

1pA 17

苗条再分化が温度感受性を示すシロイヌナズナ変異株の単離と解析

○保谷泉・小澤正一・杉山宗隆・駒嶺穆（東北大・理・生物）

植物の再分化過程において働く遺伝子群を明かにすることを目的として、苗条再分化が温度感受性を示すシロイヌナズナ変異株の単離と解析を行なった。シロイヌナズナ種子をEMSで処理し突然変異を誘発した後、2回自家受粉を繰り返して得たM3種子系統から変異体の選抜を行なった。各M3系統について、22℃（許容温度）および27℃（非許容温度）で根の外植片から苗条再分化を誘導し、3週間後に苗条再分化の有無を比較して温度感受性を示す系統を選抜した。その結果、約2300のM3種子系統から再分化が温度感受性を示すものが20系統得られた。このうちの4系統（L131、L1045、L1047、L1919）については次世代のM4植物体でも苗条再分化の温度感受性を既に確認した。これらの系統の根外植片を27℃で培養し苗条再分化を誘導した場合、L1045とL1047ではどちらも苗条再分化の前兆と考えられるカルスの局所的緑化までの形態変化は野生型株と変わらず進行したことから、これらの変異遺伝子の産物の機能は苗条再分化過程において苗条形成の直前の段階に関与していると推測された。また、L131でもカルスの発達と緑化は認められた。L1919では再分化に先立つカルスの発達が温度感受性となっていた。L1045、L1047およびL1919については遺伝解析を行なった結果全て劣性変異であることがわかった。今回はこれらのうちL1045を中心に行なった解析について報告する。

1pA 18

ニンジン不定胚形成系に於ける内生ABA量及びABA関連遺伝子発現の変動

○清末知宏、篠崎和子¹、篠崎一雄¹、中嶋正敏²、山口五十磨²、佐藤忍、鎌田博、原田宏（筑波大・生物、¹理研・植物分子生物、²東大・農化）

我々はニンジンの不定胚形成系を用い、これまでに細胞の不定胚形成能力と関連して出現・消失する細胞内蛋白質（ECP31）を検出し、それがABAによって発現が制御されるワタのLEA D34のホモログであることを示した（Plant Mol. Biol. 1992）。

一方、これまでに報告されているニンジンのembryonic geneであるDc3、Dc8もABAによって発現制御を受けるLEA geneのホモログであることが示されている。

今回、我々は不定胚形成能力と関連して出現・消失するECP31の性質が、ECP31固有の性質なのか、他のABA関連遺伝子にも共通する性質なのかを知るために、同様に不定胚形成時に出現するECP40遺伝子の発現についても解析を行った。ECP40はABA誘導性遺伝子のrabのホモログであることが塩基配列の解析から明らかになった。ECP40の不定胚形成に於ける発現は、ECP31の発現と多少は異なるものの、基本的には同一のパターンを示した。このことは、ニンジン不定胚形成系に於て内生ABAによってこれら一群のABA関連遺伝子が発現している可能性を示唆するものである。実際、内生ABAをELISAにより定量したところ embryogenic cell>somatic embryo>>non-embryogenic cellの順で内生ABA量が高いことが示された。現在、我々はニンジン不定胚形成系に於て、内生のABAが不定胚形成能力の誘導あるいは維持に重要な役割を演じているのではないかと考えている。

今泉和光、戸塚良直、米倉博子、小田 茂
(PL学園女子短期大学・植物研)

放射線によるin-vitro培養植物への影響の研究は、培養系での育種のみならず、地球環境や宇宙生物科学分野にも応用できるものと思われる。今回、その研究の一環として、低LET放射線である γ 線のin-vitro培養植物体への影響について調べた。

供試材料は成長点組織培養をおこなって得られた、トマト、ヤマノイモ、ペゴニア、スペアミントなどのin-vitro培養植物体をもちいた。 γ 線照射処理は培養器のまま、京都大学原子炉実験所 60°C の照射棟内の 3.7×10^{14} Bqの線源を用いておこなった。照射による影響の評価としての生存率は、培養個体からの苗条の出現を生存の指標とした。照射線量と生存率は、ペゴニアは γ 線量増加とともにほぼ直線的に低下するのに対して、その他の種は一定の線量を越えると急激に低下するというパターンを示した。D₅₀値での評価は、トマト0.13 KGy, ヤマノイモ0.08 KGy, スペアミント0.11 KGy, ペゴニア0.06 KGyで、試験した培養植物の中ではトマトが比較的 γ 線に対して強かった。トマトについてはさらに、高温(37 $^{\circ}\text{C}$)下でも正常に育成する、高温抵抗性株と抵抗性を示さない通常株について、 γ 線照射の影響を調査したところ、高温抵抗性株は通常株に対して γ 線に強いという傾向を示した。 γ 線照射による影響と高温抵抗性との間には、何らかの関連性があるものと推測された。

緑化過程におけるEuglenaプラスチドコード蛋白質合成のDCMUによる特異的促進

福田功¹、椎名隆、豊島喜則(¹広島大・総合科学、京大大学院、人間・環境学研究科)

光で誘導されるEuglena葉緑体の分化の過程でプラスチドの蛋白質合成速度は急激に増大し、発現パターンも大きく変化する。我々は、光合成阻害剤DCMU存在下で緑化させた細胞から単離したプラスチドでは、そのin organelloの蛋白質合成速度が著しく促進されることを既に報告したが(日本植物学会第56回大会)、今回はDCMUの効果の作用部位特異性について検討した。³⁵S]sulfateを用いたin vivoラベル実験で緑化中の細胞の全蛋白質合成速度を測定すると、12時間の光照射で照射前の約2.5倍に増大していた。しかしDCMUを処理した細胞の全蛋白質合成速度はコントロールに比較して約50%抑制されており、細胞質での蛋白質合成はDCMUで阻害されることが明らかになった。in vivoでラベルした12時間光照射細胞からプラスチドを単離しフルオログラフィーを行った結果、細胞質で合成されプラスチド中に輸送された蛋白質の合成活性にはDCMUは影響を及ぼさないことが分かった。従って、DCMUは緑化中のプラスチドで合成される蛋白質の合成能だけを特異的に促進していると結論された。プラスチドDNAにコードされた蛋白質のmRNAレベル(psbA, psbC)はDCMUの影響を受けないので、DCMUは緑化中のプラスチドの翻訳に関与する因子に特異的に作用して、蛋白質合成活性を促進していると考えられる。

○大隅良典、¹大隅萬里子（東大・教養・生物、
¹西東京科学大学）

酵母などの菌類や植物細胞に普遍的に存在する液胞は、内部に種々の加水分解酵素が局在することから、動物細胞のリソソームと相同なオルガネラであると考えられてきた。しかしながら液胞に於けるタンパク分解の機構やその生理的意義については、未だ不明な点が多い。我々は最近液胞内プロテアーゼ、*pral*, *prbl*, *cpy1*の欠損株を用いて、種々の栄養飢餓条件下に酵母細胞も高等動物細胞と同様に自己の構成成分を分解する自食作用(*autophagy*)を誘導することを見いだした。この作用によってリソソームを始めとする細胞質成分が液胞内に取り込まれて分解される。酵母細胞は細胞周期のG₁の特定の位置で外界の栄養条件を感知し増殖を制御している。窒素源などの飢餓条件下には細胞はG₁期に停止する。一方上記の液胞内プロテアーゼ欠損株は、栄養飢餓条件下に置かれると直ちに細胞周期の進行を停止しG₁期停止が出来ない。和田らによって分離された形態学的に液胞を欠く一群の*van*変異株もまた栄養飢餓条件下に細胞周期を進行させ得ない。逆にcAMPシグナル伝達経路の変異株でG₁期停止が出来ないことが知られている*bcy1*, *ras*^{val1}などの変異株は栄養飢餓条件下に自食作用を示さないことが明らかとなった。これらの栄養飢餓に対応してG₁期停止の出来ない株は全て、急激にその生存率が低下して行く。これらの事実は、栄養の涸渇を感知すると細胞周期をG₁(G₀)期停止させることが重要であるが、その過程には自己の構成成分の自食作用による分解が必須であると思われる。

○坪井 滋、大隅良典（東大・教養・生物）

昨年度の本大会で、酵母(*S. cerevisiae*)が、様々な栄養条件の飢餓に伴って自食作用を誘導することを示した。すなわち液胞内の主要なプロテイナーゼ欠損株を炭素源、窒素源、イオウ源などの欠乏した培地に移すと、細胞質に二重膜構造の自食作用胞(*autophagosome*, AP)が形成され、これが外膜で液胞膜と融合し、その結果生じた一重膜の球形構造(*autophagic body*, AB)が多数液胞内に蓄積する。これらの構造体の液胞内への蓄積にはプロテイナーゼBの活性の欠損が最も重要な要因であることが、遺伝学的な解析から示唆されていたが、PRB遺伝子の破壊実験から直接的に確認された。われわれは、この自食作用の分子レベルで理解を目的として研究を進めている。そのためには、飢餓条件下に誘導されると考えられる。APの膜はABの膜と同一であると考えられるので、まず、ABの膜タンパク質の解析を開始した。炭素源の飢餓条件下でABを蓄積した液胞を単離する条件を詳細に検討し、スフェロプラストの浸透圧ショックによる破菌とFicollの密度勾配遠心により、ABを多数取り込んだ液胞を単離することに成功した。ABを蓄積していない液胞の膜画分を調製し、それぞれその膜タンパク質を二次元電気泳動によって比較した。その結果、ABを蓄積した液胞に特異的に存在するスポットが数個確認された。これらの中には、APの膜に特異的なタンパク質が含まれていると考えられる。

1 pB 04

緑化培養細胞の光独立栄養性について (x) ;

葉緑体の微細構造と色素組成の変動

°竹田恵美、井田和子、前田晶美、松島久¹、金子康子¹、
佐藤文彦²、山田康之² (大阪女子大学・基礎理、¹埼玉大・
理・生体制御、²京大・農・農芸化学)

我々は、タバコ緑色培養細胞を材料として、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。これまで、炭素源を培地中の糖に依存せず、光合成のみにより、生育するタバコ光独立栄養細胞 (P A細胞)、光合成するが培地中の糖に依存して生育する光mixotrophic培養細胞 (P M細胞) 及び、タバコ植物体を材料とした実験から、培養細胞の光化学系活性は、増殖の最も盛んな時期では、培養細胞においても緑葉と比較しうる活性を有するが、以後の生育の進行に伴い、活性の低下が認められることを明らかとした。今回は、培養細胞と緑葉の葉緑体微細構造と色素組成の違いについて検討した結果を報告する。

P A細胞、P M細胞、緑葉の各生育段階より得られた試料の透過型電子顕微鏡写真より、葉緑体の形、チラコイドの数、プラストグロビュールの数等について計測し、統計処理を行った結果、1) 培養細胞では分裂中の葉緑体が多数存在すること、2) 培養細胞、特にP M細胞では、葉緑体当たりのインターグラナチラコイドの数が多く、また1つのグラナ当りのチラコイド数が少ないこと、3) 培養細胞特にP A細胞においてプラストグロビュールの数が多いことが明らかとなった。さらに、葉緑体色素組成についてみると、クロロフィルとカロチノイドの存在比は変わらないが、カロチノイドの組成比においてルテインの比率が培養細胞では緑葉に比べて低いことが判明した。

1 pB 05

イネにおいて未分化プラストイドの葉緑体への変換は
葉の発生段階に特異的に依存する

°射場 厚、高宮建一郎¹、藤 義博、佐藤 光²、西村光雄
(九大・理・生物、¹東工大・生命理工・生体機構、
²九大・農・遺伝子資源)

高等植物において、未分化プラストイドの葉緑体への変換は、葉の発生・成長に伴う葉細胞の分化における最も顕著な変化の一つである。この過程は細胞核と葉緑体DNAにコードされた多くの遺伝子の活性化を伴うが、その開始と制御を行なうシグナルの実体はよく解明されていない。本研究では virescent と称されるイネ温度感受性突然変異体を用いて、未分化プラストイドの葉緑体への変換が、葉の発生の初期段階に決定されることを明らかにした。温度シフト解析とこれまでの解剖学的研究から得られた知見は、virescent 遺伝子がコードする intrinsic developmental シグナルが、葉の基本構造ができ上がり、葉鞘からの抽出と展開が開始する直前に、特異的に発せられることを示している。このシグナルは、葉の発生過程において、葉緑体DNAにコードされた遺伝子発現のタイミングを制御するが、葉の形態的発生や、葉緑体タンパク質をコードした細胞核遺伝子の発現および、その光による制御には関わらない。これまで、細胞核、葉緑体、それぞれのDNAにコードされた遺伝子の発現制御は、それら2つの細胞内器官に独立して与えられるシグナルを介して行なわれるのか明らかでなかった。今回得られた知見は、遺伝子発現を制御する葉緑体に特異的なシグナル変換経路の存在を示している。

1 pB 06

講演取り消し

1 pB 07

カボチャ葉緑体に存在する70kD熱ショックタンパク質-Hsp70
°槻木竜二、西村幹夫
(基生研・細胞生物、総合研究大学院大学・生命科学)

Hsp70は熱ショックなどのストレスによってその発現が誘導される分子量約70kDの一群のタンパク質であり、原核細胞から真核細胞まで非常によく保存されたかたちで存在している。真核細胞においては細胞礎質、核、粗面小胞体、ミトコンドリアでそれぞれ特異的なHsp70の存在が確認されており、すでにそれらの一次構造も決定されている。これらオルガネラ及び原核細胞に局在するHsp70はタンパク質のほどけた状態の維持、折れたたみ、複合体からの解離に関与すると共に変性タンパク質の再生、あるいはタンパク質の変性の遅延に関与する分子シャペロンであることが示唆されている。一方、Hsp70が葉緑体に存在することは免疫化学的解析から示唆されているが、その実体はいまだつかめていない。

演者らはカボチャ子葉より単離した葉緑体の可溶性画分からHsp70を単離精製し、そのN末端アミノ酸配列を決定すると共に、その特異抗体を調製した。決定したアミノ酸配列はすでに報告されている各種Hsp70のN末端アミノ酸配列に類似していたが、なかでも枯草菌、大腸菌などの原核細胞DnaKタンパク質(Hsp70)やパン酵母ミトコンドリアHsp70とより高い類似性を示した。また調製した特異抗体は大腸菌DnaKタンパク質と特異的に反応したが、ウサギ網状赤血球無細胞系に存在する細胞礎質Hsp70とは反応しなかった。以上の結果は高等植物の葉緑体中には原核細胞型のHsp70が存在することを強く示唆している。葉緑体におけるHsp70の役割についても考察を加えたい。

1 pB 08

葉緑体へのタンパク質の輸送機構の解析

—トランスジェニックアラビドプシスを用いる試み

○吉田裕紀子、渡辺 昭（名古屋大・農・生化学制御）

核支配の葉緑体タンパク質は細胞質で前駆体タンパク質として合成され、葉緑体に輸送される。このタンパク質輸送機構には特異的な受容体をはじめとするさまざまなタンパク質因子の介在が予想されるが、いまだ不明な点が多い。今までの生化学的解析による輸送機構の知見に新たな情報を加えるためには、輸送機構に欠陥のある突然変異体を得て分子遺伝学的解析を加えることが必要であろう。我々は、輸送機構を表現形質として捉え、また本来の核支配の遺伝子産物の輸送を妨げないような突然変異体を得るために、以下のような方法を考えた。

光化学系IIコア複合体の構成タンパク質に、葉緑体遺伝子 *psbA* の遺伝子産物 D 1 がある。D 1 タンパク質は光化学系IIの反応中心を支えるタンパク質であり、またアトラジンなどの除草剤の標的タンパク質でもある。除草剤耐性型の *psbA* を通過ペプチドに連結したキメラ遺伝子を構築導入して除草剤耐性トランスジェニック植物を作り、さらにこの植物体から除草剤感受性の突然変異体を得ることができれば、輸送機構に介在する因子を分子遺伝学的に解析することが可能となるであろう。

本実験では *psbA* を通過ペプチドに連結したキメラ遺伝子を作製し、これをシロイヌナズナに導入することを試みた。その結果、除草剤耐性のトランスジェニック植物の候補を得ることができた。

1 pB 09

葉緑体チラコイドへのタンパク質輸送

○小西智一、渡辺 昭（名古屋大・農・生化学制御）

葉緑体タンパク質の多くは細胞質で前駆体として合成される。葉緑体はこれらの前駆体を識別し、それぞれのタンパク質が局在すべき場所へと正確に取り込む。我々はこの機構を明らかにするため、チラコイド膜内腔に局在する 2 種類のタンパク質の輸送をモデルにして研究をすすめてきた。昨年大会では、これらのタンパク質がいったんストロマに輸送されることを示唆する結果を報告した。本大会ではその後得られた実験結果をふまえ、より詳細な考察をおこなう。

試験管内で合成したアラスカエンドウの 23-kd と 33-kd タンパク質の輸送前駆体を ATP の存在下で単離葉緑体へ輸送した。輸送されたタンパク質はストロマに蓄積し、前駆体と成熟型との中間的な分子量を示した。葉緑体に光を照射すると、このタンパク質はチラコイド内腔へと輸送されて成熟型になった。以上の結果から、ストロマに蓄積したタンパク質が輸送中間体であること、および包膜とチラコイド膜にはそれぞれ独立した輸送装置が存在することが明らかとなった。

1 pB 10

粒子銃を用いた緑藻クラミドモナス葉緑体遺伝子への特異的突然変異の導入

高橋裕一郎（岡山大、理、生物、大学院自然科学研究科）

M. Goldschmidt-Clermont, J.-D. Rochaix（ジュネーブ大）

葉緑体は光合成などの重要な生理反応を行う細胞内小器官で、独自のDNAとその遺伝情報の発現系を持っている。葉緑体遺伝子の機能や発現を解析する上で葉緑体形質転換は最も重要な方法の一つであるが、葉緑体DNAのコピー数は多く、更に二重の包膜の内側に存在するため、葉緑体遺伝子の特異的形質転換を行うことは難しかった。しかしBoyntonらは単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* へDNAを微小なタングステン粒子に付着させ、それを粒子銃で打ち込むことにより、葉緑体へ導入し形質転換を行うことができると報告した。そこで本研究では、この方法を利用し、更に葉緑体で発現するよう設計した細菌の抗生物質耐性遺伝子カセットをマーカーとして用いることにより、特異的な葉緑体形質転換の可能性を試した。今回注目したのは、光合成の系Iの鉄硫黄タンパクをコードする *psaC* と、この遺伝子と共に転写されることが分かった2つの小さい読み取り枠ORF43とORF58で、それぞれをこのマーカーで挿入失活させた形質転換株をスペクチノマイシン耐性を指標に単離した。ORF58は *C. reinhardtii* にユニークであるが、ORF43は相同性がある読み取り枠がタバコ、イネ、コケの葉緑体ゲノムにも存在する。*psaC* の形質転換株は光合成活性を失っているが、ORF43とORF58の形質転換株は光合成活性を保持しており、光合成機能には必須のものではないと考えられる。

1 pB 11

ゼラニウム斑入り葉における色素体分化の解析

渡邊 昇、関口文彦¹、松岡英明、根本泰行

（東京農工大・工・物質生物、¹日本女子大・家政・家政理）

（目的）周辺部が白色、中心部は緑色、その間に中間色部（薄緑色）という斑入り葉を持つゼラニウムを材料として用いて、各部分に含まれる色素体の形態を観察することにより、斑入り葉における色素体分化のメカニズムについて手がかりを得ることを目的とした。

（方法）斑入り葉の三部分について中央部から周辺部に向けて、連続的に2～3mm²の領域を設定し、それぞれの領域を別々にプロトプラスト化した。これらについてDNAに特異的に結合する蛍光色素DAPIで染色して色素体内における色素体核（DNA領域）の形態に関して観察するとともに、葉緑体内のクロロフィルの自家蛍光を指標として分化の段階を判断した。

（結果）斑入り葉の各領域のプロトプラストを観察した結果、葉緑体だけを含む細胞と、原色素体だけを含む細胞と、原色素体と葉緑体を共に含む細胞が観察された。また、原色素体核としては塊状、リング状、小粒状の三種類、葉緑体核としてはリング状、小粒状の二種類の計五種類の色素体核が観察された。次に、各領域での100細胞中の全色素体数当りの、これら五種類の色素体核の割合を各領域ごとに定量化した（図1）。その結果、色素体核数のピークは周辺部から中心部へ行くにつれて塊状の原色素体核、リング状の原色素体核、小粒状の葉緑体核の順に生じていることがわかった。

（考察）通常、原色素体は葉が形成される初期の過程で全て葉緑体へと分化するが、ゼラニウム斑入り葉の場合、原色素体が葉緑体へと分化する速度が極めて遅くなっていると考えられる。更に、一細胞内に葉緑体と原色素体が共存する細胞が存在し、葉も緑色だけでなく、中間色部や白色部が生じていると思われる。

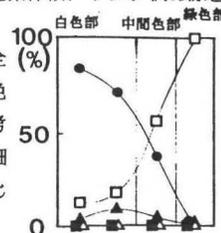


図1 斑入り葉の各領域の色素体核の割合

- ：塊状の原色素体核
- ▲：リング状の原色素体核
- ：小粒状の原色素体核
- △：リング状の葉緑体核
- ：小粒状の葉緑体核

1 pB 12

登熟カボチャ子葉における輸送小胞の免疫組織化学的解析
°西村幹夫、武内由佳、井上香織、西村いくこ
(基生研・細胞生物)

演者らはカボチャ種子の登熟過程における種子貯蔵タンパク質の細胞内輸送機構を解析している。貯蔵タンパク質11S globulin、2S protein およびそれらのタンパク質を蓄積しているプロテインボディの膜タンパク質 MP80の *in vitro* 合成、pulse-chase 標識および cDNA クローニングによる構造解析から、これらのタンパク質は rER上でプレプロ型前駆体として合成された後、プロ型前駆体の形で輸送小胞(デンスベシクル)により液胞に輸送されることを明らかにしている。今回、この輸送小胞に焦点を置き免疫組織化学的解析を試みたので、その結果を報告する。

電子顕微鏡観察により、カボチャ登熟子葉細胞には、液胞中に貯蔵タンパク質の蓄積と考えられる電子密度の高い封入体とともに、やはり電子密度の高い直径約 200nm の小胞が観察された。Protein A-gold 法により、この小胞および液胞中の電子密度の高い部分には、11S globulin、2S protein が局在していることが示された。この小胞を登熟子葉組織より単離し、その構成タンパク質を解析した結果、11S globulin、2S protein のプロ型前駆体の蓄積が観察され、この小胞が貯蔵タンパク質の輸送小胞であることが示された。単離した輸送小胞を protein A-gold 法により解析すると、個々の輸送小胞に11S globulin および 2S proteinの前駆体の蓄積が認められることから、これらの貯蔵タンパク質はそれぞれに特異的な輸送小胞によって液胞に運ばれるのではなく、両者が同一の輸送小胞によって運ばれることが示唆された。

1 pB 13

複数種の液胞タンパク質プロ型前駆体のプロセッシングに關与する
酵素—Vacuolar Processing Enzyme
°西村いくこ、井上香織、西村幹夫 (基生研・細胞生物)

種子貯蔵タンパク質を蓄積しているプロテインボディは液胞と密接な関係のあるオルガネラである。プロテインボディをクリスタロイド、マトリックス、そして膜の 3つの部分に分け、各部分を構成している 3種の代表的タンパク質の生合成過程を調べると、いずれのタンパク質もプロ型前駆体として粗面小胞体(rER)からデンスベシクル(輸送小胞)経由で液胞へ輸送された後に成熟型タンパク質に変換する。最近、この成熟型タンパク質へのプロセッシングに關与している酵素 (Vacuolar processing enzyme) の単離に成功したのでその性質について報告したい。

ヒマ種子胚乳より単離したプロセッシング酵素は分子量約 37kd のチオール型プロテアーゼで、至適 pH は 5.5付近と液胞内 pH に近い値を示した。この精製酵素の基質特異性を調べるために、プロ型前駆体タンパク質を以下の 2つの調製方法によって得た。まず、³⁵S-methionineでパルス標識した登熟カボチャ子葉をシヨ糖密度勾配遠心により細胞分画して、ERを調製しプロ型タンパク質を得た。また最近、登熟カボチャ子葉よりパーコールを用いてデンスベシクルを単離することに成功したが、このベシクル分画は多量のプロ型タンパク質を蓄積しているので、これも基質として解析を加えた。単離したvacuolar processing enzymeは ER およびデンスベシクルに含まれる proglobulin、pro2S proteinそしてpro51kdのすべてを成熟型タンパク質にプロセスした。さらに、proglobulin と pro2S protein のペプチド上のプロセッシングの部位は両者共に Asn 残基の後である。以上の結果より、液胞内でのプロセッシングは、同一の酵素が液胞に送り込まれてくる様々なプロ型前駆体タンパク質の成熟型への変換に關与していることが示唆された。

Hara-Nishimura, I., Inoue, K. & Nishimura, M. (1991) FEBS Lett., 294, 89-93.

1 pB 14

CAM植物葉の液胞膜に存在するイオンチャンネルの制御と細胞内コンパートメント

°岩崎郁子、荒田博行、楠見健介、西村光雄（九大・理・生物）

ベンケイソウ型酸代謝（Crassulacean Acid Metabolism 略してCAM）を行なうCAM植物の葉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リンゴ酸を大量に蓄積（隔離）するコンパートメントとしての役割を持っている。液胞膜の物質輸送とその制御の機構を解明するため、CAM植物 *Graptopetalum paraguayense* の葉の液胞膜でパッチクランプ法によりイオンチャンネルの解析を行なった。*G. paraguayense* の葉の液胞で観察されたSV (Slow Vacuolar)-type とわれわれが見出した第2の型のMU (malate uptake)-type のそれぞれに対応するチャンネル電流を解析し、開時間の分布および開確率を調べた。SV-type のチャンネルは細胞質中の free Ca^{2+} 濃度としては比較的高い領域 (10^{-6} M 以上)で活性化され、大部分が数 10 ms の開時間を持っており、その開確率は非常に大きい電位依存性を示した。一方、MU-type のチャンネルは細胞質側の free Ca^{2+} 濃度が $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M の領域で観察され、数 ms の開時間に対応する電流が主であり、その開確率はSV-type ほどには大きい電位依存性を示さなかった。このMU-type のチャンネルはその電位依存性からFV (Fast Vacuolar)-type のチャンネルとは異なることを報告したが¹⁾、開時間についての比較は今後の研究にまたなければならない。

1) Iwasaki, I., Arata, H., Kijima, H., Nishimura, M. (1992) Plant Physiol. in press

1 pB 15

発芽ヤエナリ種子子葉の α -アミラーゼ合成におけるERの関与

°肥塚信也・千葉一弘・田中喜之¹・諸橋征雄

(東京農工大・農, ¹農水省・農業生物資源研究所)

デンプンを貯蔵物質としているヤエナリ種子ではアミロプラスト中のデンプンは、発芽に伴って、細胞質で合成される α -アミラーゼによって分解される。一方、我々は、 α -アミラーゼ cDNA からの推定されるアミノ酸配列より α -アミラーゼは疎水性に富むシグナルペプチドを持つ前駆体タンパク質として合成されることをすでに明らかにしている(1)。したがって、 α -アミラーゼがその合成部位からアミロプラストへ輸送される際の経路を知ることが興味深いことであり、本研究は、この点について検討したものである。

ウェスタン法により調べたところ、 α -アミラーゼ蛋白は、rough ER 分画に存在しており、しかも、ER の lumen 中に mature な α -アミラーゼ蛋白と同じ分子量の蛋白として存在することがわかった。さらに、膜結合性ポリゾーム分画とフリーのポリゾーム分画を調整し、 α -アミラーゼ mRNA の存在をノーザン法で分析したところ、 α -アミラーゼ mRNA は、膜結合性ポリゾーム分画に局在していた。

以上のことにより、ヤエナリ子葉中での α -アミラーゼの輸送において小胞体が関与している可能性のあることが示唆された。

(1) Koizuka, N., Tanaka, Y. and Morohashi, Y. (1990) Plant Physiol 94.1488-1491

◎ 大平万里、前島正義（北海道大学・低温科学研究所）

細胞核の遺伝情報は、核膜の動的構造を介して出入りすると言われている。そして、細胞分裂時には、その核膜は消失・再構築という劇的な構造変動も示す。我々は、核膜・核マトリックスに着目して、植物細胞の生理現象を解析するために、今回、高純度の核膜・核マトリックス画分を調製し、タンパク質組成を分析した。

ヤエナリ芽生えの胚軸を、ヘキシレングリコール、Triton X-100等を含む緩衝液中で磨砕し、低速の遠心操作で核を沈殿として得、さらに不連続パーコール密度勾配遠心で精製した。これを2 MのKClを含む緩衝液中で超音波処理したものを核膜核マトリックス画分とした。この操作で多くのヒストンが除去された。得られた画分のタンパク質から次の結果を得た。1)動物のラミン（核膜タンパク質）に対する抗体(L.Gerace 教授供与)と反応するタンパク質は検出できなかった。2)Con Aと特異的に結合するものが数種検出され、特に180 kDa タンパク質は強く反応した。これはTriton等で可溶化されないもので、膜内在性と考えられる。また、核の塩処理で遊離する画分に、Con Aと反応する48 kDaタンパク質も検出された。3)[γ - 32 P] ATPと反応させると、数種のタンパク質が強くリン酸化された。また、これらはチェイスされなかった。これらの特徴あるタンパク質のいくつかを核膜・核マトリックスの指標にしようと検討中であり、今後、免疫化学的にも局在性を確認したい。

2次元電気泳動で分離した植物のオルガネラ特異的タンパク質のキャラクタリゼーション

◎ 川崎信二、佐藤征弥¹、宮本勝²（農水省・生物研、
¹科技厅；生物研、²生物研；茨大・農・農化）

演者らは先にこれまで困難であった植物のオルガネラタンパク質の2次元電気泳動法を確立し、数百のオルガネラの構成タンパク質の同時比較により各種の生理条件、及び遺伝的背景のもとで、興味ある変動を示す多くのスポットを観察した。しかしその生化学的な性質としては分子量と等電点が知られるのみなので、今回はこれらのタンパク質を2次元電気泳動した後にP V D F膜等にプロットしてより詳しい性質を明らかにすることを試みた。

数個の主なオルガネラタンパク質についてN末端のシーケンスを試みたが、可溶性タンパク質ではシーケンス可能な条件下で何れもブロックされていた。こうした困難を回避し、また一般に量の少ない膜タンパク質のスポットから最大限の1次構造の情報を得るためには、プロテアーゼ処理で得られる多数の低分子ペプチドを回収分離して構造解析できることが望ましい。このためにH P L Cを用いて分離分析の条件検討を行った結果を報告する。

また細胞膜を始めとするミクロゾーム膜系に多い糖タンパク質をレクチン染色した結果についても報告する。

1 pB 18

ヒマ登熟期にみられる脂質転移タンパク質の挙動

長船哲斉¹, 坪井 滋¹, 佐藤八十八¹, 山田晃弘²
(東京医大・微生物, ¹東大・教養, ²北海道東海大・工学部)

発芽期ヒマ種子の胚乳、子葉および胚軸で脂質転移タンパク質(LTP)が遺伝子発現する。免疫電顕で調べると、LTPは細胞内のミクロボディー(グリオキシソーム)の礎質と導管の細胞壁に集中して存在するが、細胞分画法により細胞内におけるLTPの分布を調べると、ミクロボディー以外の部分(可溶性画分として得られる)にかなりの量のLTPが存在することがわかった。

一方、ウエスタンブロット法により調べると、登熟期のヒマ種子には、発芽期のものにくらべて、3倍量のLTPが見いだされた。種子のLTP量は受粉後28日にピークに達し、以後減少した。受粉後28日のヒマ種子では種皮が黄色から小豆色に変化し、脂肪の合成が始まる。この時期から種皮の固くなる1週間後にかけて、LTPの細胞内挙動を免疫電顕で調べると、次のようであった。LTPは、はじめ、発芽期のヒマ種子の場合と同様に、胚乳のミクロボディー様顆粒に集中している。胚乳細胞内に大型の液胞が形成されると、LTPを含んだミクロボディー様顆粒がその液胞内に取り込まれ、顆粒の集合体が形成される。集合体をつくると、顆粒の外膜がぼやけてくる。顆粒集合体は、さらに、胚乳組織の外側へ向かって移動し、最後に種皮に移行する。この時期の種皮はやわらかく、まだ完成していない。種皮が固くなる時期になると、LTPは種子の胚乳の外側および果皮(種皮の外側)に集中して見いだされた。

1 pB 19

PMCPのヌクレオゾームにおける結合様式について

° 佐々木 揚、原田 宏¹
(秋田県・林業技術センター、¹筑波大・生物)

我々は、ユリの花粉形成過程において検出される組織特異的核タンパク質PMCP(Pollen Mother Cell Protein)に関する報告を行ってきた。1989年度年会でPMCPはヌクレオゾームの2量体以上に存在するとしたが、今回、H1ヒストンと同様に単量体以上に存在することが明かとなった。しかし、ヌクレアーゼ処理の強弱によって、PMCPの単量体における存在様式がH1と異なることが示された。

花粉母細胞の単離核をMicrococcal Nuclease(MNase)で処理し、DNAの酸可溶度が18%の限定分解条件下と32.2%の完全分解条件下で、ヌクレオゾームの2次元電気泳動を行った。DNAはEtBrで、タンパク質はCBBでそれぞれ染色して検出した。その結果、ユリ花粉母細胞のヌクレオゾーム基本塩基対の長さは210 base pair、コアは180 base pairであった。PMCPはH1とは異なり、完全分解条件下ではモノマーに確認されたが、限定分解条件下ではほとんど検出されなかった。このことは、PMCPはH1よりMNaseに対して抵抗性があることを示唆する。また、PMCPは、鋳型活性の高いクロマチン画分(実験に使用したPMCPはmeiotic recombinaseもこの画分に含むと考えられる)ではなく、鋳型活性の低い画分に集中している結果も得られた。花粉母細胞の組換え期には、nick transferase, endonucleaseの活性が上昇することが知られている。これらを総合すると、PMCPの機能は"組換え"に直接関与するのではなく、"自身のクロマチンを保護する"と考えられた。

° 高木眞佐江、保坂秀夫、田中歩¹、辻英夫¹
 (日本曹達(株)・小田原研、¹京都大・理・植物)

広範な植物種に対して殺草活性を示すbenzoyl-cyclohexanedione型化合物(BCH)は、薬剤処理後に展開してくる新葉に白化及び生育阻害を引き起こし、枯死に至らせるという特徴を持っている。今回は、BCHに対して感受性が高く、作用機構の解析に適しているアオウキクサ(*L. paucicostata* 6746)を用いて行った試験結果を報告する。3,000lux照明下では、autotrophic、mixotrophicいずれの培養においても、BCHは 10^{-8} Mで約50%の増殖阻害活性を示した。フロントが未分化な時点で薬剤処理を受けたものほど白化が著しく、薬剤処理開始後に原基が形成されたものは白化フロントとなった。一方、暗所heterotrophic培養では 10^{-5} Mにおいてもほとんど増殖阻害活性は認められず、BCHの阻害活性が現れるためには、光が必要であることが示された。薬剤処理によるクロロフィル、カロチノイドの減少と色素前駆体の蓄積は、初期にはみられず、新たなフロントの分化が進むにつれて顕著となることから、BCHの一次作用点は色素生合成系ではないと考えられた。電子顕微鏡観察の結果、光合成色素の減少以前に葉緑体の構造の異常が引き起こされていることが示された。更に暗所培養で得た黄化フロントをBCH存在下で光照射すると、40時間後でも完全な緑化に至らず、葉緑体の分化が早い時期から強く阻害されていることが電子顕微鏡において観察された。以上の結果から、BCHは未分化な細胞において葉緑体の分化を阻害することによって白化を引き起こすと考えられた。

キュウリ子葉における5-アミノレブリン酸合成のサイトカイニンによる促進機構

・ 増田 建¹、C.G.Kannangara²、辻 英夫

(京都大・理・植物、¹東工大・生命理工、²Carlsberg Laboratory, Denmark)

テトラピロール生合成の最初のステップである5-アミノレブリン酸(ALA)合成は、3段階の反応を経て行なわれる。双子葉植物では、サイトカイニンによってALA合成が促進される。今回は、サイトカイニンが3段階の反応のうちどれを促進するかについて調べた結果を報告する。

暗所でキュウリ黄化子葉をサイトカイニン的一种であるベンジルアデニン(BA)で前処理し、光照射すると、クロロフィル蓄積量およびALA合成速度は約2倍に高まった。同じ条件のもとで、ALA合成系の第3段階を触媒するアミノトランスフェラーゼの阻害剤であるgabaculineをBAとともに処理し、第2段階の反応産物であるglutamate 1-semialdehyde(GSA)の蓄積量を測定すると、GSAの蓄積量はやはりBAによって2倍になっていた。BAで暗所前処理後、緑化させたキュウリ子葉からプラスチドを単離し、*in organello*でALA合成活性を測定すると、対照区に比べ約2倍になっていた。この単離プラスチドのストロマ画分を採り、アミノアシル-tRNAシンテターゼ(第1段階反応を触媒)およびアミノトランスフェラーゼの量を、それぞれの抗体を用いて測定したが、BA処理による増加は認められなかった。しかし、単離プラスチド中の総RNA量には、BAによる増加が認められた。このRNA中に含まれるtRNA^{Glu}(第1段階反応の基質; 1991年度年会発表、Plant Physiol. Biochem. 30 印刷中)の量をノザンハイブリダイゼーションで測定した結果、BA処理により2倍に増加していた。しかし、プラスチド中の他のtRNA種と比較すると、このtRNAも同じ割合で増加していた。以上の結果は、BAによってプラスチドゲノム中でtRNA^{Glu}の発現だけが特異的に促進されるのではないが、ALA合成の最初の基質となるこのtRNAの供給が増大することによって、BAによるALA合成促進がなされることを示唆している。第2段階反応に対するBAの効果については目下調査中である。

1 pC 03

メロンおよびリンゴ実生の可溶性オーキシシン結合蛋白質の性質

李泰昊、¹金山喜則、鈴木久人、酒井慎吾¹、山木昭平
(名古屋大・農・園芸、¹筑波大・生物)

果実の成長や、単為結果などの生理現象にはオーキシシンの関与が考えられるが、その生理機構解明には内生オーキシシン量ばかりでなく、オーキシシンレセプターも研究対象に加える必要がある。

レセプターの候補となるオーキシシン結合タンパク質 (ABP) を、2,4-D結合 Sepharose 4B によるアフィニティークロマトグラフィーと2回のゲルクロマトグラフィーにより部分精製し、スカッチャードプロット等によりその性質を調べた。活性測定には¹⁴C-IAAを用い、主に硫酸沈澱法により求めた。

メロン実生から約600倍に精製されたABPは、硫酸沈澱法と平衡透析法において同等の活性を示し、Sephacrose 6Bゲルろ過において分子量約16万の位置に溶出された。至適pHは6.0、解離定数は 4.8×10^{-6} (M)と求められ、結合部位数も1 mol/mol以上であることが示唆された。一方リンゴ実生から得られたABPは、Sephacrose 4Bゲルろ過において分子量約40万の位置に溶出され、その活性溶出パターンと対応するSDS-PAGE上のバンドとして、56kDaと15kDaのものが検出された。解離定数は 7.7×10^{-6} (M)と求められ、¹⁴C-IAA結合に対する阻害率は2,4-D、NAAがほぼ100%で、PCIBが約50%であった。分子量と解離定数から、メロンABPはヤエナリから精製された可溶性ABP-IIに、リンゴABPはヤエナリABP-Iに類似していた。

1 pC 04

モモ茎頂部からのオーキシシン結合タンパク質の精製

菊池幹之、[○]大宮あけみ、酒井慎吾¹、林建樹
(農水省果樹試験場、¹筑波大・生物)

これまで、オーキシシン結合タンパク質 (ABP) の研究は、黄化芽生えや培養細胞を材料に進められてきた。しかし、特殊な環境のもとに存在するABPが、自然条件下で生長している植物体で機能しているかどうかは不明である。そこで我々は、圃場で生育しているモモの、最も生長の盛んな部位である茎頂部を材料に、可溶性画分に存在するABPの精製に取り組んできた。その結果、これまで報告されているものとは異なるABPを単離し、その性質を調べたので報告する。

モモの茎頂部からタンパク質を抽出し、遠心分離により可溶性画分を得た。Sephadex G-25で脱塩後、各種クロマトグラフィー操作 (CM-T0Y0Pearl、Sephacryl S-200、2,4-D-Sepharose、ConA-Sepharose) により、オーキシシン結合活性をもつタンパク質を得た。このタンパク質は、SDS-PAGE上で分子量20kDaの単一のバンドとして検出された。ゲル濾過により推定された分子量は80kDaで、4個のサブユニットで構成されているものと考えられた。

競合反応および可逆性試験の結果から、放射性2,4-DのABPへの結合はオーキシシン特異的で、かつ可逆的であることが明らかになった。

オーキシシンの情報発現において、植物細胞には、オーキシシンを特異的に認識する受容体が存在すると考えられる。我々は、そのような受容体を検索する目的で、2,4-D を結合させたアフィニティカラムを用いて可溶性 2,4-D 結合蛋白質を分離した。黄化したヤエナリ芽生えの胚軸を抽出バッファーにて磨砕し、超遠心にかけて得られた上清を脱塩した後、2,4-D 結合カラムにかけた。1M の NaCl を含む緩衝液で洗浄した後、40 mM の 2,4-D を含む緩衝液で溶出した。その結果、2,4-D でのみ溶出される蛋白質が数種見い出された。次に、得られた溶出液をウサギに免疫して溶出液に含まれる蛋白質全体に対する抗血清を得た。この抗血清を用いて黄化ヤエナリに存在する 2,4-D 結合蛋白質について調べたところ、約 42 kD のペプチドが 2,4-D にも IAA にも親和性を持っていた。このペプチドは、黄化ヤエナリ芽生えの胚軸にのみ検出され、根や子葉には検出されなかった。また胚軸の伸長に伴って蛋白量が増加し、さらに興味あることに、2,4-D 処理した芽生えでは検出されなかった。そこで、次に、本タンパク質の精製を行った。ゲル濾過、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーなどを用いて、ほぼ単一のタンパク質を得ることができた。ゲル濾過の結果より、native な状態では単量体で存在することが明らかになり、新たな可溶性オーキシシン結合タンパク質であることが示された。

○川口正代司、藤岡昭三¹、桜井成¹、八巻良和²、庄野邦彦
 （東大・教養・基礎科、¹理化学研究所、²東大・農・果樹園）

植物内のオーキシシンの蓄積を制御する生合成経路の研究は過去多くなされてきたが、その実体は現在もなお不明である。当研究室では、植物病原菌 *Agrobacterium tumefaciens*・*Pseudomonas savastanoi* に存在し腫瘍形成に関与するオーキシシン生合成経路 (Trp→インドールアセトアミド [IAM]→IAA) を植物において探索してきた。今回、ミカン科のカラタチ (*Poncirus trifoliata*) の様々な組織から粗酵素液を調製し活性の検出を試みたところ、顕著な IAM と IAA の活性 (IAM→IAA) が、開花後 3 週間目の幼果において検出された。トレース実験を試みると、¹⁴C で標識した IAM (1 μM, 1,333 Bq) は 90 分のインキュベーションで 36% IAA に変換されるという注目すべきものであった。そこでクラウンゴールをモデル系とし、Trp と IAM の活性 (Trp→IAM) の検出系を開発し、カラタチ幼果に適用した。その結果、Trp から IAM の変換が GC/MS とトレース実験によって明確に捉えられた。これは IAM を経由するオーキシシン生合成経路がカラタチに存在することを示唆するはじめてのものであり、この経路が果実形成のごく初期に重要な役割をしていることを想起させる。また *Agrobacterium* のオーキシシン生合成遺伝子と植物ゲノム DNA との相同性についても検討したので報告する。

参考文献 Igoshi et al. (1971) Agr. Biol. Chem. Vol.35, 629-631.

