シンポジウム

S1pH1

植物の低温耐性研究のモデル系としてのラン藻

和田元, 村田紀夫[1]（九州大・理・生物, [1]基生研）

寒さに弱い低温感受性の植物は4-10℃程度の低温にさらされると、生長阻害やクロロシスなどの低温傷害を受け、さらされる温度や時間によっては枯れてしまったりする。この低温傷害の原因の一つは、葉緑体を構成している膜系に存在するホスファチジルグリセロール（PG）と呼ばれるリン脂質の低温下での構造変化（相転移）にあるのではないかと考えられている。一方、ラン藻は、機能や構造、また、膜脂質や脂肪酸の組成においても葉緑体とよく似ており、もし仮に、PGの相転移が低温傷害の原因の一つであるとする仮説が正しければ、ラン藻は高等植物の低温傷害や耐性の機構を研究する上での有用なモデル系であると推測することができる。

演者らは、PGなどの膜脂質に結合している脂肪酸に二重結合を導入して膜脂質の流動性や相転移温度を制御しているアシル脂質不飽和化酵素の遺伝子をラン藻からクローニングし、それらの遺伝子を用いた形質転換によってラン藻の膜脂質の不飽和度を人為的に改変できる系を確立するとともに膜脂質の不飽和度と耐冷性の関係についての解析を行なっている。本講演では、それらのラン藻を用いた低温耐性の研究を紹介するとともに、それらの研究によって得られた知見が高等植物の場合にどの程度あてはまるのかについても言及し、植物の低温耐性を研究する上でのモデル系としてのラン藻の有効性について論じたい。

S1pH2

ラン藻と植物の硝酸同化系の類似点と相違点

小俣達男（名古屋大・農・応用生物科学）

酸素発生型の光合成を営む生物（ラン藻、藻類、植物）は硝酸イオンを主要な窒素源として生育するが、一部の細菌類やカビにも硝酸イオンを同化する能力をもつものがある。いずれの生物においても、硝酸イオンは、まず細胞内へ能動的に輸送され、硝酸還元酵素(NR)および亜硝酸還元酵素(NiR)によってアンモニアにまで還元された後にアミノ酸へと固定される。遺伝子の構造解析から、最近までに、ラン藻、植物、細菌、カビの硝酸イオン輸送系、NRおよびNiRの構造が決定された。その結果、(1)ラン藻のもつABC型の硝酸イオン輸送体とフェレドキシン依存性のNRはいずれも原核生物型のもので、真核生物である植物、緑藻、カビのものとは相同性がないこと、および(2)ラン藻のNiRは、葉緑体に局在している植物のNiRと相同であるが、非光合成生物である細菌およびカビのNiRとの相同性は低いこと、が明らかになった。植物では、NRについての遺伝学的、分子生物学的研究が進んでいるが、NiRについては変異株の単離が容易でないこともあって研究が進んでいない。植物のNiRの構造と機能、生合成等に関する研究においては、ラン藻がすぐれたモデル系となることが期待される。

S1pH3

ラン藻における環境応答と情報伝達

水野　猛　（名大・農・応用生物）

バクテリアは常に環境要因の変化を感知して、自らの細胞構造、生理、あるいは行動を応答的に変化させている。原核生物に見られるこのような環境応答には、しばしばセンサーキナーゼ及びリスポンスレギュレターと総称される情報伝達因子が関与していることが明らかになりつつある。この機構は現在までに３０種類以上のバクテリアで報告されており、原核生物に広く見られる普遍的な情報伝達・環境応答機構である。原核生物に属するシアノバクテリアは植物に見られるような光合成能を有する点で特徴があり、植物のモデル細胞として取り扱われることもある。これらの点を考慮して、シアノバクテリアに関して我々は細胞内情報伝達機構という観点から解析した。

S1pH4

ラン藻アミノ酸代謝系酵素の構造と機能

澤　嘉弘（島根大・農・応用生物機能）

我々は、これまで好温性ラン藻の窒素代謝系の解明を目的として、主にこの代謝系に関与するアミノ酸代謝系酵素（グルタミン合成酵素、アラニン脱水素酵素、アスパラギン酸トランスアミナーゼ等）の酵素化学的検討を行ってきた。今回、これら酵素のアミノ酸配列情報を分子進化学的に解析することにより、個々のアミノ酸代謝酵素の構造－機能相関のみならず、ラン藻のモデル生物としての可能性についての若干の考察も試みてみた。

グルタミン合成酵素(GS)は、すべての生物に存在する窒素代謝の中心酵素であり、主に２種のタイプ(GS-I, GS-II)に分類される。①真核生物は、高等植物のオルガネラタイプも含めてすべて例外なくGS-IIタイプであり、原核生物型のGS-Iタイプとはかなり相同性が低い。②GS-I, GS-IIは、原核・真核生物の分岐以前に既に存在している。③ラン藻GS(GS-I)は、分子系統樹上でアデニリル化調節機構発生の分岐点に位置している。アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AspAT)も、GS同様生物界に広く存在し詳細に研究されてきているが、原核生物由来のものは我々のラン藻を含めてもわずか5件しかない。④ラン藻AspATは、高等動植物や大腸菌由来のものとは、いずれも相同性がきわめて低く明らかに起源を異にする蛋白である。⑤しかしながら、活性中心を形成していると思われるアミノ酸残基はラン藻AspATにおいても、ほとんど保存されている。

S1pH5

葉緑体とラン藻の類似性を用いた遺伝子機能の解析

福澤秀哉（京大・農・農芸化学）

葉緑体は、ラン藻祖先生物が共生して成立したとされることから、葉緑体ゲノム上の未同定遺伝子の機能を形質転換型ラン藻を用いて解析する方法がとり得る。またラン藻突然変異株を用いて新規遺伝子を同定する際に、植物葉緑体を材料とした生化学的知見や、葉緑体ゲノムの遺伝子情報が役立つ場合もある。このようなラン藻と葉緑体の相似的関係を利用した研究は今後も期待される。ここではラン藻における無機炭素濃縮機構における炭酸脱水酵素とNADH脱水素酵素の機能、さらに葉緑体未同定遺伝子ORF320の相同遺伝子をラン藻で破壊した変異株について述べ、両者の遺伝子機能解析における問題点を考察したい。

S1pH6

光化学系の研究におけるモデル生物としてのラン藻

池内昌彦（東大，教養，生物）

光合成機能の最も基本的な部分である光化学系の構造，機能はラン藻と高等植物でよく似ており，遺伝子操作の行いやすいラン藻は理想的なモデル生物といえる．また，ラン藻には好熱性のものなどバリエーションが広いという特徴もある．このラン藻の光化学系の構造，機能がどのくらい植物のそれと同じかはすでに詳しく調べられている．したがって，光化学反応や水分解などよく保存された機能の部位やメカニズムの解明には，これまでの生化学的，物理学的な研究の成果が，現在主にラン藻を使った遺伝子破壊やアミノ酸置換などの遺伝子工学的な手法で検証もしくは掘り下げられつつある．同様なアプローチは緑藻クラミドモナスでも行われており，その解析はラン藻のものとお互いに補い合っているものも多い．なお，光化学系複合体のタンパク質に変異を導入すると活性が変わるだけでなく複合体全体が不安定になる傾向があり，変異の影響を１次的なものと２次的なものに分けて解析する必要がある．このような現状とともに，今後期待される展開（たとえば，光化学系の膜タンパク質へのアミノ酸置換導入をin vitro再構成と組み合わせた解析，特定の遺伝子へのランダムな変異導入による構造維持や機能発現に関与する部位の解析など）について，ラン藻を使う場合の利点と限界を議論する．

S1pI1

アサガオの易変性変異とトランスポゾン

飯田　滋　（東理大・基礎工・生物工）

花の絞り模様の形成は、トランスポゾンが関与する易変性（mutable）遺伝子によることが多い。　園芸植物として親しまれ、古典遺伝学的蓄積もあるアサガオの中で、白地に紫の絞り模様を生じる雀斑系アサガオの易変性変異 *a-3^{flecked}* は、アントシアニン 色素生合成系の ＤＦＲ (dihydroflavonol-4-reductase) 遺伝子の内のＤＦＲ－Ｂ遺伝子に6412 bpのＥｎ／Ｓｐｍ類縁のトランスポゾンＴｐｎ１が挿入した構造であって、花の器官形成時にＴｐｎ１がＤＦＲ－Ｂ遺伝子から転移脱離することによりＤＦＲ－Ｂ遺伝子の活性が回復することが絞り模様の形成機構であることを明かにした。この易変性変異*a-3^{flecked}*を構成するＤＦＲ遺伝子領域や　Ｔｐｎ１の構造上の特徴と遺伝的に変化し得る絞り模様について考察する。

