

RMuトランスポゾンによる
体遺伝子改変システムの構築

研究課題番号：10660003

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金
基盤研究（C）（**1**）研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者：石川隆二

（弘前大学農学生命科学部助教授）

イネ RMu トランスポゾンによる遺伝子改変システムの構築

研究組織：弘前大学農学生命科学部

研究代表者：石川隆二

研究分担者：なし

研究経費

平成10年度	2,700 千円
平成11年度	500 千円
平成12年度	700 千円
計	3,900 千円

(1) 論文など

Ishikawa, R. Structural difference of RiceMutator and maize Mutator elements and the activity of *RiceMutator*, Abstracts of 41th Annual Maize Genetics Conference, Lake Geneva, Wisconsin, 1999.

Miyashita, Y., R. Ishikawa, M. Senda, S. Akada, T. Harada and M. Niizeki : Copy number of *RMu* elements in Japanese lowland rice landrace. *Rice Genet. Newsl.* 15:162, 1998

Ishikawa, R., T. Konno, M. Senda, S. Akada, T. Harada and M. Niizeki: Behavior of transposable elements in Akihikari and its parental strains. *Rice. Genet. Newsl.* 15:163-164, 1998

(2) 口頭発表

石川隆二・宮下弥生・三浦 桂・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 *RMu2* クラスのトランスポソンの構造解析. 日本育種学会第96回講演会, 1999.

宮下弥生・石川隆二・三浦 桂・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 *RMu1* クラスにおけるトランスポソンの構造解析. 日本育種学会第96回講演会, 1999.

石川隆二・宮下弥生・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 *RMu* トランスポソンの遺伝的特徴 Ⅰ. *RMu* トランスポゾンファミリーの挿入領域の分子的特徴. 日本育種学会第95回講演会, 1999.

宮下弥生・石川隆二・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 *RMu* トランスポゾンにおけるトランスポーズ領域の構造的多型. 日本育種学会第95回講演会, 1999.

石川隆二・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 *RMu* トランスポソンの構造分化とタッキング用プローブの開

発. 日本育種学会第94回講演会, 1998.

宮下弥生・石川隆二・今野太郎・三浦 桂・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 イネ在来種における *RMu* トランスポソンの可動性. 日本育種学会第94回講演会, 1998.

石川隆二・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 *RMu* トランスポソンの遺伝的特徴 Ⅰ. *RMu* トランスポソンファミリーの挿入領域の分子的特徴. 日本育種学会第93回講演会, 1998.

1. 緒言

Mutator トランスポゾンとはトウモロコシゲノム内で見出された可動性因子であり, Donald Robertson(1978)が *Ac* トランスポゾンから生じた葉色変異系統から得た系統後代からクローニングされた. そのため, 制御因子は易変異性との共分離や *Mutator* ファミリーで最長のものとして見出された (Chomet 1991, Hershberger et al. 1991, Qin et al. 1991). 後に制御因子の命名に関して混乱をさけるため *MuDR* と改名された. イネ *RMu* 系統は *MuDR* の内部領域をプローブとして IR36 ゲノムライブラリーから得られた (Ishikawa and Freeling 1997). *RMu1-IR36* は内部に *mudrA* 遺伝子と相同な領域を有する *rmuA* 遺伝子を有する 4.3kb の配列である. その *rmuA* 遺伝子は *MuDR* の転移酵素である *mudrA* と高い相同性を示し, 内部には Super-Mu ファミリーに共通する Putative transposase domain (Eisen et al 1994) を有する. その発現は栄養成長期においては日本型のみに見出された. また, 日本型系統では北海道でのイネの北進に役立った易変異系統の赤毛(A1)系統において見出された. そのため, *RMu* トランスポゾンの転移に関しても A1 系統を中心に調査を行った. 日本型近縁系統間で *RMu* プローブにおける多型がみられたことは近年に生じた多型であると考えられた. さらに, *RMu* ファミリーにはかなりの構造変化を有したサブファミリーが分化していることから, これらサブファミリーの構造変異とその変異機構についても調査をすすめた. これらの知見は, イネゲノムにおけるジェノミクスを進めるための遺伝的解析ツールとして利用可能であると考えられる. これらの可動性の分子的証拠を得るためにいくつかの実験を行った. 1つはサザン法による内在性因子の可動性の検出である. そのために, サブファミリーを識別同定するプローブを作成した. 2つめは, イネゲノム内における *RMu* 因子の周辺配列を明らかにして, そこからの転移を確認することである. さらに, イネゲノムにおいて全ての派生系統をサザン法で解析することが困難であることから, アビドグリスを利用した *RMu* 転移検出システムを作出する試みを行った.

2. *RMu* 因子構造の解析

IR36 の *Sau3AI* 不完全消化産物から得られたライブラリーより, *RMu1-IR36* がクローニングされた (Fig 1). これまでクローニング, 解析された *RMu* 因子は 1

8 因子である (Fig 2, Tab 1). これらは逆位末端反復配列(TIR)に相同性を有し (Tab2 及び 3), さらに内在 *rmuA* 遺伝子を有するかどうかにより *RMu1* ならびに *RMu2* 因子に大別される. TIR は 141-275bp までの変異があり, 高い相同性は末端部にみられる(Fig 3, 4). これは *murA* 遺伝子が *Mutator* ファミリーの可動性因子に結合する 25-56nt を含む最末端から 90nt までにおいて高い相同性を示すことと一致した(Fig 5). 特に, *RMu1-IR36* においては 90nt の左右 TIR が完全に一致する. また, 内部構造における差違から分類したサブファミリー間においても片側の TIR 間で高い相同性を示すことは単純に左右の相同性のみによって機能を維持しているのではなく, *MuDR* と同様に転写制御領域などを含んでいることが推測される. ただ, まだ内部遺伝子の制御領域が特定されていないことより, この相同性の保持は今後の課題となろう.

RMu1 は内部の多様性を有する複数の因子に分けられる.*RMu2* 因子にも *RMu1* からの内部欠失によって生じた系統があり, *RMu2-IR36a* は IR36 ゲノムから TIR 末端に設定したプライマーによってクローニングされた(Fig 6). これらの欠失は主に縦列配列を介して生じることが *RMu1-IR36* ならびに *RMu2-IR36a* の塩基配列の比較から推定される. EST データベースから C98506 (日本晴れ, 開花期の cDNA ライブラリー) と *RMu1-IR36, RMu2-IR36a* 配列との同一性がみられた(Fig 6 のアンダーライン部). この配列は *RMu1-A1* では完全に一致したため *RMu1-A1* もしくは, その類似因子から転写されたものと考えられる(Fig 7).

RMu1-IR36 の内部配列 (TNP) ならびに右 TIR を含む 700bp の TIR 配列をプローブとして, *RMu1-IR36* 関連配列のマッピングを行った. これらのサザンは 65°C 条件における 1xSSPE, 0.1%SDS での洗浄により行ったため, 推定で 95%以上の相同性を有する配列がマッピングされたものと考えられる. マッピング材料は, あさみのり xIR24 の KRIL 系統を利用した. その結果, TNP で 2 ならびに TIR で 10 カ所の位置にマッピングされた(Fig 8A,B). セントロメアとの位置関係を図示したが, ゲノム全体に散在していることがわかった. また, これらのプローブを利用して在来種間での多型を調査した. 供試材料には日本在来水稻ならびに在来陸稻を用いた. 在来水稻 51 系統では TIR プローブでは 5-6 コピーの *RMu* 因子が識別され, RFLP パターンから 4 タイプにわけることができた(Fig 9). これらのタイプごとに TNP プローブでサザン解析を行ったところ, タイプ 1 の 11 系統のうち 1 系統が異なる RFLP を示した. 同様に在来陸稻 50 系統では TIR プローブで 4-6 コピーみられたパターンが 3 タイプに分け

られた(Fig 10). 在来陸稻ではタイプ1ならびに2がそれぞれ多型を示したことから, これらは近縁系統間で *RMu* 因子が比較的近年に転移したものではないかと推定された. 熱帯日本型12系統を用いて同様なサザン解析したところ, TIRプローブで4-8コピーとかなりの多型を示した(Fig 11). これらの多型系統においても TNPプローブで同一 RFLPパターンを示した系統があることから, これらの多型が転移によるものであれば熱帯日本型では *RMu2* クラスの因子がより高い転移活性を有することになる. 易変異系統, 赤毛系統の自殖後代8系統を用いたサザン解析においては TNPプローブで3系統, TIR系統で2系統の RFLP

パターンを示す個体がみられた(Fig 12). ただし, これらの多型が遺伝せず, 異なる自殖後代ではこのような多型を生じる頻度が異なった. したがって, これらの多型が体細胞で生じた変異か挿入領域近傍で生じたメチル化などによる制限部位の修飾により生じた後生的な, 一時的な変異であるかについては明らかでない. これらの違いを示す有効な方法がないため, 転移酵素に共通する部位を有する *rmuA* 遺伝子の転写を追跡することで, これら転移を高頻度に誘発する条件を探索した.

3. *RMu* 転移酵素の転写

rmuA 遺伝子は内部に細菌から高等植物まで広く存在するトランスポゾンファミリーである Super-Mu ファミリーに共通する転移酵素に共通する配列を有していた(Fig 13)では高い相同性を示した部分を強調して示した.

この5'領域を FM2 (ORF中の2番目の Met 配列からのプライマー) -r1 (第2エキソン内における reverse プライマー) により RT-PCR を行ったところ, 栄養生長組織では日本型系統においてのみ転写が認められた. しかし, インド型系統である IR36 並びに ACC435 系統ではみられなかった.

この2番目の Met の上流2塩基が CC であり, これは高等植物の開始メチオニンに共通する Context であり, より上流の Met ならびに下流の第3メチオニンにはみられなかった. よって, 2番目の Met からのアミノ酸配列が *rmuA* として働くことが予測された. 次に orf の上流にある3つの Met から始まるプライマーを上流からそれぞれ FM1, FM2, FM3 として Forward プライマーとして利用し, reverse として r1 プライマーを用いたところ, FM2 と r1 との組み合わせ

でのみ RT-PCR 産物が得られた。第 1 Met は転写領域外であり、第 3 Met は第 1 イントロン中にあるために増幅しなかったものと考えられる。

次にエクソン 3 内部、最も高い相同性を *mudrA* 遺伝子と示した部位に r4 プライマーを設定して、5'側の領域を FM2-r4 プライマーで増幅を行った。その結果、2種類の RT-PCR 産物が得られた(Fig 14)。3'側では単一の増幅産物しか得られなかった。FM2-r4 で得られた PCR 産物は約 1kb ならびに 0.4kb であり、塩基配列を調べた結果、1kb 断片は第 1 及び 2 イントロンがスプライシングされたものであり(ALTS1)、0.4kb 断片はイントロン以外に第 2 エクソンも含めてスプライシングされていた(ALTS2)。第 2 エクソンにも *mudrA* 遺伝子との同一性がみられるため、第 2 エクソンを失った場合は転移の抑制に働く産物を作出するのではないかと考えられる。選択的スプライシング産物(ALTS1,ALTS2)の量比の変化をみるために様々なストレスを与えたが、脱メチル化剤や単純な低温では顕著な差はみられなかった。さらに、カルスでは 0.4kb のサイズしか増幅されなかった(Fig 14)。異なる生育ステージの組織（生育後期の葉組織、止め葉ならびに葉耳間長が 0 cm 以上になる後期の穂）ならびに温度条件を 1 2 時間サイクルで変化させた時 (25°C 12 時間, 15°C 12 時間) に ALTS1 産物が ALTS2 より多くみられたため、この条件での転写産物の誘導を IR36 で試みた。ALTS1 産物を見るため、第 1 から第 2 エクソンにまたがるプライマー-ALTS を設計し、第 2 エクソンの r1 と組み合わせて RT-PCR を行った。その結果、1 2 時間サイクルの低温ストレスで IR36 からの転写産物を誘導することができた(Fig 15)。さらに、この転写産物を完全長のサイズでみるために、第 2 エクソンの 20bp 上流の 623f と RSTOP で RT-PCR を行った。DNA のコンタミネーションの可能性については PGI 遺伝子のエクソン-イントロン隣接領域を利用して確認した。cDNA からは 294bp、ゲノムからは 2 つの重複遺伝子から、それぞれイントロンを含む 1.2 ならびに 1.3kb の断片が増幅される。RT-PCR からは A1 系統では正常と考えられる第 2 エクソンを含めた ALTS2 産物がみられず、ALTS1 と考えられるサイズと異常なサイズの RT-PCR 産物がみられた(Fig 16)。これは A1 系統ではコード領域に塩基置換で様々な変異がみられるため全長にわたって正常な産物が転写されなかったためと考えられる。RT-PCR 産物の塩基配列からは non-sence, missence 変異を有したものが得られた。IR36 からは少ないながらも低温ストレスでも生育後期の葉でも ALTS1,2 の両産物が転写されていた。これらの結果より、A1 より IR36 ゲノム内においてはより厳密な遺伝子転写制御

が行われていると考えられた。これまでクローニングされた *RMu1* 因子からもこの転写制御の機構が推定される。*RMu1-IR36* に比較して、*RMu-A1* ならびに *RMu1-A23* では TIR と開始コドンの間に変異がみられ、特に日本型から得られた *RMu1* 因子では欠失もみられる。TIR においても変異がみられるため、これらが転写機構の違いに関与していると考えられた。

EST の BLASTN 検索から *rmuA* 遺伝子に高い相同性を有するものがイネ EST 配列として得られた。この配列は開花期に得られた cDNA からクローニングされており、*RMu1-A1* の配列により高い相同性を示した。アラインメントをとったところ、TIR 配列直後の 240bp から高い相同性を示した(Fig 17)。しかし、第 2 エキソンがスプライシングされていた(Fig 18)。この第 2 エキシソンの欠失した因子がないことを確認するために第 2 エキシソンを挟み込む位置にプライマーを設定して PCR を行った(Fig 19)。その結果、全てが第 2 エキシソンを含むバンドであったため、転写においてなんらかの理由で第 1 及び 2 イントロンと共に第 2 エキシソンがスプライシングを受けている、つまり第 1 イントロンのスプライス受容部位が機能していないことがわかった。イントロンの供与、受容部の塩基配列が *RMu1-IR36* ならびに *RMu1-A1* でほぼ同一であり、GT-AG 配列エキソン-イントロン隣接部にみられることから、このエキソンスキッピングはエキソン/イントロン接合部の配列異常によるものではないことがわかった(Fig 20)。一方、このようなスプライシングがおこらないことがあり、それも生育後期ならびに低温ストレス時に正常なスプライシング(ALTS 1)が頻繁に生じる。この原因は明らかでなく、なんらかのトランス因子が働いているものと考えられる。

RMu1 因子では多様性がみられる 5'ならびに 3'領域の PCR 増幅を行った。これまで得られていた *RMu1* 因子から期待されていたサイズ以外の断片も複数得られた(Fig 21,22)。この領域に複数の繰り返し配列がみられることから、これら反復配列を介した塩基配列の再構成が頻繁に生じていると考えられる。

4. *RMu* 因子の挿入領域の特徴と新たな因子の構造変異

新たな *RMu* 因子をクローニングする目的で保存性が高い TIR 領域のプライマーを利用して、PCR 及び I-PCR を行った。さらに、赤毛系統からのゲノムライブラリーを作成し TNP ならびに TIR プローブを利用してクローニングを行った。

TIR に設定したプローブからは *RMu1* からの欠失因子である *RMu2-IR36a* が得られている。この因子は転移後の 2 重鎖切断箇所を姉妹染色分体の鋳型因子をもとに Gene conversion で修復している最中にタンデムに存在している反復配列を介しての鋳型の横滑りで生じるのであろう。

I-PCR では TIR 末端直後の TIRout, *RMu1*out プライマーを行った。隣接領域にゲノムから重複された標的配列重複が認められた場合に *RMu* 因子が挿入されているとし、それらの周辺配列を調査した。9bp の標的配列ならびに TIR 隣接領域には特に顕著な塩基配列の特徴は認められなかった。

この I-PCR で得られた隣接領域にプライマー配列を設定し、LA-Taq (Takara co.)によるゲノムからの増幅を行った。A1 ゲノムからは 748bp の *RMu2-A1a*, 1147bp の *RMu2-A1b*, 1169bp の *RMu2-A1c* 因子を得た(Tab 1)。

RMu2-A1a は他の因子に比較して内部に全く相同性を示さず、右 TIR において最も低い相同性を示した因子である。さらに、この内部をプローブ化し、サザン法によりゲノム内関連因子のコピー数を推定した。その結果、イネゲノム内におよそ 2 コピー存在していることが明らかとなった(Fig 23)。

RMu2-A1b は *RMu2-IR36a* と高い相同性を示した(Fig 24)。顕著な違いは右 TIR における 245bp の挿入である。この配列を BLASTN 検索にかけたところ同じくイネゲノム内に存在する *wanderer* トランスポゾンと高い類似性を示した(Fig 25)。ただし、同トランスポゾンは 10bp の TIR を有するサイズ約 1kb のトランスポゾンである。ただし、挿入に当たる標的配列がみられないこと、*wanderer* の内部配列の一部のみが挿入されていることから、この右 TIR への挿入は転移ではないと考えられた。この挿入領域を *RMu2-IR36a* ならびに *wanderer* の配列と比較したところ、右側 TIR からの配列からみた AAG のトリヌクレオチドにおける microhomology を介した組み換えで生じた挿入であると考えられた。*Mu* トランスポゾンは切り出された時の 2 重鎖修復に際して、鋳型トランスポゾンを利用した修復を行うことが知られている。この修復の際に鋳型トランスポゾンを姉妹染色分体から探し出して修復すると考えられている。修復鎖と介在タンパクの複合体(推定)が microhomology を検索して鋳型鎖を探す際に間違っ異所的に存在する microhomology を鋳型として利用したと推定される。さらに、*RMu2-A1b* では *wanderer* 内部に存在する AAG で本来利用されるべき鋳型に戻っている。そのため、鋳型鎖を早く交換する Rapidly Exchanging Template-strand 系が働いているものと考えられる。イネゲノム内では *wanderer* トランスポゾン

は高いコピー数で存在している(Fig 26). そのため, 上記の検索システムに容易に検出されたものと考えられる.

RMu2-A1c は *RMu* 因子の中で最も長い 275bp の TIR を有していた(Fig 27). さらに内部は *RMu2-A1a* と同様に他の *RMu* 因子との類似性がなかった. この内部配列はゲノム内で 2 – 3 コピーと低コピーであるが, TIR の延長された領域はかなりの高頻度反復として存在していた (Fig 28). これは *RMu2-A1b* 同様にゲノム内に存在する高頻度反復配列が取り込まれた後に, もう一方の TIR にコピーされたものと推定される.

モデルとしては, Fig 29 に示したように,

- 1) トランスポゾンが Stem-loop 構造をとる
- 2) 挿入の入っていない TIR にニックが入る
- 3) 挿入配列がニック修復の際にコピーされる

ことで A1b から A1c 因子のような構造をとるものが生じると考えられる.

さらに, Fig 30 に示したようなモデルで内部配列がゲノム内のユニークな配列をとることが推定される. TIR の挿入と異なる点は, 複合構造をとることで異所的な鋳型を検出する TIR と異なり, 転写されているようなユークロマチン領域のユニークな配列が Loop 構造に接近しやすいために鋳型として利用されるものと考えられる.

RMu2-A1c と同じサブファミリーに属する 2 因子がゲノムデータベースから検出された(Fig 31,32). インド型のゲノム配列から得られた *RMu2-G4* は *RMu2-A1c* で欠失している部分を有しているため *RMu2-A1c* の近年の祖先因子であると考えられる. さらに, 日本晴れでみられた染色体 1 上の *RMu2-N1c* はそこから派生したものと推定される.

この他にゲノムデータベースから *RMu2-IR36b* ならびに *RMu2-IR36c* 因子と相同な因子が得られた(Tab 1). これらは日本晴れの第 1 染色体に座乗していることが塩基登録情報からわかった.

RMu2-IR36a 類似因子としては A23 系統からのゲノミックライブラリーから得られたものとして R6,R7,R12,ならびに TIR の 4 因子が得られた. これらの周辺配列から他系統における存在様式を PCR で調査している. その結果についてはまだでていない.

5. ベクターの作出

イネゲノム内では内在性の欠失因子(*RMu1-A1*, *RMu1-A23*, および *RMu1-435*)が存在し、転移酵素の転写調節機構も存在しており、実際に転移をみることや、追跡することが困難である。そのため、アラビドプシスを利用した形質転換系を利用した解析を進め転移、ならびに転移酵素の制御機構を検討することにした。

形質転換体における標識遺伝子として、さらに転移を可視化するためにオワンクラゲの蛍光タンパク(GFP)を利用することにした。GFP は静岡県立大学の丹羽博士より譲渡していただいた(Chiu et al. 1996, 丹羽康夫 1999)。

sGFP は pUC18 にクローニングされており、ベクターの構築上望ましくない制限酵素サイトもあったため、sGFP(112-*Hind*III)プライマーと sGFP(*Sac*I)プライマーにより不必要な制限サイトをなくして pBluescriptII へクローニングした(Fig 33)。ベクターの構築は Fig 34 にまとめた。

現在のところ可動因子として高い可能性を持つ *RMu1-IR36* は TIR 末端に *Bam*HI サイトを加えたプライマーを設定して、再クローニングした。この *RMu1* 因子は、35S— Ω プロモーターと sGFP との間に挿入した(Fig 35)。このベクターでは

- 1) *RMu1-IR36* の自律因子としての可動性をアラビドプシスで検定する、
- 2) イネに形質転換することで可動性（この場合は自律性でなくても可動性を示す場合が考えられる）を検定することができる。さらに、*RMu1* の代わりに *RMu2* 因子を導入して、転移酵素の過剰発現下での転移能をみるようなベクター系として利用できよう。

転移酵素に関しては、*RMu1-IR36* の内部配列から 623f(*Xba*I)ならびに RSTOP(*Sac*I)プライマーで *rmuA* 遺伝子コード領域をクローニングした。この断片を 35S プロモーター下に挿入することで過剰発現系を構築するベクターとした。

RMu2 因子の系としては *RMu2-IR36a* を TIR(*Xba*I)プライマーで増幅して pBluescriptII にクローニングした。この因子を 35S—sGFP に挿入することで非自律因子の系として、

- 1) 転移酵素過剰発現系と組み合わせて挿入して転移酵素の機能を検定
- 2) イネに導入することで可動性を検定する。

ことにした。

RMu1-IR36 の内部を TIR-r1,F5-TIR プローブで増幅し、左 TIR ならびに右

TIR のサザンハイブリダイゼーションを行った結果、右 TIR がユニークなサザンハイブリダイゼーションパターンを示した(Fig 36). このことから右 TIR のみを利用するプラスミドレスキュー系を構築することにした(Fig 37). この系には内部に Bar 遺伝子を導入する予定である. Bar 遺伝子には 35S プロモーターとコード領域の間に *XbaI* サイトがあるため、ここに *XbaI* 消失カセット (両末端が *XbaI* に相補的であり、パリンδροームを形成しない) を導入する. その後、*XbaI* サイトを利用してバイナリーベクターに RescueRmu を導入する予定である.

RMu1 因子の派生系統では *rmuA* 遺伝子上流の転写調節領域に多様性がみられたため、転移酵素の制御パターンが単一でないことが予想されている. そのため、*RMu1-IR36* から TIR-613(*BamI*)プライマーで該当領域をクローニングした(Fig 38). この領域は 35S- Ω を除いたベクターの sGFP 上流領域に挿入することで転写調節単位としての機能を検定する(Fig 39). 同様に *RMu1-A1* からの同領域もクローニングする(Fig 40,41). *RMu1-435* の該当領域は転写単位として機能しないと考えられるが同様にクローニングする(Fig 42,43). これらベクターは構築できたものから、現在アラビドプシス (コロンビア生態型) に湿潤法で導入を試みている.

6. 赤毛系統における易変異性の検定

赤毛系統ではこの 100 年の間に *an1, an2, d1, d2, d6, Ur1* など複数の変異を生じておりその原因解明は突然変異育種をすすめるためにも重要である. さらに、いまだにクローニングされていない *an1, an2, Ur1* などの遺伝子群の機能解明にもつながる. 現在のところ、*D1* 座については名古屋大学芦刈氏より、*D6* 座については遺伝学研究所伊藤氏より、周辺配列の情報をいただいて赤毛系統の変異を調査した. *D1* については全塩基配列は明らかとなっていないが、ノーザンにおける転写量が赤毛よりも低いことからなんらかの転写調節機構が変異したことが推定される. 解析としては、PCR による *D1* 座の内部領域の増幅、ならびに PCR-RFLP による多型の検定を行った. また、これらをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行って制限酵素認識部位多型をみた. RT-PCR 産物については塩基配列の決定をすすめている. 現在のところ、大きな変異は認められていない. 一部、PCR 増幅のできない転写調節領域での変異が原因していることも予想される.

D6 遺伝子座については夷糶から *d6* 対立遺伝子をしおかりの遺伝的背景下に導入した系統において欠失が認められている(Sato et al. 1999). その *d6* 供与系統における変異を夷糶のゲノミック DNA を供試して調査した. PCR による増幅ならびに塩基配列の解析から, 646bp の欠失が原因となっていることがわかった. この欠失が直接なんらかの原因で生じたか, トランスポゾンなどの可動性因子が再転移をした際に欠失したかについては明らかでない(Fig 44,45).

7. 総合論議

RMu 因子はトウモロコシの *Mutator* 因子と同じ Super-Mu ファミリーに属するトランスポゾンである. イネには Yoshida(1998)らがクローニングした *Mutator* 様因子も存在するが *RMu* とは配列が異なり, 遺伝的に分化した時期が異なる因子が複数存在しているものと考えられる. このような Paralogous な因子の存在はアラビドプシスにおいても認められる(Yu et al. 2000). トウモロコシ *Mutator* 因子は Robertson(1978)により易変異系統 *Mutator* から見出されたトランスポゾンであり, これまでに遺伝学的, 分子遺伝学的に様々なデータの蓄積がある(Bennetzen 1996, Chandler and Hardeman 1992). *Mutator* は長い TIR や 9 bp の標的配列, ならびに保存的な転移機構などが顕著な特徴である. また, 内部の配列の獲得機構についても独特な特徴を持っている(Bennetzen and Springer 1994). これらの特徴をいかして Gene Machine と呼ばれる遺伝子破壊系に利用されている(Bensen et al. 1995). 遺伝的な実験系は Lisch et al. (1994, 1996)による内部欠失系統の利用による遺伝解析で詳細に報告されている. また, トウモロコシでは 2500Mb 程度の大きなゲノムを解析する手段として, 効率的に遺伝子に挿入する *Mutator* 系を遺伝子破壊系に利用する計画がすすんでいる. その計画例を次に紹介する.

