

## 1pE10

2種の大豆リボキシゲナーゼの器官特異的な遺伝子発現

加藤 友彦、柴田 大輔 (三井植物バイオ研)

リボキシゲナーゼは広く動物植物界に存在していることが知られている。植物リボキシゲナーゼの生理的役割は不明な点が多いが、最近、耐病性機構との関連やシグナル伝達との関連が示唆されている。われわれはイネの発芽期に出現するリボキシゲナーゼL-2の遺伝子構造を決定しており<sup>1)2)</sup>、同時に大豆発芽期に発現するリボキシゲナーゼ遺伝子の構造も解析している。発芽した大豆からは3種のcDNAを単離しており、そのうちの1つであるSC514遺伝子の構造を決定した<sup>3)</sup>。また、子葉でのタンパク質レベルでの変化についても調べ、5種のリボキシゲナーゼの出現についても報告した<sup>4)</sup>。今回はさらに1つのリボキシゲナーゼを単離精製してその性質と部分的なアミノ酸配列を決定した。これは5種のリボキシゲナーゼ間では最も発現量が多く、そのアミノ酸配列は既に明かとされているリボキシゲナーゼL-1、L-2、L-3とは異なり、またSC514遺伝子から推定されるアミノ酸配列とも異なっており、新たな遺伝子発現によるものであることが判明した。これは現在、解析を進めているSC501遺伝子から推定されるアミノ酸配列と完全に一致していた。SC514、SC501遺伝子に対応するcDNAをもちいたノーザン分析を行ない両者の各器官での発現様式を調べ、さらにプロモーター領域の解析も進めているので報告する。

1) 太田ら、(1990)第13回日本分子生物学会年会講演要旨集 p.238.

2) Shirano & Shibata (1990) FEBS Letters 271, 128-130.

3) Shibata et al. (1990) Plant Molecular Biology in press

4) 加藤、太田、田中、柴田 (1990)第63回日本生化学大会講演要旨集 p.776.

## 1pE11

トマト花粉特異的プロモーターのタバコ・ナタネでの発現解析

今村順・酒井隆子・村瀬誠 (植工研)

幾つかの植物で花粉あるいは葯組織特異的に発現する遺伝子が知られている。これらの遺伝子の発現が異種の植物でどのように時間的・空間的に制御されているかを解析する目的で、トマトの花粉特異的に発現する遺伝子(LAT52)の5'上流領域600bp(tom2')をPCR法で単離し、それにレポーター遺伝子としてGUS遺伝子をつなぎ、融合遺伝子(tom2'-GUS)をタバコとナタネに導入した。得られた形質転換植物におけるGUS遺伝子の時期および組織特異的発現を調べた。

### 結果と考察

1、tom2'-GUS融合遺伝子はタバコ・ナタネとも花粉でのみ強く発現した。葯組織・花糸・萼・花卉・雌ずいでは発現は認められなかった。2、ナタネでは花粉体細胞分裂期からGUS活性が認められ、成熟花粉に至るまでその活性は増加し、開花時に最も強いGUS活性が認められた。これらの結果は、トマトにおけるLAT52遺伝子の発現と基本的に同じであり、タバコ・ナタネでトマトの遺伝子LAT52が種をこえて同じ機構で発現を制御されている可能性を示唆している。

## 1pE12

ナビン、クルシフェリンプロモーターのタバコでの発現解析

河野淳子, 今村順, 市川裕章<sup>1</sup> (植工研,<sup>1</sup>農環研)

種子貯蔵タンパク質は、その合成の時期、場所が厳密に制御されることが知られている。ナタネの種子貯蔵タンパク質であるナビン、クルシフェリンも種子登熟中期に胚でのみ合成され、最終的に種子タンパク質の80%を占める。

我々は、種子特異的、時期特異的に発現するプロモーターに有用遺伝子をつなぎ、種子で発現させることによりナタネ種子を改良することを目的として、ナビンクルシフェリンのプロモーターを単離した。単離にはPCR法を用い、ナビン 1.1 kb、クルシフェリン 0.7kbのプロモーターを得た。

これらのプロモーターの発現制御を明らかにするために、下流にレポーター遺伝子としてGUS遺伝子をつなぎ、リーフディスク法でタバコに導入して、得られた形質転換植物のGUS活性を調べた。

その結果、両プロモーターともGUSタンパク質は、受粉後20日目、すなわち胚乳が充実する時期に胚と胚乳で活発に合成された。また、組織特異性を調べたところ、種子の他に花粉でも強い発現がみられた。

よって、PCR法で得られたナタネの種子タンパク質のプロモーターは、胚に関する限り、タバコにおいてもナタネと同様に発現すると考えられた。現在これらのプロモーター領域の詳細な解析をタバコを用いて行っている。

## 1pE13

分裂酵母の接合フェロモンによる情報伝達：受容体遺伝子の構造と発現調節

中村友浩<sup>1</sup>、北村憲司、下田親 (大阪市大・理・生物、<sup>1</sup>大阪工大・一般教育)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の一倍体細胞は、培地中の窒素源の枯渇により異なる接合型 ( $h^+$ 型と  $h^-$ 型) の細胞間で接合し二倍体化する。最近、*S. pombe* の  $h^+$ 型および  $h^-$ 型細胞から各々P因子、M因子と呼ばれる接合フェロモンが分泌され、相手接合型の細胞を刺激し、接合管様の突起を形成させることが報告された。昨年の本大会で演者らは、 $h^-$ 型細胞の接合に必須の *mam2* 遺伝子がP因子の受容体タンパクをコードしている可能性を示した。

遺伝子操作により *mam2* 欠失変異株を作成し、その性質を調べた。この欠失変異を持つ細胞は正常に栄養増殖したが、P因子フェロモンに対する反応性を欠き、接合能がなくなっていた。このことは、*mam2* 遺伝子がP因子レセプターをコードしているという推定と一致する。P因子の生産とM因子に対するレセプターの形成の両方が欠損した *map1* 突然変異をホモに持つ二倍体は減数分裂できないが、正常な  $h^+$ 型細胞と共存させP因子を供給すると、減数分裂が誘導されることがわかっている。しかし、*map1* と *mam2* の二重変異をホモに持つ二倍体では  $h^+$ 型細胞を共存させても減数分裂は起こらなかった。したがって、減数分裂の誘導には、少なくとも一方の接合フェロモンのシグナル伝達系が機能することが必要であると考えられる。次に *mam2* 遺伝子の転写調節をノザン法により調べ、 $h^-$ 型一倍体株では、窒素飢餓培地に移して2時間以内に転写産物が検出されることを明らかにした。一方、 $h^+$ 型の一倍体や  $h^+/h^+$ の二倍体では窒素飢餓条件でも、*mam2* の転写は起こらなかった。したがって、*mam2* 遺伝子の転写は  $h^+$ 型の接合型遺伝子 *mat1-P* の機能を必要とする。また、 $h^+/h^-$ 型の接合型遺伝子に関するヘテロ二倍体では、 $h^-/h^-$ 型のホモ二倍体に比べ、*mam2* 転写産物のレベルが数倍高かった。この結果は接合フェロモンが二倍体細胞における減数分裂にも必要であるという事実と考え合わせて興味深い。

## 1pE14

栄養増殖から有性生殖への切り替えを支配する分裂酵母の制御遺伝子  
stel3

前川裕美、中川明子、北村憲司、下田親（大阪市大・理・生物）

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の一倍体細胞を窒素欠乏培地で培養すると異なる接合型（h<sup>+</sup>型とh<sup>-</sup>型）の細胞間で接合し二倍体化した後、減数分裂に入る。ところが一方の接合型の細胞のみを培養すると、G<sub>1</sub>期停止の後、休止期（G<sub>0</sub>期）に入る。休止期の細胞は高い生存率を長期に維持し、熱ショック等のストレスにも耐性となる。演者らは新たに多数の *S. pombe* の接合不能変異体（ste突然変異体）を単離し遺伝解析した結果、stel2、stel3の2個の新しい遺伝子を同定した。これらの変異体は接合能および減数分裂能を欠くことに加え、栄養飢餓に高い感受性を示し、熱ショックにも感受性であった。こうした表現型はこれらの変異体が窒素源飢餓条件で、G<sub>0</sub>期への移行や休止状態の維持に欠損を持つことを強く示唆している。

この新しい ste 遺伝子の機能と発現制御を解明するため遺伝子クローニングを試み、stel3 遺伝子を *S. pombe* のゲノムライブラリーより単離した。塩基配列から決定された stel3 のORFを含む1.7kbのHindIII断片をプローブとしてゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った結果、stel3 がシングルコピーの遺伝子であることがわかった。

次に、同じプローブを用いてノザン分析を行なった。stel3 の mRNA は約1.6kbのサイズを持っていた。転写産物のレベルは窒素飢餓条件で培養することにより上昇する傾向がみられた。stel3 変異をホモに持つ二倍体は減数分裂を開始できない。そこで、stel3変異株での減数分裂の開始に必須である mat1-Pi 遺伝子と、mei2 遺伝子の転写を調べた。その結果、両遺伝子の転写が強く抑制されていることが示された。以上の結果から、stel3 遺伝子は stel2 遺伝子と共に培地の栄養源の欠乏を検知し、特異的な遺伝子の発現を調節することにより、休止期移行と有性生殖の開始を制御しているものと考えられる。

## 1pE15

分裂酵母の接合型遺伝子の転写調節：pat1 タンパクキナーゼによる調節

永井勉、青野利哉、下田親（大阪市大・理・生物）

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の二倍体細胞では窒素源飢餓により減数分裂が誘導される。演者らは窒素飢餓シグナルにより最も早く転写が誘導される減数分裂関連遺伝子のひとつである h<sup>+</sup>接合型遺伝子 (mat1-Pi) の転写誘導の遺伝的制御機構について、主として mat1-Pi と大腸菌 lacZ の融合遺伝子を用いて解析した。

まず、一連の5'上流領域の欠失変異を作成し、遺伝子発現に及ぼす効果を調べた。その結果、転写開始点の上流-74から-45のわずかに30ヌクレオチドの配列が窒素飢餓による発現に必須でかつ十分であることを見出し、この配列を matP-UAS (upstream activation site) と名付けた。matP-UAS を転写の方向に対して逆向きにつなぐと、基礎発現レベルが著しく高まり、窒素飢餓によりさらに活性が上昇することがわかった。matP-UAS 中にCTTTGTCCなる9ヌクレオチドの配列が2度同方向に繰り返していることが注目された。興味深いことに、このノナーに類似したモチーフは他の窒素飢餓に反応して転写誘導されるいくつかの *S. pombe* 遺伝子の発現制御領域にも見つかった。また、ゲルシフト実験により matP-UAS には少なくとも2種類のタンパク因子が結合する可能性が示された。最近、減数分裂の開始を抑制する pat1 タンパクキナーゼが mat1-Pi の転写を調節していることが報告された。そこで pat1 の温度感受性変異株に mat1-Pi/lacZ 融合遺伝子を導入し、培養温度 (pat1 キナーゼの活性) と遺伝子発現との関係を調べた。pat1 変異株を23°C (許容温度) から30°C (制限温度) に移し6-12時間培養すると融合遺伝子の発現は5-10倍上昇した。この発現誘導に必要な5'上流領域は窒素源飢餓に反応するためのシス配列 (matP-UAS) とほぼ一致し、matP-UAS を完全に欠失させると30°Cにおいても融合遺伝子はまったく発現しなかった。以上の実験結果から、pat1 遺伝子産物が matP-UAS に結合するトランス因子を介して (たとえばトランス因子のリン酸化など) mat1-Pi 遺伝子の転写を抑制するという機構が推定される。

# 1pE16

## 分裂酵母の減数第一分裂に関する *mei4* 遺伝子の構造と発現調節

西脇真哉・田中晃一・下田親 (大阪市大・理・生物)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では培地中の窒素源の枯渇と、接合型遺伝子座のヘテロサイゴンティという2つの条件が満たされたとき減数分裂が始まる。遺伝学的な解析から減数分裂の進行に必要な特異的遺伝子がいくつか同定されている。その中で、*mei4* 遺伝子は突然変異体の表現型から、減数第一分裂の前期で必須の機能を演じるものと推定されている。*mei4* 遺伝子産物の機能と、発現調節機構を明らかにすることを目的に遺伝子の単離と解析を行なった。

*mei4* 突然変異体を宿主とする形質転換により、ゲノムライブラリーより *mei4* 遺伝子を単離した。次に、*mei4* 遺伝子の全塩基配列を決定しアミノ酸配列を推定した。その結果、イントロンで分断されていない356アミノ酸からなるORFが認められ、*mei4* タンパクが分子量39kDaのセリンに富むタンパクをコードすることが推定された。しかし、既知タンパク質のデータベース中には、特に高いホモロジーを示すものはなかった。また、*mei4* タンパクの機能を推定できるような特徴的なドメインも見いだされなかった。

次にORFを含む *mei4* 特異的プロンプを用いてノザン分析を行なった。約2.1kbの *mei4* 遺伝子の mRNA は栄養細胞にはほとんど存在せず、窒素飢餓条件で培養することにより mRNA レベルが著しく増加した。*mei4* 遺伝子の転写の活性化はヘテロタリクな一倍体でも起こるので、接合型遺伝子座のヘテロサイゴンティは必要ないと結論した。*mei4* 欠損変異体では、*mei4* 遺伝子の転写が顕著に抑制された。*mei4/lacZ* 融合遺伝子による発現量の測定によっても、同様の傾向が観察された。これらの結果は *mei4* 遺伝子の発現にはその産物自身による正の自己調節機構が働いていることを示唆する。演者らは窒素飢餓による転写活性化のためのシス因子として CTTTGTT(C/T)(C/T) のノナマーモチーフを提唱したが、*mei4* 遺伝子の5' 上流領域にも9個中8個が一致するモチーフが6個所で見つかった。

# 1pF01

## 細胞周期に於ける植物細胞骨格の転換点

馳澤盛一郎・長田敏行<sup>1</sup>(成城短大・教養,<sup>1</sup>東大・理・植物)

細胞周期に於ける微小管の配向の動態変化については、未だ不明確な点が多い。我々は、アフイディコリン処理により高度に同調したタバコBY-2株の細胞を用いて、細胞周期各期( $G_1 \cdot S \cdot G_2 \cdot M$ )で各期に特徴的な微小管の配向が存在することを既に報告した(日本植物学会90年度年会)。今回は各期の境界に於ける微小管の配向の転換点を間接蛍光抗体法により観察したところ、 $G_2/M$ ,  $M/G_1$ ,  $G_1/S$ の転換点で特徴的な変化が観察された。 $G_2/M$ では、前期前微小管束の崩壊に伴って、2つの極の微小管形成中心から紡錘体が形成された。 $M/G_1$ では、崩壊しつつある隔膜形成体と核膜を起点とする微小管が観察され、両者の同時存在も有り得ることが確認された。 $M/G_1$ の転換点については微小管阻害剤であるプロピザマイドを用いた2段階同調法を用いて、さらに詳細な検討を行った。これらにより、核由来の微小管が $G_1$ 期初期の表層微小管の起源であるとの説を示唆する結果を得た。 $G_1/S$ では、S期でのDNA合成に先んじて核が細胞の中央に移動し、これに伴い核を中心とする微小管のネットワークが形成された。これらの結果より、各転換点に於ける微小管の配向の動態変化が明確になり、以前報告した細胞周期各期の微小管の配向と併せ見ると、植物の細胞周期全体を通した微小管の動態が明らかになった。この実験系は細胞を大量に扱えることから、今回の知見についての生化学的解析も可能と思われる。

## 1pF02

ヒザオリ (Mougeotia) の細胞質におけるアクチン繊維の分布

峰雪芳直, 永井玲子<sup>1</sup> (広島大・理・植物, <sup>1</sup>大阪大・教養・生物)

接合藻ヒザオリは、リボン状の一枚の大きな葉緑体を持ち、弱光下では葉緑体の面が光の入射方向に対して垂直な方向に(弱光位)、強光下では平行な方向に(強光位)定位する。この定位運動はサイトカラシンによって阻害されることと、電子顕微鏡で細胞質中にアクチン繊維が観察されることから、この定位運動にアクトミオシン系の蛋白質が関与していると予想されている。しかし、アクチン繊維が細胞質内をどの様に配向することによって葉緑体を動かすのか、その実態については不明である。そこで、本研究では白色光による強光位反応におけるアクチン繊維の変動を調べた。ノマルスキー顕微鏡による生細胞の観察の結果、強光照射開始後6~10分で、葉緑体長辺の運動を始めている部位から、細胞長軸に対して垂直方向に走る細い繊維構造が出現することがわかった。しかし、定位運動終期になると、この細い繊維構造はほとんど消失し、かわりに葉緑体長軸に垂直に配向する少数の太い繊維構造が観察できた。細い繊維構造が見られる時期に、細胞をアクチン架橋剤 *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide(MBS)で処理した後、FITCファロイジンで染色したところ、同様な配向を示す繊維構造が認められた。従って、この繊維構造はF-アクチンを主成分とすると思われる。また、上述の太い繊維も染色された。

## 1pF03

キウリ胚軸表皮系における分裂パターン

風間晴子・峰雪芳直<sup>1</sup> (国際基督教大学・生物、<sup>1</sup>広島大・理・植物)

分裂パターンが正確に制御されることによって、気孔の分化は進行する。この分裂面の決定とその正しい位置への挿入過程に、微小管が重要な役割を果たしていることが知られているが、どのようにして気孔分化のための微小管の配向が制御されているのか全くわかっていない。これを明らかにするには、気孔分化を外的要因によって制御できる実験系があれば望ましい。キウリ胚軸表皮系は、赤色光によって気孔の分化を誘導できる現在知られている唯一の系である(風間、日本植物学会1988, 1990)。そこで、本研究ではタマネギ表皮で使われている微小管染色法(峰雪等, 1988)を改良し、キウリ表皮系でも、気孔の分化に伴う微小管の分布の変化を観察できるようにし、赤色光照射後の気孔分化の過程を調べたので報告する。赤色光照射後2時間目で分裂準備期微小管帯(preprophase band of microtubule)を持つ細胞が観察できた。この微小管帯は細胞の中央に位置し、単子葉植物に見られるような不等分裂と少し様相が異なっていた。しかし、この分裂でできた娘細胞のうち先端部に位置すると思われる細胞が分裂して孔辺細胞を形成することから、上述の細胞分裂が孔辺母細胞形成の分裂であると考えられた。双子葉植物の胚軸の気孔分化過程の観察は、知る限りこれが最初の報告であり、本研究によって、キウリの胚軸では、従来知られている分裂パターンとは異なっている可能性が示された。

## 1pF04

ホウライシダ原糸体における preprophase band の低温処理後の再形成

○村田 隆、和田正三（都立大・理・生物）

Preprophase band (PPB) は細胞分裂に先行して将来の分裂面の細胞質表層に出現する微小管束であり、分裂位置の決定に関与していると考えられている。しかし、その位置決定機構はほとんどわかっていない。PPBの位置決定機構を探る一環として、我々はPPBの微小管脱重合後の再形成過程を観察したので報告する。

赤色光下で前培養したホウライシダ原糸体を青色光下（25—26℃）に移すと、同調分裂が誘導され、PPBも同調的に誘導される（Murata and Wada 1989）。PPB形成期の細胞を低温（0℃）処理すると、PPBの微小管はわずかな断片を残して5分以内に脱重合し、2時間後にはすべてのPPBの微小管が脱重合した。

原糸体を25℃に戻し、PPBの再形成過程を観察した。0℃5分処理の原糸体を25℃に戻した場合、低温処理で消失したPPBと同じ配向をもった微小管がPPBがもとあった領域で徐々に増加し、PPBが再形成されたが、0℃2時間処理の場合には、ランダムに配向した微小管が最初に現れ、のちにPPBが再生した。

PPBの再形成における核の役割を調べるため、細胞を遠心して核をPPB領域から除去した後低温処理し、PPBの再形成を調べた。この場合も、PPBはもとあった位置にのみ再形成され、移動後の核の周囲には形成されなかった。

以上の結果はPPBの微小管は細胞表層で重合、配向制御されることを示唆する。

## 1pF05

タバコ培養細胞BY-2を用いたcaffeineによる細胞質分裂阻害機構の解析

吳学軍、園部誠司、菜岡弘郎（大阪大・理・生物）

高等植物の細胞質分裂はcaffeineの存在下で阻害され、2核の細胞が生じることが知られているが、caffeineが細胞板形成のどの段階に影響を与えているのかについてはほとんど解明されていない。我々は細胞周期を高度に同調化できるタバコ培養細胞BY-2を用いてcaffeineの作用機構について調べた。

BY-2細胞の細胞周期を同調化し、分裂期の細胞を用いてアニリンブルーにより形成中の細胞板に存在する多糖を染色した。anaphaseからearly telephaseにかけての染色パターンはcaffeineの有無にかかわらず、同様であったが、細胞をホルマリン、FAA、グルタルアルデヒドなどで固定しておくとき、caffeine処理した細胞の細胞板はアニリンブルーで染色されなくなった。このことからcaffeine存在下で合成される細胞板の多糖がcaffeine非存在下のそれと質的に異なる可能性が考えられた。そこで柿本らによる、開発された単離フラグモプラストにおけるin vitroの多糖合成系を用いてcaffeineの作用を調べたところ、caffeineの影響は見られなかった。このことはcaffeineが細胞板における多糖合成に対して直接作用するのではなくことを示唆している。caffeineが細胞壁多糖合成に影響を与えることはプロトプラストの細胞壁再生に際しても見られた。すなわち、カルコフロ-染色した細胞壁再生プロトプラストの蛍光強度は、caffeine処理の場合、無処理の場合より低かった。

## 1pF06

矮性エンドウ上胚軸におけるABAの微小管配向制御作用：伸長低下の結果か。の検討

崎山真理・柴岡弘郎（阪大・理・生物）

エンドウの矮性品種 *Pisum sativum* L. "Little Marvel" にジベレリン(GA)を与えると、節間の生長が促進され、細胞長軸に平行(タテ)に配向していた茎の表皮細胞の細胞壁微小管(MT)は、垂直(ヨコ)方向に配向を変えるが、引き続いてアブジジン酸(ABA)を与えると、GAの生長促進効果が抑えられ、MTはヨコ方向からタテ方向へと変化する(Sakiyama & Shibaoka 1990, Protoplasma 157:165-171)。

播種後5日目のエンドウにGA ( $10^{-4}$ M)を12時間処理した後、第3節間の最上部で切ったもの(截頭区)と、切らなかったもの(無截頭区)を用意し、各々の区について、水処理又はABA( $10^{-4}$ M)処理を10時間行った。無截頭区では、ABAによる生長抑制効果は、処理後約2時間目から現れたが、MTの配向の変化は処理後6時間前後までは見られなかった。これに対して截頭区では、水処理区とABA処理区の伸長速度は、処理後10時間目まで一致していたにもかかわらず、MTの配向には違いが見られ、水処理区ではヨコ方向が維持され、ABA処理区ではタテ方向へと変化していた。無截頭区の結果は、MTの配向の変化が伸長の低下によるものである可能性を示したが、截頭区の結果により、ABA処理によるMTの配向の変化が、伸長低下によるものではない事が示された。なお、GAによるMTの配向の変化についても、同様な検討を行った結果、GA自身にもMTの配向を変化させる作用がある事が明らかとなった。

## 1pF07

花粉管ミオシンの精製 - in vitro motility assay を検出手段として

河野 匡, 岡垣 壮<sup>1</sup>, 小浜 一弘<sup>2</sup>, 新免 輝男<sup>3</sup>

(東大・理・植物, <sup>1</sup>日大・理工, <sup>2</sup>群大・医・薬理, <sup>3</sup>姫工大・理・生命科学)

われわれはテッポウユリ花粉管のミオシンの単離を目指している。精製の各段階での活性の検出手段としては、まず ATPase 活性の測定が考えられるが、この材料では混在する他の ATPase のために使用に耐えない。そこで、アクトミオシンの解析に近年盛んに用いられるようになった in vitro motility assay を試してみた。花粉管の可溶性分画を調製し、ニトロセルロース膜上に吸着させた。そこに、ニワトリ胸筋から調製した F-actin をローダミン・ファロイジンで蛍光標識したものを相互作用させたところ 平均速度  $2\mu\text{m}/\text{sec}$  の Mg-ATP に依存した F-actin の運動が観察された。この方法を花粉管ミオシンの活性検出手段とし、DE-52 column → Hydroxylapatite column → Actomyosin precipitation → Superose 6 column の順で精製を進めた。得られた部分精製標品を用いての実験から、110kDa, 120kDa, 140kDa の3本のポリペプチドが ATP が存在しない時のみ F-actin と共に沈澱し、120kDa が ATP- $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  によって光親和性標識されることがわかった。以上の結果から、120kDa が花粉管ミオシンの重鎖であると考えられ、110kDa, 140kDa は他のサブユニットの可能性がある。現在さらに解析を進めている。

# 1pF08

微小管-Sepharoseの作製と微小管結合蛋白質分離への適用

水野孝一

(大阪大・理・生物)

植物微小管 (MT) と結合することによりそのMTの機能や性質を調節する、いわゆるMAP (micro-tubule associated protein) 様のregulator や、MTを軌道とした物質輸送のモーターとして働くtranslocatorについての知見は多くの研究者の努力にもかかわらずほとんど得られていないといっても過言ではない。それは植物細胞からのそれらの因子の分離・同定法が確立されていないことが主な理由であると考えられる。現在一般的に行われている動物の脳から分離したMAPを含まないtubulin からtaxol 存在下で得られたMTを用い植物細胞抽出液と混合し、因子を結合させた後MTを沈殿させ回収するという方法では一部をのぞいて期待された結果は得られていない。それはspecificity の問題なのかもしれない。植物のMTはtaxol 存在下でも低温に対してはそれほど安定化されないので同様の方法は適用できない。そこで架橋剤の一種SANPAHを用い低温でも脱重合しないMTを調製した。この架橋剤は、一端はアミノ基とのみ反応し、他端は紫外線照射によりいろいろな基と非特異的に反応するという利点を持っている。安定化されたMTとSepharose 4Bと結合させることによりaffinityカラムを作製することができた。植物細胞よりこのカラムに結合する蛋白質が得られたのでその性質を調べた。

# 1pF09

Role of Microtubules in Signal Transduction

(Blue Light, Red Light, Gravity) of Maize Coleoptiles

Peter Nick, Frontier Research Programm, Riken Institute, Wako-shi

Cortical microtubules in the outer epidermis of maize coleoptiles reorient in Response to blue light (phototropic stimulation), gravity (gravitropic stimulation), red light, and auxin. This reorientation from transverse to longitudinal initiates after a lag of 10 min and is complete within 1 hour. A hypothesis is proposed, explaining tropism by auxin-dependent microtubule reorientation. The dose-response relation of auxin-mediated microtubule reorientation is compared with the fluence-response relation of phototropically induced microtubule reorientation. It is concluded that the bell-shaped fluence-response curve of phototropism is due to a bell-shaped fluence-response relation of the blue-light triggered gradient of auxin across the organ. In addition to this role of microtubules as effectors of tropism they are involved in perception or early transduction of gravitropism. This is concluded from inhibitor experiments: using intermediate concentrations of the microtubule-eliminating drugs Ethyl-N-Phenylcarbamate (EPC) or Propyzamide, it is possible to inhibit gravitropism totally, whereas growth (tested by the ability to show phototropic curvature) still can proceed. Red light has an effect on microtubule orientation, which is opposed to that of blue light and not explicable in terms of auxin content. Moreover, it changes the attachment of tubulin to membranes, which is perceptible as increased cold stability. Additionally, the binding of soluble tubulin to EPC-coupled Sepharose is increased in extractions from

## 1pF10

疑似微小重力下におけるホウライシダ原系体の成長

笠原宏一、竹内裕一（北海道東海大学・工学部）

植物の生長に対する重力の作用については、従来から植物を水平に固定したり伸長方向を軸として回転させるなどして、各種の影響が調べられている。

今回我々は、ホウライシダ (*Adiantum capillus-veneris* L.) を使用し、発芽および発芽初期の形態形成に対する重力の影響を調べた。ホウライシダは、発芽初期の生活環の素過程を光などの要因により人為的に制御することが可能である。

疑似微小重力環境として2軸回転型の3次元クリノスタットを使用し、孢子からの発芽率、原系体の長さおよび伸長方向、細胞分裂率等について実験を行った。

4日間暗所で吸水させ、赤色光下で4日間培養した孢子の発芽率には、疑似微小重力の影響はみられなかった。

孢子発芽後に伸長してくる原系体の長さは、下方から光を照射し、下向きに原系体を伸長させたものでは伸長が促進され、クリノスタットで回転すると抑制された。また、原系体の伸長方向については、重力の方向による有意な影響はみられなかったが、伸長方向別の長さを比較したところ、回転したものは全ての方向において伸長が抑制された。

原系体に白色光を照射することにより細胞分裂を誘導し、分裂に対する重力の影響を検討したが、影響はみられなかった。

## 1pF11

ナガイモ塊茎形成におけるジャスモン酸の関与

幸田泰則・喜久田嘉郎（北大・農・植物）

ナガイモは主茎地下部の節に1本の大きな芋を形成し、また地上部の各節にはムカゴを形成する。芋とムカゴは形態学的には同一のものである。芋は担根体とも呼ばれ茎と根の間のものであると考えられているが、根に特有の放射維管束をもたず並立維管束をもつことから、一種の塊茎であると考えるのが妥当である。ナガイモのこの塊茎形成は、バレイシヨの塊茎形成と同様に短日条件で促進されることが古くから知られている。バレイシヨの塊茎形成はチュベロン酸 (TA) 類により制御されていることから、ナガイモの塊茎形成も類似の物質により制御されている可能性がある。そこでTA類がナガイモの塊茎形成に関与しているか否かについて検討した。

まずバレイシヨ茎断片培養法をTA類のアッセイ法として用い、ナガイモ葉中に含まれるTA類の定性を行った。その結果ナガイモ葉中にはTAは含まれておらずジャスモン酸 (JA) が見いだされた。JAの存在はHPLCによる純化と質量分析により確認された。植物体の生育に伴う葉中のJA含量の変動をHPLCにより測定したところ、JA含量は直線的な増加を示し、播種後4カ月目には $160 \text{ ng/g}$ 生重程に達した。次にナガイモ茎断片にJAを与えて暗所と明所 (12時間日長)  $25^\circ\text{C}$  で無菌的に培養した結果、 $10^{-7} \text{ M}$  以上のJAによる塊茎形成の促進が認められた。これらの結果は、ナガイモの塊茎形成はJAによって制御されていることを示唆している。

# 1pF12

粘菌の細胞接着タンパク質 gp 64 の cDNA 構造と脂質アンカーの構造

真鍋理一郎、斉藤玉緒、熊崎 隆<sup>1</sup>、落合 廣 (北大・理・植物、<sup>1</sup> 薬学)

昨年度の本大会において、細胞性粘菌 *P. pallidum* の分子量 64、000 の細胞間接着タンパク質が細胞膜上に局在する事、また [<sup>3</sup>H] palmitic acid の取り込みから、lipid membrane anchor を介して膜に組み込まれていることを推定した。

今回、この gp 64 の cDNA をクローニングして、その一次構造を明らかにし、また gp 64 が lipid-anchor タンパク質である事を明らかにしたので報告する。λgt11 をベクターとして cDNA ライブラリーを作り、gp 64 に対する単クローン性抗体を用いて、4 つのクローンを分離した。その一次塩基配列の結果から推定して、gp 64 は 301 個のアミノ酸の内 36 個のシステインを含む非常にシステインに富むタンパク質である事が分かった。これらの一次構造から、ホモロジーの検索をしてタンパク質の三次構造も推定した。

gp 64 が lipid-anchor タンパク質である事は次の様に決定した。精製 gp 64 を folch の分配で夾雑する脂質を除き、逆相系 HPLC (C3 カラム) で精製しアミノ酸組成を調べると cDNA の予想より疎水性アミノ酸が少なかった。そこで gp 64 をリシルエンドペプチターゼで消化し、anhydrotrypsin カラムで C 末端を回収して、エドマン分解によりアミノ酸配列を決めた。最終的に、成熟タンパク質の C 末端は、cDNA の塩基配列から予想される C 末端より、アミノ酸で 22 個内側にある Ser 残基であることが分かった。従って、成熟タンパク質のアミノ酸の総数は 280 個であった。

# 1pF13

薬培養における高温処理が花粉の蛋白質合成に及ぼす影響

○浜岡陽、山田茂裕、萩森学、片岡二郎<sup>1</sup>、岩井純夫

(日本たばこ・植物開発研、<sup>1</sup>日本たばこ・生命研)

ハクサイ (*Brassica campestris*) の花粉は、薬培養初期に 24 時間高温 (35℃) を与えることにより効率よく胚発生を誘導できることが知られているが、この高温処理の作用機作は明らかでない。我々は、高温処理により花粉の正常な分裂が阻害され、均等な 2 核への一種の異常分裂がおり、これが花粉を胚発生へ導く引金となっていることを既に報告した (1988 年度植物学会)。今回、この高温処理を与えた際の、花粉の蛋白質合成を調査した結果を報告する。

一核期後期の花粉を含む薬を無菌的に修正 B5 培地上に置床し、35℃ 及び 25℃ 下にて培養した後、薬より花粉を単離し、<sup>35</sup>S メチオニンを加え、2 時間パルスラベルを行った。その後この花粉の粗抽出液をサンプルとして IEF-SDS 二次元電気泳動を行い、フルオログラフィーによりラベルされた蛋白質を検出した。

35℃ で 24 時間培養した花粉は 25℃ で培養したものと比べて蛋白質合成が著しく抑制されていた。また、高温 (35℃) を与えた時のみに出現する、数個の泳動性の異なるスポットを検出した。このうち、分子量約 19,000 で酸性の等電点を示す蛋白質は、高温処理終了後 24 時間以内に合成が止まった。一方分子量 33,000、35,000 の 2 つの蛋白質は処理終了後 24 時間目においても合成されていた。このように今回検出した蛋白質群は、高温によりそれぞれ異なった誘導制御を受けていることが示唆された。

## 1pF14

### ニンジンEmbryogenic Cell Protein (ECP31)の精製と免疫組織化学

○清未知宏、佐藤忍、中山二郎<sup>1</sup>、磯貝彰<sup>1</sup>、鈴木昭憲<sup>1</sup>、鎌田博、原田宏(筑波大・生物、<sup>1</sup>東大・農化)

ニンジン組織培養系はオーキシンの有無で不定胚形成を制御することができ、高等植物の胚発生のモデル系として多くの形態学的、生理・生化学的、遺伝学的、分子生物学的研究が行われている。我々はこのニンジン不定胚形成系を用い、不定胚形成能を持つ細胞(Embryogenic Cell)に於て31kdのポリペプチドを特異的に認識する単クローン抗体を作成した(Plant Cell Physiol. 1990)。今回、この単クローン抗体を検出法として用い、ニンジンEmbryogenic Cellから硫酸沈澱、カラムクロマトグラフィー、SDS-PAGEにより、31kdのポリペプチド(ECP31)を精製した。ECP31のゲル濾過による分子量は約120kと算出され、生体内で多量体として存在する可能性が考えられた。ECP31の組織局在を調べる為に、精製したECP31標品をウサギに免疫しECP31抗血清を得、これを用いて免疫組織化学を行った。その結果、Embryogenic Callus内でも特に不定胚形成能が高い周縁の細胞群が濃く染まった。又、Western Blotによる解析の結果、ECP31はニンジン胚軸には存在しないが、胚軸をオーキシンを含む培地上で培養することにより、Embryogenic Callusが胚軸上に出現するのと同時期に蓄積してくることがわかった。更に、ECP31のアミノ酸配列を気相プロテインシーケンサーを用いて解析した。

## 1pF15

### ニンジン未熟種子糖タンパク質GP80の免疫学的検出 ～その未熟胚乳最外層における特異的存在～ 鳥居啓子・佐藤忍・藤伊正(筑波大・生物)

演者らは、種子形成初期過程を生化学的に解析する第一歩として、ニンジン未熟種子にmajorに出現する分子量約80kの糖タンパク質(GP80)を検出し、精製及び生化学的特性の解析を行ってきた(植物学会 第53・第54回大会)。今回、抗GP80抗体を作製し、本糖タンパク質の免疫学的・免疫組織化学的検出を行った。

ニンジンの各組織・器官のイムノプロットの結果から、GP80は、未熟種子のみに存在し、かつ、胚由来の糖タンパク質ではないと考えられた。GP80は開花後に蓄積を開始し、開花後13-15日に最も多く検出され、その後減少した。本抗体は、開花後17日に突然出現し登熟と共に消失する分子量約78kのバンド(GP78)にも反応した。アミノ酸配列・TFMSによる除糖分析の結果、この2kの分子量差は糖鎖に起因すると推定された。この開花後15-17日の間には脂質顆粒を有する胚乳細胞の形成が起こる(このためcentral cavityは胚乳組織で満たされる)事が、果実の凍結切片のPAS及びSudan Black B染色により明かとなった。抗GP80抗体を用いた免疫組織化学的研究の結果から、GP80とGP78は、細胞壁胚乳の有無に関わらず常に胚乳最外部に局在することが判明した。胚乳最外部は胚乳細胞形成が起こる場であり、貯蔵器官として肥大する胚乳では最外層として母体の組織を圧縮する。その特異的局在から、GP80は、このような胚乳最外層の役割に関連する機能を有するのではないかと考えられた。

## 1pF16

ニンジン皮組織に局在する分泌性糖タンパク質GP57  
の発現解析—傷害誘導性とダイズ塩基性7Sグロブリン  
との同一性—

佐藤 忍、Arnd Sturm<sup>1</sup>、Maarten J. Chrispeels<sup>1</sup>  
藤伊 正（筑波大・生物、<sup>1</sup> Univ. CA, San Diego）

ニンジン完熟種子の胚と胚乳の間隙、根の皮組織（内皮、表皮、周皮）、及びカルスの培地中に検出される糖タンパク質・GP57のcDNAをプローブとしてノーザンブロッティングを行い、GP57の転写産物量に関して以下のことが判明した。1）果実の形成時期を時間を追って調べると、すでに開花後0～5日目には存在する。2）若い根>non-embryogenic callus>embryogenic callusの順に多く、不定胚には全く存在しない。3）貯蔵根の師部にはほとんど存在しないが、スライスによる傷害を行うと、数時間で蓄積を初め、12時間後にはmax. に達する。以上のことからGP57は、普段は皮組織等に組織特異的に発現しており、傷害を受けたときには全身的に傷害誘導され、生体防御システムの一部を担っている可能性が考えられた。

アミノ酸シークエンスのホモロジーサーチの結果、熱水処理により誘導されることが知られる soybean basic 7S globulin（1989年 平野ら）と高い同一性を有することが判明し、このシステムが双子葉植物に広く存在することが示唆された。

## 1pF17

カボチャ根導管液に含まれるタンパク質・糖質の解析

佐藤 忍、飯塚千夏、中村紀雄<sup>1</sup>、藤伊 正（筑波大・生物、<sup>1</sup> 横市大・生物）

〔目的〕根の表面から吸収された水は、内皮細胞を通過して導管を通り地上部の諸器官へと送られる。本研究は、細胞外空間である導管内を通る液（導管液）に根の内皮や維管束細胞から分泌される有機物質、特に糖質とタンパク質を解析し、それらが地下部から地上部の器官への情報伝達に関与している可能性を検証することを目的とする。

〔方法と結果〕材料として、接ぎ木の台木品種である新土佐1号南瓜（ウリ科 広親和性、強勢、耐病、耐低温）を用い、は種後2～3ヶ月目の植物体の茎を地面から20～30cmの位置で切断し、根側の切断面より滴下する液（根導管液）を24時間採取した。1mlの液に含まれる乾留物4.8mgのうち、糖質、タンパク質は各々100.8、18.7 $\mu$ g含まれ、液体およびガスクロマトグラフィーによる分析の結果、前者には、単・二糖としてミオイノシトールのみが、オリゴ糖として主にグルコースとガラクトースからなる糖が、多糖として主にペクチンが含まれていた。3日間にわたり継時的に採取した液に含まれるタンパク質を、SDS-PAGEにより分析した結果、1日後に増加しその後減少する糖タンパク質（GP75、GP40）、48時間周期で出現するタンパク質（P32）、定常的に一定量存在するタンパク質（P19、P14s）等が検出された。

# 1pG01

## 車軸藻類節間細胞原形質流動の原動力測定

上坪英治、菊山宗弘<sup>1</sup> (一橋大・生物、<sup>1</sup>放送大・生物)

車軸藻類節間細胞に見られる原形質流動は、葉緑体層を裏打ちするアクチン繊維束(動因座繊維)と、細胞質中のおそらくミオシンの間の滑りによって起るとされている。神谷と黒田(1958)は流動を止めるに要する

平衡遠心加速度から原形質流動の原動力を求め、 $1.6 \text{ dyne cm}^{-2}$  という値を得た。

高性能ストロボ型遠心顕微鏡を用いた観察によると、動因座繊維近傍の原形質流動は、少なくとも  $1500 \text{ xg}$  まで加速も減速もしなかった。そこで細胞液密度を人工的に高くしてより大きい遠心力を原形質流動に加えることを試みた。

人工細胞液 ( $120 \text{ mM KCl}$ ,  $20 \text{ mM NaCl}$ ,  $10 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $5 \text{ mM MgCl}_2$ ) に Ficoll 400 を加え  $1.058 \text{ g cm}^{-3}$  とし、液胞灌流(田沢 1964)によって液胞内に導入した。この細胞を遠心顕微鏡(対物  $40\times/0.65$ ) で観察すると、動因座繊維近傍の流動は  $1400 \text{ xg}$  まで加速も減速もしなかった。細胞液と細胞質の密度の差は本実験においては  $0.044 \text{ g cm}^{-3}$  であり、無処理細胞においては  $0.004 \text{ g cm}^{-3}$  である。したがって本実験においては無処理細胞の場合に比べ約 10 倍以上の遠心力を加えたことになる。それゆえ、流動原動力は神谷らの値よりおそらく 1 桁以上大きいと考えられる。

# 1pG02

## オオカナダモの葉の細胞における、光による葉緑体の移動に対するヒスチジンの影響

富永義人、田沢 仁<sup>1</sup> (平安女学院短期大学、<sup>1</sup>福井工業大学)

オオカナダモの葉を葉から切り離して、暗黒下におくと葉緑体は細胞上面(periclinal face)に集まって来る。これを蛍光灯で照射すると、原形質流動が活発になり、葉緑体もこの誘導された流動によって移動する。光が強いと( $12 \text{ W/m}^2$ )、葉緑体は、細胞の側壁側(anticlinal face)で、又は側壁側から底にかけて、集合して塊を形成する。弱光下又は暗黒下に移せば、塊はとける。強光を避けるための適応の一機構が働いたと考えられる。更に強光照射を続けると、緑色が退色しアントシアン生成によって紅葉する(百瀬 1990年日本植物学会大会第55回)。この紅葉化に伴って、葉緑体の塊はとけ、流動に再び従って移動する。

