

2002 年 1 月

Group I イントロンがコードするホーミングエンザイムの
in vivo における認識 DNA 配列決定系の構築
:ミトコンドリア *cytb* 遺伝子内に突然変異を持つ
Chlamydomonas 株の作成

修士論文

環境システムコース 黒川 さゆり

目 次

要旨	1 - 2 頁
序論	3 - 4 頁
材料と方法	4 - 14 頁
結果	14 - 16 頁
考察	16 - 20 頁
謝辞	20 頁
参考文献	21 - 22 頁
培地組成表	23 頁

[要旨]

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は、直鎖状で 15.8 kbp の藻類としては最小のミトコンドリアゲノムを持つ。*Chlamydomonas smithii* (*C. smithii*) は、ミトコンドリア上の apocytochrome b 遺伝子内に と名付けられた、大きさが 1075 bp の group I イントロンを持ち、 -イントロン部分を除くとミトコンドリアの塩基配列が 99.9 % 同じであるが、 -イントロンを持たない *C. reinhardtii* と接合が可能である。その -イントロン内にはホーミングエンザイムをコードする open reading frame が存在する。apocytochrome b mRNA がスプライシングをされる前の未成熟な状態で転写・翻訳されると、 -イントロン内 ORF がコードしているホーミングエンザイムが発現し、特異的な DNA 塩基配列を認識して、切断を行うものと考えられている。 -イントロンは、切断された遺伝子が修復される際に、イントロンを含む DNA 鎖が鑄型となる相同組み換えによって、自己増殖を行うと解釈できる現象が起こる。本研究では、ホーミングエンザイムの認識配列はどのようなもので、どの程度の曖昧さがあるのかを、 *in vivo* で決定するための系を構築しようとするものである。現在 *in vitro* でホーミングエンザイムの認識配列を決定した報告はあるが *in vivo* においては 1 例も報告がない。また、 *in vitro* における解析では、その反応条件が通常の細胞環境とは大きくずれたものであるため、生体内における認識配列とは異なる結果となる可能性がある。

これまでに多くの生物種についてミトコンドリアの形質転換が試みられてきた。その中で、 *C. reinhardtii* の呼吸欠損株のみで、欠損している部分の DNA を外部から導入することで、呼吸能を回復させるという直接選択が可能である。本研究では、 *C. reinhardtii* を用いて、 *in vivo* におけるホーミングエンザイムの認識配列を以下のような方法で決定することを目指すものである。(1) -イントロン内ホーミングエンザイム認識配列は apocytochrome b 遺伝子内において、イントロン部位を中心とした 26 bp 以内の範囲だと予測されるので、認識配列と推定される部域に 1 箇所の突然変異を持ち、 5' 末端から NADH dehydrogenase subunit 4 遺伝子の一部を含む DNA construct を作成する。(2) この DNA construct を *C. reinhardtii* 由来でミトコンドリア apocytochrome b 遺伝子のほぼ全域を欠損している呼吸欠損株である *dum-16* のオス株 (mt-) に対し導入を行うことにより、予測認識配列内に突

然変異を持つ呼吸能回復株を得る事が可能であると考えられる。(3) このようにして作成した *C. reinhardtii* の突然変異を持つ呼吸能回復株のオス株 (mt-) を、*C. smithii* のメス株 (mt+) と接合させて得られる、2倍体の栄養増殖細胞のミトコンドリアを解析する。2倍体の細胞では、*C. smithii*、*C. reinhardtii* 双方のミトコンドリアゲノムが1つの細胞内に存在し、*C. smithii* -イントロンのホーミングエンザイムが発現すると、*C. reinhardtii* の apocytochrome b 遺伝子内の認識配列を切断し、自らのコピーを侵入させる。呼吸能回復株と *C. smithii* における2倍体細胞ミトコンドリアを解析したとき、突然変異の導入により認識不可能な配列に変化した場合、-イントロンの侵入が行われず、突然変異が導入されても認識可能な配列であれば、-イントロンの挿入が起こる。本研究ではこれまでに、-イントロンがコードするホーミングエンザイムの、認識部位の中央だと予測される位置に、突然変異を持つ *C. reinhardtii* 株の作出に成功した。また、突然変異を持つ *C. reinhardtii* 株と -イントロンを持つ野生型 *C. smithii* を接合させて得られた接合子のみを、効率よく単離する手法を確立すると同時に、PCR 産物内の制限酵素多型を利用して、-イントロンの侵入の有無を判定する系を構築した。

[序論]

インtronには、スプライソゾームと呼ばれる RNA とタンパクの複合体によって切り出され、主として真核生物ゲノムのタンパク質をコードする遺伝子内に見いだされる型（核型）の他に、主としてオルガネラのゲノム内で見いだされる group I (grp I)、group II (grp II) の三種類が存在する。その中で grp I イントロンは、1–2 kbp の大きさがあり、真正細菌のゲノム、真核生物のリボソーム RNA 遺伝子、オルガネラのゲノムに存在する。また、grp I、grp II イントロンは内部にホーミングエンザイム (homing enzyme) と呼ばれる、15–20 塩基を認識する制限酵素をコードする open reading frame (ORF) を持つ事が確認されている。grp I イントロン内部の ORF の塩基配列で分子系統樹を作成すると、系統的に遠い生物でも、同じ機能を持つ遺伝子の相同的な場所に挿入されているインtronは、よく似た塩基配列を持ち、宿主の系統関係とは全く関係ない近縁関係を示す。このことは、grp I イントロンが種を越えて転移できることを示している。このような grp I イントロンの種を越えた転移の機構として、インtron内にコードされているホーミングエンザイムの関与が考えられる。このモデルとして、(1) 自然界で何らかの要因により、grp I イントロンを持つ種と持たない種の間で、一時的に異種間体細胞融合のような状態が引き起こされ、(2) 異種間のミトコンドリア間や葉緑体間の融合が起こると、grp I イントロン内のホーミングエンザイムにより、grp I イントロンを持たないミトコンドリアゲノム内の認識配列が切断される。(3) イントロンは、切断されたミトコンドリアゲノムが修復される際に、相同組み換え活性によって、grp I イントロンを持たなかった遺伝子に、自らのコピーを侵入させる。(4) その後、体細胞融合の状態が解消される。(5) 異種間体細胞融合によって侵入したインtronは、その後同種間の接合を通じて、急速に種内に広がって行く、という事が考えられる。

C. reinhardtii では葉緑体は母系（メス）遺伝 (Gillham, 1978; Grant et al., 1980)、ミトコンドリアは父系（オス）遺伝 (Boynton et al., 1987; Remacle et al., 1990; Remacle and Matagne, 1993) することが知られている。接合後オス (mt-) 側の葉緑体遺伝子は、1 時間以内の早い持期に消化され、その後核融合に続き互いの葉緑体も融合するが、すでに mt- 葉緑体の DNA は消失しているので、メス (mt+) 葉緑体 DNA のみが次世代に伝わる。ミトコンドリアでは、いつ mt+ のゲノムが消

化されるのかはっきりしていないものの、減数分裂期のかなり後期、mt+ のミトコンドリアが mt- のものと融合する以前に消化されていると考えられる。しかし例外的に、接合子の約 5 % は、減数分裂に入らず鞭毛を再生し、2n (2倍体) の状態で体細胞分裂を行い栄養増殖することが知られている。-イントロンを持つ *C. smithii* mt+ と (Colleaux et al., 1990)、-イントロンを持たない *C. reinhardtii* mt- で異種間接合を行い (Ryan et al., 1978)、生じた2倍体細胞のミトコンドリアを解析すると、mt+ 細胞のミトコンドリアの消化が遅れ (あるいは消化されず) 本来は起こらないはずの mt+、mt- 両親細胞由来のミトコンドリアの融合が起こる。このとき、-イントロン内ホーミングエンザイムの働きと相同組み換え活性により、

-イントロンを持たない *C. reinhardtii* mt- のミトコンドリアに -イントロンが挿入されると解釈される現象が起こる。さらにこの現象は、プロトプラスト化した体細胞を融合をさせる事により作成した、人為的な2倍体細胞においても起こり、この場合でも高い確率で -イントロンの感染が起こる事が報告されている。このように grp イントロンが水平伝搬できる範囲は、そのホーミングエンザイムの認識配列によって決定される可能性が高い。

grp イントロンがコードするホーミングエンザイムを、大腸菌内で発現させて粗精製し、基質 DNA を *in vitro* において切断させる事により、認識配列の解析を行った例は報告されているが (Marshall and Claude, 1992; Aagaard et al., 1997), *in vivo* での実験報告はない。-イントロン内ホーミングエンザイムに関しても、*in vitro* での実験において、野生型 *C. reinhardtii* の apocytochrome b (*cytb*) 遺伝子の内部を一力所切断できるとの報告があるのみである (Ma et al., 1992)。

[材料と方法]

Chlamydomonas の株

野生型株である *C. smithii* mt+ (cc-1373) 及び *C. reinhardtii* mt- (cc-124) は *Chlamydomonas* Genetic Center (c/o Dr. Elizabeth Harris, Department of Botany, Duke University, Durham, NC 27706, USA) から譲り受けたもので、*C. reinhardtii* mt- の呼吸能欠損株である *dum-1*、*dum-14* 及び *dum-16* は、C. Remacle と R. F. Matagne (University of Liege, Belgium) 両博士から分与され

