

# テンサイS型雄性不稔細胞質のctDNA点突然変異域の塩基配列

誌名	てん菜研究会報 = Proceedings of the Sugar Beet Research Association
ISSN	09121048
巻/号	31
掲載ページ	p. 134-139
発行年月	1990年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## テンサイS型雄性不稔細胞質のctDNA 点突然変異域の塩基配列

柳井幸弘・久保友彦・三上哲夫・木下俊郎  
(北海道大学農学部)

### 1. 緒言

テンサイの実際育種に使用されているS型細胞質雄性不稔系統から抽出したミトコンドリア(mt)DNAは、正常細胞質(N型)由来のmtDNAとは顕著に異なっている(MIKAMI *et al.*, 1984a, b, c)。一方、葉緑体(ct)DNAについて、10種以上の制限酵素を用いた切断パターンの比較分析の結果から、両細胞質間に差異が見られるのはHind III による切断パターンのみであった。このS型ctDNAと同じHind III切断パターンの差異は、野生ビートより由来している細胞質を有する雄性不稔系統の一部にも共通して見出された(MIKAMI *et al.*, 1985)。従って、S型雄性不稔細胞質を特徴づける変異として注目してよい。更に、同様の結果は起源を全く異なる東ドイツの細胞質雄性不稔系統を用いた実験においても得られている(FRITZSCHE *et al.*, 1987)。

本報ではS型ctDNAにおけるHind III サイト変異の生起機構について塩基配列レベルでの差異を調べ、雄性不稔性との関連性についても検討を加えた。また塩基配列を分析した結果から、変異部の近くには2種のtRNA遺伝子及び4種のタンパク質コード遺伝子が存在することを検出した。

### 2. 材料及び方法

S型細胞質を有する雄性不稔系統TK81-MS と、その維持花粉親系統(N型細胞質)のTK81-Oを供試して、MIKAMI *et al.*, (1984c) の手法によりctDNAを調製した。プラスミドベクターpUC118/119を用いてctDNAの制限酵素切断断片をクローン化した。塩基配列の決定は、ジデオキシヌクレオチド法(SANGER *et al.*, 1977)に従った。

### 3. 結果

#### (1) Hind III サイト変異

テンサイのN型及びS型細胞質のctDNAについては、既にSma I, Pst I, Pvu II, Xho I 及びHind III を用いた酵素切断地図が作成されている(KISHIMA *et al.*, 1986, 1987; 貴島, 1988)。この

地図に基づけば、S型ctDNAに見出される変異は、大単一配列左方域に位置する5.7kbpのHind III 断片内で生じたHind III サイトの獲得変異に起因する(Fig.1a)。変異生起の分子機構を調べるため、まず変異域を含むDNA断片のクローニングを行なった。クローン化断片として、N型ctDNAから5.7kbpのHind III 断片を選び、他方S型ctDNAからは3.0kbpと2.7kbpのHind III 断片ならびに両断片と重複して変異域を含む3.5kbpのSal I-Sac I断片を用いた。Fig.1bに示すように6種の制限酵素を用いてクローン化DNAの制限酵素切断地図を作成したところ、N型とS型の間でHind III を除く制限サイトに全く差異が見られなかった。

次いで変異域をほぼ中央に持つ3.3kbpのBgl II-EcoR I 領域に関して、N型、S型両ctDNAの塩基配列を決定した(Fig.1c)。その結果によると、S型ctDNAにおいては4箇所まで1塩基置換、1箇所まで1塩基欠失のあることを見出した。5種の点突然変異のうち、Bgl II サイトに最も近い部位を占める変異は、チミン(N型ctDNA)からシトシン(S型ctDNA)への塩基転位(transition)であり、この塩基置換によってS型ctDNAに5'-AAGCTT-3' というHind III サイトの生じたことが判明した(Fig.2)。また、既に全塩基配列の決定されているタバコctDNA(SHINOZAKI *et al.*, 1986)における相同配列の検索を通じて、S型ctDNAのHind III サイト変異部位が

#### (2) 葉緑体遺伝子

塩基配列の分析結果から、trnP(プロリンtRNA)遺伝子、trnW遺伝子、petE遺伝子、psbE遺伝子、psbF(光化学系IIシクロムb559kdポリペプチド)遺伝子及びpsbL(光化学系II 3.2kd