8. *Mu* トランスポゾンによるタッキング

はじめに

トウモロコシには育種的に利用可能なトランスポゾンが数多く存在している. *Ac/Ds*, *Spm/dSpm*, *Dt*, ならびに *Mutator* などが DNA を鋳型として転移するものとして知られており, 数多くの総説がだされている (Bennetzen 1996, Chandler and Hardeman 1992, Fedoroff 1989, Kunze 1996).. *Ac/Ds* の同祖性トランスポゾンである *Ac/hobo/Tam3* 系はトウモロコシ以外でも植物・動物を問わず広

い生物種に保存されている(Streck et al. 1986, Calvi et al. 1991). 一方, *Mutator* トランスポゾンが検出されたのは近年であるが, 独特な遺伝的特徴をもとに精力的な研究が行われ, 効率的な遺伝子タギング装置として, Gene Machine と一般的に呼ばれているシステムが近年では精力的に利用されている(Bensen et al. 1995). しかし, PCR 法による選抜挿入変異体は 10-20%で, 残りは体細胞変異を検出していると推定される(未発表). さらに, 挿入変異を生じた有用な遺伝子には特許権も絡んでくるため, 新たに効率的なシステムが構築されようとしている (Das and Martienssen 1995, Martienssen 1999). トウモロコシは潜在的 4 倍体として遺伝子重複が数多く起こっている複雑な遺伝システムを備えていること, またそのためイネの 5 倍程度, ヒトと強敵するゲノムサイズであることが知られている(Herentjaris et al. 1988, Herentjaris et al. 1995). そのため, 遺伝学的に優れた業績が積み上げられてきているもののゲノムプロジェクトが進めにくい生物種と考えられてきた. しかし, RescueMu システムを利用したプロジェクト Maize Gene Discovery, sequencing and phenotypic analysis, NSF#9872657 推定額\$12,548,370)では, 遺伝子タギングならびにゲノム内全遺伝子発現様式の特特定と様々な環境下での遺伝子発現の特特定を行うとしている. この総説では, このプロジェクトの全容を明らかにするとともに, 遺伝学的ツールとして利用されている *Mutator* の特徴的な遺伝的行動様式についても明らかにする.

Mutator トランスポゾン

Mutator トランスポゾンはもともと *Ac* トランスポゾンの活性化している系統から得られたものである. Donald Robertson (1978,1980)は葉緑素異常を生じている突然変異体後代に新たな変異が高頻度で出現することを見出し, その頻度は *Ac* による変異変異体の出現率の 20 倍であることを推定した. しかし, その系統では *Ac* が不活化していることから, 突然変異は新たな機構 (*Mutator*) によるものと結論づけ, 後に *Mutator* トランスポゾンが変異源となっていることが明らかにされた.

最初にクローニングされた *Mutator* 因子は, アルコール脱水素酵素 (ADH) における *Mutator* による誘発変異体からクローニングされた *Mu1* 因子である (Freeling ら 1982, Strommer ら 1982). 制御因子 (自律性因子) は明らかでな

かったが, 1991年に3つの研究室が独立にクローニングした(Chomet et al. 1991, Hershberger et al. 1991, Qin et al. 1991). これら因子は2-3の塩基配列の変異を含み, それぞれ *Mu9*, *MuR1* および *MuA2* と名づけられ, 後年に混同をさけるため最初の発見者の Donald Robertson の頭文字をとって *MuDR* と改名された. このクローンの塩基配列の解析とこれまでの研究から *MuDR* トランスポゾンには, 1) およそ 220bp の長い末端反復配列を有する, 2) 挿入時に 9bp の標的配列の重複を生じる, 3) 減数分裂の直前に重複的転移を引き起こす, 4) ある遺伝子座への挿入頻度が $10^{-3} - 10^{-4}$ と他のトランスポゾンに比較して高い, 5) 再転移の頻度が $10^{-4} - 10^{-5}$ と低く復帰変異体が得にくい, 6) *MuDR* 因子内の *mudrA* 遺伝子が転移酵素である, 7) *MuDR* 因子内の *mudrB* 遺伝子は *Mu* 因子の転移後の再挿入に必要であることが知られている(Bennetzen 1996, Bennetzenら 1993, Chandler and Hardeman 1992).

Mutator ファミリー内には, *MuDR* により転移の制御をうけるサブファミリーが多様に分化していることも特徴の1つである. 特に, *Mu1* は *MuDR* とは全く異なる内部配列を有しており, この配列はトウモロコシにおける嫌気条件下で発現が誘導される遺伝子を内部に取り入れたと考えられる(Talbert and Chandler 1988). この他に, トウモロコシと同じ単子葉に属するイネ, ならびに双子葉のアラビドプシスにおいても *Mutator* 様トランスポゾンの存在が知られている(Ishikawa and Freeling 1997, Yu et al. 2000).

Mutator の遺伝的特徴

Mutator における転移機構はまだ明らかにされていないが, *Mutator* トランスポゾンの転移制御因子である *MuDR* 内の遺伝子 *mudrA* がトランスポゼースを産出することがわかっている. *MuDR* 内には *mudrA* と逆向きに転写される *mudrB* 遺伝子も存在している. しかし, この産物の機能についてはまだ明らかでない(Hershberger et al. 1993, Donlin et al. 1995). また, 挿入サイトからの切り出しは子実では発育が停止する直前の細胞分裂時に生じる(Levy et al. 1989). さらに, 体細胞で重複性転移をすることからコピー数の倍化が生じ, 複数の転移制御因子 (*MuDR*) を有する. この倍数化により, *Mutator* 制御機構の詳細な遺伝解析は戻し交雑による単一の制御因子を有する系統を作出した後に可能となった(Chomet et al. 1991). この系統は Minimal line と呼ばれ, 単一の制御因子

MuDR と単一の *Mu1* を有している。この系統を用いて、*Mu1* 因子の複製的転移が確認された(Lisch et al. 1995)。さらに、*MuDR* の座乗染色体の位置効果により、*Mu1* の再転移能力が影響を受けることも明らかにされた(Lisch et al. 1995)。

遺伝子タグgingには *Mu1* が多く用いられているが、これは他のサブファミリー因子に比較して *Mu1* の転移率の高いことに起因している(Bennetzen et al. 1993)。アントシアニン系色素遺伝子 *A1* のプロモーター領域にも挿入した変異体は、*a1-mum2::Mu1* 対立遺伝子を有している (O'reilly et al. 1985)。この *a1-mum2* 系統では *MuDR* が活性化しているときはアントシアニンの着色のみられない葉鞘を呈する劣性表現型を示す。一方、*MuDR* を失った遺伝的背景下では、弱いアントシアニンの着色を呈し、いわゆる抑制型突然変異として表現型が検出される(Chomet et al. 1991, Lisch et al. 1995)。このレポーター標識変異を利用した *Mu1* 因子の遺伝的行動様式は Lisch et al.(1995)により明らかにされている。

Super-Mu ファミリーとイネ *RiceMutator*

イネにおいても *Mutator* の構造的類似因子の報告もある(OSMU ; Xie et al.による遺伝子登録 1990, X16597)。その後、この OSMU とは異なる *RiceMutator* がイネゲノム内からクローニングされ、同因子が内部のトランスポゼースの配列ならびに構造的な類似性を有することが明らかにされた(*RMu1-IR36*; Ishikawa and Freeling による登録 1997, AB006808)。*RiceMutator* はもともとトウモロコシの *Mutator* ファミリーの転移制御因子である *MuDR* の内部にあるトランスポゼース遺伝子 (*mudrA*) をプローブとしてイネ栽培品種、IR36 のゲノムライブラリーからクローニングされた。サイズは 4374bp、内部に *mudrA* と高い相同性を示す遺伝子、ならびに両末端に 193bp の逆位末端反復配列を有する。さらに、その両側に挿入時に重複されたと考えられる 9bp の標的配列が見出されている。その後、サブファミリーを構成する因子 (*RMu1-A23*; Ishikawa and Freeling による登録 1999, AB023047, *RMu2-IR36*; Ishikawa and Freeling による登録 1999, AB017542) も検出された。*RiceMutator* は日本型、インド型、ならびに野生イネをとわず広くゲノムに見出される。それらの間での TIR の相同性は 59-96% と変異が認められる。内部配列に関する変異も大きく、*RMu1-A23* は *RMu1-IR36* と 86% の相同性を有し、*RMu2-IR36a* は *RMu1-IR36* の 5'側のおよそ 3kb の内部

配列の欠失をしている。さらに、異なる内部配列を獲得した因子 (*RMu2-A1*; Ishikawa and Freeling による登録 1999, ABAB017543) もクローニング[®]されている。この内部配列の多様性、ならびに TIR 相同性変異の特徴は *Mutator* ファミリーの特徴でもある。これはイネにおける同トランスポゾンが同様なシステムを利用して多様性を確保していることを示すものである。一方、*Mutator* がおよそ 215bp の TIR を共通して有しているが、イネでは平均 193bp の TIR しか有していない。DNA レベルの相同性は 50% であり、内部にトウモロコシ *Mutator* 因子といくつかの相同領域が見出される。

アラビドプシスにおける *Mutator* についても *mudrA* 遺伝子と高い相同性を示す遺伝子、比較的長い TIR、ならびにその外側に 9bp の標的配列の存在が確認されている (Yu et al. 2000)。これらのことをふまえるとイネ科のみならず高等植物にかなりの *Mutator* トランスポゾンの存在していることが推定される。これら因子の内部にあるトランスポゼース遺伝子は細菌の *IS* 因子においても保存されていることから生物界に存在していると考えられる (Eisen et al. 1994)。また、ゲノム解析の発展により、いまだ *Mutator* 様因子のみつけられていない生物種においても今後、*Mutator* トランスポゾンが検出されるものと考えられる。

新たなプロジェクト **RescueMu**

トウモロコシ遺伝学分野で 1998 年度の NSF 研究補助での対象となったプロジェクト *Maize Gene Discovery, sequencing and phenotypic analysis* は大変な興味深い (コラム, *Science* 282:652-654, 1998)。この計画はこれまでゲノム解析に関して立ち後れていたトウモロコシをゲノム解析のモデル植物の位置に高める内容を持っている。

飛行機により 2 時間以内にアクセスすることの可能な 6 大学の研究者らの協力体制はインターネットによるサイバースペースにおける研究センターでの共同組織をつくりあげることになる。研究の基本骨格は、1) 改変した *Mu* 因子である *RescueMu* を利用することで、50 万以上の固定化された遺伝子ライブラリーを蓄積し挿入領域両側 1.2kb 塩基配列解析する、2) 解析された遺伝子はマイクロアレイ上の DNA チップとされ、あらゆる組織での発現様式が確認される。3) 供試個体は自殖され、デジタルカメラなどの手段で後代の幼苗、開花期における種子の形態的突然変異などの表現型がウェブ上に記録され、ど

の研究者からのアクセスも可能となる。4) 形態的変異体は原因遺伝子のクローニングに利用される。5) 同遺伝子の塩基配列は明らかにされ、これまでトウモロコシ遺伝学が蓄積してきた遺伝標識、染色体系統を用いたマッピングが行われる(Freeling and Walbot 1993)。

従来の *Mutator* トランスポゾンによるタッキングシステムとの比較

従前の遺伝子タッキング装置, Gene Machine (Bensen ら 1995)では, およそ 1 万個体の F_1 (*Mutator* 系統 x Non-*Mutator* 系統) 系統を 50 個体程度毎に DNA をプール化し, その DNA を鋳型として機知の塩基配列と *Mutator* の TIR 間で PCR 増幅産物を示す個体を選抜していた。しかし, 体細胞における転移により生じた挿入と生殖細胞に生じた挿入変異を識別できない。そのため希望した遺伝子に関する変異は, PCR で推定した個体数の 10-20% である。一方, Martienssen は F_1 個体の止葉 2 箇所から DNA を抽出して DNA サンプル化を行うことで体細胞のみで生じる挿入変異を生殖系における挿入変異とわけることで効率化を図っている(Martienssen 1999)。この方法では, 目的遺伝子近傍への *Mutator* 因子の挿入が生じても体細胞でのみ生じた挿入では, 異なる葉から抽出した 2 つめのサンプルでは識別されず, 生殖系に伝わる挿入変異と容易に識別できる。これと同様の選抜方法は RescueMu においても採択され, 体細胞の挿入変異と生殖細胞での挿入変異の識別を容易にしている。

さらに, この研究に用いられる *Mutator* 因子は分子的に改良された RescueMu である。この因子はトウモロコシゲノムにおけるプラスミドレスキューを可能にする。プラスミドレスキューはショウジョウバエの *P* 因子を対象として応用されている手法である(Steller and Pirrotta 1986)。これまでのトランスポゾンタッキングでは, 目的の遺伝子がトランスポゾンによって分子的にタグされ, その DNA 領域をゲノミックライブラリーからクローニングすることで行われてきた。ただし, 複数のサブファミリーに分化した *Mutator* の中で特定の遺伝子に入り込んだ因子を特定してクローニングするためにはかなりの労力が必要とされる。その研究に費やす手間を省くために,

- 1) *Mu1* の中にプラスミドの複製に必須の配列であり *ori* 領域ならびに抗生物質耐性を付与する遺伝子をいれる。さらに, 内部にトウモロコシゲノムに相同性を示さない *Rizhobium* の DNA を持たせ, ゲノム内在性の *Mu1* と

区別してこの改変した *Mu1* 因子 RescueMu 因子の行動を追跡するためのプローブとして用いられる。

- 2) 35S プロモーターと色素合成に関与する *Lc* 遺伝子の間に RescueMu 因子を挿入して遺伝子銃で形質転換する
 - 3) 個体の着色でトランスポゾンの転移を確認した後に、ゲノム DNA を導入プラスミドが制限化されない酵素で処理した後にライゲースで環状化させる。ただし、2種類の制限酵素を利用することで自己環状化して回収するプラスミドサイズを小さくする。
 - 4) 処理後の全 DNA を大腸菌に形質転換することで、*Mutator* トランスポゾンの特徴である複製転移した先のすべての挿入領域近傍をクローニングする。
- 以上の手順で大量の個体からトランスポゾンの転移した先の DNA 情報を得ることを可能とした。

新規挿入の検定と利用

新規挿入は平均5個の RescueMu を有する個体を *Mutator* 活性系統と交配することで得られる。その後代は48の格子状(48x48=2304個体)に栽培され、それぞれ倍化した新しい挿入配列を生み出すことになる。これら1個体から100mgのDNAが採集される。葉断片から抽出されたDNAには、生殖細胞に伝わる新規挿入と体細胞切りだしと再挿入により生じた新規挿入も含まれる。2304x10セットの集団内での新規挿入クローン化を目的としたプラスミド救出法により固定化ライブラリーが作成される。これらの一部はストックされ、残りは塩基配列の決定と標的塩基配列への挿入因子選抜のPCRスクリーニングに用いられる。この際も48X48格子でプール化された行列サンプルが利用される。

RescueMu ならびに *Mu* 因子はプロモーターならびにイントロンに挿入される頻度が高いことが報告されている (Raizada 1999)。そのため RescueMu 挿入領域の外側にあたる 1.2kb の塩基配列を解読して、新規遺伝子のスクリーニングが行われる。挿入近傍配列ならびに cDNA ライブラリーにおける遺伝子配列、エキソンならびにイントロンの検出は、新たにトウモロコシの既知の遺伝子配列に最適化されたプログラムを用いて解析される。現在のところ得られた遺伝

子情報に対する特許化はなされず、新規塩基配列データは自動的に GenBank 番号がわりあてられ、データ公開がなされる。この計画に従事する共同研究者たちも GenBank からデータの引出しを行うため、“SuperFair”な情報公開がなされることになる (Walbot 私信)。

RescueMu 挿入のある集団を利用したい研究者には無料で種子が配布されるが、この一連の塩基配列の解読作業とデータ登録作業を行う義務付けがなされる。これらは新規の遺伝子配列と既知のものにわけられ、Galbraith によりマイクロアレイ上にプロットされる。これらマイクロアレイは7つのトウモロコシ遺伝学者により既に作成されている cDNA ライブラリーからも作成される。現在、Sara Hake の研究室で作成された頂端分裂組織の cDNA ライブラリーを利用してランダムクローンの塩基配列解読が始められており、かなりの割合で新規配列が見出されている (Walbot 私信)。

さらに、希望する研究者から特定の組織ならびにストレスを与えた条件での cDNA ライブラリーを加えて、cDNA ライブラリーに関するマイクロアレイが作成される。これらのマイクロアレイは、特定の組織における発現を明らかにするためにあらゆる組織・発育段階での遺伝子発現の解析に用いられる。既に、7つの研究室の遺伝学者は各種 cDNA ライブラリーを有しているために、これらのライブラリーが供試されるであろう。また、共通のマイクロアレイを利用する利点として、他殖性作物として遺伝的背景が多様であるトウモロコシにおいても共通の遺伝子カタログを利用することができる点があげられよう。

改良を必要とされる点

本研究の今後の改良されるべき1つは、トウモロコシの形質転換に用いられる系統は現在のところ限られており、B73,A23 自殖近交系を組み合わせた後代の HiII 系統が使用される点である。HiII 系統は活性化した *MuDR* を持たないため、RescueMu 形質転換された後、再分化個体は *MuDR* を有している *Mutator* 系統と交雑される必要がある。そのため、複数の *Mu1* が交雑により導入される。したがって、変異体がどの *Mutator* 因子による挿入変異体であるかを特定することが困難である。そのため、今後は Lisch によって作成される *Mu1* ならびに *Mu2* を含まず特定の染色体位置効果を有する *MuDR* のみを含む新 Minimal 系統が RescueMu 形質転換系統と交配されるであろう (Chometet al. 1991, Lisch 私信)。

また、遺伝子銃による遺伝子導入系が用いられることから同一の染色体位置に複数の RescueMu が挿入され、転移率の低下が推定される。

ベクターからの RescueMu の転移は着色遺伝子 (*Lc*) の発現により検出されるが、*Lc* が *Mu1* の TIR 上のプロモーター配列によりわずかに転写される(Barkan and Martienssen 1991)。そのため RescueMu 因子の切り出しによらない色素形成セクターが生じる。したがって、導入ベクターからの RescueMu の転移を検出するためには TIR 配列の突然変異集積、もしくは異なる末端反復配列を有する *Mu* 因子のベクター化が必要となる。さらに、*Lc* 遺伝子の産物は着色の細胞自律性があること、生育後期特異的な転移のためで1-2細胞でのみ着色することなどから、転移を肉眼で検出することが容易でない(Raizada 私信)。 *Bz2* 遺伝子の産物は細胞自律性がないことから、着色細胞の数が多くなり識別が容易となることから、今後は転移を識別するマーカー遺伝子としては *Bz2* 遺伝子などに変更した系が作られるであろう。このように今後も計画の進行にあわせて数々の改良が続けられるであろう。

一方、個体の表現型調査についての問題点も残っている。表現型からの遺伝的変異の調査では、形質転換中の細胞培養時に生じるソマクローナル変異と RescueMu により生じた変異を識別する必要がある。この課題はイネにおける他植物からのトランスポゾンやレトロトランスポゾンにおけるタッキング系にしても克服されなければならない。したがって、いまだ明らかになっていないソマクローナル変異の制御機構を明らかにする研究の進展が望まれる。

今後の展望と育種的利用

今後、上記の改良が行われ効率的なクローニングが可能な Gene Machine として本システムが確立されるであろう。これからのゲノム解析においては、既知の塩基配列に関する突然変異体をタッキングするシステムと表現型からの変異個体選抜ならびに遺伝子タッキングを行うシステムの並存が必要になる。さらに、トウモロコシでは潜在的4倍体としての劣性変異で致死性となる遺伝子に関しての重複遺伝子のタッキングシステム、細胞形成など個体の大きさによる組織切片作成や各組織の肉眼での検出の容易性を生かした発育遺伝学的変異体の解析のための遺伝子タッキングシステムとしての価値が見出され、一方、イネにおいては2倍体として1遺伝子に生じた変異が容易に表現型に現れること、

トウモロコシとイネで既に機能分化をした遺伝子が存在している可能性があることなどから、同様の遺伝子タッキング系を確立することが求められる。モデル植物もしくはモデル双子葉としてのアラビドプシスの遺伝子タッキング系、ならびにモデル生物としての線虫に比較して、トウモロコシならびにイネにおけるモデル穀物植物、モデル単子葉植物、モデル倍数性進化生物としての価値は、経済的にもさらに進化的にも十分な研究価値を有するものと考えられる。また、潜在するゲノム内の *Mutator* と同祖因子である *RiceMutator* がイネにおいて既存の Gene Machine として利用可能であるかは今後の検討課題となる。

引用文献

- Barkan and Martienssen (1991) Inactivation of maize transposon *Mu* suppresses a mutant phenotype by activating an outward-reading promoter near the end of *Mu1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3502-3506.
- Bennetzen, J.L. (1996) The *Mutator* transposable element system of maize. in *Transposable Elements* (eds. SAEDLER, H. & GIERL, A.) 195-229 .
- Bennetzen, J.L., PS Springer, AD Cresse and M Hendrickx (1993) Specificity and regulation of the *Mutator* transposable element system in maize. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12:57-95.
- Bennetzen, J.L., and P.S. Springer (1994) The generation of *Mutator* transposable element subfamilies in maize. *Theo Appl Genet* 87:657-667
- ~~Bennetzen, J.L.~~ (1996) In “ Transposable elements” Saidler, H. and A. Gierl (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, 195-229.
- Bensen, R.J., Johal, G.S., Crane, V.C. Tossberg, J.T., Schanable, P.S., Meeley, R.B., and S.P. Briggs (1995) Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell* 7: 75-84.
- Calvi, B.R., T.J. Hong, S.D. Findley and W.M. Gelbart (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3*. *Cell* 66:465-471.
- Chandler and Hardeman (1992) The *Mu* elements of *Zea mays*. *Adv. Genetics* 30:77-122.
- Chomet, P., Lish, D. Hardeman, K.J. Chandler, V.L. and M. Freeling (1991) Identification of a regulatory transposon that controls the *Mutator* transposable element system in maize. *Genetics* 129: 261-70.
- Das, L. and R. Martienssen (1995) Site selected transposon mutagenesis at the *hcf106* locus in maize. *The Plant Cell* 7:287-294.
- Donlin, M., D. Lisch and M Freeling (1995) Tissue-specific accumulation of MURB, a protein encoded by *MuDR*, the autonomous regulator of the *Mutator* transposable element family. *The Pant Cell* 7:1989-2999.
- Eisen, J.A., M.I. Benito and V. Walbot (1994) Sequence similarity of putative

- transposase links the maize *Mutator* autonomous element and a group of bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 19:2634-2636.
- Fedoroff, N. (1989) In: Berg, D. and M. Howe (eds) *Mobile DNA*, pp375-411, American Society for Microbiology, Washington.
- Freeling, M., D Cheng, and M. Alleleman (1982) Mutant alleles that are altered in quantitative, organ-specific behavior. *Dev. Genet.* 3:179-196.
- Freeling, M. and V. Walbot (1993) *The Maize Handbook*, pp 759, Springer laboratory, New York.
- Herentjaris, T. (1995) Atlas of duplicated sequences. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 69:67-82.
- Herentjaris, T., D Weber and S Wright (1988) Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 118:353-364.
- Hershberger, R.J., C.A. Warren and V. Walbot (1991) *Mutator* activity in maize correlates with the presence and expression of the *Mu* transposable element *Mu9*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10198-10202.
- Hershberger, R. J., M.I. Benito, K.J. Hardeman, C Warren, V.L. Chandler and V. Walbot (1995) Characterization of the major transcripts encoded by the regulatory *MuDR* transposable element of maize. *Genetics* 140:1087-1098.
- Hesia, A-P. and P. S. Schnable (1996) DNA sequence analyses support the role of interrupted gap repair in the origin of the internal deletions of the maize transposon, *MuDR*. *Genetics* 142:603-618.
- Ishikawa, R. and M. Freeling (1997) In the 39th Annual Maize Genetics Conference, Chicago, USA.
- Kunze, R. (1996) In “ Transposable elements” Saidler, H. and A. Gierl (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, 162-194.
- Levy, A.A., A.B. Britt, K.R. Luehrsen, V.L. Chandler, C. Warren and V. Walbot (1989)

- Developmental and genetic aspects of Mutator excision in maize. *Development. Genet.* 10:520-531.
- Lisch, D., and M. Freeling (1994) Loss of *Mutator* activity in a minimal line. *Maydica* 39:289-300.
- Lisch, D., P. Chomet and M. Freeling (1995) Genetic characterization of the *Mutator* system in maize: behavior and regulation of *Mu* transposons in a minimal line. *Genetics* 139:1777-1796.
- Martienssen, R. (1999) In the 41st Annual Maize Genetics Conference, Wisconsin, USA.
- O'reilly, C., N.S. Shepherd, A. Pereira, Z. Schwarz-Sommer, I. Bertram, D.S. Robertson, P.A. Peterson and H. Saedler (1985) Molecular cloning of the *a1* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*. *EMBO J* 4:877-882.
- 丹羽康夫 (2000) 「GFP とバイオイメージング」実験医学別冊, ポストゲノム時代の実験講座 3 第3章.GFPの生物種別の適用例 3. 植物, 72-85, 羊土社
- Qin, M., D.S. Robertson and A. Ellingboe (1991) Cloning of the *Mutator* transposable element *MuA2*, a putative regulator of somatic stability of the *a1*-Mum2 allele in maize. *Genetics* 129:845-854.
- Raizada, M. and V. Walbot (1999). In the 41st Annual Maize Genetics Conference, Wisconsin, USA.
- Robertson, D.S. (1978) Characterization of a *Mutator* system in maize. *Mutat. Res.* 51: 21-28.