L-ヒスチジンによっても、流動がよく誘導されることを報告して来た(富永 他 日本植物生理学会1989年度年会、Tazawa et al. PCP in print、Tominaga et al. PCP in print)。この流動下の葉緑体は、強光照射によって塊も作らず、退色もしないで、移動を続ける。流動誘導能では、L-ヒスチジンと匹敵する3-メチル-L-ヒスチジンを与えた場合には、塊はやはり形成されにくいなが長時間照射で少し形成される。流動誘導能の無い1-メチル-L-ヒスチジンは塊形成を阻害しない。

L-ヒスチジンは、活性酸素種のスカベンジャーとして知られているので、葉緑体が強光を避ける適応の機構に、活性酸素種が関与している可能性を考察する。

# 1pG03

## L-ヒスチジンによる膜電位脱分極

田沢仁、岡崎芳次<sup>1</sup>、富永義人<sup>2</sup>、浅井一視<sup>1</sup>、岩崎尚彦<sup>1</sup>

(福井工大、<sup>1</sup>大阪医大、<sup>2</sup>平安女学院短大)

L-ヒスチジンは暗黒下でオオカナダモの細胞質流動を誘発することが知られている。この誘発効果はヒスチジンが細胞内に入って何らかの作用を流動機構に及ぼす結果ではないかと考えている。ヒスチジンの原形質膜を介した輸送を調べる為に、ヒスチジンの膜電位に及ぼす影響を調べた。ヒスチジンは NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> 各 1mM, 5 mM HEPES, 3 mM Tris をふくむ人工池水 (pH 7.5) に溶かした。オオカナダモの膜電位 (液胞内電位) は暗黒中で約 -200 mV であった。そして調製してすぐの 1 mM ヒスチジンを与えても膜電位の変化はみられなかった。ところが、25°C で静置しておいたヒスチジン溶液は日がたつうちに可逆的に膜を脱分極させるようになった。同様のことがシャジクモの節間細胞でも見られた。他のアミノ酸についても同じ条件において調べたところ脱分極作用があるものがあり、特にグルタミン溶液が一番脱分極作用が強かった。アミノ酸自体にはオオカナダモおよびシャジクモに対して脱分極作用はなく、適当な条件でアミノ酸から生ずる物質が脱分極の原因ではないかと考えている。

# 1pG04

## 車軸藻節間細胞の細胞質内 pH の空間的分布

緒方 惟昭 (産医大・医短・生化学)

車軸藻節間細胞を適当なイオン環境の下で光照射すると、細胞表面付近に酸・アルカリパターンを形成する。この形成過程では、細胞全体にわたる見かけの膜電気抵抗の大きな減少とアルカリ部分での大きな脱分極を伴う。抵抗減少の時定数はアルカリ部分で小さい。しかし安定状態に入ると、アルカリ部分の見かけの静止膜電気抵抗は酸部のそれより有意に小さくなる (Ogata 1983~)。

昨年に引き続きこのメカニズムについて考察する。

方法：フェノールレッドによりあらかじめアルカリバンドの位置を確認した節間細胞を遠心しながら (800rpm/1.5 ~ 2.0hr)，CFDA\* を遠心端より与える。測定は他端より 2 ~ 3 cm の間で行う。測定器は通常の落射型蛍光顕微鏡と蛍光分光光度計を組合せた。蛍光は 518nm，励起光は 473nm ( $EM_{473}^{518}$ ) を選択した。

630nm 付近の光 (10W/m<sup>2</sup> 以上) を照射した時の蛍光強度  $R_{473}^{518}EM_{473}^{518}$  から励起光のみの時の強度  ${}^D EM_{473}^{518}$  を差し引いた値を光誘導性の pHc 増加分、 $\Delta pHc$  の相対値とした。実験ではアルカリ部分の pHc は他の部分よりやや高いという結果を得た。この事は光による H<sup>+</sup>-pump の活性化がアルカリ部分で部分的に阻害され、OH<sup>-</sup> のより大きな増加は細胞内側より OH<sup>-</sup> チャンネル又は (-) イオンチャンネルを開きアルカリ部分をより脱分極側に引っ張る事になる。

\* CFDA: 6-Carboxy Fluorescein Diacetate

## 1pG05

汽水産藻類シラタマモの膜電位に及ぼす膨圧変化の影響

岡崎芳次、岩崎尚彦（大阪医大・教養・生物）

汽水産シラタマモの一種であるシラタマモの節間細胞は外液の浸透圧変化に対して膨圧を一定に保つ（膨圧調節）機構を持っている。膨圧調節に伴う細胞浸透圧の調節は液胞内と外液の間で $K^+$ と $Cl^-$ を輸送することにより行われる。低張処理に伴う膨圧調節の際、膜電位の脱分極が膜コンダクタンスの増加と共におきる。膨圧調節は低張処理後60分以内に完了し、膜コンダクタンスも回復してくるが、膜電位は回復してこないことがわかっている。本実験ではそれ以降における膜電位の回復過程を調べた。低張処理は細胞外液を0.36 Osmの人工海水から0.21 Osmの人工海水に替えることにより行った。回復の1番早い細胞では90分後に変化しはじめ、120分後に元の膜電位の近くまで戻った。回復の1番遅い細胞でも約3時間後には変化しはじめ、約4時間後には元の値の近くまで回復した。この膜電位の回復は外液の浸透圧を0.21 Osmから低張処理前の0.36 Osmに戻すことにより促進された。この処理は膨圧を定常状態の値より低くする高張処理にあたり、シラタマモ細胞では高張処理によって膜電位が過分極することがわかっているため、そのことと本実験の結果は一致している。

## 1pG06

シラタマモ原形質膜静止膜電位におよぼす局所麻酔剤の影響

大川和秋（阪大・教養・生物）野坂修一（大阪成人病センター・麻酔科）

沖原清司（阪大・基工・生物工）吉川清（大阪成人病センター・麻酔科）

シラタマモ節間細胞に局所麻酔剤（1000  $\mu$ M以下の濃度）を作用させる時、濃度依存に膜は脱分極する。一方、活動電位のピークは通常あまり影響を受けないが、falling phaseが濃度と共に延長する。局所麻酔剤の神経興奮をblockする作用は活動電位の頻度と共に増大する（use-dependent blockと呼ばれている）。シラタマモでの活動電位の誘発する局所麻酔剤による付加的な脱分極を我々はuse-dependent depolarizationと呼び、通常の脱分極をresting depolarizationと呼ぶことにする。顕著な濃度依存性のresting depolarizationにも拘らず、脱分極中の膜コンダクタンスの変化については、増加する場合あるいは減少する場合とがあり、電位変化とコンダクタンス変化との関係を、単純には結論出来ない。この事は局所麻酔剤が膜コンダクタンスの増加させる要素と、減少させる要素の2つの要素に作用する結果と予想できる。use-dependent depolarizationの過程においては膜コンダクタンスの減少が顕著である。膜コンダクタンスの減少による膜の脱分極は起電性の $H^+$ ポンプのコンダクタンスの減少により、膜コンダクタンスの増加による膜の脱分極は拡散チャンネルのコンダクタンスの増加によるものと予想し、実験を計画した。膜コンダクタンスの電圧依存性を、ポンプの阻害剤であるDCCD存在下と、局所麻酔剤存在下とで比較した結果を報告する。

## 1pG07

シャツクモ原形質膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  及び電圧依存性の アニオンチャネル。  
パッチクランプ法を用いた研究  
沖原 清司 (阪大基礎工生物)、大川 和秋 (阪大教養生物)  
筒井 泉雄 (生理研)、葛西 道生 (阪大基礎工生物)

シャツクモ節間細胞の興奮において  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化される  $\text{Cl}^-$  チャネル ( $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel) の opening が重要な役割を果たすことはこれ迄に明かにされている。最近の calmodulin-antagonist を用いた研究は、この  $\text{Cl}^-$  チャネルの opening の活性化が  $\text{Ca}^{2+}$  と calmodulin-like factor の結合反応を介して起こることを強く示唆している。この  $\text{Cl}^-$  チャネルの性質を我々は inside-out patch clamp 法により詳細に調べようとした。その結果、顕著な  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を示すアニオンチャネルと余り  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を示さないアニオンチャネルの2成分を捉えることができたので報告する。

膜電位 +100 ~ -200 mV の領域でアニオンチャネルに対する活性を遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 0.1, 1.0, 10  $\mu\text{M}$  の場合において調べた。その結果 顕著に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を示すチャネルの性質としては 1.0  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ 、膜電位 -80 ~ -100 mV 付近で最もよく開くベル型の電圧依存性の開離率を示し、0.1, 10  $\mu\text{M}$  の濃度では 1.0  $\mu\text{M}$  の場合より開かずベル型の性質も示さないことが明かになった。さらに 1.0  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  濃度において開いていたチャネルは calmodulin-antagonist を加えることによって閉じることが確認された。

一方、他の余り  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しないアニオンチャネルは膜電位の負の領域でより開く性質をもつチャネルであることが明かになった。

## 1pG08

タバコ細胞液胞膜および原形質の電圧依存性イオンチャネル

張 平、矢部 勇、武藤 尚志 (東大・応微研)

パッチクランプ法は、シングルチャネル電流を記録する手法で、最近、高等植物細胞にも適用されており、種類のチャネル蛋白の機能解析がなされている。

タバコ培養細胞 (BY-2) からプロトプラストを調製し、原形質膜と液胞膜イオンチャネルの測定を試みた。液胞膜では、cell-attached mode, inside-out patch, whole-vacuole configuration, outside-out patch による測定、原形質膜では、cell-attached mode, inside-out patch によるイオンチャネルの測定に成功した。cell-attached 法で、原形質膜と液胞膜の電圧依存性イオンチャネルが測定された。懸濁液およびピペット内液両組成が 300mM ソルビトール/2mMEGTA (pH 7.5)/2.5mMDTT/50mMKCl の条件で、原形質膜のチャネルは外向き整流性、液胞膜のチャネルは内向き整流性を示した。原形質膜では、イオンコンダクタンス 20pS と 36pS の二種類のチャネルが、液胞膜では 120pS のチャネルのみが観察された。

液胞膜の outside-out patch で 0.1mM  $\text{ZnCl}_2$  存在下において、電圧依存性の外向きの  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが測定された。このチャネルは 1 $\mu\text{M}$  イノシトール三リン酸を添加すると約1分後に顕著に活性化された。さらに  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル阻害剤ペラバミル (10 $\mu\text{M}$ ) を与えると、約1分後に  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルはほぼ完全に阻害された。

# 1pG10

キュウリ果実でのケイ酸の局在とトノプラスト小胞への吸収

山崎睦生、山木昭平（名古屋大・農・園芸）

キュウリ果実をケイ酸を除いて栽培するとブルーム（ケイ素が主成分）が消失し外観が良くなるが、果実がくびれたりし、病虫害に対する抵抗性も低くなる。そこで本研究ではキュウリ果実内で果すケイ素の役割を明かにするために、ケイ素の細胞内での局在性、及びトノプラスト小胞内への吸収について検討した。

キュウリ果実のディスク切片からのケイ素の溶出を継時的に原子吸光で測定し、Compartment analysis 法によって解析したところ、果実での可溶性ケイ素の80%が液胞内に局在していることが明かとなった。そこで、果実組織をホモジナイズして10,000~100,000gの沈澱を6%デキストラン密度勾配遠心することによって、その界面に集まるトノプラスト小胞を採取した。この小胞はキナクリン蛍光消失実験よりH<sup>+</sup>-ATPaseによってH<sup>+</sup>ポンプを形成出来るシールしたものであった。また、キュウリ果実のトノプラスト H<sup>+</sup>-ATPase は硝酸により阻害され、バナジウムでは阻害されなかった。次に、この小胞を用いてケイ酸の吸収を調べたところ、ケイ酸はATP添加により促進され、PCMBs, CCCPによって阻害されずむしろ促進された。また果実切片を1mM PCMBs 溶液でインキュベートした時、ケイ素の液胞からの溶出は抑制されたことより、ケイ酸の液胞内への透過は拡散によるが、液胞からの溶出はPCMBsに感受性なキャリアー蛋白質と関連していることが示唆された。

# 1pG11

ホウ素の要求性と体内分布

—— タバコ培養細胞での検討 ——

水谷正治、大野佳織、間藤徹、高橋英一（京大農）

ホウ素(B)は高等植物の必須元素であるが、B欠乏による生育障害は同時多発的なので障害のメカニズムからBの作用点を明らかにする試みは成功していない。B欠乏による代謝変動はBの作用点から先ずBがなくなることによって起こるはずである。そこで脱分化した培養細胞（タバコBY-2株）のB要求性、体内分布とB欠除による代謝変動について検討した。

ホウ素吸着樹脂AmberliteIRA743で脱B処理したLS培地（B濃度0.1ppb以下）にBを段階的に添加し培養したところ、比増殖速度はB濃度に依存して増加し、培地濃度1ppmでほぼ飽和した。最大速度の1/2を与えるB濃度は60ppb(5μM)であった。この細胞のB含有率は3ppmであったが、プロトプラストにはその1%が検出された。また細胞を直接磨砕したところ、全てのBは細胞壁両分に存在した。これらの結果からBは細胞内、細胞膜ではなく細胞壁に局在し、その作用点のBに対する親和性は10<sup>-6</sup>Mと推察された。細胞をB欠除培地に移すと、24時間後に約20%の細胞が原形質分離を起こすが、コリンやグルコースの吸収速度は3時間後から低下し始め12時間後には対照区の半分以下になった。これらの結果からBは壁の完全性を介して膜の機能維持に作用している可能性が考えられた。また、培地B濃度を段階的に下げることで低B耐性細胞を選抜し、1ppbBでも生育できる細胞ラインを得た。

## 1pG12

ニチニチソウ培養細胞の親和性の異なるリン酸取り込みについて

降旗敬, 新井康仁, 城市篤, 桜井英博 (早大・教育・生物)

リンは植物三大栄養素の一つであり、植物根から無機リン酸(Pi)の形で積極的に吸収されている。われわれはニチニチソウ液体培養細胞プロトプラストを用いて培地Pi濃度によるPi取り込み活性の変動について調べた。

Pi非飢餓処理細胞(+Pi細胞;1.25-2.5mM Piを1日おきに添加して7日間培養)をPiを含まない培地に移して(-Pi処理)から5日後の細胞について、Pi取り込みの濃度依存性を調べたところ、親和性の異なる少なくとも2種類の取り込み成分の存在が予想された。また、Piを過剰に加えて培養した(++Pi処理)細胞では、低濃度域における取り込みは極めて小さかった。これを、2種類の親和性の異なる取り込み成分が存在し、++Pi処理時には高親和性の取り込みがほとんど現れないと仮定して解析を行うと、高親和性成分は $K_m = \text{約} 1.5 \mu\text{M}$ 、低親和性成分は $K_m = \text{約} 40 \mu\text{M}$ となった。さらに、-Pi処理細胞のPi取り込み活性を経日的に追跡し、2成分の変動を調べたところ、高親和性成分は3日目頃から著しい活性上昇が見られたが、低親和性成分の変動はあまり顕著ではなかった。以上より、植物細胞には親和性の異なるPi取り込み機構が少なくとも2種類存在し、このうち高親和性の取り込みはPi飢餓状態において誘導されてくる成分であることが示唆された。

## 1pG13

ラン藻 *Synechococcus* PCC 7942 の硝酸イオン輸送に関与する遺伝子群の構造

小俣達男, 平野篤<sup>1</sup>(理研・太陽光科学, <sup>1</sup>東電・技術研)

ラン藻 *Synechococcus* PCC 7942 の細胞質膜に存在する45kDタンパク質は硝酸イオンの能動輸送に関与している。45kDタンパク質の遺伝子(nrtA)の上流側には亜硝酸還元酵素の遺伝子があるが、今回、nrtAの下流域の塩基配列を解析したところ、3つのORF(ORF1, ORF2, ORF3)がnrtAに近接して存在することが明らかになった。ORF1のコードするタンパク質はアミノ酸279個からなる疎水性の高いタンパク質でそのhydropathy profileは"binding protein-dependent transport systems"として知られる細菌類の一群の物質輸送系の疎水性サブユニットのものとよく似ていた。ORF2のコードするタンパク質は659個のアミノ酸からなり、そのN末端部分は上述の細菌類の輸送系の構成サブユニットのうち、異なる輸送系の間でも構造が高度に保存されていて"MalK family"と呼ばれているタンパク質群と高い相同性を持っていた。これに対してC末端部分はnrtAの産物である45kDタンパク質との相同性を示した。ORF3のコードするタンパク質はやはりMalK typeで、ORF2のコードするタンパク質のN末端部ときわめてよく似ていた。ORF1とORF2の挿入変異株は硝酸イオンをまったく利用することができず、ORF3の挿入変異株は低い濃度の硝酸イオンを利用することができなかった。以上の結果からORF1, ORF2, ORF3はnrtAとともに硝酸イオン輸送に関与する遺伝子群であると結論された。

# 1pG14

NAD-ME型C<sub>4</sub>植物・*Panicum coloratum*の光合成におけるNaの機能

○村田伸治・間藤 徹・高橋英一（京大農）

いくつかのC<sub>4</sub>植物は栽培試験ではNa要求性を示すが、Naの生理生化学的な機能は不明である。我々は、Na欠除栽培したNAD-ME型C<sub>4</sub>植物・*Panicum coloratum*のNa欠乏症からの回復実験を行い、Na添加1時間以内に光合成速度(<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>固定量)が上昇することを明らかにした<sup>1)</sup>。このNaによる光合成促進の機構を明らかにするために以下の実験を行った。

播種後28日間、2.25mM Kを含む基本培養液<sup>1)</sup>でNa欠除栽培した*P. coloratum*に、1mM NaClを添加し、赤外線ガス分析装置を用いて経時的に光合成速度を測定した。尚、対照区には1mM KClを添加した。Na欠除植物の光合成速度は2.72μmol/m<sup>2</sup>/sであったが、Na添加30分以内に5.21μmol/m<sup>2</sup>/sまで上昇した。葉身に10mM NaClを塗布した場合も同様に上昇した。リーフコンダクタンスはNaの添加によって変化せず、Naは気孔開度を介して作用するのではないと判断した。Na添加3時間後に<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>取り込み実験を行い、初期(15秒)<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>固定産物を分析したところC<sub>4</sub>-ジカルボン酸の占める割合は両植物で変わらず(66%)、Na欠除植物でもC<sub>4</sub>光合成が行われていることが示された。葉身中のホスホエノールピルビン酸(PEP)、ピルビン酸濃度は、Naの添加により、それぞれ、増加、減少したが、その変化は緩やかでNaによる急速な光合成速度の上昇を説明できなかった。

以上の結果より、CO<sub>2</sub>が気孔を通過してからPEP carboxylaseによって固定されるまでの過程にNaが関与していると推察した。

<sup>1)</sup> Match T, Murata S (1990) Plant Physiol 92:1169-1173

# 1pG15

培養液濃度変化による浸透ストレスが生長に伴った水ポテンシャル場に及ぼす影響

野並 浩, 木山浩二, 越智竜雄<sup>1)</sup>, 橋本 康  
(愛媛大・農, <sup>1)</sup>末広産業)

生長している植物細胞の90%以上は水で占められているため、細胞拡大によって細胞内への水の流入は欠かせない条件となっている。水の移動は水の化学ポテンシャル(水ポテンシャル)の勾配に依存しているため、伸長が起こっている細胞には生長に伴った水ポテンシャル場が存在しているはずである。本研究ではインゲンマメ(*Phaseolus vulgaris* L. cv. Shiraginugasa)を使用し、Isopiestic Psychrometerを用いて培地および植物体の水分状態を計測した。光合成および貯蔵養分の細胞伸長への影響を除くために、インゲンマメの種子から胚を摘出し、植物ホルモンを含まないMS培地に植え付け培養を行ない、胚の伸長を計測した。培地は標準のMS培地を希釈することにより10%毎の濃度を設定し、水ポテンシャルで-0.1bar(0%MS)から-5.2bar(100%MS)の範囲であった。培養植物体の生長は-3.0barで最大となった。培養植物体の成熟部位の水ポテンシャルは培地の水ポテンシャルとほとんど同じであり、生長部位では水ポテンシャルは成熟部位よりも低かった。生長に伴った水ポテンシャル場の大きさの推定を成熟部位と生長部の水ポテンシャルの差を用いて行なったとき、その大きさは生長率と高い相関があり、植物体の細胞伸長は水ポテンシャルの場の大きさによって決定されていることがわかった。

収穫開始期のキュウリは土壌水分が十分にあって、梅雨期間中の晴天日に急激に萎凋し、枯死することがある。本報告は、本学農学部附属農場の圃場と1/2000 a ワグナーポットに生育したキュウリ(品種は新北星1号)を用いて急性萎凋の発生機構を検討したものである。大要は以下の通りである。

外見上まったく正常で、病害虫にもおかされていないキュウリが梅雨期の晴天日の早朝に直射光を受けると、急に萎凋しはじめ、時間の経過とともに萎凋程度は大きくなり、萎凋程度の著しく大きい個体は2、3日で枯死した。萎凋程度の大きい個体ほど葉の水ポテンシャルは低く、拡散伝導度は小さく、根から葉までの水の通導抵抗は大きかった。萎凋した個体で根から葉までの水の通導抵抗が大きいことには、第2節直下より胚軸下端までの茎基部の水の通導抵抗の著しい増加が関係していた。茎基部の水の通導抵抗は萎凋程度が大きく、葉の水ポテンシャルが低下するに伴って著しく増加した。このような茎基部の水の通導抵抗の大きい萎凋した個体では胚軸の木部にチロシスが多く認められた。急性萎凋が生じるのはつぎのような過程をたどると考えた。すなわち、梅雨期間中の晴天日に吸水と蒸散の不均衡が生じ、葉の水ポテンシャルが低下し、チロシスが発生して導管が閉塞し、茎の水の通導抵抗が大きくなり、これに伴ってさらに葉の水ポテンシャルが低下し、チロシスの発生がすすむと仮定した。この仮定を検討するため、萎凋の認められない個体の根を切断して吸水を抑制すると、葉の水ポテンシャルの低下に伴って茎基部の水の通導抵抗は増加し、茎基部の水の通導抵抗が著しく大きくなった個体では胚軸の木部にチロシスが認められた。このことから、上述した仮定が妥当であり、吸水と蒸散の不均衡によって葉の水ポテンシャルが低下することがきっかけとなり、チロシスが発生し、その後正のフィードバックによって葉の水ポテンシャルが低下し続け、萎凋程度が大きくなり、枯死に至ると推察した。



一 般 講 演

第2日 3月29日(金)



一般講演

第2日 3月29日(金) 午前部

- A会場 ストレス(I)
- B会場 光化学系II(I)
- C会場 遺伝子・窒素代謝
- D会場 微生物・植物相互作用
- E会場 炭素代謝
- F会場 光生物学(I)
- G会場 植物ホルモン(I)

## 2aA01

イネ科植物におけるベタインの蓄積とベタインアルデヒド脱水素酵素に関する研究

水野克彦、荒川圭太、岸谷幸枝<sup>1</sup>、高倍鉄子（名大・農・生化学制御、<sup>1</sup>東北大・農）

（目的）重要な作物種を含むイネ科やアカザ科の植物は、*compatible solute* としてベタインを合成・蓄積する。細胞質の浸透圧調節を司るベタインは、コリン→ベタインアルデヒド→ベタインの経路で葉緑体で合成される。ベタインアルデヒド脱水素酵素 (BADH) はこの最終段階を触媒する酵素である。各種の双子葉植物についてベタインの蓄積とBADHタンパク質の分布を調べた研究があり、ベタインの蓄積量は種によって非常にまちまちであるが、双子葉植物の系統樹においてベタインを蓄積する植物が広く分布することが報告されている。一方、単子葉植物のイネ科の作物に関しては、ベタインの蓄積とBADHタンパク質に関する情報が少ない。今回イネ科植物を用いて、BADHタンパク質の種間分布と塩ストレスによるベタインとBADHタンパク質の誘導について検討を行った。

（方法）イネ科植物の葉より酸で4級アンモニウム化合物を抽出し、NMRによりベタインの蓄積量を分析した。またBADHタンパク質のレベルはハウレンソウ緑葉のBADHに対して特異的な抗体を用いて解析した。

（結果）ある種のイネ科植物はベタインを蓄積せず、ベタイン合成経路を持たないと考えられる。一方、蓄積する種では、塩ストレスによるベタインの蓄積の誘導が確認された。さらにBADHタンパク質の種間分布・塩ストレスによる誘導についてBADHに対する特異抗体を用いて検討する。

## 2aA02

塩ストレス処理した大麦におけるベタインアルデヒド脱水素酵素の誘導

荒川圭太、石谷学、水野克彦、高倍鉄子  
（名大・農・生化学制御）

植物細胞の浸透圧調節機構は植物の耐塩性において重要な役割を担っている。高等植物のイネ科やアカザ科等のある種の作物や耐塩性藍藻では、四級アンモニウム化合物であるグリシンベタイン（ベタイン）を *compatible solute* として細胞質に蓄積することが知られている。演者らは今回、イネ科植物の中でも比較的耐塩性が高い大麦を材料に用いて、塩ストレスや塩ストレスを解除した条件下でのベタインの蓄積量の変動及びベタイン合成系の最終段階を触媒するベタインアルデヒド脱水素酵素 (BADH) の活性やタンパク質量の変動について詳細な検討を行なった。

（方法）播種後5-6日目の大麦の水耕培地に0.2 M NaClを添加することで塩ストレス処理を施した。BADH活性は、大麦緑葉から調製した55-70%硫酸画分を用いて測定した。また、以前の報告よりもさらに高度に精製したほうれん草緑葉由来のBADH (native form) を抗原として、非常に力価の高い抗体を調製した。この特異抗体を用いて、諸条件下でのBADHのタンパク質量の変動を解析した。

（結果）塩ストレス処理した大麦では、経時的にベタインの蓄積量の増加が起り、7日後には無処理のものに比べて約7倍に増加した。一方、BADH活性やBADHのタンパク質量は2-3倍の増加であった。また、塩ストレス解除後のBADHタンパク質レベルの変動や水分ストレスに対する応答なども併せて検討する。

## 2aA03

Anabaena variabilis の低温誘導性遺伝子 Lti2 は  
 $\alpha$ -アミラーゼ様タンパクをコードしている  
佐藤 直樹 (東大・理・植物)

ラン藻の一種 Anabaena variabilis M3 の生育温度を38℃から22℃にシフトすると脂肪酸の不飽和化が誘導されるという知見に基づいて、低温によって誘導される遺伝子のクローニングを進めている。まだ不飽和化酵素の遺伝子はとれていないが、低温誘導性遺伝子 Lti2 と Lti46 が得られた(昨年度本学会)。Lti2は552個のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしており、データベース検索の結果、各種の $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼ、シクロマルトデキストリングルカン転移酵素、グリコーゲン分枝酵素との相同性が見られた。これらの酵素はすべて $\alpha$ -1,4-グルカンに作用してグルカン鎖の切断と、グルカンへの転移または水分子への転移(加水分解)を行う点で類似した酵素群であり、アミラーゼの活性中心として知られる2箇所を含む4箇所の相同なアミノ酸配列を含んでいる。Lti2はこれら $\alpha$ -1,4-グルカン転移・水解酵素群に共通な配列をすべてもっており、アミノ末端側の配列はグリコーゲン分枝酵素に似ていた。そこで酵素活性を確認するために、Lti2遺伝子のコード領域を発現ベクターpKK233-2に挿入して、大腸菌で大量発現させた。この大腸菌菌液についてアミラーゼ活性を測定したが、全く検出されなかった。しかし、Lti2遺伝子は、低温のほかに暗所でも発現することから、グルカンのなんらかの代謝に関連した酵素である可能性が高い。

## 2aA04

イネおよびハウレンソウのCu/Zn型スーパーオキシドディスムターゼ遺伝子の構造と発現

○坂本 敦、大菅裕之、田中国介 (京府大・農化)

活性酸素により引き起こされる酸素ストレスは陸上植物にとっては避けることのできないリスクの1つであるが、それに対する生体防御機構として複数の酵素が関わる活性酸素消去の代謝経路が存在する。その中でもスーパーオキシドの不均化反応( $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )を触媒するスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は、系の律速酵素として働くため最も重要視されている。我々は、SOD遺伝子は活性酸素の生成を高める様々な環境あるいは内的因子に速やかに応答する柔軟な発現調節機構を備えていると考え、高等植物の主要SODである銅・亜鉛型アイソザイム(Cu/Zn-SOD)についてイネおよびハウレンソウを材料に分子生物学的解析を進めている。ハウレンソウについては、以前に得たcDNAプローブを用いて芽生えのライブラリーより細胞質型とプラスチド型のそれぞれ全長cDNAを単離した。両タイプのアミノ酸配列は既報のペプチド配列と完全に一致し、プラスチド型アイソザイムのN末端に伸張する68残基からなるトランジットペプチド構造も明らかとなった。一方、イネについては胚乳ライブラリーより少なくとも2種類の細胞質型全長cDNAを得、さらに核遺伝子についても解析を進めている。また活性酸素の生成要因の1つである光によるSOD遺伝子の誘導や、器官特異的な発現についても報告したい。

## 2aA05

緑化培養細胞の光独立栄養性について (IX) ;

ストレスタンパク質 O L P の発現と制御

○竹田恵美、佐藤文彦<sup>1</sup>、井田和子、山田康之<sup>1</sup>

(大阪女子大・基礎理、<sup>1</sup>京大・農・農芸化学)

我々は、これまで培養細胞における機能発現の調節機構を解明することを目的に研究を進めてきている。既に、タバコ培養細胞の総タンパク質を2次元電気泳動により分離するとともに、N末端アミノ酸配列のマイクロシーケンス解析を行うことにより、タバコ培養細胞には、塩ストレス耐性のタバコ培養細胞に蓄積するオスモチンやタバコPRタンパク質の1種であるPR-Sと高い相同性を有するタンパク質P1、P4、P7が蓄積していることを報告した(89年度植物生理学会年会)。今回は、P4に対する全長のcDNAを単離し、その構造と発現について解析した結果を報告する。

単離したP4(以下、OLPと呼ぶ)のcDNAの塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した結果、OLPはN末端に21残基のシグナルペプチドを持つタンパク質として合成された後、プロセシングされて分子量25kdの成熟タンパク質となるることが明らかとなった。アミノ酸配列の相同性は、オスモチンとは約76%、PR-Sとは約60%であった。発現をノザンプロットにより調べたところ、OLPのmRNAは、培養細胞のagingによって増加すること、エチレンの合成阻害剤といわれる硝酸コバルトによって低下すること、さらにエチレンを投与することによって、低下していたOLPの転写量が再び増加することが明らかとなった。

## 2aA06

P R 1 a タンパク質遺伝子の糖による発現誘導

上野敬一郎、○大島正弘<sup>1</sup>、杉山万里<sup>2</sup>、村上高<sup>1</sup>、大橋祐子<sup>1</sup>

(鹿児島県バイオテック研、農水省生物研<sup>1</sup>、島根農試<sup>2</sup>)

P R 1 タンパク質遺伝子の発現調節機構を明らかにするため、生体内低分子化合物による遺伝子発現の誘導性を検討した結果、一部の糖類が inducer として機能することが分かったので報告する。

前演者と同様にして葉肉プロトプラストを調製し、fructose, glucose, sucrose, maltose, glycerol及びmannitolを含む培地で培養し、経時的に $\beta$ -glucuronidase活性を測定したところ、PR1a-GUS形質転換植物から得たプロトプラストではfructose, glucose及びsucroseでは顕著な活性の上昇が認められ、maltoseでもやや誘導が起きたがglycerolとmannitolには殆ど誘導活性が認められなかった。35S-GUS形質転換植物で同じ実験を行ったところ、いずれの糖でも誘導は認められなかった。実験はすべてmannitolを用いて最終糖濃度を0.4Mに調整しているので、単なる浸透圧の変化などによって誘導が起こったのでは無く、上記の糖類によってPR1aタンパク質遺伝子の発現が特異的に誘導されたと考えられる。更にこれらの糖類と他のinducerとの相互作用を調べるため、培地にkinetinと2,4-Dを加えたところ、糖類による誘導効果が増強された。この系に更にサリチル酸を加えたところ、極めて顕著な誘導が認められた。これらの結果はサリチル酸、植物ホルモン及び糖類がそれぞれ同様な効果を持ったinducerとして機能しうることを示している。

## 2aA07

### PR1 タンパク質遺伝子の植物ホルモンによる発現誘導

大橋 祐子、上野 敬一郎<sup>1</sup>、榎本 末男、大島 正弘、村上 高、渡辺紳一郎、野口 貴<sup>2</sup>

(農水省生物研、<sup>1</sup>鹿児島バイテク研、<sup>2</sup>東京都農試)

我々は、タバコモザイクウイルス(TMV)感染に伴う病斑形成ストレスや切断、傷害ストレス等によって新たに誘導されてくるタバコ感染特異的(pathogenesis-related:PR) 1 タンパク質遺伝子の発現制御機構の解析を行ってきた。今回は、本遺伝子の発現が植物ホルモンによって誘導されることが明らかになったので報告する。

材料としては、PR1a遺伝子の5'側非翻訳領域 2.4Kbを $\beta$ -glucuronidase(GUS) レポーター遺伝子と連結した融合遺伝子を導入したタバコを用い、対照としては、PR1遺伝子のinducerに応答しない35S-GUS タバコを用いた。これらの植物の展開上位葉を切りとり、これらから調製した葉肉プロトプラストをinducer中でincubateした後、経時的にGUS活性を測定することによりPR1遺伝子の発現誘導を調べた。

IAA, NAAおよび2,4-Dは、0.4M glucose存在下では、いずれも5-10 $\mu$ M程度でプロトプラスト中のGUS活性を2倍以上に増加させるが、kinetin またはzeatinの添加はその4-8倍にもGUS活性を増大させ、更なるサリチル酸の添加はその10倍ものGUS活性を誘導した。最近、TMV感染による病斑形成に伴ってサリチル酸が増加してくることから、PR1遺伝子のnatural inducerがサリチル酸ではないかとする説がある。今回の我々の結果はサリチル酸に加えて、内在性植物ホルモンや、次演者がのべるように糖濃度が相加、相乗的にPR1遺伝子の発現を誘導していることを示唆する。

## 2aA08

### 乾燥によって二段階に誘導されるシロイヌナズナ遺伝子の解析

篠崎和子<sup>1</sup>、小泉昌広<sup>1,2</sup>、浦尾さとみ<sup>1</sup>、篠崎一雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>理研・遺伝子解析、<sup>2</sup>京大・理・植物)

植物は環境の変化や刺激にตอบสนองして遺伝子発現レベルでの調節を行い、外界の環境変化に適応したり、あるいは成長、分化を行っている。種々の外部環境の変化によって、植物ホルモンやセカンドメッセンジャーを介して種々の遺伝子の発現が制御される。本研究では環境因子として乾燥を取り上げ、乾燥によって誘導される核遺伝子群の発現調節とそのシグナル伝達系を解明することを目的としている。

乾燥により誘導されるシロイヌナズナのcDNAをディファレンシャルスクリーニングによりクローニングした。これらは9グループに分類され、cRD (Responsive to esiccation)と命名した。このうちcRD29クローンは他のクローンと異なり、乾燥によって二段階に誘導されることが明らかになった。すなわち、乾燥処理後約30分で誘導されて1時間後にmRNAが分解されるが、さらに3時間後に再び強く誘導される。また、低温処理やABA処理によってもcRD29は誘導されるが、この場合早い誘導は観察されなかった。ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果複数の遺伝子が存在することが示された。cRD29の遺伝子rd29A、rd29Bをクローニングし、その構造を解析した。

## 2aA09

乾燥によって誘導されるシロイヌナズナ チオール・プロテアーゼ遺伝子の発現解析

小泉昌広<sup>1,2</sup>、篠崎和子<sup>1</sup>、浦尾さとみ<sup>1</sup>、篠崎一雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>理研・遺伝子解析、<sup>2</sup>京大・理・植物)

乾燥ストレスは植物体において種々な遺伝子の発現を誘導する。乾燥によって誘導される遺伝子群の構造と発現について分子レベルで解析するために、シロイヌナズナの植物体において乾燥により特異的に蓄積するmRNAのcDNAクローンをディファレンシャル・スクリーニングによって9種類単離した。これらのcDNAクローンをcRDと命名し、それぞれの構造解析と対応する遺伝子の発現の解析を行った。そのうち、cRD19とcRD21がコードするタンパク質はチオール・プロテアーゼと高いホモロジーを示したが、お互いに異なった種類のチオール・プロテアーゼであることが明らかになった。また、ゲノミック・サザン・ハイブリダイゼーションの結果、cRD19、cRD21は別な遺伝子であり、チオール・プロテアーゼ遺伝子のファミリーであること、またそれぞれがサブファミリーを形成していることが明らかになった。cRD19とcRD21について、それぞれ一種類ずつのゲノミック・クローンを単離し、その構造解析を行うと共に、ABAやGA<sub>3</sub>の植物ホルモン処理や低温処理による発現の様子をノーザン法により解析した。さらに、それぞれのの遺伝子の5'上流に存在するシス・エレメントについて解析を行った結果、植物で既に報告されているG-boxやASF-1の配列が存在することが明らかになった。

## 2aA10

植物ホルモンABAによって誘導されるシロイヌナズナ遺伝子の解析

篠崎一雄<sup>1</sup>、篠崎和子<sup>1</sup>、小泉昌広<sup>1,2</sup>、浦尾さとみ<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>理研・遺伝子解析、<sup>2</sup>京大・理・植物)

植物では乾燥状態で耐乾燥性に必要と考えられる一群のタンパク質の合成が誘導される。乾燥によって植物ホルモンアブシジン酸(ABA)が誘導され、さらにABAによって種々の遺伝子が誘導されることが知られている。我々は乾燥によって特異的に誘導されるシロイヌナズナ一群の遺伝子(rd)の解析を進めているが本講演では、ABAによって誘導されるrd22遺伝子の構造と発現について報告する。

ディファレンシャルスクリーニングによりクローニングされた9種のcDNAクローンのうちcRD22はABAによって誘導されることが明らかになった。cRD22の塩基配列の解析の結果、ダイズ種子形成期中期に大量に転写される種子タンパク質UPS(Unknown Seed Protein)とC末端側に相同性が見いだされた。またN末端側には特徴的な繰り返し配列が見られた。ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果cRD22の遺伝子はゲノムあたり1コピーであると推定された。さらにゲノミックDNAライブラリーによりcRD22の遺伝子rd22をクローニングし塩基配列を決定した。転写開始領域の塩基配列を解析した結果、ABAによる誘導に関与すると考えられるシスエレメントが2個見いだされた。

## 2aB01

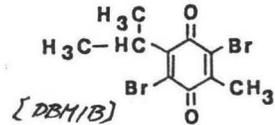
光化学系II反応中心へのキノン再構成

○伊藤繁、岩城雅代、三室守、吉坂琢磨<sup>1</sup>、三木邦夫<sup>1</sup>、  
佐藤公行<sup>2</sup> (基生研・細胞内エネルギー、阪大・工・応用  
精密<sup>1</sup>、岡大・理・生物<sup>2</sup>)

D1-D2-Cytb559-光化学系II反応中心複合体への電子受容体キノン(Q<sub>A</sub>)再構成をDBMIB=dibromothymoquinoneを用いて行い、電子移動過程を調べた。

D1-D2-b559-複合体は、ハウレンソウあるいはカボチャ葉緑体をTriton-X 100で処理後、それぞれ、digitoninあるいはdodecylmaltosideに置き換え調製した。両方の試料とも安定で良く似た分光的性質、電子伝達活性を示した。

昨年度報告したように、DBMIB存在下では閃光照射によりP680<sup>+</sup>が生成し、電荷再結合で生じるP680三重項は抑えられ、Q<sub>A</sub>の機能が再構成された。P680<sup>+</sup>は、光還元されたDBMIB、b-559及びZ等により再還元されると推定される。



これらの過程を紫外から可視領域(240-700 nm)での吸収変化の測定から解析し、各還元過程の速度、温度依存性を推定した。Q<sub>A</sub>->b-559の電子移動も確認した。

DBMIB存在下では、77 Kで測定される蛍光のうち、電荷再結合で生じる遅延蛍光成分(P680の出す683nm成分)がより選択的に抑制され、DBMIBがこの温度でもQ<sub>A</sub>として働く事を支持する結果が得られた。この際、蛍光励起スペクトルも変化し、カロチノイドからP680への直接の励起エネルギー移動も推定された。

## 2aB02

光化学系II Q<sub>A</sub>機能の再構成に必要な蛋白質成分

福原聡・荒賀千笑・赤堀興造・豊島喜則(広大・総合科)

PS II中の第一キノン電子受容体Q<sub>A</sub>の機能発現に必要な低分子量蛋白質については既に報告した。ここでは反応中心近傍に存在する集光性Chl結合蛋白質CP43及び、PQA(Q<sub>A</sub>の本体)を除去した複合体にPQAを再結合させ、Q<sub>A</sub>活性を回復させることが出来たのでその結果を報告する。

<結果> PS II粒子からドデシルマルトシドを用いてQ<sub>A</sub>還元活性を持つ複合体(47, 43, D1, D2, Cytb559, 10, 6.1, 5(N), L, 4.8, 4.1, 3.9)を得た。これをオクチルチオグルコシド(OTG)-オクチルグルコシド(OG)系で更に解体し、CP43と低分子量蛋白質を除去した新しい複合体(47, D1, D2, Cytb559, 6.1, 4.8)を調製した。この複合体はPQAを欠き、同時にパルス光照射に伴うΔA 325nmを指標とするQ<sub>A</sub>活性を持たなかった。この複合体にOTG/OG処理により遊離した全抽出成分を加えて再構成すると、Q<sub>A</sub>活性は75%まで回復した。更に全抽出成分を可容化剤存在下で、PQAと低分子量蛋白質を含む画分Aと、CP43を含む画分Bに分画した。これらの画分を単独あるいは同時に加えて再構成した結果、画分A単独でQ<sub>A</sub>活性の回復が認められた。以上の結果から、①PQAと低分子量蛋白質が同時に存在した場合PQAがQ<sub>A</sub>部位に正常に機能する状態で再構成される、②CP43はQ<sub>A</sub>機能の発現に関与していない、という結論を得た。

## 2aB03

### 光合成光化学系II Q<sub>A</sub>-Q<sub>B</sub>電子伝達における非ヘム鉄の役割

黒岩繁樹、赤堀興造、豊島喜則（広島大、総合科）

（目的）紅色光合成細菌（*Rps. viridis*）の光化学反応中心の構造に基づき、PS IIのQ<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>及び非ヘム鉄（Fe<sup>2+</sup>）の結合部位が推定されている。このFe<sup>2+</sup>に関して、光合成細菌とPS IIではそれらの化学的性質や配位状態に大きな相違点が見られる。さらにその役割についても不明である。本研究ではPS IIのこのFe<sup>2+</sup>の役割について探求した。

