

博士論文

イネ CW 型細胞質雄性不稔性における雄性不稔性発現及び稔性回復システムに
関する分子遺伝学的解析

Molecular genetic analysis on the occurrence and restoration mechanism of rice
CW-type cytoplasmic male sterility.

東北大学大学院・農学研究科

応用生命科学専攻

藤井 壮太

目次	
略語一覧	・・・2
序論	・・・4
第一章 RTG シグナリングに主眼を置いた CW-CMS 雄性不稔性発現メカニズムの解析	・・・11
第一節 CW-CMS イネにおける遺伝子発現の網羅的発現解析	・・・12
第二節 ミトコンドリア局在 Protein phosphatase 2C である DCW11 の CMS への関わり	・・・29
第三節 <i>DCW11</i> ノックダウンによって発現が抑制される NIMA-related protein kinase, <i>OsNek3</i> の機能	
解析	・・・57
第二章 CW-CMS イネのミトコンドリアゲノムの遺伝学的解析	・・・72
第一節 Pyrosequencing 法による 2 種類の CMS イネミトコンドリアゲノムの解析	・・・73
第二節 CW-CMS 系統のミトコンドリアに特有な遺伝子のゲノム構造および発現解析	・・・90
第三章 CW-CMS に対する稔性回復遺伝子 <i>Rf17</i> のポジショナルクローニング	・・・104
総合考察	・・・134
結語	・・・141
謝辞	・・・143
引用文献	・・・144
Supplementary Figures & Supplementary Tables	・・・176

略語一覧

AOX: Alternative oxidase

ARF: ADP-ribosylation factor

BAC: Bacterial artificial chromosome

BCIP: 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl phosphate p-toluidine salt

CaMV35S: Cauliflower mosaic virus 35S

CES: Control of epistacy

CMS: Cytoplasmic male sterility

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DBA: DCW11-binding ADP ribosylation factor

DCW: Down-regulated in CW

FDA: Fluorescein diacetate

GC-FID: Gas chromatograph-flame ionization detector

GFP: Green fluorescent protein

GST: Glutathione S-transferase

IC: Intergenomic compatibility

IE: Intergenomic epistasy

InDel: Insertion/ Deletion

KAS: Keto-acyl-carrier protein synthase

Kb: Kilo base-pair

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MAS: Marker-assisted selection

Mb: Mega base-pair

MCAG: Mitochondrial CMS-associated gene

mRFP: Monomeric red fluorescent protein

MTP: Mitochondrial Targeting peptide

NBT: Nitro Blue Terazolium

略語一覧 続き

ORF: Open reading frame

OsNek: Oryza sativa NIMA-related protein kinase

PP2C: Protein phosphatase 2C

PPR: Pentatricopeptide repeat

Rf: Restorer of fertility

RMS: Retrograde regulated male sterility

RNAi: RNA interference

RTG: Retrograde

SNP: Single nucleotide polymorphism

SSS: Substoichiometric shifting

TPR: Tetratricopeptide repeat

Y2H: Yeast two hybrid

序論

ミトコンドリアは真核生物の生活環にとってなくてはならない細胞内小器官であり、呼吸器官であることは良く知られている。細胞内共生以来ミトコンドリアゲノム DNA は進化につれ縮小されていった。 *Homo sapiens*(ヒト)を例にとると、ヒトは約 17kb のミトコンドリア DNA を持ち、わずか 13 遺伝子のみがミトコンドリアコードとして残っている(Anderson et al. 1981)。一方で、ミトコンドリアの起源であると考えられている α プロテオ細菌に属する *Rickettsia prowazekii* は約 1.1 Mb のゲノムを持ち、834 個の遺伝子を持っている(Andersson et al. 1998)。ミトコンドリア自身の機能はそのほとんどが略奪され独自のみで生活する能力を失っていったと考えられる。

細胞内におけるミトコンドリアの主な役割はエネルギー産生であり、エネルギー産生は電子伝達によって行われる。電子伝達は活性酸素産生を伴う危険の高い ATP 合成系であるため、ミトコンドリアは常に危険に晒されている。さらに、ミトコンドリア DNA はヒストンなどによって保護されていないと考えられているため、活性酸素など変異源による影響を受けやすいと考えられる(Morrow and Tanguay 2008)。従って、危険なプロセスを伴うミトコンドリアからは DNA を移行する必要があり、僅かに緊急性の高い遺伝子のみを残すように進化してきたと考えられている。これらの遺伝子は高等動物では非常に良く保存されているため、ミトコンドリアに残存する意義があると考えられているが真相は定かではない。

以上の様に、ミトコンドリアは独自では既に生存不可であるため、核ゲノムはミトコンドリアを利用するために多数のタンパク質を送り込み、その機能を補っている。植物でミトコンドリアに局在すると予測されている 2,000-3,000 のタンパク質のうち、およそ 30-40 のみがミトコンドリアコードである(Millar et al. 2006)。核コードのものうちの多くはミトコンドリアコード遺伝子の転写・転写後制御・翻訳制御に関わっている。例えば、植物のミトコンドリアにコードされている遺伝子に RNA ポリメラーゼ様のものは見つかっていない。 *Arabidopsis* では、ほ乳類などでオルガネラ遺伝子の転写に関わっていると考えられる Phage-type RNA polymerase を 3 つ核でコードしており、そのうちのひとつがミトコンドリアにのみ局在すると考えられている(Hedtke et al. 1997)。また、ミトコンドリア遺伝子は原核生物型と真核生物型の中間のシステムによる転写調節がなされていると考えられている(Anderson et al. 1981)。例えば、多くの遺伝子はポリシストロニック転写産物を形成しており、一つの mRNA から異なる種類の翻訳産物が生み出される。遺伝子の中では、ポリシストロニック mRNA が成熟 mRNA に至るまでには、スプライシング、プロセッシングあるいは RNA エディティングなどを経なければいけないもの

が多い。従って、ミトコンドリアの転写・翻訳系は核コードのタンパク質に依存的である。

上記の理由から、電子伝達系などの主要な機能を担うタンパク質複合体はミトコンドリアコードのものと核ゲノムコードのものの混成で成り立っていることが知られている。従って、仮にある環境変化に置かれたとき、細胞はミトコンドリアの機能を核ゲノムによる仲介によって制御する必要がある。これに対する最も簡単な方法として、余剰の mRNA プールを作成してストックしておくといった措置が考えられるが、これは非効率なシステムであり、採用されているとは考えづらい(Pogson et al. 2008)。そこで、核ゲノムには、ミトコンドリアがどのタンパク質を、どれだけ必要なのかを感知するシステムが存在すると考えられる。

核はオルガネラの状態を感知、そしてコントロールするために、主に 2 つの手段を用いていることが知られている。一つは Control by Epistasy of Synthesis (CES) と呼ばれる制御であり、オルガネラ内の様々なサブユニットの相互調節機構の存在が示唆されている。もう一つは Retrograde (RTG) regulation である。核ゲノムがミトコンドリアにタンパク質を送り込み、転写・翻訳などの機能を調節することは一般に Anterograde regulation と呼ばれており、RTG regulation はその逆であると考えられている。まず CES であるが、例えばあるタンパク質複合体について、取り込まれないサブユニットが余剰にある場合、その他のサブユニットの転写・翻訳も抑制される機構である。例えば yeast のミトコンドリアでは、Mss51 と呼ばれる翻訳因子が *Cytochrome c oxidase 1 (COX1)* mRNA に働きかけ、他のサブユニットが存在しない条件下でその発現を抑制するという CES が知られている (Zambrano et al. 2007)。ただし CES が核コードのサブユニットに適応された例は知られていない。これはオルガネラが遺伝子を保持し続けている理由の一つであり、核に移行されてしまった場合、CES が行われなくなるという可能性が示唆されている (Zerges et al. 2002, Pogson et al. 2008)。その一方、RTG regulation は、ミトコンドリアから放出される分子シグナルを核コードの受容タンパク質などを用いて感知し、その後タンパク質ネットワークを介して核遺伝子発現制御が行われる一連のシグナル伝達を指す。酵母をモデルとしての研究が有名であるが、例えば EtBr など処理してミトコンドリアゲノムを欠損させると、*CIT2* 遺伝子の発現が顕著に増加するといった現象が知られている (Parikh et al., 1987; Epstein et al., 2001; Traven et al., 2001)。この経路には、Rtg1、Rtg3 (bHLH transcription factor, Liao and Butow 1993, Jia et al. 1997, Sekito et al. 2000), Rtg2 (HSP70/sugar kinase/actin ATP binding domain, Liao and Butow 1993, Sekito et al. 2002, Liu et al. 2003) などのポジティブレギュレーターや、Mks1p (unknown, Liu et al. 2003) や Bmh1, Bmh2 (14-3-3 protein, Liu et al. 2003) などのネガティブレギュレーターが存在が知られている (RTG pathway, Butow and Avadhani, 2004)。転写因子である Rtg1 と Rtg3 は

通常時では細胞質に局在するが、ミトコンドリアストレス時には核に局在し、*CIT2*の発現を促すと考えられている(Butow and Avadhani, 2004)。ミトコンドリアがカルシウムイオンの放出を行い、CDPKなどがそのカルシウム濃度の上昇を感知、そして下流に核遺伝子発現の情報を伝える経路なども良く知られている(Rizzuto et al. 1993, Biswas et al. 2003, Butow and Avadhani 2004)。これらのRTG シグナリングのモデルにおいて、タンパク質を仲介したネットワークの存在が強く示唆されている。また *Drosophila melanogaster* ではミトコンドリアの呼吸鎖複合体サブユニットの変異体は複眼形成に異常が見られるが、p53 pathway の異常制御を引き起こす Retrograde signaling によって細胞分裂が抑制されていると考えられている(Mandal et al. 2005, Owusu-Ansah et al. 2008)。

CES や RTG シグナリングは植物の色素体においても同様の現象の存在が知られている。*Chlamydomonas* におけるPSII タンパク質(Wostrikoff et al. 2004, Minai et al. 2006) や、タバコにおけるRubiscoの調節(Wostrikoff and Stern 2007)においてCES制御の存在が確認されている。また、除草剤であり、カロテノイド合成を抑制するnorflurazonを処理すると、色素体の機能欠損に伴うかのように核コードのLight harvesting complex (a/b) binding (Lhcb) proteinの遺伝子発現が抑制されることが知られている(Oelmuller and Mohr 1986)。これは色素体欠損による余剰なタンパク質を生み出さないためのメカニズムであり、色素体の状態に合わせるRTGシグナリングを介して行われていると考えられている。1993年にSusek et al.によってLhcbプロモーターにuidA遺伝子を連結したコンストラクトを導入した植物に変異源処理を行い、norflurazon添加時にLhcb抑制が起きない変異体の単離が行われた(Susek et al. 1993)。これらの変異体はgenomes uncoupled (*gun*)と命名され、植物RTGシグナリング研究のさきがけとなった。現在、*gun*変異体は5つが見出されており、*gun2*、*gun3*、*gun4*、*gun5*変異体は、いずれもカロテノイド合成系に関わる酵素のサブユニットをコードする遺伝子に変異が挿入されていたことが明らかにされた(Mochizuki et al. 2001, Larkin et al. 2003)。*gun1*はその他の*gun*変異体とは異なり、Pentatricopeptide repeat(PPR)モチーフを持つタンパク質が原因であることが分かった(Koussevitzky et al. 2007, Woodson and Chory 2008)。しかし、植物ミトコンドリアにおけるCESの存在は現在までに示唆されておらず、RTGシグナリングについても分子機構は不明である。

植物の細胞質雄性不稔性(Cytoplasmic Male Sterility: CMS)はミトコンドリアが原因とされる現象である。1931年、Rhoadesによってトウモロコシで報告されて以来、150種以上の植物種で存在が知られている。母性遺伝性の現象であり、葯や花粉等、雄性生殖器官に特異的な機能障害、形成障害などが見られる。その雄性不稔形質より、F₁ハイブリッド品種育成に広く用いられている。興味深い事に、その表現型は種内でも多様である。例えば、

トウモロコシ T 型 CMS の場合、明らかな葯の形成異常が見られるのに対し、S 型 CMS では孢子体形成には異常は見られず、花粉形成にのみ異常が見られる。イネでは、さらに様々な表現型を示す CMS 系統の存在が知られている(Fujii et al. 2008)。また、種間あるいは属間交雑によって作成した CMS 系統(Alloplasmic CMS)はしばしば葯組織そのものの形態異常が見られ、例えばコムギなどの異質細胞質置換系統では homeotic change により葯が雌蕊に変換してしまうといった現象が知られている(Murai et al. 2002)。

CMS の原因については長らく不明であったが、1970 年、T 型 CMS を持つ系統にのみ感染する Southern Corn Leaf Blight によってハイブリッド品種が大打撃を受けたことから原因に対するヒントが生まれた。感染源である *Helimonthosporium maydis* race T の毒素は T 型 CMS のミトコンドリアにのみ効果をもたらすことが分かった(Millar and Koeppel 1971)。(i)CMS は細胞質遺伝する、(ii)*H. maydis* は T 型 CMS ミトコンドリアにのみ病原性を示す、この 2 つの鍵から、CMS はミトコンドリアが原因であるという可能性が示唆された。その後、花粉発達時におけるミトコンドリアの形態異常が報告され(Warmke and Lee 1977)、同じく T 型 CMS のミトコンドリアゲノムの構造は通常の系統のものと異なっていることがサザンブロットによって証明された(Levings and Pring 1976)。その後も、トウモロコシをモデルに研究が進められ、ミトコンドリアの *T-urf13* と呼ばれる 13 kDa の機能不明のタンパク質をコードする遺伝子が CMS 系統にユニークな ORF として見出された(Dewey et al. 1987, Dewey et al. 1988)。通常、T-CMS 系統は培養細胞から再分化することはできないが、再分化した系統は *T-urf13* 領域に変異を起こしており、花粉稔性が回復していた(Rottman et al. 1987)。中には 5 bp の欠失により *T-urf13* に premature 終止コドンが生じた系統もあり、改めて *T-urf13* が CMS 原因遺伝子であることが確認された(Wise et al. 1987)。T-urf13 タンパク質はミトコンドリア内膜でオリゴマーを形成し、内膜を貫通していることが示唆された(Hack et al. 1991)。このようなゲノム構造は多種でも知られており、様々な CMS 原因遺伝子(Mitochondrial CMS Associated Gene: MCAG)が知られている。それらについては第二章で考察する。

CMS を考察するにおいて欠かせないのが核コードの稔性回復遺伝子(*Restorer of fertility, Rf*)である。*Rf* が存在するとき、CMS 系統の花粉稔性が回復される。戻し交配によって生じる CMS では、*Rf* が失われることによって CMS が引き起こされる。トウモロコシ T-CMS においては、古典遺伝学的に 2 つの *Rf* が認められており、それぞれ *Rf1*、*Rf2* と命名されている(Schnable and Wise 1994, Wise et al. 1996)。それぞれ孢子体型に作用する *Rf* であり、ヘテロ個体でも完全に花粉稔性が回復する。*Rf1* は *T-urf13* の蓄積を抑えることが分かっているのに対し、*Rf2* は *T-urf13* の蓄積に影響を与えない(Cui et al. 1996)。*Rf2* はトランスポゾンタギングにより単離・同定され、

Aldehyde dehydrogenase 2b(ALDH2b)をコードしていることが示された(Cui et al. 1996). さらに Rf2 は実際に ALDH 活性を保持し、花粉稔性に必要な因子であることが証明された(Liu et al. 2001). Rf2 は直接 T-urf13 を除去するわけではなく、呼吸の際に蓄積する acetaldehyde を無毒化し、T-CMS の稔性回復におけるバイパスを作る酵素であると言える。近年、様々な種からの Rf クローニングが行われているが、そのことについては第 2 章で説明する。

このように T-CMS では MCAG 及び Rf について分子機構の理解が進んでいるが、MCAG によって CMS が引き起こされる経緯についての詳細は未解明である。T-urf13 はミトコンドリア内膜を貫通しており、ATP 産生に必要なプロトン勾配などを崩しているという可能性も示唆されている。T-urf13 を含めた様々な種の MCAG 産物はしばしば全身で発現することが知られている(Chase 2007)。ATP 合成は全ての植物組織において必要であると考えられるため、一見 CMS の雄性器官特異的な欠陥という特徴と矛盾する様に思える。さらに、CMS が単純に呼吸活性の損傷に因らない理由として、ミトコンドリア機能欠損変異体の形態変化が雄性器官のみに留まらないことが挙げられる。例えば、トウモロコシのミトコンドリア Cytochrome c oxidase 2 (COX2) の欠損変異体 *non-chromosomal stripe 5 (ncs5)* では、葉に異常な縞模様が生じることが知られている(Newton et al. 1990)。また、タバコの CMS-I、CMSII-変異体はプロトプラスト培養によって生じた変異により NADH dehydrogenase のサブユニットをコードする *nad7* を失っており、通常の系統と比較して明瞭な生育不良を示す(Chetrit et al. 1992, Pla et al. 1995, Gutierrez et al. 1997)。近年ではモデル植物であるシロイヌナズナのゲノム情報や変異系統が充実しており、スプライシング不全により NADH dehydrogenase の機能欠損を引き起こす *css* 変異体や *otp43* 変異体が知られている(Nakagawa et al. 2006, Falcon de Longevialle et al. 2007)。これらの変異体の原因遺伝子はミトコンドリア *nad* 遺伝子の正常な mRNA スプライシングなどに関与していた。その他、ミトコンドリア遺伝子の機能欠損変異体は通常、様々な植物種で栄養器官の形態形成異常を引き起こすことが分かってきた。すなわち、ミトコンドリアの Loss-of-function 変異体では、結果的に雄性不稔性が引き起こされることはあるが、植物体の生育そのものの異常による多面的な影響が否定できない。一方、CMS においては雄性器官特異的な形成異常が見られ、雌蕊の能力でさえも正常であると考えられている。CMS 系統に特異的に存在する MCAG を考慮に含めると、CMS はミトコンドリア遺伝子の機能の消失によって引き起こされていると考えるよりも、新規遺伝子の獲得すなわち Gain-of-function によって引き起こされていると考えるべきである。本博士論文では、ミトコンドリアの Loss-of-function 変異体と CMS を区別して記述する。これらの変異体の区別についての考察は総合考察で行う事

とする。

このような考え方から、CMS においては新規の核-ミトコンドリア間のシグナル伝達が存在するとの推察がなされており、近年研究が行われている。例えば、*Nicotiana tabacum* と *Hyoscyamus niger* のサイブリッドである異質CMS系統においては、花器官のhomeoticな形態異常が知られている(Zubko et al. 2001)。この系統ではMADS box 遺伝子群のクラス B 遺伝子の発現が減少しており、ミトコンドリアゲノム再構成の核遺伝子発現への影響が伺える。また、*Triticum aestivum* の核を持ち、*Aegilops crassa* 細胞質を持つ属間交雑 CMS 系統では、雄性器官の雌蕊化(pistillody)が知られている(Murai et al. 2002)。タバコ同様 MADS box 遺伝子群の *APETALLA3* ホモログ *WAP3* の発現低下が報告されており(Murai et al. 2002)、同じく B クラス機能を持つ *PISTILLATA* ホモログ *WPI1* は雌蕊化した器官では発現が見られなかった(Hama et al. 2004)。これらの異質細胞質による CMS はその他の種でも観察されており、CMS によって核遺伝子発現が制御される事が知られている(Linke et al. 2003, Geddy et al. 2004, Teixeira et al. 2005)。これらの研究より、細胞質置換によって核遺伝子の発現パターンが変化するという現象が知られてきた。Yeast では 1987 年に細胞質遺伝子型によって様々な核遺伝子発現が影響を受けるということがディファレンシャル・ディスプレイによって明らかにされている(Parikh et al. 1987)。従って、細胞質遺伝子型が変化した事によって核遺伝子との不和合が生じ、核-ミトコンドリア間に新規のシグナル伝達が生じたと考えられる。異質 CMS 系統における花器官の異常においてはこのような新規シグナル伝達の存在も想定されており、広義での RTG シグナリングが関与しているとも考えられている(Zubko et al. 2004)。しかしその実態は未だ不明であり、CMS と RTG シグナリングの関連性については遺伝学的な裏付けも得られていない。このことの原因として、CMS への RTG シグナリングの関与が予測されているタバコやコムギなどではゲノム情報が充実しておらず、逆遺伝学が難しい状況にあることが挙げられる。

その一方で、イネ(*Oryza sativa* L.)では多数の CMS 細胞質が見出されており、Shinryo(1984)によると 62 の独立の系統に由来する細胞質が存在する事が報告されている。ただし、細胞質の遺伝的な差異については調査されていないため、細胞質遺伝子型の独立性については留意されたい。代表的なものに Wild Abortive (WA)、Chinsurah Boro II (BT)、Honglian (HL)細胞質が知られている。これらの CMS の表現型は多様であり、WA-CMS の様に小孢子期で退化が見られるもの、BT-CMS や Lead rice (LD)-CMS の様に花粉 2-3 細胞期でデンプン蓄積の減少が見られるもの、あるいは Indian wild rice (W11)-CMS の様に部分不稔性を示すものもある(山田 卒業論文 2008)。このように多種多様な表現型を示す CMS が存在することも、CMS が単に呼吸活性などの Loss-of-function によって

引き起こされているとは考えづらい要因である。仮に Loss-of-function のみで CMS を説明しようとする、ミトコンドリア機能に欠損が生じる花粉ステージを規定している因子がこれらの CMS において存在することが想定される。しかし、ミトコンドリアが自らの遺伝子の組織特異性を制御する機構があることは考慮しづらい。従ってこれらの CMS の違いには、新規固有のシグナル伝達が存在し、表現型の違いが生じているという可能性が考えられる。このような想定においては、様々な表現型が観察され、多くの種類の細胞質が存在するイネをモデルとして CMS を研究することが理想であると言える。さらにイネは形質転換可能であり、ゲノム情報、変異系統の蓄積も充実しているため、CMS と RTG シグナリングの関連における遺伝学的根拠を見出すためには最善の材料であると考えられる。

そこで本研究では、CMS に関する核-ミトコンドリア間の相互作用に関する知見を得るため、中国野生イネの細胞質に由来する Chinese wild rice (CW)-CMS について分子遺伝学的研究を行った。CW-CMS は 1958 年、Katsuo and Mizushima によってイネでは世界で初めて見出された CMS である。しかし、ハイブリッドイネ育種に必須である *Rf* が日本在来イネに知られていなかったため分子遺伝学的研究は行われてこなかった。本博士論文の第一章で詳細を記述するが、CW-CMS 系統は一見正常な花粉発達を示す。しかし、開花時に葯から花粉が放出されても発芽能を持たないため、受精に至らない。従って第一章ではこの性質を利用してマイクロアレイを用いた CW-CMS 系統 3 細胞期花粉を含む葯の網羅的遺伝子発現解析を行った。明らかな形態異常が見られないため、発現プロファイルへの二次的・三次的な影響が少ないと考えたためである。発現解析より見出した *Down-regulated in CW11 (DCW11)* と *Oryza sativa NIMA-related protein kinase 3 (OsNek3)* について詳細な機能解析を行った。第二章では、CW-CMS の MCAG 探索のため、高速シーケンスによるゲノム解析を主軸にゲノム構造解析を行った。比較対象として LD-CMS についても同様のゲノム解析を行ったので、結果を合わせて考察した。第三章では CW-CMS に対して唯一見出されている *Rf* である *Rf17* についてポジショナルクローニングを行い、*Rf17* 遺伝子であると考えられた *RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY* について機能の解析を行った。

第一章、RTG シグナリングに主眼を置いた CW-CMS 雄性不稔性発現メカニズムの解析

CMS にはミトコンドリアから核への逆行シグナルである RTG シグナリングが関与していると考えられている (Zubko et al. 2004). しかし、その内実はブラックボックスであり、関与する分子は知られていない。さらに、yeast やほ乳類では多くの分子が見出されている RTG シグナリングであるが、植物では仲介因子は知られていない。CMS はこういった状況の中で、植物 RTG シグナリング研究を行うためには格好の題材であると言える。さらに CW-CMS は形態的な異常が極めて少ないため、網羅的遺伝子発現解析を行うには良い材料と言える。本章ではまず CW-CMS の花粉について評価を行った。次に、Agilent 22k rice oligoarray を用いたマイクロアレイ解析を行い、CW-CMS において発現が変動する遺伝子の傾向を見出した。RTG シグナリングと CMS を結びつける因子を同定することが本研究の目的の一部であり、CW-CMS において発現が減少していた遺伝子の中でシグナル伝達に関わる遺伝子について RNA ノックダウン解析を行った。この解析により、その機能低下によって CW-CMS に類似した表現型、遺伝子発現プロファイルを示した *Down-regulated in CW11 (DCW11)* に注目し、機能解析を行った。さらに、*DCW11* ノックダウン系統において CW-CMS 同様発現が減少していた *OsNek3* についても機能解析を行った。

投稿論文

- ・Fujii et al. (2007) Retrograde regulation of nuclear gene expression in CW-CMS of rice. *Plant Mol. Biol.* 63: 405-417
- ・Fujii and Toriyama (2008) *DCW11*, *Down-regulated gene 11* in CW-type cytoplasmic male sterile (CMS) rice, encoding mitochondrial protein phosphatase 2C is related to CMS. *Plant Cell Physiol.* 49: 633-640
- ・Fujii et al. (2008) Cytoplasmic male sterility-related protein kinase, *OsNek3*, is regulated downstream of mitochondrial protein phosphatase 2C, *DCW11*. *submitted*

第一節、CW-CMS イネにおける遺伝子発現の網羅的発現解析

(1)材料・方法

・材料

CW-CMS 系統は Chinese wild rice strain W1 に japonica 品種 Reimei を戻し交配した BC₃F₁ に、同じく japonica 品種である Taichung 65(T65)を戻し交配して作成した。本節マイクロアレイ解析に用いた時点の CW-CMS 系統は、T65 を 4 回戻し交配した世代、第二・三節で DCW11・OsNek3 の機能解析に用いた時点では 6 あるいは 7 回戻し交配した世代のものを用いた。しかし、マイクロアレイ解析に用いた状態のものは Marker-assisted selection(MAS)を行って核ゲノムの T65 型への置換状態を調査したものであり、少なくとも調べた 156 マーカーでは 100%T65 の遺伝子型を示した系統を用いた。MAS に用いた PCR プライマーを Table S1 に記載した。従って、CW-CMS 系統の核ゲノムはほぼ 100%が T65 に置換されていると考え、全てを同義の CW-CMS 系統であるとして扱った。

CW-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rf17* を持つ系統 W1R は Toriyama and Hinata (1987)によって作成された。T65 は *Rf17* を持たないため、W1R に種子稔性を維持しながら T65 の戻し交配を 4 回行なった。*Rf17* は第 4 染色体長腕に座乗する事が分かっている(Fujii and Toriyama 2005)。第 4 染色体長腕の RM7535 と RM3276 のみが W1R 由来で、その他のゲノム領域が T65 由来となるような系統を選抜し、CWR と名付けた。*Rf17* の由来は少なくとも W1 に因らない事が以前の解析で分かっており(藤井 卒業論文 2004)、ここでは *Rf17* の由来を便宜上 Parent of unknown origin(Fig. 1)とした。以降の解析には CWR を用いた。CWR に T65 を 2 回戻し交配し、CWR X T65 BC₃F₁ 系統を作成した。各系統の推定遺伝子型を Fig. 1 に図示した。

・花粉形態の観察

ヨウ素ヨウ化カリウム(I₂-KI)及び Fluorescein Diacetate (FDA)染色 (Heslop-Harrison et al. 1984) では、まず 3 細胞期花粉を含む葯を集めた。その後、1% I₂-KI 溶液あるいは FDA 溶液(0.004% FDA, 10% sucrose) 中でピンセットを用いて葯を潰し、花粉を押し出した。I₂-KI で染色したものは光学顕微鏡、FDA で染色したものは蛍光顕微鏡で観察した。

走査型電子顕微鏡による花粉壁の観察ではまず、3% Glutaraldehyde で花粉を固定した後、40% ethanol で 2 回、

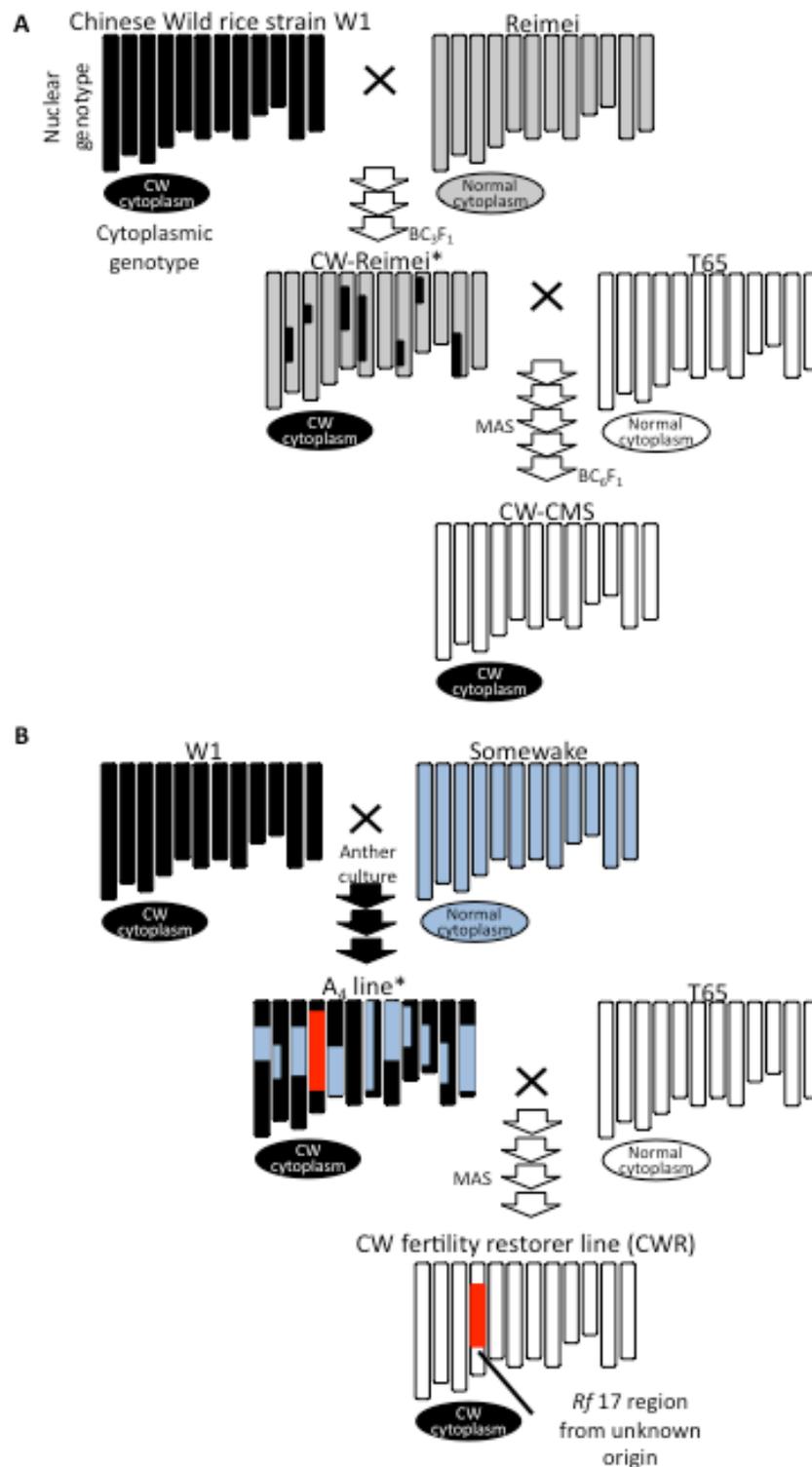


Fig. 1 Schematic genotyping of CWR and CW-CMS used in this study. Uncolored arrows indicate crosses, whereas black arrows indicate self fertilization.

A, Development of T65-isogenic CW-CMS line. Marker-assisted selection (MAS) was performed using the PCR markers described in Table S1.

B, Development of CW fertility restorer line (CWR). Indicated in red are the region containing putative *Rf17* gene transferred from unknown origin. MAS was performed to develop the T65-near isogenic CWR.

* The genotypes represented are displayed to show that chromosomes are inherited in Mendelian manner, and are not experimentally confirmed.

50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99.5% ethanol で各 1 回ずつ, 100% ethanol で 2 回置換し, 脱水を行った。その後, 2-butanol 中で凍結乾燥し, 走査型電子顕微鏡による成熟花粉の観察を行った。

人工花粉発芽培地の組成は sucrose 20%, 植物培地用寒天 1% になるように調整し, スライドガラス上に作成した (笹原・勝尾 1965)。開花後の花粉を培地上に塗布し, 28°C で 6 hr インキュベートしたのち, 光学顕微鏡で観察した。

柱頭上での花粉管伸長の観察については開花 6 時間後の柱頭をサンプリングし, 3: 1 (v/v) の ethanol: acetic acid で固定した。その後 1N KOH で柱頭を軟化したのち, 0.1% aniline blue で染色した (Sato et al. 2004)。観察は蛍光顕微鏡で行った。

・マイクロアレイ解析(ハイブリダーゼーション, 検出)

3 細胞期花粉を含む葯から, RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した total RNA をマイクロアレイ解析に用いた。CW-CMS 系統と T65 の total RNA をそれぞれ cyanine 3, cyanine 5 (Perkin Elmer) でラベルした後, RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて cRNA の精製を行った。ラベルした cRNA の断片化を行った後, 変性させ, Rice 22k DNA oligoarray G4138 (Agilent Technologies) にハイブリダイズさせた。また, データの再現性を確認するために, cyanine3 と cyanine5 を入れ換えてサンプルをラベルした。さらに, 各系統 3 つの異なる個体の葯から total RNA を抽出し, 統計処理のための繰り返しを行った。以上, 4 枚のスライドガラスを用いて解析を行った。シグナルの検出は G2534BA DNA oligoarray scanner (Agilent Technologies), 数値化には Feature Extraction Version 7.1 (Agilent Technologies) を用いた。

・マイクロアレイ解析(統計処理, データ解析)

統計処理は Microsoft (R) Excel 2004 (Microsoft)、及び R ver. 2.7.2 (<http://www.R-project.org>) を用いて行った。<http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r.html> に記載のプログラムを用い、R ver. 2.7.2 による一元配置分散分析を行って CW-CMS と T65 との間でシグナル強度に有意差が見られたものを選抜した。シグナルのノイズが高かったもの、バックグラウンドが高かったもの、あるいはシグナル強度が低すぎるものを排除したうえで、平均で \log_2 絶対値が 1 以上に変動していた遺伝子を選抜した。

タンパク質の細胞内局在予測には PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>) を用い、機能分類には InterPro

(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), TIGR (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), TAIR (<http://www.Arabidopsis.org/>) を参考にした。

•RNA 発現解析

CW-CMS 系統, CWR と T65 の根、葉、莖、3 細胞期花粉を含む葯より total RNA を抽出し、RNase-free DNase I (TaKaRa-Bio)を用いて DNase 処理を行った。cDNA 合成には First Strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare) を用いた。Tubulin alpha1-chain について cDNA を鋳型とした RT-PCR を行い、鋳型となる cDNA 量を補正した後、各遺伝子について RT-PCR を行った。また、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa-Bio)および Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa-Bio)を用いて定量的 real time RT-PCR を行った。RT-PCR に用いたプライマ一对を Table S2 に記載した。

•AOX のウエスタンブロット

AOX をウエスタンブロットについては Abe et al. (2002) とほぼ同様に行った。約 100 穎花分の三細胞期花粉を含む葯を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中ですり潰し、3,000×g, 10 min 遠心した。上清を新しいチューブに回収し、20,000×g, 5 min の遠心により粗精製オルガネラ画分を沈殿させた。上清を廃棄した後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解した。常法によって SDS-PAGE を行った後、Immobilon(Milipore)にエレクトロブロットでタンパク質を転写した。常温で 1 hr、東北大学農学研究科・岸谷幸枝助教より分譲いただいた monoclonal Anti-AOX antibody (Elthon et al. 1989) を反応させた。メンブランを TBS-T(100 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.05%(v/v) Tween20) で 2 回洗浄した。Anti-GST に対しては Anti-mouse IgG AP conjugate (Promega) を処理した後、再度洗浄を行い、AP9.5 バッファー(0.1M Tris HCl pH 9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂) 中で NBT/BCIP と反応させた。

(2)結果

・CW-CMS 系統の花粉は正常に発達するにも関わらず、発芽能を失っていた。

多くの CMS の場合と同様に、CW-CMS 系統の栄養器官の生育は、T65 と同様であった(Fig. 2A)。しかし、CW-CMS 系統では全く種子稔性が見られず、その不稔性は極めて安定していた(Fig. 2A・B)。通常、変異体などでの種子不稔性の原因は花粉、雌蕊あるいは種子形成能などの機能不全に分類することができる。戻し交配によって正常な種子が形成される事から、CW-CMS も多くの CMS 同様雄性器官に特異的な欠損が生じているものと考えられた。そこで花粉の観察を行った所、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡レベルでは CW-CMS と CWR の形態には差は見られなかった (Fig. 2C)。また、FDA 染色でも両系統の花粉に同様の蛍光が見られ、これは CW-CMS の花粉の原形質膜機能や非特異エステラーゼ活性が正常であることを示している (Fig. 2C)。I₂-KI でも同様に染色されたことも含め (Fig. 2C)、CW-CMS 系統の成熟花粉は CWR と同様に正常に発達していると考えられた。また、CWR と T65 は同様の表現型を示した(data not shown)。

イネでは開花への移行に伴って、花粉内のデンプンが糖化する現象が知られている(Koike and Satake 1987)。これは受粉後の花粉管発芽に向けてエネルギー供給源を準備しているものと考えられている。デンプンの糖化は T65 や CWR では開花 2 時間前の花粉において見られ、約 70%の花粉が糖化していた(Fig. 2D)。しかし、CW-CMS 系統の同じステージにおける花粉を観察した所、糖化している花粉は全く見られなかった(Fig. 2D)。in vitro 花粉発芽培地を用いての花粉発芽能の評価を行ったが、CW-CMS 系統は花粉発芽能を失っていることが明らかとなった(Fig. 2D)。開花 6 時間後の柱頭を Aniline blue で染色し、花粉管内のカロースを染色する事で花粉管発芽・伸長の評価を行った。in vitro の結果同様、T65 や CWR では約 80%の花粉が発芽するのに対し、CW-CMS 系統の柱頭では花粉発芽は全く見られなかった(Fig. 2D・E)。

・網羅的遺伝子発現解析による CW-CMS 系統の成熟葯における遺伝子発現プロファイリング

上記の形態観察で、CW-CMS 系統では開花直前まで維持系統である T65 と明瞭な差が見られない事を見出した。マイクロアレイなど大量のデータを解析する場合、形態変化などによる空間的な差異、あるいは発達ステージの遅延などにおける時間的な差異はサンプル間に多大な誤差を生み出すことが予想される。現在までイネにおいて最も分子遺伝学的解析が進んでいるのは BT-CMS であるが、BT-CMS はデンプン蓄積や FDA 染色反応に異常が見られるためこのような解析には適さないと考えた。一方、CW-CMS はマイクロアレイ解析を行うに当たっ

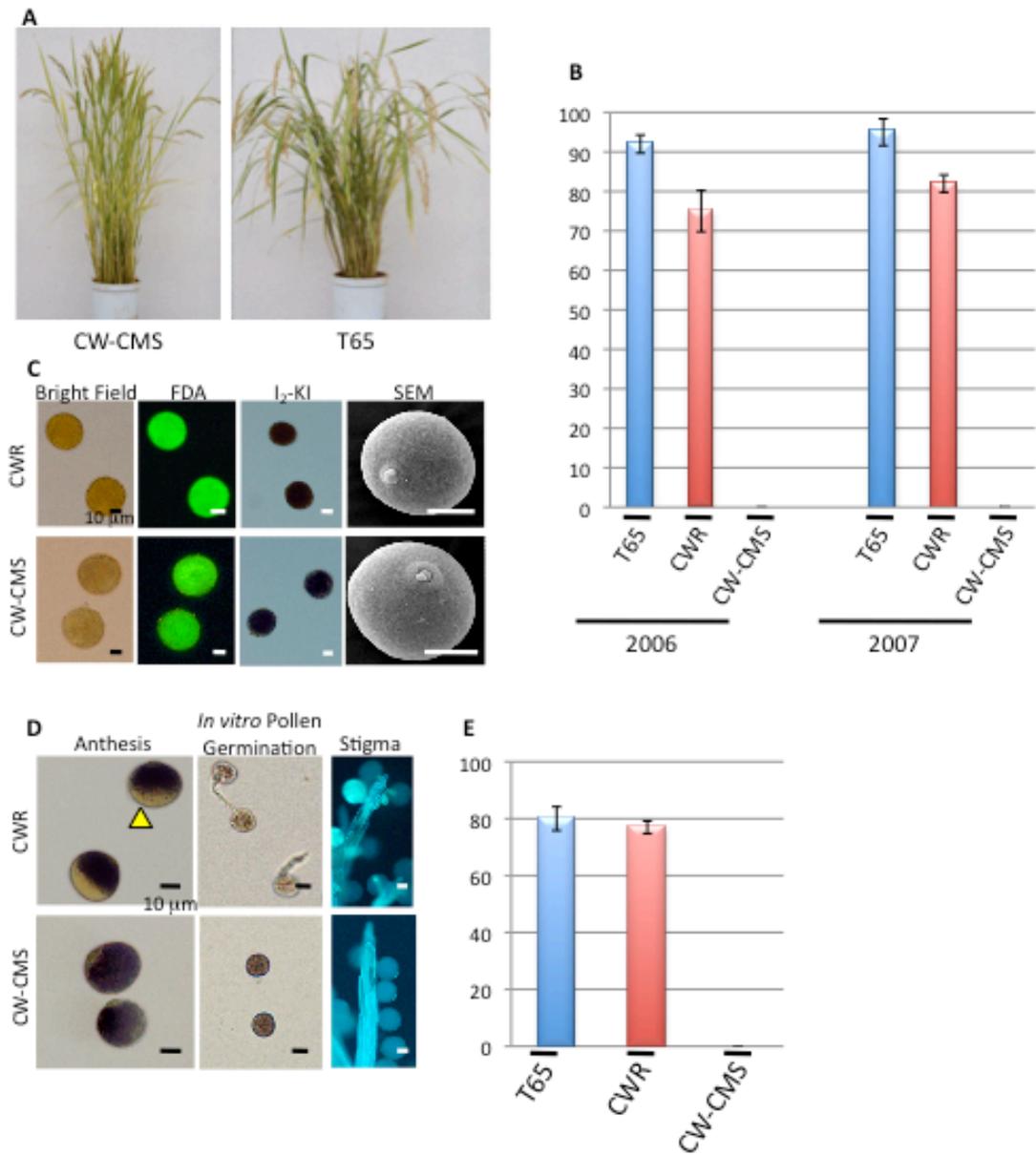


Fig. 2 Phenotype of CW-CMS line.

A, Overall vegetative appearance at harvesting stage.

B, Percentages of seed-set at year 2006 and 2007.

C, Pollen of CW-CMS line does not exhibit any developmental dysfunction.

D, Pollen of CW-CMS line does not show any germination ability. Arrowheads in column Anthesis indicates the remark of starch digestion observed in fertile pollen.

E, Percentages of pollen germination on stigma (Germinating pollen/ Pollen on stigma X 100%) six hours after anthesis.

て適当な材料であると考えた。従って、T65 と CW-CMS の形態的差異のない開花 2 日前の穎花から三細胞期花粉を含む葯をサンプリングし、マイクロアレイ解析を行った。また、核ゲノムは同一であり、細胞質ゲノムが異なる 2 サンプルを対象としているため、細胞質による核遺伝子発現制御の違いすなわち RTG 制御の違いをモニターできると考えた。

22,000 のプローブを搭載したマイクロアレイ解析の結果、両系統間で有意に発現が変動していた遺伝子を 1,282 個見出した。そのうちで CW-CMS/T65 の Log_2 絶対値が 1 以上に変動していた遺伝子は 192 個あり、 Log_2 が負のものが 107 個($\text{CWA} < \text{T65}$)、正のものが 85 個であった($\text{CWA} > \text{T65}$)。これら 192 個の遺伝子を発現差があった遺伝子とした (Table S3)。発現差があった遺伝子によってコードされるタンパク質の細胞内の局在を PSORT(<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>)によって予測した(Fig. 3)。また、推定される Gene Ontology によって分類した(Fig. 4)。

次に、マイクロアレイの精度について確証を得るため、顕著に発現が変動していた一部の遺伝子について定量的 RT-PCR を行った(Fig. 5)。具体的には *Alternative oxidase 1a (AOX1a)*、*Rubredoxin family protein* など CW-CMS において発現が増加していたもの(Fig. 5A)、*pectate lyase protein*、*pectinesterase family protein* など発現が減少していたものなどについて調査を行った。Fig. 5 には代表的なものを示しているが、合計 20 遺伝子の発現を調査したので合わせて Table S4 に記載した。少なくともこれら 20 遺伝子についてはマイクロアレイ解析と定量的 RT-PCR の結果が一致しており、今回のマイクロアレイは信頼しうる精度であったと考えられた。また、比較対照として幼苗全体から抽出した total RNA より調整した cDNA を鋳型としても定量的 RT-PCR を行ったが(Fig. 5)、CW-CMS 系統と T65 あるいは CWR 間で発現差は見られなかった。さらに、RT-PCR によって根・葉身・茎および成熟葯における代表的な 6 遺伝子の発現を調査した(Fig. 6)。結果、これらの遺伝子発現は成熟葯でのみ発現が変動していた。

AOX1a は Antimycin A、rotenone、 H_2O_2 やサリチル酸処理によって発現が誘導されることが知られている(Ho et al. 2008)。Antimycin A はミトコンドリアの呼吸鎖複合体 III(Complex III)から Cytochrome c への電子の受け渡しを阻害し、rotenone は Complex I の活性を阻害する (Fig. 7A)。AOX はシアン耐性呼吸の鍵酵素であり、ミトコンドリアストレスに応答して発現が増加すると考えられているため本研究でも CMS マーカーとして用いる事ができると考えた。Anti-AOX 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、CW-CMS 系統の葯では T65 と比較して顕著に蓄積が増加していた(Fig. 7D)。

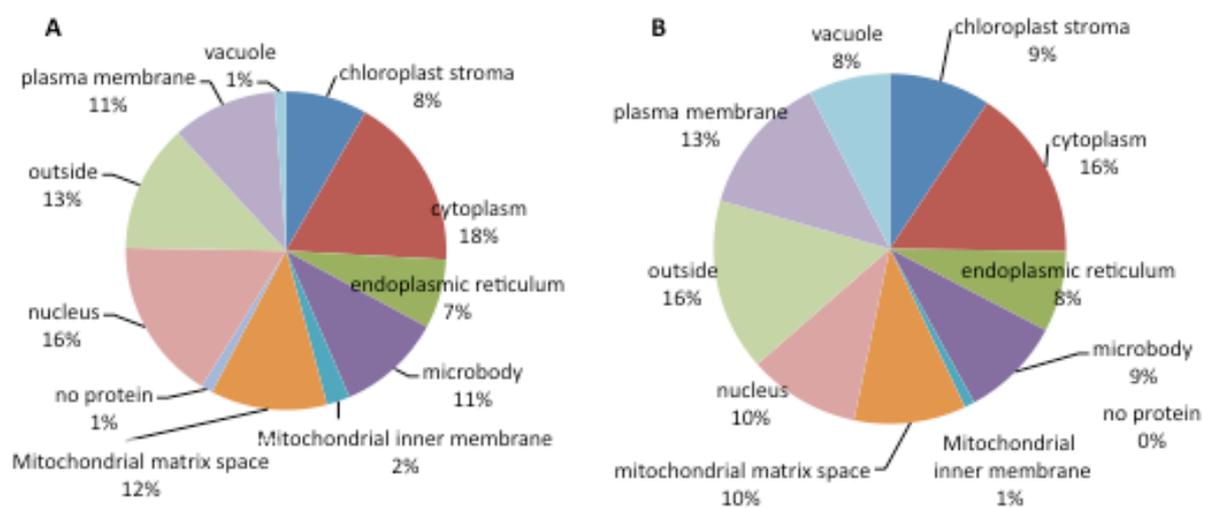


Fig. 3. Summary of transcriptomic analysis 1. Protein localization predicted by PSORT program.

A; Genes up-regulated in CW-CMS.

B; Genes down-regulated in CW-CMS.

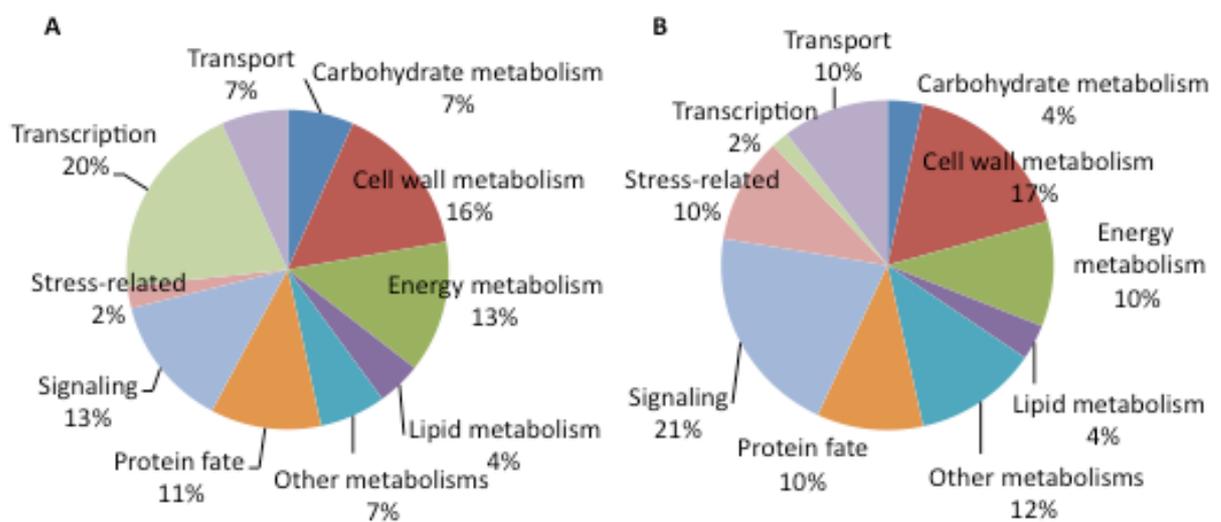


Fig. 4 Summary of transcriptomic analysis 2. Categorization by putative protein functions.

A; Genes up-regulated in CW-CMS.

B; Genes down-regulated in CW-CMS.

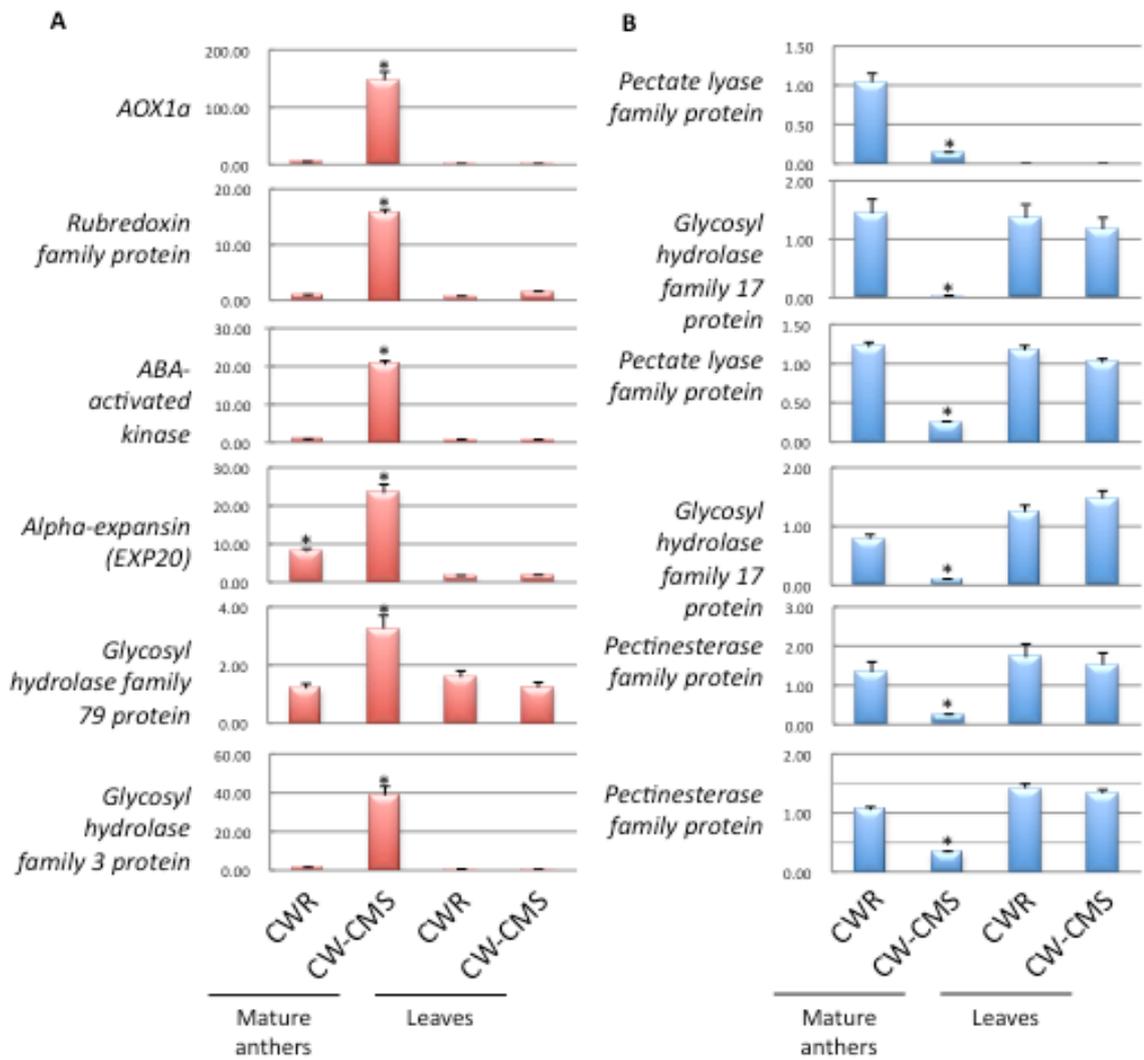


Fig. 5 Experimental confirmation of microarray by quantitative RT-PCR analysis. Values are given in relative to the expression level of T65 (T65 = 1). A, genes up-regulated in CW-CMS and B, genes down-regulated. * indicate differences that were statistically significant in comparison with T65 ($p = 0.05$).

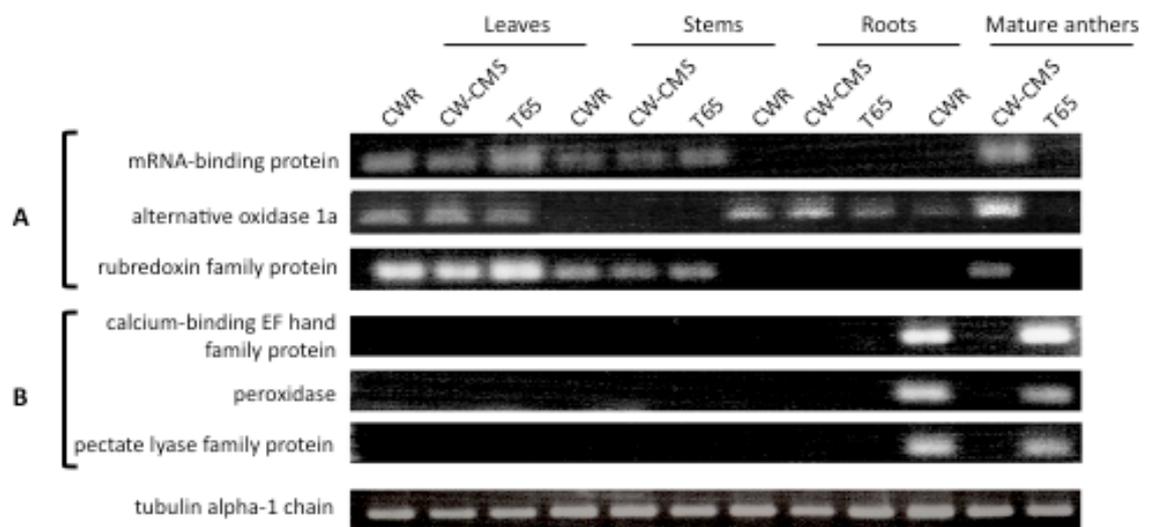


Fig. 6 RT-PCR analysis of representing genes in leaves, stems, roots and mature anthers. A, genes that were up-regulated in CW-CMS. B, genes that were down-regulated in CW-CMS.

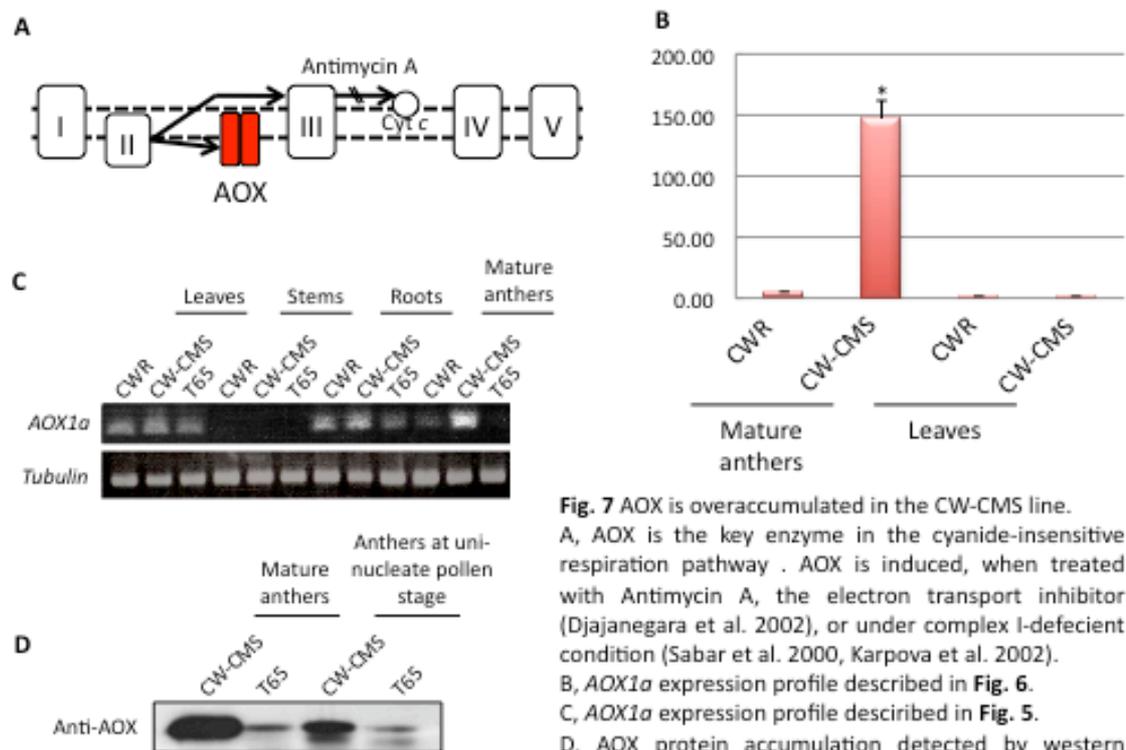


Fig. 7 AOX is overaccumulated in the CW-CMS line. A, AOX is the key enzyme in the cyanide-insensitive respiration pathway. AOX is induced, when treated with Antimycin A, the electron transport inhibitor (Djajanegara et al. 2002), or under complex I-deficient condition (Sabar et al. 2000, Karpova et al. 2002). B, *AOX1a* expression profile described in Fig. 6. C, *AOX1a* expression profile described in Fig. 5. D, AOX protein accumulation detected by western blotting using Anti-AOX antibody. 10 μ g of protein extracted from crude organelle extracts were subjected to SDS-PAGE.

また、CWRはT65と同様の molecular phenotype を示したことから、*Rf17*の効果によって遺伝子発現が回復している可能性が示唆された。このことについて確証を得るため、CWRにT65を戻し交配して得られたBC₁F₁における4遺伝子の発現を調査した(Fig. 8)。すると、*Rf17*をヘテロで持つ個体では調査した遺伝子の発現が見られ、*Rf17*を持たない系統では遺伝子発現が見られなかった。

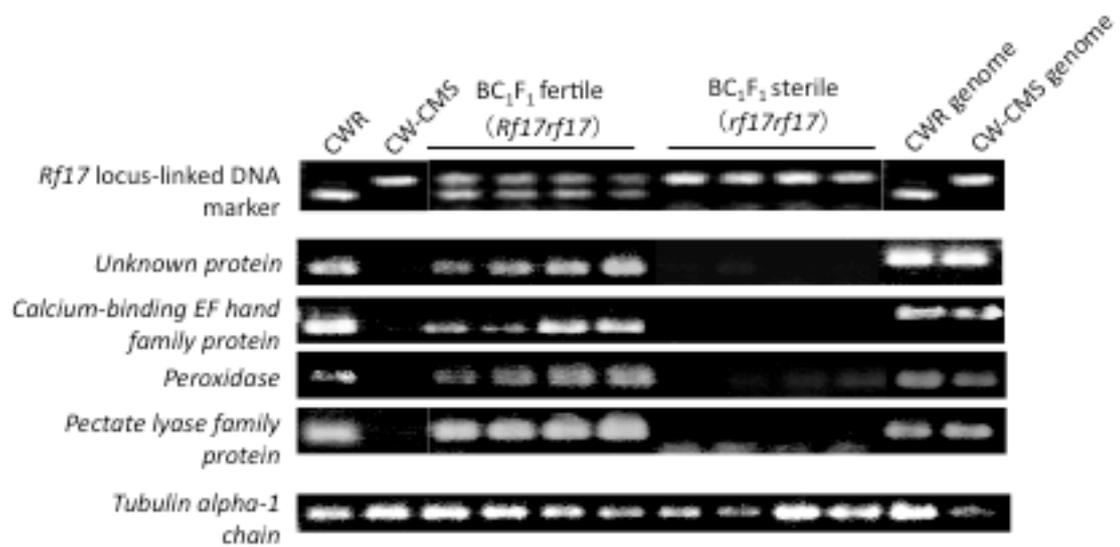


Fig. 8 RT-PCR analysis of genes down-regulated in the CW-CMS line, in BC₁F₁ individuals. Plants carrying *Rf17* were selected by the *Rf17*-linked marker on chromosome 4.