- Sato, Y., N. Sentoku, Y. Miura, H. Hirochika, H. Kitano and M. Matsuoka (1999)
Loss-of- function mutations in the rice homeobox gene OSH15 affect the
architecture of internodes resulting in dwarf plants. EMBO 18:992-1002, 1999.
- Steller,H. and Pirrotta, V. (1986) *P* transposons controlled by the heat shock promoter.
Mol. Cell. Biol.6:1640-1649 .
- Streck, R.D., J.E. MacGaffey and S.K. Beckendorf (1986) EMBO 5:3615-3623.
- Strommer, J.N., S. Hake, S. Bennetzen, W.C. Taylor and M. Freeling (1982)
Regulatory mutants of the maize *Adh1* gene caused by DNA insertions. Nature
300:542-544.
- Talbert, L.E. and V.L Chandler (1988) Characterization of a highly conserved sequence
related to *Mutator* transposable elements in maize. Mol. Biol. Evol 5:519-529.
- Yoshida, S., K. Tamaki, K. Watanabe, M Fujino and C. Nakamura (1998) A maize
MuDR-like element expressed in rice callus subcultured with proline. Hereditas
129:95-99.
- Yu, Z., right, I. And T.E. Bureau (2000) *Mutator*-like elements in Arabidopsis
thaliana:Structure, diversity and evolution. Genetics 156:2019-2031.
- W-I. Chiu, Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi and J. Sheen :
(1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. Current Biology,
6, 325-330.

Table 1. Characterization of *RMu* members in a rice plant

<i>RMu</i>	Subfamily	Length (bp)	TIR (L/R, bp)	TSD (bp)	TSD sequence	Accession
<i>RMu1-IR36</i>	RMu1/RMu2-IR36	4374	193/193	9	CCGAAAAGT	AB006808
<i>RMu1-A1</i>	RMu1/RMu2-IR36	4157	176/173	9	CTTCTGAGG	
<i>RMu1-A23</i>	RMu1/RMu2-IR36	4144	176/174			AB023047
<i>RMu1-435</i>	RMu1/RMu2-IR36	4043	176/174			
<i>RMu2-IR36a</i>	RMu1/RMu2-IR36	897	189/195			AB017542
<i>RMu2-A1b</i>	RMu1/RMu2-IR36	1147	189/195*	9	GAAAGGAGG	
<i>RMu2-R6</i>	RMu1/RMu2-IR36	898	189/195	9		
<i>RMu2-R7</i>	RMu1/RMu2-IR36	897	189/195	9		
<i>RMu2-R12</i>	RMu1/RMu2-IR36	897	189/195	9		
<i>RMu2-TIR</i>	RMu1/RMu2-IR36	897	189/195	9		
<i>RMu2-IR36b</i>	RMu2-IR36b	929	227/191			
<i>RMu2-N1a</i>	RMu2-IR36b	923	140/169	9	TCCCTCGAC	AP00302
<i>RMu2-IR36c</i>	RMu2-IR36c	1115	185/181			
<i>RMu2-N1b</i>	RMu2-IR36c	645	179/182	9	CTCCTGGAC	AP003105
<i>RMu2-A1a</i>	RMu2-A1a	748	214/177	9	AGGCCCGGC	
<i>RMu2-A1c</i>	RMu2-A1c	1169	259/275	9	ACTCTCAAC	
<i>RMu2-N1c</i>	RMu2-A1c	1062	240/240	2	CTCTGGAAC/ CTTGTAACA	AP002843
<i>RMu2-G4</i>	RMu2-A1c	1193	273/274	9	ATCTCAAC	B0808H03

Table 2. Homology of 193 nt from the end of TIRs among RMu members

Homology (%)		RMu1-IR36		RMu1-A23		RMu2-IR36a		RMu2-A1a		RMu2A1c		RMu2-IR36b		RMu2-IR36c	
		L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
RMu1-IR36	L		87	89	86	94	84	82	64	62	59	86	66	88	82
	R			85	96	87	93	82	62	62	59	84	68	83	79
RMu1-A23	L				85	90	83	79	59	60	58	85	65	87	82
	R					87	96	81	63	61	59	85	68	83	78
RMu2-IR36a	L						85	80	63	61	59	86	68	88	81
	R							79	63	59	57	82	67	82	76
RMu2-A1a	L								61	63	60	81	66	83	78
	R									55	53	62	74	62	60
RMu2-A1c	L										84	61	58	60	65
	R											59	56	57	62
RMu2-IR36b	L												66	84	81
	R													66	65
RMu2-IR36c	L														81
	R														

Table 3. Homology of 90 nt from the end of TIRs among RMu members

Homology (90bp,%)	RMu1-IR36		RMu1-A23		RMu2-IR36a		RMu2-A1a		RMu2-A1c		RMu2-IR36b		RMu2-IR36c	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
RMu1-IR36	L	100	97	98	95	93	92	64	85	59	96	82	91	92
	R		97	98	95	93	92	64	85	59	96	82	91	92
RMu1-A23	L			96	93	91	90	65	84	88	85	80	89	91
	R				96	94	91	65	84	90	97	68	90	91
RMu2-IR36a	L					91	87	64	87	87	94	83	89	91
	R						85	65	80	84	92	80	86	85
RMu2-A1a	L							63	78	81	91	76	89	87
	R								60	60	64	63	64	65
RMu2-A1c	L									91	82	73	79	82
	R										88	75	82	83
RMu2-IR36b	L											81	88	89
	R												76	78
RMu2-IR36c	L													87
	R													

RMUA orf 642nt

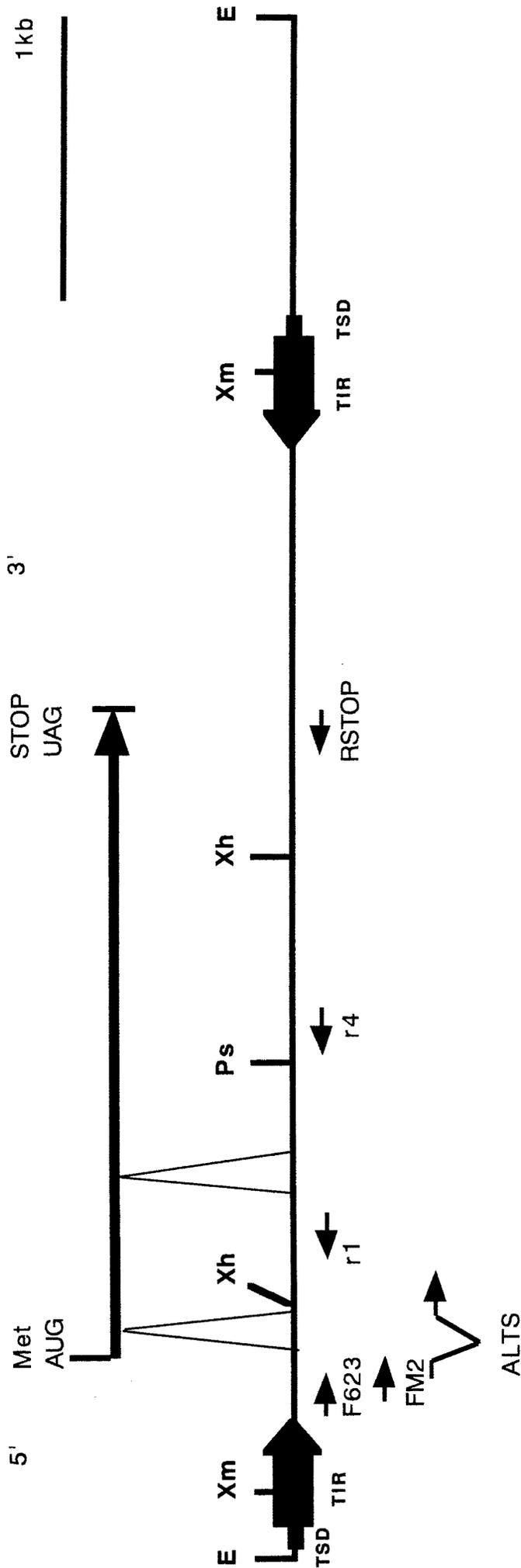
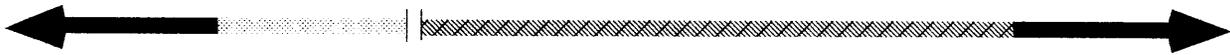
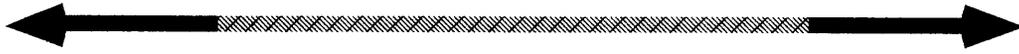


Fig 1. Restriction map flanking of RMu1-IR36 element. Primers designed for each PCR were shown as arrows. Solid arrow heads were terminal inverted repeats. *rmuA* coding sequence was shown with the first methionine and stop codon. Two introns found in the coding sequence were compared with genomic fragment. TSD is 9bp tandem duplicated sequences.



RMu1-IR36 (4374bp), *RMu1-A23* (4144bp)



RMu2-IR36a (897bp)



RMu2-IR36b (929bp)



RMu2-IR36c (1115bp)



RMu2-A1a (748bp)



RMu2-A1b (1147bp)



RMu2-A1c (1170bp)

Fig 2. Structural differences in RMu subfamilies

		10	20	30	40	50	
RMu1-IR36L	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTCG	CTGGAATACT	50
RMu1-IR36R	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTCG	CTGGAATACT	50
RMu1-A1L	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	ATTGGTTTCG	CTGAAATACT	50
RMu1-A1R	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTCG	CTGGAATACT	50
RMu1-A23L	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	ATTGGTTTCG	CTGAAATACT	50
RMu1-A23R	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTCG	CTGGAATACT	50
RMu2-A1aL	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCTCAAACG	GATGGTTTCG	CTAGAATACT	50
RMu2-A1aR	1	GAGAAAATTG	TGATCTTGCT	ATCGCAAT--	-----	TTAAATGTT	50
Rmu2-A1bL	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTCG	CTGGAATGCT	50
Rmu2-A1bR	1	TAGAAAATTG	TGATTTTTCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTCG	CTGGAATACT	50
RMu2-A1cL	1	GAGAAAATTG	GGATTATACT	ATCGTAAAAG	AGTGGTTTCG	CTGGAATGCT	50
RMu2-A1cR	1	GAGAAAATTG	GGATTATATT	ATCGTAAAAG	AGTGGTTTCG	CTGGAATGCT	50
RMu2-IR36aL	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTCG	CTGGAATACT	50
RMu2-IR36aR	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATGGTTTTG	TTGGAATACT	50
RMu2-IR36bL	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAG	AATAGTTTCG	CTGGAATACT	50
RMu2-IR36bR	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAA--	-----	---AGAATGAT	50
RMu2-IR36cL	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAATG	GATGGTTTCG	CTAGAATACA	50
RMu2-IR36cR	1	GAGAAAATTG	TGATTTTGCT	ATCGCAAAGG	A-TGGTTTCA	CTGGAATACT	50
		60	70	80	90	100	
RMu1-IR36L	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATCCTAAA	CTAAGGGGGTG	100
RMu1-IR36R	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATCCTAAA	CTA--GGGGTG	100
RMu1-A1L	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATCCTAAA	CTAAGGGGGTG	100
RMu1-A1R	51	ATC-CTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATTCTAAA	CTAAGGGGGTG	100
RMu1-A23L	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATCCTAAA	CTAAGGGGGTG	100
RMu1-A23R	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATTCTAAA	CTAAGGGGGTG	100
RMu2-A1aL	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATA	CTATCCTTAA	CTAAGGGGGTG	100
RMu2-A1aR	51	ATCCTAAACT	AACGGAGGTT	CACTAAAGCG	C---CCT---	-----	100
Rmu2-A1bL	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAATG	CTATCATAAA	CTAAGGG--TG	100
Rmu2-A1bR	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATTCTAAA	CTAAGG----	100
RMu2-A1cL	51	ACCTCTT--C	AA-ACTAATT	CACTAAAATG	CTATCTTAAA	CTGGG--GGTG	100
RMu2-A1cR	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATTCTAAA	CTGAA--GGTG	100
RMu2-IR36aL	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	TATTAATG	CTATTCTAAA	TCAAGGGGGTG	100
RMu2-IR36aR	51	ATCATTT--T	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATTCTAAA	CTAAGAGGGTG	100
RMu2-IR36bL	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	CATTAAAATA	CTATTCTAAA	CTAAGGGGGTA	100
RMu2-IR36bR	51	TTCGCTGG--	AATACTATCC	TTCAAAGTG	-----	-----	100
RMu2-IR36cL	51	ATCCCTTTTC	AA-AGTGATT	CATTAAAATG	CTATCCTAAA	CTAAGGGGGTG	100
RMu2-IR36cR	51	ATCCCTT--C	AA-AGTGATT	TACTGAAATG	CTATCCTAAA	CTGAGAGGGTG	100
		110	120	130	140	150	
RMu1-IR36L	101	TTCACTGAAA	TGCTATTTTT	GATCTTTTTG	GTTTCTAGAA	ATG-ATTTTA	150
RMu1-IR36R	101	TTCACTGAAA	TACTATTTTT	GATCTTTTTG	ATTATTACTA	ATGT-TTTTA	150
RMu1-A1L	101	TTCACCGAAA	TACTATTTTT	GTTCTTTTTG	GTTGCTAGAA	ATATATTTTA	150
RMu1-A1R	101	TTCACTGAAA	TATTATTTTT	GATCTTTTTG	-TTAGTACTA	ATGT-TTT-A	150
RMu1-A23L	101	TTCACCGAAA	TACTATTTTT	GTTCTTTTTG	GTTGCTAGAA	ATATATTTTA	150
RMu1-A23R	101	TTCACTGAAA	TATTATTTTT	GATCTTTTTG	-TTAGTACTA	ATGT-TTTTA	150
RMu2-A1aL	101	TTCACTAAAA	TGCTATTTTT	GGTCTTTTTG	GTTAATACTA	ATGT-TTTTG	150
RMu2-A1aR	101	-TCACTGAA-	TGCTATTTTT	ATTTTTT--	GTTGCTAGAA	ATG-ATTTTCG	150
Rmu2-A1bL	101	TTCACTGAAA	TGCTATTTTA	GATCTTTTTG	ATTGCTAGAA	ATG-ATTTTA	150
Rmu2-A1bR	101	----CTG---	---CATTCTA	TACCCAT--G	GTTCCCA---	----ACTTTC	150
RMu2-A1cL	101	TTCACCAAAG	TGCTATTTTC	GCTCTTTTTG	GTAATAGAA	ATGT-TTTTC	150
RMu2-A1cR	101	TTCACCAAAA	TGCTATTTTC	GTTTTTTTAG	GTAATAGAA	ATGT-TTTTT	150
RMu2-IR36aL	101	TTCACTGAAA	TGCTATTTTA	GATCTTTTTG	GTTGCTAGAA	ATG-ATTTTA	150
RMu2-IR36aR	101	TTCACTGAAA	TACTATTTTT	GATCTTTTTG	-TTAGTACTA	ATGT-TTTTA	150
RMu2-IR36bL	101	TTCACTGAAA	TACTATTTTT	GGT-TTTTTG	GTTATTAGAA	ACGA-TTTTG	150
RMu2-IR36bR	101	---ATTA--	TGCTATTTTT	GGTCTTTT--	A--GTTAGAA	ATG-ATTTTG	150
RMu2-IR36cL	101	TTCACTAAAA	TGCTATTTTT	AGTCTTTTTG	GTTGCTAGAA	ATGA-TTTTG	150
RMu2-IR36cR	101	TTCACCAAAA	TGCTATTTTC	GCTCTTTTTG	GTGAATAGAA	ATGT-TTTT-	150

Fig 3. Multiple edit done with TIRs

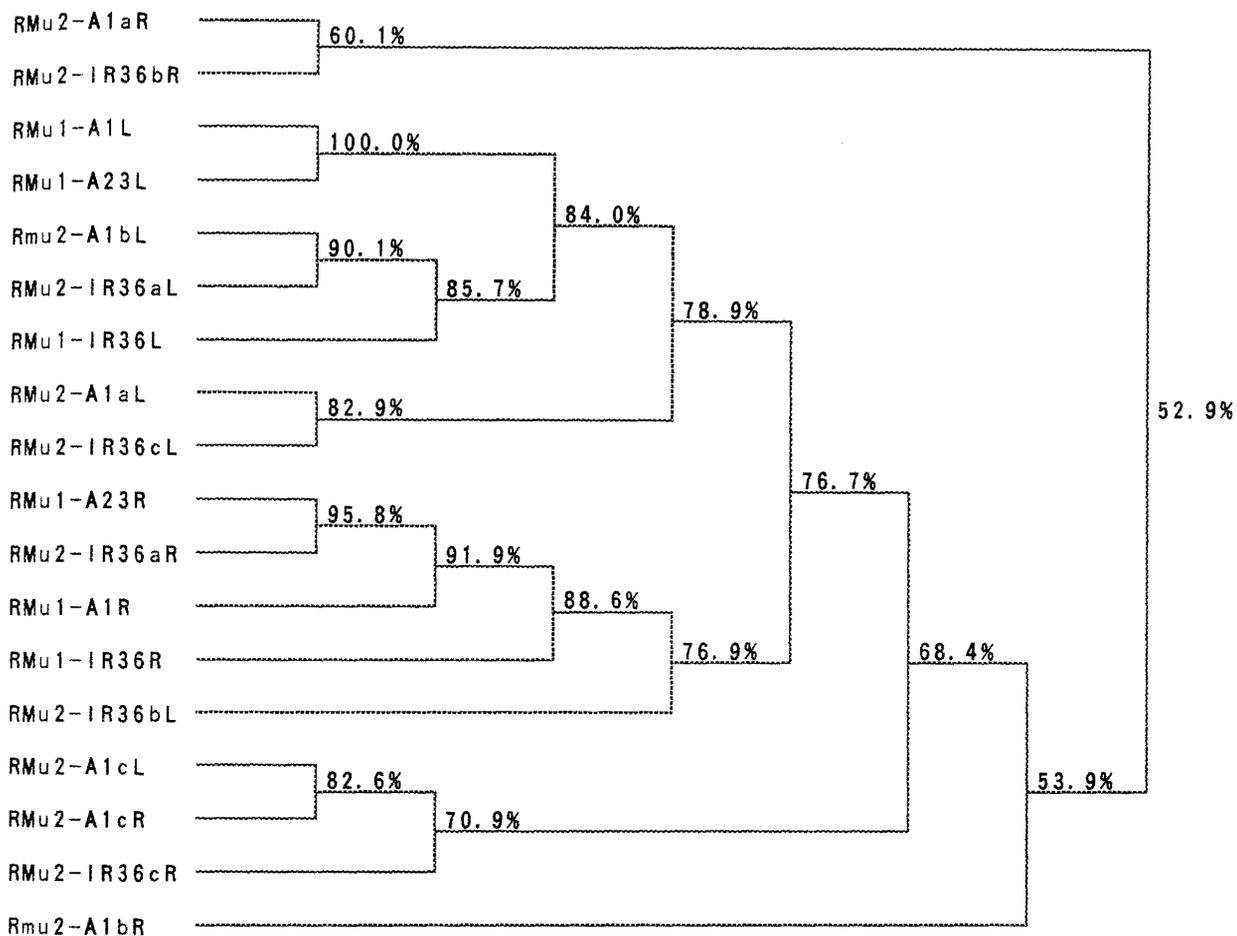


Fig 4. Phylogenetic tree of TIRs based on 193nt sequence from each end. Percentage reveals similsrity between two sequences.

MBS (25-56 nt)

IR-like

RMu1, L GAGAAATTGTGATTTTGGCTATCGCAAAGAAATGGTTTCGCTGGAAATACT
RMu1, R GAGAAATTGTGATTTTGGCTATCGCAAAGAAATGGTTTCGCTGGAAATACT
MuDR, L GAGATAATTGCCATTATAGACGAAGAGCGGAAGGGATTTCGACGAAATGGA
MuDR, R GAGATAATTGCCATTATAGACGAAGAGCGGAAGGGATTTCGACGAAATGGA

RMu1, L ATCCCTTCAAAGTGATTCAATAAATGCTATCCTAAACTAAGGGGTGTTT
RMu1, R ATCCCTTCAAAGTGATTCAATAAATGCTATCCTAAACTAAGGGGTGTTT
MuDR, L GGCCATGGCGTTGGCTTCTATGATCTGGAGACGCAGAG-GACACCCAATC
MuDR, R GGCCATGGCGTTGGCTTCTATGATCTGGAGACGCAGAG-GACAGCCAATC

IR-like

RMu1, L ACTGAAATGCTATTTTG-ATCTTTTGGTTCTAGAAAT-GATTTTACTC
RMu1, R ACTGAAATGCTATTTTG-ATCTTTTGGTTCTAGAAAT-GATTTTACTC
MuDR, L GCCAAAACAGAAAGGTGACAGCGCTTGGAGCTCCTTAAACAGGTATTACTC
MuDR, R GCCAAAACAGAAAGGTGACAGCGCTTGGAGCTCCTTAAACAGGTATTACTC

RMu1, L TATT-TTAAGTTTGT--CTGAC-A---AAATACCTTGTG-----T
RMu1, R TCTT-TTATTTTCTC--CGACCA---AAATGCCCTCGT-----C
MuDR, L TCCGTGCGCGTTTACCCTTCCGTTCCGCCCGCACACGCGTCTGTACTCCT
MuDR, R TCCGTGCGCGTTTACCCTTCCGTTCCGCCCGCACACGCGTCTGTACTCCT

RMu1, L CTTATCACC-----
RMu1, R TCTATGTCC-----
MuDR, L CTTGTGACCAGTCC
MuDR, R CTTGTACCCGTCTC

Fig 5. Sequence comparison of TIRs. MBS: MUDRA protein binding site found in TIRs of *MuDR*. IR-like: internal inverted like sequences found in *RMu* and *Mu* TIRs.

GAGAAAATTG TGATTTTGCT ATCGAAAAG AATGGTTTCG CTGGAATACT
GAGAAAATTG TGATTTTGCT ATCGAAAAG AATGGTTTCG CTGGAATACT
ATCCCTTCAA AGTGATTCAT TAAAATGCTA TCCTAAACTA AGGGGTGTTC
ATCCCTTCAA AGTGATTTAT TAAAATGCTA TTCTAAATCA AGGGGTGTTC
ACTGAAATGC TATTTTTGAT CTTTTTGGTT TCTAGAAATG ATTTTACTCT
ACTGAAATGC TATTTTAGAT CTTTTTGGTT GCTAGAAATG ATTTTACTCT
ATTTTAAGTT TTGTTCTGA- CAAAATAC-C TTGTGT-CTT ATCACCAGAT
ATTTTAAGTT TTGTTCTGAC CAAAATACCC TTGTGTCCTT GTCTCTATTA
CGAATCGATC TCTCCAGCCG TCCAGCGTCG GTGTTGACAG AG-3026del
TGTTGTG--- ----
-CTCCTATAC CACATACCCC AACTAGGCCCT ACTGTACAAA CCATTATTCA

AGAAAGCCCA ACAGTTGTGA CAAGACGGTT AGTACAACCA ACTACAATTA
-----A ACAGT-----
CATTAACTA GATGTATTTT TGCTTAACAC ACATTTCTTT GTAGCCCGCT

TGCATGTTAA TGGACAAGGA GGGACAGCAC ACACGGCACT TGCTTCACAA

GTGACATGTA AAAGGAGGTG AATATTGCTG AATCAAGCTC AAAGAGGACA

TGTACAAAGA AGCTCACACC CAAGAAAATG AAGCCTACTT GATTGTGCT

ATGCATGTA GGCACGTGTA TAGAGGTATT TTGTGACCCA TGTGGTGTTA

TGTGACCCAT GTAGTGTATG TGAACCACCG TTTGTGTGCT TACGTGTGCA

TGTGAGGCAC TGTATTTTGA GGTCTTTTGT GAACCATGGT GCATGTGAAC
-----TGTGAAC
CATGGTGCAT GTGAACCACT GTTATGTGT GACCACTGTT ATGTTGTGAA
CTGGTGCAT GTGA----- -ACCACTGTT ATGTTGTGAA
(A)
CCATTGTTAT GTGAGGTATT TTGTGAACCA CATGCTATTC AATATTATGT
CCATTGTTAT GTGAGGTATT TTGTGAACCA CATGCTATTC AATATTATGT
CTACATGCTG TCCAAATTTG TTCTATTTTG TTTTACAAT TTTTTCATGC
CTACATGCTG TCCAAATTTG TTCTATTTTG TTTTACAAT TTTTTCATGC
CCAAATTTTA TGGGTTAAGC TAGCTTCTCC ATTAT-----
CCAAATTTTA TGGGTTAAGC TAGCTTCACC ATTATATCTT TATAACTTGG
----- ATCTTGATGT GTATGCGCGC TTGTGACTGA ACTGGACTACO
AGTGAGAAAA ATCTTGATCT GTATGCACGC TTGTGGCTAA ACTGGACTAC
ACACCATTTT TATTGTACAA ATGTGAAAGC AAAATATATT GCTCTAGCAA
ACACCATTTT TATTGTACAA ATGTGAAAGC AAAATATATT GCTCTAGCAA
AGCATGTGTC AA---AACC AGAGAGGTGT TGTTTGACTT TCAAACCAGT
AGCATGTGTC AAAATTAACC AGAGATGTGT TGTCTGACTT TTAACCAGT
GCACGGGAGC TTTTGTATTA GTGTTAGTGA TCAATTAGTA TATACATATC
GCACTAGAGC TTTTGTATTA GTGTTAATGA TCAATTAGTA TATACATATC
ACGCAGCGGA GCATGAGGCG TGCATAGGTT CACAAATATA TAGCAATATA
ACGCAGCGGA GCGTGAGCCG TACATAGTTT CACAAATATA TAGCAATATA
TTTTGTCTAGA GCAA----- TGTCACCTG CCATTATCCT GGGCGAAAGG
TTTTGCTCTA GCAAAGCATG TGTCACCTG CCATTATCCT GGGCGAAAGG
AGGACATAGA GACGAGGGCA TTTTGGTCCG GAGAAAAAAT AAAAGAGAGT
AGGACATAGA GCGGAGGGCA TTTTGGTCCG GAGAAAAAAT AAAAGAGAGT
AAAAACATTA GTAATAATCA AAAAGATCCA AAATAGTATT TCAGTGAACA
AAAAACATTA GACTAA-CA AAAAGATCCA AAATAGTATT TCAGTGAACA
CCCC-TAGTT TAGGATAGCA TTTTAATGAA TCACTTTGAA GGGATAGTAT
CCTCTTAGTT TAGAATAGCA TTTTAATGAA TCACTTTAAA ATGATAGTAT
TCCAGCGAAA CCATTCTTTT GCGATAGCAA AATCACAATT TTCTC.....
TCCAACAAAA CCATTCTTTT GCGATAGCAA AATCACAATT TTCTC.....

Fig 6. Sequence comparison between *RMu1-IR36* and *RMu2-IR36a*. Underlined and double underlined sequences were found in EST C98506:double underlined sequence but 9th nucleotide was not T but A.