1 pC 07

オーキシン誘導型 ACC 合成酵素の遺伝子は
二つ以上存在する

○中川直樹¹、山崎健一¹、森仁志²、今関英雅^{1,2}
(¹名大農・生化学制御、²基生研・情報制御)

ACC 合成酵素は植物ホルモン、エチレンの生成速度を決める重要な酵素で、傷害などのストレスや、他の植物ホルモン、オーキシン処理によっても誘導される。ACC 合成酵素には免疫化学的、クロマトグラフィー的に区別できる最低二種のアイソザイムがあり、一方は傷害で強く誘導され、もう一方はオーキシン処理で強く誘導されることを見だし、それぞれを傷害型、オーキシン型と呼んでいる。すでに我々の研究室ではカボチャから傷害型 ACC 合成酵素の cDNA と遺伝子 (1, 2)、オーキシン型の cDNA を単離している (3)。今回はオーキシン型 ACC 合成酵素の遺伝子について報告する。

ゲノミックスザンの結果、オーキシン型をコードする遺伝子は複数存在することが示唆された。カボチャ全 DNA より作成した遺伝子ライブラリーを、cDNA をプローブとしてスクリーニングし、13 個の陽性クローンを単離した。制限酵素地図の比較により、これらは 4 グループに分けられた。cDNA と制限酵素地図が相同な 1 グループと、地図が全く異なるが、翻訳領域の相同性が非常に高い 1 グループについて塩基配列を決定中である。これらの遺伝子の発現様式と塩基配列を解析し、傷害型とも比較する予定である。

- (1) Nakajima et al. PCP 31: 1021-1029 (1990)
- (2) 森ら, 日本植物学会第 55 回大会研究発表記録 p.260
- (3) Nakagawa et al. PCP 32: 1153-1163 (1991)

1 pC 08

トマトおよびカボチャ由来の ACC 合成酵素の存在様式
—— 単量体と二量体について

○佐藤 茂, 森 仁志¹, 今関英雅¹
(東北大・教養・生物, ¹基生研・情報制御)

ACC 合成酵素は、AdoMet を基質にしてエチレンの前駆物質 ACC の合成を触媒するエチレン生合成経路の鍵酵素である。いままでに植物種・組織・誘導刺激の異なる幾つかの酵素が研究されてきたが、トマト果実やリンゴ果実の酵素のように単量体として得られたものとカボチャ果肉やズッキーニ果肉の酵素のように二量体として得られたものがある。単量体 (サブユニット) の分子量はいずれも約 50 kD である。ズッキーニの酵素がなぜダイマーであるのかについては、この酵素の活性部位が 2 つのサブユニットの接触面に形成され、一方のサブユニットの活性部位を構成するアミノ酸残基の一部が他方のサブユニットから供給されるためであることが考察されている (Huang et al. 1991)。しかし、これはトマトやリンゴ果実の酵素のように活性酵素が単量体として得られているものには当てはまらない。私どもは、植物種による分子型の違いがどのような構造の差違に起因し、また反応活性にどのような違いを及ぼしているか興味を持ち研究を進めている。今回は、カボチャの傷害誘導型酵素、トマトの成熟型酵素および傷害誘導型酵素の遺伝子から大腸菌内で生産された酵素がいずれも二量体として得られること、およびトマトの酵素では単量体と二量体の間で触媒反応中におこる AdoMet による不活性化反応に大きな違いがあることを見いだしたので報告する。

◎三木健、小倉長雄、中川弘毅、森仁志¹、今関英雅¹、
佐藤隆英（千葉大・園芸、¹基生研・情報制御）

エチレンは果実の成熟や老化を促進する生理活性物質であり、その生成は果実の貯蔵性に大きな影響を与える。果実の貯蔵性を向上させるためには、果実の成熟や傷害過程におけるエチレン生成機構を解明しその生成を制御する必要がある。本研究はその第一段階としてエチレン生合成系の鍵酵素・ACC合成酵素のcDNAのクローニングを試みた。

メロン果実の果肉切片を25°Cに置きエチレン生成を誘導した。この組織より調製したpoly(A)⁺RNAを鋳型、既知のACC合成酵素の共通塩基配列をもとに合成したオリゴDNAをプライマーにしてcDNAを合成した。このcDNAをもとにPCR法によりACC合成酵素の一部と思われるDNAを得た。さらに、このDNAをプローブにしてcDNAライブラリーをスクリーニングし2170bpのcDNAクローンを得た。このcDNAを大腸菌で発現させたところACC合成酵素の活性がみられた。このcDNAの塩基配列から推定すると、このACC合成酵素は493アミノ酸のポリペプチドでカボチャ果実の傷害誘導型酵素と高い相同性がみられた。現在自然に追熟させたメロン果実からACC合成酵素のcDNAのクローニングを試みておりその結果もあわせて報告する予定である。

◎和気仁志¹、小関良宏²、下村講一郎³、松永是¹

(¹東京農工大、工.物質生物、²東大、教養.生物、³国立衛試.筑波)

海洋シアノバクテリア抽出物による植物培養細胞の生育、分化促進等について検討してきた。すでに、海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. の抽出物及び、高分子画分の添加によって、ニンジン人工種子の発芽率を大きく向上させることを示した。そこで、ニンジン不定胚の幼植物体形成過程に対する海洋シアノバクテリア *Synechococcus* sp. の抽出物の高分子画分（H画分）の効果を検討した。

1) 幼植物体形成促進 ニンジン不定胚の幼植物体形成に対する影響を調べた。培養4日目より幼植物体形成が認められ、培養10日目における幼植物体形成率はH画分（100mg/l）を添加すると約60%となり、無添加では約30%であった。2) クロロフィル生成促進 不定胚の幼植物体形成に伴い生成・蓄積されるクロロフィル量について検討した。クロロフィル生成は、幼植物体形成と同様に培養4日目より認められた。クロロフィル生成量は、培養6日目には無添加での不定胚の約5倍に達した。3) クロロフィル a/b 値 幼植物体形成後のクロロフィル a と b の比を算出し、ニンジン種子発芽の値と比較した。H画分を添加すると種子発芽時と同様な時期にChl. a/b値が安定することが認められた。4) ゼアチンとの効果比較 ゼアチンの添加は、 10^{-7} M以上でH画分と同様にクロロフィル生成を促進した。しかし、幼植物体形成率では、H画分ほど効果はなく、無添加と顕著な差は認められなかった。

1 pC 11

クリカボチャおよび *G. fujikuroi* からの
カウレン合成酵素の精製

斎藤臣雄、中山康行、神谷勇治¹、山根久和、室伏 旭、
桜井 成¹、高橋信孝¹ (東京大学・農化、¹理研)

カウレン合成酵素はジベレリン生合成酵素の一つで、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) からコパリルピロリン酸 (CPP) を生成するA酵素と、CCP からカウレンを生成するB酵素とから成る。本研究では、クリカボチャ (*Cucurbita maxima*) 未熟種子から調製した可溶性酵素画分を材料として、カウレン合成酵素のB酵素の精製を試みた。精製は、CPPからカウレンを生成する活性を指標として行った。酵素液 (50 mM K-Pi, pH 8.0) に [³H]CPP (2Ci/mmol) 220,000 dpm、MgCl₂ 5mM、unicornazole 10μM を加え、30℃で1時間インキュベートし、そのヘキサン抽出物をTLCで精製してカウレン画分の放射活性を測定した。本酵素は、Butyl-Toyoparl 650M カラム (50 mM K-Pi, pH 8.0) に硫酸濃度 20%で吸着し、0%で溶出した。DEAE-HPLC (20 mM Tris-HCl, pH 7.4) では、NaCl 濃度 290 ~ 320 mM の分画に酵素活性が確認された。現在、HPLCを用いた疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行っている。

また、ジベレリン生産菌である *Gibberella fujikuroi* からの同酵素の精製を目的として、ICI培地で30℃、7日間培養した菌体から可溶性酵素を調製した。クリカボチャと同様の方法で精製を行っている。

1 pC 12

クロレラウイルスのゲノム解析

○山田隆、下前淳子、古川誠治 (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、分布動態等について、既に報告してきた (1, 2)。

これらウイルスは線状dsDNAをゲノムとしており、植物界には極めて希なIridoviridae型であることが分かった。パルスフィールド電気泳動法により、ゲノムの制限酵素地図を作成し (340~370 kbp)、特にその末端構造の詳細な解析を行った。線状分子の両末端には数百bpの逆位反復配列 (TIR) が存在し、その塩基配列を決定した。また末端には蛋白質は結合しておらず、exoIII (3'末特異的)、λ-exonuclease (5'末特異的)、Ba131等の各種ヌクレアーゼ処理により、この線状DNAゲノムの末端のヘアピン構造が判明した。アルカリアガロースゲル電気泳動法により、このヘアピン構造には少なくとも一ヶ所の切断点があることも分かった。これらの知見をもとにこのウイルスゲノムの複製機構について議論したい。

(1) Yamada, T. et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57, 3433-3437.

(2) 1991年度日本植物生理学会年会要旨集 p.169.

1 pC 13

クロレラウイルスの感染プロセス解析

°下前淳子、古川誠治、山田隆（広島大・工・醗酵）

クロレラウイルスと宿主との関係、感染の経過を形態面から調べるために、感染後経時的に電子顕微鏡観察を行った。

数種のウイルスについて生活環を調べたがいずれも形態は同じであった。ウイルスは正二十面体ビリオンの角で宿主に吸着し細胞壁を溶解する。このときスパイク状のものが見える。ついでコアを宿主内に放出し空のカプシドが外に残る。感染1,2時間後から細胞質内にカプシドが集積し始め、形成後にコアのパッケージングが起こる。6時間後には細胞質中にビリオンが散在するがカプシドの集積は止まない。また、核膜はしっかりしており、ミトコンドリア、葉緑体も存在する。やがて成熟していないビリオンを含んだまま宿主細胞は破裂し、ウイルスが放出される。約8時間で一連の溶菌サイクルが終了する。

ウイルス感染初期にみられる宿主細胞表面構造の変化、ウイルス粒子形成の微細機構、ウイルス耐性クロレラ株の細胞構造などについても言及する。

(1) Yamada, T. et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57, 3433-3437

(2) 1991年度日本植物生理学会年会要旨集 p. 169

1 pC 14

クロレラウイルスのタンパク質解析

○古川誠治、下前淳子、山田隆（広島大・工・醗酵）

当研究室により自然界からスクリーニングされたクロレラウイルスは大型（150～200 nm）の正二十面体構造をしておりゲノムサイズ(dsDNA)は約350 Kbである(1, 2)。電顕観察によって明らかになった感染プロセスにより、ウイルス粒子には、宿主吸着蛋白質、細胞壁溶解酵素、転写酵素、各種転写因子などが含まれていると予想される。本研究ではクロレラウイルスの構造と機能を明らかにする目的で、ウイルス構成蛋白質の解析を行なった。SDS-PAGEでウイルスの蛋白質を分離したところ、150 KDaから10 KDaの間に30以上のバンドが検出された。ウイルス種によりそのバンドパターンには多少の変化が見られた。約52 KDaのメジャー蛋白質はSDS-PAGEの条件によってはdimerを形成していることがわかった。PAS染色によりこのメジャーな蛋白質は糖蛋白質であることがわかり、他の数種の蛋白質とともにウイルスのcapsidを形成していることが予想された。また、尿素処理により、この蛋白質をDNAや他の蛋白質とほぼ特異的に分離できた。このことから、capsid内部にDNAを中心としたコアの存在が示唆された。以上の情報をもとにクロレラウイルス粒子の基本構造について1つのモデルを提唱したい。

(1) Yamada, T. et al. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57, 3433-3437.

(2) 1991年度日本植物生理学会年会要旨集 p. 169.

1 pC 15

Phaseolus vulgaris 毛状根への *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* の感染

井伊 辰也, 東 四郎, 阿部 美紀子, 内海 俊樹
(鹿児島大・理・生物)

ミキモピン型 Ri プラスミドを保有する *Agrobacterium rhizogenes* NIAES 1724 株を感染させて、インゲン毛状根を獲得した。インゲン毛状根は Murashige & Skoog 栄養培地で非常に良く伸長する。MS 培地中の窒素源である KNO_3 と NH_4NO_3 の濃度を徐々に下げていき、free の状態で *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CNDP 株を接種した。2-4 週間後、インゲン毛状根上に根粒様形態が観察された。形態学的、組織学的観察の結果、通常の根粒と多少の相違が観察された。

1 pC 16

クローバー根粒菌の *nod genes* のクローニング

小林不二夫, 東四郎, 内海俊樹, 阿部美紀子
(鹿児島大・理・生物)

根粒菌 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 4S 株は、ホワイトクローバに宿主特異的に窒素固定根粒を形成する。感染初期には、根毛のカーリング、感染糸形成が見られる。この現象には根粒形成遺伝子が関与しており、これらの遺伝子を解析することは感染のメカニズムを理解する上で重要である。4S 株派生の共生プラスミドを欠失した H1 株 (Nod⁻) を用い、その根粒形成能を回復させることで *nod genes* をクローニングしたので報告する。クローニングの最初のステップとして、広宿主域コスミドベクター pLAFR1 に 4S 株の DNA を挿入した。次に、挿入断片を持つ pLAFR1 をメファージにパッケージングし、そのファージを大腸菌 *E.coli* VCS257 に感染させた。作成したコスミドバンクは conjugation により容易に H1 株に接合伝達が可能であった。*nod genes* を保有する菌は、transconjugants を直接クローバに接種し、形成された根粒から単離した。これらの菌は根毛の curling、deformation、感染糸形成の表現型を示し、アセチレン還元法で窒素固定能の有無を判定した。また、電気泳動とサザン解析により、そのハイブリッドパターンから、根粒形成遺伝子を持つ 2 つの形質転換株が得られたことが分かった。この菌を使用し、flavonoide 添加による *nod genes* の誘導とその遺伝子産物と細胞壁分解系との関連について考察する。

柴田高明・手塚修文（名古屋大・農・園芸）

マメ科植物には根粒菌が感染して根粒を形成し、その中で空気中の N_2 を NH_3 として窒素固定を行う。この窒素固定の過程ではエネルギーとして主に ATP が重要な役割を果たしている。本研究ではダイズの根・根粒内サイトゾル (cytosol)・バクテロイド (bacteroids)・根粒菌 (free-living cells) におけるアデニル酸キナーゼ、ATPアーゼの特性に関して報告する。

ダイズ (*Glycine max* cv. Akisengoku) 種子に根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* strain A1017) を接種したのち、播種後7週間目のダイズ植物の根、根粒内のサイトゾル (植物由来) / バクテロイド (根粒菌由来)、未接種の根粒菌 (free-living cells) から得られた各画分中の上記酵素について検討した。

アデニル酸キナーゼ、ATPアーゼはATPの合成、分解にそれぞれ関与するが、これらの酵素の特性は上記各画分の間で違いが見られた。すなわち、根粒菌側は単独生活をしている free-living cells の状態の時と、植物細胞との共生関係にあるバクテロイドの状態の時とは上記酵素の特性は異なっていた。また、植物側も根と根粒サイトゾルの間でやはりその酵素の特性に違いが見られた。つまり単独生活状態と共生生活状態の間ではアデニンヌクレオチドのレベルの代謝調節が異なるという知見を得たのでこれについて言及する。

塩ストレス状態のモヤシマメ幼根細胞における細胞質および液胞内 pH の変化

○中村 善行、笠毛 邦弘¹、坂田 亮²、太田 英二
(慶大・理工、¹農水省・食総研、²杏林大・医学)

植物細胞には、細胞質と液胞とが存在し、各々の内部 pH は、約 7.3, 5.6 に保たれている。原形質膜と液胞膜とに存在する H^+ -ATPase および液胞膜に存在する H^+ -PPase は、 H^+ -ポンプとも呼ばれ、細胞内外および細胞質/液胞間の H^+ 濃度差の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

昨年、我々は、塩ストレス状態のモヤシマメ細胞における H^+ -ATPase の活性とその H^+ 輸送能の上昇および液胞膜 H^+ -PPase の活性とその H^+ 輸送能の減少を報告した。これら H^+ -ポンプ活性の変化は、細胞内 pH に変動をもたらすことが予想される。そこで今回、塩ストレス状態のモヤシマメ幼根細胞の細胞質および液胞内 pH を ^{31}P NMR 分光法を用いて測定し、耐塩性と H^+ -ポンプとの関連を細胞内 pH 維持の観点から検討した。

その結果、塩ストレス状態では、細胞内 Na^+ 濃度の増加に伴い、液胞内 pH が数時間以内に約 0.5 pH unit 上昇することが観察された。外液 Ca^{2+} 濃度を上げると、この細胞内 Na^+ 濃度の増加と液胞内 pH の上昇は、ともに抑制された。一方、細胞質 pH は、塩ストレス状態でもあまり変化しなかった。これらの結果から、塩ストレスにより液胞膜 H^+ -PPase が阻害され、液胞から細胞質に H^+ が流出するものの、細胞質 pH は、 H^+ -ポンプ等によって調整されていることが示唆された。

吉田 静夫・母坪 研巳
(北大・低温科学研究所)

低温感受性植物の液胞膜H⁺-ATPase (V-ATPase) は低温に敏感で、細胞を0℃で冷やすと数時間以内に著しい失活を起こす。ヤエナリ培養細胞では酵素失活と平行して細胞質pHが低下することから、液胞膜のH⁺輸送機能と低温傷害の密接な関連が示唆される。東京大会で報告したように、低温感受性のヤエナリ実生から分離された液胞膜小胞をMgATP存在下でNO₂⁻、NO₃⁻、Cl⁻を加えて低温処理するとV-ATPaseは短時間で失活する。この低温失活は酵素活性測定条件、特にTriton X-100の有無によって異なると報告したが、その原因は用いた液胞膜小胞の85%がinside outであった為であることがその後の実験で判明した。これまでの報告ではV-ATPaseは動物由来でも植物由来でもともに低温失活を起こすと考えられているが、植物の種によって酵素の低温にたいする感受性に大きな違いが見られる。耐寒性の高いエンドウの液胞膜ではこれらのアニオンによる低温失活が起こりにくい。このようにin vitro下でのV-ATPaseの低温失活や植物種間での酵素の低温安定性の機構解明は植物の低温適応の機構を知る上で重要と思われる。

本報告では、in vitro低温失活と低温安定性の機構を明らかにするため、酵素サブユニット構成の変化、触媒活性の低下とH⁺輸送活性の関係、低温耐性植物(エンドウ)と低温感受性植物(ヤエナリ)のV-ATPaseのサブユニット構成、各サブユニットのSDS-2次元電気泳動における泳動パターン、酵素のQAE Toyopearl流出パターンの比較などを中心として実験を行った。その結果、MgATPおよびアニオンによる酵素の低温失活はプロトンチャンネルを構成する16kDaを除く全てのサブユニットが膜から解離することが原因であることが判明した。ヤエナリとエンドウからそれぞれ精製された酵素のサブユニット構成はSDS-1次元電気泳動では非常に類似度が高かったが、100kDaの重比や一部の低分子サブユニットに違いがみられた。現在SDS-2次元電気泳動パターンについて検討を行っている。これらの結果に基づいて生体内でのV-ATPaseの低温失活の原因と植物間における酵素安定性の機構について推察する。

植物の低温順化に伴う呼吸活性ならびに酸素発生能の変化

貞包治夫 (尚綱短大・家政・食物栄養)

阿蘇高菜は冬場には朝夕や夜間に必ず氷点下の温度に晒される阿蘇盆地で、日夜の寒暖差に耐えて生育する野菜である。従って、九州で生産されている高菜類の中で、最も低温耐性が高いと予想されるので、これを用いて植物の低温順化の研究を行った。また、演者は昭和59年から5年間、食品産業センターで新技術開発研究に従事したが、その間、新潟県食品研究所と共同で漬物の緑度を維持する方法として、通気条件下での漬込みを検討した。その結果、葉緑体の維持に呼吸が非常に重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得ている。なお、この漬込みに際して、雑菌汚染を防止するために、3℃程度の低温で処理しているが、低温と食塩の影響については検討を行っていなかったため、それも併せて検討した。

材料は市販の野菜のため、入手までの履歴が明らかではないが、入手経路を種々変化させても、好気条件下で低温処理すると呼吸能が上昇する。その上昇は窒素通気で嫌気条件では抑制された。酸素発生能は好気条件下で低温処理すると、呼吸能の上昇と同程度の低下があった。嫌気条件では酸素発生能は著しく低下し、低温処理を続けると、活性を消失した。10%程度の食塩添加は呼吸能の上昇を抑え、酸素発生能の低下を促進した。食塩添加で嫌気条件では酸素発生能の失活が大きく、活性の回復試験でも回復不能になるまで影響を受けた。

°矢崎芳明, 坂野勝啓 (農水省・生物研)

1991年度植物学会において、我々はニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) 培養細胞およびイネ (*Oryza sativa* var. *musasikogane*) 培養細胞に低酸素ストレス (酸素通気停止) を与えると、いずれにおいても細胞質の酸性化が起きるが、その程度が両者で異なることを報告した。細胞質の酸性化の原因の一つとして、呼吸・発酵によって生成し蓄積する二酸化炭素が考えられる。そこで、 ^{31}P -NMRを用いてニチニチソウおよびイネ培養細胞に二酸化炭素を通気した場合の細胞質 pH の変化 (酸性化) を測定し比較した。

酸素 (あるいは空気) 通気を停止した後、16時間にわたって ^{31}P -NMRスペクトルの変化を調べると、イネでは細胞質が酸性化するものの概ね pH 6.3 以下にはならず、細胞質無機リン酸と液胞無機リン酸のピークが重なることはなかった。一方、ニチニチソウでは細胞質無機リン酸のピークのシフトが大きく、数時間で液胞無機リン酸のピークと重なった (pH 5.5~5.7)。無酸素状態で二酸化炭素の濃度を変化させると、両培養細胞とも細胞質が酸性化するが、低濃度の二酸化炭素ではイネ培養細胞の方が酸性化が大きい (約 pH 6.8)。しかし高濃度の二酸化炭素では、イネの細胞質が pH 6.6 以下には酸性化しないのに対し、ニチニチソウでは酸性化が大きくなり pH 6.2~6.3 まで下がった。従って、イネの細胞には低酸素かつ二酸化炭素が蓄積する環境でも細胞質を pH 6.3 以下には酸性化しない pH 調節機構があり、低酸素ストレス耐性に関与していることが示唆される。

脱水ストレスで誘導されるイネ遺伝子の解析

○高橋良二¹、原田真理子、北川良親

(秋田農短大・生工研、¹農水省・北農試)

イネ幼苗を低温(5°C)処理後、常温(25°C)に戻した時、耐寒性品種「染分」は全く障害を受けていないが、低温感受性の「早生統一」は完全に枯死する。しかし、「早生統一」を低温処理する直前に0.5Mマニトールで一時間処理すると、低温に耐え、枯死しない。この現象は10 μ MABA処理では起こらない。一方、低温処理した「染分」幼苗のABA量は顕著に増加するが、「早生統一」では殆ど増加しない。少なくとも、耐寒性遺伝子は「早生統一」にも存在し、その発現誘導に脱水ストレスが必要と思われる。そこで、脱水ストレスで誘導されかつABAで誘導されない遺伝子の分離を試みた。0.5Mマニトールで短時間(30分)処理した「染分」培養細胞mRNAからcDNAを合成し、デファレンシャルハイブリダイゼーションによって、脱水で誘導されかつABAで誘導されない遺伝子10数クローンを分離した。今回はその内の一つpMS-1の構造と植物での発現を主に報告する。pMS-1は「染分」培養細胞では0.5Mマニトール、3hで最も強く発現する。4°C低温でも発現するがABAでは発現が弱い。pMS-1は978塩基からなり、627塩基のORFを持つ。N末側にメチオニンを含む18アミノ酸の繰り返し配列が存在し、さらにN末側にオオムギのABA誘導pHV A1 RNAおよび西洋アブラナのlea7Gと相同性の高い配列が存在する。pMS-1の他脱水で誘導される数種のクローンの植物での発現も合わせて報告し、耐寒性と脱水誘導遺伝子の関係について考察する。

1 pD 06

ハードニングにより誘導される *Chlorella* 遺伝子のクローニング

°城 斗志夫、小吹 千景、船橋 淳、吉元 誠、波多野 昌二
(九大・農・食化工)

Chlorella ellipsoidea C-27は、3°C、24時間の低温処理（ハードニング）により耐凍性を獲得する。演者らは、耐凍性獲得に伴い14種類のタンパク質が*de novo*に合成されることをすでに報告した。今回、この耐凍性獲得機構を遺伝子レベルで解明するため、ハードニングにより発現される遺伝子のcDNAクローニングを行ったので報告する。

ハードニングした細胞からmRNAを調製し、λgt10をベクターとしてcDNAライブラリーを作製した。ハードニングした細胞とハードニングしていない細胞由来のcDNAをプローブとしてディファレンシャルスクリーニングを行った結果、約6000個のプラークから128個のポジティブなプラークが得られた。cDNAを含む領域をPCRにより増幅した後、クロスハイブリダイゼーションによりこれらは28グループに分類された。このうち26グループのクローンは、ノーザンハイブリダイゼーションにより、ハードニングで発現される遺伝子であることが確認され、hiC(hardening-induced *Chlorella* gene)と命名した。現在、クロレラの耐凍性獲得に深く関与すると考えられるこれらの遺伝子の塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列からその遺伝子がコードするタンパク質の機能を調べている。

1 pD 07

イネ幼苗の低温処理による遺伝子発現の誘導

°加藤 明、吉田 均 (北海道農業試験場)

28°C連続明(10,000 lux)で湛水栽培した発芽2週間のイネを5°Cの低温(弱光、相対湿度100%)に移すとしおれが観察され、4日間の低温処理ののち常温に戻すと約2週間後には枯死する。低温感受性はイネの生態型などによる差異がある。低温処理により早期に誘導される遺伝子をクローニングしてその機能を解析しイネの耐冷性との関係を調べる目的で、低温処理したイネのシュート組織のcDNAライブラリーを作成した。cDNAクローンを個別に採取してノーザン・ドットハイブリダイゼーション法で調べたところ、低温処理によりRNAの蓄積が認められるものは約4%(5~7/150)であった。低温処理した組織に特異的なcDNAに富むライブラリーをサブトラクション法により作成し、低温処理したイネのポリA(+)RNAより合成した[32P]cDNAをプローブとして低温により強く誘導される遺伝子のcDNAクローン10種を単離した。これらのcDNAに対応するmRNAは5°Cの低温処理開始後3時間で増加が認められ、15°Cでは程度は少ないが同様の反応がみられた。低温反応性の遺伝子の中にはABA、NaClおよび乾燥処理によって誘導されるものが含まれていたが、低温処理によって特異的に誘導されるものが多かった。低温に対する感受性の異なるイネ品種について低温による遺伝子誘導の程度を比較したところ、5°C24時間の処理では顕著な差異はなかった。

1pD 08

紫外線照射の生長阻害作用における波長および 温度依存性

○竹内裕一、池田幸子（北海道東海大・工・生物工学）

近年、フロンガスなどの人工の塩素化合物の大気中への放出により、成層圏のオゾン層が破壊され、その結果、地表面に到達する紫外線のうち、UV-B と呼ばれる波長 290-320 nm の紫外線の量が増加する可能性が指摘されている。

紫外線照射量の増加による環境への影響を評価するためには、可視光線照射下における紫外線の作用スペクトルが不可欠であるが、この点に関する十分な知見はない。

暗所で生育させたキュウリの黄化芽生えから子葉を切り取り、種々の透過限界波長をもつ紫外透過フィルターの下で、健康線灯を用いて紫外線を照射しつつ *in vitro* で培養した。20℃、100 μM の zeatin 存在下で、2 日間培養すると生重量は 4-5 倍に増加した。この生長およびクロロフィル量あたりの光合成活性は、波長 320 nm 以下の紫外線照射により阻害された。クロロフィル合成は、300 nm 以下の紫外線で強く阻害され、紫外線の照度が大きい場合は、300-320 nm の紫外線照射でも阻害がみられた。

また、これらの紫外線照射による阻害は、培養温度に依存し、子葉を 25℃ で培養した場合には、阻害率の低下が認められた。

1pD 09

大麦のベタインアルデヒド脱水素酵素の cDNA クローニング

○石谷学、荒川圭太、高倍鉄子
(名大・農・制御)

植物細胞は塩または水分ストレスを受けると適合溶質 (compatible solute) と呼ばれる低分子有機化合物を蓄積することによって浸透圧調節を行なうことが知られている。なかでもグリシンベタイン (ベタイン) は細胞内に高濃度蓄積しても代謝機能に阻害効果を示さないことが報告されている。これまで我々はオオムギを材料にしてベタイン合成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) に着目して生化学的研究を行い、オオムギ緑葉にベタインアルデヒドに特異的な BADH が存在すること、BADH が塩ストレスで誘導される酵素であることを明らかにした。そこで次に塩ストレスによる BADH 遺伝子の発現調節機構を明らかにする目的でオオムギからの BADH の cDNA クローニングを試みた。

最終濃度が 300mM NaCl になるように段階的に塩ストレスを与えた大麦より調製した poly(A)⁺RNA を鋳型とし λZAP II をベクターとして cDNA ライブラリーを作製した。プローブとしては既に報告されているハウレンソウの BADH cDNA の 3' 側に相当する 0.7Kbp を PCR 法により増幅させ、pBluescript プラスミドにサブクローニングしたものをを用いた。その結果、約 60 万個のプラークをスクリーニングして 3 つのクローンを得、最長のものは約 1.9Kbp のインサートを含んでいた。現在、このクローニングした遺伝子の塩基配列をケイ光標識した primer を用いたジデオキシ法によって決定中である。

1 pD 10

緑藻の光合成に及ぼす H_2O_2 の影響

武田 徹、重岡 成、横田明穂¹、平山 修、光永俊郎
(近畿大・食栄、¹大阪府大・農化)

光合成生物の葉緑体内で光還元により生成される O_2^- は、SODなどの作用を受けて速やかに H_2O_2 に不均化される。高等植物の葉緑体では 10^{-3}M の H_2O_2 が蓄積されると、 CO_2 固定が100%阻害されることが知られている。したがって、光合成生物は生命維持のため必然的に H_2O_2 消去酵素として極めて有効なアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (AsAP) を葉緑体内に有する。しかしながら、緑藻のEuglenaのAsAPは葉緑体には存在せずシトソールに局在する。一方、ChlamydomonasのAsAP活性は光合成速度に比べ極端に低い。そこで今回、これら緑藻の光合成と H_2O_2 生成、消去系を関連づけながら、光合成 CO_2 固定反応の H_2O_2 感受性について検討した。

定常期まで培養したEuglena細胞を 10^{-4}M NaN_3 で処理すると、1時間でAsAP活性がほとんど阻害された。この細胞では、細胞外に加えた H_2O_2 の取り込みとその後の分解はほとんど起こらなかった。そこで次に、 NaN_3 処理したEuglena細胞を使い CO_2 固定に及ぼす H_2O_2 の影響について検討した。その結果、Euglenaの CO_2 固定は 10^{-3}M H_2O_2 存在下で約30%阻害された。このことは、ホウレンソウ葉の葉緑体で 10^{-3}M の H_2O_2 により CO_2 固定が100%阻害されることと考え併せても、Euglenaの CO_2 固定反応が H_2O_2 に対して耐性を持つことを意味している。なおChlamydomonasについての結果も併せて報告する。

1 pD 11

タバコ培養細胞のリン酸欠乏によるアルミニウムストレス耐性獲得機構の解析

山本洋子、豆塚弘毅、小野寛治、葛西身延、松本英明
(岡山大・資生研)

Alは土壌の主要元素であるが、酸性化によって溶出されたものが吸収され、植物の細胞分裂阻害や伸長阻害を引き起こす。これら阻害機構の詳細は不明であるが、最も簡単な説明としてリン酸アルミニウムの形成によるリン酸 (P) 欠乏が考えられている。我々はタバコ培養細胞を用い、Alへの応答反応を検討する中で、P欠乏細胞がAlに対する一過性の耐性を示すことを見いだした。

Al耐性を獲得するためには、P欠乏培地で2~3日の前培養を必要とし、この処理により細胞内P含量は正常細胞の約50%に低下した。さらに前培養中に蛋白合成阻害剤のCycloheximideを加えるとAl耐性が見られず、従って、Al耐性の獲得には蛋白合成を伴うことが推察される。正常細胞とP欠乏細胞のAl取り込み量は、Al処理開始後数時間は同程度に増加したが、24時間処理後においてはP欠乏細胞のAl含量はむしろ減少し、正常細胞の約50%であった。このことから、P欠乏細胞では、細胞内に取り込まれたAlの細胞外への排出機構が誘導されている可能性がある。

以上の結果は、P欠乏に伴って発現誘導される遺伝子の中にAl耐性に関わるものが存在する可能性を示唆している。一方、我々はタバコ培養細胞を酸性培地で前培養することによってもAl耐性を獲得することを見いだしており、これらの現象とネズミチフス菌で報告されているリン酸レギュロンとの関係についても考察する。

1pD 12

近紫外線照射時における *Ancystis nidulans* R-2 での
GroESLの発現
柴田 均、馬場克也、澤 嘉弘、落合英夫
(島根大・農・生物機能学)

定常期のラン藻 *A. nidulans* R-2 に真夏の日本で日中に観測される程度の近紫外線 (2.2 mW/cm^2) を照射することで、多数のUVショックタンパク質が生成されることと、このラン藻内に存在するS-320と仮称した水溶性の化合物が増感されて、スーパーオキシドアニオンラジカルが生成することをすでに報告した。

UVショックタンパク質を同定する一環として、比較的大量に発現した58Kのタンパクバンドを切り出し、N-末端のアミノ酸配列を22残基について分析した。このタンパクは、すでに *A. nidulans* の熱ショックタンパク質の一つとして報告されていたGroELに一致した。このGroELタンパク質は、酸化ストレスで変性したタンパク質の修復のために合成されたと考えられる。PCR法を使い、制限サイトを付随させたオリゴヌクレオチドをプライマーとしてこの遺伝子 (GroESL) を合成し、pUC 19にサブクローニングできた。またこのラン藻のGroESL遺伝子と相同性の高い大腸菌の遺伝子を、名古屋大学のKoharaライブラリーより、約8.0 kbpのEcoRI断片をpUC 19にサブクローニングし、高発現させることに成功した。今後、大腸菌のGroESLを精製して抗体の作製を行い、またラン藻のGroESLを高発現させ、このタンパク質の機能解明を行う予定である。

1pD 13

ハウレン草に対するUV-B照射の効果 I
活性酸素消去系の誘導について
柴田 均¹、鈴木優子¹、内藤陽子²、本田雄一²
(島根大・農・¹生物機能学、²環境生物学)

UV-Bが活性酸素(スーパーオキシドアニオンラジカルや一重項酸素)の生成源となる経路が報告されているので、本研究ではUV-B照射下で生育させたハウレン草での活性酸素消去系について、UV-A照射、自然光下、UV-カット条件下で育てたハウレン草での活性と比較した。

温室に通常のビニールフィルムを装着した自然光条件下、UVカットフィルムを装着したUV-カット条件、さらにUV-カット条件でBLB蛍光灯(FL-20BLB)終日照射区(UV-A、 $18.6 \mu\text{W/cm}^2$)、健康線ランプ(FL-20SG)終日照射区(UV-B、 $15.4 \mu\text{W/cm}^2$)でそれぞれ40-80日間生育させたハウレン草葉を植物材料とした。

草丈、展開した葉数、生体重、乾物重で比較した生育は、UV-カットや自然光条件下での植物体と比較すると、UV-A照射区で若干の生育促進作用が認められたのに対して、UV-B照射区では生育が著しく阻害されていた。UV-B照射された葉では活性酸素消去系酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(AP)、グルタチオンレダクターゼ(GR)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼの比活性が上昇しており、クロロフィル、カロチノイド、フラボノイド等の色素の含量が増加していた。ストロマではAP、GRとSOD活性の上昇も確認された。これらの結果は照射されたUV-Bが活性酸素生成源となっていることを示している。

The capability of rice and wheat seed to degrade starchy reserves present in the endosperm tissue, under anaerobic conditions, was compared. The results showed that rice, a species highly tolerant to anoxia, can readily breakdown starch under anaerobiosis concomitant with germination, while wheat does not germinate and fails to degrade starch present in endosperm. This clearly distinct behavior is likely due to the successful inducible formation of α -amylase in rice under anoxia, whereas the enzyme is not produced in wheat seeds. We found that rice seeds possess a set of enzymes allowing to utilize starch, degradative products under anoxic conditions. Wheat seeds were shown to germinate even under anoxia if fed glucose or sucrose exogenously. The overall results indicate that induction of α -amylase appears to be a key factor in permitting rice seeds to germinate under totally anaerobic environments.