(3)考察

・CW-CMS 系統の花粉発芽能欠損に関する考察

CW-CMS 系統の花粉は外観としては正常に見えるが、花粉発芽能力を失っている事が明らかとなった。近年、シロイヌナズナで花粉形態は一見正常であるにも関わらず、花粉管発芽あるいは伸張能力を失った変異体が多数報告されている。*npg1*はカルモジュリン結合タンパク質にT-DNAが挿入された変異体であり、正常な花粉形成を示すが、花粉管発芽能を失っていた (Golovkin and Reddy 2003)。*seth1* および *seth2*は細胞膜にタンパク質を定着させる Glycophosphatidylinositol (GPI) の合成に関わるタンパク質が欠損した変異体であり、*npg1* 同様花粉形成は正常であるが、発芽能力が欠損していた (Lelanne et al. 2004)。Lelanne ら (2004) はプロテオーム解析を用い、GPIによって細胞膜に定着するタンパク質の候補を挙げており、それらの中にはβ1,3-glucanaseなど細胞壁代謝に関わるような遺伝子の産物と推定されるものも含まれていた。また、Johnson ら (2004) はシロイヌナズナ T-DNA タグラインの大規模なスクリーニングを行い、雄性配偶体の機能欠損変異体同定を目指した。通常、T-DNAがhemizygousに挿入されている場合後代は-/-: +/-: +/+ = 1: 2: 1に分離する。しかし、配偶子形成に必要な遺伝子が欠損している変異体では片側の親からのT-DNAアリル伝達が行われなため、分離比が-/-: +/-: +/+ = 1: 1: 0に歪む事が考えられる。Johnson ら(2004)はさらに花粉特異的プロモーターである *LAT52* に *GUS* 遺伝子を連結した遺伝子カセットをT-DNA内に組み込む事で、雄性配偶体で機能する遺伝子にT-DNAが入っている変異体を32系統見出した。これらの変異体のうち多くは花粉発芽あるいは花粉管伸長に欠損が見られ、T-DNAが挿入されている遺伝子は様々な機能を担っていることが推測された。こういった研究で見出された遺伝子がCW-CMS系統の発芽能欠損に直接的に関係している可能性もある。

走査型電子顕微鏡による形態観察では、CW-CMS系統の花粉壁の外観はCWRと差が見られなかった (Fig. 2C)。従ってCW-CMS花粉の柱頭に付着する能力は正常であることが予想される。しかし、開花2時間前の花粉ではデンプンの糖化能に差が見られた (Fig. 2D)。CWR花粉では発芽孔と対局側のデンプンの分解が見られたが、Fig. 2のようにCW-CMS系統の花粉ではデンプンの分解が見られず、デンプンが花粉全体に均一に分布している。さらに、CW-CMS系統の花粉は人工発芽培地上での発芽が見られず (Fig. 2D)、柱頭での花粉管伸発芽も見られなかった (Fig. 2D・E)。これらの結果は笹原・勝尾 (1965) の報告と一致した。笹原・勝尾 (1965) は培地上でCW型雄性不稔系統の花粉が吸水は行うが、花粉管伸長が見られず、肥大して原形質が吐出してしまうという現象を報告している。BT-CMS系統や他のイネの雄性不稔変異体が花粉の発達に異常が見られるのに対し(山田 卒業論

文 2008)、CW-CMS 系統の花粉は開花時に飛散することが目視できるため、少なくとも葯壁を押し開く程充実した花粉を生産していると考えられた。CW-CMS 系統では透過型電子顕微鏡による観察でも花粉の異常が見られない事が知られており(Yamada et al. 2008)、ミトコンドリアの形態異常も見られない。以上を総合して考察すると、CW-CMS 系統における花粉発達は T65 と差が見られず、デンプンの蓄積が明らかに減少する BT-CMS、LD-CMS 及びタペート細胞崩壊時に既に花粉形成異常が見られる WA-CMS などとは異なっていた(山田 卒業論文 2008)。

・CW-CMS 系統における核遺伝子発現変動に関する RTG シグナリングの考察

CW-CMS 系統では合計 192 個の様々な遺伝子発現が変動しており、細胞質置換による核遺伝子発現の影響を調査することができた(Fig. 3, Fig. 4, Table S3)。CWR においてこれらの遺伝子発現は T65 と同様であり、*Rf17* に依存して回復していることが示された。近年、同様の目的で CMS 系統の網羅的解析を行った報告が幾つかなされた。Hochholding et al. (2004) はプロテオーム解析で、トウモロコシの通常細胞質と CMS 細胞質を持つ二系統の比較を行った。ただし雄性不稔性による影響を避けるためか、両系統とも *Rf* を持つものを用いた。Ear からミトコンドリアタンパク質を抽出したところ、25 スポットに蓄積量の差が見られた。シロイヌナズナのマイクロアレイを用いた解析で、*B. napus* の CMS 系統の花序において、244 遺伝子の発現が異常である事が示された(Carlsson et al. 2007, Carlsson et al. 2008)。コムギでは AGC protein kinase が CMS 系統で発現が増加している事が知られており(Saraike et al. 2007)、一方テンサイでは Lipid-transfer protein の発現が顕著に減少していることが報告されている(Matsuhira et al. 2007)。このような解析には共通の問題があり、CMS による 2 次的、3 次的な影響が遺伝子発現レベルでの影響を及ぼしている可能性がある。従ってこれらの解析によって見出された遺伝子は CMS の副産物である可能性もあり、CMS の原因であるかどうかは遺伝学的解析によって慎重に判断されなければならない。

本研究の解析で、発現が変動していた個々の遺伝子のうちには直接雄性不稔形質を考察できるものが多々見出された。ここでは見出されてきた遺伝子のうちで植物のミトコンドリアストレスに最も関わりが深い AOX 遺伝子について考察する。AOX は様々なミトコンドリアストレスに応答することが知られているが(Vanlerberghe and McIntosh 1996, Ho et al. 2008)、タバコ CMS II 変異体においても発現が増加することが知られている(Sabar et al. 2000, Vidal et al. 2007)。先述の通り、CMS II 変異体はミトコンドリアの *nad7* が完全に欠失しており、Complex I 活性が低下している。AOX は Complex III の機能が低下した際のバイパスを仲介する酵素であり、Reactive

Oxygen Species (ROS)の消去に関わっていると考えられている。AOXはミトコンドリアストレスに広く応答することが知られているが、CMSにおいて発現が増加しているという報告は本研究が最初である。タバコCMS IIはLoss-of-function変異体であることに留意されたい。実際に、タバコCMS II系統はAOXの過剰蓄積が雄性器官のみではなく葉で見られ、生育不良を示す(Sabar et al. 2000)。興味深い事にシアン耐性呼吸経路に関わるAOXが異常蓄積しているため、変異体はシアン非感受性を示す(Sabar et al. 2000)。さらに、トウモロコシの*ncs*変異体もAOXの過剰蓄積が報告されている(Karpova et al. 2002)。一方で、CW-CMS系統は栄養器官における生育はT65と同様であり(Fig. 2)、*AOX1a*の発現は成熟葯のみで増加していた(Fig. 7)。また、マイクロアレイの精度確認として発現の再調査を行った20遺伝子全てが*AOX1a*同様に成熟葯特異的に異常な発現レベルを示していた(Fig. 5, Table S4)。このことは、CW-CMSはその表現型のみならず、遺伝子発現レベルにおいてもLoss-of-function変異体とは区別できることを示唆している。また、様々な遺伝子の発現変動から、CW-CMSは雄性器官特異的な現象によって制御されていると推察された。

植物におけるRTGシグナリングについて知見は殆ど得られていないが、ミトコンドリアストレス条件下で*AOX1a*発現を促進する因子の探索を試みたケースはある(Djajanegara et al. 2002, Zarkovic et al. 2005, Dojcinovic et al. 2005, Ho et al. 2008)。Zarkovic et al. (2005)は suppressor screening を行い、*AOX1a*発現を促すtrans因子の同定を試みた結果、4つの変異体を同定した。Dojcinovic et al. (2005)はプロモーター解析によるcis因子の解析を行い、*AOX1a*プロモーターにある93 bpの領域がストレス反応に重要である事を見出した。また、Ho et al. (2008)もcis因子とtrans因子両方の解析を行い、サリチル酸シグナリングの変異体では*AOX1a*発現が減少する事を報告している。しかし、具体的な転写因子や、ミトコンドリアストレス応答因子等は明らかにされておらず、CMSを理解する見解においても解明が待たれる。本研究では、植物の花粉発達には雄性器官特異的なシグナリングや遺伝子発現制御が存在すると考え、マイクロアレイにおいて見出した遺伝子の中でも機能としてシグナル伝達に関わる可能性がある遺伝子に注目し、さらなる解析を行った。

第二節、ミトコンドリア局在 Protein phosphatase 2C である DCW11 の CMS への関わり

(1)材料・方法

・形質転換用コンストラクトの作成

過剰発現用ベクターについては pBI101 の *HindIII-BamHI* 制限酵素サイトに Maize ubiquitin プロモーターを TaKaRa ligation kit ver 2.1 (TaKaRa)を用いて導入した。その後、Maize ubiquitin プロモーター下流の *BamHI-SacI* サイトに Green Fluorescent Protein (GFP)あるいは 2xHemagglutinin タグと 6xHistidine を同様に導入した。DCW11(LOC_Os02g15594)のORFに相当する領域1,089 bpをプライマー対5'-GGATCCATGGTATGCTTCGCTAGCCT-3'、5'-GGATCCTTATTCAGTTTTATCATGGTGAA-3'を用い、KOD-PCR(TOYOBO)によって増幅し、pGEM T-vector (Promega)にサブクローニングした。インサートのシーケンスを確認した後、pBI101のMaize ubiquitin プロモーター下流の *BamHI* サイトに連結した。また、BY-2においてDCW11 Mitochondrial Targeting peptide (MTP)-GFP 融合タンパク質を発現させるためには、同様の方法を用いて *CaMV35S* プロモーターを GFP の上流に組入れ、DCW11 MTP を GFP と連結した。DCW11 MTP 領域 198 bp はプライマー対 5'-GGATCCATGGTATGCTTCGCTAGCCT-3'と 5' -GGATCCGGAGTCGAGCATCATC CTGG- 3'を用いてクローニングした。

RNAi 用バイナリーベクターについてはまず各遺伝子の特異的領域を KOD-PCR で増幅し、CACC を片側に付加した。その後、PCR 産物を pENTER D-TOPO ligation kit (Invitrogen)を用いてエントリーベクターに導入した。作成したエントリーベクターを pANDA ベクター(奈良先端技術大学院大学、三木博士・島本博士より分譲)と共に LR clonase mix (Invitrogen)と 25°C、1hr インキュベートすることで pANDA ベクターにトリガー配列を組み入れた。特異的領域の増幅に用いたプライマー対は、*DCW11* については 5' -CACCCCCTTGCGAAAACAGAAGA-3' と 5' -CCGTAATGGCAGGTAATTAG- 3'、*DBA* については 5' -CACCTGCATAAGCTAGGGGAGCTT- 3' と 5' -GACCACCCAAAGCAGAATAA- 3'を用いた。

・遺伝子組換え植物の作成

作成したバイナリーベクターは freeze-thaw 法を用いて *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 に導入した。T65 へのアグロバクテリウム感染は常法に従った(Yokoi et al. 1997)。タバコ BY2 細胞への感染は YEP 培地で

晩培養したアグロバクテリウムと BY2 細胞を 24 時間共存培養し、カルベニシリンを含んだ MS 培地で洗浄したのち、カナマイシン選抜を行った。

・ GFP 蛍光の観察

CaMV 35S::DCW11 MTP::GFP コンストラクトを導入した BY2 細胞の観察には、蛍光顕微鏡を用いた。遺伝子導入した BY2 細胞を Mito Tracker Red (Invitrogen)によって染色し、ミトコンドリア局在のコントロールとした。

・ *E. coli* における組換え GST-DCW11 タンパク質の発現及び精製

MTP を含まない DCW11 の領域をプライマー 5'-CACCGGATCCGCCGCGCCAGGATGATGCTCGACTCCTC-3' と 5'-GGATCCAATGACAACCTCCTCCTGCAT-3'を用い、KOD polymerase(TOYOBO)による PCR で増幅し、pENTER D-TOPO vector (Invitrogen)に導入した。鋳型 DNA として、T65 の成熟薬 total RNA から合成した cDNA を用いた。LR クロナーゼによって pDEST15 Gateway vector (Invitrogen)に導入した。作成した Glutathione S-Transferase (GST)-DCW11 融合タンパク質発現ベクターを *E. coli* strain BL21AI (Invitrogen)に導入した。1×LB 培地で 37°C、16 hr 前培養した形質転換 BL21AI を、500 ml の 2×YT 培地で 3 hr 本培養し、Arabinose を最終濃度 0.02%になるように加えて 15°C、16 hr 融合タンパク質発現を誘導した。10,000×g で遠心することで集菌し、上清を取り除いた後、2 ml の MTPBS バッファー(150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)に懸濁した。10 s の超音波処理を 2 回行った後、最終濃度 0.2%になるように Triton-X を加え穏やかに混合した。懸濁液を 20,000×g で 5 min 遠心し、上清を新しいチューブに移した後、Glutathione Sepharose (GE Healthcare)を加え 1hr 穏やかに混合した。フラッシュして Sepharose を沈殿させた後上清を取り除き、MTPBS バッファー 2 ml で 4 回洗浄した。還元型 Glutathione を加え、GST-DCW11 融合タンパク質を溶出した。

また、147 番目のアスパラギン酸をアラニン、148 番目のグリシンをセリンに置換した DCW11_m1、150 番目のグリシンをアルギニンに置換した DCW11_m2 それぞれを GST と融合させて *E. coli* で発現した。DCW11_m1 を作成するためには一般的な Site-directed mutagenesis の方法に従った。プライマー対 5'-CACCGGATCCGCCGCCAGGATGATGCTCGACTCCTC-3' と 5'-GCCTATTTGGTGTATTTGCTAGTCATGGAGGA-3'、及び 5'-GCTAGTCATGGAGGACCACGTGCTGCTGAGTA-3' と 5'-GGATCCAATGACAACCTCCTCCTGCAT-3'それぞれを用いた 1 次 PCR を行った。PCR 産物を電気泳動し、ゲル抽出キット(Mo-Bio)を用いた DNA ゲル抽出を行っ

た. ゲル抽出産物を鋳型とし、プライマー対5'-CACCGGATCCGCCGCCAGGATGATGCTCGACTCCTC-3'と5'-GGATCCAATGACAACCTCCTCCTGCAT-3'を用いて2次PCRを行い、PCR産物をpENTER D-TOPO vectorに導入した. DCW11_m2についてはプライマー対5'-CACCGGATCCGCCGCCAGGATGATGCTCGACTCCTC-3'、及び5'-GCCTATTTGGTGTATTTGATGGTCATAGAGGA-3'と5'-GATGGTCATAGAGGACCACGTGCTGCTGAGTA-3'と5'-GGATCCAATGACAACCTCCTCCTGCAT-3'それぞれを用いた1次PCRを行い、DCW11_m1と同様にクローニングした. *E. coli*における発現及び精製は通常型DCW11と同様に行った.

・ Protein Phosphatase 活性の調査

GST 精製を行った GST-DCW11、GST-DCW11_m1 と GST-DCW11_m2 における phosphatase 活性を Phosphatase Assay kit (Jena Biosciences)を用いて計測した. Lambert-Beer's law に従って活性を計測した. 吸光度 405 nm の経時的な測定は SmartSpec 3000 (Bio-Rad)の kinetics モードを用いて行った.

・ Yeast Two-Hybrid

Matchmaker Library Construction & Screening Kit (Clontech)に付属のベクター等を用い、マニュアルに従って行った. T65 の三細胞期花粉を含む葯から抽出した RNA を用い、GAL4 Activation domain(GAL4-AD)を融合したタンパク質を発現する *S. cerevisiae* strain AH109 を宿主とした Two-Hybrid ライブラリー(pGADT7-prey)を作成した. MTP を除いた DCW11 を pGBKT7 にサブクローニングし、*S. cerevisiae* strain Y187 に導入した. GAL4 DNA Binding domain monoclonal 抗体(Clontech)で DCW11 と GAL4 DNA Binding domain(GAL4-BD)との融合タンパク質の発現を確認した. 作成した pGBKT7-DCW11-bait を導入した Y187 と、pGADT7-prey ライブラリー-AH109 を 2xYPAD 培地 50 ml 中での mating によって二倍体を形成させ、アデニン、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファンを欠落させた SD 培地(SD -Ade/-His/-Leu/-Trp)で約 300,000 の二倍体をスクリーニングした. 1次スクリーニングにおいてポジティブだったクローンについて X- α -gal を用いた青白選抜で二次スクリーニングした. pGADT7-prey プラスミドを精製後、再度 AH109 に導入し、bait との mating を行う事で相互作用の確認を行った. その後ポジティブクローンからプラスミドを精製し、シークエンス解析を行った.

・ *E. coli* における組換え Thioredoxin-DBA-6XHis タンパク質の発現及び精製

DBA の ORF を含む 544 bp の領域はプライマー対 5'-GAATCCATGGGGCTCACGTTACCAA-3' と 5'-GTCGACTTAGGCCTTGCTGGCAATGT-3'を用いて増幅した。鋳型 DNA として、T65 の成熟薬 total RNA から合成した cDNA を用いた。PCR 産物を pBAD/Thio His TOPO vector (Invitrogen)に TOPO isomerase (Invitrogen)を用いた TA クローニングで導入した。作成した Thioredoxin-DBA-6XHis(TDBAH)発現用ベクターを *E. coli* strain LMG194 に導入した。発現ベクターを導入した LMG194 を 1×LB で 37°C、16 hr 培養したものの 1 ml を 500 ml の RM medium (0.04 M Na₂HPO₄, 0.02 M KH₂PO₄, 0.09 M NaCl, 0.02 M NH₄Cl, 2% casamino acids (w/v), 1 mM MgCl₂, 0.2% glucose (w/v))中で 37°C、3 hr 本培養した。Arabinose を最終濃度 0.2%になるように加えて TDBAH の発現を誘導した後、10,000×g で遠心することで集菌し、上清を取り除いた。Lysis buffer (Tris-HCl pH8.0, 500 mM KCl, 2 mM imidazole, 10 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100 (v/v), 10% glycerol (v/v), 1 mg/ml lysozyme)を加えて激しく攪拌した後、2 s、10 回超音波処理を行った。20,000×g で 10 min 遠心し、上清を新しいチューブに移した後、Ni-Agarose resin (QIAGEN)を加え、4°C、60 min 穏やかに混和した。Resin を 3,000×g でフラッシュして沈殿させた後上清を捨て、沈殿をカラムに移した。Resin に対する 20 倍量の Wash buffer (Tris-HCl pH8.0, 350 mM KCl, 20 mM imidazole, 10 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100 (v/v), 10% glycerol (v/v))で洗浄を行った後、Elution buffer (Tris-HCl pH8.0, 350 mM KCl, 250 mM imidazole, 10 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100 (v/v), 10% glycerol (v/v))を用いて TDBAH を溶出した。

・ GST pull-down assay

GST-DCW11 融合タンパク質を Gluthathione Sepharose (GE Healthcare)とインキュベートし、TEN100 バッファー(20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl)で 4 回洗浄を行った。精製した TDBAH 100 mg を TEN100 バッファー中で Sepharose 中の GST-DCW11 と 4°C、1 hr インキュベートした。Sepharose を 100 倍量の TEN100 バッファーで洗浄したのち、SDS Sample バッファー(0.06 M Tris-HCl pH 6.8, 10%(w/v) Glycerol, 2%(w/v) SDS, 5%(v/v) 2-Mercaptoethanol, 0.0025%(w/v) Bromophenol Blue)に溶解した。懸濁物を 3 分間煮沸し、20,000×g で 5 min 遠心した後上清をウエスタンブロットに用いた。常法によって SDS-PAGE を行った後、Immobilon(Milipore)にエレクトロブロットでタンパク質を転写した。常温で 1 hr、Anti-GST antibody produced in rabbit (Sigma)あるいは Anti-His HRP conjugate (QIAGEN)を反応させた。メンブランを TBS-T(100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween20)で 2 回洗浄した。Anti-GST に対しては Anti-rabbit IgG

AP conjugate (Promega)を処理した後、再度洗浄を行い、AP9.5 バッファー(0.1M Tris HCl pH 9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂)中で NBT/BCIP と反応させた。Anti-His HRP conjugate については抗原抗体反応後の洗浄後、ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare)を用いて検出した。

・ GTPase 活性の調査

精製した TDBAH の GTPase 活性を ATPase/GTPase ELIPA kits (Cytoskeleton)を用いて測定した。吸光度 370 nm の経時的な測定は SmartSpec 3000 (Bio-Rad)の kinetics モードを用いて行った。

(2)結果

・DCW11 はミトコンドリア局在の Protein Phosphatase 2C をコードする。

第一節において行ったマイクロアレイで、CW-CMS 系統において発現差が減少していた 107 個の *Down-regulated in CW(DCW)* 遺伝子に注目した。本研究では CMS における RTG シグナリングに関する因子の探索を目的としているため、*DCW* 遺伝子の中でもシグナル伝達に関係するタンパク質をコードしている遺伝子に注目した(Fig. 4, Table S3)。これらの遺伝子の多くはカルシウムイオン結合ドメインである EF-hand モチーフを持つもの(*DCW3*, *DCW4*, *DCW5*, *DCW6*, *DCW10*)、あるいはタンパク質のリン酸化/脱リン酸化に関わるもの(*DCW1*, *DCW5*, *DCW7*, *DCW11*)をコードしていると予測された (Table S5)。多くの細胞内シグナリングがそうであるように、CW-CMS の発現メカニズムにもカルシウム受容体やリン酸化カスケードが関わっていることが推察された。RNAi 法によってこれらの遺伝子をそれぞれノックダウンしたところ、*DCW11* が世代を経ても安定的な種子不稔性を示した(Table S5)。*DCW11* ノックダウン系統の T_0 世代では独立の 6 系統が 50%以下の種子稔性を示し、 T_1 世代ではそのうち 5 系統が 50%以下の種子稔性を示した。詳細は後述する。その他の遺伝子の RNAi 系統ではこのような傾向は見られず、 T_0 世代では種子不稔性であったものも T_1 世代では通常通り稔実していた。従って本研究ではこれらのタンパク質の中で、ミトコンドリア局在であると予測された *DCW11* について詳細な機能解析を行った。

DCW11 は Protein Phosphatase 2C (PP2C)ドメインを持つ 363 アミノ酸のタンパク質であり、PREDOTAR (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>)、PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)、TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)と MitoProt (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>)により、ミトコンドリア局在である可能性が強く示唆された(Fig. 9)。*DCW11* の予測 MTP を含む 66 アミノ酸を GFP に連結した融合タンパク質をタバコ BY2 細胞で発現させた(Fig. 9)。Mito Tracker Red の蛍光と GFP の蛍光が merge したため、*DCW11* はミトコンドリア局在である可能性が高いと考えられた。

DCW11 が 実際に PP2C として機能しうるか調べるため、まず recombinant *DCW11* タンパク質が phosphatase 活性を持つ事を調査した。MTP を除く *DCW11* を GST と融合させて *E. coli* で発現させ、精製したところ、融合タンパク質が *in vitro* で phosphatase 活性を持つということが明らかとなった(Fig. 10)。Lambert-Beer's law に従って活性速度を推測したところ、 $A = 0.09$ ($\text{nmol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)となることがわかり、ポジティブコントロールとして用いた Calf-Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)は $A = 0.88$ であった。この試験では Phosphatase assay kit

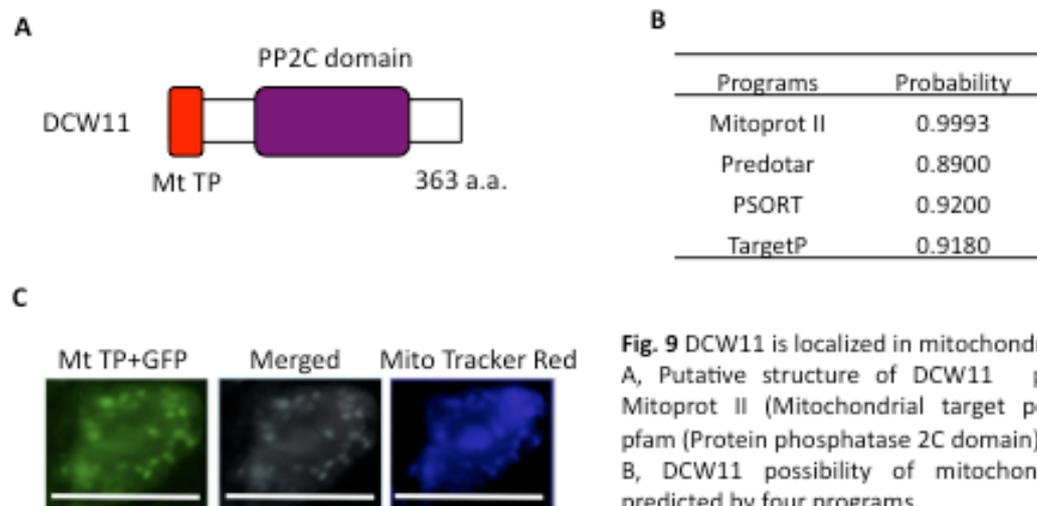


Fig. 9 DCW11 is localized in mitochondria.

A, Putative structure of DCW11 predicted by Mitoprot II (Mitochondrial target peptide), and pfam (Protein phosphatase 2C domain).

B, DCW11 possibility of mitochondrial export predicted by four programs.

C, DCW11 Mt TP was fused to GFP and expressed in tobacco BY2 cells under 35S CaMV promoter.

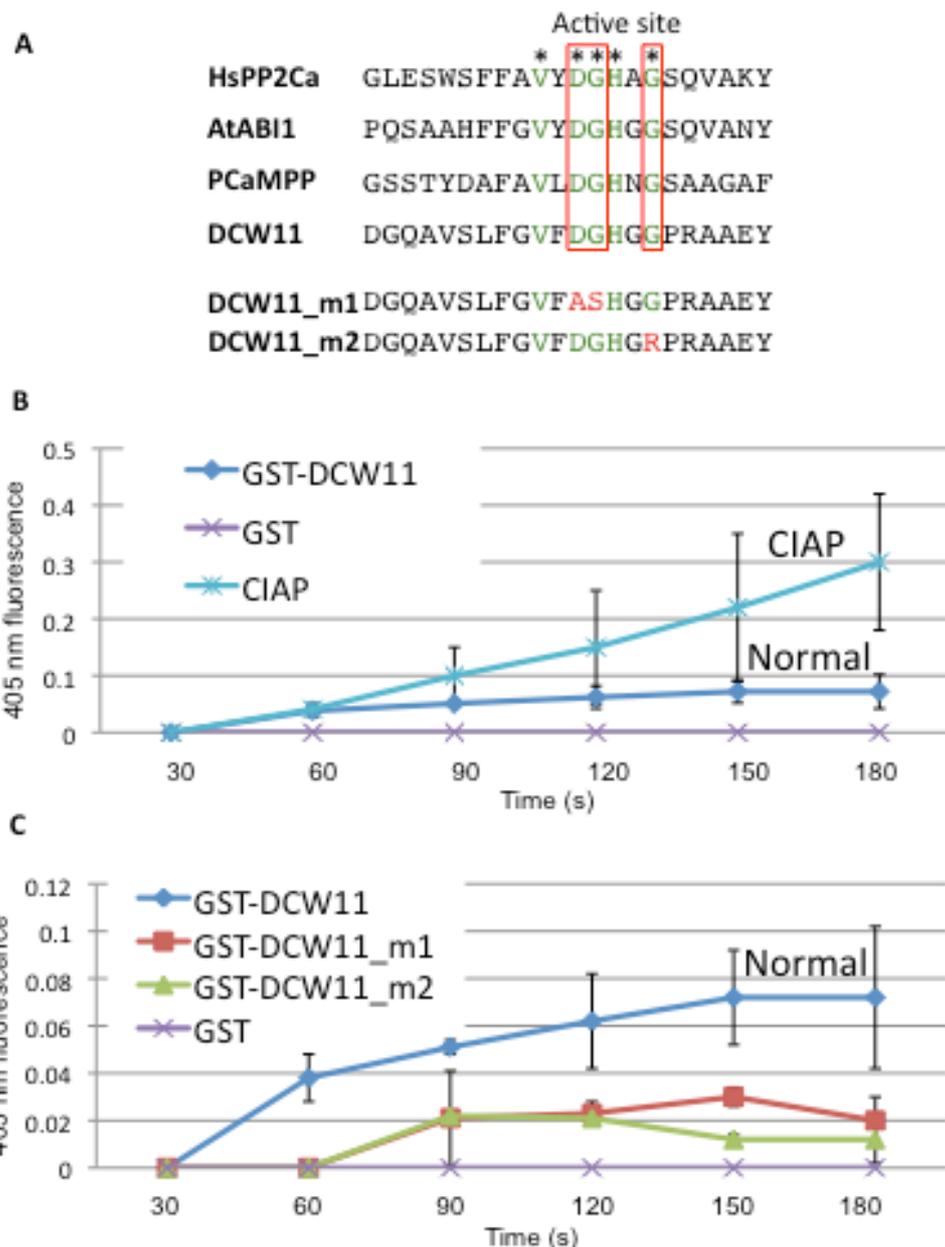


Fig. 10 Phosphatase activity of GST-DCW11 fusion recombinant protein. A, Alignment of conserved Mn-ion binding peptides in PP2C. Asterisks indicated the core-binding amino acids. Boxed are the peptides demonstrated to be required for protein phosphatase activity in a previous study (Takezawa 2003). B, Phosphatase activity assay for purified GST-DCW11 and GST expressed in *E. coli*. CIAP (TaKaRa-Bio) was used as the phosphatase control. C, Phosphatase activity assay for GST-DCW11_m1 and GST-DCW11_m2. O.D. 405 nm was measured using SmartSpec 3000 (Bio-Rad).

(Jena Biosciences)を用いたため、一般的な phosphatase としての活性のみ調査している。DCW11 が実際にタンパク質を脱リン酸化する能力を持つかどうかは不明であった。従って、DCW11 が持つ PP2C でマンガンイオン結合ペプチドとして保存されているアミノ酸を置換した GST-DCW11_m1 (D147A/G148S)と GST-DCW11_m2(G150R)の2種類の融合タンパク質を Site-directed mutagenesis によって作成し、精製した。*Physcomitrella patens* の PP2C、PCaMPP のマンガンイオン結合ペプチドに同様の変異を導入したものでは活性が低下したことから、PP2C の活性に必須なドメインであると考えられている(Takezawa 2003)。GST-DCW11_m1 と GST-DCW11_m2 は通常型の GST-DCW11 と比較して、著しく phosphatase 活性が低下したことから(Fig. 10)、DCW11 は一般的な PP2C の特徴を保持しており、植物体内においても PP2C として機能することが考えられた。

・DCW11は花粉発芽能に必須な遺伝子であり、DCW11の機能低下はCW-CMS様の表現型を引き起こす。

DCW11の植物体内における機能を調査するため、各植物組織における DCW11 mRNA の発現パターンを調べた。四分子期、一核期、二細胞期、三細胞期の花粉を含む葯、三細胞期花粉、雌蕊、完熟種子、幼苗地上部、幼苗根組織それぞれから抽出した total RNA から cDNA を合成し、定量的 RT-PCR を行った(Fig. 11A)。DCW11 の発現は葯の発達後期に強く見られ、特に三細胞期で最も強い発現を示した。また、Affymetrix マイクロアレイを用いてのイネ生殖過程における遺伝子発現アトラス作成を目指したデータベース Oryza_Express(http://gbarrier.lab.nig.ac.jp/oryza_express/)から抽出した DCW11 の発現パターンも定量的 RT-PCR の結果と同様の傾向を示した(Fig. 11B)。

シロイヌナズナでは76個の遺伝子がPP2Cをコードすると予測されており(Kerk et al. 2002, Schweighofer et al. 2004)、本研究で TIGR (<http://www.arabidopsis.org/>)で検索を行ったところイネでは79 遺伝子がPP2Cをコードしていると予測された。ClustalW v. 1.8によってこれらPP2Cにおけるアミノ酸配列レベルでの類似性を比較し、JalView v. 2.4によって系統樹を作成した(Fig. 12, Fig. S1)。イネとシロイヌナズナのPP2Cは11個のグループを形成し、ホモログ関係にあるものが多く見出された(Fig. S1)。ただし、6つのPP2Cはoutgroupと見なした(TAIR-ID: At3G63340, At4g11040, At1g67820, TIGR-ID: LOC_Os04g42260, LOC_Os04g08560, LOC_Os10g22460)。DCW11はシロイヌナズナにおけるAt5g53140、イネゲノム内ではLOC_Os06g33549(DCW11-like: DCW11L)と最も高い相同性を示した(Fig. 12, Fig. 13)。なお、LOC_Os05g50970もDCW11と高い相同性を示したが、ミト

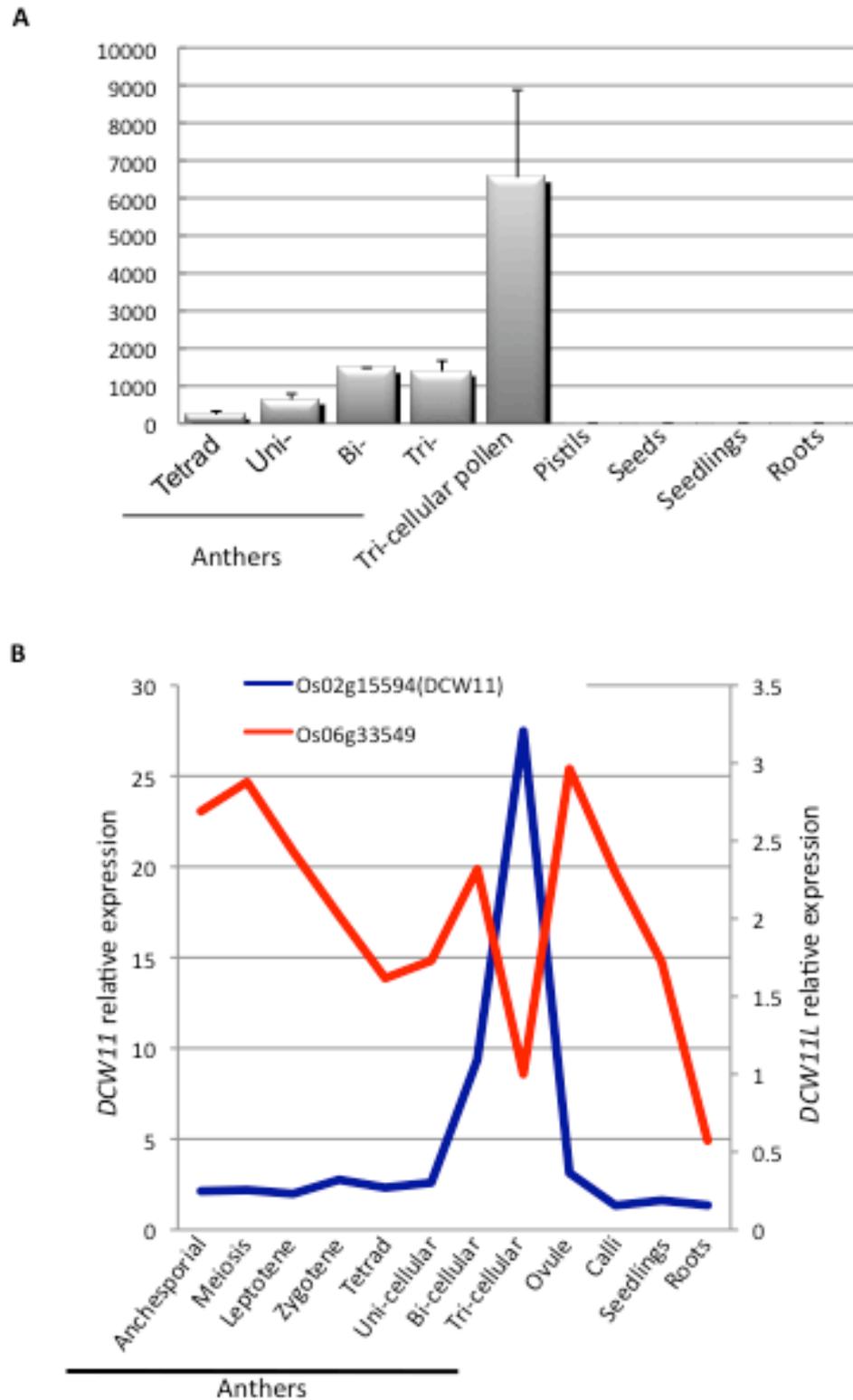


Fig. 11 Expression profile of *DCW11*.

A, Quantitative RT-PCR analysis of *DCW11* expression. Anthers at indicated pollen stages were sampled. Expression level of *DCW11* was normalized by the expression of *Alpha-tubulin*.

B, Expression profile *DCW11* and *DCW11-like*, extracted from *Oryza_Express*.

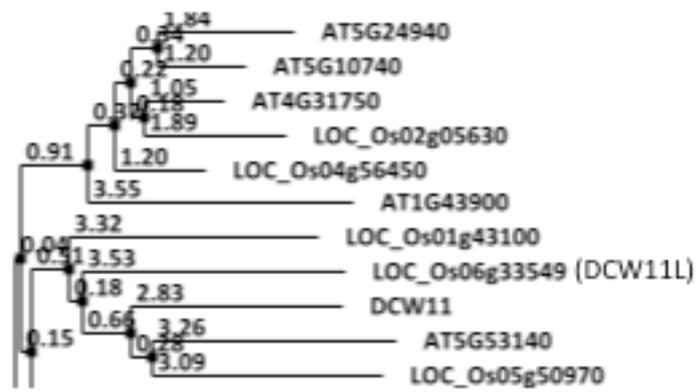


Fig. 12 Phylogenetic analysis of DCW11. Neighborhood-joining tree was generated from % identity.

```

DCW11_Os02g15594 1 M V C F A S L R R A L P L L - - - L R A T T T T T P R F L - L P R A L S G G V G G G A A V D A R | 44
AtDCW11_AT5G53140 1 M V C S S F I R S F I V Q A G C R I G V L A Q G R H Q F I H I K K T L S V G F G F R T S V I G - | 47
DCW11L_Os06g33549 1 M A R A A G L R A L V G I E - - - - - A A G R G R R V A A S P S P G G T P A A S R G L P G - | 40

DCW11_Os02g15594 45 A L L R G H S G W R G L R V A A R M M L D S S D S A A A A G Q M Q P Q Q R A A G A V A C S A Q D 92
AtDCW11_AT5G53140 48 - - F R T T S G - I G F R T S A K M M V D T S - - - - - A G E K R - - - - - I S L V D M P P E K 82
DCW11L_Os06g33549 41 - - W P G F C G - V G C G S S S S S S F A P P - - - - - R M Q A R - - - R A A G S A A R T R S P 77

DCW11_Os02g15594 93 G G A A G Y A S G G W A R E D G K L K C G Y S S F R G K R A T M E D F Y D V K L T E I D G Q A V 140
AtDCW11_AT5G53140 83 V D D G G Y I G G W K N D D G S L S C G Y C S F R G K R S T M E D F Y D I K A S T I E G Q A V 130
DCW11L_Os06g33549 78 S Q S N G W I T G G S A S E D G R L S W D Y S S F K G R R P S M E D R F S I K M T T I N E Q T V 125

DCW11_Os02g15594 141 S L F G V F D G H G G P R A A E Y L K E N L F E N L L K H P E F L T D T K L A I S E T Y Q K T D 188
AtDCW11_AT5G53140 131 C M F G I F D G H G G S R A A E Y L K E H L F N N L M K H P Q F L T D T K L A L N E T Y K Q T D 178
DCW11L_Os06g33549 126 S L F G V F D G H G G S L A A E Y L K E H L F E N L V N H P E L L R D T K L A I S Q T F L K T D 173

DCW11_Os02g15594 189 T D F L E S E S - N A F R D D G S T A S T A V L V G G H L Y V A N V G D S R A V V S K A G K A M 235
AtDCW11_AT5G53140 179 V A F L E S E K - D T Y R D D G S T A S A A V L V G N H L Y V A N V G D S R T I V S K A G K A I 225
DCW11L_Os06g33549 174 A D F L E S V S S N P F R D D G S T A V T A I L V G N H L Y V G N V G D S R V V A L K A G K A V 221

DCW11_Os02g15594 236 A L S E D H K P N R S D E R K R I E N A G G V V I W A G T W R V G G V L A M S R A F G N R L L K 283
AtDCW11_AT5G53140 226 A L S D D H K P N R S D E R K R I E S A G G V I M W A G T W R V G G V L A M S R A F G N R M L K 273
DCW11L_Os06g33549 222 P L S E D H K P N R K D E Q K R I E D A G G I V V F D D T W R V N G L L A M S R A F G N R A L K 269

DCW11_Os02g15594 284 P F V V A E P E I Q E E L V N E D L E C L V L A S D G L W D V V E N E E A V S L A K T E D L P E 331
AtDCW11_AT5G53140 274 Q F V V A E P E I Q D L E I D H E A E L L V L A S D G L W D V V P N E D A V A L A Q S E E E P E 321
DCW11L_Os06g33549 270 H Y V K A E P D I Q E K V V D E S L E Y L I L A T D G L W D V M R N E D A V S L L K A Q D G P K 317

DCW11_Os02g15594 332 S V A R K L T E I A Y S R G S A D N I T C I V V Q F H H D K T E - - - - - 363
AtDCW11_AT5G53140 322 A A A R K L T D T A F S R G S A D N I T C I V V K F R H D K T E S P K I E T N A M A E S E P E L 369
DCW11L_Os06g33549 318 A A A M K L T E V A H S R L T L D N I T C I V L Q F H H G K S T N S N - - - - - 352

DCW11_Os02g15594 - - - - -
AtDCW11_AT5G53140 370 N P T T E L E P E S N P S T A L E T E S I P K A E L E S E P D A I P D P K P E T E P E T K G E K 417
DCW11L_Os06g33549 - - - - -

DCW11_Os02g15594 - - -
AtDCW11_AT5G53140 418 A G E
DCW11L_Os06g33549 - - -

```

Fig. 13 Alignment of DCW11, AtDCW11 and DCW1L. Sequences were paired by ClustalW v 1.8 program. Broken box indicates the putative mitochondrial targeting peptides, and boxes indicate the PP2C domains.

コンドリア局在ではないと考えられたため解析対象外とした。DCW11 と DCW11L は 57%の相同性を示したが、DCW11L のイネ組織間における発現パターンを *Oryza_Express* から抽出すると、DCW11 とは対照的に三細胞期花粉を含む葯において顕著に発現が減少していた(Fig. 11B)。このことから、DCW11 と DCW11L は高度に機能分化しているものと考えられた。DCW11 と DCW11L の 3'非翻訳領域は保存されておらず (data not shown)、RNAi による DCW11 の特異的ノックダウンは可能と考えた。

RNAi 法によって T65 における DCW11 のノックダウンを試みたところ、T₀ 世代で 4-38%に DCW11 の発現が減少した系統が得られた(Fig. 14. Knock Down DCW11 系統: KDDCW11)。Maize ubiquitin::*GUS* (*Ubi::GUS*)を導入したコントロール系統では、種子稔性が 75%程度であったのに対し、KDDCW11 系統では 4-56%に低下していた。このような表現型は T₁ 世代でも見られ、DCW11 が KDDCW11 系統では種子稔性が 15-49%に低下していた(Fig. 14, Fig. 15A)。DCW11 は雄性器官でのみ発現が見られ、さらに三細胞期花粉で強い発現が見られたことから、KDDCW11 における種子不稔性は花粉不稔によって引き起こされていると推測した。しかし、各 KDDCW11 系統で、花粉の I₂-KI による染色率は 85%以上であった(Fig. 14)。そこで CW-CMS 系統と同様、KDDCW11 系統は花粉の発芽能力が低下しているという事を推測した。開花後の柱頭を Aniline blue によって染色したところ、通常の T65 では平均して 102 粒の花粉が柱頭に付着し、そのうち 87 粒が発芽していた(Fig. 15B・C)。しかし、KDDCW11-3 と KDDCW11-7 の T₁ 世代の個体の柱頭を同様に染色したところ、それぞれ 32 および 39 粒の花粉しか付着しておらず、またそれぞれ 9 および 15 粒の花粉しか発芽していなかった(Fig. 15C)。CW-CMS 系統は平均で 3 粒が柱頭に付着していたが、発芽していた花粉は無かった。このことから、KDDCW11 系統では花粉発芽能が低下しており、結果的に種子不稔性が生じているということが明らかとなった。

KDDCW11 が CW-CMS 系統と類似した表現型を示したことから、DCW11 の発現抑制は CW-CMS と深く関わっている可能性が推測された。第一章・第一節における解析で、CW-CMS 系統において顕著に *AOX1a* 遺伝子の発現が増加しており、AOX タンパク質が異常に蓄積していることを示した(Fig. 7)。本研究における系において、*AOX1a* は CW-CMS で発現が増加するマーカー遺伝子となると考え、KDDCW11 系統における *AOX1a* の mRNA 発現を調べた(Fig. 16A)。その結果、KDDCW11 系統では *AOX1a* が CW-CMS 同様、T65 と比較して発現が高くなっており、AOX タンパク質の蓄積も増加していた(Fig. 16C)。そこで逆に DCW11 を CW-CMS 系統において過剰発現させれば AOX の異常な蓄積が抑制されると考えたため、*Ubi::DCW11*(Fig. 16B)を CW-CMS 系統に導入した(CMS_OXDCW11)。T65 に *Ubi::DCW11* を導入した場合は AOX 蓄積に変化は見られなかったが、CW-CMS

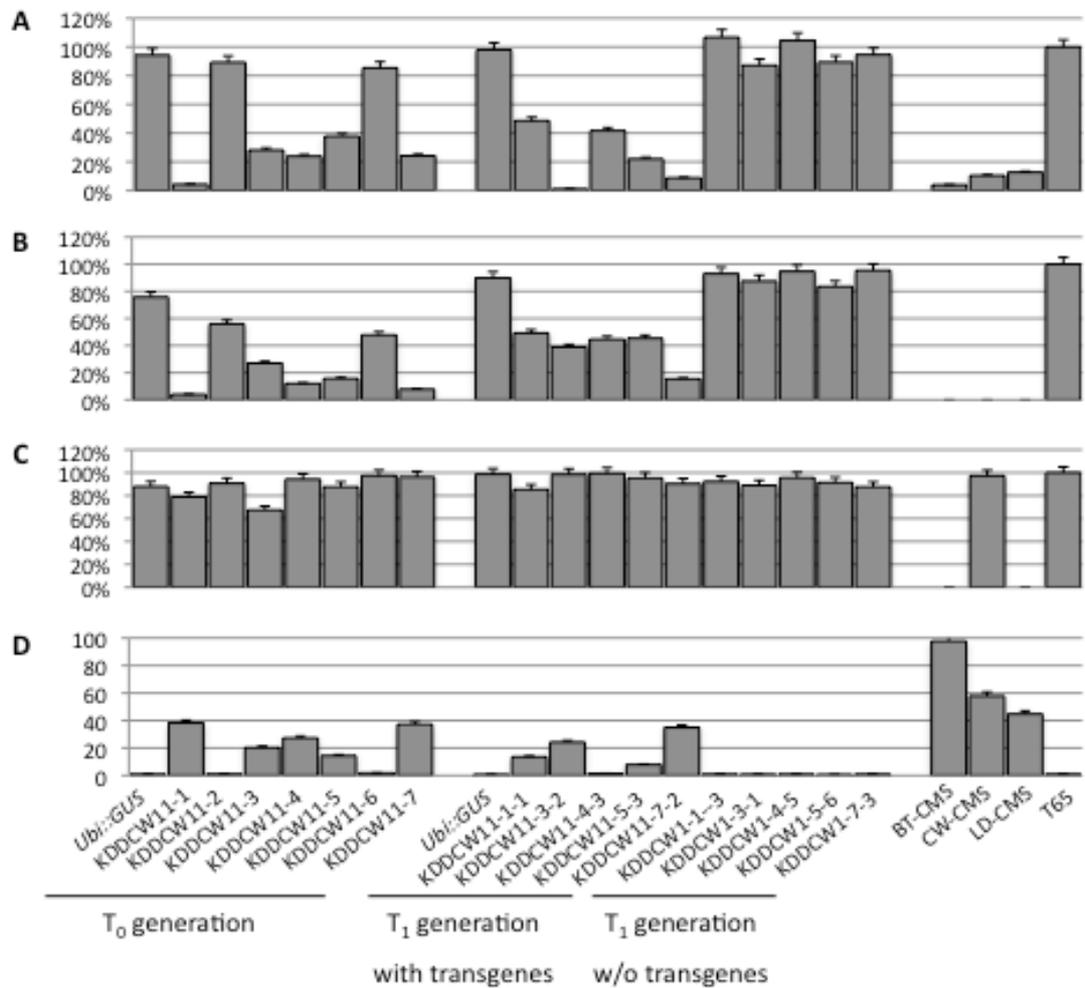


Fig. 14 Reproductive and molecular phenotypes of *DCW11* knockdown plants.

A, Relative *DCW11* expression level in anthers at tri-cellular pollen stage monitored as described in **Fig. 11A**.

B, Seed-set.

C, Pollen stainability.

D, Relative *AOX1a* expression level investigated using the same method as that for *DCW11*. Scores in each plant are shown in percentages for A-C (untransformed T65 = 100%), and relative expression values in D (untransformed T65 = 1).

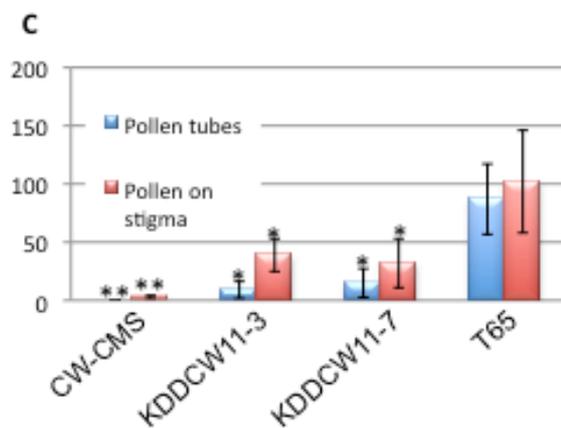
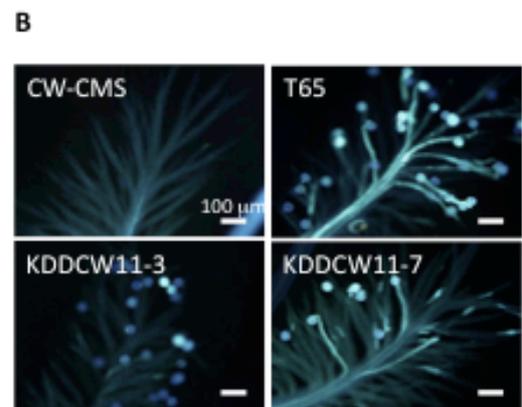
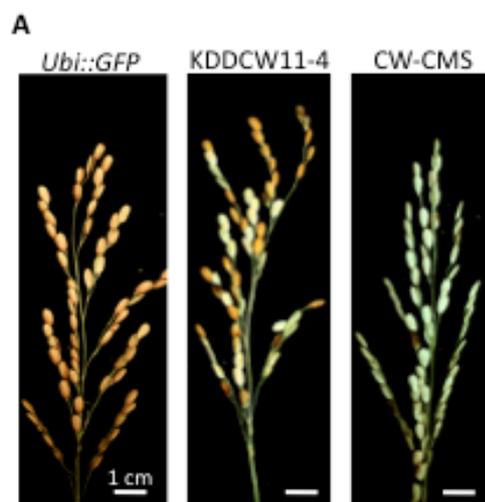


Fig. 15 Reproductive phenotypes of KDDCW11 plants.

A, KDDCW11-4 were reduced in seed-set.

B, Stigma six hours after anthesis stained with aniline blue.

C, Numbers of pollen and pollen tubes on stigma six hours after flowering. At six flowers from three independent plants were counted for each line. Values are given as the average of at least 18 flowers counted. Statistically significant values against the value of T65 were given * ($p = 0.05$) and ** ($p = 0.01$)

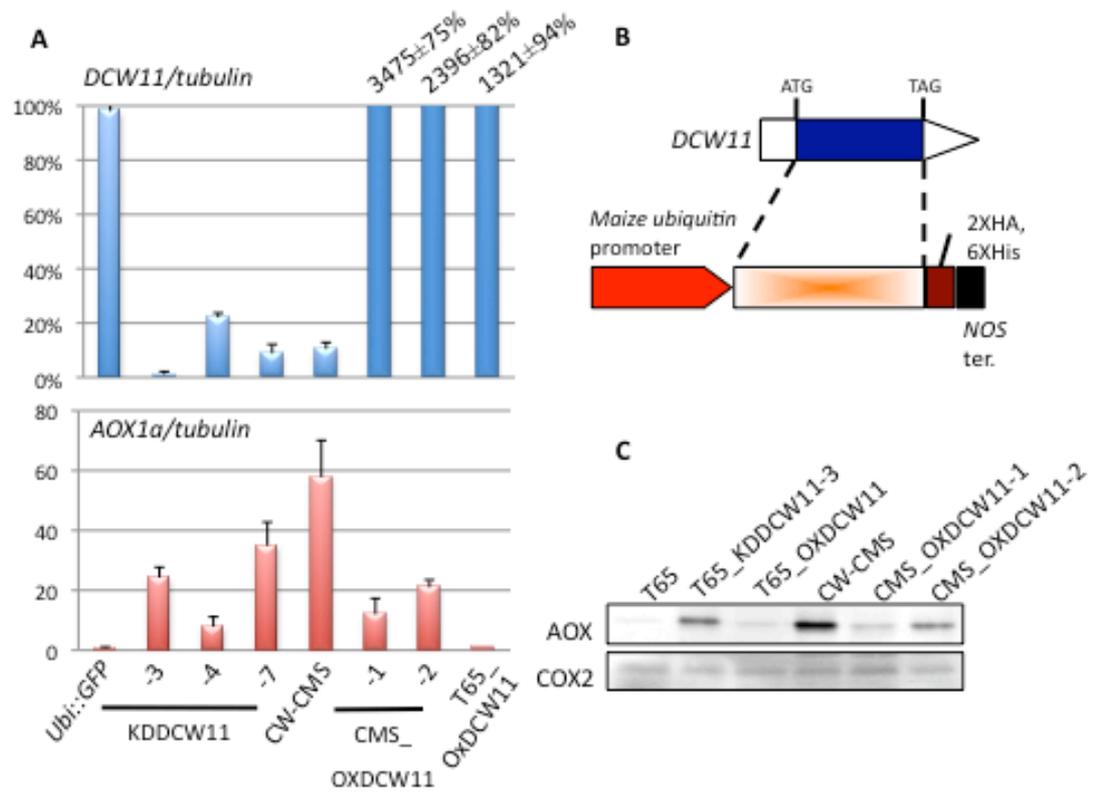


Fig. 16 AOX accumulation of KDDCW11 and OXDCW11 plants.

A, Relative *DCW11* and *AOX1a* expression measured by quantitative RT-PCR.

B, *DCW11* overexpression construct introduced into the CW-CMS line.

C, AOX protein accumulation detected by western blotting using Anti-AOX antibody or Anti-COX2 antibody. Ten μ g of protein extracted from crude organelle extracts were subjected to SDS-PAGE.

系統に導入した場合、AOXの蓄積が顕著に減少した(Fig. 16A・C)。従って、CW-CMS系統においてAOXが異常に発現増加している原因はDCW11の機能低下にあると推察された。また、CW-CMS系統で発現が変動していた *Expansin-alpha* (AK101940)、*CSP41* (*Cleavage specificity 41*:AK071575)、*Pectate lyase* (AK070509, AK100191)、*Pectin methylesterase* (AK107457)や *OsNek3* (AK067073)などの発現をKDDCW11において調査した(Fig. 17)。その結果 *Pectate lyase*、*Pectin methylesterase*や *OsNek3*などはDCW11のノックダウンによって発現が減少したが、*Expansin-alpha*や *CSP41*は影響を受けなかった。

・PP2CであるDCW11はADP-Ribosylation Factorと結合する。

DCW11はPP2Cであり、PP2Cはその他のタンパク質の翻訳後修飾を担い、細胞内の様々なシグナル伝達に関与している(reviewed by Schweighofer et al. 2004)。従ってDCW11と相互作用する因子が存在する可能性が高いと考えられた。そこでYeast-two-hybrid (Y2H)スクリーニングを用い、T65の成熟薬においてDCW11と結合するタンパク質の探索を行った。約300,000クローンの二倍体をスクリーニングした結果、SD -Ade/-His/-Leu/-Trp培地上での1次スクリーニングで4個の陽性クローンを得た。青白選抜による2次スクリーニングを行った後、pGADT7-preyのインサートシーケンスを行ったところ、1種類の遺伝子に由来する陽性クローンがあることが分かり、ADP-Ribosylation Factor (ARF、LOC_Os03g59740)であると予測された(Fig. 18)。このARFタンパク質はミトコンドリアに局在する可能性が高く、生体内でも結合する可能性が高いと考え、DCW11-Binding ARF (DBA)と名付けて解析を行った。DBAは181アミノ酸のタンパク質であり、DCW11同様、PREDOTAR、PSORT、TargetPとMitoProtによってミトコンドリア局在である可能性が強く推測された。DBA全長をpBAD-Thio His TOPO vector (Invitrogen)にクローニングし、Thioredoxin-DBA-6XHis (TDBAH)融合タンパク質の *E. coli*での発現及び精製を行った。GST-DCW11とTDBAHをインキュベートした後、GST pull-down assayを行ったところ、GST精製画分にTDBAHが含まれていることが確認できた(Fig. 18)。従って、DBAとDCW11は *in vitro*でも結合するということが示された。

ARFはsmall GTPaseの一種であり、シロイヌナズナでは21、イネでは15遺伝子がARFをコードしていた(Fig. 19A)。PREDOTARによる予測ではそのうち多くがミトコンドリア局在であるということが推測された(Fig. 19B)。GTPase/ATPase ELIPA assay (Cytoskeleton.com)を用いてTDBAHのGTPase活性を調べた(Fig. 19C)。ネガティブコントロールとして用いたGSTと比較して高い酵素活性を示したため、DBAはGTPaseとして機能する可

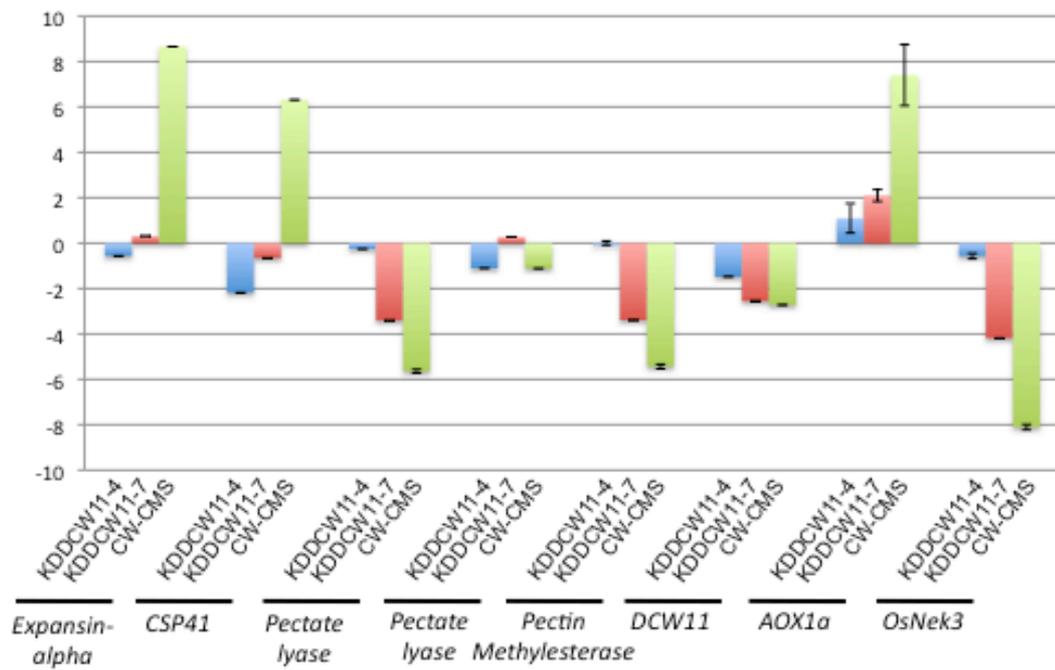


Fig. 17 Relative mRNA expression of CW-CMS related genes in *DCW11* knockdown lines. Values are given in Log_2 ratio against T65, normalized by the expression level of *tubulin alpha-1 chain* (AK069140).

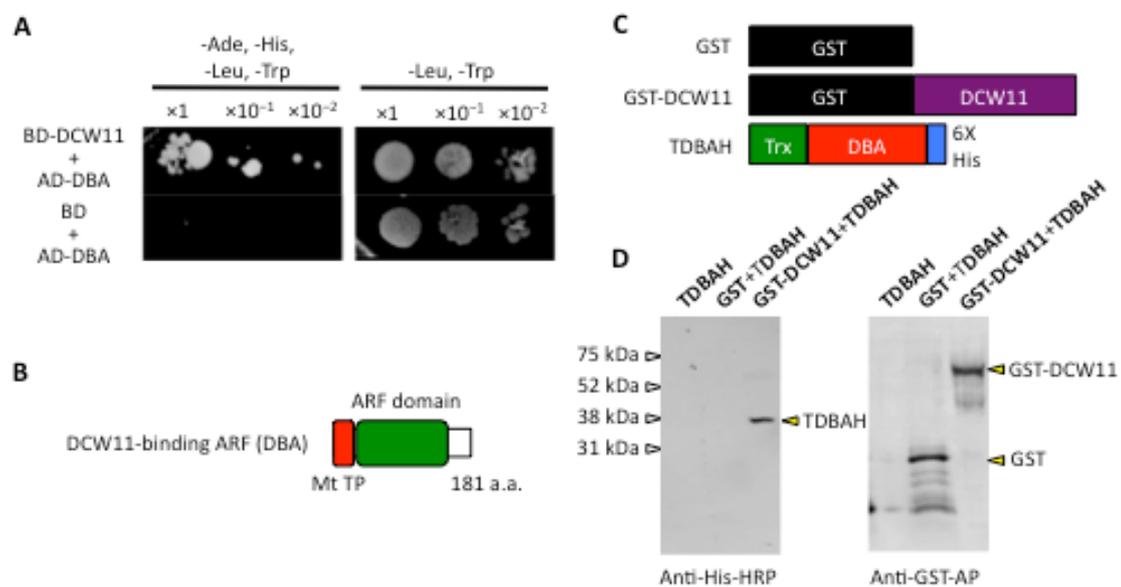


Fig. 18 DCW11 interacts with ARF domain-containing protein.

A, Yeast Y187 strain carrying full-length DCW11 (w/o Mt TP) fused to GAL4 DNA-Binding domain (BD) was mated with yeast AH109 strain carrying part of ADP-ribosylation factor (DCW11 binding ARF: DBA) fused to GAL4 Activation domain (AD). Diploids were streaked on Ade/His/Leu/Trp-deficient media.

B, Putative structure of DBA predicted by Mitoprot II (Mitochondrial target peptide), and pfam ADP-ribosylation factor domain).

C, Schematic images of GST, GST-DCW11 and TDBAH.

D, GST pull-down assay of GST-DCW11 with TDBAH. Protein extracted from GST-purified fraction were subjected to SDS-PAGE.

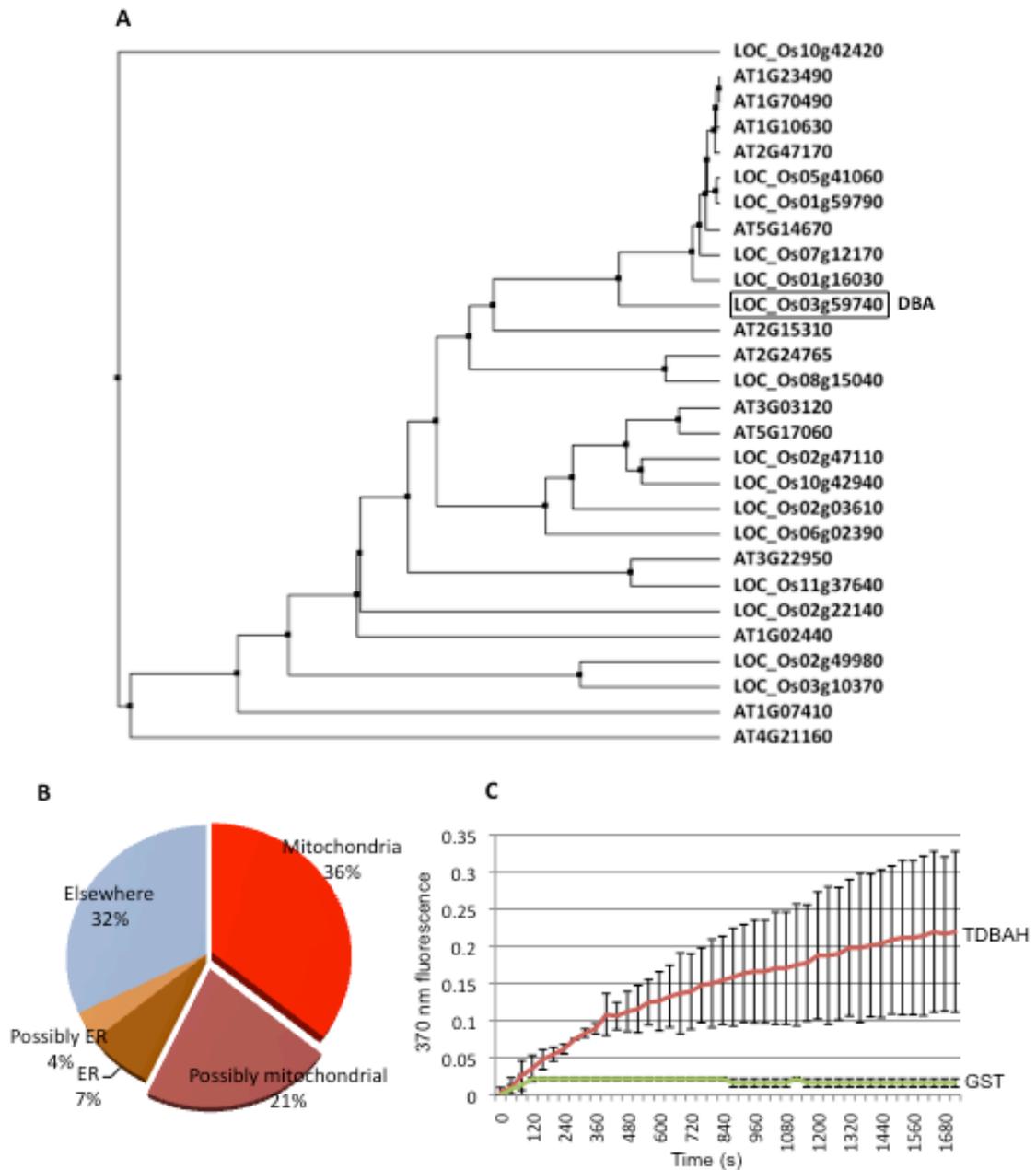


Fig. 19 Characteristics of rice and *Arabidopsis* ARFs.

A, Phylogenetic tree of 21 *Arabidopsis* ARFs and 15 rice ARFs. ClustalW v 1.8 were used to align amino acid sequences, and average distance tree were generated from % identity using Jalview v 2.4 software.

B, Prediction of ARF protein localization by Predotar v. 1.3.