		10	20	30	40	50	
A1 (3136-4040	1	CTCCTATACC	ATATACCCCA	ACTAGGCCTA	CTGTAGAAAC	CATTATTCAA	50
C98506	1	CnCTATACC	ATATACCCCA	ACTAGGCCTA	CTGTAGAAAC	CATTATTCAA	50
		60	70	80	90	100	
A1 (3136-4040	51	GAAAGCCCAA	CAATTGTGAC	AAGACGGTTA	GTACAACCAA	CTACAATTAC	100
C98506	51	GAAAGCCCAA	CAATTGTGAC	AAGACG----	-----	-----	100
		110	120	130	140	150	
A1 (3136-4040	101	ATTAACCTAG	ATGTATTTTT	GCTTAACAAC	AACAATTTCC	TTGTAGCCGG	150
C98506	101	-----	-----	-----	-----	-----CCGG	150
		160	170	180	190	200	
A1 (3136-4040	151	CTTGCAATGT	TAATGGAACA	AGGAGGGACA	AGCTCACAAC	CGGCACCTGC	200
C98506	151	CTNGCAATGT	TAATGGAACA	AGGAGGGACA	AGCTCACAAC	CGGCACCTGC	200
		210	220	230	240	250	
A1 (3136-4040	201	TTCACAAGTG	ACATGTAATA	GGAGGGTGAA	TATTGCTGAA	TCAAGCTC-A	250
C98506	201	TTCACAAGTG	ACATGTAATA	GGAGGGTGAA	TATTGCTGAA	TCAAGCTCCA	250
		260	270	280	290	300	
A1 (3136-4040	251	CAGCCGGCTC	CATCAAAGAG	GACATGTACA	AAGAAGCTCA	CACCCAAGAA	300
C98506	251	CAGCCGGCTC	CATCAAAGAG	GACATGTACA	AAGAAGCTCA	CACCCAAGAA	300
		310	320	330	340	350	
A1 (3136-4040	301	AATGAAGCCT	ACTTGAATAG	CTCCTCCTGT	ATCACAACTA	ATATTGTGTG	350
C98506	301	AATGAAGCCT	ACTTGAATAG	CTCCTCCTGT	ATCACAACTA	ATATTGTGTG	350
		360	370	380	390	400	
A1 (3136-4040	351	CTGTGCATGT	GAGGCACAAT	TATAGGAGGT	ATTTTGTGAA	CCATGGTGCA	400
C98506	351	CTGTGCATGT	GAGGCACAAT	TATAGGAGGT	ATTTTGTGAA	CCATGGTGCA	400
		410	420	430	440	450	
A1 (3136-4040	401	TGTGAACCAT	GTTGGTGTAT	GTGAACCACC	TTTGTGTTG	GTGCATGTGA	450
C98506	401	TGTGAACCAT	GTTGGTGTAT	GTGAACCACC	TTTGTGTTG	GTGCATGTGA	450
		460	470	480	490	500	
A1 (3136-4040	451	GGCACTGTTA	TGTGAGGTCT	TTTGTGAACC	ATGGTGCATA	TGAACCACTA	500
C98506	451	GGCACTGTTA	TGTGAGGTCT	TTTGTGAACC	ATGGTGCATA	TGAACCACTA	500
		510	520	530	540	550	
A1 (3136-4040	501	CTATGTTGTG	AACCATGGTG	CATGTGAACC	ACTGTTATGT	TGTGAACCAT	550
C98506	501	CTATGTTGTG	AACCATGGTG	CATGTGAACC	ACTGTTATGT	TGTGAACCAT	550
		560	570	580	590	600	
A1 (3136-4040	551	TGTTATGTGA	GGTATTTTGT	GAACC.....	600
C98506	551	TGTTATGTGA	GGTATTTTGT	GAACCAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	600
		610	620	630	640	650	
A1 (3136-4040	601	650
C98506	601	650

Fig 7. Sequence comparison between a part of RMu1-A1 sequence and a sequence of EST clone, C98506.

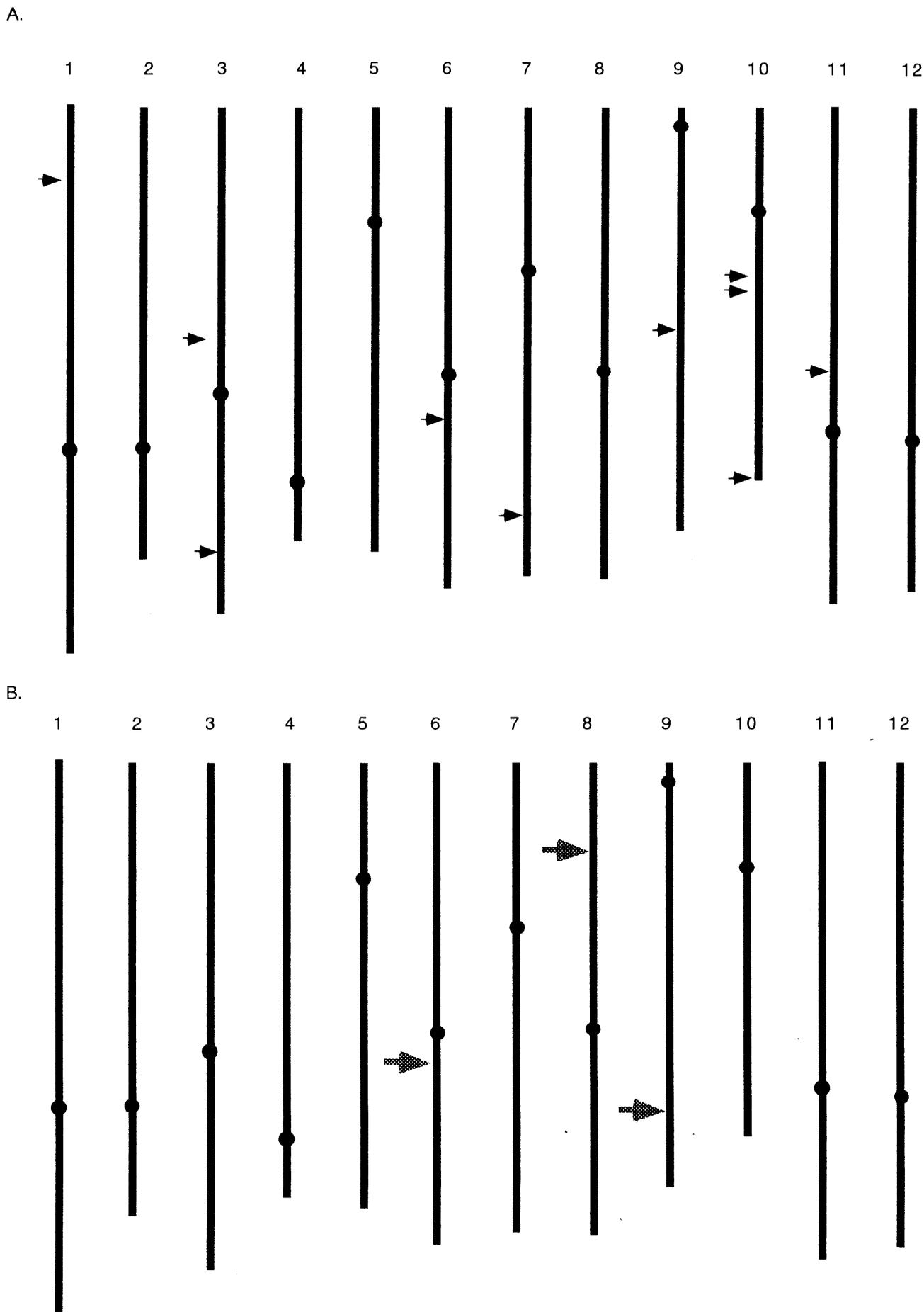


Fig 8. Chromosomal locations of *RMu* related fragments probed with TIR (A) and TNP (B).

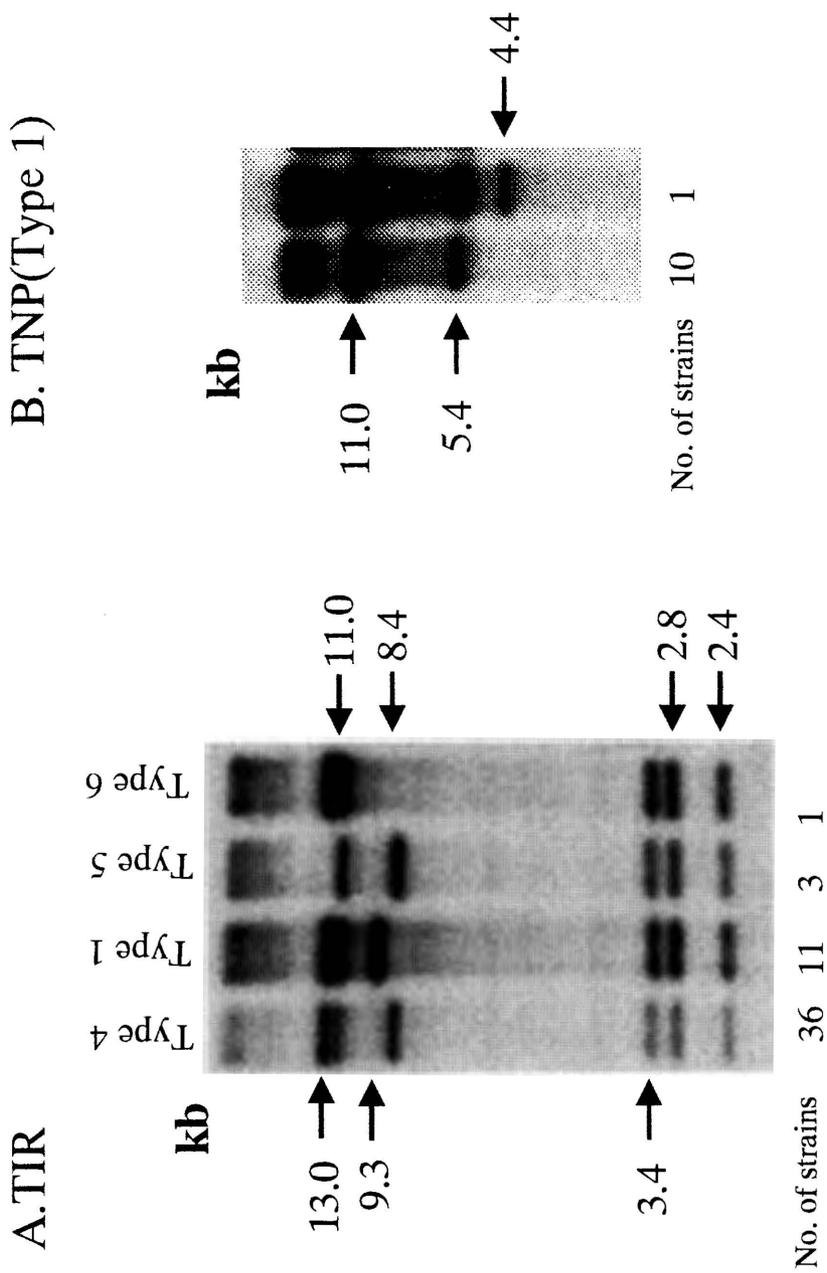


Fig 9. Variation banding pattern probed with TIR (A) and TNP (B) in Japanese lowland strains. Eleven strains in Type 1 was hybridized to TNP (B) and showed RFLPs among them.

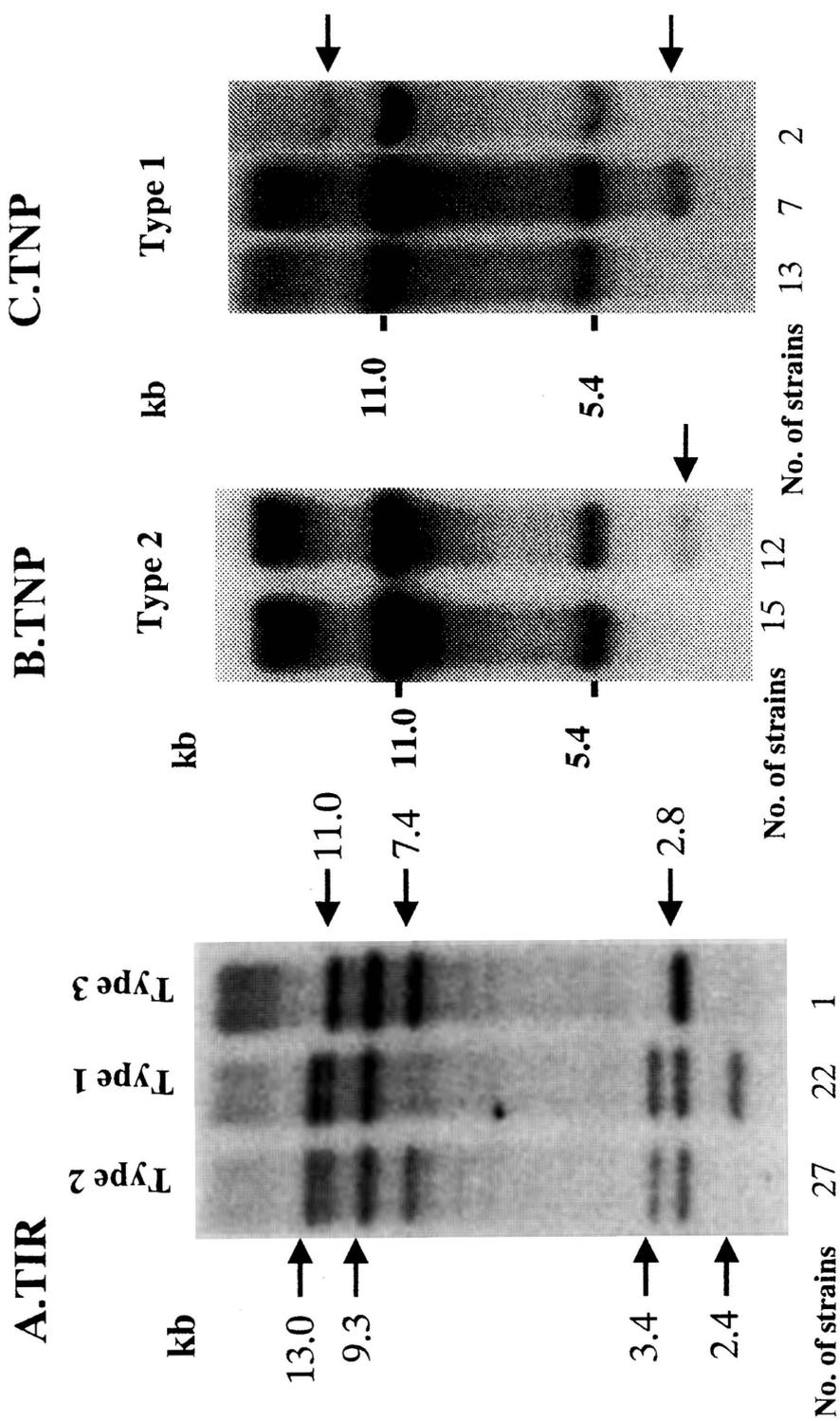


Fig 10. Variation banding pattern probed with TIR (A) and TNP (B and C) in Japanese upland strains. Twenty-seven strains in Type 2 and twenty-two strains in Type 1 were hybridized to TNP (B) and showed RFLPs among them.

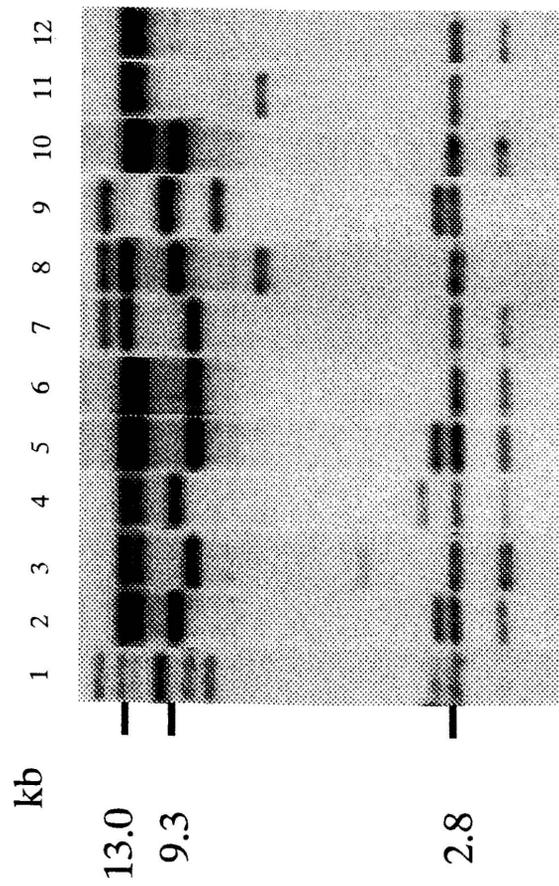


Fig 10. Variation banding pattern probed with TIR among Tropical *japonica* strains.

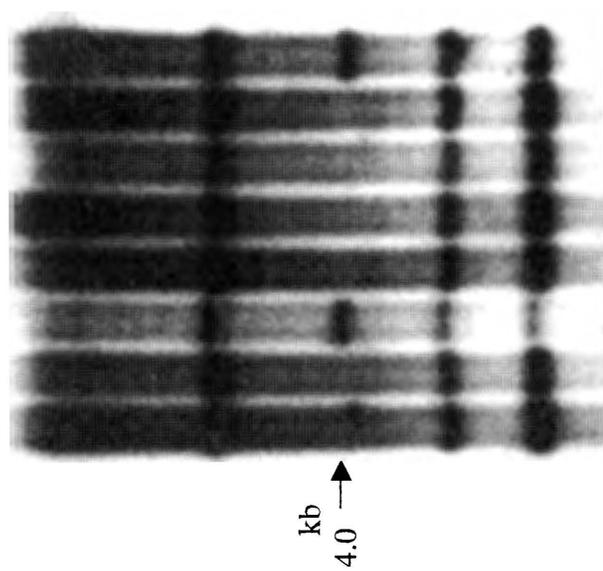


Fig 12. Newly found RFLPs in self-pollinated progeny of Akage strain. Genomic DNAs were digested with *Sac* I and probed with TIR.

```

RMuJ MILLYFKFCSDKIPCVLSPDRIDLSSRPASVLTEGEAGSGIGRGDSSAPP
M L
MuDR MDL-----

RMuJ HRLRLRRGAGPHPCHSPTSSSPQRHRPHPPPLPPPPPAAATATPIRRR
TP
MuDR -----TP-----

RMuJ PHPPRPSTATPICRRPHPPPPPSAATAAPIHRVHLPLPPSAAAPRSAL
MuDR -----

RMuJ PALHSLPLSLNVLGFDSMDDSTWLQIVGRLEEEPGNQLVVVQSPVDEPD
F S*D ** ****SP *P
MuDR -----SFNSLDSNG-----IPNSPDVDP

RMuJ SGGSSPPTQGEQPQPEPHPPPIVDWENLQIIESLDEEGRVNI VDDDELYV
G ** * * E** *DW*** * * LD*EGRV*** * E*Y*
MuDR LGETGGSBGLQKIDGESQ---LDWDSIIVSDVLDDEGRVQVPTENEIYF

RMuJ LLGLRAEDEAAENAQAAAATEQGNGKNGAENRNHDENEVEVEP PVEDE
LGL**DEAA N*** G*C* * * D * ** P D
MuDR NLGLNKGDEAANNRFs-----GSGTNCHAQGSLLTDNEDHHDQPCQDY

RMuJ VAGERMMVNDANKPSLVKGTIVPNKVFRLAVRQFAINEEFELWVKATDR
** E* *V* PS* G** PNMK FR*A*RQ AI EFEL * *T
MuDR IPDEKRVVYNRNMP SMQPGCLFPNMKEFRIAMRQYAIKHEFELGIEVIST

RMuJ KKYVGACKGASDCPWHVNGRRQADE-RTVMVTKFTNYHTCTSSGRRKTTT
*YVG CKG* DCPW*** R T**V * HTCTSSGRRKTTT
MuDR TRYVGYCKGG-DCPWRIYAREEKKGLPTIVVAVLDDVHTCTSSGRRRITT

RMuJ PTSAMVASKAIHILRTDSGMGPKELQKRLQEDQKCKINYDTVAKGRSLAM
PT* WVA *A *L *MG*KELQ LQ I*YDTV*KG* A*
MuDR PTCGWVAFHAKPLLMKPKQMGAKELQQLQTHNVTIGYDTVWKGKKEKAL

RMuJ IQLQGSWEENFHMILYRWRAAVMERSPGSVIEIDTIEVDGKVFYFNRFCCAL
L*GSWEE*F *LY W* AV* P SVIEID I DGK YF*RFPCA*
MuDR RELYGSWEESFQLLYSWKEAVIAVMPDSVIEIDVILEDGKYYFSRFFCAF

RMuJ SPCITGFLTGCRPYLSVNSTALNGLWKGHLASAIAIDGNWNYPIAFGFF
*PCI*GF GCRPYLSV STALNG W GHLASA *DG NWMYP* FGFF
MuDR GPCISGFRDGCRRPYLSVDSBALNWRWNGHLASATGVDGHNWNYPCFGFF

RMuJ DAETDNDWTFMQLLKAIGKVSPLAICTDACKGLEIAVHRVFPWAGHRE
AET DNW WFM QL K**G ***LAIC*DA*KGL AV VFP A *RE
MuDR QAETVDNWIFWFKQLKVKVGDHTLLAICSDAQKGLMHAVNEVFPYAEERRE

RMuJ CFNHLTQNLKIKYGGSVFQEMYPVARSYRAQVHEECMDTIKCACTDVALW
CF HL *N *K* GS MYP*AR YR V E * * * *A
MuDR CFRHLMGNYVKHAGS--EHMYPAAARAYRRDVF EHVSKVRNV-HKIAEY

RMuJ LDYHKLWYRSGFNAEIKCDYVTNLAECFNWIRDIKALPICELADTC
LD* HK**WYRSGFN *IKCDY*TNN*AE NNW**D K LP*C*LA*
MuDR LDQHHKFLWYRSGFNKD IKCDYITNNMAEYVNNWVKDHKDLVPCDLAEKI

RMuJ REMIMTLWNRRRRIGNKFTGTILPAVLHQLRARTRGLGHL SVVHADITTA
REM M L* RRRRIG K* G ILP VL L*ARTRGLGHLs*V* D * A
MuDR REMTMELFHRRRRIGKHLGII LPSVLA I LKARTRGLGHLsIVKCDNYMA

RMuJ EVWDNSSSHARHVARTHEQSTCQEWQHTGKPCQH ALAVIASQQIRDVKL
EV D**** *HV* *C*C EWQHTGKPCQH LA*I* Q RDV *
MuDR EVRDSINCMTKHVVAELKQCSCEEWQHTGKPCQHGLALIIAQDSRDVGM

RMuJ ENYINPYYSVALFWNAYNISIEFLPKDSQWPKVDLFFVLGAPLAKRNLGR
EN * YYS F AY* *EP* D*S WP VD** * AP*A*R*LGR
MuDR ENFVDDYYS TERFKIAYSRRVEPIGDRSFWPSVDFASGVFAP IARRGLGR

RMuJ YRKLRIKGCLEDGSKPK-----DC-----
*RK RIK*CLE G* * K C
MuDR QRKNRIKSCLEGGsARNKsTNENEKTKGRLKQYTCPNCGELGHRQSSYK

RMuJ -----
MuDR CPLNGTKRKRKPRINTKNWIPKELRTSSQNVPVQPDVAEEVTEQLEED

RMuJ -----EGND-----
E *
MuDR PQFETEQLGLALFQPLGAQITEQEAEPAEQAPASPPPTRKWLVKKITP

RMuJ -----
MuDR KKRLRISAQQQXY

```

Fig 13. Comparison of amino acids sequences of *mudrA* gene and *rmuA* gene.

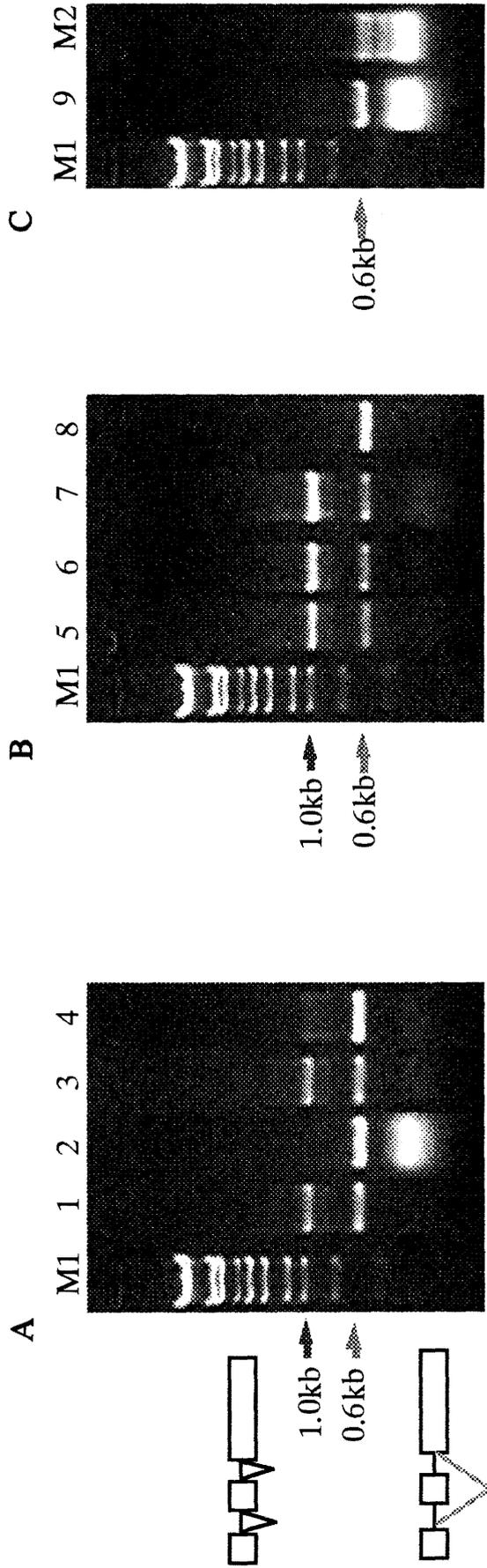
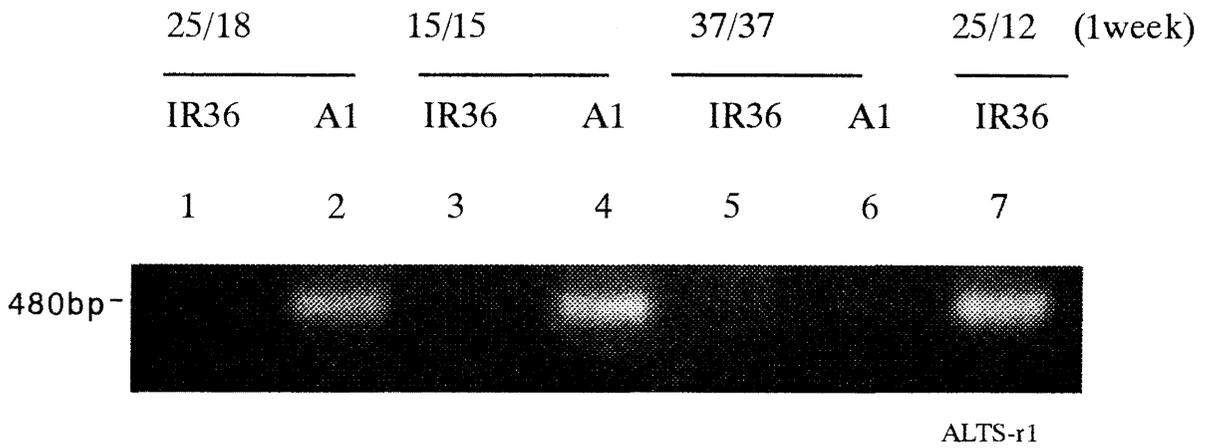
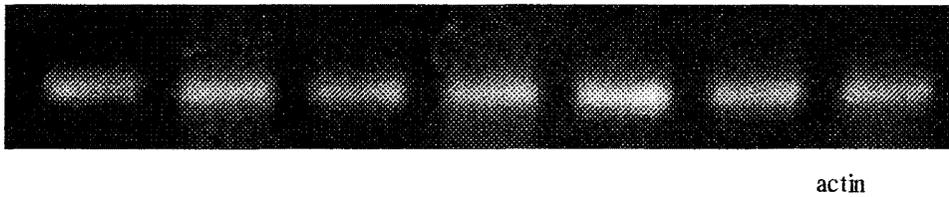


Fig 14. RT-PCR of *rmlA* gene transcript. A: 1.0kb RT-PCR fragments correspond to the transcripts spliced with the 1st and the 2nd introns. PCR products covered from the first ATG to the middle of the 3rd exon. 0.6 kb fragment lost the 2nd exon with two intron. Lanes 1 and 3 were panicles at later stage. In contrast, lanes 2 and 4 were young panicles. B: Lanes 5 to 7 were tissues from the plants grown under 25°C (day) and 15°C (night). Lane 8 were tissue from the plant grown under 25°C (day) /20°C (night). C: RT-PCR product obtained from calli.