（実験）測定試料の光化学反応中心濃度を高めるために、集光性蛋白質IIを大部分除去した光化学反応中心複合体（RC）を作成した。さらに、Tris処理を行い、水分解系を除去したRC（TrisRC）を調製し、これを基準物質とした。一方、Fe<sup>2+</sup>の影響を分離するために、Fe<sup>2+</sup>を除去したRC（-Fe<sup>2+</sup>-TrisRC）、Fe<sup>2+</sup>をZn<sup>2+</sup>及びMn<sup>2+</sup>で置換したRC（Zn<sup>2+</sup>-TrisRC及びMn<sup>2+</sup>-TrisRC）を調製した。そしてこの電子伝達に影響を与える因子（pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HCOO<sup>-</sup>）を変化させて、レーザーフラッシュフォトリシス法により、PS II中の非ヘム鉄の役割を探求した。

（結果）Q<sub>A</sub>→Q<sub>B</sub>電子伝達過程では、以下の2つの過程が考えられる。

(1)  $Q_A Fe^{3+} Q_B \xrightarrow{h\nu} Q_A^- Fe^{2+} Q_B \rightarrow Q_A Fe^{2+} Q_B$  (2)  $Q_A Me^{2+} Q_B \xrightarrow{h\nu} Q_A^- Me^{2+} Q_B \rightarrow Q_A Me^{2+} Q_B^-$   
過程(1)に関しては、TrisRCにおいては従来報告されているような速い時定数ではなく、 $t_{1/2} = 250 \mu s$ と観測された。過程(2)に関しては、pH 6.0, 25mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の条件下で $t_{1/2}$ が500 $\mu s$ 以上であった。以上、光合成細菌とは異なり、PS IIの非ヘム鉄はpH変化やHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度変化によりQ<sub>A</sub>→Q<sub>B</sub>電子伝達速度を調節している可能性が考えられるが、考察中である。

## 2aB04

### アトラジン結合解析より推定されるQ<sub>B</sub>サイトでのブラストキノロン交換の機構

高橋正昭（甲南大・理・生物）

光化学系II（PS II）反応中心のQ<sub>B</sub>サイトからブラストハイドロキノロン（PQH<sub>2</sub>）は膜脂質内に解離し、代わりに酸化型のPQが結合する。これはQ<sub>B</sub>サイトとPQの相互作用が、PQ分子が還元されると弱くなる結果である。本研究では、PQと同じ部位に結合することが知られているアトラジンのD1タンパク質との結合のパラメーターに対する酸化還元剤の影響より、PQH<sub>2</sub>の解離を導く原因を調べた。

〔方法〕PS II膜（80  $\mu g$  Chl）を<sup>14</sup>C-アトラジン（0~1.0  $\mu M$ ）、40 mM Mes-NaOH（pH 6.5）、10 mM NaCl、0.4 Mシヨ糖を含む基本反応液（0.5 ml）中で、25℃、15分インキュベートした後10,500 x g、15分遠心し、上清の100 $\mu l$ を採ってフリーのアトラジン濃度を決定した。DCMU存在下でのアトラジンの濃度とフリーのアトラジン濃度の差をChlの濃度で割ってアトラジンの結合数とした。

〔結果〕フェニルキノンの添加により、アトラジンの結合定数は $1.32 \times 10^7 M^{-1}$ から $4.09 \times 10^6 M^{-1}$ に低下した。暗中にはフェニルキノンにより非ヘム鉄が酸化されるので、非ヘム鉄の酸化とともにPQに対するリガンドの位置の変化、あるいは、数が減り結合が弱くなると考えられる。また、PS IIの活性によって変動した最大結合数は、フェニルキノン存在下では反応中心の数に一致する4 mol/1,000 mol Chlになり、全てのQ<sub>B</sub>サイトにアトラジンが結合できるようになった。

## 2aB05

### 光化学系Ⅱ反応中心の色素の選択的抽出

木戸 敏孝, 唐 暁松<sup>1</sup>, 佐藤 公行 (岡大・理・生物  
<sup>1</sup>プリンストン大)

最近、光化学系Ⅱ反応中心の単離が可能になり、種々の方法で標品が調製されるようになった。しかし、単離された標品の性質は、研究グループにより多少異なっており、特に紅色光合成細菌の光化学反応中心との対比の上で興味ある色素組成に関しては大きな食い違いが報告されている。我々は以前、等電点電気泳動法により精製した反応中心が、6 chl a, 2 pheo a, 2  $\beta$ -car, 1 Cyt b-559 heme, の組成比を持つことを報告したが、今回、DEAE-Toyopearl に吸着した反応中心を高濃度の Triton X-100 で長時間処理することによって、前報とは異なる色素組成を持つ2種類の標品が得られることを見いだした。標品の1つは、紅色光合成細菌の場合に似て、2分子の pheo a 当たり4分子の chl a を含み、他の1つは、2分子の pheo a 当たり8分子の chl a を含んでいる。興味ある事実は、後者において、pheo 分子のほとんどすべてが飽和定常光照射下で光還元されることである。この事実は、他の成分の組成を考慮に入れると、この標品では本来反応系には直結していない "inactive branch" の1分子の pheo a が、2分子の "accessory" chl a と共に、抽出されていることを示すものと考えられる。

## 2aB06

### 時間分解 EPR による光合成系Ⅱ中の P680 とクロシンDの位置の研究

小寺義男・田倉慶三・藤原ちづる・河盛阿佐子  
(関学大・理)

光化学系Ⅱ (PSⅡ) に光照射すると波長680nmの光を吸収して反応中心P680がP680<sup>+</sup>へと酸化される。我々はドナー側の働かない低温90Kにおいてレーザー照射を行ない、その直後に現れるP680<sup>+</sup>を時間分解EPRで測定し、酸素発生系(OEC)のS<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>状態におけるマイクロ波飽和特性を得た。また、同じ温度においてクロシン残基D<sup>+</sup>のEPR信号であるSig. II<sub>s</sub>の飽和特性と、パルスEPR法によってT<sub>1</sub>を直接測定した。これらの結果によりP680とOECのMn錯体までの距離は、クロシンDとOECまでの距離の0.85倍であることが解った。さらに、PSⅡのドナー側、アクセプター側の様々な酸化状態のもとでSig. II<sub>s</sub>のT<sub>1</sub>の温度依存性(77K~160K)を測定し、以下の知見を得た。

- (1) Sig. II<sub>s</sub>のこの温度範囲における1/T<sub>1</sub>の活性化エネルギーは2.0 kJ/molであり、この値はD<sup>+</sup>とQ<sub>a</sub><sup>-</sup>との電荷再結合のエネルギー<sup>(1)</sup>と等しい。
- (2) アクセプター側のQ<sub>a</sub>の酸化状態の変化はT<sub>1</sub>に大きな影響を与える。
- (3) OECのS<sub>2</sub>状態におけるMnの相関時間は10<sup>-9</sup>~10<sup>-11</sup>秒であることが解った。

これらの結果よりPSⅡの構造及び機構について総合的に検討する。

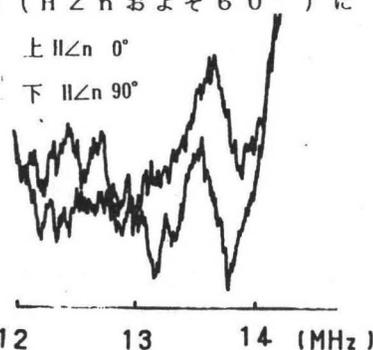
1) T. Inui, A. Kawamori et al., (1989) Biochim. Biophys. Acta 973, 147-152

## 2aB07

配向 P S II 膜 E N D O R によるマンガンダイマー  
およびチロシン D の配置の研究

三野広幸・戸高伸治・中塩雅朝・河盛阿佐子 (関学大・理)

ほうれん草より精製した P S II 膜は乾燥することにより配向し、E P R 異方性を示す。最近、設備の充実、ラジカル濃度の向上により以前に比べて良好なスペクトルを得ることができた。まずマルチライン信号であるが、E P R においてマルチライン信号自身はほぼ等方的であり、E N D O R において異方性を観測することができた。我々は以前にマルチライン信号の E N D O R において、およそ 4 M H z の分離を与える信号がマンガン系に直接配向した水のプロトンである可能性を示した。特に、この信号に関して考察すると (図 1 に低磁場側を示す)、その角度依存性から、プロトン-電子間のなす方向が、膜平面に近い方向 ( $H \angle n$  およそ  $60^\circ$ ) に存在することがコンピューターシミュレーションから示される。実際には、マルチライン信号は主にマンガンダイマーに起因していると考えられる。そこで 2 つのマンガンを中心においたいくつかのモデルを考える。また、S i g. II の E N D O R スペクトルからチロシン残基上のスピン濃度分布を考慮して同様の解析を行い報告する。



(図 1)

## 2aB08

M n 除去系 II 酸化側におけるヒスチジン残基の光酸化  
小野高明、井上頼直 (理研、太陽光科学)

光化学系 II の酸化側では酸素発生反応を触媒する M n クラスター、及び反応中心 P 680 と M n クラスター間の電子移動に関与する tyrosine 残基のみが酸化還元成分として機能していると考えられてきた。最近、C a<sup>2+</sup> 除去系 II において新しい酸化還元成分に由来する熱発光、E P R 信号が報告され、histidine 残基がその実体ではないかと推定されている (文献、1 & 2)。もし、この histidine 残基が M n クラスターと tyrosine 残基間の電子移動に関与しているとする、M n クラスターを除去した系 II においても histidine 残基の酸化が起こる事が期待される。M n を完全に除去した B B Y 標品を閃光照射すると、 $-20^\circ\text{C}$  付近に熱発光が見られ M n クラスターが存在しなくても系 II 酸化側に正電荷が蓄積し得る事が明かとなった。この発光は T r i s 処理した系 II を連続光照射したときに観察された A<sub>T</sub>-band であると同定された。A<sub>T</sub>-band 生成は、histidine 残基の修飾剤である diethylpyrocarbonate 処理により特異的に阻害され、脱修飾処理である N H<sub>2</sub>O H 処理により可逆的に回復した。又、修飾反応の p K<sub>a</sub> は約 6.2 付近であった。これらの結果は、histidine 残基が A<sub>T</sub>-band 生成に密接に関与している事を示している。興味深い事に、A<sub>T</sub>-band の生成は M n<sup>2+</sup> により強く阻害された。その K<sub>m</sub> 値は約  $18 \mu\text{M}$  であり、光活性化より推定されている M n 結合部位の親和性と良く一致していた。以上の結果は、A<sub>T</sub>-band 生成に関与する histidine 残基が M n 結合部位の極めて近傍に存在している事を示唆しており、この histidine 残基が tyrosine 残基間との電子移動と M n クラスターの結合に関与する酸化還元的に活性な配位子である可能性を示唆している。

- (文献) 1. Boussac, A., Zimmermann, J.-L., Rutherford, A.W. & Lavergne, J. (1990) Nature. 347, 303-306  
2. Ono, T. & Inoue, Y. (1990) B.B.A. 1020, 269-277

## 2aC01

ダイズ植物におけるウリカーゼ遺伝子の組織特異的発現  
伊藤秀記、田中耕二、田島茂行、\*河内 宏  
(香川大農、\*農水省農業生物資源研)

尿酸を酸化分解してアラントインを生成するウリカーゼは、パーオキシゾームのマーカ酵素であるが、ダイズ植物においては根粒非感染細胞内パーオキシゾームにのみ検出される共生特異的タンパク (nodulin 35) であると考えられ、その遺伝子発現機構が検討されてきたが、近年、ダイズ種子においてもウリカーゼ活性を含むパーオキシゾームの存在が報告された<sup>1)</sup>。両者のウリカーゼを比較するために、ウリカーゼ精製を硫酸塩析、DEAE-セルロースカラム、Sephacryl S-200カラムクロマトグラフィーによって行ない、得られた精製標品をFreund adjuvant とともに兎を免疫しポリクローナル抗体を得た。ウリカーゼ遺伝子クローニングは根粒cDNAライブラリーを調製し、合成DNAプライマーを用いたPCR法で行なった。

各植物組織におけるウリカーゼ活性を測定したところ、根粒に強い活性が認められると共に発芽直後の胚軸、胚乳にも高分子画分のみで弱い活性が検出された。

ウリカーゼタンパクの存在をウエスタンブロット後、ELISAによって検討したところ、根粒、胚乳とも33 kDに一本のバンドが確認された。ノーザンブロットの結果よりウリカーゼは根粒が窒素固定活性を示す前に発現してくることが示唆され、ダイズ発芽種子はウリカーゼ遺伝子発現を検討するうえで有用な系であると考えられた。

1) 桜井ら、日本植物学会第54回大会研究発表記録、p202、1989

## 2aC02

ワツ藻 *Trichodesmium* sp. NIBB1067株の窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*, *D*, *K*) の制限酵素地図による解析  
Jonathan, P. Zehr<sup>1</sup>, 大城 香, 藤田善彦  
(基生研・細胞生物, <sup>1</sup>ニュージャージー州立大・海洋研)

窒素固定酵素の三つの蛋白をコードする遺伝子 (*nifH*, *D*, *K*) は耐酸性のない窒素固定系を持つ単細胞種や異形細胞を分化しない糸状体種のワツ藻ではバクテリアと同様一つの隣合ったクラスターとしてDNA上に存在する。一方異形細胞を形成し好氣的窒素固定を行う種では外から与えた窒素源を用いて生育し本遺伝子が発現していない細胞では *nifD* のコード領域に約11kbpの excision が存在し、細胞を窒素固定条件に移すと11kbp-excision が切り出され *nifH*, *D*, *K* クラスターの形成が起こった後窒素固定酵素の転写が開始されることが知られている。*Trichodesmium* はブルネ科に属するワツ藻で異形細胞を形成しないがその窒素固定系は異形細胞を形成する種に匹敵する高い耐酸性を持つ。本ワツ藻の窒素固定酵素遺伝子の構造を明らかにする最初の試みとして、窒素固定条件及び窒素源として尿素(0.5 mM)を与え窒素固定酵素を合成しない条件で生育させた細胞からそれぞれ genomic DNA を抽出し、シカゴ大学・Haselkorn博士のもとで得られた *Anabaena* sp. 7120株の *nifH*, *D*, *K* 及び11kbp-excision部分のDNAを probe として制限酵素地図の作製を行った。結果は、本ワツ藻の *nifH*, *D*, *K* は窒素固定酵素が発現されている条件、非発現条件いずれでも隣合ったクラスターを形成していることが示された。

## 2aC03

ラン藻 *Plectonema boryanum* における Fe-蛋白質遺伝子 (*nifH*, *fixC*) の欠損変異株とその性質

藤田祐一、高橋康弘、松原央 (大阪大, 理, 生物)

*fixC* は、ゼニゴケ葉緑体 DNA に存在する未同定 open reading frame の一つで、ニトロゲナーゼの Fe-蛋白質遺伝子 *nifH* と有意な相同性を示す。ラン藻 *Plectonema boryanum* からの *fixC* と *nifH* の cloning とその塩基配列は、昨年度の本大会で報告した。*fixC* 遺伝子産物の機能を明らかにするため、*P. boryanum* を用いて *fixC* 欠損変異株の単離を試みた。まず、*fixC* を分断する様に kanamycin 耐性 ( $Km^R$ ) 遺伝子を挿入した plasmid を構築した。この plasmid を、電気穿孔法によって細胞内に導入後、染色体 DNA との相同的組換えの結果生じる変異株を、 $Km^R$  を指標に選択することにした。電気パルスの条件設定のため、最初に *nifH* 遺伝子欠損変異株の単離を試みた。電界強度 12.5 kV/cm、時定数 10.7 ms のパルス処理の結果、変異株 YFH201 を単離した。本株は、予想通り、窒素固定能欠損 (*nif*<sup>-</sup>) の形質を示した。同じ条件のパルス処理により、*fixC* 欠損変異株 YFC1004 を得た。YFC1004 は、光独立栄養的にも窒素固定的にも、野生株と殆ど変わりなく生育することから、*fixC* 蛋白質は、光合成系にも、窒素固定系にも、必須でないことが示された。更に、弱光下、又は、暗所においても、glucose 添加により野生株と大差ない生育を示すが、chlorophyll (Chl) 含量が大幅に減少する形質を示した。この形質は、通常光下では生じないことから、*fixC* 蛋白質は、光非依存型の Chl 合成系に、何等かの形で、関与していることが示唆された。

## 2aC04

サツマイモ塊根におけるフェニルアラニンアンモニアリアーゼの発現

田中喜之 (生物研)

サツマイモ塊根は、病傷害、エチレン、光など種々の因子によりフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) が de novo に多量に合成される。PAL には数種類の遺伝子が存在しておりそれぞれの刺激により特定の遺伝子が発現されることが予想される。そこで種々の刺激により誘導される PAL の cDNA をクローニングしその構造を明らかにするとともにその発現パターンを解析した。

傷害による PAL 活性の変動パターンは 2 種の PAL の存在を示唆していたので傷害後 4 時間及び 14 時間経過した組織から、またエチレン処理をした組織より RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを調製した。すでに傷害サツマイモ組織より得た cDNA クローン (pPAL02) をプローブにしてスクリーニングしたところいずれのライブラリーにおいても 1000 個当たり 1 個の positive plaque が見られた。その中で pPAL02 の 3'-noncoding region とハイブリダイズしないものが約半数あり、各ライブラリーより十数クローンづつサブクローニングし制限酵素地図、3'末端側の塩基配列を調べたところ polyA 鎖のつく位置に差があるがほぼ同一のものであった。その中で最も長いクローン (pPAL2-8, ~2.5kb) の塩基配列を決定した。pPAL02 とは核酸及びアミノ酸レベルで各々 79.7, 88.1% のホモロジーがあった。ノーザンブロット分析により pPAL02 が傷害後 4 時間で検出されるのに対し pPAL2-8 は 2 時間ですでに発現していた。

## 2aC05

*Panicum miliaceum* アスパラギン酸アミノ基転移酵素 -  
cDNAクローニングと窒素による発現制御  
谷口光隆, 光部篤人, 澤木弘道, 笹川英夫, 長谷俊治,  
杉山達夫 (名大・農・農化)

NAD-ME型 C<sub>4</sub>植物の C<sub>4</sub>ジカルボン酸回路において、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)は葉肉細胞の細胞壁質および維管束鞘細胞のミトコンドリアに局在し、中心的な役割を演じている。我々はこの両細胞でのAspATアイソザイムの機能発現を解明することを目的として、今回cDNAクローニングを行うと共に、そのアイソザイムの蓄積に対する供給窒素の影響を調べた。

緑化葉より調製した poly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型としてcDNAライブラリーを作製し、各アイソザイムを認識する2種の抗体でスクリーニングを行い、両アイソザイムに相当するクローンを得た。塩基配列より予想されるアミノ酸配列には50%の相同性が認められる一方、構造的あるいは機能的に必須であることが知られているアミノ酸残基は全て保存されていた。また、供給窒素の変動に伴うAspATアイソザイムの発現パターンを解析した。低窒素(0.3mM NO<sup>3-</sup>)で約2週間生育させた窒素欠乏の植物に高窒素(8mM NO<sup>3-</sup>)をあたえ、欠乏回復過程でのアイソザイムの蓄積を調べた。AspATは、補填後選択的に増加し、72時間後には1.5倍になった。この増加は、葉肉細胞に存在するAspATに特異的であり、維管束鞘細胞ミトコンドリアに局在するアイソザイムには変動が見られなかった。したがって、アイソザイム間で窒素変動に伴う発現調節が異なることが示唆された。

## 2aC06

トウモロコシ グルタミン合成酵素、グルタミン酸合成  
酵素遺伝子群の転写産物の蓄積から見た発現解析  
榊原均、長谷俊治、杉山達夫 (名古屋大・農化)

我々はC<sub>4</sub>植物であるトウモロコシを用いてグルタミン合成酵素(GS)/グルタミン酸合成酵素(GOGAT)サイクルの機能及びその発現調節機構の解明を目的とし以下の実験を行なった。トウモロコシ緑化葉から作製されたcDNAライブラリーより5種類のGSクローンpGS107,112,117,122,202を単離しそれらの構造を決定した。他の植物のGSの一次構造と比較したところ、107,112,117,122はcytosolic GSとより高い相同性を示した。202はplastidic GSとより高い相同性を示したが、N末端側の一部を欠いていた。これらのGS cDNAと、すでに得ているFd-GOGAT cDNAをプローブとし、細胞内での転写物の存在量の関係調べた。葉、中はい軸、根での存在量をみたところ、107,112はいずれの器官でも大量に存在したのに対し、117は葉に、122は根にそれぞれ少量ずつではあるが偏在していた。plastid型の202は葉に局在していたが、同じくplastidに存在するFd-GOGATは葉の他に中はい軸、根にも少量ずつ存在した。光誘導の過程においては、202とFd-GOGAT mRNAは光照射後、協調的に著しく増加した。一方、cytosol型の107,112は緑化過程でわずかながら増加傾向を示したが、117は減少、122は変化がなかった。この様にC<sub>4</sub>植物には、C<sub>3</sub>植物に比べ多くのGS遺伝子が存在し、それらの発現様式もより複雑化されていると考えられる。現在、維管束鞘細胞と葉肉細胞間での発現についても検討中である。

## 2aC07

ハツカダイコン子葉における発現調節の異なる細胞質  
局在性グルタミン合成酵素群のcDNA クローニング  
浜田和行, 渡辺 昭 (名古屋大・農・生化学制御)

グルタミン合成酵素(GS)はアンモニア同化のかなめとなる酵素であり、土壌から吸収した窒素の同化だけではなく、光呼吸の際に生ずるアンモニアの再同化、また、植物体内の窒素の転流時にはその転流形態の一つであるグルタミンの合成においても重要な役割を果たしている。ハツカダイコンの子葉には、葉緑体局在性GS(GS<sub>2</sub>)と細胞質局在性GS(GS<sub>1</sub>)が存在しているが、我々の研究室では老化に伴って発現し、窒素の転流に関与すると考えられるGS<sub>1</sub>のcDNAと遺伝子がクローニングされている。しかし、一般的にGS<sub>1</sub>は多重遺伝子族を形成しており、ハツカダイコンでもこのcDNAに対応する遺伝子以外にも恒常的に発現している遺伝子があることがわかってきた。この多重遺伝子族のメンバーによる発現の違いをはっきりさせるために、他のメンバーのcDNAクローニングを試みた。その結果、新たな二つのGS<sub>1</sub>cDNAクローンが得られ、その構造について調べたところ、これらのGS<sub>1</sub>遺伝子はお互いに非常に近縁で、アミノ酸配列で90%近い相同性を示すが、その発現のパターンは互いにはっきり異なっていることがわかった。また、cDNAのin vitro 転写・翻訳産物の二次元電気泳動法による解析から、これら3種類のクローンに対応するGS<sub>1</sub>遺伝子はハツカダイコン子葉で発現しているGS<sub>1</sub>遺伝子のすべてであることが明らかになった。

## 2aC08

イネ・グルタミン合成酵素GS<sub>1</sub>およびGS<sub>2</sub>遺伝子の  
プロモーター活性の比較  
木崎 暁子<sup>1</sup>、坂本 敦<sup>2</sup>、田中 國介<sup>2</sup>、竹葉 剛<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>京大・農生、<sup>2</sup>京府大・農化、<sup>3</sup>京府大・応生)

イネのような好アンモニア性植物の窒素同化では、グルタミン合成酵素(GS)が主要な役割をはたしている。我々はすでにイネから3種のcDNA(RGS8、RGS28、RGS31)を単離・解析した。RGS8は主に根で発現するGS<sub>1</sub>型(細胞質局在型)であり、RGS28は主に葉で発現するGS<sub>1</sub>型である。RGS31は葉緑体に局在するGS<sub>2</sub>型である。これら3つのcDNAに対応する核遺伝子も単離・構造解析しており、それらの遺伝子の器官特異的発現を調節するシス配列を解析中である。これらの遺伝子の発現調節機構を調べるために、それぞれの遺伝子の5'上流域をβ-glucuronidase(GUS)遺伝子に連結し、タバコに導入し、プロモーター活性を検討した。

すでにRGS28(GS<sub>1</sub>型)に対応する遺伝子の場合、タバコにおいてもイネにおけるのと同様に葉で主に発現すること、アンモニアにより発現が誘導されるという結果を発表している。今回、RGS31(GS<sub>2</sub>型)に対応する遺伝子の5'上流域(1.5kb)とGUS遺伝子のキメラ遺伝子を導入したタバコについて、RGS28の場合と同様な実験を行い、その発現様式について比較した。また、GS<sub>2</sub>は、光により誘導されることがわかっているので、光による発現調節についても調べたので結果を報告する。

## 2aC09

### イネのRFLP解析に関する研究(I)

#### ゲノムDNAによる多型分析

半沢 幹朗, 菊池 彰, 大場 伸也<sup>2</sup>, 菊池 文雄<sup>1</sup>, 内宮 博文<sup>2</sup>

(筑波大・生物,<sup>1</sup>筑波大・農林,<sup>2</sup>北大・理・生物)

DNAを制限酵素で切断した場合に、品種等の違いによって生じる断片の長さの違いを生ずる場合がある。これはDNA制限断片長多型 (RFLPs) と呼ばれ、遺伝的マーカーとして有用である。

イネ (*Oryza sativa*.L)のRFLP分析を行うためにインド型品種である Culture 340 のDNAを *EcoRI*と *PstI*で処理して2種類のゲノムライブラリーを作成し、各クローンをプローブとした。オートラジオグラムからコピー数を推定すると、低コピーのクローンの割合は *EcoRI*ライブラリーが50.7%、*PstI*ライブラリーでは71.8%であった。

つぎに、日本型の愛国と Culture 340間でRFLP分析を行ったところ、*EcoRI*ライブラリーでは33.3%、*PstI*ライブラリーでは53.9%に多型がみられた。これらのうち *PstI*ライブラリーでは2種類の制限酵素で同時に多型がみられたのが24.2%、3種類の酵素で多型がみられたのが16.1%、4種類全てで多型がみられたのは8.1%であった。制限酵素により生じる断片長の平均と多型頻度の間には強い相関がみられた( $r=0.99^{**}$ )。また、Culture 340でバンドが出現し愛国でバンドがみられないものが3クローン得られ、DNA断片の挿入や欠失が生じているものと推定された。

## 2aC10

### イネのRFLP解析に関する研究(II)

#### cDNAクローンによるRFLP分析とその特徴

菊池 彰 半沢 幹朗 大場 伸也<sup>1</sup> 菊池 文雄<sup>2</sup> 木野 新一郎<sup>1</sup> 加藤 敦之<sup>1</sup> 内宮 博文<sup>1</sup>

(筑波大・生物,<sup>1</sup>北大・理・植物,<sup>2</sup>筑波大・農林)

RFLP分析は主に genomic DNA プローブを用いて行われているが、本研究では cDNA プローブを用い genomic DNA プローブとの比較を行った。また両プローブを用いた RFLP 連鎖地図を作成した。4種類の各制限酵素による RFLPs の検出率は cDNA プローブを用いた場合、genomic DNA プローブに対し全ての酵素において RFLPs 検出頻度が2倍以上高く、サザン法で得られるバンド数も多かった。また genomic DNA をプローブに用いた場合にはバンドの平均サイズと RFLPs 検出頻度の間に関連関係が認められたが、cDNA プローブを用いた場合にはその関係は認められなかった。こうした相違の原因はイントロンの有無によるものと推定される。更に genomic DNA 及び cDNA マーカーを用い RFLP 連鎖地図の作成を行い、約 1000 cM にのぼる連鎖群を得た。

また日本型イネとインド型イネ間の戻し交雑第一世代における期待分離比 1:1 (日本型 : 雑種型) に適合しない RFLP マーカー ( $p > 0.05$ ) について連鎖地図との関係を比較したところ、分離の歪みを起こす因子の存在が推定された。

## 2aD01

### Subtractive hybridizationによるダイズ根粒からのnodulin 遺伝子のcDNAクローニング

○河内 宏・畑 信吾 (農業生物資源研究所)

根粒菌の感染によりマメ科植物に共生窒素固定根粒が形成される過程で発現する植物遺伝子(nodulin遺伝子)をsubtraction法によってクローニングした。すなわち、ダイズ根粒mRNAから調製した<sup>32</sup>P-cDNAから非感染根mRNAと相補的な配列を差し引くことによって得られた根粒特異的なプローブで根粒のcDNAライブラリーを検索し、発育段階の異なる根粒からあわせて25以上の特異的クローンを得た。塩基配列の解析の結果、この中には従来知られているnodulin遺伝子の大部分と、10個以上の未知遺伝子が含まれていた。ノーザンブロットの結果、新たに単離されたnodulin遺伝子はその発現時期により、(1)感染初期の根ですでに発現しているもの、(2)感染初期の根では検出されないが窒素固定活性の発現に先だって8日目の根粒で比較的大量に発現するもの、および(3)leghemoglobin遺伝子と同様に窒素固定活性の現れる13日目を境に発現するもの、に分類された。グループIに属するnodulinのうち#3, #37は(Hy)Proに富む繰り返し配列をもち、従来知られているeNod2ファミリーに属する。#36はまったく異なった構造を持つが、基にも弱く発現していた。グループIIに属する#315は、eNod55(ダイズ)と類似の(Hy)Pro-Serの繰り返し配列を持つ。その他の新規nodulin遺伝子は、ダイズ以外のマメ科根粒も含めて既知のnodulin遺伝子との相同性は認められなかった。単離されたnodulin遺伝子はすべて、Nod<sup>+</sup>Fix<sup>-</sup>菌によって形成された無効根粒においても発現しており、その発現量にもほとんど差はなかった。

## 2aD02

### 溶原性ファージによる根粒菌感染機能の変動

○内海俊樹・東 四郎・阿部美紀子(鹿児島大・理・生物)

根粒菌とマメ科植物の共生関係は、両者の高度に調節された遺伝子発現系の上に成立しているが、根粒菌にファージが溶原化していた場合の根粒細胞内におけるファージ・菌・植物細胞の三者の遺伝的・生理的相互関係は、興味のあるところである。本研究では、クローバ根粒菌とその溶原性ファージについて、ファージの溶原化と宿主根粒菌の根粒形成能(Nod)との関係及び、植物細胞内におけるファージ遺伝子の発現について解析を試み、植物細胞への遺伝子ベクターとしての機能開発を検討するのが目的である。

野生のホワイトクローバ根粒より分離したクローバ根粒菌*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* UK-1:  $\phi$ U株(Nod<sup>+</sup>)は溶原菌であり、UV照射あるいはMitomycin C処理により溶原性ファージU-moleを誘発することができる。ファージU-moleは、形態的にはPodoviridaeに属し、genome sizeは約40kbであった。UK-1:  $\phi$ U株の接種により形成されたクローバ根粒をMitomycin C処理後、透過型電子顕微鏡にて観察したところ、根粒細胞内の根粒菌におけるファージの誘発、植物細胞質中へのファージ粒子の放出が観察された。ファージU-moleは、他のクローバ根粒菌野生株4S株(Nod<sup>+</sup>)にも溶原化したが、植物との共生に関して二種の異なる表現型を示す溶原菌、即ち、Nod<sup>+</sup>である4S:  $\phi$ UN<sup>+</sup>株とNod<sup>-</sup>である4S:  $\phi$ UN<sup>-</sup>株が得られた。4S:  $\phi$ UN<sup>-</sup>株においては、根粒形成遺伝子群(nod-genes)が存在するSym plasmid(315 kb)がcuringされており、ファージの溶原化によってSym plasmidの複製が阻害される可能性が示唆された。次に、4S:  $\phi$ UN<sup>+</sup>株、4S:  $\phi$ UN<sup>-</sup>株それぞれのファージU-moleの溶原化位置の決定と、誘発されるファージのDNAの比較を試みた。U-moleのattP領域(EcoRI 6 kb fragment)をprobeとして、2株の全DNAについてSouthern hybridizationを行なった結果、hybridizeするDNA fragmentが一致することから、溶原化位置は同じであると判断した。しかし、4S:  $\phi$ UN<sup>-</sup>株より誘発されたファージのDNAには、本来のファージU-moleのDNAには存在しない特異的なDNA fragmentが存在することが明らかとなった。特に、この特異的な領域のほぼ全体をcoverしていると予想されるEcoRI 4.7 kb fragmentをcloningし、その起源とSym plasmid curingの関係について考察したので報告する。

## 2aD03

*Pseudomonas syringae*の非病原性遺伝子Avr Dにより生産される、ダイズの抵抗性遺伝子に対応した特異的エリシターの性質と部分精製

○川崎信二, 鈴木玲奈<sup>1</sup>, S. Midland<sup>2</sup>, J. Sims<sup>2</sup>, N. Keen<sup>2</sup>

(農水省・生物研,<sup>1</sup>日本女子大,<sup>2</sup>Calif. Univ. Riverside)

植物と病原体との相互作用の特異性はそれぞれの抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子との対応により決定される場合が多く知られている。avr Dはトマトの病原菌 *Ps. syringae* pv. *tomato* から得られた非病原性遺伝子であるが、ダイズの病原菌 *Ps. syringae* pv. *glycinea* に導入した場合に、特定の品種に対しての非病原性を菌に付与する。この avr D に対応した宿主の抵抗性は1遺伝子により決められていることが交配から明らかになっている。

avr D を導入した大腸菌は培地にこの遺伝子に対応した品種レベルでの宿主特異性を持った過敏反応誘導性のエリシターを分泌する。このエリシターは宿主が病原体の侵入を認識するシグナル物質と考えられるので、その精製を試みた。培地からエリシターを有機溶媒で抽出後、逆相及び順相のクロマトグラフィーにかけ葉に対する過敏反応誘導活性のアッセイにより活性成分を分離した。活性は複数のピークに認められたがそのうちの代表的なピークについて2次元NMR分析を行ない暫定構造を決定した。分子式は  $C_{15}O_6H_{24}$  ないし  $C_{13}O_6H_{20}$  で、 $C_7$  又は  $C_5$  の炭化水素側鎖と酸素に富む親水性部分とからなる構造を持つと考えられた。

## 2aD04

リボキシゲナーゼの遺伝子発現を伴う新たな病害抵抗性制御機構

彭友良、白野由美子、柴田大輔 (三井植物バイオ研)

酸化型の不飽和脂肪酸がイネから単離され、これらがいもち病菌に対して抗菌性を示すことが知られている。われわれはこの抗菌性物質の生合成がリボキシゲナーゼ経路によるものであると推定している。そこでいもち病菌に対するイネの抵抗性発現機構を解明する目的でリボキシゲナーゼ遺伝子の発現制御の研究を進めている。既に、いもち病菌に感染した葉から cDNA ライブラリーを作成してリボキシゲナーゼをコードするクローン (1.3 kbp) を得ている<sup>1)</sup>。さらにこのクローンをを用いて 2.9 kbp のクローンを得た。プライマーエクステンションの結果、このクローンは全長にはあと 180 bp ほど必要であった。塩基配列を決定した結果、既にわれわれが単離しているイネ発芽期リボキシゲナーゼ L-2 のアミノ酸配列との相同性は低い。また、N 末端にトランジットペプチド様配列が見いだされ、これは他のリボキシゲナーゼには見られず、生合成後に葉緑体へ移行する可能性が考えられる。非親和性いもち病菌の感染に伴いリボキシゲナーゼ活性が特異的に上昇することは太田ら<sup>2)</sup>により示されているが、この活性の上昇が遺伝子の転写の上昇によるものかどうかを調べる目的でノーザン分析を行った。5葉期のイネ (品種、愛知旭) の第5葉にいもち病菌を接種して経時的に mRNA を調製した。非親和性レース 131 を接種した場合は、リボキシゲナーゼの遺伝子発現が接種後 15 時間から増加していくことが明かとなった。また、親和性レース 007 を接種した場合は、リボキシゲナーゼ遺伝子の発現量は低かった。この抵抗性を示す組合せでのリボキシゲナーゼ遺伝子の発現の経時的変化はいもち病菌の侵入とその後の感染菌糸の伸長停止時間によく一致している。以上の結果は、リボキシゲナーゼの遺伝子発現を伴う新たな病害抵抗性の発現制御機構の存在を強く示唆している。参考文献 1) D. Shibata, H. Ohta, Y.-L. Peng, K. Tanaka 2nd Int. Workshop Mol. Biol. Rice p. 37 (1990) 2) H. Ohta, K. Shida, Y. Morita, Y.-L. Peng, I. Furusawa, J. Shishiyama 5th Int. Congress Plant Pathology p. 250 (1988)

## 2aD05

イネの細胞膜上でのいもち病抵抗性遺伝子産物の探索の  
試み

°宮本 勝, 清沢茂久<sup>1</sup>, 児玉 治, 赤塚尹巳, 川崎信二<sup>2</sup>  
(茨城大・農・農化, <sup>1</sup>協和発酵, <sup>2</sup>農水省・生物研)

遺伝子対遺伝子理論では植物の病原菌に対する抵抗性は、それぞれの持つ非病原性遺伝子と抵抗性遺伝子とがそろった時に成立すると考えられており、実際にいくつかの非病原性遺伝子が主に細菌から分離されているが、植物の抵抗性遺伝子の実体はまだほとんど知られていない。植物の抵抗性反応が病原体の種類によらず、ほぼ同様であることから、抵抗性遺伝子産物は病原体の認識に関与していることが予想される。イネといもち病菌の間でもこの遺伝子対遺伝子の関係が成立すると考えられ、日本産のイネでは9種類のPiと呼ばれる抵抗性遺伝子の存在が遺伝学的に示されており、そのcongenic lineの作製の試みもなされる等、この理論の検証には良い材料と考えられた。

抵抗性遺伝子の産物が病原体の特定成分のレセプターであるとすれば、それは細胞表面上に発現されている可能性が高い。そこでこの仮説の元に、抵抗性反応が最も強く現れる組織であるイネの緑葉から細胞膜を単離し、日本晴のPiのcongenic lineの間で、2次元電気泳動によりその構成タンパク質の比較を行なった。その結果、Pi-aとPi-iを持つ系統にそれぞれ、他の系統とは異なるタンパク質のスポットを見出した。

## 2aD06

トランスポゾン (Tn5)-標識化による *A. tumefaciens* の  
病原性に関与する外膜タンパクとその遺伝子の同定  
姜熙玩、°小島峯雄 (名大、農、生化学制御)

〔目的〕 *A. tumefaciens* は双子葉植物と2-3の単子葉植物の傷口に感染し、本菌が保有しているTi-plasmid 中の一部分(T-DNA)を宿主植物の染色体に転移することによりゴールを形成する。ゴール形成の全体的機構に関してはほぼ明らかにされている。しかし、本菌の外膜が T-DNAの宿主植物への転移や宿主特異性発現においてどのような役割を果たしているかについては不明である。この点についての知見を得るために本研究を行った。〔方法及び結果〕 *A. tumefaciens* (ATCC23308, octopine型)をTn5をもつ *E. coli* (pCHR81, 東大、笹川千尋氏より分譲)と接合させた後、ネオマイシン(neo)を含む最少液体培地中で、42℃, 17時間加熱処理した。処理菌をneoを含む固形培地上で選択し、各コロニーを増殖させ、ニンジン切片に接種し、ゴール形成の有無で病原性を判定した。このようにして、多数の非病原性変異株を得、これらの外膜タンパク質をSDS-PAGEで分析した。これらの分離株の一つ(B-39株)は約18KDaの外膜タンパクを欠失していた。このB-39株の継代培養中に出現したneo感受性復帰菌(B-49株)は病原性を完全に回復し、外膜タンパク質も親株のそれに復帰していた。Tn5の挿入部位をSouthern法を用い調べたところ、B-39株の染色体DNAに検出され、Ti-plasmidには検出されなかった。今後このTn5が挿入された遺伝子を分離し、その構造を解析する予定である。

## 2aD07

線状dsDNAをゲノムとするクロレラウイルス(Saijo Virus)のゲノム解析及び感染特性  
山田 隆(広大・工・醗酵)

単細胞緑藻クロレラに感染するウイルスを自然界より分離し、その性状、感染特性、ゲノム構造(制限酵素地図)等を明らかにしたので報告する。

ウイルスの検出は *Chlorella* sp. NC64A株を検定菌としてプレート上でのブランクアッセイ法に依った。ウイルス源には広島大学西条キャンパス周辺及び京都市内の自然池の水を用いた。何れのサンプルからも100 $\mu$ l当り6~500 pfuの頻度でウイルスブランク(径0.5~1.0 cm)が検出され、その数は季節により変動した。精製ウイルス粒子より検出したゲノムは総ての場合において線状dsDNAであり、パルスフィールドゲル電気泳動法によりサイズは340~370 kbpと決定した。ウイルスSVK1, SVK2のゲノムについて制限酵素解析を進め、*Nae*I, *Not*I, *Sfi*I, *Sse*Iの各サイトのマッピングを行った。線状DNAゲノムの構造上の特徴を議論したい。更にSVK1感染細胞よりウイルス耐性変異株K1R1~K1R3を単離した。これら耐性株は他起源のウイルスに対しても耐性を示し、一連のクロレラウイルス(Saijo Virus)の近縁性を示唆している。K1R2, K1R3は不安定で、プレート培養中、不定形ブランクを低頻度で形成する。このブランクより単離したウイルスゲノムには変化が起こっていることが制限酵素解析により判明した。電顕観察により、Saijo Virusは巨大な( $\phi$ =130~200 nm)正二十面体構造をしており、植物には極めて希なIridoviridae型であることが分かった。

## 2aD08

ベラドンナ培養根と放線菌(*Nocardiosis sp.*)との相互作用による赤色色素の生成様式  
○野末雅之、清水圭祐、清水豊、高山真策<sup>1</sup>(信大・理・生物、<sup>1</sup>PCCテクノロジー・筑波研)

ベラドンナ培養根に放線菌(*Nocardiosis sp.* BL-1)を接種して培養すると、培地中に赤色色素が生産される(高山ら、日本生薬学会、1990)。ベラドンナ根のろ液に菌を接種しても同様に色素が生産されることから、色素生成に必須の因子がベラドンナ根から培地中に分泌されると考えられ、今回その因子の分離を試み、その諸性質を検討した。

ベラドンナ(*Atropa belladonna*)の培養根と放線菌(*Nocardiosis sp.* BL-1)を実験材料に用いた。ベラドンナ根の培養は、MS液体培地(6% ショ糖、0.3mg/1NAAを含む)を、また放線菌の培養には、ブイヨン培地を用いた。ベラドンナ根の培養ろ液に放線菌を接種し、25 $^{\circ}$ C、暗所で振とう培養し、赤色色素を生産させた。色素量は、525 nmの吸光度を測定して求めた。

ベラドンナ根培養30日目のろ液を濃縮後、セファデックスG-25でゲル濾過し、色素生成の活性分画を得た。活性分画のピークは、280 nmの吸収パターンと一致し、分子量マーカーとして用いたビタミンB<sub>12</sub>(1,355)の直後に溶出された。また、諸性質を検討した結果、活性分画中の色素生成因子は、熱に比較的安定な水溶性の低分子化合物であることがわかった。

## 2aE01

ホウレンソウRuBisCOが示す履歴現象へのRuBisCO  
activaseの影響

○辻本 憲孝、横田 明穂 (大阪府大・農)