○ 辻 淳憲・松岡英明・根本泰行

(東京農工大・工・応用生物工学)

・目的 演者らは、植物生葉のCO₂ ストレス応答に関する一連の研究を行っている。本研究は細胞レベルでの応答機構解析の一環としてタバコ培養細胞について、CO₂ 電位応答および、細胞内遊離Ca²⁺濃度測定を行ない、応答機構を考察した。

・方法、結果 植え継ぎ後2～3日目の培地に懸濁させたタバコ培養細胞(*Nicotiana tabacum* line BY-2)を顕微鏡下でマイクロピペットを用いて固定し、細胞内に電位測定用微小電極を刺入した。その結果、静止電位は約-100mVであった。CO₂と反応させると約2分後から細胞内電位は緩やかに負側に変化し、5分後に反応を停止させると元の電位まで回復した。次に、CO₂ 応答における[Ca²⁺_{cyt}]の変化について検討した。細胞を固定しマイクロインジェクション法を用いて細胞内にFluo3を導入した場合、細胞1個でも十分に測定でき、1時間以上その蛍光強度は変化しなかった。また、その蛍光強度はCO₂、空気との反応直後から減少し、反応停止後も初めの強度の約50%で、もとには戻らなかった。そこで、空気との反応に伴う蛍光変化を基準としてCO₂との反応に伴う蛍光強度を調べたところ、反応開始直後に蛍光強度が数%増加し、停止直後に急激に減少した。すなわち、CO₂ 応答にともない[Ca²⁺_{cyt}]が変化した。

1pD 16

小麦幼葉鞘の成長と細胞壁組成に対する水ストレスの影響

若林和幸, 中山尚美*, 保尊隆享, 神阪盛一郎 (大阪市大・理・生物, *香川大・教育)

水不足の条件下では植物の成長が抑制される。このような水ストレス条件でカボチャ下胚軸の成長が抑えられる時、細胞壁構成多糖類の量的増加が抑制されると同時に、構造の変化が起こることが報告されている(Sakurai et al. 1987*)。さらに、細胞壁合成の抑制が、水ストレスによる成長抑制の一因となっている可能性が示されている。しかし、単子葉植物では、成長と細胞壁代謝に対する水ストレスの影響についてはほとんど調べられていない。本研究では、ポリエチレングリコール(PEG4000)を用いて黄化小麦芽生えに水ストレスを与え、幼葉鞘の成長と細胞壁組成に対する影響を調べた。

5時間吸水させた小麦種子を水を含むろ紙上に蒔き、暗所26℃で2日間生育させた後、芽生えを0.80mMPEGを含むろ紙上に移し成長を調べた。幼葉鞘の成長は20mMPEGにより抑制され、60mMではほぼ40%成長が抑えられていた。次に、60mMPEGを用い成長の回復を調べたところ、芽生えを1日間PEG処理の後水に戻すと幼葉鞘の成長は最終的に、対照の90%まで回復した。この時の細胞壁を分析した結果、PEG処理によりセルロース・非セルロース性の両画分共に糖量の増加が抑えられており、特にセルロース画分での増加の抑制が大きかった。次に、PEG除去による成長の回復に伴う細胞壁の糖量の変化を見ると、成長が90%回復したのに対し、セルロース画分の糖量は対照の80%のレベルまでしか回復していなかった。しかし、非セルロース性画分の糖量は完全に対照のレベルにまで戻っていた。水ストレスの影響がセルロース画分が大きかったこの結果は、双子葉植物であるカボチャ下胚軸での場合と同じであり、水ストレスによる成長の抑制には、非セルロース性多糖類よりもセルロースの合成の抑制が関与している可能性が示された。

*, Sakurai, N., Tanaka, S., Kuraishi, S. (1987) Plant Cell Physiol. 23:1051-1058.

1pD 17

光独立栄養培養細胞株の環境ストレス耐性について

○佐藤文彦、室田憲一、竹田恵美、山田康之
(京都大学、農、農化)

我々はこれまで培養細胞に蓄積するタンパク質を2次元電気泳動により分離し、そのN末端アミノ酸配列を決定するとともにデータベースを用いた相同配列検索を行うことにより、我々の用いている光独立栄養培養細胞株には塩ストレスで誘導されるオスモチン、エチレンや障害などによって誘導されるキチナーゼやグルカナーゼなどのストレスタンパク質が著量蓄積していることを明らかにしてきた。今回、これらタンパク質の機能を探ることを目的に種々の環境ストレスに対する培養細胞の応答を検討したのでその結果を報告する。

環境ストレスとして塩、酸素毒性、高温を加え培養した。無選抜の培養細胞は0.2M NaCl、50mM Na₂SO₄、10μMパラコート、あるいは55℃60分の処理により著しく生育阻害を受けることが明らかとなり、培養細胞がこれらストレスに対して特別な耐性を持つということは認められなかった。そこで、これら環境ストレス存在下で生育しうる細胞を選抜することを試み、現在までに0.2M NaCl、50mM Na₂SO₄あるいは100μMパラコート存在下で健全に生育する細胞株を確立した。確立した耐性細胞の交差抵抗性は小さいことより、それぞれの耐性の機構は異なっていると考えられ、現在その性質の詳細な検討を進めている。

1pD 18

抗ファイトシデロフォア（ムギネ酸類）モノクローナル抗体の作製と応用

○三橋秀一, L.J. Sikora¹, J.S. Buyer¹, 伏谷眞二², 森 敏（東京大・農, ¹米国農務省, ²東北大・薬）

イネ科植物は鉄欠乏条件下において低分子の鉄キレーターであるファイトシデロフォア（ムギネ酸類）を分泌する。ムギネ酸類を測定する方法としては現在 T L C, H P L C が用いられているが、感度と測定に要する時間において一長一短がある。そこで高感度でかつ多検体を同時に測定できる、モノクローナル抗体による E L I S A 法の確立を目指した。低分子のムギネ酸類を抗原とするためにはタンパク質に固定化させねばならないが、固定化反応の容易さからニコチアナミンをムギネ酸の代わりに用いた。ニコチアナミンは、ムギネ酸類の一つであるデオキシムギネ酸の 3' の O H 基が N H₂ 基となっているもので、それ自体にはファイトシデロフォア活性はない。まずニコチアナミンを化学合成し、N H₂ 基を介して B S A に結合させて抗原とした。その結果、ムギネ酸類に群特異的に反応する抗体を産生する cell line が得られた。限界希釈法により単クローン化し、そこから抗体を精製した。この抗体について特性を調べたところ、3種のムギネ酸類に、抗原としたニコチアナミンに対するものと同程度の反応性を持ち、また金属とキレートしたムギネ酸類にもほぼ同程度の反応性を持つことがわかった。この抗体を用いた競争 E L I S A 法は H P L C と同レベルの感度を持ち、かつ多検体のサンプルを迅速に測定することができることがわかった。

1pD 19

太陽光感受性イネ突然変異株における可視光と温度の影響

○布施拓市、射場 厚、佐藤 光¹、西村光雄（九州大・理・生物、¹九州大・農・遺伝子資源）

最近オゾン層破壊、大気汚染等の環境問題が深刻化し、植物の置かれている環境も悪化しつつある。このため、厳しい環境条件に対する植物の防御機構を調べることは必要である。イネの突然変異株 K L 8 0 8 (*sp 1-2*) は、太陽光を照射したとき葉に病斑様の枯死部が生じる。この研究では、K L 8 0 8 の性質を利用して強光照射時の葉の変化や活性酸素消去系を調べ、障害の波長特性や温度依存性について検討した。障害時の温度依存性を調べた結果、30°Cで照射したとき K L 8 0 8 の葉には障害が生じたが、20°Cでは障害は生じなかったことから、K L 8 0 8 における障害発現には温度依存性があると考えられる。障害を生じる光の波長域を調べるため、青、緑、赤の3種類の光で障害の波長特性を調べた結果、主に青色光が障害を引き起こすことがわかった。光障害は活性酸素によって生じる場合が多いので、K L 8 0 8 の活性酸素消去系を調べた。強光照射前のスーパーオキシドディスムターゼ活性やペルオキシダーゼ活性は、野生株とほとんど変わらなかった。30°Cで生育した K L 8 0 8 の第5葉の総アスコルビン酸量は、野生株と比べて約40%低下していたが、20°Cで生育した葉は、両者の間にほとんど差はなかった。このことから、K L 8 0 8 のアスコルビン酸生合成系には高温感受性があることが考えられ、強光照射による障害の温度依存性との関連を示唆している。

1 pE 01

ホウライシダの原糸体成長におよぼす過重力の影響

°笠原宏一, 柳谷一美, 竹内裕一, 山田晃弘

(北海道東海大・工)

植物の成長に対する重力の影響については、従来から 1 xg 下で植物を水平に固定する方法や、クリノスタット上で植物を回転させる方法などにより、各種の影響が調べられている。

ホウライシダ (*Adiantum capillus-veneris* L.) の原糸体は赤色光の照射により、細胞分裂をおこさずに光源方向へ伸長するが、我々はこの伸長が 3 次元クリノスタット上の疑似微小重力環境下で培養した場合、地上成育に対して抑制されることを前回報告した。

今回、遠心過重力装置 (半径 160~310 mm) を使用し、20 xg までの過重力がホウライシダの発芽率および原糸体の伸長におよぼす影響を調べた。

発芽率に対する過重力の影響については対照との有意な差はみられなかった。

原糸体の伸長方向と過重力方向を一致させた条件では、対照 (地上成長) に対して伸長が促進された。反対に、伸長方向と逆方向に過重力をかけた条件では伸長が抑制された。原糸体の太さには対照との有意差はみられなかった。

過重力をかけた場合、通常の形態とは異なる原糸体が多くみられ、過重力が大きくなるほど増加する傾向がみられた。

1 pE 02

イネの節間伸長高進性突然変異体

中村郁郎 (国立遺伝学研究所)

イネの節間伸長性は、品種育種において重要な形質であるので比較的良く研究されてきた。すでに、矮性あるいは半矮性の突然変異体を材料として数多くの研究が行われており、いくつかの矮性変異体はジベレリンなどの植物ホルモンの産生量あるいは感受性の低下に起因することが報告されている。しかし、イネの節間伸長が植物ホルモンによりどのように制御しているかについては解明されていない課題が多いと考えられる。

私はイネ品種コシヒカリのガンマー線 (25 k および 30 k R) 照射後代の M2 種子 (静岡大学農学部の中井教授から分譲していただいた) をもとに M3 穂別系統を 2 万穂採種して選抜実験をおこない、約 20 万個体の中から発芽稚苗の第 2 節間から上位の節間伸長性が著しく高進した突然変異体を 1 個体見いだした。この変異体は死ぬことなく生長を続けるが、穂を形成することができない。そこで、M3 穂別系統に戻ってこの突然変異体を誘導する遺伝子に関してヘテロの遺伝子型を持つ系統の選抜をおこなったところ、ヘテロ系統を 2 個体同定することができた。このヘテロ系統から採種した種子を用いて、この突然変異体 (アワオドリと命名した) の遺伝子分析、形態形成、ジベレリン生合成阻害剤のユニコナゾールに対する反応性などに関する実験結果を報告する。

1 pE 03

細胞骨格阻害剤及び低温処理のタマネギ根端分裂組織分裂準備p34^{cdc2}帯に及ぼす影響

°峰雪芳直, 山下正兼¹, 長濱嘉孝¹, 飯田秀利², 安楽泰宏²

(広島大・理・植物,¹基生研・生殖,²基生研・細胞増殖)

分裂準備微小管帯(Preprophase band of microtubule)は、分裂前に将来の細胞分裂面を予言する位置に形成されるため、細胞分裂面の位置の制御に重要な働きをしていると考えられている。我々は昨年、多くの真核生物で、細胞周期のG₂からM期への移行を調節している蛋白質であるp34^{cdc2}キナーゼが、この分裂準備帯に特異的に蓄積されることを報告した(Protoplasma 1991)。そこで、本報告では、このp34^{cdc2}帯と微小管帯との関係を詳しく知るために、阻害剤や物理的処理で微小管帯を破壊、又は変形させた場合、p34^{cdc2}帯がどのような影響を受けるか調べた。播種後4日目のタマネギの根端細胞を使い、p34^{cdc2}と微小管を、各々FITC又はTexas Redで蛍光二重染色し、蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡で観察した。コルヒチンで微小管帯を完全に破壊するとp34^{cdc2}帯も消失した。低温処理(0°C)では、微小管帯は完全には消失せず、いくつかの微小管束が残る。この時、p34^{cdc2}は微小管束に付随して存在していた。表皮細胞では、サイトカラシン処理で微小管帯の幅が広がる事が知られているが(Mineyuki and Palevitz: J. Cell Sci. 1990)、根端細胞でもこれが確認できた。また、この時、p34^{cdc2}帯も幅広くなった。これらの結果は、p34^{cdc2}が微小管帯の微小管に付随して行動していることを示唆する。本研究の一部は三島海雲記念財団からの学術奨励金によっておこなわれた。

1 pE 04

アラビドプシス茎頂における時間的/空間的突然変異

acaulisの低温感受性の解析

°塚谷裕一・荒木崇・内藤哲・米田好文

(東京大・遺伝子実験施設)

我々は現在、花成過程と抽苔過程の関連を知る目的で、アラビドプシス(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)から、花序を欠損するが生殖器官は正常である突然変異、acaulisの単離とその解析を進めている。現在、複数の相補群に分類されるacaulis突然変異株を得ているが、今回はそのうちの一つの突然変異、acaulis 1の温度感受性について報告する。acaulis 1については3つの程度の異なる突然変異株を得、その全てについて温度感受性を認めた。いずれも16°C、22°Cで培養すると、花序の著しい短縮及び葉の細胞の伸長阻害という、顕著な表現型を示したが、28°Cで培養するとこの表現型は全く見られなくなり、野生株と区別できなくなった。

これを利用して、acaulis 1株の花序の表現型は茎頂で自律的におこるものなのか、あるいは先に起こる葉の異常から二次的に生じるものなのか、を知るために、またこの遺伝子の、花序形態形成に必要な時期を特定するために、温度シフト実験を行なった。その結果、花序分化時と思われる時期に28°Cから16°Cへシフトした植物は、ロゼット葉は正常でありながら典型的なacaulisの花序を形成した。この結果から、この株の花序の形態異常は、花序を形成する成長点が自律的に引き起こしていることが示唆された。また、時期を変えての一連の温度シフト実験の結果、acaulis遺伝子産物は正常な花序を作る上で、花序の伸長の間常に必要なものであることが示唆された。以上の知見を含め、この突然変異株を用いた温度シフト実験の結果をまとめて報告する。

荒木崇・塚谷裕一・高橋卓・内藤哲・黒岩常祥¹・米田好文
(東京大・遺伝子実験施設, ¹ 東京大・理・植物)

シロイヌナズナにおいては、det1, det2, cop1という光形態形成過程に関与する3つの突然変異が知られている。われわれは、暗条件下においても光形態形成過程が進行するdet変異類似の表現型を示す突然変異を同定した。この変異は、穏性の低下が見られない点で既知の3つの変異のいずれとも異なり、また、暗条件下で花成に至るまでの形態形成が完遂する点でdet2, cop1変異とは異なっている。この変異は遺伝解析の結果、det1, det2のいずれとも異なる遺伝子座の変異であることがわかった。そこでrem変異と命名し、その表現型の解析をおこなった。暗条件下では、rem変異においても他の変異と同様にrbcs、chs等の光誘導遺伝子のmRNAの高いレベルの蓄積が認められた。rem変異はdet1変異と同様に普通葉を分化・展開するが、色素体は葉緑体とはならず、白色体の形状を示していた。一方、明条件下においても、rem変異は下胚軸長、色素含量、花成の光周期に対する反応性等において野生型との顕著な差異を示した。光誘導遺伝子発現の明→暗順応、概日リズム等に関しては現在検討中である。rem変異の解析と並行して、野生型において暗条件下で光形態形成過程を進行させる条件として液体振盪培養、周期的熱ショックについても検討をおこなった。

キウリ胚軸表皮の気孔の成形に対する光の影響：

— 赤色光による副細胞の誘導 —

° 風間晴子・森田康裕 (国際基督教大学・生物)

一对の孔辺細胞と、多くの場合それを取りまく幾つかの副細胞から成り立つ気孔の成形過程は、細胞分裂パターンの正確な制御によって進行する。従って、分裂パターン制御の研究に於ける優れた実験系とされ、これまでに、特に、単子葉植物の葉の表皮系を用いた多くの研究がある。一方、すでに報告してきたように、キウリ胚軸表皮系は、赤色光による孔辺細胞の分化の誘導、即ち、外的要因による孔辺細胞の分化の制御が可能な系としての利点がある(風間、日本植物学会、1988、1990、風間&峰雪、日本植物生理学会、1991)。さらに、キウリ胚軸表皮の気孔成形過程は、10個前後の副細胞の分化を伴い、胚軸の軸性のもとに、並層、及び、垂直分裂、横分裂、接線分裂、放射分裂等を含む点に於て、その副細胞の分化過程を人為的に制御できるならば、細胞分裂パターン制御研究の、より優れた系と成り得る。そこで、これまでに報告されていない、双子葉植物の胚軸表皮系における副細胞形成過程を観察すると共に、副細胞形成に対する赤色光効果を定量的に扱うための指標として、“副細胞形成指数”を考案し、副細胞分化に対する赤色光効果について調べた。(i) 対照の指数1(孔辺細胞のみ誘導、且つ、成形され、副細胞の形成は全くみられない)に対し、赤色光照射50時間後では指数は5(孔辺細胞の周辺に於ける細胞数が対照に比べ5個多い)となり、また、赤色光による副細胞誘導は、ある閾値をもって“all-or-none”の反応として起こっていることが推測された。(ii) 孔辺細胞の形成頻度には差のない部域において、胚軸に沿って赤色光による副細胞の形成に対する、いわゆる“competence”の勾配が認められた。以上、孔辺細胞と副細胞の分化過程の分離が可能となり、赤色光照射により副細胞の分化の開始を人為的に制御できる可能性が示唆された。また、従来知られている、孔辺祖母細胞の分裂(孔辺母細胞の分化)、または、孔辺母細胞の分裂(孔辺細胞の分化)に伴う必然的な副細胞の分化過程とは異なり、孔辺細胞の分化とは独立に副細胞の分化を制御している何らかの要因の存在が示唆された。

○小野道之、提公代、岡崎光雄、原田宏¹

(信州大学・繊維・応生、¹筑波大・生物)

アサガオ(紫)芽生えは、1回の短日処理により花成誘導できる。明暗の感受とフロリゲンの合成は、子葉で行われると考えられ、遺伝子発現の変化を伴うという示唆がある。本実験は、短日処理に伴う子葉タンパク質の変化の検出を目的として行った。

連続光下で育てた、播種後7日目の芽生え(*Pharbitis nil* Choisi., st. Violet)に対し、1回の光周期処理：短日(16時間暗期、花成誘導条件)、光中断(16時間暗期の8時間目に10分間の光照射、非花成誘導条件)または長日(連続明期、非花成誘導条件)を行い、子葉タンパク質を2次元電気泳動により分析した。1次元目をアガロース等電点電気泳動、2次元目をSDS-PAGE(ポリアクリルアミド濃度勾配15~12%+12%)で分離、銀染色、クマシー染色及び³⁵Sメチオニンを用いた*in vivo*標識タンパク質のフルオログラムとして検出した。その結果、銀染色で約1200個、クマシー染色で約600個、フルオログラムで約800個のタンパク質スポットが再現性良く検出された。フルオログラムの解析として、画像解析装置PDQUEST™(Protein Database Inc., 東洋紡)を用いたところ、ラベリングの相対強度がLD=D6=NB10<NB16<SD10<SD16と短日処理に特異的である1スポット(M.W.約22kD、pI約7.5)が示された(LD=連続明期、D6=暗期開始後6時間目、NB10, 16=光中断処理の暗期開始後10, 16時間目、SD10, 16=短日処理の暗期開始後10, 16時間目；SD16はLDの13倍)。

アサガオの強光-低温開花におけるアスコルビン酸の役割

○篠崎真輝、¹小島泰弘、¹平井信博(京大・農・応植
¹京大・農・食工)

短日植物であるアサガオのVioletが低温(13-15℃)で10日以上育てると連続光下でも花芽形成すること、低温処理前に強光を照射すると、花成に必要な低温処理日数が著しく短縮されること、子葉の酢酸抽出物中に強光及低温の初期過程で著しく増加する物質(H fraction)が存在すること、H fractionの消長と花成が密接に関連していることは以前に報告した。今回はH fractionの同定結果(アスコルビン酸)とアスコルビン酸の強光-低温開花における役割について報告する。H fractionは不安定で同定が困難であったが、ジアゾメタンでメチル化したところ安定した物質が得られたので、MSとNMRで調べ、アスコルビン酸であることが判明した。アスコルビン酸は弱光下では含量がきわめて低く、照度が高くなるにつれて増加し、3000 luxでは1mg/g.fr.w.に達するものもあった。アスコルビン酸含量と花芽数はパラレルに増加した。またアスコルビン酸は弱光-低温でも花成誘導に先立ち増加する。以前に報告したように貧栄養による花成はクロロゲン酸やピノレジノール含量と密接に関連しているが、低温下では増加しない。低温下では花芽形成に先立ちフェルロイルキナ酸やデヒドロジコニフェリルアルコール含量が増加する。アスコルビン酸はバラクマリン酸の水酸化を促進してコーヒー酸の含量を高めることによりこれらのフェニールプロバノイド代謝を制御している。

竹能清俊（東北大・農・園芸）

Friedmanら（1989）は、暗処理前に与えたEGTAがアサガオの花成を阻害することから、Ca²⁺が光周期的花成誘導に関与することを初めて報告した。しかし、Tretynら（1990）は、暗処理前後のどの時期に処理しても特異的に作用する時期がなく、Ca²⁺は花成誘導には直接関与していないと結論した。そこで、新たに確立した灌流法を用いて、この問題について検討した。

播種後6日目のアサガオ、‘ムラサキ’芽生えの子葉を面積1 cm²を残してtrimし、下胚軸を約3 cm残して根を切除したcuttingを検定植物とした。下胚軸切断端から試料を含む水溶液200 μlを加圧して押し込み、検定植物を灌流した。灌流後直ちに他のアサガオ芽生えに接木した。灌流の前または後に16時間の暗処理を行い、その他は、25℃、連続光下に保った。暗処理終了後3週間目に花芽形成の有無を調べた。暗処理開始直前に灌流したEGTAは1 mM以上の濃度で栄養生長を阻害することなく花成を阻害し、10 mMでほぼ完全に花成を阻害した。暗処理開始8時間前、直前、暗処理終了直後、4時間後にEGTAを灌流した場合、暗処理直前に灌流したときに著しい阻害が認められた。LaCl₃、chlorpromazineでも同様の結果が得られた。これらの結果は、Friedmanら（1989）を支持するものであり、Ca²⁺が光周期的花成誘導に関与することを示している。

阿部知子、吉田茂男（理研・薬剤作用）

多年生植物の食用アスパラガス(*Asparagus officinalis* L.)の種子をトリアジン系薬剤で処理すると、本来花芽形成能を持たない1か月の実生の茎頂に花芽を誘導することができる。しかし、同じ薬剤でアスパラガスの植物体を処理しても花芽は誘導されない。このように、薬剤による異常な花芽誘導は、アスパラガスの種子胚分化期に限って発現することが示唆されている。また、この誘導作用に対する各種植物ホルモンの影響を調査したところ、2,4-D、NAA、IPAなどの非内生型のオーキシシン類が顕著に花芽形成を阻害することが判明した。そこで今回は、胚分化過程に影響を与えるオーキシシン類と花芽形成過程との関連を明かにして薬剤の作用機構を解析するために、薬剤処理とオーキシシン類処理の組み合わせに関する量的・時間的關係を精査した。その結果、種子を水に浸した後、4日目から8日目までの4日間の薬剤処理により花芽は誘導されるが、その他の期間には薬剤が作用しないことが判明した。また、オーキシシン類による花芽誘導阻害作用は薬剤と同時処理の場合に現われ、薬剤処理期間の前後にオーキシシン類を投与しても花芽誘導率の著しい低下は認められなかった。

1 pE 11

ニンジンのストレスによる不定胚誘導系における 蛋白質パターンの変化

○立川 佳伸, 鎌田 博, 原田 宏 (筑波大, 生物)

ニンジン不定胚誘導系は, オーキシンの一種である2,4-Dの有無で簡単に不定胚の形成を制御出来ることから通常の種子中における胚発生のモデル系として様々な生化学的, 分子生物学的研究が行われてきた。しかし, 2,4-Dは不定胚形成能獲得以外のさまざまな生理反応にも影響を与えていると考えられ, 不定胚形成の初期過程に必須な変化のみを検出する際の妨げと成っている。そこで, 植物ホルモンを用いないストレス処理による不定胚誘導系を用い, ストレス処理時の蛋白質のパターンの変化を二次元電気泳動を用いて比較することで不定胚の誘導初期過程に関与する蛋白質の検出を試みた。

ニンジン実生の頂芽を2,4-D(1mg/l), Sucrose(0.7M), NaCl(0.3M)あるいはCdCl₂(0.5mM)を含むMS培地上で一定期間(2-3週間)培養し, この組織片の抽出液を二次元電気泳動で分離した。銀染色では全ての処理区で400以上のスポットが検出された。特に63KDa付近に検出されたスポットは全てのストレス処理で共通に見られた。また, このスポットはニンジン実生胚軸を2,4-D(1mg/l)処理を行うことで誘導したEmbryogenic Cellsには検出できたが, Nonembryogenic Cellsでは検出できなかった。現在, この蛋白質の不定胚形成への関与について調べている。

1 pE 12

ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素分化における プロテアーゼ活性の発現

南 淳, 福田裕穂 (東北大・理・生物)

高等植物の道管・仮道管は中空の組織である。その構成要素である管状要素の発生過程において、二次細胞壁の形成と平行して、核をはじめとする全細胞内容物の自己分解が起こる。演者等はこの管状要素分化を高等植物におけるプログラムされた細胞死のモデルと考え、ヒヤクニチソウの管状要素分化誘導系を用いて、そのメカニズムの解析に取り組んでいる。この培養系では単離した葉肉細胞を高頻度で同調的に管状要素へに分化させることが可能であるため、細胞死の過程の細胞学的・生化学的解析が容易であると考えたためである。

ニュートラルレッド染色した細胞の光学顕微鏡下の観察により、この系において、分化過程の比較的初期に液胞が崩壊することがわかった。次に、液胞に局在していると考えられる酸性加水分解酵素の培養過程に伴う変動を調べた。その結果、液胞の崩壊前までに、酸性フォスファターゼ、フォスフォジエステラーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、酸性プロテアーゼの活性が増大することがわかった。特にプロテアーゼの活性増大は分化に深く関係していることが示唆された。そこで、カラムクロマトグラフィー及び電気泳動によって、プロテアーゼの分離を試みた。そして、分化に関連して、数種の異なるプロテアーゼ分子が発現している可能性が示された。

1 pE 13

ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の分化転換過程における修復型DNA合成の解析

°杉山宗隆、駒嶺穆（東北大・理・生物）

ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素への分化転換はS期DNA複製を必要としないが、アフィディコリン（APC、 α 型DNAポリメラーゼの特異的阻害剤）など各種のDNA合成阻害剤で阻止される。これは、この過程で見いだされた修復型DNA合成が分化転換に必須であると考えると合理的に説明できる。修復型DNA合成は見かけ上APC非感受性であったが、このDNA合成がUV損傷などに対する修復合成と同様に α 型および β 型DNAポリメラーゼの協調した働きによって担われているのであれば、分化転換のAPCによる阻害と修復型DNA合成の分化転換への関与とは矛盾しない。この場合、APC存在下では修復型DNA合成が正常には完了しないために分化転換が起きないと解釈されるが、実際核様体の沈降速度を解析した結果、APCで処理した細胞ではDNAに切れ目が残存することが示唆された。さらに今回、APC存在下で修復型合成部位を $[^3\text{H}]$ チミジンで標識した核DNAを調製し、これをエクソヌクレアーゼIIIで分解して放射能の遊離速度を調べ、APCによって修復型合成部位の3'側のギャップが埋まらないことを示す結果を得た。また、分化転換過程における修復型DNA合成の解析をより深く進めるために、プロモデオキシウリジン（BrdU）による標識と抗BrdU抗体を利用して、合成部位を含むDNA断片の濃縮と増幅を行ったので、これについても報告する。

1 pE 14

ミカツキモのgametic protoplast形成に機能する因子

1.細胞間伝達物質(PR-IP)の誘導機構

°関本弘之、猪木泰、藤伊正（筑波大・生物科学）

ミカツキモの有性生殖時に、-型細胞のプロトプラスト形成を誘起する情報伝達物質(PR-IP)が、+型細胞から培地中に分泌される生理活性糖タンパク質であることを明らかにした(Planta(1990))。今回は、-型細胞から放出され、+型細胞に対してPR-IPの放出を促す物質を検索し、その部分的特性を明らかにしたので報告する。

(方法と結果) a.+、-両型の細胞を混合し有性生殖を誘起した時点で培地を回収し、その培地中で+型細胞を単独で培養すると、細胞からのPR-IP放出量は増加した。この増加は-型細胞を単独で培養した培地に+型細胞を培養した場合にも観察された。またPR-IPの放出は、活性を含む培地中で+型細胞を培養後、約15時間で認められ、約24時間後まで徐々に増加した。

b.PR-IPの放出を促す活性は、-型細胞培養開始後、極めて短時間(約1時間)で培地中に検出された。

c.この因子のPR-IP放出誘起活性は、約50倍に培地を希釈しても検出され、80°C、10分の熱処理で30%まで低下し、透析(Mr 3500排除)によっては内液中に維持された。

以上の結果は、ミカツキモの有性生殖時に、-型細胞が単独で放出する分子量3500以上の因子が、+型細胞に作用しPR-IPの放出を誘起し、このPR-IPの作用により、プロトプラスト形成が開始することを示している。

2. 細胞間伝達物質 (PR-IP) の作用機構

* 関本弘之、佐藤忍、藤伊正 (筑波大・生物科学)

我々は、ミカヅキモの一型細胞のプロトプラスト形成を誘起する糖タンパク質 (PR-IP: 42, 19kDa のサブユニットで構成) が、作用するには、強光下での低細胞密度の前培養が重要であることを 1991 年大会において報告した。今回は、PR-IP がどのような機構で一型細胞にプロトプラスト化を誘起するのかを検討した。

(方法) PR-IP を NHS-LC-biotin により化学的に標識し、一型細胞に添加した。6 時間の培養後、細胞を MIB 培地で洗って回収し、細胞に結合している PR-IP の量をアビジン-ビオチン複合法で定量した。またその後のプロトプラスト形成数を測定した。

(結果) 1). PR-IP の小サブユニット (19kDa) のみが細胞に結合した。その結合は PR-IP 添加量に依存して増加し、やがて飽和した。このときのプロトプラストの形成数も同様に飽和性を示し、それぞれの 50% 飽和濃度はほぼ同値であった。

2). Scatchard-plot 解析より、解離定数が $3.2 \times 10^{-8} M$ と推定された。3). ビオチン標識小サブユニットの結合は、非標識の PR-IP 添加により阻害された。4). 小サブユニットは、強光下での低細胞密度の前培養を行った一型細胞によく結合した。また PR-IP によりプロトプラスト化を起こさない + 型細胞には全く結合しなかった。

以上の結果より、PR-IP による一型細胞のプロトプラスト化誘起は、細胞のもつ特異的レセプターと小サブユニットとの結合を介して起こることが強く示唆された。

* 頼藤 徹也、大隅 良典 (東大・教養・生物)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* MATa 細胞は、MAT α 細胞より分泌される α ファクターと呼ばれるペプチド接合フェロモンにより接合過程に進む。 α ファクターの作用には接合に必須の一群の遺伝子発現の誘導、その結果起こる細胞周期の停止などと、プロジェクションと呼ばれる突起の形成という形態変化の誘導が知られている。突起形成に必要な α ファクターの K_m 値は細胞周期停止の K_m 値に比べて 100 倍大きく、その間の濃度で処理された MATa 細胞は細胞周期を停止するが突起を形成せず、本来突起を形成するべき方向に伸長成長を行う。

今回この突起形成の機構を解析することを目的として突起形成に十分な濃度の α ファクターで処理しても突起を形成せず、伸長成長する変異株の単離を試みた。変異原処理した MATa (*sst1*) 細胞を、対数増殖期まで増殖させ α ファクターで処理し、その培養液中から顕微操作により細胞周期を停止している突起を形成せず伸長成長している細胞を直接分離した。四分子分析の結果、とられた変異株は 3 つの相補性グループに分かれた。これらは 3 株は形態学的にはまったく区別がつかない表現型をもち、通常の増殖には何等影響を示さなかった。さらにこれらの遺伝子は接合には必須ではないことがわかった。今回は、この突起形成不能株の、主として α ファクター存在下の形態変化について報告する。

近藤孝男 (基礎生物学研究所)

生物時計 (ここではサーカディアンリズム) は単細胞生物からヒトに至るまでほとんどすべての生物で確認されており、地球上の生物にとって最も重大な環境変化、すなわち昼夜交替に適応すべく機能している。そして多くのリズムの生理学的性質が共通していることから、特有の振動発生機構 (基礎振動) の存在が期待されている。この基礎振動が細胞内で発生していることは確実であるが、細胞下レベルの確実な知見は全く得られていない。リズムを測定するためには数日から1週間にわたる連続測定が必要なので、解析に利用できる実験系に限られることが最も大きな困難であると考えられる。特に生物時計の分子機構解明に有効なアプローチと考えられる突然変異の遺伝子解析を効率よく適用出来る実験系は少ない。

生物時計の分子遺伝学的解析が可能な実験系としては1) 分子遺伝学的手法が利用出来る生物種であること、2) 測定の容易なリズムを示すこと、特に多数の個体の時計を能率よく検定してスクリーニング出来ること、が必要である。1) の条件を満たす実験系としては我々は酵母、らん藻などに注目した。最近Kippertが分裂酵母の高温耐性リズムを報告し、Chen, Mitsui, Sweeneyらがらん藻の窒素固定化酵素のリズムを発見したので、これらの生物でも生物時計が機能していることは明らかになった。そのリズムの測定は容易ではないが1) の利点を活かし生物発光系の遺伝子を組み込み、「人工の時計の針」として作動させることが出来れば、2) の条件をも満たす実験系を得ることが可能である。今回はこうした試みによって、得られた生物発光のリズムについて報告し、生物時計の分子機構に迫る戦略を考えてみたい。なおこの研究は米国 Vanderbilt大、C.H. Johnson博士、Texas A&M 大 S.S. Golden博士との共同研究である。

〇秋山正志, 石浦正寛¹, 中島秀明 (岡山大・理・生物,
¹基生研・細胞生物)

アカバシカビ (*Neurospora crassa*) では、現在までに7種の異なる遺伝子座に位置する「時計」遺伝子が報告されている (Feldman)。これらは突然変異によって、連続暗下での分生子形成リズムの周期が変更されることより同定された。Dunlapらのグループにより、その中の *frq* 遺伝子がクローニングされ、ゲノムDNAの塩基配列が決定されている。我々は別の時計遺伝子の1つ *prd-1* 遺伝子のクローニングを試みているので報告する。最初に *prd-1* 遺伝子の近傍に位置する *acr-2* 遺伝子から *prd-1* 遺伝子への染色体歩行を計画し、*acr-2* 株ゲノムDNA由来のコスミドライブラリーを作成した。ベクター pDC107 は pDC1 および C. Yanofsky より送られた pSV50 から切り出した 2.6 kbp のベノミル抵抗性遺伝子から構成した。しかしながら、トランスフォーメーションにより、アクリフラビン感受性のスフェロプラストから抵抗性のトランスフォーマントを選択することはできなかった。そこで、*prd-1* 株のスフェロプラストから野生型のトランスフォーマントを直接選択する方法を開発し、最終的に *prd-1* 株の周期を相補する 4.2 kbp の DNA 断片を得た。塩基配列を決定した結果、1280 bp よりなる ORF の存在が予想された。4.2 kb の断片をプローブとして行ったノーザン・ハイブリダイゼーションの結果、2種の mRNA が確認され、その日周期を調査した。

五藤竜太，加上律子，^o中島秀明（岡山大・理・生物）

アカパンカビの分生子形成リズムを制御する生物時計の遺伝学的解析のために、これまで多くの周期変異株が報告されている。これらの変異株は、時計の周期以外の性質、たとえば成長速度などはほとんど変化していない。これはリズム測定が、成長することと分生子形成を前提にしなければならないことによる。この事情は他の生物についての同様の実験でも同じである。しかし、もし時計の機構が基礎的に重要な代謝活性に密接な関係を持っていたとしたら、真の意味での時計変異株は、従来の方法では分離できない可能性もある。このような仮定にたつて、温度感受性の時計変異株の分離を試みた。まずレプリカ法で温度感受性変異株を現在までに約80株分離することに成功した。それらの時計の性質を周期ばかりでなく、周期の温度補償性、高温処理に対する位相応答曲線をそれぞれの株で比較した。特に30℃ですでに成長阻害が顕著に起こるような温度感受性変異株に着目した。また従来分離されている同様な変異株についても同様の実験を行なった。その結果、1. 一般に温度感受性変異株の周期は不連続に変化する、2. ある株の高温に対する位相応答曲線を調べると、特定の部域で位相変化が起こる度合が顕著に小さくなっている、3. ある株では、この位相応答曲線自体の形が野性株とは大きく異なる、などの変化を観察することができた。これらの現象について報告する。

一 般 講 演

第2日 3月30日(月)

一般講演

第2日 3月30日(月) 午前の部

- A会場 栄養・転流・水分生理
- B会場 細胞壁
- C会場 タンパク質・酵素(I)
- D会場 分子生物学(III)
- E会場 分子生物学(IV)
- F会場 光合成(II)
- G会場 脂質／光合成(III)

2aA 01

キュリーポイントパイロリシスGC/MSによる水稻種子の分析

○寒川喜三郎、井上章子、永野 正（大阪府大・農・農芸化学）

キュリーポイントパイロリシスーガスクロマトグラフィー質量分析計（Py-GC/MS）法は、多量の情報が化学的な前処理を必要とせずに微量のサンプルで得られる方法である。今回は水稻種子の解析に本法を用いて検討を加えた。