A.



B.



C.

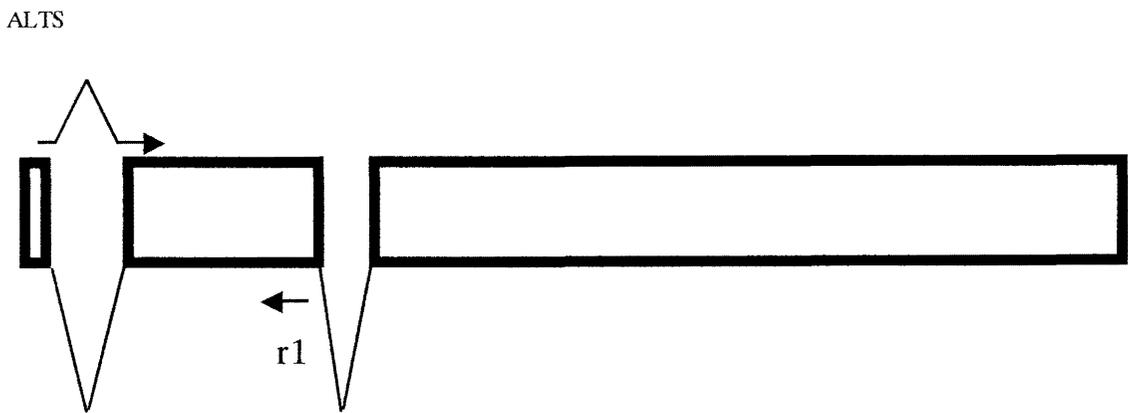


Fig 15. Activation of the *rmuA* gene. A: Cycling stress of lower temperature given for a week activated the transcription of the *rmuA* gene. RT-PCR was done with ALTS and r1 primer shown in panel C. B: Control for RT-PCR reaction by actin primers.

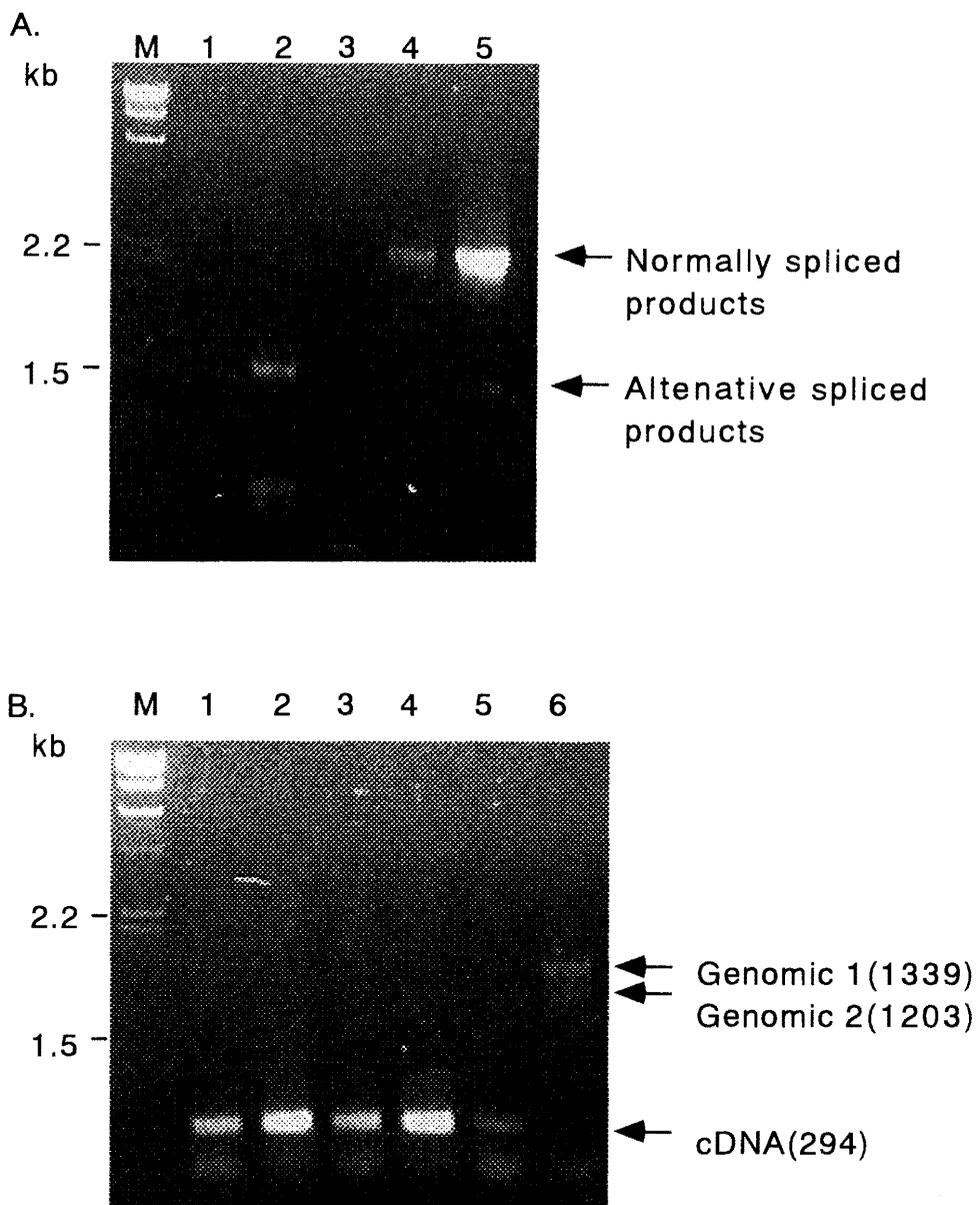


Fig 16. Alternative transcription amplified by RT-PCR. Panel A: 623f and RSTOP primers were used for RT-PCR. Normally spliced product including the exon 1 to 3 were shown with an arrow. Alternative spliced product lost the exon 2. Lane 1, 3: RNA samples were extracted from mature leaves from A1 and IR36 grown in green house. Lanes 2 and 4: RNA samples from flag leaves grown in green house. lane 5: RNA sample from mature leaves grown with cycling stress (25°C for 12 hours and 12°C for 12 hours). Panel B: primers designed to amplify a portion of Pgi gene including introns. Lanes 1 to 5 were same as panel A. Lane 6: Genomic DNA of A1. Amplified fragment from Pgi1 and Pgi2 were shown with arrows (genomic 1 and genomic 2).

NTR

A *RMu1-A1* 240 5' C--T-GAGGAGGAGAAAGCTGGGA-GCGGCATCGGCAGAGCGACACGAGGTGCCTCCACATCGGCTTCGGTCTCGGGGCGCGCCGCCCTGCCAC 335
 * * * * *
 B EST C71789 5' CCCTCGAGGAGGAGAAAGCTGGGAAGCGGCAATCGGCAGAGCGGACACGAGNTGCCCTCCACATCGGGTTCGGTCTCGGGGCGCGCCGCCCTCCMAC 100
 10 20 30 40 50 60 70 80 90

336 TCCCCACACTGCTCTCCCCAGTCAGCGCGCGG-CCCCATCGGCCTCGGCCACCGCCGCCACCCACCGCTATCGCGCGCGCCCATC 435
 * * * * *
 TCCCCACACTGCTCTCCCCAGTNAAGCGCGCGCCCATCGGCCTCGGGCACCGCCGCCATCGCGCGGCCACCCACCGCTATCGCGNGCCCGCCCATC 200
 101 110 120 130 140 150 160 170 180 190

436 CACCGCTGCCCTCGGTCAGTCTCCCGCCCTCCACTCCCTCCCTCCCTCCCTCAATGTGTGGTTAGGGTTTGGCTCC 514
 * * * * *
 CACCGCTGCCCTCGGTCAGTCTCCCGCCCTCCACTCCCTCCCTCCCTCCCTCAATGTGTGGTTAGGGTTTGGCTCC 3'
 201 210 220 230 240 250 260 270

1st exon

A *RMu1-A1* 515 5' ATGGATGACTCCACCTGGCTACAGATTGTTGGAGG 3' 551
 * * * * *
 B EST C71789 5' ATGGATGACTCCACCTGGCTACAGATTGTTGGAGG 3' 280
 280 290 300 310

3rd exon

A *RMu1-A1* 1355 5' TGACAAAGTTTACTAATCATCATCACAGTGTACATCTAGGGTAGAAGGAGACTACACACCAACCA-GCGCTGGGTTGCTTCCAAGGCCATCCATATCC 1453
 * * * * *
 B EST C71789 5' TGACAAAGTTTACTAATCATCATCACAGTGTACATCTAGGGTAGAAGGAGACTACACACCAACCAAGCGGCTGGNTTGTCTCCAAGNCAATCCATATCC 410
 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410

1454 TTGGGACA-GATTTCAGGTAT-GGGCCCTAAAGAACTGGAAAAAAGGTT 3' 1499
 * * * * *
 TTGGACAAGATTTCAGGTATTGGCCNTAAAGAAGTTTCAAAAAAGGTT 3'
 420 430 440 450 460

Fig 17. Sequence comparison between RMu-A1 and rice EST, C71789. Gap was indicated with dash. Same nucleotides were shown with asterisks. Differences were marked.

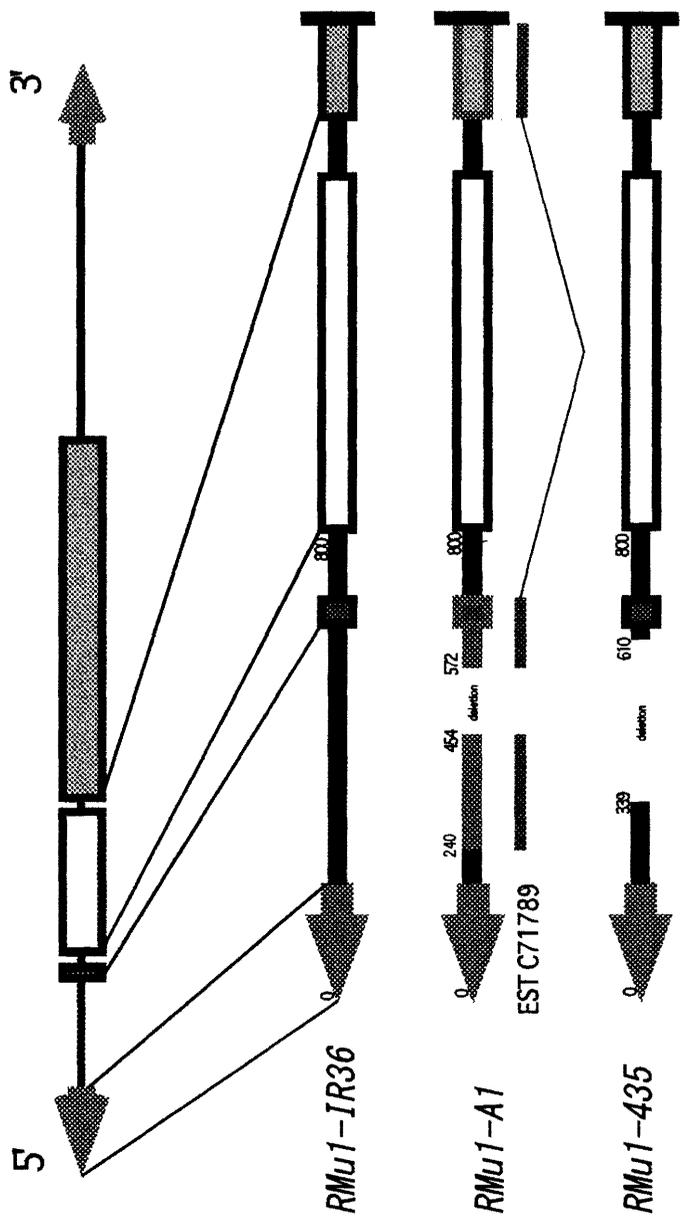


Fig 18. Structural similarities found in RMu1-A1 and a rice EST, C71789.

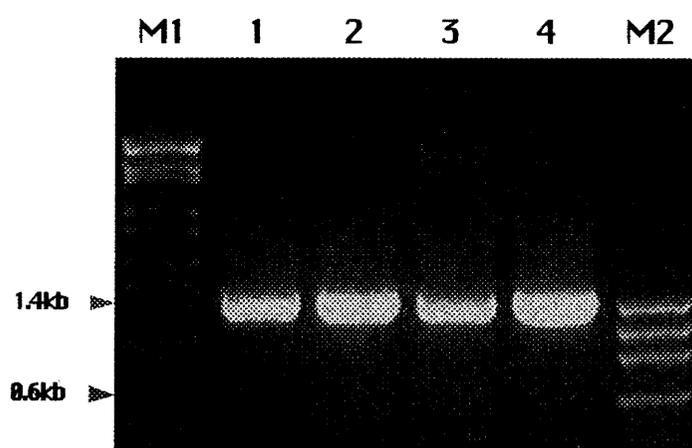


Fig 19. Genomic fragments carrying exon 2. Genomic PCR was done with FM2 and r4 primers which can amplify a part of coding sequences including exon 2.

Intron 1

```

1  GTATGCACITCTCTATTTTTTTTTCAGTGACATGATTACCGGATTGATT 50
2  *****
1  GTATGCACITCTCTATTTTTTTT--CAGTGACATGATCCAGGATTGATT 50
3  *****
51  GCTGGAAGTAAGGGTTAGATAGATCTGACTATTGTTTGCAATTAATTGC 100
4  *****
51  GCTGGAAGTAAGGGTTAGATAGATCTGACTATTGTTTGCAATTAATTGC 100
5  *****
101 ATCTTTTCTCTAA 150
102 *****
101 TTCTTTTCTCTAA 150

```

Intron 2

```

1  GTACTTTTTTTCCTAATGCATTGACATTTTTCACITCTATGTTATTTTCT 50
2  *****
1  GTACTTTTTTTCCTAATGCATTAAATAATTTTTCACITCTATGTTTCT 50
3  *****
51  TTATTTTGCCTCAAIGCCATGTTTTTATTTGTTTAAATTT-GCAA 100
4  *****
51  TTATTTTGCCTCAAIGCCATGTTTTTATTTGTTTAAATTTTGCA 100
5  *****

```

Fig20. Sequence idengtities in two introns of *RMu1-IR36* and *RMu1-A1*.

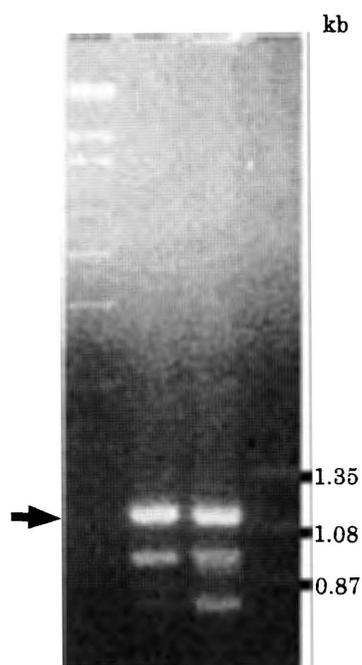
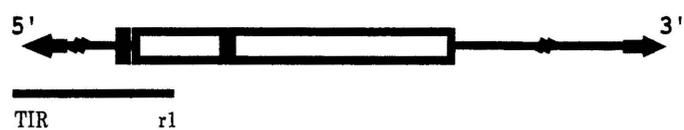
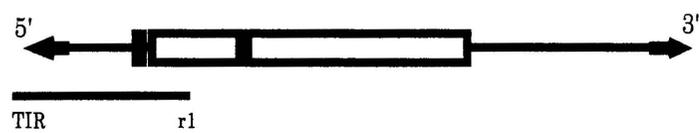


Fig 21. Polymorphism detected at 5' region in *RMu1* elements. TIR and r1 primers were used to amplify variable regions from genomic DNAs from IR36 and A1. Arrow shows the size of the region in *RMu1*-IR36.

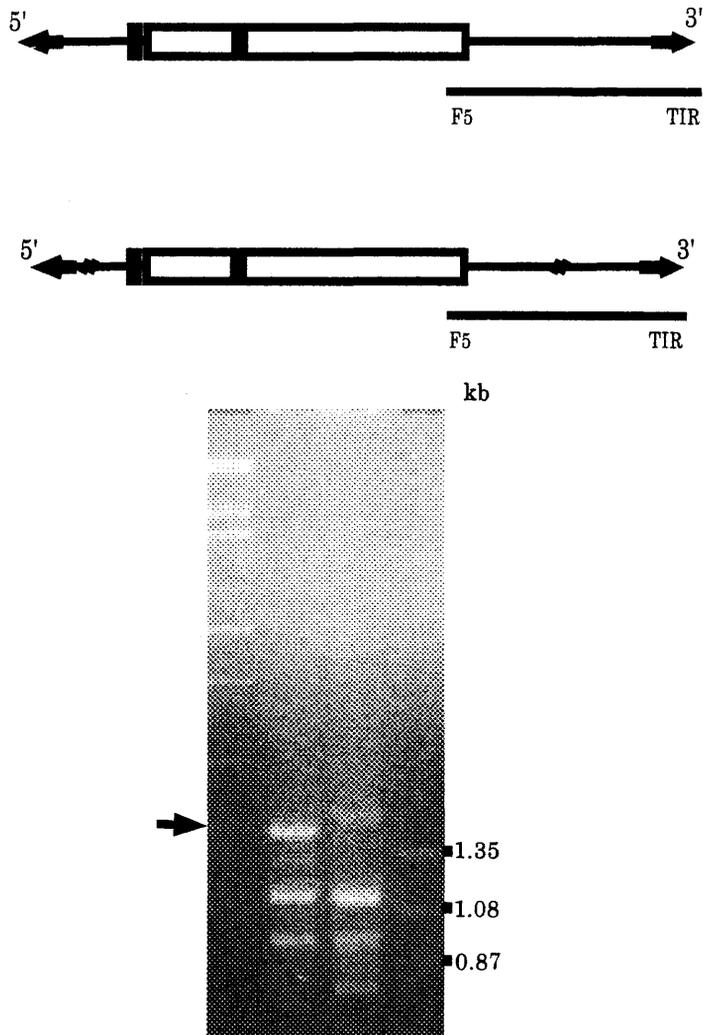


Fig 22. Polymorphism detected at 5' region in *RMu1* elements. TIR and r1 primers were used to amplify variable regions from genomic DNAs from IR36 and A1. Arrow shows the size of the region in *RMu1*-IR36.

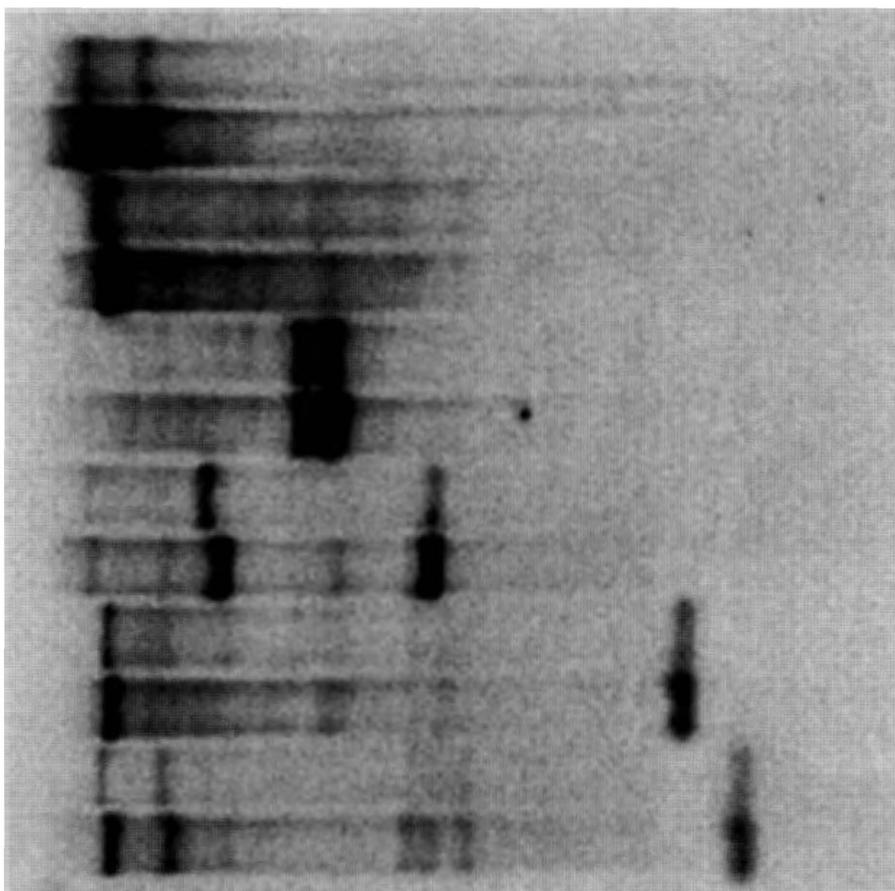


Fig23. DNA gel blot of Asaminori (odd lanes) and IR24 (even lanes). Lanes 1 and 2: EcoRI, lanes 3 and 4: HindIII, lanes 5 and 6 PstI, lanes 7 and 8: SacI, lanes 9 and 10: XbaI, lanes 11 and 12: XhoI. Int2 probe prepared from internal sequence of *RMu2-Ata* was used.