不活性型のRuBisCO(E)は $^1\text{CO}_2$ (C)と $\text{Mg}^{2+}$ (M)を結合しECMとなって触媒機能を発現する。活性化されたRuBisCOを $^2\text{CO}_2$ ならびにRuBPと反応させると、最初の数分は高い活性(initial burst)を示すが、その後活性は低下し反応は直線的に進行する(linear phase)。これはRuBisCOがinitial burstでECM $^*R$ 、linear phaseでは0.1~1.0mM RuBP存在下でE $^*CM^*R$ 、2~5mM RuBP存在下で'RECM $^*R$ 及び'RE $^*CM^*R$ 構造を取ることに由来する履歴現象のためである。また、RuBisCO activaseはその機能発現に2mM以上のRuBPを必要とするとしてされている。そこで本研究ではRuBisCOの機能形態変化に及ぼすRuBisCO activaseの影響を調べた。

RuBisCO(E)にRuBPを終濃度0.5mM加えて不活性型のRuBisCO(E $^*R$ )とした。これを4mM RuBP、ATP、ATP再生系およびactivaseを含む系に加えてactivaseの反応を開始させた。活性化後一定量をRuBisCOのcarboxylase反応系へ加えてRuBisCOの反応の経時変化を追跡した。activaseによって活性化されたRuBisCOの反応は反応時間に対して直線的に進行し履歴現象は全く示さなかった。このことはactivaseによるE $^*R$ の活性化によって生成したRuBisCOは'RECM $^*R$ と'RE $^*CM^*R$ の混合形態を採っていると思われる。一方、RuBisCOの示す履歴現象に及ぼすactivaseの影響を調べたところ、activase無添加系と同様に履歴現象がみられた。これらの結果から、RuBisCOの機能形態変化(履歴現象)には影響しないと考えられる。

## 2aE02

ホウレンソウRuBisCOに対するモノクローナル抗体の  
作成とその特性

○横田明穂、久延 薫<sup>1</sup>、渡海 寛、重岡 成<sup>1</sup>、小崎俊司<sup>2</sup>  
(大阪府大・農、<sup>1</sup>近畿大・農、<sup>2</sup>大阪府大・農・獣医)

RuBisCOは光合成と光呼吸代謝系の初発反応を触媒する酵素で、植物の光合成効率を決定する重要な代謝的な位置を占めている。これまでRuBisCOの構造と活性発現の関連について、RuBisCO反応中心アミノ酸の化学修飾やX線回折さらには分子生物学的手法によって研究され、多大なる成果を収めてきた。一方、モノクローナル抗体(MAb)は抗原タンパク質の多くのアミノ酸残基を一度に不活性化してしまうという点で、これまでの手法と根本的に異なる。また、MAbは、抗原接種後のマウス体内での抗体産成段階において実験者の意志が入りえないという点で、予期できないほど素晴らしい成果をもたらす可能性を秘めている。本研究ではこのような期待を持ってホウレンソウRuBisCOに対するMAbを作成したので、その特性について発表する。

得られたMAbは2系統8種類で、すべてIgMであった。ホウレンソウRuBisCO以外にEuglena RuBisCO、Synechococcus RuBisCOとよく反応したが、Rhodospirillum RuBisCOとの反応は弱いものであった。これらの反応はRuBisCOがSDSや尿素による変性を受けても影響されなかった。また、MAbはRuBisCOのlarge subunitおよびsmall subunit両方に反応性を示したが、RuBisCOのcarboxylase反応およびこの過程で起こる履歴現象には全く影響しなかった。これらの結果は、両subunitのアミノ酸配列上に相同性は高いが反応には一切関与しない配列が存在することを意味している。現在その相同配列部位を決定中である。

## 2aE03

ホレンソウRuBisCO活性調節部位への種々の糖リン酸の結合親和性について

○東岡 雅也、横田 明穂 (大阪府大・農)

RuBisCOは、その活性発現に活性化を必要とする。活性化された植物のRuBisCOは、基質RuBPとCO<sub>2</sub>が与えられた後活性はゆっくりと低下し、反応開始数分後には反応開始直後の活性の50~80%に低下したsteady rateを示すような二相性の反応を示す。この二相性の反応はRuBisCOが本来持っているhysteretic propertyによるもの和我々は考えている。1mM以下のRuBP存在下ではRuBPは基質部位に結合しinitial burstを示し、その後蛋白構造がゆっくりと変化し活性の低い構造をとる。しかし、2mM以上ではRuBPは基質部位に加え、hysteresisを示す前と示した後の両方のRuBisCOの基質部位とは異なる部位(我々は活性調節部位と呼んでいる。)にも結合し、hysteresisによる活性の低下が50%程抑えられる。ケイ光プローブを用いたRuBisCOの構造と活性に関する研究によっても活性調節部位の存在が示唆されている。そこで、HummelとDreyerらの方法に従い、ゲルろ過によってこれらの化合物のRuBisCOへの結合量と結合親和性について検討してみた。

CABPの結合量は100 $\mu$ Mで最大となり、RuBisCO 1mol当たり基質部位数8molの約2倍に相当する15.8molであった。また、CABP濃度に対して結合量をプロットしてみるとbumpy curvesが描けた。以上の結果からRuBisCOには活性調節部位が存在し、その部位への結合は結合量の増加に伴いKdが30.6 $\rightarrow$ 13.9 $\mu$ M, 486 $\rightarrow$ 0.68 $\mu$ Mに大きく低下するような正の協同性を示す二成分からなることが明らかとなった。RuBPおよび6-PGの結果についても報告する予定である。

## 2aE04

ホウレンソウRuBisCOへのRuBP構造アナログの影響

○横田 明穂、泉川 達也 (大阪府大・農)

植物由来の活性化RuBisCOは、反応に伴い活性が低下する、いわゆる履歴現象を示す。これは、基質結合部位にRuBPが結合した後、RuBisCOが反応開始直後とは異なる活性の低い別の形態を採るためである。RuBisCOにはまた、活性調節部位も存在し、この履歴現象を弱める働きを示すことが最近の我々の研究で明らかになってきた。これらの部位にはRuBPのほか、6-phosphogluconateやRuBisCOのcarboxylase反応中間体の構造アナログ(CABP)も結合する。本研究では、これらの両部位の化学構造と結合特性を検討するために種々のRuBP構造アナログを合成し、それらがRuBisCOの履歴現象と活性調節部位に及ぼす影響について検討した。

Xylulose 1,5-bisphosphate(XuBP)は基質結合部位にのみ結合し、RuBisCOのcarboxylase反応の基質になると同時に活性化RuBisCOから活性化CO<sub>2</sub>をゆっくりと放逐した。XuBP carboxylase反応の反応生成物は3-phosphoglycerateであった。この反応の最大速度はRuBP carboxylase反応の場合の0.03%で、K<sub>0.5</sub>(XuBP)は12~15  $\mu$ Mであった。XuBPの活性化CO<sub>2</sub>の放逐作用は可逆であった。RuBisCOによる反応系中のXuBPの消費に伴いRuBisCOは再び活性化された。一方、糖酸であるD-glucarateはRuBisCOの基質結合部位に結合し、RuBPが引き起こすようなタンパクの構造変化を誘引した。また、carboxylase反応をRuBPに対して拮抗的に阻害し、K<sub>i</sub>値は2.5 mMであった。

## 2aE05

高等植物型 RuBisCOのラン藻における発現

○和田正悟、和田野晃、横田明穂、姫野道夫、

小林裕和<sup>1</sup> (大阪府大・農・農化、<sup>1</sup>名大・RIセンター)

RuBisCOのCO<sub>2</sub>に対する親和性は高等植物において最も高く、ラン藻や光合成細菌などの原核生物では一般に低い。そこで、CO<sub>2</sub>に対する親和性の低いRuBisCOをもつ光合成生物の光合成能の改良方法の一つとして親和性のより高いRuBisCO遺伝子の導入が考えられる。我々はラン藻 *Synechococcus* PCC7942 (Km(CO<sub>2</sub>) = ~250 μMのRuBisCOをもつ) に紅色光合成細菌 *Chromatium vinosum*由来のCO<sub>2</sub>に対する親和性の高い高等植物型RuBisCO (Km(CO<sub>2</sub>) = 37 μM)の遺伝子を導入・発現させ、その形質転換ラン藻の性質について調べた。

組換えプラスミド(pUCV1)は、*C. vinosum*のRuBisCO遺伝子(3.6kb)をラン藻-大腸菌シャトルベクタープラスミドpUC303のXbaI-XhoI断片(8.0kb)に挿入し作成した。形質転換の結果、クロラムフェニコール耐性のラン藻MT1を得た。MT1中での*C. vinosum*-RuBisCOタンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより確認した。また、MT1より調製した菌体抽出液のRuBisCOの比活性は、野生株に比べ約1.4倍に増加していた。さらに、光合成酸素発生速度を測定した結果、MT1では野生株に比較して最大速度が約20%増加していた。

## 2aE06

代謝中間体によるカルビンサイクルの調節

○岩城俊雄、和田野晃、横田明穂、平橋智宏、

姫野道夫 (大阪府大・農・農化)

カルビンサイクルはトリオスリン酸を介して細胞質とつながったリブーロス 1,5-ビスリン酸(RuBP)の再生系である。光飽和条件で緑葉周辺のCO<sub>2</sub>濃度を変化させると、カルビンサイクル中のRuBPと3-ホスホリブリン酸の定常状態濃度は大きく変化するが、他の中間物濃度はほぼ一定に保たれている。その時、RuBPの合成速度はCO<sub>2</sub>固定速度にほぼ等しい0~350 μmol/mg Chl/hrの範囲で変化する。リブーロス 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシナーゼ(RuBisCO)はCO<sub>2</sub>固定を触媒する酵素であるが、上に述べたようなCO<sub>2</sub>濃度変化にともなうRuBP合成速度(カルビンサイクルのRuBP再生速度)に対する調節は、RuBisCOに対する調節だけではなく他の調節ステップとの協調を考慮しなければならない。

アルトラーゼはトリオスリン酸から、カルビンサイクルの最初の不可逆ステップを触媒するフルクトス 1,6-ビスリン酸に、その基質であるフルクトス 1,6-ビスリン酸を供給する酵素である。ホソウタバコから精製したクロロプラストのアルトラーゼは、生理的濃度のRuBPによって阻害を受け( $K_i=0.78$  mM)、RuBPの定常状態濃度変化に対応してそのFBP合成速度が20~100 μmol/mg Chl/hrと変化する事がわかった。そこで、このアルトラーゼのRuBP再生系の調節に対する寄与を明らかにするために、カルビンサイクルのWoodrow-モデルにアルトラーゼの項を加え検討したところ、アルトラーゼが重要な調節ステップであることが明らかになった。

Woodrow, I.E. (1986) BBA 851: 181-192.

## 2aE07

### 重水素化クロレラの炭素代謝とその調節

○榎葉繁紀、植村照美、海野けい子、岡田昌二  
(静岡県大・薬・放射薬品)

〔目的〕演者らはクロレラ(*Chlorella ellipsoidea* C-27)を用いて重水素(D)の生物学的同位体効果を検討しており、先の大会において細胞成分がD化することによりクロレラの炭素代謝の主経路が、シヨ糖合成からデンプン合成へと変化することを示唆した。そこで今回、クロレラの炭素代謝に関係した酵素活性ならびにデンプン及びシヨ糖含量に対する細胞成分のD化の影響を検討した。

〔方法〕酵素活性はH<sub>2</sub>O培地中で培養したクロレラ(H-クロレラ)ならびにD<sub>2</sub>O培地中で培養したクロレラ(D-クロレラ)から調製したホモジネート用いて測定した。また、デンプン及びシヨ糖含量はRaoらの方法により測定した。

〔結果〕① デンプン及びシヨ糖含量に対する影響 H-クロレラに比較してD-クロレラにおけるデンプン含量は著しく増加しており、その一方でシヨ糖ならびにグルコース含量は有意に低下していた。

① 酵素活性に対する影響 D-クロレラにおいてはstarch synthase活性の著しい増加ならびにamylase及びphosphorylase活性の低下がみられた。

〔考察〕細胞成分のD化はデンプンの合成酵素活性を増加させるとともに分解酵素活性を低下させることによりデンプン含量を増加させることが示された。

## 2aE08

### イネの穎におけるC<sub>4</sub>型炭素代謝の駆動

今泉信之、石原 邦、<sup>○</sup>鮫島宗明<sup>1</sup>

(東京農工大・農、<sup>1</sup>農水省・生物研)

前報で、イネ内外穎のC<sub>4</sub>光合成関連酵素活性が止葉よりも高く、その値は内外穎中のRuBPCase活性にほぼ等しいことを報告した。さらに開花後6日目の外穎ではPPDKの発現量が顕著に増大し、光合成炭酸固定の初期産物としてC<sub>4</sub>化合物を生じる割合が止葉よりも多いことを明かにした。

そこで、イネの穎中でC<sub>4</sub>光合成型の炭素代謝が駆動している可能性を明らかにするため、以下の実験を行った。まず外穎をCO<sub>2</sub>を含まない気相中で15分間照射し、照射停止と同時に<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を与え炭酸固定を行わせた。前照射後の暗所30秒間<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>は光合成に匹敵する速度で固定され、暗固定産物中の<sup>14</sup>Cは97%以上がC<sub>4</sub>化合物中に取り込まれ、他の化合物中には移行していなかった。その後、系内の<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>に切り替えると共に照射を開始(再照射)したところ、再照射20秒の間にC<sub>4</sub>化合物中の<sup>14</sup>Cの約50%は3-PGAおよび糖リン酸を経て、シヨ糖へと移行した。さらに、暗所<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>下で生成したリンゴ酸中の全<sup>14</sup>C量の83%がC-4位に分布していたことから、リンゴ酸中の<sup>14</sup>CはC<sub>4</sub>光合成的代謝を経てカルビン回路へと移行したことが明かとなった。

## 2aE09

H<sup>+</sup>またはNa<sup>+</sup>ジャンプによる葉肉細胞葉緑体のビルビン酸輸送の促進—イネ科C<sub>4</sub>種間の比較

大西純一<sup>○</sup>, 青木直大, 金井龍二(埼玉大・理・生化)

C<sub>4</sub>植物の葉肉細胞葉緑体(MCp)は, 光に依存して能動的にビルビン酸を取り込む。キビ(*Panicum miliaceum*)を含むいくつかの種では, 光の代わりに外液のNa<sup>+</sup>濃度を急に増加させること(Na<sup>+</sup>ジャンプ)がビルビン酸取り込みを促進する事が見いだされ, これらでは, Na<sup>+</sup>とビルビン酸の共輸送(cotransport)が働いている事が示された。しかし, トウモロコシ(*Zea mays*)やソルガム(*Sorghum bicolor*)のMCpでは, Na<sup>+</sup>ジャンプは無効で, その代わりにH<sup>+</sup>ジャンプ(外液のpH低下)が有効であり, H<sup>+</sup>との共輸送が働いていると思われる(90年度植物学会発表)。今回, 20種以上のイネ科C<sub>4</sub>種の葉肉細胞プロトプラストよりMCpを単離し, それぞれについて, Na<sup>+</sup>ジャンプ, H<sup>+</sup>ジャンプの何れが暗所でのビルビン酸取り込みを促進するかを調べた。その結果, カゼクサ亜科(Eragrostoideae)に属するギョウギシバ連(Chloridoideae; PEP-CKおよびNAD-ME型を含む)2属3種, カゼクサ連(Eragrosteae; NAD-ME型)1種およびヒゲシバ連(Sporoboleae; PEP-CK型)1種, そしてキビ亜科(Panicoideae)のキビ連(Paniceae; 全ての型を含む)6属11種では, すべてNa<sup>+</sup>ジャンプが有効で, H<sup>+</sup>ジャンプの有効なのは, 進化分類上比較的新しいC<sub>4</sub>群であるキビ亜科ヒメアブラサスキ連(Andropogoneae)に属する3属4種(*Zea*, *Sorghum*, *Coix*; すべてNADP-ME型)に限られていた。

## 2aE10

クラミドモナスにおける高CO<sub>2</sub>要求性を示さない  
ホスホグリコール酸ホスファターゼ活性欠損変異株

鈴木健策, L.F. Marek<sup>1</sup>, M.H. Spalding<sup>1</sup>, 猪川倫好  
(筑波大・生物, <sup>1</sup>アイオワ州立大・植物)

5%CO<sub>2</sub>を通過して培養した単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を大気条件下(21% O<sub>2</sub>, 0.04% CO<sub>2</sub>)に移すと光合成のCO<sub>2</sub>に対する親和性が著しく高まり, 光呼吸も見かけ上観察されなくなる。これは低CO<sub>2</sub>下で「CO<sub>2</sub>濃縮機構」と呼ばれる仕組みが誘導され葉緑体内にCO<sub>2</sub>が濃縮されることにより, RuBPカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼのRuBPカルボキシラーゼ活性が高まりRuBPオキシゲナーゼ活性が低く抑えられるためと考えられている。しかし低CO<sub>2</sub>培養細胞でも無視できないレベルの光呼吸が起こっており, 光呼吸の最初の産物のホスホグリコール酸をほとんど代謝できない突然変異株であるホスホグリコール酸ホスファターゼ活性欠損変異株(*pgp-1*)は大気条件下では独立栄養的に全く生育できない(Suzuki et al. 1990 Plant Physiol. 93:231-237)。これは蓄積したホスホグリコール酸がトリオースリン酸イソメラーゼを阻害し光合成が著しく低下するためと考えられる。我々は最近, ホスホグリコール酸ホスファターゼ活性が *pgp-1* 同様低いにも関わらず大気条件下でもほぼ正常に生育できる変異株を単離することに成功した。今回は, そのうち特に生育の良かった4つの株と, 野生株及び *pgp-1* について光合成<sup>14</sup>C代謝, ホスホグリコール酸ホスファターゼ活性とそのpH特性, トリオースリン酸イソメラーゼのホスホグリコール酸に対する感受性等について比較検討を行った。

## 2aF01

フィトクロムによるホウライシダ胞子の第一回核分裂の誘導と青色光による抑制

古谷雅樹、神野美佐緒、岡本晴子(理研・フロンティア)

真正シダ目の胞子発芽は、フィトクロムと青・近紫外光受容色素を介して制御されている(Furuya, *Encycl. Pl. Physiol.* 16B, 1983)。ホウライシダの休眠胞子では、吸水後に赤色光照射を連続的に受けると約40時間目までに、短時間だけ受けると約100時間目までに核分裂が誘導される。この赤色光効果は、近紫外光照射によって光可逆的に、青色光によって光非可逆的に抑えられる(Kanno et al 1989)。

この核分裂の光調節と、古くから知られている光発芽(原糸体・仮根の出現)の関係を調べるために、第1回核分裂を終えた直後の胞子に種々の光照射を行ってみたところ、光照射の条件に関わらず、第1回核分裂を終えた胞子は全て発芽し、核分裂後から発芽までの間に光調節反応は見いだせなかった。従って、狭義の発芽は光調節されておらず、いわゆる光発芽は第1回核分裂がフィトクロムのPfrによって誘導された結果として引き起こされることが解った。また、Pfr依存光発芽を阻害する青色光の作用(Sugai & Furuya 1967)は、上記のPfr依存核分裂誘導に対する抑制であって、核分裂後は発芽まで全く効果がないことが解った。

原糸体の核分裂は青色光でG<sub>1</sub>期からS期へ誘導される結果(Miyata et al 1979)引き起こされるので、発生の進行にともなって、光を受容するフィトクロムの分子種が交代するか、光情報伝達系が変わるか、など調べるのが今後の課題である。

## 2aF02

イネI型フィトクロム遺伝子を導入したタバコにおけるフィトクロムによる下胚軸の伸長と緑化の調節

・長谷あきら、西沢直子<sup>1</sup>、S. A. Kay<sup>2</sup>、M. Deak<sup>2</sup>、N. -H. Chua<sup>2</sup>、古谷雅樹(理研・FRP、<sup>1</sup>東大・農・農化、<sup>2</sup>Rockefeller大)

フィトクロムは緑色植物界に広く存在する色素蛋白質で、様々な光形態形成反応の光受容体である。我々はフィトクロムの作用機構を探るためイネI型フィトクロム遺伝子をタバコに導入し(Kay et al., 1989)その生理作用を調べてきた。その結果、弱白色光下(0.01W/m<sup>2</sup>)ではイネI型フィトクロムを過剰に発現しているタバコの下胚軸は対照植物に比べ著しく短いことをみいだした(本大会1990年度年会)。本研究ではこの現象をさらに詳しく解析した。

まず、この反応の赤・近紫外光可逆性について調べたところ、赤色光による短時間照射(4時間おきに5分間)で反応が起こり、赤色光の効果は近紫外光照射により打ち消されることがわかった。従って、観察された下胚軸の伸長抑制がフィトクロム依存であることが確かめられた。さらに、反応の光強度依存性を求めたところ、遺伝子導入植物では見かけ上対照植物の1000倍程度光感受性が高められていることがわかった。また、緑化の過程もフィトクロムにより制御されているので、子葉におけるクロロフィルの蓄積についても光強度依存性を調べたが、この反応に関しては対照植物の10倍程度しか光感受性が高まっていなかった。これは、クロロフィルの蓄積にはフィトクロム以外の光受容体も関与しているためと考えられる。さらに、クロロプラストの発達についても電子顕微鏡による詳しい解析を試みた。

## 2aF03

酵母で発現させたエンドウフィトクロム I 蛋白質への  
クロモフォアの導入

<sup>1</sup>富澤健一、<sup>1,2</sup>Lily Deforce、<sup>1</sup>伊藤直子、  
<sup>1,2</sup>Pill-Soon Song、<sup>1</sup>古谷雅樹  
(<sup>1</sup>理研フロンティア、<sup>2</sup>ネブラスカ大)

フィトクロム I (PI) は単量体分子量 124kDa の光受容蛋白で、その発色団が蛋白部分に共有結合している。PI アポ蛋白と発色団との相互作用を理解する上で、試験管内再構成系における解析は多くの知見が期待できる。PI アポ蛋白については、我々はすでにエンドウ PI cDNA を酵母で発現させる系を開発している。また、発色団についてはフィトクロム発色団(フィトクロモビリン)の類似体であるフィコシアノピリンを単離する方法が報告されている。そこで本研究は、PI アポ蛋白と発色団による試験管内再構成系を確立するとともに、いくつかのアミノ酸配列の欠損したアポ蛋白を用い、どの配列が発色団の取り込みに必須かについての知見を得ることを目的として行なった。トランスジェニック酵母から得られる PI アポ蛋白と精製したフィコシアノピリンとを 4°C で放置したところ赤近赤外光可逆性を示す産物が 5 分以内に生成した。またこの産物を SDS-PAGE により展開し、Zn<sup>2+</sup> による蛍光を観察したところ、120kDa 付近に蛍光が見られた。このことは発色団がアポ蛋白に共有結合していることを示している。この発色団の取り込みは、N-端より 46 個あるいは、C-端より 576 個のアミノ酸を欠損させても起こるが、225 個の欠損では同様の条件では取り込みは見られなかった。このことは、発色団の取り込みに対し、N-端より 46-225 のアミノ酸配列が関係することを示唆している。

## 2aF04

大腸菌で発現させた II 型フィトクロム遺伝子 (*phyB*)  
の産物に対する単クローン性抗体の作製

・長谷あきら、E. Lopez、富澤健一、S. A. Kay<sup>1</sup>、R. Kern<sup>1</sup>、M. Deak<sup>1</sup>、N.-H. Chua<sup>1</sup>、古谷雅樹 (理研・FRP、<sup>1</sup>Rockefeller 大)

フィトクロムは緑色植物界に広く存在する分子量約 12 万の色素蛋白質で、様々な光形態形成反応の光受容体である。最近フィトクロムには複数の分子種が存在することが明らかにされた (Abe et al., 1989; Sharrock & Quail, 1989)。これらの分子種の機能上の差異などを調べるには、分子種特異的な抗体を持つことが望ましいが、I 型フィトクロム以外の分子種は微量しか存在せず従来の方法で抗体を作製するのが困難であった。そこで本研究では大腸菌で発現させたタバコ II 型フィトクロム蛋白質断片に対する単クローン性抗体を作製しその性質を調べた。

まず、発現ベクターを用いたタバコ II 型フィトクロム遺伝子断片 (2.5kb) を大腸菌で発現させ同蛋白質標品を得た。次に、この蛋白質でマウスを免疫し、常法により単クローン性抗体産生株 6 株を得た。陽性クローンの検出はドット・プロット法で行なった。次に、タバコの粗抽出液との反応をウェスタン・プロット法で調べたところ、これらの抗体は分子量約 12 万のタバコの蛋白質を認識することがわかった。また、これらの抗体と反応する蛋白質の含量は黄化組織と緑色組織でほぼ同じであった。以上の知見は、得られた抗体がタバコの II 型フィトクロムを特異的に認識していることを示唆している。また、これらの抗体の幾つかは、トマト、キュウリ、*Arabidopsis* のフィトクロムとも交叉反応を示した。

## 2aF05

### The *lh* mutant of cucumber lacks a type II phytochrome protein and shows an extreme shade-avoidance reaction.

E. López, A. Nagatani, R. E. Kendrick<sup>1</sup>, M. Koornneef<sup>1</sup>, J. Wesselius<sup>1</sup>, M. Furuya (FRP, RIKEN, <sup>1</sup>Agricultural Univ., Wageningen)

Phytochrome photoreceptor controls various aspects of plant development, including expression of different genes during first dark to light transition, or shade-avoidance growth reaction upon perception of far-red enriched shade light environment. We have shown that a *long hypocotyl* (*lh*) mutant of cucumber specifically displays a constitutively saturated shade-avoidance reaction, involving various developmental responses. This has been attributed to deficiency or damage to a light-stable form of phytochrome.

In *Arabidopsis thaliana* a minimum of three different genes coding for phytochrome have recently been found (*phyA*, *B*, *C*), *phyA* coding for the well known, light-labile phytochrome polypeptide. We have used a cDNA clone from tobacco, homologous to *Arabidopsis phyB*, to produce specific monoclonal antibodies (see abstract by Nagatani et al.). One such antibody, mAT1, could recognise in immunoblots a single band, the size of phytochrome, in extracts from wild type cucumber tissue, but that band was missing in the *lh* mutant. On the other hand light-labile PhyA polypeptide, as recognised by the PhyA antibody mAP5, was present in both wild type and the mutant. The kinetics of decay in the light of PhyA polypeptide was consistent with that known for the chromoprotein by spectrophotometry, both in the wild type and the mutant. In contrast, the polypeptide recognised by mAT1 was light-stable.

The specific absence of a light stable phytochrome form, most likely a *phyB* gene product, in the *lh* mutant, gives support to the hypothesis of a main role for stable phytochrome in the broad, developmental shade-avoidance reaction.

## 2aF06

### Approaches to identifying and isolating phytochrome-binding proteins

Partis, M.D., Thomas, B. and Furuya, M. HRI, West Sussex UK; Riken, Japan

We have been attempting to identify components of the plant cell which interact with phytochrome. To this end, we have devised a variety of *in vitro* assays of phytochrome binding. These include (1) direct binding of phytochrome to membrane proteins separated by electrophoresis and transferred to solid phase, (2) production of site-directed antibodies and antipeptides, and (3) photoaffinity labelling with synthetic peptides corresponding to portions of the phytochrome molecule which have been identified as potential interactive sites by computer modelling.

Using these assays, a component of oat etioplast membranes has been shown to bind phytochrome. The binding of Pfr and Pr appears to be of equal affinity, but is reduced following irradiation of tissue with red light. The extent of binding may be inhibited by Fab fragments of a site-directed antibody to an amphiphilic region at the C-terminus of phytochrome but not by monoclonal antibodies to other epitopes, implicating this area in the binding. Pea phytochrome can substitute for the oat protein, and pea etioplasts for the oat membranes, indicating that the binding is conserved. We are using this feature of the binding to screen expression libraries in  $\lambda$ ZAP and PUC19 for this and other phytochrome-binding proteins.

## 2aF07

Phytochrome regulation in *Pinus palustris*

SILVERTHORNE, Jane (Department of Biology, University of California, Santa Cruz, USA)

We have cloned genomic fragments containing genes for the light-harvesting chlorophyll *a/b*-proteins associated with Photosystem II (*cab*) and for phytochrome (*phy*) from the pine *Pinus palustris*. As has been observed in many gymnosperms, this pine can synthesize a limited amount of chlorophyll in the cotyledons during early seedling development in a light-independent manner. The light-harvesting chlorophyll *a/b*-proteins associated with Photosystem II are absent in the embryo but accumulate soon after germination and are inserted into thylakoid light-harvesting complexes, regardless of the light conditions. The total *cab* mRNA is also absent in the embryo but accumulates in a light-independent manner during seedling development. We are therefore interested in characterizing these genes with respect to the regulation of their expression during seedling development. We have found that this pine contains three *cab* genes and we have started to examine the expression of each gene with respect to the role of phytochrome and tissue specificity. In addition, we have so far cloned fragments encoding two different *phy* genes from this pine and have studied the expression of these genes in response to light conditions and during development. Results from these studies will be presented.

## 2aF08

Structure and expression of the *Phaseolus vulgaris* *rbcS* genes.

G.I. Jenkins, T.I. Sawbridge, M.R. Knight, N.A.R. Urwin and E. Lopez.

Biochemistry Department, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, U.K.

The small subunit (*rbcS*) of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the French bean *Phaseolus vulgaris* L. is encoded by a small gene family consisting of probably three members. Three *rbcS* genes represented in a light-grown primary leaf cDNA library were characterised by sequencing cDNA clones. The genes were identical in their coding sequences, for both the transit peptide and the mature polypeptide, but divergent in their untranslated sequences. The first amino acid of the mature polypeptide was isoleucine, which differs from the methionine found in other *rbcS* genes. Surprisingly, one of the cDNA clones contained two introns, which were at positions conserved in *rbcS* genes from other species. This cDNA clone probably resulted from the cloning of an unprocessed transcript. Expression of the *rbcS* genes is stimulated by light, although transcripts can readily be detected in dark-grown primary leaves. Expression is also tissue-specific, as in other species. Gene-specific probes are being used to investigate the expression of individual members of the *rbcS* gene family, particularly with respect to the photoregulation of expression in light-grown primary leaves.

## 2aF09

Developmental gradients and photoregulation of amylases in developing monocot leaves

K.J.M.Vally, R.Datta and R.Sharma, University of Hyderabad, India.

Monocotyledon leaves presents a gradient of plastids and leaf cells at different developmental stages along the leaf axis by virtue of an active basal meristem contributing to the leaf elongation. Since both morphogenetic development of leaf and chloroplast biogenesis intimately depend on availability of light, an interrelationship between leaf development, chloroplast biogenesis and photoregulation of cytosolic and plastidic amylases were investigated. In maize (*Zea mays*) and pearl millet (*Pennisetum americanum*) seedlings light acting via phytochrome stimulated the level of amylases in the leaves. The above light mediated increase in amylolytic activity of leaf was largely confined to an increase in the level of  $\beta$ -amylase activity in leaf. The analysis of the gradient of photostimulation revealed that the maximal induction in  $\beta$ -amylase activity in above leaves is localized in the area close to the base of leaf. The subcellular fractionation studies showed that while  $\beta$ -amylase is confined to only cytosol of mesophyll cells,  $\alpha$ -amylase is present both in cytosol and plastids of above cells. Furthermore bundle sheath cells were essentially devoid of  $\beta$ -amylase activity and possessed only plastidic isoform of  $\alpha$ -amylase. The plastidic  $\alpha$ -amylase induction was intimately dependent on chloroplast biogenesis and followed a gradient akin to chloroplast development.

## 2aF10

Light-induced increase in inositol triphosphate in cotyledons of *Pharbitis nil*.

Peter J. Lumsden, Lancashire Polytechnic, U.K.

In the photoperiodic control of floral induction in the short-day plant *Pharbitis nil* light has two effects; to control the phase of the circadian rhythm responsible for photoperiodic time measurement, and to directly inhibit floral induction at certain phases of the rhythm. Both responses to light seem to involve the photoreceptor phytochrome.

We have examined whether the transduction of the light signal(s) might involve an increase in the intracellular concentration of inositol trisphosphate ( $IP_3$ ), a central mechanism for the transduction of hormone, neurotransmitter and light signals in animals. Using radiolabelled substrates ( $^{32}P$ -orthophosphate and  $^3H$ -myoinositol) and an  $IP_3$ -specific binding assay we have found significant increases in  $IP_3$  following exposure to light which is known to cause a phase shift in the circadian rhythm involved in time measurement, but without a concomitant increase in concentration of diacylglycerol (DAG). We have also demonstrated the presence of a membrane-associated phospholipase C specific for phosphatidyl inositol bisphosphate ( $PIP_2$ ), a necessary element for the production of  $IP_3$  following receptor stimulation. The enzyme has a pH optimum of 6.8 and is activated by calcium ions, deoxycholate, CHAPS, phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine.

## 2aF11

### The Phytochrome-mediated Protein Dephosphorylation of the Phosphoproteins in Oat Cell

Moon-Hwan Park and Quae Chae\*

Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

According to our previous work (1,2), phosphorylations of two proteins ( 27 KDa, 32 KDa ) in oat cells were dependent on phytochrome action and protein kinase C or its like molecule was involved in this process. When the phosphorylation degree of these two proteins was examined as a function of red light irradiation time, dephosphorylation (second time scale ), phosphorylation (< 3 minutes ) and dephosphorylation (> 3 minutes ) were observed, respectively. In order to investigate the involvement of protein phosphatase in the processes of dephosphorylation of these two proteins, changes of phosphorylation degrees were measured by loading phosphatase inhibitors (okadaic acid, NaF ) into the oat cells. An inhibition of protein phosphatase was observed by addition of 10 mM NaF in both cases of dephosphorylation ( short time and long time ). When we added different concentrations of okadaic acid ( 1 nM, 15 nM, 1  $\mu$ M ) into the cell, the inhibition effect was only observed at its concentration of 1  $\mu$ M in both cases. These results suggest that protein phosphatase must be involved in the phytochrome-mediated dephosphorylations and the kind of phosphatase might be PP<sub>2B</sub> (calcineurin).

(1) Park, M. H. and Chae, Q. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 9-14.

(2) Park, M. H. and Chae, Q. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 1185-1190.

## 2aG01

### ナガイモの内生ジベレリン

丹野憲昭, 横田孝雄<sup>1</sup>, 安部 守, 岡上伸雄<sup>2</sup>

(山形大・理・生物, <sup>1</sup> 帝京大, <sup>2</sup> 東北大)

ジベレリン (GA) がいろいろな植物の休眠を覚ますことはよく知られている。しかし、低温処理などによって休眠を覚ましたナガイモのむかごでは、GA<sub>3</sub> 処理によって発芽が抑制される。また、CCCなどのGA生合成阻害剤は休眠しているナガイモのむかごを発芽させる。これらのことから、ナガイモのむかごの休眠の誘導・維持には内生GAが関与していると考えられる。ナガイモのむかごの休眠時における内生GAの動態を調べることは、GAによる休眠調節のメカニズムを理解するために重要である。ナガイモの内生GAについてはほとんど知られていない。そこで、休眠しているナガイモのむかごの内生GAの単離・同定を試みた。

約50kgのむかごから常法によって酸性酢酸エチル分画(26g)を得た。これを種々の充填剤を用いたオープンカラムに通し、ODS-HPLC, N(Me)<sub>2</sub>-HPLCで精製し、矮性イネ(短銀坊主)による生物検定で数種の活性分画を得た。現在、これらの分画に含まれるGAのGC-MSによる同定を行っている。

## 2aG02

エンドウ根のジベレリン誘導成長における細胞壁と細胞浸透圧の変化

谷本英一 (名古屋市立大学教養部生物)

ジベレリン合成阻害作用のある矮化剤・アンシミドールをジベレリンと共に用いることによってジベレリンによる根の伸長成長を誘導できる。演者はこの系を用いてジベレリンによる根の伸長成長の制御機構を考察してきた。キウリやエンドウの胚軸では、ジベレリンが細胞の浸透濃度を高めることが成長促進の要因であることが、風間・勝見および宮本・神阪によって明らかにされている。

しかし、根の伸長制御が浸透濃度の変化にどの程度依存しているのかは明らかではない。そこで今回は、アンシミドール(+)ジベレリン処理による根の浸透濃度の変化と細胞壁の伸展性の変化について報告する。細胞の浸透濃度は蒸気圧法によって求めた。細胞壁の伸展性は、根の外部浸透圧を加減したときの根の長さをリゾメーターでモニターする *in vivo extension* 法、およびメタノール固定した根の伸長帯切片を、テンサイルテスターにかける応力緩和法によって測定した。

細胞の浸透濃度は根の先端から基部に向かって上昇する傾向がみられた。ジベレリン処理によって根の浸透濃度は上昇せず、アンシミドール単独処理に比べてむしろ低下する傾向がみられた。

一方、*in vivo extension* 法による細胞壁の伸展性はアンシミドール単独処理によって著しく低下し、ジベレリン処理によって伸展性は高く保たれた。根の伸長帯の浸透濃度はジベレリンによって上昇しないので、*in vivo extension* 法による根の伸長増大は細胞壁の伸展性の増大を反映しているものと考えられる。山本・増田らによって確立された応力緩和法による解析では、少なくとも幼葉鞘や茎と同じ応力緩和条件下では最少緩和時間などのパラメーターにジベレリンの効果は現れなかった。しかし、応力歪曲線にはジベレリンの効果が見れており、オーキシンによる伸長促進の場合とは異なる細胞壁の性質にジベレリンの効果が見れていることが示唆された。しかし根の応力歪曲線の解析法は十分確立されていないのでこの点に関してはもう少し検討が必要である。

## 2aG03

エンドウ上胚軸の成長とインベルターゼ活性に対するジベレリンの影響

宮本健助、上田純一、桃谷好英、神阪盛一郎<sup>1</sup>(大阪府大・総合科学、<sup>1</sup>大阪市大・理・生物)

私たちはジベレリン(GA)の茎成長促進機構についてエンドウ芽生えを用い研究を行ってきた。GAが茎成長を促進するとき、子葉や茎の非伸長部域から伸長部域への糖の転流が促進され、そこに蓄積した糖は浸透物質や細胞壁多糖の合成基質として機能することを明らかにした。さらにGAによる成長および糖蓄積促進と、篩管からの糖のunloadingに関係すると考えられているインベルターゼ活性との間に高い相関関係があることを見いだした。そこで、エンドウ茎成長におけるインベルターゼの役割について研究を行い以下の結果を得た。

オーキシン(IAA、100ng/plant)は、GA( $10^{-5}$ M)と同程度にエンドウ茎成長を促進する。しかし、オーキシンは、茎伸長部域におけるインベルターゼ活性および糖蓄積量に対してほとんど影響しなかった。この事実は、GAによるインベルターゼ活性の上昇が単に茎伸長促進の結果によるものではないことを示している。また、遠心分離法により茎伸長部域のアポプラストの液を採取したところ、インベルターゼ活性の多くがこの分画中に認められた。この事から、GAが茎伸長部域のアポプラストに存在するインベルターゼ活性を高めて茎伸長部域における糖のunloadingを促進し、糖の蓄積を促進することが示唆された。現在、GAによって活性が上昇するインベルターゼの単離・精製を試みており、その結果を併せて報告する。

## 2aG04

ジベレリン生合成阻害剤を用いた $\alpha$ -アミラーゼ誘導の抑制

○光永伸一郎, 林誠, 赤沢堯, 山口淳二

(名大・農・生化学制御)

〔目的〕 ウニコナゾール (uniconazole) は、ジベレリン (以下GA) 合成のうち、カウレンからカウレン酸に至るステップを阻害し、植物の矮化を促す生長調整剤である。本研究では、正常品種である日本晴、GAの生合成系酵素が欠損している矮性変異体の短銀坊主と小丈玉錦の3種類のイネを用いて、それぞれの発芽過程 (特にGAと $\alpha$ -アミラーゼ誘導との相関関係) に及ぼすウニコナゾールの影響を比較・検討した。

〔方法・結果〕 3種類のイネ種子を、 $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ Mの濃度のウニコナゾールを含む培養液中で4日間発芽させ、誘導された $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した。さらに伸長生長との関係を調べるために、前述同様の処理を施した後、1週間生長させたイネの第2葉鞘の長さを測定した。その結果、1) 3種類のイネにウニコナゾールを施すと草丈の伸長は抑制されるが、GAを加えた場合にはその抑制が解除されること、2) 日本晴における $\alpha$ -アミラーゼ誘導は、ウニコナゾールによって殆んど抑制されないが、他の2種においては強く阻害されることなどが明らかになった。これらの結果から、伸長生長と $\alpha$ -アミラーゼ誘導に必要なGA濃度には違いがあり、後者に関してはより低濃度のGAで十分であると推察された。

## 2aG05

アラビドプシスを用いた発芽制御機構の解析

○南原英司, Peter McCourt, 赤沢堯 (名古屋大・農・生化学制御)

〔目的〕 発芽は種子が休眠を打破し生物的に活性化される段階である。一般に、休眠はアブシジン酸によって誘導されると考えられている。植物の種子の発芽はジベレリンによって誘導されることはよく知られているが、ジベレリンと発芽との関係についての研究は顕著な進歩がみられていない。そこで、私共はアブシジン酸欠損の突然変異体とジベレリン生合成阻害剤 (ウニコナゾール) を用いた解析に基づき発芽時におけるジベレリンの作用について考察する。

〔結果〕 アラビドプシスの野性株は高濃度 ( $10^{-4}$ M) のウニコナゾール存在下では発芽が阻害される。その阻害はジベレリンを加えることによって回復する。一方、アブシジン酸を合成できない突然変異体 (aba) とアブシジン酸耐性の突然変異体 (abi) を用いた実験の結果、これらの突然変異体はウニコナゾール存在下においても発芽することが明らかになった。これらの結果は、1) アラビドプシスの発芽にはジベレリンが必要であること、2) 発芽時の種子において、アブシジン酸が存在しなければジベレリンは必ずしも必要ではないことを示している。さらに、暗所においても発芽できる *Def* 突然変異体などについても同様の解析を行っているため、これらの結果もあわせて報告する。

## 2aG06

細胞壁における矮性発現と植物ホルモンの関与

佐藤竹哉・勝見允行（国際基督教大学・生物）

細胞壁組成について：トウモロコシのジベレリン（GA）欠損矮性突然変異 d5 の場合、その分離正常（高性）体との間で有意な差がみられたのは、ヘミセルロース B（HB）分画であり、d5 の方がその含量は多かった。HB 分画の構成分子の分子量分布を gel permeation HPLC で分析すると、d5 のピークは約 8 Kd にあって、正常体のピークが 0.3 Kd にあるのに比べて高子量の分子種からなっていることが分かった。d5 を GA で処理すると、HB 分画の含量も正常体程度に低下し、分子量分布のピークも低い方へシフトすることが分かった。この結果は、伸長成長には細胞壁の HB 分画が大きく関わっていること、GA の作用はこの分画と関係があることを示唆している。他方、正常体の数十倍もの GA を生産し、GA 受容体異常の突然変異と考えられている矮性トウモロコシ D8 では、HB 分画の量はその分離正常体よりやや多く、より多くの高分子量分子種を含んでいた。しかし、分子量分布のピークは両者とも、約 20 Kd であり、d5 の正常体の場合に比べて高いところで、ほぼ一致していた。D8 では、d5 に見られるような、正常体との間に顕著な違いは見られなかった。D8 は細胞壁以外に矮性の主な原因があるとも考えられる。