【方法】 分析に供した水稻種子は、1989、90、91年産を用いた。分析試料は玄米とそれぞれの種子を精米し白米とした物および30度Cで15日、30日間保管した白米を材料とし、粉碎後分析に供した。Py-GCの条件は、パイロライザーは日本分析工業製（JHP-3型）、ガスクロは日立製作所製（G-3000）を用いた。Py-GC/MSにはパイロライザーをキャピラリーGC/MS（QP2000-A、島津製）に装着して用いた。キャピラリーカラムはDB-WAX（長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25 μ m）を用いた。熱分解には、590℃のパイロホイルを使用した。

【結果】 得られたピログラムは、多数の熱分解産物を示した。クラスター分析の結果は、3つのグループに分けられることを示した。91年産の玄米は離れた位置に分類された。加温による影響がピログラムに反映することを示した。玄米と91年産白米の15日加温を区別する情報は第1主成分に存在すること、89年産の白米と15日加温を区別する情報は第2主成分に存在するものと推定された。また因子分析を実施し、その解析を行った。

2aA 02

ニチニチソウ培養細胞の細胞外酸性ホスファターゼの精製とその性質

○城市 篤、新井康仁、降旗 敬、桜井英博

（早稲田大・教育・生物）

ニチニチソウ培養細胞をリン酸を含まない培地に植え継ぎ、培養（-Pi処理）すると4日目頃から細胞外への酸性ホスファターゼ（APase）の分泌が急激に上昇するが、リン酸を1日おきに加えて、培養（+Pi処理）すると6日目でも-Pi処理2日目程度の分泌に留まっている。-Pi,+Pi処理した培地の90%飽和硫酸沈澱画分をnative PAGE、活性染色すると -Pi処理4日目以降、おおまかに分けて3つのアイソザイム（移動度の低い順にI, II, III）が確認されたが、+Pi処理ではI, IIの2つしか確認されなかった。このアイソザイムのうち主要なIを精製し、その性質を調べた。

培地の50-85%飽和硫酸分画、ゲル濾過（Toyopearl HW55）では3つのアイソザイムとも同じ画分に得られる。これを陰イオン交換（Mono Q FPLC）にかけるとIは2つの画分（Ia, Ib）に分かれて溶出され、II, IIIはより高い塩濃度で溶出される。Ia, Ibは、さらにゲル濾過（Superdex 75 FPLC）により、電気泳動的に単一バンドに精製できた。

Ia, Ibともに至適pH 4.5、PAS陽性、活性に2価カチオンを必要とせず、300nMモリブデン酸により50%阻害された。IaとIb共に基質特異性が広く、糖リン酸、フィチン酸、ヌクレオチド、PPiなどを分解する。なお、Iaはヌクレオシド三リン酸に対する活性が、Ibは糖リン酸に対する活性がより高かった。分子量はSDS-PAGEでIa:60kDa, Ib:57kDa、ゲル濾過でIa:59kDa, Ib:54kDaであった。

2aA 03

ニチニチソウ培養細胞における無機リン酸取り込みの諸性質

°降旗 敬、新井康仁、城市 篤、桜井英博

(早稲田大・教育・生物)

ニチニチソウ培養細胞をリン酸を含まない培地で培養(-Pi処理)するとリン酸取り込み活性が著しく上昇する。前回の大会では、プロトプラストを用いたリン酸取り込みのリン酸濃度依存性(0.1-1000 μ M[Pi])の研究から、-Pi処理細胞には、親和性の異なる少なくとも2種類の取り込み成分があることを報告した。その後の研究によりそれぞれの K_m として1.5および40 μ M[Pi]が得られた。リン酸(1.5-2.5mM)を1日おきに添加してリン酸飢餓にならないように培養した(+Pi処理)細胞では高親和性成分がほとんど見られないことから、-Pi処理に伴うリン酸取り込み活性の上昇は、高親和性成分の発現によるものであった。

この2種類の取り込み成分それぞれの性質について、高親和性成分は-Pi処理細胞を用いて測定時のPi濃度2.5 μ Mで、低親和性成分は+Pi処理細胞、Pi濃度500 μ Mで、阻害剤の効果などを調べた。至適pHは両成分とも約5.5であった。阻害剤の効果では、両成分とも10 μ MグラミシジンS、10 μ M FCCP、10 μ M DESで90%以上、100 μ M DCCD、100 μ Mヨード酢酸、100 μ Mアジドでは約50%程度の阻害が見られた。NEM(100 μ M)は低親和性成分への阻害が高親和性成分への阻害に比べて大きかった。また、10 μ M DIDS、5 μ g/ml Dio-9、1mM KNO₃、100 μ Mバナジン酸、1mMモリブデン酸はほとんど阻害効果がなかった。

2aA 04

硝酸塩によるブドウ休眠芽の萌芽促進効果とアミノ酸代謝

鈴木章方(山梨大学・教育・生物)

ブドウの休眠芽に硝酸カリウム水溶液を塗布すると、萌芽が早まり、果実収穫期も早まる。そこで、硝酸イオンを与えたとき、アミノ酸代謝はどのようになるのか調べた。(方法)ブドウの1年枝を、落葉直後12月初旬に切り取り、1節ごとの切片を、水または50mM KNO₃水溶液にさして、25℃明所におくと、休眠芽は約3週間で萌芽する。その時の芽と茎の部分を70%エタノール抽出して、HPLCにかけた。(結果)1. KNO₃によって、約6日分萌芽が早まる。2. 芽と茎の総アミノ酸量は、当初ともに約9 mmol/gで等しいが、芽では両処理ともに増加したが、茎ではKNO₃を与えた時にだけ増加した。3. アミノ酸の分子比率%は、0日の芽では、ARG48%、ALA15%、GLN10%、GLU7%、ASP4%であり、茎では、ARG38%、GLN24%、ASP7%、ALA5%、VAL4%であった。つまり、芽のALAは茎の3倍になる。4. 芽のアミノ酸比率の変化: PRO、GLN、SERは増加し、ARG、ALAは減少した。GLUグループ内で、PRO+GLN←ARGの図式が成り立つ。ALAの減少はTCA回路の作動と一致している。KNO₃は、GLNを増やし、ALAの減少を促す。5. 茎のアミノ酸比率の変化: ALA、LYS、TYRは増加し、GLN、ASPは減少し、ALAとGLNの増減は芽とは逆になる。KNO₃は、ALAとGLNを増やす。ALAの動きから見ると、茎においては解糖系優位となり、KNO₃はその傾向を助長するものと考えられる。

2aA 05

イネ葉細胞質型グルタミン合成酵素の窒素転流における
役割 —細胞質型グルタミン合成酵素の組織内局在性—
○蒲地一成、山谷知行、前 忠彦、小島邦彦
(東北大・農・農化)

演者らは、現在まで細胞質型グルタミン合成酵素(GS1)の窒素転流における役割を解明することを目的として研究を行ってきた。その結果、イネにおける主要な窒素転流形態であるグルタミンは、GS1により合成されていることが強く示唆され、報告を行ってきた^{1), 2)}。しかし、GS1の組織内局在性は未だ不明である。そこで本研究では、免疫組織化学的手法を用いてイネ葉GS1の組織内局在性を明らかにして、窒素転流のためのグルタミンが合成される組織を同定することを目的とした。

イネGS1・GS2のcDNA解析から推定されるアミノ酸配列³⁾をもとに、GS1に特異的な配列部分に対して合成ペプチド(17残基)を作製し、これを免疫源として抗GS1特異抗体を調製した。得られた抗体を用いて、免疫組織化学的手法(Tissue print immunoblot)により、イネ主稈第13葉身におけるGS1の組織内局在性を検討した結果、GS1抗原は特異的に大維管束・小維管束に局在していることが判明した。一方、同手法を用いてGS2、Fd-GOGAT、NADH-GDHの局在性を検討した結果、いずれの抗原も葉肉細胞に局在していることが示された。以上の結果から、転流のためのグルタミンは、維管束内でGS1により合成されていることが強く示唆された。

1) Kamachi et al. (1991) Plant Physiol 96:411. 2) Kamachi et al. (1992) Plant Physiol (in press). 3) Sakamoto et al. (1989) Plant Mol Biol 13:611.

2aA 06

イネのシンク組織におけるNADH依存性グルタミン酸
合成酵素タンパク質の免疫学的解析
°早川俊彦、山谷知行、前忠彦、小島邦彦
(東北大・農・農化)

イネは老化葉(ソース)から生長中の葉や穂(シンク)へ主にグルタミンとして窒素を転流する。しかし、シンクでの主要な遊離アミノ酸であるグルタミン酸への変換機構に関しては不明である。我々はこの変換に着目し、登熟過程のイネ種子におけるNADH依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)の発現を特異抗体¹⁾を用いて蛋白レベルで解析した。同様にFd-GOGAT, GS, NADP-IDHについても解析した。

イネ(ササニシキ)をガラス室で水耕栽培し、主稈の穂の上位第5位までの1次枝梗に着生する穎果を開花日から登熟終了まで収穫した。穎果中の可溶性蛋白当たりのNADH-GOGAT活性は、開花日より増加し、可溶性蛋白含量の増加に先立って5日目にピークを示し、以降減少した。一方、可溶性蛋白当たりのFd-GOGAT, GS, NADP-IDH活性は5日目まで一定であり、以降減少した。登熟の初期を除き、穎果中にはNADH- とFd-GOGAT活性がほぼ等量存在した。Immunoblot解析では、穎果中には精製イネ培養細胞NADH-GOGATと移動度の一致する約200kDのバンドのみが検出された。同様に精製イネ葉Fd-GOGATと一致する約160kDのバンドも検出された。登熟過程の各バンドの変化は、相当する各GOGAT活性の挙動とほぼ一致した。また精製標品を標準として定量した結果、登熟期間を通じNADH-GOGAT蛋白はFd-GOGAT蛋白よりも多く発現していることが示された。1) Hayakawa et al. (1992) Plant Physiol. in press

2aA 07

登熟過程の大豆種子における窒素同化酵素の分布

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

ダイズ種子における窒素化合物の移行は、篩管液で主要なAsparagineが種皮の柔細胞層にunloadingされた後、原形質連絡の見られない内細胞層から溶出し、子葉組織に取り込まれると考えられる。既に、種皮のアミノ酸代謝関連酵素活性（ASNase, Aminotransferase, GS, Pd-, NADH-GOGAT, NADH-GDH, NADP-isocitrate dehydrogenase, PEPCase）のうち、GS活性は子葉に比べてかなり強いことが明らかとなり、種皮分泌液ではGlutamineが主要である報告と符合した。

今回は、GSの種皮、子葉組織における分布、及びアミノ酸代謝関連酵素の登熟中の変動を免疫化学的に検討し、種皮の窒素化合物の移行に果たす役割について報告する。ダイズ種皮、子葉ともGSは、細胞質型GS1が主体であった。種皮では39kDaのGS1ペプチドは2バンドからなり、種子の黄化する時期に至り分子量の小さいバンド及びGS2バンドは消失した。子葉では登熟中期に僅かであったGS1が、黄化期に至りかなり認められた。GOGATペプチドはFD型、NADH型とも、子葉ではそれらの活性の低い品種で大きな変化が登熟中見られなかったが、活性の増大する品種では比例して増加した。黄化期の種皮ではいずれの品種でもGOGATペプチドの低下が見られなかった。GS1抗体を用いたTISSUE BLOTT、及びGS2抗体による免疫組織化学的な光顕観察では、種皮の細胞組織、特に柔細胞群にGS1タンパク質が多く分布する結果を得た。

これらの結果から、種皮柔細胞はその細胞質でアミドの変換を行い、SYMPLASTな窒素化合物の移行に積極的に関与していると推察される。

2aA 08

イネの生育にともなう、葉鞘のデンプン含量と炭水化物代謝関連酵素活性の変化

渡辺嘉人、中村保典¹、石井龍一（東大・農、¹農水省生物資源研）

イネの葉鞘は、デンプンの一時的蓄積器官として機能し、その蓄積量は植物体の生育段階によって大きく変動する。そこで、こうした葉鞘における生育段階によるデンプンレベルの変動を、炭水化物代謝関連酵素の活性の面から解析することを試みた。

出穂期直前に出現した上位葉鞘は、下位葉鞘に比較してより多くのデンプンを蓄積していた。両葉鞘間で、可溶性全タンパク質量に差はほとんど認められなかったが、いくつかの酵素では、その活性に大きな差が見られた。特に顆粒結合性および可溶性のスターチシンターゼ、ブランチングエンザイム、スクロースシンターゼなどの酵素活性が上位葉鞘で高く、葉鞘のデンプン含量と対応していた。さらに、これらの酵素活性は、植物体を異なる光条件下で生育させた場合にも変化することから、光合成産物の供給量により制御されていると考えられた。またスクロースフォスフェートシンターゼ活性は、出穂期に一時的に増加し、光合成産物の穂への転流と関連していると考えられた。

以上より、葉鞘は単なる余剰光合成産物のプールではなく、植物体全体の光合成産物の分配と関係した代謝的調節を受けていると考えられた。

2aA 09

タバコ培養細胞におけるホウ素結合多糖の同定

大野佳織・間藤 徹・関谷次郎（京都大 農化 補栄）

ホウ素は高等植物の必須元素であるが生理作用は未だ明らかにされていない。その作用はホウ素が本来存在する場所で起こるはずである。我々は昨年のもので、細胞のホウ素の99%は細胞壁に存在していることを示した。そこで更に細胞壁中の結合部位を特定しようと考えた。

2,4-D 0.2ppmを含む改良LS培地で培養したタバコ培養細胞BY-2株から粗細胞壁を調製した。粗細胞壁をドリセラゼで48時間処理することにより細胞壁中のホウ素の80-90%が多糖に結合したホウ素として可溶化された。ホウ素の定量はDNNO-HPLC法、糖の定量はフェノール硫酸法によった。抽出液にイオン交換及び分子ふるいクロマトグラフィーを行い分子量約7000の電気的に均一なホウ素含有多糖を得た。多糖1分子にホウ素1分子が結合していた。このホウ素は1N HClで30℃15分間の処理により完全に除去され、ホウ酸の形で糖の水酸基とエーテル結合していると考えられた。塩酸処理で多糖の分子量及び等電点はほとんど変化しなかった。構成糖からこの多糖はラムノガラクトナンであろうと推察された。ダイコン細胞壁からも同様のホウ素含有酸性多糖が得られ、このホウ素含有多糖は高等植物細胞壁に普遍的に存在するものと思われた。

2aA 10

車軸藻類節間細胞の原形質流動におよぼす横向きの変心力

上坪英治（一橋大・生物）菊山宗弘（放送大・生物）

ストロボ型遠心顕微鏡を用い、*Nitella axilliformis* 節間細胞に直軸方向の変心力を加えた。細胞皮層部の動因座繊維（アクチン束）に接して流れる細胞質内質は、遠心・求心両方向とも4~1500×gの範囲で加速も減速もせず、対照と等しい流速を保った。伴の細胞質により大きい変心力を加えるため、*Chara australis* 節間細胞の細胞液を灌流法により高密度人工細胞液（1.058 g/cm³ ; 120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ + Ficoll 400）と置換した。その結果、細胞質と細胞液の密度差は0.044 g/cm³（対照の約10倍）となったが、この細胞の流動も1400×gまで加速も減速もしなかった。無処理細胞の流動は、14,000×gを加えても全く影響を受けないと推論できる。

N. orientalis 節間細胞を遠心顕微鏡ローターの回転半径と直角（接線方向）にセットし、細胞長軸に直角方向（横向き）の変心力を加えてみた。流速は遠心加速度的増加にともないほぼ直線的に低下し、1100×gで26 μm/s（対照の43%）となった。アクチン束と細胞質（のミオシン）との相互作用は、横向きの力に対し、比較的弱いことがわかった。

2aA 11

車軸藻類における巨大分子の細胞間輸送

菊山宗弘・原陽司・島田希代・丁大橋¹

(放送大学・生物¹ 姫路工大・理・生命科学)

原形質連絡を通過する物質の細胞間輸送の様子を車軸藻類を用いて調べた。車軸藻類は節および節間細胞が一次的に配列した構造をしていること、節間細胞が非常に大きいので細胞内成分の分析が単一細胞でも可能であることなどからこの研究材料として適している。

蛍光色素 (FITC) で標識した物質を節間細胞の細胞質中に顕微注射し、隣接する節と節間細胞への標識物質の移動を蛍光顕微鏡で調べたところ、ミオグロビン (分子量約 20,000) や卵白アルブミン (分子量約 45,000) であっても数時間後には隣接細胞に移ることが認められた。隣接細胞の細胞質をしぼりだしゲル濾過によって調べたところ、隣接節間細胞中の FITC で標識された物質の分子量は注射されたもののそれと同じであった。また、隣接細胞に移ったエクオリン (分子量約 20,000) は、カルシウムに依存した発光能を保持していた。このことは、これらの巨大分子が分解されることなく、そのままの形で原形質連絡を通過したことを示している。これは、原形質連絡を通過できるものは分子量 1,000 程度以下であるというこれまでの常識をくつがえすものである。

2aA 12

ラン藻硝酸トランスロケーター欠損株における
フィコビリソームタンパク質の蓄積と窒素栄養

¹ 澤木弘道、杉山達夫 (名古屋大・農・農化)

LHCPや幾つかのC4酵素を始め機能的には付帯的と考えられる光合成遺伝子が、窒素により選択的に発現調節されることが明らかにされている。われわれは *Synechococcus* において窒素による選択的な発現調節を受ける光合成遺伝子を探索するために、機能的には LHCP に近いと目されるアンテナ色素フィコビリソームのタンパク質 (フィコシアニン) について解析を行った。その結果、野性株では無機窒素として硝酸塩、アンモニウムイオンに関わりなく、窒素栄養状態に応答しフィコシアニンの蓄積は選択的に変動した。このタンパク質の蓄積の変動は mRNA の変動をとめない、この調節が転写段階で制御されるものと判断された。

一方、硝酸トランスロケーター欠損株 M45⁽¹⁾ を用いて、窒素栄養の制限状態でのフィコシアニンの蓄積を調べた。M45 は硝酸塩を窒素源としたときは生育が制限される。10 mM、30 mM、65 mM KNO₃ のそれぞれの培地で、変異株におけるフィコシアニンの蓄積は窒素栄養に依存し野性株と同様に変化した。しかし、その mRNA 蓄積は窒素の栄養状態の低下にとめない見掛け上増加した。現在、この相反した現象について、タンパク質合成と分解の観点から検討を加えている。

(1) Omata T., Ohmori M., Arai N., and Ogawa T. (1989) PNAS 86, 6612-6616

2aB 01

キウリ下胚軸細胞壁の成長パラメータに対する成長物質の効果

○岡本 尚, 山田章代, 勝見允行¹ (横浜市大・文理
・生物, ¹国際基督教大・理・生物)

I A A の成長促進効果は、まづ細胞壁の展性 (Φ) を増大させ、そのために膨圧 (P) が減少して吸水が容易になるためと永年信じられてきた。ところがミトリスアゲの胚軸で、中堀等による P の直接連続測定 (1991) は、I A A によって成長速度が数倍に上昇するとき P が全く変化しないことを明らかにした。また岡本らによる導管圧ジャンプ法の開発によって、増加するのは Φ (1.6倍) だけではなく、実効膨圧 ($P - Y$) も 2.7倍に増大する事がわかった。 P が変化しない以上、これは今まで Green & Cummins (1974) 以来高等植物では不変と考えられてきた壁の臨界降伏圧 Y が I A A によって減少すると考えざるを得ない。これら従来常識を破る諸結果が、双子葉植物全体に通ずる一般法則であるか否かを検証するために、まづ成長生理の研究によく用いられるキウリ下胚軸で I A A の成長パラメータに対する効果を調べた。その結果この材料に於いても、I A A は Φ を 5 倍に増大させるだけでなく、実効膨圧 ($P - Y$) を 2.4 倍に増大させ、その結果成長速度が 120 倍に増加する事がわかった。

I A A の灌流開始後急速に上昇した成長速度は 2.5 時間目から下がり始めるが、新しい植物ホルモン、ブラシノライドの導管灌流で 2 時間前処理すると、速度はそのまま維持される。このときのパラメータの変化についても報告する。

2aB 02

成長する植物細胞壁に関する研究 1.

ポプラ培養細胞のキシログルカナーゼについて

○中村信吾、林 隆久、伊東隆夫 (京大木研)

キシログルカンは、成長する植物細胞壁中でセルロースミクロフィブリルに強固に結合し、壁にある程度の強さを与えている。キシログルカナーゼ (エンド-1,4- β -グルカナーゼ) は、一次壁内層面に存在し、オーキシンにより誘導され、キシログルカンを特異的に分解する。キシログルカナーゼによって部分的に分解されると、ミクロフィブリルのネットワークが弱められ、細胞壁のゆるみが誘導されることが示唆されている。細胞壁のゆるみを分子レベルで解明するために、キシログルカナーゼの分子細胞生物学的研究に着手した。

オーキシンを含む MS 培地で培養したポプラ細胞は、細胞質、壁、培地中にそれぞれグルカナーゼ活性をもつことが認められた。そこで、細胞壁と培地中のグルカナーゼをゲル濾過、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。ともにグルカナーゼは、キシログルカンを基質にしたとき、キシログルカンヘプタサッカライドによって活性化されることが示された。カルボキシメチルセルロースに対する親和性は、他の植物由来のエンド-1,4- β -グルカナーゼに比べて、ともに比較的強いことが認められた。

2aB 03

キシログルカンによるマイクロフィブリルの架橋構造

○馬場啓一, 林 隆久, 伊東隆夫, 曾根良昭¹, 三崎 旭¹

(京大・木研, ¹大阪市大・生活科学)

高等植物の一次細胞壁は、セルロースマイクロフィブリルをキシログルカンが架橋してネットワークを形成することで、その形状と堅さが保たれていると考えられている。キシログルカンがマイクロフィブリル間を架橋しているモデルはすでに提案されているが、実際の細胞壁中での両者の配置については明らかではない。今回われわれは、エンドウ上胚軸由来のキシログルカンとセルロースの複合体(細胞壁ゴースト)に抗キシログルカン抗体を作用させて、マイクロフィブリルネットワーク上におけるキシログルカン局在を電顕観察した。

抗キシログルカン抗体による標識は、マイクロフィブリルが交差している近辺に多く観察された。これら標識はフィブリル上よりもフィブリル間に多く認められた。このことは、キシログルカンがフィブリル同士を架橋していることを示している。キシログルカンを除いた細胞壁ゴーストにキシログルカンを *in vitro* で結合させ、複合体を再構成したものについては、抗体標識はフィブリル上のみに認められた。このことから、*in vitro*での複合体再構成では、キシログルカンはフィブリル同士を架橋するよりも、むしろフィブリルの表層を覆うように結合することが示唆された。

2aB 04

オリゴサッカライドによる細胞壁キシログルカナーゼの フィードバックアクチベーション

○林 隆久, 伊東隆夫(京大・木研)

植物細胞壁に強固に結合しているキシログルカナーゼ(エンド-1,4-β-グルカナーゼ)は、オーキシンにより誘導され、一次壁キシログルカンを分解し、セルロースマイクロフィブリルのネットワークを弱めて細胞壁にゆるみをもたらすことが示唆されている。このキシログルカナーゼは、分解産物であるキシログルカンオリゴサッカライドによって、非拮抗的に活性化され、重合度の高いオリゴサッカライドに強い親和性をもつ。

キシログルカン・セルロース複合体を基質に用いた場合、分解によって生じるキシログルカンオリゴサッカライドの濃度が高くなるにつれて、キシログルカナーゼが活性化され、セルロースマイクロフィブリルに強固に結合したキシログルカンが分解されていくことが認められた。活性化における、酵素1分子当たりのオリゴサッカライドの結合部位数は、平衡透析法により1.3と測定された。

キシログルカナーゼの活性化の機構の解析にサブサイト理論を導入した。基質に対する親和性が変わらないにもかかわらず、触媒中心活性(K_{cat})が増加するのは、酵素と基質のすべての結合定数の和が一定にもかかわらず、プロダクティブな結合様式の結合定数の和が相対的に高くなるためと推察した。

2aB 05

マンノオリゴ糖認識抗体を用いた免疫電顕によるグルコマンナン
のイネ種子細胞壁中への蓄積の品種・組織特異性の解析
o 賀来華江¹⁾、馬場啓一²⁾、伊東隆夫²⁾、渋谷直人¹⁾
(農水省 生物研¹⁾、京大 木研²⁾)

我々はこれまでに、特定の遺伝的背景をもったイネ品種群では、その胚乳細胞壁にグルコマンナンが大量に蓄積すること、さらにこの現象がイネ第9染色体上の特定の領域に存在する単一の優性遺伝子によって支配されていることを明らかにしてきた¹⁻³⁾。本講演では、この多糖に対する抗体を調製し、免疫電顕によりその品種・組織特異的発現を調べた結果を報告する。

[方法] β 1,4-結合マンノハクテオース (Man₆) と BSA をカップリングさせ、これをウサギに感作して抗血清を得た。この抗血清を Cello₄-Sepharose で吸収後、Man₄-Sepharose カラムに通し、吸着画分をグリソリン塩酸緩衝液 (pH 2.3) で溶出してマンノオリゴ糖認識抗体を得た。この抗体の特異性は ELISA 法を用いたアッセイ阻害実験により調べた。開花後7日目の藤坂5号 (グルコマンナン +) および荔支江 (グルコマンナン -) の種子の樹脂包埋切片を、マンノオリゴ糖認識抗体および金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体で処理した後、電顕観察を行った。

[結果] 精製マンノオリゴ糖認識抗体は、Man₄-Man₆ に対して高い親和性を示したが、セロオリゴ糖に対する親和性は極めて低かった。免疫電顕観察の結果、藤坂5号では胚乳部および糊粉層の細胞壁に金コロイドの沈着が認められたが、荔支江ではいずれの部位にも金コロイドの沈着は認められなかった。また、前者での金コロイドの沈着はマンノオリゴ糖により阻害された。これらの結果は、グルコマンナンが特定の品種の澱粉性胚乳および糊粉層細胞壁に蓄積していることを示している。

¹⁾ R. Zamorski ら、1991年度植物生理学会年会講演要旨、²⁾ 渋谷直人・R. Zamorski、1991年度農芸化学学会大会講演要旨、³⁾ 矢野昌裕ら、育種学会第80回講演会要旨。

2aB 06

酸生長と細胞壁の力学的性質

o 水野暁子、中堀 清¹⁾、加藤 潔²⁾ (日本福祉大、
¹⁾ 岡山大・理・生、²⁾ 名大・理・生)

植物の軸性器官の定常的な伸長生長は、 $\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = \Phi(P^i - Y)$ 、 $\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = L(\Delta\pi - P^i)$ の連立方程式で記述される。これまでに、導管圧ジャンプ法および膨圧測定法によって、オーキシン誘導生長に際しての、細胞壁の展性 Φ 、有効膨圧 $(P^i - Y)$ 、および膨圧 P^i の挙動が求められてきた (Nakahori et al. 1991)。同じ方法を用いて、酸生長におけるこれらのパラメーターの挙動を求め、オーキシン誘導生長の場合と比較した。

アルミナ懸濁液で表皮を abrade したミトリササゲ下胚軸伸長帯の軸片を導管灌流しながら、表皮側から pH 1 の塩酸水溶液のアエロゾルを与えた。1-2分後、軸片の生長は急速に促進され、この時、オーキシン誘導生長の場合と同様に、 Φ も $(P^i - Y)$ も増加した。一方、オーキシン誘導生長ではほとんど変化のなかった P^i (Nakahori et al. 1991) は、酸生長に際しては、著しく減少した。これは、オーキシンが表皮側プロトンポンプと同時に木部側プロトンポンプも活性化して (Ikoma & Okamoto 1988)、細胞壁の弛緩と同時に能動的吸水をも促進する (Katou & Furumoto 1986) のに対して、表皮側から与えたプロトンは、表皮細胞壁を弛緩させるが、プロトンポンプは活性化しないことによるものと考えられる。

Nakahori et al. (1991) Plant Cell Physiol. 32:121-129

Ikoma & Okamoto (1988) Plant Cell Physiol. 29:261-267

Katou & Furumoto (1986) Protoplasma 133:174-185

2aB 07

ニンジン細胞の分化状態によるペクチン様物質の差異

— 酢酸セルロース膜電気泳動による解析 —

○菊池 彰・佐藤 忍・藤伊 正 (筑波大・生物)

細胞壁多糖を酢酸セルロース膜電気泳動にかけ、酸性糖(トルイジンブルー染色)および全糖(Periodic Acid Schiff's reagent <PAS> 染色)の検出と定量を行った。ポリガラクトロン酸を泳動、染色した膜を画像解析にかけたところ、トルイジンブルー染色では 20 ng ~ 10 μg の、PAS 染色では 1 μg ~ 40 μg の範囲で定量的検出が可能であった。この手法を用いてニンジンの Non-embryogenic cell (NC)、Embryogenic cell (EC)、Somatic embryo (SE)、Seedling (SL)の 4 材料を用いて細胞壁多糖の解析を行った。ペクチン画分の酸性多糖においては、NC と EC でポリガラクトロン酸と同じ移動度のスポットが、SE ではポリガラクトロン酸近辺にスミアなスポットが、SL ではポリガラクトロン酸からペクチンの間の位置にスミアな染色がみられた。ヘミセルロース画分の酸性多糖には、ポリガラクトロン酸の位置に、NC、EC、SE、では 2 つの、SL では 1 つの、スポット検出され、そのパターンは各々に特異的であった。またペクチン、ヘミセルロースの両画分の中性多糖は EC >> NC = SE > SL の順で多く検出された。以上の結果から分化状態の異なる細胞ではその細胞壁多糖の組成に違いが存在することが示唆された。

2aB 08

コルヒチン処理した培養わた繊維壁の

マイクロフィブリル配向

○伊東隆夫(京大木研)、奥 恭行(三菱製紙)

Ovule culture により培養したわたの繊維は純粹のセルロースからなるが、コルヒチンを含む培地で生育させると異常な壁肥厚を示すことがわかり、わたの繊維の成長にともなう微小管配向の結果をふまえ、これの生成機構について考察した。

野外および人工気象室で生育したわた植物を用い、開花直後の胚珠を培養し、培養数日後にコルヒチンを加えた培地あるいは加えない培地で繊維をさらに培養し、1 から数日後に繊維の微小管の配列を蛍光抗体法で調べるとともに形成された壁構造を偏光顕微鏡、電顕超薄切片法ならびにレプリカ法により調べた。

野外で生育させたわたと人工気象室で生育させたわたの繊維の伸長は前者のほうが長く伸び、後者では早い時期に伸長が停止した。開花直後のわたの繊維では微小管はランダムで、その後繊維に直角方向に配列した。培養後 8 日経過すると、配向の揃った二次壁が堆積し始め、微小管は約 45° に、その後さらに約 20° と急な角度に向きを変えた。これら微小管の配向はいずれの場合も繊維壁のセルロースマイクロフィブリルの配向を反映していた。コルヒチン処理すると微小管は短くかつ数が減少し、一次壁形成中に処理すると方向性をもってモザイク状に肥厚した壁が形成され、二次壁形成開始時期に処理を開始すると一方向に部分的に肥厚した壁が形成された。これら異常な壁肥厚からマイクロフィブリルの堆積の仕組みを考察した。

2aB 09

キシログルカン鎖の「つなぎ換え反応」を触媒する
新規酵素の単離と反応機構の解析

○西谷和彦・富永るみ・吉野内美香・富田英津子
(鹿児島大学・教養部)

植物細胞壁はセルロース微繊維とマトリックスゲルとから成る。キシログルカンはマトリックスゲルを構成する主要な高分子で、セルロース微繊維間をつなぐ架橋構造として機能している。この架橋構造中のある種の変化が細胞壁の伸展性の制御機構において最も重要な過程であることを示す事実は過去10年の間にアズキをはじめ、様々な植物で明らかにされてきた。また、この構造変化には、なんらかの糖転移反応が関与するであろうと予想されている。しかしながら、キシログルカン鎖の転移反応を触媒するような酵素の存在は未だ実証されていない。そこで、私たちは、キシログルカン分子間の「つなぎ換え反応」を想定し、その反応を検出するために新しい方法を開発し、その検出法を用いて未知の酵素活性の探索と酵素の単離・精製を進めてきた。その結果、アズキ上胚軸アポプラスト液からキシログルカン鎖間の転移反応を触媒する新規酵素を単離することができた。その基質特異性及び酵素反応機構からエンド型キシログルカン転移酵素 (xyloglucan: xyloglucanotransferase, 略称 endo-xyloglucan transferase) と命名した。この酵素はSDS-PAGE (銀染色) 上で33 kDa付近に単一バンドを与える糖タンパク質である。また、末端標識キシログルカンを基質として用いた酵素反応機構の解析結果は、この新規酵素がキシログルカン架橋のつなぎ換え反応と同時に架橋構造の構築過程にも関与していることを示している。以上の結果から、この新規酵素は細胞壁の高次構造の構築過程において基幹酵素の一つとして機能していると考えられる。

2aB 10

光によるイネ幼葉鞘の成長阻害における細胞壁結合ジフェルラ酸の役割

○Kah-Siew Tan, 保尊隆享, 増田芳雄¹, 神阪盛一郎, (大阪市大・理・生物, ¹帝塚山短大・食品)

ジフェルラ酸仮説 (Fry 1979) によると、イネ科植物では、細胞壁中のアラビノキシランのアラビノース側鎖にエステル結合しているフェルラ酸がペルオキシダーゼによる酸化的カップリング反応を受け、生成したジフェルラ酸がアラビノキシラン分子間に架橋して細胞壁の伸展性を低下させると考えられる。光によってイネ幼葉鞘の伸長成長が阻害される時、この仮説が成り立つかどうか検討した。

暗所、水中で1日生育させたイネ (*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki) 芽生えに白色光 (5 W/m²) を照射すると、約1日のラグの後、幼葉鞘の成長が阻害された。この成長阻害にともなって、応力緩和法で測定される細胞壁の最小緩和時間及び緩和速度が大きくなり、伸展性 (strain/load) が低下した。したがって、白色光による成長阻害は、細胞壁が硬く伸びにくくなったため引き起こされたと考えられる。光照射は、セルロース及びヘミセルロース量には影響しなかった。一方、幼葉鞘当たり、単位長さ当たり、そしてアラビノース当たりのフェルラ酸、ジフェルラ酸量は成長とともに増加し、光はその増加を促進した。このような光によるフェルラ酸、ジフェルラ酸の蓄積と細胞壁の力学的な性質の変化との間には相関が認められた。以上の実験結果は、白色光によるイネ幼葉鞘の成長阻害が、ジフェルラ酸レベルの上昇による細胞壁伸展性の低下を介してもたらされることを示している。

2aB 11

アズキ上胚軸切片のオーキシシン誘導成長並びにガラクトサン分解に対するガラクトース結合レクチンの影響

保尊隆享、増田芳雄¹ (大阪市大・理・生物、¹帝塚山短大・食品)

オーキシシンは、細胞壁をゆるませて植物の伸長成長を促進すると考えられている。双子葉植物では、細胞壁のゆるみの原因となる壁構成多糖の変化として、キシログルカン、ガラクトサン、ポリガラクトツロナンの分解があげられる。我々は、キシログルカンを認識する抗体、レクチンを用い、この多糖の分解が確かにオーキシシンによる細胞壁のゆるみの原因となっていることを示した。しかし、他の多糖の貢献については明らかになっていない。本研究では、オーキシシン誘導成長におけるガラクトサン分解の役割を知るため、アズキ上胚軸切片におけるガラクトサン分解、細胞壁のゆるみ、そして伸長成長に対するガラクトース結合レクチンの影響を調べた。

実験に用いた数種のガラクトース/N-アセチルガラクトサミン結合レクチンのうち、*Bauhinia purpurea* 及び *Erythrina cristagalli* 由来レクチンは、in vivo、in vitro でのガラクトサンの分解を阻害した。しかし、これらは、オーキシシンによる細胞壁の力学的性質の変化には影響しなかった。また、いずれのレクチンも、オーキシシン誘導成長を阻害しなかった。レクチンにより細胞壁中でのガラクトサン分解を阻害しても、細胞壁の伸びやすさや伸長成長速度に変化が見られなかったことから、少なくともアズキ上胚軸では、ガラクトサンの分解はオーキシシンによる伸長成長誘導の直接的な原因とはなっていないと考えられる。

2aB 12

エンドウ莖成長の光による抑制機構：細胞壁多糖に対する影響

宮本健助・上田純一・保尊隆享、神阪盛一郎¹・増田芳雄²
(大阪府立大・総合科学、¹大阪市大・理・生物、²帝塚山短大・食品科学)

光 (白色蛍光灯: 5 W/m²) による黄化エンドウ芽生えの莖成長抑制機構を明らかにするために、細胞の吸水成長を規定する細胞壁の力学的性質が調べられた。その結果、光は表皮組織ではなく、内部組織の細胞壁を硬くし内部組織の吸水力を低下させ、それによって組織張力を低下させ莖成長を抑制することがわかった。そこで、光が内部組織の細胞壁の力学的性質を変化させる機構を明らかにするために、細胞壁構成多糖に対する光の影響を調べた。

5日齢の黄化エンドウ芽生えに6時間光を照射し、芽生えの莖伸長領域を切り出し、表皮組織と内部組織に分け、常法に従いペクチン、ヘミセルロースI、IIおよびセルロースに分画した。光照射したものと暗所で培養したものとでは、内部組織におけるこれらの分画の組成比に大きな違いは認められなかった。また、各分画の中性糖組成にも差は認められなかった。しかしながら、ヘミセルロースII画分の分子量分布を調べた結果、光照射によってその平均分子量が増大すること、さらにこの増大がキシログルカンの平均分子量の増加に基づくことが明かとなった。この光による分子量の変化は、表皮組織では認められなかった。以上の結果から、光は内部組織のキシログルカンの分子量を変化させることによって細胞壁の力学的性質に影響し、組織張力を低下させ、莖成長を抑制するものと考えられる。

2aC 01

イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンにおけるサブユニット分子の多様性について

○小川雅広、佐藤光¹ (京大・食研、¹九大・農・遺伝子資源)

デンプン性胚乳のProtein body-IIに集積するグルテリンの2つのサブユニット(40 kDaの酸性サブユニット: α -gluと20 kDaの塩基性サブユニット: β -glu)は電気泳動的に分子多様性を示すがその詳細については明かでない。今回これらの分子多様性がアジア栽培イネ(*Oryza sativa* L.)の日本型イネとインド型イネにおいて特徴があること、さらに両サブユニットに変異が存在することを見いだしたので報告する。

材料には水稲品種日本型「金南風」とインド型「IR36」、そして九州大学保存系統を用いた。SDS-PAGEでは α -gluは3つ(α -1, α -2, α -3)、 β -gluは2つ(β -1と β -2)に分離するがIEFでは α -gluは10-12, β -gluは9-10のバンドに分離した。特徴は α -3に見いだされ、日本型イネはインド型イネに比べてサイズが小さいことが判った。一方、 β -gluには差異は見いだせなかった。IEFのバンドパターンの特徴は α -gluのバンド7とバンド8で見られ、日本型ではバンド8が、インド型ではバンド7が欠損し、これらのバンドが α -2を構成するポリペプチドであることからIEFでしか見いだせない特徴である事が判った。さらに α -2と α -3を構成するポリペプチドの存在量で両者に違いがあったが、 α -1を構成するポリペプチド数と存在量は日本型とインド型で同一であった。 β -gluではバンドの濃淡の差以外の顕著な差異はなかった。九州大学保存系統のグルテリンに関する変異を捜したところ α -1の変異はほとんど見出すことが出来なかったが、 α -2と α -3の変異が多く存在することが判明した。以上の結果からイネの種分化の過程で種子貯蔵タンパク質のグルテリンの質的変異も同時に起こっているものと結論した。