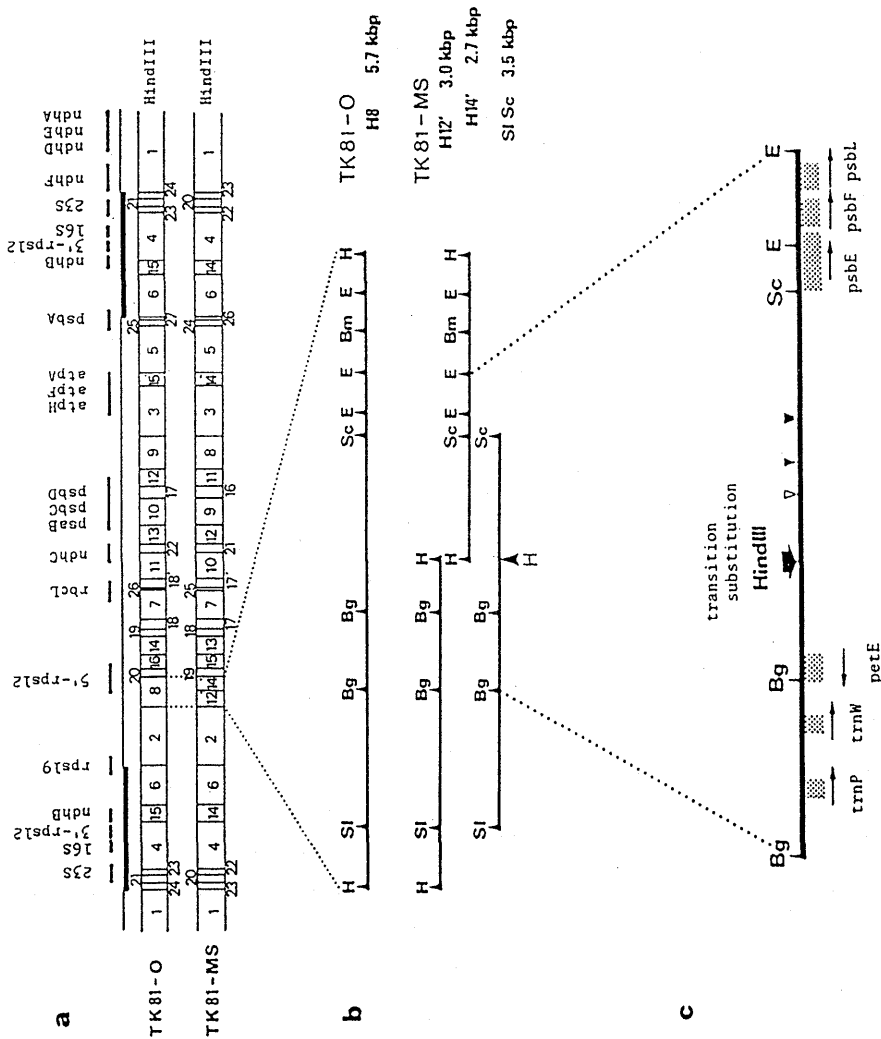


Fig. 1 a : Comparison of HindIII restriction maps between ctDNAs extracted from normal (TK81-0) and S male sterile (TK81-MS) cytoplasts. b : Detailed maps of cloned HindIII fragments. Restriction sites are denoted as HindIII (H), Sal I (S1), BglII (Bg), Sac I (Sc), EcoR I (E) and BamHI (Bm). c : Schematic diagram showing the arrangement of a HindIII site mutation and chloroplast genes. The dotted areas indicate the coding regions of the chloroplast genes. The 1 bp substitution and deletion points are marked with vertical black and white arrowheads respectively.