内生 IAA 量について：矮性発現と IAA 含量との相関が示唆されている例、また GA が IAA 含量に影響を及ぼす例が報告されているので、上記材料について検討した。IAA は常法により抽出し、GC-MS で測定した。d5 では、IAA 含量は正常体に比べて低かったが、GA はこれに対して影響がなかった。また、D8 では、その分離正常体との間に差は認められなかった。これらのことから、トウモロコシ d5 と D8 の矮性発現は内生 IAA のレベルとは直接関係がないものと思われる。

## 2aG07

ゼニゴケの細胞増殖に関与するプロテインキナーゼ（PKase）とその細胞内基質

金勝一樹、道家建二郎、大槻健蔵<sup>1</sup>（北里大・教養・生物、<sup>1</sup>衛生・生物科学）

我々は、光照射による細胞増殖の誘導機構をゼニゴケの培養細胞系で生化学的に解析している。前会（1990, 東京）、ヒストン H1 を極めてよくリン酸化する PKase（HK-II）が本細胞の増殖誘導機構に関与していることを報告した。一方、動物細胞にはカゼインキナーゼ II（CK-II）が細胞種を越えて広く分布しているばかりでなく、細胞増殖の制御に重要な役割を演じていることが明らかにされている。そこで今回、ゼニゴケ培養細胞より高塩濃度（1.0 M KCl）で抽出された細胞上清液から Mono Q カラムクロマトグラフィーを用いて CK-II 様 PKase を部分精製した。この PKase は、① cAMP および Ca<sup>2+</sup> 非依存的にカゼインをよくリン酸化すること、② 低濃度のヘパリン（1 μg/ml）で活性が阻害されること、③ 塩基性ポリペプチドである poly-Lys やヒストン H1 で著しく活性化されること、さらに④ ATP 以外にも GTP がリン酸供与体になることなどの性質を持つことが明らかになった。これらの酵素化学的性質は CK-II のそれらと極めてよく一致した。さらに、ヒストン H1 は HK-II の最も有効な基質であるばかりでなく、CK-II 様 PKase の有効な活性化因子でもある。そこでこれら 2 つの異なる PKase の生理的相互作用を解析した。その結果、HK-II によるヒストン H1 のリン酸化を介して CK-II 活性が調節される可能性が示唆された。

## 2aG08

タバコ緑葉からの可溶性サイトカニン結合蛋白質の  
単離とその性質 (II)

\* 桃谷英樹、辻英夫 (京大・理・植生研)

サイトカニンは、クロロフィルの合成促進・分解抑制や蛋白質、RNA、核・葉緑体DNA量の増加など、緑葉における多様な効果が知られているが、その作用機構の解明には、レセプターを単離し、その構造、性質を調べることが必要と考えられる。

先に、我々はタバコ緑葉可溶性画分からアフィニティーカラムを用いて解離定数が $1 \times 10^{-7} M$ のサイトカニン結合タンパク質 (CBP I) を精製し、この他に解離定数 $1 \times 10^{-8} M$ のCBP IIが存在することを示した (日本植物学会第55回大会、1990)。今回は (1) 解離定数 $10^{-8} M$ 成分の精製、および (2) 細胞内のサイトカニン結合部位について報告する。 (1) タバコ緑葉をホモジナイズし、 $150,000 \times g$  で2時間遠心した上清から硫酸塩析 (65% 飽和) の後、DEAE-Sephadex A25、CM-Sephadex C50によって、BAに対する解離定数が $7 \times 10^{-8} M$ の画分と $1 \times 10^{-8} M$ の画分を得た。後者はさらにPhenyl-Sepharose CL4B、DEAE-Sephadex A25によって精製を進めた。なお、前者についてもCM-Sephadex C50 (0-180mM NaCl)、Sephadex G75によって精製を行った。結合活性の測定は $^{14}C$ -ベンジルアデニン (BA) を用い平衡透析法によって行った。 (2) タバコ緑葉から、それぞれ核、葉緑体、細胞質リボソームを分画し、各画分のBAに対する結合活性を調べた。Foxらはサイトカニンのリボソームへの結合を報告しているが、細胞質リボソームにはサイトカニンの特異的な結合は認められなかった。

## 2aG09

キュウリ・プラスチドの5-アミノレブリン酸合成に関与する $tRNA^{Glu}$ の  
精製とその性質

増田 建、小峰 由里子<sup>1</sup>、井口 八郎<sup>1</sup>、C. G. Kannangara<sup>2</sup>、辻 英夫  
(京都大・植生研、<sup>1</sup>京都大・生物物理、<sup>2</sup>Carlsberg Laboratory, Denmark)

5-アミノレブリン酸 (ALA) 合成は、クロロフィル、ヘム等のテトラピロール合成の最初のステップであり、律速段階として制御に関与していると考えられている。ALA合成系は、高等植物等では3つの反応段階より成り、その第1段階は、グルタミン酸と $tRNA^{Glu}$ とのアミノアシル化反応であることが知られている。本報告では、キュウリ・プラスチドを用いて、この $tRNA^{Glu}$ の単離・精製を行い、また、精製した $tRNA^{Glu}$ をプローブとして、これをコードしている葉緑体DNA領域のクローニングを行ったので報告する。

緑化キュウリ子葉のプラスチド破碎により得られたストロマ蛋白質を、Sephadex CL-6Bにより分画し、ALA合成活性を持つ画分を分取した。この画分をChlorophyllin Sepharoseにより精製した結果、高塩濃度で溶出される画分に、核酸を主に含む画分が得られた。この画分を、ポリアクリルアミド2次元電気泳動法により分離し、解析した結果、*in vitro* ALA合成反応を促進するスポットを得た。このスポットをゲル中より抽出し、これをプローブとしてキュウリ葉緑体DNAとのサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、EcoRI、BamHI、HindIII断片それぞれに、2つの主要なバンドが観察された。この2つのDNA断片のクローニングを行い、得られたそれぞれのクローンについて、現在塩基配列の決定を行っている。

一般講演

第2日 3月29日(金) 午後の部

- A会場 植物ホルモン(II)
- B会場 光化学系II(II)
- D会場 プロテアーゼ・情報伝達
- E会場 炭酸輸送・光合成活性
- F会場 オルガネラ
- G会場 ストレス(II)

## 2pA02

### ヤエベニシダレおよびヤマザクラにおける頂芽優勢

中村輝子、福地佳子、早乙女真紀、趙徳以、橋和丘陽<sup>1</sup>、  
岩崎文雄<sup>2</sup>、石井幸夫<sup>3</sup>（日本女子大、<sup>1</sup>島津、<sup>2</sup>筑大・農林  
<sup>3</sup>森林総研）

枝垂れ桜の枝の生長を解析することを目的として研究を進め、今回は伸長方向と頂芽優勢について調べた。オオシマザクラを台木として、ヤエベニシダレを接ぎ穂とした2年生の鉢植えの接ぎ木を実験材料として用いた。予備実験はヤマザクラの芽生えを用いて行った。

予備実験において、外生のIAAが茎の伸長を促進することおよび、内生のIAAが存在することを確認した。又、予備実験において頂芽優勢におけるIAAやTIBAの濃度の検討も行った。

ヤエベニシダレの当年枝の長枝は、伸長開始後約2ヶ月の間に伸長し屈曲する。枝の先端の若いノース節が伸長帯である。基部の伸長を停止した数節で屈曲が進行する。この様な状態で、上方および下方（重力の方向）へ向って、頂芽優勢で同様の速度で伸長している枝の頂芽を切除すると、両場合とも、切断部に最も近い側芽のみが頂芽と同じ方向に生長した。IAAは側芽の生長を抑制した。

## 2pA03

### ジャスミン酸およびそのメチルエステルの離層形成促進作用

上田純一、宮本健助、桃谷好英、加藤次郎（大阪府大、  
総合科学、岡山理大、理）

ジャスミン酸およびそのメチルエステルのゴガツササゲ第一葉葉柄切片の離層形成に対する影響を検討した。これらは1 $\mu$ M以上で暗黒下および明所下で離層形成を促進した。それらの離層形成促進活性はアブシジン酸やC18-不飽和脂肪酸の活性と同程度であった。アブシジン酸とは異なり、ジャスミン酸およびそのメチルエステルは、C18-不飽和脂肪酸と同様にゴガツササゲ第一葉葉柄切片のエチレン生成には影響しなかった。離層が形成される場合、葉柄側離層部の細胞肥大が生じることが知られている。この事実は離層形成時において、離層部細胞の細胞壁の構造が変化することを示唆している。そこで、ジャスミン酸メチルエステルおよびアブシジン酸の葉柄側および葉枕側離層部細胞の細胞壁構成多糖組成とそれらの含量に対する影響を調べた。その結果、ジャスミン酸メチルエステルおよびアブシジン酸は葉柄側および葉枕側離層部細胞のペクチン、ヘミセルロースの質、量には影響しないものの、葉柄側離層部細胞のセルロース含量を著しく低下させた。

以上の結果、ジャスミン酸およびそのメチルエステルはエチレン生成を増加させることなく、ゴガツササゲ葉柄側離層部細胞の細胞壁、特にセルロースの分解と合成に関する代謝に影響し、離層形成を促進することが明かとなった。

## 2pA04

アブシジン酸類緑体に対するモノクローン抗体

北川良親<sup>1</sup>・日諸啓子<sup>1</sup>・山本浩<sup>2</sup>・折谷隆之<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>秋田農短大・生工研, <sup>2</sup>東北大農・農化)

植物のアブシジン酸 (ABA) 生合成系路について近年解析が進んでいるが、未だ不明な点も多い。一方、植物病原糸状菌の一種サルコスボラ菌もアブシジン酸を生産し、その生合成系路はメバロン酸からファルネシルピロリン酸を経、さらに4'-ヒドロキシ- $\gamma$ -イオニリデン酢酸 (4'OH $\gamma$ 酸)、1', 4'-ジヒドロキシ- $\gamma$ -イオニリデン酢酸 (1'4'diol $\gamma$ 酸) 経てABAに至るものと考えられている。今後各階段における酵素化学的な研究が必要である。各代謝産物と特異的に反応する抗体が得られれば微量の試料で分別定量が可能になり、酵素化学的研究を進めることが容易になるであろう。そこで、我々は4'OH $\gamma$ 酸、1'4'diol $\gamma$ 酸、およびABAを分別定量できる免疫化学的測定法を確立するためモノクローン抗体の製造を試みた。マウスを1'4'diol $\gamma$ 酸およびABA-BSAで免疫し、常法に従ってハイブリドーマを作製した。モノクローン抗体はABAおよび上記二種の類緑体-BSA複合体を用いるELISA法で検定し、3個の抗体産生ハイブリドーマを選別した。いずれの抗体とも遊離のABAおよび類緑体とは反応せず、そのBSA複合体もしくはメチル化物と反応した。一つはABA特異、他は1'4'diol $\gamma$ 酸特異的な抗体で、もう一つはABAおよび類緑体のいずれとも反応する抗体であった。サルコスボラ菌の生育時期別に生産されるABAおよび1'4'diol $\gamma$ 酸の分別定量を行うことができた。

## 2pA05

低温吸水によるコムギ種子胚のアブシジン酸感受性低下と mRNA の変化

川上直人、川端ちさと、野田和彦 (横浜市大・木原生研)

コムギ (*Triticum aestivum* L. line Kitakei-1354) 種子胚に対するアブシジン酸 (ABA) の発芽抑制効果は、後熟による休眠性低下とともに失われる。また、休眠を持たない品種の種子胚はABA存在下でも発芽することから、コムギ種子の休眠は胚のABAに対する反応性 (感受性) によることが示唆されている。休眠中のコムギ種子を低温下で吸水させると発芽することが以前から知られている。そこで、低温吸水による休眠の変化と種子胚のABAに対する反応性の変化を詳しく調べ、低温による休眠性低下時の遺伝子発現の様子を翻訳可能な mRNA レベルで調べた。

休眠中の完熟種子を5℃、10℃、15℃、20℃の各温度で一定時間吸水させた後、20℃に移して7日後の発芽率を調べた。種子胚のABAに対する反応性は、低温吸水後の種子から取り出した胚の、 $10^{-4}$ M ABAを含む紙上での20℃、7日後の発芽率で調べた。コムギ種子の休眠および胚のABAに対する反応性は20℃における吸水では保たれるが、15℃以下では吸水時間の長さに比例して失われてゆくことが分かった。この効果は温度が低いほど顕著であった。この結果は、種子胚のABAに対する反応性が休眠の主要な要因であることをさらに強く示唆している。5℃で吸水させた種子の胚から調製した poly(A)<sup>+</sup>RNA の無細胞タンパク質合成系による翻訳産物は、二次元電気泳動法によって分離した。この結果は現在解析中である。

## 2pA07

### Effects of Cinnamic acid, Its Derivatives, ABA and Their Interactions on Seed Germination and Etiolated Seedling Growth of Lettuce

○Hai-Hang Li, Masafumi Inoue, Niroyuki Nishimura<sup>1</sup> & Junya Mizutani  
Plant Ecochem. Proj., Res. Devel. Corp. of Japan, <sup>1</sup>Hokkaido Tokai Univ.

trans-Cinnamic acid, o-, m-, p-coumaric acids inhibited the growth of lettuce etiolated seedling from  $10^{-4}$ M and seed germination from  $10^{-3}$ M. Coumarin inhibited the growth of lettuce etiolated seedling from  $10^{-5}$ M and seed germination from  $10^{-4}$ M. These inhibitions increased with their concentrations. Chlorogenic acid inhibited lettuce seedling growth from  $5 \times 10^{-4}$ M, but did not inhibit seed germination from  $10^{-5}$  -  $5 \times 10^{-3}$ M. Caffeic and ferulic acids promoted hypocotyl elongation at low concentrations (below  $10^{-3}$ M), but did not promote root elongation. High concentrations (over  $10^{-3}$ M) of caffeic and ferulic acids inhibited growth of lettuce seedlings.

trans-Cinnamic acid, o-, m-, p-coumaric acids, chlorogenic acid and coumarin had additive inhibiting effects both on seedling growth and seed germination when they were used in combinations one another. They also showed additive inhibition with ABA both on seed germination and seedling growth. At low concentrations, ABA only inhibited hypocotyl elongation, these phenolic compounds inhibited root elongation, their combinations inhibited the growth of the whole plant. Low concentrations (below  $10^{-3}$ M) of caffeic and ferulic acids could reverse the inhibitions of trans-cinnamic acid, o-, m-, p-coumaric acids, chlorogenic acid, coumarin and ABA on seed germination and seedling growth, but high concentrations of them could not.

Cinnamic acid and its derivatives were found to play important roles in the interaction among plants as allelochemicals. From the results above, in plants or in soil as allelochemicals, trans-cinnamic acid, coumaric acids, chlorogenic acid and coumarin might produce inhibiting effect on plant growth, regardless of their concentrations. Caffeic and ferulic acids might have promoting effect or inhibiting effect on plant growth according to their concentrations. The results also showed that these phenolic compounds might have regulative roles in plants.

## 2pA09

### ブラシノステロイドの代謝と活性化

横田孝雄、鈴木啓之<sup>1</sup>、高橋信孝<sup>1</sup>、藤岡正三<sup>2</sup>、桜井成<sup>2</sup>  
(帝京大・理工・バイオ、<sup>1</sup>東大・農化、<sup>2</sup>理研・植生環)

植物には様々なブラシノステロイド(BR)が存在する。これらの中でもっとも多くの植物に分布し、しかも生理活性の高いBRはブラシノライドとカステステロンであり、これら2つのBRは植物中においても生理的に重要な役割を果たしている可能性がある。ブラシノライドがカステステロンから生合成されることはその構造から容易に類推されるが、最近我々はこの経路をニチニチソウのクラウンゴール培養細胞を用いて証明することができた。ブラシノライドとカステステロンの生理活性の強さを比較すると、ビント豆第二節間試験ではブラシノライドがカステステロンより100倍強いが、イネ葉身屈曲試験では数倍強い位である。ここでは、ブラシノライドが活性型であり、カステステロンは単なる前駆体なのかについて、放射標識したカステステロンを用いた代謝実験の結果をもとに議論する。

## 2pA10

イネの出液中サイトカイニンとその出穂後の変化

—品種日本晴とアケノホシの比較

°副島 洋・杉山 民二<sup>1</sup>・石原 邦 (農工大・農、<sup>1</sup>明治大・農)

水稻品種アケノホシは日本晴に比べ登熟期の葉身の老化に伴う光合成系の活性の低下程度が小さく、このことが多収性の原因になっているが、両品種間になぜ葉身の老化に相違があるのかは明らかではない。この点を検討するため本研究では茎からの出液中に含まれるサイトカイニンに着目し、特に登熟期に出液速度・地上部に送られるサイトカイニンが日本晴とアケノホシで異なるかどうかを検討した。

水田に生育させた日本晴とアケノホシを用い、高さ15cmの位置で茎葉部を切除し、その切口に脱脂綿をあて、午後8時から翌朝8時まで出液を採取した。脱脂綿からEtOHで抽出した出液に内部標準としてZ-d<sub>5</sub>, RZ-d<sub>5</sub>, iP-d<sub>6</sub>, iPA-d<sub>6</sub>を添加した。この抽出液をODSカラムを用いたHPLCで精製した。この際Zより高極性の画分にCK活性が認められたので、これを結合型CK画分として酸加水分解した後Z-d<sub>5</sub>, iP-d<sub>6</sub>を加え、HPLCで精製した。定量にはGC-SIMを用いた。

両品種の出穂直後の出液中には遊離型のZ, tRZ, iP, iPAが認められたが、量的には結合型Zが多かった。それぞれのCK量はその後減少したが、アケノホシのCK量は日本晴よりも登熟期間中常に多く、両品種の相違は登熟中期以降大きくなった。また、結合型Zは日本晴では登熟中期には遊離型CKより少なくなったが、アケノホシではiPAが増加する登熟後期まで多かった。このことから、アケノホシの葉身の老化が遅いことに出液中CK、特に結合型Zが重要な役割を持っていることが考えられた。なお、結合型iPは登熟初期にごくわずかの量存在が確認された。cRZはいずれの測定でも検出されなかった。

## 2pA11

タバコサイトカイニン結合蛋白質の精製

三井 真一、杉浦 昌弘 (名大、遺伝子)

タバコ (*Nicotiana tabacum* BY4) 緑葉を切除して暗所で18時間放置した後、無傷葉緑体を調製し、*in organello* 翻訳を行ったところ、切除してただちに調製した葉緑体に比べ、標識アミノ酸の取り込みが70%ほどに低下した。この時に $10^{-4}M$ のベンジルアデニン(BA)を添加しておくこと翻訳活性の低下はほとんど見られなかった。こうした翻訳活性の変化には特定の翻訳産物の増加や減少は伴っていなかった。以上のことから、タバコ緑葉にはサイトカイニンを認識する物質(レセプター)が存在すると考えられる。このレセプターである可能性をもつサイトカイニン結合蛋白質を、BAへの結合能を指標として精製した。

およそ600gのタバコ (*N. glauca*) 緑葉から、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー、Mono Qカラムクロマトグラフィー、Phenyl Superoseカラムクロマトグラフィー、Superose 12によるゲル濾過によってサイトカイニン結合蛋白質(CBP 57)を700倍まで精製した。CBP 57の分子量はSDS-PAGEでは57KD、ゲル濾過法では130KDと算出され、溶液中ではダイマーとして存在していることが示唆された。CBP 57のベンジルアデニンに対する結合は $10^{-4}M$ のゼアチン、アデニンおよびATPによって阻害され、cAMPによってやや阻害された。また、 $10^{-4}M$ のIAAによって結合は阻害も促進もされなかった。

CBP 57の局在性を調べるために、CBP 57に対する抗体を作製し、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、CBP 57は、単位蛋白質当たり、タバコ根中に緑葉中の10倍以上含まれていることが示された。また、タバコ培養細胞BY-2株中にもタバコ葉中のおよそ2倍のCBP 57が含まれていた。

CBP 57のN-末端のアミノ酸配列の決定を試みたが、N-末端はブロックされていた。そこで、現在、リジルエンドペプチダーゼによりCBP 57を消化し、生じたペプチド断片のアミノ酸配列の決定を試みており、さきの結果とあわせてCBP 57の機能について考察する。

## 2pB01

酸性処理による異常  $S_2$  生成の  $S$ -state 依存性

沈建仁・小野高明・井上頼直（理研・太陽光科学）

光化学系 II の  $O_2$  発生活性は pH 3.0 で処理すると失活する。この失活は EPR や熱発光で異常な  $S_2$  状態が観測されたことから、 $S$ -state 遷移中の  $S_2$  状態が酸性処理により修飾を受けたためであることが明らかになっている。私たちは酸性処理中及び処理前の光照射の影響を調べ、 $S_3$  状態にある  $O_2$  発生複合体を酸性処理すると異常な  $S_2$  が効率よく生成することを見いだしたので報告する。

暗黒で酸性処理した系 II 膜標品を  $0^\circ\text{C}$  で光照射すると異常  $S_2$  が生じることは知られているが、光照射下で酸処理すると新たな光照射をしなくても異常  $S_2$  が生じることが熱発光の測定で分かった。そこで酸性処理中の光照射がどんな役割をしているかを調べるために、処理中及び処理前に閃光照射を行い、異常  $S_2$  の生成を調べた。その結果、酸性処理中に閃光照射を与えても  $S$ -state の遷移は起こらず、異常  $S_2$  の生成は認められなかった。一方、処理前に閃光照射を与えた場合、異常  $S_2$  の生成は 1 回の閃光ではあまりなく、2 回目の閃光で著しく認められた。その後閃光照射数の増加に伴い徐々に減り、6 回目の閃光で再び大きくなった。このような周期 4 の振動パターンは  $O_2$  発生反応の  $S$ -state 遷移と対応しており、系 II 電子受容体側の初期条件を変えても変わらなかった。2 と 6 回目の閃光照射で、 $S$ -state は主に  $S_3$  状態にあるので、以上の結果は異常な  $S_2$  が  $S_3$  状態から生成されやすいことを示すものである。

## 2pB02

乾燥状態における光化学系 II 膜の  $S$  状態遷移

川本邦男，浅田浩二（京都大学・食糧科学研究所）

【目的】 光化学系 II 膜 (PS II 膜) を凍結乾燥すると、酸素発生活性を保った PS II 膜乾燥標品 (乾燥 PS II 膜) が得られる (川本, 浅田 1990 年度講演要旨 p.198)。本研究では、乾燥 PS II 膜を用いて乾燥状態における  $S$  状態遷移を調べた。

【方法】 ホウレンソウから調製した PS II 膜を水で約 50 倍に希釈し、 $35,000 \times g$  で 10 分間遠心して得られた沈澱を水で懸濁した。これにあらかじめ  $0.6 \text{ M}$  2,6-dimethylbenzoquinone (DMBQ) を添加し、4 時間暗所で凍結乾燥して得られたものを乾燥 PS II 膜とした。

【結果・考察】 乾燥 PS II 膜の酸素発生活性は、PS II 膜のその約 80% であった。反応液中で乾燥 PS II 膜に閃光照射したときの酸素発生パターンより、水-酸化部位が見かけ上還元されていることがわかった。また、反応液中で乾燥 PS II 膜に 12 閃光の前照射をし、暗所放置後に閃光照射すると、凍結乾燥していない PS II 膜と同様の酸素発生パターンを示した。ところが、相対湿度 20% 未満の空气中で乾燥 PS II 膜に 12 閃光の前照射をした後、反応液中で閃光照射すると、前照射せずに反応液中で閃光照射した場合と同様の酸素発生パターンを示し、見かけ上還元されたままであった。つまり、乾燥状態では  $S$  状態遷移が阻害されることが示唆された。

## 2pB03

クロマツ光化学系II複合体の酸素発生能獲得に伴う生化学的变化

篠原健司・小野高明<sup>1</sup>・井上頼直<sup>1</sup> (農水省・森林総研、<sup>1</sup>理研・太陽光科学)

暗所で生育させたクロマツ(*Pinus thunbergii*)子葉は、クロロフィルを持ち、未成熟な葉緑体を発達させる。この葉緑体には、2種の光化学系とチトクロム**b/f**複合体の構成タンパク質の多くが形成されているが、酸素発生能は持たない。

そこで、クロマツ子葉(明所、暗所、暗所→明所)より光化学系II複合体を調製し、酸素発生能獲得に伴う生化学的变化を解析した。明所の標品は、反応中心あたり約4原子のMnと約1原子のCaを保持していた。暗所の標品は、酸素発生能を持たず、Caは含んでいるものの、Mnは全く存在せず、特異抗体により構成タンパク質を調べると、D1, D2を始めとする全てのintrinsic proteinと3種のextrinsic proteinのうち33 kDaタンパク質のみを持っていた。また、光照射により、Mnは系II複合体に組込まれ、暗所の系II標品に存在しない2種のタンパク質も強個に結合し、酸素発生能を獲得した。一方、この2種類のタンパク質は、暗所の子葉より調製したチラコイド膜に成熟型として存在した。以上の結果は、クロマツ子葉では、酸素発生能光活性化に伴い、Mnクラスターが形成され、全ての構成タンパク質が光化学系II複合体に完全にアセンブリーすること、また暗所でも構成タンパク質のmaturationに必要なシステムが構築されていることを示唆している。

## 2pB04

光合成酸素発生光活性化の量子収率  
——電子受容体の効果  
徳富光恵、井上頼直 (理研・太陽光科学)

光合成酸素発生反応を触媒するMnクラスターは、NH<sub>2</sub>OH処理で解体され光化学系IIから遊離する。Mnクラスターを解離させた光化学系IIにMn<sup>2+</sup>を添加して光を照射すると、Mnクラスターが再構成され酸素発生能が回復する。この酸素発生光活性化(Mnクラスターの光再構成)には、少なくとも2回の光化学反応が必要であると考えられているが、光活性化の量子収率が非常に低いため解析が困難であった。光活性化の量子収率はMn<sup>2+</sup>濃度と補助因子であるCa<sup>2+</sup>とCl<sup>-</sup>の濃度に依存し、これらのイオン濃度を最適化することで増大できることを報告してきた。本研究では光活性化の量子収率に対する電子受容体の効果を調べ、ベンゾキノン(1,4-benzoquinone, BQ)型受容体が光活性化に最も有効であり量子収率を大きく増大させることがわかった。

NH<sub>2</sub>OH処理を施したコムギ光化学系II粒子を2 mM Mn<sup>2+</sup>/20 mM Ca<sup>2+</sup>/1.2 M Cl<sup>-</sup>に懸濁し0.25秒間隔で閃光を10発照射すると、NH<sub>2</sub>OH処理前の約14%の酸素発生能が回復した。2.5 μM DCIP存在下で閃光を照射すると活性の回復は約20%に増大したが、20 μM phenyl-BQ存在下では約30%の活性を回復させることができた。Tetra-bromo-BQ, Tetrachloro-BQ, 2,5-あるいは2,6-dichloro-BQでもphenyl-BQと同程度の活性が回復した。20 μM phenyl-BQ存在下の活性の回復の照射閃光数依存性を調べた実験で、2発目の閃光で初めて酸素発生活性が現れることがわかり、2電子当量の酸化反応でMnクラスターが再構成される可能性が示唆された。

## 2pB05

### トウモロコシ葉緑体における光化学系IIの還元側の光活性化

與志平尚、小林善親・奥達雄（九州大・農・林）

集光性クロロフィルタンパク質(LHC-II)のリン酸化はチトクロームb/f複合体の還元に共役して、プロテインキナーゼが活性化されることによって起こると考えられている。しかし、暗所で発芽生育したトウモロコシ子葉から単離した葉緑体ではジチオナイト存在下でのLHC-IIリン酸化活性および光化学系II活性(DPC→DPIP)を示すにもかかわらず、電子供与体存在下での光に依存したリン酸化活性をもたない。一方、子葉に光を照射してのち単離した葉緑体では、光に依存したリン酸化が起こる。このような葉緑体にヒドロキシルアミン(HA)処理を行って水分分解系を阻害しても、電子供与体存在下での光に依存したリン酸化が見られた。そこで、光化学系IIの還元側の光活性化について調べ、次の結果を得た。

暗所で形成された葉緑体は光化学系II活性をしめすが、光に依存したFeCN還元活性をほとんど示さない。この葉緑体をDPC存在下で光を照射すると酸素発生活性及びFeCN還元活性を示すようになった。しかし、HA処理を行ってのち光を照射したものではFeCN還元活性を示さなかった。以上の結果から、暗所で形成された葉緑体は酸素発生活能を欠くだけでなく、光化学系IIからPQやチトクロームb/f複合体への電子伝達能も欠いており、その活性化は単離葉緑体においても行われ、酸素発生活系の活性化を阻害すると光化学系IIの還元側の活性化も阻害されると考えられる。

## 2pB06

### トリス処理グラナの酸素発生活系でのMn-前処理によるMnの再結合について

山下 魏 ・ 蝦名 真澄° （筑波大・生物）

トリス処理グラナ標品は酸素発生活系からMnを欠いているために酸素発生活能を持たない。このようなグラナ標品を暗中で2 mMのMnとともに3 mMの還元型DCPIPを用いた処理をすると、ひきつずく光再活性化でMnを添加せずとも酸素発生活能を回復させることができる。この暗中でMnをグラナに取り込ませる処理をMn-前処理と呼んでいる。Mn-前処理ではグラナの反応中心あたり約10個のMnを取り込ませることができるが、処理したグラナは酸素発生活能を持たないことから酸素発生活系のMnクラスターに機能的に組み込まれてはいないと考えられ、その存在状態や結合部位など不明である。そのためMn-前処理によってグラナ膜に結合したMnについて検討を行った。

Mn-前処理によって結合したMnは光再活性化の際に利用されて、グラナ膜は酸素発生活能を回復するが、Mn-前処理を施さず光再活性化の際にMnを添加するとき比べて早く酸素発生活能を回復した。また、Mn-前処理によって結合したMnは緩衝液による洗浄で簡単に流失してしまうが、緩衝液中に還元型DCPIPを添加することによって、光再活性化に必要な量のMnを安定化させることができた。Mn-前処理によって弱く結合し、還元型DCPIPによって安定化されたMnは20 mMのCaやMgなどの2価のカチオンによって2価のMnイオンとして流出していることがESRで検出されたが、光再活性化に利用されて酸素発生活能を回復したので、チラコイド膜内腔側に溶出していることが示唆された。また、酸性でグラナ膜に結合したMnは解離し、そのpKaは3.2であった。この酸性での解離を、水素イオン濃度とMn原子数の両対数として表すと、pKa付近では傾斜の急な直線として表され、Mnの結合した蛋白成分の酸性条件による変性を示唆していた。

これらのことから、Mn-前処理によるグラナ標品へのMnの結合はチラコイド膜内腔側に存在するある種の蛋白質成分によるものであることが示唆され、詳細を検討中である。

## 2pB07

表在性33kDa蛋白はCyt. b559およびpsb I産物と架橋する

榎並勲, 太田幸子, 三橋智, 池内昌彦<sup>1</sup>, 加藤栄<sup>2</sup>

(東理大・理, <sup>1</sup>理研, <sup>2</sup>東大)

ホウレンソウからTritonとn-Heptyl-thiogluco-sideを用いて単離した酸素発生標品 (HTG標品) は、LHC-IIを含まず、47, 43kDa, D2, D1, CP29, Cyt. b559, 4.8 kDa (psb I遺伝子産物) の膜蛋白と33, 23, 17kDaの表在性蛋白から構成されている(1)。これらの複数の蛋白が互いにどのような相互位置関係で存在しているか明らかにする目的で、今回は主としてリジンアミノ基間で架橋するHexamethylene-diisocyanate (HMDI)を用いた架橋反応を行い、抗体を用いて架橋産物の同定を行った。HTG標品をHMDIで処理しSDS PAGEにかけると、HMDIの濃度を増加するにつれて43kDaと33kDaの間に2本の新しい架橋産物バンド (A, Bバンド) がはっきりと出現した。Western blotting法により各抗体との反応性を調べたところ、約42kDaの分子量のところに出現するAバンドは抗33kDaと抗9.4kDa (Cyt. b559の大型サブユニット) と反応し、約38kDaのところに出現するBバンドは抗33kDaと抗4.8kDaと反応した。一方、CaCl<sub>2</sub>処理により33kDa蛋白を除いたHTG標品を用いてHMDIで同様に処理した場合は、AとBの架橋産物バンドは完全に消失した。従って、表在性の33kDa蛋白はCyt. b559の大型サブユニットおよび4.8kDa蛋白 (psb I遺伝子産物) と隣接関係にあると結論される。

(1) Enami et al. (1989) Biochim. Biophys. Acta 977, 33-39.

## 2pB08

3種の表在性蛋白を固定化した酸素発生標品のNaClや尿素処理の影響

榎並勲, 北村直人, 清水威智郎, 加藤栄<sup>1</sup> (東理大・理, <sup>1</sup>東大)

Tritonを用いてホウレンソウから調製した酸素発生標品を1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)で処理すると、表在性の33kDa蛋白を完全に47kDaの膜蛋白に架橋固定化できることは先に報告した。今回はさらにEDC濃度を上げていくと23, 17kDaの表在性蛋白も固定化できることがわかってきたので、その固定化標品の性質について報告する。①処理時のEDC濃度を上げていくと、まず約1%で33kDa蛋白が、次に約3%で17kDa蛋白、約4%で23kDa蛋白が固定化された。②3種の表在性蛋白を固定化した標品の酸素発生は未架橋標品とほぼ同程度の活性を示したが、Cl<sup>-</sup>依存性を示すようになった。③固定化標品をNaCl処理すると、23, 17kDa蛋白は遊離しないにもかかわらず、酸素発生活性は低下しCa<sup>2+</sup>によって部分的に再活性化された。このことは、NaCl処理は23, 17kDa蛋白が遊離することによって活性を低下させCa<sup>2+</sup>の要求性を出現させたのではないことを示す。④尿素/NaCl処理した後0℃で24時間処理すると、未架橋標品ではゆるく結合した2個のMn原子が溶出してくることが知られているが、33kDa蛋白を固定化した標品では1個のMn原子のみが溶出し、3種の表在性蛋白を固定化した標品ではほぼ完全にMn原子の溶出は抑えられた。

## 2pB09

藍色細菌 *Synechocystis* PCC6803 の光化学系II 活性に  
対するベタインの効果

林 秀則、Mamedov, M., 和田 元、村田紀夫 (基生研)

グリシンベタイン (以下ベタイン) は中性の分子内両性イオンの一種であり、多くの植物体内に存在し、高塩濃度下、乾燥条件下における細胞内の浸透圧調整に利用されていると考えられている。最近、高等植物の光化学系II 複合体における酸素発生能の失活が、高濃度のベタインによって抑制されることが報告されている。本研究では藍色細菌の光化学系II 活性について、ベタインによる同様の保護作用について検討した。

藍色細菌 *Synechocystis* PCC6803 からチラコイド膜をフレンチプレスまたはガラスビーズを用いて単離する際に、1 M ベタインを添加した場合、酸素発生能が添加しなかった場合に比べ約2倍高い膜標品が得られた。また単離されたチラコイド膜においても、ベタイン添加によって酸素発生能が約60%増加すると同時に、室温においてもその活性が数時間保持された。また水からDCIPへの光還元活性にはベタイン添加の効果がみられたのに対し、DPCからDCIPへの光還元活性にはほとんど効果がなかった。これらの保護作用は高等植物の場合と同様、ベタインによって光化学系IIの表在性タンパク質の構造および他の構成タンパク質との結合が安定化されること、およびMnクラスターが近傍のタンパク質の構造の安定化によって保持されるためと考えられる。

## 2pD01

オオムギ・エチオプラストから可溶化したプロテアーゼ  
によるクロロフィル-タンパク質の分解

本多忠紀、伊藤寿、田中歩、辻英夫 (京大・理・植生研)

昨年、我々はオオムギ黄化葉より単離したエチオプラストの膜画分をインキュベートするとNADPH-プロトクロロフィライド-レダクターゼが選択的に分解されることを示した。一方、緑化初期においては集光性クロロフィルa/b-蛋白質複合体(LHCII)がすばやく分解されることが知られている。これらのことはエチオプラスト膜画分にプロテアーゼが存在することを示すものと考えられる。そこで、我々はエチオプラスト膜の可溶化物が実際にLHCIIを分解するかどうかを調べた。

オオムギ黄化葉よりパーコールを用いて無傷エチオプラストを単離した。これを低張下で破裂させた後、膜画分のみを遠心により集め、氷冷下で1% Tritonx-100により可溶化した。また、基質となるLHCIIは、オオムギ成熟葉より精製した。反応前後の試料をSDS-PAGEにかけて、LHCII量の変化をクマシーブルーによるゲル染色またはウエスタン・プロットにより調べた。

精製されたLHCIIの自己分解はほとんどなく、エチオプラスト膜の可溶化物とインキュベートしたときのみ、LHCIIの分解が起こった。また、エチオプラストをTritonx-100で可溶化せずにそのままLHCIIとインキュベートしても、LHCIIの分解はみられなかった。このLHCIIの分解に際して、LHCIIの減少と分解産物の出現がウエスタン・プロットにより明かにされた。

## 2pD02

### メロン・セリンプロテアーゼの生合成と蓄積

山形裕士、山内靖雄、大西達司<sup>1)</sup>、増沢拓也、岩崎照雄  
(神大・農化、<sup>1)</sup>現、サントリー食品研)

メロン果汁中の最も主要なタンパク質は耐熱性のアルカリ・セリンプロテアーゼ(MSP)である。精製MSPは活性を保持したまま限定自己消化すること等を既に報告した。今回はMSPの生合成様式を調べcDNAクローニングを行なった。

受粉後各時期のアミメロンについて組織別にカゼイン分解活性を測定した結果、MSPは受粉後10日前後の若い時期に出現し、ネット形成期(20日頃)までにほぼ合成され、完熟(50日)まで量的に変化せず果芯部の果汁中に分泌、蓄積した。

またtissue blotting分析よりMSPの合成部位は種子に接した周囲の組織と考えられた。受粉後10日前後の、種子を包む袋状組織はその外側の組織(胎座)と比べて15倍程度強い標識アミノ酸取り込み活性を有しており、この組織がMSPの合成部位である可能性が示唆された。さらにパルス標識実験よりMSP前駆体の存在が示唆された。また成熟酵素のnative型67 kD MSPは果実の成長後期に果汁中で54 kD MSPに限定自己消化した。

一方、成長期のメロンより精製したmRNAのcDNAをλgt11に組み込んで作製したcDNAライブラリーについて免疫スクリーニングを行なった。その結果、6個のポジティブクローンを単離した。現在、その構造解析を進めている。

## 2pD03

### ハウレンソウ緑葉中におけるプロテアソームの精製とその性質

尾崎昌彦、佐藤隆英、小倉長雄、中川弘毅(千葉大・園芸・農化)

最近、中性及び弱アルカリに至適pHをもち、潜在的なプロテアーゼ活性をもつプロテアソームと呼ばれる高分子量多機能プロテアーゼ複合体が、酵母からヒトに至る真核生物に普遍的に存在することが田中らにより報告されている<sup>1)</sup>。このプロテアソームと呼ばれる酵素は分子量約75万、沈降係数20Sと非常に大きな分子であり、分子量2.1万~3.1万、等電点3~10の不均一な15~20個のサブユニット群から構成された総数30~40個の多成分複合体である。またプロテアソームは同一分子内に複数のプロテアーゼ活性部位を有することが報告されている。このプロテアソームの大きな特徴として細胞内では潜在型、即ち不活性型で存在し、in vitroでSDS、脂肪酸などの添加により活性化されることが挙げられる。

プロテアソームは真核生物に普遍的に存在していると考えられているが、植物では未だその存在が報告されていない。そこで、本研究ではハウレンソウ緑葉にプロテアソームが存在するか否かを検索した。その結果、ハウレンソウ粗酵素液中にプロテアソーム様高分子プロテアーゼの存在が認められたので、その部分精製を試み、得られた部分精製標品の性格付けを試みた。

<sup>1)</sup> Tanaka, K., Yoshimura, T., Kumatori, A., Ichihara, A., Ikai, A., Nishigai, M., Kameyama, K. and Takagi, T., J. Biol. Chem., 263, 31, pp16209-16217(1988)

## 2pD04

### エンドウ葉緑体エンドペプチダーゼの精製と抗体作製

○清田誠一郎、坂野勝啓（農水省・生物研）

Liu and Jargendorf<sup>1)</sup>は、エンドウ葉緑体可溶性画分に Suc-(ala)<sub>3</sub>-pNA を基質とするエンドペプチダーゼ活性（以下、便宜的に ChI-EP1）を見だし、部分精製し、その性質を報告した。我々は、このエンドペプチダーゼを電気泳動的に単一酵素にまで精製し、その抗体を作製したので報告する。

エンドウ葉を破砕し、遠心によって単離した葉緑体を 50mM Hepes-KOH (pH7.6), 50 mM NaCl に懸濁し破裂させ、可溶性画分を得た。DEAE-Toyopearl 及び Superose 12 を組み合わせて、SDS 電気泳動的に単一の酵素標品を得た。葉緑体単離時の取量の低さから解析に十分な量の精製酵素を得るのが難しいため、エンドウ葉粗抽出物からの精製方法についても検討を行い、葉緑体の場合とほぼ同様の方法で精製を行うことができた。

精製酵素を 2 回（約 10 $\mu$ l/回）免疫したマウス腹腔に Ehrlich 癌細胞を接種、抗体を含む腹水を得た。この抗体を用いて ChI-EP1 のスクリーニングを行ったところ、エンドウ、ニチニチソウ、タバコ、ハウレンソウ、キュウリ、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシで存在が確認できた。広い分布から、この酵素の葉緑体での役割が注目される。

1) Plant Physiol. 81:603-608(1986)

## 2pD05

### 光化学系 II 反応中心サブユニット D-1 蛋白質の成熟化に関与する酵素の同定と性質

藤田修嗣、佐藤公行（岡山大・理・生物）

光化学系 II 反応中心複合体の構成成分のひとつである D-1 蛋白質は、葉緑体チラコイド膜蛋白質の中で最も大きい速度で代謝回転しているものとしても知られている。光の照射下で分子量 33.5 kDa の前駆体として合成された D-1 蛋白質は、合成後数分以内に 32 kDa の成熟型へと変化する。このプロセッシングは、一般的な N 末端ペプチドの切除とは異なり、C 末端のアミノ酸 9 残基（ハウレンソウの場合）の除去として行われる。この現象は研究者の注目を集め、様々な分析がなされているが、その生理的意義は未だ明確ではなく、反応中心における酸素発生系の分子構築に重要な役割を持つと考えられるにとどまっている。

すでに我々は、ハウレンソウチラコイド膜より、この D-1 の成熟化を媒介する酵素を、高度に精製してきたが、今回、TSKgel G2000SWXL を精製に用いることにより、成熟化活性と平行する蛋白質を同定することができたので報告する。