さらに、トランスポゾンが関与していると思われる＂吹掛け絞り＂ 花のアサガオの易変性変異 *speckled* の諸性質についても言及する。

S1pI2

ストレスによるレトロトランスポゾンの活性化

廣近洋彦　（農業生物資源研究所）

植物のトランスポゾンは遺伝学的解析により、不安定な変異を誘発する因子として同定されてきた。近年、これらとは構造および転移機構の全く異なったトランスポゾン（レトロトランスポゾン）の存在が明かとなった。RNAを介して転移をするレトロトランスポゾンは遺伝学的解析で同定することが困難であるため植物ではあまり研究が進んでいなかったが、分子生物学的手法を用い飛躍的に進み、コケ植物から種子植物まで普遍的に存在する植物の主要なトランスポゾンであることが明かとなった。レトロトランスポゾンのコピー数およびゲノム上の分布は、過去に活発な転移をしたことを示しているが、現在通常の条件化では転移活性は全く検出されない。タバコから単離されたＴｔｏ１は、転写および転移が培養によって活性化されることが示された。たとえば、培養細胞株ＢＹ-２においてはＴｔｏ１のコピー数が植物体の１０倍となっていた。培養を経て得られた再分化個体、形質転換体においてもコピー数の増加が見られた。転移活性が主に転写レベルで調節されていることが示され、転写の活性化に関与するシス配列として１３ｂｐの反復配列が同定された。現在この配列に結合する転写調節因子の遺伝子のクローン化を行っている。同様に培養によって活性化されるレトロトランスポゾンがイネからも単離された。このように単子葉および双子葉植物から培養によって活性化されるレトロトランスポゾンが単離され、同様な性質を持つレトロトランスポゾンが高等植物に広く分布しているものと推測さられる。さらに、別のストレス（ウイルス感染）でも活性化されるレトロトランスポゾンの存在が明かとなり、感染により誘導されるサリチル酸と傷が活性化の要因になっていることが示された。ストレスによるレトロトランスポゾンの活性化機構および活性化の意味について考察する。

S1pI3

イネ*waxy*遺伝子の Gene Silencing:
Cosuppression と Paramutation

鳥本　功I、伊藤　紀美子（植工研、I奈良先端大バイオサイエンス）

Gene Silencing は遺伝子間のホモロジーに依存した遺伝子発現の抑制であり多くの例が知られるようになってきた。Gene Silencing にはトランスジーン間の相互作用によるものとトランスジーンと内在性の遺伝子との相互作用によるものとが知られている。我々は*waxy*遺伝子を導入したトランスジェニックイネにおいて高頻度に*waxy*発現のcosuppressionが起こることを見出した。また、花粉における*waxy*遺伝子の cosuppression にはふたつのタイプがあることがわかった。次代の植物においては cosuppession の頻度は減少した。一方、胚乳では cosuprression は見られないがトランスジーンの発現の抑制されている種子が見つかった。この現象は遺伝子間の相互作用の例として知られている Paramutation に類似していた。mRNA を作らない*waxy*突然変異体にトランスジーンを導入したところ、cosuppression は起こらないことが明らかになった。このことから、内在性の遺伝子の転写産物の存在が cosuppression を起こすために必要であることが示唆された。

S1pI4

高等植物ミトコンドリアＲＮＡにおける遺伝情報の変換（ＲＮＡエディティング）

門脇光一　（農水省・生物研・分子育種）

イネ atp9、 rpl5、 rps14、トウモロコシ rps13、トマト coxI 等のミトコンドリア RNA における RNA エディティング部位を同定した。得られたシーケンスよりアミノ酸置換、翻訳開始コドンの形成、翻訳終止コドンの形成などの遺伝情報の変換が推定された。多数の cDNA の構造解析より RNA エディティングの迅速性と反応様式を検討したところ、トリパノソーマでみられるような反応極性はないことが明かとなった。また過剰にエディティングを受けた RNA や部分的にエディティングを受けた RNA が RNA 集団中に存在することが確認された。上記データと他生物における RNA エディティング部位の比較を行ったところ、高等植物ミトコンドリアにおいて RNA エディティングは進化的に喪失の傾向にあることが推測された。

S1pI5

オルガネラゲノム間のＤＮＡ断片の転移

平井篤志（東京大・農・放射線遺伝）

植物細胞には核、葉緑体、ミトコンドリアに遺伝情報が納められているが、それぞれのゲノム間でＤＮＡ断片の転移があることはよく知られている。そこで今回はイネのミトコンドリアにある葉緑体から転移した配列を中心に論議する。

葉緑体ゲノムからミトコンドリアゲノムへ転移した配列の位置を確定し、塩基配列を決定した。それによると最大6.8 kbp、最小32 bpの１６断片が転移していたが、一度に転移したのではなく、その時期は断片により異なっていた。古いものはイネ科植物の起源にさかのぼり、新しいものはイネとトウモロコシが分化した後に転移している。このように転移してきた配列の機能は未知の部分が多い。特にタンパク質をcodeしている部分は偽遺伝子になっている箇所が多く、機能していないと見られている。しかしイネには９個の完全なtRNA遺伝子が葉緑体から転移してきており、いずれも発現しているものと考えられる。さらに*nad9*のｍＲＮＡは上流にある葉緑体から転移してきた配列から転写が始まっており、葉緑体ではプロモーターとして働いていない配列がミトコンドリアでは働いているようである。これらのことはミトコンドリアゲノムの柔軟性を示していると思われる。

S2aH1

韓国における大気汚染の現状と植物被害

李　忠和（東京農工大・農）

韓国の自然環境は、急速な産業化と都市化の過程により破壊されつつある。この中で、特に、大気汚染による被害がさらに加速化していると考えられる。一方、森林土壌は、酸性雨に感受性の高い花崗岩母材の褐色森林土が多いため、森林生態系に対する酸性降下物の影響が懸念されており、また、現在の都市および工場地域の大気環境を考慮すると、今後は、森林生態系に悪影響を及ぼす可能性がある。そこで、本シンポジウムでは、韓国の森林地域における大気汚染および雨のｐＨの実態と土壌の酸性化および樹木に及ぼす影響を紹介する。

１）森林地域における大気中のSO_2の年平均('92.10－'93.9)濃度は、8.8(3－43)ppbであり、工場地域では21ppbで、最も高く、大都市では15ppbである。

２）森林地域における雨のｐＨは、年平均('92.10－93.9)5.5で、工場地域の場合は4.5および大都市の場合は4.8である。また、全国調査区65カ所の中で、pH5.0以下の酸性雨地域は12%、pH5.1－5.5の弱酸性雨地域は43%およびpH5.6以上の地域は45%である。

３）森林土壌のｐＨ分布は、pH4.5以下が6%、pH4.6－5.0が34%、pH5.0－5.5が49%、pH5.5以上が11%である。

４）森林衰退度指数(正常=0,軽微被害=1,中被害=2,重被害=3)は、全国平均0.8と、比較的良好な状態である。

５）年輪解析による生長衰退の傾向は、'70年代の後半に比べて、'80年代は持続的な衰退傾向が見られたが、'90年代は回復の兆しが見られる。

S2aH2

中国における沙漠化の現状

莫　文紅・西村　格（岐阜大・流環研）

沙漠化とは、乾燥・半乾燥と亜湿潤の地域における気候的な乾燥化を主因とする生態系の退化のほか、人間の不合理な活動による沙漠の発生を指す。中国には、このような沙漠や沙漠化した土地が17.6百万haとともに15.8百万haに及ぶ沙漠化傾向にある土地がある。

ここではまず中国、特に内蒙古地域における（1）草原の沙漠化の現状（2）沙漠化地域の植生（3）沙漠化の原因（4）沙漠化対策の現状等を概説する。その後ち、中国の沙漠化地域の回復に関連する、数種の沙漠草本植物の生態生理的研究に基づいた（1）植物の耐乾性メカニズム（2）先駆植物の耐砂性について検討した結果を若干述べる。

S2aH3

東アジア地域における研究の現状と課題

戸塚　績（東京農工大・農）

東アジア各国では、最近めざましい経済発展により、エネルギー消費量が増大している。そのために、化石燃料の燃焼にともなう大気汚染物質の発生量が著しく増加している。一方、これらの国々の大都市域では自動車台数の増加により、都市域の大気汚染はますます深刻化している。中国では揚子江の南部地域で大気汚染や酸性雨による森林被害が顕著となっており、社会問題化している。韓国や台湾でも生活環境の汚染が進行し、大気汚染による植物被害が発生している。また、東南アジア諸国では自動車排ガスによる大気汚染が社会問題となっており、降水のPHも年々低下している。

このような状況下で大気汚染や酸性雨による植物被害が研究対象として取上げられ、被害発生のメカニズムの解明のための共同研究も進められている。

我が国では環境事業団の地球環境基金を利用して、大気汚染対策のための技術移転や、一般市民への啓蒙活動を実施しているが、受入れ国側の研究者の養成や研究施設の維持管理のための技術を向上させることが不可欠となっている。

S2aH4

植物におけるアルミニウム毒性と耐性の発現機構

松本英明，山本洋子，江崎文一，佐々木昌生（岡山大・資生研）

世界の農耕地の数十パーセントが酸性土壌であると言われている。さらに酸性雨の例に見られるように生物生産に関わる環境が徐々に酸性化しているとの指摘がなされている。酸性土壌における障害は土壌中で溶解するアルミニウムイオン（Al）であると言われ、根圏ストレスの主要なものの一つである。酸性条件下で溶解されたAlイオンは経根的に吸収され、根の伸長を強く阻害し根の水分、養分吸収が阻害される。地球上の人口の急激な増加や、作物を生産する環境の酸性化を考えるとき、Alによる植物の生育阻害機構を解明し、耐性植物を作出することが重要な課題になっている。

ここではAl毒性の機構について、吸収されたAlの根組織、細胞内分布さらには根の形態変化について述べ、その結果、引き起こされる根伸長阻害に関わる細胞伸長、細胞分裂や膜機能の障害について報告する。また耐性機構については、主として培養細胞を用いて耐性誘導機構およびそれらに関わると考えられる遺伝子について述べる。