C, TDBAH GTPase activity assay conducted using GTPase/ATPase ELIPA assay (Cytoskeleton.com).

から抽出したところ、*DCW11* 同様、三細胞期花粉を含む葯で最も強い発現を示した(Fig. 20)。しかし、*DCW11* と異なり、その他の組織でも発現が見られた(Fig. 20)。

DBA と *DCW11* の機能の関係を調べるために、*DBA* のノックダウン系統を作成した(*KDDBA*, Fig. 21)。*KDDBA* では *KDDCW11* と同様、*AOX1a* の発現が顕著に増加していた(Fig. 21)。*DBA* を抑制した場合、*DCW11* を抑制した場合よりも約 100 倍以上高い *AOX1a* の発現が見られた(Fig. 21)。しかし *KDDCW11* で発現が抑制されていた *OsNek3* の発現変動は見られなかった(Fig. 21)。*KDDBA* の花粉稔性及び種子稔性の調査を行ったが、非形質転換体と比較して有意な差は見られなかった。

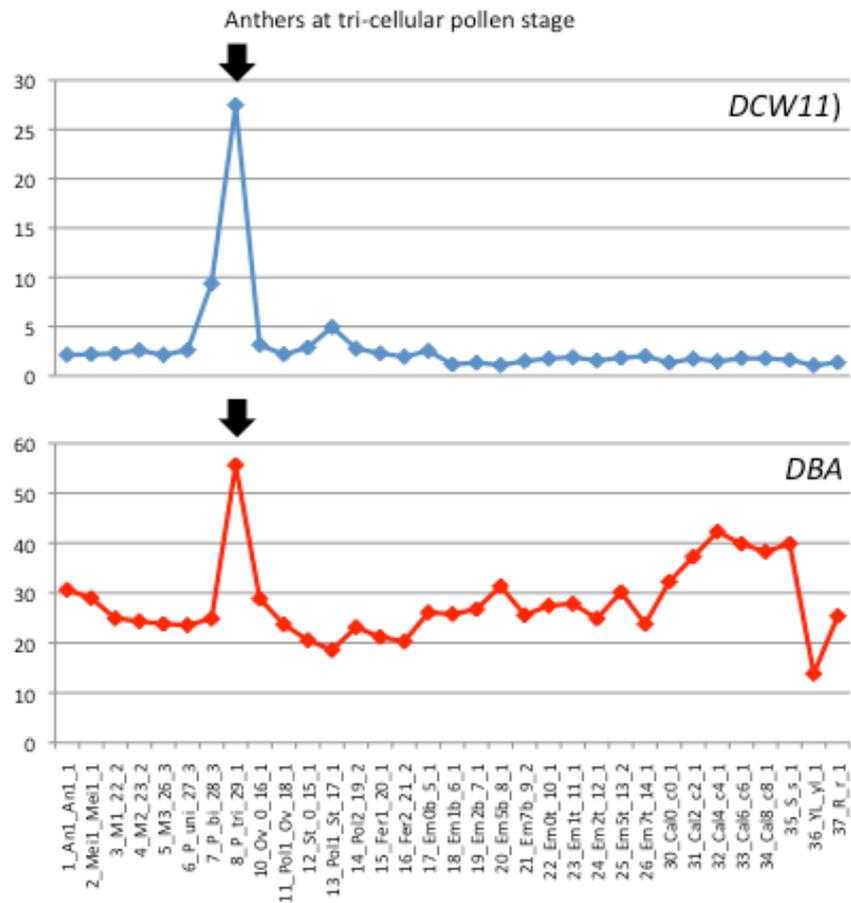


Fig. 20 Expression profiles of *DCW11* and *DBA* extracted from *Oryza_Express* (http://gbarrier.lab.nig.ac.jp/oryza_express/). The specific descriptions for each sampling tissues are clarified in their website.

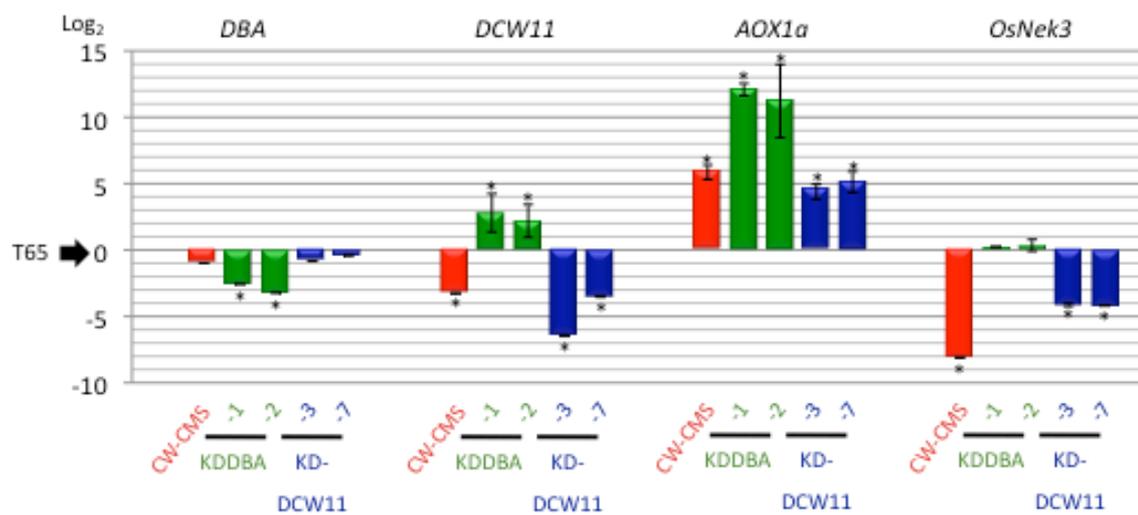


Fig. 21 *DBA*, *DCW11*, *AOX1a* and *OsNek3* mRNA expression in KDDBA and KDDCW11 lines. Values are given in Log₂ ratio against T65, normalized by the expression level of *tubulin alpha-1 chain* (AK069140). Asterisks were marked for values statistically differed compared to T65 (ANOVA p = 0.05).

(3)考察

・DCW11 は機能未知のサブファミリーに属する PP2C をコードする。

DCW11 はミトコンドリアに局在する PP2C であり、脱リン酸化反応によるターゲットタンパク質の制御に関わっているという可能性が考えられた。タンパク質のリン酸化修飾は細胞内のシグナル伝達において重要である。植物においてもリン酸化を通じたシグナルカスケードは植物ホルモンの受容、ストレス応答や形態形成など様々な活動に関わっていることが知られている(Bogre et al. 2003)。シロイヌナズナでは 1,000 以上の protein kinase の存在が予測されている。その数から protein kinase は高いターゲット特異性を持つ事が推測されるが、一方 protein phosphatase についてはどうか？Protein phosphatase はシロイヌナズナでは 112 個見出されており(Kerk et al. 2002)、そのうち 76 個が PP2C である。Protein kinase に対して phosphatase の数は少ないにも関わらず、一部の PP2C は高い基質特異性を持つ事が知られている(Zhou et al. 2002, Meskiene et al. 2003)。従って最近では、植物は general な役割を持つ protein phosphatase を利用する一方、specific な機能を持つものも併用すると考えられている。

シロイヌナズナの PP2C の系統樹を作成した Schweighofer et al. (2004)によると、76 個の PP2C は A-J の 10 個のサブグループに分類される。A は ABA シグナリングに関係する ABI1、ABI を含み、B はアルファアルファの MAPK シグナリングを抑制する MP2C、C は CLAVATA のネガティブレギュレーターであると考えられている POLTERGEIST を含む(Schweighofer et al. 2004)。DCW11 と最も相同性が高い At5g53140 は F グループに分類されたが、このグループに属する遺伝子の機能は未知であった。本研究ではシロイヌナズナ、イネ両方の PP2C を含む系統樹を作成し、11 個のグループを見出した(Fig. S1)。これは本研究では系統樹作成に Clustal W を用い、Schweighofer et al. (2004)は T-coffee を用いた事に起因していると考えられた。しかし、本研究では Schweighofer et al. (2004)が outgroup と見なした At1g75010 も新しいグループに組み入れることができた。

植物のミトコンドリア局在 PP2C については知見が無いが、ほ乳類ではいくつか報告がある。Mouse のミトコンドリア PP2C は、実際に Protein phosphatase 活性を持つ事が報告されている(Joshi et al. 2007)。脊椎動物で広く保存されている PP2Cm はミトコンドリアのマトリックスに局在し、ノックダウンはミトコンドリアの膜ポテンシャルを低下させ、細胞死を引き起こす(Lu et al. 2007)。DCW11 上記 2 つの PP2C とは相同性がなく(data not shown)、ミトコンドリア内での機能は未知である。植物ミトコンドリアでは 30 程度の Phosphoprotein の存在が

予測されており (Juszczuk et al. 2007)、DCW11 もこれらのうちどれかの活性調節に関わるのではないかと予測された。

・DCW11 と CW-CMS の原因に深く関係している。

T65 における *DCW11* のノックダウンは CW-CMS 様の表現型を引き起こした。逆に CW-CMS 系統における *DCW11* の過剰発現は AOX の過剰蓄積を抑制したため、DCW11 の機能低下が CW-CMS 系統において AOX の異常な蓄積を引き起こしていると考えられた。

核コードのミトコンドリア遺伝子の機能欠損は様々な発達異常を引き起こすことが知られている。一例を Table S6 に記載する。しかし、配偶子に異常が生じる変異体の解析は限られており、殆どの遺伝子について変異アリルが二倍体においてホモになった場合の解析が行われている。ミトコンドリア呼吸鎖複合体 Complex II である Succinate dehydrogenase (SDH) complex のサブユニットをコードする *SDH1* への T-DNA 挿入系統では、雄性配偶子から後代への T-DNA 伝達が行われなくなっている(Leon et al. 2007)。それに対して雌性配偶子から後代への T-DNA 伝達は 20%の減少に留まっており、花粉と雌性配偶子ではミトコンドリア Complex II の機能が異なっていることが想像できる。*SDH1-1/sdh1-1* の hemizygous 変異体では約半数の花粉の形成が一核期で発達が停止していた(Leon et al. 2007)。一方 Yeast の Miro GTPase のシロイヌナズナホモログである *Miro1* の T-DNA 挿入変異体では、花粉発達に異常は見られないが、変異アリルを持つ花粉は発芽能力が著しく低下し、アリル伝達率が著しく減少する(Yamaoka and Leaver 2008)。雌性配偶子の伝達率に異常は見られないが、T-DNA 挿入アリルが homozygous になると致死になってしまう(Yamaoka and Leaver 2008)。Miro GTPase は真核生物で広く保存されている GTPase であり、ミトコンドリア外膜に結合することが知られている(Fransson et al. 2006)。この Class の GTPase は真核生物全般で必須であると考えられているが、詳細な機能は不明である。また、Formylglycinamide ribonucleotide synthase をコードする *PUR4* に T-DNA が挿入された変異アリルは花粉致死になる(Berthome et al. 2008)。*PUR4* はミトコンドリアとプラスチド両方に局在していた。*pur4* アリルは雌性配偶子からは正常に伝達された。

雄性配偶子特異的な致死を引き起こす変異アリルが存在する一方で、雌性配偶子形成、あるいは雌雄両方の配偶子に影響を及ぼす変異アリルも存在する。Yeast でミトコンドリアマトリックスに局在するシャペロン Mdj1p オルソログに T-DNA が挿入された *gfa2* 変異体では、雌性配偶子形成時に極核の融合が生じなくなる(Christensen et

al. 2002). この変異アリルの伝達率は減少しないが、受精後の助細胞におけるプログラム細胞死が生じなくなる。これはミトコンドリアでは cytochrome c の放出など細胞死に深く関わっている(Cai et al. 1998)ためであると考えられた。また、*nfd1* 変異体は重複受精時の極核と精細胞核との融合に欠陥がある変異体として同定された (Portereiko et al. 2006)。NFD1 はミトコンドリアの 50S Ribosomal subunit L21 をコードしており、雌性配偶子と雄性配偶子両側からの *nfd1* アリル伝達率の減少が見られた。

ミトコンドリアは好気呼吸に必須なオルガネラであるため、全ての細胞に必要であると考えられる。それにも関わらず上記のミトコンドリア機能欠損変異体は様々な種類の異常を引き起こしていた。これはミトコンドリアの機能の質あるいは量の必要性が細胞によって異なることを示唆している。例えば雌性配偶子の分化は複雑であり、細胞死に注目すると(1)減数分裂後に3つの megaspore が退化する、(2)反足細胞の退化、(3)受精後の助細胞、と3つの細胞死が関わっている(Christensen et al. 2002)。従ってこれらの細胞死にミトコンドリアの特殊な機能が必要である可能性が考えられる。雄性配偶子に主な異常が見られた変異体などでは(Leon et al. 2007, Yamaoka and Leaver 2008, Berthome et al. 2008)、なぜ雌性配偶体に異常が生じないのか興味が持たれる。ひとつの答えとしては、雌性配偶子は孢子体組織に取り囲まれており、それら二倍体の細胞からの ATP 輸送が雌性配偶体を生きながらえさせている可能性が考えられる(Christensen et al. 2002)。

以上の変異体における考察を踏まえると、*DCW11* のような遺伝子はミトコンドリアの機能が雄性配偶子と雌性配偶子で異なっているということの裏付けのひとつである。*DCW11* は成熟花粉で特異的に機能していると考えられ、*DCW11* のノックダウンは花粉発芽能を低下させた。ミトコンドリアは花粉発芽時にエネルギー供給を担う可能性が考えられるが、変異体解析や生理学的な見解は見当たらなかった。しかし花粉管においては、ミトコンドリアは細胞の先端に凝集されているということが報告されている(Lovy-Wheeler et al. 2007)。*DCW11* はミトコンドリアにおいて他のタンパク質の脱リン酸化を行っていると考えられ、*DCW11* の欠損がミトコンドリア機能の低下を促したことで花粉発芽能が低下したことが考えられた。

また、AOX はミトコンドリアストレスマーカーであることは良く知られているが(Vanlerberghe and McIntosh 1996)、本研究では CW-CMS マーカーとして用いた。*DCW11* の過剰発現によって CW-CMS 系統における AOX 蓄積が抑制された。この AOX の異常蓄積は RTG シグナリングの影響であると考えられ、花粉特異的なミトコンドリア-核間の相互作用が存在することが予測された。しかし一方生理学実験レベルで、花粉は転写抑制の影響を受けないということが示唆されてきた(Mascarenhas 1993, Honys and Twell 2003)。すなわち花粉では mRNA が

蓄積されており、発芽時に翻訳がなされるという見解が生まれた。また、単細胞における花粉ではシグナル伝達が活発に行われているとは考えられて来なかった(Maskarenhas 1993)。しかし近年、花粉のトランスクリプトーム解析などで転写調節因子なども見出されており、花粉内においても転写調節、シグナル伝達が行われていることが確認されている(Honys and Twell 2003)。精細胞特異的 DUO1 は R2R3 MYB ドメインを持ち、MYB 遺伝子の多くは転写因子として機能する(Durbarry et al. 2005)。最近見出された花粉二細胞期特異的遺伝子 FBL17 は Ubiquitin-proteasome を介した Cyclin-dependent kinase A;1 inhibitor の分解を行い、花粉三細胞期への分裂を制御している(Kim et al. 2008)。これらの研究により、花粉における複雑なシグナル伝達を想像する事が可能になった。従って DCW11 の機能低下による AOX の過剰蓄積は緒言で述べた yeast の RTG pathway の様に多くの仲介因子が存在するものと考えられた。この事から CMS_OXDCW11 系統では AOX の過剰蓄積は抑制されたが、花粉稔性、及び種子稔性の回復は見られなかった(data not shown)。CW-CMS 系統における AOX1a 発現を誘発する経路と、花粉稔性に関わるシグナル伝達は独立である事が考察された。

・DCW11 と相互作用する DBA も CW-CMS へ関与する。

本研究で、DCW11 と相互作用する因子として、DBA を見出してきた。DBA は ARF であり、DBA は GTPase 活性を持つと考えられた(Fig. 19)。GTPase は GTP と結合して Pi を放出し、GDP と結合した状態の不活性型になることが知られている(Vernoud et al. 2003)。しかし、Bovine brain から精製した ARF 単独では GTPase 活性が検出できず(Kahn and Gilman 1986)、ARF の効率的な GTPase 活性には GTPase-activating protein (GAP)が必要であると考えられている(Huang et al. 2002)。DBA に対応する GAP を見出し、同時にインキュベートすればより DBA の GTPase 活性が高くなる可能性が考えられた。ARF は GTP と結合していない状態で活性型となり、effector と呼ばれる下流タンパク質を膜へと輸送するということが知られている(Huang et al. 2002)。DBA と DCW11 の関係を考察するにあたり、ARF が直接リン酸化あるいは脱リン酸化による制御を受ける可能性を示唆する論文を検索したが見当たらなかった。DBA が通常の ARF のように effector の膜への trafficking を行っていると仮定すると、DBA が DCW11 を effector としている可能性が高いと考えられた。DBA を抑制した場合 DCW11 を抑制したときよりも約 100 倍近く AOX1a レベルが増加していた(Fig. 21)。RNAi の抑制程度も関係するため単純な比較はできないが、DBA の機能欠損の方が DCW11 の機能欠損よりもミトコンドリアによりストレスを与えるという可能性が示唆された。

そして DCW11 はミトコンドリア内膜あるいは外膜で他のターゲットの脱リン酸化を担っているということが考えられた。トウモロコシ(Hack et al. 1991)、パチュニア(Nivison et al. 1994)とテンサイ(Yamamoto et al. 2005, Yamamoto et al. 2008) の CMS において見出された MCAG はミトコンドリア内膜に局在することが示されている。CW-CMS における MCAG の探索については第二章で詳しく述べるが、本研究までに MCAG は見出されていない。今まで見出されてきた CMS のような MCAG が存在し、膜に組み込まれている可能性を考えると、MCAG が DCW11 と直接関係している可能性も考えられた。この仮説は、KDDCW11 が CW-CMS に類似する表現型、molecular phenotype を示したことによって支持されている(Figs. 14-17)。

最後に、DBA ノックダウンでは DCW11 ノックダウン同様 AOX1a の発現が顕著に増加していたが、OsNek3 の発現は変動していなかった(Fig. 21)。OsNek3 は DCW11 ノックダウンによって発現が促されるが、DBA のノックダウンによる発現促進は受けなかったことから、DCW11 あるいは DBA の機能を考察するためには OsNek3 の機能を解析することが有効であるという事が考えられた。

第三節 DCW11 ノックダウンによって発現が抑制される NIMA-related protein kinase, *OsNek3* の機能解析

(1) 材料・方法

・ *OsNek3* の *Tos17* 挿入系統の単離

OsNek3 へのレトロトランスポゾン *Tos17* 挿入系統 ND6002 は農業生物資源研究所、宮尾安藝雄博士より分譲頂いた。*OsNek3* への *Tos17* 挿入は PCR 法で確認した。*Tos17* が挿入されていない WT 型アリルを増幅するプライマー対 5'-TAAGGCTTCATGTTCTGATG-3' と 5'-GTTGATGATGCCCTTCTTGG-3'、及び *Tos17* 挿入アリルを増幅するプライマー対 5'-ATTGTTAGGTTGCAAGTTAGTTAAGA-3' と 5'-GTTGATGATGCCCTTCTTGG-3' を用いて PCR を行った。

・ 形質転換用コンストラクトの作成

OsNek3 の ORF 領域 1,752 bp をプライマー対 5'-GGATCCATGGAGCAGTATGAGGTGCT-3' and 5'-GGATCCCAATCCAGTCCCTTTGAAGCTC-3' を用いて増幅した。第一章・第二節(1)材料・方法・形質転換用コンストラクトの作成と同様に *OsNek3* ORF を過剰発現用のコンストラクトに導入した。

・ *OsNek* 遺伝子の発現解析

OsNek 遺伝子の発現解析には以下に示すプライマー対を用いた。塩基配列は左側が 5' とする。

OsNek1 (LOC_Os03g43590): GCATATGCGATCACTCTCAC CGCTACTTCCTTGTTAATCC

OsNek2 (LOC_Os12g41180): TCGCCAGTTTTGTCATGTGC TGATTGCAGGTGCCACATGA

OsNek3 (LOC_Os07g08000): TTGCTTAAGCACCCACACC CGTCTTGTTAGGTTGACTTGC

OsNek4 (LOC_Os05g36960): CCTGTCGATGTGAGTATCTG GGCTATTTACAACATGCGCC

OsNek5 (LOC_Os01g64490): CTCGAAAACAGCCTGTTTCAAG AACTGCGACTCGCTTCATCA

OsNek6 (LOC_Os02g37830): CGTTCCCATCGTTACAGAAG ACGTAAGTTTTGGTGACCCT

・ 花粉の DAPI 染色

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による花粉の染色には、DAPI 染色液(1mg/ml DAPI, 0.05M Tris-HCl (pH

7.0), 0.5%(v/v) Triton X-100)中で薬を押しつぶして花粉を出した後、蛍光顕微鏡で観察した。

(2)結果

- ・ *OsNek3* の発現は三細胞期花粉特異的であり、CMS バックグラウンドで抑制される。

Oryza sativa NIMA-related kinase 3 (*OsNek3*)は第一章・第一節において行ったマイクロアレイで、CW-CMS 系統において発現が減少していた *DCW1* である。また、第二節において *KDDCW11* においても発現が減少していた遺伝子でもあった。NIMA-related kinase は *Aspergillus nidulans* において見出された。Nek の変異体である *never-in-mitosis A* (NIMA)は、有糸分裂の G2 期で細胞分裂が停止してしまう (Osmani and Ye 1996)。植物ではゲノム解析によりシロイヌナズナで 7、イネで 6、ポプラで 9 個の遺伝子が Nek をコードすると予測されている (Vigneault et al. 2007)。Vigneault et al. (2007)では、マイクロアレイ解析による Nek の発現パターンの結果も掲載されていたが、生殖器官におけるデータは無かった。*OsNek3* に対する基礎的な知見を得るため、本研究ではまず *OsNek* の雄性生殖器官における発現パターンを調査した (Fig. 22)。Vigneault et al. (2007)の解析では、栄養組織における *OsNek3* の発現はほとんど検出されなかった。これは本研究でも同様であり、栄養組織では殆ど *OsNek3* の発現は検出できなかった。一方、*OsNek3* は葯における強い発現特異性を持ち、*DCW11* 同様成熟花粉において最も強い発現を示した (Fig. 22)。*OsNek3* プロモーターを *mRFP* と連結したコンストラクトを用いたプロモーター解析でも同様であり、RFP 蛍光は成熟花粉で最も強かった (Fig. S2)。一方、その他の *OsNek* は *OsNek3* とは異なり、成熟葯特異的な発現パターンを示さなかった (Fig. 22B・C)。また、CMS バックグラウンドにおける *OsNek* の発現パターンを調べたところ、*OsNek3* の発現のみが BT-CMS、CW-CMS、LD-CMS 全ての CMS タイプで減少していることがわかった (Fig. 23)。その他の *OsNek* は CMS バックグラウンドの影響を受けない事がわかった。

- ・ *OsNek3* のノックアウトは生育に影響を及ぼさないが、過剰発現は様々な異常を引き起こす。

OsNek3 の機能を調査するため、*OsNek3* に *Tos17* が挿入された系統 ND6002 を農業生物資源研究所より分譲して頂いた。ND6002 では *OsNek3* の 14 番目のエキソンに *Tos17* が挿入されていた (Fig. 24A)。ND6002 では *OsNek3* の mRNA が検出されず (Fig. 24B)、*OsNek3* の機能を失っていると考えられたため、ND6002 を *osnek3* 変異体とした。Hemizygous (+/-)の個体の自植後代を展開したところ、-/-: +/-: +/+ = 35:63:29 ($\chi^2=0.75$, $p=0.05$, 1:2:1)と正常に分離したため、配偶子致死は起こっていないと考えられた。また、*osnek3* 変異体では WT である日本晴と比較して明白な表現型の異常は見られなかった (Fig. 25A)。*OsNek3* は他の *OsNek* と比較して特徴的な

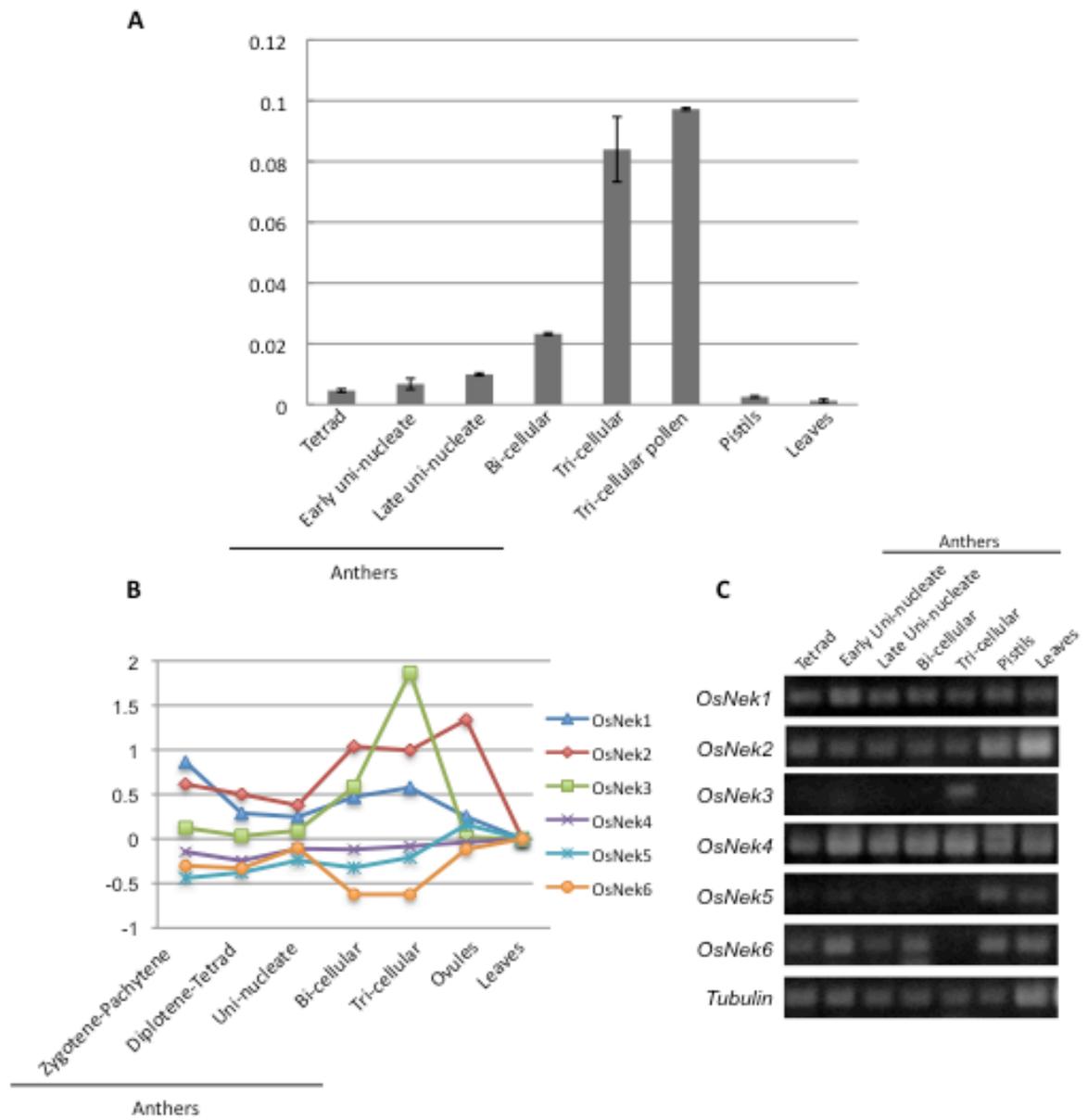


Fig. 22 Expression profiles of *OsNeks*.

A, *OsNek3* tissue expression specificity monitored by quantitative RT-PCR. Values are given in relative expression level against the level of *tubulin alpha-1 chain* (AK069140).

B, Expression profiles of *OsNeks* extracted from the microarray data in *Oryza_Express*.

C, Expression profiles of *OsNeks* monitored by RT-PCR.

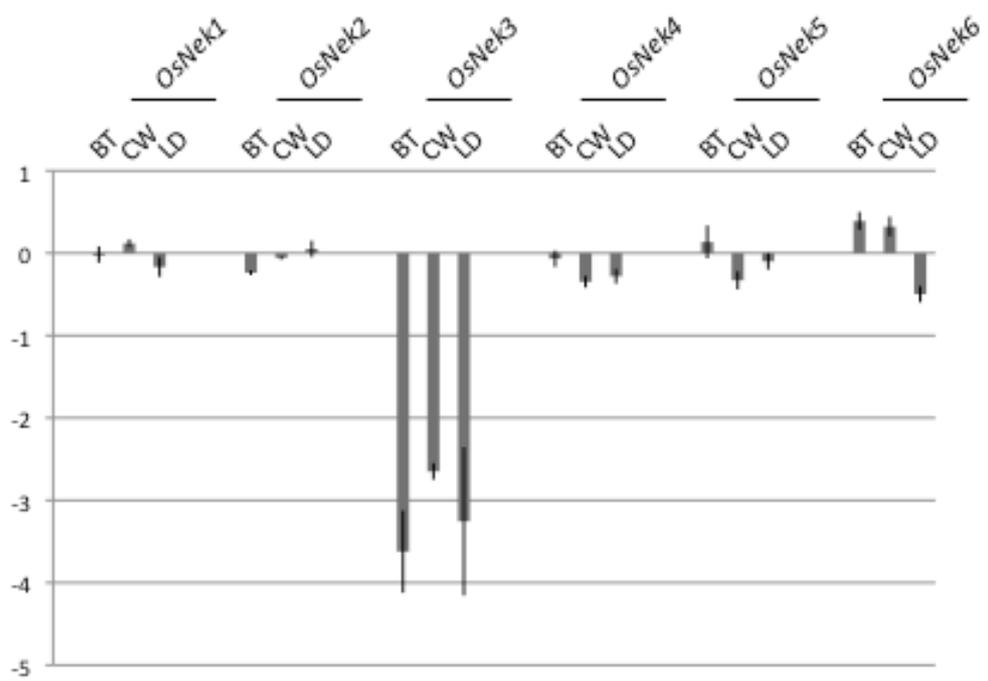


Fig. 23 *OsNek3* expression in anthers at the tri-cellular pollen stage was downregulated in CMS-lines. Quantitative RT-PCR analysis of *OsNeks* mRNA is shown after normalization with the level of *tubulin alpha-1 chain* (AK069140). The expression values in each CMS-lines are displayed in Log₂ ratio against expression levels of Taichung 65.

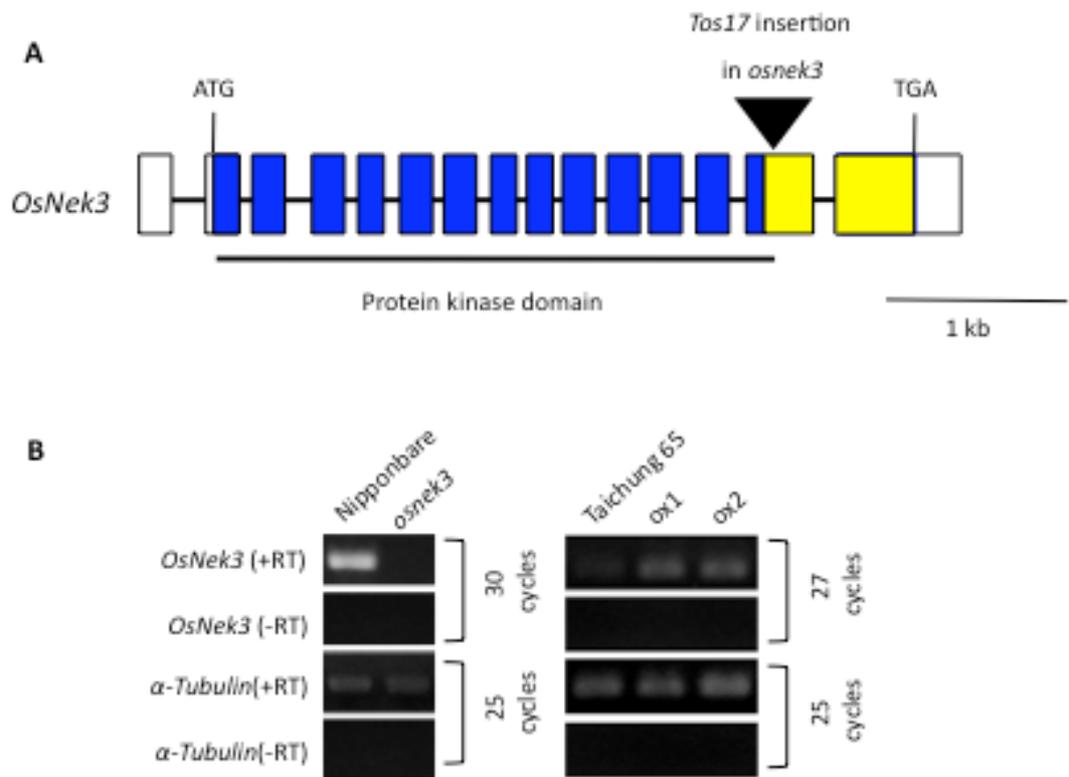


Fig. 24 *OsNek3* *Tos17*-insertion line and *OsNek3*-overexpression lines.

A, Schematic figure of *OsNek3*. Blue boxes indicate the region encoding the protein kinase domain. Yellow boxes indicate the rest of the ORF region.

B, Semi-quantitative RT-PCR analysis of *OsNek3* mRNA expression in anthers at the tri-cellular pollen stage in *Tos17*-inserted *OsNek3*-knockout line (*osnek3*) and *OsNek3*-overexpression lines (*ox1* and *ox2*).

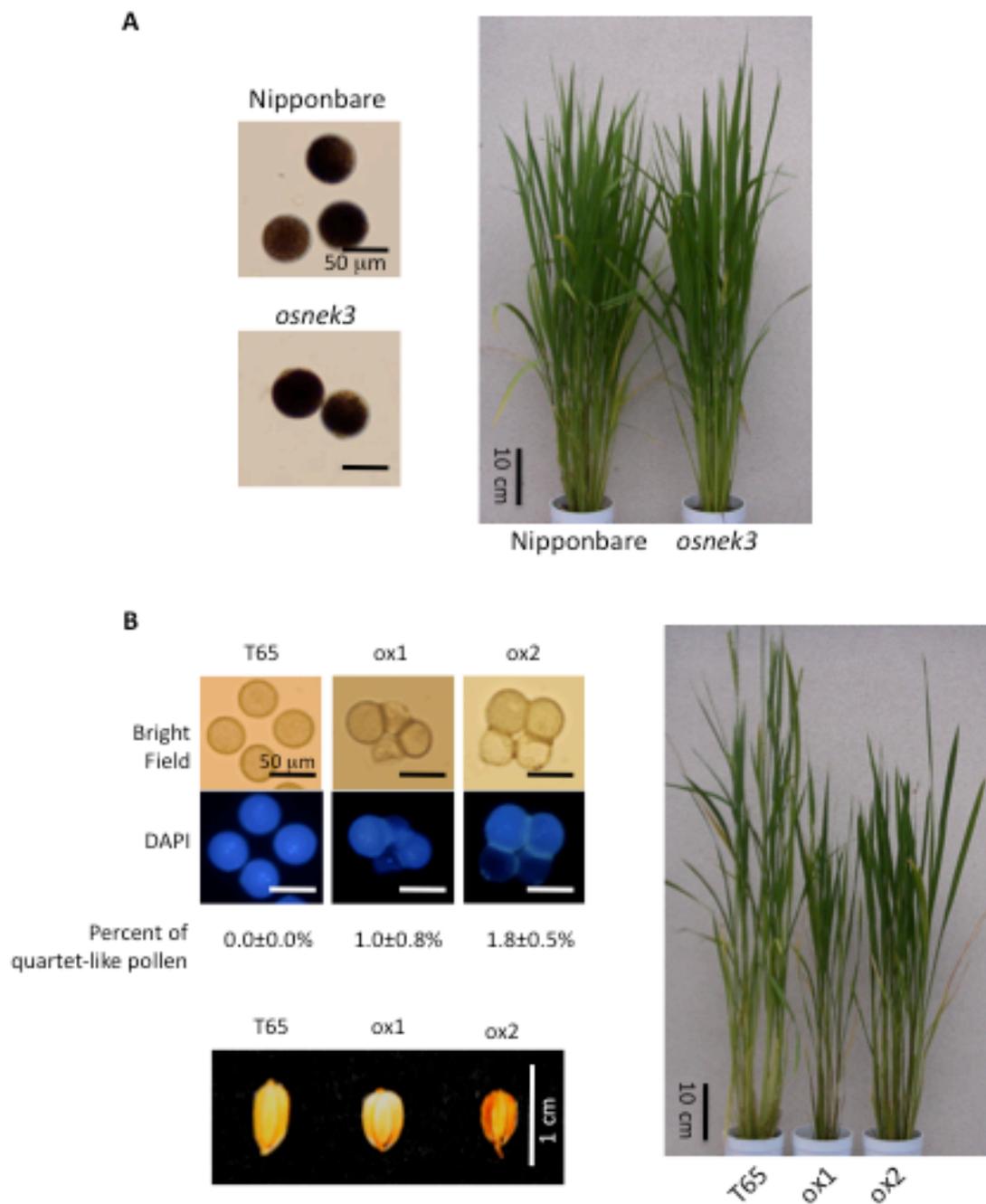


Fig. 25 Phenotypes of *OsNek3* knockout and overexpression lines.

A, The *Tos17*-inserted *OsNek3*-knockout line (*osnek3*) did not exhibit phenotypes in pollen. Left two panels display pollen stained with I2-KI. Right panel displays overall plant architecture of *osnek3*.

B, *OsNek3*-overexpressed lines (*ox1* and *ox2*) exhibited various phenotypes. Upper left panels: tri-cellular pollen. Lower left panel: seed shapes. Right panel: overall plant architecture.

mRNA 発現パターンを示していたため、特有の機能を持つと考えられたが、*osnek3* 変異体では異常は見られなかった。これは、*OsNek3* はその他の *OsNek*、特に *OsNek1* 及び *OsNek2* と高い相同性を示したため、機能が相補されたということが考えられた(Fig. 26)。

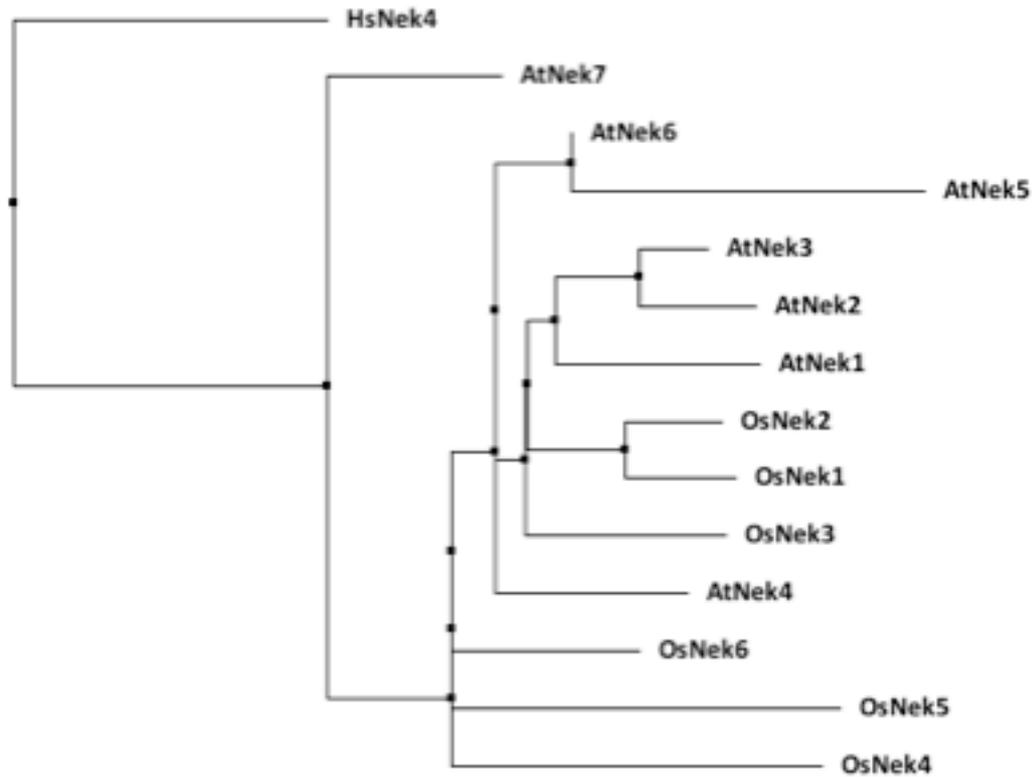
一方、*OsNek3* を過剰発現した系統では、種々の異常な表現型が見られた。*OsNek3* の ORF 領域と 6XHis・2XHA(ox1)、あるいは GFP(ox2)との融合タンパク質を T65 において過剰発現させた(Fig. 25B)。ox1 および ox2 は半矮性を示し、種子の長さが短くなっていた(Fig. 25B)。これはブラシノステロイド欠損変異体に類似していた(Hong et al. 2002, Sakamoto et al. 2006)。興味深い事に、ox1 および ox2 ではそれぞれ 1.0%、1.8%の成熟花粉が四分子期のように細胞壁が融合したままであった(Fig. 25B)。DAPI 染色によってこれらの花粉は 3 細胞期であることが確認された(Fig. 25B)。シロイヌナズナでは *quartet(qrt)* 変異体が見出されており、この変異体では花粉が四分子期のような構造を保ったまま、成熟花粉へと発達することが報告されている(Preuss et al. 1994)。従って *OsNek3* 過剰発現系統で見出されたこの成熟花粉の四分子構造を、今後 *qrt* 様の構造、と定義して議論する。過剰発現系統における *qrt* 様構造では、必ず半数の花粉が潰れていた(Fig. 25B)。これらの系統は導入遺伝子を Homozygous で保持していたため、Zygosity の問題ではないと考察された。なお、ox1 と ox2 は各コンストラクトを導入した系統のうちの代表として表現型を掲載しているが、その他の系統もほぼ同様の表現型を示したためそれらについての説明は省略する。

osnek3 および *OsNek3* 過剰発現系統において、*DCW11* と *AOX1a* の発現を調査した(Fig. 27)。第二節の結果と同様 *KDDCW11* では *OsNek3* の発現は顕著に抑制されていたが、*osnek3* あるいは ox1・ox2 では *DCW11* 及び *AOX1a* の発現に変動は見られなかった(Fig. 27)。従って、*OsNek3* の発現制御において、*DCW11* は上流に位置していることが推測された。

・ ***OsNek3* は主に核に局在し、*OsPLIM2b* と yeast 内で結合する。**

OsNek3 を CaMV 35S プロモーター下流に連結し、GFP と融合させて BY2 細胞で発現させた。方法は第一章・第二節で *DCW11* について行ったものと同様に行った。GFP 蛍光は DAPI で染色された核で多く見られたが、その他微小管構造や細胞膜と思われる部分でも蛍光が見られた(Fig. 28A)。従って *OsNek3* は核、微小管構造と細胞膜に局在すると考えられた。また、Y2H スクリーニングによって *Nek* と相互作用する因子が見出されている(Pnueli et al. 2001, Sakai et al. 2008)。従って *OsNek3* の相互作用因子を探索するにあたり Y2H は有効であると考

A



B

OsNek3	1	MEQYEVLEQIGKGS	FGSALLVRHKVEKKR	RYVLLKKIRLARQTD	42
OsNek1	1	MEQYEVLEQIGKGA	FGSALLVRHKVEKKKYVLLKKIRLARQTD	42	
OsNek2	1	MDQYEVLEQIGKGA	FGSALLVRHKL	LEKKKYVLLKKIRLARQTD	42
OsNek3	43	RCRRSAHQEMELIAKVRNPY	IVEYKDSWVEKGCYVCI	VIGYC	84
OsNek1	43	RTRRSAHQEMQLIATVRNPF	IVEYKDSWVEKGCYVCI	IIGYC	84
OsNek2	43	RTRRSAHQEMQLIATVRNPF	IVEYKDSWVEKGCYVCI	VIGYC	84
OsNek3	85	EGGDMS	EAIKKANSNYFSEER	LCMWLVQLLMALDYLHVNHIL	126
OsNek1	85	EGGDMAE	AIKRATGDHFSEELCKWLVQLLMALDYLHANHIL	126	
OsNek2	85	EGGDMAE	AIKRANGTYFSEELCKWLVQLLMALDYLHANHIL	126	
OsNek3	127	HRDVKCSNIFLTKDQNI	RLGDFGLAKVLTSDDLT	SSVVGTPS	168
OsNek1	127	HRDVKCSNIFLTRDQSI	RLGDFGLAKILTSDDL	ASSVVGTPS	168
OsNek2	127	HRDVKCSNIFIARDQSI	RLGDFGLAKILTSDDL	ASSVVGTPS	168
OsNek3	169	YMCPELLADIPYGS	KSDIWSLGCCLYEMTALK	PAFKA	FDMQT210
OsNek1	169	YMCPELLADIPYGT	KSDIWSLGCCLYEMTALR	PAFKA	FDMQA210
OsNek2	169	YMCPELLADIPYGT	KSDIWSLGCCLYEMTALR	PAFKA	FDMQA210
OsNek3	211	LINKIS	KSVLAPLPTIYSGAFRGLIKSMLRKS	PDHRPSAAE	L252
OsNek1	211	LISKITKS	IVSPLPTRYSGAFRGLIKSMLRKS	PEHRPSAAE	L252
OsNek2	211	LINKITKS	IVSPLPTKYS	GAFRGLIKSMLRKS	PEHRPSAAQL252

Fig. 26 Characteristics of *Arabidopsis* and rice Neks.

A, Neighborhood-joining tree drawn from % identity using Jalview v 2.4.

B, Putative protein kinase domain of OsNek3, OsNek1 and OsNek2.

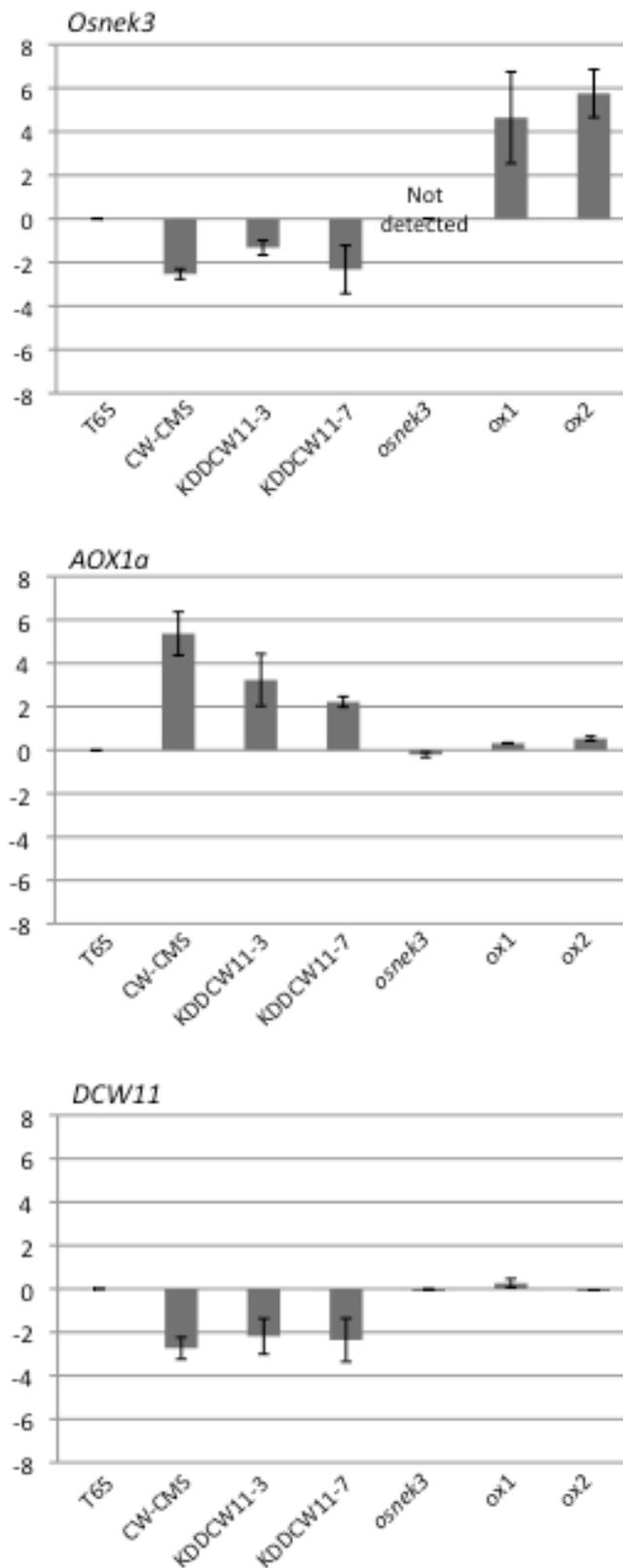


Fig. 27 Quantitative RT-PCR analysis of *OsNek3*, *AOX1a* and *DCW11* in DCW-knockdown lines (KDDCW11-3 and KDDCW11-7), *Tos17*-inserted *OsNek3*-knockout line (*osnek3*), *OsNek3*-overexpressed lines (*ox1* and *ox2*). The expression values were normalized by the level of *Tubulin*. The expression values in each line are displayed in Log₂ ratio against expression levels of T65.

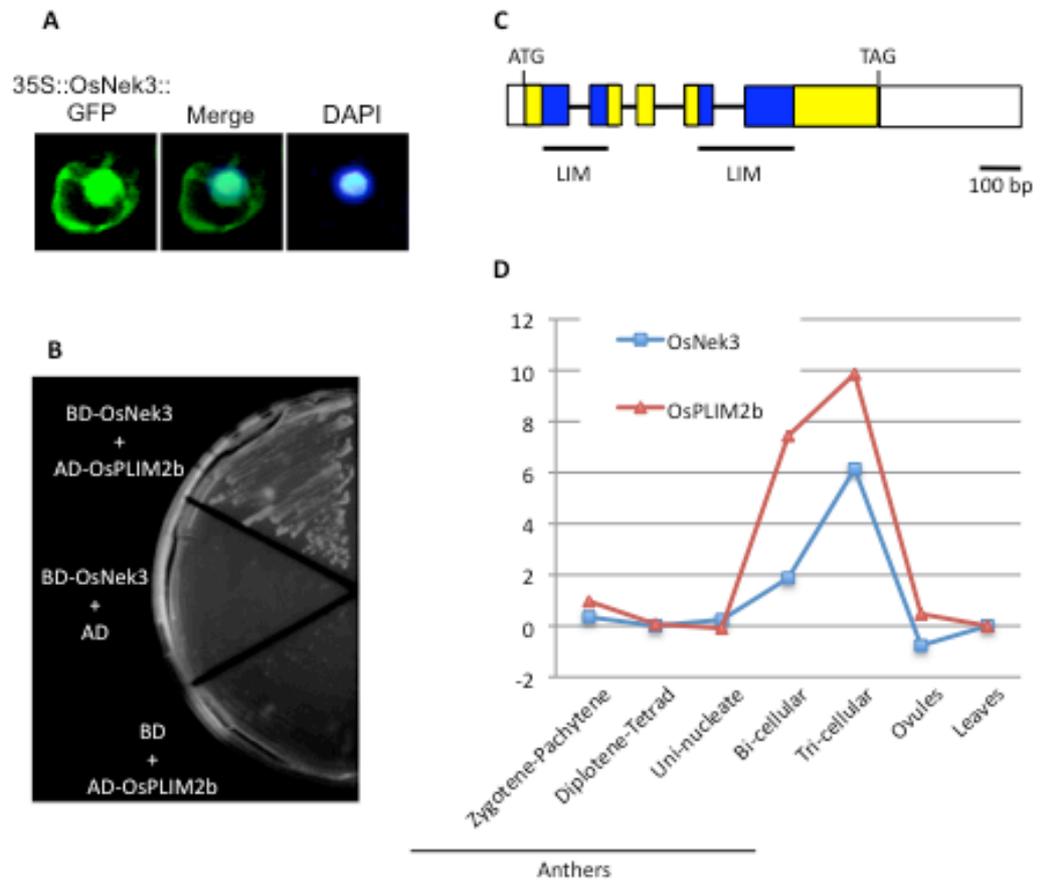


Fig. 28 OsNek3 interacts with OsPLIM2b in yeast.

A, Tobacco BY-2 cells transformed with CaMV35S promoter driven OsNek3::GFP. Merged image (middle) of GFP fluorescence (left) and DAPI fluorescence (right) is displayed.

B, Yeast-two-hybrid screening of OsNek3-interacting OsPLIM2b.

C, Schematic figure of *OsPLIM2b* (LOC_Os04g45010). Blue boxes indicate the region encoding LIM domain. Yellow boxes indicate the rest of the ORF region.

D, Expression patterns of *OsPLIM2b* extracted from microarray analysis during rice reproductive development using the Affymetrix system (http://gbarrier.lab.nig.ac.jp/oryza_express/).

えた。OsNek3 の ORF 全長を GAL4 DNA-DB と融合したタンパク質を *S. cerevisiae* strain strain Y187 で発現させ bait とし、mating によって第一章・第二節で作製したライブラリーのスクリーニングを行った。二次スクリーニング後、3 つの陽性クローンが得られた。陽性クローンに由来する pGADT7-prey プラスミドのスクリーニングを行ったところ、LIM-domain containing protein をコードすると予測される遺伝子(TIGR: LOC_Os04g45010) と相同性が高いことが明らかとなった(Fig. 28C)。この遺伝子はゲノム解析によって *OsPLIM2b* と命名されており (Araud et al. 2007)、2 つの LIM ドメインを保持していた。*OsPLIM2b* の mRNA 発現は *OsNek3* 同様花粉三細胞期の花粉で最も強かったため(Fig. 28D)、*OsPLIM2b* と *OsNek3* が生体内でも結合する可能性が考えられた。

(3)考察

- ・ *OsNek3* は *OsNek* の中でも特殊なメカニズムによって発現制御されている。

OsNek3 は花粉三細胞期で最も強く発現しており、CMS バックグラウンドでは発現が抑制されていた。KDDCW11 においても *OsNek3* の発現が抑制されていたため、*DCW11* のノックダウンが CMS 様の molecular phenotype を引き起こすという可能性も後押しされた。また *OsNek3* の機能を欠損した変異体 *osnek3* では特に表現型の異常は見られなかったが、*OsNek3* を過剰発現すると様々な表現型が見られた。半矮性や種子が短い等、ブラシノステロイド欠損変異体と類似した表現型が見られた他、稀に *qrt* 様の構造を示す成熟花粉が見られた。最後に、*OsNek3* は *OsPLIM2b* と yeast 内で結合するということが示された。

OsNek の発現解析から(Fig. 22, Fig. 23)、*OsNek3* は *OsNek* の中でも独特な発現制御がなされているという可能性が示唆された。CMS バックグラウンドで *OsNek3* の発現のみが抑制されていたということから(Fig. 27)、*OsNek3* のプロモーターにのみ CMS の影響を受ける cis-element が存在することが考察された。PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)による検索では、既知の花粉特異的 cis-element、g10(Pectate lyase に見られる、GTGANTG)や Lat52(Lat52 に見られる、AGAAA)が *OsNek3* に特に多い傾向などは見られなかった。従って *OsNek* のプロモーターの比較解析を行う事で、CMS の際に引き起こされる RTG シグナリングによって制御される新規の cis-element を同定できる可能性が考えられた。

- ・ *OsNek3* の過剰発現によって稀に生じる *qrt* 様構造の考察

OsNek3 の機能欠損は形態的な異常を引き起こさないと考えられたが、*OsNek3* の過剰発現は *qrt* 様の花粉構造を稀に引き起こした(Fig. 25B)。シロイヌナズナの *qrt* 変異体では、(i)成熟花粉ステージになっても四分子期のように花粉壁が融合したままである、(ii)個々の花粉には生殖能力があり正常な発芽能力がある、という 2 つの特徴がある(Preuss et al. 1994)。この特徴から、雄性配偶子変異体解析である tetrad analysis に利用されている。 *qrt* バックグラウンドにおいて雄性配偶子致死アレルをヘテロで持つ場合、*qrt* 構造のうち半分の花粉が致死の表現型を示すと想定されるため、分離比の確認に有用な形質である。分子機構は最近明らかになり、*QUARTET1* は Pectin methyl esterase (PME)をコードすることが示された(Francis et al. 2006)。PME はシロイヌナズナでは 66 個の遺伝子によって構成される大きなファミリーであり、生体内では細胞壁を緩くする機能があると考えられている(Bosch and Hepler 2005, Francis et al. 2006)。根や花粉管の伸張においては細胞壁の素早い再構成が必要であると

考えられており、PME は鍵となる働きを果たしていると考えられる(Bosch and Hepler 2005). *qrt1* 変異体においては、PME に因る細胞壁分解能が欠損したため、花粉壁が融合したまま成熟したと考えられた(Francis et al. 2006). しかし *qrt1* の他に *qrt* 様花粉構造を示す変異体が 2 つシロイヌナズナでは見出されているが、それらの原因遺伝子は明らかにされておらず、PME 以外の分子機構は不明である. イネにおいてもシロイヌナズナ同様、PME による花粉壁再構成が行われていると仮定すると、OsNek3 の過剰発現はタペート細胞における PME の活性化に負の影響を与えている可能性が考えられた. ただし、OsNek3 過剰発現系統ではごく稀に *qrt* 様の花粉が見られたため、OsNek3 による PME の制御は二次的な効果による可能性が考えられた.

イネでは *qrt* 様の表現型を示す *sps12* 変異体が知られているが、分子機構は明らかにされていない(Yamagata et al. 2007). また、Gain-of-function によって *qrt* 様の花粉構造が生じるという知見はなく、本研究で見出した OsNek3 の関連は貴重な知見になりうる.

・ OsNek3 は花粉管伸張に関わる可能性が示唆された.

トマトで見出された Nek である SPAK は CETS family protein である SELF-PRUNING と結合することが知られている(Pnueli et al. 2001). ポプラのPNek1 は14-3-3タンパク質(Cloutier et al. 2005)、AtNek6 は Armadillo-repeat containing protein(Sakai et al. 2008)とそれぞれ結合することが報告されている. Nek はもともと *Aspergillus* において細胞分裂制御に関わる因子として見出されてきた. しかし、植物では維管束木部など細胞分裂が盛んではない組織でも発現が見られる(Vigneault et al. 2007). 従って植物の Nek は細胞分裂のみならず、様々な生体反応に関わっている可能性が示唆されている.