2aC 02

イネ α -アミラーゼアイソザイムの解析

○下司直美¹、光永伸一郎、Pierdomenico Perata、
赤沢堯、山口淳二 (名大・農・農芸化学¹、生化学制御)

【目的】 α -アミラーゼは、デンプン性穀物種子の発芽時において誘導される酵素として広く研究されている。遺伝子の構造解析の結果から、イネには約10種類の α -アミラーゼ遺伝子が存在することが明らかとなっている。それら遺伝子群とその産物である各々のアイソザイムの特性を明かにすることを目的とした。

【方法】 酵母遺伝子発現系を用いたイネ α -アミラーゼcDNA (pOS103, pOS137)の発現産物、イネ液体培養細胞およびイネ各組織由来の細胞抽出液を用いて、等電点電気泳動により各種アイソザイムを分離し、活性染色・イムノプロット・ConA-peroxidase染色により、 α -アミラーゼ活性・ α -アミラーゼ抗体との反応性・糖タンパク質の検出を行なった。

【結果】 1) イネの α -アミラーゼアイソザイムは主に6種類(バンド0, I, II, III, IV, V)に分類された。2) 酵母遺伝子発現系を用いた遺伝子産物の同定の結果、このうちバンドIは遺伝子*RAmy1A*の産物、またバンドVは遺伝子*RAmy3D*の産物と推定された。3) α -アミラーゼ抗体(抗バンドI)は他のアイソザイムと殆ど反応性を示さない。4) 発芽種子ではバンドI、液体培養細胞ではバンドII, III, IV, Vのアイソザイムが多量に存在した。これらの詳細な特性について報告する。

2aC 03

コマユミの葉からのUDP-グルコース：
フラボノール α -グルコシルトランスフェラーゼについて
* 楊志慶、石倉成行（熊本大・理・生物科学）

フラボノールの配糖体化を触媒する酵素は、これまでに多くの植物から報告されているが、そのほとんどはグルコースまたはラムノースの転移酵素である。今回、私達はニシキギ科植物のコマユミ (*Euonymus alatus* f. *ciliato-dentatus*) の葉から、ケンフェロールの配糖体化反応を触媒する α -キシロシルトランスフェラーゼ (F3XT) と α -グルコシルトランスフェラーゼ (FGT) の複数の酵素活性を見出すことができた。ここでは特に FGT を中心に、種々の性質について報告する。

コマユミの幼葉からの酵素抽出液は、硫酸分画、Sephadex G-100 及び DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーにより、四つのピークに分かれて、F3XT は一つの画分に、FGT は F3GT-1, F3GT-2 及び F7GT の三つの画分に分離できた。更に、Ultrogel AcA 44 カラムクロマトグラフィーにより、3種類の FGT は、それぞれ粗酵素抽出液の約 50.1, 94.8 及び 139.9 倍にまで純化できた。それらの FGT の分子量は、ゲル濾過法と電気泳動によりいずれも約 48 KDa と推定され、ロトフォア等電点電気泳動により pI は約 5.0 であることが判明し、F3XT の pI 6.1 と明らかに異なる。そこで、今回は特に3種類の FGT について詳しく調べた。F3GT-1, F3GT-2 及び F7GT の三つの酵素の最適 pH は、いずれもトリス-塩酸緩衝液では 7.5 であった。また、それらの活性は 1 mM の Cu^{2+} 及び Zn^{2+} により、著しく阻害された。1 mM のバラクロロ安息香酸第二水銀 (PCMB) 等の SH 基試薬によっても強く阻害されるが、2-メルカプトエタノール (14 mM) の同時添加により、その阻害を解除できたことから、酵素の活性部位に SH 基が関与していることが示唆される。Km 値を調べると、F3GT-1, F3GT-2 及び F7GT は UDP-glucose に対してはそれぞれ 3.7, 5.6, 2.0 μM となり、kaempferol に対しては 0.7, 7.1, 11.1 μM となり、いずれも基質に対して高い親和性を示す。更にフラボノール、フラボノール配糖体及びフラボノンの各種誘導体を基質として調べたところ、F3GT-1 と F3GT-2 はフラボノールの3位の配糖体化に特異的であり、7位にすでに糖残基を結合しているものには3位への glucose を受け入れることができないことが判った。そして、それぞれの酵素の反応生成物を調べた結果から F3GT-1 と F3GT-2 はフラボノール 3- α -グルコシルトランスフェラーゼ、F7GT は 7- α -グルコシルトランスフェラーゼであることが判った。

2aC 04

ヒャクニチソウ管状要素分化過程で誘導される
ペルオキシダーゼアイソザイムの解析
* 佐藤 康、杉山宗隆、駒嶺 穆、福田裕穂
(東北大・理・生物)

リグニン合成の最終段階はペルオキシダーゼにより触媒されると考えられているが、生体内に多数存在するペルオキシダーゼアイソザイムのうち、どのアイソザイムがリグニン合成に関与しているかは未だに明らかではない。ヒャクニチソウ管状要素分化実験系において、リグニン化に伴い細胞壁に存在するイオン結合性ペルオキシダーゼアイソザイムのパターンが変化する事が示されている。そこで、本報告ではまず、phenylalanine ammonia-lyaseの阻害剤である L- α -aminoxy- β -phenyl propionic acid 及び 2-aminoindan-2-phosphoric acid で処理する事により、リグニン合成を阻害した時のペルオキシダーゼアイソザイムパターンの変動を調べた。その結果、培地中のペルオキシダーゼ活性は低下し、イオン結合性ペルオキシダーゼ活性は上昇し、特にアイソザイムのうち P5 の活性が著しく上昇した。次にリグニン前駆体を加えリグニン沈着を回復させたところ、これらの変動は打ち消された。続いて、リグニン合成に重要だと考えられる P5 の単離を試みた。細胞壁より塩抽出される画分を CM-Sephadex を用いて 10mM Na-acetate buffer (pH 5.0) で 0~0.5M NaCl の濃度勾配で溶出し、その後 Cathodic Native-PAGE を行う事により、P5 を部分精製した。以上の結果をもとにリグニン沈着と細胞壁ペルオキシダーゼアイソザイムの関連を考察する。

2aC 05

チャアスコルビン酸ペルオキシダーゼと酵母チトクロム
cペルオキシダーゼのアミノ酸配列の相同性
陳功祥、^o佐野智、浅田浩二（京都大・食研）

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）は、植物の葉やその他の組織で発生するH₂O₂の消去に機能している。チャ葉APXの内、葉緑体に局在し光合成に伴って発生するH₂O₂を消去するアイソザイム（APXII）を精製し、リジルエンドペプチダーゼによって消化した。これを逆相HPLCによって精製し、16のペプチド断片についてアミノ酸分析およびアミノ酸配列の決定を行った。配列を決定したのは198残基であり、これはチャAPXIIの分子量、アミノ酸分析の結果から全体の64%に相当する。これらのペプチド断片と他のタンパク質との相同性を検索した結果、ヘムに対する第5リガンドであるproximal His周辺のアミノ酸配列と非常に相同性の高い断片があった。また、全体的にAPXのペプチド断片には、植物のグアヤコールペルオキシダーゼ（GPX）に対してよりも、酵母ミトコンドリアのチトクロムcペルオキシダーゼ（CCP）に対する相同性の方が高いものが多かった。またAPX断片の内3つにトリオースリン酸イソメラーゼと高い相同性が見られた。

アミノ酸配列や酵素的性質、分子的性質などから考えて、H₂O₂消去に機能するペルオキシダーゼのAPXとCCPは電子供与体の違いはあるが、同じ祖先タンパク質に由来すると考えられる。また、リグニンの生合成などに関与するGPXはAPX、CCPとヘムペルオキシダーゼ分子進化の初期に分岐したと考えられる。

2aC 06

ダイコンの根の ascorbate peroxidase

2. 性質

^o大屋 俊英¹、森村 洋子²、猪川 倫好（筑波大・生物、¹秋田県生物資源センター、²恵泉短大）

葉緑体の ascorbate peroxidase (APO) については浅田らの詳細な報告があり、光合成の際に作られる過酸化水素の消去に働くとされている。我々は根におけるAPOの研究からダイコンの根の酵素を高い純度で精製した（植物生理学会 1990）。今回は本酵素のいくつかの性質について報告する。

①免疫学的性質：ウサギに5回に分けてAPOを皮下注射して抗血清を得た。この抗血清はダイコンの葉のAPOとも強い親和性を示したが、グアヤコール型のペルオキシダーゼ(PO)には全く応答しなかった。また、市販のセイヨウワサビPO抗体はダイコンPOと反応するが、APOとは全く反応せず、APOとPOの抗原決定基はかなり異なるようである。さらに、抗APO抗血清はコマツナ根のAPOおよびトウモロコシの子葉鞘のヘムタンパク質（小柴、植物学会1991）と応答した。ハウレンソウ葉APOに対するモノクローン抗体8種（Saji et al. 1991）との応答を調べたところ、AP1、AP3、AP8と強く反応した。

②アミノ酸シーケンス：N末端の20残基のアミノ酸シーケンスを調べたところ、ハウレンソウやシロイヌナズナのAPOとは類似性があったが、POとは共通するところがなく、チャ葉のAPOとも類似性がなかった。アミノ酸組成の比較からは、HRPともチャ葉APOとも類縁関係が弱い事が示された。

2aC 07

NAD-ME型C₄植物キビのアスパラギン酸アミノ基転移酵素アイソザイムの性状と発現の解析
*谷口光隆、岡田健一、杉山達夫
(名古屋大・農・農化)

NAD-ME型C₄植物であるキビには、3種のアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)が存在する。このうち葉肉細胞のサイトソルあるいは維管束鞘細胞のミトコンドリアに局在する2種のアイソザイムは、光誘導的に葉組織中で多量に発現蓄積し、C₄光合成に関与している。一方、第3のAspATアイソザイムは光誘導を受けず、緑葉中での蓄積量も前2者に比べて少ないことから、C₄経路の進化以前から存在し、アミノ酸代謝等に関与するAspATと考えられ、いわばC₃型AspATといえる。本研究では、キビ緑葉よりこれら3種のアイソザイムの精製を行い、アイソザイム相互の性状を比較することを目指している。

緑葉抽出物を硫酸分画後、DE-32クロマトグラフィーにより3種のアイソザイムを分離した。さらにSephacryl S-200、Phenyl-Sepharose、ハイドロキシアパタイト等のカラムクロマトグラフィーを行いアイソザイムを精製した。現在、それらの酵素化学的性質及び物理化学的性質を比較検討中である。

また、C₄型AspATアイソザイムの発現様式を解析した。黄化葉の光照射にともしない両アイソザイムの活性及びタンパク質量は同じ様な増加パターンを示したが、mRNA蓄積パターンには違いがみられた。この結果を他の光合成タンパク質と比較しながら考察する予定である。

2aC 08

ケツルアズキからのフラボノール 0-グリコシルトランスフェラーゼの検出と性質
*間藤正美、石倉成行 (熊本大・理・生物科学)

ケツルアズキ(*Vigna mungo*)のフラボノール配糖体として、ロビニンとケンフェロール 3-O-ルチノシドの存在が報告されている(Ishikura et al.1981)。本研究では、これらのフラボノールの3-位の配糖体化に関与するフラボノール 3-O-グリコシルトランスフェラーゼについて調べた。その結果、実生から抽出した酵素はケンフェロールをアストラガリン(ケンフェロール 3-O-グルコシド)に変換するUDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase(F3GT)活性とケンフェロールをトリフオリン(ケンフェロール 3-O-ガラクトシド)に変換するUDP-galactose: flavonol 3-O-galactosyltransferase(F3GaT)活性を示した。F3GTとF3GaTの分子量はいずれも約43kDaであった。硫酸分画及びクロマトフォーカシングによる精製で、F3GTは約18倍、F3GaTは約275倍にまで純化された。最適pHは両酵素ともに7.5~8.0であった。F3GTのケンフェロール及びケルセチンに対するK_m値はそれぞれ0.67μMと0.77μMで、UDP-グルコースに対して1.67mMであった。F3GaTのケンフェロール及びケルセチンに対するK_m値は0.40μMと0.42μMで、UDP-ガラクトースに対しては125μMであった。F3GT及びF3GaTのpIはそれぞれ6.1と5.1で両酵素の活性部位にSH基が関与しているとみられ、2価の金属イオンは阻害的である。両酵素ともに3-位や7-位に糖の付いていないフラボノールに対して高い活性を示した。

*牧 泰史、小山 和成、伊藤 寿、田中 歩、和田 明¹、
辻 英夫（京大・理・植物、¹京大・理・物理）

我々は、オオムギの細胞質リボソームを構成する蛋白質約90個のうち5個が黄化組織に特異的に存在し、11個が緑葉組織に特異的に存在することを明らかにしてきた。そこで今回は、(1)発育段階に対して特異的にみられるこれらのリボソーム蛋白質(PSP)のうち、緑葉に特異的なPSPが黄化組織中でも会合していない状態ですでに存在しているか、(2)リボソーム蛋白質構成の変化は可逆的であるかという点について調べたので報告する。

暗所または明暗周期下で6日間育てたオオムギの第一葉を破碎し、3,000 x g、10分間遠心したペレットを不溶性画分とした。このときの上清を 1 Mショ糖クッションに乗せ 100,000 x g、14時間遠心して、その上清を可溶性画分とし、ペレットをショ糖密度勾配遠心で精製したものを細胞質リボソーム画分とした。これらの画分から蛋白質を抽出し、ラジカルフリー高還元性ポリアクリルアミドゲル二次電気泳動法により蛋白質構成を調べた。その結果、緑葉に特異的なPSPは黄化葉のいずれの画分にもみられなかった。このことは、緑葉に特異的なPSPは緑化過程で新たに合成されることを示している。また、黄化葉に24時間光照射するとリボソームの蛋白質構成は緑葉に近くなるが、これを再び暗所で54時間インキュベートしても黄化葉のPSPは出現しなかった。このことより、緑化過程におけるリボソーム蛋白質構成の変化は不可逆的なものと思われる。一方、黄化葉に3時間光照射した段階のリボソームの蛋白質構成はまだ黄化葉と同じ状態のままであったが、その後再び暗所に戻しても緑葉と同じ構成へと変わった。このことは、光によって引金が引かれると、リボソームの蛋白質構成の変化は光がなくても進行することを示唆している。

2aC 10

テンサイ根の肥大に伴って発現するタンパク質について

○池田義友・水江由佳・大橋伸一・増田宏志
(帯畜大・生資化)

テンサイ根はその肥大に伴いショ糖を多量に蓄積するが、その肥大過程で酸性インベルターゼが消失し、アルカリ性インベルターゼが出現する。このように根の肥大はこの他にも著しい代謝変化をもたらすものと考えられる。そこで今回はテンサイ根の肥大に伴って発現する2種のタンパク質を選び、それらを精製し、性質を検討したので報告する。

テンサイ根は肥大すると同時にショ糖の蓄積を開始する。一方、各生育期の根の可溶性タンパク質を塩析後、DEAE-cellulose chromatographyし、その各フラクションをSDS-PAGEに供するという方法で分析した。その結果、生重量あたりのタンパク質パターンはまだ肥大していない時期では少なく、次に肥大が始まり、盛んになる時期では多くのタンパク質が新しく出現し、それぞれが量的に多くなった。更に、肥大とショ糖蓄積が停止する時期ではそれぞれのタンパク質は低下したり、消失する。そのようなタンパク質のうち2種類のタンパク質(P-39、P-24)を選び精製し、それらに対する特異抗体を産生した。2種類のタンパク質とも根の肥大と相関があった。P-39はニンジンやタマネギにも存在した。一方、ビートの幼葉切片から誘導した懸濁培養細胞の可溶性タンパク質はSDS-PAGEでのパターンで肥大の盛んな根のそれと似たパターンを示し、P-39、P-24が存在した。

2aC 11

イネ・糊粉層細胞におけるカルボキシペプチダーゼ遺伝子の発現

・鷲尾健司、石川 鏡 (北大・理・植物)

穀類植物の発芽種子には酵素学的特性の異なる5つのカルボキシペプチダーゼが存在することが知られている。II型及び、プロリルエクソペプチダーゼであるIV型とV型カルボキシペプチダーゼは、乾燥種子において既にその活性が検出されるため種子発芽過程に合成されると考えられている。I型については発芽過程後期に活性が上昇してくるが、mRNAに特異的なプローブを用いたノーザン法によりその合成部位は発芽胚、特に胚盤に限定されていることが示されている。残りのIII型はI型と同様に発芽過程後期に発現してくるがその由来は不明であった。近年、オオムギの精製酵素より直接決定されたIII型カルボキシペプチダーゼの1次構造は、既にコムギにおいてジベレリン酸誘導性遺伝子の産物として同定されていたカルボキシペプチダーゼ様のタンパク質と極めて類似したものであった。コムギ遺伝子の相同物として単離されたイネ・III型カルボキシペプチダーゼ遺伝子は、ゲノム内でユニークに存在しており、発芽種子においては糊粉層を含む胚乳組織での発現が顕著である。そのプロモーター領域にはジベレリン酸に呼応してエンハンサー様の作用を示す pyrimidine box と呼ばれる配列が存在していることから、このクラスのカルボキシペプチダーゼは穀類種子の発芽過程において糊粉層特異的にジベレリン酸による発現制御を受けているものと思われる。

2aC 12

カボチャ傷害誘導ACC合成酵素機能ドメインの解析

○小野鉄雄、森仁志¹、山崎健一、今関英雅 (名大農・
生化学制御 基生研¹・情報制御)

高等植物におけるエチレンの生成速度を調節しているACC合成酵素の機能ドメインの解析をおこなった。ACC合成酵素については、(1)活性を保った状態でC末端側が部分分解される。(2)活性にPLPを要求するといった特徴が知られている。(1)についてはどの程度までC末端側が欠失しても活性を保持するか(2)については一次構造からPLPとの結合が予想されるリジン残基は活性中心であるのかという問題を調べた。カボチャ果実傷害誘導ACC合成酵素 cDNA は大腸菌中で活性のある酵素を発現するので、cDNA の変異体を導入した大腸菌の粗抽出液中の酵素活性を比較測定した。その結果、酵素のC末端部を順次欠失すると一時活性の有意の上昇がみられた。また60アミノ酸以上欠失すると活性は完全に失われた。さらにリジンに部位特異的な変異を導入した酵素について現在解析を行っている。

2aD 01

植物の TBP (TATA ボックス結合性蛋白)の機能

武田 穰、広川秀夫^{*}、今関英雅、○山崎健一 (名古屋大学農学部・生化学制御、*上智大学・生命科学研究所)

クローン化された *Arabidopsis thaliana* 由来の TBP cDNA を大腸菌発現ベクターに挿入したプラスミド (Gasch et al, Nature, 1990) を用いて TBP 蛋白を大腸菌内で大量生産し、DEAE-セルロース、P-セルロース、TATA ボックス・アフィニティーカラムを用いて精製し、次に、これに対する抗体を作製した。また、インタクトな TBP を植物体から調製するために、イネ胚芽、小麦胚芽の核抽出液を TATA ボックス・アフィニティーカラムにかけ、結合画分を得た。これらの TATA 配列結合画分を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースフィルター上にプロット後、上記の抗体を作用させたところ、各々のレーンに一本ずつのバンド (分子量 25 kDa) が観察された。このようなことから、植物の核内に一般的に TBP が存在することが示唆される。また、ヒト TBP を熱失活させた HeLa の試験管内転写系に *Arabidopsis* の TBP を補って、その転写における生物活性を検討したところ、ヒト TBP と置換して転写開始活性を回復させることが分かった。さらに、この蛋白を TATA ボックスを含む DNA 断片に結合させ、免疫電顕を行ったところ、TBP が DNA を折り曲げる活性を持っていることが分かり、その折れ曲がった位置に結合している構造体が観察された。現在、この構造体の存在を生化学的に証明する為の研究を行っているところである。

2aD 02

イネ胚芽核抽出液を用いた *in vitro* 転写系の開発

○椋本藤夫、広瀬進¹、今関英雅、山崎健一 (名大・農
・生化学制御、¹遺伝研・遺伝情報)

遺伝子の転写制御機構の研究において、*in vitro* 転写系を用いた観察が我々に多くの知見を与えていることは、動物、酵母等の例からも明かであるが、植物の分野においては、*in vitro* 転写系による研究の例はわずかである。本研究では、植物遺伝子の転写制御機構を生化学的に証明することを目的として、イネ胚芽からの核抽出液を用いて *in vitro* 転写系を作成し、その至適条件の検討を行なった。

次にイネ胚芽抽出液の転写装置が TATA 配列に依存した転写開始を示すかどうかを検定するために、TATA 配列に一塩基置換をおこさせた植物のプロモーターをもつ転写鑄型を 23 種類作製した。これらのプロモーターからの転写開始効率をイネの *in vitro* 転写系で調べるための予備実験として、① HeLa の *in vitro* 転写系、また② TFII D (TATA 配列結合性タンパク質) のみを含まない HeLa の系に植物 (シロイナズナ) の TFII D を加えた再構成の系を用いて転写開始効率を比較した。その結果、プロモーターの活性は、置換された塩基の種類と置換のおきた位置に影響されることが分かった。また① HeLa の系、② 植物の TFII D を加えた再構成系のどちらの系においてもプロモーター認識パターンは類似していた。現在、イネ胚芽核抽出液を用いてプロモーター認識パターンを検討中である。

森 仁志、今関 英雅¹ (基生研、¹名古屋大、農)

エチレン生合成を調節しているACC合成酵素は、傷害等のストレスや、オーキシンの作用によって、あるいは果実の追熟時に誘導され、それぞれの刺激特異的に異なるアイソザイム(傷害誘導型:W型、オーキシン誘導型:A型、追熟誘導型:R型)が発現する。これまでに明らかになっているACC合成酵素のアミノ酸一次構造を比較した結果、お互いには60%前後の類似性であるが、活性部位を含めよく保存されたアミノ酸配列領域が7つ見いだされ、酵素活性の発現に必要な領域であると推測される。一方、カボチャW型酵素の抗体はトマトW型酵素と反応するが、カボチャA型酵素とは反応しないという知見から、それぞれのアイソザイムグループに特異的な一次構造が存在する可能性が示唆されている。このことを明らかにするためには、それぞれのアイソザイムグループごとに複数の全長鎖cDNAクローンを単離し、アミノ酸配列を比較する必要がある。そこで前述のアミノ酸配列領域のうち、それに対する塩基配列もよく保存されている領域を選び、PCR法を用いて未報告のACC合成酵素のcDNAクローニングを試みた。現在、アボカド果実(W&R型)、トマト(A型3種)、ヤエナリ(A型)、アラビドプシス(A型)下胚軸から、PCR-cDNA断片を得ている。これらをプローブとして全長鎖クローンを単離して、アミノ酸配列を比較、考察する。

2aD 04

エチレン誘導性アズキ酸性キチナーゼ、
塩基性パーオキシダーゼ遺伝子の単離

山口雄記¹、森仁志²、山崎健一¹、今関英雅^{1,2}

(名大農・生化学制御¹、基生研・情報制御²)

我々はアズキ初生葉のエチレンによって誘導されるクラスⅢ酸性キチナーゼ、塩基性パーオキシダーゼのcDNAの単離と塩基配列決定をすると共にそれらの発現の解析を行ってきた。今回、発現制御を解明するため、両遺伝子の構造を決定した。単離されたクローンは酸性キチナーゼ5つ、塩基性パーオキシダーゼ2つであり、各々同一の遺伝子を含んでいると推定された。クローンDNAとゲノミックDNAとのサザン解析から両遺伝子は各々ゲノム上で単一の遺伝子と推定された。塩基性パーオキシダーゼ遺伝子は3つのエクソンと2つのイントロンから、酸性キチナーゼ遺伝子は1つのエクソンから構成されていた。パーオキシダーゼ遺伝子のイントロンはトマトのスペリン化に関わるパーオキシダーゼ遺伝子のもとの数と位置が一致した。両遺伝子の5'上流域には各々数十塩基からなる繰り返り配列が存在していた。両遺伝子の5'上流域にはタバコ・キチナーゼ等の遺伝子上流に存在するエチレン応答要素'TAAPuAGCCGCC'は存在しなかった。しかしアズキ両遺伝子に共通して存在する数種の配列が存在した。現在、感染・エリクターによる発現誘導について解析中である。

2aD 05

ナタマメ種子タンパク質遺伝子：5'-制御領域の解析

°山内大輔、山本純子、南川隆雄（都立大・理・生物）

ナタマメ (*Canavalia gladiata*) の主要な種子タンパク質であるコンカナバリン A (Con A) およびカナバリン遺伝子の種子形成期特異的な発現に関わるシス領域の同定と上流域に結合するトランス作用因子の検索を試みた。

5'上流 -734 bp までの領域を含むカナバリン遺伝子をタバコに導入したところ、得られた形質転換体の種子中でカナバリンの蓄積が認められ、この配列中に種子特異的な発現に関わるシス領域があると推定された。一方、Con A 遺伝子についてはその 5'上流域と β -グルクロニダーゼ遺伝子との融合遺伝子をタバコに導入した。その結果、Con A 遺伝子の -1016 から -603 の領域に種子特異的な発現に関わるシス領域が存在することがわかった。Con A 遺伝子およびカナバリン遺伝子の両方の 5'上流域に結合する核タンパク質として CaBP1 が見出されている（日本植物学会第 56 回大会）。カナバリン遺伝子における CaBP1 結合配列は 6 ヶ所に及び、それらには AT が 17bp 以上連続しているという特徴がみられたが、Con A 遺伝子の上流 -602 までの領域にも AT が 15 bp 以上連続する配列が 9 ヶ所含まれており、それらに CaBP1 が結合すると予想された。以上のことより、Con A 遺伝子については CaBP1 結合配列を含む 5'上流 -602 までの領域は種子特異的な転写には不十分で、-1016 までの領域が必要であることがわかった。

2aD 06

ケツルアズキの α -アミラーゼ遺伝子の構造

°竹内一、山内大輔、南川隆雄（都立大・理・生物）

ケツルアズキ (*Vigna mungo*) 種子は、子葉に蓄えていたデンプンを発芽期に分解し炭素源として利用する。このため発芽期の子葉では α -アミラーゼの活性が上昇する。この酵素活性の発現はノーザンブロット分析の結果から mRNA レベルで調節されていると推定された。また、 α -アミラーゼ遺伝子はゲノムサザンブロット分析により 1 コピー存在すると予想された。そこで α -アミラーゼ遺伝子の構造を調べるために PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いてその単離を行った。

α -アミラーゼ cDNA の塩基配列をもとにして作製したプライマーを用いて PCR を行ったところ、約 2200 bp の断片の増幅がみられた。サザンブロット分析の結果、この断片は α -アミラーゼ cDNA とハイブリダイズすることがわかったので、これは α -アミラーゼ遺伝子のイントロンを含む転写領域であると考えられる。

また転写領域の 5'上流域の塩基配列を決定するために IPCR (Inverse PCR) 法によるゲノムウォーキングを行い、転写開始点の 5'上流域約 700 bp の断片を単離した。この断片をプラスミドベクター pUC118 にサブクローニングし、塩基配列を決定した。

2aD 07

光合成型と非光合成型フェレドキシンをコードする遺伝子の構造比較

○中野亮史、木股洋子、米倉圭子、長谷俊治（名大・農化）

トウモロコシに存在するフェレドキシン (Fd) イソ蛋白質 (FdI-FdIV) は、一次構造、電子伝達特性、及び遺伝子の発現様式等から光合成型 (FdI, FdII) と非光合成型 (FdIII, FdIV) に大別できることをこれまでに明らかにした。光合成型FdIは葉器官特異的に発現し、顕著な光誘導を受けるが、一方、非光合成FdIIIの発現は根や中はい軸でも起こり、光に応答しない。この遺伝子発現の相違を解明する第一段階として、すでに構造が判明しているFdI遺伝子に加えて、今回は、非光合成型であるFdIII遺伝子の構造を初めて決定するとともに、両遺伝子のコピー数や座の比較解析も行なった。FdIIIの遺伝子は、転写開始点下流と翻訳開始点上流の間に約300bpの繰り返し配列を持つ3kbのイントロンが存在することが、FdIや他の植物由来の光合成型Fdの遺伝子とは大きく異なる点であった。プロモーター領域には両型のFd遺伝子の特徴付ける明確な差異は今のところ見当たらない。FdIとFdIIIの3'非翻訳領域や上記のイントロン部分を特異プローブとして、2種のインブレットとそれらのF1ハイブリッドの核DNAのサザン解析を行ない、FdIとFdIII遺伝子はゲノムあたり1コピーであり、イントロン領域は両インブレットともFdIII遺伝子にのみ存在することを確認した。また、F2ハイブリッドを用いたRFLP解析からは、FdIとFdIII遺伝子の連鎖はないと推定した。このRFLP解析の途上、FdIII遺伝子近傍で高頻度でDNAの構造変化が起こる領域があることを示唆する結果も得た。

2aD 08

トウモロコシ・フェレドキシン-NADP⁺還元酵素の遺伝子発現

村本郁子、松村智裕、榊原均、長谷俊治（名大・農化）

フェレドキシン-NADP⁺還元酵素 (FNR) の一般的な生理機能は、葉緑体電子伝達系からフェレドキシン (Fd) を介して電子を受け取り、NADP⁺を光還元することである。しかし、最近、国内外の研究グループにより、根のような非光合成器官にも葉のFNRとは異なる分子種が存在することが報告され、光合成系と直接かかわりを持たないこの分子種の構造や機能が注目されている。われわれはトウモロコシを材料として、葉器官特異的でしかも光誘導の発現様式をもつ光合成型Fdと、非光合成器官にも構成的に発現する非光合成型Fdの存在と特性を蛋白質や遺伝子レベルで明らかにした¹⁻³⁾。FNR分子種とこれらのFdとの生理的対応関係を明らかにすることが、非光合成器官での電子伝達機構を理解するためには急務であると考え、今回、葉と根より分別調製したPolyA⁺ RNAより作製したcDNAライブラリーから、それぞれFNR遺伝子を単離した。両者の制限酵素サイトは異なるけれども、塩基配列や推定アミノ酸配列には構造既知の他の植物由来の葉FNRとの明確な相同性が認められている。目下、全構造の決定とそれぞれの遺伝子に対する特異プローブを用いたノーザン解析を行ないつつあり、今年会では光合成と非光合成器官におけるFNRの遺伝子発現を、Fdのそれと比較対応させながら考察する予定でいる。

文献 ¹⁾Hase et al. (1991) Plant Physiol. 96, 77. ²⁾Suzuki et al. (1991) Plant Physiol. 97, 375. ³⁾Hase et al. (1991) Plant Physiol. 97, 1395.

2aD 09

トランスジェニックアラビドプシスをを用いたニチニチソウ
S期特異的遺伝子 (*cyc07*) の組織特異的発現の解析
○佐藤 勉・伊藤 正樹・駒嶺 穆・福田 裕徳 (東北大・
理・生物)

演者らの研究室では、ニチニチソウの細胞周期S期特異的に発現する遺伝子*cyc07*を単離し、これを用いて、高等植物の細胞周期の制御機構へのアプローチを行ってきた。*cyc07*は非同調な培養細胞では、log phaseに発現し、またニチニチソウの幼植物体では、根端を含む根の領域に強く発現していることが確かめられている。

今回、演者らは*cyc07*の5'上流域約0.6kbを含むDNA断片と、 β -glucuronidase (GUS)との融合遺伝子を作製し、これをアグロバクテリアを用いてシロイヌナズナに導入し、シロイヌナズナ形質転換体を作製した。作製した形質転換体を用いて、GUSの発現を組織レベルで解析した結果、GUSの発現は根端分裂組織、茎頂、側根の形成部、初期の腋芽、鞘の中の未成熟胚、葯の内部など、細胞分裂の盛んな組織に検出された。一方、葉、茎などの細胞分裂の起こっていないと考えられる組織にはGUSの発現は検出されなかった。また形質転換体の茎の一部をオーキシンを含む培地で培養し、カルスを誘導したところ、カルス増殖する細胞にGUSの活性が検出された。以上、今回の結果は、*cyc07*の発現が根端に限らず、様々な分裂組織で起こることを示した。また、*cyc07*の発現が約0.6kbの5'上流域中の配列により制御されていること、及びそのトランス制御因子がシロイヌナズナにも存在していることを示した。

2aD 10

ニチニチソウ同調培養系のS期に特異的に発現する遺伝子、
*cyc07*に相同な酵母遺伝子の解析
○伊藤正樹、駒嶺穆 (東北大・理・生物)

演者らは、細胞周期中で発現が変動する遺伝子の単離を目的として、ニチニチソウ同調培養系を用い、differential screeningを行った。いくつかのcDNAクローンが得られたが、このうち*cyc07*と名付けた遺伝子に注目して解析を進めた。*cyc07*は、同調培養系における細胞周期のS期に特異的に発現した。また、インタクトな植物体においても、培養細胞においても、増殖の盛んな細胞に特異的な発現が認められた。

出芽酵母が、この*cyc07*に相同な遺伝子を持つということが明らかになった。この出芽酵母の相同遺伝子は、半数体ゲノム当たり2コピー存在していた。これら遺伝子をクローニングし、*PLC1*、*PLC2*と名付けた。*PLC1*、*PLC2*はサイズの異なるmRNAをコードしており、これらmRNAの発現は増殖の盛んな細胞に特異的に認められた。この相同遺伝子の機能を解析するため、遺伝子破壊(gene disruption)を行い、*PLC1*、*PLC2*のnull mutationを作製し、細胞周期の進行に及ぼす影響について解析した。この結果、*PLC1*、*PLC2*の二重破壊株は、増殖能を喪失した。また、半数体においても二倍体においても、1コピーの破壊だけで、増殖の遅延、すなわちcell cycle timeの増加が認められた。また二倍体においては、遺伝子破壊によるgene copy numberの減少と共に、細胞増殖の速度が低下した。これらの結果は、*PLC* gene familyの発現が、出芽酵母の細胞周期の進行に必須であることを示しており、また、その発現量が増殖速度に影響を与えることを示唆している。今回は、出芽酵母における遺伝子破壊株の表現系の他、遺伝子の発現パターンおよびその構造にみられる高度な保存性から推測される*cyc07*遺伝子の機能についての考察を含めて報告する。

2aD 11

ヒャクニチソウ管状要素分化過程で強く発現する遺伝子 (TED3, TED4) の解析

○出村 拓・福田裕穂 (東北大・理・生物)

ヒャクニチソウ (*Zinnia elegans* L. cv. Canary bird) の芽生えの第一葉から機械的に単離した葉肉細胞は、オーキシシン (NAA) とサイトカイニン (BA) を含む分化培地で培養することにより高頻度 (30-40%) かつ同調的 (培養開始後60時間から80時間) に管状要素 (tracheary element: TE) に分化する。前回の大会で我々は、この系を用い、管状要素分化過程で発現量が増加する5種類の cDNA clone (TED1-5) を単離した事を報告した。

今回はそれらの cDNA の解析を更に進め、TED2 に続いて TED3, 4 の全塩基配列と TED1, 5 の部分塩基配列を決定した。得られた結果をもとにデータバンクを検索したところ、TED1はヒャクニチソウのミトコンドリアの F₁-ATPase α -subunit 遺伝子をコードしている事が明らかになった。TED2 及び TED5 は同一の遺伝子をコードしており、モルモットの水晶体に特異的なタンパク質 (zeta-crystallin)、及び数種の生物のアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) と部分的に類似した配列をコードしていた。TED3 は親水性のタンパク質をコードしていたが、有為な相同性を示す配列を見いだす事はできなかった。TED4 はオオムギの糊粉細胞に特異的に発現する遺伝子 (B11E) の配列と高い相同性を示した。現在、これら遺伝子の成長・分化に伴う発現パターンの解析を進めており、その結果も合わせて報告する。

2aD 12

ヒャクニチソウ phenylalanine ammonia-lyase DNA の単離とこれを用いた管状要素分化の解析

○福田裕穂、吉村敏彦、出村拓 (東北大・理・生物)

私たちはこれまでヒャクニチソウ葉肉細胞から管状要素 (道管・仮道管細胞) への単細胞分化系を開発し、これを用いて植物細胞分化の仕組みについて詳細な解析を行ってきた。このうち、リグニン合成は管状要素分化の最も特徴的な生化学的 event である。私たちは、ヒャクニチソウ管状要素分化のリグニン合成において、phenylalanine ammonia-lyase (PAL) が key 酵素の一つとなっており、分化過程で急激に増加することを明らかにした。この PAL 酵素活性の上昇の機構を遺伝子レベルで解析するための第一歩として、今回は、ヒャクニチソウからの PAL 遺伝子の単離とその発現機構の解明を試みた。

これまでに報告されている3種類の植物、インゲンマメ、サツマイモ、イネの PAL のアミノ酸配列の共通部分を基に、5' と 3' の2つの DNA プライマーを合成した。これを用いて、ヒャクニチソウのゲノム DNA と培養48時間目の cDNA から、PAL-DNA を PCR 法により増幅し、クローニングした。cDNA を基にした場合のみ増幅がみられ、増幅した DNA 断片は予想される長さ約 550 bp であった。得られた DNA 断片は、塩基レベルで、インゲンマメ、サツマイモと約 76%、イネと 73% のホモロジーがあった。これをプローブとしてほぼ全長の PAL cDNA が得られた。現在、PAL mRNA の発現パターンを解析中である。

2aE 01

栄養飢餓による細胞周期の停止を支配する分裂酵母の
stel3遺伝子はRNAヘリカーゼをコードする
前川裕美、[○]下田 親 (大阪市大・理・生物)

分裂酵母 Schizosaccharomyce pombe のstel3変異株は窒素飢餓条件で、①接合できない、②減数分裂できない、③G₀期に入れない、④細胞周期のG₁期で停止できない、などの性質を示した。stel3⁺ 遺伝子を S. pombe ゲノムライブラリーよりクローニングし塩基配列を決定した。塩基配列から推定されたstel3⁺ 遺伝子産物は436個のアミノ酸からなり、DEADボックスファミリーに属するATP依存性RNAヘリカーゼのコンセンサス配列を完全に保持していた。タンパクコード領域を欠失させた遺伝子破壊実験よりstel3⁺ 遺伝子は栄養増殖には必須でないことが明らかになった。既知の30種のDEADボックスタンパクとアミノ酸配列を比較したところ、ショウジョウバエのME31BタンパクとC末端領域を除く364アミノ酸にわたって72%のホモロジーを示すことが判明した。ME31B遺伝子は雌の生殖系列の細胞で特異的に発現し、卵形成に必須であることが報告されている。stel3⁺ とME31B遺伝子が類似した機能を持つかどうかを知るため、ME31BのcDNAを分裂酵母で強制発現させたところ、stel3変異が相補された。したがって、分裂酵母のStel3とショウジョウバエのME31Bは構造的にも、機能的にも相同なタンパクと考えられる。Stel3タンパクは栄養飢餓条件で機能する性分化などに必要な遺伝子群の発現を、転写後のレベルで制御するのではないかと推定される。

2aE 02

分裂酵母における性フェロモンによる情報伝達：
減数分裂の誘導に必須の遺伝子発現
[○]下田 親・柳内浩之 (大阪市大・理・生物)

分裂酵母 Schizosaccharomyce pombe にはP型とM型の2つの接合型がある。P型、M型細胞から、それぞれP-ファクター、M-ファクターというフェロモンが分泌され相手型細胞の接合管の形成を誘導し、また二倍体では減数分裂の開始に働く。オリゴペプチドであるM-ファクターはP型細胞のレセプター (Map3タンパク) とGTP結合タンパクのG α サブユニット (Gpa1タンパク) を介して、最終的に減数分裂に必須の接合型遺伝子mat1-Pm (以下Pmと略) の転写誘導を引き起こす。