S3aH1

細胞壁の分子構築をみる

伊東隆夫（京都大・木質研）

アポプラストを構成する細胞壁は主成分がセルロースからなり、他の成分と絡み合って複合した多孔質の構造となる。水分などの通路として働くアポプラストとしての細胞壁の性質について、分子の構成の観点から明らかにするために電子顕微鏡手法の一つである急速凍結ディープエッチング法を用いて研究してきている。高等植物細胞のみならずセルロース性の細胞壁を有する藻類を含む二、三の植物種の細胞壁の分子の三次元構成について観察した結果を紹介する。高等植物や藻類での共通の実験結果として、以下のことが明らかになっている。①通常の超薄切片法での観察像と比べて分子の立体構成が細部にわたって鮮明に捉えられる。②改めて、細胞壁が著しい多孔性を有することが可視化できる。③セルロースミクロフィブリル間を非セルロース性の物質が架橋しているのを可視化できる。④各種化学抽出処理法を応用して壁成分を段階的に抽出する前と後の壁構造を比べることにより壁の構成成分の局在部位を明らかにすることが可能となる。

S3aH2

細胞壁多糖分解活性の調節機構

保尊隆享（大阪市大・理・生物）

アポプラストのダイナミックな機能の多くは、特定の細胞壁多糖の代謝回転（分解）の促進によって引き起こされる。細胞壁多糖の分解活性がどのようなしくみで調節されるか、双子葉植物のオーキシン誘導成長におけるキシログルカン分解を例として概括する。多糖分解の促進は、従来多糖分解酵素の *de novo* 合成によって説明されてきた。しかし、アズキ上胚軸においてヨウ素を用いてキシログルカン分解活性を調べたところ、オーキシンによる活性上昇は顕著ではなかった。したがって、既存の酵素の活性化も重要であると考えられる。この活性を細胞壁より抽出するには高濃度の塩が必要であり、キシログルカン分解酵素は細胞壁に強く結合していることが示された。これらの酵素は細胞壁内では自由に移動できず、十分な活性を持ち得ないものと考えられる。その活性化は、細胞壁環境の変化、特に酸性化により移動度が増すことによって引き起こされる。一方、ペクチン性多糖の存在はキシログルカンの分解を妨げる働きをしており、キシログルカンの自己分解はペクチンを除去すると著しく活性化された。ペクチンの部分分解を引き金としてキシログルカン分解がカスケード的に誘導される機構が考えられる。以上のしくみとともに、細胞壁中に多糖分解促進物質や阻害物質が内在し、分解活性の調節に関与する可能性も考えられる。

S3aH3

細胞壁におけるホウ素の機能

間藤　徹　（京都大・農化）

高等植物をカルシウム(Ca)またはホウ素(B)の欠除培地に移すと直ちに根の伸長が停止する。他の必須元素ではこのような症状は出ない。これはCa, Bの細胞の細胞最外層すなわちアポプラストでの作用を示唆する。16の必須元素のなかで，その生理作用機作が解明されていないのもBとCaで（後者の細胞質における機能は動物細胞からのフィードバックによって明らかになってきたが），この一致はアポプラストの生理学研究が立ち後れていること，植物栄養研究のフロンティアがアポプラストにあることを指し示している。

ホウ酸は糖水酸基と容易にエステル結合を形成することから糖代謝に関連していると考えられてきたが，反応性の高さ故に特異的結合も同定できなかった。タバコ培養細胞や2，3種の緑葉についてホウ素の細胞内分布を調べたところ，シンプラストには全く存在せず，大部分のホウ素が細胞壁あるいは細胞間隙に存在していた。これはホウ素がアポプラストで機能していることを示唆する。そこで細胞壁標品を加水分解酵素により可溶化し高分子態ホウ素を追跡したところ，細胞壁ホウ素の大部分が特定のペクチン多糖と会合して存在した。ホウ素のアポプラストへの局在，特定の多糖との結合といった従来の見解と対立する結果は，ホウ素が細胞壁への結合を介して細胞代謝を制御するとともに，アポプラスト環境の恒常性維持が細胞に必須であることを示すものである。

S3aH4

アブラナ科植物の自家不和合性の現象とその分子機構

磯貝　彰（奈良先端大バイオサイエンス研究科）

アブラナ科植物の自家不和合性は胞子体型自家不和合性に属し，Ｓ遺伝子座にある複対立遺伝子によって制御されている．すなわち，柱頭のＳ遺伝子型と同じＳ遺伝子型を示す花粉は，自己と認識され，柱頭の先端にある乳頭細胞上で，発芽を停止するか，発芽しても花粉管の伸長が停止する．一方，Ｓ遺伝子型の異なる花粉は，発芽し，乳頭細胞の細胞壁を切り開くように侵入し，花粉管をのばして行く．すなわち，自己の花粉の認識，および，花粉の発芽抑制あるいは花粉管の伸長阻害という現象は，乳頭細胞の細胞壁のあたりで起きている現象と見ることが出来る．

現在，こうした自己の花粉の認識システムとして，次のようなモデルが提唱されている．すなわち，花粉の表層に存在する葯由来と考えられる物質（花粉の側のＳ遺伝子産物）が，乳頭細胞の細胞壁中にあるＳ遺伝子特異糖蛋白質（ＳＬＧ）および，ＳＬＧにきわめて類似した細胞外ドメインを有するレセプタープロテインキナーゼ（ＳＲＫ）の共同の作業によって認識され，その情報が細胞内の燐酸化カスケードを介した情報伝達系によって伝えられ，きわめて局所的に花粉発育を阻害するというものである．この仮説にいたる経過と，未解決の問題点について報告する．また，ＳＬＧやＳＲＫの自家不和合性への直接の関与を証明する１つの方法として，形質転換植物を作成した．この結果についても報告する予定である．

S3aH5

アポプラストから原形質膜を経て細胞骨格へ

永井玲子（大阪大・理）

吾々は、オオセキショウモ葉肉細胞について、原形質流動の軌道として働いているマイクロフィラメント(MF)束の配列の安定化に細胞壁が寄与していること、また安定化の分子機構に関して以下に述べるような結果を得たので報告する。1)MF束は葉肉細胞の、葉の表面に対して垂直な細胞壁(4面)に沿う細胞膜に近接して、その長軸を揃えて敷設されている。2)細胞を遠心処理すると、内質細胞質は遠心端に移行するが、MF束は元の位置に残るので、MF束は外質で安定化されている。3)原形質分離はMF束の配列を乱し、原形質流動のパターン異常を起した。従ってMF束の正常な配列の維持には、細胞壁と細胞膜との接着が必須である。4)サイトカラシンB(CB)処理(24時間)により、細胞の長軸細胞壁(side wall)に沿うMF束は消失したが、長軸端細胞壁(end wall)に沿うMF束は殆ど変化しなかった。このことはMF束がend wall側でより安定化を受けていることを示す。5)CB処理前にend wallをトリプシンで処理(30分)するとMF束は完全に消失した。このことは、安定化機構にタンパク質が関与していることを示す。6)合成ペプチドGRGDSPでend wallを処理すると、濃度依存的に流動パターンの異常とMF束配列の乱れが起った。コントロールペプチドGRGESP処理では変化はみられなかった。このことは、動物細胞にみられる焦点接着におけるフィブロネクチンとその受容体、細胞骨格間の結合に相当する機構が、細胞壁、MF束の結合に関与していることを示唆する。7)合成ペプチドARYDEも同様の変化をもたらした。

一般講演

第１日　３月28日（火）

一般講演

第１日　３月28日（火）　午前の部

Ａ会場　生長制御（１）
Ｂ会場　蛋白質・酵素（１）
Ｃ会場　光合成（１）
Ｄ会場　光合成（２）
Ｅ会場　細胞壁（１）
Ｆ会場　代謝（１）
Ｇ会場　環境応答（１）
Ｈ会場　遺伝子発現（１）
Ｉ会場　遺伝子構造

1aA01

高親和性サイトカイニン特異的結合蛋白（CSBP）の特異的アフィニティークロマトグラフィーによる分離

永田龍二，橋本祐一，首藤紘一[1]（東大・分生研，[1]東大・薬）

先に演者らは，サイトカイニンレセプターとみられる高親和性サイトカイニン特異的結合蛋白（CSBP）の存在を黄化ヤエナリ芽生え等の植物組織中に見出した．CSBPは各種サイトカイニンと特異的かつ競合的に結合する．ゼアチンをしのぐ活性を持つ尿素型サイトカイニン＝*N*－（2－クロロ－4－ピリジル）－*N'*－フェニル尿素（4PU30，フォルクロルフェヌロン）に対するCSBPの結合定数は$4 \times 10^{10}\ M^{-1}$，1細胞あたりのCSBP含量は3,000分子と見積もっている．

今回，演者らはピリジル尿素誘導体のリガンドアフィニティークロマトグラフィー等を用いて4段階で黄化ヤエナリ芽生え全細胞抽出液からCSBPを約10万倍まで精製し（全回収率7％），SDS−PAGE上においてCSBPのバンドを特定したので報告する．

最終精製段階での4PU30特異的結合活性を持つ画分はゼアチンに対して4PU30と同等の親和性で結合し，ベンジルアデニンとは4PU30の約1／10の親和性で結合した．また活性画分の4PU30に対する結合定数は$1 \times 10^{11}\ M^{-1}$と求められた．すなわち今回得られた結合蛋白はCSBP同等の性質を備えており，CSBP本体と考えられる．SDS−PAGEでの易動度からCSBPの分子量は43 kDaと見積もられた．