たものである。

C. reinhardtii の cytb 遺伝子を含む形質転換用 DNA construct の作成

呼吸能欠損株を形質転換すると同時に、cytb 部に 1 箇所の突然変異を導入するための形質転換用 DNA construct は、大濱らにより作成されたミトコンドリアゲノムの 5' 末端から NADH dehydrogenase subunit 4 (*nd4*) 遺伝子に至るまでの 1.8 kb を含む DNA construct (C.c-p1.8) を基にして、突然変異を導入したプライマーを用いた polymerase chain reaction (PCR) により、目的とする突然変異を *cytb* 内に導入して作成した。呼吸能欠損株 *dum-16* に導入する DNA construct の *cytb* 遺伝子内に含ませる 1 箇所の突然変異は、アミノ酸に変化が起こらないよう、コドンの 3 番目を野生型以外の 3 種類の塩基に変更した (表 1)。最初に exon1 側の 2 箇所に 3 種類づつ合計 6 種類の突然変異を以下の方法で導入した。まず、ミトコンドリアゲノム 5' 末端から突然変異部分を含み、最後部が *nd4* 遺伝子の 3' 末端付近までの約 1.8 kbp の大きさのもの (図 1) を作成した。これは 1 回の PCR で合成するのは不可能なため、ミトコンドリアゲノム 5' 末端から突然変異部位までの前半と、突然変異部分から *nd4* 遺伝子の 3' 末端付近までの後半に分けて合成した (図 2)。DNA construct の 5' 側である前半部分は、C. reinhardtii のミトコンドリアゲノムの 5' 末端から 1.8 kbp までの部分を、pT7Blue-2T-Vector (Novagen) に導入した環状 DNA である C.c-p1.8 (Ohama 投稿準備中) を鋳型 DNA とし、ミトコンドリアゲノムの 5' 末端に正方向プライマー [5'-ACTACGCATGCCTAAGTGCGCAAACAGTAT-3']、突然変異部分に逆方向プライマー [(a) 5'-GGTTATGTACTACC TGGGGCCAAATG-3', (b) 5'-CTACCATGGGG CAAATGTCTTCTGG-3'; は突然変異挿入部位]、DNA construct の 3' 側である後半部分も同様に、C.c-p1.8 を鋳型 DNA とし、突然変異部分に正方向プライマー [(a) 5'-CATTTGGCCCCA GGTAGTACATAACC-3', (b) 5'-CCAGAAAGACATTG CCCCATGGTAG-3']、*nd4* 遺伝子 3' 末端付近である 1.8 kb DNA construct の 3' 末端に逆方向プライマー [5'-GGTCCTGCCGACGTTACTCGTACTGAGTTCCATACTGTCCTACCA-3'] を設定し、反応液 50 μl、プライマー各 0.4 μM、鋳型 DNA 0.03 μg、プログラム [アニーリング温度 55 ℃、伸長時間 前半 1 分、後半 30 秒、サイクル数 30] で、PCR

を行った (DNA 増幅器 SANYO, ExTaqTM Takara 以降同様)。これらの産物は 0.8 % アガロースゲルを用いて電気泳動後、GenEluteTMMinus EtBr Spin Columns (SIGMA) を用い、遠心する事で DNA を抽出した。その後、前半部分と後半部分の 産物で、対応する突然変異を持つもの各 1 μ l づつを混合したものを鑄型 DNA と し、プライマーは前半部分の合成に用いた正方向プライマーと、後半部分の合成に用 いた逆方向プライマーで、濃度・使用量は同様、反応液量も先と同様、プログラム [ア ニーリング温度 55 、伸長時間 1 分 30 秒、サイクル数 30] の PCR で前半部 分後半部分を貼り付けることにより、1箇所の突然変異を持ち、全長が 1.8 kbp の 形質転換用 DNA construct とした。続いて、exon2 側にも exon1 側と同様に、 コドンの 3 番目のみに突然変異を導入するべきであるが、1 箇所の突然変異ではアミ ノ酸が全く違うものに変化する配列 (Gln His) があるため、その配列部分にはコド ンの 1 番目と 3 番目の 2 箇所に突然変異を導入し、類似のアミノ酸に変化させたもの (Gln Asn) を形質転換用 DNA construct とした (表 1)。この時、*dum-16* に對 して DNA construct を導入する際、1.8 kbp の DNA construct よりも *dum-16* のミトコンドリアと相同な塩基配列を多く持つよう、3' 末端を *nd4* 遺伝子の 5' 末 端付近まで延長し、全長 約 3.0 kbp の DNA construct とした。しかし、exon2 側 に突然変異を持つ 3.0 kbp DNA construct はサイズが大きく、クローニングする際 に、作成した DNA construct とベクターの連結 (ライゲーション) 効率が著しく悪 化したため、制限酵素 *EcoR* の認識配列を DNA construct の 5' 及び 3' 末端に 付加し、ベクターの *EcoR* サイトにクローニングした。PCR による DNA construct の合成は、1.8 kbp と同様に、5' 側である前半部分と 3' 側である後半 部分に分けて行った。前半部分は、C.c-1.8 を鑄型 DNA、ミトコンドリアゲノム 5' 末端に正方向プライマー [5'-ACTACGCATGCCTAAGTGCGCAAACAGTAT-3']、 突然変異部分に逆方向プライマー [(c) 5'-CTACCATGGGGC A ATGTCTTCTGG-3', (d) 5'-GGCCAAATGTC TTCTGGGTGCT-3']、後半部分 は全長を 3.0 kbp とするため、*C. reinhardtii* ミトコンドリア全 DNA (Ohama 投 稿準備中) を鑄型 DNA、突然変異部に正方向プライマー [(c) 5'-CCAGAAAGACAT T GCCCATGGTAG-3', (d) 5'-AGCACCCCCAGAA GACATTGGCC-3']、*nd4* 遺伝子 5' 末端付近に逆方向プライマー [5'-GCGTTGGTAATTGCGTGCTAACGT-3'] を設定し、反応液 50 μ l、各プラ

イマー 0.4 μ M、鑄型 DNA 0.03 μ g、プログラム [アニーリング温度 55 °C、伸長時間 2 分、サイクル数 30] の PCR を行った。産物を exon1 側と同様に精製し、前半部分と後半部分の産物で対応する突然変異を持つもの 各 1 μ l づつを混合し、前半後半部分を張り付ける PCR の鑄型 DNA とした。この時、ミトコンドリアゲノム 5' 末端に EcoR 認識配列を付加した正方向プライマー [5'-TGGAATTCACTACGCATGCCTAAGTGCAGCA-3']、nd4 遺伝子 5' 末端付近にも、前半後半部分を張り付けた産物が、後半部分の逆方向プライマー部分から約 200 bp 短くなるよう内側に、EcoR 認識配列を付加した逆方向プライマー [5'-GCGAATTGATTCCAGAGGCCATTATCAT-3'] を設定し、反応液 50 μ l、各プライマー 0.4 μ M、鑄型 DNA 0.03 μ g、プログラム [アニーリング温度 55 °C、伸長時間 2 分 30 秒、サイクル数 30] の PCR を行った。これにより、全長約 3.0 kbp で、5' と 3' 両末端に EcoR 認識配列を付加した DNA 断片を合成した。産物は、両端に EcoR 認識配列を持つので、QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) で精製した後、制限酵素 EcoR (Takara) 50 ユニット で一晩処理し、3.0 kbp DNA construct とした。

cytb 遺伝子内に突然変異が導入された形質転換用 DNA construct のクローニング

合成した exon1 側に変異を持つ 1.8 kbp DNA construct は、TA クローニングで pT7blue T-Vector (Novagen) に、exon2 側にへ変異を持つ 3.0 kbp DNA construct はあらかじめベクター両端に EcoR 認識配列を持った、ライゲーション用処理済み pUC118 EcoR /BAP Vector (Takara) に、それぞれ DNA Ligation System DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara) を用いライゲーションを行った。その後、大腸菌 Competent Cell (DH5 α COMPETENT high Competent Cell Kit: TOYOBO) に導入しクローニングを行った。DNA construct を導入した大腸菌は、LB 液体培地 (Sambrook and Russell, 2001(a)) に抗生素質アンピシリン (amp)(Sambrook and Russell, 2001(b); Harris E.H., 1989) を、最終濃度が 100 μ g/ml となるよう加えたもの (LB+amp 培地、培地(1)) に、さらに X-gal と IPTG を加えた培地で (培地 (2))、blue-white セレクション (Sambrook and Russell, 2001(c)) を行い、DNA construct が導入されている大腸菌コロニーを選択した。選

択したコロニーを LB+amp 培地 1 ml で 1 晚培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) で DNA を抽出した。抽出した DNA construct は、意図した突然変異が導入されているかを確認するために塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、ミトコンドリアゲノムの正方向と逆方向両側から決定し正確なデータを得るため、正方向プライマー [5'-GTTAGTACTACCGTATTGGTGCAAG-3'] と逆方向プライマー [5'-CCACGTGAGATCGTCTGGATCAGT-3'] をそれぞれ設定し、CyTM5 Thermo SequenceTM Dye Termination Kit、ALF express DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech 以降同様) を用いて行った。意図した突然変異を持つ DNA construct が導入されていることが確認ができた大腸菌は、LB+amp 培地 50 ml において約 1 晚で大量培養する。培養した大腸菌から、Plasmid Mini Purification Kit (QIAGEN) を用いて抽出された、全 12 種類の DNA construct を、cytb 遺伝子欠損を持つ *C. reinhardtii* の形質転換に用いた。

培養条件

野生株の *C. smithii*、*C. reinhardtii* と、呼吸能欠損株 *dum-1*、*dum-14*、*dum-16* 株は総て、液体 TAP 培地 (Tris-Acetate-Phosphate, 培地 (3)) に、大腸菌の汚染を防ぐため、抗生素質のアンピシリンを 100 µg/ml (培地 (2)) を添加した培地 (TAP+amp) で、明所 25 で静置もしくは振とう培養を行った。形質転換を行う場合、*dum-16* (mt-) 株を同様の培地、明所 25 で振とう培養し、対数増殖期に達した細胞 ($2-4 \times 10^6$ cells/ml) 5-7 ml を、ナイロンフィルター HybondTM-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) 表面に、細胞が直径 6 cm の円形に 1 層程度に薄く広がるよう吸引濾過を行い集めた。細胞を集めたフィルターは、TAP+amp 培地に最終濃度が 1 % になるように寒天を加えてプレートにした培地 (TAP+amp-1% 寒天) に乗せ、形質転換用プレートとした。

形質転換

ミトコンドリアの形質転換は PDS-1000/He particle delivery-system (Bio-Rad) を用いたパーティクルガン法により行った。基本的には、Randolph-Anderson, B.L. et al. (1993) の方法に従い、以下のように改変したものである。直径が 600 nm (Bio-Rad catalogue # 165-2262) 金粒子をエタノールと滅菌水で洗浄し、50 % ゲ