この酵素は SDS-urea-PAGE 上では 45 kDa のバンドとして検出されるが、TSKgel G2000 SWXL からの溶出位置では、分子量 34~36 kDa と推定された。等電点は 5.5、活性至適 pH は 7.7 であった。

また、この酵素が、比較的弱い界面活性剤処理でチラコイド膜から可溶化されること及び、膜のプロテアーゼ処理による分析から、膜の内腔に存在していることも示唆された。現在この酵素のアミノ酸配列を決定して、その遺伝子を同定する作業を進めている。

## 2pD06

チラコイド膜結合アポリリエンドペプチダーゼのキャラクタリゼーション

○ 桑原 朋彦・鈴木 恒平 (東邦大・理・生物分子)

光合成・水-酸化系の 18-kDaタンパク質のN端 12個のアミノ酸を切断するプロテアーゼ活性 (EARPIVVGPPPP↓LSGG-) を、ハウレンソウの光化学系II膜から精製してその性質を調べた。

粗抽出液をゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200) にかけてプロテアーゼ活性は 40 kDaあるいは bed volume あるいはその両方に現れた。系II膜サンプルによって両者の比率は異なり、後者に富むものでも粗抽出液を凍結融解すると 40 kDaに溶出した。これらの事実は、本プロテアーゼが2種類のフォームをとりうることを示唆する。bed volume での溶出はプロテアーゼとゲルろ過担体との疎水性相互作用によるものと考えられる。

40 kDa に現れるプロテアーゼ活性は Co を用いたキレーティングクロマトグラフィーにより精製された。精製標品は 280-240 nm の範囲で殆ど吸収を示さなかった。pH 4-8 の範囲で 18-kDa タンパク質分解活性を示した。50 mM 以上の塩の存在により反応が阻害されることからプロテアーゼと基質の静電的相互作用が示唆された。プロテアーゼは crude な状態では安定であったが精製標品は数日間失活した。現在安定化の方法を検討している。

bed volume に現れるプロテアーゼ活性は、40 kDa のものとは対比的に2週間以上安定であった。このことから、本プロテアーゼには安定化因子が存在し、それが結合した状態ではゲルろ過担体との相互作用により bed volume に溶出するのではないと思われる。

上記の精製標品には、銀染色によっても、ポリペプチドは検出されず、従って、プロテアーゼのポリペプチドはまだ同定されていない。

## 2pD07

アラスカエンドウにおける光信号伝達の分子機構

連沼 仰嗣 (横浜市大・木原生研)

W. R. Briggs (カーネギー研・植物)

アラスカエンドウ黄化芽生え第3節間を切り取り、赤色光照射後、遠心操作および水性二層分配を用いて原形質膜を単離した。 $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ ,  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ を結合させた後に、Triton X-100ゲル電気泳動により蛋白質を展開した。 $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ ,  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ を結合するATP-GTP-結合蛋白質、AGP-1~12を見出した。AGP-1, -2はATPを主に次にGTPを結合した。AGP-3, -4はGTP結合は特異性が高いが、他のATP, CTP, UTPが $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ の結合を促進した。赤色光はAGP-1, -2, -7, -8の $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ 結合能を光強度、光量に依存して促進させ、AGP-3, -4の $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ 結合能を同様に促進した。しかし緑色安全光処理したのも $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ ,  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ の結合能をかなり示し、厳格な観点からは問題点を残した。トランスデューシン $\alpha$ および $\beta$ ,  $\gamma$ サブユニットの抗体を用いてウエスタンブロットすると、 $\alpha$ -サブユニットの抗体では37 KDおよび125 KD,  $\beta$ ,  $\gamma$ サブユニットの抗体では30 KDと40 KDの蛋白質が同定された。Triton X-100ゲル電気泳動のAGP-1バンドはトランスデューシン抗体と交叉する37 KD蛋白質を含んでいた。赤色光照射により37 KDおよび125 KD蛋白質は原形質膜から減少するが、30 KD, 40 KD蛋白質は変化しない。37 KD蛋白質は百日咳毒素によりADP-リボシル化され、赤色光照射によりADP-リボシル化が促進された。植物においては光信号伝達がATP-GTP-結合蛋白質へのATP, GTPの結合、さらにそのADP-リボシル化が共役して起る可能性が示唆された。

## 2pD08

アカパンカビのATP-GTP-結合蛋白質に関する生化学的また局在性に関する解析

連沼 仰嗣 (横浜市大・木原生研)

アカパンカビ菌糸より、0.25 M蔗糖を含む緩衝液を用いて、膜分画および可溶性分画を調製した。 $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ 、 $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ を結合させた後に、試料をUVで照射した。GTP結合蛋白質は $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ をポケット状の中に取り込むことが知られている。UVで蛋白質をクロスリンクすることにより $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ を結合蛋白質に固定することができる。試料をSDSゲル電気泳動にかけ、ras抗体を用いてウエスタンブロットした。膜分画に23 KDのかなりはっきりしたras抗体に交叉反応を示すバンドが見られた。オートラジオグラフィの結果、膜分画に約25本の可溶性分画に約14本のバンドが見られた。そのうち90%近くのバンドが $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ も $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ も結合した。ras抗体に交叉反応を示す23 KD蛋白質は $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ および $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ をほぼ同等に結合した。 $10^{-5}$  Mおよび $10^{-4}$  M, ATP, GTP, CTP またはUTP を用いてヌクレオチド特異性を調べた。 $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ を結合する活性は一般的に特異性が低いが、GTPによりその結合が促進されるものが存在した。さらに $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{GTP}$ の結合活性を見ると $10^{-5}$  M ATP またはGTP でその結合活性の上昇するものが多数見られた。Ha-ras DNA をプローブとして、それに相同性を示すゲノミッククローンを得た(Yoshida, Hasunuma & Murayama : in preparation)。これ及びTorres のグループにより単離されたcDNAクローンは共にATP結合の共通配列GXGXXGを含んでいた。このcDNAクローンは24 KDと推定され、上記の23 KD蛋白質との関連が興味深い。

## 2pD09

イネ篩管液中のタンパク質のリン酸化に関する光条件の影響

中村進一、林浩昭、茅野充男 (東京大学・農・農芸化学)

高等植物において篩管は同化産物を輸送する重要な組織であるが単に物質を輸送するだけとは考えられない。花芽形成のシグナルが篩管を通して成長点に伝えられることや、*in vivo*での $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込み実験によりイネ篩管液タンパク質には光条件に対応するリン酸化、脱リン酸化が起こることから、篩管が植物体においてシグナルの伝達に使われている可能性が考えられる。

(方法) 水耕栽培で育てたイネ(観稲)を用い、インセクトレーザー法で篩管液を採取した。また篩管液は明、暗と異なる光条件で採取しその中に含まれる篩管液タンパク質の*in vitro*リン酸化を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて行い、SDS-PAGEにより分離後、オートラジオグラムを作成した。

(結果) イネ篩管液タンパク質の*in vitro*リン酸化では分子量約22kDa、33kDaのタンパク質にリン酸化が起こることからイネ篩管液中でのプロテインキナーゼの存在が示唆された。このイネ篩管液タンパク質のリン酸化は篩管液採取時の光条件によって違いのあることが認められた。そしてイネ篩管液中には分子量約47kDaの自己リン酸化するタンパク質が存在し、イネ篩管液中でのプロテインキナーゼの存在が別の面からも示された。この自己リン酸化するタンパク質は明暗いずれの光条件で採取した篩管液中にも存在することから、イネ篩管液タンパク質のリン酸化は光によるCa<sup>2+</sup>情報伝達物質の調節によって行われていると考えられる。

## 2pD10

耐塩性緑藻 *Dunaliella tertiolecta* の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテインキナーゼ

湯浅高志、武藤尚志（東大・応微研）

*D. tertiolecta* は高い耐塩性をもち 0.1~5M NaCl を含む培地で生育可能であり、塩濃度の急激な変化に適応出来る。この塩濃度変化に対する適応過程にはタンパク質の *de novo* 合成を必要しないといわれ、タンパク質の修飾的な活性調節が浸透圧調節に関与している可能性が考えられる。

*D. tertiolecta* の細胞破砕物の超速心上清から、硫酸沈澱、DEAE-Toyopearl、Phenyl-Sepharose、ヒドロキシアパタイトの3回のクロマトグラフィーによって  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテインキナーゼ (CDPK) を約 900 倍に精製した。CDPK は、プロテインキナーゼ C、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼと異なり、 $\text{Ca}^{2+}$  以外の活性化因子（リン脂質やカルモデュリン等）を必要としなかった。CDPK はプロテインキナーゼ C 阻害剤 H-9 では阻害されず、カルモデュリン阻害剤トリフルオペラジン・カルミダゾリウムによって  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  M の濃度で、プロテインキナーゼ特異的阻害剤 K252a によって  $10^{-6} \sim 10^{-5}$  M の濃度で阻害された。5  $\mu$  M の K252a を細胞に与えたところ、高浸透圧ショック下では細胞容積の回復には影響がなかったが、低浸透圧ショック下では細胞は膨潤したまま形状が回復しなかった。これは低浸透圧下における細胞容積調節にタンパク質リン酸化が関与していることを示唆している。

## 2pD11

ラン藻スピルリナにおける cAMP の生理的意義

大森和子、大森正之<sup>1</sup>（昭和女子大・生活科学、  
<sup>1</sup>東京大・海洋研）

我々はこれまでの実験から、糸状性ラン藻の *Anabaena cylindrica* には、通常 50-200 ピコモル/mg クロロフィルの cAMP が含まれていることを報告している。また、同じ糸状性ラン藻の *Spirulina* は、細胞内に cAMP を含んでいるだけでなく、細胞外に cAMP を放出することが明かになった。しかしながら、これら細胞内外の cAMP がどのような生理的機能を持つかは未だに明かにされていない。本実験においては、*Spirulina* の懸濁液に、異なった濃度の cAMP を与えたときに起きる藻体の凝集現象について検討した。

培養後、約 7 日目の *Spirulina platensis* 細胞を濾過により洗浄して集め、新しい SOT 培地に懸濁した。この懸濁液を一定量ずつ内径 3.4 cm の P 1 シャーレに分注し、それに  $2.6 \times 10^{-8}$  M から、 $2.6 \times 10^{-3}$  M までの異なった濃度の cAMP を加えた。その後静置したシャーレ内での藻体の凝集の様子を観察した。その結果、cAMP 濃度がある程度以上高くなると *Spirulina* は凝集を開始することが認められた。 $2.6 \times 10^{-3}$  M cAMP では、およそ 5 分ほどで凝集が顕著となり、10 分後には直径約 1.4 cm のマットが形成された。一度形成されたマットは容易にはほぐれなかった。藻体の凝集は  $2.6 \times 10^{-6}$  M によっても明確に促進されるが、凝集速度は遅かった。なお、藻体の凝集の促進は、1 mL レベルの cGMP、ATP、AMP によっては見られなかった。

## 2pE01

### *Chlorella regularis*の溶存無機炭素利用機構の特徴

佐藤 朗・白岩 善博(新潟大・理・生物)

細胞表面に局在するcarbonic anhydrase (CA)のみを有し、細胞内CAを有しない低CO<sub>2</sub>条件下で培養した単細胞緑藻*Chlorella regularis*の光合成のCO<sub>2</sub>に対する高い親和性は、細胞表面に局在するCAには僅かしか依存せず、CA非依存性の要因が大きく関与していることが既に示されている(佐藤と白岩 日本植物生理学会 1989)。そこで本研究では、*C. regularis*におけるCA非依存性の要因を解析し、以下の結果を得た。

①基質律速条件下での<sup>14</sup>C-DIC(溶存無機炭素)の細胞外から細胞内への透過速度は、CO<sub>2</sub>に対し低い親和性しか示さない高CO<sub>2</sub>細胞に比べ低CO<sub>2</sub>細胞で大きかった。取り込まれた<sup>14</sup>C-DICはその70~80%が固定反応に使われ残りが細胞内へ蓄積された。その濃度は、細胞外濃度の約190倍(低CO<sub>2</sub>細胞)および約80倍(高CO<sub>2</sub>細胞)にまで濃縮されていた。

②active CO<sub>2</sub> transportの阻害剤であるNa<sub>2</sub>Sにより、<sup>14</sup>C-DIC取り込みの阻害と、CO<sub>2</sub>に対する親和性の低下がみられた。細胞外から細胞内への<sup>14</sup>C-DICの取り込み速度はCA阻害剤によって影響されなかった。

③濃縮状態で細胞内に蓄積された<sup>14</sup>C-DICは、反応外液中の<sup>14</sup>C-DICが枯渇しても<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>固定に利用されずに一定濃度を維持した。これは光合成のCO<sub>2</sub>に対する高い親和性が無機炭素濃縮に依存せず、active CO<sub>2</sub> transportによるものであることを支持する。

以上の結果は、固定速度を上まわる取り込み速度を維持する積極的なCO<sub>2</sub>輸送(active CO<sub>2</sub> transport)系の存在と、細胞内へのDIC濃縮機構の存在を示し、それがCA非依存性であることを示している。

## 2pE03

### シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 の無機炭素固定に関与する遺伝子 *icfA* - 遺伝子破壊による解析

・鈴木英治<sup>1</sup>・小向豊<sup>2</sup>・福澤秀哉

(東大・応微研、<sup>1</sup>茨城大・理・生物、<sup>2</sup>埼玉大・理・生化)

演者らはさきにシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 の温度感受性高CO<sub>2</sub>要求性突然変異株 C3P-0 を相補する野生株の染色体領域を同定した。本研究ではこの染色体領域について遺伝子破壊の手法を用いて解析した。

上記野生株の染色体領域内にある HincII、XhoI、SphI 部位にそれぞれカナマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、これらを用いて野生株の形質転換を行なった。10 μg/ml カナマイシン存在下、高CO<sub>2</sub>(5% CO<sub>2</sub> 通気)条件で選択した結果、カナマイシン耐性株(それぞれ HC-2 XH-5 および SP-2 株)が得られた。サザンブロット法により、各々標的部位にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることが確認された。異なるCO<sub>2</sub>濃度における各形質転換株の生育を調べたところ HC-2 株は低CO<sub>2</sub>(0.04% CO<sub>2</sub>《通常の空気》通気)条件、高CO<sub>2</sub>条件のいずれでも生育したのに対し、XH-5 株および SP-2 株は生育に5% CO<sub>2</sub>を要求し、低CO<sub>2</sub>条件では生育が停止した(1.5% CO<sub>2</sub>でも生育は抑えられた)。野生株の同染色体領域1662 bpについて塩基配列を決定したところ、HincII 部位の275 bp 下流から始まり、XhoI および SphI 部位を含む816 bp(272 アミノ酸)からなる open reading frame が存在することが明らかとなり、遺伝子 *icfA* と命名した。この遺伝子が無機炭素(CO<sub>2</sub>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)の固定に関与していると推定される。各形質転換株についての細胞内構造および無機炭素の蓄積、固定能についても検討したので併せて報告する。

## 2pE04

### Synechocystis PCC6803の無機炭酸輸送における *ndhB* 遺伝子の役割

小川晃男 (理研, 太陽光科学)

藍藻 Synechocystis PCC6803 から2種類の無機炭酸輸送欠損変異株, RKa および Rkb, を単離した[1]. Synechocystis 野生株のジ-ソライブ-ラリ-から, それぞれの変異株を相補する2種類のク-ソを単離し分析した. その結果, RKaでは葉緑体の *ndhB* 遺伝子と *ndhB* -をもつ521個のアミノ酸をコードする遺伝子(*ndhB* と命名)が, Rkbでは80個のアミノ酸をコードする遺伝子(*ictA*) が変異をうけていることが判った[2,3]. 野生株のそれぞれの遺伝子にカマイソ耐性遺伝子を挿入し不活性化し変異株(M55およびM9)を作成した. M55 および M9 変異株は  $CO_2$  および  $HCO_3^-$  を細胞内に輸送する活性をもたなかった. これらの結果はこれら2つの遺伝子が無機炭酸輸送に 必須であることを示している. M55はほとんど呼吸活性を示さず, 従って, *ndhB* 遺伝子は *ndhB* -から予想されるようにNADH dehydrogenase の subunit2 をコードしていると考えられる. M9も呼吸活性が低く, *ictA*も上記酵素の sub-unitの1つをコードしている可能性がある. NADH dehydrogenase は無機炭酸輸送の energizationに 関与する光化学系1の環状電子伝達系の必須成分であると考えられる.

- 1) Ogawa, T. (1990) *Plant Physiol.* 94, 760-765.
- 2) Ogawa, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 3) Ogawa, T. *Plant Physiol.* in press.

## 2pE05

### イネの葉の老化に対する光の効果

岡田克彦・加藤栄(東大・理・植物)

葉の老化の進行は環境条件によって大きな影響を受け、とくに光は大きな調節的役割を果たしている。昨年の植物生理学会で、イネの切り葉の老化に伴って起きるクロロフィルの分解はフィトクロムによって制御されていることを報告した。これに対応し LHCII の分解は弱光照射で抑制されたが、Rubisco の分解には光の影響は認められなかった。そこで、今回はさらに多くのチラコイド膜タンパク質について、その分解に対する光の効果を調べた。まず、暗所での分解の速度がタンパク質によってかなり異なっていることが見出された。さらにタンパク質の中でも弱光照射により顕著にその分解が抑制されるものと、抑制効果が不完全なものがあることが見出された。したがってチラコイド膜の中でもその分解過程はタンパク質により差があることになる。

一方、植物体に付いた葉でも各タンパク質の分解は暗所で著しく促進された。さらに光はチラコイド膜タンパク質の分解を抑制した。しかし切り葉と異なり Rubisco の分解も光照射により抑制を受けることが見出された。この場合、弱光でも部分的に抑えられたが、強光下でさらに強い抑制が認められた。そして、DCMUにより光の効果はかなり打ち消されたので、この光の効果には光合成も関与していると考えられる。

## 2pE06

イネ葉の老化過程における光強度が光合成能力に及ぼす影響

○日出間純、牧野周、前忠彦、小島邦彦  
(東北大・農・農化)

イネ葉の老化過程における光合成能力に関して、光環境が及ぼす影響について調べた。材料として、イネ(ササニシキ)の第13葉を用い、その完全展開後、異なる光強度(100%と20%自然光)の下で栽培した。ガス代謝同化箱法により葉内CO<sub>2</sub>分圧(Ci)に対する光合成速度のレスポンスを経時的に測定した。同時に、Cyt f, CF1, Rubisco, Chlの含量を測定した。Cyt f, CF1含量は、老化過程において急激に減少し、その減少速度は20%区のほうが速かった。これらの変化と、Ci = 600 ubarでの光合成速度の変化との間に高い相関がみられたが、大気CO<sub>2</sub>分圧での光合成速度の変化との間には相関が見られなかった。このことは、100%区のCyt f, CF1含量は、大気条件下での光合成速度の律速因子ではないことを示している。Rubisco含量も老化過程において減少したが、逆に20%区のほうが遅かった。しかし、この変化の違いは、Ci=200 ubarでの光合成速度の変化を反映していなかった。このことは、20%区の老化葉において、in vivoでのRubisco活性が制御されていることを予想させた。また老化過程においてChl含量は最も遅く減少し、特に20%区では、Chl a/b比の減少を伴いながら、その含量はほぼ一定であった。以上、弱光下で老化したイネ葉の光合成特性について、陰葉型光合成特性と比較して考察した。

## 2pE07

黄色亀の尾の光合成特性

—特にRubiscoのin vivo活性について—

○日出間純、牧野周、前忠彦、小島邦彦  
(東北大・農・農化)

私たちは、イネを材料に、単葉の光合成能力を炭酸固定能力、電子伝達能力、集光性能の3つの能力に分け、それら各能力間の相互関係を明らかにすることを目的としている。今回は、ササニシキと、Chl含量が顕著に少なく集光性能または電子伝達能力が低下している黄色変異種、黄色亀の尾を選んだ<sup>1)</sup>。水耕栽培により、その窒素栄養を10, 2, 0.2 mMの3段階で2週間処理した後の完全展開葉を用いた。まず、ガス代謝同化箱法によりin vivoにおける炭酸固定能力と電子伝達能力のバランスを調べた。黄色亀の尾とササニシキはともに、絶対活性には差が認められたものの、両能力間のバランスには差が認められなかった。しかしながら、単位面積当りの光合成因子の含量を調べたところ、黄色亀の尾のCyt f含量は、ササニシキに比べ50%程度であったが、Rubisco含量は逆に1.2~1.8倍量存在していた。そこで、in vivoにおけるRubisco活性化率を調べたところ、黄色亀の尾は約45%程度であるのに対して、ササニシキは約80%程度であることがわかった。以上のことから、Rubiscoの活性制御について他の光合成因子(Cyt f, CF1, LHCII)との関係から考察する。

1)横田聡 日本植物生理学会1988年度年会講演要旨集

## 2pE08

コムギ第一葉におけるRuBisCO:LSU分解物様ポリペプチドの免疫学的検出

○鈴木正人、前忠彦、牧野周、小島邦彦  
(東北大・農・農化)

コムギ葉より機械的に単離精製した葉緑体中にはウェスタンブロットレベルでRuBisCO分解活性が検出されていた(Mae et al. 1989 PCP 30, 193)。しかしそれは、葉緑体の単離精製過程で液胞プロテアーゼが葉緑体外胞膜に非特異的(?)に吸着してきたことによる人工産物であることが、サーモリシン処理を導入することにより明らかとなった(Miyadai et al, 1990 Plant Physiol 92, 1215)。けれども、ウェスタンブロットに供するタンパク量を増やしたところ、サーモリシン処理に関わらず、今までには検出されなかった精製抗LSU抗体に陽性な49KD-、44KD-ポリペプチドを検出するに至った。そこで私達はこれらの2つのポリペプチドについて詳細に検討した。まず、V8-プロテアーゼによるマッピングの結果、LSUの分解物であることが明らかとなった。次に、これらの分解物は液胞プロテアーゼのLSU分解物とは阻害剤に対するレスポンスが明らかに異なっており、また、インタクトな葉緑体中に内在することがわかった。さらに、これらポリペプチドは葉の磨砕液中にも検出されたが、<sup>35</sup>S-RuBisCOを用いたtracer実験を行うことにより、磨砕過程での人工産物ではないことを確認した。このように、新たに検出された49KD-、44KD-ポリペプチドは、生葉の葉緑体内に存在するLSU分解物である可能性が強く示唆された。

## 2pE09

C<sub>3</sub>型主要作物における窒素栄養に対する光合成特性の違い

○牧野周、坂下普志、日出間純、前忠彦、小島邦彦  
(東北大・農・農化)

窒素供給に伴い葉身中のRubisco含量が、Chl量および全窒素量の割合に対し特異的に増加することがしばしば報告されている。Evans and Terashima (1988)は、ホウレンソウを材料に、この現象をRuBP再生産能とのバランスから説明した。しかし、一部の作物(イネ、コムギ等)では、このような窒素供給に伴うRubisco含量率の特異的増加は必ずしも認められていない。そこで、私たちはC<sub>3</sub>植物であるコムギ、インゲン、エンドウ、ホウレンソウを材料に、窒素供給の違いによる全窒素含量とChlに対するRubiscoへの窒素分配の応答について植物種間差を調べ、電子伝達活性およびRuBP再生産能とのバランスについて考察した。

その結果、インゲン、エンドウ、ホウレンソウについては、Evans and Terashimaと同様の結果が認められたが、コムギについては、やはりRubisco含量率の増加は認められなかった。さらに、コムギのみ、電子伝達活性とRubisco活性の比は、窒素供給の違いに依存せず一定であった。にもかかわらず、ガス交換同化箱法の結果は窒素供給の違いによらず、RuBP再生産能とRubiscoのバランスが変化しないことを示した。このバランスについて、葉内拡散抵抗とそれに関与すると思われるCarbonic anhydrase活性の窒素栄養に対する応答から考察した。

## 2pE10

リン酸欠乏ストレスのトウモロコシに及ぼす影響について  
I. 葉内リン酸、生長、光合成と光合成産物の分配について  
白田秀明、下河原浩介（帝京大、医）

リン酸は植物の生育、またC<sub>4</sub>光合成ではピルビン酸リン酸ジキナーゼの触媒する反応に必須である。しかし、リン酸欠乏ストレスのC<sub>4</sub>光合成に及ぼす影響の研究は殆どなされていない。トウモロコシを種より3週間0.5mMのPi及び1μMのPi（Low-P植物）下で育て、リン酸欠乏ストレスのトウモロコシの成長、光合成、光合成産物の分配、葉内無機リン酸含量等に及ぼす影響について検討し、以下の結果を得た（2）-（6）は基部から数えて第3葉のなかほどを用いたものである）。

1) 成長（地上部の新鮮重）：播種後24日でLow-P植物はコントロールの60%。  
2) 葉面積当りの a) 乾燥重量、b) 可溶性タンパク含量：共に影響は少なかった、c) クロロフィル含量：19日後Low-P植物で15%低下した。3) 21日後に葉面積当りの a) 酸可溶性PiはLow-P植物で77%、b) 光合成的炭酸固定能は68%低下した。4) 酸可溶性Pi含量と光合成的炭酸固定能の間には強い相関が認められた。（0.6mmol Pi/m<sup>2</sup>以上では光合成能には影響はなかったが、それ以下では光合成能は著しく阻害された。）5) 光合成産物の（ショ糖とデンプンへの）分配：（コントロールの葉による光合成能を光強度やCO<sub>2</sub>濃度を下げてLow-P植物のそれとほぼ同様にし、比較した。）Piの低下はデンプンへの光合成産物を減少させた。このことはPiの低下が光合成能を阻害させることで間接的にデンプンへの光合成産物の分配を減少させているのではなく、直接的な影響を持つことを示している。6) 夜間のデンプンの分解はLow-P植物で阻害された。以上のことを短期的なリン酸欠乏のC<sub>3</sub>-、C<sub>4</sub>-光合成への影響に関する従来知見と関連させて考える。

## 2pF01

葉緑体ゲノムの比較  
島田浩章、杉浦昌弘  
（三井植物バイオ研、名大遺伝子）

これまでにイネおよびタバコ、ゼニゴケ葉緑体DNAの全塩基配列が明らかになっている。これらの葉緑体ゲノムに含まれている遺伝子および、ORFとそれぞれの間のスペース領域を比較した。それぞれの遺伝子のGC含量と、コドン使用頻度およびそれぞれの植物間でのホモロジーを調べたところ、葉緑体の遺伝子は、光合成関連遺伝子群からなるグループとその他の遺伝子群の2つにグループに、大きく分類できることがわかった。光合成遺伝子はすべてが一つのグループにまとめられた。このグループの遺伝子は植物間でのホモロジーが高く、GC含量もゲノム全体の平均値より高かった。さらに3番目の塩基がGCであるコドンが多く用いられているなどの特徴がみられた。これに対し、転写系遺伝子などのグループに含まれる遺伝子は、全体的にホモロジーが低く、GC含量もゲノム全体の平均値と差がなかった。NADH dehydrogenase遺伝子群は光呼吸などの役割が推測されているにもかかわらず、この分類では光合成遺伝子群ではなく、転写系遺伝子と同じグループに分類された。ほとんどのORFは、この2つのグループのどちらかに分類された。このことは、これらのORFがコードする蛋白の機能を推定する手助けとなる可能性を示唆する。

## 2pF02

暗所培養フタバネゼニゴケ細胞における葉緑体DNAのメチル化について

滝尾 進・佐藤佳男・佐藤敏生 (広島大・理・植物)

我々が分離したフタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea* var. *diptera*) 培養細胞は、暗所で生育させても明所と同様の高いクロロフィル量と光合成酸素発生能を持つ葉緑体を形成する特徴を持つ。この苔類細胞では、光合成遺伝子の発現の調節機構が、高等植物とは異なっていると考えられる。近年、色素体遺伝子の発現の調節にDNAのメチル化が関与することが報告されている。本実験では、この苔類細胞の葉緑体DNAにおけるメチル化の有無について調べた。

暗所・従属栄養条件下で生育した細胞の葉緑体DNAを、メチル化感受性の異なる各種のイソ制限酵素で処理して切断断片の大きさを比較したところ、メチルシトシンに感受性のEcoRIIと非感受性のBstNIで切断パターンに違いが見られた。その葉緑体DNAを酸加水分解し、構成塩基を逆相高速液体クロマトグラフィーにより調べたところ、メチル化塩基が検出された。また、光独立栄養条件下で生育させた細胞の葉緑体DNAの制限酵素切断パターンも、暗所・従属栄養細胞と同様の結果が得られた。以上の結果から、この苔類細胞では、明暗に拘らず葉緑体DNAはメチル化していることが明らかになった。

## 2pF03

タバコ培養細胞におけるプロプラスチドDNAの複製

武田 稔<sup>1</sup>, 廣川秀夫<sup>1</sup>, 長田敏行<sup>2</sup> (名古屋大・農・生化学制御,<sup>1</sup>上智大・生命科学研,<sup>2</sup>東京大・理・植物)

タバコ培養細胞BY2の定常期細胞を新鮮培地に移植すると、プロプラスチドDNAが複製を開始するが、核DNAの複製は少なくとも24時間は始まらない。この状態の細胞から、複製開始直後のプロプラスチドDNA複製中間体を分離した。この複製中間体フラクションをプローブとしてハイブリダイゼーションを行なったところ、タバコクロプラスチドDNAのInverted Repeat領域に強く結合した。

より詳細なマッピングを行なうため、各複製中間体分子の上でD-loopがどこに存在するかを電子顕微鏡を用いて解析した。D-loopを持つDNA断片の多くは、ハイブリダイゼーションで強いシグナルを示した場所、即ち、Inverted Repeat内に由来した。異なる制限酵素を用いた結果を分析すると、D-loopの位置は23S rRNA遺伝子の近傍に落ちた。又、Inverted Repeatのそれぞれに存在する領域(同一塩基配列を有する)が、2つとも、*in vivo*において複製起点として働いていることが示唆された。In vivoにおけるプラスチドDNAの複製起点が複数あることによって決定され、互いに一致したのは初めてのことである。

## 2pF04

### ミカツキモの葉緑体分裂

著本春樹（東京大・教養・生物）

葉緑体分裂の機構を明らかにするために、単細胞緑藻ミカツキモ (*Closterium ehrenbergii*) を用いて、細胞骨格系の要素であるアクチン繊維と微小管が葉緑体分裂に関与しているかどうかを検討した。

F-アクチンを特異的に染色するローダミンファロイジンでミカツキモの細胞を蛍光染色すると、細胞表層とseptumでの繊維状蛍光像、核の周囲の蛍光像のほかに、分裂中の葉緑体のくびれに環状の蛍光像が認められた。アクチンの重合を阻害するサイトカラシンD (6-25 $\mu$ M)を細胞分裂の直前に与えると、遅くとも投与1時間後には原形質流動が停止し、ローダミンファロイジンで蛍光染色される細胞表層の繊維構造は完全に破壊されていた。3-6時間後にはseptum形成の阻害と葉緑体分裂の阻害（くびれの形成不全）が認められた。しかし、9時間以上経つと原形質流動の回復と葉緑体分裂が見られた。一方、チューブリンの重合阻害剤アミプロフロスメチルを10 $\mu$ g/mlの濃度で与えると、細胞分裂は起こるが娘核の葉緑体のくびれへの移動は阻害された。しかし、葉緑体は分裂した。100 $\mu$ g/mlの濃度で与えると、細胞分裂も阻害されたが葉緑体分裂も原形質流動も全く阻害を受けなかった。

以上の結果から、ミカツキモの葉緑体分裂にアクチン繊維が関与していることが強く示唆され、一方、微小管は葉緑体分裂に関与していないことが示された。

## 2pF05

高等植物のミトコンドリア核DNA合成は分裂組織の特定部位でおこる

黒岩常祥・藤江誠・河野重行（東大・理・植物）、黒岩晴子（上智大・生命研）

高等植物のミトコンドリアの分裂周期と分化の様式はほとんど明らかでない。その理由として、*in vivo*の組織細胞内において核DNAを直接観察することができなかったことによる。新たに開発したテラビット-DAPI-蛍光顕微鏡法は、組織全体をとらえながら核DNA分子の挙動の把握と定量を同時に可能とし、既に高等植物の胚珠における巨大なミトコンドリア核の発見 (kuroiwa ら、1990) や細胞質遺伝の研究 (Kuroiwa ら、1990) に役立っている。本研究の目的は、この方法とオートラジオグラフィを併用することによって、ペルゴニア (*Pelargonium zonale*) のミトコンドリア核の機能を調べ、増殖様式を明らかにすることであった。実生を25 $\mu$ Ci/mlの<sup>3</sup>Hチミジンの溶液に各時間浸し、4%ホルマリンで固定した。テラビットに包埋した試料を0.5-0.9 $\mu$ mの厚さの切片にし、オートラジオグラフィの試料とした。1か月の露光後、DAPI蛍光顕微鏡法で観察した。その結果、根の組織は、根端から200 $\mu$ mが根冠、200 $\mu$ mから700 $\mu$ mまでが分裂組織、700 $\mu$ m以上が伸長域に分かれた。また、静止中心、中心柱のような明瞭な組織分化だけでなく更に細かく分化が見られた。分裂組織の先端部、即ち静止中心に接する部位のミトコンドリアは大きな核 (1500kbp) を1個含み、活発にDNA合成をしながら細胞周期の時期に関係なく増殖していた。しかし分裂組織の上部に移るに従ってミトコンドリアはDNA合成を伴わない分裂をし小さくなり、伸長領域や表皮ではその核に含まれるDNA量は150kbp以下になった。

## 2pF06

単細胞真核紅藻 *Cyanidium caldarium* RK-1型からの  
細胞核、ミトコンドリア、葉緑体DNAの単離  
太田にじ・河野重行・長島秀行<sup>1</sup>・黒岩常祥  
(東大・理・植物、<sup>1</sup>東京理科大・基礎工)

単細胞真核紅藻イデユコゴメ (*Cyanidium caldarium*) にはRK-1型とM-8型の2つの異なる型が存在する。体制の単純な方のRK-1型は細胞内にミトコンドリアと葉緑体を各1個含み、細胞核のDNA量は真核植物として最も少ないものの一つである。また、細胞の増殖を同調化できる (Mita and Kuroiwa, 1988)。このようなことからオルガネラの分裂周期と遺伝子発現及びオルガネラ間における遺伝子発現の相互作用を研究する際に適切な材料と考えられる。しかしながら、RK-1型は細胞壁が非常に堅く、細胞を破壊することが困難であったため、多くの研究者の試みにもかかわらずそのDNAを単離することができなかつた。本研究では、これらRK-1型とM-8型の2種の細胞をガラスビーズとともに振盪して細胞を破壊し、プロテアーゼ処理をした後、臭化エチジウム-塩化セシウム及びヘキスト33258-塩化セシウムの連続密度勾配遠心を行うことにより、細胞核、ミトコンドリア及び葉緑体DNAをはじめ単離することができた。RK-1型ではDNAの密度が大きい順に細胞核、葉緑体、ミトコンドリアであったが、M-8型ではミトコンドリア、細胞核、葉緑体の順であり、それぞれの型の葉緑体の制限酵素パターンは異なっていた。この結果はRK-1型とM-8型が別種であるという考え (Nagashima and Fukuda, 1981) を支持している。次に、オルガネラの分裂周期と遺伝子発現の関係を研究するための第一段階として、より真核植物の始原的体制を持つイデユコゴメRK-1型の葉緑体DNAのクローニングを開始したので、併せて報告する。

## 2pF07

原色素体および葉緑体から単離した色素体核の遺伝子発現  
制御機構の解析

酒井敦、河野重行、長田敏行、黒岩常祥 (東大・理・植物)

色素体の分化過程で色素体核の数や形態およびその構成タンパク質は大きく変動する。これは色素体分化にともなう色素体遺伝子の発現制御がこのような色素体核の構造変化、すなわち色素体DNAとタンパク質との結合様式の変化によってなされていることを示唆している。そこで、分子構造に大きな相違のある原色素体核と葉緑体核をタバコ培養細胞 (BY-2) とタバコ葉肉細胞から無傷単離し、これを用いて *in vivo* の転写制御の状態を反映した *in vitro* 転写系を開発し (酒井ら、1990)、色素体分化と転写制御との関係を調べた。単離葉緑体核は単離原色素体核の10倍以上のUTP取り込み活性を示し、両者が *in vitro* で合成した転写産物の構成も *in vivo* を反映して異なっていた。原色素体核と葉緑体核における個々の色素体遺伝子の相対的な転写活性をより詳細に比較するため、代表的な色素体遺伝子 (*psbA*, *atpA*, *rpoB*, *psaA*, *atpB*, *rbcL*, *petB*, *rp116*, 23SrDNA) のプローブDNAをスロットプロットし、これに両単離色素体核の *in vitro* 転写産物をハイブリダイズし、各遺伝子の転写量を測定した。原色素体核では色素体遺伝子の転写活性は全体に低く抑えられ、葉緑体核の1/10以下であった。一方、葉緑体核の転写活性は全体的に高く、なかでも23SrDNA, *psbA*, *rbcL*, *petB* の転写が選択的に活性化されていた。現在、このような転写制御に色素体核の構造変化が関与していることをより直接的に示すために、単離色素体核の構造を人為的に改変し、その転写制御機能を解析中である。

## 2pF08

ユーグレナ細胞の葉緑体形成過程におけるLHCP II  
タンパク質分子の動態

°長松哲齊, 角田修次, 江原友子, 長谷榮二<sup>1</sup>, J. A. Schiff<sup>2</sup>  
(東京医大, <sup>1</sup>帝京大・医, <sup>2</sup>ブランダイス大・光生物)

昨年度の本学会で、同調培養ユーグレナのcell cycle中におけるLHCP IIタンパク質の細胞内局在性を免疫電子顕微鏡法で経時的に追跡し、cell cycleの初期、中期にLHCP IIがゴルジ体上に特異的に観察されることを報告した。今回は葉緑体形成過程におけるLHCP IIの細胞内配置について調べた結果、同様の現象が観察されたので報告する。

暗所で培養した*Euglena gracilis* var. *bacillaris*細胞を暗所で無機培地に移し72時間後、細胞分裂が停止した細胞に光(照度150 ft-c)を照射し、免疫電顕法で金粒子(LHCP IIの局在性を示す)の細胞内局在性を追跡した。LHCP IIは6時間まで観察されなかった。9時間前後からLHCP IIは最初に細胞質のCOS構造<sup>1)</sup>に観察され、プラスチド構造、ゴルジ体への局在性はなかった。12時間前後からLHCP IIはゴルジ体、プラスチド(チラコイド膜)上にみられ、48時間では何れもLHCP IIの強い反応がみられた。光照射72時間後に葉緑体構造が完成すると、LHCP IIはチラコイド膜にのみ局在し、葉緑体の形成途中に観察されたゴルジ体上には全く見られなかった。

以上の結果から、合成されたLHCP IIタンパク質はゴルジ体を経由して葉緑体に運ばれることが示唆される

文献: 1) Osafune et al. *Exp. Cell Res.*, 148: 530-535 (1983)

## 2pF09

ユーグレナ細胞の葉緑体形成過程におけるRuBisCOタンパク質  
分子の局在性:モノクローナル抗体による免疫電顕観察

°江原友子、長松哲齊、久延 薫<sup>1</sup>、渡海 寛<sup>1</sup>、横田明穂<sup>1</sup>、長谷榮二<sup>2</sup>  
(東京医大、<sup>1</sup>大阪府立大・農、<sup>2</sup>帝京大・医)

ユーグレナ細胞は前培養条件を適切に選べば、葉緑体形成の初期暗過程が観察できる。すなわち、脂質が蓄積した細胞を暗所で有機炭素源を除いた無機培地に移し、通気すると(“0時間細胞”)酸化による脂質の急激な減少が見られ、同時に細胞分裂が始まる。それに伴ってリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ(RuBisCO)比活性は暗所144時間でおおよそ12倍に増加し、以後一定の値を保つ。この結果はWestern Blotting法によるタンパク質の増加パターンとも一致している。このような葉緑体形成暗過程におけるRuBisCOの細胞内配置をポリクローナル抗体を用いて免疫電子顕微鏡法観察を行った。144時間細胞におけるRuBisCOは細胞核およびプロプラスチドに特異的に局在し、その割合は両者で全体の約60%をしめることが判った。また細胞質内には多くのdense osmiophilic 構造(Z構造)が一時的に形成され、RuBisCOはその構造上にも特異的に局在した。この時期に形成されるZ構造はRuBisCOの輸送などに関与している可能性も考えられる。144時間後、RuBisCOはピレノイド構造上に特異的に存在した。

以上の結果はRuBisCOモノクローナル抗体でも観察されこれらについて論議したい。

## 2pF10

Euglena の緑化過程におけるプラスチド蛋白質合成速度の変化

○ 権名 隆・福田 功・豊島 喜則 (広島大・総合科)

暗所で継代培養したEuglena 白色細胞は葉緑体を欠き、未分化のプロプラスチドを有している。この白色細胞に連続光を照射すると、クロロフィルの蓄積と同時に葉緑体が発達してくる(緑化)。緑化中各時間で単離したプラスチドの蛋白質合成速度を調べると、照射6時間以降で顕著な増大がみられ、D1、ルビスコ大サブユニット蛋白質が発現してくる。本研究では緑化中の蛋白質合成に対する前照射と光電子伝達阻害剤DCMUの影響を検討した。2時間の前照射後、12時間暗所におくとクロロフィルの蓄積がないにも関わらず蛋白質合成速度が前照射直後の5倍に増大した。この後、連続光を照射するとクロロフィルの蓄積が前照射により促進されるが(potentiation)同時にプラスチドの総蛋白質合成速度も促進され、連続照射6時間後にはコントロールの3倍程度に達した。psbAのmRNAレベルも前照射により増大し、potentiationには転写レベルでの制御が関わっていると思われる。さらに、光電子伝達と緑化中の蛋白質合成速度の増加の関係を調べるため、DCMU存在下で緑化を起こしたプラスチドの蛋白質合成速度を測定したところ、予想に反して12時間照射では未処理の場合の3-4倍に増大し、DCMU結合蛋白質であるD1蛋白質の合成も同様に促進された。psbAのmRNAレベルはDCMU処理で変化せず、potentiationとは異なる機構でプラスチド蛋白質合成能が高まっていると考えられる。

## 2pG01

ハウレンソウ緑葉に及ぼす亜硫酸、硫酸の影響

奥田晃典, 太田英二 (慶大・理工・物質科学, 慶大・理工・計測)