現在，CSBPのアミノ酸配列を決定するため，黄化ヤエナリ芽生え40 kgからCSBPの単離を進めている．

1aA02

トウモロコシ幼葉鞘アルデヒド（インドールアセトアルデヒド）酸化酵素の精製

小柴共一（都立大・理・生物）

インドール酢酸（IAA）は、植物において重要な役割を果たしていることが明確であるにもかかわらず、その生合成経路およびそれに働く酵素の実態は未だに明確になっていない。演者らは、トウモロコシ幼葉鞘の先端部においてIAAがL-Trpから合成されることを昨年度の本大会で報告した。一方、この反応に関与する可能性の高い酵素の一つであるアルデヒド酸化酵素（AldO）を、トウモロコシの幼葉鞘より精製しその性質に検討を加えてきたが、今回、精製標品からマウスの抗血清を得ることができたので報告する。

AldOの活性は、インドールアセトアルデヒドを基質とし生成されるIAAを定量することにより測定した。トウモロコシ幼葉鞘およそ200 gから DEAE-トヨパール，Phenyl-5PW，ヒドロキシアパタイト，DEAE-5PWを用いたカラムクロマトグラフィーにより、native-PAGEでほぼ単一の精製標品が得られた。精製されたAldOは、ベンズアルデヒドを基質とした活性染色により粗抽出液で検出される3本のバンドの内の一つであることがわかった。この標品およそ100μgをマウスに免疫し、特異性の高い抗血清が得られた。抗血清を用いたwestern blottingにより、本酵素は幼葉鞘の先端部に比較的多く分布することが明らかになった。また、この酵素のIAA生合成への関与の可能性を明らかにするため、基質特異性、Km値、などの諸性質についても検討を加えた。

1aA03

タバコプロトプラストにオーキシン非依存性を与える遺伝子*axi* 1のダイズ・イネからの単離

藤巻秀，渡辺好充，Rick Walden[1]，林浩昭，茅野充男（東京大・農・応用生命化学，[1]Max Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln, Germany）

axi 1 (auxin-independent growth)は、タバコプロトプラスト中で過剰発現させるとオーキシンを含まない、或いは過剰に含む培地上でも細胞分裂及びカルス形成をひきおこす遺伝子である。この遺伝子は、activation T-DNA tagging法によりタバコから単離されたものであり、その機能を解明することによりオーキシンのシグナルから細胞分裂に至る系について新たな知見が得られると期待できる。本実験では、*axi* 1は植物の基本的な遺伝子の一つであると考え、ダイズ・イネからの単離を試みた。

タバコから得られた*axi* 1 cDNAをプローブとし、ダイズ・イネのゲノミックライブラリーよりアミノ酸レベルで80%以上のホモロジーを有するDNA断片を少なくとも2種類ずつ単離した。次にその配列をもとにRACE（rapid amplification of cDNA end)法を用いて、ダイズ・イネから抽出したmRNAより、*axi* 1 cDNAの増幅・クローニングを試みた。現在発現ベクターにクローニングできたcDNAについて、タバコプロトプラストへのPEG法による導入、及びその活性の測定を試行中である。

1aA04

ダイズ（*Glicine max*）の芽生えフック部におけるオーキシンの局在性

[1]堀 智子、[2]石川 文雄、[3]近藤 昭夫、[1]鵜沢 里美、[1]中山 克己、[1]岡田 光正（東邦大・理・[1]生物分子、[3]生物、[2]医・免疫）

オーキシンは、植物の生長に関して重要な機能を持つ。その分布は光や重力などの刺激に対して極性を示すと考えられているが、刺激、オーキシンの分布、伸長生長の三者の関係は未だ不明な点も多い。内在性indole-3-acetate(IAA)の植物体内における分布を調べるために我々は抗IAAポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行いダイズ芽生えのフック部におけるIAAの局在性を検討した。抗IAAポリクローナル抗体は、IAAをBSAと架橋し抗原とすることにより作製した。暗条件下で生育したダイズ芽生えのフック部におけるIAAの分布には以下のような特徴が見られた。フック部の内側と外側では染色部位に差異が観察された。形態的には内側においては、細胞内の染色部位が比較的凝集した状態で存在していたが、外側においては分散した状態で存在していた。

1aA05

ＩＡＡ処理で誘導されるトウモロコシ中胚軸切片の*in vitro*タンパク質燐酸化

加藤良一、高綱抄智子、和田　剛、成原ゆみ
（山形大・教育・生物）

IAA 処理で誘導される特異的なタンパク質燐酸化については、今までいくつか報告されている。本研究では、IAA 処理による生長促進とこのタンパク質燐酸化を関連させながら、IAA がどのようなタンパク質燐酸化の系を介して生長促進に働くのか調べた。

トウモロコシ中胚軸の生長帯切片(5 mm)を、各濃度の IAA 中で各時間 Incubate した。それを、破砕・遠心操作(85 K xg)し、得られた上清を Centricon-10 で濃縮・脱塩した。それに [^{32}P]-ATP を加えて 4 分 Incubate し、燐酸化反応を行わせた後、SDS-PAGE 及び Autoradiography にかけた。

中胚軸切片を IAA で 20 分 Incubate すると、10種のタンパク質の燐酸化が促進された。また、同切片を 10^{-8}～10^{-5}M IAA 中でそれぞれ Incubate すると、IAA の濃度増加と共にその燐酸化がより促進された。これは、IAA の濃度増加と共にその生長もより促進される結果と一致した。次に、IAA で Incubate した同切片から Sample を得て、それに cyclic AMP, cyclic GMP, W-7, W-5, H-7 or HA1004 を [^{32}P]-ATP と共に加えて燐酸化反応を行わせた。結果は、W-7 及び H-7 の添加がその燐酸化を阻害した。以上のことから、IAA は、Calmodulin 及び Protein kinase C のタンパク質燐酸化の系を介して、中胚軸の生長促進に働いていると考えられる。

1aA06

光照射したトウモロコシ芽生え中に存在する抗オーキシン活性物質の探索

穴井豊昭[1]、大竹信之[1]、小瀬村誠治[2]、山村庄亮[2]、長谷川宏司[1,3]（[1]筑波大・応用生物化学、[2]慶応大・理工、[3]植物情報物質研究センター）

演者らは、これまでの研究において光照射したトウモロコシ芽生えから抗オーキシン活性物質として、6-methoxy-2-benzoxazolinoneを単離することに成功した。また、この物質が膜結合型のオーキシン結合蛋白質に作用しオーキシンの結合を阻害すること、光照射によって酵素の活性化が引き起こされ、この物質の内生量が増加することなどを明らかにしてきた。

研究の過程において、我々はこの物質以外にも、同様の抗オーキシン活性を示す化合物がトウモロコシ芽生え中に存在することを見いだし、現在その精製および構造解析を行っている。

本学会では、この新しい抗オーキシン活性物質の構造と、その植物体内における動態について報告を行いたい。

1aA07

トウモロコシ幼葉鞘におけるオーキシン代謝のオーキシン自身による制御

飯野盛利（大阪市大・理・植物園）

The transport and metabolism of indole-3-acetic acid (IAA) and their relation to IAA concentrations were investigated in coleoptiles of maize seedlings grown under red light. Lanolin paste containing different concentrations (0, 0.1, and 1 mg g^{-1}) of IAA together with ^{3}H-IAA as a tracer was applied to a narrow subapical zone (4-5 mm from the top) of an intact coleoptile. It was found that IAA is metabolized and immobilized in the tissue during its basipetal transport and that this metabolic activity is enhanced as the tissue content of IAA increases. The metabolites were highly water-soluble and remained mostly in the water phase after ether-water partitioning; they did not release a significant amount of IAA upon alkaline treatments, and were separated into 3 major peaks on TLC. It has been concluded that IAA is metabolically decomposed during its basipetal transport and the rate of this decomposition are regulated by IAA itself. Implications of the finding is discussed with regard to the growth regulation by auxin.

1aA08

イネの発芽におけるジベレリン生合成能の発現とα－アミラーゼの誘導の解析

崔用華、小林正智、桜井成（理研）

イネの種子のα－アミラーゼはジベレリン処理により誘導されることが知られているが、α－アミラーゼが実際に内生ジベレリンにより誘導されていることを証明するには至っていない。そこでイネ発芽時の内生ジベレリンレベルについて解析したところ、茎葉の伸長が始まる吸水開始後３－５日目の間にレベルが上昇することが明らかとなった。α－アミラーゼの活性もこの間に増加を開始した。内生ジベレリンレベルの低い矮性イネではα－アミラーゼ活性は低かった。更にジベレリン生合成阻害剤を処理した正常種のイネの種子ではα－アミラーゼ活性は増加せず、ジベレリンを処理することで活性が回復した。これらの結果はイネ種子の発芽時におけるα－アミラーゼの誘導には内生ジベレリンの生合成が必要であることを示している。α－アミラーゼの誘導の回復に必要なジベレリン量は茎葉の伸長の回復に必要な量よりも少なく、それぞれ異なった受容システムにより制御されていると考えられる。ジベレリンレベル及びα－アミラーゼ活性の増加は大麦の場合よりも緩やかであった。同じイネ科の種子でもこのように異なったパターンを示す事実は興味深い。

1aA09

シロイヌナズナの花器官の発達にはジベレリンが必要である

後藤伸治, Richard P. Pharis[1]（宮教大.生物, [1]カルガリー大.生物）

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L.)のジベレリン(GA)感受性突然変異*ga1-1*は体内GAを欠くため植物体は矮性となり，花芽形成も野生型よりも遅い。また，形成された花器官は未発達のまま不稔となる。花器官のうち，めしべおよびがく片は比較的正常に発達するが，花弁およびおしべの発達，成長は阻害され，特に花粉と花糸は成熟には至らず，花粉の受精能力もない。しかし，この花のめしべに野生型の花粉をつけると正常な種子ができる。