OsNek3 は OsPLIM2b と結合する可能性が高い事が示された. 近年、ユリから単離された LILIM1 は、花粉において過剰発現する事で花粉管伸張阻害効果があることが示された(Wang et al. 2008). LILIM は F-actin と結合するため、花粉管の細胞骨格を制御しているものと考えられた. LILIM は花粉特異的に発現している事が報告されている(Wang et al. 2008). *Oryza Express* から 6 個の *OsLIM* 遺伝子の発現パターンを抽出したところ、*OsPLIM2a*, *OsPLIM2b* と *OsPLIM2c* が三細胞期花粉を含む葯で強く発現していた(Fig. S3). *OsPLIM2* の 3 つはそれぞれ 64% 以上の相同性があり(Fig. S4)、パラログであると考えられている(Amaud et al. 2007). アミノ酸配列レベルでは OsWLIM1 が最も LILIM と高い相同性を示したが、*OsWLIM1* を含むその他の *OsLIM* は花粉特異的な発現を示さなかった事から(Fig. S4)、*OsPLIM2* が LILIM の機能を果たしていると考えられた. *OsNek3* も同ステージで高レ

ベルの mRNA 発現を示したため、OsNek3 と OsPLIM2b とのネットワークが花粉発達及び花粉発芽に深く関わっていると考えられた。LILIM はアクチンに結合するため、微小管構造に局在することが予測されるが、本研究の結果からも OsNek3 が微小管構造に局在する可能性が考えられた(Fig. 28)。OsNek3 が OsPLIM2b をリン酸化し、OsPLIM2b の活性を制御する事で花粉管における細胞骨格が再編成され、細胞伸張が制御されるという事が考えられた。一方、*osnek3* 変異体で表現型が見られなかったことは OsNek3 の機能が OsNek1 あるいは OsNek2 によって相補されている可能性がある事を言及した。さらに OsPLIM2b の機能も非常に相同性が高い OsPLIM2a と OsPLIM2c によって相補される可能性があり(Fig. S3)、*OsNek3* と *OsPLIM2b* の両遺伝子が花粉発芽に関わっている可能性を遺伝学で検証することは難しいと考察された。今後 OsNek3 および OsPLIM2b の花粉発芽への関わりを証明するには生化学的アプローチを用いることが有効であると考えられた。

CW-CMS 系統の花粉は発芽能力を失っている事を先述した(Fig. 2)。従って CW-CMS においては花粉発芽に関わるような核遺伝子発現が抑制されているのではないかと考察され、*OsNek3* はそのような遺伝子であると考えられた。第一節で行ったマイクロアレイでは、CW-CMS 系統における OsPLIM2b (LOC_Os04g45010)の発現低下は見られなかった(data not shown)。mRNA 発現パターンから、*OsPLIM2b* も *OsNek3* 同様三細胞期花粉において機能する事が考えられた。この事から、CW-CMS において花粉発芽に機能しうる遺伝子全てが減少しているのではなく、選択的に発現抑制が起こっているという事が示唆された。従って CW-CMS 系統において生じている RTG シグナリングは特定の遺伝子群を制御しうるものであると考えられた。*DCW11* を抑制した事によって *OsNek3* 発現も抑制されたことは、緒言で記述したシロイヌナズナにおける Noflurazon 処理などプラスチドストレス時の *Lhcb* 遺伝子発現抑制 RTG シグナリングを連想させる(Susek et al. 1993)。この *Lhcb* 抑制の RTG シグナリングは、ストレスによってプラスチドの機能が低下した場合、エネルギー保存のために核コード遺伝子発現の抑制が起こるというものであると想像できる。本研究の場合、*DCW11* の機能低下によって引き起こされたミトコンドリアストレスを起因とした RTG シグナリングによって *OsNek3* の発現が抑制されているものと考えられた。しかし、DBA の機能低下では *OsNek3* の発現は変動しなかったことから、この RTG シグナリングは少なくとも2種類以上に分化しているものと考察された。以上のような RTG シグナリングが CW-CMS における花粉発芽能の欠損によって引き起こされているのではないかと考えられ、*DCW11* の局在を考えるとミトコンドリアが起因となっていると考えられた。

第二章、CW-CMS イネのミトコンドリアゲノムの遺伝学的解析

緒言で述べた様に、多くの CMS 系統において特有のミトコンドリア ORF として MCAG が見出されている (Schnable and Wise 1998, Hanson and Bentolilla 2004). MCAG は CMS がミトコンドリア遺伝子の Gain-of-function 変異によって引き起こされるという所以であり、既存の遺伝子の Loss-of-function ではなく、MCAG が存在する事が CMS の原因であると考えられている。第一章・第二節・考察においても述べた様に、これまでに見出された MCAG 産物はミトコンドリア内膜に局在する可能性が強く示唆されており、多くのものが強い疎水性を示す。本章では以上の MCAG のバックグラウンドを踏まえ、CW-CMS 系統における MCAG を見出すことを目的とした。そのため、第一節では Pyrosequencing 法を用いた CW-CMS ミトコンドリアゲノムの塩基配列の解析を行った。第二節では CW-CMS 系統に特有のゲノム構造に注目し、MCAG としての可能性を追求した。

投稿論文

・ Fujii et al. (2008) Large-scale genomic re-organizations were present only in cytoplasmic male sterile mitochondria: Comparison of five independent rice mitochondrial genomes. *in preparation*

第一節 Pyrosequencing 法による 2 種類の CMS イネミトコンドリアゲノムの解析

(1)材料・方法

・材料

CW-CMS 系統は第一章でと同様のものを用いた。LD-CMS 系統はインディカ品種 Lead rice に由来する CMS 系統である (Itabashi et al. 2008)。既知のミトコンドリアゲノムシーケンスは日本晴 (DQ167400)、PA64S (DQ167807) と 93-11 (DQ167399) として NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) に登録されていたものを用いた。PA64S の核ゲノムは *Oryza sativa* L. ssp. *indica* に由来するものであるが、細胞質ゲノムは *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* に由来する系統である (Tian et al. 2006)。PA64S は温度・日長感受性の核型雄性不稔系統であり、細胞質雄性不稔系統ではない。93-11 は核ゲノム及び細胞質ゲノム共々 Indica に由来する系統である。

・ミトコンドリア DNA の抽出

Tanaka et al. (2004) の方法に従った。胚盤由来カルス 5 g を氷冷した抽出バッファー (0.4 M mannitol, 25 mM MOPS (pH 7.8), 1 mM EGTA, 4 mM cystein, 0.2% BSA (w/v)) 中で潰した後、四層の Miracloth (Calbiochem) で濾過した。抽出液を 1,000×g, 1 分遠心した後、上清を回収し、さらに 2,000×g, 10 分間遠心した。上清を回収後、10,000×g, 15 分間遠心をする事でオルガネラ画分を沈殿させた。沈殿を 5 ml の抽出バッファーに融解し、超遠心管に用意したショ糖勾配層 (20 %, 35 %, 47 %, 60 % sucrose (w/v), 10 mM Tricine (pH 7.5), 1 mM EGTA) の上に重層した。108,000×g, 90 分間遠心を行った後、35% から 47% の層を回収した。3 volume の洗浄バッファー (0.2 M mannitol, 10 mM Tricine (pH 7.5), 1 mM EGTA) で洗浄した後、10,000×g, 20 分間遠心して生じた沈殿をミトコンドリア画分とした。ミトコンドリアゲノム DNA の抽出には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いた。

・Pyrosequencing 法による全ミトコンドリア塩基配列決定およびミトコンドリアゲノム構造の解析

GS FLX 高速シーケンサーによる pyrosequence は TaKaRa-Bio での受託解析により行った。CW-CMS は計 15,965,332 bp の塩基配列が得られ、ミトコンドリアゲノムを 500,000 bp と仮定すると冗長度 31.9 となり、LD-CMS は計 15,020,464 bp の塩基配列が得られ、冗長度 30.0 であった。Read fragments のコンティグ化は

TaKaRa-Bio が行ったが、高頻度の重複と転座により全ゲノムのアセンブリーは不可能であったため、1-50 kb 程度のコンティグ約 500 配列を入手した。これらの配列を BLAST 検索し、既知の日本晴ゲノム上での位置を明らかにした。また、この過程で核ゲノムに完全ヒットした配列を調査対象から除外した。ミトコンドリアにマスターサークルが存在する事は結論されていないが(Kubo and Mikami 2007)、本研究では存在するという仮定し、全ゲノムがひとつの環状 DNA になるようにコンティグを Sequencher ver. 4.2.2 (Gene Codes corporation)で連結していった。Genome Matcher ver. 1.21(Otsubo et al. 2008)によって日本晴、CW-CMS 系統、LD-CMS 系統それぞれのゲノムの再編成を調査した。また、Spidey program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>)によって既知のミトコンドリア遺伝子、rRNA 及び tRNA 内の変異同定を行った。新規遺伝子予測には Genemark.hmm for Prokaryotes (http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/gmhmm2_prok.cgi)を用いた。イネの BT-CMS における MCAG であると考えられている *orf79* が 79 アミノ酸のタンパク質をコードすることから、70 アミノ酸未満の ORF は解析対象外とした。

(2)結果

・ CMS 系統におけるミトコンドリアゲノムの概要

本研究では CW-CMS の原因解明を目的としているが、全ミトコンドリアの塩基配列解析を行った場合 CW-CMS 系統に特有な変異かどうか確認するためには比較対象が必要であると考えられた。従って CW-CMS と LD-CMS 両方のミトコンドリア DNA を抽出し、Pyrosequencing を行った。結果の概要を Table 1 に示した。CW-CMS が 564,191 bp、LDA が 417,033 bp のミトコンドリアゲノムを構成していることが推測された。ライブラリーの全配列決定によってシーケンスが明らかになっている日本晴(Nipponbare)が 490,520 bp(Notsu et al. 2002)、ショットガンシーケンスによってシーケンス解析が行われた PA64S 及び 93-11 はそれぞれ 490,673 bp、491,515 bp であった (Tian et al. 2006)。日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica)、PA64S (Japonica)と 93-11 (Indica)の 3 つのゲノム間では大きなゲノム再編成が起こっていないことが確認された(Fig. 29)。一方、日本晴、CW-CMS (*Oryza rufipogon* Griff.)と LD-CMS (Indica)の 3 つのゲノム間では複雑なゲノム再編成が生じていることが明らかとなった(Table 1)。例えば CW-CMS では、日本晴と比較して少なくとも 15 回の相同性組み換えが生じたと推測された(Table 1, Fig. 29)。LD-CMS も少なくとも 12 回のゲノム組み換えが生じたと予測された(Table 1, Fig. 29)。日本晴、PA64S と 93-11 ではそれぞれ 3 つの大きな重複領域(>10,000 bp)があったのに対し、CW-CMS では 5 つ、一方 LD-CMS では大きな重複は 1 つであった(Table 1)。従って重複の多さが各ゲノムの大きさに比例していると考えられ、この見解は Allen et al. (2007)によるトモロコシ 5 系統のミトコンドリアシーケンス解析における結果と一致した。Fig. 29, Fig. 30 ではこれらの結果を図示した。重複領域を除いた日本晴の 374,866 bp に対して各ゲノムをプロットしたところ、日本晴、PA64S と 93-11 のゲノム構成は極めて類似していることが分かったが、CW-CMS と LD-CMS は激しい相同性組み換え、転座、逆位や挿入欠失などが生じていることが考えられた(Fig. 29, Fig. 30)。日本晴、CW-CMS と LD-CMS のマスターサークルを Fig. 31 に示した。

・ 日本晴において予測されている遺伝子における変異

日本晴では 55 個の遺伝子、23 個の tRNA(pseudo-tRNA を含む)、3 個の rRNA が予測されている(Notsu et al. 2002)。Spidey program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>)を用いて各ゲノムにおけるこれらの配列内の変異を探索したところ、*cox3*、*orf152b*、*orf176*、*orf224*、*orf288*、*pseudo-rps14*、*rps1* と *rps2* の遺伝子領域内に SNPs や InDels が見られた(Table 2)。合計 28 種類の変異が見られたが、遺伝子領域内の変異のみ

Table 1 Summary of genomic organization

	Nipponbare	CW-CMS	LD-CMS
Length	490,669	564,191	417,033
Synonymus mutations	–	0	0
Non-synonymus mutations	–	3	1
Large duplications (>10,000 bp)	3	5	1
Recombination (vs Nipponbare)	–	15	12
Large InDels (>1,000 bp)	–	1	2

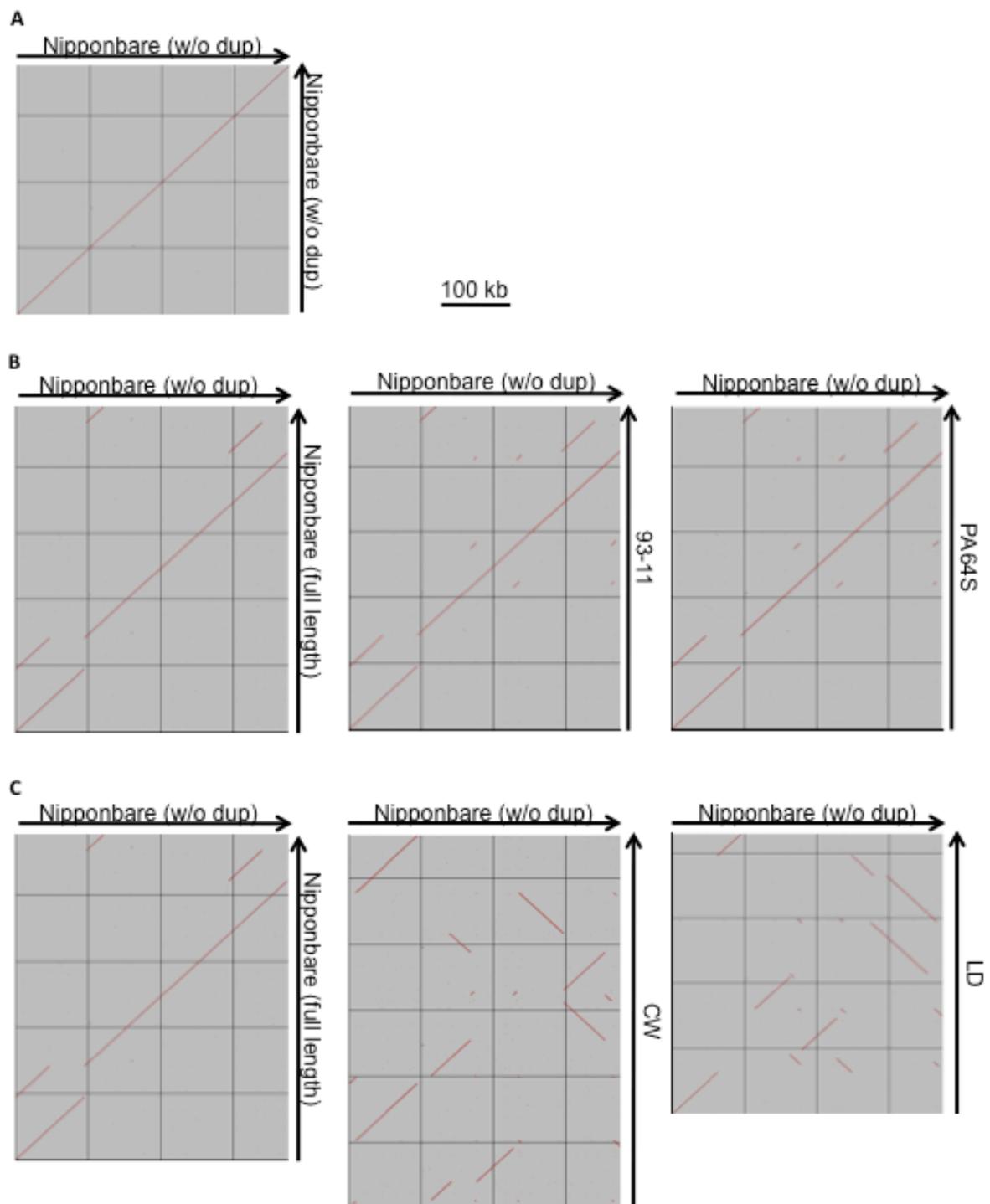


Fig. 29 Genomic organization plot of five rice mitochondrial genomes. Red lines indicated the homologous regions. A, Nipponbare genome without large duplicated regions (W/o dup) plotted against its own genome. B, Nipponbare genome (w/o dup) in X axis, plotted against Nipponbare with duplicated region (full length), 93-11 or PA64S genomes in Y axis. C, Nipponbare genome (w/o dup) in X axis, plotted against CW-CMS or LD-CMS genomes in Y axis .

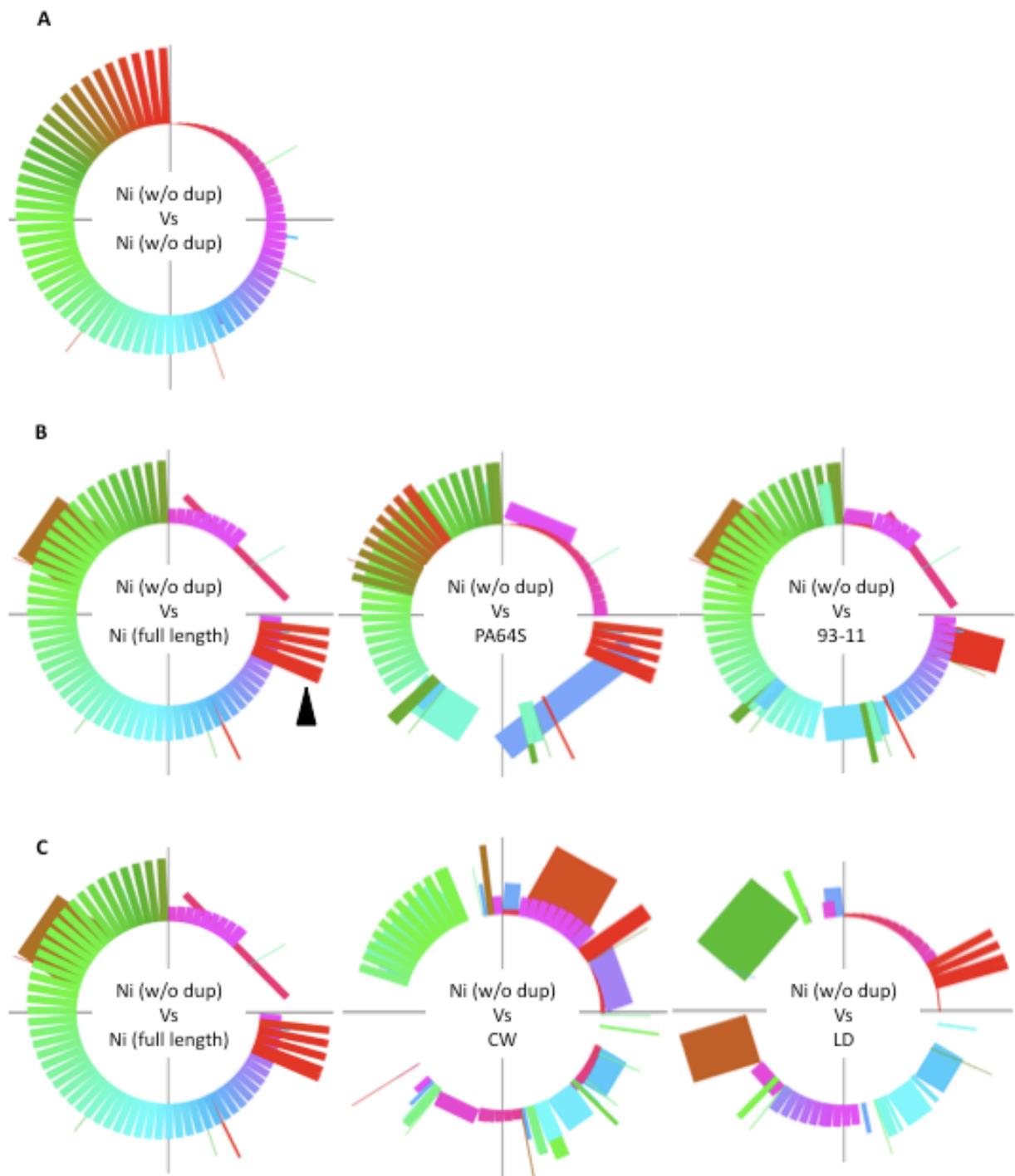


Fig. 30 Colorgrams of mitochondrial genome alignment. Mitochondrial sequence of Nipponbare genome (w/o duplication) is aligned from 0 o'clock to 12 o'clock position. Colors and height of the boxes indicate the regions of similarity. For example, red large boxes in the leftmost colorgram of B (arrowhead) shows the remark of duplication. A, Nipponbare genome without large duplicated regions (W/o dup) plotted against its own genome. B, Nipponbare genome (w/o dup), plotted against Nipponbare with duplicated region (full length), 93-11 or PA64S genomes. C, Nipponbare genome (w/o dup), plotted against CW-CMS or LD-CMS genomes.

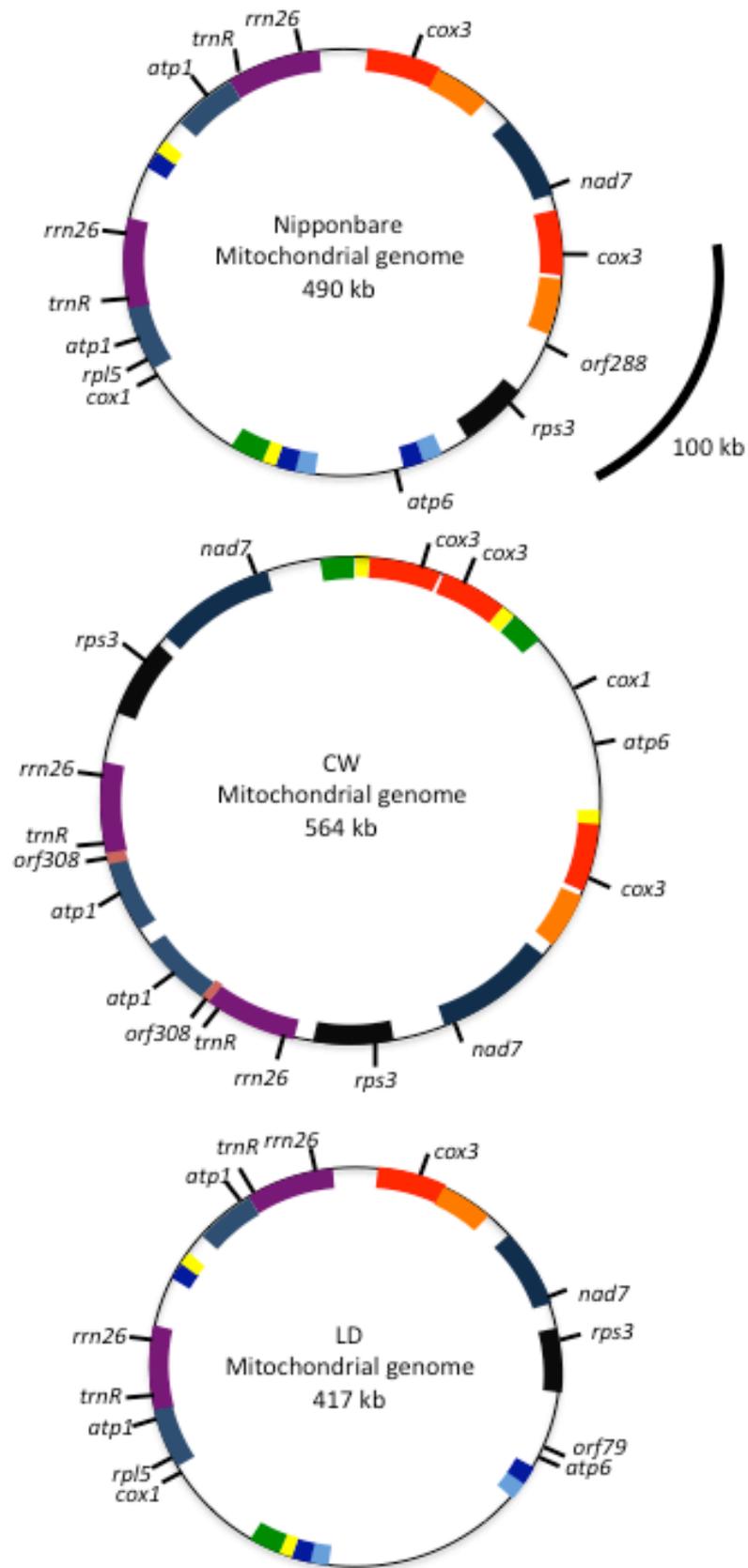


Fig. 31 Putative mastercircle of Nipponbare, CW-CMS and LD-CMS mitochondrial genome. Boxes with same colors indicate the same regions.

Table 2 Summary of SNPs and InDels in genic regions

Genes	Synonymus			Non-synonymus			Deletions			Other mutations			Allele types*				
	CW	LD	PA64S	93-11	CW	LD	PA64S	93-11	CW	LD	PA64S	93-11	CW	LD	PA64S	93-11	Gene types*
cox3	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
orf152b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not present	-	-	-	c
orf176	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	9
orf224	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
orf288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Partially present	-	-	-	c & l
pseudo-rps14	-	-	-	-	-	-	-	6	6	-	-	-	-	-	-	-	cl
rps1	-	-	-	-	2** (R144G)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c
rps2	-	-	-	-	2 (K183N, F184Y)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c & l

*Gene types were designated to distinguish every possible mode of mutations. For example, cox3 were same in CW-CMS(c), LD-CMS(l) and Nipponbare (N)but different in 93-11(9), thus designated as 9 type.

** Two nucleotide mutations resulted in one amino acid exchange.

*** ORF elongation by nucleotide changes in the N-terminal region. L162P is the amino acid change in *orf288* basis.

では PA64S と日本晴を区別する事はできなかった。さらに、Tian et al. (2006)が見出した PA64S vs 93-11 間の非遺伝子領域における InDel によって CW-CMS ゲノムと LD-CMS ゲノムを分類した(Table 3)。その結果両 CMS 系統は、InDel 76336、InDel 76598、InDel 90662、InDel 201718 については 93-11 型であったが、その他ほとんどの InDel は *japonica* 型であった(Table 3、Fig. 32A)。例外的に、InDel 200488 は日本晴、PA64S、93-11 と両 CMS 系統全てが異なる遺伝子型を保持していた。しかし、非遺伝子領域における InDel では CMS 系統間に差を見出す事はできなかった。また、Tian et al. (2006)が見出した 96 の SNPs によって CW-CMS と LD-CMS ゲノムを分類した場合も同様であり、52.3%の SNP が *japonica* 型であった事に加え(Table 4、Fig. 32A)、両 CMS 系統のゲノムは完全に同じ genotype であった。遺伝子領域内の変異あるいは PA64S vs 93-11 間の InDels・SNPs によって各ハプログループ間の遺伝的距離の算出を行った(Fig. 32B-D)。結果、遺伝子領域をもとに算出した場合には CW-CMS 系統が outgroup と見なされ、PA64S と日本晴の cluster に対して LD-CMS 系統、93-11 の順で近い事が明らかとなった(Fig. 32B)。しかし、非遺伝子領域の InDel や SNP について同様の解析を行った場合、93-11 が outgroup となり、両 CMS 系統は PA64S と日本晴の cluster に近い事が図示された(Fig. 32C)。遺伝子領域、InDels・SNPs 全ての変異を考慮して系統樹を作成した場合、93-11 が outgroup とみなされ、日本晴からの遺伝的距離は PA64S<LD-CMS<CW-CMS<93-11 の順で離れて行く事が明らかとなった。

個々の遺伝子領域に注目した場合、各 CMS 系統に特有の変異がいくつか見られた。以降、93-11 特異的な変異が見られる遺伝子を gene type 9、CW-CMS 特異的なものを gene type c、CW-CMS 系統と LD-CMS 系統に共通の変異を持つものを gene type cl、両 CMS 系統で type は異なるが変異が見られるものを gene type c & l と記す。例えば *orf152b* は前半部分が CW-CMS ミトコンドリアゲノムより欠失しており、ORF が粗めない状態になっていた。こういった遺伝子を gene type c と分類した。その他 gene type c として、ハウスキーピング遺伝子であるにも関わらず *rps1* 及び *rps2* に非同義置換が見られた(Table 2)。さらに、*pseudo-rps14* は Gene type cl に属し、CW-CMS 系統と LD-CMS 系統に共通の 6 塩基の欠失が見られた(Table 2)。Tian et al. (2006)が見出した通り、*cox3* と *orf224* はそれぞれ一箇所の非同義置換を伴っていた(Table 2)。また、Tian et al. (2006)では言及されていなかったが、*orf176* は 93-11 において 9 塩基の欠失が生じており、3 アミノ酸が欠失した ORF 構成になっていた。

Gene type c & l に属する *orf288* はアリル間で興味深い挙動を示した。*orf288* は日本晴、PA64S と 93-11 においては 288 アミノ酸のタンパク質をコードすると予測される遺伝子であるが、LD-CMS 系統においては N 末端側の塩基配列の変異によって ORF が 310 アミノ酸に延長されていた (*LDORF310*, Table 2)。それに対して、CW-CMS

Table 3 Comparison of InDel genotypes among japonica mitochondrial genomes Nipponbare, PA64S and indica 93-11 (Tian et al. 2006).

Indel*	Nipponbare	PA64S	93-11	CW-CMS	LD-CMS
30846	j	j	i	j	j
65598	j	j	i	j	j
76336	j	j	i	i	i
76516	j	j	i	j	j
76598	j	j	i	i	i
90662	j	j	i	i	i
125906	j	j	i	j	j
182342	j	j	i	j	j
200488**	n	p	i	c	c
201781	j	j	i	i	i
223769	j	j	i	j	j
224223	j	j	i	j	j
242747	j	j	i	j	j
256168	j	j	i	j	j
282887	j	j	i	j	j
283343	j	j	i	j	j
308242	j	j	i	j	j
308253	j	j	i	j	j
316378	j	j	i	j	j
342328	j	j	i	j	j
391513	j	j	i	j	j
413841	j	j	i	j	j
414297	j	j	i	j	j
423441	j	j	i	j	j

*Nipponbare vs 93-11 InDels detected in the genomic study by Tian et al. (2006).

**Only CW-CMS and LD-CMS genomes retained the same sequences in this region, and other genomes possessed different sequences.

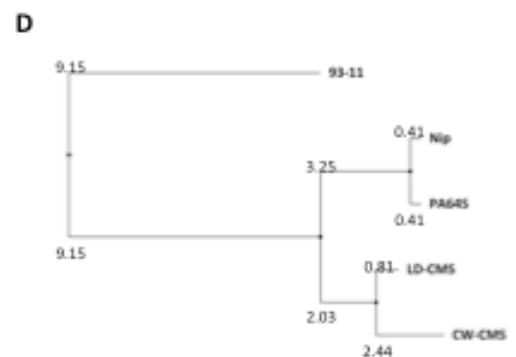
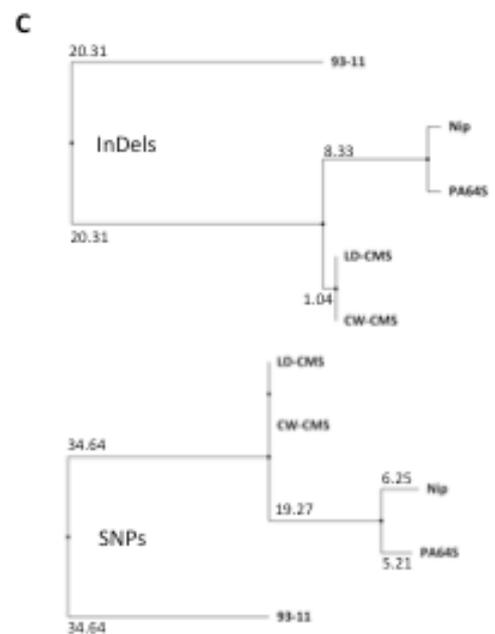
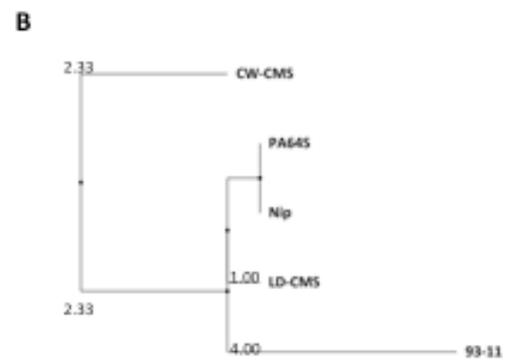
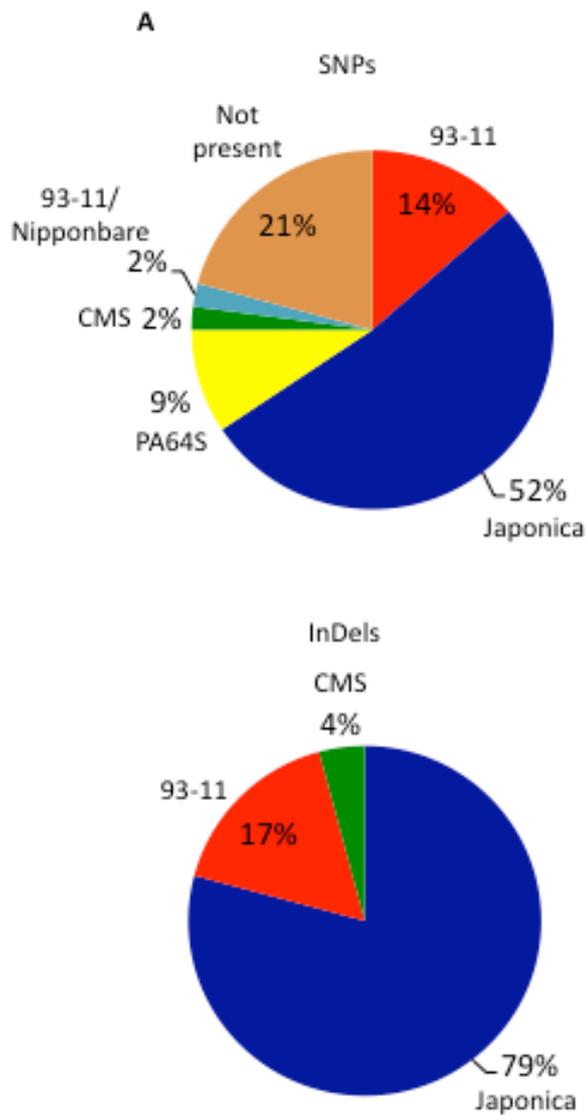


Fig. 32 Phylogenetic tree generated from polymorphisms in gene regions. Neighborhood-joining tree was drawn from % identity using Jalview v 2.4.

A, Percentages of SNP and InDel genotypes in the CMS lines. CMS specific genotypes are displayed as 'CMS'.

B, based on % identity of genic regions (**Table 2**).

C, based on % identity of 93-11 vs PA64S InDels & SNPs (**Tables 3 and 4**).

D, based on % identity of all mutations surveyed (**Tables 2-4**).

Table 4 Comparison of SNP genotypes among japonica mitochondrial genomes Nipponbare, PA64S and indica 93-11 (Tian et al. 2006).

SNP	93-11	PA64S	Nipponbare	CW	LD	SNP	93-11	PA64S	Nipponbare	CW	LD
15961	t	c	c	c	c	185205	c	a	a	a	a
17248	a	g	g	g	g	196453	t	c	c	c	c
17437	a	g	g	g	g	196528	a	g	g	g	g
17513	a	g	g	g	g	196613	t	c	c	c	c
26386	g	a	g	a	a	196629	t	c	c	c	c
26417	g	t	g	t	t	196722	a	c	c	c	c
26426	c	t	c	t	t	196827	c	t	t	t	t
26821	a	t	t	c	c	197532	c	a	a	a	a
27619	t	c	c	c	c	197566	g	a	a	a	a
28595	c	a	a	c	c	197699	a	g	g	g	g
30150	a	g	g	a	a	200512	g	a	g	g	g
37258	g	t	t	t	t	207556	a	g	g	g	g
39256	c	t	t	t	t	220332	g	t	g	g	g
50738	c	t	t	t	t	242078	g	t	t	g	g
54970	g	a	a	a	a	270855	t	a	a	a	a
111021	t	c	c	c	c	270859	t	c	c	c	c
112308	a	g	g	g	g	279452	g	t	t	t	t
112497	a	g	g	g	g	286730	c	a	a	a	a
112573	a	g	g	g	g	293945	t	a	a	t	t
121446	a	g	g	g	g	315058	t	g	g	g	g
121477	g	t	g	t	t	315059	c	g	g	g	g
121486	c	t	c	t	t	315060	c	a	a	a	a
121881	a	t	t	c	c	343444	a	g	g	g	g
122679	t	c	c	c	c	360775	g	t	t	t	t
123655	c	a	a	c	c	362256	t	a	t	a	a
125210	a	g	g	a	a	362260	a	g	a	g	g
132319	g	t	t	t	t	372918	t	g	g	g	g
134316	c	t	t	t	t	399859	c	g	g	g	g
144888	a	t	t	-	-	406658	a	c	c	c	c
144935	g	t	t	-	-	407724	a	g	g	a	a
148023	t	a	a	-	-	410408	g	t	t	t	t
148116	g	t	t	-	-	420175	c	t	t	c	c
148117	g	t	t	-	-	424557	a	g	g	g	g
150194	t	c	c	c	c	441888	g	t	t	t	t
151859	g	a	a	-	-	443369	t	a	t	a	a
152170	t	c	c	-	-	443373	a	g	a	g	g
152303	a	g	g	-	-	454031	t	g	g	g	g
152387	g	a	a	-	-	471043	t	a	a	-	-
153360	t	g	g	-	-	471136	g	t	t	-	-
158637	t	a	a	-	-	471137	g	t	t	-	-
162693	c	a	a	a	a	473214	t	c	c	c	c
177989	t	c	c	c	c	475190	t	c	c	-	-
179724	c	t	t	c	c	475323	a	g	g	-	-
182959	g	t	t	g	g	475407	g	a	a	-	-
183090	t	g	g	t	t	476380	t	g	g	-	-
183122	t	c	c	t	t	476431	c	t	t	-	-
185198	t	c	c	c	c	481657	t	a	a	-	-
185204	g	a	a	a	a	485713	c	a	a	a	a

系統では *orf288* の前半 294 bp のみに相同性がある配列が存在し、それ以降の配列は由来不明の配列であった(Fig. 33). しかし、この由来不明の配列と *orf288* の前半部分を合わせて ORF を組む事ができ、308 アミノ酸のタンパク質をコードする遺伝子が予測された(Fig. 33). この ORF は CW-CMS 特異的に見出されたため、*CWORF308* と命名した. *CWORF308* の配列情報を Fig. S5 に記載した.

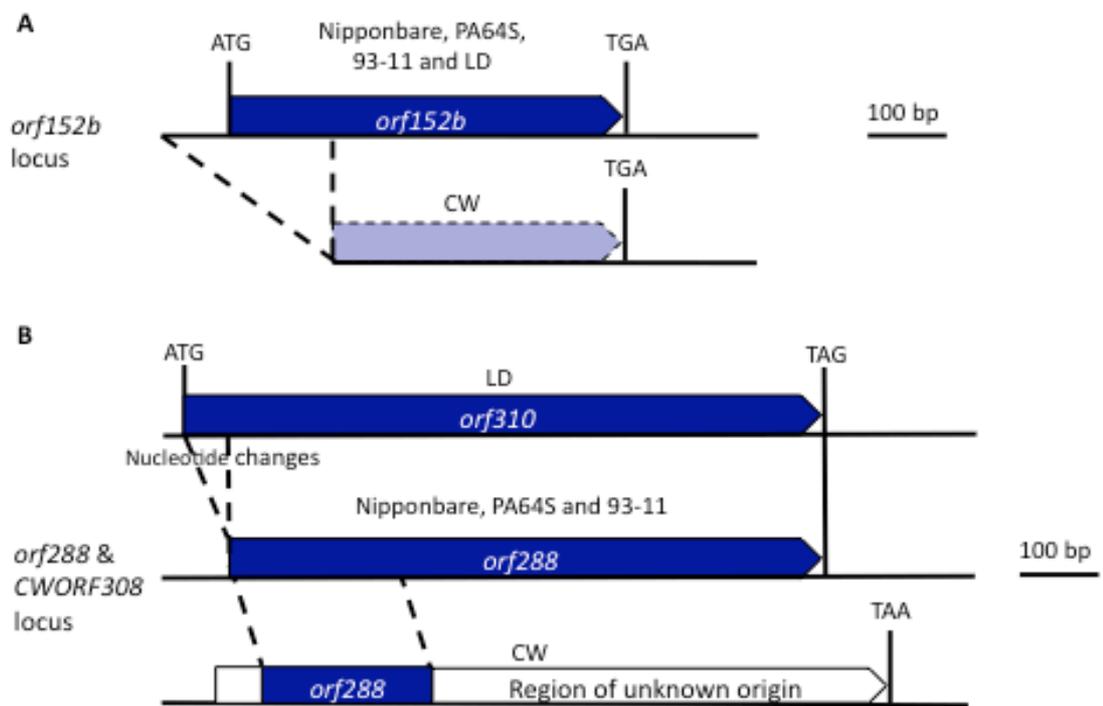


Fig. 33 Comparison of gene coding regions.

A, Structure of *orf152b*, categorized as gene type c. The deletion of the N-terminal region caused the loss of entire ORF in CW-CMS genome.

C, Structure of *orf288*, categorized as gene type c & I. Partial N-terminal peptides and sequences of unknown origin generated *CWORF308* gene in CW-CMS genome.

(3)考察

- ・ CMS 系統では日本晴と比較して複雑なゲノム再編成が生じていた.

第一節では CW-CMS における MCAG 候補を見出す事を目的として、Pyrosequencing 法を用いたシークエンス解析を行った. 既知の日本晴、PA64S と 93-11、そして今回明らかにした CW-CMS と LD-CMS とのシークエンスを比較し、イネ種内でのミトコンドリア多型について一般的な知見を得た. その後、CMS 系統に特有の配列に注目し、CW-CMS 系統に特異的な *CWORF308* を見出した.

植物ミトコンドリアのゲノム解析は多くの植物種で行われており、双子葉類ではシロイヌナズナ(Unseld et al. 1997)、テンサイ (Kubo et al. 2000、Sato et al. 2004)、ナタネ(*Brassica napus*, Handa 2003)、タバコ (*Nicotiana tabacum*, Sugiyama et al. 2005)が公開されている. 単子葉類ではイネ (Notsu et al. 2002、Tian et al. 2006)、トウモロコシ (Clifton et al. 2004、Allen et al. 2005)、コムギ (Ogihara et al. 2005)が明らかにされている. 中でもテンサイ(Sato et al. 2004)とトウモロコシ(Allen et al. 2007)では CMS 系統のミトコンドリアも明らかにされている. 最小のゲノムを持つ *B. napus* は 221,853 bp であり、最大のものはトウモロコシの CMS-C であり、739,719 bp であると推測された. 動物のミトコンドリアゲノムが *D. melanogaster* から *Homo sapiens* まで 13 遺伝子を含む約 17 kb に広く保存されているのに対し、高等植物では多種多様である事が明らかにされている (Kubo and Mikami 2007、Kubo and Newton 2007). 高等植物種間での比較では、*nad*、*cob*、*cox* や *atp* など呼吸鎖複合体に関わるサブユニットをコードする遺伝子は良く保存されているのに対し、*rpl* や *rps* など翻訳に関わる遺伝子は種によってはミトコンドリアから欠失しているものがあつた(Kubo and Newton 2007). しかしトウモロコシでは種内の遺伝子は保存されていたが、通常細胞質を持つ NB 系統が 569,630 bp であつたのに対し、先述の通り CMS-C 系統では 739,719 bp であると推測された(Allen et al. 2007). 従つて、ゲノム構造の変化と遺伝子の取捨選択は進化の過程で必ずしも一致しないものと考察された.

Tian et al. (2006)の解析の通り、今回の解析でも *japonica* である日本晴、PA64S と *indica* である 93-11 の間に大きなゲノム再編成は見られなかつた. その一方で CMS 系統と日本晴の間では 10 回を超える相同性組み換えが起つたという事が明らかとなつた(Table 1). トウモロコシの CMS 系統を含む 5 系統のショットガンシークエンス解析では、ミトコンドリアゲノムは 535,825 から 739,719 bp と今回の解析よりもさらに大きく構造が異なると予測されていた(Allen et al. 2007). トウモロコシでは、通常細胞質を持つ二系統間でもゲノム構造が大きく異なつており、16 回の相同性組み換えが起つていることが予測された(Allen et al. 2007). 興味深い事に、イネの栽培

種間(日本晴、PA64S、93-11)では大きなゲノム構造の差は見られず、この差は他殖性植物と自殖性植物の差であると考えられた。一方、LD-CMS は 93-11 と同様 *indica* イネであるにも関わらず、93-11 とのゲノム構成は日本晴との比較から考えて大きく異なっている事が推測された(Table 1, Figs. 29, 30)。従って、CMS 系統における大規模なゲノム再編成は単に地域性の違いでは説明できない事が推測された。実際、遺伝子領域にのみ注目した場合、93-11 のみが他の 4 系統と大きく遺伝的に離れている事が考えられた(Fig. 32)。これは、大まかなゲノム構造解析によって見出された各系統間の遠近と矛盾している。従って今回の解析から、イネのミトコンドリアにおける遺伝子領域内における変異とゲノム構造の変化は必ずしも同時に生じる訳ではなく、独立な進化的要因によって制御されているものと考察された。具体的に日本晴からの距離について考えてみると、ゲノム構造(相同性組み換えの数)に注目した場合 PA64S=93-11<LD-CMS<CW-CMS となるにも関わらず、塩基配列の変異から遺伝的距離を算出した場合 PA64S<LD-CMS<CW-CMS<93-11 となる。すなわち LD-CMS 系統、CW-CMS 系統と 93-11 はゲノム構造から想像される日本晴との遺伝的距離が逆転している。結論として、両 CMS 系統は *japonica* と *indica* の両方の変異を併せ持つため、祖先種に位置しているのではないかと考察された。仮定を具体的に述べると、イネミトコンドリアゲノムは CW-CMS から LD-CMS に至る過程にゲノム再編成によって *LDORF310* を獲得した。*LDORF310* はさらなるゲノム再編成によって *orf288* になったと考えられ、LD-CMS は *japonica*、*indica* に分化していったと考えられた。ただし、これらの変異が CMS という表現型に特有である可能性もあるため、一概には断定しきれない。さらに日本晴、PA64S と 93-11 は shotgun sequence、本研究で解読した CMS 系統は pyrosequence という手法の差を考慮し、全相同性領域の塩基配列比較を行わなかった。93-11 vs PA64S の既知の変異のみではなく、全変異を対照に考察すれば進化の順が異なる可能性も考えられる。

イネでは、CMS 系統特有と考えられるゲノム再編成の影響がミトコンドリアゲノムの構成に大きく影響を与えているという可能性が示唆された。トウモロコシでは調査した全ての系統間でミトコンドリアゲノム構造が大きく異なっていたため、CMS による影響がマスクされていたとも考えられる(Allen et al. 2007)。テンサイの様々な野生系統の *cox2-cox1* 遺伝子間領域のハプロタイプを調べたところ 26 タイプに別れ、3 つの CMS 細胞質はそれぞれ異なるハプロタイプに分類された(Nishizawa et al. 2007)。最も頻度の高いハプロタイプ seq01 には TK81-O と BGRC56777 が含まれたが、両ゲノムの RFLP によって作成された physical map は大きく異なっており、BGRC56777(progenitor)のゲノム再編成によって TK81-O(derivative)が生じたと推測された(Nishizawa et al. 2007)。TK81-O、BGRC56777 と TK81-MS(CMS)のゲノム構成はそれぞれ大幅に異なっており、CMS、塩基配

列の変化、ゲノム構成の変化についての直接の考察はできないが、本研究で見出した様に必ずしもゲノム再編成と中身の塩基配列の置換程度は一致していないように思われた。

・ CW-CMS 系統において特異的に見出された *CWORF308*

本研究では CW-CMS 系統あるいは LD-CMS 系統に特有なゲノム構造、塩基配列を見出す事ができた。Gene type c、type l あるいは type cl に属する遺伝子領域内の変異は CMS 系統に特異的である可能性である事も考えられた。本研究に最も深く関わるものとして特徴的であったのが *CWORF308* と命名した CW-CMS 特異的な新規 ORF である。CMS の MCAG に関する研究は 1980 年代から盛んに行われており、多くの MCAG の場合既存のミトコンドリア配列と由来不明の配列のキメラ構成によって成り立っていることが報告されている(Schnable and Wise 1998、Hanson and Bentolila 2004、Fujii and Toriyama 2008)。この既存の配列は多くの場合呼吸鎖複合体サブユニットをコードするミトコンドリア遺伝子の一部である事が多い。例えばトウモロコシの T-CMS における MCAG と考えられている T-urf13 は一部に *rm26* の配列を持ち、*atp4* 遺伝子と隣接している(Dewey et al. 1986、Hanson and Bentolila 2004)。ペチュニアの MCAG として有力な *pcf* は *atp9* と *cox2* に由来する配列を一部持ち、残り半分が由来不明である(Young and Hanson 1987)。イネの BT-CMS では完全な *atp6* から 219 bp を隔てた下流に *orf79* と呼ばれる一部に *cox1* 断片を持つ配列が知られている(Iwabuchi et al. 1993、Akagi et al. 1994)。Itabashi et al. (2008)がこの *orf79* に酷似した *L-orf79* 配列を LD-CMS から見出しており、今回の Pyrosequencing でも *L-orf79* を見出した(data not shown)。

今回見出した *CWORF308* を CW-CMS の MCAG として有力であると考え理由として、(i)既存の遺伝子 (*orf288*)とのキメラ構造から成立する ORF である、(ii)CW-CMS ミトコンドリアゲノムにその他に既存の遺伝子とのキメラ構造を持つ ORF あるいは新規 ORF が見出せない、という 2 つの要因が挙げられる。Genemark.hmm for Prokaryotes による遺伝子予測を行ったところ、既存の遺伝子以外のもので 70 アミノ酸以上をコードする遺伝子は *CWORF308* のみであった(data not shown)。さらに、*CWORF308* に含まれる *orf288* 相同性領域は *cox2* と類似の配列である事から、呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子の一部が含まれているとも考えられた。従って *CWORF308* が MCAG として有力であると考えたため、第二節においては *CWORF308* を中心に CW-CMS 特有のゲノム構造の解析を行った。

第二節 CW-CMS 系統のミトコンドリアに特有な遺伝子のゲノム構造および発現解析

(1)材料・方法

・材料

CWR、CW-CMS、T65 は第一章と同様のものを用いた。World Rice Core collection 69 系統は農業生物資源研究所、江花薫子博士より分譲頂いた (Table S7)。CWORF308 と ORF288 の増幅はそれぞれ 288-F3 と 763-1R、288-F3 と 288-R のプライマー対を用いた PCR によって行った (Table S8)。

・λライブラリーの作成及び CWORF308 配列を含む陽性クローンの単離

CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) を用いて単離した CWR の total DNA 10 µg を制限酵素 *Sau3AI* (TaKaRa-Bio) 0.016U と混合して 37°C, 30 分処理し, 部分消化した。DNA 精製後, Klenow Enzyme (Roche Diagnostics) を用いて DNA 断片の fill-in 反応を行った。DNA を精製した後, ベクター-λGEM-11 *XhoI* half-site arms (Promega) に Ligation High (TOYOBO) を用いて 16°C, 16 hr ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応物を Gigapack III Gold packaging extract (Stratagene) を用いて 22°C, 2 hr パッケージングした。作成した λライブラリーを大腸菌に感染させ, Top agar (Agarose 0.7%, 1 mM MgSO₄ in 1×LB) と混合して LB 培地に撒いた。37°C で 8 hr 培養した後, プラークを Hybond-N+ (Amersham Biosciences) にトランスファーした。シグナルの検出はサザンブロットと同様に行い, 陽性プラークを打ち抜き, 2 次, 3 次スクリーニングを行った。CWORF308 を含むクローンの単離にはプライマー対 288-F3 と 288-R3 の PCR によって作成したプローブを用いた (Table S8)。COX1 を含むクローンの単離にはプライマー対 COX1-F と COX1-R の PCR によって作成したプローブを用いた (Table S8)。得られた陽性クローンの λDNA を液体培養法によって抽出した。5 µg の λDNA を制限酵素 *EcoRI*, *SacI*, *SalI*, *XbaI* (タカラバイオ) を用いて完全消化し, DNA Ligation Kit Ver. 2 (タカラバイオ) を用いて pBluescript SK-ベクターにサブクローニングした。

・サザンブロットによるミトコンドリアゲノム構造解析

CW-CMS および T65 のミトコンドリア画分から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。そのうち 0.5 µg を制限酵素 *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI* (TaKaRa-Bio) それぞれ 30U で完全消化した後, 0.6%

アガロースで電気泳動した。DNA を 2% NaOH, 8.8% NaCl でアルカリ変性させた後, 12.1% Tris, 8.8% NaCl, pH 7.5 で中和し, ナイロンメンブラン Nytran N (Schleicher & Schuell) にトランスファーした。UV クロスリンカーで DNA を固定した後, 作成したプローブを用いて 65°C, 16 時間ハイブリダイゼーションを行い, 0.1×SSC, 0.1% SDS でメンブランを洗浄した後, 検出した。

本章で用いたプローブは Table S8 に記載したプライマー対を用いた PCR によって作成した。

・ミトコンドリア遺伝子の発現解析

ノーザンブロットにを行うにあたり, CWR, CW-CMS と T65 のミトコンドリア画分からフェノール・クロロホルム法でミトコンドリア RNA を抽出した。抽出した全 RNA のうち 2.5 µg をホルムアルデヒド処理後, 1% アガロースゲルで電気泳動した。RNA をナイロンメンブラン Nytran N (Schleicher & Schuell) にトランスファーした後, UV クロスリンカーを用いてメンブランに固定した。作成したプローブを用いて 68°C, 16 hr ハイブリダイゼーションを行い, 0.1×SSC, 0.1% SDS でメンブランを洗浄した後, 検出した。CWORF308 領域の Probe1 は 763-1F と 763-1R, Probe2 は 763-2F と 763-2R, Probe3 は 763-3F と 763-3R を用いた PCR によってそれぞれ作成した (Table S8)。

定量的 RT-PCR は第一章・第一節で行った方法と同様に行った。この際使用したプライマー対を Table S8 に記載した。

(2)結果

・CWORF308は疎水性の強いタンパク質をコードすると考えられ、イネ栽培種には存在しない。

現在までの状況を考えるとMCAGの特徴として、(i)CMS系統に特異的なORF(Hanson and Bentolila 2004)、(ii)既知のミトコンドリア配列の一部を含む(Hanson and Bentolila) 2004、(iii)ミトコンドリア内膜に局在する(Hack et al. 1991, Nivison et al. 1994)、(iv)*Rf*による転写・翻訳レベルでの制御を受ける(Hanson and Bentolila)、などが挙げられる。CWORF308がMCAGである可能性について追求するため、イネ栽培種内におけるCWORF308及びORF288の分布をPCRによって調査した(Fig. 34)。ハウスキーピング遺伝子である*cox2*は予想通り全ての系統が保持していたのに対し、ORF288は35系統のみに存在しており、約半数のみが保持している事が明らかとなった(Fig. 34A)。一方、CW-CMSとChinese Wild rice strain W1以外では、調査した系統の中でCWORF308を持つ系統は存在しなかった(Fig. 34A)。PCRではWRC02やWRC04に若干のCWORF308シグナルが見られたが、定量的PCRを行ってW1あるいはCW-CMSの増幅量と比較すると 10^{-4} 程度である事が予測された(Fig. 34B)。従って偽陽性のレベルか、あるいはCWORF308を含むサブゲノムが稀に体細胞変異などによって生じている可能性がある事等が考えられた。

また、SOSUI program (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)によるCWORF308の疎水性を調査した(Fig. 35)。T-urf13とorf79が一箇所、pcfが三箇所に強い疎水性領域を持つのに対し、CWORF308は二箇所が膜貫通ドメインである事が予測された(Fig. 35)。以上の状況証拠から、CWORF308は(iv)を除くMCAGとしての特徴を兼ね備えていると考えられた。

・CWORF308領域のゲノム構造及びRNA転写パターンの調査

CWRのライブラリーからCWORF308の領域を含む陽性クローンを4つ得て、それらのシーケンス解析を行ったところPyrosequencingと同様のゲノム構造があることが判明した(Fig. 36A)。また、CWORF308の5' UTR側の領域は日本晴における*rp15*遺伝子座周辺と同一であることが分かったため、CWRにおける*rp15*の領域を含む2つの陽性クローンを得た。シーケンス解析を行ったところ、*rp15*領域周辺はPyrosequencingの結果と同様に、*rps2*のアミノ末端を含む5' UTR領域が*rp15* ORFのプロモーター領域と相同性組み換えによって入れ替わっていた(Fig. 36B)。Fig. 37ではorf288と*rp15*遺伝子座の再編成によって生じたと考えられるCWORF308遺伝子座の成り立ちを図示した。日本晴では、*rp15*と*atp1*は約8.9 kbを隔てて隣接しているが、CW-CMS系統の

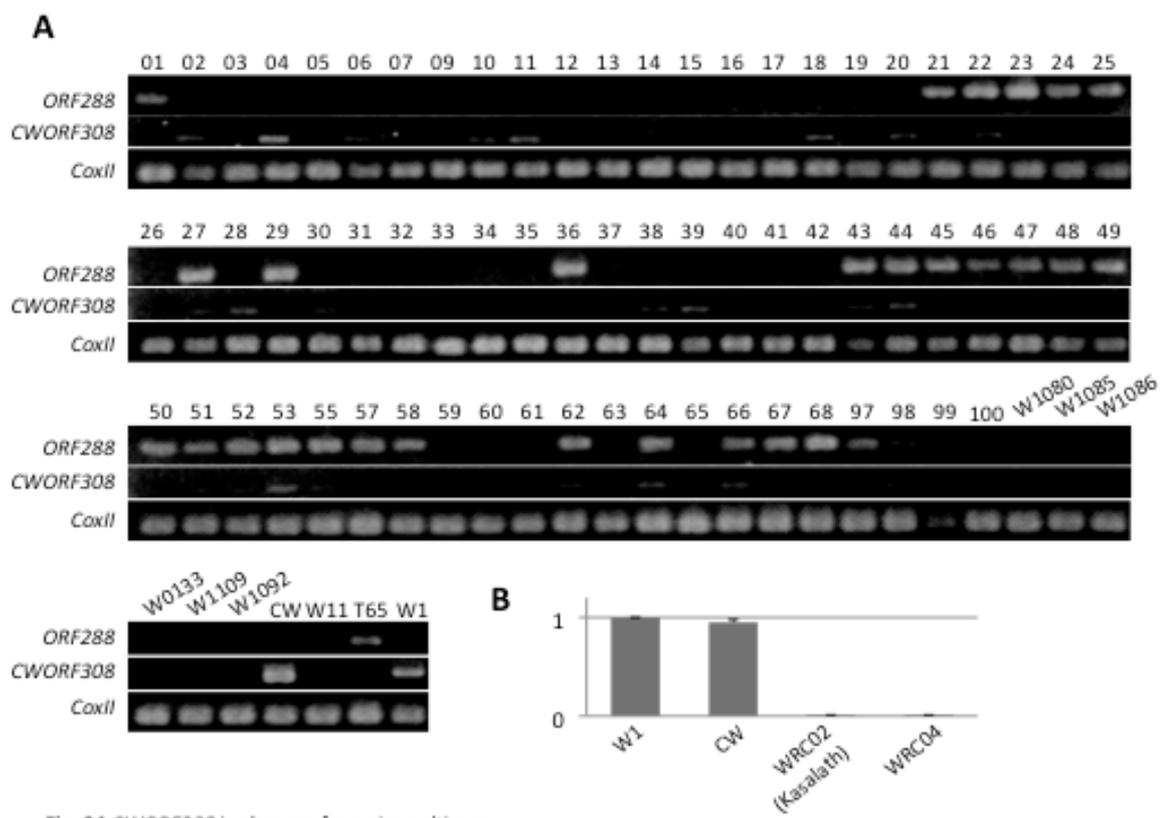


Fig. 34 *CWORF308* is absent from rice cultivars.

A, PCR analysis. Primers were designed to detect *orf288* and *CWorf308*. Housekeeping *cox2* was detected for internal control. Numbers indicate the World rice core-collection (WRC) strains in **Table 57**. W1080, W1085, W1086, W0133, W1109 and W1092 are the lines reported to carry CMS cytoplasm by Shinjyo (1982). W11 is a semi-CMS cytoplasm found in Indian wild rice strain W11.

B, Quantitative PCR of *CWORF308* in lines with faint *CWORF308* amplification (WRC02, WRC04). The abundance of *CWORF308* gene in WRC02 and WRC 04 compared to original CW-CMS cytoplasm carrying W1 and CW-CMS line were approximately 1/10,000, which is virtually ignorable.

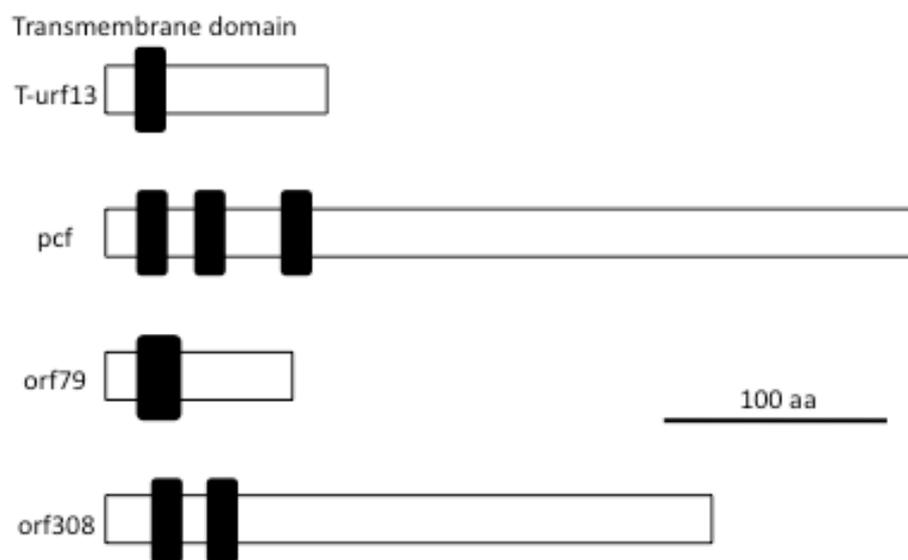


Fig. 35 Hydrophobic regions in CWORF308 and known MCAGs predicted by SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html).

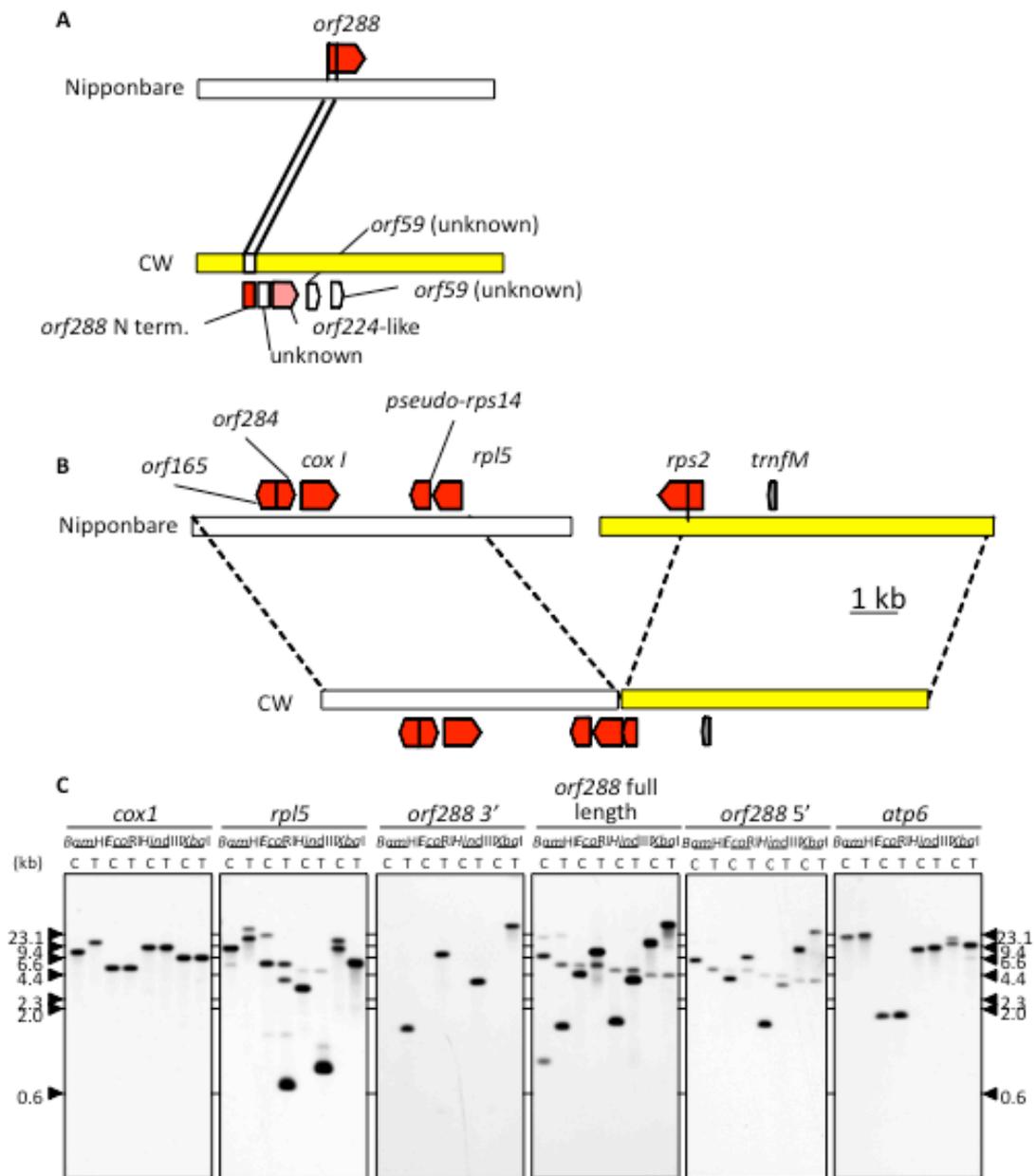


Fig. 36 Unique genomic organization in CW-CMS mitochondria genome.

A, Genomic structure of *CWORF308* locus revealed by genomic walking.

B, Genomic structure of *cox1* locus revealed by genomic walking.

C; RFLPs around mitochondrial genes. C and T indicate CW-CMS and Taichung 65, respectively.

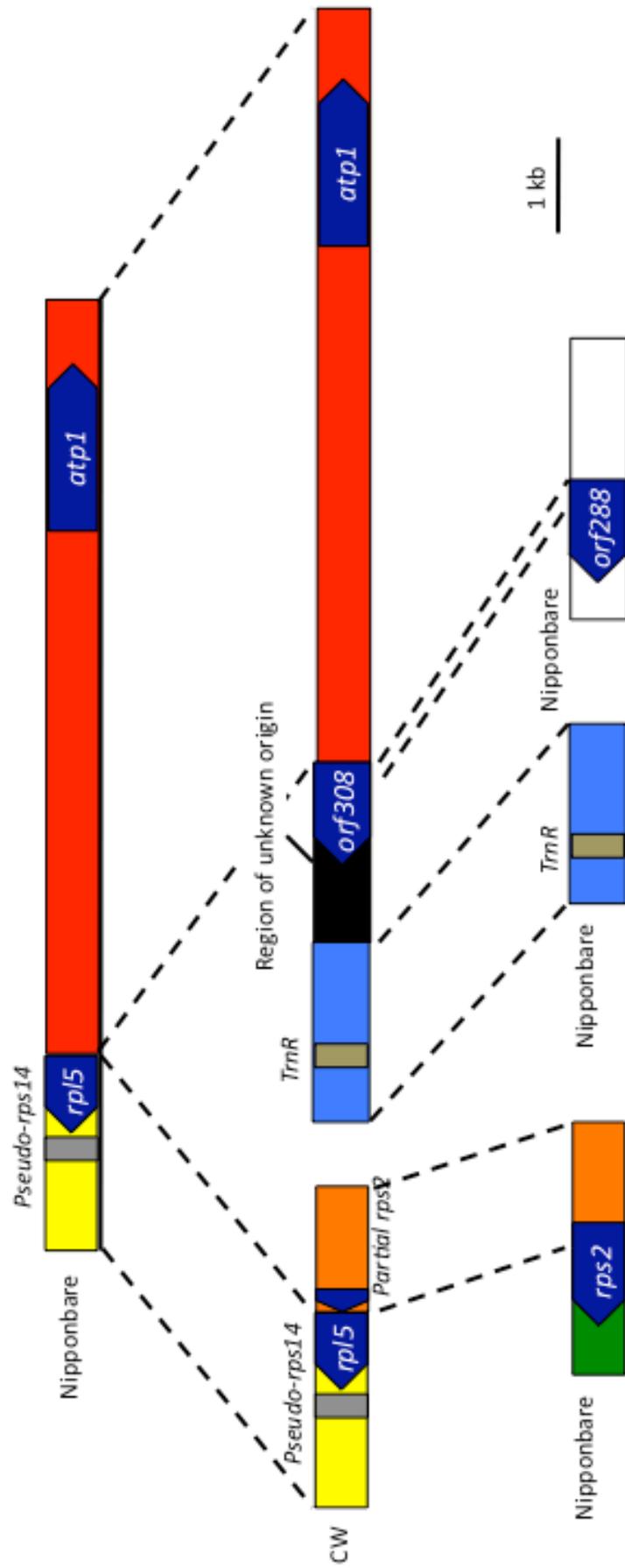


Fig. 37 Large-scale genomic re-organization presumed to explain the evolution of CWORF308 locus. Boxes with same colors indicate same regions.