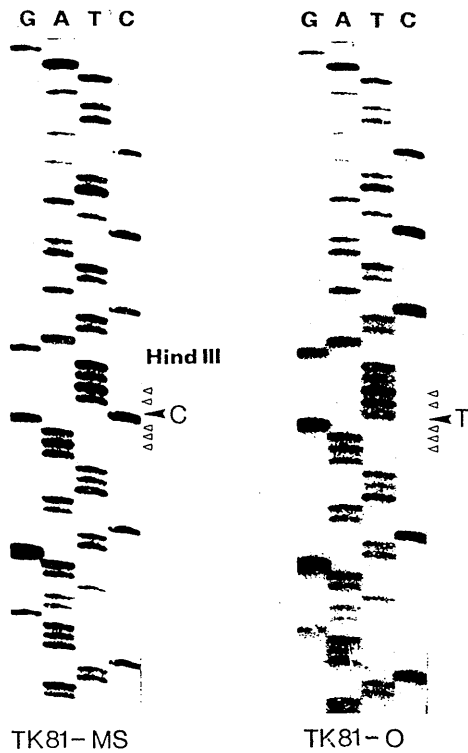


Fig. 2 Comparison of sequencing ladder patterns between ctDNAs extracted from S (TK81-MS) and normal (TK81-0) cytoplasm. The lbp substitution generating Hind III restriction site in S ctNDA is marked with black arrows.

Table 1 Constitution of six chloroplast genes in sugarbeet and their homology with the corresponding genes from other plant species.

Genes		Sugarbeet		Homology (%) with							
		Nucleotides	Amino acids	Tobacco	Liverwort		Rice		Wheat		
				nuc. <sup>1)</sup>	a.a. <sup>2)</sup>	nuc.	a.a.	nuc.	a.a.	nuc.	a.a.
<i>trn</i>	P	74	—	97.3	—	94.6	—	98.6	—	98.6	—
<i>trn</i>	W	74	—	100.0	—	94.6	—	98.6	—	98.6	—
<i>pet</i>	E	114	37	94.7	100.0	81.6	86.0	92.1	100.0	—	—
<i>psb</i>	E	249	82	95.6	98.8	84.3	89.0	94.8	98.8	94.0	98.8
<i>psb</i>	F	120	39	90.0	92.3	80.8	92.3	93.3	94.9	92.5	92.3
<i>psb</i>	L	114	37	94.0	97.4	85.5	89.5	90.6	97.4	90.6	97.4

1) homology in nucleotide sequence

2) homology in amino acid sequence

ポリペプチド) 遺伝子とみなされる読み取り枠が見出された (Fig.1c)。それぞれの塩基配列をタバコ (SHINOZAKI *et al.*, 1986), イネ (HIRATSUKA *et al.*, 1989), ゼニゴケ (OHYAMA *et al.*, 1986), コムギ (MARECHAL *et al.*, 1987; WEBBER *et al.*, 1989)などの植物種で報告された対応遺伝子と比べると, 80~100%の高い相同性が認められた (Table 1)。これらの葉緑体遺伝子のゲノム上での配列はタバコの場合と一致した。

#### 4. 考察

雄性不稔細胞質のctDNA に構造異変が見られる例としては, テンサイのほかにトウモロコシのS型 (PRING & LEVINGS, 1978)やソルガムの milo型 (PRING *et al.*, 1982) で報告されている。しかしそれら異変を塩基配列レベルで解析したのは本報が最初の事例である。テンサイのS型ctDNA においては, 3.3.kbp にわたる領域内で4箇所の1塩基置換と, 1箇所の1塩基欠失が見出された。いずれの点突然変異も *petE* と *psbE* 遺伝子間のスペース中に生じており, この変異が葉緑体遺伝子の発現に直接影響を及ぼすとは考え難い。今後は転写産物に関する比較分析が必要となるが, ここで得られた結果はテンサイの細胞質雄性不稔性とミトコンドリアゲノムの関連性を裏付けるデータの1つとなったと考えている。

Hind III サイト変異を生じた部位は, Fig. 2 から一見してわかるように, 極めてATに富む領域中にある。他の点突然変異部位についても同様の特徴を見出せる。