この*ga1-1*の若いつぼみにGAを処理すると，抑制されていた花弁，花粉，花糸などが発達，成長し，自家受粉して種子を形成する。その際，これらの器官の正常化の程度と持続はGAの種類および濃度により異なる。調査したGAでは，その効果の強さは，2,2-dimethyl GA4 >GA7 >GA3 >GA4 >GA1 = GA5の順であった。GAに対する感受性は敏感な順に乳頭突起，花弁の発達，花糸の伸長，花粉の成熟となり，花粉の成熟に最も大量のGAを必要とした。また、正常な花器官が発達するためにはGAが存在し続ける必要があり，GAの添加を中止すると花器官は再び未発達となった。

これらの結果から，花器官のうち少なくとも花弁の発達，花粉の成熟および花糸の伸長にはGAの存在が必須であると結論される。

1aA10

アカパンカビの野生株および集落型突然変異株の菌糸成長過程におけるオーキシンおよびジベレリンの作用

佐々奈緒美、富田香織[1]、別所広隆[1]、中村卓造[1]、村山肇子[2]、中村輝子（日女大・理・物生, [1]昭和薬大・生物, [2]関東学院大・工）

アカパンカビ野生株74Aにおいて、オーキシンおよびジベレリンが若い菌糸の伸長を促進し、オーキシンとジベレリンの相互作用が相加的であることをこれまでに報告した。また、オーキシンとジベレリンは、若い菌糸の伸長に続く分枝に影響をおよぼし、特にオーキシンが菌糸の伸長の先端優性に深く関わっている可能性について報告した。今回は、分枝菌糸伸長を含む菌糸成長過程におけるオーキシンとジベレリンの役割についてさらに詳細な検討を行なった。また野生株に加え数種の集落型突然変異株を用い、菌糸成長過程におけるオーキシンとジベレリンの作用とオーキシンの内生量の変動について野生株との比較検討を行なった。分生子の前培養、採取方法等は、これまでと同様に行なった。菌糸伸長および分枝菌糸の観察は、前回と同様にカバーグラス上に寒天を含む培地を塗り付け、約２０個の分生子を接種し２６℃暗黒中で培養後、オーキシンあるいはジベレリン処理しさらに数時間同条件で培養後顕微鏡観察し測定を行なった。内生オーキシンについては、分生子を液体振盪培養した後濾過し菌体と培地を分け、常套法により抽出し高速液体クロマトグラフィーを用いて分析を行なった。野生株の菌糸成長において、菌糸先端からはじめて分枝菌糸が出現する場所までの長さは、対照に対してジベレリン処理された場合には短く、オーキシン処理された場合には長かった。集落型突然変異株の中の１種は、オーキシンにより菌糸成長が促進された。

1aA11

ウキクサ 、*Lemna gibba* G3、の老化と若返り。その特徴とタンパクパタンの変動

定金豊、岡崎裕美、中島秀明（岡山大・理・生物）

ウキクサのフロンドの老化と若返りは、Ashby(1949)によって最初に報告された大変興味のある現象である。１枚のフロンド（母フロンド）に着目したとき、それが左右のポケットで交互に生産する娘フロンドの表面積は母フロンドの老化にともなって減少する。大体十数個の娘フロンドを生産した後、母フロンドは死を迎える。老化した母フロンドから生産された娘フロンドは、自身より少し大きいフロンドを生産する。数回これを繰り返した後、娘フロンドの大きさは最初の母フロンドの大きさに戻っていく。これが若返りの過程である。この二つの過程により、結果として集団は老幼のフロンドからなる。Ashbyによって発見されたこの現象を確認した後、この老化と若返りの過程におよぼす植物ホルモンの影響をまず調査した。しかし老化の過程は影響を受けなかったが、若返りの過程はＡＢＡによって阻害された。フロンド単位面積当たりのタンパク量は、それぞれの娘フロンドで変化しなかった。さらに二次元電気泳動パタンによるタンパクの構成の変化を比較して、それぞれの過程に特有に変動するタンパクを同定する試みを報告する。

1aB01

ジャガイモ塊茎のリポキシゲナーゼ反応系に関わるコルネル酸合成酵素活性の分離と性質

和田清伸、地阪光生、横田一成、滝波弘一（島根大・農・生物資源科学）

脂肪酸ヒドロペルオキシドは、植物に広く分布するリポキシゲナーゼ（LOX）の作用で生じた後、解裂や閉環反応を経て、短鎖のアルデヒドやアルコールおよびジャスモン酸等の生理活性物質に変換されて植物の様々な生理機能に関与する。ジャガイモ塊茎のLOX反応系では、脂肪酸ヒドロペルオキシドからジビニルエーテル結合を有するコルネル酸（CA）が生成するが、このような反応系は他にあまり例がない。本研究では、このCAを合成する酵素の単離と諸性質の解析を試みた。

CA合成酵素はジャガイモ塊茎粗抽出物のミクロソーム画分に回収され、0.5% DOC処理によりそのほぼ100%が可溶化された。この可溶化酵素をDEAE-セルロース陰イオン交換クロマトグラフィー（直線濃度勾配溶出）にて分画したところ、２つの活性ピークが現れ、各酵素標品の精製度は粗抽出物に対し15倍および６倍であった。一方、可溶化画分をゲルろ過HPLCにて分析したところ、活性ピークは分子量200 kDa以上の高分子量領域に検出された。傷害ストレス下で、LOX活性は時間の経過とともに増大したが、CA合成酵素活性は減少し、24時間後には活性がほぼ消失した。また、CAはジャガイモ塊茎LOXを拮抗阻害することが報告されているが、今回、同LOXに対するCAの作用をより詳細に検討したところ、低濃度のCAはLOX活性をむしろ促進した。以上の結果より、CAはジャガイモ塊茎のLOX反応系の調節因子の一つであることが示唆された。

1aB02

キュウリ実生リポキシゲナーゼの発現様式とその生理的役割について

松井健二、田渕豊、津留英治、梶原忠彦、長谷俊治[1]（山口大・農・生物資源、[1]阪大・蛋白研）

リポキシゲナーゼ(LOX)は、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸に分子状酸素を添加する酵素で動植物界に広く見いだされている。キュウリでは乾燥種子にLOX活性は検出されないが、発芽3日目から急激に高まり、5～6日目をピークとした一過的な誘導が見られる。また、根には至適pHの異なるアイソザイムが存在し、その活性は3日目に弱いピークが見られ6日目以降も長く保持されている。そこで我々はキュウリ子葉、根における*LOX*遺伝子の発現様式の解明と子葉におけるLOXの生理的役割の解明を試みた。

これまでに子葉、根LOXのcDNAを単離し、その構造を明らかにしており、また各遺伝子に共通なプローブ及び特異的なプローブを用いることにより、両遺伝子を区別して検出する系を開発した。この系でRNAブロッティングを行った結果、子葉におけるLOX活性発現が転写レベルで制御されること、その遺伝子発現が光により負に制御されることが示された。また、根に特異的なプローブを用いた系で子葉*LOX*遺伝子がほとんど検出されなかったこと、および子葉とは違った根のLOX活性発現が転写レベルで制御されていることから、両*LOX*遺伝子が空間的、時間的に異なった制御様式で発現していることが示された。

現在、子葉LOXは中性脂質中のリノール酸もよい基質とすること、子葉LOX活性の誘導様式と子葉における貯蔵脂質の減少様式が極めて一致することから本酵素が脂質分解、すなわち炭素源転流に関連している可能性について検討中である。

1aB03

キュウリ子葉リポキシゲナーゼはトリグリセリド油水界面上で酸素添加する

松井健二、梶原忠彦（山口大・農・生物資源）

リポキシゲナーゼはリノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸に酸素添加する酵素である。キュウリ種子を発芽させると本酵素は発芽3日目から急激に合成されるが、その発現様式は種子貯蔵脂質の分解と高度に相関している(1)。そこで、我々は本酵素のトリグリセリドへの反応性について検討した。本酵素はGum Arabicで懸濁したtrilinoleinに対して顕著な酸素添加活性を示し、リノール酸を基質にした場合、リノール酸エマルジョンの崩壊するpH 7から活性が急激に低下したのに対し、trilinoleinを基質にした場合は、pH 9.0まで高い活性を維持すること、trilinoleinに対する酸素添加は、時間と共に反応速度が低下すること、trioleinによって形成したエマルジョンとの前処理でほぼ完全に活性を失うこと、などを観察した。これらの結果は多くのリパーゼに知られている油水界面上での触媒反応、つまり、scooting mode、で本酵素がtrilinoleinに作用していることを示す。つまり、キュウリ子葉リポキシゲナーゼは油水界面を認識し、その界面に非可逆的に吸着したうえで、その酸素添加反応を触媒すると考えられる。こうした結果をもとに、リポキシゲナーゼが脂肪性種子発芽時の脂質分解に関与している可能性について報告する。

(1) Matsui, K., Irie, M., Kajiwara, T. and Hatanaka, A. (1992) *Plant Sci.* **85**, 23-32.