ミトコンドリアでは *rps2* 遺伝子座を含んだ組み換えが生じていた(Fig. 37)。一方、*atp1* の領域は *CWORF308* 領域の上流に挿入されており、*CWORF308* の下流には日本晴では *tmR* に相当する領域が挿入されていた(Fig. 37)。なお、以上のシーケンス解析の過程で、約 20.5 kb の塩基配列を Sanger 法で解読した。第二章・第一節で行った pyrosequence の結果との比較して、2 箇所の塩基配列の違い見られたため、pyrosequence の精度は約 99.99% であると推測した。

rpl5 と *orf288* の領域を元に作製したプローブを用いてザンブロットを行い、シーケンス解析の結果から予想されるバンドサイズが同一であることを確認した(Fig. 36)。従って *CWORF308* 遺伝子座は、*ORF288* の 5' 部位、*tmR* 領域(水色)、*rpl5* の 5' 部位(赤色)と由来不明の配列(黒色)の混成による複雑な相同性組み換えによって成立していることが明らかとなった(Fig. 37)。なお、CW-CMS における *rps2* は全長を含むものが他の領域に存在したため(data not shown)、*rpl5* の上流に挿入された *rps2* アミノ末端部位を含む 5' UTR 領域は相同性組み換えではないと考えられた。

CWORF308 が CWR、CW-CMS 系統との間で異なる発現パターンを示す場合、MCAG としての有力候補であると考えられる。従って *CWORF308* 領域から設計した 3 プローブを用いてノーザンブロットを行った(Fig. 38)。しかし、どのプローブを用いた場合も両系統間に RNA 転写パターンの差は見られなかった。どのプローブを用いた場合にも CW-CMS と CWR に複数のバンドが見られた事から、*CWORF308* 領域はプロセッシングを受けていると考えられた。また、*CWORF308* 遺伝子座の起源に関わると推測された *cox1* や *rpl5* などのプローブを用いてノーザンブロットを行った場合でも CWR と CW-CMS 系統は同様のバンドパターンを示した(Fig. 39)。その他、74 個のミトコンドリア遺伝子の発現パターンが両系統で同様であった(data not shown)。一方で、ミトコンドリア遺伝子の発現量が増減している可能性を考え、定量的 RT-PCR によって三細胞期花粉を含む葯におけるミトコンドリア 60 遺伝子の発現を調査した(Fig. 39, Fig. S5)。コントロールをミトコンドリア外の遺伝子、*Tubulin*(核コード)あるいは *psbA*(プラスチドコード)として補正したところ、18 個の遺伝子が CW-CMS あるいは CWR いずれかにおいて T65 との発現比の Log₂ value が 1 以上になっていた(Fig. 39)。いずれのコントロールにおいても結果は同様であったため、Fig. 39 では *Tubulin* をコントロールとした場合のみを示した。Log₂ value が 1.58 以上になっていたものには *rpl5* や *pre-rps14* などが挙げられ、これらの遺伝子の近辺は先ほどゲノム再編成が起こっていると述べた(Fig. 37)。*orf288* と *orf152b* は遺伝子が欠損しているため、検出できないものと考えられた(Table 1, Fig. 39)。

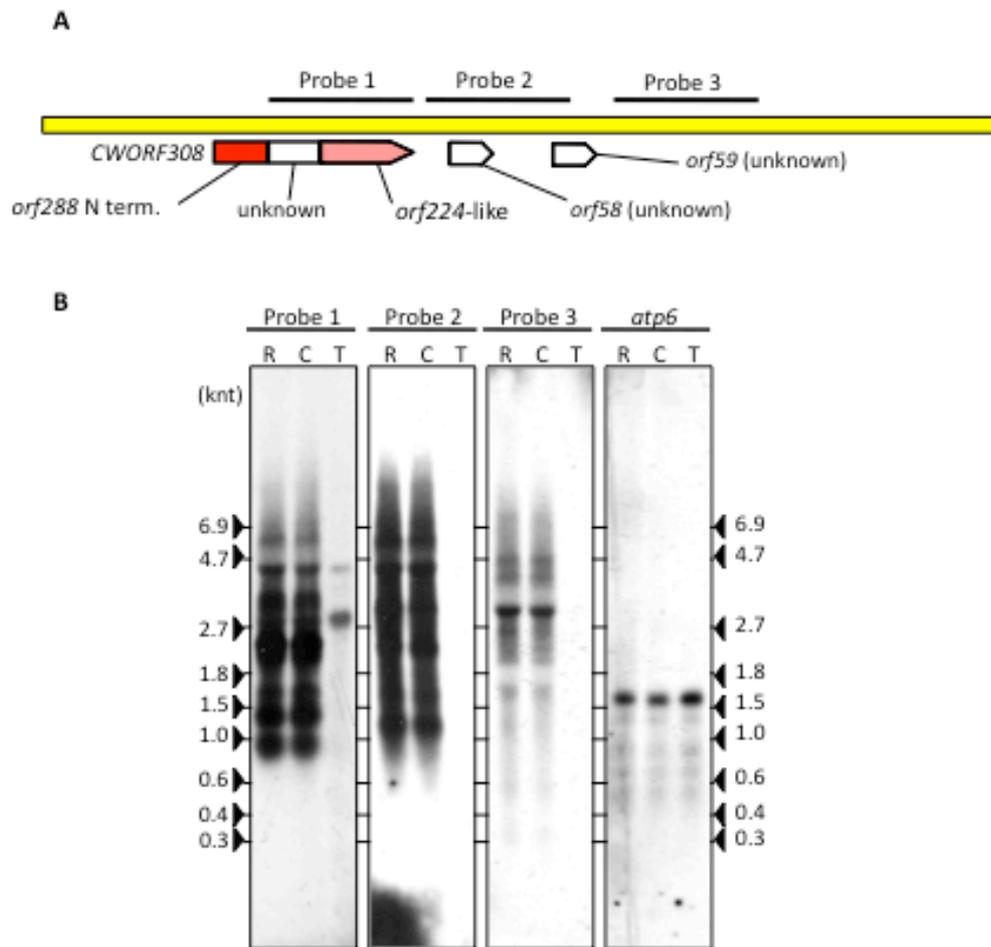


Fig. 38 Northern blot analysis of *CWORF308* region.

A, Probes designed to detect *CWORF308* transcripts.

B, Northern blot analysis of *CWORF308*. Transcript pattern of *atp6* is displayed as an internal control.

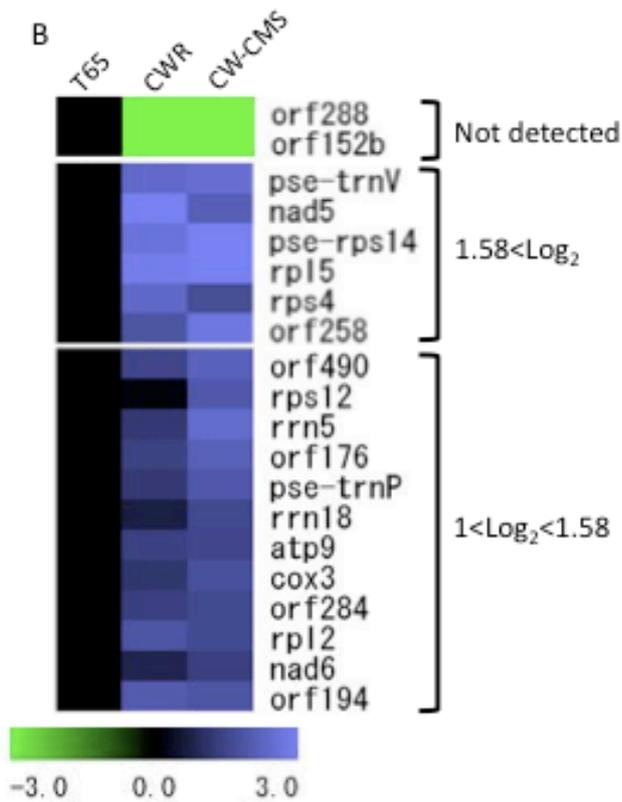
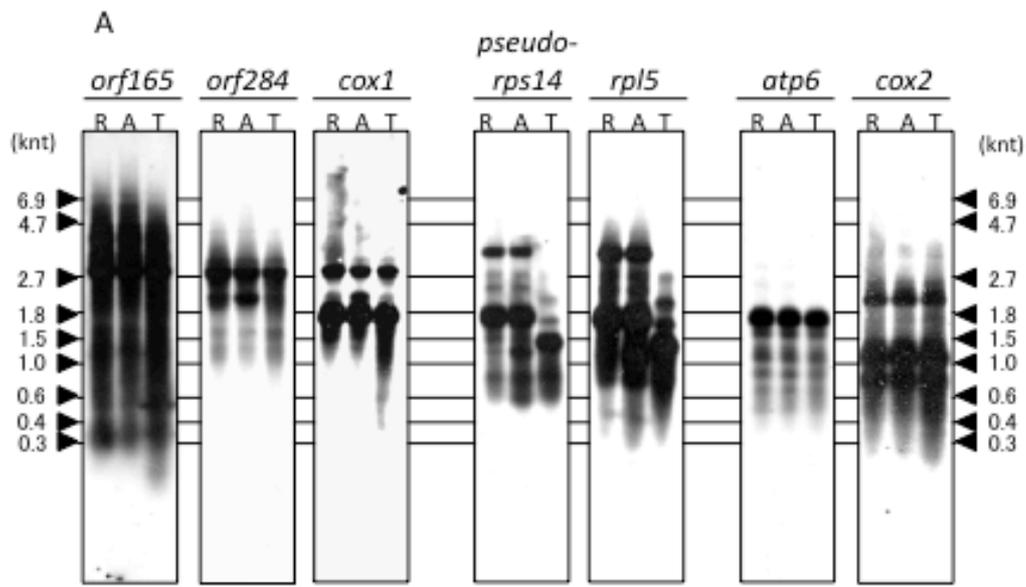


Fig. 39 Expression analysis of mitochondrial genes.

A, Northern blot analysis of genes around *cox1* and *rpl5* locus. *atp6* and *cox2* are displayed as the internal control.

B, Expression profile of mitochondrial genes monitored by quantitative RT-PCR.

(3)考察

- ・ *CWORF308* は複雑なゲノム再編成によって生じた CW-CMS 特異的な遺伝子である。

CWORF308 は栽培種内に存在しない可能性が極めて高い事が示され、CW-CMS 特異的な遺伝子であることが証明された。それにも関わらず、CWR と CW-CMS 間で *CWORF308* の発現パターンに差が見られず、タンパク質レベルでの調査を行う必要があると考えられた。

植物ミトコンドリアゲノムはひとつの環状 DNA であるマスターサークル構造を取ることが仮定されているが、複数のサブゲノムに分かれて遺伝情報が保存されているという考え方もある(Oldenburg and Bendich 1996)。また、サブゲノムはそれぞれのコピー数が異なっているという説もあり、コピー数の移り変わりは Substoichiometric Shifting (SSS)と定義されている(Abdelnoor et al. 2003, Zaegel et al. 2006)。サブゲノムはそれぞれの相同領域で頻繁に組み換わると考えられている。高等植物におけるミトコンドリアゲノムの複雑な進化は SSS やサブゲノム間の相同性組み換えによって引き起こされていると考えられている(Kubo and Newton 2007)。Small et al. (1989) はマスターサークルにおける重複反復配列がサブゲノムに分かれ、再びマスターサークルを形成するときに片方のサブゲノムのみが選択されることで植物ミトコンドリアゲノムでの相同性組み換えが生じるという仮説を立てた。この仮説はミトコンドリアゲノムの組み換え抑制遺伝子の欠失変異体によって支持されており(Kuzmin et al. 2005)、*E. coli* のミスマッチ修復酵素 MutS のホモログがシロイヌナズナにおいて組み換え抑制を制御していることが示された(Abdelnoor et al. 2003, Zaegel et al. 2006)。これらの変異体では異常な SSS で、特定のサブゲノムが増減する事で頻繁なゲノム組み換えが起こると考察された。このような SSS と相同性組み換えに困って CMS が生じるとも考えられており、実際に *MutS* ホモログを抑制したトマトとタバコでは人為的に CMS を生じさせる事に成功している(Sandhu et al. 2007)。

以上の仮説に従って具体的に進化の中でどのように CMS が生じたかを考えると、重複領域の近傍に MCAG が存在する可能性が高いという事が考えられた。テンサイ (Sato et al. 2004)、トウモロコシ (Allen et al. 2007)において MCAG と考えられている遺伝子は重複領域の近傍にあることが分かっている。イネの BT-CMS では *orf79* が *atp6* に隣接しているが、*atp6* は重複領域から約 2,000 bp 程度の近い位置にある(Notsu et al. 2002)。従って *orf79* は *atp6* の近傍の重複領域を起点とした相同性組み換えによって引き起こされている可能性が考えられる。この事は BT-CMS では *N-atp6* と *B-atp6* の 2 遺伝子座の *atp6* が検出されることによって裏付けられていると考えられた(Iwabuchi et al. 1993, Akagi et al. 1994, Itabashi et al. 2008)。これらの見解が有意であるかどうかは今後検証す

る必要があると考えられるが、今回見出した *CWORF308* の一部の由来となっている *orf288* も日本晴では2つの重複領域に挟まれて座乗している(Notsu et al. 2002). また、*CWORF308* の上流配列である *rpl5* 上流配列は重複領域内にあり、*trnR* 領域に由来する下流の配列は重複領域近傍である(Notsu et al. 2002). 従って *CWORF308* の起源は現在まで見出されている MCAG の特徴と矛盾しないと考えられた. また、既知の MCAG には必ず由来不明の配列が含まれているため CMS は単に重複領域の組み換えでは説明できない. *CWORF308* にも由来不明の配列が含まれている事から、このような面も含めて *CWORF308* は単に相同性組み換えによって生じたものではなく、MCAG として有力ではないかと考えられた.

・ *CWORF308* の発現は CWR と CW-CMS 系統の間で差が見られなかった.

現在までに見出されている多くの MCAG は CMS 系統と *Rif* 系統間で転写後制御・翻訳制御に差が見られる. これは *Rif* 遺伝子産物が MCAG に RNA レベルあるいはタンパク質レベルで働きかける事で説明されており、幾つかの植物種で分子機構が分かっている. すなわち *Rif* のクローニングが行われている植物であり、ペチュニア (Bentolila et al. 2002)、コセナダイコン(Brown et al. 2003, Desloire et al. 2003, Koizuka et al. 2003)、イネ (Kazama and Toriyama 2003, Komori et al. 2004, Akagi et al. 2004, Wang et al. 2006)とソルガム(Klein et al. 2005)が相当する. これらの植物からクローニングされた *Rif* は全て Pentatricopeptide Repeat (PPR)と呼ばれるモチーフを持つタンパク質である事が示された. PPR は Small and Peeters (2000)によって見出されたモチーフであり、タンパク質間の相互作用に関わる Tetratricopeptide Repeat(TPR)に似たモチーフではあるがその名の通り 35(Penta = 5, Trico =30)アミノ酸の繰り返し配列である. 植物では400-600程度の巨大な遺伝子ファミリーを形成すると考えられており(Small and Peeters 2000, Lurin et al. 2004, Andres et al. 2007, O'Toole et al. 2008, Schmitz-Linneweber and Small 2008)、比較的最近になって見出されたタンパク質ファミリーではあるが多くの解析例がある. シロイヌナズナでは少なくとも16個の独立の PPR 変異体についての報告例があり(Schmitz-Linneweber and Small 2008)、その多くがオルガネラ遺伝子の転写後調節に関わっていることが知られている (Kotera et al. 2004, Schmitz-Linneweber et al. 2005, Okuda et al. 2006, Okuda et al. 2007). 興味深い事に、PPR 遺伝子は高等植物でのみ多く見られ、ミトコンドリアの起源であるとされる *Rickettsia prowazekii* や葉緑体の起源であるとされる *Synechocystis sp* でも見られない(Lurin et al. 2004). さらに、緑藻である *Chlamydomonas* でも僅かに12個しか見られないため、葉緑体獲得のみが PPR が爆発的に増殖した理由ではないと考えられる(Merchant et al. 2007,

O'Toole et al. 2008). PPR の具体的な機能としては、HCF152 はプラスチドの *psBB-psbT-psbH-petB-petD* オペロンに結合し、プロセッシングを担うことが示されている(Nakamura et al. 2003). LOJ (Prasad et al. 2005), LOI1 (Kobayashi et al. 2007), OTP43 (Falcon de Longevialle et al. 2007), PPR336 (Uyttewaal et al. 2008)と PPR40 (Zsigmond et al. 2008)はミトコンドリアに局在し、それぞれのターゲット遺伝子の転写後制御を担っていると推測されている。PPR はオルガネラゲノムに対して特定の RNA ターゲットを持っており、病原菌と宿主における遺伝子対遺伝子説のような関係であると推測されている。

Rf 対 MCAG の多くは PPR 対ターゲット遺伝子の関係を踏襲しているため、広く受け入れられてきた。ペチュニアの *Rf* がコードしていた *Rf*-PPR592 は MCAG である *pcf* の翻訳制御を担うと考えられており(Bentolilla et al. 2002)、*Rf*-PPR592 は RNase に感受性の高分子タンパク質複合体(RsHMWC)の一部である事が示された(Gillman et al. 2007)。RsHMWC はリボソーム複合体であると予測されている。また、コセナダイコンの *Rf* がコードしていた *Rfk/Rfo* は MCAG である ORF138 の翻訳抑制を担っていた(Koizuka et al. 2003)。上記における PPR の役割は不明な部分が多いが、イネ BT-CMS における *Rf1* は *B-atp6-orf79* オペロンの転写産物に結合し、プロセッシングを行うことで ORF79 の翻訳抑制を行う事が示されている(Kazama et al. 2008)。例外的なものとして、テンサイ CMS における *Rf1*-preSatp6 システムが挙げられ、*Rf1* は PPR ではなく Metalloprotease-like (MPL)タンパク質をコードしていると考えられている(久保ら 2008)。MCAG であると考えられている preSatp6 はミトコンドリア内膜でホモオリゴマーを形成すると考えられており(Yamamoto et al. 2005)、*Rf1* は preSatp6 ホモオリゴマーをモノマーに分解するという見解が得られている(久保ら 2008)。

従って本研究において見出した *CWORF308* も仮に MCAG であるとするとなんらかの形で *Rf* による制御を受ける事が最も高い可能性であると考えられる。具体的には RNA editing やタンパク質レベルでの制御を受ける可能性が考えられる。しかし、トウモロコシの T-CMS における *Rf2* のように、T-urf13 蓄積に作用しないにも関わらず稔性を回復する *Rf* も存在する。*Rf2* はミトコンドリア局在の Aldehyde dehydrogenase (ALDH)をコードしており、花粉における呼吸の際に生じる Acetaldehyde の無毒化などを担うと考えられている(Cui et al. 1996, Liu et al. 2001)。*Rf* の中には *Rf* 対 MCAG の関係によって稔性回復を行うのではなく、MCAG の作用に対する花粉稔性への言わばバイパスを作成するものも存在すると考えられる。従って CWR の持つ *Rf* が必ずしも MCAG に作用するとは限らない。

また、*CWORF308*以外にも本研究では興味深い発現差を示す遺伝子を見出した(Fig. 39). 遺伝子隣接領域に大きなゲノム構造の変化を伴っていた *rpl5* は、CW 細胞質を持つ CWR と CW-CMS で大きく発現が増加していた(Fig. 39). これはプロモーター領域の構造変化によって cis 配列が日本晴と異なったためと考えられた(Fig. 36, Fig. 37). また、*rps1* や *rps2* はハウスキーピング遺伝子であるにも関わらず、非同義置換が生じていた(Table 2). さらに、CWR あるいは CW-CMS では合計 18 遺伝子の発現が増加していた(Fig. 39, Fig. S5). 本研究における定量的 RT-PCR は *Tubulin* あるいは *psbA* をコントロールとしているため、ミトコンドリアのコピー数の違いも検出している可能性がある. インゲンにおいて、SSS と CMS は密接に関連していると考えられており、MCAG であると考えられている *pvs-orf239* を含むサブゲノムのコピー数を稔性回復遺伝子 *Fr* が低下させる事が知られている(He et al. 1995, Janska et al. 1998, Sarria et al. 1998). 本研究で見出した 18 遺伝子とサブゲノム上の位置関係については関連性を見出す事ができなかったが、ミトコンドリア内の SSS バランスが崩れた事が CW-CMS を引き起こしている原因である可能性も否定できない.

第三章、CW-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rf17* のポジショナルクローニング

第二章の解析では MCAG に対して CWR が持つ *Rf* の作用を検出できなかった。しかし、*Rf* の中には PPR や MPL のように MCAG に直接作用せず、CMS に対してバイパスを作るものも存在すると考えられた。従って本章では、CWR が持つ *Rf17* の分子機構を明らかにするため、*Rf17* のポジショナルクローニングを行った。

投稿論文

・ Fujii, S. and Toriyama, K. (2005) Molecular mapping of the fertility restorer gene for ms-CW-type cytoplasmic male sterility of rice. *Theor. Appl. Genet.* 111: 696-701.

・ Fujii, S. and Toriyama, K. Suppressed expression of *RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY* restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants. *submitted*

(1)材料・方法

・材料

CWR、CW-CMS、T65 は第一章・第一節で説明したものと同様のものを用いた。CWR と CSSL209 の交配によって F_2 及び BC_1F_1 分離集団を作成し、高密度連鎖解析に用いた。CSSL209 (*rf17rf17* Koshihikari/Kasalath 第4染色体長腕置換系統)を農業生物資源研究所、矢野昌裕博士より分譲頂いた。World Rice Core collection 69 系統は第二章・第二節において記述したものと同様のものを用いた。

・ポジショナルクローニング及び相補性試験

ラフマッピングの詳細については藤井・修士論文2006年に記載した。本研究で用いたDNAマーカーの情報はTable S9に記載した。Integrated research project for plants, insects and animals using genome technology QT-2001 及び QT-2007 プロジェクトでCWRのBACライブラリーを作製し、*Rf17* 領域を含むクローンW1R010G19を得た。同クローンの単離・シーケンス解析は農業生物資源研究所、松本隆博士に支援いただいた。W1R010G19を *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I で完全消化し、塩基配列に変異のあった配列を含む領域のサブクローニングを行った。*Bam*HI, *Xba*I 断片はpBIN19に、*Hind*III 断片をpBI101にサブクローニングし、アグロバクテリウムEHA105に導入した。形質転換植物の作成は第一章について述べたものと同様に行った。*Rf17* 領域内に見出された全遺伝子の情報と、遺伝子発現解析に用いた全プライマー配列をTable S10に示した。

・RMSプロモーター::mRFP解析

RMSと命名した遺伝子(LOC_Os04g40020)のプロモーター領域をプライマー対5'-GGATCCCCCTTCAAGCCTTCATGAAATGCTCC-3'と5'-GGATCCGGTGGCTAAACTTGGCCAGC-3'を用いたPCRで増幅し、クローニングした。mRFPコーディング領域をR4pGWBベクター(Nakagawa et al. 2008)からPCRでクローニングし、RMSプロモーター下流に連結した。作成したコンストラクトをT65に導入した。

三細胞期花粉を蛍光顕微鏡で観察し、RFP蛍光が見られる花粉の割合を数えた。調査は1つのコンストラクトにつき、1コピーで導入された独立の3系統について行った。

RMSのプロモーター領域におけるSNP検出には、プライマー対5'-TCGTTTCACCACGGTAGATAGACTCAT-3'、5'-CCCACATCTTCTCCTTGCATAATCC-3'を用いたPCRを行い、PCR産物を制限酵素 *MaeIII*(Roche diagnostics) で処理した後、電気泳動を行った。

・ GC-FID(Gas Chromatograph-Flame Ionization Detector)を用いた脂肪酸分析

GC-FID を用いた三細胞期花粉を含む薬に含まれる脂肪酸分析は島津製作所に依頼した。脂肪酸含量の有意差検定には Tukey の多重検定を用いた。

(2)結果

・ *Rf17* 遺伝子領域には 16 個の候補遺伝子が見出された.

稔性回復遺伝子を保持する CWR と保持しない T65 との交配によって作成した BC₁F₁ 分離集団 96 個体は種子稔性可稔 : 不稔が 42:54 に分離した($\chi^2 = 1.50$, $p=0.01$, 1:1). 稔性回復は一遺伝子によって支配されていると考えられ、GRAMENE website (<http://www.gramene.org/>)に従いこれを *Rf17* とした(Fujii and Toriyama 2005). CWR と T65 間では利用できる DNA マーカーが少なかったため、CWR と CSSL209 の交配で作成した BC₁F₁ 4032 個体と F₂ 9184 個体を用いて高密度連鎖解析を行ったところ、*Rf17* を SNP7-16 と SNP7-4 の間 77 kb に挟み込んだ(Fig. 40). この領域には 2 つの PPR 遺伝子(*PPR1*: LOC_Os04g39970, *PPR2*: LOC_Os04g40010)を含む 16 個の ORF が予想された. この領域における CWR のシーケンス解析を行ったところ、21 箇所の変異が生じていることが明らかとなった(Fig. 40, Table S11). 変異のうち、アミノ酸置換を伴うものは *PPR2* に生じた T から A への変異のみであり(CWR: A, 日本晴/CW-CMS/T65: T), この変異によって CWR の *PPR2* アリルにストップコドンが生じていた(Fig. 40). その他の変異はプロモーターあるいはイントロンに位置していた(Table S11).

これらの *Rf17* 候補遺伝子について成熟薬における mRNA 発現解析を行ったところ(*ORF8* は transposase, *ORF9* は retrotransposon であったため解析対象外), *ORF11* と命名した遺伝子のみ発現が変動していた(Fig. 41). *ORF11* は CW-CMS と比較して CWR で顕著に発現が減少しており、定量的 RT-PCR を行ったところ約 1/10 に発現が減少していた(Fig. 42). *ORF11* のプロモーターは *PPR2* と重複していると考えられ、*PPR2* 内にある SNP が *ORF11* の制御を担っている可能性が考えられた. すなわち、CWR アリル(A)の場合発現が抑制され、CW-CMS アリル(T)の場合発現が抑制されないと予測した. 以上の解析から、*PPR2* と *ORF11* 以外は *Rf17* 候補から除外できると考えた.

・ RNAi 法による *ORF11* と *PPR2* の発現抑制

現在までに単離同定されている *Rf* は全てミトコンドリアの MCAG に対して機能するものであり、トウモロコシの *Rf2* もバイパスを作成するものではあるが機能的であると分類できる. しかし、配偶体型 *Rf* を考慮する際、機能欠失型の *Rf* が存在することも考えられる. 実際、トウモロコシの CMS-S における稔性回復遺伝子 *rf-lethal1* (*rf1*)は、機能欠損によって稔性回復が引き起こされると考えられている(Wen et al. 2003). すなわち遺伝学的に考えると、遺伝子によってコードされるタンパク質が機能している場合に稔性回復が起こるのか、機能しない場合

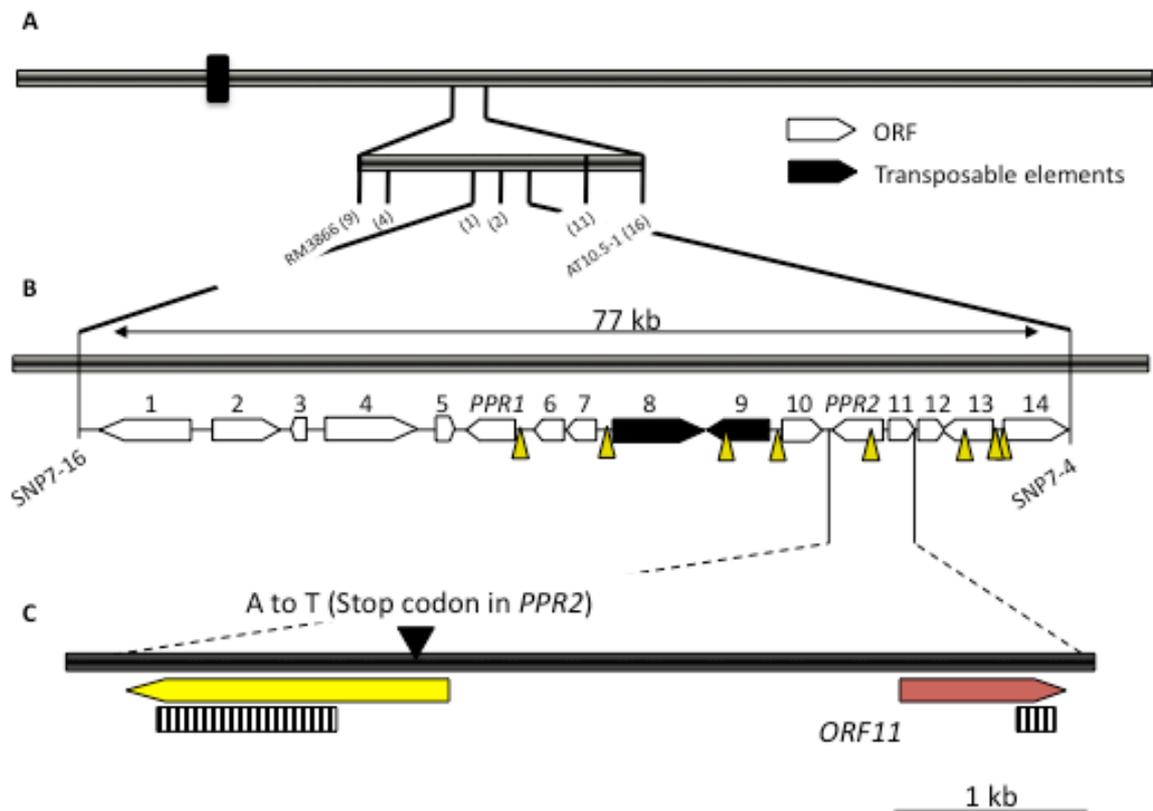


Fig. 40 *Rf17* surrounding region.

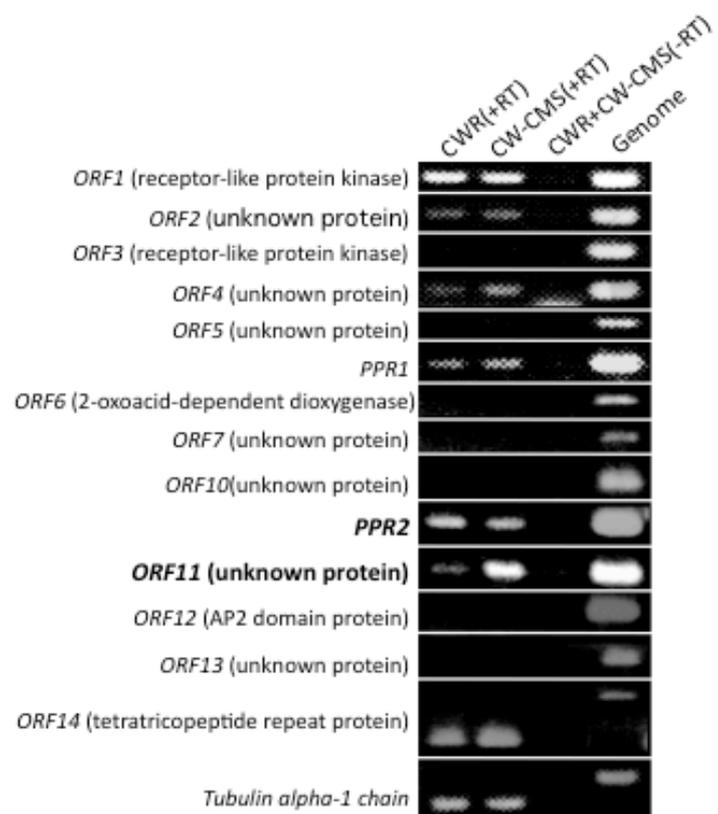
A, Coarse position of *Rf* locus on chromosome 4.

B, 16 genes were predicted in the 77 kb region including *Rf17*. Arrowheads indicate the positions of SNPs or InDels.

C, Closeup of *PPR2* and *ORF11* genomic region. Striped bars indicate the fragments utilized for RNAi-mediated knockdown experiment of *PPR2* and *ORF11*.



Fig. 41 mRNA expression of genes predicted around the *Rf17* locus. As gene 8 and gene 9 were predictive transposable elements, their expression profiles were not analyzed.



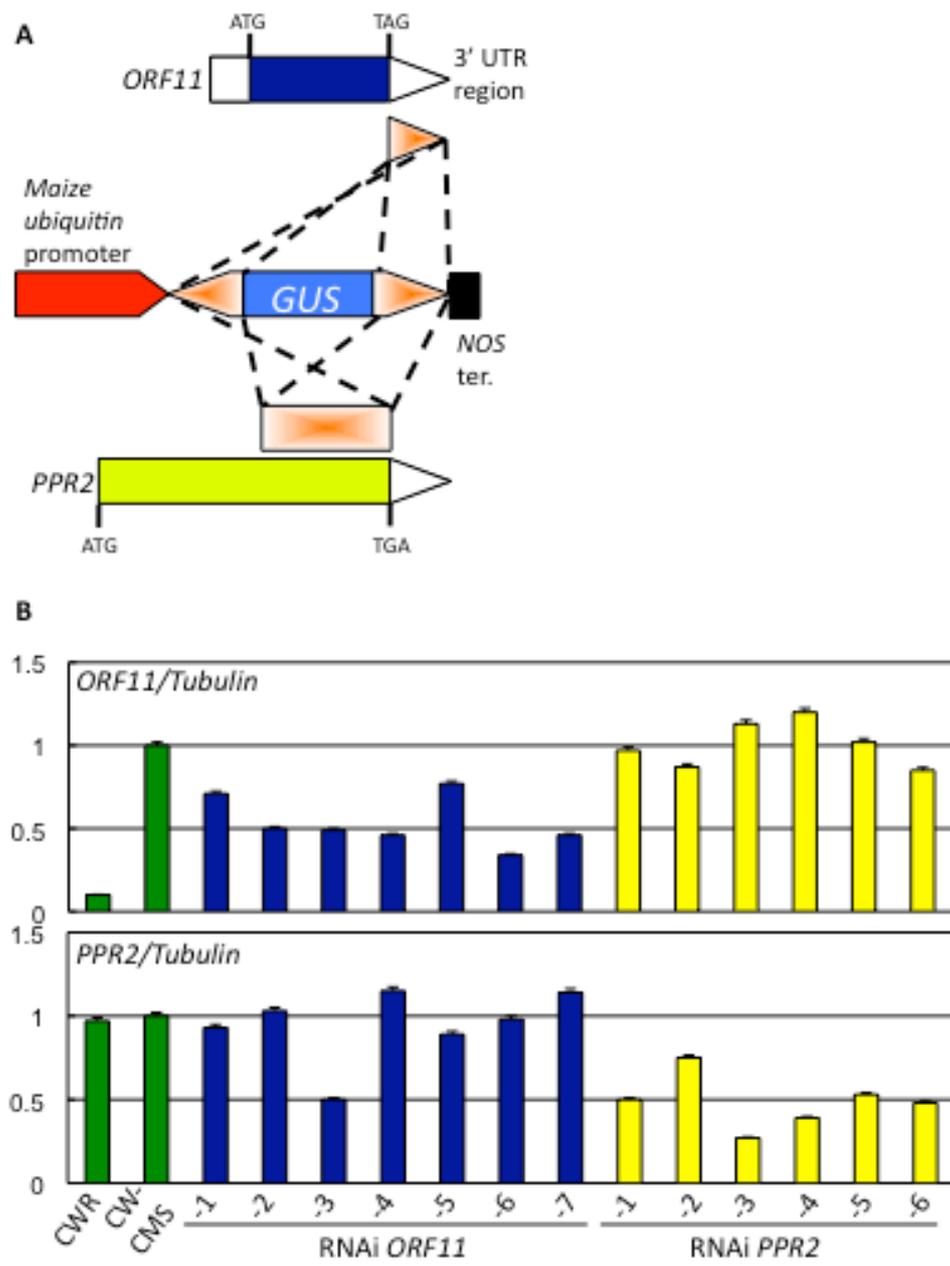


Fig.42 RNAi knockdown of *ORF11* and *PPR2* in the CW-CMS line.
 A, Construct for RNAi.
 B, Quantitative RT-PCR analysis of *ORF11* and *PPR2* in the transgenic lines.

に稔性回復が起こるのかは両方のケースがあり得る。シーケンス解析と発現解析から、*PPR2* と *ORF11* が *Rf17* に関わっている可能性が示唆されたが、両遺伝子は CWR において機能しないような変異が生じている可能性が考えられた。すなわち *Rf17* アリルで機能を欠損している可能性が考えられた。このため、*PPR2* あるいは *ORF11* の機能を抑制することで CW-CMS 系統において稔性回復を引き起こす事ができると仮定した。

この仮説を証明するために、RNAi 法を用いて CW-CMS 系統における *ORF11* と *PPR2* の発現それぞれを抑制した系統を作成した(Fig. 42)。Fig. 40 の striped bars で示した部分をトリガーとして用いたところ、*ORF11* を 34-77%に抑制した RNAi_ORF11 を 7 系統、*PPR2* を 25-75%に抑制した RNAi_PPR2 を 6 系統得る事ができた。まずこれらの系統の開花 2 時間前の花粉の糖化能力を評価した。CWR の花粉をデンプンが糖化している花粉、デンプンが充実したままの花粉、及び形態が異常な花粉に分類すると、68%の花粉が糖化されていることが明らかとなった(Fig. 43)。それに対し、CW-CMS 系統では糖化している花粉は見られなかった。一方、RNAi_ORF11 系統では一部に糖化している花粉が見られた。特に *ORF11* が良く抑制されていた RNAi_ORF11-3 では 38%、RNAi_ORF11-6 では 28.5%の花粉が糖化していた(Fig. 43)。しかし RNAi_PPR2 系統では花粉糖化の回復は見られなかった。

同じ RNAi 系統を用いて開花後の柱頭における花粉発芽能力の検定を行った(Fig. 44、Table 5)。CWR 系統では開花後柱頭に付着していた花粉のうち、77%の花粉が発芽していた。それに対し CW-CMS 系統では僅かに柱頭に付着している花粉が見られたが、そのうちで発芽している花粉は見られなかった。一方 RNAi_ORF11-2 と RNAi_ORF11-3 ではごく稀にはあるが、花粉発芽が見られる柱頭があったのに対し、RNAi_PPR2 系統では見られなかった(Fig. 44、Table 5)。また、RNAi_ORF11-2、-3、-4、-6 など比較的 *ORF11* が抑制されていた系統では 2-5%程度の種子稔実が見られた(Fig. 44)。

・ *ORF11* の過剰発現

ORF11 の発現抑制は CW-CMS 系統において稔性回復を引き起こした。従って逆に *ORF11* を CWR において過剰発現する事で、雄性不稔性が引き起こされるという可能性を考えた。そこで Maize ubiquitin promoter の下流に *ORF11* を連結して CWR と T65 それぞれに導入した。CWR において、導入遺伝子が 1 コピーで *ORF11* が過剰発現されている系統を 2 系統選抜し、花粉観察を行ったところそれぞれ 60%以上の花粉においてデンプンの蓄積が減少していることが明らかとなった(Fig. 45)。従って *ORF11* の過剰発現は CWR において配偶体型の花粉不

A

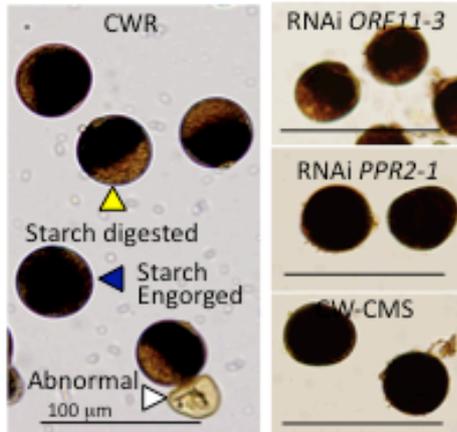
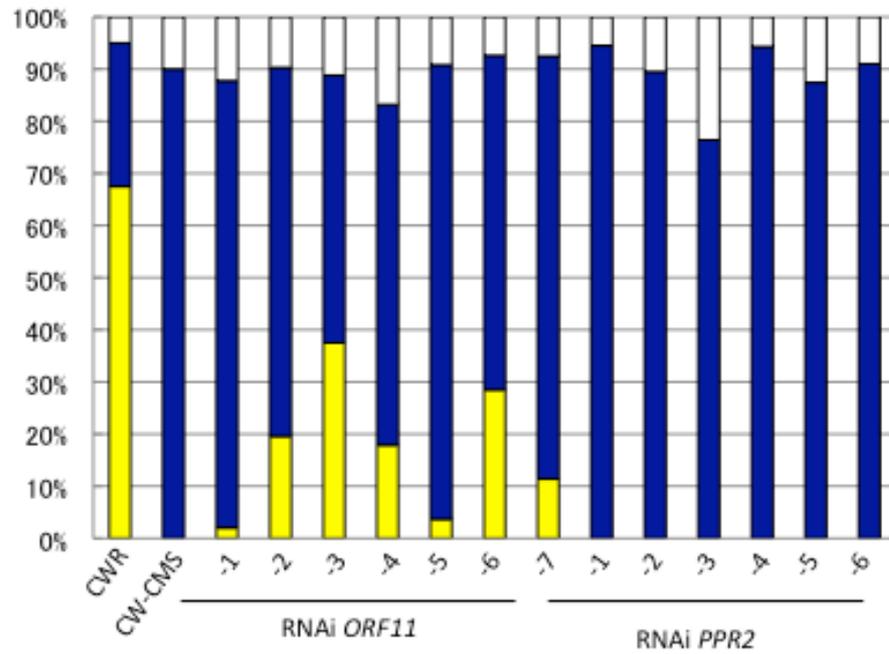


Fig. 43 Starch digestion restored in the pollen of *ORF11* RNAi-mediated knockdown lines.

A, Pollen stained with I2-KI.

B, Ratio of starch-digested (yellow), starch-engorged (blue) and abnormal pollen (white) in CWR, CW-CMS, *ORF11* RNAi transgenic lines, and *PPR2* RNAi transgenic lines.

B



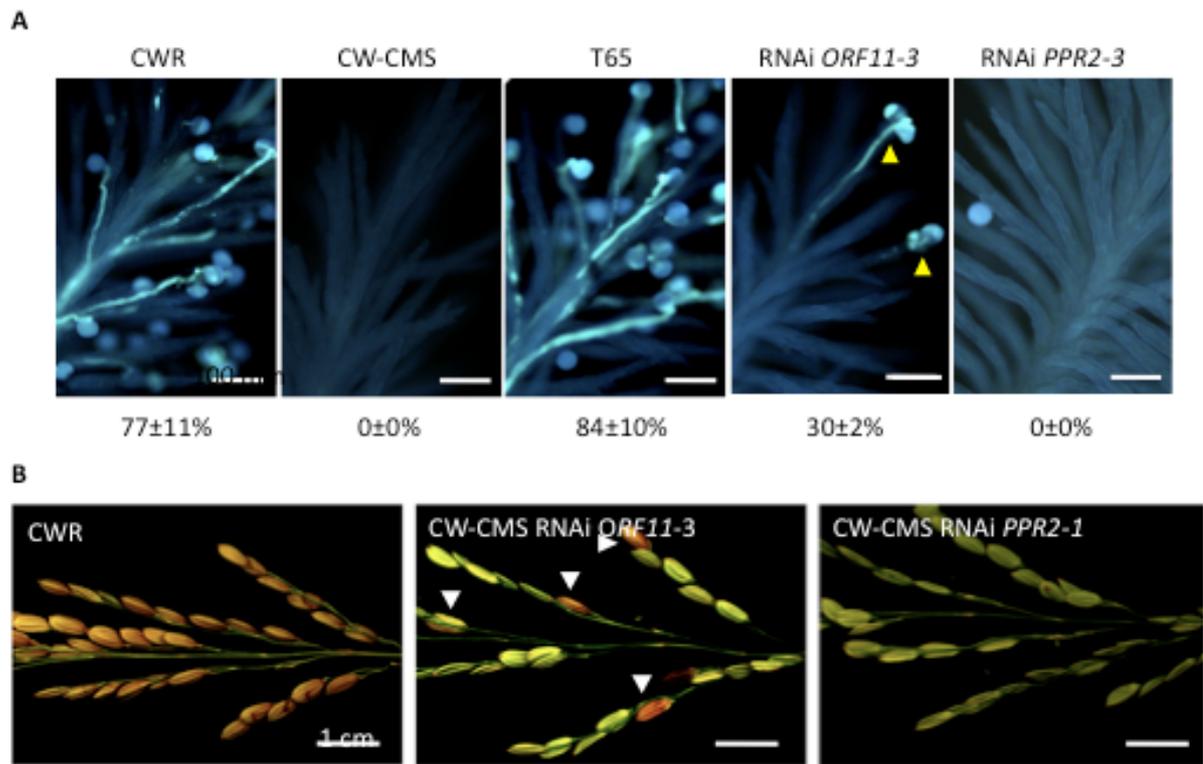


Fig. 44 RNAi-mediated knockdown of *ORF11* and *PPR2* restores fertility to the CMS plants.

A, Stigmas 6 hours after anthesis stained with aniline blue. Arrowheads in RNAi *ORF11-3* panel indicate the traces of pollen germinations. Bars = 100 μ m.

B, Seed-set observed on RNAi *ORF11-3*. Arrowheads indicate the restored seed-sets observed in RNAi *ORF11-3* plants.

Table 5 Pollen germination frequency on stigmas after anthesis.

Lines	Numbers of stigmas observed (n)	Numbers of stigmas with pollen germination (a)	Frequency of stigmas with pollen germination (a/n)	Numbers of pollen per stigma (b)	Numbers of germinating pollen per stigma (c)	Frequency of pollen germination (c/b)±SD
CWR	7	7	100.0%	152.6	118.1	77±11%
CW-CMS	7	0	0.0%	0.4	0.0	0±0%
T65	7	7	100.0%	151.0	121.7	84±10%
RNAi-ORF11-2	18	4	22.2%	1.3	0.4	30±2%
RNAi-ORF11-3	23	6	26.0%	1.7	0.5	29±28%
RNAi-PPR2-1	12	0	0.0%	0.7	0.0	0±0%
RNAi-PPR2-3	16	0	0.0%	0.4	0.0	0±0%

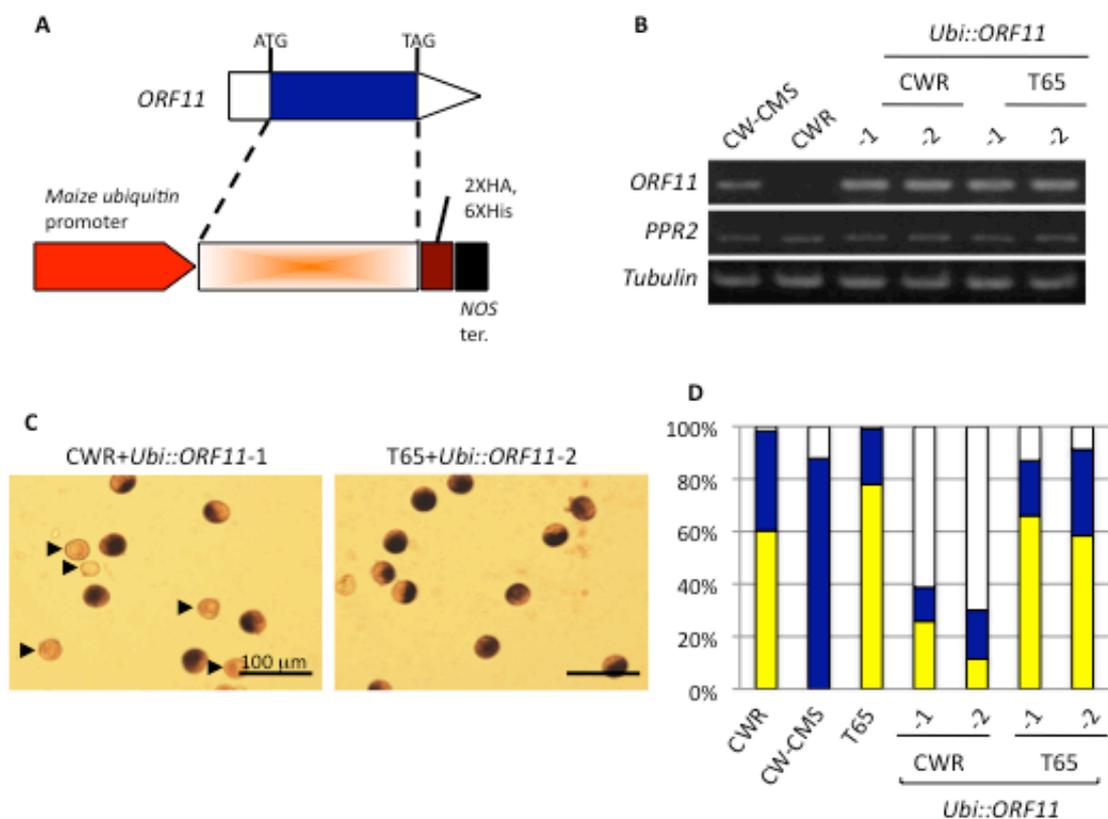


Fig. 45 The effect of *ORF11* overexpression in CWR and T65 lines .

A, Constructs for overexpression.

B, Semi-quantitative RT-PCR analysis of *ORF11* and *PPR2* in CW-CMS, CWR and overexpression lines.

C, Pollen 2 hours before anthesis stained with I_2 -KI. Arrowheads indicate the shrunken pollen frequently observed in CWR +*Ubi::ORF11* lines.

D, Pollen were categorized into three groups as in **Fig. 43**. Ratio of starch-digested (yellow), starch-engorged (blue), and abnormal pollen (white) in each line.

稔性を引き起こすものと考えられた。導入遺伝子と雄性不稔性が連鎖している事を検証するために、CWR において *ORF11* が導入された系統の自殖後代検定、及び T65 との相互交配検定を行った(Table 6)。

CWR_Ubi::*ORF11*/+の後代では、ハイグロマイシン耐性個体(Hygr)とハイグロマイシン感受性個体の割合が 34:28($\chi^2=0.23$, $p=0.05$, 1:1)となった。メンデル遺伝で想定される 3:1 から大きく外れたため、雌雄どちらかの配偶子が致死になっているという可能性を考え、T65 との相互交配を行った。CWR_Ubi::*ORF11*/+ \times T65 の交配では 24:32 ($\chi^2=0.15$, $p=0.05$, 1:1)となり正常な分離比を示したが、T65 \times CWR_Ubi::*ORF11*/+の交配では 2:82 ($\chi^2=0.017$, $p=0.05$, 0:1)となり雄性配偶子からの導入遺伝子の伝達が著しく減少していることが示された。この傾向は独立の CWR_Ubi::*ORF11* 系統でも見られ、すなわち導入遺伝子は花粉致死性を引き起こす事が示された。一方 T65_Ubi::*ORF11* 系統では花粉稔性に以上は見られず(Fig. 45)、導入遺伝子の分離比も正常であったため(data not shown)、相互交配実験は行わなかった。

・ *ORF11* の発現解析

ORF11 の発現抑制が *Rf17* の実体である可能性が強く示唆されたため、*ORF11* の発現がどのようにして制御されているかについて興味を持たれた。改めて *ORF11* の発現解析を行ったところ、先述の通り *ORF11* の発現は CWR において低く制御されていたが、T65 においても CW-CMS 系統より発現が低い事が分かった(Fig. 46A)。花粉のみから RNA を抽出した定量的 RT-PCR ではこの傾向はさらに顕著であり、T65 と比較して CW-CMS 系統では 10 倍以上 *ORF11* の発現が増加している事が明らかとなった(Fig. 46B)。また、CWR の三細胞期花粉では *ORF11* の mRNA が殆ど検出できなかった(Fig. 46B)。第二章で供述した通り CW-CMS と日本晴はミトコンドリアゲノム構造が大きく異なっていた。サザンブロット解析では T65 は日本晴と殆ど同一のゲノム構造を持つと予測できた(Fig. 36)。従って CW-CMS と T65 も大きくゲノム構造が異なっている事が考えられる。一方、両系統の核ゲノムは調査した限りでは 100% T65 に置換されているため(第一章・第一節・(1)材料・方法を参照)、isogenic である事を確認している。*ORF11* の領域はシーケンス解析によって両系統の配列が完全に一致していることを確認している(data not shown)。従って *ORF11* の発現量の違いはミトコンドリアゲノムの違いによって引き起こされていると考えられた。この事を実験的に検証するために、CWR と T65 との相互交配によって作成した F_1 における *ORF11* の発現を調査した(Fig. 47)。すると、CWR を♀親にした場合でのみ *ORF11* の発現が見られた。従

Table 6 Reciprocal cross test for monitoring allele transmission efficiency.

Cross (Female X Male)	Hyg ^r	Hyg ^S	Hyg ^r /Total	X ²
Ubi::ORF11-a/+ self	34	28	54.8%	0.23 (1:1)
Ubi::ORF11-a/+ X T65	24	32	42.9%	0.15 (1:1)
T65 X Ubi::ORF11-a/+	2	83	2.4%	0.02 (0:1)
Ubi::ORF11-b/+ self	22	31	41.5%	0.33 (1:1)
Ubi::ORF11-b/+ X T65	32	19	62.7%	0.21 (1:1)
T65 X Ubi::ORF11-b/+	0	65	0.0%	not applicable

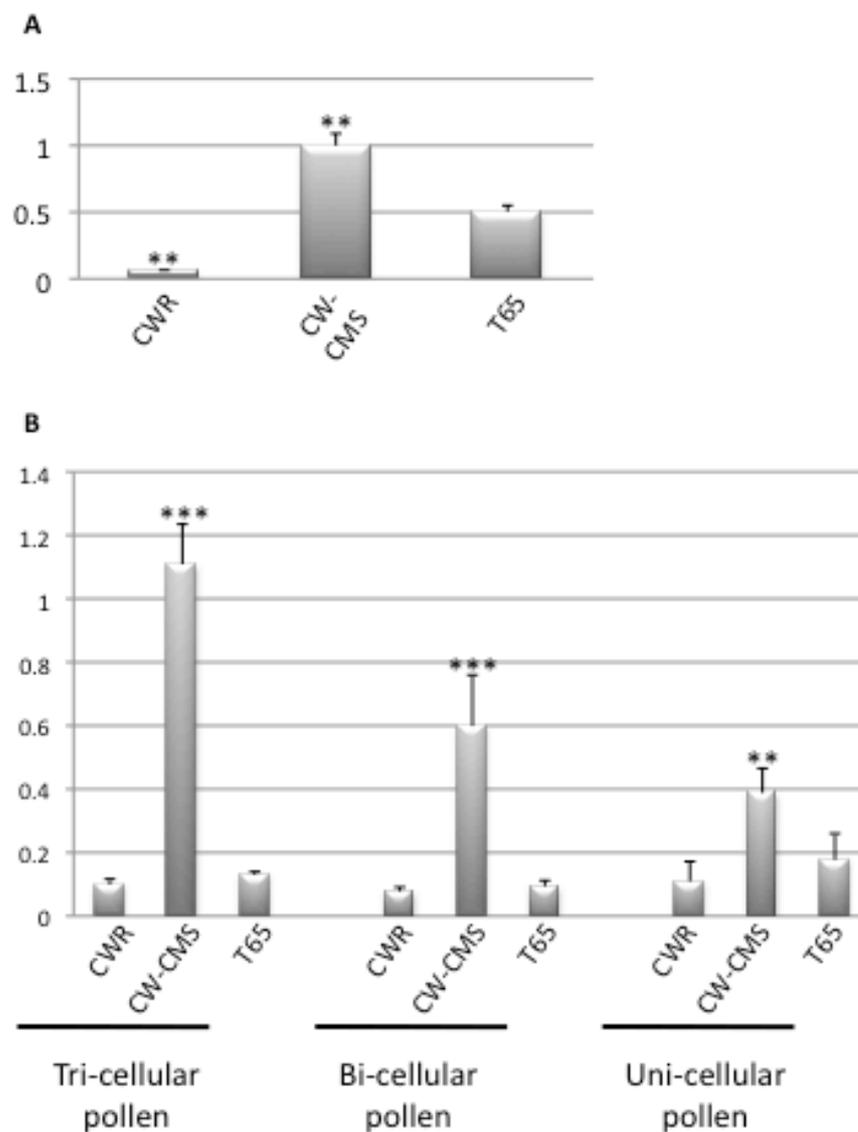


Fig. 46 *ORF11* is differentially regulated in T65 and CW-CMS.

A, Relative expression of *ORF11* in anthers at tri-cellular pollen stage monitored by quantitative RT-PCR. B, Relative expression of *ORF11* during pollen development monitored by quantitative RT-PCR. RNA was extracted from isolated pollen grains.

** ($p = 0.01$), *** ($p = 0.005$) indicate statistical significance by ANOVA in comparison with T65.

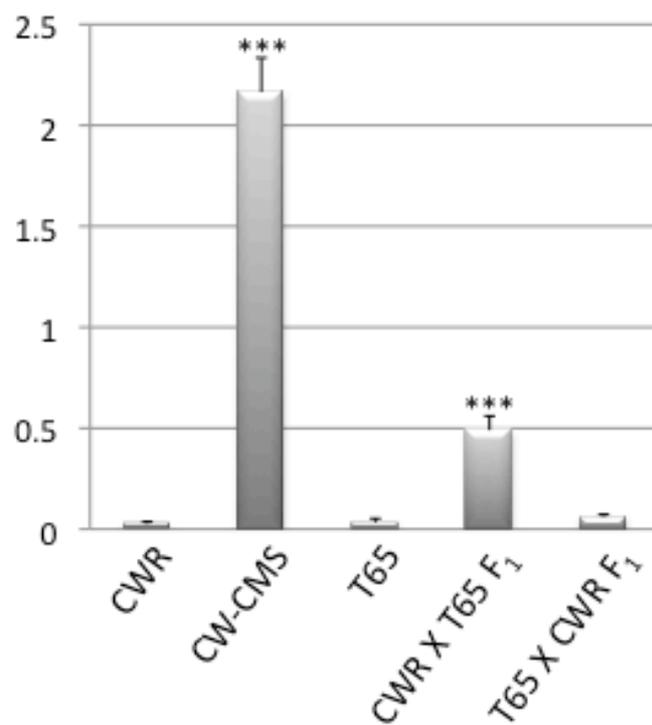


Fig. 47 Tri-cellular pollen *ORF11* expression in reciprocal hybrids monitored by quantitative RT-PCR. Note that F₁ pairs CWR X T65 and T65 X CWR possess totally isogenic chromosomes but different cytoplasm. *** indicates statistical significance by ANOVA ($p=0.005$) in comparison with T65.

って *ORF11* の発現制御は細胞質依存的に行われており、具体的には CW-CMS 細胞質バックグラウンドでのみ発現が見られると考えられた。細胞質置換によって生じる核遺伝子発現制御の違いは RTG 制御によるものと考えられる。従って、機能不明の *ORF11* を *RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY (RMS)* と命名した。RMS は KDDCW11 系統でも発現が増加しており、DCW11 の欠損によって引き起こされる RTG シグナリングの下流にあると考察された(Fig. 48)。

CW-CMS 系統と T65 間の RMS の発現制御の違いは RTG シグナリングの違いによって引き起こされていると考えられた。一方、*Rf17* の原因であると考えられる CW-CMS 系統と CWR 系統の発現制御の違いは RMS 開始コドンから 2,286 bp の位置にある SNP であると考えた(Fig. 49)。従って CWR(*Rf17*)と CW-CMS(*rf17*)両方のアレルの RMS プロモーター領域 4,613 bp の下流に *monomeric Red Fluorescent Protein (mRFP)* を連結し、T65 に導入した。各コンストラクトについて 1 コピーでコンストラクトが導入された 3 系統を選抜し、三細胞期花粉における RFP 蛍光を観察した(Fig. 50)。すると CWR アレルを導入した場合は蛍光が見られなかったのに対し、CW-CMS アレルを導入すると蛍光が見られた。このコンストラクト内に含まれている変異は 2,286 bp の位置にある SNP のみであるため、この SNP が CWR アレル(*Rf17*)における RMS 発現発現を抑制しているものと考えられた。

この SNP は制限酵素 *Maell*(Roche diagnostics)サイト(GTNAC)内に含まれていたため、CWR アレルは *Maell* に認識されないと考えられた。従って、この SNP を検出する PCR-RFLP マーカーを作成し、SNP の分布を World rice core-collection 69 系統内で調査したが他に CWR アレルを持つ系統は存在しなかった(data not shown)。交配実験により Japonica の栽培イネ 214 系統は *Rf17* を持たない事が報告されている(石嶺・新城 1978)。また、CWR の育成過程で交配に使われた系統、Strain W1、レイメイ(Reimei)、染分(Somewake)もこの SNP を持たなかったため(Fig. 1, Fig. 49B)、*Rf17* の由来は不明であった。

・ RMS の機能についての調査

RMS は 178 アミノ酸のタンパク質をコードすると考えられ、一部に 20 アミノ酸程度の Acyl-carrier protein synthase (ACPS)ドメインを持つということが予測された(Fig. 51A)。ACPS ドメインを持つ酵素は脂肪酸合成に関わっており、C14:0-ACPあるいはC16:0-ACPをC18:0-ACPへ伸長する機能があることが知られている(Nishida 2004)。本来 ACPS ドメインは 70-90 アミノ酸であり、RMS はその一部しか持たない。従って通常の ACPS と

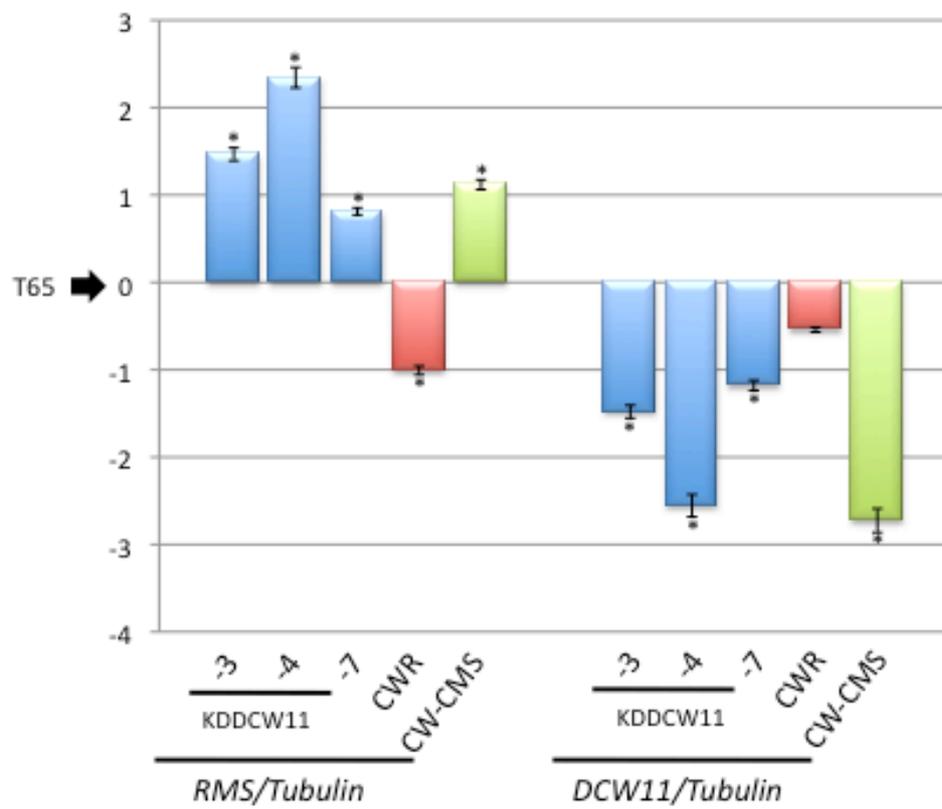


Fig. 48 DCW11 knockdown results in *RMS* up-regulation. Log₂ values are given against the expression level of T65, with normalization by *alpha-tubulin*. *indicates statistical significance by ANOVA ($p = 0.05$) in comparison with T65.

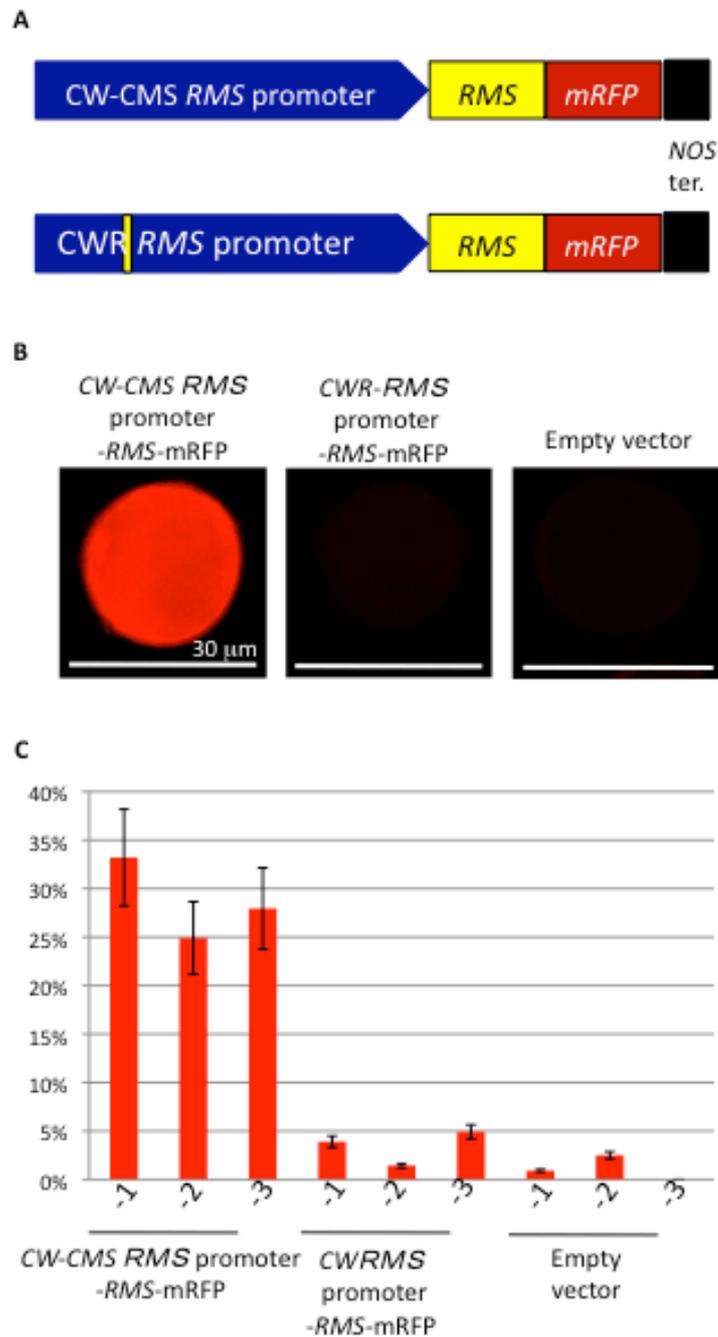


Fig. 50 RMS promoter analysis.