更に注目されるのは, Hind III サイト変異部位の近傍には *trnP* と *trnW* 遺伝子の存在することである。最近これら2種の葉緑体tRNA遺伝子の塩基配列がコムギのミトコンドリアのマスター染色体 (MARECHAL *et al.*, 1987) とトウモロコシのミトコンドリアに存在するプラスミド (LEON *et al.*, 1989)中に相次いで発見された。しかも *trnW* 遺伝子はコムギのミトコンドリア内で転写されており, 加えてコムギのミトコンドリアゲノム独自の *trnW* 遺伝子に相当する配列が他に見出されないで, 上記遺伝子の産物であるトリプトファンtRNAがミトコンドリア内のタンパク質合成に与かっている可能性が極めて高い。著者らは, テンサイの葉緑体 *trnW* 遺伝子をプローブに用いて, これと相補性を示すテンサイのミトコンドリア DNA 断片をスク

リーニングして数種のクローンを得ている。今後これらのミトコンドリア DNA の分析を併行して進め, 葉緑体, ミトコンドリア両ゲノム間での塩基配列の移行現象と, これがオルガネラゲノムの変異や進化に及ぼす影響を検討していきたい。

またテンサイには, S型と異型の雄性不稔細胞質 (S-2, S-3, S-4) の ctDNA にも Hind III サイト獲得変異が見出され, しかも小単一配列内で生起していることがわかっている (貴島, 1988)。今後この変異部位についても詳細な解析を進め, 雄性不稔性との関連について検討を加える予定である。

#### 5. 摘要

テンサイのS型細胞質のctDNA は, 大単一配列に1箇所のHind III サイト獲得変異を含む点で, N型細胞質のctDNA と異なる。この変異部位についてN型, S型両ctDNA の塩基配列を決定して比較した結果, チミン (N型) とシトシン (S型) 間の1塩基置換により, 新たにS型ctDNA にHind III サイトを生じたことがわかった。Hind III サイトの獲得変異は, 遺伝子間のスペース中にあり, 葉緑体遺伝子の発現には直接影響を及ぼす可能性が低い。

また塩基配列の検索を通じて, 変異部の近傍に2種のtRNA遺伝子及び4種のタンパク質コード遺伝子の存在が見出された。

#### 引用文献

- 1) FRITZSCHE, K., M. METZLAFF, R. MELZER and R. HAGEMANN (1987): Comparative restriction endonuclease analysis and molecular cloning of plastid DNAs from wild species and cultivated varieties of the genus *Beta* (L.). *Theor Appl Genet*, 74, 589-594
- 2) HIRATSUKA, J., H. SHIMADA, R. WHITTIER, T. ISHIBASHI, M. SAKAMOTO, M. MORI, C. KONDO, Y. HONJI, C.-R. SUN, B.-Y. MENG, Y.-Q. LI, A. KANNO, Y. NISHIZAWA, A. HIRAI, K. SHINOZAKI and M. SUGIURA (1989): The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet*, 217, 185-194