<i>RMu2-IR36</i>	GAGAAAAATTGTGATTTTGTCTATCGCAAAGAATGGTTTTGTGGAATACTATCATTTTAA	60
<i>RMu2-A1b</i>	TAGAAAAATTGTGATTTTCTATCGCAAAGAATGGTTTCGCTGGAATACTATCCCTTCAA	
<i>RMu2-IR36</i>	AGTGATTCATTA AAAATGCTATTC TAAACTAAG-----	120
<i>RMu2-A1b</i>	AGTGATTCATTA AAAATGCTATTC TAAACTAAGGCTGCATTC TATACCCATGGTTCCCAAC	
<i>RMu2-IR36</i>	-----	180
<i>RMu2-A1b</i>	TTTCCTCCATCGTTTTACGCACACACGC'TTTTCAA ACTGCTAGACGGTGTGTTTTTTGCA	
<i>RMu2-IR36</i>	-----	240
<i>RMu2-A1b</i>	AATAGCAAATACTAAATTAATCGCGTGCTAATCGCTACTCCGTTTTC CGTGTAGGAAGT	
<i>RMu2-IR36</i>	-----	300
<i>RMu2-A1b</i>	GAGGTTCCCAACCCTCACTCCGGAACACAGCCTAAGAGGTGTTCACTGAAATGCTATTTT	
<i>RMu2-IR36</i>	-----AGGTGTTCACTGAAATACTATTTT	360
<i>RMu2-A1b</i>	GAGGTTCCCAACCCTCACTCCGGAACACAGCCTAAGAGGTGTTCACTGAAATGCTATTTT	
<i>RMu2-IR36</i>	GGATCTTTTTG-TTAGTACTAATGTTTTTACTCTCTTTTAGTTTTCTCCGGACCAAAAT	420
<i>RMu2-A1b</i>	GGATCTTTTTGGTTAGTACTAATGTTTTTACTCTCTTTTAGTTTTCTCCGGACCAAAAT	
<i>RMu2-IR36</i>	GCCCTCGCCTCTATGTCTCTCTTTTCGCC CAGGATAATGGCAGGTGACACATGCTTTGCT	480
<i>RMu2-A1b</i>	GCCCTCGCCTCTATGTCTCTCTTTTCGCC CAGGATAATGGCAGGTGACACATGCTTTGCT	
<i>RMu2-IR36</i>	AGAGCAAATA TATTGCTATATATTTGTGAAAC-TATGTACGGCTCACGCTCCGCTGCGT	540
<i>RMu2-A1b</i>	CTAGCAAATA TATTGCTATATATTTGTGAAACCTATGCACGGCTCACGCTCCGCTGCGT	
<i>RMu2-IR36</i>	GATATGTATATACTAATTGATCATTAACACTAATACAAAAGCTCTAGTGCCTGGTTTAA	600
<i>RMu2-A1b</i>	GATATATATACTAATTGATCATTAACACTAATACAAAAGCTCTAGTGCCTGGTTTGA	
<i>RMu2-IR36</i>	AAGTCAGACAACACATCTCTGGTTAATTTTGACACATGCTTTGCTAGAGCAATATATTTT	660
<i>RMu2-A1b</i>	AAGTCAAACAGCACTTCTCTGGTT---TTGACACATGCTTTGCTATAGCAATATATTTT	
<i>RMu2-IR36</i>	GCTTTCACATTT-GTACAAT-AAAAATGGTGTGTAGTCCAGTTTAGCCACAAGCGTGCAT	720
<i>RMu2-A1b</i>	GCTTTCACATTTGTACAATTA AAAATGGTGTGTAGTCCAGTTCAGCCACAAGCGCGCAT	
<i>RMu2-IR36</i>	ACAGATCAAGATTTTTCTCACTCCAAGTTATAAAGATATAATGGTGAAGCTAGCTTAACC	780
<i>RMu2-A1b</i>	ACACATCAAGATTTTTCTCACTCCAAGTTATAAAGATATAATGGAGAAGCTAGCTTAACC	
<i>RMu2-IR36</i>	CATAAAATTTGGGCATGAAAAAATTTGTA AAAACAAAATAGAACAAAATTTGGACAGCATGT	840
<i>RMu2-A1b</i>	CATAAAATTTGGGCATGAAAAAATTTGTA AAAACAAAATAGAACAAAATTTGGACAGCATGT	
<i>RMu2-IR36</i>	AGACATAATATTTGAATAGCATGTGGTTCACAAAATACCTCACATAACAATGGTTCA CAAC	900
<i>RMu2-A1b</i>	AGACATAATATTTGAATAGCATGTGGTTCACAAAATACCTCACATAACAATGGTTCA CAAC	
<i>RMu2-IR36</i>	ATAACAGTGGTTCACA-TGCACCAA-GGTTTACA---ACT---GTTTCAACATAATAGA	960
<i>RMu2-A1b</i>	ATAACAGTAGTTTCAACATACCAGTGGTTCACATGCACCATGGTTTCAACCGTAATAAA	
<i>RMu2-IR36</i>	GACAAGGACACAAGGGTATTTTGGTCAGAACAAA ACTTAAAATAGAGTAAAATCATTTCT	1020
<i>RMu2-A1b</i>	GACAAGGACACAAGGGTATTTTGGTCAGAACAAA ACTTAAAATAGAGTAAAATCATTTCT	
<i>RMu2-IR36</i>	AGCAACCAAAAAGATCTAAAATAGCATTTTCA GTGAACACCCCTTGA-TTTAGAAATAGCAT	1080
<i>RMu2-A1b</i>	AGCAATCAAAAAGATCTAAAATAGCATTTTCA GTGAACACCC-TT-AGTTTATGATAGCAT	
<i>RMu2-IR36</i>	TTTAATAAATCACTTTGAAGGGATAGTATTTCCAGCGAAACCATTTCTTTTGGCATAGCAA	1140
<i>RMu2-A1b</i>	TT-AATGAATCACTTTGAAGGGATAGCATTTCCAGCGAAACCATTTCTTTTGGCATAGCAA	
<i>RMu2-IR36</i>	ATCACAATTTTCTC	
<i>RMu2-A1b</i>	ATCACGATTTTCTC	

Fig 24. Sequence comparison between *RMu2-IR36a* and *RMu2-A1b*. *RMu2-IR36a* sequence starts from right TIR to left TIR.

wanderer	AAGGTTGTGTTCCGGCATTGCTGGTCCCATCCTCTCCCCCTCGT
	*** ** * * **** * * * ** *
Insertion	AAGGCTGCATTCTATAACCCATGGTCCCAACTTTCCTCCATCGT

Original	CTAAACTAAG
wanderer	TTTCTGCGCGCACGCTTTTCAAAGTCTAAACAATGTGTTTTTTGCAAAA
	*** ** * **** * * **** * * **** * * **** * * **** * *
Insertion	TTTACGCACACACGCTTTTCAAAGTCTAGACGGTGTGTTTTTTGCAAAA
wanderer	A---GTTTCTATACGAAAGTTGCTTAAAAAATTATATTAATCCATTTTTG
	* **** * * **** * * **** * * **** * * **** * *
Insertion	AAAAAATTCTATACGAAAGTTGCTCAAAAAATCATATTAATCCATTTTTG
wanderer	CAAAAAAA--GCAAATACTTAATTAATCACGCGCTAATGAACTGCTTCG
	***** **** * * **** * * **** * * **** * *
Insertion	AAAAAAAATAGCAAATACTAAATTAATCGCGTGCTAAT-CGCTACTCCG
wanderer	TTTTCCGTGCGCACATCATGTGCTGGGAAGATTGGCTTCCGAACGCACCC
	***** * * * * * * * **** * * **** * *
Insertion	TTTTCCGTGCTAGGAAGTGAGGTTCCCAACCCTCACTCCCGAACACAGCC
wanderer	TAAG

Insertion	TAAG

Original	AAGAGGTGTTCACTGAAATACTATTTTGGATCTTTTTG-TTAGTA

Fig 25. Sequence similarity found between wanderer and an insertion sequence in *RMu2-A1b*. Presumable recombination point (AAG) was aligned with original TIR sequence in *RMu2-IR36a*.

A. B.

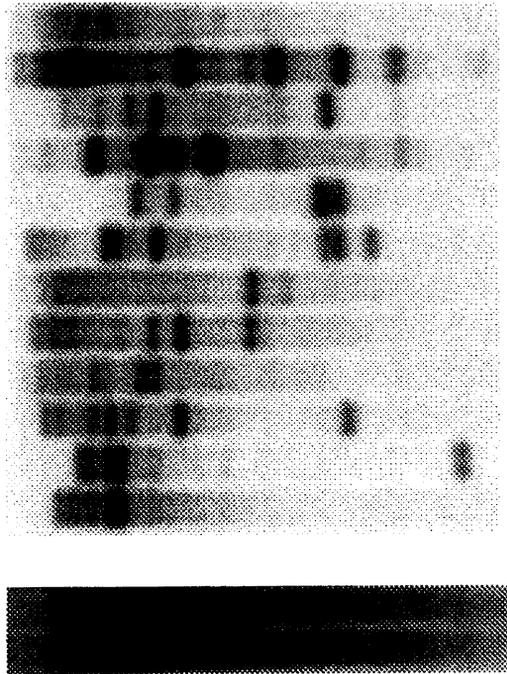
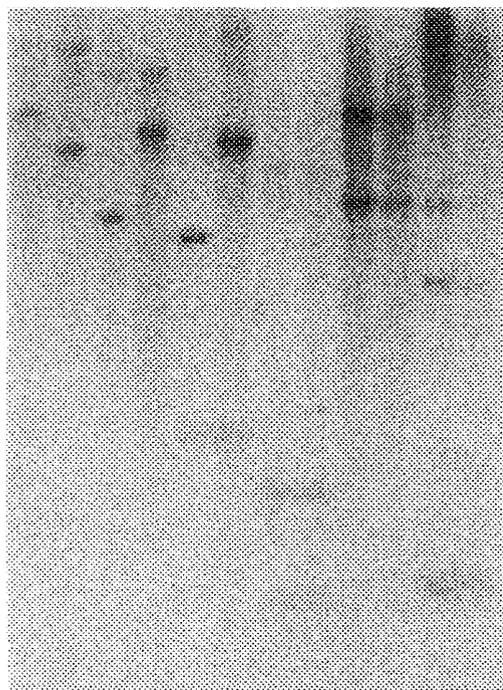


Fig 26. DNA gel blot of Asaminori and IR24. An insertion sequence
In *Rmu2-Alt* was hybridized to panel A (lane 1; Asaminori, lane 2; IR24).
Genomic DNAs were digested with *EcoRI*. Panel B: The same blot used in Fig 23
Was used and hybridized with TIR probe.

A.



B.

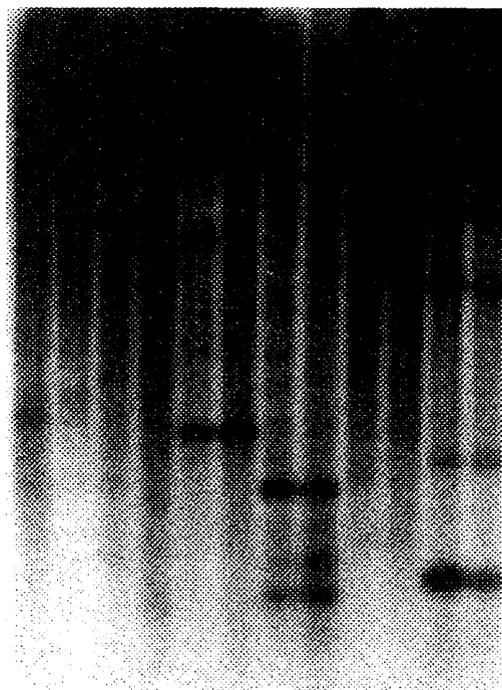


Fig 28. DNA gel blot of genomic DNAs of Asaminori and IR24. Lane definition is same as Fig 23. Panel A: RMul-A1c internal probe was hybridized. Panel B: *RMe²-A1c* specific TIR probe was hybridized with the same blot in panel A.

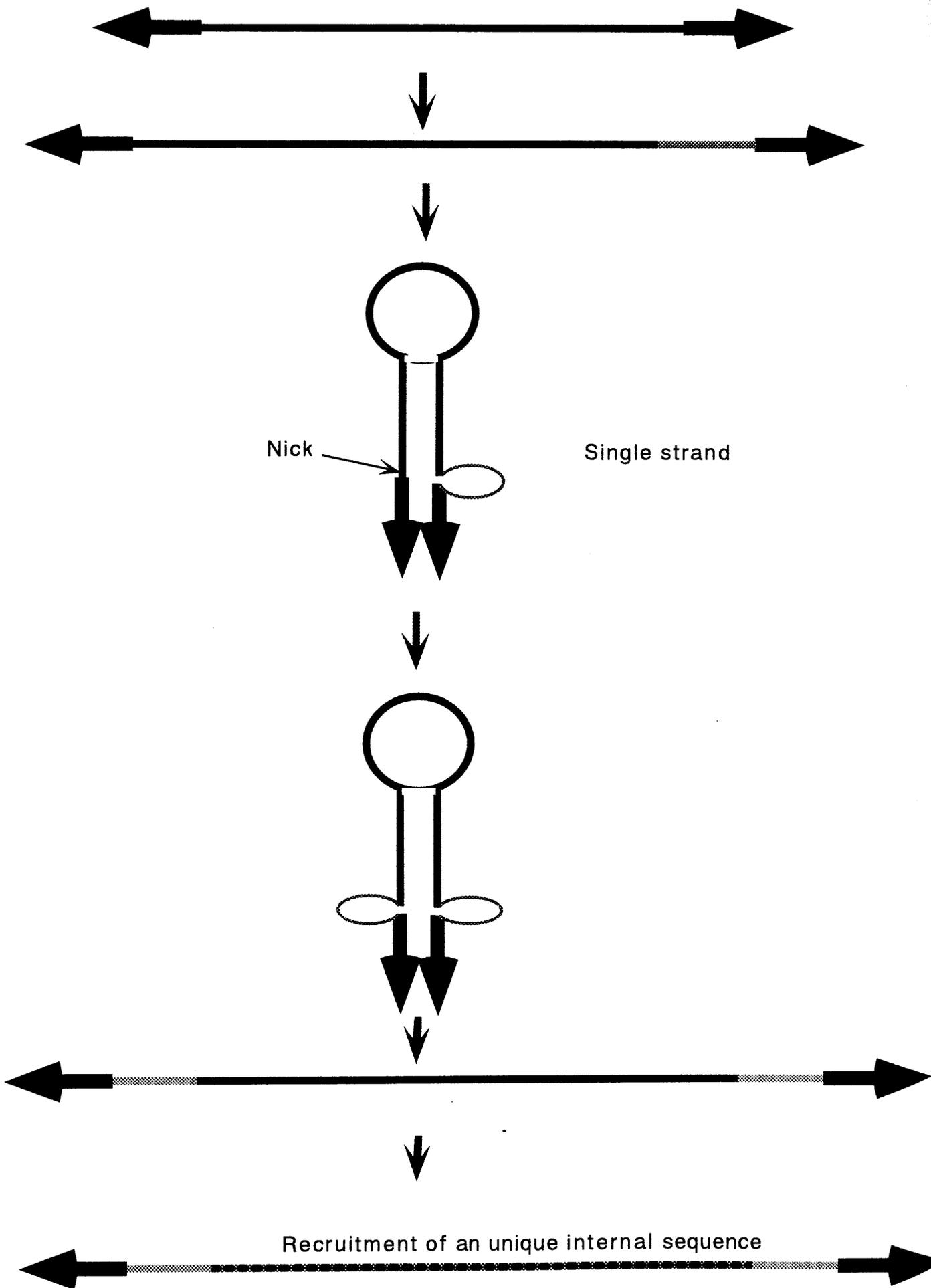


Fig 29. Model of extension of TIRs in *RMu* subfamily.

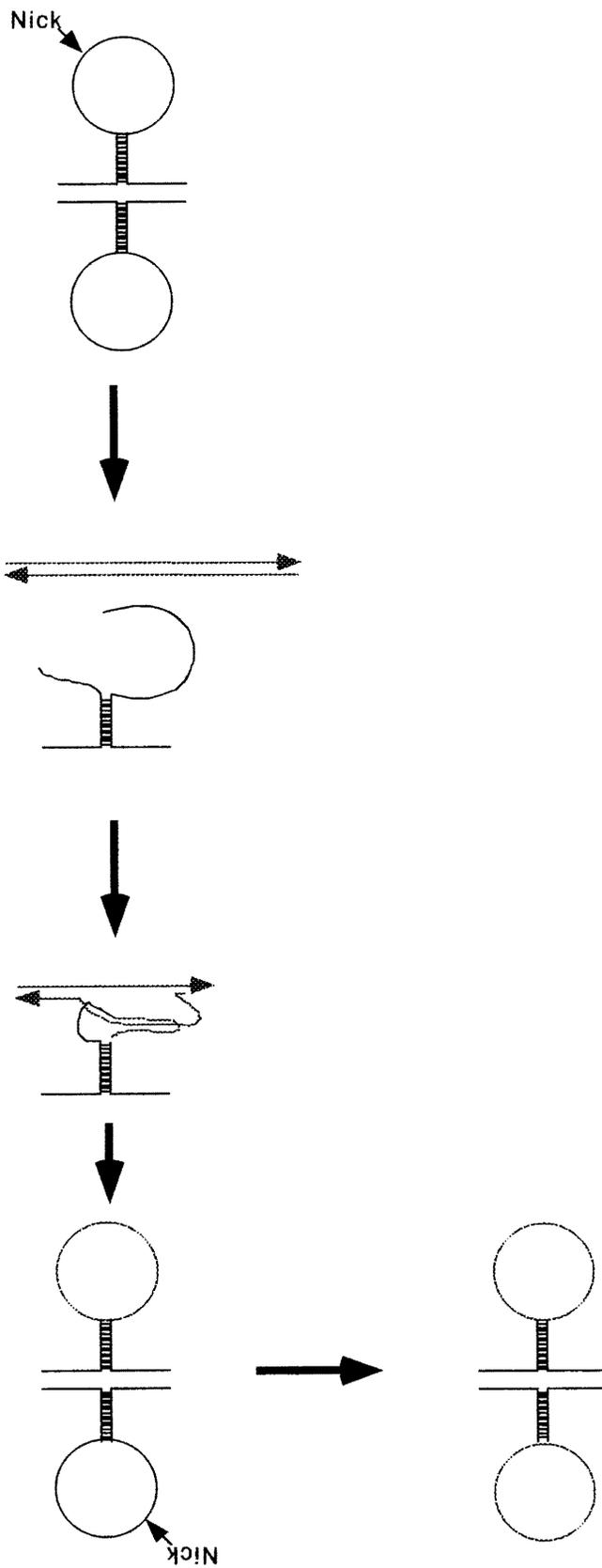


Fig 30. Model of rccruitment of an unique internal sequence from an extopic template.

		10	20	30	40	50	
RMu2-A1c	1	GAGAAAATGG	GGATTATACT	ATCGTAAAAG	AGTGGTTTCG	CTGGAATGCT	50
RMu2-G4	1	GAGAAAATGG	GGATTATACT	ATCGTAAAAG	AGTGGTTTCG	CTGGAATGCT	50
		60	70	80	90	100	
RMu2-A1c	51	ACCTCTTCAA	ACTAATTCAC	TAAAATGCTA	TCTTAAACTG	GAGGTGTICA	100
RMu2-G4	51	ATCTCTTCAA	ACTAATTCAC	TAAAATGCTA	TCTTAAACTG	GAGGTGTICA	100
		110	120	130	140	150	
RMu2-A1c	101	CGAAAGTGGT	ATTTTCGCTC	TTTTGGGTAA	ATAGAAATGT	TTTTCCCTCA	150
RMu2-G4	101	CGAAAGTGGT	ATTTTCGCTC	TTTTGGGTAA	ATAGAAATGT	TTTTCCCTCA	150
		160	170	180	190	200	
RMu2-A1c	151	TTTTAACTTT	TTTTCTGG	-----	-GCTACGGGC	CCACATGTCA	200
RMu2-G4	151	TTTTAACTTT	TTTTCTGGACC	AAAATACCCC	TGCTACGGGC	CCACATGTCA	200
		210	220	230	240	250	
RMu2-A1c	201	TACTCTCCAC	TCTCTCCTTC	TCCCCCTCCC	CTCTATCGAG	GGAGGCCCGG	250
RMu2-G4	201	TACTCTCCAC	TCTCTCCTTC	TCCCCCTCCC	CTCTATCGAG	GGAGGCCCGG	250
		260	270	280	290	300	
RMu2-A1c	251	TGGGGGAGG	CGAGCAGTGG	CGGGGGCCGC	GTCCCGCTCC	CTGGCCGGCC	300
RMu2-G4	251	TGGGGGAGG	CGAGCAGTGG	CGGGGGCCGC	GTCCCGCTCC	CTGGCCGGCC	300
		310	320	330	340	350	
RMu2-A1c	301	GGCTCGACCT	CGAGAAGCTG	ATGGCCGGCC	AGTCGGGTA	GGCCGTGCTC	350
RMu2-G4	301	GGCTCGACCT	CGAGAAGCTG	ATGGCCGGCC	AGTCGGGTA	GGCCGTGCTC	350
		360	370	380	390	400	
RMu2-A1c	351	GACGACCTCC	TCATCCCGTC	CTCCTCGCC-	GACGC-GCG-	-CAACAACGGC	400
RMu2-G4	351	GACGACCTCC	TCATCCCGTC	CTCCTCGCC	GACGCCCGCC	CCACAACGGC	400
		410	420	430	440	450	
RMu2-A1c	401	-TACGCATTT	GAGCCCGTGC	AGAGGATCCT	GGCCGGCTAC	CTCGACCATG	450
RMu2-G4	401	CTACGCATTT	GAGCCCGTGC	AGAGGATCCT	GGCCGGCTAC	CTCGACCATG	450
		460	470	480	490	500	
RMu2-A1c	451	AGGGCCAGCC	GGGGCCGGCC	C-GC-ACGGC	TGGACTGGAC	CACCGAGGAC	500
RMu2-G4	451	AGGGCCAGCC	GGGGCCGGCC	CGGCCACGGC	TGGACTGGAC	CACCGAGGAC	500
		510	520	530	540	550	
RMu2-A1c	501	GACTTCAGCT	CGGGGGTGTG	GC-GCCGCAC	AACGACGTCG	CCCAGGTCGG	550
RMu2-G4	501	GACTTCAGCT	CAGGGGTGTG	CGGCCCGCAC	AACGACGTCG	CCCAGGTCGG	550
		560	570	580	590	600	
RMu2-A1c	551	CAGGCTCATG	GAGAGCTACC	TGCCCGAGAT	CGCCTCCGAC	GAGAACCTGT	600
RMu2-G4	551	CAGGCTCATG	GAGAGCTACC	TGCCCGAGAT	CGCCTCCGAC	GAGAACCTGT	600
		610	620	630	640	650	
RMu2-A1c	601	CCATTGACTA	GTTCACCGCC	CTCCCGGAGC	TCATCCCGGA	GCACGCCAGG	650
RMu2-G4	601	CCATTGACTA	GTTCACCGCC	CTCCCGGAGC	TCATCCCGGA	GCACGCCAGG	650
		660	670	680	690	700	
RMu2-A1c	651	TTCAACGAGG	ACGGCATGTA	CCACGCCATC	GACATCTACT	TGAAGGTTAG	700
RMu2-G4	651	TTCAACGAGG	ACGGCATGTA	CCACGCCATC	GACATCTACT	TGAAGGTTAG	700
		710	720	730	740	750	
RMu2-A1c	701	AAGCTGCCAT	TCACATCGAT	CACATAAAAA	TGGCTAAATC	CTTCGTTAAT	750
RMu2-G4	701	AAGCTGCCAT	TCACATCGAT	CACATAAAAA	TGGCTAAATC	CTTCGTTAAT	750
		760	770	780	790	800	
RMu2-A1c	751	CACCTCCACTA	AATGCTTATG	TGGCCGGTGC	AGACGGTGGT	GCAGGTGCTG	800
RMu2-G4	751	CACCTCCACTA	AATGCTTATG	TGGCCGGTGC	AGACGGTGGT	GCAGGTGCTG	800
		810	820	830	840	850	
RMu2-A1c	801	TACCACGAGC	AGCG-CGGCT	CGGCCGGCCA	TGGCAGCCGC	CGAGCACCCG	850
RMu2-G4	801	TACCACGAGC	AGCGCGCCCT	CGGCCGGCCA	TGGCAGCCGC	CGAGCACCCG	850
		860	870	880	890	900	
RMu2-A1c	851	GCEGTGGTAC	-CCGGCCGGC	AGTCCCGGGC	GETGTGGTAC	AGGCCBACAC	900
RMu2-G4	851	GCCGTGGTAC	GCGGGCCGGC	AGTCCCGGGC	GETGTGGTAC	AGGCCBACAC	900
		910	920	930	940	950	
RMu2-A1c	901	CGAGCTTCAA	CGGGCGTGTG	GGCCACTGCT	CGCCTCCAAC	CACCGCGGCT	950
RMu2-G4	901	CGAGCTTCAA	CGGGCGTGTG	GGCCACTGCT	CGCCTCCAAC	CACCGCGGCT	950
		960	970	980	990	1000	
RMu2-A1c	951	CCCTCGAGAG	AGATGAAGAG	GAGAAGGAGA	GAGTAGAGGG	AGTATGACAG	1000
RMu2-G4	951	CCCTCGAGAG	AGATGAAGAG	GAGAAGGAGA	GAGTAGAGGG	AGTATGACAG	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
RMu2-A1c	1001	GTCGGCCCGC	ATTAGGGGTA	TTTTGGTCCG	GGAAAAAGTT	ATAATTGAGA	1050
RMu2-G4	1001	GTCGGCCCGC	ATCAGGGGTA	TTTTGGTCCG	GGAAAAAGTT	ATAATTGAGA	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
RMu2-A1c	1051	AAAAACATTT	CTATTTACCT	AAAAAACCGA	AAATAGCATT	TGGTGAACA	1100
RMu2-G4	1051	AAAAACATTT	CTATTTACCT	AAAAAACCGA	AAATAGCATT	TGGTGAACA	1100
		1110	1120	1130	1140	1150	
RMu2-A1c	1101	CCTTCAGTTT	AGAATAGCAT	TTTAAATGAAT	CACCTTGAAS	GGATAGCATT	1150
RMu2-G4	1101	CCTTCAGTTT	AGAATAGCAT	TTTAAATGAAT	CACCTTGAAG	GGATAGCATT	1150
		1160	1170	1180	1190	1200	
RMu2-A1c	1151	CCAGCGAAAC	CACCTTTTTA	CGATAGTATA	ATCCCAATTT	TCTC.....	1200
RMu2-G4	1151	CCAGCGAAAC	CACCTTTTTA	CGATAGTATA	AATC-ATTT	TCTC.....	1200

Fig 31. Sequence comparison between *RMu1-A1c* and *RMu1-G4*.