1aB04

ニチニチソウ培養細胞の細胞外酸性ホスファターゼアイソザイムの精製とその諸性質

田中正浩、城市篤、桜井英博（早稲田大学・教育・生物）

ニチニチソウ培養細胞ではリン酸欠乏時に高親和性リン酸取り込み活性が上昇し（Furihataら、1992）、また、培地中へ細胞外酸性ホスファターゼが放出される。このホスファターゼには4種のアイソザイム（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ）が存在するが、Ⅰ、Ⅱ、Ⅳはリン酸欠乏により誘導され、Ⅲは構成的に発現している。我々は、これまでにⅠ、Ⅱ、Ⅲを精製し、その諸性質について報告した（Joichiら、1992, 1993）。

今回、Ⅳを精製した。これまでと同様に培地の50-85％飽和硫安画分をゲル濾過（Toyopearl　HW55)、陰イオン交換（MonoQ　FPLC）にかけ、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳに分画し、さらにゲル濾過（Superdex75　FPLC）により、Ⅳを電気泳動的に単一に精製した。Ⅳの分子量はSDS-PAGEで43kDaで、4種のアイソザイムの中で最も小さかった。至適pHは5.0であり（Ⅰ、Ⅱは、4.5、Ⅲは5.0）、最も中性寄りにあった。p-ニトロフェニルリン酸、β-ナフチルリン酸をよく分解したが、糖リン酸に対する活性は低かった。

ⅢのN末端アミノ酸配列の決定のため、粗精製標品をSDS-PAGE後、PVDF膜へブロット、目的バンドを切り出し、気相シークエンサー（ABI社477A）にて分析した。N末端から10残基までの配列：ＩＰＴＴＬＤＧＰＦＫ。

1aB05

ゼンマイ胞子葉緑体におけるプロテインキナーゼとその生理的基質の単離

蒲池浩之、近藤憲作、水上史之、井上弘（富山大・理・生物圏環境）

ゼンマイ胞子の葉緑体チラコイド膜には、高等植物の成熟葉におけるものに比べて多数のリン酸化タンパク質が含まれているが、その生理的意義についてはほとんど分かっていない。そこで我々は、これを明らかにするための第一段階として、ゼンマイ胞子葉緑体チラコイド膜に含まれるプロテインキナーゼとその生理的基質を単離することを試みた。

ゼンマイ胞子葉緑体チラコイド膜に含まれるプロテインキナーゼの一部は、葉緑体チラコイド膜の凍結・融解処理によって、それらの生理的基質と共に可溶性画分として遊離する。本研究では、この可溶性画分（粗抽出液）を出発材料として用いた。

粗抽出液には、約8種類のリン酸化タンパク質が存在し、主に38kDと31kDポリペプチドが顕著にリン酸化されていた。38kDポリペプチドは、電気泳動により分離したゲル中においてもリン酸化されることから、自己リン酸化能を持ったプロテインキナーゼであることが示された。この自己リン酸化能を目安にしてこのキナーゼを精製したところ、自己リン酸化能のない42kDポリペプチドをサブユニットに持っていることが分かった。また、このキナーゼのゲルろ過による分子量は、68kDであった。次に、このキナーゼ（PK68）の生理的基質を同定するために、熱処理した粗抽出液とPK68を再構成しリン酸化させることを試みた。結果は、31kDポリペプチドがPK68の特異的基質であることを示していた。また、31kDポリペプチドは、ゲルろ過による分子量が150kDであったため、生体内では4量体として存在していることが推測された。

1aB06

ステビオール合成酵素の検出と特性

金 勤碁, 柴田 均, 山下 寛
島根大学農学部応用生物機能学講座

ステビア植物 (*Stevia rebaudiana*) は多量に甘味配糖体を蓄積するが, そのアグリコンであるステビオール (13-hydroxy kaurenoic acid) の合成酵素についての知見は得られていない. ステビオール合成はジベレリン合成経路からの分岐点であり, ステビオシド蓄積の重要な step である. 基質である Kaurenoic acid (KA) はヒマワリの未熟種子のアセトン-extract から TLC と HPLC で純粋精製し, GC/MS で KA であることを確認した. KA と ^{14}C-CH_3I から ^{14}C-Me-KA も調製した. ステビア葉から調製した, Chloroplast, Mitochondria, Microsome, Soluble fraction と KA を incubation 後, 生成物を HPLC と GC/MS で分析した結果, NADPH と FAD に依存して, stroma fraction でステビオールの生成が検出された. また ^{14}C-methyl-KA から ^{14}C-methyl-Steviol が同じ条件下で生成することも確認した.

1aB07

植物イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼの新規阻害剤はヒスチジン生合成阻害によって除草作用を示す。

多田幸代, 波多野美香, 中山由美子, Raymonde Fonné-Pfister[1], 太田大策（日本チバガイギー（株）国際科学研究所, [1]Ciba-Geigy Ltd., Switzerland）

イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼ (IGPD) は、微生物及び植物においてヒスチジン生合成経路に関与する酵素の一つである。昨年の本大会において、我々は、小麦IGPD cDNAの単離及びバキュロウイルス発現系による大量発現について報告した。今回は、IGPD反応の基質の構造に基づいて合成した新規IGPD阻害剤 (IRL1803及びIRL1856)の組み換えIGPDに対する阻害様式及び小麦に対する除草活性について報告する。

両化合物の小麦IGPDに対する阻害定数は約10 nMで、同程度であったが、IRL1803はslow-binding type inhibitorの性質を示した。バジル培養細胞を用いた実験では、IRL 1803は、IRL 1856に比べて１０倍以上の強い生育阻害を示した。また、これらの生育阻害はHisの添加により完全に回復した。次に、発芽後４日目の小麦植物を、これらのIGPD阻害剤 (4 kg/ha)で処理したところ、著しい生育阻害がみられた。IRL1803処理した植物からはIGPD活性は全く検出できなかったが、Western blottingによりIGPDタンパクの存在が認められた。このことは、IRL 1803処理植物におけるIGPD活性の消失は酵素量の減少によるものではないことを示唆している。すなわち、IRL 1803及びIRL 1856は、植物中でIGPDを阻害しヒスチジン生合成を抑制する新規除草剤である。

1aB08

マツバボタン(Portulaca glandiflora Hook.)カルスにおけるチロシンヒドロキシラーゼの精製とその性質

小林 直子、寺本 進(熊本大・理・生物科学)

ベタシアニン生成の制御機構を解明するために、マツバボタンの赤色カルスを材料として、ベタシアニン生合成におけるチロシンからDOPAへの流れに着目している。

その結果、赤色カルスより抽出した粗酵素液中にチロシンヒドロキシラーゼ活性が検出され、さらにその活性のピークはベタシアニン量のピークの前で観察された。これより、ベタシアニン生合成にチロシンからDOPAへの水酸化を触媒するチロシンヒドロキシラーゼが深く関与していることが示唆された。

しかしながら、この酵素は動物、菌類においては詳細に調べられているものの、植物においてはまだ見つかっておらず、精製も未だに行われていない。そこで本研究では、赤色カルスから、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーそしてセファクリルS-200ゲル濾過によりチロシンヒドロキシラーゼを単離・精製した。その結果、ゲル濾過により分子量は48000、最適pHは8.0であった。Km値は1.6mMで、金属塩は銅、カルシウムイオンにより促進された。また各種試薬に対する影響は2-ME、DTTで阻害された。以上のことより、本酵素は基質としてモノフェノールであるチロシンのみを水酸化し、ジフェノールオキシダーゼ活性を持っていないので、チロシンからDOPAへの水酸化反応を特異的に触媒する水酸化酵素であると考えられる。

1aB09

ベタニジン分解酵素について

公文慶朗、斎藤裕之、竹中秀行、加藤研治（塩野義製薬, 油日ラボ）

Betacyaninは中心子目植物に存在する含窒素色素であり合成系以外にbetanin の分解酵素が存在することが知られている。

今回、betanin の前駆体であるbetanidin を分解する酵素二種(BDE_1、BDE_2）がヨウシュヤマゴボウに存在することを見出だし、抽出精製した。BDE_1の分子量は49,000、BDE_2の分子量は54,000, 至適 pH はいずれも 6.0であった。Betanidin に対する BDE_1 のKmは2.5×10^{-4} M、BDE_2 のKmは1.2×10^{-4} M であったが、betanin はほとんど分解しなかった。BDE_1 および BDE_2 はbetanidin にglucose が付加する前にbetanidin を分解している可能性が考えられる。さらに betaninを分解する酵素(BDE_3）についても精製し、性質を調べた。Betanin 分解酵素は分子量 28,000 であり、至適pHは 3.0であった。この酵素は betaninの aglycon部分を分解すると共にβ-glucosidase活性を持ち glucoseを遊離させたが、直接 betanidinを分解することはできなかった。BDE_1、BDE_2、および BDE_3 の主な代謝産物は紫外、可視部吸収スペクトルが一致することから同じ物であると思われる。

秋季に赤色化した果肉のBetanidin 分解酵素活性は緑色の果肉とほとんど変わらなかったが、 betanin分解活性(BDE_3）はかなり低下しておりこれがbetanin 蓄積量の増加に関与している可能性が示唆された。

1aB10

フェレドキシンイソタンパク質蓄積が示すトマト果実クロモプラスト形成の２つの経路

青木　考，　和田　敬四郎　（金沢大・理・生物）

トマト（*Lycopersicon esculentum*)は、少なくとも５つのフェレドキシン(Fd)イソタンパク質を持ち、果実では５つのFdが蓄積するが、成長に伴う増減のパターンが各々異なっている。しかしその増減パターンはライプニングにおける果実組織の赤色化とは無関係のようであった。そこで、Fdイソタンパク質の蓄積とプラスチドの形態との関係を明らかにするために、単離したクロロプラストとクロモプラスト中でのFdの蓄積パターンを調べてみた。するとFd0と名付けたイソタンパク質は、緑色果実全体からは検出されるにもかかわらず、緑色果実から単離したクロロプラストには存在しないことがわかった。一方、赤色果実から単離したクロモプラストにはFd0を含む全てのイソタンパク質が、赤色果実全体と同じように蓄積していた。これより緑色果実中にFd0の豊富なクロロプラストとは別のプラスチドが存在する事が予想され、Fd0が根にも蓄積すること、Fd0蓄積は光非依存的なことから、このプラスチドは非光合成的であると考えられる。さらに果実内部の組織ごとのFd0蓄積のライプニング前後での変化から、２種類のプラスチドが共に、同時的にクロモプラストに変換されていることがわかった。