リセロールを加え最終濃度を 60 mg/ml の懸濁液としたもの 25 μ l と、直径が 100 nm の金粒子コロイド液 (GC 100, British Biocell International) 1 ml を遠心し、上清を取り除いた後 50 %グリセロール 25 μ l を加え懸濁液としたものを混合して使用した。この 2 種類の直径の混合金粒子に、形質転換用 DNA construct 5 μ g と、2.5 M、CaCl₂ 50 μ l、0.1 M スペルミジン 20 μ l を加えることで、DNA を金粒子に沈着させた。25 mm Hg で減圧にしたパーティクルガン装置内で、DNA を沈着させた金粒子を、1100 pounds per square inch (psi) の圧力の He ガスを吹きつける事で、*dum-16* 株を集めた形質転換用プレート上に発射した。飛ばされた金粒子が細胞を貫通する際に、DNA construct が細胞中及びミトコンドリア内に導入される。

形質転換体の選抜方法

dum-16 株は、呼吸能を欠損しているため、光があれば光合成により生育可能であるが、暗所では生育不可能である。しかし、*cytb* 遺伝子を含む外来 DNA が導入され、ミトコンドリアゲノム間で相同組み換えを起こした細胞は、呼吸能を回復しているため暗所でも酢酸を炭素源として生育可能である。そこで、パーティクルガンで DNA を導入したプレートを暗所で培養すれば、呼吸能を回復した株のみコロニーを形成するはずであり、選抜が可能となる。しかし、常に暗所で生育させると、DNA が導入されず呼吸能を回復していない *dum-16* 株のみではなく、導入されて呼吸能を回復した株の生育もかなり遅くなり、互いの成長速度に差がつくまでに長時間必要となる。そこで、1 日数時間光を与え、(25 ℃ で 2 時間明所、22 時間暗所のサイクル) 呼吸能回復株の成長を促進し、成長速度のコントラストをはっきりさせた。出現した呼吸能回復株のコロニーを、爪楊枝で TAP+amp 液体培地に移し、25 ℃ 明所で培養を行うことで、形質転換体を選抜した。

形質転換の確認

形質転換体の選抜後、液体 TAP+amp 培地で培養した呼吸能回復株が、*cytb* 遺伝子内に突然変異を保持しているかの確認を、塩基配列の決定により行った。まず呼吸能回復株の培養液 1 ml を遠心して細胞を集め、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) で全 DNA を抽出した。その後、ミトコンドリアの突然変異部分を含む部域約 2.5

kbp を、ミトコンドリアゲノムの 5' 末端から 200 bp の部分に、正方向プライマー [5'-CGTGTAGCTAGTCTGCCCTGG-3']、*nd4* 遺伝子 5' 末端から約 400 bp 下流の部分に逆方向プライマー [5'-CTTGTTGATTGGCCGTGCTCCTTACGG-3'] を設定し、反応液 50 μl、プライマー 0.4 μM、鑄型 DNA として呼吸能回復株から抽出した未分画全 DNA 各 2 μl、プログラム〔アニーリング温度 55°、伸長時間 2 分、サイクル数 40〕の PCR により増幅させた。産物は 0.8 % アガロースゲル電気泳動後、目的とする DNA 断片を GenEluteTMMinus EtBr Spin Columns (SIGMA) を用い精製した。この方法では DNA 回収率が低く濃度が低いため、MICROCON Centrifugal Filter Devices YM-30 (分画分子量 10,000 MILLIPORE) を用い、2 倍まで遠心濃縮を行った。その後、クローニングを行った時と同様のプライマーを用いて DNA の塩基配列の決定を行い、呼吸能回復株が意図した突然変異を持っているか確認を行った。

接合

接合を行うために、親株である *C. smithii* mt+ (cc-1373) と、*dum-16* mt- から作成した突然変異を持つ呼吸能回復株を、それぞれ TAP+amp 液体培地で飽和近くまで振とう培養した。それらの親株を、空気が入るようキャップにあそびがある 14 ml のチューブ (FALCON, BECTON DICKINSON) にそれぞれ 1.6 ml づつ取り、Mating TAP (通常の TAP 培地の NH₄Cl を除き、それと等量の KCl を加えた培地: Saito et al., 2000 (a)) +amp 4.8 ml を加え合計 8 ml とし、25° 明所で 3 日-5 日間静置し、接合させた。接合子は密集し膜を作るので、生じた接合膜を爪楊枝でくい取り、スクリューキャップの 1.5 ml チューブに通常の液体 TAP+amp 培地 1 ml を入れたものに移し、アルミホイルで包むことで暗所とし、25° で 5-7 日間静置して接合子を成熟させた。その後、接合膜は TAP+amp-1% 寒天プレート培地に移し、25° 明所に移して数時間で、接合子の膜内に 4 つの F1 細胞が生じていることが確認できる。

F1 細胞の分離

明所に移した数時間後に、ミトコンドリアの解析のため接合子の膜がはじけ、F1 細胞が泳ぎだす前に、接合子を自作のガラス針を用いて、1 細胞ずつ分離する事が必要

である。そこで、スライドガラスの上に TAP+amp-1% 寒天培地を薄く撒き、プレパラート用のものを作成した（図 3）。暗所に移しておいた接合膜を、少量爪楊枝またはピペットですくい取り、液体 TAP+amp 培地 30 μl 中になるべく膜が細かくほぐれるように懸濁し、作成したプレパラートの中央に、線を引くようにまいた。プレパラートを、数時間から 1 晩、暗所もしくは 2-3 時間だけ光を当てた後暗所に移し静置する。その後プレパラートを光学顕微鏡で観察しながら、ガラス針を用いて接合子を 1 細胞づつ動かし、周辺に他の細胞が確認できない場所まで運び、その細胞が接合子であることを顕微鏡で観察して確認した。確認ができたら、細胞付近の寒天部分をガラス針で切り取り、通常の TAP+amp-1% 寒天 プレートに移して、明所で 7-10 日間程度培養し、F1 細胞がコロニーを形成するのを待った。

***cytb* に突然変異を持つ *C. reinhardtii* と *C. smithii* の接合による接合子の発芽率解析**

cytb 遺伝子に突然変異を持つ各呼吸能回復株と野生株の *C. smithii* の接合子と、コントロール用に野生株の *C. reinhardtii* と *C. smithii* 接合子から、各接合日毎に 10 個程度の接合子を分離し、通常の TAP+amp-1% 寒天プレート上、25℃、明所で培養を続け、接合子を減数分裂、体細胞分裂をさせた。それぞれのプレート上にコロニーが形成された後、接合した日毎に分離できた接合子の数と、その中で発芽した数を記録する。

ミトコンドリアの解析

F1 細胞のミトコンドリアが、オスである *C. reinhardtii* のミトコンドリアを受け継いでいるのか、そしてそこに - イントロンの侵入は起こっているのかを解析するため、接合子が発芽し生じたコロニーから、細胞を爪楊枝で拾い、スクリューキャップの 1.5 ml チューブ内、1 ml の液体 TAP+amp 培地で培養した。数日で DNA を抽出するために十分な細胞量まで増えるので、細胞を遠心して回収した。全 DNA の回収は DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) とガラスピーズを併用した。まず、回収した細胞に直径が 0.3-0.5 mm のガラスピーズ（ポリサイエンス社）を、その細胞体積の 3 倍程度の量を加え、ビーズが自由に動き細胞を粉碎できるよう、DNeasy Plant Mini Kit の RNase とタンパク変成材のみ少量加え、2-3 分 vortex して細

胞を破碎するが、破碎率の確認のため、一部細胞の入った液を顕微鏡観察し、3割程度の細胞が破碎されているところで止めた。その後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 DNA を抽出した。各呼吸能回復株と *C. smithii* (cc-1373) の接合により得られた成熟接合子より抽出した全 DNA を鋳型とし、まず (1) - イントロン内部に正方向プライマー [5'-TAGGAGCAATCCAACAGCGAT-3'] そして *nd4* 遺伝子と NADH dehydrogenase subunit 5 (*nd5*) 遺伝子の間に逆方向プライマー [5'-GCCTAGGCACCAATAGTGGTG-3'] を設定したもの、そして (2) - イントロンを挟むよう、*cytb* 遺伝子の - イントロンより下流の exon2 側に正方向プライマー [5'-GTTAGTACTACCGTATTGGTGCAAG-3'] そして *nd4* 遺伝子と *nd5* 遺伝子の間に逆方向プライマー [(1)と同様] を設定したものの 2 種類を、反応液 50 μl、プライマー各 0.2 μM、鋳型 DNA 各 2 μl、プログラム [アニーリング温度 48 ℃、伸長時間 2 分、サイクル数 30] の PCR を行い増幅させた。この時、- イントロンがミトコンドリアの融合後も侵入をしていなければ、(1) は増幅せず (2) で - イントロンが入っていない長さの産物が得られる。もし侵入していれば、(1) 及び (2) が共に増幅し、(2) は - イントロンが入った長さの産物が得られる、ただし - イントロンには立体構造があり、それが妨げとなって PCR 産物の増幅が弱いことがあるため、主に (1) の結果により判断を行った。このような PCR を、突然変異を持つ呼吸能回復株を接合させ得られた F1 細胞のコロニーから、各突然変異毎に 6 個づつ採取して行った。

制限酵素消化パターンによる - イントロン転移の有無の確認

接合後のミトコンドリアを PCR によって解析し、- イントロンの存在が認められた場合、そのミトコンドリアが何らかの要因で *C. smithii* のものが残ってしまったのではなく、確実に *C. reinhardtii* のミトコンドリアに - イントロンが侵入したものだと証明するため制限酵素で消化し、切断パターンの違いを利用した。*C. smithii* と *C. reinhardtii* ではミトコンドリア DNA 塩基配列は 99.9 % 等しいが、*C. smithii* のミトコンドリアのみに存在し、*C. reinhardtii* には存在しない制限酵素認識配列がある。それらは、- イントロン侵入部から *cytb* 遺伝子の 3' 末端方向 約 500 bp の部分に *Nhe* 、*nd4* 遺伝子の 5' 末端から 3' 末端方向約 400 bp の部分に *Nco* 、cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子の 3' 末端から 5' 末