A, Constructs used for RMS promoter::mRFP analysis.

B, RFP fluorescence in mature pollen observed by fluorescent microscopy.

C, Percentages RFP fluorescent pollen in each line.

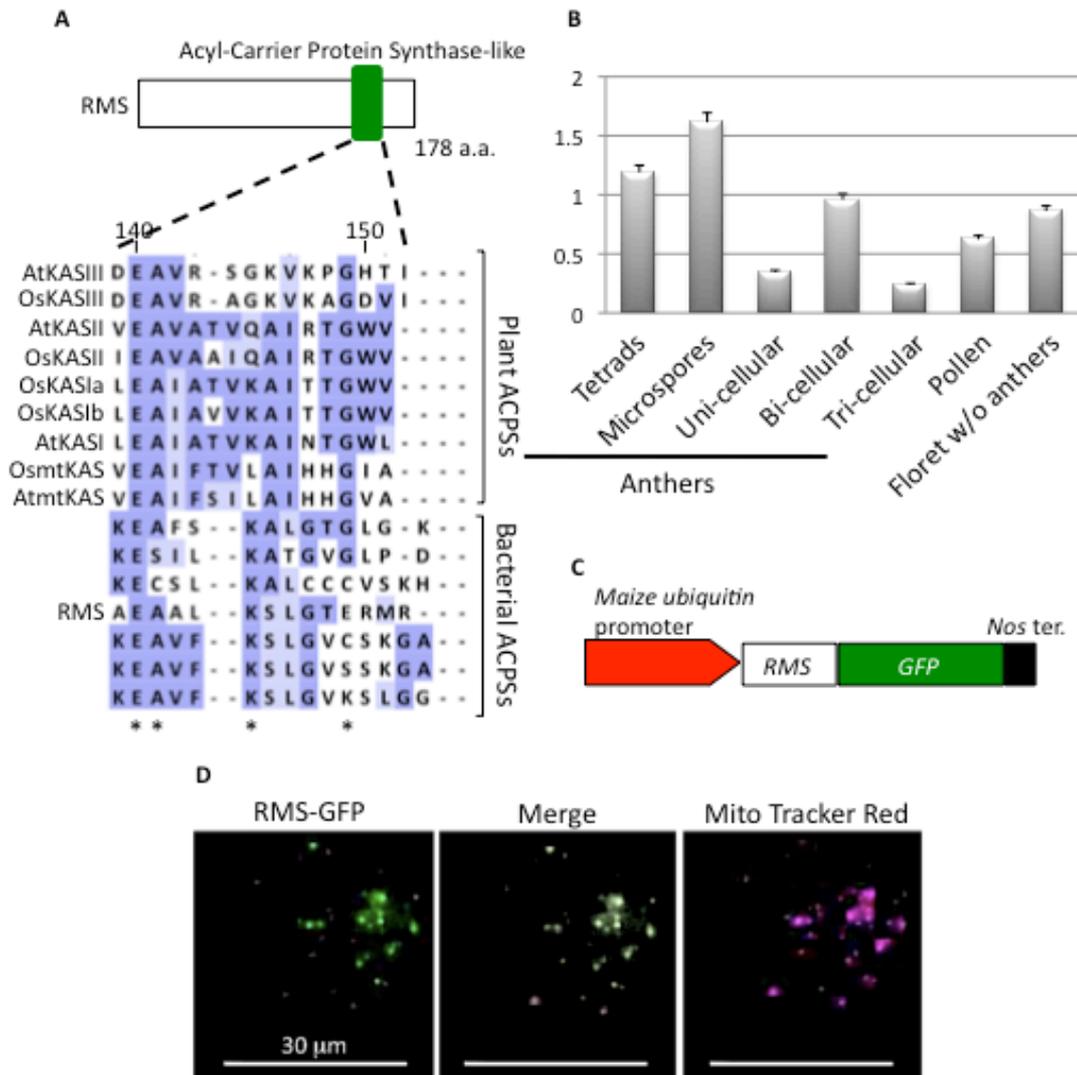


Fig. 51 RMS is an unknown mitochondrial protein with partial Acyl-carrier protein synthase domain.

A, Structure of RMS, and the conserved region of Acyl-carrier protein synthase (ACPS) protein present in RMS. Asterisks indicate the relatively conserved residues between the plant and the bacterial ACPSs.

B, Quantitative RT-PCR analysis of *ORF11* in anther tissues of T65.

C, Construct designed to express RMS-GFP fusion protein.

D, RMS-GFP fusion protein stably expressed in rice protoplast. Transformed protoplasts were counterstained with Mito Tracker Red (Invitrogen) and observed under fluorescent microscopy.

しての活性は持たないと考えられた。また、RMSは植物型ではなく、バクテリア型のACPSを持つ事がACPSで保存されているドメインのアミノ酸配列比較から明らかとなった(Fig. 51A)。従って、データベースからの機能の推定は難しいと考えられた。RMSの発現はT65において様々な雄性器官の様々なステージで低いレベルで発現していた(Fig. 51B)。RMSをUbiquitin promoterの下流でGFPと融合させてイネのプロトプラストにおいて発現させたところ、GFP蛍光とMito Tracker Redの蛍光が一致したため、RMSはミトコンドリア局在である可能性が高いことが分かった(Fig. 51D)。

また、Y2Hスクリーニングを用いてRMSと結合するタンパク質の探索を行ったところ、*Oryza sativa* Keto-acyl-carrier protein synthase II (OsKASII: LOC_Os07g42420)とyeast内で結合する事が分かった(Fig. 52A)。OsKASIIはACPSドメインを持ち(Fig. 52C)、*E. coli*のKASIIはホモダイマーを形成して初めて基質に結合できるという事が結晶構造解析から予測されている(Moche et al. 2001)。従ってACPS様のモチーフを持つRMSがOsKASIIと結合する可能性はあると考えられた。RMSがなんらかの形で脂肪酸合成に関わっているという事を踏まえ、CWR、CW-CMS系統とT65における脂肪酸含量をGC-FIDによって調査した(Fig. 53)。CW-CMSではC14:0の脂肪酸が有意に多く、C18:1(9)とC18:2(9,12)の脂肪酸が有意に少ないという事が明らかとなった。

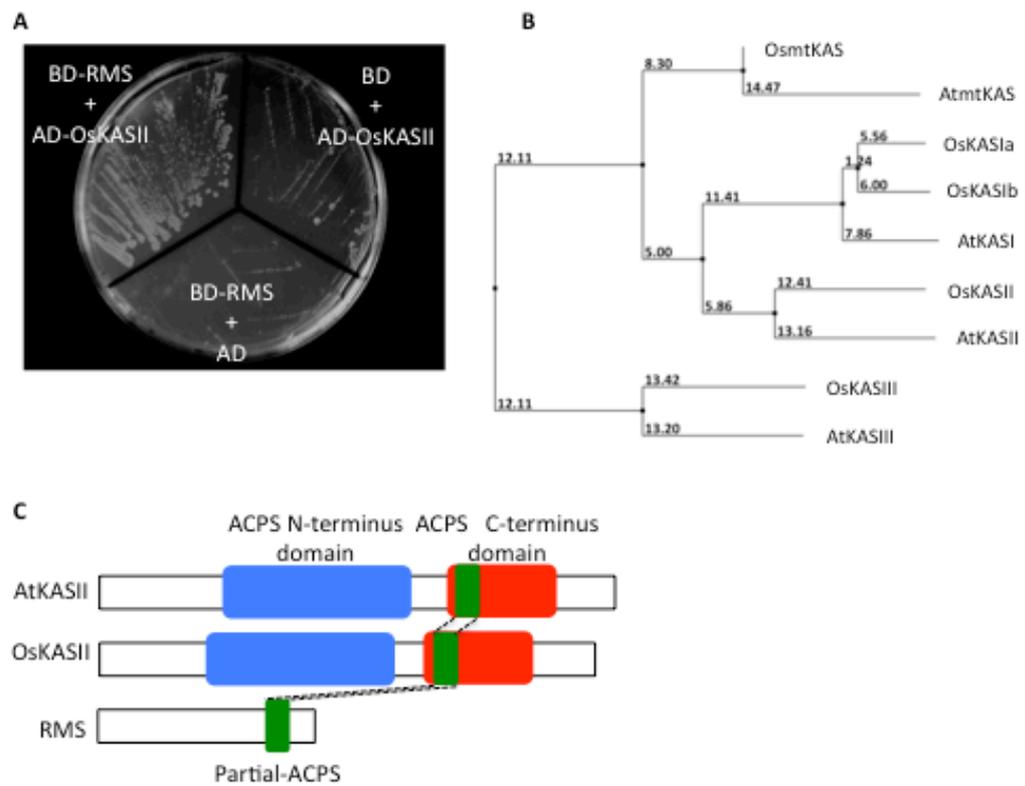


Fig. 52 RMS interacts with OsKASII in yeast.
 A, Yeast Y187 strain carrying full-length RMS fused to GAL4 DNA-Binding domain (BD) was mated with yeast AH109 strain carrying OsKASII protein. Diploids were streaked onto Ade/His/Leu/Trp-deficient media.
 B, Phylogenetic tree of rice and *Arabidopsis* KAS generated by neighborhood-joining method based on % identity.
 C, Comparison of ACPS domain in At KASII, OsKASII and RMS.

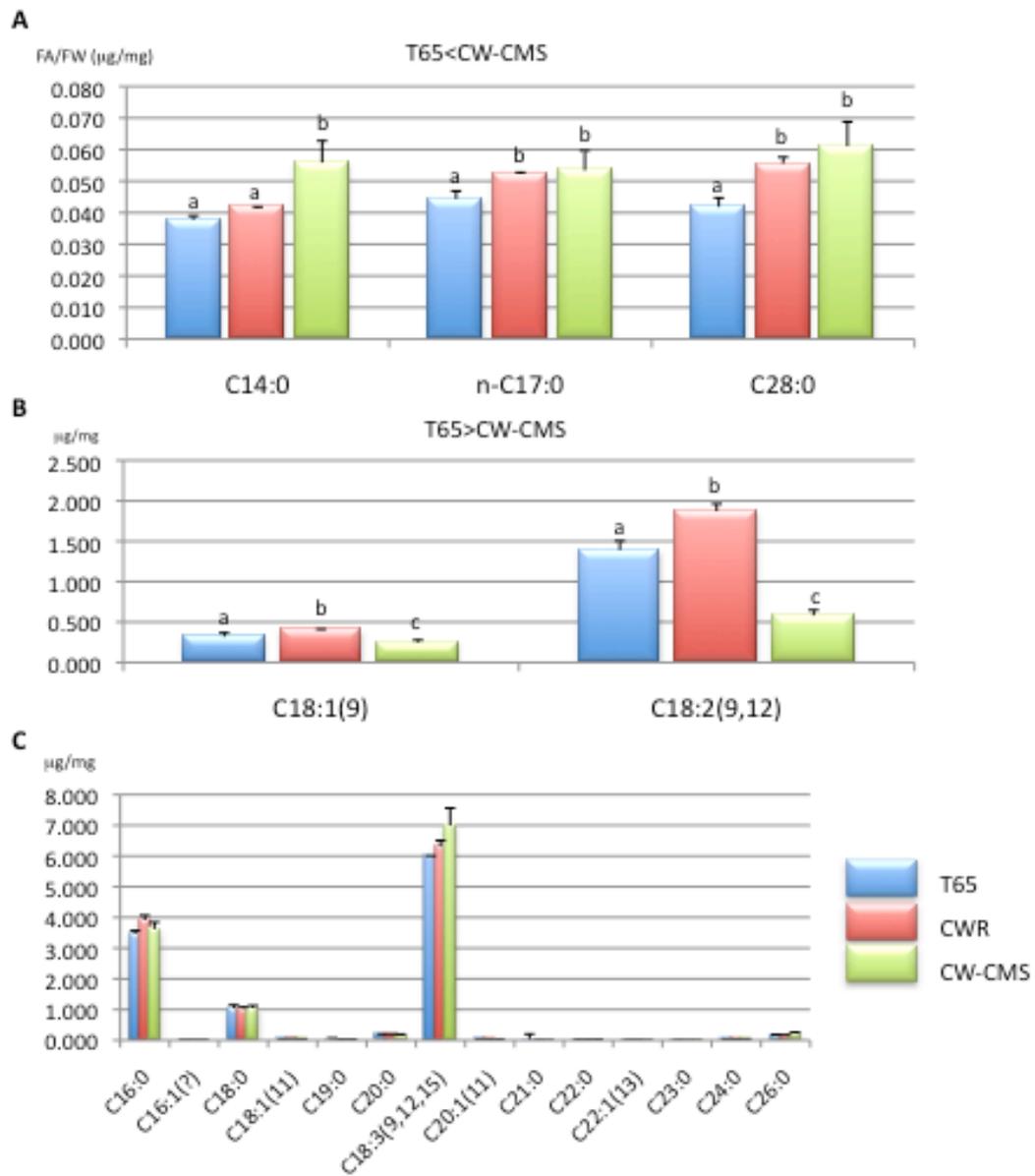


Fig. 53 Fatty acid content in anthers at tri-cellular pollen stage measured by GC-FID analysis. All the statistical tests were done by Tukey's method ($p = 0.05$).

A, Fatty acids increased in the CW-CMS line.

B, Fatty acids reduced in the CW-CMS line.

C, Fatty acids without any statistical differences between the lines.

(3)考察

- ・ *Rf17* は *RMS* の発現抑制によって説明される。

Rf17 のポジショナルクローニングを行い、第四染色体上の 77 kb 内に 16 個の候補遺伝子を見出した。シーケンズ解析と発現解析により、*Rf17* の原因は *ORF11* あるいは *PPR2* の機能低下である事を推測した。RNAi 法によってそれぞれの遺伝子を CW-CMS 系統においてノックダウンしたところ、*ORF11* を抑制した場合のみ稔性回復が見られた。従って *Rf17* の原因は *ORF11* の発現減少にあり、*ORF11* はプロモーターにおける SNP によってその発現が制御されていた。*ORF11* は細胞質依存的に発現制御されていたため、*RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY (RMS)* と命名した。*Rf17* アリルは、*RMS* の発現が抑制されたアリルである事を証明した。*RMS* はミトコンドリアに局在しており、yeast 内では *OsKASII* と結合したが、生体内での明確な機能は未知であった。

第二章で、現在までに単離・同定されてきた *Rf* はほとんどが PPR タンパク質をコードしていた事を述べた。イネの BT-CMS における *Rf1* を例にとると、PPR である *Rf1* タンパク質が MCAG である *B-atp6-orf79* ジストロンに由来する mRNA をプロセッシングすることで、*ORF79* タンパク質を抑制するというモデルが確立されている (Kazama and Toriyama 2003, Wang et al. 2006, Kazama et al. 2008, Fig. 54)。*Rf1* は配偶体型に稔性回復を引き起こす遺伝子であり、花粉において *Rf1* タンパク質が機能する事で稔性回復する事が示された。

しかし、半数体での優劣は存在せず、機能欠損が花粉稔性を引き起こすケースも考えられる。Wen et al. (2003) はトウモロコシ CMS-S に対する配偶体型稔性回復遺伝子座について、遺伝子機能の優劣について調査を行った。コルヒチン処理によって遺伝子型が *RfRf/rf* となる四倍体を作成したところ、*RfRf* の花粉しか遺伝しない事が明らかとなった。従って *Rf/rf* は致死になると考えられたため、*Rf* 遺伝子の機能は欠損しているもの(機能として劣性)と考えられた。従って Wen et al. (2003) は *rf* がコードするタンパク質が CMS-S 細胞質において致死性を引き起こしていると結論したため、*rf=Rf-lethal1 (Rf1)* とし、*Rf=rf1* とした。このように機能欠損型の *Rf* が存在し、CMS バックグラウンドで機能する事で雄性不稔性を引き起こす遺伝子が存在することが知られている。

今回見出した *Rf17* は機能欠損型に分類され、*RMS* の発現低下によって稔性回復が引き起こされる事が考えられた。*rf1* の分子機構は不明であり、本研究は初めて機能欠損型 *Rf* の実体を明らかにしたと言える。BT-CMS イネを培養してから再分化する事で、変異によって稔性回復遺伝子が生じたとの報告がある (Ling 1991)。この稔性回復遺伝子は核遺伝する事から、単に *ORF79* が欠失したものではないと考えられた。これらの機能欠損型の *Rf*

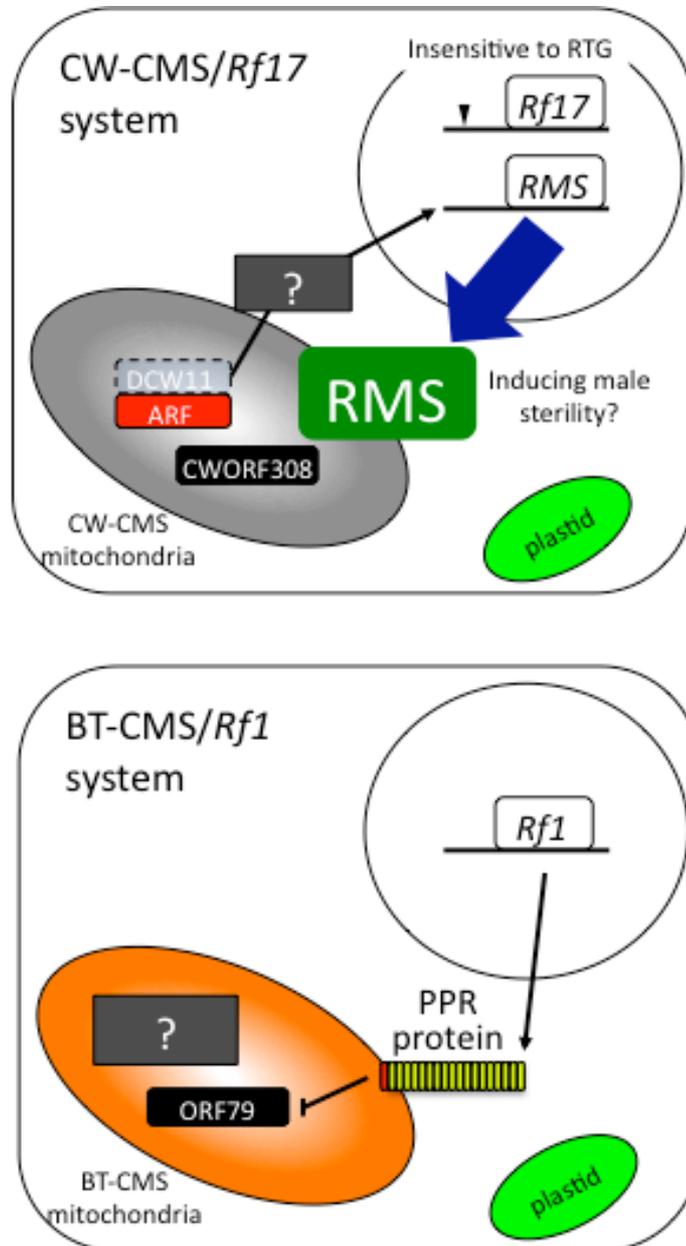


Fig. 54 Comparison of molecular mechanisms of CW-CMS/*Rf17* system revealed in this study, with well-known BT-CMS/*Rf1* system (Iwabuchi et al. 1993, Akagi et al. 1994, Kazama and Toriyama 2003, Wang et al. 2006, Kazama et al. 2008). *Rf17* is a reduced expression allele of *RMS*.

は MCAG の機能に対して稔性回復へのバイパスを作るものであり、必ずしも MCAG の転写・翻訳に直接影響を与えるものではないと考えられる。CWORF308 の MCAG としての可能性についてはさらに解析が必要ではあるが、本章で見出された *Rf17* の性質を考えると *Rf17* の有無が MCAG の直接の制御に影響を与えない可能性もある。

・ *RMS* は RTG シグナリングを含むユニークな機構によって発現制御されている。

RMS は細胞質ゲノムの由来によって発現レベルが異なるため、RTG シグナリングによって制御されているものと考えられた。第一章で、CW-CMS 系統において発現が変動する遺伝子を 192 個見出したが、*RMS* はこれらのような制御を受ける遺伝子の一部であるとも考えられた。なお、第一章のマイクロアレイでは、*RMS* の発現量が低すぎたため、検出できなかった。*RMS* の発現と遺伝子型を整理し直すと (Fig. 55)、(i) T65 細胞質を持つ場合は *Rf17*(CWR) あるいは *rf17*(CW-CMS/T65) どちらのアリルであっても *RMS* は発現しない、(ii) CW-CMS 細胞質ゲノムを持つ場合、*rf17* アリルを持つと *RMS* は発現するが、*Rf17* アリルの場合 *RMS* は発現しない、という 2 つの性質が考えられた。すなわち T65 細胞質の場合核側のアリルに関係なく *RMS* が発現しないという事で、T65 ゲノムが Epistatic であると捉える事ができる。この現象は Genomic Imprinting に類似しているように思えるが、Genomic Imprinting は片親に由来するアリルのみが発現する現象であるため、両親以上の mRNA 発現は想定していない (Autran et al. 2005)。本研究と類似の現象はトウモロコシの F₁ ハイブリッドで見られ、雑種強勢の超優性説を裏付けるような現象であると考えられている (Song and Messing 2003, Swanson-Wagner et al. 2006)。Song and Messing (2003) は *α-zein* 遺伝子群に注目し、*asz22.4* や *azs22.16* 等は片方の hybrid のみで両親以上の発現が見られた事を報告している。ただし、これらの研究では本研究における CW-CMS 系統のように successive backcross 系統における発現は調査していない。本研究で見出した Epistatic な制御の内実は Fig. 54 のブラックボックスで示したように不明ではあるが、DCW11 と *RMS* との関係を考えると RTG シグナリングが関わっていると考えられる。この Intergenomic Epistasis と RTG シグナリング、さらに CMS の発現及び *Rf* メカニズムについての更なる考察は総合考察で後述する。

一方、*Rf17* アリルの *RMS* はプロモーター領域にある変異によって発現が抑制されていることが示唆された。近年、*indica* 品種の脱粒性に関わる QTL *qSH1* は、プロモーター領域にある SNP によって *OsRPL* 遺伝子の離層における空間的発現制御が行われなくなった事で、*japonica* における機能が失われたと報告された (Konishi et al.

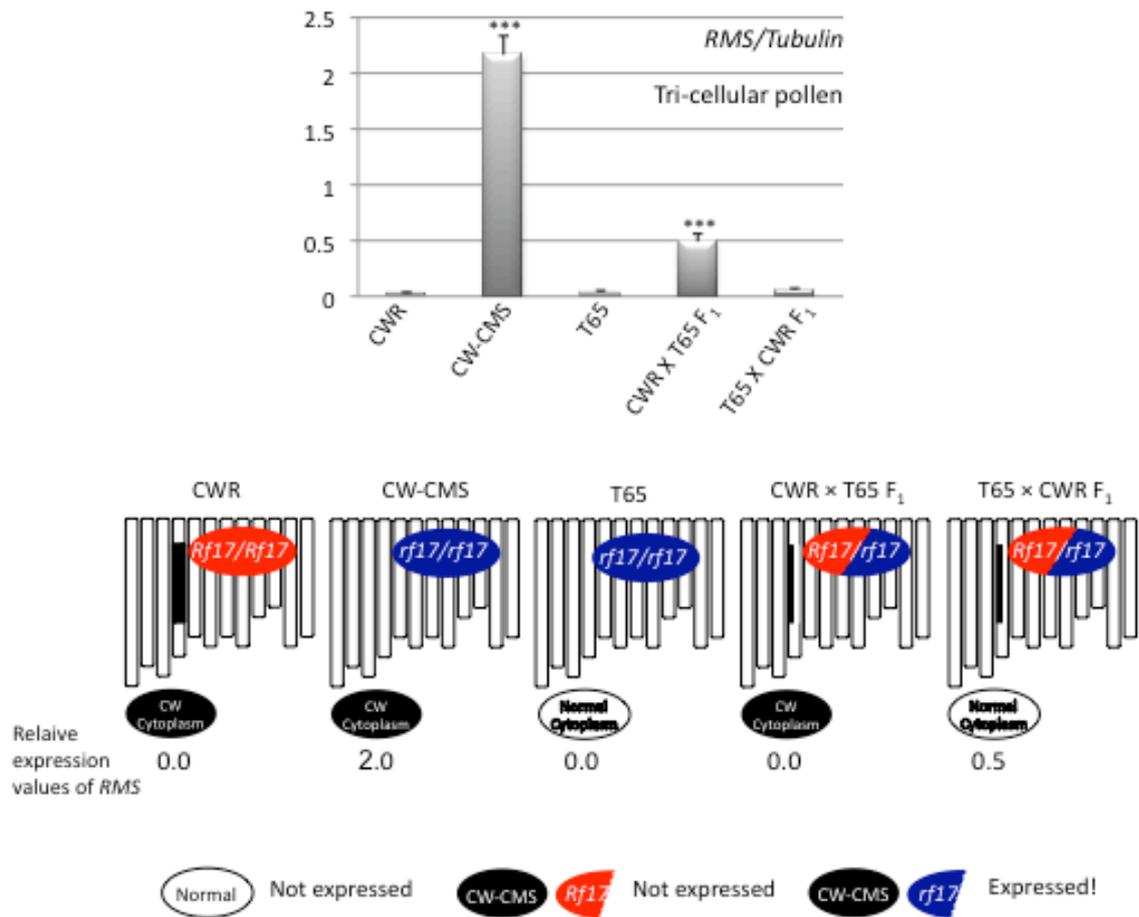


Fig. 55 Involvement of molecular Integenomic Epistasis (IE) in *RMS* regulation. *Rf17* is the reduced expression allele of *RMS*. The explanation of the RT-PCR experiment is described in Fig. 47. *RMS* is considered to be expressed only in CW-CMS/*rf17* condition, and not expressed when cytoplasmic genotype is normal.

2006). この SNP は *OsRPL* から 12 kb 離れているが、同時に導入することで初めて表現型が相補されたため cis-element であると考えられた。本研究でも、CWR における *RMS* の発現は 2.2 kb 上流の SNP によって花粉での発現が抑制されると考えられた。ただし、プロモーター活性が T65 バックグラウンドにおいて確認された (Fig. 50)。これは、T65 の花粉において *RMS* の発現が見られないという結果 (Fig. 46) と矛盾している。この原因は不明であるが、CW-CMS アリルの *RMS* プロモーターの方が ectopic な活性を持ちやすいという可能性が考えられた。

・ **RMS は機能不明のミトコンドリア局在タンパク質である。**

RMS は機能的なドメインを持たなかったが、唯一 ACPS 様ドメインが機能に対する鍵であると考えられた。ACPS におけるこの 20 アミノ酸は種間でも特に良く保存されていた (Fig. 51)。また、*RMS* における ACPS 様ドメインは植物型よりはバクテリア型に近く、*RMS* がイネにおいて ACPS として機能している可能性は極めて低いと考えられた。一方、*RMS* は *OsKASII* と yeast 内で結合することが示された。*KASII* はシロイヌナズナで変異体が見出されており、ノックアウトは胚致死になることが報告されている (Pidkowich et al. 2007, Hakozaki et al. 2008)。*KASII* はプラスチドで機能すると考えられており、ノックアウト変異体は C16:0 が過剰に蓄積し、初期胚の発達が停止すると考えられた。*OsKASII* の mRNA の発現パターンを *Oryza_Express* (http://gbarrier.lab.nig.ac.jp/oryza_express/) で調べたところ、柱頭や、受精後の柱頭での発現が多く見られた (Fig. S6)。一方、同じくプラスチド局在の *OsKAS1a* (LOC_Os04g55060)、*OsKAS1b* (LOC_Os06g09630) と *OsKAS1c* (LOC_Os04g36800)、およびミトコンドリア局在の *OsmtKAS* (LOC_Os02g10320) なども花粉で発現していると考えられ (Fig. S6)、生体内では *RMS* がこれらと結合する可能性も考えられた。*RMS* は ACPS-like ドメインによって *KAS* と結合すると考えられたが、実際にこのドメインはその他の *KAS* で良く保存されていた (Fig. 51)。*RMS* はミトコンドリアに局在するため、結合する可能性として最も高いのが *OsmtKAS* であると考えられた。

また、GC-FID により、CW-CMS 系統では C18:1 脂肪酸が減少している事が明らかとなった (Fig. 53)。C18:1-ACP は生体内では Sphingolipid などの前駆体となる事が知られている。変異体解析などで、シロイヌナズナで Sphingolipid は正常な花粉発達に必要なと報告されている (Teng et al. 2008, Dietrich et al. 2008)。さらにイネの sphingolipid 前駆体合成酵素をコードする *DSH1* ノックダウン系統では稔実率が著しく低下した (Imamura et al.

2007). RMS と CW-CMS 系統における C18:1 減少の直接的な関係については不明だが、Shingolipid など脂肪酸は花粉発達や花粉発芽に必要な因子であり、無関係では無いと考えられた。

ここで、トウモロコシ CMS-S において *Rf* として機能する *rf1* がコードするタンパク質について考察する(Wen et al. 2003). *Rf1/rf1* ではミトコンドリア遺伝子にコードされる ATPA の蓄積が減少しており、さらに *rf1* は homozygous になると胚致死を引き起こした。従って *Rf1* は植物の発生に必須の遺伝子あるが、CMS-S バックグラウンドにおける花粉の形成を阻害する遺伝子であるとの結論がなされた。*Rf1* の分子機構は不明であるが、ATPA の蓄積を促す事から、PPR のようにミトコンドリア遺伝子に働きかけるような遺伝子であると予測されている(Chase 2007). CMS-S の MCAG は *orf355-orf77* であると考えられているが、この遺伝子産物と ATPA が相互作用して雄性不稔性を引き起こすと考察された。なお、この Wen et al. (2003)の研究から花粉稔性において ATPA の機能が不要無いという可能性が示唆されており、花粉の機能を考察する際に興味深い見解であると思われた。一方、*Rf17* は homozygous になっても致死性を引き起こさない事から、少なくとも *rf1* のような分子機構では無いと考えられた。

以上を踏まえて現在までに見出されている CMS/*Rf* システムを Fig. 56 にまとめた。BT-CMS における *Rf1B-atp6-B-orf79* など多くのケースは(i)に分類され(Bentolilla et al. 2002, Koizuka et al. 2003, Kazama and Toriyama et al. 2003, Wang et al. 2006, Gillman et al. 2007, Kazama et al. 2008, 久保ら 2008)、*Rf* が MCAG に働きかける。トウモロコシ T-CMS における *Rf2/T-urf13* はケース(ii)に分類され、MCAG の効果に対して ALDH によって稔性へのバイパスをつくるものと考えられる(Cui et al. 1996, Liu et al. 2001)。Wen et al. (2003)が見出したトウモロコシの S-CMS に対する *rf1/orf355-orf77* もバイパスを作る *Rf* システムとして分類されるが、機能欠損によって引き起こされるため(iii)に分類する。本研究で見出された *Rf17/MCAG(CWORF308?)* システムは RMS の機能は不明であるため未知な部分が多いが、(iii)とは異なるため(iv)に分類した。

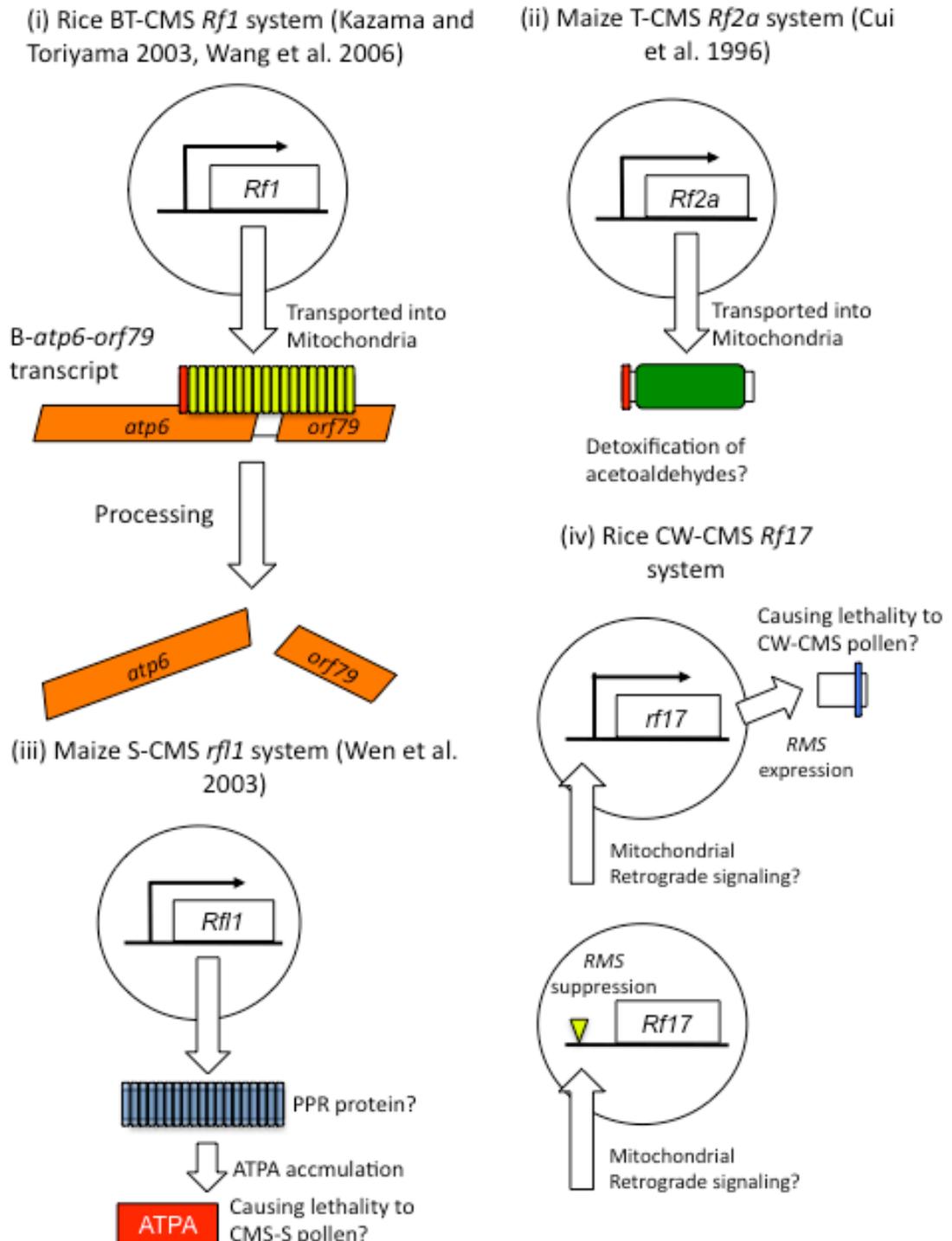


Fig. 56 Summary of CMS/*Rf* systems currently identified.

(i) Majority of CMS/*Rf* systems are categorized in this group, and BT-CMS/*Rf1* system is displayed as the representative.

(ii) Maize CMS-T/*Rf2* system.

(iii) Maize CMS-S/*rf1* system. The protein encoded by *rf1* is yet to be identified, although a review predict it to be a PPR protein (Chase 2007).

(iv) Since *Rf17Rf17* plants were not lethal, unlike maize *rf11/rf11* plants (Wen et al. 2003), *Rf17* function is presumed be unrelated to housekeeping mitochondrial functions. Although RMS function is undetermined, it is a noteworthy feature that RMS expression is dependent on cytoplasmic genotypes, which in this study presumed as mediated by a RTG-signaling.

総合考察

本研究では、CW-CMS の稔性回復メカニズム、雄性不稔性発現メカニズムの解析から、CW-CMS を説明する様々な因子を見出した。マイクロアレイ解析を起点とした逆遺伝学的解析で、CW-CMS の表現型に深く関連する DCW11 はミトコンドリア局在の PP2C であり、GTPase である DBA と結合する事が示された(第一章・第二節)。また、*OsNek3* は花粉発芽に関わる可能性が高いと考えられたが、CW-CMS バックグラウンド、DCW11 機能欠損下両方の条件で発現が減少していた(第一章・第三節)。CWORF308 は、疎水性の高いタンパク質であり、MCAG として最も有力であると考えられたが、今後転写後制御あるいは翻訳レベルでの解析によって証明する必要があると考えられた(第二章)。最後に、*Rf17* は *RMS* の発現が抑制されたアリルである事を見出した(第三章)。以上の結果を Fig. 57 にまとめた。

まず、CWORF308 が MCAG であると仮定すると、CWORF308 及び *RMS* が共にミトコンドリアに局在する場合、CW-CMS が生じると考えられた。CWORF308 は疎水性が強いため、今まで見出されてきた MCAG と同様(Hanson and Bentolila 2004)、ミトコンドリア内膜に結合するようなタンパク質ではないかと考察された。また、*RMS* は yeast 内で *OsKASII* と結合した。*RMS* はミトコンドリアに局在するため、プラスチド局在の *OsKASII* と生体内で結合する可能性は低いと考えられたが、ミトコンドリア局在の *OsKASII* ホモログと結合し脂肪酸代謝に関係する可能性は考えられた。実際、CW-CMS 系統において C18:1 脂肪酸が減少していたが、C18:1 は花粉発芽に重要な sphingolipid の前駆体となる事が知られている(Imamura et al. 2007)。*RMS* と CWORF308 が同時にミトコンドリアに局在することで生じる現象は未知であるが、花粉発芽能に負の影響を与えるものと考察された。

この際、詳細なメカニズムは不明であるが、DCW11 の機能阻害が生じ、この事によって生じた RTG シグナリングによって *AOX1a* が発現誘発される可能性が考えられた。また、*AOX1a* を誘発する経路との独立性は不明であるが、*OsNek3* もこの際発現が抑制されていた。*OsNek3* は *OsPLIM2b* と yeast 内で結合する事や mRNA の発現パターンから花粉管伸長に関わると考えられた。ただし、*OsNek3* が遺伝学的に花粉発芽に関わる可能性については検証できなかった。CW-CMS における RTG シグナリングでは *OsNek3* 以外の遺伝子も発現が抑制されていたため(第一章・第一節)、これらが花粉発芽能欠損の直接の原因となっている可能性も考えられた。なお、CW-CMS における *AOX1a* 誘発、*OsNek3* 抑制経路の存在を仮定しているが、通常条件下で *AOX1a* を抑制している因子があり、*OsNek3* 発現を促している因子が存在する可能性も考えられた。すなわち、花粉発芽が正常に行われるにはミトコンドリアからの正常なシグナル伝達が必要であるという可能性も考察された。

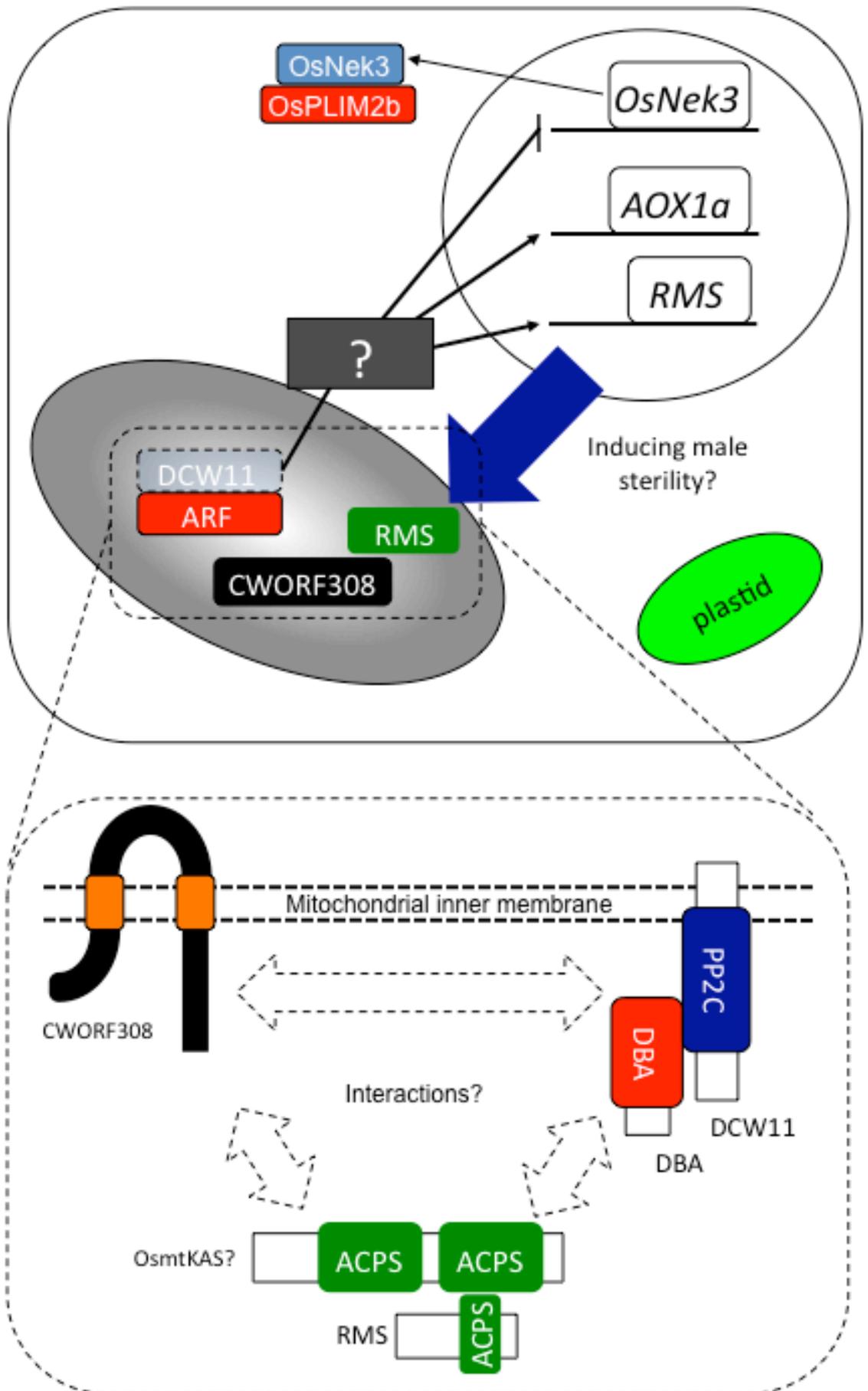


Fig. 57 Summary of CW-CMS/Rf17 system identified in this study.

今後、CW-CMS/*Rf17*メカニズムの全容を解明するにあたり、ミトコンドリア内におけるDCW11、DBA、RMS及びCWORF308の相互作用関係について探索する事が有効であると考えられた。さらに、*OsNek3*あるいは*AOX1a*の転写制御に関わる、ミトコンドリア-核間のシグナリング因子を同定する事で、CW-CMSの原因から結果までを連結する事ができると考えられた。

本研究においてCW-CMSを研究した際に見出された現象と、ミトコンドリア-核間の相互作用に見出される一般的な現象とを比較するには、まずミトコンドリアゲノムに生じうる変異及び核ゲノムとの関係について分類するべきである。ミトコンドリア-核間の関係は4つのクラスに分けられると考えられる。(i) Loss-of-function, (ii) Intergenic Compatibility, (iii) Intergenic Epistasis, (iv) Gain-of-functionの4つである。すなわち我々の現象への理解度の順番が(i)<(ii)<(iii)<(iv)であると考えられる。

(i) Loss-of-functionは最も単純な説明が可能なクラスであり、植物でもトウモロコシの*ncs* (Newton et al. 1990, Lauer et al. 1990, Marienfeld et al. 1994, Newton et al. 1996)やタバコのCMS変異体 (Chetrit et al. 1992)などが知られている。これらの系統はミトコンドリアの呼吸鎖複合体やリボソーム複合体のサブユニットが欠失しているため様々な生育異常を示し、しばしば雄性不稔性を示す。例外として、テンサイの野生集団の中に見られるG-CMSがあり、この系統ではCOX2サブユニットが欠失しているにも関わらず栄養成長に大きな異常は見られない(Ducos et al. 2001)。G-CMSは雄性不稔性のみが表現型として見られるため、栄養器官では核コードのAOX等によって機能が補われていると推測されている(Ducos et al. 2001)。また、高等動物でもミトコンドリアのLoss-of-functionは種々の異常を引き起こし、ヒトではパーキンソン病の原因はミトコンドリアの呼吸鎖複合体Iの機能低下にあると言われている(Corti et al. 2005)。また、マウスでミトコンドリアのDNA polymeraseのproof-reading subunitを欠失させた*Polga*変異体はミトコンドリアDNAへの変異の割合が上昇し、通常の個体よりはるかに高い割合でミトコンドリアの機能が失われる(Kujoth et al. 2005, Vermulst et al. 2007, Vermulst et al. 2008)。この変異マウスは短命であり、ミトコンドリアの正常な機能が生命維持に重要である事を示唆している。G-CMSの例外を除き、CMSは雄性器官に特異的な現象であるため、Loss-of-functionクラスであるとは考えづらい(Chase 2007, Fujii and Toriyama 2008)。生理学実験によって、トウモロコシの花粉や葯では呼吸活性が高いという知見が得られている(Lee and Warmke 1979)。従って、これらの雄性生殖器官での高いATP要求性がCMSの原因であるとする見解もある(Chase 2007)。しかし一方で、根なども高い呼吸活性を持つ事が知られており

(Balk and Leaver 2001)、植物種にもよると考えられるが、呼吸活性と組織特異性に関する知見は一定ではない。CMS の高い安定性を考えると単純に ATP の不足等、物量のみによる説明は不可能であると考えられる。

一方、(ii) Intergenomic Compatibility (IC)は生殖隔離機構の一種であるとも考えられており、最も研究が進んでいるのは *Tigriopus californicus* (ケンミジンコ)である。 *T. californicus* は北米大陸の沿岸に生息しており、集団間でミトコンドリアゲノムの配列が大きく異なる事が知られている(Elison and Burton 2008a)。集団間交雑によって F₂ 世代での雑種崩壊が起こる事が知られており(Elison and Burton 2008a, Elison and Burton 2008b)、この雑種崩壊はミトコンドリアコードの COX (Cytochrome c oxidase)と核コードの CYC (Cytochrome c)の不和合によって生じると考えられている(Rawson and Burton 2002)。例えば、集団 SD と SB はそれぞれ異なるアミノ酸配列の COX と CYC を持つが、COX に対して同じ集団の CYC を基質として与えた場合 *in vitro* での COX 活性が高い(Rawson and Burton 2002, Harrison and Burton 2006)。一方で違う集団に由来する CYC を COX に与えた場合活性は著しく低下し、これが F₂ における雑種崩壊の原因ではないかと考えられた。IC はすなわち核ゲノムとミトコンドリアゲノムの相性であり、通常核ゲノムの二遺伝子座によって仮定される Dobzhansky-Muller の雑種不稔不和合説(Dobzhansky 1936)が、ミトコンドリア-核間の相性にも当てはまる事が示された(Elison and Burton 2008a)。それでは CMS は IC クラスに当てはまるか？ IC クラスはミトコンドリアに既存の遺伝子にある neutral な変異が、集団間によってそれぞれの核ゲノムと適合している、と言い換える事ができる。従って MCAG のように CMS 特異的に出現した遺伝子に対して *Rf* を獲得した機構は IC とは別であると考えべきである。

Intergenomic Epistasis(IE)と IC は区別が難しいが、IC が核とミトコンドリアの相互依存関係であるのに対し、IE はどちらかの遺伝子型が形質を決定してしまうと定義づける事ができる。例えば *Drosophila melanogaster* では、*D. simulans* のミトコンドリアゲノムによって置換する事が個体の寿命に大きく影響するという現象が分かってきた(Rand 2005)。 *D. melanogaster* の Laboratory strain Crete10 に対し、 *D. simulans* strain 38 (sm38)の相互交配による F₁ 世代では sm38 を♀親にした個体の方が長寿であった(Rand et al. 2006)。しかし、sm21 について同様の実験を行った場合、Crete10 を♀親にした方が長寿であった。Crete を♀親にした場合はどちらの交配でも同程度の寿命を示したため、Crete ミトコンドリアが Epistatic であるという事が考えられた。核ゲノムが同じ F₁ でも細胞質親によって寿命が異なる事から、ミトコンドリアゲノムが寿命を規定しているという仮説、すなわち IE の存在が考えられた。この関係は、Fig. 55 における T65 と CW-CMS ミトコンドリア、そして *Rf17* 遺伝子座の関係になぞらえることができ、T65 ミトコンドリアゲノムが Epistatic と捉える事ができると先述した(第三章・

考察). *D. melanogaster* 内の交雑でも同様の現象が知られており、ミトコンドリアの遺伝情報が寿命に大きく寄与するといったことが考えられている(Maklakov et al. 2006). *Drosophila* の寿命における IE の分子機構は分かっていないが、RTG シグナリングの影響も無関係ではないと考えられており(Rand 2005)、ミトコンドリア遺伝子型が核遺伝子発現に与える影響が存在すると考えられる。残念ながら、緒言で述べたような yeast の RTG pathway や、*D. melanogaster* における p53 pathway と IE との関わりは未知であり、IE においてどのような現象が生じているかは現在までに知見が無い。

植物における IE 様の現象はいくつか報告されている。Allen (2005)は、*Z. mays* を核ゲノムドナーとして、祖先種である *Z. mays teosinte*、*Z. luxurians*、*Z. diploperennis* や *Z. perennis* を細胞質ドナーとして作成した細胞質置換系統の表現型解析を行った。Teosinte 以外の多くの細胞質置換系統において、生育遅延が見られた他、調査した 58 のうち 56 の形質にいずれかの系統で有意な差が認められた(Allen 2005)。多くの場合、plant height が低くなるなど弱勢の形質が多く現れる一方、分けつが増加するなど一般的には強勢と見なされる形質も現れた。この現象は、細胞質親を代えると生じない事から IE である事が予測される。植物ではその他にも組織培養能、耐病性、種子貯蔵デンプン量、収量や各種環境ストレス等の重要な形質が細胞質遺伝子型によって異なる、という報告がある(Allen 2005)。CMS はこれらの現象のうち、表現型が見出しやすい例であるという可能性も考察されている。原著論文においてこれらの現象は Cytoplasmic effect という表現が使われているが、IE と同様であると考えられる。高等植物種間におけるミトコンドリア遺伝子は非常に良く保存されている。それにもかかわらず、Allen (2005)が見出した現象や、CMS のような例が見られる事はハウスキーピング遺伝子以外の存在が大きいと考えられる。CMS における MCAG は分子機構として唯一見出されている可能性であり、MCAG が IE を引き起こしている事が考察された。本研究では、DCW11 と DBA の機能低下が *AOX1* の発現を増加させるという RTG シグナリングを見出した。DCW11、DBA そして MCAG の分子レベルでの関わりを見出す事で、CW-CMS における IE と RTG シグナリングの関わりを示す事ができると考えられた。

Gain-of-function クラスの変異が高等動物ミトコンドリアゲノムにおいて報告された例はない。Gain-of-function クラスの変異は、呼吸鎖複合体や翻訳に関わる遺伝子以外にも多くの ORF を持つ植物ミトコンドリアにのみ許された変異であると言えるかもしれない。実際、高等動物の集団内におけるミトコンドリア変異は neutral な変異がランダムに分布するのではなく、特定の変異に対する正の選抜圧がある事が予想されている(Bazin et al. 2006, Meiklejohn et al. 2007, Dowling et al. 2008)。従って高等動物のミトコンドリアにはそのゲノムサイズから予想さ

れるように遊びが無く、新たな変異が生じにくいとされている。MCAG のような新規の遺伝子はサブゲノムとマスタースタークルの行き来を含む複雑なゲノム再編成から生じると考えられるため(Kubo and Newton 2007)、高等植物ミトコンドリアのように重複領域がある事が条件であると考えられる。Gain-of-function の変異として唯一研究がなされている例が CMS であり、CMS は高等植物のミトコンドリアの進化を考えるにあたって貴重な現象であると言える。本来 WT の細胞質ゲノムにない ORF がミトコンドリア、あるいはミトコンドリア-核間の相互作用にどのような影響を与えるかは CMS の解析によって明らかにされると考えられる。残念な事に現在まで見出されている CMS ミトコンドリアゲノムは MCAG 領域以外のゲノム編成も通常のものとは大きく異なっており、MCAG のみの影響を調査する事は難しい。植物においてミトコンドリア形質転換技術が確立されれば、MCAG の機能を解析する事が可能であると考えられる。CMS の再現を目的として、核ゲノムに MCAG を導入した研究例は幾つか報告されている。既知のミトコンドリア移行シグナルに MCAG を融合し核ゲノムに導入する実験が様々な植物種で行われている (Wintz et al. 1995, Chaumont et al. 1995, He et al. 1996, Duroc et al. 2006, Wang et al. 2006, Kim et al. 2007, Yamamoto et al. 2008)。このうち 4 つの実験で不稔性が引き起こされ(He et al. 1996, Wang et al. 2006, Kim et al. 2007, Yamamoto et al. 2008)、3 つの実験では不稔性が引き起こされてなかった事が報告されている(Wintz et al. 1995, Chaumont et al. 1995, Duroc et al. 2006)。Wintz et al. (1995)はペチュニアに pcf を導入した場合にも雄性不稔性を引き起こせなかったため、CMS を再現するにはミトコンドリア内膜の正しい位置に MCAG 産物が挿入される必要があると考察した。従って CMS が雄性器官特異的な Gain-of-function 現象であるためには MCAG の雄性器官特異的な機能について注目する必要があると考えられる。近年の研究により、タペート層は発達後プログラム細胞死によって崩壊し、花粉外壁に脂質等を供給する事が知られている(Piffaneli and Murphy 1998, Balk and Leaver 2001, Kawanabe et al. 2006)。高等動物ではミトコンドリアがプログラム細胞死における鍵となっている事は広く知られているため(Cai et al. 1998)、CMS とタペート層の崩壊は密接に関連していると考えられている(Balk and Leaver 2001)。ヒマワリの PET-CMS ではタペート細胞の未熟な細胞死が花粉発達に影響を与える事が報告されており、ミトコンドリアと花粉不稔性の関係が明確にされている(Balk and Leaver 2001)。また、タペート特異的にミトコンドリア局在タンパク質遺伝子の発現を抑制する事で雄性不稔性が誘発される、という報告もある(Kitashiba et al. 1998, Yui et al. 2003)。従ってタペート層の正しいプログラム細胞死にはミトコンドリアの機能が必要であると考えられ、タペート層発達が異常な CMS の場合 MCAG がプログラム細胞死に影響を与えるという説明が可能である。ただし、本研究の CW-CMS ように花粉発達ステージで初めて異常

が見られる場合は上記の理由では説明できない。MCAGによる新規の機能が花粉特異的に異常を引き起こすという説明が最も合理的であると考えられる。

雄性不稔性発現と稔性回復システムは、トウモロコシを中心に複数の植物でモデルが確立されてきた(Schnable and Wise 1998)。しかし、植物ミトコンドリアにおけるRTGシグナリングの知見は皆無に近い。本研究では、雄性不稔性発現に関わるRTGシグナリング因子候補としてDCW11、DBAを見出した。さらに、*RMS*の発現抑制によって稔性回復を引き起こすという他種では知られていないユニークな稔性回復システムの可能性を見出した(Fig. 54)。*RMS*はRTGシグナリングによる制御を受けることから、本研究ではCW-CMSの雄性不稔性発現機構並びに稔性回復機構をRTGシグナリングによって連結する事ができた。今後CMSを解明して行くにあたり、CMSは雄性器官特異的なGain-of-function現象であるという事と、*RMS*の発現制御によって示されたようにIEとRTGシグナリングがCMSに関わっている事を意識しなければならない。現在植物においてIEの概念は広く認識されておらず、Cytoplasmic effectとして大別されている。本研究では、*RMS*の発現制御メカニズムが植物におけるIEのモデルとなりうる事が示された。

結語

ミトコンドリアゲノムが単純な高等動物では核-ミトコンドリアの不適合による弱勢や異常などは良く知られている(Ellison and Burton 2008b). そして両ゲノムのクロストークによる制御の存在は広く認知されている(Butow and Avadhani 2004). しかし、高等植物のミトコンドリアゲノム構成は極めて複雑であるため、高等動物で知られるようなクロストーク系は明らかにされて来なかった. そのような背景においてCMSはミトコンドリアと核との共存関係を探るにあたり、モデルとなっている現象である(Hanson and Bentolila 2004). 本研究では、CMSにおける核-ミトコンドリア間のクロストークに関わる因子の探索を目的とし、花粉に顕著な異常が見られないCW-CMSをモデルとして分子遺伝学的解析を行った.

第一章では、CW-CMS系統の花粉に顕著な異常が見られない事を利用して、マイクロアレイ解析によって細胞質遺伝子型に影響を受ける核遺伝子のスクリーニングを行った. このスクリーニングで見出した遺伝子の中で、*DCW11*について機能解析を行った. *DCW11*のノックダウンはCW-CMS様の表現型を引き起こし、*DCW11*の機能低下がCW-CMSにおけるRTGシグナリングのトリガーとなっているのではないかと考えられた. これは、CW-CMSにおいて発現が増加していた*AOX1a*遺伝子の発現について、CW-CMS系統で*DCW11*を過剰発現させると*AOX1a*の発現が抑制された事が裏付けとなっている. さらに、*OsNek3*は*DCW11*の機能低下時に発現が抑制されていた. 従って*DCW11*の機能低下は、*AOX1a*の発現を促し、*OsNek3*の発現を抑制する、というCW-CMSにおいて生じる現象を引き起こす事が確認された. *DCW11*はCMSの原因に近い因子である事が推測された.

第二章では、CW-CMSのミトコンドリアゲノムの塩基配列解析によって、CMSの原因因子(MCAG)を見出す事を目的とした. 既知の日本晴、93-11、PA64S等のミトコンドリアゲノムと比較して、CMS系統のミトコンドリアゲノムは大きくその構造が再編成されている事が示唆された. しかし、遺伝子領域の変異は解析したゲノムのうち日本晴のみがoutgroupとなり、CMS特有のゲノム再編成がある可能性が示唆された. シークエンス解析によってMCAGの候補として有力な*CWORF308*を見出した. *CWORF308*は疎水性の強いタンパク質であり、組換えが頻繁に見られる領域内に位置していると考えられた. *CWORF308*はCW-CMS細胞質にのみ存在している可能性が高くMCAGである可能性は高いと考えられた.

第三章では、稔性回復遺伝子 *Rf17* のポジショナルクローニングを行った。 *Rf17* は *RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY (RMS)* と命名した遺伝子のプロモーター領域内にある一塩基置換による発現抑制が原因となっている可能性が考えられた。 *RMS* の遺伝子発現は Intergenic Epistacy (IE) によって制御されていると考えられ、Normal 細胞質バックグラウンドでは発現しないのに対し、CW-CMS バックグラウンドで *rf17* アリルを持つ場合のみ発現が見られる事が明らかとなった。 *DCW11* の機能低下によっても *RMS* 発現が増加する事から、*RMS* は IE によって引き起こされる RTG シグナリングによって発現が促されている可能性が示唆された。

本研究で扱った遺伝子のデータベースにおける ID を Table S にまとめた。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導を頂きました東北大学大学院農学研究科環境適応生物工学分野、鳥山欽哉教授、佐藤茂助教授、吉岡俊人助手には多大なるご指導を頂きましたこと深く感謝を申し上げます。特に、鳥山欽哉教授には実験計画・操作、論文作成における指針など様々なご指導を頂き、本博士論文作成までお導きくださったことを深く感謝します。

また、東北大学大学院農学研究科植物遺伝育種分野、西尾剛教授、北柴大泰準教授、岸谷幸枝助教にも実験指針等におきまして大変お世話になったことを感謝します。また、同研究室の先輩方、同期生、および後輩方にも大変お世話になったことをこの場を借りて感謝致します。

農業生物資源研究所、矢野昌弘博士にはコシヒカリ/カサラス染色体置換系統を分譲いただきましたこと深く感謝を申し上げます。同研究所、江花薫子博士にはイネ栽培種コアコレクション 69 系統を分譲いただきましたこと深く御礼申し上げます。同研究所、宮尾安藝雄博士及び廣近洋彦博士には *Tos17* 系統を分譲いただきました事に感謝御礼を申し上げます。イネゲノムリソースセンター、長村吉晃博士および同施設テクニシャン本山立子氏にはマイクロアレイ解析についてご指導およびご助言を頂きましたこと深く感謝を申し上げます。

農業生物資源研究所、松本隆博士および農林水産先端技術研究所、片桐敏博士には BAC ライブラリー作成・シークエンスについて支援頂きましたことに深く感謝致します。

国立遺伝学研究所、倉田のり博士および藤田雅丈博士には未発表のマイクロアレイデータを利用させていただいた事を深く感謝致します。

三重大学生命科学支援センター、には加賀谷安章博士 GFP 及び 6×His 融合ベクター、島根大学、中川強博士には mRFP 融合ベクターを分譲頂きましたこと御礼を申し上げます。

本論文の構成は、東北大学大学院農学研究科環境適応生物工学分野の先輩方、奥崎文子博士と川辺隆大博士との連日のご指導・討論によってのみなし得た事を付け加えます。そして本論文の総合考察は、同分野の後輩を叱咤激励し、自らの教化を振り返る事でのみ可能であったと考えています。また植物生命科学科の同期生との議論の時間はかけがえの無いものでした。

精神の支えであり続けてくださった白戸陽子さん、及ばない私を支持し続けていただいた両親、俊平、三太郎、寺田智江さんには感謝し尽くせません。

本研究は日本学術振興会、特別研究員奨励費 DC1 (18・1532)の支援によって行われました。

引用文献

- Abdelnoor, R., V., Yule, R., Elo, A., Christensen, A., C., Meyer-Gauen, G. and Mackenzie, S., A. (2003) Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to *MutS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5968-5973.
- Abe, F., Saito, K., Miura, K. and Toriyama, K. (2002) A single nucleotide polymorphism in the alternative oxidase gene among rice varieties differing in low temperature tolerance. *FEBS Lett.* 527: 181-185.
- Akagi, H., Sakamoto, M., Shinjyo, C., Shimada, H. and Fujimura, T. (1994) A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Curr. Genet.* 25: 52-58.
- Akagi, H., Nakamura, A., Yokozeki-Misono, Y., Inagaki, A., Takahashi, H., Mori, K. and Fujimura, T. (2004) Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1449-1457.
- Allen J., O. (2005) Effect of teosinte cytoplasmic genomes on maize phenotype. *Genetics* 169: 863-880.
- Allen, J., O, Fauron, C., M., Minx, P., Roark, L., Oddiraju, S., Ning Lin, G., Meyer, L., Sun, H., Kim, K., Wang, C., Du, F., Xu, D., Gibson, M., Cifrese, J., Clifton, A., W. and Newton, K., J. (2007) Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize. *Genetics* 177: 1173-1192.
- Anderson, S., Bankier, A., T., Barrell, B., G., de Bruijn, M., H., Coulson, A., R., Drouin, J., Eperon, I., C., Nierlich, D., P., Roe, B., A., Sanger, F., Schreier, P., H., Smith, A., J., Staden, R. and Young, I., G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Andersson, S., G., Zomorodipour, A., Andersson, J., O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U., C., Podowski, R., M.,

- Näslund, A., K., Eriksson, A., S., Winkler, H., H. and Kurland, C., G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. 396: 133-140.
- Andrés, C., Lurin, C. and Small, I., D. (2007) The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiol. Plant*. 129: 14-22.
- Arnaud, D., Déjardin, A., Leplé, J., C., Lesage-Descauses, M., C. and Pilate, G. (2007) Genome-wide analysis of LIM gene family in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*. *DNA Res.* 14, 103-116.
- Autran, D., Huanca-Mamani, W. and Vielle-Calzada, J., P. (2005) Genomic imprinting in plants: the epigenetic version of an Oedipus complex. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 19-25.
- Balk, J. and Leaver, C., J. (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 13: 1803-1818.
- Bazin, E., Glémin, S. and Galtier, N. (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312: 570-572.
- Bentolilla, S., Alfonso, A., A. and Hanson, M., R. (2002) A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10887-10892.
- Berthomé, R., Thomasset, M., Maene, M., Bourgeois, N., Froger, N. and Budar, F. (2008) *pur4* mutations are lethal to the male, but not the female, gametophyte and affect sporophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147: 650-660.
- Biswas, G., Anandatheerthavarada, H., K., Zaidi, M. and Avadhani, N., G. (2003) Mitochondria to nucleus stress

signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkappaBbeta. *J. Cell Biol.* 161: 507-519.

Bögre, L., Okrész, L., Henriques, R. and Anthony, R., G. (2003) Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci.* 8: 424-431.

Bonhomme, S., Budar, F., Lancelin, D., Small, I., Defrance, M., C. and Pelletier, G. (1992) Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 235: 340-348.

Bosch., M. and Hepler., P., K. (2005) Pectin methylesterase and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* 17, 3219-3226.

Brown, G., G., Formanova, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Zhang, J., Cheung, W., Y. and Landry, B., S. (2003) The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.* 35: 262-272.

Butow, R., A. and Avadhani, N., G. (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell* 14: 1-15.

Cai, J., Yang, J. and Jones, D., P. (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 139-149.