1aC01

形質転換型ランソウSynechocystis　sp.　PCC 6803及び好熱性ランソウSynechococcus vulcanusのフェレドキシン遺伝子のクローニング

仲本準、鈴木豊子（埼玉大・理・生化）

チトクロームやフェレドキシンなどの鉄を含む蛋白質は、種々の代謝系で重要な役割を果たしている。鉄濃度が変化する生育環境条件下で十分な生育を維持するために、このような鉄を含む蛋白質の発現がどのように調節されているのかを調べるために、まず、形質転換型ランソウSynechocystis　sp.　PCC 6803のフェレドキシン遺伝子のクローニングを行い、その構造を明らかにした。この遺伝子は、ゲノム中に一コピー存在したが、相同な他の遺伝子の存在も示唆された（現在この遺伝子をクローニング中である）。フェレドキシン遺伝子の転写産物の蓄積量は、培養液中の鉄濃度に依存して変化した。このランソウのフェレドキシン遺伝子を用いて、好熱性ランソウSynechococcus vulcanusのフェレドキシン遺伝子をクローニングし、その全構造を決定した。

現在、これらのフェレドキシン及びその他の鉄を含む蛋白質の遺伝子の発現に及ぼす鉄濃度の影響を比較している。

1aC02

ラン藻*Plectonema boryanum*でのトウモロコシ・フェレドキシンイソ蛋白質の機能的発現

松村智裕，藤田祐一，長谷俊治（大阪大・蛋白研）

フェレドキシン(Fd)は，光化学系Ｉで励起された電子やピリジンヌクレオチド由来の電子を様々な物質代謝系に伝達・分配する．植物には，2種類以上のFdの存在が知られており，トウモロコシにも葉や根における発現様式が異なる2種類のFdイソ蛋白質，FdI(光合成型)とFdIII(非光合成型)が見出され，生理的に分業している可能性が示唆されている．本研究では，トウモロコシFdI，FdIIIの機能特性を解析する一手段として，これらの分子をラン藻*Plectonema boryanum*内で発現したところ，表現型に与える影響が異なっていたのでその結果について報告する．

大腸菌のtrcプロモーター下においたFdI及びFdIIIの成熟体領域のみをコードする遺伝子断片を大腸菌と*P. boryanum* 間のシャトルベクターpPBH201に挿入した発現プラスミドを構築し，ラン藻の形質転換体を得た．これらはラン藻自身のFdに加えて，鉄・硫黄クラスターを備えたFdIあるいはFdIIIを有していた．FdIを導入した株は，コントロールと同じような表現型を示したが，FdIIIを導入した株は，独立栄養培地で顕著な生育阻害が見られ，培地にグルコースを加えることでその阻害が緩和された．このような表現型の相異は，両Fdの物性の差，例えば酸化還元電位(FdI : -423mV，FdIII : -345mV)が異なることに起因するものと考えられる．現在，大腸菌*lacI*^{q}遺伝子を用いて*trc*プロモーターのラン藻内での発現を制御することにより，FdIIIの発現誘導の過程とラン藻の生理状態の変化の様子を時間を追って解析しつつあり，その結果も合わせて報告する．

1aC03

プラストシアニンとPSIとの相互作用に及ぼすPsaFサブユニットの役割

日比野隆[1]，Lee Byung Hyun[2]，高倍昭洋[1,3]（名城大・理工，[2]名古屋大・生物分子応答センター，[3]名城大・総合研究所）

高等植物におけるPSI複合体のPsaFサブユニットはプラストシアニンドッキング蛋白質と呼ばれ，プラストシアニンがP700を特異的に認識し，効率のよい電子移動を行なう上で重要な役割を果たすと考えられている。しかし，シアノバクテリアではPsaFサブユニットが上記反応に関与しないことが示されている。我々は，PsaFサブユニットの役割を明らかにするために，キュウリからpsaF遺伝子を単離し，その結果について報告した。今回，PsaFサブユニットの役割に関して更に検討したので，その結果について報告する。PsaFサブユニットのPSIおよびプラストシアニンとの相互作用をin　vitroで検討することを目的として，psaF遺伝子の大腸菌における発現を試みた。PsaFサブユニットのシグナルシーケンスを全て含むプレカーサーPsaF，N-末端部分を削除した中間サイズPsaF，まったく含まない成熟型PsaFをコードする遺伝子を作成し大腸菌で発現させた。その結果は，いずれの場合も PsaF 蛋白質の蓄積が認められなかった。そこで，同様の遺伝子をシアノバクテリアで発現することを試みたところ，PsaF　蛋白質の蓄積が認められた。現在，その局在部位等について検討を進めている。

1aC04

光化学系Ⅱ膜・酸素発生系の光再活性化反応における チトクロム b_{559}の役割

水澤直樹，山下巍　（筑波大・生物）

私達は、前学会でトリス処理で Ｍｎを除去した系Ⅱ膜の高電位型チトクロム b_{559} は、１Ｍ ＮａＣｌを加えると酸化型に変わるがＭｎを電子供与体とする酸素発生系の光再活性化初期反応で光還元される事を報告した。 本研究では、閃光照射でトリス処理系Ⅱ膜を光再活性化し、高電位型チトクロム b_{559}の光還元が Ｍｎ-クラスターの再構築に直接関与している可能性を調べた。 その結果、チトクロム b_{559}は、酸素発生系の光再活性化において電子受容体として機能する事がわかってきたので報告する。

トリス処理系Ⅱ膜では、約１／３のチトクロム b_{559}が高電位型で存在し、その大部分は還元型で安定だが、反応液のＮａＣｌ濃度を１Ｍ に上げると酸化型になり、その酸化された高電位型のうち１／３は、低電位型に移行した。 この １Ｍ ＮａＣｌを含む系Ⅱ膜懸濁液に、Mn^{2+}・Ca^{2+}を加え、１ 秒間隔で閃光照射すると、２発目で低電位型から高電位型への回復が顕著に起こり、それに続き還元型チトクロム b_{559}の蓄積、最後に酸素発生能の回復が起こった。 また、還元型チトクロム b_{559}の蓄積と酸素発生能の回復はともに閃光間隔が０．２～１秒の時に最大値を示した。 更に、１）光再活性化による還元型チトクロム b_{559}の蓄積と酸素発生能の回復は、ともにＤＣＭＵにより阻害される事、２）光再活性化の際にＤＣＰＩＰを添加すると、還元型チトクロム b_{559}の蓄積速度は著しく低下するが酸素発生能の回復には影響しない事から、高電位型チトクロム b_{559}は系Ⅱ還元側の Q_B部位以降から電子を受容する事が示唆された。

1aC05

化学合成独立栄養細菌と光合成細菌のフェレドキシン-$NADP^+$還元酵素の比較生化学

引地 進、福森 義宏（東工大・生命理工・生命理学）

化学合成独立細菌は無機物の酸化によって生育に必要なエネルギーを得ている細菌である。そのATP生成機構は多くの研究によって明らかにされつつあるが、それに比べてNADPH生成機構の詳細は不明である。そこで私達は化学合成独立栄養細菌*Nitrobacter winogradskyi* (*N.win.*) および、本細菌との近い系統関係が示唆されている紅色非硫黄光合成細菌*Rhodopseudomonas palustris* (*R.pal.*) から$NADP^+$ reductaseを精製し、その諸性質を比較検討した。両酵素の分子量はそれぞれ36000,38000であり、生体内では共にホモダイマーとして存在している。また蛍光分析より補欠分子族はともにFADであり、それらの分光学的性質はお互いによく似ていた。両酵素のN末端アミノ酸配列（20アミノ酸）はほぼ同じであった。さらに両酵素はNAD^+より$NADP^+$に高い基質特異性を示し、クロロプラストを用いた光還元系でNADPH生成活性を示した。光合成細菌における本酵素の電子供与体はフェレドキシンであると思われるが、化学合成独立栄養細菌の電子供与体については明らかでなかった。しかし今回可溶性のチトクロム*c*550が$NADP^+$還元系に関与していることが示唆されたので、CO_2固定のための光エネルギー非依存性$NADP^+$還元系を精製酵素を用いて再構成することを試みた。

1aC06

ホウレンソウ強結合型フェレドキシン－NADP還元酵素の構造

先浜直子，西村和泉，小幡茂裕[1]，新勝光
（神戸大・理・生物，[1]キシダ化学・研究開発グループ）

ホウレンソウチラコイド膜に結合するFNR には強結合性のもの(FNR-T) と弱結合性のもの(FNR-L) とが存在する。ゲル沪過による分子量は43,000と78,000で，前者は１分子，後者は２分子の単量体FNR (FNR-M) と随伴タンパク質との複合体と考えられる。両複合体に含まれるFNR-M の一次構造が必ずしも同一でないと考えられる事象が報告されている。即ち，N末端アミノ酸としてQをもつものと＜Qをもつものが見出されること，また成熟FNR のアミノ酸配列から求められた 269残基目アミノ酸はVであるのに，cDNAの塩基配列から求められたものはFである。そこで本研究ではまずFNR-T に含まれるFNR-M についてN末端と 269残基目アミノ酸を調べた。