端方向約 500 bp の部分に *Xba* 、 *coxl* 遺伝子の 3' 末端から 5' 末端方向約 250 bp の部分に *Hpa* という 4 箇所である (図 4)。今回はこれらの中から、*Nco* 、 *Xba* 、 *Hpa* の三箇所を用いた。まず、*cytb* 遺伝子内に突然変異を持つ呼吸能回復株と *C. smithii* の接合により得られた成熟接合子から抽出した全 DNA を鋳型とした PCR をを行い、制限酵素で処理を行うための DNA 断片を増幅させた。-イントロンが侵入している事を確実に示すため、正方向プライマーは -イントロンの 5' 末端付近に設定 [5'-TAGGAGCAATCCAACAGCGAT-3'] し、1 種類の PCR 産物で 3 種類の制限酵素による処理のパターンを解析するため、逆方向プライマーを NADH dehydrogenase subunit 2 (*nd2*) 遺伝子の 5' 末端付近に設定 [5'-CGGATGTGGATGTGGCCAAAGACACATTGCGCAA-3'] する。反応液 50 μl、プライマー各 0.2 μM、鋳型 DNA 各 1 μl、プログラム [アニーリング温度 52° 、伸長時間 3 分、サイクル数 30] の PCR をを行い、約 6.5 kbp の DNA 断片の合成を行った。この時、コントロールに野生株 *C. smithii* (cc-1373 mt+) と *C. reinhardtii* (cc-124 mt-) からも同様に全 DNA を抽出し、同様の PCR で DNA 断片を合成した (*C. reinhardtii* については -イントロンを持たないため、-イントロンとほぼ同じ場所に、*C. reinhardtii* 用プライマー 5'-ACGGTAGCACCCCAGAAAGACATTG-3' を設定した)。その後、産物を QIAquick PCR Purification Kit (250) で精製し、制限酵素 *Nco* 、 *Xba* 、 *Hpa* (総て Takara) それぞれ 10 ユニットづつで 5 時間処理を行い、切断パターンの解析を行った。

呼吸能欠損株の遺伝子欠損領域の決定

呼吸能欠損株 *dum-16* と、同様に *cytb* 遺伝子に欠損を持つと報告されている突然変異株である *dum-1* の、*cytb* 遺伝子の欠損領域を明確にするため、両者を 1.5 ml チューブ、TAP+amp 液体培地にて培養し、全 DNA を DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により抽出した。抽出した全 DNA を鋳型 DNA とし、(1) *cytb* 遺伝子 5' 末端付近に 1 箇所、(2)-(6) *nd4* 遺伝子 3' 末端から 5' 末端方向約 300 bp の部分から約 200 bp 每に 5 箇所、合計 6 箇所に正方向プライマー [(1) 5'-GAGTTGGGTAGGCTACCAAATGAGTGTAGTACAC-3' , (2) 5'-GTAAACAA GAAGAACAAAGTG-3' , (3) 5'-GACATGTGAGCAATACTAGAG-3' , (4) 5'-

CTAGCAATACTACACTACCAGCAG-3', (5) 5'-ACCAAAGAACGGGCCATAGTG-3', (6) 5'-CGCAGCAACATCATGCAAATA-3']、*nd5* 遺伝子 3' 末端付近に逆方向プライマー [5'-ACCATGGGGCGTTAAAACCTCTACC-3'] を設定し、反応液 5 μl、鑄型 DNA として抽出した全 DNA 各 1 μl、プライマー 各 0.2 μM、プログラム [アニーリング温度 38 ℃、伸長時間 1 分、25 サイクル] の PCR で DNA が増幅されるか否かで正方向のプライマー部分の遺伝子を保持しているのか、どの程度まで *dum-1*、*dum-16* のミトコンドリア遺伝子の欠損が進んでいるのか調査した。

[結果]

cytb 遺伝子内に突然変異を持つ呼吸回復株の作出

exon1 側に突然変異を持つ 1.8 kbp の DNA construct 6 種類に続いて、exon2 側に突然変異を持つ 3.0 kbp DNA construct 6 種類、合計 12 種類を作成し、それが意図した以外の突然変異を持たないことを、DNA の塩基配列を決定することで確認した。その後総ての DNA construct を *dum-16* (mt-) へ、パーティクルガンを用いてそれぞれ 3 回づつ導入を試みた。3 回の導入実験の内、1 回は大腸菌の汚染により全くコロニーが得られなかつたが、最終的には 7 種類の突然変異を持つ呼吸能回復株のコロニーを得た (図 5、表 2)。しかし、2 箇所の突然変異を持ち、アミノ酸変化を伴う 2 種類の DNA construct を導入した株 (CAA (Gln) AAT (Asn)、CAA (Gln) AAC (Asn)) と、アミノ酸変化を伴わない 1 塩基突然変異を導入した DNA construct を導入した株 (GGC GGT、TCT TCA、CCA CCG) においては、形質転換体が得られていない。

接合

作出できた 1 塩基の突然変異を持つ呼吸能回復株 (mt-) 総てと、コントロール用の野生株 *C. reinhardtii* (cc-124、mt-) と、接合させる野生株 *C. smithii* (cc-1373、mt+) を、通常の液体 TAP+amp 培地で培養し、定常期まで増殖した細胞を、20 倍、40 倍、100 倍の 3 段階に希釈して、さらに振とう培養を開始した。細胞の観察を行いながら、mt-、mt+ 双方が良く分裂し、泳いでいる状態となった時から飽和直前の状態まで様々な細胞状態の時期に、培地から窒素源を抜く事で、配偶子への誘

導が行えるため、通常の液体 TAP 培地から窒素源を除いた培地 Mating TAP で接合を行った。先にコロニーが得られた 6 種類の呼吸能回復株では 7 回、後で採取した 1 種類については 3 回、野生株 *C. reinhardtii* (コントロール実験) では 2 回づつ、野生株 *C. smithii* と接合を行ったところ、飽和直前まで増殖し良く泳いでいる細胞同士を混合すると、最も高い接合率を示した。*C. reinhardtii* の接合率は通常全体の 5 % 程度だが、接合子は細胞同士が集まり、膜状となって液表面に浮いてくるため、容易にすくい取ることが可能であった。特に、コントロールに行った野生株の *C. smithii* と *C. reinhardtii* の接合では接合率が高く、しっかりと接合膜を作った。しかし、呼吸能回復株では接合率が明らかに低く、膜にならないものが殆どであった。この場合接合子は、培地の表面に薄い層となって浮いてくる、もしくは液面付近のチューブ壁面に張り付いた。ピペットで水面を薄く取る、壁面を掻き取るという方法で接合子を採取し、7 種類の呼吸能回復株総てについて栄養増殖期細胞を含まない接合子の分離に成功した。

***cytb* に突然変異を持つ *C. reinhardtii* と *C. smithii* の接合による接合子の発芽率解析**

まず 2 培体ではなく、通常の接合子の解析を行うため、1 塩基の突然変異を持つ呼吸能回復株と野生株の *C. reinhardtii* を *C. smithii* と接合させ、その後発芽させた。各親株の組み合わせで、各接合日ごとに 10 個程度の接合子を分離し、TAP+amp-1 % 寒天プレート上、25 ℃、明所で培養を続けることで、接合子を減数分裂させ細胞分裂させたが、コロニーを形成しない接合子が各プレートにおいて 約 50 % 存在した (表 3)。

***cytb* に突然変異を持つ *C. reinhardtii* と *C. smithii* の接合により得られた F1 細胞のミトコンドリアの解析**

コロニーを形成した接合子から、7 種類の各呼吸能回復株毎に 6 個づつ合計 42 個のコロニーを任意に選び、爪楊枝で液体 TAP+amp 培地に移して培養した後、全 DNA を抽出し、PCR によって - イントロンの転移の有無の確認を行った。7 種類の呼吸能回復株の中で 6 種類は予測通り、- イントロン内のプライマーで DNA の增幅は見られなかったため、- イントロンの侵入はなく、ミトコンドリアは父系遺

伝であることの確認ができた。しかし、(b)-G 変異を持つ 1 種類の呼吸能回復株の接合子から得られた 1 つのコロニーの PCR 結果から、-イントロンの増幅が確認された（図 6）。その 1 つのコロニーについては制限酵素切断パターンにより、ミトコンドリアが *C. smithii*、*C. reinhardtii* どちらの由来であるか確認を行ったが、総ての制限酵素サイトで切断が起こり、*C. smithii* 由来のミトコンドリアであると予測される結果となった（図 7）。

呼吸能欠損株における *cytb* 及び *nd4* 遺伝子の欠損領域

dum-16 及び *dum-1* 株について *cytb* 遺伝子がどこまで欠損しているのか調査を行った。最初に *cytb* 遺伝子内と *nd4* 遺伝子内にプライマーを設定した PCR を行いその増幅を観察したが、非常に増幅が弱い、もしくは増えないという結果が確認された（データ未掲載）。これにより、*cytb* 遺伝子にとどまらず *nd4* 内にまで遺伝子の欠損領域が拡大している可能性が考えられた。続いてより詳しい解析を行うため、*cytb* 遺伝子の 5' 末端付近に 1 箇所、*nd4* 遺伝子の 3' 末端付近から 5' 末端方向に向けて 200 bp 毎に 5 箇所の合計 6 箇所と、*nd5* 遺伝子の 3' 末端付近の間で PCR を行った。その結果、分子量が大きくなるほど産物は減少しており、中でも *dum-1* においては *cytb* 遺伝子内の正方向プライマーのものは、ほとんど産物が見られなかった（図 8）。

[考察]

cytb 遺伝子欠損株

dum-16 株は、ミトコンドリア内の *cytb* 遺伝子をほぼ全域欠損していると報告されているが (Matagne et al., 1989)、その欠損範囲の詳細は不明で、次第に広がっていると言われている。さらに、ミトコンドリアゲノムの 5' 末端部分を欠いていることから、非常に不安定な細胞で、通常の培養条件でも成長が突然遅くなる、死に至るなどの変化が起こりやすい株である。もし、*cytb* 遺伝子を全域欠損し *nd4* 遺伝子まで欠損領域が広がっているとすれば、現在導入している DNA construct は *nd4* 遺伝子の一部しか持たないため、換えを起こす時に相同的な配列部分が少なく、形質転換効率を下げる原因となる。そこで形質転換効率を向上させるためにも、*cytb* 遺伝