- 3) 貴島祐治 (1988) : テンサイおよびその近縁種におけるオルガネラゲノムの変異性に関する分子遺伝学的研究. 学位論文, 北海道大学 農学部
- 4) KISHIMA, Y., T. MIKAMI, T. HARADA, K. SHINOZAKI, M. SUGIURA and T. KINOSHITA (1986): Restriction fragment map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*, 7, 201-205
- 5) KISHIMA, Y., T. MIKAMI, A. HIRAI, M. SUGIURA and T. KINOSHITA (1987): Beta chloroplast genomes: analysis of Fraction 1 protein and chloroplast DNA variation. *Theor Appl Genet*, 73, 330-336
- 6) LEON, P., V. WALBOT and P. BEDINGER (1989): Molecular analysis of the linear 2.3kb plasmid of maize mitochondria: apparent capture of tRNA genes. *Nucl Acids Res*, 17, 4089-4099
- 7) MARECHAL, L., P. RENEBERG-ROOS, J. M. GRIENENBERGER, J. COLIN, J. H. WEH, B. LEJUNE, F. QUETIER and D. M. LONSDALE (1987): Homology in the region containing a tRNA<sup>trp</sup> gene and a (complete or partial) tRNA<sup>pro</sup> gene in wheat mitochondrial and chloroplast genomes. *Curr Genet*, 12, 91-98
- 8) MIKAMI, T., Y. KISHIMA, M. SUGIURA and T. KINOSHITA (1984a) : Chloroplast DNA diversity in the cytoplasm of sugar beet and its related species. *Plant Sci Lett*, 36, 231-235
- 9) MIKAMI, T., K. SHINOZAKI, M. SUGIURA and T. KINOSHITA (1984b): Characterization of chloroplast DNA from sugar beet with normal and male-sterile cytoplasm. *Jpn J Genet*, 59, 497-504
- 10) MIKAMI, T., M. SUGIURA and T. KINOSHITA (1984c): Molecular heterogeneity in mitochondrial and chloroplast DNAs from normal and male sterile cytoplasm in sugar beets. *Curr Genet*, 8, 319-322
- 11) MIKAMI, T., Y. KISHIMA, M. SUGIURA and T. KINOSHITA (1985) : Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male-sterile cytoplasm. *Theor Appl Genet*, 71, 166-171
- 12) OHYAMA, K., H. FUKUZAWA, T. KOHCHI, H. SHIRAI, T. SANO, S. SANO, K. UMESONO, Y. SHIKI, M. TAKEUCHI, Z. CHANG, S. AOTA, H. INOKUCHI and H. OZEKI (1986): Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*, 322, 572-574
- 13) PRING, D. R. and C. S. LEVINGS 3. (1978): Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasm. *Genetics*, 89, 121-136
- 14) PRING, D. R., M. F. CONDE and K. F. SCHELTZ (1982): Organelle genome diversity in sorghum: Male-sterile cytoplasm. *Crop Sci*, 22, 414-421
- 15) SANGER, F., S. NICKLEN and A. R. COULSON (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467
- 16) SHINOZAKI, K., M. OHME, M. TANAKA, T. WAKASUGI, N. HAYASHIDA, T. MATSUBATASHI, N. ZAITA, J. CHUNWONGSE, J. OBOKATA, K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, C. OHTO, K. TORAZAWA, B.-Y. MENG, M. SUGITA, H. DENO, T. KAMOGASHIRA, K. YAMADA, J. KUSUDA, A. KATO, N. TOHDOH, H. SHIMADA and M. SUGIURA (1986): The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J*, 5, 2043-2049
- 17) WEBBER, A. N., S. M. HIRD, L. C. PACKMAN, T. A. DYER and J. C. GRAY (1989) : A photosystem 2. polypeptide is encoded by an open reading frame cotranscribed with genes for cytochrome b-559 in wheat chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*, 12, 141-151

# Nucleotide Sequencing of the Region Bearing Apoint Mutation Found in the Chloroplast Genome of S Male Sterile Sugar Beet

Yukihiro YANAI, Tomohiko KUBO, Tesuo MIKAKI and Toshiro KINOSHITA

*Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060 JAPAN*

## Summary

Molecular analyses of organellar DNA and *in organello* synthesized protein have provided strong evidence for mitochondrial involvement in the inheritance of cytoplasmic male sterility in sugar beet. On the other hand, we have found a minor change existing in the chloroplast (ct) genome of the male sterile (*S*) cytoplasm. Namely *S* ctDNA is distinguishable from the normal (*N*) ctDNA by an additional HindIII site in the large single copy region of the ct genome.

Following this, we have cloned restriction fragments containing the HindIII site alteration derived from *S* ctDNA, together with the corresponding sequences of *N* ctDNA.

Nucleotide sequence analyses indicated that the HindIII site mutation is generated by a substitution of an AT pair for a GC pair in the case of *S* ctDNA. The HindIII site under consideration was located in a spacer DNA between *petE* (gene for cytochrome b/f complex subunit 5) and *psbE* (gene for photosystem II cytochrome b559 9kd polypeptide), suggesting that the expression of ct genes may not be affected by this mutation.

We also presented the sequence of two tRNA genes and four protein encoding genes located near the mutation site; the genes for tRNA-Trp (CCA) (*trnW*), tRNA-Pro (UGG) (*trnP*), cytochrome b/f complex subunit 5 (*petE*), photosystem II cytochrome b559kd/4kd polypeptide (*psbE/psbF*), photosystem II 3.2kd polypeptide (*psbL*). These putative ct genes in sugar beet showed high homologies of 80–100% with the corresponding genes derived from other plant species including tobacco.