		10	20	30	40	50	
RMu2-A1c	1	GAGAAAATTG	GGATTATACT	ATCGTAAAAG	AGTGGTTTCG	CTGGAAATGCT	50
RMu2-N1c	1	GAGAAAATTG	GGATTATACC	ATGSCAAAAG	AGTGGTTTCG	CTCGAATGCC	50
		60	70	80	90	100	
RMu2-A1c	51	ACCTCTTCAA	ACTAATTCAC	TAAAATGCTA	TCTTAAACTG	-GAGGCTTTC	100
RMu2-N1c	51	ATCGCTTCAA	ACTGATTCAC	TGTAATAGCA	TCTTAAACTA	AGAGGTAATTC	100
		110	120	130	140	150	
RMu2-A1c	101	ACCAAGTTCG	TAATTTTCGCT	CTTTTG-CGT	AAATAGAAA	GTTTTTCCTC	150
RMu2-N1c	101	ATCGAATAT	TSTTTTCAT	CTTTTTCGCT	GAATAGAAA	GTTTTTCCTC	150
		160	170	180	190	200	
RMu2-A1c	151	AAATTTAACT	TTTT-TCTGG	GCTACGGGCC	CACATGTCAT	ACTCTCCACT	200
RMu2-N1c	151	AAATTTAAT	TTTTGCCCAG	ACCA-AAATA	CCCTGAGAG	GGCCCTCCT	200
		210	220	230	240	250	
RMu2-A1c	201	CTCTCCTCTC	CCGCCCTCCC	TCTATCGAGG	GAGGGCCGGT	GGCGGAGGC	250
RMu2-N1c	201	GTCATACTCT	CTCAGCTCTC	TCTTTT----	CCCTCTT	CGC-----	250
		260	270	280	290	300	
RMu2-A1c	251	GAGGAGTGGC	CGCGGCCGGC	TGGCCGTCGC	TGGCGTCCGC	GCTCGACCTC	300
RMu2-N1c	251	---CTCTTCC	TCTCTCTCTC	TGGTGGSCGC	AGTGGGAGCT	GT--GGTGC	300
		310	320	330	340	350	
RMu2-A1c	301	GAGAAGCTGA	TGGCGCCGA	GTCGGCTAGC	CCGTGCTCGA	CGACCTCCTC	350
RMu2-N1c	301	CAGCAGACGA	TAGCGG-GGC	--CGGTGAGG	--GTGTGAGA	GGA--TCCCA	350
		360	370	380	390	400	
RMu2-A1c	351	ATCCCGTCTC	CCTCGCCGAC	GCGCGCACAA	CGGCTACGAC	ATTGACGGCG	400
RMu2-N1c	351	ATTGCGTCTC	CT----CAAC	ATG-GAGGGA	CG----CCGAC	AATGAC-CCC	400
		410	420	430	440	450	
RMu2-A1c	401	TCCAGAGGAT	CCTGGCCGGC	TACCTCGACG	ATGAGGGCGA	CGCGCCGGCG	450
RMu2-N1c	401	TGCGG-----	-CTGGCTCGG	TG--TCACCT	GCGTCGAGGA	CG--CGGGCG	450
		460	470	480	490	500	
RMu2-A1c	451	CGCGCCAGCG	CTGGACTGCA	CCACCGACGA	CGACTTCAGC	TGGCGGTTGT	500
RMu2-N1c	451	GTG-GGAGGG	TCGG-----	----CGAGC-	TGG----AGC	TCGCCAACTT	500
		510	520	530	540	550	
RMu2-A1c	501	GCGCGCCGAC	AACGACCTCG	CCCAGGTCGG	GAGGCTCATG	GAGAGCTACC	550
RMu2-N1c	501	CTCACT-CAC	GA-GCTACCT	CCCA--TC--	CGAGTGTCTG	----CTACC	550
		560	570	580	590	600	
RMu2-A1c	551	TCCCGGAGAT	CGCCT-CCGA	CGAAGACCTG	TCCATTGACT	AGTTCCAGCG	600
RMu2-N1c	551	CTAC--AACC	AGCTTSCCGG	CCAGATCCCG	GTCGCCA---	---TCCAGAC	600
		610	620	630	640	650	
RMu2-A1c	601	CCTCGCCGAG	CTCATCCCGG	AGCACGCGAG	GTTCAAAGAG	GACGGCATGT	650
RMu2-N1c	601	GCT-GGAGG-	---AGCTCCG	GGGCTCTCTG	GCTCA-CAAC	CTCCTCTCCA	650
		660	670	680	690	700	
RMu2-A1c	651	ACDAGCCAT	CGACATCTAC	TGAAGGTTA	-GAAGCTGCC	ATTCACATCG	700
RMu2-N1c	651	GCTATATTCC	TG-CGGAGAT	TGGCGGGGG	TGGAGGTGTG	TGGAGATC-	700
		710	720	730	740	750	
RMu2-A1c	701	ATCACTAAA	AAATGGCTAAA	TGCTTCGTTA	ATCACTCCAC	TAAATGCTTA	750
RMu2-N1c	701	---TTSAGG	GAGGGTTCGA	GCA TG-GGGA	TGGAGATTGC	CGCATGC--G	750
		760	770	780	790	800	
RMu2-A1c	751	TGTGGCCGTT	GCAAGCGGTT	GTGCAAGTGC	TGTACCAAGA	GCAAGCGGCC	800
RMu2-N1c	751	AGGGGCATGC	CGAGGTTGTC	GAGGTGCTGC	TCCAGCGCGG	GGCGGATGCC	800
		810	820	830	840	850	
RMu2-A1c	801	TCCGCGCCGC	ATGSCAGCGC	CCGAGCACCG	CGCGCTCGTA	CCCGCCGGCG	850
RMu2-N1c	801	ATCAT-TGCC	GGCGAGATCG	CCATG-GCTG	C-TCCCT-CG	CTCGGT--CG	850
		860	870	880	890	900	
RMu2-A1c	851	AGTCCCGCGC	GCTGTCTTAC	AGGCCGACAC	CGAGCTTCAA	CGGCGCTGTC	900
RMu2-N1c	851	A--CGGTCG	CTCCCGCCA	CGCCCGCTGC	CGACACCCAC	CTGC-CTCCC	900
		910	920	930	940	950	
RMu2-A1c	901	GCCACGTGCT	CCCTCTCAAC	CACCGGCCCT	CCCTCGAGAG	AGATGAAGAG	950
RMu2-N1c	901	GGCCACCGC-	CAGTCCCAAC	T-----GGA	CCCAAGAGAG	AGAGGAAGAG	950
		960	970	980	990	1000	
RMu2-A1c	951	GACAAGGAGA	GAGTAGAGGG	AGTATGACAG	GTGGCCCGC	ATAGGGGTA	1000
RMu2-N1c	951	GGAAAAGAGA	GAGGTGAAAG	AGTATGACAG	GTEGGCCCGC	CTAAGGGETA	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
RMu2-A1c	1001	TTTTGGTCCG	GGAAAAGTT	ATATTTGASA	AAAAACATTT	CTATTTAGCT	1050
RMu2-N1c	1001	TTTTGGTCTA	GBCAAAAT	AAAATTTAGC	AAAAACATTT	ATATTTACCA	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
RMu2-A1c	1051	AAAAAACCAG	AAATAGCATT	TTCGTGAACA	CCT-TCAGTT	TAGAAATAGCA	1100
RMu2-N1c	1051	AAAAAATAAA	AAATGGCATT	TTCGTGAACA	CCTCTCAGTT	TAGGATGTCA	1100
		1110	1120	1130	1140	1150	
RMu2-A1c	1101	TTTTAAAGAA	TCACTTTGA	GGATAGCAT	TCCAGCGAAA	CCACTCTTTT	1150
RMu2-N1c	1101	TTATAGTAAA	TCAGTTTGA	GTGATGATAT	TCCAGCGAAA	CCACT-TTTT	1150
		1160	1170	1180	1190	1200	
RMu2-A1c	1151	ACGATAATAT	AATCCCAATT	TTCCTC.....	1200
RMu2-N1c	1151	GCHATGGTAT	AATCCCAATT	TTCCTA.....	1200

Fig 32. Sequence comparison between *RMu2-A1c* and *RMu2-N1c*.

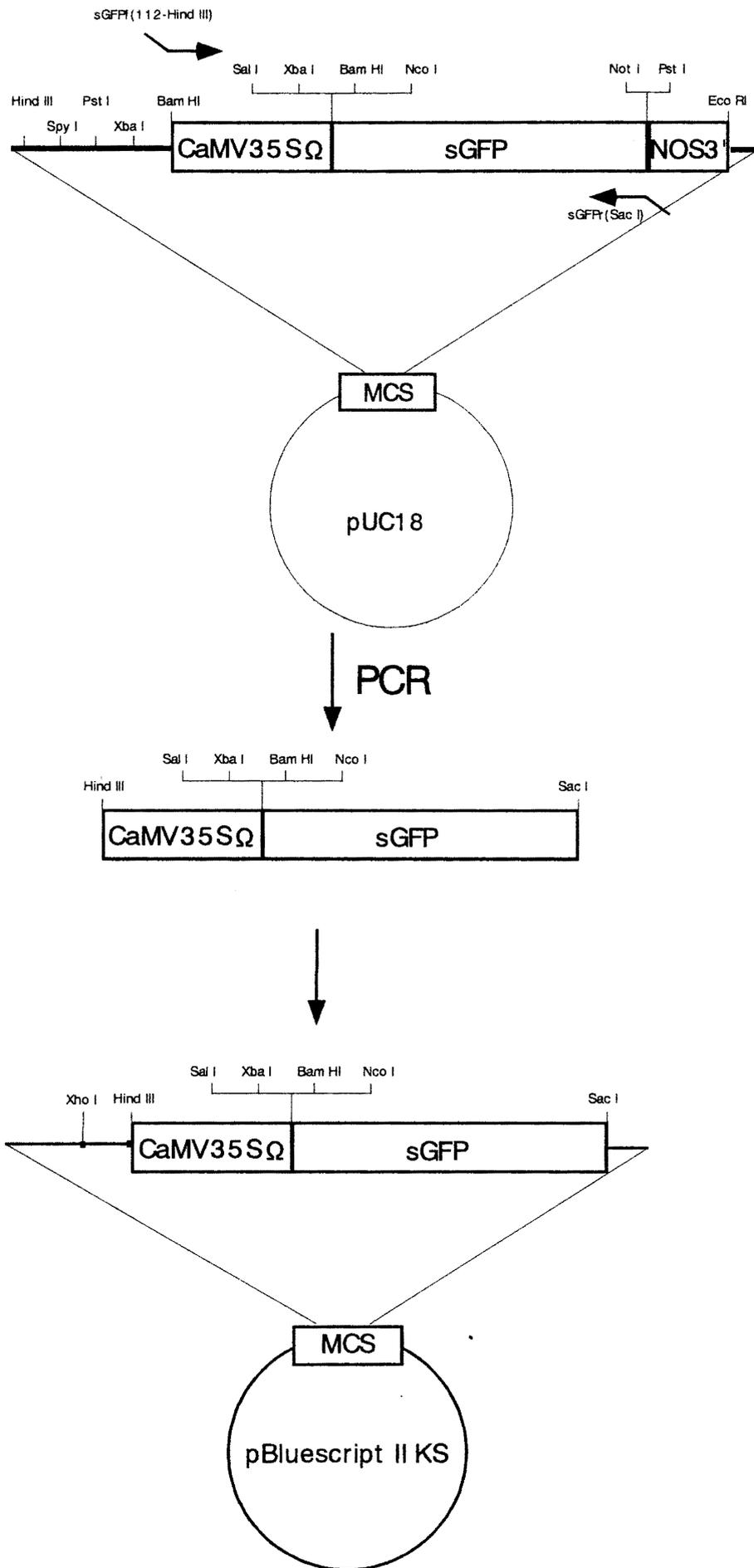


Fig 33. Modification of restriction sites in a sGFP vector.

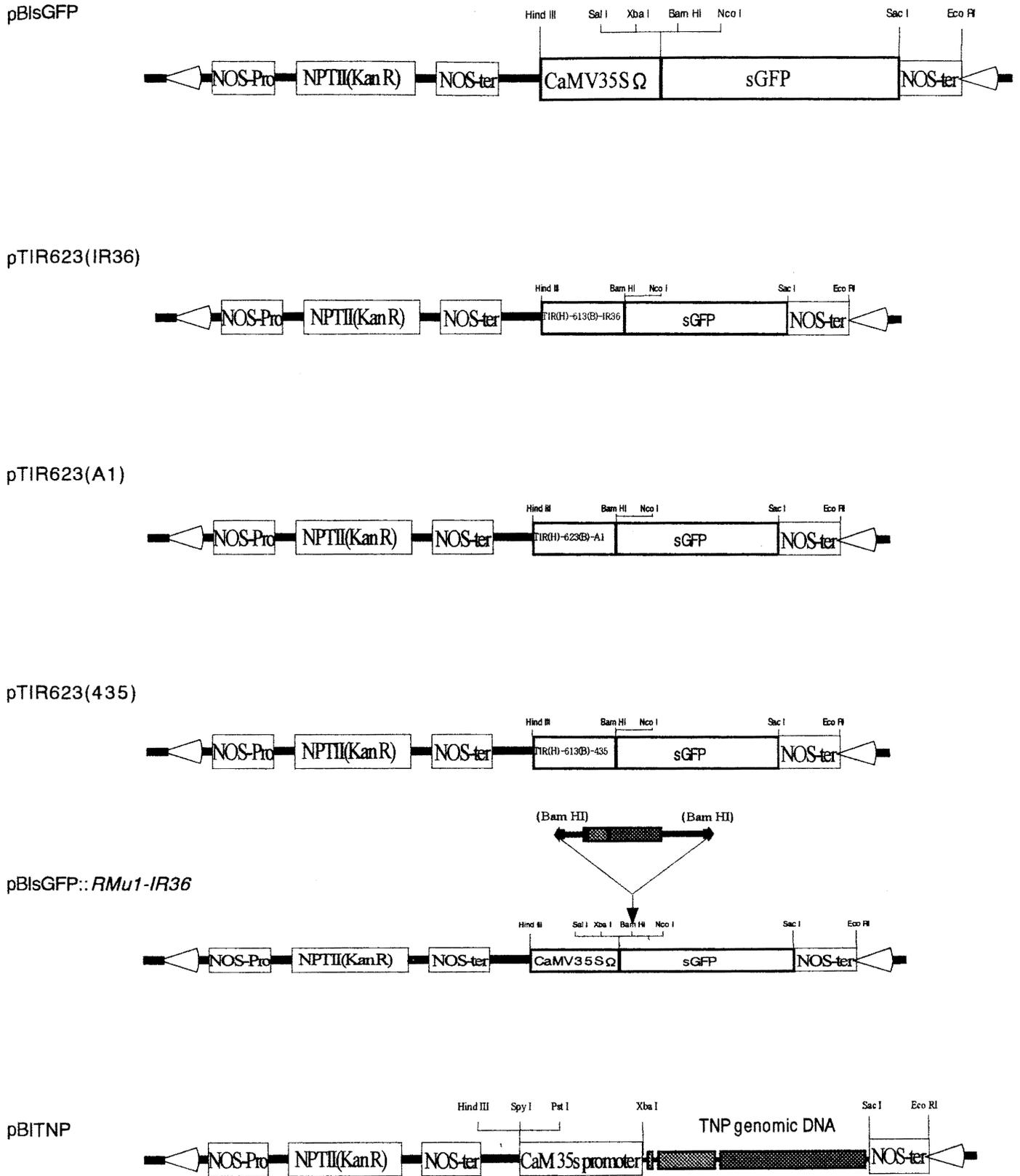


Fig 34. Series of constructed vectors.

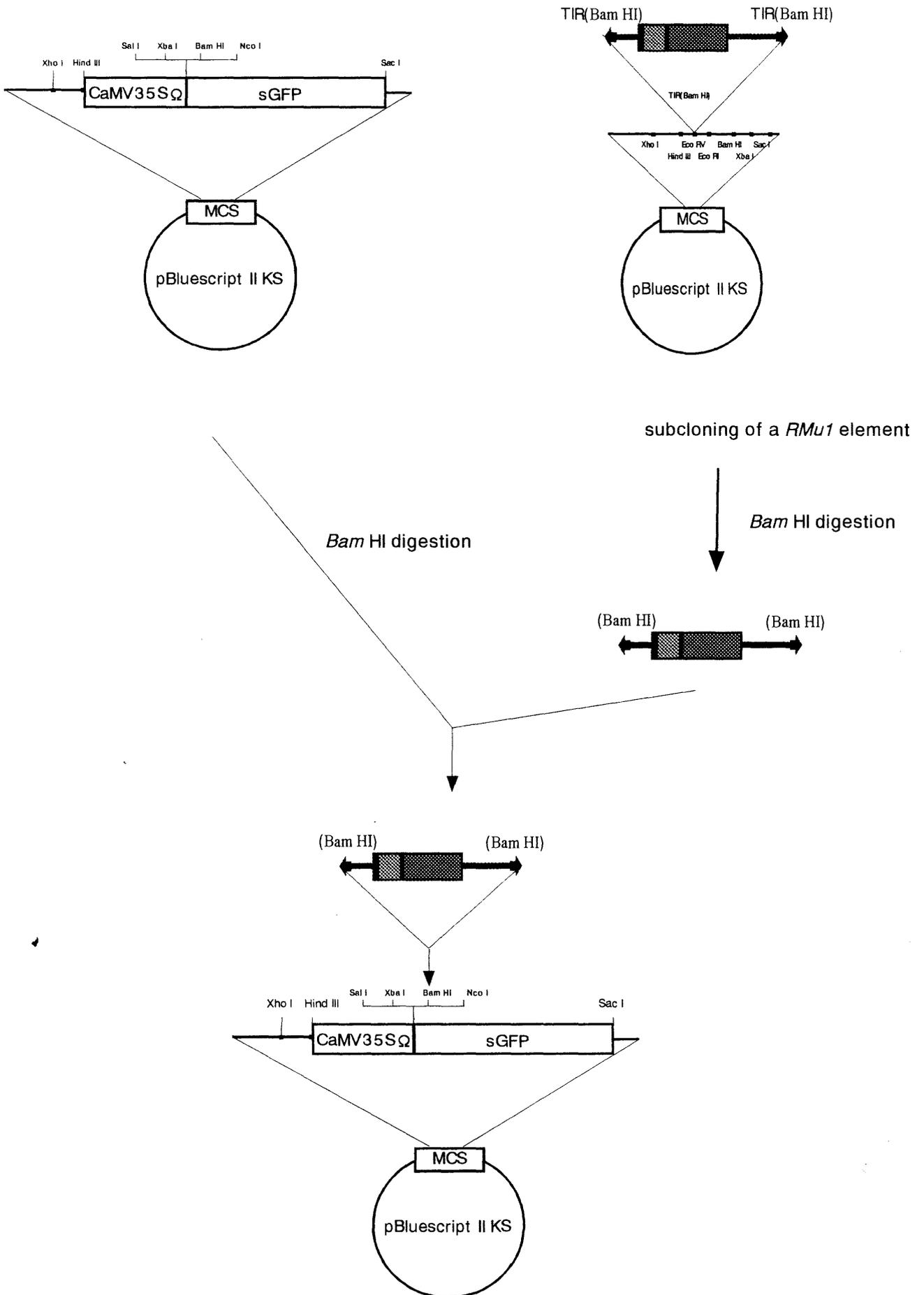


Fig 35. Construction of an *RMu1* inserted vector.

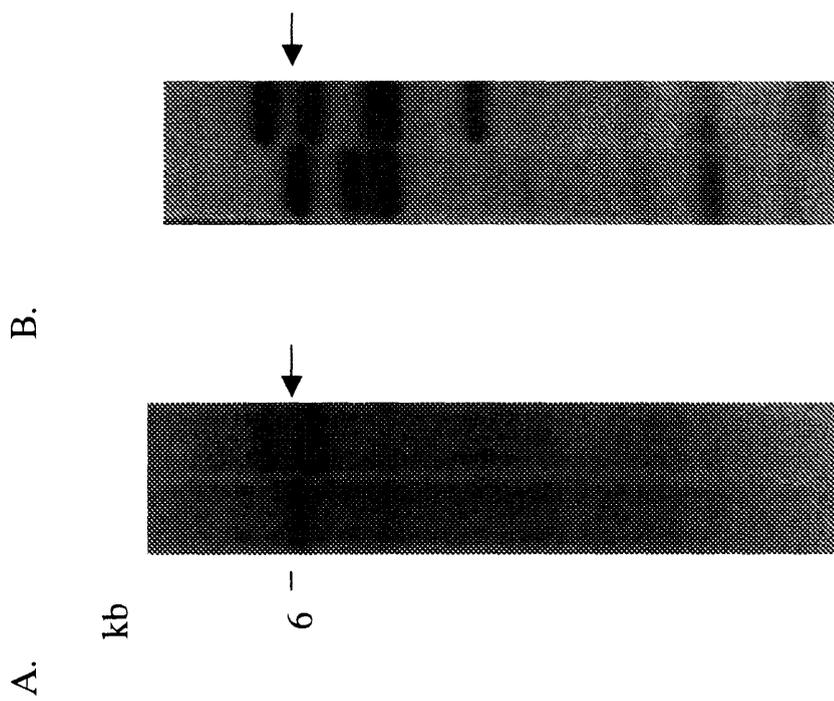


Fig 36. DNA gel blot of *Dra*I digested genomic DNAs. Genomic DNAs of IR36 (lane 1) and A1 (lane 2) were digested and hybridized to left TIR probe(panel A, TIR-r1) and right TIR probe(panel B, F5-TIR).

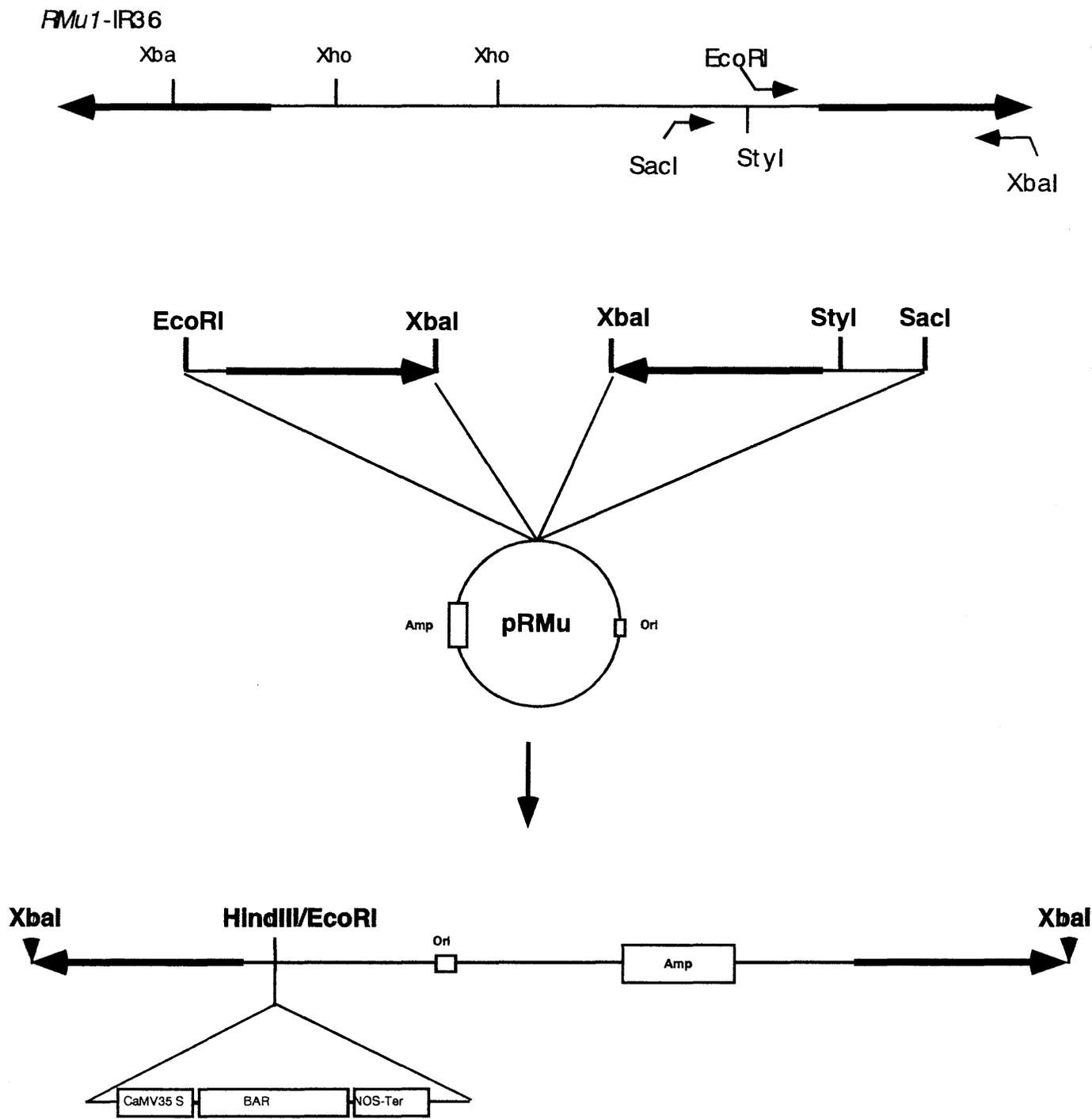


Fig 37. Construction of RescuerRMu vector.

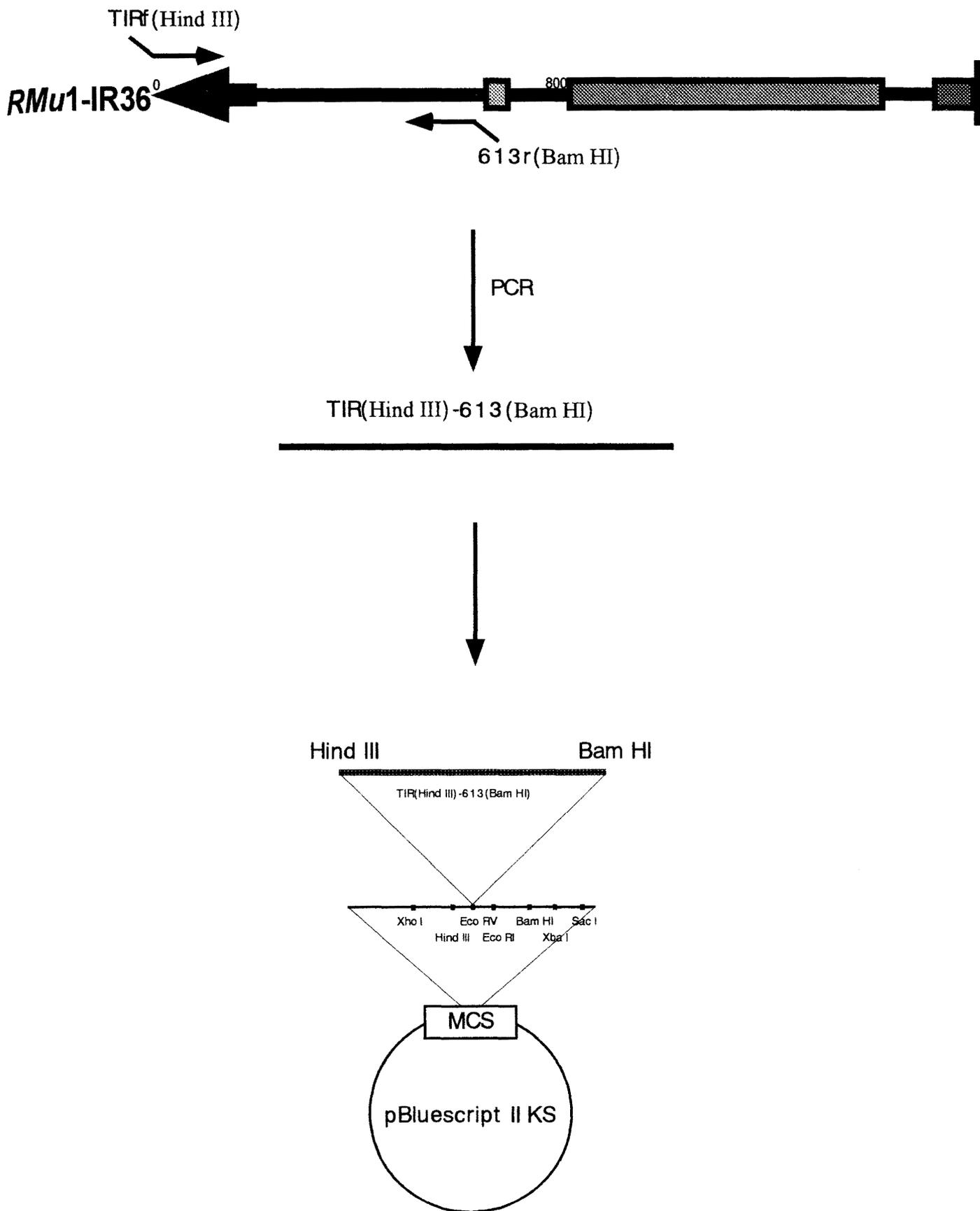


Fig38. Cloning of upstream region of a *rmuA* gene in *RMu1-IR36*.