Pm遺伝子の転写を解析するため大腸菌lacZをレポーターとする融合遺伝子を作成した。Pm-lacZ融合遺伝子を導入した細胞を、窒素源欠乏条件下でM-ファクターで処理し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、①P型細胞ではM-ファクター処理により8時間以内に活性が10倍以上に上昇すること、②この活性の増加はM-ファクターの濃度に依存すること、③M型細胞や、フェロモン受容体を欠損したP型細胞では活性上昇がみられないこと、などが明らかになった。つぎに、Pm遺伝子のプロモーターを解析し、M-ファクターに応答するために必要な領域を、転写開始点の上流-42から-62のわずか21ヌクレオチドの配列に限定できた。このフェロモン応答領域には、ヒトなどで知られているHMGボックスを含む転写因子のターゲットであるTCTTTGTTモチーフが含まれていた。

2aE 03

キビ・アスパラギン酸アミノ基転移酵素アイソザイム
遺伝子の構造解析

○森淳二, 山田満奈美, 山田茂裕¹, 谷口光隆, 長谷俊治
杉山達夫 (名大・農・農化, ¹J T)

キビ(*Panicum miliaceum*)に代表されるNAD-ME型C₄植物においてアスパラギン酸アミノ基転移酵(AspAT)は葉肉細胞の細胞基質及び維管束鞘細胞のミトコンドリアにて多量発現し、C₄ジカルボン酸回路にて機能している。我々は既にキビから両アイソザイムのcDNAクローン(pcAAT2及びpmAAT1,3)を単離し、緑化過程で両アイソザイムは転写レベルで増加していることを明らかにしてきた。本研究では、AspATアイソザイムの細胞特異的な発現機構の解明するために、核遺伝子を単離し、その構造解析を試みた。

キビ・ゲノムライブラリーよりスクリーニングを行い、両アイソザイムのcDNAに対応するゲノムクローンを得た。塩基配列の解析結果より、サイトソル型は11個、ミトコンドリア型は9個のイントロンをそれぞれ持つが、イントロン挿入部位はアイソザイム間で一致した部位は存在しなかった。さらに、両アイソザイムの転写開始点を決定し、5'上流領域を比較したところ、両者に相同性のある配列は確認できなかった。またキビと同じNAD-ME型植物であるシコクビエ(*Eleusine coracana*)のサイトソル型についても5'上流領域の塩基配列を決定し、キビと比較したところ、GC-richないくつかの相同性の高い配列がクラスター状に見いだされた。

2aE 04

ニセアカシア樹皮レクチンのcDNAクローニングと
発現の季節変化

○吉田和正、山本直樹、田崎清(農水省・森林総研)

特定の糖鎖を認識し結合するタンパク質であるレクチンは、植物では種子に存在するものが古くから研究されてきた。近年、種子以外の栄養器官にもレクチンが存在することがわかってきたが、それらの機能等については明かではない。本研究ではニセアカシアの内樹皮に存在するレクチンの発現制御機構と機能を解明するためにレクチンのcDNAをクローニングし、季節による発現の変化を調べた。

ニセアカシアの秋の内樹皮から調製したポリ(A)RNAをもとにcDNAライブラリを作製し、抗体によってスクリーニングを行った。得られた数クローンの中から鎖長の最も長いものについて塩基配列を決定した。塩基配列から推定されるアミノ酸配列には精製レクチンで調べたN末側アミノ酸配列が含まれており、樹皮レクチンは286アミノ酸から成る前駆体として合成された後、シグナルペプチドが除かれ255アミノ酸の成熟タンパク質になると考えられた。また成熟タンパク質にはアスパラギン結合型糖鎖の付加部位と考えられる配列が1ヶ所存在した。野外のニセアカシアから一月ごとに採取した内樹皮からRNAと可溶性タンパク質を抽出し、それぞれノーザンおよびウエスタンブロット法で調べた。その結果、レクチンRNAは8月から3月にかけて検出された一方、タンパク質は9月から4月の期間、顕著に認められ、発現に季節的なパターンがあることがわかった。

松田学、山本直樹¹、[○]山田恭司（富山大・理・生物、
¹農水省・森林総研・遺伝子）

frxC 遺伝子ははじめゼニゴケ葉緑体 DNA 上で機能不明な ORF として見いだされたもので、葉緑体 DNA 塩基配列データの比較によれば、frxC の相同遺伝子はタバコならびにイネの葉緑体には存在していない。最近、我々は、frxC 遺伝子に相同な配列の存在の有無を被子植物類とコケ類との中間に位置付けられるシダ類ならびに裸子植物類について調べた。ゼニゴケの frxC 遺伝子断片をプローブとするハイブリダイゼーションによる解析の結果、この遺伝子の相同配列は、各種シダ類の葉緑体 DNA および一部の裸子植物類の全 DNA に存在することが判明した⁽¹⁾。したがって、frxC 遺伝子は、被子植物のグループを除く維管束植物の全体に広く分布している可能性が強い。一方、この遺伝子産物の機能についても、最近になってランソウやクラミドモナスなどの下等生物において単離された frxC 欠損変異株の解析結果が、あい前後して報告されており、frxC 遺伝子産物は暗所におけるクロロフィル合成、グリーンングに不可欠であることが明らかとなってきた。そこで、我々の見いだした維管束植物に存在する frxC 遺伝子の機能的な意義を調べるために、シダ植物から frxC 遺伝子クローニングし、その構造を解析した。

(1) K. Yamada et al. Plant Cell Physiol. 33(3)(in press)

マツ cab 及び rbcS プロモーターによる組織特異的な暗所発現
[○]山本直樹、福井充枝（森林総研）

マツの cab および rbcS は光に依存することなく暗所でも発現するという点において、被子植物のこれらの遺伝子と大きく性格を異にしている。これらのマツの遺伝子の発現様式を各々のプロモーターの特性として説明することができるか否かについてレポーター遺伝子(GUS)を用いて、クロマツの cab6、および rbcS7 と名付けた2つの遺伝子のプロモーターについて解析を行った。その解析結果、①マツの cab6 と rbcS7 のプロモーターはタバコの細胞でも機能すること、②光感受性を示さず明暗の条件にかかわらず恒常的に機能することについては、既に報告した。一方、マツの芽生えでは、両遺伝子は組織特異的に発現することが示唆されている。そこで本大会では、形質転換体タバコを用いて、両遺伝子のプロモーターが組織特異性を制御するか否かについて、GUS mRNA および GUS 活性により検討を行った。cab6 プロモーターは、葉で最も強く、茎でも、特に緑色の若い組織で活性を示した。しかし、根のような非光合成器官、組織では活性は検出できなかった。rbcS7 プロモーターの場合にもほぼ同様の結果が得られた。

マツの cab および rbcS は、光に依存せず恒常的に発現するが、組織特異的に発現する。この発現様式は、それらのプロモーターの特性として説明できるようになった。また、これらのプロモーターには光誘導に関するエレメントは備わっていないが、組織特異的な発現に関するエレメントは既に獲得済みであると推測された。

2aE 07

トロパンアルカロイド生合成遺伝子の発現解析

○橋本隆、鐘ヶ江健、天野靖浩、林あすか、梶矢弘美、
山田康之（京大・農・農化）

トロパンアルカロイド生合成酵素の一つである hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H; EC1.14.11.11.) は、培養根および植物体のひげ根といった二次生長の見られない生長段階の若い根で特異的に発現しており(1)、これらの組織の内鞘細胞にH6Hタンパク質が局在することが免疫組織化学により判明している(2)。そこで、植物におけるこのような細胞特異的な遺伝子の発現調節機構を分子レベルで解明することを目的として、H6H遺伝子とその5'上流域の解析を行った。

H6H遺伝子のcDNA(1)をプローブとして、H6H遺伝子の約2Kb上流を含むゲノミッククローンを単離し、5'上流域約1KbおよびH6H構造遺伝子の全塩基配列を決定した。この5'上流域がH6H遺伝子の細胞特異的な発現を制御しているかどうかを確認するため、種々の長さの5'上流プロモーター領域をGUSレポーター遺伝子につないだプラスミドベクターを構築し、バイナリーベクター法により数種の植物に導入した。得られた形質転換体のGUS組織染色の結果も、あわせて報告する予定である。

1)Matsuda, J. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 9460-9464.

2)Hashimoto, T. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 4648-4653.

2aE 08

葉緑体への蛋白質輸送に関する包膜蛋白質

佐々木幸子、関口和正、永野幸生、松野隆一、*小西智一、
*渡辺昭（京大農、*名大農）

エンドウ葉緑体ゲノムの遺伝子は光により大量発現するが、光に関係なく常時発現している遺伝子もある。我々は常時発現遺伝子の中にプラスチドの生存に必要な遺伝子があると考え、そのような遺伝子を探した。ORF231はpetAオペロンに存在し、すべての葉緑体に保存され、常時少量だけ発現している遺伝子であったので、この遺伝子産物の局在場所と機能とを明らかにすることを本研究の目的とした。

ORF231には4つの膜貫通ドメインがあったので、膜蛋白質と推定し、まず抗体を作り、Immunoblottingにより局在場所を調べた。葉緑体の内包膜にこの抗体と反応する34kDa蛋白質があった。我々はこの蛋白質をORF231の遺伝子産物と考え、CEMA (chloroplast envelope membrane)と命名した。

次に蛍光顕微鏡と電子顕微鏡により、CEMAの局在場所を調べたところ、葉緑体表面にあることが確認された。表層にある蛋白質は輸送に関与する可能性があるため、*in vitro*蛋白質輸送に及ぼす上記抗体の影響を調べた。その結果抗体が輸送を阻害したので、本蛋白質は輸送に関与すると推定した。

2aE 09

マメ科ササゲ属及びサイトウ属六種植物 rDNA の RFLP 分析

○鄭堅瑜、入船浩平、中田政司、田中隆荘、森川弘道
(広島大・理)

マメ科ササゲ属およびサイトウ属には経済上重要な植物が含まれている。しかし、これらの植物種の分類学上の帰属は必ずしも明確ではない。これらの植物種では染色体数が殆ど変わらず、そのサイズは比較的小さく(約2μm)、形状も類似しており、通常の核型分析による類縁関係の解析が困難な種群である。

我々はすでに、染色体のC-バンド法、蛍光バンド法およびin situ ハイブリダイゼーション法により、ササゲ属2種(サンジャクササゲおよびササゲ)およびサイトウ属4種(アズキ、ツルアズキ、ペニバナインゲンおよびサイトウ)の類縁関係を細胞学的に解析してきた。今回はこれら6種およびサイトウ6品種のDNAレベルでの類縁関係を明らかにする目的で、制限酵素断片長多型(RFLP)分析を行った結果について報告する。

それぞれの種または品種の実生(約100個体)から全DNAを抽出し、15種類の制限酵素で処理し、サザン分析した。プローブとして³²Pで標識したイネのrDNAのコード領域の一部(18Sと25Sを含む3.9kb断片)とリョクトウのrDNAの非転写スペーサー領域の一部(1.9kb)の2種を用いた。Nei and Li (1979)の方法を用いて、rDNA制限酵素断片のパターンから、供した種及び品種間の遺伝距離を計算した。サイトウ6品種の遺伝距離は極めて近いとの結果が得られた。他方、RFLP分析による6種の類縁関係は細胞学的分析結果と完全には一致しなかった。

2aE 10

Euglena gracilis Zの細胞分裂へのADPリボシル化の関与

○竹中重雄、中野長久 (大阪府大・農・農芸化学)

現在までに動物由来の培養細胞等において細胞分裂とADPリボシル化の関係が示唆されているがそれらでは同調分裂を誘導することが困難であることからその関係は未だに明かとされていない。そこで我々は動物と植物の両方に分類され、同調分裂が光、栄養素によって完全に誘導されることに着目し*Euglena gracilis* Zを最適のモデル生物であると結論した。23°C、5,000luxの光照射下において14時間の明期、続く10時間を暗期とする条件により同調分裂を誘導した結果*E. gracilis* Zは核酸合成期である8-10時間目、明期から暗期への移行期であり、細胞分裂開始直前の14時間目にADPリボシル化活性の上昇が見られた。8時間目にはポリADPリボシル化、モノADPリボシル化反応が進行し、14時間目においてはモノADPリボシル化反応のみが進行していた。14時間目においては17kdの低分子量蛋白質が特異的モノADPリボシル化を受けていた。このモノADPリボシル化反応のアクセプターはアルギニン残基であった。アルギニン特異的モノADPリボシルトランスフェラーゼ活性は10時間目そして14時間目にその活性が上昇した。さらに細胞分画の結果より全てのオルガネラに存在し、それぞれのオルガネラに固有の活性変動を示したことによりアルギニン特異的モノADPリボシルトランスフェラーゼアイソザイムの存在が明かとなった。よってモノADPリボシル化反応は細胞内の各オルガネラにおいて多様な機能を果たし、細胞分裂に関与することが明かとなった。

2aE 11

アカパンカビのras関連ATP-GTP(NTP)結合タンパク質の特徴付け

○西川 和子、大崎由加里、蓮沼仰嗣、
(横浜市大 木原生研)

アカパンカビ(74A)を完全暗黒下で34時間培養後、菌糸を磨碎し、ナイロンメッシュ(30 μ m)で濾過後、9Krpmで遠心した。その上清を39Krpmで遠心し、沈澱を膜分画とした。膜分画と(α - 32 P)ATP, (α - 32 P)GTP, (α - 32 P)CTP及び(α - 32 P)UTPを反応させ、UV照射により既に結合しているヌクレオチドを固定した。5-20%SDS-PAGEを行い、ニトロセルロース膜にブロットし、オートラジオグラフィーを行った。その結果、膜分画中の多数のヌクレオチド結合タンパク質は(α - 32 P)GTPだけでなく、(α - 32 P)ATP, (α - 32 P)CTP及び(α - 32 P)UTPも結合した。ほとんどの結合タンパク質において(α - 32 P)GTPの結合は、 10^{-3} M ATPにより 10^{-3} M GTPよりも強く阻害された。また、 10^{-3} M, 10^{-4} M CTPは(α - 32 P)CTPの結合を特異的に阻害した。これらの結果からこれらのNTP結合タンパク質に対し4種のヌクレオチドによるアロステリックな効果が示唆された。ウエスタンブロットにより、膜分画にHa-ras抗体に交叉反応する4種のタンパク質(27KD, 26KD, 23.5KD, 21KD)を見いだした。ゲルからの切り出しにより部分精製した26KDのタンパク質(p26)は(α - 32 P)ATP及び(α - 32 P)GTPを結合し、その結合はHa-ras抗体で前処理を行なうことにより阻害された。(α - 32 P)GTPの結合は、 10^{-4} M ATPにより 10^{-4} M GTPよりも強く阻害された。(α - 32 P)ATPの結合は 10^{-4} M ATPとUTPにより阻害された。

2aE 12

ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)カゼインキナーゼII
(CK-II)による特異リン酸化タンパク質の生化学的特徴

°金勝一樹、道家建二郎、大塚明久¹、大槻健蔵¹
(北里大・教養・生物、¹衛生・生物科学)

我々は、動物や酵母で細胞の増殖の制御に重要な生理的役割を演じているカゼインキナーゼII(CK-II)が、ゼニゴケの培養細胞中にも存在することを前本学会(岡山1991)で報告した。本キナーゼは、(i)陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおける挙動や、(ii)Superoseゲル濾過法(HPLC)により2つの異なる画分(α と $\alpha_2\beta_2$)に分離される点で動物細胞のCK-IIと異なっていた。そこで、植物独自の器官である葉緑体の生理機能の調節における、CK-IIの特異な生理的役割に着目して本研究を行なった。Ohyama(1982)らの方法で精製した葉緑体から1.0M KClを含む緩衝液(pH7.4)で抽出した画分に、(i)カゼインをリン酸化し、(ii)poly-Lysにより活性化され、しかも(iii)低濃度のヘパリンにより阻害されるCK-II活性が認められた。本画分を高温処理(100°Cで3分)後、精製CK-IIで特異的にリン酸化される基質を検索したところ、分子量16kDa, 23kDaおよび35kDaのpolypeptideが検出された。これらは、(i)CK-II以外の4種のキナーゼでは全くリン酸化されなかったこと、(ii)特に分子量35kDaのpolypeptide(p35)はpI 8.9であり、生物種の異なる葉緑体中にも認められたこと、さらに(iii)部分精製したp35の生化学的性質を解析した結果などを総合すると、CK-IIによるp35の特異的なリン酸化は植物細胞に特徴的な生理代謝の調節に重要な役割を持つものと考えられた。

2 aF 01

Heat Stability of Photosynthetic Electron Transport Reactions

◦Mamedov M.D, Hayashi H. and Murata N. (National Institute for Basic Biology)

An investigation of the heat stability of photosynthetic apparatus is important in the elucidation of the mechanism for adaptation of plants to high temperature. In the present study we examined heat stability of various electron-transport and phosphorylation reactions as well as the effect of glycinebetaine (an osmoregulant in halophilic plants) and polyunsaturated fatty acids on these reactions in thylakoid membranes of *Synechocystis* PCC6803.

Among the partial reactions, the oxygen-evolving activity of photosystem 2 was the most sensitive to high temperature, and only this activity was protected by betaine against the heat-induced inactivation.

No differences were observed in the heat stability of any of the partial reactions between wild type and the *Fad6/desA::K_m^r* strain, that contained only monounsaturated lipid molecules. These observations suggest that the polyunsaturated fatty acids are not related to the heat stability of the electron-transport and phosphorylation reactions.

2 aF 02

緑色硫黄細菌 *Chlorobium limicola* の反応中心複合体を単離・精製する試み

◦大岡宏造、角谷佐紀、伊藤繁¹、松原央、R. Malkin² (大阪大・理・生物、¹基生研、²Univ. Calif.)

緑色イオウ細菌の光化学系反応中心には、初期電子受容体として Fe-S センターが存在することが膜標品の EPR スペクトルから明らかにされ、高等植物の光化学系 I 反応中心 (PS I) との類似性が強く指摘されている。しかしながら、この緑色イオウ細菌の反応中心は非常に不安定であることから、その複合体に含まれる電子伝達成分やサブユニット組成など不明な点が多い。今回我々は、この反応中心の電子伝達機構をタンパク質レベルで解析することを目的とし、反応中心を構成するタンパク質複合体の単離・精製に着手することにした。

本研究の材料としては、膜標品の分光学的諸性質がよく研究されている *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* (Larsen) を用いた。まず菌体をフレンチプレスにより破壊し、細胞膜画分を集めた。細胞膜は EDTA で 1 回洗い、界面活性剤で可溶化後、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。現在のところ完全な精製標品を得るに至っていないが、SDS-PAGE による解析では、主に 3 本のバンド (68, 41, 21 kDa) が検出され、ヘム染色法により、21 kDa のバンドはヘムタンパク質であることが半明した。また、酸化還元差スペクトルからは、反応中心とチトクローム *c* に由来すると思われる吸収ピークが、それぞれ 830 nm と 551 nm に見いだされた。この標品中には Bchl a と Bchl 663 が約 3.9 対 1 の比で存在し、反応中心あたりの Bchl は約 30 個であることから、アンテナサイズとしてはほぼ最小の標品が得られたと思われる。

2aF 03

紅色光合成細菌 *Rhodospirillum molischianum* の反応中心複合体における電子伝達と膜電位形成の速度論的対応
・永島賢治、伊藤繁¹、嶋田敬三、松浦克美（都立大・理・生物、¹基生研）

紅色光合成細菌 *Rs. molischianum* の反応中心複合体 (RC) は、*Rhodopseudomonas viridis* の RC と同様、膜結合型チトクロムサブユニットを含む。我々は、このサブユニット中の4つのヘムから第1キノン受容体 (Q_A) までの電子伝達距離と、発生する膜電位の大きさの関係を調べ、RC内部での等電位面の分布に関するモデルを提案してきた。このモデルを確かめるために、各ヘムから special pair (P) への電子伝達 (数 μ 秒) と、その時の膜電位形成の大きさを、レーザーパルス励起によって測定した。カロチノイドシフトで見た膜電位形成は、測定限界 (μ 秒) 以下の速い成分と、数 μ 秒で変化する成分の2つに分けられた。前者は P-Q_A 間の電子伝達によるものであり、4つのヘムの酸化還元状態に関係なくほぼ一定の大きさだったが、後者は電子供与体となるヘムが異なれば変化の大きさも異なり、標準酸化還元電位 (E_m) が一番高いヘムの酸化に伴って最も大きな膜電位が生じた。

Rps. viridis においては、一番 E_m の高いヘムは最も P に近く、今回の各ヘムの酸化速度の測定結果もそれと矛盾しない。これらの結果は、チトクロムサブユニット内の等電位面の分布が、膜面に平行な成分だけでなくこのサブユニットの外形に沿った成分も持つという、我々のモデルを支持する。さらに、配向させた光合成膜に対する直線偏光の測定によっても、一番 E_m の高いヘムの位置がほぼ確認された。

2aF 04

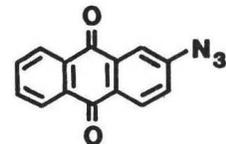
Photoaffinity label による光化学系 I 反応中心複合体内のキノンの結合部位の同定

○ 岩城 雅代・高橋 正昭¹・嶋田 敬三²・伊藤 繁

(基生研・甲南大、理、生物¹・都立大、理、生物²)

光化学系 I 反応中心複合体ではフィロキノン (ビタミン K1) が2次電子受容体として働く。系 I のキノン結合部位は系 II や紅色細菌のキノン部位に比べ、キノンの還元力をより強く保つ機能をもつ。しかし、系 I 反応中心のキノン結合部位/構造はまだ明らかではない。³Hラベルしたアジドキノンを用い、光アフィニティラベル法により結合部位を構成するペプチド部分を推定した。

【方法】ホウレンソウ光化学系 I 粒子をジエチルエーテル処理しフィロキノンを抽出した後、2-アジド³[H]アンスラキノンを右図を添加・一晩放置し(再構成し)、紫外光照射によりアジド基をタンパク



に結合させ、SDS-PAGE/fluorographyにより結合部位を調べた。また、アジドキノンをタンパクに結合させた後、リシルエンドペプチターゼでタンパクを特異的に加水分解し、結合断片の分子量を推定した。【結果】① ³Hアジドキノンは反応中心コアを形成するPSI-AあるいはPSI-Bに結合し、他の小ペプチドには結合しなかった。また、アジドキノンの結合は100倍量のCOLDキノンを共存させることにより阻害された。② 紅色細菌で同様の実験を行なった結果、アジドキノンはQ_A部位を構成するMサブユニットに特異的に結合することから、この方法でキノンがキノン結合部位と特異的に反応することが確かめられた。③ 加水分解産物のうち14.5kDa、9kDa、<4kDaのペプチド断片にアジドキノンは結合した。アジド基の結合が1ヶ所、加水分解が部分的であったと仮定すればPSI-Aのチラコイド膜外側の鉄硫黄センター(Fx)を結合するCys残基を含むループ部分がキノン結合部位を構成すると推定された。

2aF 05

ナノ秒 photo-selection 法による光化学系 I 電子受容体
クロロフィル A₀ の配向決定

○伊藤 繁・岩城雅代・三室 守 (基生研 エネルギー変換)

光化学系 I 反応中心の 1 次電子受容体 (A₀ = クロロフィル a 単量体 = Chl a-690) は、非常に低い酸化還元電位 (約 -1 V) で働くが、差吸収スペクトルと反応速度以外はよくわかっていない。A₀ と反応中心クロロフィル (P700) の位置関係を直線偏向による photo-selection 法で推定した。

【方法】 ホウレンソウ系 I 粒子を池上・加藤の方法で 80% 水飽和エーテルで抽出し、11Chl/P700 を持ち、2 次電子受容体フィロキノンを除いた粒子を作成し、50% グリセロール中で 10ns レーザ閃光照射後 20ns の差吸収スペクトルを、レーザー偏光に対して 0-90 度の測定用偏光により観測した。

【結果】 (1) エーテル抽出粒子にキノンを再構成した標品で P700 を調べた。この場合 A₀⁻ は光励起後 100ps 以内にキノンにより再酸化され 20ns 後では P700^{*} のみが観測される。弱い励起光を用いるとレーザー偏光面と同じ方向に吸収振動子を持つ P700 のみが励起され、この時間では方向を変えずに P700^{*} を与えるとき期待される。700-720 nm のレーザー偏光で励起した場合 0°/90° の測定偏光では殆ど同じ形の P700^{*} の差スペクトルが約 2/1 の比で測定された。一方、670-690 nm の励起では 1/1 の比が得られ、P700 以外のクロロフィルからの励起エネルギー転移では偏光特性が保存されなかった。

(2) フィロキノン欠乏の場合、レーザー励起後約 40ns の寿命を持つ (P700^{*}A₀⁻) 状態が見られる。700-720 nm のレーザー偏光で励起すると P700^{*} はキノン存在下と同じ偏光角依存性を示したが、A₀⁻ 部分の吸収変化は異なる角度依存性を示し P700 とは異なる平面にあることを示した。これから P700 と A₀ の位置関係を推定した。

2aF 06

光化学系 I 反応中心標品の調製と性質

小林慎一, 大矢武志, 古木正人, 清水徳朗, 仲本準
鈴木浩一, ° 檜山哲夫 (埼玉大・理・生化)

光化学系 I 反応中心標品はこれまでいろいろな研究室からその調製と性質について報告がある。同じホウレンソウ葉緑体を材料としても、調製方法によって、収率、性質、サブユニット組成が相当に異なっていることが知られている。我々はこれまでホウレンソウを使って反応中心標品を調製する方法について、さまざまな改良を試みて来た。目的は出来るだけ簡単に短時間に且つ収率良く反応中心標品を得る方法の開発である。今回界面活性剤 Triton X-100 で葉緑体可溶化を行う際に加熱処理をすることにより 1 段のイオン交換クロマトグラフィーだけで、サブユニット 5 種 (PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaE) のみから成る反応中心標品を 70% 以上の収率で得られることが分かった。さらにこの標品を高濃度 NaI で処理し限外濾過をするだけで、非常にきれいな Core 標品 (PsaA と PsaB のみからなる反応中心標品) を得ることが出来た。これらの標品の化学的組成と光化学的性質を合わせ報告する。

2aF 07

光化学系 1 反応中心を構成するサブユニットの数について

° 大矢武志, 小林慎一, 佐藤成宙, 仲本準, 檜山哲夫, 千田正昭¹ (埼玉大・理・生化, ¹日本分光)

光化学系 1 反応中心を構成するサブユニットは 10 種以上知られているが, それらの反応中心色素 P700 あたりの分子数は正確には分かっていない。これまでいろいろな方法でこの問題が研究されてきた。SDS-PAGE の染色強度を測ることが簡単なため広く用いられてきているが信頼のおける方法ではない。¹⁴C uniform ラベル法を用いた報告では各サブユニットの同定が行われていなかったため, やはり不十分であった。我々は今回 SDS-PAGE と immunoblotting を組合せた方法で PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaE 及び PsaL についていくつかの異なる光化学系 1 反応中心標品及びチラコイド膜を使ってそれらサブユニットの定量を試みた。また精製反応中心標品では, プロットした PVDF 膜上の各サブユニットに相当するバンドを直接加水分解し, アミノクローム法による定量的アミノ酸組成分析を行い, モル数を算出した。また以前に報告したシステイン残基を蛍光ラベルする方法を再検討した結果も合わせて報告する。

2aF 08

光化学系 I 鉄硫黄タンパクの反応中心複合体の構造における役割

高橋裕一郎 (岡山大、理、生物、大学院自然科学研究科)

M. Goldschmidt-Clermont, J.-D. Rochaix (ジュネーブ大)

光化学系 I 反応中心は約 11 種のサブユニットを含む色素タンパク複合体で、反応中心と集光性色素は 2 種の大型のサブユニットに、電子受容体 FA と FB は 9kDa の鉄硫黄タンパクに存在する。真核生物ではこれらのサブユニットはそれぞれ葉緑体遺伝子 *psaA*, *psaB*, *psaC* にコードされている。本研究では鉄硫黄タンパクが系 I 反応中心複合体の会合にどのような役割を果たしているかを明らかにするため、葉緑体形質転換法を用いて緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の *psaC* 遺伝子を薬剤耐性マーカーで挿入失活させた形質転換株を単離した。得られた形質転換株の形質を解析した結果、以下のことが明らかになった。① 蛍光誘導期現象および系 I による酸素吸収活性の測定から、形質転換株の系 I 活性は完全に失われていた。② SDS-PAGE によるチラコイド膜のタンパク分析では系 I 複合体の構成サブユニットの存在量は検出限界以下であった。③ 高感度のウェスタン分析により反応中心サブユニットの存在は検出できたが、その量は野生株のわずか数%と大きく減少していた。④ 葉緑体タンパクのパルス・チェース・ラベルの実験により、反応中心サブユニットは正常に合成されるが不安定で急速に分解されることが示された。以上の結果より鉄硫黄タンパクは光化学反応に必須の成分であるばかりでなく、*Chlamydomonas* では複合体の安定な会合に不可欠であると結論される。

2aF 09

光化学系 I アンテナ色素の再構成：再構成におよぼす
脂質の影響
池上勇 （帝京大・薬）

ホーレンソウやラン藻の光化学系 I 粒子をエーテル処理することにより、P700の活性を保持したままアンテナchl-a(および脂質)の大部分を抽出することができる。この標品に脂質と共にchl-aを再添加するとchl-aのアンテナとしての機能を再構成することができ、このとき脂質としてはPG(ホスファチジルグリセロール)が最も有効であった。今回は、アンテナ再構成に対する、リン脂質分子中の二個のアシル基の影響、およびchl-aアナログを用いた結果について報告する。

(1) PG分子中のアシル基炭素数12(C_{12:0}/12:0)のものはchl-aの膜への結合を阻害した。一方、C_{14:0}/14:0のものはアンテナ再構成に最も有効であり、炭素数が16から18に増えると効果が低下した。二重結合を含むアシル基(C_{16:0}/16:1、C_{16:1}/16:1、C_{16:2}/16:2)では炭素鎖が長くてもC_{14:0}/14:0とほぼ同様に有効であった。

(2) PC(ホスファチジルコリン)で上記のアシル基をもつものはいずれもアンテナ再構成には無効であった。以上の結果から脂質分子の構造がchl-aの膜への有機的結合に重要であることが示唆された。

(3) chl-bはPGと共に再添加したときアンテナとして機能しうるように膜に結合した。chl-bをもたないラン藻でも同様な結果が得られたのでchl-bはchl-a結合部位に結合するものと推定された。phco-a、bchl-aではアンテナは再構成されなかった。

2aF 10

光質によるラン藻光化学系 I の形成調節

相澤 克則 ・ 藤田 善彦 （基生所・細胞生物）

藻類の光化学系 I/II の量比 (PS I/PS II 比) は生育時の光質により調節される。ラン藻 *Synechocystis* PCC6714 等では、これは細胞あたりの PS I 含量が光質により増減する事により起こる。今回は PS I/PS II 比の調節が PS I の形成速度の変化によるものかどうかを ³⁵S-メチオニンを用いた膜蛋白質の RI ラベル実験により調べた。

Synechocystis PCC6714 を弱い PS I 光で培養し、次に増殖速度がこれとほぼ同一となる PS II 光を照射、経時的に ³⁵S-メチオニンで細胞をパルスラベルした。回収した細胞を破碎後、膜蛋白質を可溶化し、免疫沈降法等により PS I コアペプチド等の形成速度を求めた。その結果：(1) 細胞のメチオニン取込み速度や、全蛋白質及び膜蛋白質の生合成速度は、照射光質のシフトに拘らずほぼ一定であった。これに対し (2) PS I コアペプチドの形成速度は、光質シフト後数分で活性化を受け、20 分で PS I 光照射時の約 2 倍の速度に達した。さらにこの活性化状態は、PS II 光の照射下では、観察した限り 6 時間持続した。この光質シフトは、PS I の含量増加を起こす条件である事は既に報告した。従って以上の結果は、PS II 光で PS I 形成速度が促進される事で PS I の増加が起こり、これが PS I/PS II 比の上昇をもたらすものと解釈される。これらの結果を示すとともに、生育時の光条件の変化に伴う PS I/PS II 比、膜蛋白質組成、PS I 形成速度の各々の変化について論議する。

藤田善彦, 村上明男(基生研・細胞生物)

ラン藻のチラコイド系について、光合成条件によりPSI複合体の形成が調節を受け、光条件に適したPSI/PSII比のチラコイド系となること、また、Cyt_{b₆}の酸化反応が調節の信号となることを今までに報告した。PSI形成の調節に関連して、PSI形成が抑制されている時には、Chl_a前駆体、Pchlide、Mg-protoporphyrin、が著しく蓄積され、Chl_a合成がChlide_a生成以後の部位で強く抑制されていることを見出した。この抑制はPSI形成が促進される条件にシフトすると急速に解除される。この現象を解析し、(1)Chl_a合成抑制はたん白合成阻害により解除されること、(2)また、HQNOによりCyt_{b₆}酸化が阻害されると合成抑制の解除も阻害されること、(3)HQNOの効果はたん白合成の阻害により一時的に増大することを示す結果を得た。これらの結果より、(1)Chl_a合成の調節はPSI形成の調節の反映ではなく、Chl_a自身の合成が調節されることによること、(2)合成調節は抑制的に行われ、HQNOで阻害される信号により解除されること、(3)信号伝達、Chl_a合成の抑制機構は、それぞれ回転の早いたん白が関与していることを示すものと推定された。これらの実験結果を報告すると共に、Chl_a合成調節とPSI形成調節との関連を論議する。

ラン藻 phosphoribulokinase の暗及及び明中下における活性化状態

平橋智裕、姫野道夫、和田野晃 (大阪府大・農・農化)

Phosphoribulokinase (PRK) は Calvin-Benson 回路における CO₂ 固定反応の基質となる ribulose 1,5-bisphosphate を ribulose 5-phosphate と ATP より合成する反応を触媒する酵素である。高等植物において本酵素は葉緑体ストロマ内に局在し、いくつかの代謝中間体やストロマ内の Mg²⁺ 濃度、pH により影響を受け、更に光活性化を受ける酵素の一つであることから、Calvin-Benson 回路の制御を考える上で重要な酵素であるといわれている。一方、ラン藻を用いた実験(1)では、PRK はわずかに光活性化されていることが報告されている。しかしラン藻 PRK の暗及、明中における活性比は10倍に達することはなく、高等植物と同様な活性化が行われているかどうか詳しいことは明かではない。本研究ではラン藻 *Synechococcus* PCC7942 を用いてラン藻 PRK の暗及及び明中下における活性化状態について検討を行った。

ラン藻を暗闇で1時間通気した後、光を照射し、時間を追って順次液体窒素で瞬間凍結後ガラスビーズ磨砕し15,000rpmで10分間遠心分離した上清について PRK 活性を測定した。抽出液に EDTA を加えると、本酵素の暗及における活性は光を照射した際の PRK 活性と同じであり、この EDTA による活性の保持効果は dithiothreitol や還元型 glutathione による活性化と異なり EDTA を希釈することにより速やかに消失することが判明した。以上のことからラン藻の PRK は in vivo において高等植物型の光活性化はなされず、代謝中間体等の二次情報伝達物質の関与により制御を受けていると推測した。

(1) Duggan, J. X. et al. (1975) *Planta*, 122, 293-297

2aG 01

Pseudomonas E-3株のヘキサデセン酸 Δ^9 -シス-トランス異性化酵素の精製と性質
川添亮・奥山英登志（北海道大・理・生物）

耐冷菌 Pseudomonas E-3株は少なくとも2種の不飽和脂肪酸シス-トランス異性化酵素を持っている。1つは細胞質に存在し、遊離の Δ^9 -シス-ヘキサデセン酸〔16:1(9c)〕をトランス体に異性化するものでありもう1つは細胞質画分に存在しホスファチジルエタノールアミン中の16:1(9c)をトランス体に異性化する酵素である。いずれもこれまでに知られていなかったものであり、本研究では細胞質に存在する酵素の精製を試み、いくつかの性質を調べた。

20℃で培養した菌体より細胞質を調製し、硫酸分画の後陰イオン交換・疎水性・ゲル濾過の各種クロマトグラフィーにより約5,000倍に精製することができた。本酵素標品はnative-PAGE, SDS-PAGEのいずれにおいても2本の主要なバンドからなることが示されたことから、酵素活性が異なる2種類のタンパク質の共存により発現されることが示唆される。又、本酵素は0℃で最大活性を示し、-20℃でその5%、40℃でその23%の活性を持っていた。さらにフェナントロリンで阻害を受けず、 α -トコフェロールなど脂肪酸の抗酸化剤で強く阻害された。

16:1(9c)に高い特異性を持つことから我々は本酵素をヘキサデセン酸 Δ^9 -シス-トランス異性化酵素と名付けたい。

2aG 02

南極海産ハプト藻 Prymnesiophyte strain B の脂質について
森田 直樹・小亀 一弘・奥山 英登志
（北海道大・理・生物）

Prymnesiophyte strain B（以下 strain B）は南極海の海水より単離された、生育の至適及び上限温度がそれぞれ、2.5-5℃、7.5-10℃にある高度に好冷的なハプト藻である。本研究は真核性藻類の低温適応のメカニズムを脂質レベルで明らかにするための手始めとして、strain Bの脂質及び脂肪酸を、鞭毛により遊泳する細胞（遊泳細胞）と、器物に付着する細胞（付着性細胞）との違いに焦点をあて詳細に分析した。

（方法）Strain BはPES培地を用い、3000 lux、長日条件下、5℃で静置培養した。遊泳細胞は培地を吸引濾過し、濾紙上にトラップし、付着性細胞はフラスコ壁よりはがし遠心分離により集めた。脂質は常法により抽出し、各脂質クラスは2次元TLCにより分離した。脂肪酸は、メチルエステルとしてGLC、GC-MSにより分析した。

（結果及び考察）Strain Bの付着性細胞の全脂質の70%以上は、MGDG, DGDG, PC, 中性脂質であった。脂肪酸は、18:5(3,6,9,12,15)が30%を占め最も主要なものであった。一方、遊泳細胞には、未同定であるが、付着性細胞には見られない脂質が検出された。また、付着性細胞に比べると18:5をはじめとする長鎖多不飽和脂肪酸が著しく少なかった。以上の結果より、細胞の運動性と脂質及び脂肪酸組成との関係が示唆される。

2aG 03

単細胞ラン藻, Synechococcus sp. Miami BG 43511の
同調培養時における脂質変動
○ 梶田聖孝, 岡本智伸, 菊地正武 (九州東海大学),
三井 旭 (マイアミ大学)

目的] 単細胞ラン藻 Synechococcus sp. Miami BG 43511 株は同調培養に成功した高水素発生ラン藻として, その機能機作の解明が期待されているが, 脂質成分に関しては未解明であった. そこで, 本株の脂質成分同定と同調培養によるその変動について検討した.

方法] Synechococcus sp. Miami BG 43511はマイアミ大学海洋大気研究所に保存中のものを用いた. 同調培養は人工合成培地A-Nを用い, 4% CO₂を連続通気しながらpHを正確に7.6にコントロールした(培養温度30°C). 培養の光前処理は, 遮光-光照射-遮光を各16時間くり返した. GLCカラムは, 10% SP-2300 Supelcoport(80/100メッシュ)を用いた.

結果] 本株は主要脂質として, MGDG, DGDG, SQDGを含み, PGも認められた. 脂溶性色素としては, β -carotene, echinenone, pheophytin a, chlorophyll a, zeaxanthinが認められた. 同調培養による脂質組成の大きな変動は認められなかった.

本株の主要構成脂肪酸は, α -リノレン酸とパルミチン酸であり, この両者で全体の60%以上を占めていた. 同調培養により, Cell cycleの変動に伴うと思われる多不飽和脂肪酸の変動が一部認められが更に詳しい検討が必要である.