子及び *nd4* 遺伝子をどこまで保持しているのかより詳しく調査する事が必要あった。*dum-1*、*dum-16* 株の *cytb* 及び *nd4* 遺伝子の欠損領域調査の PCR における DNA 増幅程度を観察する事で、どの程度まで *dum-1*、*dum-16* 株のミトコンドリア遺伝子の欠損が進んでいるのかが確認できた。この PCR 反応では、それぞれの産物は長さが 200 bp 程度の差で 550–1700 bp の間にあり、*nd4* 遺伝子にまで欠損が進んでいなければ、産物の収量に差はさほど現れないものと予測された。さらに、電気泳動で等量の産物（分子数）を流した場合、分子量が大きいほどはっきりとバンドが現れるはずであった。ところが分子量が大きくなるほど、つまり、ミトコンドリアゲノムの 5' 末端に近い部分にプライマーを設定して PCR を行ったものほど、産物のバンドは薄くなり減少していた。これは、鑄型として用いた全 DNA 内における、ミトコンドリアゲノムの 5' 末端の保持の状況は、*cytb* から *nd4* までの間でばらつきがあり、中でも *cytb* 部分を保持しているゲノムが少ない事を示している。今回調査を行った *dum-1*、*dum-16* 株は、単離された変異株から培養したものであり、基本的には全個体が同じ遺伝情報を持つはずである。しかし、*dum-1*、*dum-16* 株のような突然変異株では、ゲノムの不安定さから徐々に欠損領域が拡大しており、1 個体内の 1 ミトコンドリアに存在する、50 - 100 コピーのゲノムにおいても、欠損領域にはらつきが発生すると考えられる。そのため、今回のようにミトコンドリア集団全体のゲノムの欠損領域を調査すると、様々な欠損状態のミトコンドリアゲノムを検出する結果となったと考えられる。このまま培養を続けると、ある程度ゲノムが欠損状態で安定する細胞や、欠損が進行し、生命を維持できなくなるほど欠損領域が拡大して、死に至る細胞が発生する、などの現象が起こると考えられる。今回検証した中でも特に、*dum-1* 株については欠損領域が広く、*cytb* 遺伝子にとどまらず、*nd4* 遺伝子にまで欠損が進行しているゲノムが多く存在すると考えられる。さらに *dum-1*、*dum-16* 株に類似の株で、ミトコンドリアゲノムの 5' 末端から *cytb* 遺伝子を欠いていると報告されている *dum-14* 株という呼吸能欠損株が存在するため、その欠損領域の解析も行いたい。

突然変異を持つ呼吸能回復株の作成

今回用いたパーティクルガンによる形質転換の方法は、一般的にタバコ培養細胞やシロイヌナズナ葉の形質転換に使用されているが、この方法により *C. reinhardtii* の

葉緑体も効率よく形質転換される (Boynton and Gillham, 1993)。加えて、核、ミトコンドリアにも遺伝子導入が可能であり有用な手法である。このパーティクルガンを用いた方法により 7 種類の呼吸能を回復した形質転換体が得られた。しかし、2 箇所の突然変異を導入した呼吸能回復株は、2 種類共にコロニーが採取できていない。

表 4 で *C. reinhardtii* と種々の生物の *cytb* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸を比較した。塩基配列の変異はいくらかあるものの、アミノ酸の変化は 1 箇所で Met から Leu、Ile という類似アミノ酸への変化が見られるのみであった。特に今回コロニーが得られていない 2 箇所の突然変異を導入した呼吸回復株の、突然変異部位と同様の部位に変異のある生物は見られなかった。これは、*cytb* 遺伝子の - イントロン侵入部位周辺は、アミノ酸の変化を許容しない、極めて強く保存されたアミノ酸をコードする部位である可能性を示している。今回の 2 箇所の突然変異を加えた DNA construct がうまくミトコンドリア内に導入されたとしても、アミノ酸が変化しているため *cytb* 遺伝子が正常に機能せず、呼吸能を回復していない可能性がある。現在、ここまで作成した 12 種類の DNA construct 以外に、- イントロン侵入部位前後 6 bp に、アミノ酸が変化するものも含め、終止コドンとなるもののみを除いた全種類の 1 箇所の突然変異を導入し、アミノ酸の変化によりどの程度形質転換効率が変化するのか検討を行っている。

接合

C. reinhardtii 親株間での接合では、両親株の組み合わせにもよるが、発芽率は 50 % 程度 (Saito et al., 2000 (b)) であると報告されている。今回は、異種間でさらに突然変異を持つ株での接合であったが、発芽率は平均すると 50 % 程度を示している。しかしながら大きさが大きく、特に、体細胞分裂は盛んに行うが、鞭毛を持たず泳いでいる状態の細胞を接合に用いた場合は、その接合率が低かった。この原因として、両親株を混合した時期により、影響が及ぼされていると言う事が考えられる。*Chlamydomonas* は増えた個体が自由に泳ぎ出さず、ゼラチン化した母細胞の膜内にとどまって群体となった状態 (Harris E. H., 1989(a)) になることがあり、その状態を palmelloid と呼ぶが、その場合接合はほとんど起こらなかった。palmelloid の状態は酸素の供給状態を良くする、培地を薄くする、極めて薄い細胞濃度から培養をやり直す、などの処置を施す事で解消されるといわれているが、細胞濃度を極薄い

状態にし、振とう培養をすることで解消された。このように、泳いでいる細胞が多い状態にすることで、接合効率はかなり改善し、突然変異を持つ株においてもしっかりと膜を作るほど高い接合率を示した。

異種間接合における -イントロンの転移の可能性

今回行ったような液体倍地による接合では、接合子 1 細胞でのミトコンドリアを解析するため、未接合の体細胞と接合した細胞を分離する作業が必要である。野生株を両親株とした接合のように、常に安定した確率で接合が起こり膜を作るようならば、できた膜をすくい取ることで容易に分離が可能である。しかし、膜を作らなかった場合、接合させている培地の液を、ピペットで吸い取ることで接合子を分離するため、未接合の細胞が混ざってしまう。そこで、プレパラートを作り光学顕微鏡下で 1 細胞の分離を行った。このプレパラート上で接合子の成熟を行うと、顕微鏡下で接合子の内部に細胞が 4 つに割れてくるのが観察できるため、接合子であることが容易に確認できる。そのまま発芽を待つと、母細胞の細胞壁がはじけ 4 つの F1 細胞が泳ぐ所まで観察可能である。しかし、寒天を薄く作っているため培地が乾きやすく、スライドガラスでは表面積が狭いため、カビや大腸菌の汚染があったときに全体に広がりやすい。そこで、今回プレパラート上で発芽を行わなず、1 細胞にまで分離し、通常の寒天培地に移植を行った。1 細胞の分離は、ガラス棒を引き延ばして作成したガラス針を用いて移動させて行う。しかし、暗所から明所へと移し F1 細胞へと成熟させていき、成熟しきった細胞をガラス針で移動させようとすると、接合子の細胞壁が脆くなってしまい、移動させる間に細胞壁を破壊してしまうおそれがある。そこで、暗所からプレパラート上に移した後、数時間から 1 晩、暗所もしくは数時間だけ光を当て静置し、成熟が完了する以前に行うのが適当であった。

ミトコンドリアにおいては、7 種類の呼吸能回復株毎に 6 個づつコロニーを採取し解析を行ったが、全 42 個の中で 1 個 -イントロンが挿入された可能性がある結果が見られた。しかし、制限酵素による切断パターンの結果からは、-イントロンが *C. reinhardtii* に転移したというデータは得られなかった。これは、-イントロンが相同組み換えによって自らのコピーを切断したゲノムに挿入する場合、イントロン部分のみではなくその周囲かなり広い部域の組み替えを起こすというデータが報告されているため (Boynton et al., 1987; Remacle et al., 1990; Remacle and

Matagne, 1993)、相同組み替えによって -イントロンが *C. reinhardtii* に侵入し、さらに *C. smithii* のみに確認されている制限酵素認識配列部分までも持ち込んだため、もしくは、接合子を 1 細胞づつ分離する際、未接合の *C. smithii* の細胞を誤って拾ったためと考えられる。

今後の実験

通常の接合子におけるミトコンドリアの解析により、*Chlamydomonas*においてはミトコンドリアは父系遺伝であり、おそらくミトコンドリア融合以前に mt+ 側のミトコンドリア DNA が完全に消化されるため、-イントロンの感染が起こらない事が確認できた。今後、-イントロンのホーミングエンザイム認識配列を決定するためには、2倍体細胞における -イントロンの解析が必要である。この時、通常の接合により生じた2倍体細胞もしくは、原形質体 (protoplast) を用いた体細胞融合により作成した人工的な2倍体細胞を選抜し、解析する事により -イントロンホーミングエンザイムの認識配列の決定を行う必要がある。その方法として、通常の接合や体細胞融合を行った後、近赤外波長のレーザービームにより顕微鏡下の対象物 (生細胞、その内部の小器官や微粒子、リポソーム) など 数 μm 単位のものを捕捉可能な装置を用いる。もしくは、あらかじめ *C. smithii* と 1 塩基の突然変異を持つ *dum-16* 呼吸能回復株双方の核、葉緑体、ミトコンドリアのいずれかに、別々の薬剤耐性を持たせておき、接合後2倍体細胞になったもののみ両方の薬剤耐性を持つ事を利用し、両薬剤を含んだ培地で培養することで、2倍体のみを選抜するという方法が考えられる。

[謝辞]

このテーマでの研究をするきっかけを与えてくださった大濱武教授には、当初から本原稿の校正まで、さまざまな助言をいただきました。また、同講座の後輩の方々にも、研究を進めていく上でサポートをしていただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

[参考文献]

Aagaard, C. , M. J. Awayez , R. A. Garrett (1997) Profile of the DNA recognition site of the archaeal homing endonuclease I-DmoI. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1523-1530.

Boynton, J. E. and Gillham, N. W. (1993) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol.* **217**, 510-536.

Boyntone, J. E. , E. H. Harris, B. D. Burkhardt, P. M. Lamerson (1987) Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Sci. USA*, **84**, 2391-2395.

Colleaux, L. , M. R. M. Wolwertz, R. F. Matagne, B. Dujon (1990) The apocytochrome b gene of *Chlamydomonas smithii* contains a mobile intron related to both *Saccharomyces* and *Neurospora* introns. *Mol Gen Genet*, **223**, 288-296.

Gillham N. W. (1978) Organelle heredity. *Reven Press, New York*, pp 1-602.

Harris E. H. (1989) *Chalmydomonas* sourcebook. Academic Press, San Diego (a) 82-84, (b) 47-50, (c) 576-579.

Hutner, S. H. , L. Provasoli, A. Schatz, C. P. Haskins (1950) Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.* **94**, 152-170.

