & S.D.Tanksley (1988) Chloroplast DNA sequences integrated into an intron of a tomato nuclear gene. *Mol.Gen.Genet.* 215, 65-68
101. E.Pichersky, J.M.Logsdon Jr, J.M.McGrath & R.A.Stasys (1991) Fragments of plastid DNA in the nuclear genome of tomato: prevalence, chromosomal location, and possible mechanism of integration. *Mol.Gen.Genet.* 225, 453-458