2aG 04

講演取り消し

2aG 05

タバコ培養細胞における *in vivo* ラベルによるイノシトールリン脂質代謝の研究

◦ 鎌田 芳彰、武藤 尚志 (東大・応微研)

原形質膜のイノシトールリン脂質代謝 (PI代謝) は植物細胞の細胞内情報伝達系を担う有力な候補として考えられているが未だ決定的な証拠は出ていない。我々は既に *in vitro* 研究により、タバコ培養細胞BY-2株の原形質膜のPI代謝の諸酵素の生化学的性質を明らかにした (Kamada and Muto, 1991)。今回、 $[^3\text{H}]$ イノシトールを用いたPI代謝産物の *in vivo* ラベルによる解析を試みた。従来、植物細胞において $[^3\text{H}]$ イノシトールはグルクロン酸を介して細胞壁の前駆体に変換され、1.PI代謝産物に取り込まれるラベルの比活性が落ち、2.多種の糖リン酸と思われる物質にラベルが取り込まれイノシトールリン酸の分析を妨害することから、これらの改善が必須とされていた。我々は細胞の培地からイノシトールを除き、かわりにグルクロン酸を加えて前培養を行なうことにより、イノシトール1,4,5-三リン酸 (IP_3) へのラベルの取り込みを上昇させることに成功した。また長時間のグラジエント溶出によるHPLCでイノシトール1,4-二リン酸 (IP_2)、および IP_3 を分離・同定することに成功した。次に上記の条件で $[^3\text{H}]$ イノシトールラベルした培養細胞に *Phytophthora nicotianae* より調製したエリシターを与えたところ、5~10分の短時間にイノシトールリン酸の増加が観察され、特に IP_2 はエリシターを与えないときの15~20倍にまで増加した。この様に外界の刺激によってPI代謝が促進されることが示された。

2aG 06

脂肪酸不飽和化と光合成

◦ 和田元¹、Zoltan Gombos¹、坂本敏夫²、村田紀夫^{1,2}

(¹基生研、²総研大)

光合成の初期過程の場であるチラコイド膜は、他の生体膜と同様、おもに脂質とタンパク質から構成され、その膜脂質には多量の多価不飽和脂肪酸(二重結合を二つ以上含む脂肪酸)が結合している。本研究では、チラコイド膜に存在するタンパク質複合体の活性およびその安定化に及ぼす多価不飽和脂肪酸の影響について、ラン藻 *Synechocystis* PCC6803の野生株および同株より遺伝子工学的手法によって作成した多価不飽和脂肪酸欠損株(以下、欠損株)を用いて解析し、光合成における多価不飽和脂肪酸の役割について検討した。

光合成活性の熱的安定性に及ぼす多価不飽和脂肪酸の影響を調べるために、野生株および欠損株の生細胞を用いて、光合成的酸素発生能および光化学系2の活性の温度依存性およびそれらの活性に及ぼす熱処理の効果を調べた。その結果、両株間には顕著な差が見られず、多価不飽和脂肪酸が光合成活性の熱的安定化には寄与していないことが明かとなった。次に、光合成活性の強光による失活(光阻害)について調べたところ、欠損株は野生株に比べて低温下で著しい光阻害を被ることが明かとなった。このことは、多価不飽和脂肪酸が光阻害を抑える上で重要な機能を担っていることを示唆している。

2aG 07

光合成の高温適応の生化学

○西山佳孝^{1,2}、Eszter Kovács¹、林秀則¹、渡辺正²、
村田紀夫¹（¹基生研、²東大・生産研）

植物が高温環境にさらされると、光合成器官、特に酸素発生系が最初に損傷を被る。したがって植物の高温環境への適応には酸素発生系の高温耐性化が必要となる。光合成の熱安定性がチラコイド膜における脂肪酸の不飽和度に影響されないことはすでに当研究室で明らかにされており、脂質以外の高温耐性化因子が存在していると考えられる。本研究では光合成の高温適応の分子機構を明らかにすることを目的として、形質転換型ラン藻 *Synechococcus* PCC7002について生育温度と光合成の熱安定性の関係を生細胞および単離チラコイド膜を用いて解析した。

ラン藻の生育温度を上げるにつれて、生細胞における酸素発生系の熱安定性が増大した。さらにベンゾキノンを電子受容体として測定した酸素発生系についても同様な関係が見られたことから、光化学系2における高温耐性化が起こっていると推定された。つぎに単離されたチラコイド膜について酸素発生系の熱失活を調べた結果、生細胞の場合と同様に高温で培養した細胞のチラコイド膜はより高い熱安定性を示すことが確認された。この結果は生細胞で見られた高温適応が単離チラコイド膜に保存されていることを示しており、この中に光合成の高温耐性化因子が存在することを示唆している。

2aG 08

ラン藻スピルリナにおけるマット形成

— cAMP分解酵素の阻害剤による影響 —

大森和子、広瀬正紀¹、大森正之²（昭和女子大・生活科学、
¹和歌山大・教育、²東京大・海洋研）

糸状性ラン藻 *Spirulina platensis* の懸濁液にcAMPを添加すると、細胞の呼吸や運動が促進され、同時に藻体の凝集が起こり、水面にマットを形成する。培地中のcAMP濃度が、細胞内の代謝系になんらかの影響を与えている可能性が考えられる。一方、細胞内のcAMP濃度の変化と運動やマット形成との関係についてはこれまで知見がない。培地にcAMPを与えた場合の細胞内のcAMP量の測定は技術的な理由からむずかしいため、今回の実験では、cAMPの分解酵素ホスホジエステラーゼの阻害剤である3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) を培地に添加 (5×10^{-4} M) して、細胞内のcAMP濃度の変化と呼吸および運動に及ぼす影響とについて実験を行った。細胞懸濁液をろ過し、細胞をろ紙上で洗浄し、SOT培地に懸濁した。懸濁液5 ml をベトリシャーレに分注した後、cAMPおよびIBMXを添加し、マット形成への影響を観察した。細胞の運動は、顕微鏡下での滑走距離をビデオレコーダーを用いて測定した。

IBMXを細胞懸濁液に添加し、その前後の細胞内cAMP含量を¹²⁵I-ラジオリジオイムノアッセイにより測定した結果、IBMXによりcAMP含量は1分後には数倍に増加することが明らかとなった。細胞外へのcAMPの放出はきわめてゆっくり行われた。細胞の凝集はIBMX添加直後から開始され、25分後には、cAMPを 1×10^{-5} M加えたときとほぼ同様の大きさのマットが形成された。また、細胞の滑走運動はIBMXにより3倍、呼吸活性は、2倍促進された。これらの結果から、*Spirulina* においては、細胞内cAMP量の増加に対応して、すばやい代謝の変化が起こり、さらに運動やマットの形成が促進されると推論した。

2aG 09

緑藻ダナリエラにおける、浸透圧変化によるcAMP濃度変化

大澤弘宣¹、中山克己[○]、岡田光正 (東邦大 理 生物分子、¹全薬工業)

耐塩緑藻 *Dunaliella viridis* における細胞内情報伝達系について調べた。

- 1) この藻の細胞の超音波処理液は、adenylate cyclase 活性 ($16.0 \text{ cAMP produced min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) を示した。
- 2) この酵素活性は、膜分画と可溶性分画両方に見られた。
- 3) この酵素活性は、 $1 \mu\text{M}$ の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (GTPの analogue) により活性化されたが、 Ca^{2+} と calmodulin には影響されなかった。このことは、この酵素がGタンパクにより制御されていることを示唆している。
- 4) 細胞破碎液には、cAMPを破壊する Phosphodiesterase 活性 ($23.1 \text{ cAMP decomposed min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) が検出された。
- 5) これらの結果は、ダナリエラに cAMP を介する細胞内情報伝達系があることを示唆する。
- 6) この藻を 1.7M NaCl から 1.0M NaCl の培地に移すと、2分以内に cAMP 濃度は、 10^8 細胞あたり、 2.4 pmol から 3.9 pmol に上昇し、30分以内にもとの濃度に戻った。
- 7) 現在、この藻の adenylate cyclase の精製を試みている。

2aG 10

シアノバクテリア *Synechococcus* PCC7942 のカロテノイド組成への除草剤の影響

正元和盛 (熊本大学・教育学部・生物)

シアノバクテリア *Synechococcus* PCC7942 を強光下で培養すると、細胞壁面分にゼアキサンチンの蓄積がみられ、また細胞全体としてもカロテノイド組成中でゼアキサンチンの割合が増加する。このようなカロテノイド組成変動への影響をみるため、bleaching herbicide として知られている norflurazon (NF) を加え、本シアノバクテリアでのカロテノイド合成阻害を調べた。

Synechococcus PCC7942 は、BG-11培地中白色蛍光灯下で培養し (600 lx , 25°C)、細胞回収後アセトンで抽出した。カロテノイド分析は、逆相HPLCで水/エタノールのグラディエント ($13/87 - 0/100 \%$) で溶出し、同定定量した。

強光下培養細胞では、カロテノイド/chl *a* 比が増加するが、norflurazon (NF) 存在下ではその比が増加しなかった。このときカロテノイド組成については、強光下でゼアキサンチンが増加するが、NF 存在下ではその増加も小さかった。NF 濃度依存性をみると、低濃度 NF ($<0.2 \mu\text{M}$) では、 β -カロテンが増加し (ゼアキサンチンが減少し)、高濃度 ($>1 \mu\text{M}$) では、報告されている阻害と一致してすべてのカロテノイド成分の増加はみられなかった。このとき細胞増殖速度への影響は小さかった。同じ結果は、NF 添加後の培養時間依存でもみられた。

これらの結果は、低濃度 NF では β -カロテン水酸化の阻害があることを示唆する。

2aG 11

ラン色細菌 *Anacystis nidulans* の光リン酸化に対する
テントキシンの阻害について

○吉岡達哉, 太田嘉則, 久堀 徹¹, 桜井英博
(早稲田大・教育・生物, ¹横浜市大・生物)

テントキシン感受性高等植物は、発芽時にテントキシンを作用させると葉が白化して枯れる。一般に、テントキシン感受性高等植物は、 F_1 ATPase 活性が阻害されることが知られている。一方、藻類以下の下等植物での F_1 ATPase 活性が阻害されるという報告は、これまでほとんどなかったもので、*A.nidulans* F_1 ATPase の関与する、さまざまな反応に対するテントキシンの影響を調べた。

光リン酸化反応に対する影響では、照射前にテントキシンとチラコイド膜をインキュベートすると、時間とともに阻害の割合が大きくなり、 $1\mu\text{M}$ テントキシンでは20分のインキュベートで阻害度がほぼ平衡に達する。光リン酸化の50%阻害に必要な濃度はインキュベート時間30分で、約 400nM であった。光リン酸化に伴う ΔpH の解消に対する影響を9-アミノアクリジンを用いて調べたところ、高濃度テントキシンでは ΔpH の解消が阻害された。

単離 F_1 に対する影響では、ATPase 活性測定法によりテントキシンの阻害効果変動する。トリプシン処理 F_1 の Ca^{2+} -ATPase が最も強く阻害され、約 500nM で50%の阻害が見られた。テントキシンはエネルギー伝達阻害剤的に *A.nidulans* F_1 を阻害すると結論される。

2aG 12

緑色光合成細菌の光化学反応中心とそのペプチド

○楠元範明、那須英和、高野博子、¹井上和仁、桜井英博
(早稲田大・教育・生物、¹神奈川大・理・応用生物)

緑色光合成細菌光化学系はPS I と類似性が高い。*Chlorobium limicola* のクロマトホアからできるだけ嫌気性を保つようにAr気下でTriton抽出し、ショ糖密度勾配超遠心により、反応中心に富む粒子を精製した。蛍光性SH試薬で標識すると、SDS-PAGEで40kDa, 16kDaに強い蛍光を示すペプチドバンドが得られた。反応中心粒子を次の条件で処理し、EPR測定を行った：(A)、暗所で凍らせる；(B)、 $\text{pH}10$, 40mM ジチオナイト存在下で暗所で凍らせる；(C)、(B)を77Kで4分間光照射。(A)では $g=1.94$ に小さなスペクトルがみられた。(B)-(A)では、 $g=1.94, 1.88$ にジチオナイトによって還元される差スペクトルが、(C)-(B)では、同じく $g=1.94, 1.88$ に光によって還元される差スペクトルが得られた。後二者のスペクトルはNitschkeら(1990)のmembraneでの報告にほぼ一致しているので、反応中心に富む粒子が可溶化できたと考えられる。なお、 $g=1.94$ における(A)のシグナルの大きさは(B)の約1/3であった。

H₂および触媒によりさらに嫌気性の維持に努め、*Chlorobium tepidum* から精製された標品では、室温における μ 秒領域の閃光分光測定で435nmに負のピークを持つ吸光変化($t_{1/2}=40\mu\text{sec}$)がみられた。この吸光変化について研究中である。

一般講演

第2日 3月30日(月) 午後の部

- A会場 タンパク質・酵素(Ⅱ)
- B会場 ストレス(Ⅱ)
- C会場 分子生物学(V)
- D会場 光合成(Ⅳ)
- E会場 光合成(V)
- G会場 分子生物学(VI)

2pA 01

大腸菌における嫌氣的 Mn SOD 合成に及ぶ硝酸呼吸の作用

三宅浩一郎 (広島大・理・植物)

大腸菌の Mn SOD 合成は、*fur*, *arcAB*, *soxRS* の3つの遺伝子により調節されている。*fur* は鉄イオンによる Mn SOD 合成の抑制に関与し、*arcAB* は酸素による Mn SOD 合成の誘導に関与し、*soxRS* はスーパーオキシドによる Mn SOD 合成の誘導に関与している。我々は無酸素下においても硝酸呼吸で生育すると Mn SOD 合成が生じることを見い出した。発酵により生育した大腸菌を硝酸呼吸により2時間生育させると硝酸呼吸系は完全に誘導されるが Mn SOD 活性は存在しないような細胞が得られる。このような細胞を硝酸呼吸が作動する条件下におくと Mn SOD 蛋白質の合成が生じる。鉄イオンを除去した条件下においても硝酸呼吸が作動する条件下でのみ Mn SOD 合成が生じること、硝酸呼吸による Mn SOD 合成が鉄イオンにより阻害されることから硝酸呼吸と *fur* は無関係と考えられる。無酸素下ではスーパーオキシドの生成も考之にくく、硝酸呼吸は *arcAB* による調節系に属すると考えられる。*arcAB* は酸素呼吸における電子伝達系成分の状態を検出している可能性が示唆されている。そこで今回、硝酸呼吸による Mn SOD 合成の誘導に及ぶアンカップラーや ATP 合成酵素阻害剤の影響を調査したのでその結果を報告する。

2pA 02

部位特異的変異の導入による *Rhodobacter capsulatus* フェレドキシン I の構造と機能の解析

○徳田賢一郎, 佐伯和彦, 松原 央 (阪大・理・生物)

紅色非硫黄細菌 *R. capsulatus* は機能的に分化した複数のフェレドキシン (Fd) を有している。我々は、Fdl 遺伝子 (*fdxN*) がニトロゲナーゼ系遺伝子群に属する *nifE* の約 2kbp 上流に位置すること、また、遺伝子破壊による *fdxN* 欠損株 (MSA1) の窒素固定能は著しく低下するが *fdxN* を含むプラスミドの導入により回復することを確かめている。この Fdl は Fe-S クラスターを結合する Cys に特徴的な配列を 2 つ持ち、N 末端側のものは一般的な CxxCxxCxxxC であるのに対し、C 末端側のものは C³⁸xxC⁴¹xxxxxxxxxC⁵⁰xxx⁵⁴xxxx⁵⁹ (2 番目と 3 番目の Cys の間にアミノ酸の数が多く、5 番目の Cys が存在する) で、他の光合成細菌の Fd や窒素固定細菌の *nif* 遺伝子群中で同定された Fd 様遺伝子産物にのみ共通した構造を持っている。これらの一次構造上の特異性と生理機能との関連を調べるために、まず部位特異的変異を加えた各種の変異 *fdxN'* を作製し、次にそれらを持つプラスミドを MSA1 に導入して窒素固定による生育を調べ、さらに変異蛋白質の精製を試みた。Fdl の 42 から 49 番目の 8 アミノ酸を Gly, Ala の 2 アミノ酸に置換した *fdxNGA* および、Cys 59 を Ser に置換した *fdxNC59S* を用いた場合には野生株と同程度に窒素固定能が回復したが、Cys 54 を Ser に置換した *fdxNC54S* では回復しなかった。従って、C 末端側の 42 から 49 番目の 8 残基は生理的にあまり重要な機能を担っていないこと、Fe-S クラスターの保持には Cys 59 以外の 8 個の Cys が関与していることが示唆された。FdxNGA の分光学的性質も報告する。

2pA 03

黄化ヤエナリにおけるジベレリン結合タンパク質の
精製と単離 ○中嶋正敏、酒井慎吾¹、金澤健二、
山口五十磨、高橋信孝²、室伏 旭
(東京大・農・農化、¹筑波大・生物科学系、²理 研)

目 的、 演者らは高等植物におけるジベレリンの作用発現機構解明の端緒として、ジベレリンに結合能を持つタンパク質の検索を進めている。今回は、黄化させたヤエナリの芽生えを材料に用いて、その可溶性画分から当該タンパク質の精製を行ったので報告する。

材料及び方法、 暗黒下で生育したヤエナリ (*Vigna radiata*) の芽生えから胚軸部のみを収穫して材料とした。硫酸沈澱法による粗精製の後、ジベレリンをリガンドとして調製したアフィニティークロマトグラフィーや、陰イオン交換カラムおよびゲル濾過カラムを用いたクロマトグラフィーにより精製を行った。

ジベレリンとの結合活性は、ジベレリンA₄トリチウム標識体のタンパク質との結合放射活性量のうち、過剰量の非標識体を添加して置換される量を、有効結合放射活性量として評価した。

結 果、 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより二つの活性画分が認められ、それぞれ500kDaと150kDa近辺と推定された。電気泳動結果より二つの画分は同一のもので、高分子画分は低分子画分の凝集体と思われる。ジベレリンとの結合に関する至適環境条件、および基質特異性についての検討を行ったので、それらの詳細についても報告する予定である。

2pA 04

黄化アサガオ胚軸中のCa²⁺依存性タンパク質リン酸化
坂本 光、柴田幸子 (北里大・薬)

タンパク質リン酸化酵素が、cAMP, cGMP, Ca²⁺等の細胞内伝達物質によって活性化され、種々の酵素活性を調節することは動物細胞において広く研究されている。植物細胞においても類似の機構の存在は報告されているが、未だ不明の点が多い。我々は、生体膜受容伝達機構解析の手始めとして、タンパク質リン酸化酵素活性に対するCa²⁺, calmodulinの効果について検討した。酵素活性は、黄化アサガオ胚軸から得た粗膜画分タンパク質に、[γ-³²P]ATP から取り込まれた放射活性によって求めた。その結果、粗膜画分中には、Ca²⁺依存、非依存性の酵素活性が認められ、Ca²⁺依存性の酵素活性は、1μM Ca²⁺によって活性化され、膜タンパク質の主にセリン残基をリン酸化した。この酵素活性は、calmodulinに対しては依存性を示さず、むしろ過剰のCa²⁺存在下 calmodulinによって抑制傾向を示した。この抑制効果は、calmodulin antagonistである W-7の添加によってほぼ解消された。一方、histone H1 を基質とすると、Ca²⁺存在下 calmodulinによる酵素活性の抑制効果は認められなかった。また、この抑制効果は、Ca²⁺非存在下では認められなかった。以上のことから、calmodulinは、Ca²⁺と複合体を形成し、Ca²⁺依存性タンパク質リン酸化酵素の基質である膜タンパク質近傍の疎水性領域に結合し、リン酸化を抑制すると考えられる。

鈴木宏一郎、茅野充男（東大・農・農芸化学）

メタロチオネインは低分子量のシステインを多く含む金属含有タンパク質で、生体内において重金属の毒性を軽減するなどの役割を持ち、幅広い生物種に存在している。植物においては、フィトケラチンが発見されているが、哺乳類タイプの遺伝子からの直接の転写産物としてのメタロチオネインの存在は明確でない。本研究では、大豆を材料として用い、その胚軸よりCu,Zn含有タンパク質の精製を行い、その性質を明らかにすることを目指している。

大豆胚軸よりタンパクを抽出し、エタノール、クロロホルムを用いた粗分画の後ゲル濾過（Sephadex G-75）を行った。流出液についてCu,Zn濃度を測定して3個のピークを確認した。その分子量約17kDのピークを回収し、バッファー交換し、コバレントクロマトグラフィーカラム（Thiopropyl-Sepharose 6B）にかけた。0.3M酢酸アンモニウム（pH5.5、1M NaCl）で洗浄後、50mM Tris-HCl（pH 8.0、1M NaCl、50mM DTT）で溶出した後、SH基を4-ビニルピリジンによりアルキル化し、二次元電気泳動により解析したところ、分子量7kD、14kD、20kDの三種のSH基含有タンパク質の存在が明らかになった。そのアミノ酸配列及び重金属親和性について検討した。

中村進一、林浩昭、茅野充男（東大・農・農芸化）

イネ篩管液において、光条件に支配されるタンパク質のリン酸化、脱リン酸化反応が生じること、およびイネ篩管液の14kDa、22kDaのタンパク質などが*in vitro*でリン酸化されたことから、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。このことによりイネ篩管内において情報伝達が行われているが予想されるので更に詳しく検討した。

〈実験方法〉水耕栽培で育てたイネ（観稻）から、インセクトレーザー法により篩管液を採取し、そのタンパク質の*in vitro*リン酸化反応を種々の条件下で調べ比較検討した。

〈実験結果〉自己リン酸化するタンパク質の検出をイネ篩管液タンパク質を用いて試みたところ、カルシウムを含む反応液中でのみこの反応が起こった。またカルシウムの反応阻害剤である塩化ランタンによってリン酸化反応が著しく阻害された。従ってイネ篩管液中のプロテインキナーゼはカルシウム依存性であると予想された。更にリン酸化されたタンパク質をアルカリ加水分解したところ、リン酸化されたタンパク質はほとんどすべてが脱リン酸化されたことからセリン・スレオニン残基がリン酸化されていることが判明した。

2pA 07

オジギソウADPaseの精製と性質

・ 佐原 敬、伊藤隆二、田宮 徹、土屋隆英（上智大
・ 理工・化学）

オジギソウにはATPよりもADPを優先的に加水分解するADPaseが存在する。このADPaseは非常に高い活性を有し、3種のアイソザイムが存在する。本酵素はATPよりもADPを強く分解する基質特異性を持つ点でアピラーゼと異なる。我々はこの様な性質を持つ酵素が他の植物にも存在することを既に明らかにした。今回、オジギソウADPaseの生体内での機能の解明のために、本酵素を精製し、酵素化学的性質を明らかにすることを目的とした。

オジギソウADPaseの3種のアイソザイムは、Davis-PAGEで移動度の異なるバンドとして検出された。アイソザイムはいずれも分子量約13万と推定され、SDS-PAGEでは各々6万7千のバンドとして検出されたことから二量体タンパク質と考えられた。Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺などの2価金属イオンで活性化され、至適温度35~40℃、至適pH 8付近であった。基質特異性については、アデノシン以外の塩基の場合でもヌクレオチド三リン酸よりもヌクレオチド二リン酸に対する活性が高かった。またAMP、pNPPは分解せずホスファターゼと異なっていた。各種阻害剤の活性への影響を調べたところ強く阻害するものはなかった。ATP、ADPを基質としたときのKm、Vmaxについて検討したところ、KmはいずれのアイソザイムもADPの方が小さくADPの親和性が高かった。VmaxもADPの方が極めて高かった。以上の基質特異性、阻害剤の感受性、ATPよりもADPに対する親和性の高さなどからこのADPaseの機能を知ることは大変興味深いことである。現在、オジギソウADPaseの機能解明をするため酵素化学的性質について解析を深め、更に酵素組織化学的手法により細胞内局在を明らかにすることを試みている。

2pA 08

モヤシマメの桂皮酸4水酸化活性を持つP450と
NADPH cyt c(P450)還元酵素の精製
・ 水谷正治、太田大策、佐藤了
(日本チバガイギー国際科学研究所)

シトクロム450はプロトヘムを含む膜結合蛋白質であり、基質に1原子の酸素を付加する反応を触媒するモノオキシゲナーゼである。植物組織中では様々のP450がリグニン、フラボノイド、ステロール、ジベレリン、ファイトアレキシン等の生合成に関与しているが、酵素の精製が困難であり植物におけるP450の研究は進んでいない。

そこで植物組織中に比較的多く存在しフェニルプロパノイド生合成経路において重要な役割を果たしている桂皮酸4水酸化活性を持つシトクロムP450(C4H)及びNADPH cyt c(P450)還元酵素の精製を試みた。Mung bean黄化苗ミクロゾームを2% Triton X-114で可溶化後、両酵素について各種クロマトグラフィーを行なった。C4Hは、DEAE Sepharose、hydroxyapatite、カチオン交換、アニオン交換カラムクロマトグラフィーにより分子量58KDaの電気泳動的に均一の標品に精製された。C4Hは、酸化型では低スピン型の吸収スペクトルを示し基質であるtrans桂皮酸の添加により高スピン型への吸収スペクトル変化が見られた。NADPH cyt c還元酵素はDEAE Sepharose、hydroxyapatite、2'5'-ADP Sepharoseクロマトグラフィーにより可溶化画分から230倍に精製することができ、電気泳動的に均一な81KDaの標品を得た。この酵素の光吸収スペクトルは動物由来の還元酵素のスペクトルとよく一致していた。また両酵素はDLPCを用いた再構成系において高い桂皮酸4水酸化活性を示した。現在、両酵素標品の部分アミノ酸配列を決定中である。

小柴 共一 (都立大・理・生物)

トウモロコシ子葉鞘先端部より、インドールアセトアルデヒド (IAAld) を酸化してインドール-3-酢酸 (IAA) を生成する活性を触媒するアルデヒド酸化酵素 (aldehyde oxidase) を、タンパク質に対する比活性でおよそ 700 倍まで精製し、その性質を調べた。

トウモロコシ子葉鞘は、種子を、25°C、赤色光下 2 日間、暗所 1 日間で発芽させた芽生えより、先端部およそ 1 cm を緑色光下で切取ったものを用いた。およそ 200 g の試料より抽出した粗酵素液から、硫酸分画、DEAE-、Butyl-TOYOPEARL、ヒドロキシルアパタイト (HA-1000)、DEAE-5PW、G3000SW_{xL} カラムクロマトグラフィーにより精製を進めた。酵素活性は、IAAld を基質とし生成する IAA を HPLC (ODS カラム) を用い測定した。その結果、① 分子量、およそ 150 kD のサブユニット 2 個からなるタンパク質である、② IAAld 以外のアルデヒド (ベンズアルデヒド、ブチルアルデヒド、フェニルアセトアルデヒドなど) も基質とする基質特異性の低い酵素である、③ 280nm のタンパク質に由来する吸収以外に 340, 430, 456, 478nm 付近に特有の吸収を示す、ことなどが明らかになった。これらの性質は、この酵素が動物などで報告されているアルデヒド酸化酵素ときわめて類似した、非ヘム鉄、フラビン、モリブデン等を含むタンパク質であることを示している。現在、本酵素の IAA 合成への関与の可能性を明らかにするため、より詳細な検討を進めている。

○國松聖司、倉本猛史、山形裕士、相園泰生、岩崎照雄
(神大・農・農化)

イネ科種子のズブチリシンインヒビターのうち、麦類のインヒビターについては内在性 α -アミラーゼも阻害する双頭型の二機能性インヒビターであること等、その特性が明らかにされている。今回、我々は、未だ特性が不明確であるイネ種子ズブチリシンインヒビター (RSI) の存在部位、精製及び特性について報告する。

RSI は、種子外層に局在することを既に報告したが、さらに米糠を非水系溶媒を用いる分画遠心により単離した Aleurone 顆粒中に存在することを抗体を用いて確認した。また、脱脂米糠より硫酸沈澱、各種カラムクロマトグラフィーで RSI を均一にまで精製した。分子量は SDS-PAGE で 21 kD、DNS 法で決定した N 末端アミノ酸は Ala であり、アミノ酸組成分析の結果からも RSI は加藤ら (第 22 回蛋白質構造討論会要旨 p. 101, 1971) の SI と同一のインヒビターと考えられた。また等電点は 9.05 であった。RSI はズブチリシン Carlsberg と 1:1 のモル比で結合し、ほぼ 100% 阻害したが、Nagarse は約 55% しか阻害しなかった。またアルカリ性より酸性下で、熱に対してより安定で、pH 5 では 100°C、10 分後でも約 80% の活性を有していた。

RSI は、部分精製したイネ α -アミラーゼを 20% 程度阻害し、二機能性を有することが明らかになったが、大麦 α -アミラーゼに対する阻害率は低く、大麦インヒビターがイネよりも大麦 α -アミラーゼを強く阻害したのとは対照的であった。

2pA 11

ヒガンバナレクチンの精製と性質

○八木史郎、野口繁基、Irwin J. Goldstein¹(鹿児島大学・農学部・応用生化、¹ミシガン大学・生化学)

最近、単子葉植物の球根や葉からマンノース特異的レクチンが分離精製され、その糖鎖特異性が詳細に調べられているが、それらは共通の特徴をもつとされている。すなわちマンノースの三糖(アスパラギン型糖鎖のコア)を強く認識するがオボアルブミンは結合しない。またマンノースをリガンドにもつアフィニティ担体に1M (NH₄)₂SO₄存在下で結合し、この方法で精製される。ヒガンバナ科、ユリ科、ラン科の植物から同様なレクチンが精製されている。我々はヒガンバナ球根に強いウサギ赤血球凝集活性を認め上述のアフィニティークロマトグラフィで精製を試みたが果たせなかった。そのため、イオン交換クロマトグラフィとゲルろ過でヒガンバナレクチンを精製した。このレクチン(電気泳動で主に二成分)はオボアルブミンカラムに強く吸着されメチル α -マンノシド、pH 1.5グリシン塩酸緩衝液では溶出されない。8M尿素でのみ溶出された(活性は1/8に減少した)。マンノースは弱い活性阻害しか示さず、フェチュイン、アシアロフェチュイン、オボムコイドは強い阻害を示し、この点でも他のマンノース特異的レクチン(単子葉植物の)と異なっていた。

2pA 12

トウモロコシ葉の可溶性プロテアーゼの精製と性質
小沢 新, 塩井 祐三, 高宮 建一郎 (東工大・生命理工・生体機構)

イネ、ムギの緑葉中には、リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RubisCO)などの蛋白質を分解する数種の可溶性プロテアーゼの存在が示唆されているが、精製されて詳しくその性質が調べられているのはごくわずかである。我々は、トウモロコシ成葉から同様のプロテアーゼを単離・精製したので、一昨年の本大会の続報として、その性質を報告する。

【方法】トウモロコシ成葉を破碎後遠心し、得られた上清を粗抽出物として用いた。粗抽出物を硫酸分画、DEAE-イオン交換クロマト、ブチルトヨパール疎水性クロマト、ゲルろ過、ハイドロキシアパタイトクロマトをおこない、SDS-PAGE でほぼ単一のバンドにまで精製した。プロテアーゼの活性は、ハウレンソウ RubisCO を基質として用い、大サブユニットの SDS-PAGE でのバンドの消失を測定することによりおこなった。

【結果と考察】サブユニットの分子量は SDS-PAGE で 39kDa, native form では約 310kDa と求められた。この酵素の活性発現にはメルカプトエタノール等の SH 剤と、SDS 等の界面活性剤の共存が必要である。SDS 以外にはラウロイルサルコシンNa, 臭化セチルトリメチルアンモニウム, 塩化ラウリルピリジニウムが有効であったが、トリトン-X100, Tween-20, Brij-35, LDAO, CHAPS, (デオキシ)コール酸などは無効であった。最適 pH は 5.1であった。活性は、ヨード酢酸, ロイペプチンによって阻害されたが、PMSF, アンチパインによってはほとんど阻害されなかった。これらのことから、この酵素は、SH 酵素であり、液胞に存在していると考えられる。牛血清アルブミン, 卵白アルブミン, ヘモグロビン, カゼイン等を基質として用いた時の分解速度は RubisCO の数分の一以下であった。

2pA 13

植物に存在する高分子量プロテアーゼの精製とその性質

大泉宏,[○]森安裕二, 三好泰博, L.Malek¹

(静岡県立大・教養・生物,¹Lakehead Univ.)

シヤジクモ植物, ホウレンソウ, タバコ培養細胞を用いて suc-leu-leu-val-tyr-MCAを加水分解するプロテアーゼを native PAGE後の活性染色により検索した。その結果, いずれの植物にも移動度をほぼ同じくするプロテアーゼの存在することがわかった。このうち, シヤジクモ植物より, この酵素を DEAEイオン交換クロマトグラフィー・調製用 PAGEで精製してその性質を調べた。精製標品は native PAGEで単一のバンドを与え, SDS-PAGEで, 分子量が 26,000 から 32,000 の約 6本のバンドにわかれた。分子量はゲル濾過により約 600,000 であった。酵素活性は 0.02-0.03%の SDSにより約 10倍に増加し, 最適 pHは 8.5 であった。この濃度の SDS添加条件下において, 基質が存在すれば, 酵素は少なくとも 2時間は安定であったが, 基質が存在しないと, 酵素は約 10分で失活した。この酵素活性は NEM, pCMB, leupeptin, antipain, chymostatinにより阻害されたが, E-64は効かなかった。DFP, PMSFは効果がなかった。phenanthroline (1mM)は阻害したが, EDTAは効かなかった。pepstatinは効果がなかった。ホウレンソウから精製した酵素標品もほぼ同様の性質を持つことを確認した。この酵素はプロテアソーム (multicatalytic proteinase)に相当する酵素であると考えられるが, 現在さらに詳しい検討を行っている。

2pA 14

クロレラの細胞壁溶解酵素の精製とその性質

[○]吉元 誠、金子伸江、城斗志夫、波多野昌二
(九大・農・食化工)

我々の研究室では、*Chlorella ellipsoidea* Gerneck (IAM C-27)の耐凍性獲得の機作について研究している。最近、市販のカーボハイドラーゼ類にクロレラの粗抽出液を組み合わせるにより、プロトプラスト化に成功した。しかし、本クロレラの細胞壁溶解酵素については、ほとんど解明されていない。今回、本酵素をクロレラの抽出液から精製し、その性質について検討したので報告する。

クロレラの細胞破砕物の超遠心上清から、Toyopearl HW-55F、DEAE-Sepharoseによるカラムクロマトグラフィおよび調製用ポリアクリルアミド電気泳動により、細胞壁溶解酵素を約 210倍に精製した。回収率は 23%、最終標品は SDS-PAGEで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約 22kDで、等電点は約 6.3であった。酵素は約 30℃までは安定であり、至適温度は約 40℃であった。酵素の至適 pHは 8~9で、pH6~9の範囲で安定であった。Ca²⁺、Mg²⁺および Mn²⁺は、酵素活性を約 5~8倍促進し、その作用は Ca²⁺が最も強かった。一方、Zn²⁺および Fe²⁺は酵素に対して阻害作用を示した。蛋白質分解酵素の阻害剤について検討した結果、モノオード酢酸は、酵素を阻害したが、DFPおよび EDTAは何等影響を及ぼさなかった。

2pB 01

イネ発芽期における活性酸素除去系酵素への低温の影響

○猿山晴夫、谷田昌稔（北海道グリーンバイオ研究所）

植物には活性酸素除去のための酵素がいくつか存在するが、それら酵素遺伝子の発現や、酵素活性が、低温傷害からの防御に関係する事が示唆されており、我々も、イネ種子胚のカタラーゼ比活性と低温発芽能との高い相関をすでに報告している（1）。今回、我々は、イネ幼苗期の活性酸素除去関連酵素（スーパーオキシドディスムターゼ SOD、カタラーゼ CAT、アスコルビン酸パーオキシダーゼ APX、グルタチオンリダクターゼ GR）や、TCA 回路のイソクエン酸脱水素酵素（IDH）等に対する低温処理（chilling/5℃、または10℃/7日）の影響を初期耐冷性強品種（USSR-22）と弱品種（K選4号）を用いて比較研究した。

両品種を Chilling 後に、25℃に戻してその生育を調べたところ、USSR-22 はその後も順調に生育したが、K選4号は、著しい傷害を受け枯死した。SOD は両品種とも Chilling による活性変化は見られなかったが、25℃へ戻して 2 日後の芽、葉そして根において最大 2.5 倍ほどに活性が上昇した。一方、CAT は、両品種とも chilling によって著しく活性が低下した。しかし、25℃に戻した後の活性回復は USSR-22 で顕著であり、芽では約 2 倍の活性上昇を示した。APX についても 25℃に戻した後の活性に両品種間で大きな差が認められた。すなわち、USSR-22 では芽と葉で活性が増大したのに対し、K選4号では活性は低下する傾向にあり、特に根では、著しい活性の低下が見られた。GR や IDH では chilling の影響は殆ど認められなかった。

以上の結果から、イネの低温傷害に対する防御と回復には、活性酸素除去系酵素の中でも特に CAT や APX が非常に重要であり、それら酵素遺伝子の発現や酵素の低温耐性が要求されるものと思われる。（1）日本農芸化学会 1990 年大会講演要旨 P.365

2pB 02

イネ培養細胞の塩ストレスによる傷害と細胞内 pH 変化

○朽津和幸、矢崎芳明、笠毛邦弘¹、坂野勝啓、渋谷直人
（農水省・生物研、¹農水省・食総研）

植物細胞が塩ストレスを受けると、細胞内に Na⁺が流入し、K⁺が流出することが知られているが、細胞が傷害を受ける機構は明らかではない。我々は昨年の本大会において、イネ液体培養細胞から単離した液胞膜におけるピロリン酸依存性プロトン輸送には K⁺が必要で、Na⁺により強く阻害されることを報告した。イネ培養細胞の生育は、ほぼ同程度の濃度（50-100mM）の NaCl によって阻害された。液胞膜のプロトンポンプが塩ストレスによる 1 つの標的となっている可能性が考えられたので、*in vivo* ³¹P-NMR法を用いて、細胞質と液胞の pH 変化を解析した。細胞を培養時に近い濃度に懸濁し酸素を通気することにより、生理的条件を保ったまま細胞質と液胞の pH を経時的に測定できた。通常の培養条件では細胞質の pH は約 7.5 で、液胞は約 5 であった。細胞が塩ストレスを受けると、数十分のうちに液胞の pH は 6 近くまで上昇し、液胞がアルカリ化された。細胞質の pH は、弱い塩ストレスの場合にはほぼ一定に保たれたが、高濃度の NaCl にさらされた場合や、培地中の Ca²⁺を除いた場合には、酸性化が見られた。すなわち、細胞体積の大部分を占める液胞には細胞質の数百倍の H⁺が蓄積されているが、塩ストレスを受けると、液胞から細胞質に H⁺が漏出することが明らかとなった。このように、H⁺などのイオンの細胞内のコンパートメンテーションが大きく乱されることが、塩ストレス傷害の重要な原因となっている可能性が考えられる。

2pB 03

クロレラ細胞における重水素の増殖阻害作用

○小池千恵子、海野けい子、安藤一郎、横柿修一、
岡田昌二（静岡県大・薬・放射薬品）

水素の安定同位体である重水素（D）の同位体効果として、細胞増殖阻害作用が知られている。この機序解明のため、同調化したクロレラ細胞（Chlorella ellipsoidea C-27）を用い、細胞のphaseによるDの作用の違いを検討した。