Ma, D. P. , Y. T. King, W. S. Luckett, Jr. (1992) The group I intron of apocytochrome b gene from *Chlamydomonas smithii* encodes a site-specific endonuclease. *Plant Molecular Biology*. **18**, 1001-1004.

Marshall, P. and C. Lemieux (1992) The I-CeuI endonuclease recognizes a sequence of 19 base pairs and preferentially cleaves the coding strand of the *Chlamydomonas moewusii*

chloroplast large subunit rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6410-6470.

Matagne, R. F. , M. R. M. Wolwertz, C. Munaut, C. Duyckaerts, F. Sluse (1989) Induction and Characterization of Mitochondrial DNA Mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology*. **108**, 1221-1226.

Randolph-Anderson, B. L. , J. E. Boynton, N. W. Gillham E. L. Harris (1993) Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet*, **236**, 235-244.

Remacle, C. , C. Bovie, M. R. M. Wolwertz, R. Loppes, R. F. Matagne (1990) Mitochondrial genome transmission in *Chlamydomonas* diploids obtained by sexual crosses and artificial fusions: Role of the mating type and of a 1kb intron. *Mol Gen Genet*, **223**, 180-184..

Remacle, C. and R. F. Matagne (1993) Transmission, recombination and conversion of mitochondrial markers in relation to the mobility of a group I intron in *Chlamydomonas*. *Curr Genet*, **23**, 518-525.

Ryan, R. , D. Grant, K. S. Chiang, H. Swift (1978) Isolation and characterization of mitochondrial DNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3268-3272.

Saito, T. , M. Hirono, K. Shimogawara (2000) クラミドモナス技術講習会資料, (a) 1-1. (b) 1-7.

Sambrook, J. and D. W. Russell (2001) Molecular Cloning THIRD EDITION. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, *Cold Spring Harbor*, New York. (a) 3, Appendix 2.2. (b) 3, Appendix 2.6. (c) 1, 1.123-1.125.

[培地組成表]

(1) Ampicillin (Sambrook and Russell 2001 (b); Harris E. H., 1989 (b))

stock solution: 100 mg/ml, -Working: dilute with TAP Medium for 100 μ g/ml

(2) X-gal, IPTG

Stock solution IPTG 2%	Working: 1ml per Liter of LB-amp Medium
X-gal 2%	Working: 2ml per Liter of LB-amp Medium

(3) Preparation of TAP Medium (Harris E. H., 1989 (c))

TAP Medium (水 1 l 中に含まれる薬品の量)

Tris	2.42g
TAP salts	25ml
Phosphate aolution	0.375ml
Hutner trace element	1.0ml
Glacial acetic acid	1.0ml

[Stock solution]

1. TAP salts (水 1 l 中に含まれる薬品の量)

NH ₄ Cl	15g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.0g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0g

2. Phosphate solution (水 100 ml 中に含まれる薬品の量)

K ₂ HPO ₄	28.8g
KH ₂ PO ₄	14.4g

3. Hutner trace element (Hutner et al., 1950) (水 1 l 中に含まれる薬品の量)

EDTA, disodium salt	50g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22g
H ₃ BO ₃	11.4g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5.06g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.61g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.10g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.99g

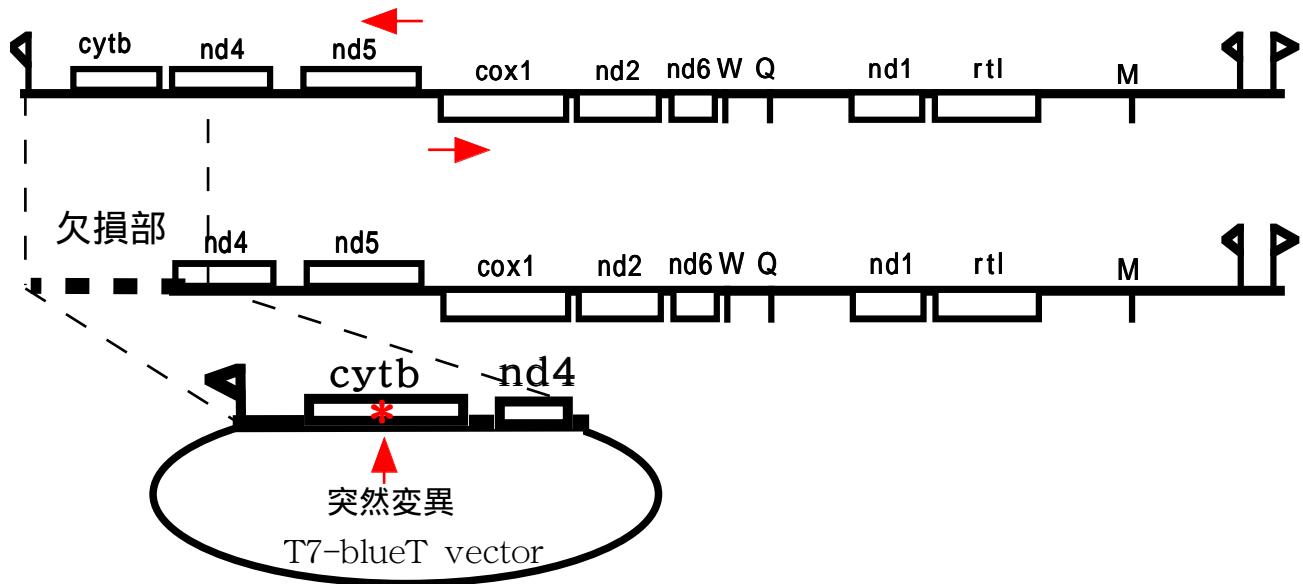


図 1 ミトコンドリアゲノム構成及び大腸菌ベクターにクローン化された形質転換用 DNA 構成
野生型 *Chlamydomonas reinhardtii* (上) と呼吸能欠損株 (下)
矢印は転写の方向を示す。

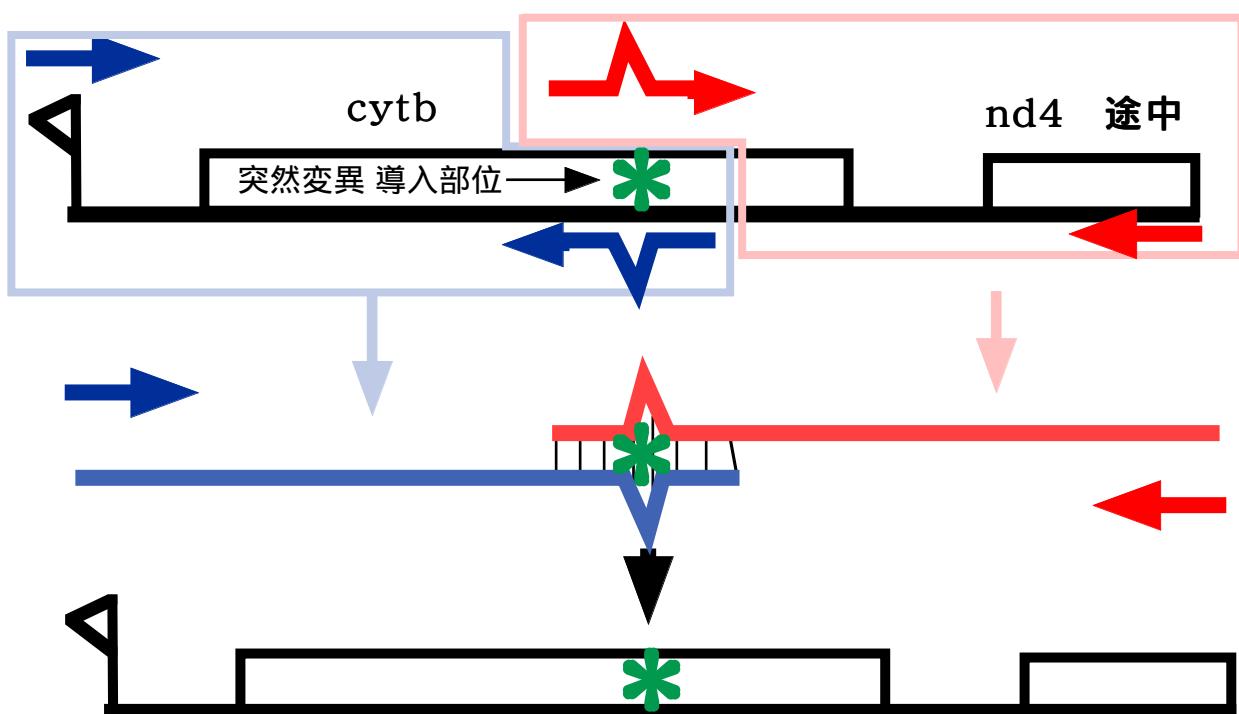


図 2 突然変異を含むDNA constructの合成手順
矢印は合成DNAプライマーを示し、矢印中の山型部分は導入する突然変異塩基部位。

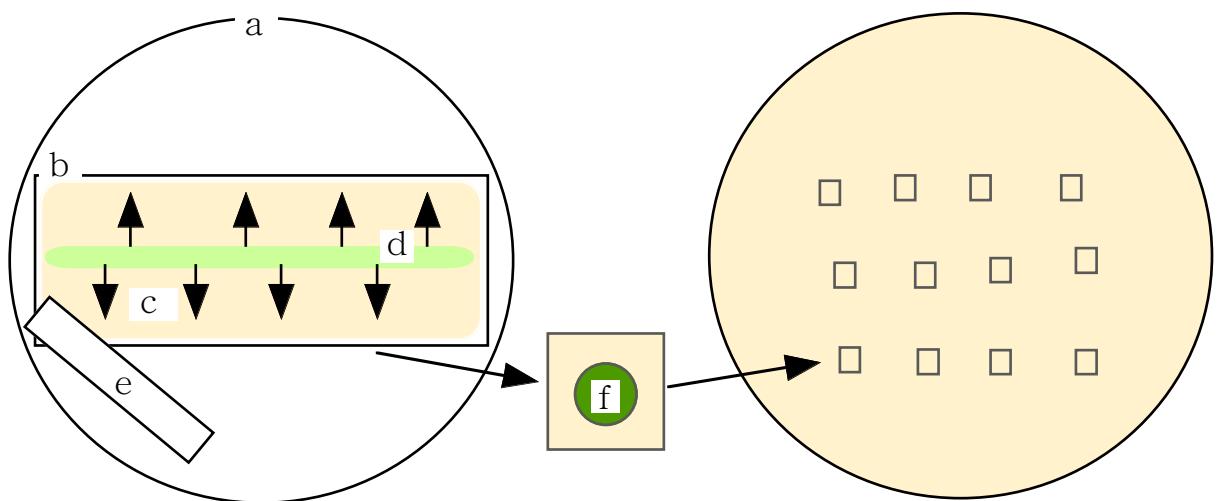


図3 接合子の分離方法

- a. プラスチックシャーレ
- b. スライドガラス
- c. TAP+amp-1% 寒天
- d. 接合子懸濁液
- e. TAP+amp-1% 寒天が薄く乾きやすいため、液体TAP+ampをしみこませた濾紙
- f. 接合子