Carlsson, J., Lagercrantz, U., Sundström, J., Teixeira, R., Wellmer, F., Meyerowitz, E., M. and Glimelius, K. (2007) Microarray analysis reveals altered expression of a large number of nuclear genes in developing cytoplasmic male sterile *Brassica napus* flowers. *Plant J.* 49: 452-462.

Carlsson, J., Leino, M., Sohlberg, J., Sundström, J.F. and Glimelius, K. (2008) Mitochondrial regulation of flower development. *Mitochondrion* 8: 74-86.

Chase, C., D. (2007) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends Plant Sci.* 23: 81-90.

Chaumont, F., Bernier, B., Buxant, R., Williams, M., E., Levings, C., S., III and Boutry, M. (1995) Targeting the maize T-urf13 product into tobacco mitochondria confers methomyl sensitivity to mitochondrial respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1167-1171.

Chetrit, P., Rios, R., De Paepe, R., Vitart, V., Gutierrez, S. and Vedel, F. (1992) Cytoplasmic male sterility is associated with large deletions in the mitochondrial DNA of two *Nicotiana sylvestris* protoclones. *Curr. Genet.* 21: 131-137.

Chritensen, C., A., Gorsich, A., W., Brown, R., H., Jones, L., G., Shaw, J., M. and Drews, G., N. (2002) Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2215-1132.

Clifton, S., W., Minx, P., Fauron, C., M., Gibson, M., Allen, J., O., Sun, H., Thompson, M., Barbazuk, W., B.,

Kanuganti, S., Tayloe, C., Meyer, L., Wilson, R., K. and Newton, K., J. (2004) Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol.* 136: 3486-3503.

Cloutier, M., Vigneault, F., Lachance, D. and Séguin, A. (2005) Characterization of a poplar NIMA-related kinase

PNek1 and its potential role in meristematic activity. *FEBS Lett.* 579, 4659-4665.

Corti, O., Hampe, C., Darios, F., Ibanez, P., Ruberg, M. and Brice, A. (2005) Parkinson's disease: from causes to mechanisms. *C. R. Biol.* 328: 131-142.

Cui, X., Wise, R., P. and Schnable, P., S. (1996) The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* 272: 1334-1336.

Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., Falentin, C., Giancola, S., Renard, M., Budar, F., Small, I., Caboche, M., Delourme, R. and Bendahmane, A. (2003) Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep.* 4: 588-594.

Dewey, R., E., Levings, C., S. III. and Timothy, D., H. (1986) Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* 44: 439-449.

Dewey, R., E., Timothy, D., H. and Levings, III., C., S. (1987) A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5374-5378.

Dewey, R., E., Siedow, J., N., Timothy, D., H. and Levings, III., C., S. (1988) A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin. *Science* 239: 293-295.

Dietrich, C., R., Han, G., Chen, M., Berg, R., H., Dunn, T., M. and Cahoon, E., B. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* *LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* 54: 2842-98.

Djajanegara, I., Finnegan, P., M., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J. and Day, D., A. (2002) Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Mol. Biol.* 50, 735-742.

Dobzhansky, T. (1936) Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila Pseudoobscura* hybrids. *Genetics.* 21: 113-135.

Dojcinovic, D., Krosting, J., Harris, A., J., Wagner, D., J. and Rhoads, D., M. (2005) Identification of a region of the *Arabidopsis AtAOX1a* promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant Mol. Biol.* 58, 159-175.

Dowling, D., K., Friberg, U. and Lindell, J. (2008) Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends Ecol. Evol.* 23: 546-554.

Ducos, E., Touzet, P. and Boutry, M. (2001) The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *Plant J.* 26: 171-180.

Durbarry, A., Vizir, I. and Twell, D. (2005) Male germ line development in *Arabidopsis. duo* pollen mutants reveal gametophytic regulators of generative cell cycle progression. *Plant Physiol.* 137: 297-307.

Duroc, Y., Gaillard, C., Hiard, S., Tinchant, C., Berthome, R., Pelletier, G. and Budar, F. (2006) Nuclear expression of a cytoplasmic male sterility gene modifies mitochondrial morphology in yeast and plant cells. *Plant Sci.* 170: 755-767.

Ellison, C., K. and Burton, R., S. (2008a) Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution.* 62: 631-638.

Ellison, C., K. and Burton, R., S. (2008b) Genotype-dependent variation of mitochondrial transcriptional profiles in interpopulation hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15831-15836.

Epstein, C., B., Waddle, J., A., Hale, W., IV., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T., L., Garner, H., R. and Butow, R., A. (2001) Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol. Biol. Cell* 12: 297-308.

Falcon de Longevialle, A., Meyer, E., H., Andrés, C., Taylor, N., L., Lurin, C., Millar, H. and Small, I. (2007) The pentatricopeptide repeat gene *OTP43* is required for *trans*-splicing of the mitochondrial *nad1* intron 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 3256-3265.

Francis, K., E., Lam, S., Y. and Copenhaver, G., P. (2006) Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiol.* 42, 1004-1013.

Fransson, S., Ruusala, A. and Aspenström, P. (2006) The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344: 500-510.

藤井壮太 (2004) CW型細胞質雄性不稔性における稔性回復遺伝子の連鎖解析 卒業論文 東北大学

藤井壮太 (2006) CW型細胞質雄性不稔イネにおける雄性不稔性と稔性回復における分子遺伝学的解析 修士論文 東北大学

Fujii, S. and Toriyama, K. (2005) Molecular mapping of the fertility restorer gene for ms-CW-type cytoplasmic male sterility of rice. *Theor. Appl. Genet.* 111: 696-701.

Fujii, S., Komatsu, S. and Toriyama, K. (2007) Retrograde regulation of nuclear gene expression in CW-CMS of rice. *Plant Mol. Biol.* 63: 405-417.

Fujii, S. and Toriyama, K. (2008) *DCW11*, down-regulated gene 11 in CW-type cytoplasmic male sterile rice, encoding mitochondrial protein phosphatase 2c is related to cytoplasmic male sterility. *Plant Cell Physiol.* 49: 633-640.

Fujii, S. and Toriyama, K. (2008) Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility. *Plant Cell Physiol.* 49: 1484-1494.

Fujii, S., Kazama, T. and Toriyama, K. (2008) Molecular studies on cytoplasmic male sterility-related genes and restorer genes in rice. In *Rice Biology in Genomics Era*. Edited by Hirano, H. Y. et al. (eds.) pp. 205-216. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Fuller, D., Q. and Sato, Y. (2008) Japonica rice carried to, not from, Southeast Asia. *Nat. Genet.* 40: 1264-1265.

Geddy, R., Mahe, L. and Brown, G., G. (2004) Cell-specific regulation of a *Brassica napus* CMS-associated gene by a nuclear restorer with related effects on a floral homeotic gene promoter. *Plant J.* 41: 333-345.

Gillman, J., D., Bentolila, S. and Hanson, M., R. (2007) The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. *Plant J.* 49: 217-227.

Golvkin, M. and Reddy, A., S. (2003) A calmodulin-binding protein from *Arabidopsis* has an essential role in pollen germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10588-10563.

Gutierrez, S., Sabar, M., Lelandais, C., Chetrit, P., Diolez, P., Degand, H., Boutry, M., Vedel, F., de Kouchkovsky, Y. and De Paepe, R. (1997) Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3436-3441.

Hack, E., Lin, C., Yang, H. and Homer, H. (1991) T-URF 13 protein from mitochondria of Texas male-sterile maize (*Zea mays* L.) : Its purification and submitochondrial localization, and immunogold labeling in anther tapetum during microsporogenesis. *Plant Physiol.* 95: 861-870.

Hakozaki, H., Park, J., I., Endo, M., Takada, Y., Kazama, T., Takeda, Y., Suzuki, G., Kawagishi-Kobayashi, M. and Watanabe, M. (2008) Expression and developmental function of the 3-ketoacyl-ACP synthase2 gene in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.* 83: 143-152.

Hama, E., Takumi, S., Ogihara, Y. and Murai, K. (2004) Pistillody is caused by alterations to the class-B MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats. *Planta* 218: 712-720.

Handa, H. (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 31: 5907-5916.

Hanson, M., R. and Bentolila, S. (2004) Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16: S1109-1120.

Harrison, J., S. and Burton, R., S. (2006) Tracing hybrid incompatibilities to single amino acid substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 23: 559-564.

He, S., Lyznik, A. and Mackenzie, S. (1995) Pollen fertility restoration by nuclear gene *Fr* in CMS bean: nuclear-directed alteration of a mitochondrial population. *Genetics* 139: 955-962.

He, S., Abad, A., R., Gelvin, S., B. and Mackenzie, S., A. (1996) A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11763-11768.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. and Shivanna, K., R. (1984) The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Genet.* 67: 367-375

Hedtke, B., Börner, T. and Weihe, A. (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277: 809-811.

Ho, H.M., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle-Watts, D., Van Aken, O. and Whelan, J.

(2008) Identification of Regulatory Pathways Controlling Gene Expression of Stress-Responsive Mitochondrial

Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 1858-1873.

Hochholdinger, F., Guo, L. and Schnable, P., S. (2004) Cytoplasmic regulation of the accumulation of nuclear-encoded proteins in the mitochondrial proteome of maize. *Plant J.* 37: 199-208.

Hong, Z., Ueguchi-Tanaka, M., Shimizu-Sato, S., Inukai, Y., Fujioka, S., Shimada, Y., Takatsuto, S., Agetsuma, M.,

Yoshida, S., Watanabe, Y., Uozu, S., Kitano, H., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2002) Loss-of-function of a rice

brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells

in the leaves and stem. *Plant J.* 32, 495-508.

Honys, D. and Twell, D. (2003) Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiol.* 132: 640-652.

Huang, C., F., Chen, C., C., Tung, L., Buu, L., M. and Lee, F., J. (2002) The yeast ADP-ribosylation factor GAP, Gcs1p, is involved in maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* 115: 275-282.

Imamura, T., Kusano, H., Kajigaya, Y., Ichikawa, M. and Shimada, H. (2007) A rice dihydrosphingosine C4

hydroxylase (DSH1) gene, which is abundantly expressed in the stigmas, vascular cells and apical meristem, may

be involved in fertility. *Plant Cell Physiol.* 48: 1108-1120.

石嶺行男・新城長有 (1978) 稲の二雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子の日本水稻奨励品種における分布. 琉

球大学農学部学術報告 第25号: 665-672

Iwabashi, E., Kazama, T., Toriyama K. (2008) Characterization of cytoplasmic male sterility of rice with Lead Rice cytoplasm in comparison with that with Chinsurah Boro II cytoplasm. *Plant Cell Reports* (in press)

Iwabuchi, M., Kyojuka, N. and Shimamoto, K. (1993) Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J.* 12: 1437-1446.

Janska, H., Sarria, R., Woloszynska, M., Arrieta-Montiel, M. and Mackenzie, S., A. (1998) Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell.* 10: 1163-1180.

Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J. and Butow, R., A. (1997) A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1110-1117.

Johnson, M., A., von Besser, K., Zhou, Q., Smith, E., Aux, G., Patton, D., Levin, J., Z. and Preuss, D. (2004) *Arabidopsis* hapless mutations define essential gametophytic functions. *Genetics* 168: 971-982.

Joshi, M., Jeoung, N., H., Popov, K., M. and Harris, R., A. (2007) Identification of a novel PP2C-type mitochondrial phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356: 38-44.

Juszczuk, I., M., Bykova, N., V. and Moller, I., M. (2007) Protein phosphorylation in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 129, 90-103.

Kahn, R., A. and Gilman, A., G. (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J. Biol. Chem.* 261: 7906-7911.

Karpova, O., V., Kuzmin, E., V., Elthon, T., E. and Newton, K., J. (2002) Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants. *Plant Cell*. 14, 3271-3284.

Katsuo, K. and Mizushima, U. (1958) Studies on the cytoplasmic difference among rice varieties, *Oryza sativa* L. 1. On the fertility of hybrids obtained reciprocally between cultivated and wild varieties. *Japan J. Breed.* 8: 1-5

Kawanabe, T., Ariizumi, T., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. and Toriyama, K. (2006) Abolition of the tapetum suicide program ruins microsporogenesis. *Plant Cell Physiol.* 47: 784-787.

Kazama, T. and Toriyama, K. (2003) A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett.* 544: 99-102.

Kazama, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Sugita, M. and Toriyama, K. (2008) Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant J.* 55: 619-628.

Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D., W., Barsam, B., Veretnik, S. and Gribskov, M. (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant J.* 46: 400-413.

Kim, D., H., Kang, J., G. and Kim, B., D. (2007) Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated *orf456* gene of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Mol. Biol.* 63:519-532.

Kim, H., J., Oh, S., A., Brownfield, L., Hong, S., H., Ryu, H., Hwang, I., Twell, D. and Nam, H., G. (2008) Control of plant germline proliferation by SCF (FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* 455: 1134-1137.

Kitashiba, H., Kitazawa, E., Kishitani, S. and Toriyama, K. (1998) Partial male sterility in transgenic tobacco carrying an antisense gene for alternative oxidase under the control of a tapetum-specific promoter. *Mol. Breed.* 5: 209-218.

Klein, R., R., Klein, P., E., Mullet, J., E., Minx, P., Rooney, W., L. and Schertz, K., F. (2005) Fertility restorer locus *Rf1* [corrected] of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theor. Appl. Genet.* 111: 994-1012.

Kobayashi, K., Suzuki, M., Tang, J., Nagata, N., Ohyama, K., Seki, H., Kiuchi, R., Kaneko, Y., Nakazawa, M., Matsui, M., Matsumoto, S., Yoshida, S. and Muranaka, T. (2007) Lovastatin insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 48: 322-331.

Koike, S. and Satake, T. (1987) Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants. *Japan Jour. Crop Sci.* 56: 666-672.

Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, R., Hayakawa, H., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., Sakai, T. and Imamura, J. (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J.* 34: 407-415.

Komori, T., Ohta, S., Murai, N., Takakura, Y., Kuraya, Y., Suzuki, S., Hiei, Y., Imaseki, H. and Nitta, N. (2004) Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J.* 37: 315-325.

Konishi, S., Izawa, T., Lin, S., Y., Eban, K., Fukuta, Y., Sasaki, T. and Yano, M. (2006) An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science* 312: 1392-1396.

Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. and Chory, J. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316: 715-719.

Kotera, E., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2004) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433: 326-330.

久保友彦・松平洋明・北崎一義・亀井陽子・三上哲夫(2008)ユニークな遺伝子を採用したテンサイ稔性回復メカニズム. 日本育種学会誌 10(別2): 30.

Kubo, T. and Mikami, T. (2007) Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome. *Physiol. Plant.* 129: 6-13

Kubo, T. and Newton, K., J. (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* 8: 5-14.

Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A. and Mikami, T. (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res.* 28: 2571-2576.

Kujoth, G., C., Hiona, A., Pugh, T., D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S., E., Hofer, T., Seo, A., Y., Sullivan, R., Jobling, W., A., Morrow, J., D., Van Remmen, H., Sedivy, J., M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C. and Prolla, T., A. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-484.

Kuzmin, E., V., Duvick, D., N. and Newton, K., J. (2005) A mitochondrial mutator system in maize. *Plant Physiol.* 137: 779-789.

Larkin, R.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Chory, J. (2003) GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* 299: 902-906.

- Lauer, M., Knudsen, C., Newton, K., J., Gabay-Laughnan, S. and Laughnan, J., R. (1990) A partially deleted mitochondrial cytochrome oxidase gene in the *NCS6* abnormal growth mutant of maize. *New Biol.* 2: 179-186.
- Lee, S., J. and Warmke, H., E. (1979) Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. *Am. J. Bot.* 66: 141-148.
- Lelanne, E., Honys, D., Johnson, A., Borner, G. H., Lilley, K. S., Dupree, P., Grossniklaus, U. and Twell, D. (2004) SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 229-240.
- Leon, G., Holuigue, L. and Jordana, X. (2007) Mitochondrial complex II is essential for gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 1534-1546.
- Levings, C., S and Pring, D., R. (1976) Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize. *Science* 193: 158-160.
- Liao, X. and Butow, R., A. (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72: 61-71.
- Ling, D., H. (1991) in *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 14 ed. Rice, Bajaj, Y.P.S., pp 347-367, Springer-Verlag. Berlin.
- Linke, B., Nothnagel, T. and Borner, T. (2003) Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of MADS box genes homologous to GLOBOSA and DEFICIENS. *Plant J.* 34: 27-37.
- Liu, F., Cui, X., Horner, H., T., Weiner, H. and Schnable, P., S. (2001) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase

activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* 13: 1063-1078.

Liu, Z., Sekito, T., Spirek, M., Thornton, J. and Butow, R.A. (2003) Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol. Cell* 12: 401-411.

Lovy-Wheeler, A., Cárdenas, L., Kunkel, J., G. and Hepler, P., K. (2007) Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 64:217-232.

Lu, G., Ren, S., Korge, P., Choi, J., Dong, Y., Weiss, J., Koehler, C., Chen, J., N. and Wang, Y. (2007) A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates the mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development. *Genes Dev*. 21: 784-796.

Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecham, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L. and Small, I.D. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103.

Maklakov, A., A., Friberg, U., Dowling, D., K. and Arnqvist, G. (2006) Within-population variation in cytoplasmic genes affects female life span and aging in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 60: 2081-2086.

Mandal, S., Guptan, P., Owusu-Ansah, E. and Banerjee, U. (2005) Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the *tenured* mutation in *Drosophila*. *Dev. Cell* 9: 843-854.

Marienfeld, J., R. and Newton, K., J. (1994) The maize *NCS2* abnormal growth mutant has a chimeric *nad4-nad7* mitochondrial gene and is associated with reduced complex I function.

Genetics. 138: 855-863.

Mascarenhas, J., P. (1993) Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 5: 1303-1314.

Matsuhira, H., Shinada, H., Yui-Kurino, R., Hamano, N., Umeda, M., Mikami, T. and Kubo, T. (2007) An anther-specific lipid transfer protein gene in sugar beet: its expression is strongly reduced in male-sterile plants with Owen cytoplasm. *Physiol. Plant.* 129: 407-414.

Meiklejohn, C., D., Montooth, K., L. and Rand, D., M. (2007) Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends Genet.* 23: 259-263.

Merchant, S., S., Prochnik, S., E., Vallon, O., Harris, E., H., Karpowicz, S.J., Witman, G., B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L., K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W., F., Qu, L., H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A., A., Spalding, M., H., Kapitonov, V., V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V., Croft, M., T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P., A., Lemaire, S., D., Lobanov, A., V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J., V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A., M., Niyogi, K., Novoselov, S., V., Paulsen, I., T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J., P., Riaño-Pachón, D., M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S., L., Almer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C., J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M., R., Ledford, H., Long, J., C., Minagawa, J., Page, M., D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A., M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C., L., Gladyshev, V., N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R., T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y., W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W., C., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I., V., Rokhsar, D., S. and Grossman, A., R. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-50.

Meskiene, I., Baudouin, E., Schweighofer, A., Liwosz, A., Jonak, C., Rodriguez, P., L., Jelinek, H. and Hirt, H. (2003) Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 278: 18945-18952.

Millar, R., J. and Koeppel, D., E (1971) Southern corn leaf blight: Susceptible and resistant mitochondria. *Science* 174: 67-69.

Millar, A., H., Whelan, J. and Small, I. (2006) Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Curr Opin Plant Biol.* 9: 610-615.

Minai, L., Wostrikoff, K., Wollman, F., A. and Choquet, Y. (2006) Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a series of assembly-controlled steps that regulate translation. *Plant Cell* 18: 159-175.

Moche, M., Dehesh, K., Edwards, P. and Lindqvist, Y. (2001) The crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Synechocystis* sp. at 1.54 Å resolution and its relationship to other condensing enzymes. *J. Mol. Biol.* 305: 491-503.

Mochizuki, N., Brusslan, J., A., Larkin, R., Nagatani, A. and Chory, J. (2001) *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2053-2058.

Morrow, G. and Tanguay, R., M. (2008) Mitochondria and ageing in *Drosophila*. *Biotechnol. J.* 3: 728-739.

Murai, K., Takumi, S., Koga, H. and Ogihara, Y. (2002) Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *Plant J.* 29: 169-181.

Murray, M., G. and Thompson, W., F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.

Nakagawa, N. and Sakurai, N. (2006) A mutation in *At-nMat1a*, which encodes a nuclear gene having high similarity to group II intron maturase, causes impaired splicing of mitochondrial *NAD4* transcript and altered carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 772-883.

Nakagawa, T., Nakamura, S., Tanaka, K., Kawamukai, M., Suzuki, T., Nakamura, K., Kimura, T. and Ishiguro, S. (2008) Development of R4 gateway binary vectors (R4pGWB) enabling high-throughput promoter swapping for plant research. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 624-629.

Nakamura, T., Meirhoff, K., Westhoff, P. and Schuster, G. (2003) RNA-binding properties of HCF152, an *Arabidopsis* PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur. J. Biochem.* 270: 4070-4081.

Newton, K., J., Knudsen, C., Gabay-Laughnan, S. and Laughnan, J., R. (1990) An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell* 2: 107-113.

Newton, K., J., Mariano, J., M., Gibson, C., M., Kuzmin, E. and Gabay-Laughnan, S. (1996) Involvement of S2 episomal sequences in the generation of *NCS4* deletion mutation in maize mitochondria. *Dev. Genet.* 19: 277-286.

Nishida, I. (2004) in *Molecular Biology and Biotechnology of plant organelles*, eds Daniell H, Chase C (Springer, The Netherlands) pp 543-564.

Nishizawa S, Mikami T, Kubo T. (2007) Mitochondrial DNA phylogeny of cultivated and wild beets: relationships among cytoplasmic male-sterility-inducing and nonsterilizing cytoplasms. *Genetics.* 177: 1703-1712.

Nivison, H., T., Sutton, C., A., Wilson, R., K. and Hanson, M., R. (1994) Sequencing, processing, and localization of the petunia CMS-associated mitochondrial protein. *Plant J.* 5: 613-623.

Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A. and Kadowaki, K. (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet Genomics* 268: 434-445.

Oelmüller, R. and Mohr, H. (1986) Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* 106-113.

Ogihara, Y., Yamazaki, Y., Murai, K., Kanno, A., Terachi, T., Shiina, T., Miyashita, N., Nasuda, S., Nakamura, C., Mori, N., Takumi, S., Murata, M., Futo, S. and Tsunewaki, K. (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 33: 6235-6250.

Okuda, K., Nakamura, T., Sugita, M., Shimizu, T. and Shikanai, T. (2006) A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J. Biol. Chem.* 281: 37661-37667.

Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K. and Shikanai, T. (2007) Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8178-8183.

Oldenburg, D., J. and Bendich, A., J. (1996) Size and structure of replicating mitochondrial DNA in cultured tobacco cells. *Plant Cell* 8: 447-461.

Osmani, S., A. and Ye, X., S. (1996) Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *Biochem. J.* 317, 633-641.

O'Toole, N., Hattori, M., Andrés, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M. and Small, I., D. (2008) On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1120-1128.

Ohtsubo, Y., Ikeda-Ohtsubo, W., Nagata, Y. and Tsuda, M. (2008) GenomeMatcher: A graphical user interface for DNA sequence comparison. *BMC Bioinform.* 9: 376.

Owusu-Ansah, E., Yavari, A., Mandal, S. and Banerjee, U. (2008) Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat. Genet.* 40: 356-361.

Parikh, V., S., Morgan, M., M., Scott, R., Clements, L. and Butow, R., A. (1987) The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* 235: 576-580.

Pidkowich, M., S., Nguyen, H., T., Heilmann, I., Ischebeck, T. and Shanklin, J. (2007) Modulating seed beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II level converts the composition of a temperate seed oil to that of a palm-like tropical oil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 4742-4747.

Piffanelli, P. and Murphy, D.J. (1998) Novel organelles and targeting mechanisms in the anther tapetum. *Trends Plant Sci.* 3: 250-253.

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

Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N. and Lifschitz, E. (2001) Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* 13: 2687-2702.

Pogson, B., J., Woo, N., S., Förster, B. and Small, I., D. (2008) Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci.* 13: 602-609.

Portereiko, M., F., Sandaklie-Nikolova, L., Lloyd, A., Dever, C., A., Otsuga, D. and Drews, G., N. (2006) *NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1* encodes the *Arabidopsis* RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. *Plant Physiol.* 141: 957-965.

Prasad, A., M., Sivanandan, C., Resminath, R., Thakare, D., R., Bhat, S., R. and Srinivasan. (2005) Cloning and characterization of a pentatricopeptide protein encoding gene (*Lou*) that is specifically expressed in lateral organ junctions in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 353: 67-79.

Preuss, D., Rhee, S., Y. and Davis, R., W. (1994) Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the *QUARTET (QRT)* genes. *Science* 264: 1458-1460.

Rand, D., M. (2005) Mitochondrial genetics of aging: intergenomic conflict resolution. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 45: re5.

Rand, D.M., Fry, A. and Sheldahl, L. (2006) Nuclear-mitochondrial epistasis and drosophila aging: introgression of *Drosophila simulans* mtDNA modifies longevity in *D. melanogaster* nuclear backgrounds. *Genetics* 172: 329-341.

Rawson, P., D. and Burton, R., S. (2002) Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12955-12958.

- Rhoades, M., M. (1931) Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea Mays*. *Science* 73: 340-341.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1993) Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262: 744-747.
- Rottman, W., H, Brears, T., Hodge, T., P. and Lonsdale, D. (1987) A mitochondrial gene is lost via homologous recombination during reversion of CMS T maize to fertility. *EMBO J.* 6: 1541-1546.
- Sabar, M., De Paepe, R. and de Kouchkovsky, Y. (2000) Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol.* 124: 1239-1249.
- Sakai, T., Honing, H., Nishioka, M., Uehara, Y., Takahashi, M., Fujisawa, N., Saji, K., Seki, M., Shinozaki, K., Jones, M.A., Smirnov, N., Okada, K. and Wasteneys, G., O. (2008) Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 53: 157-171.
- Sakamoto, T., Morinaka, Y., Ohnishi, T., Sunohara, H., Fujioka, S., Ueguchi-Tanaka, M., Mizutani, M., Sakata, K., Takatsuto, S., Yoshida, S., Tanaka, H., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2006) Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat. Biotechnol.* 24: 105-109.
- Sandhu, A., P., Abdelnoor, R., V. and Mackenzie, S., A. (2007) Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1766-1770.
- Saraike, T., Shitsukawa, N., Yamamoto, Y., Hagita, H., Iwasaki, Y., Takumi, S. and Murai, K. (2007) Identification of a

protein kinase gene associated with pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, in alloplasmic wheat. *Planta* 227: 211-221.

Sarria, R., Lyznik, A., Vallejos, C., E. and Mackenzie S., A. (1998) A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. *Plant Cell* 10: 1217-1228.

笹原健夫・勝尾清(1965)稲の細胞質差異に関する研究. 育種学雑誌 15: 43-48

Sato, Y., Okamoto, S. and Nishio, T. (2004) Diversification and alteration of recognition specificity of the pollen ligand SP11/SCR in self-incompatibility of *Brassica* and *Raphanus*. *Plant Cell* 16: 3230-3241.

Sato, M., Kubo, T., Nishizawa, S., Estiati, A., Ichoda, N. and Mikami, T. (2004) 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. Gen. Genome*. 272: 247-256.

Schmitz-Linneweber, C. and Small, I. (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* 12: 663-70.

Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. and Barkan, A. (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17: 2791-2804.

Schnable, P., S. and Wise, R., P. (1994) Recovery of heritable, transposon-induced, mutant alleles of the *rf2* nuclear restorer of T-cytoplasm maize. *Genetics* 136: 1171-1185.

Schnable, P., S. and Wise, R., P. (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Trends Plant Sci.* 3: 175-180.

Schweighofer, A., Hirt, H. and Meskiene, I. (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236-243.

Sekito, T., Thornton, J. and Butow, R., A. (2000) Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol. Biol. Cell* 11: 2103-2115.

Sekito, T., Liu, Z., Thornton, J. and Butow, R., A. (2002) RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Mol. Biol. Cell* 13: 795-804.

Shinjyo, C. (1984) Cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice having genome A. In *Biology of rice*, S. Tsunoda and N. Takahashi (eds.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Elsvier, Amsterdam, pp. 321-338.

Small, I., D. and Peeters, N. (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25: 46-47.

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

Song, R. and Messing, J. (2003) Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9055-9060.

Sugiyama, Y., Watase, Y., Nagase, M., Makita, N., Yagura, S., Hirai, A. and Sugiura, M. (2005) The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol. Genet. Genomics* 272: 603-615.

Susek, R., E., Ausubel, F., M. and Chory, J. (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear

CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74: 787-799.

Swanson-Wagner, R., A., Jia, Y., DeCook, R., Borsuk, L., A., Nettleton, D. and Schnable, P., S. (2006) All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F₁ hybrid and its inbred parents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6805-6810.

Takezawa, D. (2003) Characterization of a novel plant PP2C-like protein Ser/Thr phosphatase as a calmodulin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 278: 38076-38083.

Tanaka, N., Fujita, M., Handa, H., Murayama, S., Uemura, M., Kawamura, Y., Mitsui, T., Mikami, S., Tozawa, Y., Yoshinaga, T. and Komatsu, S. (2004) Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments. *Mol. Gen. Genomics* 271: 566-576.

Teixeira, R.T., Farbos, I. and Glimelius, K. (2005) Expression levels of meristem identity and homeotic genes are modified by nuclear-mitochondrial interactions in alloplasmic male-sterile lines of *Brassica napus*. *Plant J.* 42: 731-42.

Teng, C., Dong, H., Shi, L., Deng, Y., Mu, J., Zhang, J., Yang, X. and Zuo, J. (2008) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146: 1322-1332.

Tian, X., Zheng, J., Hu, S. and Yu, J. (2006) The rice mitochondrial genomes and their variations. *Plant Physiol.* 140: 401-410.

Toriyama, K. and Hinata, K. (1987) Anther culture application to breeding of a restorer for male-sterile cytoplasm of wild rice [*ms-CW*]. *Japan. J. Breed.* 37: 469-473.

Traven, A., Wong, J., M., S., Xu, D., Sopta, M. and Ingles, C., J. (2001) Interorganellar communication. *Altered*

nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial *dna* mutant. *J. Biol. Chem.* 276: 4020-4027.

Unsold, M., Marienfeld, J., R., Brandt, P. and Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15: 57-61.

Uyttewaal, M., Mireau, H., Rurek, M., Hammani, K., Arnal, N., Quadrado, M. and Giegé, P. (2008) PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J. Mol. Biol.* 2008 375: 626-636.

Vanlerberghe, G., C. and McIntosh, L. (1996) Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 111: 589-595.

Vermulst, M., Bielas, J., H., Kujoth, G., C., Ladiges, W., C., Rabinovitch, P., S., Prolla, T., A. and Loeb, L., A. (2007) Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nat. Genet.* 39: 540-543.

Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G., C., Bielas, J., H., Rabinovitch, P., S., Prolla, T., A. and Loeb, L., A. (2008) DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat. Genet.* 40: 392-394.

Vernoud, V., Horton, A., C., Yang, Z. and Nielsen, E. (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 1191-1208.

Vidal, G., Ribas-Carbo, M., Garmier, M., Dubertret, G., Rasmusson, A., G., Mathieu, C., Foyer, C., H. and De Paepe, R. (2007) Lack of respiratory chain complex I impairs alternative oxidase engagement and modulates redox signaling during elicitor-induced cell death in tobacco. *Plant Cell* 19: 640-655.

Vigneault, F., Lachance, D., Cloutier, M., Pelletier, G., Levasseur, C. and Séguin, A. (2007) Members of the plant NIMA-related kinases are involved in organ development and vascularization in poplar, *Arabidopsis* and rice. *Plant J.* 51, 575-588.

Wang, H., I., Wan, A., R. and Jauh, G., Y. (2008) An actin-binding protein, LILIM1, mediates calcium and hydrogen regulation of actin dynamics in pollen tubes. *Plant Physiol.* 147, 1619-1636.

Wang, Z., Zou, Y., Li, X., Zhang, Q., Chen, L., Wu, H., Su, D., Chen, Y., Guo, J., Luo, D., Long, Y., Zhong, Y. and Liu, Y., G. (2006) 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* 18: 676-687.

Warmke, H., E and Lee, S., L., J. (1977) Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. *J. Hered.* 68: 213-222.

Wen, L., Ruesch, K., L., Ortega, V., M., Kamps, T., L., Gabay-Laughnan, S. and Chase, C., D. (2003) A nuclear restorer-of-fertility mutation disrupts accumulation of mitochondrial ATP synthase subunit alpha in developing pollen of S male-sterile maize. *Genetics* 165: 771-779.

Wintz, H., Chen, H., C., Sutton, C., A., Conley, C., A., Cobb, A., Ruth, D. and Hanson, M., R. (1995) Expression of the CMS-associated *urfS* sequence in transgenic petunia and tobacco. *Plant Mol. Biol.* 28: 83-92.

Wise, R., P., Fliss, A., E., Pring, D., R and Gengenbach, B., G. (1987) *urf13-T* of T cytoplasm maize mitochondria encodes a 13 kD polypeptide. *Plant Mol. Biol.* 9: 121-126.

Wise, R., P., Dill, C., L. and Schnable, P., S. (1996) Mutator-induced mutations of the *rf1* nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of *T-urf13* mitochondrial transcripts. *Genetics* 143: 1383-1394.

Woodson, J., D. and Chory, J. (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* 9: 383-395.

Wostrikoff, K., Girard-Bascou, J., Wollman, F., A. and Choquet, Y. (2004) Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* 23: 2696-2705.

Wostrikoff, K. and Stern, D. (2007) Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007 104: 6466-6471.

山田茉莉 (2008) イネ5種細胞質雄性不稔性の比較解析 卒業論文 東北大学

Yamada, M., Fujii, S. and Toriyama, K. (2008) Comparison of mitochondrial genome structure and pollen morphology among five types of cytoplasmic male sterility. The 6th International Symposium of Rice Functional Genomics. Abstract P. 178

Yamagata, Y., Doi, K., Yasui, H. and Yoshimura, A. (2007) Identification of mutants for abnormal pollen development in rice. *Breed. Sci.* 57, 331-336.

Yamamoto, M., P, Kubo, T. and Mikami, T. (2005) The 5'-leader sequence of sugar beet mitochondrial *atp6* encodes a novel polypeptide that is characteristic of Owen cytoplasmic male sterility. *Mol. Gen. Genom.* 273: 342-349.

Yamamoto, M., P, Shinada, H., Onodera, Y., Komaki, C., Mikami, T. and Kubo, T. (2008) A male sterility-associated mitochondrial protein in wild beets causes pollen disruption in transgenic plants. *Plant J.* 54: 1027-1036.

Yamaoka, S. and Leaver, C., J. (2008) EMB2473/MIRO1, an *Arabidopsis* Miro GTPase, is required for

embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen. *Plant Cell* 20: 589-601.

Yokoi, S., Tsuchiya, T., Toriyama, K. and Hinata, K. (1997) Tapetum-specific expression of the *Osg6B* promoter- β -glucuronidase gene in transgenic rice. *Plant Cell Rep.* 16: 363-367.

Young, E., G. and Hanson, M., R. (1987) A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50: 41-49.

Yui, R., Iketani, S., Mikami, T. and Kubo, T. (2003) Antisense inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1 α subunit in anther tapetum causes male sterility. *Plant J.* 34: 57-66.

Zaegel, V., Guermann, B., Le Ret, M., Andrés, C., Meyer, D., Erhardt, M., Canaday, J., Gualberto, J., M. and Imbault, P. (2006) The plant-specific ssDNA binding protein OSB1 is involved in the stoichiometric transmission of mitochondrial DNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3548-3563.

Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R., L., Fox, T., D., Tzagoloff, A. and Barrientos, A. (2007) Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 18: 523-535.

Zarkovic, J., Anderson, S., L. and Rhoads, D., M. (2005) A reporter gene system used to study developmental expression of *alternative oxidase* and isolate mitochondrial retrograde regulation mutants in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 57: 871-888.

Zerges, W., Wang, S. and Rochaix, J., D. (2002) Light activates binding of membrane proteins to chloroplast RNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 50: 573-585.

Zhou, B., Wang, Z., X., Zhao, Y., Brautigan, D., L. and Zhang, Z., Y. (2002) The specificity of extracellular

signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 277: 31818-31825.

Zsigmond, L., Rigó, G., Szarka, A., Székely, G., Otvös, K., Darula, Z., Medzihradzky, K., F., Koncz, C., Koncz, Z. and Szabados, L. (2008) *Arabidopsis* PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* 146: 1721-1737.

Zubko, M., K., Zubko, E., I., Ruban, A., V., Adler, K., Mock, H., P., Misera, S., Gleba, Y., Y. and Grimm, B. (2001) Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum* (+ *Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility. *Plant J.* 25: 627-639.

Zubko, M. (2004) Mitochondrial tuning fork in nuclear homeotic functions. *Trends Plant Sci.* 9: 61-64.

Supplementary Figures (Fig. S)

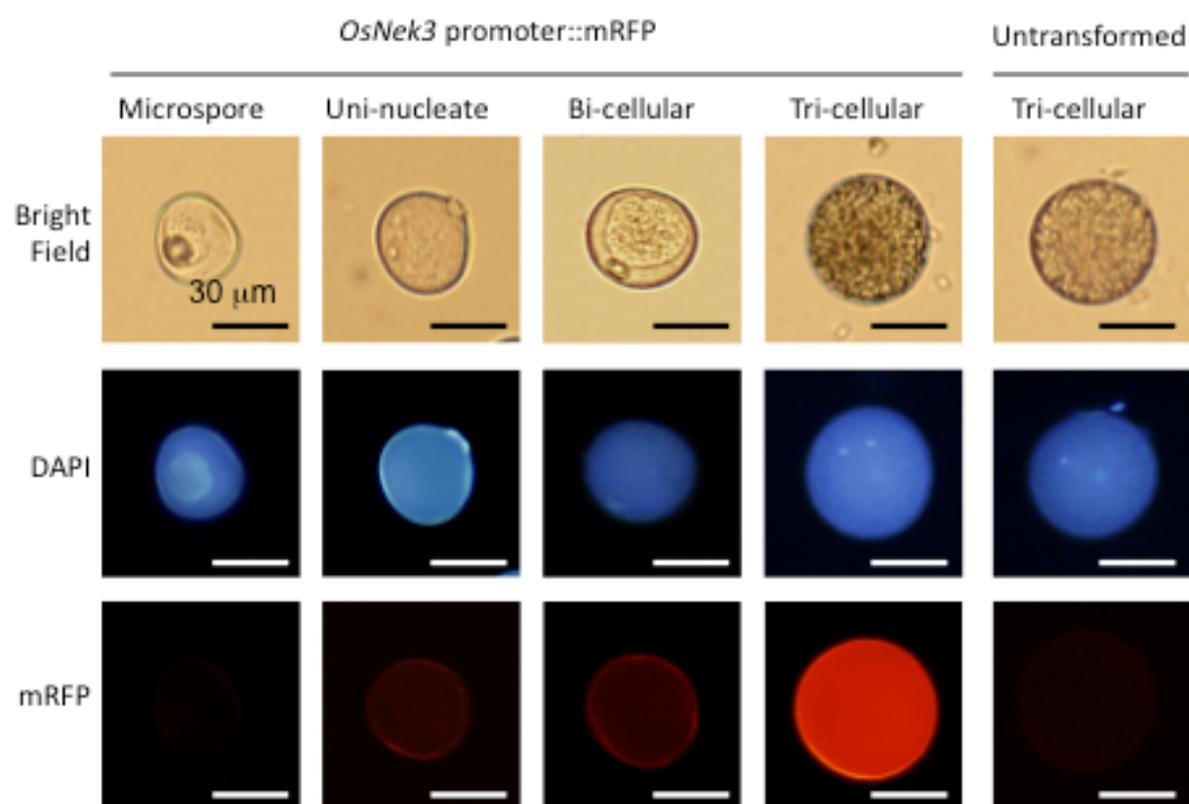


Fig. S2 *OsNek3* promoter activity assay in Fujii et al. *submitted*. 3,032 bp *OsNek3* promoter fragment was fused to mRFP, and introduced into T65.

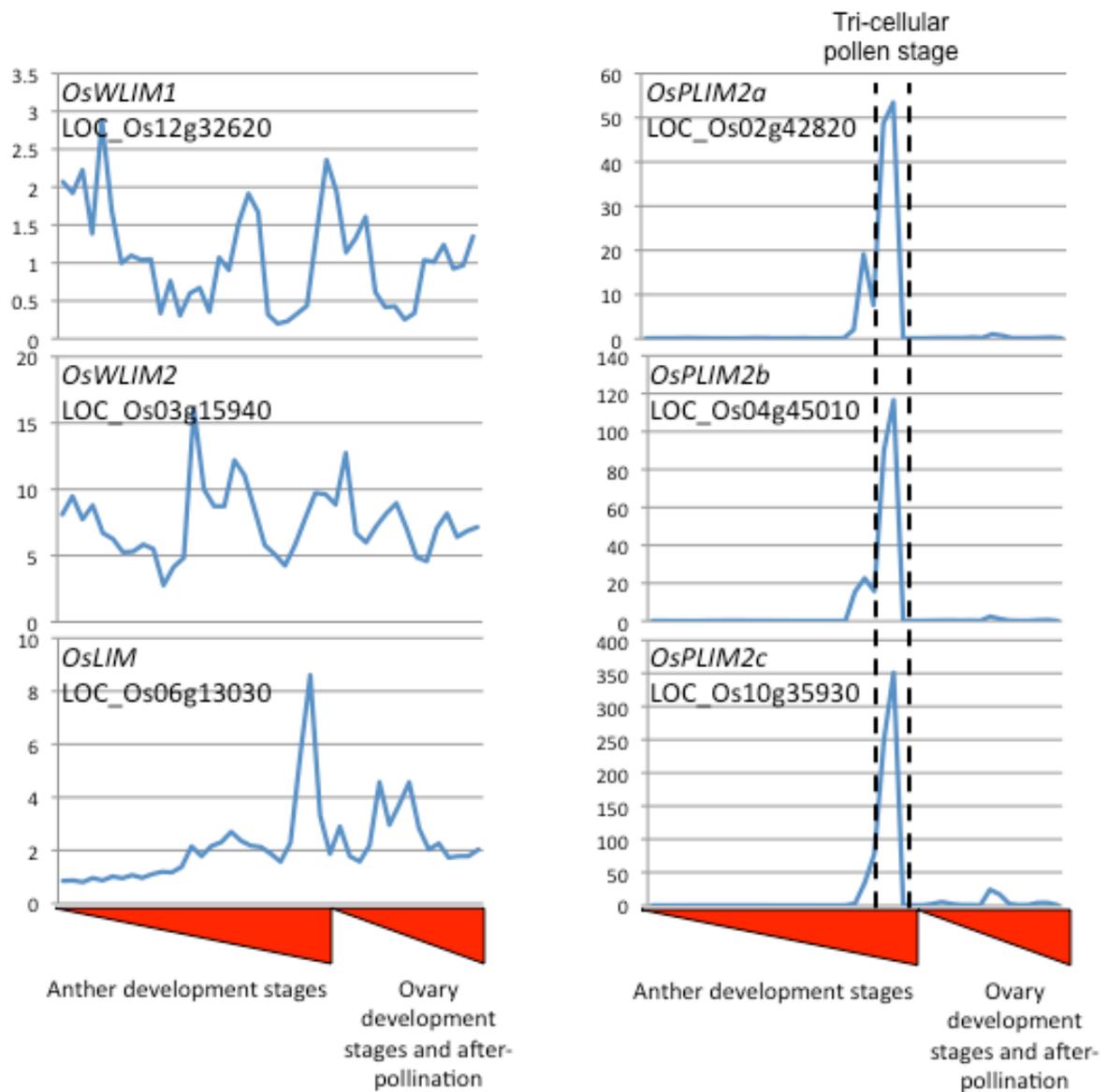


Fig. S3 *OsLIM* mRNA expression status extracted from *Oryza_Express*.

```

OsPLIM2a  1  - - - M S F T G T Q D K C K A C D K T V H F I D L L T A D G V S Y H K T C F K C 37
OsPLIM2b  1  - - - M S F T G T Q D K C T A C D K T V H F I D L L T A D G V P Y H K T C F K C 37
OsPLIM2c  1  - - - M T F S G T Q D K C N A C D K T V H F I D L L T A D S I P Y H K S C F R C 37
OsWLIM1   1  - M A T S F Q G T T T K C M A C D K T V Y L V D K L T A D N R V Y H K A C F R C 39
OsWLIM2   1  - - - - M F S G T Q Q K C K V C T K T V Y P M D Q L S T D G V V F H R S C F K C 36
OsLIM     1  M A A A W G G T Q K C D S C G R T V Y P V E E L A A D G R V Y H R P C F R C 40

OsPLIM2a  38 S H C K G T L S M C N Y S S M D G V L Y C K T H F E Q L F K E T G S F S K K F S 77
OsPLIM2b  38 S H C K G I L S M C S Y S S M D G V L Y C K T H F E Q L F K E T G S F S K K F A 77
OsPLIM2c  38 S H C K G T L S M C S Y S S M D G V L Y C K T H F E Q L F K E T G T F K K N F P 77
OsWLIM1   40 H H C K G T L K L A N Y N S F E G V L Y C R P H F D Q L F K R T G S L D K S F E 79
OsWLIM2   37 Q H C K S T L S L G N Y S S I E G V P Y C K P H F E Q L F K E T G S Y N K S F Q 76
OsLIM     41 T H C K A T L Q F S N Y S S V E G V L Y C K P H Y D Q I L K S T G S L E K S F E 80

OsPLIM2a  78 Q G G K S S E K S - - - D Q G R A P S K L S S A F S G T Q D K C A A C Q K T V Y 114
OsPLIM2b  78 P G C R S T D K - - - E L A R A P S K I C S A F S G T Q D K C A A C Q K T V Y 113
OsPLIM2c  78 S G T K A N S E - - - - Q A K I P S K L S S V F C G T Q D K C T A C K K T V Y 112
OsWLIM1   80 G T P K V V K P E K T V E N E - N A I K V S S A F A G T R E K C V G C N K T V Y 118
OsWLIM2   77 S P A K P A S E K L T P E L T R S P S K A A R M F S G T Q E K C A T C S K T A Y 116
OsLIM     81 G T S K S A K A E K S N G N K G Q P N R F S S M F V G T Q D K C V V C N K T V Y 120

OsPLIM2a  115 P L E K L T L E G E S Y H K S C F K C S H G G C I L T T S S Y A A L N G I L Y C 154
OsPLIM2b  114 P L E K L T L E G E S Y H K S C F K C S H G G C I L T T S S Y A A L N G V L Y C 153
OsPLIM2c  113 P L E K M T M E G E C Y H R T C F K C A H G G C L L T N A S Y A S H N G I L Y C 152
OsWLIM1   119 P I E R V T V N N T M Y H K S C F K C C H G G C T I S P S N Y I A H E G K L Y C 158
OsWLIM2   117 P L E K V T V E G Q A Y H K S C F K C S H G G C A I S P S N Y A A L E G I L Y C 156
OsLIM     121 P L E K V N L N G S S Y H K S C F R C T H G G C T L S P S N N V T H E G K L Y C 160

OsPLIM2a  155 K I H F S Q L F K E K G S Y N H L I Q T A Q S K Q K E S E E - - - - - - - - - 184
OsPLIM2b  154 K I H F G Q L F M E K G S Y N H M K K K S E S - Q E V L P E - - - - - - - - - 182
OsPLIM2c  153 Q N H F W Q L F K K S G S Y D N L L K P A S A A A E N T V E S - - - - - - - - - 183
OsWLIM1   159 K H H H I Q L I K E K G N F S Q L E N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 177
OsWLIM2   157 K H H F S Q L F K E K G S Y N H L I K C A S V K R A E A Q P - - - - - - - - - 186
OsLIM     161 K T H H S Q L F M V K G N F S N F E D S T P N A K V D I E K Q P E H E D A T K N 200

OsPLIM2a  185 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 206
OsPLIM2b  183 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 201
OsPLIM2c  184 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 207
OsWLIM1   178 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 195
OsWLIM2   187 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 196
OsLIM     201 P G G P G Q G D G L T E K P L E S E L T P E K P S Q D D I V A E K Q S Q S S V D 240

```

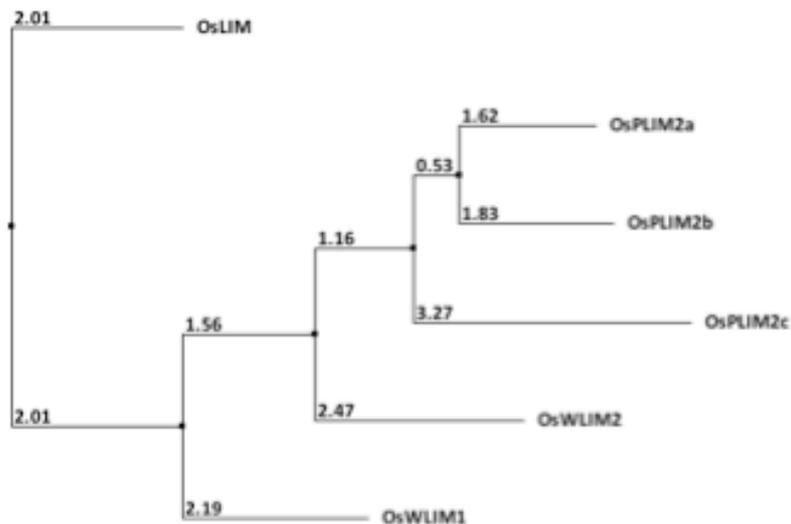


Fig. 54 Alignment of *OsLIM* pairwise by ClustalW v. 1.8 program. Neighborhood-joining tree was drawn based on % identity. OsWLIM1: LOC_Os12g32620, OsWLIM2: LOC_Os03g15940, OsLIM: LOC_Os06g13030, OsPLIM2a: LOC_Os02g42820, OsPLIM2b: LOC_Os04g45010, OsPLIM2c: LOC_Os10g35930

A

```

1 TCCATGTTTATCATGATACGCTTCGAACGTGCGTGTTCCCGATTCAATTGGAAAGTGGTTA 60
61 TTTTCACAAGATTCTTTGTCCCCGGATCTACTGTTTCTTATTCTTCTGATTTTGGTTTTT 120
121 GTATCACGGATGTTGGTTTCGCGCTTTATGGCCCCGTTCTGCAGTATTGACGTCTCGCATT 180
181 TTCACTACTTTTGTGTTCTTTCTTCAGCGGTTTTGAGTGGATCGGTGGCAACACGCCGCT 240
241 GATAACGAACCTATTAATAATGGGGCAGCTCCCGCTGCTTACGGATCCGGGGCAGAAGGA 300
301 CCCTCAAATTCGCTTATTCACTTATACTTCCGATTTGGCGGAAGATTCGGTCAGTTC 360
361 GGGCGTAGTAGAAGTACCGCCTCGTCTCTCTTTTTCCAAGGACTTTCGGGCCAGATTCCC 420
421 ACGGCACCAAATCCCCCGGGGAAGAAGTACAGCAGAACCTTCCAAACTTTTTATCCCTG 480
481 CCAGAGGAGGATACGGTGGAGCACTTATTAGGGGCAGGAAGAGCAGCCGGAGGAGCCGGG 540
541 GGCGCAGGTGGGGCCGCTGGAACTGCCCTGCAGCTGAGCAAATCCAGGGAGAAGATCAT 600
601 GCCGGGTTCGTGCCAGATCTCCACCAAATTCAGCATGATGTTATAAGAAACAGACTTGCT 660
661 ACTTCAACTCCCACAAGTGAAGTAAGCGACGATGAGATAGACGCACGCATTTTTCTTAAG 720
721 AAAGATATTATCGATCGCATGGCCCAATTAGACCCGGACCGGGATGGATTCTGGAAATGAG 780
781 CAAAAGGACCACTTAGTCGCTCATGGAATCCTCAATAAGGGTAAAGAGTATACCTTCCAG 840
841 GGACTGATAAACCTCTGTAAAAATTTAAATAAATGCGATGCAAAACAGTCCTCTTTTCAAT 900
901 AAAAATAAGAAAAATAAATAAGTACTAA 927

```

B

```

1 SMFIMIRFERACSRFIGKWLFSQDSLSPDLLFLILLILVFSRMLVRAWPRSAVLTS 58
59 RIFTTFVVLSSAVLSGSVAHAADNEPINNGAAPAAYGSGAEGPSNSALFTYTSDLAED 116
117 SVSSGRSRSTASSFFQGLSGQIPTAPNSPGEEVQQNLPNFLSLPEEDTVEHLLGAGR 174
175 AAGGAGGAGGAAGTAPAAEQIQGEDHAGFVPDLHQIQHDVIRNRLATSTPTSEVSDE 232
233 IDARIFLKKDIIDRMAQLDPDRDGFWNEQKDHLVAHGILNKGKEYTFQGLINLCKNLN 290
291 KCDANSPLFNKIKKINKY 308

```

Fig. S5 Alignment of A, *CWORF308* nucleotide sequences and B, *CWORF308* amino acids. Underlined are the regions which may be considered to be in same origin with *orf288* partial sequences. Broken-underlined are the regions similar to *orf224* (>85%). Boxed are the partial *cox2* sequences.

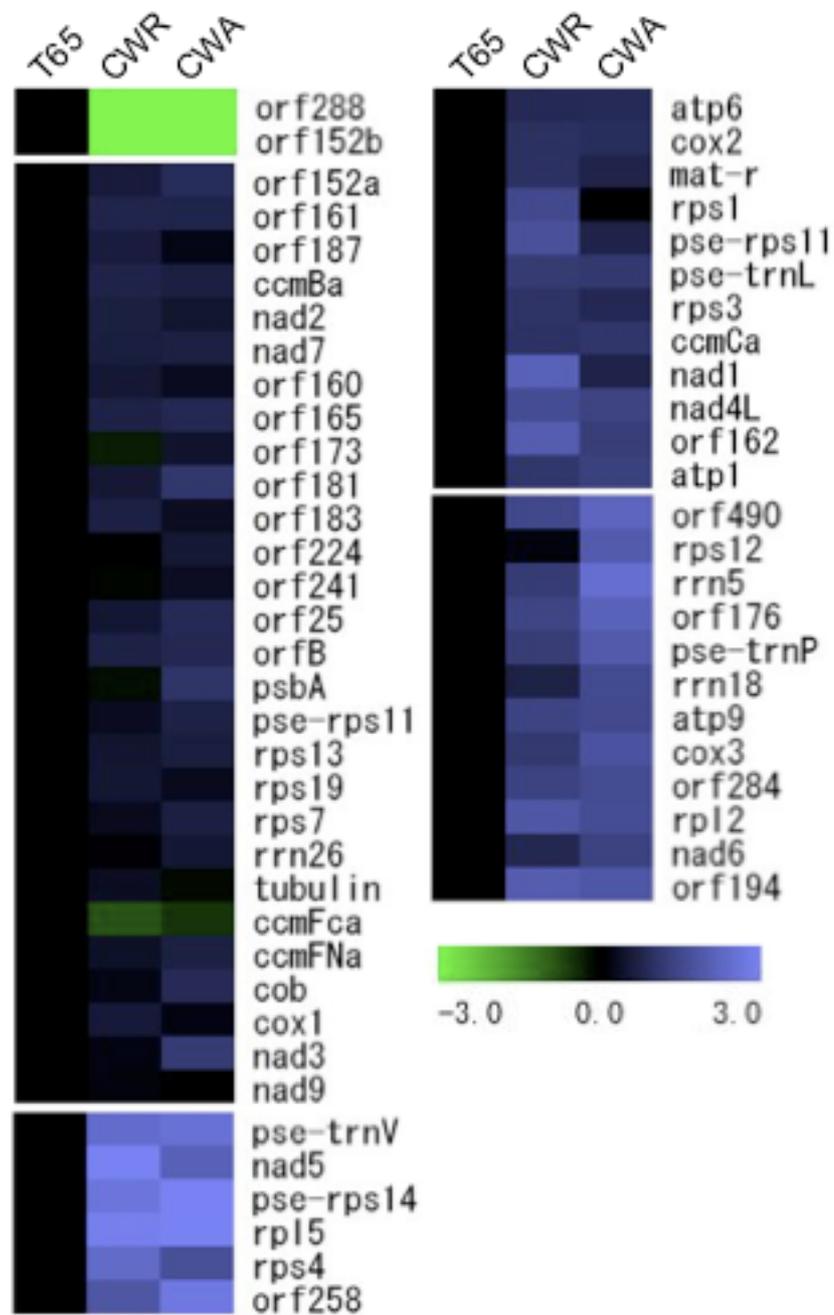


Fig. S5 Result of quantitative RT-PCR analysis of mitochondrial genes.

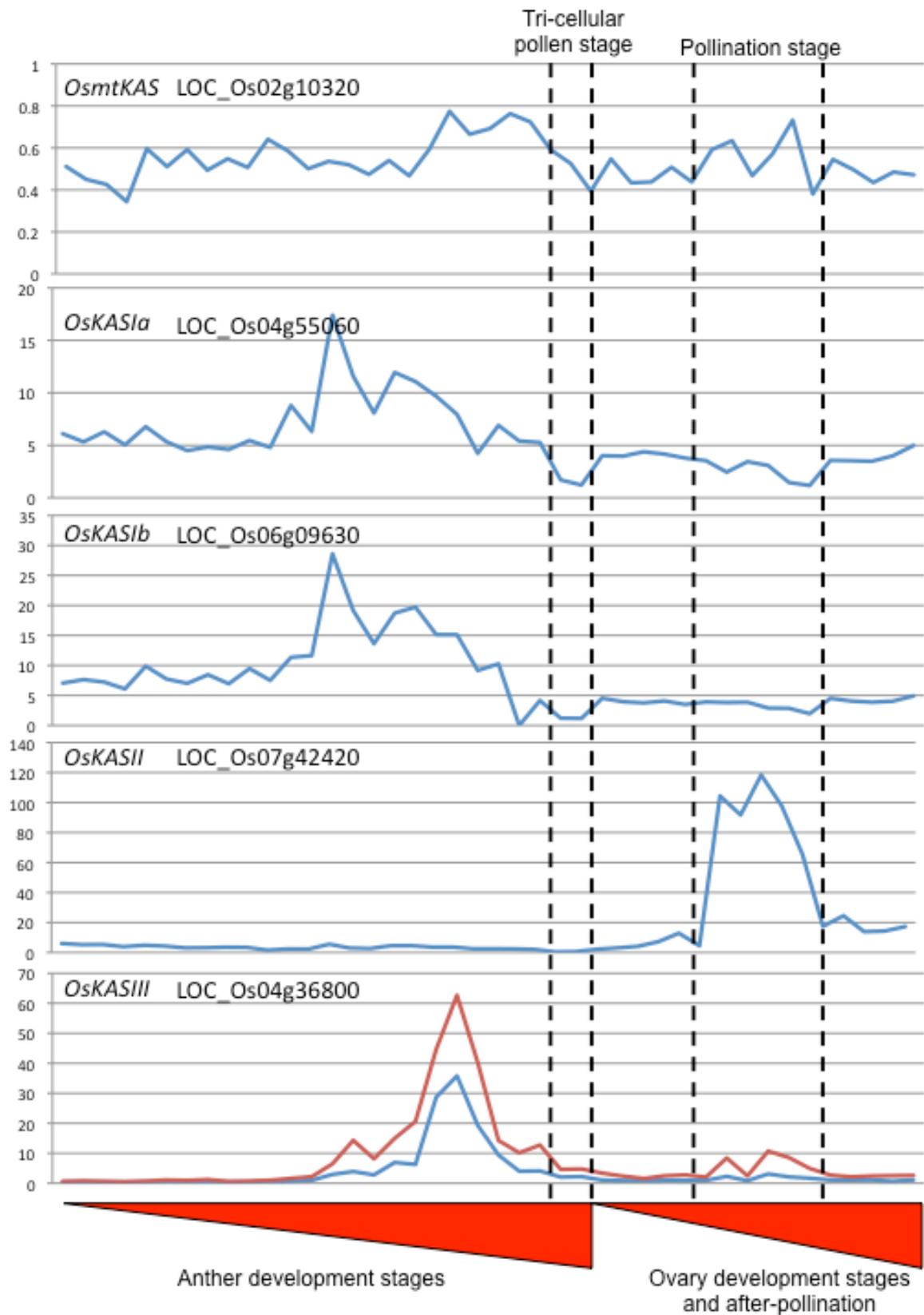


Fig. S6 *OsKAS* mRNA expression status extracted from Oryza_Express. Two probes were assigned for *OsKAS III*.