通常のH₂O培地中でクロレラ細胞を同調化し、Dn-phase（分裂直後の幼細胞）、D~L-phase（成長途中）およびL₁L₂-phase（分裂準備期）の細胞を得た。これをD₂Oで調製した培地に移し、その後の増殖から阻害の程度を比較した結果、phaseの違いにより細胞のDに対する感受性が異なることが見いだされた。すなわち、D~L-phase cellが最も阻害が大きく、次いで、L₁L₂-phase、Dn-phaseの順に阻害作用を受けることが示された。同時に細胞微細構造の変化を検討したところ、Dにより増殖が阻害されている間の特徴的な変化として、D~L-phase cellにおいてD₂O培地中に移植2日後以降、原形質膜付近に多数の小胞の形成がみられ、増殖阻害との関連が考えられた。また炭酸固定量はDにより大きく抑制され、これはD~L-phase cellにおいて顕著であった。ATPaseの活性の変化もDn-phase cellよりD~L-phase cellで大きく、D₂O中での細胞内ATP代謝に与える影響が大きいものと考えられた。以上から、代謝が活発な成長途中の細胞の方がDにより傷害を受けやすいことが示唆された。

2pB 04

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、栗山典子、渡辺真弓、萩間奈緒子、
岡田昌二（静岡県大・薬・放射薬品）

演者らは水素の安定同位体である重水素(D)により、クロレラ細胞（Chlorella ellipsoidea C-27）の熱感受性が変化することを見いだしたことから、今回、クロレラ細胞の蛋白質の熱変性、及びATPase活性に対するDの影響について検討した。

細胞はD₂O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D化したクロレラ(D-クロレラ)を用いた。これら細胞の細胞質蛋白画分について、45°C、1 hの熱処理を行い変性した蛋白質量を測定した。また予め37°Cで熱処理し、熱ショック蛋白質(HSP)を誘導合成させた細胞の蛋白質画分での変性、及び45°C熱処理時でのATP添加の影響について調べた。その結果通常のH₂O培地で培養したクロレラ(H-クロレラ)では、予備加熱した試料で、ATP添加により変性蛋白質量が減少し、誘導合成されたHSPの効果が示された。一方、D-クロレラではそれらの効果ははっきりせず、HSP誘導量の低下とD化蛋白質での変性増大が考えられた。次に熱処理によるATP代謝への影響を見るため、ATPase活性の変化を調べた。その結果、H-クロレラでは熱処理によりF₀F₁型ATPaseの活性が上昇したが、D-クロレラでは上昇は僅かであり、熱処理後傷害回復のために必要なATP供給が十分になされないことが示唆された。これらのことからHSP及びATPの不足、D化蛋白質の変性増大等がD-クロレラの熱感受性増大をもたらしていると考えられた。

2pB 05

冬期紅葉化した常緑木本葉におけるNMR緩和時間への
アントシアニンの関与。
賀来章輔¹・井上眞理²・土岐健次郎²
(九大・教養・生物、南九州大・園芸)

冬期、紅葉化した常緑木本植物の葉組織における水プロトンのNMR縦緩和時間(T_1)へのアントシアニンの影響を調べるために次の研究を行った。サツキ、サンゴジュ、ヒイラギナンテンの3植物を供試し、厳寒期2月の同一の枝から通常葉(以下、緑葉)と紅色化葉(以下、紅葉)を選び、 T_1 、含水量、アントシアニン含量及び葉肉における紅色化したアントシアニン含有柔細胞の組織内分布などについて調べた。サツキとサンゴジュの紅葉では、緑葉に比べ含水量が明らかに減少しているが、ヒイラギナンテンの紅葉の含水量の減少は極めて僅かであった。一方、 T_1 は3植物いずれでも緑葉と紅葉では差が殆ど認められなかった。紅葉におけるアントシアニン含量の増加と、アントシアニン含有柔細胞の葉肉組織における分布はサツキとサンゴジュにおいてとくに顕著であった。これらのことは両植物における厳寒期の紅葉が、緑葉に比べ含水量が減少しているにも拘らず、 T_1 値が一定であることに関与していることを示唆する。 T_1 のアントシアニンの濃度依存性を*in vitro*で調べた結果から類推すると、アントシアニン含量が多いことより、アントシアニンが葉肉組織の多くの柔細胞でコンパートメント化して存在することが T_1 を高いレベルで維持するの有効に作用しているものと考えられる。

2pB 06

ホソバノハマアカザのベタイン合成経路
坂口博英 間藤 徹 (京大農化植栄)

多くの植物で塩ストレスに対応してベタインを蓄積することが知られている。アカザ科の塩生植物ホソバノハマアカザ(ホソバ)では構成的にベタインを蓄積しているが、培地塩濃度の上昇にとともにさらに濃度が上昇する。我々はベタインは細胞内では細胞質に局在することを示したが、体内でも特に若い葉に高かった(100mM<)。そこでベタイン濃度の高い若い葉(young)と古い葉(old)にベタインの前駆体と考えられるコリン(Cho)、エタノールアミン(EA)を与え、これらがベタイン(Bet)へ代謝される速度、経路を検討した。50mMNaClを与えて水耕栽培したホソバ緑葉から裏皮を剥いた直径4mmのleaf discを調製し、これを14C前駆体と明所でincubateした。Choはどちらの葉でも同じ速度でBetに変換された。EAを与えた場合、14C比活性はphosphoryl EA, Phosphoryl Cho, Cho, Betの順に経時的に上昇し、BetはEAのリン酸化、phosphoryl EAのメチル化、phosphoryl Choの脱リン酸、Choの酸化という経路で合成され、Cho生成はEAの直接のメチル化やphosphatidyl誘導体を経由しないと推定された。EAを与えた場合にはyoung, old葉でBet生成量に差がありEA→Choの間で何らかの制御がかかっていると考えられた。そこでEAを与えchaseを行うとBet生成量の少ないold葉ではラベルはphosphoryl EAに顕著に認められ、メチル化の段階がホソバのベタイン合成系を律速している可能性が考えられた。

2pB 07

ゼニゴケ培養プロトプラストのストレス耐性

菅原康剛、竹内正幸（埼玉大・理・生体制御）

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) カルスから単離したプロトプラストでは、培養によって細胞壁の再生、分裂が起こる。この培養過程で再生細胞を凍結あるいは脱水に対する耐性を調べると、培養開始 18~20 時間で最大になる。このような高い耐性はカルスの組織では見られないこと、また、この耐性の変化は、(1) 細胞壁再生の変化とよく一致していること、(2) 細胞分裂の起こらない暗条件でもみられること、(3) 細胞壁を再生した細胞（再生細胞）の酵素処理によって再度細胞壁を除くと耐性が失われることから、細胞分裂よりもむしろ細胞壁の再生過程と密接に関連して起きていることが示唆された。しかし、プロトプラストあるいは再生細胞の脱水に使用する高濃度 (2.0 M、4.2 Osmol) の平衡塩溶液 [Scarsh: Plant Physiol., 16, 171(1941)] 中で細胞壁分解酵素を処理すると、細胞壁は消失するが耐性は維持された。これらの結果から、再生された細胞壁そのものが耐性の獲得に関与しているのではなく、細胞壁の再生過程あるいはこの過程に平行して起こっている細胞の変化が耐性獲得に係わっていることが示唆された。

2pB 08

イネ生殖器官の冷温ストレスによる糖代謝異常

川口健太郎、小池説夫（農水省・北海道農試）

イネ穂ばらみ期障害型冷害は、冷温ストレスによる雄性生殖器官（葯）での小胞子の発育阻害が原因で発生する不稔現象である。冷温を感受した葯ではタベート細胞¹⁾の異常肥大が観察され、また非還元糖が増加すると報告されている²⁾。そこでこのタベート肥大現象は、冷温ストレスによる糖代謝異常が引き起こした浸透圧攪乱が主な原因と考え、特定器官の主要な糖含量と糖代謝系酵素活性の冷温処理による変動を測定した。材料は冷温処理によるタベート肥大の顕著な、北海道イネ品種「ゆきひかり」の突然変異系統 YM56-1（北海道立上川農試、菊地治巳氏より分譲）を用いた。

その結果、冷温処理により、葯に含まれるスクロース及びスターチが約 2 倍に増加するとともに、未同定のオリゴ糖についても量的な変化が見いだされた。また、葉身と幼穂について糖代謝系酵素活性を比較したところ、冷温処理により数種の酵素について活性変動が認められた。特に UDP グルコースピロフォスフォリラーゼ活性は幼穂でのみ低下が著しく、対照区の約 30% であった。これらのことは特定の代謝系の冷温感受性が器官によって異なることを示唆している。

- 1) タベート細胞：葯壁最内層にあって小胞子に栄養を供給する機能を持つ細胞
- 2) Ito N. (1978) Proc. Crop Sci. Soc. Jap. 47(2):324-329

2pB 09

ユリ薬冷温障害の発生機作

○小池説夫、松井博和¹（農水省・北海道農試、²北大・農・農化）

イネ薬の最高冷温感受性時期は、減数分裂終了直後の小胞子初期であることが明らかにされている。この時期の冷温障害の発生機作解明のため、モデル植物として大型の薬を持つテッポウユリを用いて実験を行った。8℃4日間処理で、ユリでも花粉発育障害がみられ、最高冷温感受性時期が小胞子初期であることが確かめられた。この感受性期の特徴として、減数分裂が終了した四分子細胞が四つの小胞子細胞として薬腔液に遊離するステップがあり、これには四分子細胞外膜（カロース膜）の溶解反応が係わっている。冷温処理はこのカロース膜溶解反応に係わる酵素カラーセ： β -1, 3-グルカナーゼ活性を著しく低下させ、小胞子発育の進展をおくらせること、また、この酵素活性発現に伴う薬腔液のpH低下（6→5）を攪乱させることが判った。このように、冷温障害の発生機作に β -1, 3-グルカナーゼの活性発現調節が深く関与していることから、この時期の薬に特異的に発現している本酵素の生成・分布・分泌・活性発現の解明を目指すことにした。そこで、まず、ユリの葉から常法に従い精製・単離した β -1, 3-グルカナーゼのN末端部分一次構造を決定した。これに基づき調製したオリゴヌクレオチド・プローブ等を用いて、小胞子初期ユリ薬のcDNAライブラリーからの本酵素遺伝子のクローニングを現在進めている。

2pB 10

ハウレンソウ緑葉において低温ストレスにより誘導される耐熱性タンパク質

○数岡徹、大江田憲治（住友化学・宝塚総研）

低温ストレスやアブシジン酸(ABA)により誘導される LEA (late-embryogenesis-abundant) タンパク質ファミリー等は極めて hydrophilic である。それ故、これらはボイルしても熱変性による凝集が起らず上清にとどまるといふ耐熱性タンパク質である。そこで、我々はこれらの耐熱性タンパク質に着目し、ハウレンソウを用いて低温ストレス誘導される耐熱性タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、低温処理4日目にして、細胞内に蓄積する3つの耐熱性タンパク質、HES140, 85, 82 (140, 85, 82kDa heat-stable proteins) を検出した。これら3つのタンパク質は低温処理期間中に葉と茎で特異的に蓄積し、根では全く蓄積しなかった。

一方、Wheat germ system による *in vitro* translation 法を用いて、低温ストレス誘導される mRNA 量の変化を調べた。その結果、低温処理した葉において HES 140 と 85 に対応する mRNA の蓄積が認められたが、HES82 に対応するそれは検出されなかった。これらの結果は、HES140, 85 の低温ストレス誘導が遺伝子の発現レベルで制御されていることを示唆する。さらに、HES85 の合成は ABA, 乾燥ストレス及び傷害ストレスによっても誘導された。本講演では、これらの低温ストレス誘導耐熱性タンパク質のストレス防御における役割について議論する。

2pB 11

植物の塩基性および酸性キチナーゼの生産分泌の調節

°豊田安基江、北林雅夫、早川弘美、江坂宗春
(広島大・生物生産)

目的:高等植物に認められるキチナーゼは、植物の生体防御に関わっていると考えられている。これまでの研究で、カボチャ培養細胞を液体培養した時に、培地中に大量に分泌されるタンパク質が塩基性キチナーゼであるとわかっている。また、シカクマメの液体培養においても培養後期にキチナーゼの分泌が認められた。これらキチナーゼの分泌調節についての研究を行ったので報告する。

方法及び結果:カボチャキチナーゼについて、カボチャ果実組織における傷害ストレスに対する応答性を調べた結果、傷害後、キチナーゼ活性の著しい増大が認められた。カボチャ特異抗体を用いた組織プリント法の結果から、傷害を与えた直後ではキチナーゼが果実組織表皮に、わずかな量局在していたのに対し、傷害後3日目では切片全体に相当量のキチナーゼが認められた。

シカクマメ液体培養において、培養後期に大量に分泌されるタンパク質が認められた。培養後30日目の培地から本タンパク質を精製し、アミノ末端側のアミノ酸配列を17残基決定した結果、本タンパク質がタバコやキュウリの酸性キチナーゼとホモロジーを有していることがわかった。一方、耐塩性シカクマメ培養細胞において特異的に分泌される6種のタンパク質のうち、1つがアミノ末端側のアミノ酸配列により、塩基性キチナーゼであることが判明した。また、カボチャキチナーゼと免疫学的類似性が認められた。

2pB 12

好大気汚染物質植物の育成

(2) 野生植物の NO_2 に対する気孔開閉応答

°檜垣朝、濃野昌子、鎌田光宜、中田政司、豊原源太郎、
藤田耕之輔¹、森川弘道 (広島大・理、¹広島大・生物生産)

我々は、大気汚染物質の一つである NO_2 を高度に同化し、 NO_2 にN源を依存して生育する好大気汚染物質植物の開発を目指して研究を進めている¹⁾。¹⁵ NO_2 を用いた暴露実験法により、野生および栽培植物の NO_2 同化能力を調べた。これまでに合計約140種について調べ、キク科、アブラナ科に同化能力の高い植物がみられ、一般に野生イネ科植物は同化能が低いことが分かった。同能力最大と最小植物の差は約40倍であった。次に、野生植物のうち同化能の高い数種と低い数種について、気孔の NO_2 に対する開閉応答(蒸散量)を重量法を用いて測定した。チェンバー内の電子天秤上に鉢植えの植物体をのせ、明所、一定湿度条件下で3-5ppmの¹⁵ NO_2 に暴露し、蒸散速度を¹⁵ NO_2 添加前および添加後8時間にわたって連続測定した。また暴露終了後、常法により植物中の¹⁵ NO_2 同化量を定量した。その結果、蒸散速度は、¹⁵ NO_2 添加により①変化しない(または増加する)、②一過的に減じ、もとのレベルに戻る、③一過的に減じ、もとのレベルに戻るがゆっくり減少する場合に分けられた。他方、 NO_2 同化能力の高い種(または個体)が①とは限らなかった。また逆に同能力の低いものが③とは限らなかった。以上の結果から、 NO_2 同化能力の差異は気孔開閉(蒸散速度)応答の差異では説明できないと結論された。

1) 日本植物学会第56回大会・研究発表記録 p.316.

2pB 13

好大気汚染物質植物の育成 (3) 道路沿い野生植物の生態学的特徴と好NO₂植物について

豊原源太郎・濃野昌子・檜垣朝・鎌田光宜・中田政司・藤田耕之輔¹・森川弘道(広島大・理, ¹広島大・生物生産)

環境ストレスが植物の種の分化を生じさせる原因になると言われている。特に、大気汚染、重金属汚染、薬剤散布などの人類文明に起因する環境ストレスのもとでは、比較的短期間で植物の個体群に遺伝的な変化が生じ、数十年間で汚染耐性植物が出現している。道路沿いに生育する雑草は強い環境ストレス下に置かれているので、NO₂耐性植物の形成が予想されるが、逆にNO₂を好む植物も含まれている可能性がある。生態学的に予想されるのは、好窒素植物が土壌中の窒素養分の不足した状態に置かれたとき、排気ガスのNO₂を直接気孔から取り込んで利用する形質を得たならば、ストレス下で生存が可能となり、同時に他の排気ガスに弱い植物の生育が抑えられるために有利な条件となることであり、好窒素植物は好NO₂植物の有力な候補者と考えられる。雑草、野菜、園芸植物などには好窒素植物が多くみられることから、まず雑草から好NO₂植物を選別することを試みた。そこで、道路沿いの雑草の生態を調査し、どの種が排気ガスの多い所に生育しているのか調べた。次に、植物の種によるNO₂同化量の違いを測定し、また、同種の個体群間での違いを調べた。その結果、道路沿いの雑草にはキク科とイネ科の植物が特に多く見られ、キク科植物の中にはNO₂同化量の多いものが含まれていて、逆にイネ科はNO₂耐性型の植物であった。また、マメ科などの菌根植物のNO₂同化量は少なかった。

2pB 14

好大気汚染物質植物の育成 (4) ホウレンソウNiR cDNAを導入したトランスジェニックシロイヌナズナ植物の作成

鎌田光宜, 神 幸夫, 澤崎達也, 関 原明¹, 井田正二², 森川弘道(広島大・理, ¹京大・農, ²京大・食研)

大気汚染物質であるNO₂は気孔を通して植物葉に吸収、硝酸同化経路で同化され、NO₂由来の窒素はアミノ酸、タンパク質に固定される。また亜硝酸還元酵素(NiR)活性は概日リズムにより変動し、夜間には大きく低下するため亜硝酸が蓄積して植物に傷害を及ぼすと考えられている(米山ら1978年)。外来プロモーターの制御下にあるNiR遺伝子を導入したトランスジェニック植物を作成し、得られた植物のNiR活性の日周期による変動、NO₂同化能力などを生理・生化学的に解析することは、好NO₂植物(生育に必要な窒素源をNO₂ガスに依存するような植物)の開発に関する分子生物学的基礎知見を与えるものとして興味深い課題である。

本研究ではシロイヌナズナを実験材料とした。本植物は演者らがこれまでに調べた約140種の野生、栽培植物の中ではNO₂同化能力の比較的高い植物であり、形質転換法による好NO₂植物の開発植物材料としても好適である。

CaMV35Sプロモーターの制御下にあるホウレンソウNiR cDNAおよび同プロモーターの制御下にあるピアラフォス耐性遺伝子(bar)を有するプラスミドpMKB17(CaMV35S pro-NiR cDNA-NOS ter, CaMV35S pro-bar-NOS ter)を構築した。本プラスミドを常法によりシロイヌナズナ植物根組織にパーティクルガンを用いて導入した。導入処理2日後、ピアラフォス2ppmを含む莖葉誘導培地に移植して選抜を開始し、約2週間後に緑色の耐性カルスを得た。これらを4-7日毎に植え継ぎ2週間後に莖葉(6系統)が形成された。現在、莖葉からの個体再生について研究中である。

2pC 01

コムギEcプロテイン(メタロチオネイン)遺伝子の
クローニングと発現

°川嶋一郎、茅野充男、Byron G.Lane¹ (東大・農・
農化、¹Univ.of Toronto)

メタロチオネイン(MT)は、低分子量、システインリッチな重金属結合タンパク質であり、多くの生物種で存在が知られている。一方、Ecプロテインはコムギ成熟胚より精製されたZn結合タンパク質であり、その部分アミノ酸配列(59残基)がMTに特徴的なCys-X-Cys配列を含むことよりClassIIMTに分類されている。

Ecプロテイン部分アミノ酸配列をもとに合成した2つのオリゴヌクレオチドをプローブとし、コムギ成熟胚より作製したcDNAライブラリーをスクリーニングした結果、81アミノ酸残基中17システイン残基を含むタンパク質をコードするEcプロテインcDNAクローンを得た。またこのcDNAをプローブとしコムギゲノムライブラリーよりEcプロテイン遺伝子をクローニングし、5'上流域約2kbを含む3.1kbのフラグメントをシーケンスし、プライマーエクステンション法で転写開始点を決定した。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果、この転写産物はコムギ未熟胚中に多く、胚の成熟と共に減少し、発芽後5時間でほぼ消失することがわかった。また発芽中の成熟胚をアブジジン酸(ABA)処理または水ストレス処理すると転写産物の増加が認められた。これらの結果より、Ecプロテイン遺伝子の発現は種子特異的であり、ABA、水ストレスで誘導されることが示唆された。

2pC 02

イネ篩管液中の核酸に関する解析

°廣瀬直哉、口野嘉幸¹、大嶋利幸、茅野充男

(東大・農・農化、¹国立ガンセンター・生物物理部)

篩管液により情報伝達等の機能面を重視した研究が最近行われており、本研究ではインセクトレーザ法により採取したイネ篩管液を用いて核酸の検出を行い、植物組織においてサイトカイニンの前駆体として機能することが知られているトランスファーRNAの存在の有無とその特性の解明を試みた。

篩管液をフェノール抽出、エタノール沈澱により除タンパクを行いTE bufferに溶かしたものを電気泳動にかけたところ、低塩基数のところバンドが現れた。この様な塩基数で生理的意義のある核酸としてtRNAが考えられた。この核酸にDNase処理をして吸光度法により濃度変化を見ると、DNase処理前後で核酸濃度が1/10以下に減少し、篩管液核酸は無視できない量のDNAを含んでいることが推定された。大部分がRNAと考えられるDNase処理後の分画について、ホルムアミド分解を伴ったポストラベル法によりヌクレオチドの分析を行った。RNAをランダムに切断し、その5'末端を γ -³²Pで標識した後電気泳動にかけてゲルを切り分け、それぞれの分画からRNAを抽出した。抽出後ヌクレアーゼP₁で完全分解し、標識されたヌクレオシドについて2次元展開にかけて分析した。この結果、篩管液核酸は植物由来の特異的tRNAを多く含むことが推定された。現在、この特異的tRNAのシーケンスを決定し、その働きについて考慮しているところである。

2pC 03

傷害によって誘導される西洋ワサビ
ペルオキシダーゼ遺伝子の解析

○河岡明義*, 太田裕志, 関根政実, 新名惇彦, 高野光男
(阪大・工・応用生物, * 山陽国策バルブ・生物研)

植物においてペルオキシダーゼは多くのアイソザイムやアイソフォームから構成されているが, その機能の違いや多様性の意義についてはほとんど不明である。我々は, これまでに西洋ワサビのペルオキシダーゼ・ゲノム遺伝子 prxC1a, C1b, C2, C3 の4種類を単離したが, 今回は傷害によって誘導されるペルオキシダーゼ遺伝子について報告する。

西洋ワサビの葉部にパンチで傷害を与え, そのリーフディスクをリン酸緩衝液中でインキュベートすると, 細胞壁画分のペルオキシダーゼ活性が継時的に増大し, 3日後には1.5倍になった。この画分には, 多くのペルオキシダーゼのアイソザイムやアイソフォームが存在するので, 転写レベルで検討した。アイソザイム遺伝子に特異的DNAプローブを用いて解析した結果, prxC2 転写産物が, 傷害によって顕著に増加していた。また, 5'上流領域(約500bp)とGUSの融合遺伝子をタバコに導入し, トランスジェニックタバコのリーフディスクを同様にリン酸緩衝液中に置くと, やはりprxC2 の5'上流領域を持つものが高いGUS活性の上昇を示した。

2pC 04

アラビドプシスのペルオキシダーゼ・アイソザイムの
cDNAクローニング

○新名惇彦, 山本啓二, 関根政実, 高野光男(阪大・工・応用生物)

【目的】ペルオキシダーゼは生物界に広く分布し, 植物ではリグニンの生合成と分解, 傷害に対する応答などの機能が推定されている。我々は既に西洋ワサビのペルオキシダーゼ遺伝子をプローブに用い, 同じアブラナ科に属するアラビドプシスのペルオキシダーゼの中性および塩基性アイソザイムのゲノム遺伝子, prxCa と prxEa を得た。各アイソザイムの酵素的性質, 機能を明らかにするには, 遺伝子の植物または微生物での発現系を確立する必要がある。本研究ではアラビドプシスのペルオキシダーゼの cDNA クローニングと発現を目的とした。

【方法と結果】ゲノム遺伝子, prxCa および prxEa から予想される翻訳開始コドンとポリ A 付加シグナル付近の配列に基づき 17 - 21 mer のオリゴヌクレオチドを合成した。アラビドプシスの茎部からフェノール・SDS 法により RNA を抽出し, 後者のヌクレオチドをプライマーとした逆転写反応で生成した cDNA を PCR の鋳型とした。PCR は 両ヌクレオチドをプライマーとし, 94°C, 1.5 min: 50°C, 1.5 min: 72°C, 2 min の反応を 35 サイクル行った。その結果, prxCa, prxEa に対し, 共に約 1.1 kbp の cDNA 断片が増幅された。塩基配列は, ゲノム遺伝子で予想されたエキソンの配列と一致した。この cDNA の上流に高いプロモーター活性を持つ prxEa の 5'上流, 約 1 kbp 断片をつけ, タバコ細胞での発現を検討している。

我々は、形質転換タバコ細胞を用いて、プレプロ型前駆体構造をとるサツマイモ液胞蛋白質スボラミン前駆体の液胞への輸送機構を解析しており、すでに親水性アミノ酸に富む16アミノ酸残基よりなるプロ領域が液胞への効率良い輸送のために必要であることを報告してきた¹⁾。現在我々は、プロ領域中の液胞への輸送シグナルとして働く最少領域決定しその性質を明らかにする目的で、プロ領域の部分欠失変異及び各アミノ酸残基をグリシン残基に置換した変異を導入した改変スボラミン前駆体の、形質転換タバコ培養細胞における細胞内輸送とプロセッシングについて解析を行っている。現在までに13種の変異体の解析を行い、プレプロ前駆体N末端より26番目のアスパラギンをグリシンに置換した変異(N26G:以下同)およびI28G変異を発現させたタバコ細胞において、多量のプロスボラミンの細胞外への分泌を観察した。また、この領域を含む部分の欠失変異を発現させた場合においてもスボラミン前駆体の細胞外への多量の分泌が観察された。しかし、T32G等の多くの変異体を発現させた場合には、細胞外へのプロスボラミンの分泌は観察されなかった。以上の結果から、プロペプチド領域のAsn²⁶Pro²⁷Ile²⁸部分が分泌系から液胞への輸送系への蛋白質の仕分けに重要な役割を果していると考えられる。

¹⁾Matsuoka and Nakamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 834-838 (1991)

サツマイモ塊根に多量に存在するスボラミンとβ-アミラーゼは通常の栽培植物体では、塊根以外の器官ではほとんど存在しないが、この2種のタンパク質の蓄積はサツマイモ葉-葉柄をショ糖処理すると葉と葉柄に多量のデンプンと併に誘導される。このような遺伝子発現の誘導はサツマイモのスボラミン遺伝子やβ-アミラーゼ遺伝子のプロモーターとGUSとの融合遺伝子を導入した形質転換タバコの葉切片を高濃度のショ糖を含むMS固形培地上で処理した場合でもでもみられる。

我々は昨年の本大会でサツマイモ葉-葉柄におけるスボラミンとβ-アミラーゼ mRNAのショ糖による蓄積誘導がシクロヘキシミド、カルモジュリン阻害剤、あるいはEGTAの存在下で抑えられることを報告した。今回我々は、上記のβ-Amy:GUS融合遺伝子を導入した形質転換タバコを用いたショ糖による誘導系でも、カルモジュリン阻害剤のW-7やカルシウムチャンネルブロッカーのジルチアゼムがGUSの誘導を抑えることを見いだした。また、このGUSの誘導は動物のプロテインキナーゼC(PKC)を阻害するスタウロsporinやK-252aによっても阻害された。一方、PKCを阻害しないプロテインキナーゼ阻害剤であるHA1004, KT5720やゲニステインによっては阻害されなかった。従って、形質転換タバコにおけるβ-Amy:GUS融合遺伝子のショ糖による発現誘導にはCa²⁺/カルモジュリンやPKCの情報伝達系が関与している可能性が示唆された。

2 pC 07

形質転換タバコを用いたスポラミン遺伝子プロモーター
シス制御配列の解析

○森上 敦、真野昌二、中村研三 (名大・農・生化)

サツマイモ塊根に多量に存在するスポラミンの遺伝子は塊根以外の器官でも高濃度のショ糖の供給によって発現誘導を受ける。スポラミン多重遺伝子族の遺伝子の一つgSP0-A1の5'上流305bpとレポーター遺伝子GUSとの融合遺伝子は、形質転換タバコ幼植物体の茎のショ糖蓄積部位と推定される部位で発現するが、葉での発現は弱い。これらの形質転換タバコの葉切片を直接高濃度のショ糖を含むMS固形培地上に静置して暗下で処理すると、葉切片のGUSは1~2日のラグを経て顕著に増加した。このgSP0-A1:GUS融合遺伝子のタバコ葉切片でのショ糖誘導に関わるシス制御配列を決定するため、様々な5'-側からの欠失や内部欠失を持つプロモーターを作製し、そのGUSとの融合遺伝子をタバコに導入して解析を行った。その結果、スポラミン多重遺伝子族や類似の発現制御を受けるβ-アミラーゼ遺伝子の5'上流域に共通に見られる保存配列や核タンパク質結合配列のうち、Box2配列はショ糖誘導に必須でないが、SP8BF結合配列を含む領域とBox3配列を含む領域の両方がショ糖誘導に必須であることが明らかになった。

2 pC 08

サツマイモβ-アミラーゼ遺伝子の-800領域に存在するCGTCA
配列に結合する因子

○石黒澄衛、田中美穂子、中村研三 (名大・農・生化)

β-アミラーゼは、スポラミンと共にサツマイモ塊根に多量に存在するタンパク質である。我々は、β-アミラーゼ遺伝子(gβ-Amy)の5'上流域に結合する因子の解析を進めており、サツマイモ葉柄核抽出液より、これまでに3種類の因子を見いだしている。このうち転写開始点より-800bpの領域に結合するRBFは、ゲルシフトアッセイによる解析から、コムギヒストン遺伝子の転写因子HBP-1bと類似の因子であることが予想されていた。今回は、RBFに関し、さらに解析を行った。

まず、RBFの結合配列を決定するため、-800領域の短いDNA断片をプローブに用いたゲルシフトアッセイやメチル化結合阻害実験を行った。その結果、RBFの結合配列はTCACGTCAという2回転対称に近い配列であることが明らかとなった。この配列はHBP-1bの結合配列ともよく一致する。しかしRBFとHBP-1bにはその生化学的な性質に関していくつかの相違点も認められた。

スポラミン遺伝子と同様に、gβ-Amyの発現はショ糖やポリガラクトuron酸(PGA)で誘導される。ショ糖処理、PGA処理、及び無処理のサツマイモ葉柄から核抽出液を調製し、ゲルシフトアッセイで解析した。その結果、いずれの核抽出液にもRBFは存在していた。しかし、RBFの結合配列は、形質転換タバコの葉での解析からショ糖誘導に重要であることが示された約400bpのDNA配列中に含まれており、RBFがショ糖誘導に関与している可能性は否定できない。

2pC 09

ジャスモン酸類によるジャガイモカテブシンD
インヒビター遺伝子族の発現誘導
○石川敦司、中村研三（名古屋大・農・生化）

カテブシンDインヒビター(CDI)遺伝子は栽培ジャガイモ植物体では塊茎選択的な発現をするが、塊茎形成誘導作用をもつジャスモン酸/ジャスモン酸メチルエステル(JA/MJA)を葉に与えるとその発現が誘導される。北大の幸田・吉原らによって種々のJA構造類似化合物の構造と塊茎形成誘導作用との相関が明らかにされている。今回我々は、JAのCDI遺伝子の発現誘導作用と塊茎形成誘導作用との関係を明らかにすることを目的に、種々のJA構造類似化合物によるCDI遺伝子の発現誘導作用を解析した。

JA/MJA以上の塊茎形成誘導作用をもつツベロン酸やツベロン酸メチルエステルは、CDI遺伝子の発現誘導作用をほとんど示さなかった。また塊茎形成誘導作用をほとんど持たないジヒドロジャスモン酸メチルエステルは、低いながらCDI遺伝子の発現誘導作用を示した。このように種々のJA構造類似化合物の構造と、CDI遺伝子の発現誘導作用はこれら化合物の塊茎形成誘導作用とは異なる構造-機能の相関を示した。

CDI遺伝子の一つTSP24.5-A1遺伝子の発現制御を解析するためにTSP24.5-A1遺伝子の5'上流域約2KbとGUSレポーター遺伝子との融合遺伝子を作成し、タバコを形質転換した。現在、得られた形質転換植物体を解析中である。

2pC 10

酵母SNF1と相同なタバコプロテインキナーゼの構造
と機能

○村中俊哉*、坂野弘美、町田泰則
(名古屋大・理・生物、*住友化学・宝塚総研)

これまでに我々は、タバコ培養細胞BY-2のcDNAを鋳型としてPCR法により、酵母におけるグルコース抑制解除に係わる遺伝子の一つであるSNF1プロテインキナーゼ遺伝子と高いアミノ酸相同性を示す遺伝子フラグメントCC5を単離している。このCC5をプローブとしてタバコ培養細胞cDNAライブラリーから全翻訳領域を含むと思われるcDNA(*npk5* cDNA)をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、*npk5*は、2041ヌクレオチドで511アミノ酸からなるORFを含んでいた。推定されるアミノ酸配列を酵母SNF1のアミノ酸配列と比較したところ、キナーゼ領域で65%のアミノ酸が同一であり、キナーゼ領域下流においても一部保存されている領域があった。一方、SNF1は、酵母において、グルコース抑制を受ける多くの遺伝子群(*SUC2*、*GAL*系、*MAL*系、*ADH*系など)の発現調節に関与しており、SNF1の変異酵母は、シュクロース、ガラクトースなどを単独の糖源としては生育できない。そこで、タバコ*npk5*を*snf1*変異酵母で発現させ、SNF1の機能を相補するかどうか検討した。その結果、タバコ*npk5*を導入した*snf1*変異酵母はガラクトースまたはシュクロースを単独の糖源とする培地で生育した。これより、タバコNPK5は酵母SNF1の機能を相補することがわかった。

2 pC 11

タバコの出芽酵母STE11 関連遺伝子

○坂野弘美、中村敏英、町田泰則（名大・理・生物）

我々はタバコ培養細胞BY-2から、出芽酵母STE11タンパク質と部分的に相同なアミノ酸配列を持つタンパク質をコードするcDNAをクローニングし、このタンパク質をコードする遺伝子を*npk7*と名づけた。その推定されるアミノ酸配列から、NPK7タンパク質にはSTE11のキナーゼ領域と48%の相同性があるドメインがあり、さらにそのC末端側にキナーゼ活性の制御領域と推定されるドメインがあることがわかった。STE11は出芽酵母の接合因子に応答するシグナル伝達に必要な遺伝子で、プロテインキナーゼをコードすることが知られている。そこで、出芽酵母でNPK7タンパク質がSTE11と同様な機能を持つかどうかを検討した。FUS1遺伝子は接合因子により発現が誘導される遺伝子で、その発現にはSTE11の機能を必要とする。このFUS1プロモーターと*lacZ*の融合遺伝子を持つ野性株に、全長の*npk7*cDNAとC末端領域を欠失させたcDNAをそれぞれ導入し、発現させた。この結果、*npk7*cDNA全長では*lacZ*の発現は認められなかったが、C末端を欠失させたcDNAでは接合因子なしに低レベルの*lacZ*の発現が誘導された。従って、NPK7タンパク質はSTE11の機能の一部を果たし得ると考えられる。

2 pC 12

タバコの膜結合型プロテインキナーゼの構造と特徴

○森部豊輝、坂野弘美、町田泰則
（名古屋大・理・生物）

前回の大会で、我々はPCR法により、タバコ培養細胞からプロテインキナーゼ遺伝子の一部と思われる5つのDNA断片をクローニングしたことを報告した。今回、これらの内の一つのクローンCC15について、全翻訳領域を含むと思われるcDNA(*npk15* cDNA)をクローニングし、その塩基配列を決定し、それから推定されるアミノ酸配列の構造解析を行った。NPK15タンパクは、近年、トウモロコシからクローニングされている膜結合型プロテインキナーゼであると思われるZmPK1と触媒領域において同一のアミノ酸が41%と高い相同性を示した。また、NPK15もN端に膜貫通領域と推定されるアミノ酸配列を持ち、膜貫通型プロテインキナーゼと思われる。さらに、この*npk15* cDNAをタバコ培養細胞に導入したところ、得られる形質転換体の数がコントロールに比べて、非常に減少した。このことから、*npk15*が植物細胞内のシグナル伝達系において非常に重要な機能を持っていることが示唆される。現在、NPK15の過剰発現が細胞の致死性と本当に結びつくかどうかを調べている。

2pC 13

形質転換タバコにおける *par* (protoplast auxin-regulated) 遺伝子発現制御領域の解析

○丹羽康夫、馬場晶子¹、村中俊哉²、町田泰則¹ (静岡県大・生活健康科学・食糧(植物)細胞工学、¹名大・理・生物、²住友化学宝塚総研)

par (protoplast auxin-regulated) 遺伝子は、タバコ葉肉細胞プロトプラストにおいて、合成オーキシンである 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) によりその発現量が増大する遺伝子としてクローニングされた。これまでにこの遺伝子は、タバコ植物体では、葉、茎と比較して根で強く発現していること、また種子形成の後期に発現のレベルが上昇することがわかっている。本研究では、*par* 遺伝子ファミリーの中の *par1* もしくは *par2* 遺伝子の 5' 上流域と、レポーター遺伝子 (β -グルクロニダーゼ遺伝子: GUS) とを連結したキメラ遺伝子をもつ形質転換タバコの芽生えを用い、*par* 遺伝子のオーキシンによる発現様式を詳細に検討した。両キメラ遺伝子は、発芽の初期より根で発現しており、根端部と根毛周辺の細胞で高い発現が見られた。また、子葉と胚軸では低いレベルの発現しか検出されなかった。それぞれの形質転換芽生えを、2,4-D を含む緩衝液に 24 時間浸しておく、2,4-D を含まない場合と比較して、キメラ遺伝子の発現量が増大することがわかった。発現の上昇は、芽生え全体で見られたが、胚軸、子葉で特に著しかった。このことは、これらの遺伝子のオーキシンによる発現誘導に関与している領域が、両者に共通した部分、つまり -400 までに存在することを示している。さらに、*par1* の 5' 上流域を順次欠失させたキメラ遺伝子を持った形質転換芽生えを用いて同様の解析を行っている。

2pC 14

ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の小プラスミド pMA1 の塩基配列決定と機能解析

○富永宏志、芦田裕之*、澤 嘉弘、落合英夫

(島根大・農・応用生物機能、*島根大遺伝子実験施設)

(目的) ラン藻 *Microcystis aeruginosa* は単細胞性のラン藻であり、環境科学上悪名高い水の華 (アオコ) の優占種である。本研究に於いてはその小プラスミド pMA1 (2.2 kb) の全塩基配列決定、遺伝子発現の解析を目的とした。

(方法) *M. aeruginosa* からのプラスミドは、アルカリ-SDS 改良法を用いて抽出後、超遠心機を用いて精製した。HincII の部分分解により pMA1 を pUC19 に導入した。Sequence反応には Sequenase Ver.2.0 Kit を用いた。情報解析には DNASIS 及び IDEAS を用いた。遺伝子産物を同定するために、マキシセル法を行った。

(結果) ①. *M. aeruginosa* については大小 2 種類のプラスミド pMA1 (2.2 kb)、pMA2 (5 kb) の存在を確認した。②. pMA1 の全塩基配列 (2287 bp) を決定した。③. ORF の探索を行ったところ、分子量 1 万以上の翻訳物ができる可能性のある領域が 9 個所判明した。④. 最も大きいもので分子量約 3 万であった。このもののアミノ酸配列を基にホモロジー検索を行ったところグラム陽性菌の REP タンパクと約 30% のホモロジーのあることが判明した。⑤. マキシセル法により分子量約 14,000 の明確な遺伝子産物を確認した。

(考察) pMA1 のコード領域は 771 番目の開始コドン GTG から 1140 番目の終止コドン TAA までと考えられる。