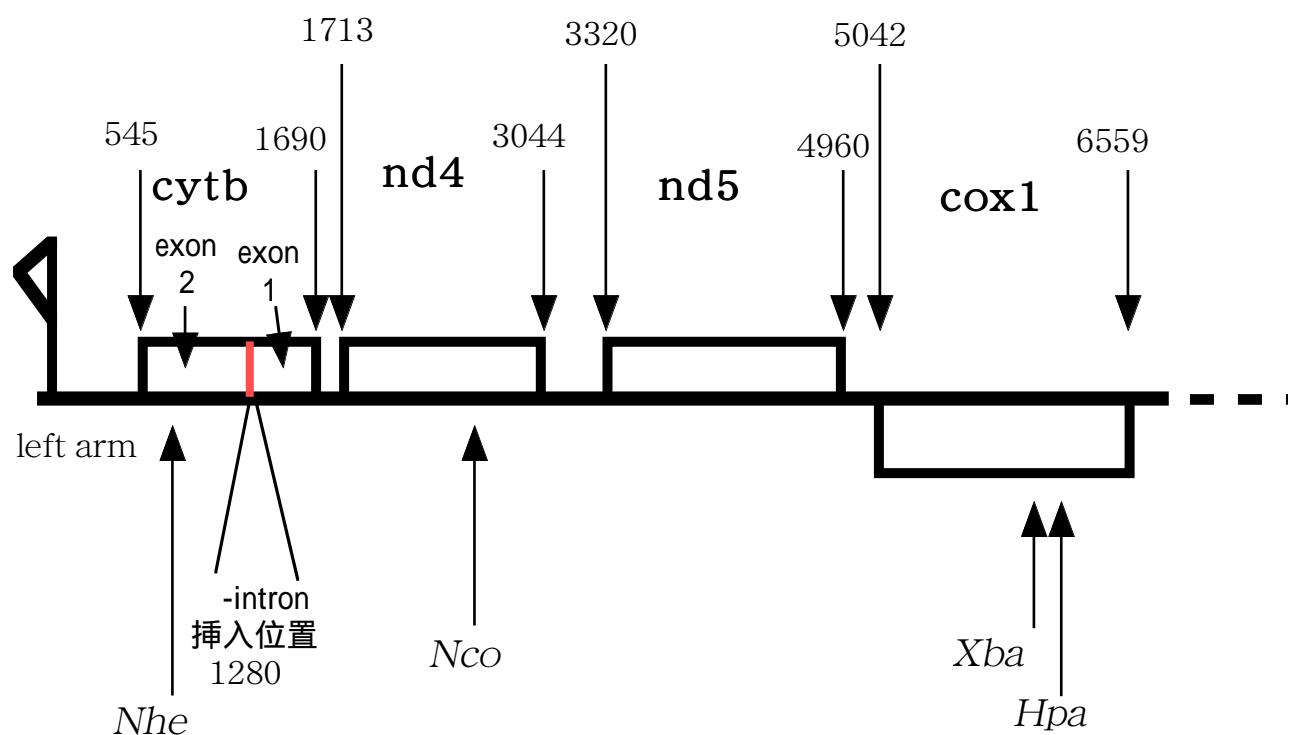
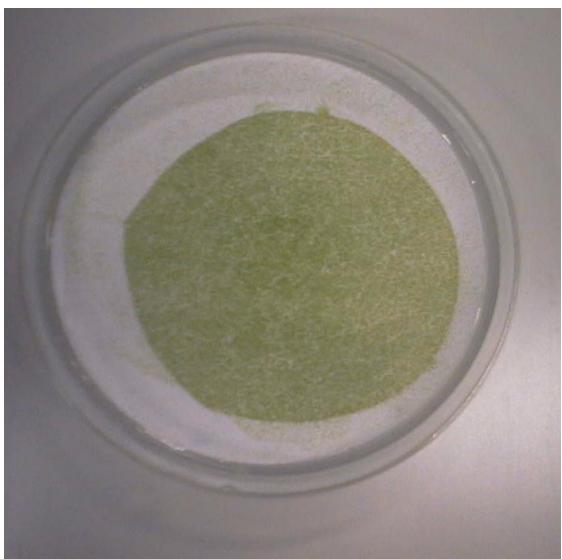


図4 *C. smithii* ミトコンドリアにおいて、制限酵素 *Nhe* , *Nco* , *Xba* , *Hpa* で切断される位置

(A)



(B)

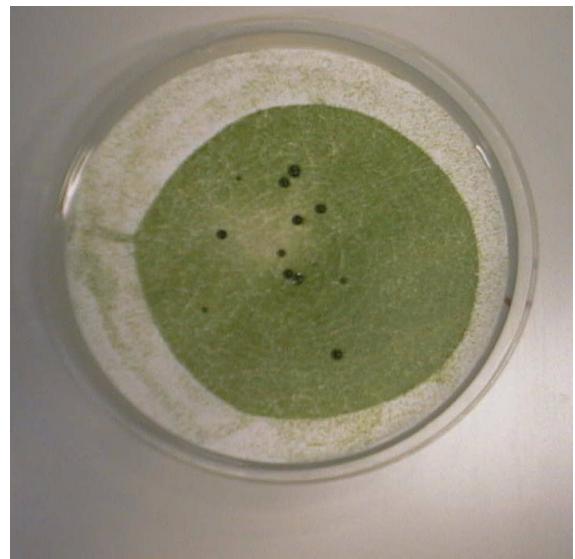


図5 (A) DNA constructを導入していないコントロールのプレート
(B) DNA constructの導入により、形質転換体のコロニーを生じたプレート

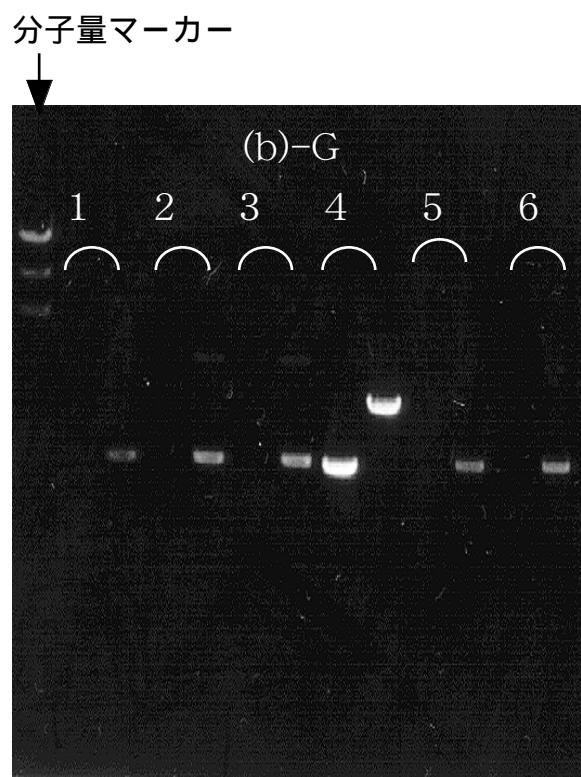
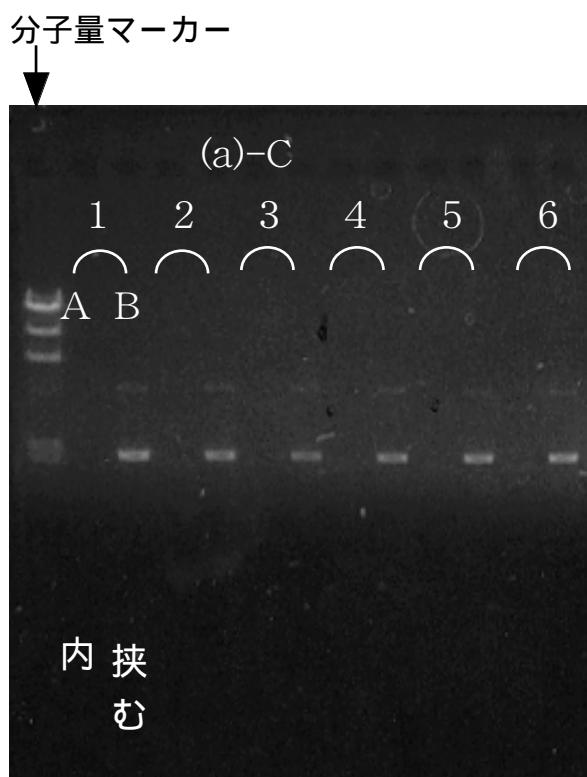


図6 (a)-C, (b)-G 変異を持つ、それぞれ6つのコロニーより抽出したDNAを用いたPCR結果(その他のサンプル省略)
Aレーン: 内部プライマーによるPCR産物の電気泳動結果
Bレーン: を挟むプライマーによるPCR産物の電気泳動結果
(b)-G の4のコロニーのみ -イントロンが存在。