Supplementary Tables (Table S)

Table S1 Information of DNA markers used for MAS				
Marker name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Chromosome	Position
RM3252	GGTAACTTTGTTCCCATGCC	GGTCAATCATGCATGCAAGC	1	0.3
RM8068	AAACCTCTCGCTGTAATTAG	TGAACATTTATTGATATGGTA	1	9.5
RM1167	GAACATAAACCATGCGGGAG	AGCTAGTGGCAAAAGTGTGC	1	22.6
RM8146	GACTCCTCCAAGTGCAACG	GTAGCTTCCCCACAATGTCA	1	25.4
RM6466	CGAACGAGAACTCCCTCATG	ATTGCACCAAGAGGAGATCG	1	49.0
RM1287	GGAAGCATCATGCAATAGCC	GGCCGTAGTTTTGCTACTGC	1	58.1
RM8003	ATCATGTTAATTAATGTCTAG	TGCTAAAAGGTTATTTTAC	1	73.7
RM8144	AAAAGTAGCTATATTTGGGA	GTGAGGAAATTATCGAAACAG	1	95.7
RM3475	GTCGGTTTGCCTAGTTGAGC	TTCTCGGTGTATGGGTCTC	1	107.6
RM8097	TACATACACGTTTATGTGCC	CGAGCGTAGGAAGACTACC	1	129.0
RM1216	TTCCCCAATGGAACAGTGAC	AGGGTCTACCACCCGATCTC	1	132.1
RM8085	TGCGTTTCGATTTCTTTTAA	GGAAAGTTGTGTTCTTTGGC	1	139.9
RM8062	CAAATTAATCCATCCATTATT	GAGGAGATGCTAGTTAATTAC	1	155.2
RM6321	GGCTCTACCTCGCTGTTGTC	ACGAATATAACCTGCGGCAG	1	181.8
RM8136	ATGTAAGCTAGGTAGAGCTG	GCGTACGTACGTAAGTAATA	1	181.8
RM3340	TCTTGGCAAGCTCTCCTCTC	CCATCATCTCGATCTTGACG	2	0.0
RM7033	GTGCCCAACTGCCTAATAC	GTTGGCGGTGATTCTGATG	2	7.9
RM4355	GGGATGAGAGTAGAAGGCA	TATATGGCAAGCCTAGCG	2	19.0
RM6911	GGTGATTGCTATTTAACTTC	ACTTTTTCCAAATTATGCT	2	42.1
RM6023	AAGGAAGCAGCGATGTGAAG	GAGCTAGAGATCACCTGGCG	2	81.7
RM3515	GGAAAGAAGATATGCCATGC	AGAGAGAATCAGAAACACCAA	2	95.2
RM1367	CGTAGGATCGGAGTTGTTGC	CCTAGCTGCTACCACCAAGC	2	110.9
RM5631	CGTCCAAGAAATATTGCAGT	GTGAGACAGAATCCTTACGC	2	118.1
RM5303	GCCATTTCTGCTCTTTCTTA	GTTTGCATGGAGAAGAAGAA	2	126.4
RM3789	ATTAAGGGCAGGGGCATATC	CATTGACTGGTGTGGTCAGG	2	150.5
RM3850	AAGTTGAGAATGAGGGACAA	TTCGGAAGTGAAAAGGTAAT	2	156.3
RM3248	AGAAGGTTGCTTTCTTGGCC	CTTGCAAGGTCTGTTGCATC	2	157.9
RM4108	GTCCCTCGCTTTATATCTAG	CAACTCTGCTAAACGAATTA	3	1.1
RM6297	TTCTTCTCTCTCTCGCTCG	CCAAAGCAACCCATCTCAAC	3	7.9
RM1338	AGAGGGAATTAGATTGGATT	GGTCCACTTCTCTCTTCTAT	3	40.3
RM6676	GTTACGGTCCAATAAGAAT	CTTTCAAGCTTACGAAAACA	3	65.4
RM3223	CCGACGCTCAAGATCGTC	GAGAGAGAGGAGGGGAGAGG	3	86.0
RM6146	ATCTTCTCCGTTCTCCCTC	AAGGAGGGAGGAGGCAGTAG	3	86.0
RM5626	ATCAGTCGGTCATAAACGCC	ACCTTCTCTTCTGCTGCTG	3	99.0
RM2334	CATGCATCTGATCTGATTAT	TGTGAAGAGTACAAGTAGGG	3	115.6
RM3856	TTGCATAACAAGATGAACAA	TTAATTGCGGATTTTTTATT	3	127.4
RM6759	TGGAAAATTTGATGACATAA	TATGGGGTATCCATAATCTC	3	144.5
RM7389	AGCGACGGATGCATGATC	TTGAGCCGGAGGTAGTCTTG	3	164.4
RM3585	TTGATGAGAGTGAACAGCG	CGTTTATGCAGAAACACCC	3	164.4
RM3586	GAAGAGAGAGCCAGAGCCAG	ACACGATCGAGCTAGAAGACG	3	164.4
RM7535	GACGAAAACCGGTCGAATTC	TCCAACAAGAGTGAGCATGC	4	6.8
RM1359	AACGAATTCTATTTTGCCTC	TTCTTCTCATTTCATTCGC	4	56.1
RM3558	ACGAGAGATCTTCTTTGCAG	CCTCTATTATGCCTCTACGC	4	69.8
RM3866	AGTTGGTCATCTACCAGAGC	GATCTTCTTGCTCAGAAAG	4	70.9
RM3276	TCCGTCTCGACTCTCCATC	GATGAGACACCACGGACATG	4	102.4
RM3335	TAATCCACTGTGTCATTTAA	ACCATCATCTTGTACCTAGT	4	113.2
RM5879	ACCAGAGATCGATTGGTAGC	GGCTGCCTATCGAGGCTAAC	4	129.6
RM1248	ACAAGCAGCTAATGGTTGGG	GTGATTTTGGCTCAGGTCAG	5	3.0

Table S1 Continued				
Marker name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Chromosome	Position
RM7373	AACTCCTCCTTCCTTCTGCGC	ACAGTTGATCGATCTTGCC	5	3.0
RM5874	GAAAAGATCTGGCTCGTTG	GCATCATCGCCAGAGCTC	5	30.7
RM3777	GCTCCAAATCTTGGTCTTG	TCTCACCTCTTCCCTACAAGC	5	31.5
RM3853	AACATATGCTATGTGCCCTT	GGAGTTATCAGCAAATGCTC	5	31.5
RM3322	CTTCTCCACCCATGCCAC	CCTGCAACGAACACCCAC	5	32.0
RM3419	ATCTGGTGAAACAGTGCTC	CTGCTGCTATTCTCAAGAC	5	36.4
RM3437	AACCACCTAGGTTTCTCCCC	TAGCAACGAGGTTATTGGGC	5	60.7
RM3800	GAATGAACCATTCCAAATGA	CCTGGAAGTGCTGTATGATC	5	87.4
RM4501	GCACAAATGTCTCTGTCTAA	AGAGTACGAAACGGTACAAG	5	89.6
RM1054	ACTTACATCTGAGGTGCATA	GCATTGCAGATTACAGATAC	5	122.0
RM8109	CATTGTTTAAGTGCATAATTG	ACCATGACATGGCACATT	6	1.7
RM2615	CAGAGTGCTTTAGACAATCA	AAATTGGTAAGAGATTCTGC	6	32.7
RM6857	ATGTTTTCTTTTTGGAGG	AGAGGAAAAGATGAGGGAAG	6	34.3
RM6836	TTGTTGTATACCTCATCGAC	AGGGTAAGACGTTTAACTTG	6	54.1
RM5745	ATGCCAAGTGGACGATGTAC	ACATGTGGGTAGTGGGATGG	6	64.9
RM6818	GTCGCATTCGTCTCCACC	ACCATTTCCAGATGACTCGG	6	65.8
RM1161	AAACTGTTTTACCCTGGCC	ATCCCCTTCTGCGGTA AAC	6	65.8
RM2229	AGCACCTAAGCATCTAGCAC	CATGTCACCCAAAACAATTA	6	65.8
RM5087	AAGGAGTTAGTGGGGATAA	GAGATGAGATCCGAACCTCT	6	65.8
RM3827	TAGTCTCGAGGACGGATTG	CTGGCCTTTCTCAATCTGC	6	80.4
RM5314	ATCCCACCAATAACCCTTGC	TGGTTGAGAGGTTTGGATGG	6	91.9
RM5753	AACATGCTCAACTTCTGGGC	GCTAGGTACGATCCAGCTGC	6	124.4
RM508	AGAAGCCGGTTCATAGTTCATGC	ACCCGTGAACCACAAAGAACG	6	<8.2
RM7083	AACTCAGGCACGCCAAACAGC	CCACCTCTACCTGTACGGTCTCG	6	<8.2
RM19262	GGAAAGACCAGTTTAGAGCAATGG	AGCTAGATCCCTGTTTACACAG	6	<8.2
RM8059	CTTGATGCATCCACGGTACG	AACCAACGAACCAACGGAAAGC	6	<8.2
RM8060	GGTTGTGCTGAATACTGTCCATAAGC	CAGGTAACCGGTGAAGATGTCTG	6	<8.2
RM3132	TTTGAGGAGAGTTCTTGGGTTTG	CTCCACTTCTCTTCACTCCCTTCC	6	<8.2
RM4784	TACTGCAGAATTCCTGTGAGACG	GTACAAATTCCTGTTCTGAGAGC	6	<8.2
RM7399	CAGATATGATGTTCTTGCCCTTGC	GCTTGCCAGATCACCTACCTACC	6	<8.2
RM2353	CCTGGAGCAACTGTGGTACAAGC	AGCCACACTGTGGTAGGTTTGG	6	<8.2
RM6663	CCTCATCGGTCCGAACAC	ATACAGTGGGAAGCGTGTCCG	7	0.0
RM3196	ACCACTGCAGCAACCACC	ACATGTGATCGAGCTTTCC	7	0.0
RM1093	AGGTTGATGAACCCGATGAG	CTAGCTGCAGAACGGAGGAG	7	2.5
RM3394	CCCTTACGTGCAGTACATTG	ATGCAAGCTACTTACTAGCG	7	2.5
RM8263	TTTGCTGTCCCTTTGTTT	TGCAATCAAAGTCTTAGGG	7	35.7
RM6872	GGATGAACACTGATGATGGC	ACCTCCACCAGATATCCAC	7	35.7
RM6728	GGGTATGTGCTGCTATTTTA	GAAATCTGGAATTTTCCCTA	7	42.6
RM6767	ACATTCTTGATCTACGTGGC	AATTATGGTTGCTAGGTTGG	7	60.8
RM1973	GAGTTGCAAGGATATTTTAA	TGGAGCCTAGAGAATACATA	7	71.3
RM1330	CAGAGCTGTGGAAGAGGAG	CTCCTCAAACCGACTTC	7	96.1
RM1364	AAGAAATCAAAAACACATGA	AAAACATCTACTTTGATCCA	7	101.8
RM5720	CCTGATAAATTGACAGTTAC	GAGAGTAGGAGTTGATAACA	7	115.5
RM1306	TGCCAATTACCTTCCCGTAC	TGCTCCGATTGCTGCTATG	7	116.1
RM5911	CCCTCTTTTAAAGTCTGGGG	GGTGCCTCCTTTCAAAGTTG	8	0.0
RM6369	CAAGCTAGGGCTGCATAAGC	GCTTACCTACCTACCTACC	8	0.5
RM1235	GAAAATAAAAAGCAGAGGA	AAGCTATCCATTTTGGATTA	8	12.8
RM3572	AGTGCTGTCTGGTTTTTGGC	CCCCTCCCTTTCTTTCTTTG	8	32.7

Table S1 Continued				
Marker name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Chromosome	Position
RM4085	ACGAAACTACTCATGTGTAA	CGAGTCTAGAATCCATATAA	8	35.7
RM6215	CAGCAGAGAGATGACGCAAG	AAACCCAAAACCTCGTCTC	8	66.5
RM5485	CTTCCACAAGCTTGGCTAGG	AATGCCATCCCCTACTCATG	8	96.6
RM8058	ATATGATTTTCTCAAACAAC	CCAAACTACTAAACAGTACA	8	99.1
RM3120	ATCGATGGAAGCTCTTTGCC	GGATGTACAAGAGCTTAGGAG	8	127.2
RM3496	CGCTGAAAATACTGAATTGA	AGATGCATTTATTCCGAAAG	8	127.2
RM3840	GAGGAAGAGGAAGGGACTCACC	TTGCGTCCTACTGCTACTTCTTCC	8	127.2
RM7400	TGCAGCAGAAACACGAAGAG	AACTGCCATCATCTCCAAG	8	127.2
RM1328	GAATGGGATTAGACGATTTG	CCATGAGTGACATCAAAGG	9	0.0
RM8206	TCTTTCTGGATCATTGGATG	ACTCTGCCAAGGATAACAAG	9	3.2
RM6475	AGATCAAAGCAACGGCTAGC	GAACAGAGAGGGGACGTGTC	9	42.5
RM5657	TATGTGCATTTGTAAGGTGA	GCTTTAGATTATTGAGCGAG	9	49.3
RM1189	AACTGCCCATTTGTCTGTC	GACTCCGGACTAGACCAATC	9	58.3
RM7424	AGAAGCCCATCTAGCAGCAG	TCAAGCTAGCCACACAGCTG	9	60.8
RM5786	AAATCAGGAAAGTTTCTCAGC	AGAGACACAGGCAAGTCATC	9	77.2
RM2144	ACATTATGAAACGGAGGAAG	GAAATGATGCATCAGCATT	9	91.5
RM6364	GTTCAATTCGTCCTTCTCGG	TCTCGATTCTTCTTCTCCG	10	0.0
RM3311	AAGTATCCCTGTCTCACGCC	AGGTAGAGGGAGGGAGGGAG	10	19.0
RM6704	CACACATTGCATTACGAGGG	CAGGGGCAGCTTGAATACTG	10	48.1
RM1873	CTGACAGGACATTA AAAAAC	CCTCATCCTTAATCTCTTTA	10	48.4
RM5352	CATGGTGCAAGTGATGGATC	GTCTCTGCTGCAACACATCG	10	71.4
RM3451	CGGCGAGATAACAATTCTCC	GCGTGATGATATGGTATCGG	10	72.8
RM4771	ACGTTGATTTCAATCAGGTC	ACGCTAACTGAGAAACATGG	10	83.8
RM5768	TTAGAGATGGCCTAGCAGC	CACCTCATCCATGACAC	10	94.1
RM1761	ACGCTTAAAGAACATTTGAT	GCGATTAACCTTTAACCATT	11	0.3
RM7557	GTGTACTGCCATGAAAGGCC	GAAGTGCCTTTCAGGAGAG	11	9.2
RM1812	CAGCTAGTGAGCTCCTAGTG	GCTAACCCACCAACTTATTC	11	10.3
RM5599	CTCACAATATCACCATCCAC	AATTTTGTGCTGTTGTTGAA	11	19.8
RM3625	CTTGCAATTCAATTGCTTAC	GGTGGCCTAGTGAAACTAAA	11	34.8
RM3428	ATTCATGCTTCCTTTCAGTG	GATTACTGGTTTGCCATTTG	11	56.2
RM6091	GCTGTCCTGTCTTGAATCC	TGGTAGGCTGGTGACATGC	11	56.2
RM5349	AGGGCATGCTTACATCCAAC	CATTTGCTTCTATGCCCCAG	11	79.1
RM5961	GTATGCTCCTCCTCACCTGC	ACATGCGACGTGATGTGAAC	11	79.9
RM4069	ACAATAATCTTCAAAGATGC	AATCATTGTGAAGTTCAATC	11	112.1
RM1233	GTGTAATCATGGGCACGTG	AGATTGGCTCCTGAAGAAGG	11	112.9
RM7240	GCGACGACGAAGCTACCTAC	ACGTTTCGGGTTTCATGCC	11	112.9
RM5926	ATATACTGTAGGTCCATCCA	AGATAGTATAGCGTAGCAGC	11	117.9
RM1880	ACCACTAAATAAGCACATAC	GGCATCATACATTA AAATAC	12	9.4
RM3483	CCTAGCTTTCAGGAGCAAG	CCCACAATGAGAAACAGTTG	12	10.0
RM8214	CCTAGCTTTCAGGAGCAAG	CCCACAATGAGAAACAGTTG	12	10.0
RM3472	ATCGCAAGAACTCCGTGAAG	CGCTTTTGAGCTCGCCTC	12	27.6
RM3455	TGAATCCACACTCGCAGATC	GCCAGTCCACGATTGGTC	12	38.1
RM7619	CTTGGTATGTATTGGCAGCG	GAGGCAATAGGAGGGGAGAG	12	38.1
RM5746	TCGCTACGTGACTGATTTG	ATATCATCAGTCGGCAGCAG	12	39.4
RM7003	GGCAGACATACAGCTTATAGGC	TGCAAATGAACCCCTTAGC	12	41.8
RM6973	CAACTCCAGCTTCGCCAAC	CGGCCACACCTAAATAACG	12	49.3
RM1337	GCTGAGGAGTATCCTTTCTC	ACCATAGGAAGATCATCACA	12	51.5
RM1261	GTCCATGCCCAAGACACAAC	GTTACATCATGGGTGACCCC	12	61.6

Table S1 Continued				
Marker name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Chromosome	Position
RM1246	AGCTCGATCCCCTAGCTCTC	TTGGAGAAGGTCACCTGCC	12	65.3
RM7102	CGGCTTGAGAGCGTTTTAG	TACTTGGTTACTCGGGTCGG	12	71.9
RM6869	GAGCTCCTGTAGTGACCCG	ATCAGCCTCGCCAGCTTC	12	75.8
RM3331	CCTCCTCCATGAGCTAATGC	AGGAGGAGCGGATTTCTCTC	12	89.5
RM7376	TCACCGTCACCTCTTAAGTC	GGTGGTTGTGTTCTGTTTGG	12	89.5
RM1103	CAGCTGCTGCTACTACCCG	CTACTCCACGTCCATGCATG	12	91.4
RM5609	CGCCAGTGTCGAATATGATG	TCTTGGTGCAGTAGGTGCAC	12	93.0
RM6947	ATTAAACGTCCACTGCTGGC	GCTAGGTTAGTGGTGCAGGG	12	93.0
RM5479	TGATGCCTCCTAAGCTCACC	ACTTCTCCCCTCTGCTCC	12	95.4
RM1264	CGGATAAGGACAAAGCAAGC	GTAGTACTGTGGACCAACCCG	12	104.2
RM6953	ATGTCTCAACGGACGTAGGC	CTTGATGCAAGAACTGCTGC	12	104.2
RM2197	ACTGAGAAGTTAATCATCG	GAACAAGTTGAAGAGAAAC	12	109.2

Table S2 Sequences of primers used for RT-PCR analysis.

Accession number	Description	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
AK101940	alpha-expansin (EXP20)	CGACGATGTGGGTGTCATTCT	TTTGCCATGCTGAGCAGATC
AK065263	glycosyl hydrolase family 79 protein	TGCCCTGCATGTAGTTAGA	GGTCTCAATGGGAAAGAGC
AK072485	glycosyl hydrolase family 3 protein	TCTCAATGTGTAGCCAGAGC	ATGGTACGAGAATCACTCACC
AK064040	alternative oxidase 1a	GTCTACTGCCGAGGATTTGCATCAC	CCGATACAGCTAAAGAGCTCTC
AK058434	rubredoxin family protein	ACGAGATGATCGATCCACTG	CGTAGGATGATCAAACAGGC
AK058858	cytochrome b6f complex subunit	TATTCAGGATCGCCGTCATC	CTGCCTCCAAAACGTGTTTC
AK069697	ABA-activated protein kinase	TTTCAGAGCAGGTAGAGCTC	TCTCATTCTCAGTGTTCCC
AK071575	mRNA-binding protein	CACCTCGTCATGGTCAAATAC	GCTGAATCTGATTGACTCTG
AK070509	pectate lyase family protein	CTAGGCATGCATATGCTTGC	GATTGCATTACTGCCGAACC
AK068978	glycosyl hydrolase family 17 protein	TGATGCTAAAGAGAGCGAGG	CACCATGAGTTGAGGAGAAG
AK100191	pectate lyase family protein	ACTTGAACGCCAAGGAGGTG	AATTAGCATGGCATGCCGAC
AK073663	glycosyl hydrolase family 17 protein	GACAGTATCAGCCACTGTAC	TGTAAGACGAAAGGCAGTGC
AK107017	pectinesterase family protein	AGATCGCCAATGAGATCGTG	TTGCTTGCATCCAATCCAGG
AK071728	pectinesterase family protein	GGATCTTCGATCTCTCACTC	CCAGTCCCAAAACAATCGAGATCC
AK107457	pectinmethylesterase family protein	ATGGATGCGACAACGATGAC	CTCCAGCAAATCCAATGAC
AK070632	glycosyl hydrolase family 20 protein	CGTACAGCACCATATGAACC	TGAGATGCTGATTTACACTTGG
AK069803	glycoside hydrolase family 28 protein	ACGTGGTATAAGTGAGCTGC	GGAATGATGGATCGAACCAG
AK072945	peroxidase	ATTTTCATCCCTGGCTTCCAC	GCAGAGTGTAGTAGTAACCG
AK105582	calcium-binding EF hand family protein	AGAAGCACGTCCAGTAATCC	ACTTACGCGTGTAGTTACCC
AK072436	unknown protein	TTCCCTTTTTGGGACCAAC	GAGAGATCCATCATCTGCTG

Table S3 Genes that changed their expression in CW-CMS background.			
Genes up-regulated in CW-CMS			
Functional categorization	Accession number	Description	Fold change
Carbohydrate metabolism	AK101744	alpha-amylase, putative / 1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase	4.14
	AK101978	glycogen synthase	3.53
Cell wall metabolism	AK101940	expansin, putative (EXP20)	27.19
	AK100973	acidic endochitinase	9.11
	AK063473	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein contains proline-rich extensin domains	7.17
	AK065263	glycosyl hydrolase family 79 protein	6.73
	AK072485	glycosyl hydrolase family 3 protein	5.22
	AK064256	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein contains proline-rich extensin domains	3.22
	AK073018	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	3.14
Energy metabolism	AK064040	alternative oxidase 1a	12.68
	AK058434	rubredoxin family protein	11.79
	AK058858	cytochrome b6f complex subunit	10.78
Other metabolisms	AK069725	chorismate mutase	8.27
	AK073754	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	5.95
	AK066656	pantoate-beta-alanine ligase	3.09
	AK069697	putative similar to abscisic acid-activated protein kinase	10.16
	AK103249	protein kinase family protein	3.44
Signaling	AK062711	calmodulin-related protein 2	3.13
Transcription	AK101209	myb family transcription factor	16.47
	AK071575	mRNA-binding protein	16.23
	AK063498	probable bHLH transcription factor	6.15
	AK071630	zinc finger (B-box type) family protein	5.70
	AK109839	ovule development protein, putative similar to ovule development protein AINTEGUMENTA	5.46
	AK069685	argonaute protein	4.52
	AK067268	zinc finger (C2H2 type) family protein	4.03
	AK068565	myb family transcription factor	3.55

Table S3 continued			
Genes up-regulated in CW-CMS			
Functional categorization	Accession number	Description	Fold change
Transport	AK065497	integral membrane protein, putative / sugar transporter family protein	6.40
	AK069202	hexose transporter	5.38
Miscellaneous	AK058425	aspartyl protease family protein	4.84
	AK106276	F-box family protein	4.09
	AK100124	serine carboxypeptidase S28 family protein	3.65
Unclassified	AK101587	unknown protein	8.48
	AK064101	unknown protein	6.27
	AK063099	unknown protein	5.29
	AK107846	unknown protein	5.05
	AK062437	unknown protein	4.64
	AK108160	unknown protein	4.62
	AK105584	unknown protein	4.39
	AK072453	unknown protein	4.33
	AK111022	expressed protein	4.27
	AK065906	unknown protein	4.25
	AK111111	unknown protein	4.20
	AK064954	unknown protein	4.07
	AK100734	unknown protein	4.05
	AK064603	unknown protein	3.99
	AK064746	unknown protein	3.95
	AK062202	unknown protein	3.92
	AK099545	GRAM domain-containing protein	3.88
	AK059455	unknown protein	3.88
	AK106400	hypothetical protein	3.81
AK107430	unknown protein	3.76	
AK058962	no protein	3.72	
AK072464	unknown protein	3.62	
AK101544	unknown protein	3.39	
AK105313	expressed protein	3.37	

Table S3 continued			
Genes up-regulated in CW-CMS			
Functional categorization	Accession number	Description	Fold change
Unclassified	AK061273	unknown protein	3.30
	AK108278	unknown protein	3.05
	AK107818	unknown protein	3.03
Genes down-regulated in CW-CMS			
Functional categorization	Accession number	Description	Fold change
Carbohydrate metabolism	AK071484	mannitol dehydrogenase	3.06
Cell wall metabolism	AK070509	pectate lyase family protein	10.78
	AK068978	glycosyl hydrolase family 17 protein	7.48
	AK100191	pectate lyase family protein	6.44
	AK073663	glycosyl hydrolase family 17 protein	6.27
	AK107017	pectinesterase family protein	6.19
	AK071728	pectinesterase family protein	5.89
	AK107457	pectinmethylesterase family protein	5.42
	AK070632	glycosyl hydrolase family 20 protein	5.37
	AK069803	glycoside hydrolase family 28 protein	5.01
Energy metabolism	AK072945	peroxidase	13.32
	AK061619	chlorophyll A-B binding protein	12.26
Other metabolisms	AK069945	esterase/lipase/thioesterase family protein	25.28
	AK071716	galactinol synthase	6.80
	AK067755	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	4.29
	AK100433	pyruvate decarboxylase	3.68
	AK104981	probable lipid transfer protein	3.23
	AK101594	pyruvate decarboxylase	3.09
Signaling	AK105582	calcium-binding EF hand family protein	20.63
	AK108780	C2 domain-containing protein	16.36
	AK069127	calcium-dependent protein kinase	7.24

Table S3 continued				
Genes down-regulated in CW-CMS				
Functional categorization	Accession number	Description	Fold change	
Signaling	AK067073	protein kinase	4.90	
	AK100423	armadillo/beta-catenin repeat family protein	4.44	
	AK066554	calmodulin-binding family protein	4.02	
	AK059951	inorganic pyrophosphatase	3.58	
	AK069983	protein kinase	3.04	
Stress-related	AK070150	universal stress protein (USP) family protein	6.55	
	AK070630	harpin-induced protein	4.74	
	AK071240	17.6 kDa class II heat shock protein	3.58	
	AK071397	universal stress protein (USP) family protein	3.27	
	AK108159	universal stress protein (USP) family protein	3.08	
Transcription	AK106057	AP2 domain-containing transcription factor	3.80	
Transport	AK106877	MATE efflux family protein	19.19	
	AK071190	small basic membrane integral family protein	7.81	
	AK100933	cation/hydrogen exchanger, putative (CHX15) monovalent cation:proton antiporter family 2 (CPA2) member	5.55	
	AK100741	cation/hydrogen exchanger, putative (CHX15) monovalent cation:proton antiporter family 2 (CPA2) member	5.24	
	AK069092	cation/hydrogen exchanger, putative (CHX19) similar to putative Na ⁺ /H ⁺ -exchanging protein	3.33	
	AK100300	cation/hydrogen exchanger, putative (CHX15) monovalent cation:proton antiporter family 2 (CPAp2) member	3.30	
	Miscellaneous	AK072248	transducin family protein / WD-40 repeat family protein contains 7 WD-40 repeats	6.58
	AK072895	epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein	5.42	
	AK107007	fringe-related protein	4.81	
	AK071055	senescence-associated protein-related	3.88	
Unclassified	AK069743	unknown protein	26.43	
	AK072436	unknown protein	25.64	
	AK111113	unknown protein	22.84	
	AK109142	33 kDa secretory protein-related	17.79	
	AK069940	unknown protein	16.40	

Table S3 continued			
Genes down-regulated in CW-CMS			
Functional categorization	Accession number	Description	Fold change
Unclassified	AK072877	unknown protein	15.27
	AK107003	unknown protein	14.10
	AK070142	expressed protein	12.68
	AK102004	expressed protein	11.69
	AK070362	unknown protein	10.54
	AK070108	unknown protein	10.03
	AK107767	unknown protein	9.36
	AK064756	unknown protein	9.20
	AK106917	expressed protein	8.96
	AK069295	unknown protein	8.58
	AK109746	transferase family protein	8.29
	AK110682	2'-hydroxyisoflavone reductase	8.04
	AK111460	unknown protein	7.12
	AK104054	hypothetical protein	6.37
	AK058247	unknown protein	5.90
	AK072757	unknown protein	5.32
	AK108237	catechol oxidase	5.16
	AK060265	no protein	4.92
	AK111075	expressed protein	4.53
	AK069005	unknown protein	4.12
	AK107066	unknown protein	4.05
	AK070868	unknown protein	4.02
	AK071064	unknown protein	3.99
	AK070305	unknown protein	3.98
	AK070920	unknown protein	3.90
	AK107255	expressed protein	3.46
	AK072952	unknown protein	3.37
	AK070355	unknown protein	3.27
	AK108872	expressed protein	3.21
	AK105729	gibberellin-regulated family protein	3.15
	AK069364	unknown protein	3.15

Table S3 continued			
Genes down-regulated in CW-CMS			
Functional categorization	Accession number	Description	Fold change
Unclassified	AK060632	unknown protein	3.06
	AK071298	unknown protein	3.04
	AK105373	unknown protein	3.03
	AK107765	unknown protein	3.00

CW-CMS up-regulated genes						
Functional categorization	Accession number	Description	Sample	Fold change	SD	
Cell wall metabolism	AK101940	alpha-expansin (EXP20)	CWR mature anthers	7.96	**	6.04
			CW-CMS mature anthers	23.26	***	9.51
			CWR veg. organs	1.60		0.16
			CW-CMS veg. organs	1.72		0.73
Energy metabolism	AK065263	glycosyl hydrolase family 79 protein	CWR mature anthers	1.19		0.15
			CW-CMS mature anthers	3.25	**	0.06
			CWR veg. organs	1.57		0.38
			CW-CMS veg. organs	1.22		0.40
			CWR mature anthers	1.40		0.44
			CW-CMS mature anthers	38.69	***	12.90
Energy metabolism	AK072485	glycosyl hydrolase family 3 protein	CWR veg. organs	0.52		0.35
			CW-CMS veg. organs	0.38		0.06
			CWR mature anthers	4.66	**	1.29
			CW-CMS mature anthers	147.18	***	73.39
			CWR veg. organs	1.26		0.29
			CW-CMS veg. organs	1.21		0.39
Energy metabolism	AK064040	alternative oxidase 1a	CWR mature anthers	0.81		0.03
			CW-CMS mature anthers	20.39	***	0.83
			CWR veg. organs	0.76		0.02
			CW-CMS veg. organs	0.68		0.02

Table S4 continued						
CW-CMS up-regulated genes						
Functional categorization	Accession number	Description	Sample	Fold change	SD	
Energy metabolism	AK058858	cytochrome b6f complex subunit	CWR mature anthers	5.99	**	3.27
			CW-CMS mature anthers	5.43	***	1.60
			CWR veg. organs	1.15		0.57
			CW-CMS veg. organs	1.09		0.33
Signaling	AK069697	ABA-activated protein kinase	CWR mature anthers	1.07		0.91
			CW-CMS mature anthers	6.59	*	8.59
			CWR veg. organs	0.29	**	0.16
			CW-CMS veg. organs	0.98		0.72
Transcription	AK071575	mRNA-binding protein	CWR mature anthers	0.93		0.03
			CW-CMS mature anthers	15.56	***	4.90
			CWR veg. organs	0.70		0.15
			CW-CMS veg. organs	1.53		1.08
CW-CMS down-regulated genes						
Functional categorization	Accession number	Description	Sample	Fold change	SD	
Cell wall metabolism	AK070509	pectate lyase family protein	CWR mature anthers	1.04		0.29
			CW-CMS mature anthers	0.13	**	0.04
			CWR veg. organs	-		-
			CW-CMS veg. organs	-		-
AK068978	AK068978	glycosyl hydrolase family 17 protein	CWR mature anthers	1.44		1.02
			CW-CMS mature anthers	0.03	***	0.02
			CWR veg. organs	1.36		0.19
			CW-CMS veg. organs	1.17		0.83

Table S4 continued						
CW-CMS down-regulated genes						
Functional categorization	Accession number	Description	Sample	Fold change	SD	
Cell wall metabolism	AK100191	pectate lyase family protein	CWR mature anthers	1.21	1.05	
			CW-CMS mature anthers	0.25	0.12	**
			CWR veg. organs	1.17	1.11	
			CW-CMS veg. organs	1.01	1.01	
	AK073663	glycosyl hydrolase family 17 protein	CWR mature anthers	0.79	0.40	
			CW-CMS mature anthers	0.10	0.06	***
			CWR veg. organs	1.25	0.61	
			CW-CMS veg. organs	1.47	1.10	
	AK107017	pectinesterase family protein	CWR mature anthers	1.33	0.98	
			CW-CMS mature anthers	0.22	0.34	***
			CWR veg. organs	1.71	1.52	
			CW-CMS veg. organs	1.52	1.12	
	AK071728	pectinesterase family protein	CWR mature anthers	1.05	1.02	
			CW-CMS mature anthers	0.33	0.21	**
			CWR veg. organs	1.42	1.39	
			CW-CMS veg. organs	1.33	1.02	
	AK107457	pectinmethylesterase family protein	CWR mature anthers	1.28	0.97	
			CW-CMS mature anthers	0.19	0.01	***
			CWR veg. organs	1.02	0.97	
			CW-CMS veg. organs	1.01	0.78	

Table S4 continued						
CW-CMS down-regulated genes						
Functional categorization	Accession number	Description	Sample	Fold change	SD	
Cell wall metabolism	AK070632	glycosyl hydrolase family 20 protein	CWR mature anthers	2.12	1.83	
			CW-CMS mature anthers	0.15	0.05	***
			CWR veg. organs	0.98	0.07	
			CW-CMS veg. organs	0.73	0.09	
Energy metabolism	AK069803	glycoside hydrolase family 28 protein	CWR mature anthers	1.08	0.03	
			CW-CMS mature anthers	0.21	0.05	***
			CWR veg. organs	0.90	0.24	
			CW-CMS veg. organs	1.03	0.00	
			peroxidase	CWR mature anthers	1.05	0.28
Signaling	AK105582	calcium-binding EF hand family protein	CWR mature anthers	0.78	0.29	
			CW-CMS mature anthers	0.02	0.01	***
			CWR veg. organs	-	-	
			CW-CMS veg. organs	-	-	
Unclassified	AK072436	unknown protein	CWR mature anthers	0.50	0.01	***
			CW-CMS mature anthers	0.02	0.01	***
			CWR veg. organs	-	-	
			CW-CMS veg. organs	-	-	

Transcript levels were measured in three biological replicates from cDNA prepared from mature anthers and vegetative organs (leaves, stems and roots). Relative transcript levels were normalized to the levels of tubulin alpha-1 chain (AK069140). The fold change compared with Taichung 65 levels is indicated; the level of significance was assessed using a t-test: (*) 0.01<P<0.05; (**) 0.001<P<0.01; (***) P<0.001; (-) no transcripts were detected.

Table S5 Summary of <i>DCW</i> RNAi lines.					
Name of the gene	Accession No.	Predicted protein functions	Numbers of RNAi lines regenerated	Number of independent lines with seed-set loss in T_0 generation*	Number of independent lines with seed-set loss in T_1 generation*
<i>DCW1</i>	AK067073	protein kinase, putative similar to LSTK-1-like kinase	-	-	-
<i>DCW2</i>	AK072436	unknown protein	-	-	-
<i>DCW3</i>	AK105582	calcium-binding EF hand family protein	8	4	0
<i>DCW4</i>	AK108780	C2 domain-containing protein low similarity to splicing coactivator subunit SRm300	5	2	0
<i>DCW5</i>	AK069127	calcium-dependent protein kinase, putative / CDPK, putative similar to calmodulin-domain protein kinase CDPK isoform 6	-	-	-
<i>DCW6</i>	AK066554	calmodulin-binding family protein	4	1	0
<i>DCW7</i>	AK069983	protein kinase, putative similar to viroid symptom modulation protein/dual-specificity protein kinase	2	0	0
<i>DCW8</i>	AK071629	C2 domain-containing protein similar to zinc finger and C2 domain protein	5	1	0
<i>DCW9</i>	AK070211	cyclin, putative similar to B-like cyclin	3	3	0
<i>DCW10</i>	AK071435	calcium-binding protein	4	1	0
<i>DCW11</i>	AK069289	protein phosphatase 2C	8	6	5
<i>DCW12</i>	AK100423	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing family protein	7	3	1
<i>DCW13</i>	AK106057	AP2 domain-containing transcription factor, putative contains similarity to AP2 domain transcription factor	6	0	0
* Lines with more than 50% loss in seed-set.					

Table S6 Representatives of known mitochondrial mutants.									
Plant species	Mutant name	Complex	Subunit	Nuclear or mitochondrial	Phenotypes 1	Phenotypes 2	Authors	Year	Journal
<i>Arabidopsis</i>	<i>fro1</i>	I	18 kDa Fe-S	Nuclear	Declined cold response	-	Lee et al.	2002	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>css1</i>	I	NAD4	Nuclear	Retarded growth	-	Nakagawa et al.	2006	Plant Cell Physiol.
<i>Arabidopsis</i>	<i>otp43</i>	I	NAD1	Nuclear	Malformed seeds	-	Longevialle et al.	2007	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>sdh1-1</i>	II	SDH1-1	Nuclear	Male sterility (Gametophyte)	Female sterility (Gametophyte, partial)	Leon et al.	2007	Plant Physiol.
<i>Arabidopsis</i>	<i>ppr40</i>	III	PPR40	Nuclear	ABA hypersensitivity	Retarded growth	Zsigmond et al.	2008	Plant Physiol.
<i>Arabidopsis</i>	<i>loi1</i>	IV	COX2	Nuclear	Lovastatin insensitive	-	Kobayashi et al.	2007	Plant Cell Physiol.
<i>Arabidopsis</i>	<i>mtkas-1</i>	mtKAS	mtKAS	Nuclear	Retarded growth	-	Ewald et al.	2007	Plant Physiol.
<i>Arabidopsis</i>	<i>tom20-2</i>	Outer membrane	TOM20	Nuclear	Retarded growth	-	Lister et al.	2007	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>tom20-3</i>	Outer membrane	TOM20	Nuclear	Retarded growth	-	Lister et al.	2007	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>tom20-4</i>	Outer membrane	TOM20	Nuclear	Retarded growth	-	Lister et al.	2007	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>metaxin</i>	Outer membrane	METAXIN	Nuclear	Abnormal growth	Male sterility	Lister et al.	2007	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>dgs1</i>	Outer membrane	DGS1	Nuclear	Retarded growth	Plastid lipid biosynthesis	Xu et al.	2008	Plant J.
<i>Arabidopsis</i>	<i>mtom64-2</i>	Outer membrane	MTOM64	Nuclear	-	-	Lister et al.	2007	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>mrp11-1</i>	Ribosome	RPL11	Nuclear	-	-	Pesaresi et al.	2006	Plant Cell
<i>Arabidopsis</i>	<i>ppr336</i>	Ribosome	PPR336	Nuclear	-	-	Uyttewaal et al.	2008	J. Mol. Biol.
Maize	NCS2	I	NAD4, NAD7	Mitochondrial	Abnormal growth	Male sterility	Mariefeld et al.	1994	Genetics
Maize	NCS6	IV	COX2	Mitochondrial	Abnormal growth	Male sterility	Lauer et al.	1992	New Biol.
Maize	NCS4	Ribosome	RPS3/RPL16	Mitochondrial	Abnormal growth	Male sterility	Newton et al.	1996	Dev. Genet.
Maize	<i>emp4</i>	-	RPS2/RPS3/RPL16	Nuclear	Seed-lethal	-	Gutierrez-Marcos et al.	2007	Plant Cell
Sugar beet	G-CMS	IV	COX2	Mitochondrial	Male sterility (Sporophyte)	-	Ducos et al.	2001	Plant J.
Tobacco	CMS1	I	NAD7	Mitochondrial	Abnormal growth	Male sterility	Chetrit et al.	1992	Curr. Genet.
Tobacco	CMS2	I	NAD7	Mitochondrial	Abnormal growth	Male sterility	Chetrit et al.	1992	Curr. Genet.
Tobacco	NMS1	I	NAD4	Nuclear	Abnormal growth	Male sterility	Brangeon et al.	2000	Plant J.

Table S7 List of the accessions selected for the development of a rice diversity r						
No.	Name	WRC No.		No.	Name	WRC No.
1	Nipponbare	WRC 1		44	Khao Nok	WRC 46
2	Kasalath	WRC 2		45	Jaguary	WRC 47
3	Bei Khe	WRC 3		46	Khau Mac Kho	WRC 48
4	Jena 035	WRC 4		47	Padi Perak	WRC 49
5	Naba	WRC 5		48	Rexmont	WRC 50
6	Puluik Arang	WRC 6		49	Urasan 1	WRC 51
7	Davao 1	WRC 7		50	Khau Tan Chiem	WRC 52
8	Ryo Suisan Koumai	WRC 9		51	Tima	WRC 53
9	Shuusoushu	WRC 10		52	Yun 83-149	WRC 54
10	Jinguoyin	WRC 11		53	Tupa729	WRC 55
11	Asu	WRC 13		54	Milyang 23	WRC 57
12	IR 58	WRC 14		55	Neang Menh	WRC 58
13	Co 13	WRC 15		56	Neang Phtong	WRC 59
14	Vary Futsi	WRC 16		57	Hakphaynhay	WRC 60
15	Keiboba	WRC 17		58	Radin Goi Sesat	WRC 61
16	Qingyu	WRC 18		59	Kemasin	WRC 62
17	Deng Pao Zhai	WRC 19		60	Bleiyo	WRC 63
18	Tadukan	WRC 20		61	Padi Kuning	WRC 64
19	Shwe Nang Gyi	WRC 21		62	Rambhog	WRC 65
20	Calotoc	WRC 22		63	Bingala	WRC 66
21	Lebed	WRC 23		64	Phulba	WRC 67
22	Pinulupot 1	WRC 24		65	Khao Nam Jen	WRC 68
23	Muha	WRC 25		66	Chin Galay	WRC 97
24	Jhona 2	WRC 26		67	Deejiaohualuo	WRC 98
25	Nepal 8	WRC 27		68	Hong Cheuh Zai	WRC 99
26	Jarjan	WRC 28		69	Vandaran	WRC100
27	Kalo Dhan	WRC 29				
28	Anjana Dhan	WRC 30				
29	Shoni	WRC 31				
30	Tupa 121-3	WRC 32				
31	Surjamukhi	WRC 33				
32	ARC 7291	WRC 34				
33	ARC 5955	WRC 35				
34	Ratul	WRC 36				
35	ARC 7047	WRC 37				
36	ARC 11094	WRC 38				
37	Badari Dhan	WRC 39				
38	Nepal 555	WRC 40				
39	Kaluheenati	WRC 41				
40	Local Basmati	WRC 42				
41	Dianyu 1	WRC 43				
42	Basilanon	WRC 44				
43	Ma sho	WRC 45				

Table S8 Primers used for probe synthesis and quantitative RT-PCR of mitochondrial genes

Oligo name	Pligo sequence	Oligo name	Pligo sequence	Oligo name	Pligo sequence
288F3	GCATGATGATCCGATAATC	atp1-F	ACAGAGCTCTTTTATCGCGG	nad9-F	GATCGATATTTGCGGAGTGG
288R3	TAGGTTTCGTTATCAGCGG	atp1-R	TCCCCCTTTTCGTTGAAGG	nad9-R	TATCCGTCGCTACGCTGTTC
288F	ATGCAGGAAGCTGCTAATCG	atp6-F	AGGGTATGATACCCCTTAGC	orf152a-F	TGAGTCCGAAGAACAACCTTGC
288R	AGGAAGCGGAGTTTTGATCC	atp6-R	GAGATCGTAGAAACATGAGC	orf152a-R	TGAAATGGAAGAGTAGGCGG
		atp9-F	TGAATTGAGAAAGCCGGTGG	orf152b-F	CACTCTTTTCCACCCATCC
763-1F	AAGAGGACTGTTTGCATCGC	atp9-R	TCAGAAAGGCCATCATTGGG	orf152b-R	TCAGGGCTCTGAGTTGAAG
763-1R	CCTTTTCCAAGGACTTTTCG	ccmB-F	GTCACGCCCTTAATGATAGG	orf153-F	TGTGGCATGGACCTTGATC
763-2F	CGAGACGTCGTAACCAACA	ccmB-R	CCCTTCTGTTTCTATAGAGG	orf153-R	TGTGGCATGGACCTTGATC
763-2R	AGATGTAAGGAAGCTGAAGC	ccmC-F	ACCGGTACAGAAATTGTTGC	orf160-F	ATGAGTTTACCCGGCACTAG
763-3F	CCAGGGTACTTACTAAAAGC	ccmC-R	GGTATTCCTTCTCGAGCTTC	orf160-R	TGACGGAATGCAGCATTTC
763-3R	TTCCGATAGAGCGGAAAGCA	ccmFc-F	GTGCATCTTATGTTGGGTG	orf161-F	TCCGACAATGAGATTCTAC
		ccmFc-R	GCCAACAGAAATCCTATCCG	orf161-R	AAAAGATGGACATCGCATCG
		ccmFn-F	CAGGACCAGGAACCAATTCCG	orf162-F	TTCCACGCTCCTAGAATTG
		ccmFn-R	TAACCAGCCCAGCAATAAGC	orf162-R	CTAAAAGCTATCGCACCCAGG
		cob-F	AAAGGATCTGTAGTTCGGG	orf165-F	CTCGATGAAACCTCTACTTC
		cob-R	TAAGAGACTGATCCGGTGGC	orf165-R	TCAGCTGTTAGAGCAAAGG
		cox1-F	TGTACTTTCTATGGGAGCCG	orf173-F	TTGCAATCAGCCCCAAATCC
		cox1-R	TTGATAGCTGGAAGTTCTCC	orf173-R	AGGTGTAATAGGACTCCCAG
		cox2-F	TTCGGACTATAACAGTTCCG	orf176-F	AGGAGTGTAACCACGTACG
		cox2-R	TGATTGGATACCCAATCCCG	orf176-R	TAAGGCAGCTGCAAGAACAG
		cox3-F	TGGGGTTTTAGATCCTTGGG	orf181-F	ACCAGACTACATGCCAAGAC
		cox3-R	ACCTCCCACCAATAGATAG	orf181-R	GCTAAAATAGATGCCAACCGCA
		mat-r-F	TTGCATAGCTCAGGTGAGAG	orf183-F	AGAGAAAGAGGGAGATGGAC
		mat-r-R	AAGCTTCCAAGCTCTATGC	orf183-R	AGCTTTGGATCATCGCTAAG
		nad1-F	GCAGCATTTCCACGATATCG	orf187-F	ATGACCCGCATCTACAACCT
		nad1-R	TTCAAAACCGTACGTGGAGC	orf187-R	AGAGCAGAGGACTCGAAATC
		nad2-F	TTTTAGCGGTTTCCCAGAG	orf194-F	TCGCCTTTGATGACTCGTTG
		nad2-R	TATAGAGCGAAAGAGCTGCC	orf194-R	CACTTGTCTATGAGTGTCCG
		nad3-F	TGTTTACAACGCGAGAAACG	orf224-F	CCTCTACTCTAATTGGATCC
		nad3-R	CACCCCTTTTCCATTCATAG	orf224-R	TCAAGTTTCAAGTCTGCTTC
		nad4-F	CCAATATGAGTTTACCCGGC	orf241-F	GGGATCTCAGTCTATTGTGC
		nad4L-F	AGACAGGATGTATTGACCC	orf241-R	TCCAAGCTTTGTAGCAGG
		nad4L-R	TTCGACAGCAATAGTCCCTC	orf258-F	AATTTGCTACCCGTGTCTGC
		nad4-R	GCCATGTTGCACTAAGTTAC	orf258-R	CATCCATCCCAAAGCAGGTC
		nad5-F	ATACTTTTGGCTCTCGGGAG	orf25-F	TCAAAGAAACTCTCGACGGG
		nad5-R	TCCGTTGCAGAAAAGAGACC	orf25-R	TAGGACTATCAAGCCTTCCC
		nad6-F	TCAAATAGCGGAGATTACG	orf284-F	CTATCTGAGCCTTACGAGC
		nad6-R	TTTGGTCTGTCCTCCTCCTC	orf284-R	GGAATTCGGTTCTTCGAGC
		nad7-F	ATCCGTATCGAAGAGATGCG	orf288-F	ATGCAGGAAGCTGCTAATCG
		nad7-R	ACCTCTCAAACACAATATC	orf288-R	AGGAAGCGGAGTTTTGATCC

Table S7 continued

Oligo name	Pligo sequence	Oligo name	Pligo sequence
orf490-F	AGATGATCGCAAGTCCACTG	rrn5-F	GAAGCATCGGACCAATGATC
orf490-R	TTAACCTCCACAATGGAGGC	rrn5-R	TTTGACCATGTCTCCCGAAC
orfB-F	CTTCTGTTATGCTTTTCC	trnC-F	CCCATTTTAGAACCCTTAC
orfB-R	AGATTATGCTTCCTTGCCCG	trnC-R	CGGCACCCAGATTTGAAGT
orfX-F	GCTTCTCCTTGTTCCTGTT	trnD-F	TTGTAACCGGCTTTTCACCG
orfX-R	CTTTTTCTCGATCGAGCCC	trnD-R	GAAGACAAAATGAGTCGGGC
pseudo-rpl16-F	TGCAGATGTAGTAGGGGTTG	trnE-F	CTGGAGTCAAAGGAGCTTTC
pseudo-rpl16-R	CGACCACTGAACAACTTGG	trnE-R	ATCCCTTACGGGAATCGAAC
pseudo-rps11-F	GA AAAAACAACGGCCGAGAC	trnF-F	TGAGGGTTCAAGTCAAGTCC
pseudo-rps11-R	TGTGGAAGTTGGGTCACATC	trnFM-F	TGTACATTTGGTACTGGTC
pseudo-rps14-F	CACAAACGTAGATTGCTCGC	trnFM-R	GACAGGATTCGAACCTGCAG
pseudo-rps14-R	ATGCCCATCAAAGAACCTCG	trnF-R	GCCAGGAACCAGATTTGAAC
pseudo-trnL-F	CCTAGTCACTCGCTAAAGC	trnH-F	ACACTTCCAAGTCCTAAGAG
pseudo-trnL-R	ATGTTGGAGCAAGAAGACGC	trnH-R	CGAACGACGGGAATTGAACC
pseudo-trnP-F	GTGATATGAGGTTGAACAGGC	trnK-F	TCAACATCTCGACTTCGCTC
pseudo-trnP-R	GGGATGACAGGATTGAACC	trnK-R	TCCTACGAGATTGACGTTCCG
pseudo-trnV-F	TGAGGTTTACTCCTCCATG	trnL-F	CCTTGAGTCAGAGGCTTAC
pseudo-trnV-R	GTCTCATATTCCACTCTTGC	trnL-R	TTAGTAGGGCTCGAACCTAC
rpl2-F	TGCGATTGCTCCAAACCTTC	trnM(54284)-F	CTCAACACTTTTCTTGCTCC
rpl2-R	TCCATGAGGATGATCCACTG	trnM(54284)-R	CCTACTATTGGATTGAACC
rpl5-F	AGTACCAAAAAGCTGCCTCTG	trnM-F	CCAACATTTGTGACGGCTAC
rpl5-R	TTTCCCCCTCATTTTTAGC	trnM-R	CCTACTATTGGATTGAACC
rps12-F	GATTTCGTATGGTAGAGAAG	trnN-F	GGGACATCAAAGTGGGAAG
rps12-R	GATTTTGGTCTTTCTGCACC	trnN-R	TTACCAAGGACTGAGTTCCC
rps13-F	CTTCCGATGAACAAGTCAAG	trnP-F	CGCCTAAGATCGAAAATGCG
rps13-R	GAGTTCGTTGACCGCGTAAG	trnP-R	CAAGGTGACAGGATTCGAAC
rps19-F	TTCCAATCCCAACCATGGTG	trnQ-F	CATCCATCCCACTCATATAG
rps19-R	CTCCGTGTAAGCAAACTC	trnQ-R	GGAGTAAAAGGATTGCAACC
rps1-F	AGATGAGCTTACAGGACTGC	trnR-F	TTAGGACAAGCACGAAGAGG
rps1-R	CCTCCTTTTAGGGTTAAAGC	trnR-R	CGTCCAATAGGATTGAACC
rps2-F	TTTCAACTGTGGAGCCCTTC	trnS(336728)-F	AACTCTGAGATAGCACAGC
rps2-R	CTATTTGGCTAATGCCATCC	trnS(336728)-R	GGAGGAAATGGGATTGCAAC
rps3-F	CCTCATGGGTAAGGATAAGG	trnS(357852)-F	ATGGCGTAGCGTACGTTATG
rps3-R	CTTCCGCATTCAAGTTCTAG	trnS(357852)-R	GGAAAGAGAGGGATTGCAAC
rps4-F	CCGCGGTGAAGAAATAAGGA	trnS-F	CTTTGACTCACGAACTCGAG
rps4-R	TCCGAAGAGGAAGGTTTGGA	trnS-R	GGATGGAGAGGGATTGCAAC
rps7-F	AACTTTCGCATGATCGATGG	trnW-F	GCTTTATCTCCTGTCGTAAG
rps7-R	TACCACCATCTGAAATGCGC	trnW-R	CCTCAAACAAGAGTTCCAC
rrn18-F	TTGTGTTGCTGAGACATGCG	trnY-F	ACGACTGTTGCACTTCACTC
rrn18-R	TACGGCTACCTTGTTACGAC	trnY-R	GAGGCAGGATTGCAACCTAC
rrn26-F	TCTCGCTCAACGGATCAAAG		
rrn26-R	AGTACGAGATCGCTTCACAC		

Table S9 Information of DNA markers used in <i>Rf17</i> positional cloning						
Marker name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Polymorphism detection*	BAC clone accession	CWR vs. SL209 polymorphism type	
AT4-1	ACTGAAGCAAGTGACGTACG	CACCACTAGTCCACTAGTTC	PCR	OSINBa0016002	SSR	
AT4-3	GTTGTGAGTTGTGAACGCAC	ACATCTCGCTACTGACAGCA	-	OSINBa0016002	-	
AT5-1	ATGGAACGAAGGAGATATGC	GTAGCACAGATGTTGTTCCGG	-	OSINBa0089K21	-	
AT5-2	CACTAGCTAGCTTATGGACC	GTACTCCCAACCAATCTACTC	-	OSINBa0089K21	-	
AT5-3	AGTCTCCGTAACACACGATCG	GCTTCAGAAGGACCACATGAGA	-	OSINBa0089K21	-	
AT5-4	GTAGGGAAGGAGAGTTAACC	TGATGAGCATGCACGCTCTTC	-	OSINBa0089K21	-	
AT5-5	ATGTTTTCCACAGTTACCGC	GTTATGTGTGCGTGTGATGAGC	-	OSINBa0089K21	-	
INDEL5-1	CCTGCACTGACCATCTTTCA	ATCGGTTGAAACCAGCTGAC	-	OSINBa0089K21	-	
INDEL5-2	GAGGCACATGACGAGATTGA	ATCAGTAGCCGTGGAACACC	PCR-RFLP(MspI)	OSINBa0089K21	INDEL	
INDEL5-3	GAAAGGATGGCGTGTAGCAT	CTGGTTGCCTGCCCTATATC	-	OSINBa0089K21	-	
INDEL5-4	TTGTTCCGTTATCCCAAGACA	CTCCTTCCGATCCAATCAAA	-	OSINBa0089K21	-	
INDEL5-5	CGCTTTTACAGGGTGACCTAC	TCCATTACCTCACCTCACA	-	OSINBa0089K21	-	
INDEL6-1	CATAGCCGGCCAGAACTAAG	TAGTAGCGCTGCAGAAAGTG	PCR-RFLP(HhaI)	OSINBb0022F23	INDEL	
INDEL6-2	AACCATCCAAGGAAAGTGACG	GCCTTGAAACAGGATGAAA	-	OSINBb0022F23	-	
INDEL6-3	TGTCAGGGTTACGGGTTAGG	GACCGGCTGAGATTAGCATC	-	OSINBb0022F23	-	
INDEL6-4	TTGGTATGTCTCGAATCCA	TGATTGACAGCCAAACAGGA	PCR-RFLP(HhaI)	OSINBb0022F23	INDEL	
INDEL7-1	AACTCCACATGCATGCCATC	CTGTAATCGCTTTGAGATGC	PCR	OSINBa0022H21	SCAR	
INDEL7-15	AGAGACCCAGTAGAGTAGAG	TCAATGGGTATGTGTCATG	-	OSINBa0022H21	-	
INDEL7-18	GTCATTCTCGTAAACAAAGCG	TCCATTGGAACACTACTCCCTC	PCR	OSINBa0022H21	INDEL	
INDEL7-2	ATTTCCGGGGCTCATAATGGG	AGAAAGCCCGACACTCCATT	PCR	OSINBa0022H21	INDEL	
SNP7-10	GATGGCTACTACATCCACC	GGGAATTACGCCAGAAATGC	-	OSINBa0022H21	-	
SNP7-11	CCACCATCTAAACATCGGTG	AGAAGGCAGTGCAAAAGGGAG	-	OSINBa0022H21	-	
SNP7-12	AAACATGCTTTGGGCAAG	GCTTGACAACTTTGAGTGGG	-	OSINBa0022H21	-	
SNP7-14	CGGTACGAAATTTTCAGTAGC	ATCTCGTGC AAAACAAGCC	PCR	OSINBa0022H21	INDEL	
SNP7-16	GAGCCAACTGCAACGAGTTC	GTGGTACCATCTCTAGTATCC	PCR	OSINBa0022H21	INDEL	
SNP7-17	ACGTCCTTGTGTTTGTGTC	TTGATCGTGGCGATTCTATGG	PCR	OSINBa0022H21	INDEL	
SNP7-20	ATTATCTGCACACCTGGTG	TGAGAAATTCACGGGAACGG	-	OSINBa0022H21	-	
SNP7-21	GGAAGAAGTGATTCGCTCAAC	GGGTAGGATGATTCAGATGC	PCR-RFLP(SpeI)	OSINBa0022H21	SNP	
SNP7-23	GATCCAAGCTAGCTTCTACC	GCCCTCAATTTAGCTCCAAC	-	OSINBa0022H21	-	
SNP7-25	CCGAACTGCTCTTCATATGAAC	GACTGAGCTGAAGCTAACTC	-	OSINBa0022H21	-	

Table S9 continued						
Marker name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Polymorphism detection*	BAC clone accession		
SNP7-26	GGTATGATGATCAGCTGCC	GTAGTAGGGCCCTTTGCTTG	PCR-RFLP(MspI)	OSJNBa0022H21	SNP	
SNP7-3	AACCTCTGTGCGACTGAA	GTGGAAATGCTAGAATGAC	-	OSJNBa0022H21	-	
SNP7-4	CCACCACCTGATGCCAACTAC	ATGACATGCGAACACAGCTCAC	PCR-RFLP(HhaI)	OSJNBa0022H21	SNP	
SNP7-5	CGGTGCTGTATTATCTCC	TTATTCTCTGGAGGGTGCA	PCR-RFLP(MseI)	OSJNBa0022H21	SNP	
SNP7-8	ATCCGATGAAACCCAACTCG	CCTAACTTATCATCCTCGCC	-	OSJNBa0022H21	-	
SNP7-9	TCTTATGCCGTTGGCTGTTG	CGTCAAGTGTCTATCTGTG	-	OSJNBa0022H21	-	
AT8-1	AGTCAGCTGACTCCATAGGT	ACCATCGTATTTTATCCCGC	-	OSJNBa0044K18	-	
AT8-2	CGAAATCGTAGCTAGCTAGG	GACTAAAGATCGAGCTGACC	-	OSJNBa0044K18	-	
AT8-4	ATTCACCCACTGGTGGAGAA	GGTGAATCTACTACGACGG	-	OSJNBa0044K18	-	
AT8-5	TCTTGGTTTTGAGCCTCTG	CTCCATTTCCGGTCTTCCT	-	OSJNBa0044K18	-	
INDEL8-1	ACAGAGACCAATTTCCCTC	TGCTCGATGTCGAAATCGCC	PCR	OSJNBa0044K18	INDEL	
INDEL8-2	GTGGGTTGCTTCTACACTG	GTTTCTGTGTAGGAATGCC	PCR	OSJNBa0044K18	INDEL	
RM3839**	AATGGACCAGAAAGCACAC	AAAAAGAGCATGGGGGCTAC	PCR	OSJNBa0044K18	SSR	
S13322***	TGGTGCAGACATTCCTGAGAT	AGGGTCTCGGGTGTAGATTGC	PCR-RFLP(HaeIII)	OSJNBa0044K18		
SNP8-3	ACTCTGATCATTTGGGCTC	TGTTAACTGCAGGACATGGG	-	OSJNBa0044K18	-	
SNP8-4	AGGTGTACAGGCTTGAATGC	AGAGCAGTAGGAGAGGATG	PCR	OSJNBa0044K18	INDEL	
SNP8-5	CTGAATGTGGGAAGCAACAG	CCAGGAGGTACAATGATCTC	-	OSJNBa0044K18	-	
SNP8-6	AGGACTGAAACCCCACTCAG	CAGGGAAGAATCTTGATCGG	-	OSJNBa0044K18	-	
SNP8-7	AGCAGCTCATGCAAAACGTG	AGATGCAGAACCGGTACTACT	-	OSJNBa0044K18	-	
SNP8-8	GACATAGATGGTGCACTGTC	CTACGATGGCCCACTAGATG	-	OSJNBa0044K18	-	
SNP8-9	GGGAATGCTGGCTTAATGGG	GCGATCACTAGTTCACCCAG	-	OSJNBa0044K18	-	
INDEL9-1	ACGACAATACCGCCATGATG	CGTACGGAGTAAACTTGGAC	-	OSJNBb0011N17	-	
INDEL9-2	ATCCATGCAATTCCTTCCCG	CCAGGTTTTGGTGGCTTTG	-	OSJNBb0011N17	-	
INDEL9-3	AAGACAACCCCTGGTTCCGG	AAGCGAACTAACCCGATTGCG	-	OSJNBb0011N17	-	
GT10-1	GCAGTCAAATCCGATGGTAG	ATTAGATGCGTCAACTCCACGA	PCR	OSJNBa0081L15	SSR	
INDEL10-1	TCGTTCAACTCCACTGCAAG	GTAGGAAGCTTCACTTCGC	-	OSJNBa0081L15	-	
TG10.5-1	TGGTAGAAAAACCTCAACCCC	CGAGACTACTACTCTCTCG	PCR	OSJNBa0081L15	SSR	

* No polymorphisms detected (-)

** McCouch et al. (2002)

*** <http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/caps/index.html>

Table S10 Information of genes predicted in <i>Rf17</i> region						
Genes predicted in <i>Rf17</i> locus	TIGR_ID	RAP-DB_ID	WhoGA	Primer for RT-PCR-1	Primer for RT-PCR-2	
<i>ORF1</i>	LOC_Os04g39910	Os04g0475100	OSJNBa0022H21.G19	ATCTGATGCTGGTATTCCGG	GGAGCTGTGAGAACTTGAG	
<i>ORF2</i>	-	Os04g0475200	OSJNBa0022H21.22	CAAAACACAAAACGCACACTGG	TCCTCTTGGATGCACCAAAG	
<i>ORF3</i>	LOC_Os04g39930	Os04g0475200	-	GTCTGCTTGACTTGGAAACAC	GCTCAGTTGCTGAACCTTTCAGAG	
<i>ORF4</i>	LOC_Os04g39940	Os04g0475200	-	TCTTCGTCGAAGGCTCCCGCATCCTCTTC	TAGGATTCACGCGTGTCTAC	
<i>ORF5</i>	LOC_Os04g39950	Os04g0475300	-	ACTTCTCTGCCCATCTCAAC	TAGCCAGGGAGCTTATCTG	
<i>ORF6</i>	LOC_Os04g39980	Os04g0475600	OSJNBa0022H21.25	GTTCAAGGAGTTCCTCCAGAAG	AAGGAGAATCGAACCTGCGTG	
<i>ORF7</i>	-	-	OSJNBa0022H21.26.spp	GGTCGTCCGTTCTGTCACCTC	AAGAGCTAATTCGTGCCCTC	
<i>ORF8</i>	LOC_Os04g39990	-	OSJNBa0022H21.G24	-	-	
<i>ORF9</i>	LOC_Os04g40000	-	OSJNBa0022H21.29	-	-	
<i>ORF10</i>	-	-	OSJNBa0022H21.G26	ATGGAAAAGAGCCCAAGGTGC	TTAGTAGTGGCTCTCTCCTCC	
<i>ORF11</i>	LOC_Os04g40020	Os04g0475900	OSJNBa0022H21.G29	ACTCGGTTCCAGGCGATGGTGAA	GGTGGCTAAAACCTGGCCAGCCAAAAC	
<i>ORF12</i>	-	-	OSJNBa0022H21.G30	TCAGGACGAGAGCCCTCAAG	AAATCCTTTTCTGGAGACCCG	
<i>ORF13</i>	-	-	OSJNBa0022H21.34	TTCCACCATCGCTGGAAACCGAGTC	TCCTCAAGTACCATGCACAAAACAG	
<i>ORF14</i>	LOC_Os04g40030	Os04g0476000	OSJNBa0022H21.E14	GTGGAGAGAAGAGGGGAAAC	GCTCAGTTGTCTAACTTGAC	
<i>PPR1</i>	LOC_Os04g39970	Os04g0475500	-	CAATCTTCGCACGTTTACG	TCACTACCAGTGACACATCC	
<i>PPR2</i>	LOC_Os04g40010	Os04g0475800	OSJNBa0022H21.G27	TCGTTACCACCGTAGATAGACTCAT	CCCACATCTTCTCTTGCAATAATCC	

Table S11 Summary of SNPs and InDels detected by the comparison of CWR and Nipponbare <i>Rf17</i> region,			
polymorphism position	polymorphism types*	nearest gene1	nearest gene 2
89251	T insertion	5'UTR or promoter, pred11, PPR7-1	-
89252	C insertion	5'UTR or promoter, pred11, PPR7-1	-
89254	A insertion	5'UTR or promoter, pred11, PPR7-1	-
89255	T insertion	5'UTR or promoter, pred11, PPR7-1	3' UTR, orf7, hypthetical protein
95931	G insertion	5'UTR or promoter, orf8, retrotransposon	3' UTR, orf7, hypthetical protein
95932	G insertion	5'UTR or promoter, orf8, retrotransposon	3' UTR, orf7, hypthetical protein
95948	C insertion	5'UTR or promoter, orf8, retrotransposon	3' UTR, orf7, hypthetical protein
106132	C deletion	exon coding, orf9, transposase	-
106133	C deletion	exon coding, orf9,, transposase	-
106836	G deletion	5'UTR or promoter, orf9,, transposase	5'UTR or promoter, orf10, hypothetical protein, KOME
107768	G deletion	intron, orf10, hypothetical protein, KOME	-
107769	G deletion	intron, orf10, hypothetical protein, KOME	-
112743	T to A	exon coding, pred15, PPR7-2	-
119024	T deletion	intron, orf12, hypothetical protein	-
119033	A deletion	intron, orf12,, hypothetical protein	-
122030	C to T	5'UTR or promoter,orf14, F-box TPR	-
122032	C to A	5'UTR or promoter, orf14, F-box TPR	-
122038	C to A	5'UTR or promoter, orf147, F-box TPR	-
122040	C to T	5'UTR or promoter, orf14, F-box TPR	-
122065	T deletion	5'UTR or promoter, orf14, F-box TPR	-
122781	A to C	5'UTR or promoter, orf14, F-box TPR	-

Table S12			
Designation of gene in this study	RAB-DB_ID	TIGR_ID	Chapter/Section analyzed
DCW11	Os02g0255100	LOC_Os02g15594	1/2
DCW11L	Os06g0526800	LOC_Os06g33549	1/2
DBA	Os03g0811900	LOC_Os03g59740	1/2
OsNek1	Os03g0636800	LOC_Os03g43590	1/3
OsNek2	Os12g0604700	LOC_Os12g41180	1/3
OsNek3	Os07g0176600	LOC_Os07g08000	1/3
OsNek4	Os05g0440800	LOC_Os05g36960	1/3
OsNek5	Os01g0864700	LOC_Os01g64490	1/3
OsNek6	Os02g0590800	LOC_Os02g37830	1/3
OsPLIM2a	Os02g0641000	LOC_Os02g42820	1/3
OsPLIM2b	Os04g0532500	LOC_Os04g45010	1/3
OsPLIM2c	Os10g0503100	LOC_Os10g35930	1/3
OsLIM	Os06g0237300	LOC_Os06g13030	1/3
OsWLIM1	Os12g0510900	LOC_Os12g32620	1/3
OsWLIM2	Os03g0266100	LOC_Os03g15940	1/3
Tublin-alpha1 chain	Os07g0574800	LOC_Os07g38730	1-3/-
AOX1a	Os04g0600200	LOC_Os04g51150	1/2
OsKAS1a	Os04g0643300	LOC_Os04g55060	3/-
OsKAS1b	Os06g0196600	LOC_Os06g09630	3/-
OsKASII	Os07g0616200	LOC_Os07g42420	3/-
OsKASIII	Os04g0445700	LOC_Os04g36800	3/-
OsmtKAS	Os02g0196900	LOC_Os02g10320	3/-
RMS	Os04g0475900	LOC_Os04g40020	3/-
PPR2	Os04g0475800	LOC_Os04g40010	3/-