Fig 39. Ligation of anupstream region to sGFP vector.

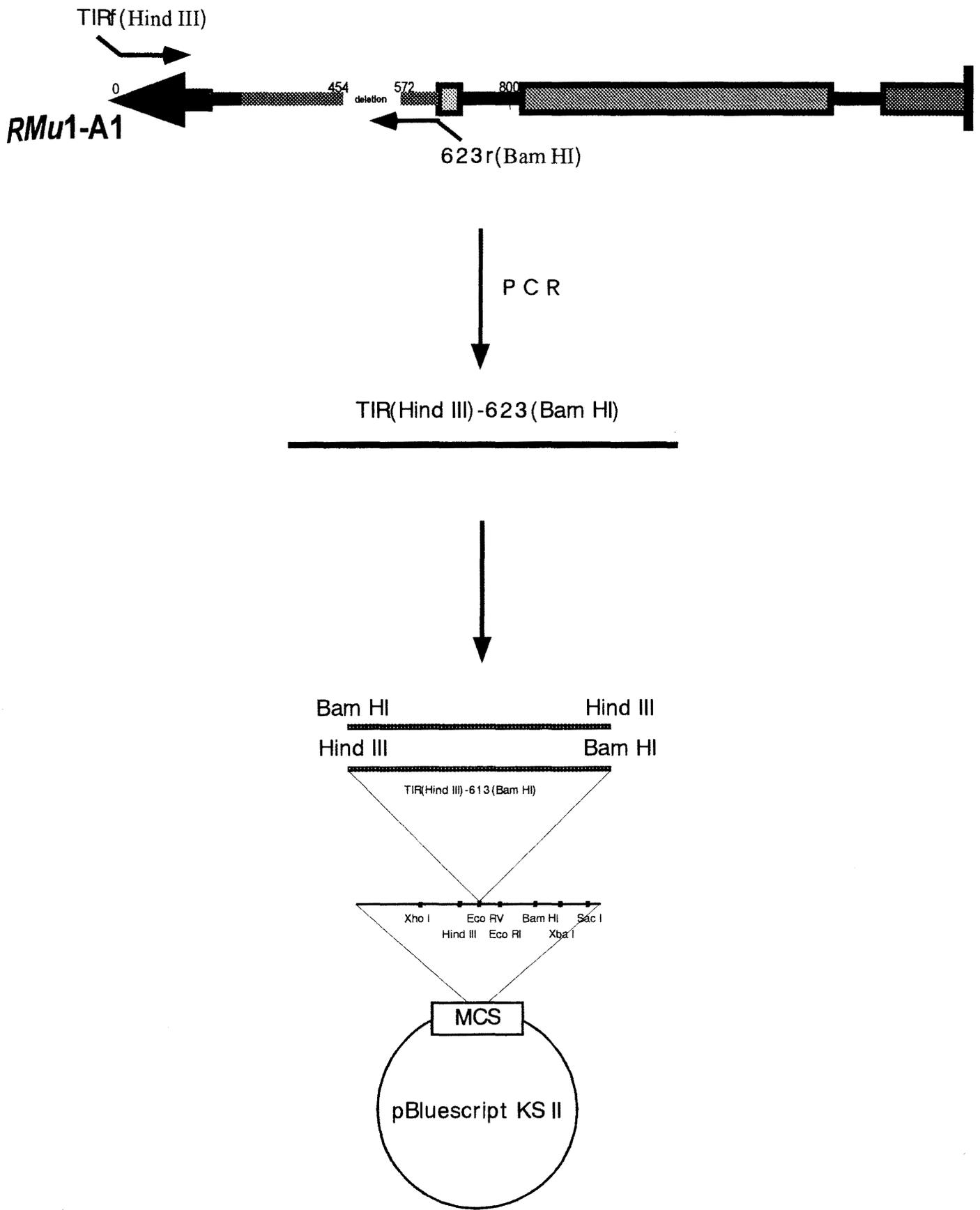


Fig40. Cloning of upstream region of a *rmuA* gene in *RMu1-A1*.

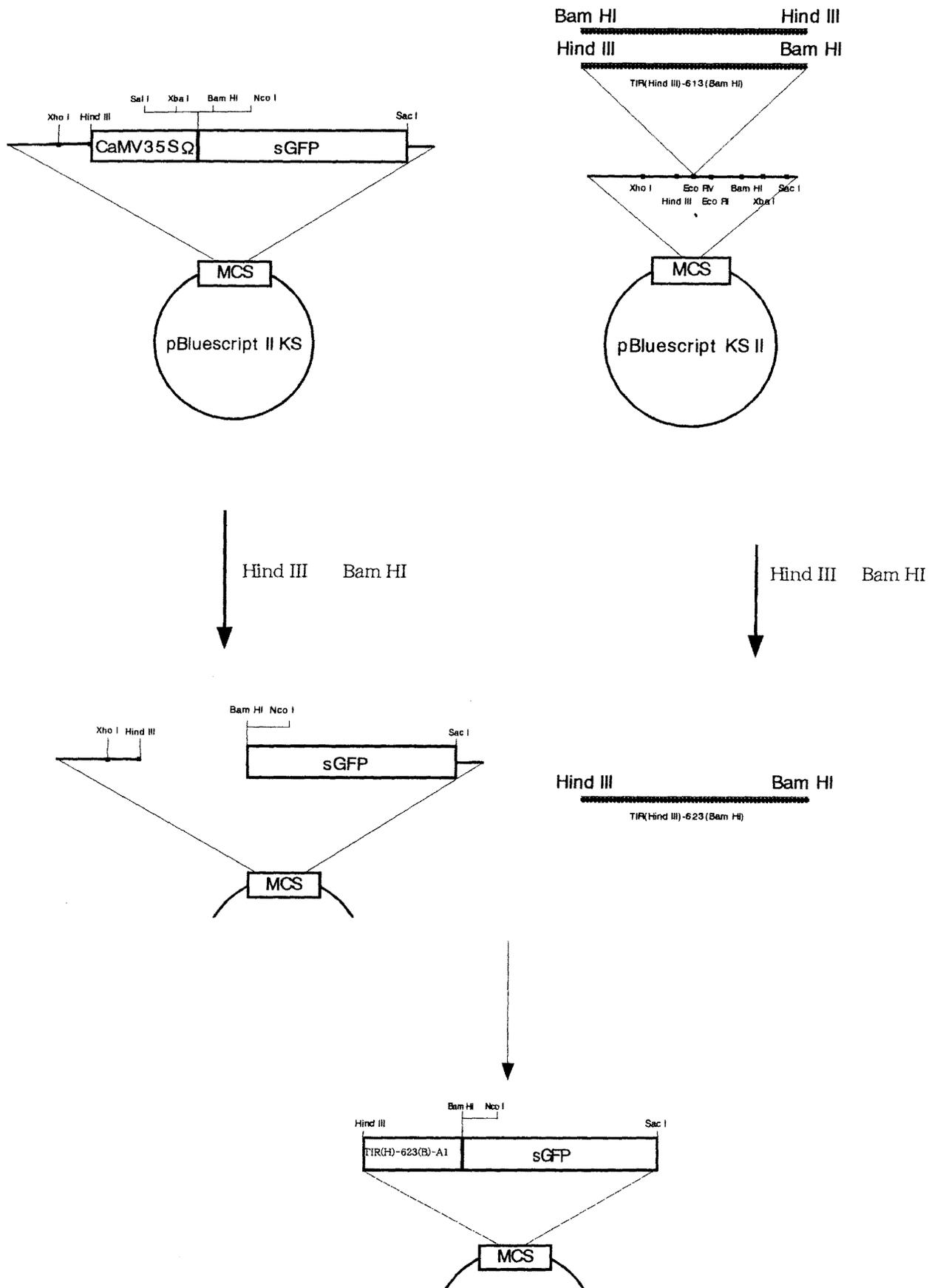


Fig 41. Ligation of anupstream region to sGFP vector.

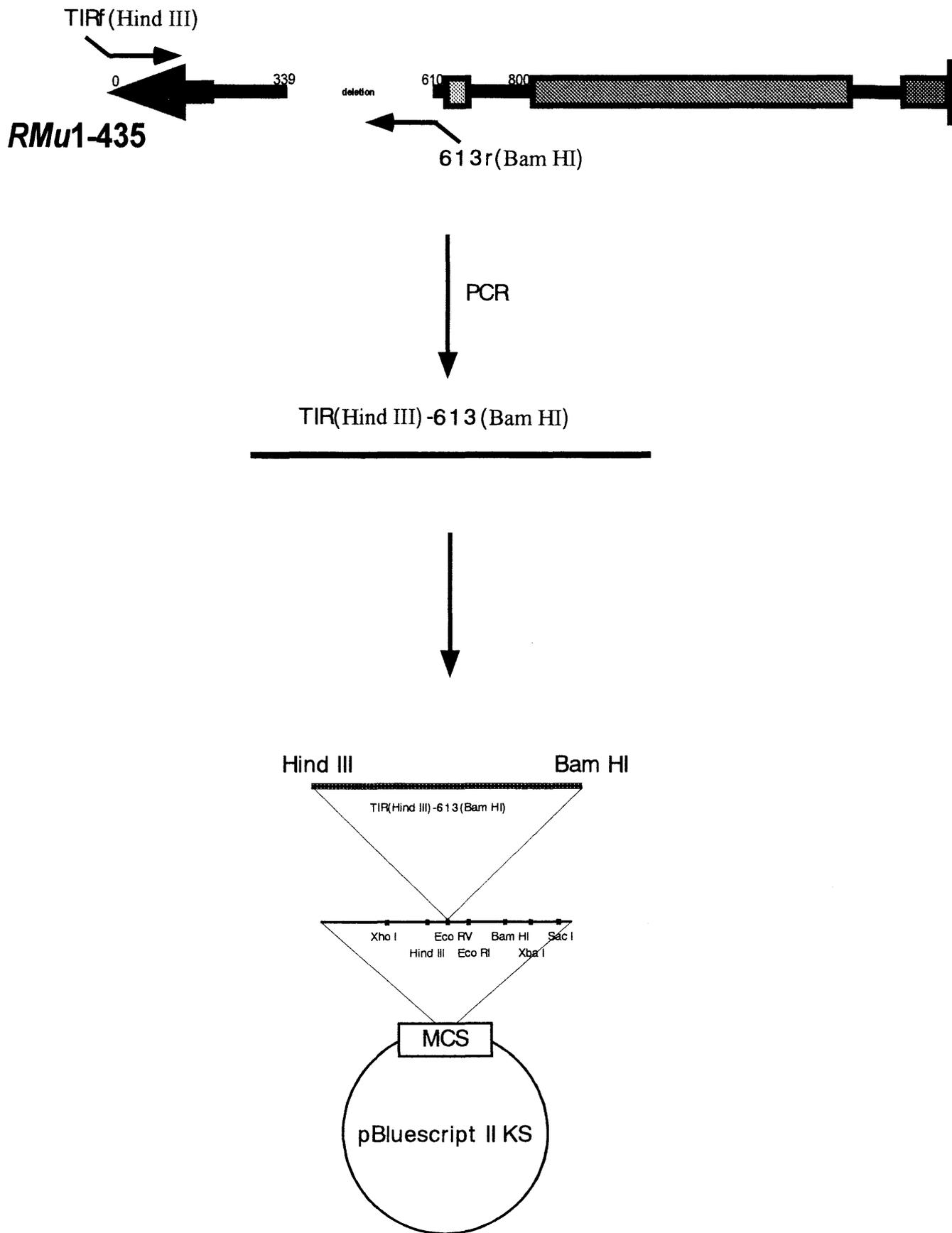


Fig 42. Cloning of upstream region of a *rmuA* gene in *RMu1-435*.

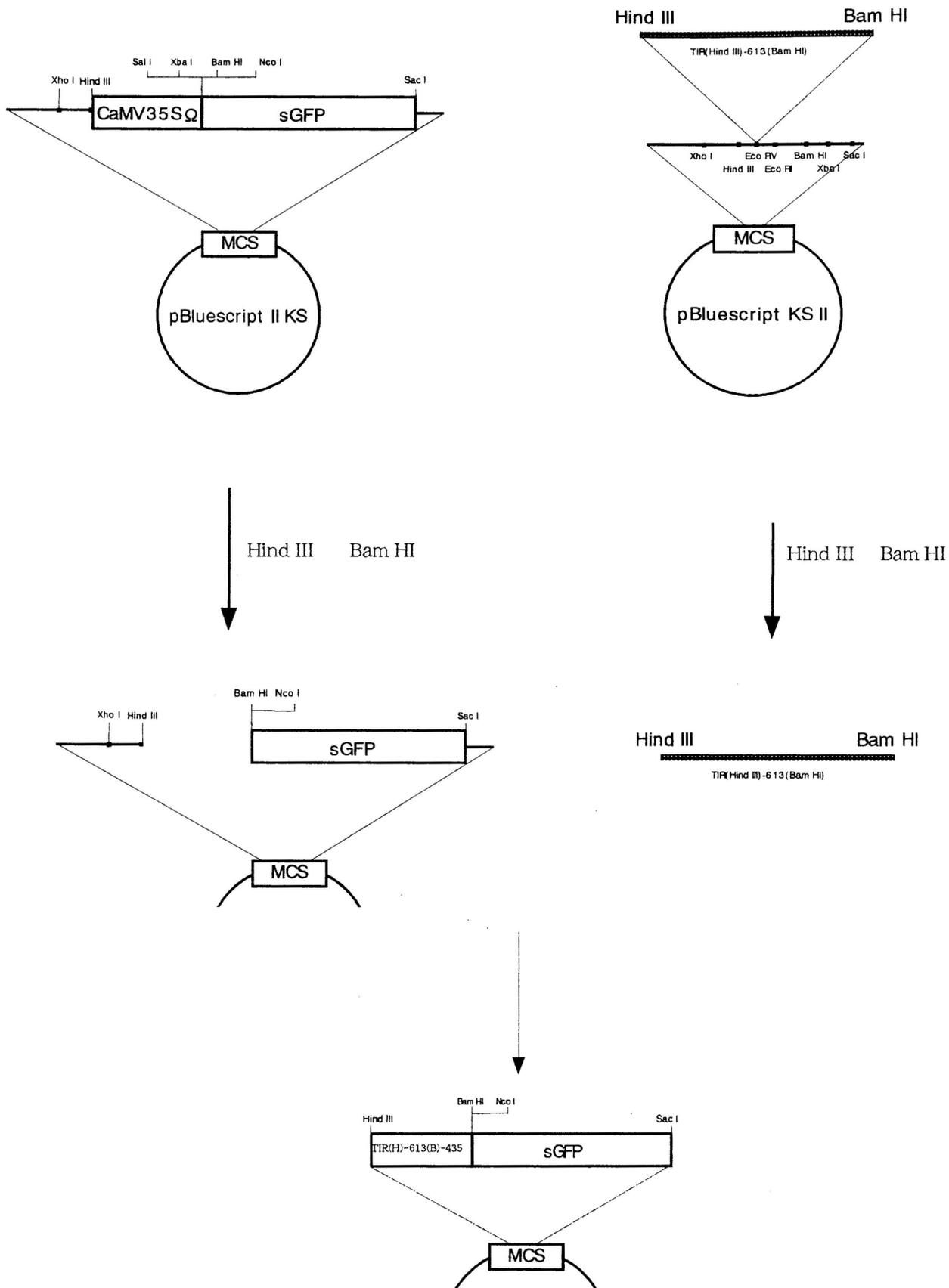


Fig 43. Ligation of anupstream region to sGFP vector.

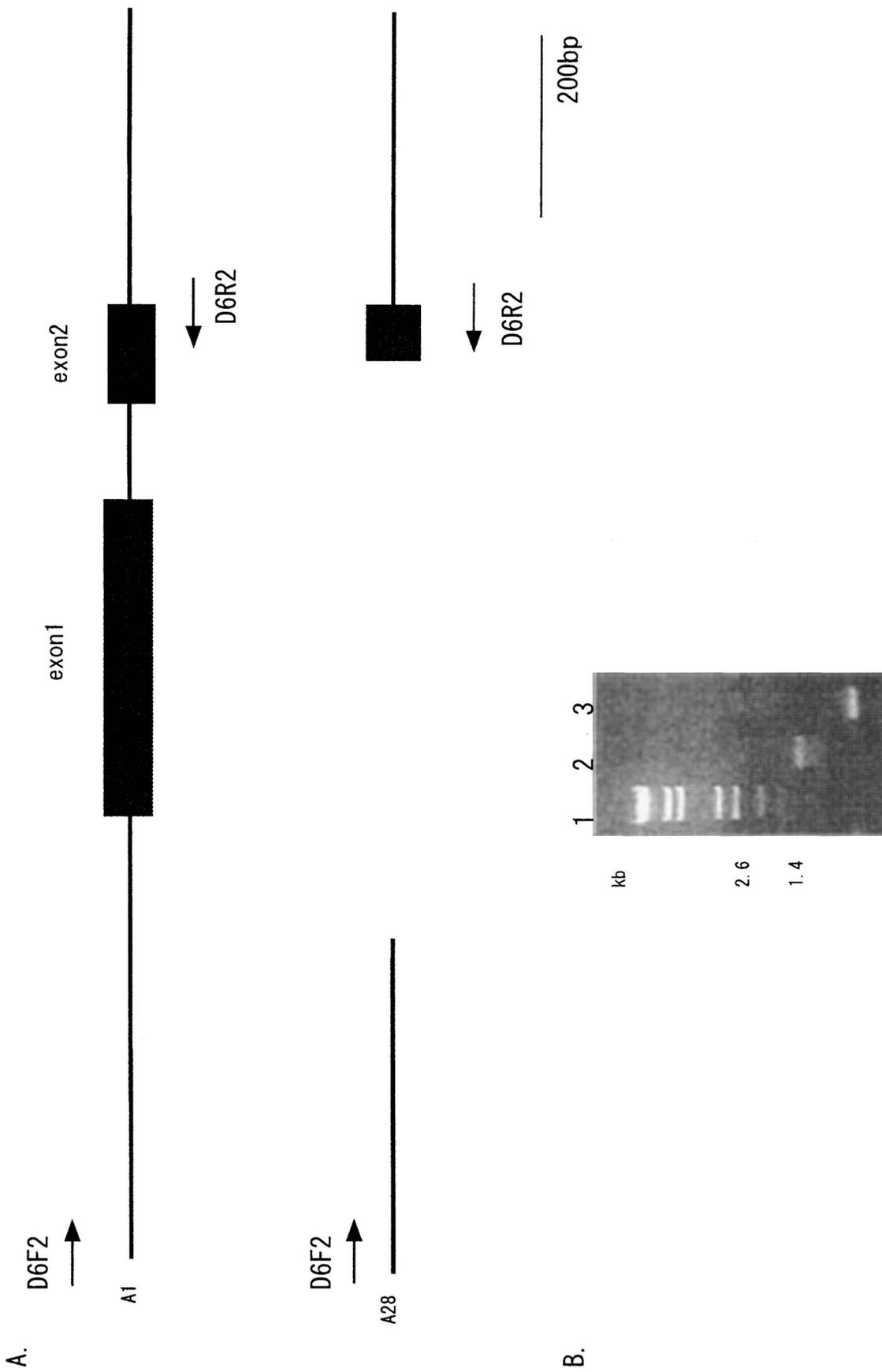


Fig 44. A deletion found in d6 allele in A28 strain. D6F2 and D6R2 primers amplified polymorphic region (panel A). The PCR product revealed the difference of the fragment size (Panel B). Lane 1; size marker, lambda *StyI* digests, lane 2; A1, lane 3; A28.



		10	20	30	40	50	
A1-F2R2	1	GGTCAATACA	CACGCCAACT	ATATAGTTTA	GCTGCAAAC	TCAGTCTTTT	50
A28-F2R2	1	GGTCAATACA	CACGCCAACT	ATATAGTTTA	GCTGCAAAC	TCAGTCTTTT	50
		60	70	80	90	100	
A1-F2R2	51	TCCATCACAT	CAACCTGTCA	TACACACACA	ACTTTTCAGT	CGCATCATCT	100
A28-F2R2	51	TCCATCACAT	CAACCTGTCA	TACACACACA	ACTTTTCAGT	CGCATCATCT	100
		110	120	130	140	150	
A1-F2R2	101	CCAATTTTAA	GCAAAATTTA	AACTTTGGAT	CCAACATAAA	ACAGGCTTAG	150
A28-F2R2	101	CCAATTTTAA	GCAAAATTTA	AACTTTGGAT	CCAACATAAA	ACAGGCTTAG	150
		160	170	180	190	200	
A1-F2R2	151	TAGCTGGGAT	GAGCAGTTAT	CAGATTTGCA	AGCTGGGAGT	AATTAAGTAG	200
A28-F2R2	151	TAGCTGGGAT	GAGCAGTTAT	CAGATTTGCA	AGCTGGGAGT	AATTAAGTAG	200
		210	220	230	240	250	
A1-F2R2	201	AGTACGGTGA	CACAGTAGAA	GTAGGGTATG	ATCCATATGA	TATTCCTCC	250
A28-F2R2	201	AGTACGGTGA	CACAGTAGAA	GTAGGGTATG	ATCCATATGA	TATTCCTCC	250
		260	270	280	290	300	
A1-F2R2	251	CTCCCTGCCC	AGCTTGCAAA	TCTCTCTCT	TCTCGTCTCG	TCCTTGGCTG	300
A28-F2R2	251	CTCCCTGCCC	AGCTTGCAAA	TCTCTCTCT	TCTCGTCTCG	TCCTTGGCTG	300
		310	320	330	340	350	
A1-F2R2	301	TGATTTGACG	CGAGAAAAG	GATAGCCACC	CGCCATGGCC	CACACGCTCG	350
A28-F2R2	301	TGATTTGACG	CGAGAAAAG	GATAGCCACC	CGCCATGGCC	CACACGCTCG	350
		360	370	380	390	400	
A1-F2R2	351	CGCACATACG	CTACACCTCC	CCCTCGCCG	AGTATACACC	TCCACCTTTC	400
A28-F2R2	351	CGCACATACG	CTACACCTCC	CCCTCGCCG	-----	-----	400
		410	420	430	440	450	
A1-F2R2	401	CCTTCCATTA	ATACCTNCAC	CCCCCACTCC	TCTCCCCCAT	CTCCCCCTCC	450
A28-F2R2	401	-----	-----	-----	-----	-----	450
		460	470	480	490	500	
A1-F2R2	451	TCTCGCCATT	GGAGCTAGAC	AGCTCGAGCT	CAGGAGGAAG	AAGAGAGAGA	500
A28-F2R2	451	-----	-----	-----	-----	-----	500
		510	520	530	540	550	
A1-F2R2	501	GCTAGCTGCT	AGGGTTTCCA	TCGGATTTGG	TTTTTTATTT	TCTTTTTGT	550
A28-F2R2	501	-----	-----	-----	-----	-----	550
		560	570	580	590	600	
A1-F2R2	551	TCTTGTGTGT	GTTTTGATGG	ATCAGAGCTT	TGGGAATCTT	GGAGGAGGAG	600
A28-F2R2	551	-----	-----	-----	-----	-----	600
		610	620	630	640	650	
A1-F2R2	601	GAGGAGCAGG	GGGGAGCGGC	AAGGGCGCGG	CGTCGTCGTT	CCTGCGCTGC	650
A28-F2R2	601	-----	-----	-----	-----	-----	650
		660	670	680	690	700	
A1-F2R2	651	CGCTGTCCAC	GCGGCGGCGG	CCACCGCGTA	CTACGGCACG	CCGCTCGCCT	700
A28-F2R2	651	-----	-----	-----	-----	-----	700
		710	720	730	740	750	
A1-F2R2	701	TGCACCAGGC	GGCGGCCGCG	GCTGGCCCGT	CGCAGTACCA	CGGTACCGGT	750
A28-F2R2	701	-----	-----	-----	-----	-----	750
		760	770	780	790	800	
A1-F2R2	751	CACCCCAACC	ACGGCGGCGG	CCACCACCAC	AGCAAGCACG	CGGCGCCGGT	800
A28-F2R2	751	-----	-----	-----	-----	-----	800
		810	820	830	840	850	
A1-F2R2	801	GGTGGGGAGA	TCTCGGCGGC	GGAGGCCGAG	TCCATCAAGG	CCAAGATCAT	850
A28-F2R2	801	-----	-----	-----	-----	-----	850
		860	870	880	890	900	
A1-F2R2	851	GGCGCACCCC	CAGTACTCCG	CCCTCCTCGC	AGCCTACCTC	GA CTGCCAGA	900
A28-F2R2	851	-----	-----	-----	-----	-----	900
		910	920	930	940	950	
A1-F2R2	901	AAGTATATAC	GCTCGATTAA	TTCTTCTCCG	ATTTTGTGTA	ACAAAATACT	950
A28-F2R2	901	-----	-----	-----	-----	-----	950
		960	970	980	990	1000	
A1-F2R2	951	CCGTAGTAAT	TATCTATCGA	TCATATATAT	CACTGCAATT	TTGATCCATC	1000
A28-F2R2	951	-----	-----	-----	-----	-----	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
A1-F2R2	1001	CATCCATCCA	GGTCGGAGCG	CCGCCGAGGT	GCTGGAGAGC	TGACGCCACG	1050
A28-F2R2	1001	-----	-----	-----	-----	-----	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
A1-F2R2	1051	GCGCAAGCT	GACGCGCGCC	TCCGCGCCGC	CACGAGCCGC	GCGAGCCCGA	1100
A28-F2R2	1051	GCGCAAGCT	GACGCGCGCC	TCCGCGCCGC	CACGAGCCGC	GCGAGCCCGA	1100
		1110	1120	1130	1140	1150	
A1-F2R2	1101	GCTCGACCAAG	TTC	1150
A28-F2R2	1101	GCTCGACCAAG	TTC	1150

Fig 45. A deletion occurred in *d6* allele in A28 strain.