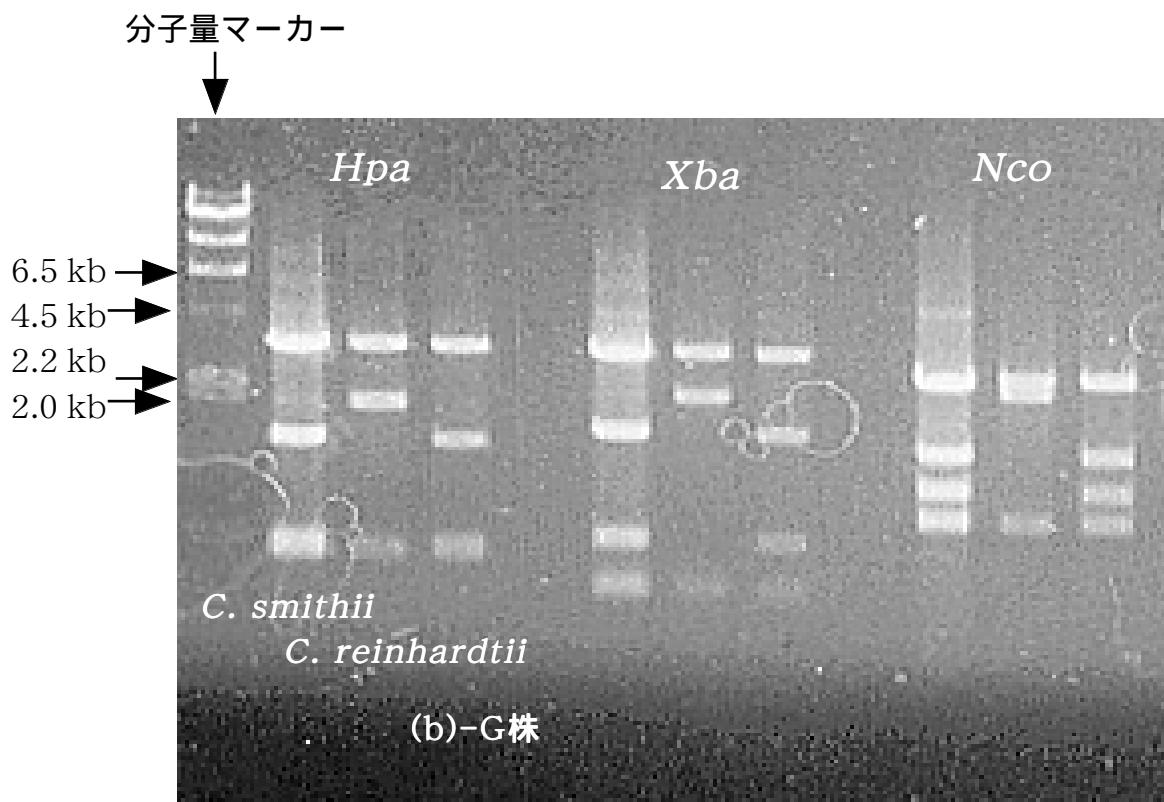


図7 *C. smithii* (野生型)、*C. reinhardtii* (野生型)、(b)-G 変異を持つF1コロニーの1つ、それぞれにおけるミトコンドリアDNAの、*Hpa* *Xba* *Nco* 制限酵素切斷パターン
(b)-G 変異を持つF1コロニーの1つは *C. smithii* と同じパターンを示す。

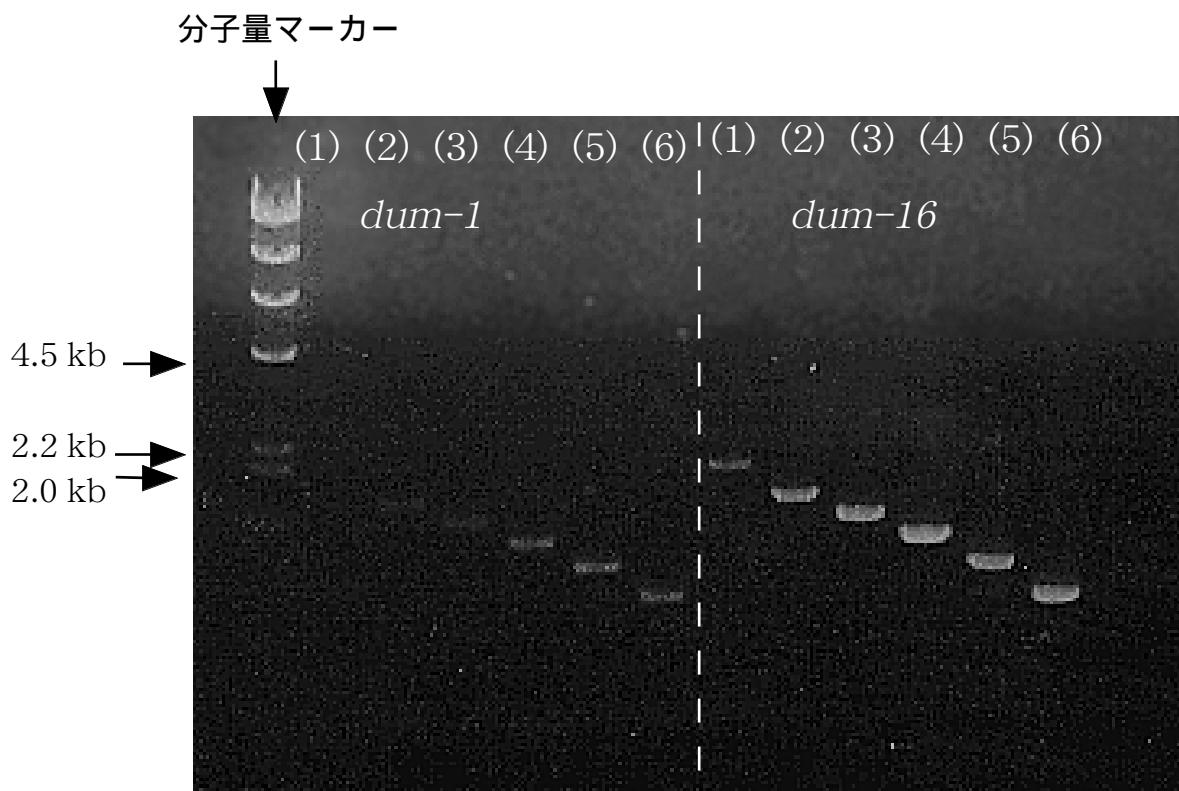


図8 *dum-1* 及び *dum-16* のミトコンドリア欠損領域の推定

exon 1				-イントロン		exon 2			
(a)		挿入部位		(c)		(d)			
GTA	CTA	CCA	TGG	GGC	CAA	ATG	TCT	TTC	TGG
Val	Leu	Pro	Trp	Gly	Gln	Met	Ser	Phe	Trp
		W		GGA	W		TCA		
		CCT		GGT	AAT		W		
		CCG		GGG	CAG		TCG		
		CCC		W	AAC		TCC		

表1 *C. reinhardtii* のミトコンドリア内 -イントロン認識配列

各呼吸能回復株はCCA CCTならば(a)-Tのように示す。

W：野生型

：1塩基の置換ではアミノ酸が変化し、*cytb* 遺伝子の働きを阻害する可能性があるため、2塩基を置換することで類似のアミノ酸に変化させる

-イントロン 挿入部位									
GTA	CTA	CCA	TGG	GGC	CAA	ATG	TCT	TTC	TGG
Val	Leu	Pro	Trp	Gly	Gln	Met	Ser	Phe	Trp
		W		GGA	W				
		CCT						W	
				GGG	CAG		TCG		
		CCC		W			TCC		

表2 dum-16 形質転換結果

W：野生型

：形質転換体が得られなかつたもの

		25-Sep	26-Sep	1-Oct	2-Oct	3-Oct	4-Oct	12-Oct
呼吸回復株	(a)-T	4/5	5/7	9/10	7/10	6/12	2/8	3/5
	(a)-C	7/10	5/10	6/10	3/7	5/10	1/8	5/8
	(b)-A	5/8	5/8	8/12	6/9	6/10	9/12	6/8
	(b)-G	2/6	6/9			3/6	4/6	3/5
	(c)-G					5/7	4/7	5/7
	(d)-G	1/6	5/7	7/10	6/9	7/11	8/12	3/6
	(d)-C	3/6	3/8	8/11	9/12	3/10	10/12	5/9
	野生型					7/10	9/12	

表3 *cytb* 内部に突然変異を持つ呼吸回復株 ((a)-T から (d)-C まで) と *C. smithii* の接合子、野生型 *C. reinhardtii* と *C. smithii* の接合子の発芽率
それぞれの接合日において、発芽数 / 採取した接合子数。

<i>C. reinhardtii cytb</i> (クラミドモナス目)	TAT GTA CTA CCA TGG GGC CAA ATG TCT TTC
<i>C. smithii cytb</i> (クラミドモナス目)	Tyr Va Leu Pro Trp Gy Gn Met Ser Ser
<i>Batrachuperus tabaensis stra n MVZ231095 cytb gene</i> (イモリ目)	TAT GTC CTC CCA TGG GGC CAA ATA TCC TTC
	Tyr Va Leu Ile Ser
<i>Chrysemys pectam tochondron</i> (カメ目)	TAT GTC CTA CCA TGG GGC CAA ATA TCC TTC
	Va Ile Ser
<i>Lux us card na s cytb gene</i> (コイ目)	TAT GTA CTA CCA TGG GGC CAA CTG TCC TTC
	Leu Ser
<i>Nyct nomops aur nosus m tochondra cytb gene</i> (コウモリ目)	TAT GTA TTA CCA TG A GGA CAA ATG TCT TTC
	Leu *Trp Gy
<i>Paru a americana cytb gene</i> (スズメ目)	TAT GTA CTG CCA TG A GGC CAA ATG TCA TTC
	Leu *Trp Ser
<i>Pasmod um sp. GRW4 cytb gene</i> (アピコンプレックス門)	TAT GTA TTA CCT TGG GGT CAA ATG AGT TTC
	Leu Pro Gy Ser
<i>Tetraselmis aff. Macu ate cytb gene</i> (クロロデンドロン目)	TAT GTA TTA CCT TGG GGT CAA ATG ATG TCT TTT
	Leu Pro Gy Ser
<i>Thomomys ta po des cytb gene</i> (リス亜目)	TAC GTC CTA CCA TGG GGA CAA ATG TCA TTC
	Tyr Va Gy Ser
<i>Tr meresurus abo abrs cytb gene</i> (ヘビ亜目)	TAT GTA CTA CCA TGG GGC CAA ATA TCC TTC
	Ile Ser
<i>V verraz beta ha cytb gene</i> (ネコ目)	TAT GTC CTA CCA TGA GGC CAA ATG TCN TTC
	Va

表4 *C. reinahrdtii* と種々の生物の *cytb* 遺伝子の塩基配列及びアミノ酸の比較

赤字は二箇所の突然変異を加えた部位、青字は塩基配列、アミノ酸に違いのある部位。

* : TGAは普通遺伝暗号表では終止コドンだが、動物のミトコンドリアではTrpとして使われる場合が多い。