植物の酸性雨障害に関する研究は主に可視害や農作物の収量や生育について行われてきた。本研究はハウレンソウ葉組織を酸性雨の主成分である亜硫酸および硫酸を含む溶液(疑似酸性雨)に浸漬し、光合成・呼吸速度およびクロロフィル含量を調べ、細胞レベルでの影響について検討を行った。光合成・呼吸速度の測定には酸素電極法を用い、クロロフィル含量はArnonnの方法によった。また葉組織には例の少ない $^{31}\text{P}$ -NMR法によって、ハウレンソウ葉組織をin vivoで測定し、細胞内pHを調べた。疑似酸性雨のpHの低下に従って光合成速度、呼吸速度は減少したが、クロロフィル含量の明かな変化は見られなかった。このことから酸性雨は光合成の初期段階ではなく、電子伝達、光リン酸化、炭酸固定回路を阻害することを示している。また、 $\text{SO}_3^{2-}$ 溶液は $\text{SO}_4^{2-}$ 溶液より呼吸・光合成の活性を著しく低下させ、 $\text{SO}_3^{2-}$ による光合成、呼吸系を阻害する機構の存在が示唆された。 $^{31}\text{P}$ -NMR法によって見積もった細胞質pHは、外液pH7.0における暗条件でpH6.9~7.0、明条件ではpH7.2~7.3であった。pH2.9の酸性溶液に浸漬した場合には、細胞内pHの低下が見られ、 $\text{SO}_3^{2-}$ 溶液では細胞質pHはさらに低下した。以上のことから、酸性雨は、特に $\text{SO}_3^{2-}$ を含む場合には細胞内pHを低下させることによる光合成および呼吸活性の著しい低下が確認された。

## 2pG02

光低温処理はキュウリチラコイド膜を uncouple する

寺島一郎, 園池公毅, 河津維, 加藤栄 (東大・理・植物)

低温感受性植物として知られるキュウリ (*Cucumis sativus* L.) の葉を, おだやかな光照射下, 5°C で5時間処理した後調製したチラコイド膜は, 一部のH<sup>+</sup>ATPase ATP合成酵素部位(CF<sub>1</sub>)を欠いており, そのためにH<sup>+</sup>チャンネル(CF<sub>0</sub>)が露出した"uncouple"した状態のものであった。一方, 無傷葉において, 短いフラッシュにより誘起されるカロチノイドシフトの暗緩和を解析したWise & Ort (1989)は, H<sup>+</sup>ATPaseは, 光低温処理後も損傷を受けておらず, チラコイド膜の"uncoupling"は調製時におこったアーティファクトであると主張した。

この論争に決着をつけるべく行った本研究では, (1). 光低温処理後に調製した無傷葉緑体も"uncouple"していること; (2). 無傷葉において, 葉緑体収縮による535nmの吸収変化および蛍光誘導における non-photochemical な消光が, 光低温処理後に見られなくなること; (3). 一部のCF<sub>1</sub>を欠くチラコイド膜において測定したカロチノイドシフトの暗緩和は, 対照に比較して"unmistakable"には早くならないことなどが明らかになり, "uncoupling"が現実におこる現象であることが確認できた。 (CF<sub>1</sub>の抗体を御恵与下さった名大・農・生化学制御の渡辺昭教授と, ウェスタンブロッティングによるCF<sub>1</sub>サブユニットの解析を行なって下さった当研究室の菓子野康浩博士に深くお礼申し上げます)

## 2pG03

ヤエナリ培養細胞の増殖周期に伴う耐冷性の変化

八反田 幸子・吉田 静夫 (北大・低温研)

ヤエナリ(緑豆)は東南アジア原産の亜熱帯性植物で低温感受性が高い。ヤエナリの根から誘導された液体培養細胞を26°Cで12日間周期でバッチ法で培養したとき, 細胞の低温感受性は細胞増殖周期に応じて大きく異なることが確認された。低温処理(0°C)直後の細胞活性の低下と26°Cに再び戻した時の活性回復は共にTTC還元力で評価した。培養を開始して所定日数に達した細胞を0°Cで5日間処理し, その直後にTTC還元を行わせると培養開始後6日目の細胞は還元力を完全に失うが16日目の細胞では比較的高い還元力(対照の約80%)を保持していた。この事は, 対数増殖初期の細胞が最も低温感受性が高く対数増殖後期からstationary phaseにかけて細胞は低温耐性となることを示している。培養開始後6日目の細胞について低温処理によるTTC還元力の時間経過を調べると0°C12時間後には対照の60%まで, 0°C24時間後には対照の10-20%までそれぞれ低下した。このような比較的短時間の低温処理によるTTC還元力の低下は可逆的で細胞を常温に戻して短時間培養すると再び回復することが分かった。一方, 24時間以上低温処理するとTTC還元力は全く回復せず細胞は不可逆的な傷害を受けるものと思われる。このような細胞の増殖周期による低温感受性の著しい変化の原因について幾つかの実験を試みその結果について考察する。

2pG04

植物細胞のホメオスタシスと環境ストレス  
1. 低温ストレスによる細胞内pHの変化  
吉田 静夫 (北大・低温研)

細胞の内部はいろいろな細胞小器官と生体膜で区画された独自の微小環境を形作っている。これらの微小環境はエネルギーに依存する生体膜物質輸送系によって恒常性が保たれている。植物がしばしば遭遇する高温や低温等の環境ストレスは生体膜輸送系に対して直接影響し、細胞内微小環境の恒常性維持に大きな影響を与えるものと考えられる。本報告では低温感受性のヤエナリ液体培養細胞を用いて、低温ストレスが細胞内pHに与える影響について実験を行った。pHプローブとしてFDAを細胞に与え、495および450nmの励起光による蛍光比(495/450)を蛍光分光光度計で測定し、pHに対する蛍光比の検量曲線から細胞内のpHを推定した。低温に最も敏感な対数増殖初期の細胞では、低温処理(0℃)開始直後から細胞質のpHは低下し始め、数時間後には著しい酸性化が認められた。一方、低温耐性なstationary phaseの細胞では、低温処理直後に一時的なpH低下が見られたが、その後速やかに正常値迄回復し120時間後も一定のpHを維持した。蛍光顕微鏡と画像解析装置によるratio image法を用いてプロトブラストで測定した場合もほぼ同様であった。以上の結果は、低温下における細胞質pHの恒常性維持機構が低温耐性植物と低温感受性植物で異なっていることを示唆するものと思われる。

2pG05

低温によるコクズ幼根細胞内pHの変化  
— <sup>31</sup>P NMRによる測定  
小川知子、太田英二 (慶大・理工・計測)

低温感受性植物である Mung bean (*Vigna mungo*) 幼植物を一定時間低温(0℃)処理し、その切断根の細胞内pH、ATPレベルを *in vivo* <sup>31</sup>P NMRによって測定した。これまではNMR測定を20℃で行っており、低温処理による影響が回復している可能性がある。そこで今回は低温での温度制御を可能にし、5℃で測定を行った。

5時間の処理では、細胞内pH、ATPレベルともに変化は殆どみられなかった。12時間処理では、細胞質のpHは低下し、液胞のpHはわずかに上昇した。24時間の処理では、細胞質pHはさらに低下した。ATPレベルは処理時間とともに減少し、対照(無処理の組織)の60%となった。5℃での測定後、測定温度を上げ(20分間要する)20℃において測定した。12時間処理の組織のATPレベルは対照レベルまで回復し、24時間処理の組織は、対照レベルの75%まで回復した。細胞内pHは回復はみられなかった。一方5℃、24時間処理の組織においても、細胞質pHの低下、液胞pHの上昇、ATPレベルの減少がみられるが、同様な回復測定を行うと、ATPレベルは対照値まで回復し、細胞質pHは0.1 pH units 上昇した。

## 2pG06

<sup>1</sup>H-NMR緩和時間でモニターしたヤエナリ胚軸での冷温及び高温ストレスへの特異的初期応答とタンパク合成  
井上眞理、賀来章輔（九大・教養・生物）

冷温感受性の高い「もやしめ」の一種、ヤエナリ (*Vigna radiata*) の黄化芽生えの胚軸を供試し、冷温ショック (0℃ - 7, 24, 48 h) と熱ショック (40℃ / 45℃ - 1, 4, 7 h) を与え、水プロトンNMR緩和時間 (T<sub>1</sub>) の変化を対比した。冷温ショックの場合には処理直後のT<sub>1</sub>値は増大しているが、熱ショックの場合には減少している。処理解除後、常温下でのT<sub>1</sub>の経時的变化を1 h後から3日後まで調べると、可視害を伴わない冷温ショック (0℃ - 24 h) の場合には、T<sub>1</sub>値は処理後急速に減少し1 - 2 h以内でほぼ処理前の値に回復しその値を維持する。一方、熱ショック (40℃ - 4 h) の場合は減少したT<sub>1</sub>値がその後も維持される。

これに対し、ストレス強度を増した0℃ - 48 hと45℃ - 4 hの場合には処理直後のT<sub>1</sub>変化は前述の傾向と同じであるが、1 - 2日後に組織の褐変や壊死のような傷害が明瞭になると、それに対応してT<sub>1</sub>値は前者では更に激減し、後者では逆に激増する。このことは両ストレスにより発現した可視害はNMR緩和挙動の上では異なることを示唆する。T<sub>1</sub>に及ぼす要因として、含水量以外には陽イオン (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) の変動やタンパク質の量的及び質的变化などが考えられるのでその結果についても報告する。またタンパク質の低温及び熱変性の違いが上述の特異的T<sub>1</sub>緩和に反映していることも想定される。

## 2pG07

クロレラの耐凍性獲得に伴う蛋白質合成の変化

溝田泰達、城斗志夫、<sup>○</sup>吉元誠、波多野昌二（九大・農・食化工）

【目的】 *Chlorella ellipsoidea* Gerneck (IAM C-27) を低温 (3℃) で処理すると耐凍性を獲得する。耐凍性獲得の遺伝子レベルでの解明を目的とし、低温処理により誘導される蛋白質について、*in vivo* および *in vitro* 翻訳系で検討した。

【方法】 クロレラの低温処理時間と *in vivo* および *in vitro* 蛋白質合成の変化について、二次元電気泳動のフルオログラフィにより分析した。*in vivo* ラベル実験は、細胞をあらかじめS欠乏状態におき、[<sup>35</sup>S]methionineを取り込ませて行った。

【結果】 *in vivo* ラベル実験で、低温処理6時間までに、14種類の新たな蛋白質が観察された。これらの蛋白質のうち、分子量55 kD, 等電点5.0の蛋白質はグルコース-6-リン酸脱水素酵素である可能性が示唆された。低温処理したクロレラよりmRNAを調製し、*in vitro* 翻訳産物をフルオログラフィにより分析した。その結果、低温処理3時間で8種類、さらに6時間で2種類、24時間で3種類のmRNAが誘導された。また、ハイブリッドサブトラクション法により、低温処理6時間目に少なくとも3種類の低分子mRNAが誘導されることを確認した。以上の結果から、耐凍性獲得に転写レベルでの調節が関与し、さらに耐凍性獲得に必要なmRNAは低温処理初期に転写されることが示唆された。今後は、cDNAライブラリーより、耐凍性に関与する遺伝子をクローニングし解析する予定である。

## 2pG08

重水素の同位体効果によるクロレラの細胞膜構成脂質および細胞内微細構造の変化

安藤一郎、小池千恵子、海野けい子、岡田昌二、

波多野昌二<sup>1</sup> (静岡県大・薬・放射薬品、<sup>1</sup>九大・農)

〔目的〕 演者らはクロレラ細胞 (*Chlorella ellipsoidea* C-27) を用い、水素の安定同位体である重水素(D)の生物学的同位体効果を解明することを目的として、細胞内のHがDに置き換わること(D化)によって起こる、細胞構成脂質および細胞微細構造の変化について検討した。

〔方法〕 重水を60mol%または100mol%含む培地中で継代培養し、細胞成分がD化されたクロレラ(60%D-クロレラ、100%D-クロレラ)について細胞周期的に同一と考えられる細胞より抽出した脂質について分析を行い、通常の水培地中で培養したクロレラ(H-クロレラ)との比較、検討を行った。また、各々のクロレラの微細構造を透過型電子顕微鏡にて観察した。

〔結果・考察〕 D-クロレラにおいて、主要脂質であるMGDG, DGDG, PE, PC, PSの含量は細胞容積あたりで比較した場合やや減少していたが、その組成比に対する影響は認められなかった。MGDG, DGDGの構成脂肪酸をGLCにより分析したところ、D-クロレラではグリセロールsn-2位のC18の割合が減少し、脂質合成経路が変化している可能性が示唆された。また電顕による鏡検では、クロロプラストおよびミトコンドリアでの変化が観察され、細胞機能の変化との関連を検討している。

## 2pG09

クロレラ細胞の熱ショック応答における重水素の影響

海野けい子、荻野敦子、岡田昌二

(静岡県大・薬・放射薬品)

〔目的〕 演者らは、クロレラ細胞 (*Chlorella ellipsoidea* C-27) に対する水素の安定同位体・重水素(D)の生物学的同位体効果の一つとして、細胞の熱感受性の変化に着目し、その機構解明を目的として、今回は熱処理時における細胞内ATP量の変化と細胞のD化との関連について検討した。

〔結果〕 H<sub>2</sub>Oの代わりにD<sub>2</sub>Oを含む無機培地中で培養することにより得られた、細胞成分が高度に重水素化したクロレラ細胞(D-クロレラ)の細胞内ATP量は、コントロールの状態(25℃)において、通常のH<sub>2</sub>O培地の細胞(H-クロレラ)より低かった。暗所において34-43℃の熱処理を行ったとき、H-クロレラおよびD-クロレラともに、熱処理温度の上昇に伴い細胞内ATP量は著しく減少したが、やはりD-クロレラの方が低い値であった。その後、暗所または光照射下において25℃に戻し、熱傷害からの回復時におけるATP量の変化を調べた。その結果、暗所ではH-クロレラ、D-クロレラともにコントロールと同レベルにATP量は回復したが、光照射下では異なり、D-クロレラではコントロールより低い値であった。これらのことから、D-クロレラにおけるATP量の低下は、熱感受性増大の一因となっていることが考えられた。

## 2pG10

### イネ科植物に対する重金属の影響

井上雅裕・遠山鴻・城尾昌範・村山徹郎（愛媛大・理・生物）

植物は重金属ストレスに対する様々な防御、耐性機能を持つ。例えば、フィトケラチン（PC）や有機酸による重金属の毒性緩和、細胞壁や液胞での重金属の濃縮などが知られている。

私達は先に、数種の植物の芽生えを用いてカドミウム（Cd）の影響を比較し、イネ科植物が双子葉植物より高いCd耐性を持つことを示した。そこで、今回、その原因について検討した。植物材料として、トウモロコシ、イネ、オートムギを、また対照としてアズキを用いた。発芽後、明所で1週間成育させた芽生えに、10~200  $\mu\text{M}$  の硫酸カドミウムを根から付与し、その後数日間成育させた。

アズキの根は30  $\mu\text{M}$  Cdで顕著な阻害をうけたが、トウモロコシの根は90  $\mu\text{M}$  Cdでも阻害をうけなかった。両者のCd取り込み量には大差は見られなかったが、後者は細胞壁より細胞質により多くのCdを蓄積した。これらとCd耐性の関係を様々なCd濃度の影響下で調べた結果、細胞質Cdと耐性の間に平行関係が見られた。さらに細胞質分画をSephadex G-50 カラムで分析したところ、分子量約4,000と<1,000の2つの分画にCdが検出された。アミノ酸分析、逆相カラムによる分析の結果、前者はPC、後者はPC以外の物質であった。PCの量とCd耐性との間に相関が見られた。イネ、オートムギでも同様の関係が見られた。一方、双子葉植物の根は低いPC合成能を示した。

以上の結果から、イネ科植物のカドミウム耐性は細胞質におけるフィトケラチン合成と大きなかわりがあると考えられる。

## 2pG11

### イネ水中芽生えの酸素適応過程におけるスーパーオキシドジスムターゼ・アイソザイムの消長

丑丸敬史・石田教弘<sup>1</sup>・小川健一<sup>2</sup>・柴坂三根夫<sup>4</sup>・浅田浩二<sup>3</sup>・辻英夫  
(京大・理・植生研,<sup>1</sup>農・農,<sup>2</sup>農・林工,<sup>3</sup>食研,<sup>4</sup>岡大・資生研)

暗所水中で発芽させたイネ芽生え（水中芽生え）を暗所のまま空気中に移すことにより、低酸素条件下及び酸素適応過程におけるフェレドキシン-NADP<sup>+</sup>還元酵素（FNR）、チトクロムc（それぞれプラスチド、ミトコンドリアの電子伝達系発達の指標）と各オルガネラに局在するスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の消長をイムノプロットにより調べた。その結果、次のことが明らかになった。

（1）低酸素条件下では、プラスチドにはFNR、プラスチドSODともごく少量しか存在せず、両者とも酸素適応時に増加した。（2）これに対し、ミトコンドリアSODは異なった消長パターンを示した。水中芽生えでは、チトクロムcは少ないもののミトコンドリアの電子伝達鎖はすでにつながっており、芽生えが空気中へ移されると、ただちに電子伝達系が働き始めることが知られている。このように、好気条件に移されるとただちにそのオルガネラ内に活性酸素を生じると考えられる場合には、低酸素条件下でも好気条件下とほぼ同程度のSODが予め準備されていた。酸素適応時にチトクロムcは増加するが、ミトコンドリアSODの量はほとんど変らなかった。

このように、高等植物では、活性酸素消去系の代表的な酵素であるSODの各アイソザイムの発現は、環境の酸素濃度に対して一様に制御されているのではなく、これらのアイソザイムが局在するオルガネラの電子伝達系の発達程度、つまり活性酸素発生能の程度に応じて調節されているように思われる。

植物根は周囲の水分状態によって好気、嫌気的环境ストレスを受けることが考えられ、独自の活性酸素防御系を発達させていることが考えられる。ここでは水耕栽培により育成したホウレンソウ根を採取し、防御系酵素の存在を明らかにするとともに、嫌気ストレスの影響を調べた。又、根のグルタチオン還元酵素の性質について葉のそれと比較検討した。

ホウレンソウを好気及び嫌気状態で水耕栽培し、根中の防御系酵素、基質、抗酸化物質を測定した。ホウレンソウ根はスーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオン還元酵素 (GR)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、アスコルビン酸、グルタチオン、トコフェロール等の活性酸素防御系物質を備えていた。嫌気状態におかれた時、アルコール脱水素酵素活性は顕著に増大したが上記の防御系酵素に大きな変化は認められなかった。GRの根からの単離を試みた。ADP-セファロース等のカラムクロマトグラフィーでSDS-PAGEで均一なまでに精製した。本酵素の最終精製標品の比活性は $149 \mu\text{moles NADPH oxidized} \cdot (\text{mg protein})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ で至適pHは中性域(葉緑体酵素は弱アルカリ性)にあった。本酵素は葉緑体酵素よりも分子量が高く、基質親和性は葉緑体のものと大きな差は認められなかった。葉緑体酵素の抗体は根の酵素と反応性があることがイムノプロット法で明らかになった。又、根には免疫学的に異なる2種のGRアイソザイムが存在していることも明らかにした。



一 般 講 演

第3日 3月30日(土)



一般講演

第3日 3月30日(土) 午前の部

- A会場 脂質・生体膜
- B会場 細菌光化学系・電子伝達系
- D会場 窒素代謝
- E会場 花成・生殖・オーキシン
- F会場 オルガネラ・タンパク輸送
- G会場 光生物学(II)

## 3aA01

### 種子の脂質蓄積に及ぼす光の影響

稲永醇二、西 直子（鹿大学農）

植物の貯蔵器官における物質の集積は遺伝的要因のほか、環境要因によっても変る。演者らは、落花生、大豆の莢実部の光環境をかえて栽培した結果、Darkのもとでは脂質含有量が増加することを見出した。今回は糠に約15%の脂質を含み、油脂資源として重要な水稲を用いて、脂質蓄積に及ぼす光の影響について検討を行なった。

品種「にしひかり」をビニールハウスのなかで土耕栽培し、開花後10日目から穂の部分をアルミホイルで覆ってDarkにし（Ⅱ区）、開花後、10,20,30,40,50日目に種子を収穫し、糊殻を除いた部分と40日目に収穫した米糠の部分を用いて脂質含量を測定し、無処理（Ⅰ区）と比較検討を行なった。

Ⅰ、Ⅱ区とも種子の乾物重は10から20日目にかけて急速に、それ以降も緩やかに増加したが、20日目からⅡ区はⅠ区に比して明らかに低く推移した。一方、脂質含量についてみると、Ⅰ区では10から20日目にかけて急速に減少し、その後ほぼ一定の値で推移したのにたいし、Ⅱ区では20日目から40日目にかけて緩やかに減少し、20,30日目ではⅠ区に比して明らかに高く推移した。またTG, DGもⅠ区とⅡ区では異なった推移を示した。米糠の脂質含量は、Ⅰ区では20%、Ⅱ区では24%となり、いずれもFieldで収穫された米糠よりも高い値を示し、遮光の効果が認められた。

## 3aA03

### クリプトモナスにおけるベタイン脂質の存在とその代謝

佐藤 直樹（東大・理・植物）

クロロフィル a と c の他にフィコビル色素をもち、nucleomorph という特異な DNA を含むことで系統分類・進化の点で注目されるクリプト藻の一種 *Cryptomonas* CR-1 の脂質を2次元 TLC により分画し、各脂質クラスの脂肪酸を GLC により分析・定量した。主な脂質クラスとして、糖脂質である MGDG, DGDG, SQDG とリン脂質である PG, PC の他に、Dragendorff 試薬陽性でリンを含まない脂質が検出された。この脂質は *Ochromonas danica* で最近同定された DGTA [diacylglycerol-0-2' (hydroxymethyl)-(N,N,N-trimethyl)- $\beta$ -alanine] (以前 Lipid B と呼ばれていたもの) と、TLC での Rf 値および機器分析の結果が一致した。DGTA はこの他には数種の褐藻 (Araki et al. 投稿中) で存在が知られているだけである。*Cryptomonas* には微量のホモセリン脂質 DGTS (DGTA とは異性体にあたる) と未同定のベタイン脂質も検出された。DGTA の C-1 位には 16:0, 18:1, 20:5 が、C-2 位には 20:5, 22:4 が結合しており、脂肪酸種の多様性と分子種構成において、他の脂質クラスとは著しく異なっていた。DGTA の構造を決めた Eichenberger らは DGTS から脱炭酸、再カルボキシル化によって DGTA が作られるという説を提出しているが、*Cryptomonas* 生細胞を用いたトレーサー実験の結果は、DGTS が DGTA の前駆体であることを明確には示さなかった。なお、MGDG と DGDG は C18/C18 という典型的な "eukaryotic" 分子種からなっていたが、PC から MGDG へのラベルの移動は見られず、"eukaryotic pathway" が働いていないことも示された。

## 3aA04

アズキ培養細胞のスフィンゴ脂質の代謝

○小嶋道之<sup>1</sup>、西田生郎<sup>1</sup>、村田紀夫<sup>1</sup>、大西正男、  
伊藤精亮（帯畜大・生資化、<sup>1</sup>基生研）

〔目的〕高等植物のセラブロシドは、構成スフィンゴイドのC-8位の二重結合の幾何異性(シストランス)により熱的特性を大きく異にする。今回、このC-8位の不飽和化経路を明らかにした。

〔方法〕植え継ぎ後3日目のアズキ(*Vigna angularis*)培養細胞に[3-<sup>14</sup>C]セリンを取り込ませ、セラブロシドへの経時的なラベルの移行を分析した。

〔結果〕アズキ培養細胞に取り込まれた[3-<sup>14</sup>C]セリンのラベルは、まず遊離の飽和型スフィンゴイド(スフィンガニン)に認められたが、これは、10分後には減少をはじめた。セラミドの構成スフィンゴイドへの取り込みは、30分まで大部分がスフィンガニンでみられたが、その後スフィンガニンのラベルは減少し、逆に不飽和型スフィンゴイド(4,8-スフィンガジエニン)のラベルが増大した。また、セラミドの4-ヒドロキシスフィンゴイドへのラベルの移行は、飽和型および不飽和型ともに同じ割合で認められた。セラブロシドの構成スフィンゴイドへの取り込みは、10分以降急速に認められた。その大部分のラベルは、4,8-スフィンガジエニンに認められたが、4-ヒドロキシスフィンゴイドへの取り込みは、60分後でも微量であった。これらの結果は、構成スフィンゴイドの不飽和化と4-ヒドロキシル化は、主にセラミドで起ることを示唆している。

## 3aA05

クラミドモナスの脂質代謝異常変異株の単離

佐藤典裕、都筑幹夫<sup>1</sup>、川口昭彦（東大・教養・生物、  
<sup>1</sup>東大・応微研）

モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)、ホスファチジルグリセロール(PG)及びスルフォキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)は葉緑体を構築する脂質であり、またこれらの脂質には $\alpha$ -リノレン酸(18:3(9,12,15))等の不飽和度の高い脂肪酸が多く含まれている。葉緑体脂質あるいはそれらを構成する高度不飽和脂肪酸の生理的意義は不明であり、また脂肪酸の不飽和化に関与するタンパク質(不飽和化酵素と電子伝達系タンパク質)及びその遺伝子の解明も余り進んでいない。本研究では、これらの諸問題の解明を目的として、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* から、UV処理により突然変異を誘発させクロロフィル蛍光の異常な変異株を約100種分離し、そのうち脂質代謝変異株を2種類(HF2、9)単離したので報告する。HF2は葉緑体脂質のうちSQDGが欠損した変異株であった。また全脂肪酸をみた場合、元の株では16:1(7)、18:1(9)の割合が2%、7%と低く、18:2(9,12)、18:3(9,12,15)の割合が20%、14%と高かったが、変異株HF9では逆に16:1(7)、18:1(9)の割合が13%、31%と高く、18:2(9,12)、18:3(9,12,15)の割合が4%、7%と低かった。各脂質クラスの分析からMGDG上での16:1(7)から16:2(7,10)への不飽和化と葉緑体脂質の18:1(9)から18:2(9,12)への不飽和化、即ち葉緑体脂質の $\omega$ 6の位置での不飽和化が欠損しているものと予想される。

## 3aA06

形質転換によるラン藻 *Anacystis nidulans* R2-SPc の低温耐性能の獲得

和田 元、Zoltan Gombos、村田 紀夫 (基生研)

ラン藻 *Anacystis nidulans* は低温感受性で、0°Cに近い低温に曝されると数分間で光合成などの諸活性を非可逆的に失う。この低温傷害は、細胞膜の相転移に起因している<sup>1)</sup>。一方、生体膜の相転移温度は、膜を構成している極性脂質の脂肪酸の不飽和結合に依存し、不飽和結合の数が多きほど低くなる。本研究では、低温耐性型のラン藻である *Synechocystis* PCC6803 から既に我々が単離した不飽和化酵素遺伝子<sup>2)</sup> (*desA*; 脂肪酸の $\Delta 12$ の位置に不飽和結合を導入する酵素をコードしている)を用いて *A. nidulans* R2-SPc を形質転換し、低温耐性能の改良を試みた。

*Synechocystis* PCC6803 から単離した *desA* 遺伝子をシャトルベクター pUC303 につき、このプラスミドを用いて *A. nidulans* R2-SPc を形質転換した。得られた形質転換体は、野生株が本来持たない $\Delta 12$ 不飽和化能を獲得し、パルミトレン酸とオレイン酸をさらに不飽和化してヘキサデカジエン酸とリノール酸を生合成することができるようになった。また、形質転換体の細胞膜の相転移温度は野生株に比べて2°C低く、しかも低温に対する耐性が増大していることが見出された。このことは、ラン藻の耐寒性が不飽和化酵素遺伝子による形質転換によって増加したことを示している。

参考文献 1) Murata, N., J. Bioenergetics and Biomembranes, 21:61-75 (1989).  
2) Wada et al., Nature, 347:200-203 (1990).

## 3aA07

シロイヌナズナのグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼの cDNA の解析

西田生郎、田坂恭嗣、白石英秋、村田紀夫 (基生研)

グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼは、高等植物の低温感受性の原因物質と考えられている脂質分子種の生合成を支配する。我々は、すでに、低温耐性植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の本酵素のゲノム遺伝子 (*AtsA* 遺伝子) を単離し、構造を決定している (日本植物学会第54回大会)。本研究では、*AtsA* 遺伝子の mRNA に対する cDNA クローンを単離し、構造解析及び大腸菌での発現を行った。

*AtsA* 遺伝子断片をプローブとしてシロイヌナズナの  $\lambda$  ZAPII cDNA ライブラリーをスクリーニングし、1,377 bp の翻訳領域を含む全長 1,445 bp の cDNA クローンを単離した。塩基配列の解析から、このクローンは、*AtsA* 遺伝子の mRNA に対する cDNA であることがわかり、*AtsA* 遺伝子の発現が証明された。

トランジットペプチドを除く 369 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする cDNA 遺伝子を、発現ベクター pET3c を用いて大腸菌 BL21(DE3) 中で発現させたところ、菌の可溶性画分に、あらたに本酵素活性が検出された。このことは、*AtsA* 遺伝子が本酵素ポリペプチドをコードすることの直接的証明である。また、この酵素活性は、18:1-ACP に対する選択性を示した。このことは、高等植物の低温耐性における本酵素の役割を支持する結果であった。

## 3aA08

アシルー（アシルキャリアプロテイン）ハイドロラーゼの精製

今井博之<sup>1</sup>、西田生郎<sup>1,2</sup>、村田紀夫<sup>1,2</sup>（<sup>1</sup>総研大・分子生物機構論、<sup>2</sup>基生研）

高等植物の葉において、アシルー（アシルキャリアプロテイン）ハイドロラーゼ（以下、アシル-ACPハイドロラーゼと略す）は、葉緑体から細胞質への脂肪酸輸送過程の最初の反応を触媒して、細胞質のグリセロ脂質合成系への脂肪酸の供給を支配している。我々はこの分子機構を解析するために、等電点が4.5、5.3および7.8のアシル-ACPハイドロラーゼのイソ型（それぞれAH1, AH2およびAH3と略す）をカボチャ子葉の葉緑体より分離している（日本植物生理学会1990年度年会）。本研究では、AH1タンパク質の精製を行った。

カボチャの種子を連続照明のもとで発芽させ、芽生えを25°C、7日生育させたのち実験に用いた。この抽出液を酸沈澱法、ポリエチレングリコール沈澱法、DEAE-Toyopearl 650C、Sephacryl S-200HR、ACP-affinity および Mono-P の各クロマトグラフィーにより6,500倍まで精製した。これをTSKgel G3000SWゲルろ過カラムに供して、AH1の分子量を55,000と推定した。この活性画分をSDS-PAGEに供したところ、分子量33,000のポリペプチドが活性と対応することがわかった。この結果と先のゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果から、AH1は分子量6万前後の二量体であると推定された。

## 3aA09

原形質膜のプロトン輸送におけるりん脂質の分子種の影響

笠毛 邦弘・山西 弘恭（農水省・食総研）

プロトン輸送に関与する原形質膜結合ATPase活性は、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)それにホスファチジルグリセロール(PG)によって活性化され、またPCの分子種においては、Sn-1及びSn-2のいずれかが飽和脂肪酸、他方が不飽和脂肪酸を持つものももっとも強く活性化することを前回本学会で報告した。そこで今回は、プロトン輸送においても分子種間にこのような違いがあるかを、我々が構築した再構成膜小胞を用いて明らかにしたので報告する。

原形質膜はヤエナリ(*Vigna radiata* L.)の胚軸から得た。ATPaseはデオキシコール酸とZwittergentで可溶化したものを用いた。種々のりん脂質の分子種の再構成膜小胞は、デオキシコール酸希釈法を用いて調製した。再構成膜小胞を介してのプロトンの輸送は、キナクリンの蛍光のクエンチングで測定した。

その結果、Sn-1及びSn-2のいずれかが飽和脂肪酸、他方が不飽和脂肪酸の組み合わせで、アルキル基の長さが16-18であるPC, PSあるいはPGのプロテオリポゾームでもっとも強いプロトンの輸送がみられた。またプロトン輸送はATPaseの活性とほぼ一致した。

## 3aA10

塩ストレス状態のモヤシマメ幼根における原形質膜および液胞膜  
プロトンポンプの活性化

○中村 善行, 笠毛 邦弘<sup>1</sup>, 太田 英二, 坂田 亮<sup>2</sup> (慶大理工計測,  
<sup>1</sup>農水省食総研分子情報解析, <sup>2</sup>杏林大医学)

植物細胞の原形質膜および液胞膜に存在するH<sup>+</sup>-ATPaseは、H<sup>+</sup>を細胞質からそれぞれ細胞外および液胞内に能動輸送する酵素で、植物が環境変化に対応して細胞内の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている。昨年の大会で我々は、塩ストレス状態で、モヤシマメ幼根細胞のH<sup>+</sup>-ATPase活性が上昇することを報告した。そこで今回は、高濃度のNaClを含む培地と含まない培地で育成したモヤシマメ培養細胞から各々原形質膜および液胞膜小胞を調製し、その膜結合性H<sup>+</sup>-ATPaseのH<sup>+</sup>-pumping活性を蛍光色素を用いて調べた。さらに、このATPaseをリボゾームに組込んだプロテオリボゾームを作製し、その活性とH<sup>+</sup>-pumpingを調べた。また、植物細胞の耐塩性との関連が注目されている液胞膜結合性H<sup>+</sup>-PPiaseの活性とH<sup>+</sup>-pumping活性に及ぼす塩ストレスの影響についても検討した。

その結果、高塩濃度環境で育成した細胞の原形質膜および液胞膜H<sup>+</sup>-ATPaseは、いずれもそのH<sup>+</sup>-pumping活性が上昇することがわかった。また、これらATPaseをリボゾームに組込んだ再構成膜でも加水分解活性およびH<sup>+</sup>-pumping活性の上昇が見られた。一方、液胞膜PPiaseは、塩ストレスによってその活性が低下し、H<sup>+</sup>-pumping能力も減少することがわかった。以上の結果から、植物の耐塩生長においてH<sup>+</sup>-ATPaseが積極的役割を果たしている可能性が示唆された。

## 3aA11

植物培養細胞の液胞膜ピロリン酸依存性プロトン輸送と  
塩ストレス

○朽津和幸, 笠毛邦弘<sup>1</sup> (農水省・生物研・細胞生理, <sup>1</sup>農水省・食総研・分子情報解析)

植物細胞が塩ストレスを受けて死に至るのは、必ずしも浸透圧差による脱水によるのではなく、細胞内にNa<sup>+</sup>が流入し、逆にK<sup>+</sup>が流出することが重要な原因と考えられているが、その細胞、分子レベルの機構は明らかでない。我々は、*in vivo* <sup>31</sup>P-NMR法を用いて、耐塩性緑藻 *Dunaliella* では、塩ストレスを受けると、H<sup>+</sup>が細胞外に放出され細胞内pHが変化すること (Plant Cell Physiol 30:407-414(1989)、ストレスに弱い車軸藻では、酸性コンパートメントである液胞から細胞質へH<sup>+</sup>が流出すること (Plant Physiol 90:1102-1107(1989)) を報告した。塩ストレスにより細胞が傷害を受ける際には、液胞膜上に存在するH<sup>+</sup>-ポンプが阻害される可能性が考えられたので、イネ及びタバコの液体培養細胞から液胞膜を単離して検討した。単離液胞膜にはH<sup>+</sup>-ATPaseとH<sup>+</sup>-Pyrophosphatase (PPase) の2種のH<sup>+</sup>-ポンプが存在した。H<sup>+</sup>-ATPase活性は、ほとんどNa<sup>+</sup>の影響を受けなかったが、液胞膜のPPase及びピロリン酸依存のH<sup>+</sup>輸送活性はK<sup>+</sup>により活性化され、またK<sup>+</sup>存在下でNa<sup>+</sup>によって強く阻害された。Cl<sup>-</sup>は活性に大きな影響を与えなかったが、F<sup>-</sup>は活性を強く阻害した。この結果、細胞質のNa<sup>+</sup>が増加しK<sup>+</sup>が減少する条件下では、H<sup>+</sup>-PPaseによるH<sup>+</sup>輸送活性が大きく低下することが明らかとなり、H<sup>+</sup>-ポンプが、塩(Na<sup>+</sup>)ストレスのターゲットとなっている可能性が考えられる。

## 3aA12

イネ根原形質膜からの  $\text{NO}_3^-$  及び  $\text{Cl}^-$  輸送体の再構成について

○原田久富美・脇内成昭<sup>1</sup>・末吉邦<sup>2</sup>・王子善清<sup>2</sup>

(神戸大、自然科学・<sup>1</sup>共同研究センター・<sup>2</sup>農)

イネ幼植物根から水性二層分配法により原形質膜小胞を精製しデオキシコール酸を用いて可溶化した。可溶化タンパク質は、リン脂質と混合した後、Sephadex G-100カラムを用いてデオキシコール酸を除去することによりリボソームへ再構成した。再構成リボソームは、ATP依存性のアクリジンオレンジの蛍光消光を示したが、これはバナジン酸により強く阻害され、原形質膜の  $\text{H}^+$ -ATPase が再構成されていると考えられた。種々のアニオンの存在下での再構成リボソームに形成される  $\Delta\text{pH}$  の測定は、FITCデキストランを用い、この色素をリボソーム内に取り込ませて、その蛍光強度の変化により行った。FITCデキストランとアクリジンオレンジの結果の比較から、アニオンのリボソーム内部への透過速度がキナクリンやアクリジンオレンジの蛍光消光速度の律速となりうるということが推察され、キナクリンの蛍光消光の初速度をアニオン輸送速度の指標として用いた。蛍光消光の初速度は、 $\text{NO}_3^-$  の濃度に対して見かけ上飽和曲線となり、 $\text{Cl}^-$  の場合はより直線的であった。また、アニオンチャンネルブロッカーである DIDS により蛍光消光の初速度は阻害されたが、ATPase 活性、pH 差、膜電位差形成の阻害は起こっておらず、DIDS の効果は、アニオンのリボソーム内部への輸送あるいは蓄積が阻害された結果であると考えられ、再構成リボソームにこれらのアニオン輸送体が存在する可能性が示唆された。

## 3aA13

CAM 植物葉の液胞膜のリンゴ酸輸送に関与する 2 種類のイオンチャンネルの生理的意義

○岩崎郁子、荒田博行、楠見健介、木島博正<sup>1</sup>、西村光雄  
(九大・理・生物、名大・理・物理<sup>1</sup>)

ベンケイソウ型酸代謝 (Crassulacean Acid Metabolism 略して CAM) を行なう CAM 植物の液胞は、光合成に必要な二酸化炭素の一時貯蔵所として夜間リンゴ酸を大量に蓄積 (隔離) する。そこで液胞膜の物質輸送の機構を解明するため、CAM 植物 *Graptopetalum paraguayense* の葉の液胞膜から inside-out patch を作りチャンネルの解析を行なった。内外の溶液が pH 7.5 でリンゴ酸の 99% 以上が -2 価で存在する条件で、電極内液 (細胞質側) の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が 1 mM のときチャンネル電流は正 (細胞質側から液胞内側へ向かう) で整流作用を示した。これは Hedrich と Neher (1987) の SV-type のチャンネルと同様の性質であった。この場合リンゴ酸が液胞からの排出の方向に動いたことになる。一方、細胞質中の遊離の  $\text{Ca}^{2+}$  を  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  M とした時はチャンネル電流は負で整流作用を示し、SV-type や整流作用をもたない FV-type のチャンネルとは異なることがわかった。この場合では -2 価のリンゴ酸が液胞内へ入る方向に動く。一方、取り込まれた  $\text{CO}_2$  をリンゴ酸にする最初の過程で働く phosphoenolpyruvate carboxylase は昼夜でリンゴ酸に対する感受性が異なることが知られている。この酵素のリンゴ酸に対する  $K_i$  値等から細胞質中のリンゴ酸濃度を推定し、リンゴ酸の液胞への取り込み及び排出がおこなわれる細胞内の条件をさぐった。

## 3aA14

### 葉緑体共役因子(CF<sub>1</sub>)のATPase素反応の解析

久堀 徹、吉田賢右<sup>1</sup>、望月 桂<sup>2</sup> (横浜市大・生物、  
<sup>1</sup>東京工大・生命理学、<sup>2</sup>横浜市大・化学)

F<sub>1</sub>型のATPaseの反応機構は、これまでミトコンドリアF<sub>1</sub>、大腸菌のF<sub>1</sub>などを中心に調べられている。葉緑体共役因子CF<sub>1</sub>の場合には、酵素が他のエネルギー産生膜系由来のものと異なり、潜性であること、内在性の1個の強固に結合したADPを持っていること、ATPase活性自身がMgにより非常に強い阻害を受けることなどの理由により、十分な解析が行われていない。そこで、今回はATPのアナログTNP-ATP/ADPを用いてCF<sub>1</sub>の基質結合部位の性質、触媒反応について得られた結果を報告する。

CF<sub>1</sub>に1:1でTNP-ADPが結合すると可視領域に吸収変化を生じ、その形状は好熱菌F<sub>1</sub>の単離βサブユニットに対するこのアナログの結合によって生じる吸収変化に酷似していた。平衡透析法によりアナログの結合個数を測定すると、酵素あたり約1個の高親和性部位が存在するという結果が得られた。次に、CF<sub>1</sub>をTNP-ATPと1:1のモル比でインキュベートした後、ゲルろ過によって未結合のヌクレオチドを除去して得られるCF<sub>1</sub>:TNP-ATP複合体について、エタノール存在下でATPaseを測定すると、結合したTNP-ATPの加水分解は、酵素の代謝回転とは無関係に起こることがわかった。以上の結果は、TNP-アナログがβサブユニット上の高親和性部位に結合するが、その部位が定常状態の触媒活性には与からない結合部位であることを示唆している。

## 3aA15

### ユリのミトコンドリアATPaseについて

○関谷次郎、厚東良和、小川貴代、伊藤文、多田幹郎  
(岡山大・農・生物資源)

植物の雄性配偶体である花粉は、減数分裂や半数体細胞分裂などをへて成熟花粉になる。本研究では発生過程にある雄性配偶体のミトコンドリアATPaseの活性と本酵素の構造を明らかにすることを目的としてしているが、今回はユリ雄性配偶体の形成過程におけるミトコンドリアATPaseの活性変化と、ユリ球根のミトコンドリアF<sub>1</sub>-ATPaseの精製とその構造について報告する。

植物材料はテッポウユリを用いた。開花前の蕾から、あるいは開花した花から葯を取り出し、花粉を集めた。この花粉からショ糖で等張にした緩衝液で磨砕後、分画遠心でミトコンドリアを調製し、次いで低張緩衝液と超音波破碎操作で重ミトコンドリア粒子(SMP)を調製してATPaseの酵素活性を測定した。蛋白質当たりの酵素活性は小花粉細胞分裂直後の7-8cmの配偶体で最も活性が高く、その後低下した。しかし減数分裂後の配偶体SMPの活性は葯壁のそれの2-3倍あり、配偶体の本酵素活性は高かった。球根のミトコンドリアF<sub>1</sub>-ATPaseの精製はSMPの調製、クロロホルムによる可溶化、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーなどによって精製し電気泳動的に単一な酵素(分子量約380kD)を得た。また5種類のサブユニット(53、51、37、23、15kD)からなっていることが判明した。

## 3aA16

### Heterosigma akashiwo の細胞膜結合、 硝酸誘導性26kDタンパク質の特性

三橋敏、宮城布明、佐藤忍、藤伊正（筑波大・生物）

植物における硝酸イオンとりこみは硝酸イオンによって誘導される細胞膜タンパク質が関与していると考えられている。我々はこれまで、海産ラフィド藻 Heterosigma akashiwo を、窒素源として  $\text{NO}_3^-$  のみ、あるいは、 $\text{NH}_4^+$  のみを与えて培養したところ、前者に後者の約20倍の硝酸イオンとりこみ活性を検出し、その細胞膜上に硝酸イオン誘導性26kDポリペプチドの存在を確認しており、今回はその特性の解析を行った。

26kDポリペプチドは細胞膜画分から7M ureaや一連の界面活性剤処理によっては可溶化されず、0.1N NaOHにより抽出された。また、この画分を中和し、DEAE-Sepharose CL-6B, MonoQカラムにかけることにより部分精製を行った。

次に、このアミノ酸配列を分析するにあたりN末端が修飾されていたため、ババインあるいは、リジルエンドペプチダーゼで断片化し、内部部分配列を決定した。これにより、疎水性の高い次の配列をもつことが明らかとなった。

Tyr-X-Asp-Met-Ile-Val-Lys-Ala-Ile-Val-Ala-Leu

この配列は Escherichia coli 細胞膜のリボース輸送システムの rbsC タンパク質の一領域と高い相同性をもつことが判明した。さらに現在、このcDNAのクローニングを行っている。

## 3aB01

### 緑色光合成細菌における反応中心活性の測定系の再構築

村井忠司・川端繁樹（富山県立大学工学部）

緑色光合成細菌 Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum の無細胞抽出液において、光合成反応中心（RC）活性は炭酸水素イオン（ $\text{HCO}_3^-$ ）によって促進を受ける。この現象は、反応溶液に細菌の培養液と同じ組成の無機塩類の存在のもと（条件Ⅰ）において認められる。

RC活性の発現に培養液の無機塩類のいずれが影響するかを調べたところ、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、および、 $\text{NaCl}$  が有意に作用した。次に、反応溶液に、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 、あるいは、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  と  $\text{NaCl}$  を添加した条件、あるいは、これらの無機塩類を添加しない条件のもと（条件Ⅱ）で、RC活性に及ぼす  $\text{HCO}_3^-$  の効果を調べた。その結果、RC活性はいずれの場合においても  $\text{HCO}_3^-$  によって同じ程度に促進を受けた。そこで、反応溶液に無機塩類を無添加の条件のもと（条件Ⅲ）で、RC活性に及ぼす種々の濃度の  $\text{HCO}_3^-$  の効果を測定した。RC活性は  $\text{HCO}_3^-$  の濃度の増加にともない高くなり、 $\text{HCO}_3^-$  の活性化定数（ $K_a$ ）は16.7mMであり、このときRC活性は3.6倍の促進を受けた。

なお、反応溶液に、条件ⅠおよびⅡではグリコール酸を添加したが、条件Ⅲでグリコール酸は添加しなかった。条件Ⅲにおいて、RC活性はグリコール酸の存在を要することなく  $\text{HCO}_3^-$  によって促進を受けた。

## 3aB02

### 光合成細菌光反応ユニットのシート形成の試み

原正之、三宅淳、浅田泰男（通産省工業技術院、微生物工業技術研究所）

紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas viridis* の光合成膜（クロマトホア）には光合成反応中心蛋白質と集光クロロフィル結合蛋白質から成る色素蛋白質複合体、光反応ユニット（PRU）が存在する。我々は界面活性剤 CHAPS を用いて PRU を可溶化、精製して安定な精製標品を得る事に成功し、既に報告している(1)。今回は透析法を用いて、PRU の三次元結晶と思われるシート状の固まりを得たので報告する。

光合成膜を CHAPS で可溶化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により PRU を精製し、濃縮した。濃縮溶液を遠心して不溶物を除き、10 mM Tris-HCl (pH 8.2) に2週間透析すると透析チューブ内に 0.1 - 2.0 mm 程度の PRU シートが生成する。

シートは緑色で精製 PRU と類似の吸収スペクトルを有しており、SDS-PAGE により分析したサブユニット組成も PRU のそれと同様であった。光学顕微鏡下で観察するとシートは平滑な表面と直線的な辺縁部を持っているが複屈折性は認められなかった。シートを乾燥し、白金・炭素レプリカを作成して電子顕微鏡による表面構造の観察を行うと PRU と思われる粒子が多数配列、積層しているのが観察された。以上の実験結果よりこのシートは PRU の3次元結晶、もしくはそれに類似した蛋白質集合体と考えられる。

参考文献 (1) Hara, M. et al. (1990) *Plant & Cell Physiol.* 31, 951-960.

## 3aB03

### 緑色硫黄細菌 *Chlorobium limicola* における反応中心結合型 Cytochrome c 光酸化と還元

奥村信蔵、嶋田敬三、松浦克美（都立大・理・生物）

緑色硫黄細菌 *Chlorobium limicola* の反応中心複合体（RC）は、高等植物の光化学系 I に類似したものと考えられているが、その性質は電子伝達経路とともに詳しくは判っていない。本研究では光酸化された RC のバクテリオクロロフィルを還元する Cytochrome c について、主に RC 結合型の Cytochrome c が存在するかどうかを閃光照射による Cytochrome c の酸化還元によって調べた。測定には、生細胞とそれから調整した膜標品を用いた。

生細胞に閃光照射を行うと、好氣的条件下では Cytochrome c の光酸化はごく小さかったが、嫌気条件にして 0.2~0.5 mM の  $\text{Na}_2\text{S}$  を加えると大きな酸化がみられ、短い間隔での繰り返し閃光照射で1回の閃光の数倍の酸化がみられた。各閃光後の酸化速度は 100  $\mu\text{s}$  以下であった。1回の閃光による光酸化のスペクトルのピークは 552 nm で、複数回閃光後のピークは 1 nm ほど長波長側にシフトしていた。酸化された Cytochrome c の還元は、 $\text{Na}_2\text{S}$  の濃度の増加に伴い速くなった。同様の結果は、膜標品における測定でも得られた。

以上の結果から、緑色硫黄細菌の RC には紅色細菌と類似の複数のヘムを持つ、RC 結合型 Cytochrome c が存在することが示唆された。

## 3aB04

好気性光合成細菌 Roseobacter denitrificans における  
カロテノイドの嫌気条件下での光還元  
原島圭二、高市真一<sup>1</sup>（八千代国際大、<sup>1</sup>日本医大・生物）

暗所で好氣的に生育して bacteriochlorophyll をたくわえた Roseobacter denitrificans（旧名：Erythrobacter sp. OCh 114）の細胞を嫌気条件下で光照射すると carotenoid の主成分、赤色の spheroidenone (I) の一部が黄色い色素に変化する。その一つは UV, <sup>1</sup>H-NMR および FD-MS スペクトルの解析によって、3,4-dihydrospheroidenone (II) と決定した。II は I の 3,4 位の C,C-二重結合の還元によって生じたと思われる（Takaichi et al. Arch. Microbiol.: 印刷中）。

嫌気光照射細胞中には I および II 以外の黄色い色素が多数見られるが、それは逆相 HPLC によって A, B, C の 3 画分に分離できた。A 画分は diketo-（三級）monohydroxy 化合物から成り立ち、B 画分は diketo 化合物から成り立っていた。これらの物質の構造の詳細は分からない。しかし FD-MS、クロマトグラフィーでの挙動などから判断すると、A 画分は I または II および OH-spheroidenone または dihydro-OH-spheroidenone が結合した二量体、B 画分は I または II が 2 分子結合した二量体であると考えられる。このような不可解な現象は、光照射で生じ、嫌気条件下で堰き止められた電子の異常な振る舞いによって起きた酸化還元反応の結果であると思われる。

## 3aB05

Roseobacter denitrificans (Erythrobacter sp. OCh 114) のトリメチルアミン N-オキシド呼吸に関与する電子伝達系

<sup>0</sup> 荒田博行、清水実、高宮建一郎（九州大学・理・生物）

好気性光合成細菌 Roseobacter denitrificans は、近縁の通性嫌気性の光合成細菌、Rhodobacter capsulatus や Rhodobacter sphaeroides と同様、トリメチルアミン N-オキシド (TMAO) を電子受容体として嫌気性呼吸をする。その電子伝達系には、シトクロム b-c<sub>1</sub> 複合体が関与し、この点で R. capsulatus と異なる。

また、この細菌はシトクロム c<sub>2</sub> (シトクロム c<sub>551</sub>) の他に二種類の可溶性の低分子量 (SDS-PAGE 上で 14,000 と 13,500) の c 型シトクロムを持っている。14 kDa のシトクロムは TMAO 存在下で好氣的に培養すると増加し、13.5 kDa のシトクロム (シトクロム c<sub>552</sub>) は TMAO 存在下で嫌氣的に培養すると増える。

R. denitrificans の可溶性画分には、これら三種のシトクロムを TMAO によって酸化する反応を触媒する活性がある。しかし、その活性は TMAO リダクターゼ (還元型メチルヴィオローゲンを電子共与体にして活性を測定) を精製する過程で失われる。TMAO リダクターゼとシトクロムの他に TMAO 呼吸に関与している成分があるか、TMAO リダクターゼはシトクロム b-c<sub>1</sub> 複合体から直接電子を受け取り、可溶性の c 型シトクロムを TMAO が酸化する反応は artifact であるか、どちらかだと考えられる。

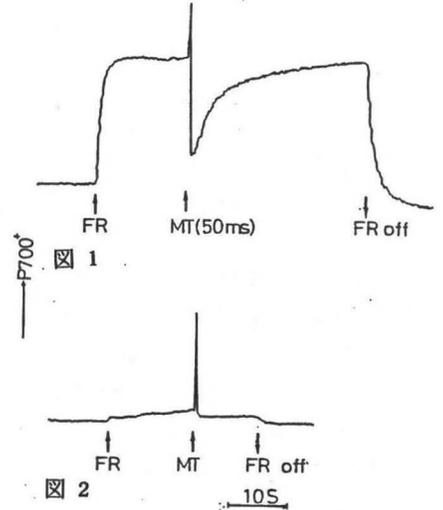
# 3aB06

*Synechococcus* sp. PCC 7002 の P700 の酸化還元

米 華玲<sup>°</sup>・遠藤 剛・浅田 浩二 (京都大学 食研)

*Synechococcus* sp. PCC 7002 では *Nostoc muscorum* と比べ、赤外光 (FR) による P700 の光酸化がされにくいことを見出した。この機構を FR 照射下での閃光による P700 の酸化還元及び蛍光の変化に対する阻害剤の効果から解析した。

Intact cells に FR を照射すると、*N. muscorum* (図 1) に比べ、*S. 7002* の P700 の光酸化レベルは低かった (図 2)。DBMIB を添加すると、FR による P700 の酸化は促進されたが、DCMU 添加及び嫌気条件下では影響されなかった。また、FR の前照射によって蛍光収率が高くなり、これも DBMIB の存在下で促進された。以上の結果から *S. 7002* における FR による低い P700 の光酸化レベルは PSI を中心としたプラストキノンを経由する循環的電子伝達によって P700 が速やかに還元されるためと考えられる。



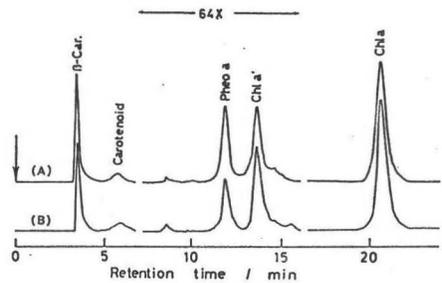
# 3aB07

光適応した *Synechocystis* PCC 6714 における光化学系反応中心の Chl a' と Pheo a 量による定量

前田広幸, 村上明男<sup>2</sup>, 小林正美<sup>1</sup>, 渡辺正, 藤田善彦<sup>2</sup>

(東大・生研,<sup>1</sup>筑波大・物質工学,<sup>2</sup>基生研・細胞生物)

シアノバクテリアから高等植物までの光合成系の光化学反応中心では、反応中心あたり Pheo a が 2 分子存在する。また我々は最近、反応中心 I あたり 1 分子の Chl a のエピマー (Chl a') が存在することを確認した。従って、以上 2 つの微量色素の HPLC 定量により反応中心 I、II が簡便かつ迅速に定量できると期待される。そこで今回、環境の光質によって反応中心 I / II 比を著しく変えるシアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6714 に本法を適用した。その結果、主として系 I を励起する光および主として系 II を励起する光に馴化したシアノバクテリアの反応中心 I / Chl a, 反応中心 II / Chl a および反応中心 I / II 比として、それぞれ従来の測定法に基づく報告値とよく一致する値が得られた。また、試料を共通とした両測定法の結果について併せて報告する。



*Synechocystis* PCC 6714 抽出液の HPLC チャート A) PS I 光下 B) PS II 光下

## 3aB08

チトクロム  $b_6-f$  複合体をめぐる電子伝達の温度依存性

— *Synechocystis* PCC 6714 の場合

村上 明男<sup>1</sup>・顧 天青<sup>1,2</sup>・藤田 善彦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>基生研・細胞生物、<sup>2</sup>中国科学院・植物研)

我々は、光合成光条件に適応して光化学系・電子伝達複合体の構成量比が大きく異なった標記ラン藻について、定常的に光合成が進行している時の Cyt  $f$  と P700 の閃光誘起酸化・還元から定常状態での光合成電子伝達系の解析を行い報告した。今回は、電子伝達の各段階での反応の特徴を更に明らかにする手段の一つとして、閃光誘起酸化・還元反応の温度依存性を調べた。25°C で培養した2種類の細胞、高PS I / PS II 細胞 (PS II : Cyt  $b_6-f$  : PS I  $\cong$  1:1:3) と低PS I / PS II 細胞 (PS II : Cyt  $b_6-f$  : PS I  $\cong$  1:1:1) について5~35°C の範囲で解析を行った。その結果、閃光後の Cyt  $f$  還元速度常数は両細胞共強い温度依存性を示した。また、高PS I / PS II 細胞では温度によらず全量の Cyt  $f$  が閃光により酸化したが、低PS I / PS II 細胞では低温下で閃光による酸化量が減少した。しかし、連続光下では全量が酸化し、温度の影響はなかった。また、Cyt  $b_6$  の閃光による還元とその後の酸化は、閃光後の Cyt  $f$  還元と同様な強い温度依存性を示した。一方、閃光後の P700 還元の温度依存性は、低PS I / PS II 細胞での Cyt  $f$  酸化量の温度依存性と一致し、プラストシアニンの酸化・還元が Cyt  $f$  還元の場合のような強い温度依存性を持たないことを示唆した。以上の結果を報告し、Cyt  $b_6-f$  複合体をめぐる電子伝達反応の特徴について論ずる。

## 3aB09

チトクロム  $b_6-f$  複合体の電子伝達とPS I アセンブリの

関係 — *Synechocystis* PCC 6714 の場合

村上 明男・藤田 善彦 (基生研・細胞生物)

光合成光条件によるチラコイド電子伝達系の構成制御、特にPS I 存在量の調節を電子伝達の定常状態との関連で解析を行った結果、①Cyt  $b_6-f$  複合体の還元レベルがPS I 量の調節と強い関連性を示すこと、②特にCyt  $b_6$  の還元レベル、またはCyt  $b_6$  を経由する電子伝達流束が高い時に、PS I 形成の促進が起こることを見だし報告した。この点を更に明らかにする目的で、Cyt  $b_6$  の酸化を阻害するHQNOを用いて、そのPS I 形成への影響を検討した。HQNOは不安定であり、長時間を要する我々の実験系では使用が困難である。そこで、安定性を検討の上、5時間毎に再添加する方法を案出した。50  $\mu$ M のHQNOは還元型Cyt  $b_6$  の著しい蓄積を起こす。この濃度のHQNOは、①PS I 量が増加し、高いPS I / PS II 比のチラコイド系を維持する光条件下では、細胞のPS I / PS II 比にかかわらずPS I 量の増加を抑制し、量比の低下を起こした。しかし、②PS I / PS II 比が低下する光条件下では、量比の低下に影響を与えなかった。このPS I 形成におけるHQNOの抑制効果は、Cyt  $b_6-f$  複合体の"Q"サイクルがPS I 形成の制御と強い関連を持つことを示唆する。また、PS I 形成の促進能を欠いた突然変異株の中に、Cyt  $b_6$  の酸化がHQNO阻害を受けにくい株が存在することを見いだした。これらの結果を報告すると共に、PS I 形成の調節とCyt  $b_6-f$  複合体をめぐる電子伝達状態との関連について論ずる。

## 3aB10

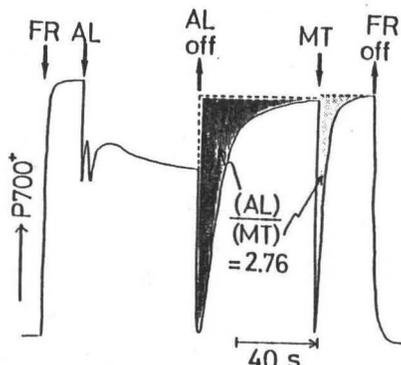
生葉での光化学系 I への電子供与プールサイズの光照射による増加

浅田浩二、U. Schreiber<sup>1)</sup>、U. Heber<sup>1)</sup> (京大食研、

<sup>1)</sup> U. Würzburg)

生葉で光化学系 I - II 間に電子を供与できるプールサイズを P700 の酸化、還元から測定した。FR を照射しつつ白色光 [AL] 照射を行い、AL を off にした後の面積 (AL) と 50 ms 閃光 [MT] 照射後の面積 (MT) を測定した。(MT) は系 II - I 間の主としてプラストキノン (PQ) による電子プールサイズを示すので、(AL) / (MT) から AL によって生じた P700 に電子を供給できるプールサイズを求めた。

(AL) / (MT) は AL 照度の増加と共に高くなり陽葉植物では 2.7-2.9、陰葉植物では 2.0-2.2 の値を示した。一方、嫌気条件下におくと陽葉植物では 7.5-9.0、陰葉植物では 3-5.8 となった。フェレドキシン (Fd) 含量は PQ とほぼ等しい反応中心当たり ~8 分子 [BBA, 723, 400 (1983)] であるので、(AL) / (MT) の値は Fd 以外に NAD(P)H などが系 II - I 間に電子を供与できるプールとなることを示す。反応中心の PQ 含量が高い陽葉植物の (AL) / (MT) 比が高いことは系 II - I 間への電子供与が光環境適応の一つの機構であることを示唆する。



## 3aB11

KCN による葉緑体酸素光吸収の促進

遠藤 剛、U. Schreiber<sup>1)</sup>、C. Neubauer<sup>1)</sup>、浅田浩二

(京都大学・食糧科学研究所、<sup>1)</sup> Universität Würzburg)

炭酸固定系を阻害した葉緑体では、酸素が光還元され、生成した過酸化水素は、電子伝達と共役したアスコルビン酸ペルオキシダーゼ、モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素によりさらに光還元され水が生成する。この際、Mehler 反応 (酸素吸収) と水分解反応 (酸素発生) が同時に起こるため見かけ上、酸素濃度の変化はない。Iodoacetamide または glyceraldehyde により炭酸固定を阻害し、さらに KCN によりアスコルビン酸ペルオキシダーゼを阻害したホウレンソウ無傷葉緑体では、酸素の吸収がみられた。この場合の KCN の効果はカタラーゼおよびプラストシアニンの阻害によるものではないことを確認した。また KCN による酸素吸収とともに、蛍光の photochemical、および nonphotochemical quenching が低下した。酸素吸収と photochemical quenching の低下は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ阻害による 1) 電子伝達活性全体の低下に伴う酸素発生の低下、または 2) 還元された電子伝達鎖による Mehler 反応の促進に由来すると考えられる。現在両仮説の検討を行っている。Nonphotochemical quenching の低下は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ阻害による膜電位形成の低下を示し、過酸化水素の光還元系が膜電位形成の制御に機能し得ることが明かになった。

## 3aB12

### マレイミド化合物によるチラコイド膜からの H<sup>+</sup> 放出阻害

山崎秀雄, 岡山繁樹<sup>1</sup>, 西村光雄 (九大・理・生物, <sup>1</sup>九大・教養)

葉緑体チラコイド膜における ATP 合成 (光リン酸化) は、膜を介した H<sup>+</sup> の濃度勾配 ( $\Delta pH$ ) を駆動力としている。 $\Delta pH$  形成に関与する電子伝達反応には、シトクロム *b<sub>6</sub>/f* 複合体近傍のプラストキノンの酸化還元や、光化学系 II、I での電子供与体の酸化及び受容体の還元が知られている。これら一連の反応の結果、stroma 側からルーメン側へ H<sup>+</sup> がベクトル的に輸送される。プロトノフォアの添加等によってチラコイド膜胞の H<sup>+</sup> 保持能を低下させると、見かけ上ベクトル性 H<sup>+</sup> 輸送は、減少又は消失することが期待される。ところが、実際には H<sup>+</sup> の取り込みにかわって、スカラー性の H<sup>+</sup> の放出と暗中で緩和が見られるようになる。この光誘起性 H<sup>+</sup> 放出の性格、機構、エネルギー変換に対する寄与などは不明のままである。我々はチラコイド膜で見られる H<sup>+</sup> 放出が他の膜系でも起きる現象か否かを再検討した。代表的なエネルギー変換膜系としてラット肝臓より調製したミトコンドリアと、光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* クロマトフォア膜を用いた。その結果、呼吸による垂ミトコンドリア粒子での H<sup>+</sup> の取り込みも、クロマトフォア膜での光誘起性の H<sup>+</sup> の取り込みもプロトノフォアの濃度に依存して見かけ上減少していくが、チラコイド膜のような H<sup>+</sup> 放出は高濃度域でも観察されなかった。チラコイド膜からの H<sup>+</sup> 放出は、マレイミドによって阻害される。N-ethylmaleimide (NEM) による 50% 阻害濃度は pH 7.0 で 10 mM であり、この条件下では通常のベクトル性の H<sup>+</sup> の取り込みも電子伝達活性も顕著な阻害を受けていなかった。チラコイド膜を NEM 存在下で照射下及び暗中で前修飾を行なうと、照射下で処理したものだけに阻害が見られた。NEM による光依存性の阻害は、H<sup>+</sup> 放出が膜タンパク質ドメインの構造変化によることを強く示唆している。チラコイド膜に特異な H<sup>+</sup> 放出のエネルギー変換に対する寄与等を考察する。

## 3aB13

### ゼンマイ胞子の発芽時における葉緑体の光化学的性質

井上 弘・太田桂子・田村典明 (富山大・理・生物)

ゼンマイ (*Osmunda japonica*) の胞子は葉緑体を持っている。クロロフィル類としては、クロロフィル a と b だけを含み、他の誘導体は認められない (塩井祐三氏の HPLC による測定)。吸水させた直後の胞子は、僅かの光合成活性しか示さないが好気状態に置くことにより、活性は増大してくる。今回は、主に、吸水後に培養した胞子から葉緑体を単離し、その電子伝達反応活性の変動を観察し、光合成活性誘導の主要因が光化学反応系の形成であるか否かを検討した。

吸水直後の胞子から単離した葉緑体においても系 II (H<sub>2</sub>O → DCIP) 反応および系 I (DCIPH<sub>2</sub> → MV) 反応活性は存在し、それぞれ約 30 μmol DCIPH<sub>2</sub> と約 50 μmol O<sub>2</sub>/mgChl・h であった。暗培養した時、系 II 活性は減少するが系 I 活性は増大する。照射下で培養した場合には、系 II 活性は増大するが、系 I 活性は 1 2 時間までは増大するがその後、低下する傾向にある。このほか、蛍光の観察から、吸水直後の光合成誘導については、系 I および II それぞれの活性増大以外の要因も考慮する必要がある。

前回、この光合成誘導は、クロラムフェニコールで阻害されることを報告したが、更に、リンコマイシン、エリスロマイシン、ストレプトマイシンなどの添加効果を検討した結果、これらは吸水後の光合成誘導には殆ど影響を与えなかったので光合成誘導に必要な蛋白質はすべて胞子中に準備されていると言える。

## 3aB14

マングローブチラコイド膜における光化学活性

○池原規勝, 嘉数 修, 新川百合子, 山城尚美,

Goh Chang Hyo (琉球大・理・生物)

熱帯・亜熱帯の湾岸や河口の汽水条件下で特異的に生育するマングローブについて、光化学活性を有するチラコイド膜の単離とその特性についての実験を試みた。タンニンを中心とする多くのphenol様物質を含むマングローブからの活性のあるチラコイド膜の単離は、木本性植物の故に困難とされていた。Critchleyらの報告と我々の研究室からの報告にもそれらが見られた。その難しさを克服すべく、色々な工夫を試みた結果、PPI(ピロリン酸)をbufferに加えることによって光活性を持つチラコイド膜の単離に成功した。そのチラコイド膜における光化学活性の特性について報告したい。電顕からの構造を見る限りにおいては何の変化も見られないがATP合成能に一つの疑問がもたれた。すなわち、アンモニアによるuncouplingと光によるpHの変化が見られなかったのである。しかし、PPIをbufferに加えることによってこれらは解消できた。PPIをbufferに加えることによってFeCNやNADPの光還元はもとよりLight-dependent pH changeも見られるようになり、ATP合成能も有するチラコイド膜が得られた。光化学IとIIとの連続性も確認できた。それにしてもマングローブには多くの光活性に作用を及ぼす物質が含まれている可能性があり、今後の詳しい研究が要求されるものと思われる。今後はこれら物質と光化学活性との相関関係を調べていきたい。

## 3aD01

イネ・アスパラギン酸キナーゼの多様性

—リジン及びスレオニン阻害型アイソザイム

○清田誠一郎, 坂野勝啓(農水省・生物研)

イネ幼植物緑葉からアスパラギン酸キナーゼを精製を試みた。その過程で、リジン阻害型アスパラギン酸キナーゼ(Lys-AK)は、DEAE-Toyopearlで2つのピーク(溶出塩濃度の低い方からpeak1, peak2)を示し、アイソザイムの存在が示唆された。また、その2つの活性の比に実験毎の変動が見られたので<sup>1)</sup>、播種後の日数による変動があるのではないかと考え検討を行った。

温室で生育させたイネ幼植物葉を播種後、2-5週間の間1週毎に採取し、50mM Potassium phosphate buffer(pH 7.6), 15% glycerol, 0.1mM lysineで抽出、Sephadex G-25を通した粗抽出液をDEAE Toyopearl1カラムで分離し、AK活性の溶出パターンを解析した。活性の比(peak1/peak2)は、2.22から0.35まで変化した。測定液に10mMの濃度になるようlysineまたは、threonineを添加して活性を測定したところ、播種後2週間の葉を用いた実験で、従来報告していた2つのLys-AKの他にスレオニンで阻害を受ける活性(Thr-AK)が見られた。Lys-AK peak1, peak2, Thr-AKともにゲルろ過(Superose 12)による分子量に差は認められなかった。また、他のクロマトグラフィーにおいても挙動に大きな差は見られなかった。現在、3つのAKの関連を解明するため、精製を行っている。

1)日本植物生理学会1990年度年会講演要旨 p.56

### 3aD02

#### Spirulina platensis のシステイン合成酵素

中村勝人 (岐阜大・教養・生物)

システイン合成酵素 (CSase) は、硫酸還元系より供給される硫化物イオンとO-アセチルセリン (OAS) とを縮合してシステインを合成する。高等植物では電気泳動またはイオン交換クロマトグラフィーにより分離する多様性成分の存在、さらに、一次構造および触媒機能の異なる成分の存在が観察されている\*。本研究では、原核藻類である *Spirulina platensis* より CSase の分離・精製をおこない、得られた酵素標品に対する諸性質の検討をおこなった。

SOT 培地中で 30°C・2週間通気攪拌培養した *S. platensis* 藻体 (480g) を緩衝液存在下で超音波処理をおこない酵素を抽出した。抽出液は 65°C 加熱処理ならびに硫酸分画をおこなった後、クロマトグラフィーに供した。

本精製により 163 units/mg protein の比活性を示す電気泳動的に均一な標品を得た (収率 19%)。精製 CSase の構造上の性質として、分子量 36,500 のサブユニットの 2 量体であること、280 および 410 nm に吸収極大が存在することが明らかとなった ( $A_{410}/A_{280}=0.18$ )。酵素反応上の特性として、至適 pH が 8.0 であること、OAS に対する  $K_m$  値が 4.3 mM であること、および微弱ながら  $\beta$ -シアノアラニンならびにヒドロキシメチルシステイン合成酵素活性を有することが判明した。これらの性質は *Allium* (高等植物) CSase type I に類似している。一方、CSase 多様性成分は検出されなかった。\* 中村ら 日本植物生理学会 1988 年度年会要旨集 p. 289

### 3aD03

#### イネ培養細胞の NADH 依存性グルタミン酸合成酵素の精製

早川俊彦、山谷知行、小島邦彦 (東北大・農・農化)

生理的な役割が解明されていない NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) の特異抗体を作成する目的で、上記酵素の精製を行った。材料には、イネ葉や根の抽出液に比較して可溶性タンパク質当りの活性が高い、対数増殖初期のイネ (ササニシキ) 培養細胞を用いた。なお、この時期のイネ細胞では、イネ葉と異なり Fd-GOGAT 活性は低く、NADH-GOGAT 活性の 1/4 程度である。NADH-GOGAT 活性は、生成物のグルタミン酸を分離後、ニンヒドリン法で定量して求めた (1)。

イネ培養細胞 1 kg を液体窒素で凍結後、-80°C に保存した。200g 新鮮重相当のイネ細胞を、1 mM PMSF, 10  $\mu$ M leupeptine, 1 mM EDTA, 2 mM 2-oxoglutarate, 0.2% 2-ME, 100 mM KCl を含む 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.5) で磨砕し、その遠心上清を粗酵素液とした。NADH-GOGAT は、粗酵素液を順次 Butyl Toyopearl 650 M, Sephacryl S-300, Blue Sepharose CL-6B, Butyl Toyopearl 650S のカラムクロマトグラフィーで、815 倍に精製された。回収率は 6.1%、最終標品の比活性は 9.8  $\mu$ mol glutamate/min/mg protein であり、SDS-PAGE (7.5% gel) および native PAGE (7% gel) で純度を検定した結果、いずれも単一のバンドを示した。SDS-PAGE の移動度から求めた分子量は、196 kDa であった。その他の性質も、紹介する予定である。

1) Hata et al. (1990) *Plant Cell Physiol.* 31: 1071-1077.

## 3aD04

水稲葉の老化にともなう窒素転流とグルタミン合成酵素 (GS) - 第13葉身の先端から基部におけるGSの挙動 -  
○蒲地一成、山谷知行、前忠彦、小島邦彦  
(東北大・農・農化)

水稲は、生長するに従って順次下位葉から枯れ、老化葉の窒素を生長中の葉や穂に転流する。特に葉に最も多量に存在する Rubiscoは、重要な転流窒素源となっている。我々は、すでに窒素転流において細胞質型のグルタミン合成酵素 (GS1) が、窒素の再同化を担っていることを示唆する結果を得ている<sup>1)</sup>。そこで、本大会では、単葉内における GS1の挙動を老化と関連づけて明らかにすることを目的とした。

水稲 (ササニシキ) を水耕法によりガラス室内で育て、完全展開後の第13葉を老化の前・中・後期と分けて収穫した。それぞれの葉身を基部から 2cm ごとに細断し、Rubisco・クロロフィル・可溶性タンパク質・GS1タンパク質量の変動について調べた。その結果、老化前期の葉においては、Rubisco・クロロフィル・可溶性タンパク質の新鮮重当りの含量は、ともに葉身の先端部において高かった。一方、老化後期の葉においては、葉身の基部から先端部においてほぼ一定の低い値を示した。このことより、転流される窒素の大部分は、葉の先端部に由来することが強く示唆された。また老化前期の葉における GS1タンパク質量は、葉身の中心部で多いことが明らかとなった。現在、老化にともなう GS1タンパク質量の変動を解析している。

1) Kamachi et al. (1991) Plant Physiol. in press

## 3aD05

ダイズ登熟時の種皮、子葉におけるグルタミン酸代謝関連酵素群の量的変動

○増田亮一、蒲地一成<sup>1</sup>、早川俊彦<sup>1</sup>、山谷知行<sup>1</sup>、小島邦彦<sup>1</sup>  
(農水省・食総研、<sup>1</sup>東北大・農)

ダイズ種子の呈味性成分であるグルタミン酸は、遊離アミノ酸プールと同様に登熟中期に最大となり、その含量には品種間差が認められる。このような特性は、登熟中の篩管液の組成が品種間で異なること、あるいは、転流された窒素化合物を変換するアミノ酸代謝関連酵素活性が登熟中の種皮、子葉で異なることに由来すると考えられる。ダイズ種皮の柔細胞層でunloadingされたAsparagineは、細胞壁が厚く原形質連絡のない、denseな細胞質を持つ内層細胞に取り込まれた後、子葉組織に移行し、子葉では速やかにタンパク質に合成されると言われている。この細胞層のアミノ酸代謝関連酵素活性 (ASNase, aminotransferase, GS, Fd-, NADH-GOGAT, NADH-GDH, NADP-isocitrate dehydrogenase, PEPCase) は、種子の遊離アミノ酸含量を左右する重要な役割を果たしていると考えられる。

そこで、材料にアミノ酸含量に相違のあるダイズ品種を用い、酵素レベルの品種間差を検討した。種皮のGS活性は子葉より高く、GS1が主であった (western blot)。GDH活性も種皮で高かった。GOGAT活性は種皮と子葉でNADH-, FD-活性が同程度であった。ASNase活性は登熟に伴い、子葉、種皮とも低下し、中期以降は変化しなかった。登熟中の種皮のアミノ酸合成関連酵素群の量的変動が、種子グルタミン酸プール量に大きく反映することを発表したい。

## 3aD06

ホウレンソウ緑葉中に存在する同化型硝酸還元酵素不活性化因子の性質

吉村倫彰, ○奥尾勝彦, 佐藤隆英, 小倉長雄, 中川弘毅  
(千葉大, 園芸, 農化)

ホウレンソウ緑葉中には硝酸還元酵素(NR)活性を阻害するタンパク質性因子(NRI)がある。このNRIによる阻害反応は不可逆的であるが、NRIにはプロテアーゼ活性は認められていない。我々は前大会でこのNRIは2量体構造をとる分子量110KDaの糖タンパク質であることを述べた。今回は精製標品中に混在していた2種類の成分のうち、いずれがNRIであるかを同定し、さらにNRIの反応様式について検討を進めたのでそれらの結果を報告する。

(方法ならびに結果)

精製標品中に含まれる2成分のNRIの相互関係を検討するために、それぞれのペプチドマップを比較した。ペプチドマッピングは、SDS-PAGEにより得られる51KDaおよび53KDaのバンドを切り出し、これを濃縮ゲル中で*Staphyrococcus aureus* V8プロテアーゼと反応させることにより行った。この結果、各々のサブユニットから消化されたフラグメントはいずれも2KDa程度の差はあるが、マップは極めて類似していた。この結果から51KDa及び53KDaのサブユニットは、同一由来のものであると推定した。

NRIの反応生成物を非変性下のPAGEで分析するとNR及びNRIの移動度とは異なる、移動度より小さいバンドの出現が観察された。これらの反応生成物の分子量をヘドリック&スミスの方法により求めたところ、各々540, 790及び910KDaと算定された。これらの結果はホウレンソウ緑葉中のNRIにはNR分子を会合させる働きがあることを示している。

## 3aD07

ラン藻 *Trichodesmium* sp. NIBB1067株の窒素固定活性発現の制御

大城 香・Jonathan P. Zehr<sup>1</sup>・藤田善彦

(基生研・細胞生物, <sup>1</sup>ニューヨーク州立大・海洋研)

*Trichodesmium* sp. NIBB1067株の窒素固定活性の制御に鉄蛋白の転写後修飾が関与し、SDS-PAGE上で見かけの分子量の高い型が不活性型である可能性を昨年度の本年会で報告した。今回は本ラン藻を12時間明・12時間暗周期で培養し窒素固定活性と鉄蛋白の挙動を解析した。本ラン藻の窒素固定活性は光依存性で、明期初期2-3時間の誘導期を経て出現し明期中期に最大値に達したが、その後は照射されているにもかかわらず活性は徐々に減少し照射終了と同時に全く見られなくなった。窒素固定酵素は明暗期いずれの細胞からも検出されたが、暗期終期には鉄蛋白はすべて高分子型となっており低分子型は明期初期2-3時間の誘導期を経て検出され、その含量は明期中期に最大となった後徐々に減少したが明期終了時にも検出され、照射終了後3-5時間たって検出されなくなった。明期後期の酵素活性の低下は気相の一部を75%に置換すること、あるいはグルタミン酸合成酵素の阻害剤であるL-メチオニン-DL-スルホキシッド添加により阻止された。以上の結果から明期初期の活性化は光による酵素の活性化により、明期後期の活性の低下には細胞内窒素中間代謝物による酵素の不活性化によりそれぞれ制御されている可能性が考えられた。また高分子型鉄蛋白のみを持つ酵素は活性を示さなかった。

## 3aE01

### ノルエピネフリンから作られる花成誘導物質

貝原純子、瀧本 敦、篠崎真輝（京大・農・応用植物）

多くの植物の水抽出物はきわめて低濃度でアオウキクサ（*Lemna paucicostata*）151（P151）の花成を誘導し、アオウキクサおよびアサガオの抽出物はとくに高い活性を示す。また、アオウキクサ441（P441）の水磨砕物を遠心分離して得られる沈澱の懸濁液とノルエピネフリン（NE）の混合物が P151 に対して高い花成誘導活性を示すこと、および P441 の水抽出物中には NE が含まれていることを昨年度の植物学会で発表した。今回は P441 をすりつぶすことなく、そのまま NE 溶液に浸しておいても活性物質がつくられることを報告する。

P441 を 30 分以上 0.5 mM NE 溶液に浸しておき、植物体を取り除いた後その NE 溶液を検定用培養液に加えると、P151 の花成が誘導される。しかしながら、P441 を水に 30 分以上浸しておいて、植物体を取り除きその水に NE を加えても活性は現われない。このことは、NE が植物体と接触することによって花成誘導物質がつくられることを意味する。検定植物である P151 を NE 溶液（0.5 mM）に 24 時間浮かせておいても、その NE 溶液は活性を示すようになり、その P151 を検定用培養液に移して培養してもわずかながら花成が誘導される。このことも上記の考えを支持する。

## 3aE02

### ノルエピネフリンに由来する花成誘導物質の特性

瀧本 敦、貝原純子、篠崎真輝（京大・農・応用植物）

アオウキクサ（*Lemna paucicostata*）441（P441）の水磨砕物の遠沈沈澱物を懸濁させた液とノルエピネフリン（NE）の混合物、あるいは P441 を浸した NE 溶液がアオウキクサ 151（P151）の花成を誘導することは前演者が述べたとおりである。活性成分をふくむ溶液は濃縮すると容易に沈澱を生じ、この沈澱は数回水洗してもなお活性物質を含んでいる。活性成分を含む溶液を HPLC（Wakosil 5C18-200）で分画すると、NE と活性物質は別の画分に溶離されるので、NE と factor C が共同的に働くのではなく、両者から活性物質がつくられるものと考えられる。植物体の遠沈沈澱物の懸濁液を HPLC で分画し、各画分を NE とともに検定溶液に加えて花成誘導活性を調べると、有効成分（factor C）は活性物質と同じまたはきわめて近い画分に溶離される。

NE そのものはほとんど活性を示さないが、100-300  $\mu$ M の高濃度で与えると弱い活性を示し、KOH に溶解させると、かなり高い活性を示すようになる（3-10  $\mu$ M 相当で有効）。この活性はピペコリン酸の共存によって著しく高められるが、このようにしてつくられる活性物質よりも、NE と factor C を混ぜてつくられる活性物質の方がはるかに有効である。なお、NE-KOH の活性は NE、KOH の濃度、保存期間などによって大きく変化し、活性成分の生成に必要な条件を追跡中である。

## 3aE03

### アオウキクサ151系統の花成誘導

○中山善雄<sup>1</sup>, 田中修<sup>1</sup>, 山本哲朗<sup>1</sup>, 尾崎朋奈<sup>1</sup>, 竹葉剛<sup>1</sup>  
(甲南大・理・生物、<sup>1</sup>京府大・生科)

アオウキクサ151系統は短日植物であり、benzyladenineを含む1/10 E(1/10E+B A)培養液で生育すると、短日条件下で10日目に花成反応を示す。しかし、長日条件下でも培養開始後14日目には花成が起こる。この花成は、培養液の窒素濃度を高めると消失し、低下させると促進される。また、花芽を分化した植物の窒素含量は培養開始時の約半分に低下しており、この植物は窒素欠乏により花成を誘導すると思われる。窒素欠乏培養液では、タンパク質含量の急速な低下が認められ、protease inhibitorにより、栄養成長に影響なく、花成反応が阻害される。

一方、長日条件下での花成反応は catalase, chymotrypsin, cytochrome c, hemoglobin, lysozyme, RuBisCO などの市販タンパク質標品を添加した培養液で促進される。ゲル濾過して酵素活性を調べた catalase, chymotrypsin, lysozyme では、酵素活性と花成反応が同じ分画で認められ、lysozyme の結晶標品に効果があることから、タンパク質の構成成分が促進効果に関与していると考えられる。

以上の結果から、1/10 E+BA 培養液で生育するこの植物は、培養日数が延びると窒素含量が低下して、protease が活性化され、培養液中に添加されたタンパク質が吸収、分解され、その分解産物によって花成反応が促進されると考えられる。

## 3aE04

### アオウキクサ花成誘導ポリペプチド cDNA の単離

木戸毅<sup>1</sup>、木崎暁子<sup>2</sup>、田中修<sup>3</sup>、葛西善三郎<sup>1</sup>、竹葉剛<sup>4</sup> (   
<sup>1</sup>近畿大・農化、<sup>2</sup>京大・農生、<sup>3</sup>甲南大・理、<sup>4</sup>京府大・生)

アオウキクサ (*Lemna paucicostata* 151) の花成を極く低濃度で誘導する高分子性の物質が、植物界に広く分布することが判明したので、その物質の諸性質を調べたところ、それは、タンパク質の性質をもつ (proteinase K で低分子化する、熱変性する、等) こと、その部分構造が花成誘導活性をもつこと、抽出過程で低分子化しやすいこと、等が明らかとなった (Plant Physiol 94:1677-1681)。

そこで、高分子性花成誘導物質の化学的正体を知るために、アオウキクサ抽出物から通常のタンパク質精製の手法で活性物質を精製した。ゲル濾過 (BioGel A1.5m) で分離される約 120kDa の成分は、イオン交換 (MonoQ) で2つの成分に分離された。そのうち、約 0.8 M NaCl で溶出される成分は、逆相クロマト (PepRPC) で単一のピークに分離後、SDS-PAGE で約 22kDa のバンドとして CBB 染色でき、そのN末端側のアミノ酸配列が25個決定できた。

そのアミノ酸配列を参考にして、ヌクレオチドを合成し、それをプローブとして、アオウキクサ cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、約 1.1 kb, 2.2 kb の positive clone を得た。その塩基配列を決定した結果、単離したポリペプチドのアミノ酸配列をコードする cDNA であることが判明した。