N末端分析に用いたFNR-T は，FNR-L を抽出除去した葉緑体からアセトン分画，SDS-PAGE，PVDF膜へのエレクトロブロットにより単離した。膜上のFNR-M 吸着部分を切り出し，直接シーケンサーで分析した。また 269残基目アミノ酸の分析に用いたFNR-T は，アセトン分画後アフィニティクロマトによって精製した。アルギニルエンドペプチダーゼ消化後，Tricine-SDS-PAGE，エレクトロブロットにより 269残基目を含むペプチドをPVDF膜上に取り出し，アミノ酸配列を分析した。Vが検出された。従って，FNR-T に含まれるFNR-M はQをN末端とし 269残基目アミノ酸としてVをもつFNR である。同様の分析をFNR-Lについても進めている。

1aC07

系Ⅰ粒子に結合するフェレドキシン－ＮＡＤＰ還元酵素のN末端構造

酒井幸三，唐木裕子[1]，新 勝光[1] （積水化成品工業中央研，[1]神戸大・理・生物）

酒井らは1991年度年会でフエリシアン化カリと$MgCl_2$を含む溶液を使用して，ホウレンソウから高いNADP光還元活性を示しFNRを結合する系Ⅰ粒子を単離したことを報告した。この方法でフエリシアン化カリは系Ⅰ粒子の光化学活性の失活防止，$MgCl_2$はFNRの脱落防止に役立つ。本研究では諸条件を検討しさらにFNR結合量の多い系Ⅰ粒子を単離した。FNR/P700は1.3，NADP光還元活性は161 μmolNADP/mgChl/hであった。

チラコイド膜には強結合型FNRと弱結合型FNRとが結合しているが，系Ⅰ粒子に結合するFNRがいずれに属するかを明らかにすることは，両者が異なる生理的役割を持つ可能性があることから非常に重要である。単離系Ⅰ粒子のFNRは界面活性剤処理にも脱落しないことから強結合型と思われるが，このことを確かめるためにN末端アミノ酸を分析した。何故なら最近我々の研究室では強結合型FNRのN末端にはグルタミン，弱結合型にはγ-ピログルタミン酸が配列していることを見出したからである。単離系Ⅰ粒子を35%アセトン中で超音波処理してFNRを抽出し，75%で沈殿とした。このアセトン粉末を抽出処理し，SDS-PAGEとエレクトロブロットでPVDF膜上にFNRを回収した。吸着部分の切片を直接気相型シーケンサーで分析すると，グルタミンが検出された。この結果は系Ⅰ粒子に結合するFNRが強結合型であることを示唆する。

1aC08

ホウレンソウ大型ＦＮＲに混入するＮＡＤ依存フラビン酵素

三上覚範，木全由佳，新　勝光（神戸大・理・生物）

ホウレンソウから高度精製した大型FNR試料をSDS-PAGEで分析すると，FNRの33kDaバンドに加えて55kDaバンドが現れる。このバンドは，当初コネクテイン由来のものと考えられたが，本研究によって，混在するNAD依存フラビン酵素のものであることがわかった。このフラビン酵素の細胞内分布はまだ明確でないが，単離葉緑体からアセトンや硫安で抽出できる。そこでFNRの精製とは関係なく，単離精製し，その性質を調べた。

ホウレンソウ葉のアセトン抽出と分画，硫安分画，フェニールトヨパール，マトレックスレッドA，フェニール-5PW，DEAE-5PWの各クロマトによって高度に精製した。FADを含有し，典型的なフラビンタンパク質の吸収スペクトルを示す。吸光度比（A_{456}/A_{273}）は0.171 で高度に純化されている。分子量はSDS-PAGEで55kDa，ゲルろ過で85kDaで、この差の原因は不明。NADHを基質に高いジアホラーゼ活性を示す。NADHのKmは0.15mM。ユビキノン，フェニール-p-キノンなども電子受容体となるが，フェレドキシンとの間で電子授受はない。

高度に精製した大型FNR試料にこのフラビン酵素が混入したのは，精製全工程で同一区分に分画され，吸収スペクトルが酷似していたことによる。特に，フェレドキシンカラムへの同時吸着は予想外のことであった。精製初期のアセトン分画はフラビン酵素から大型FNRを解体して排除するのに効果的な操作であるが，大型FNRからフラビン酵素を排除するのに有効な手段はまだ見出せない。

1aC09

ホウレンソウ葉緑体包膜の電子伝達タンパク質

村田　善則、高橋　正昭（甲南大・理・生物、大阪府大・農・応用生化）

緑色植物では光合成により、葉緑体内の反応はもとより、細胞質で行われるエネルギー要求性の反応を駆動する還元力を供給している。昨年の本大会において、我々は、光照射された無傷葉緑体がシトクロム *c*（Cyt *c*）を還元することを見いだし、その反応が葉緑体包膜に局在する電子伝達系によることを報告した。そこで、葉緑体包膜から、電子伝達タンパク質の精製を試みた。β-オクチルグルコシド(OGP)により可溶化された包膜タンパク質を、ヒドロキシアパタイトに吸着させ、KH_2PO_4で溶出した。Cyt *c* 酸化活性を有する溶出画分を、続いてゲル濾過にかけた。溶出液の示すSDS-PAGEのパターンとCyt *c* 酸化活性の比較から電子伝達活性を示すタンパク質を同定した。この酸化還元タンパク質の葉緑体包膜外膜での局在性と電子伝達活性の局在性とは一致した。その他、酸化還元電位、アミノ酸配列、包膜酸化還元タンパク質を再構成したリポソームにおける電子伝達などについて報告する。

1aC10

ホウレンソウの葉緑体包膜を構成するタンパク質の同定とその局在性

吉雄麻喜，菓子野康浩，小池裕幸，佐藤和彦（姫路工大・理・生命科学）

葉緑体の包膜は、イオン輸送や代謝産物輸送、脂質合成といった重要な役割を果たしている。しかし、それらの機能を担っているタンパク質はほとんど同定されていない。一方、最近は遺伝子クローニングの技術によって発見され、アミノ酸配列も解析されたのに、機能については全く解明されていないタンパク質が多く報告されるようになってきた。これらのタンパク質については内・外包膜のどちらに存在するのかさえも確定されていないのが現状である。我々はホウレンソウ葉緑体の内・外包膜を分離し、それぞれに含まれているタンパク質のN-末端アミノ酸配列を分析してきた。同定できたタンパク質の局在性を調べてみると、報告された側とは異なる方の膜にも存在しているタンパク質があった。これは包膜の分離がうまく行かず、お互いの画分に混入しているか、報告されているタンパク質の局在性が実は違っているという2つの可能性が考えられる。そこで、連続密度勾配遠心により包膜を分離し、各画分について電気泳動を行ってタンパク質がどのように分布しているのかを調べたので報告する。

1aD01

パルスケイ光法による光合成の低温光阻害および低温光耐性の解析

津山孝人、新家勝、北川敬浩、小林善親（九大・農・林）

低温光照射による光合成阻害について低温耐性植物（トウヒ）および低温感受性植物（イネ）を用いて解析した。光照射下において３０℃から０℃まで一定の速度で温度を変えながらパルスケイ光測定を行うと、２４°および１１℃においてQ_Aの酸化還元状態が急激に変化し、２℃でQ_Aはすべて還元された。このようなQ_Aの過剰還元はイネ・トウヒでともに観察される。Q_Aの過剰還元のもとでは、弱光照射下においても系Ⅱの量子収率が時間とともに低下した。しかし、光合成活性の阻害はイネにおいてのみ観察される。低温光照射下・低温暗所での量子収率、光利用効率、光合成活性の変化を測定したところ、低温光照射下で見られた量子収率の低下は、イネの場合系Ⅱ阻害によるものであり、トウヒの場合系Ⅱ内での光利用効率の低下によるものであった。これらの結果をもとにトウヒの低温耐性とキサントフィルサイクルとの関係についても考察する。

1aD02

直鎖電子伝達反応におけるH^+／e比について

小林善親、S. Neimanis, U. Heber（九大・農・林学、Univ. Würzburg）

光合成はどのようなストイキオメトリーで行われているか。化学量論比は、電子伝達、H^+輸送、Qサイクル、ＡＴＰ合成、CO_2固定などの反応とその共役機構にかかわる未解決の問題である。このような研究を行うため、直鎖電子伝達速度、サイクリック電子伝達速度、H^+輸送速度、ΔH^+、e／O_2比、ＡＴＰ、光強度、量子収率、CO_2固定など多現象同時測定法の開発と改良を試みてきた。ここでは、無傷葉緑体およびチラコイド膜の定常状態での直鎖電子伝達反応におけるH^+／e比の測定結果について述べる。無傷葉緑体においてNO_2^-、メチルビオローゲンを受容体としたときH^+／e＝３、チラコイド膜においてメチルビオローゲンを受容体としたときH^+／e＝３、フェリシアン化カリウムを受容体としたときH^+／e＝２であった。これらの結果は、水から光化学系Ｉへの直鎖電子伝達においてQサイクルは常に機能していることを示している。

1aD03

光化学系II反応中心に結合した15-シス-β-カロテンの検出

Bialek-Bylka, Grazyna・鞆　達也[1]・佐藤　公行[1]・小山　泰
（関学大理，岡山大理/基生研[1]）

光合成系のカロテノイドは光保護作用と補助集光作用の２つの役割を演じている．この２つの作用に関連して，紅色光合成細菌ではカロテノイドのコンフィギュレーションの自然選択が行われている．すなわち光保護作用が主要な役割であると思われる光反応中心では15シス体が，補助集光作用が主要な役割であると思われるアンテナ複合体では全トランス体が選択されている．

光化学系II反応中心と紅色光合成細菌の光反応中心との間には，電子伝達系とペプチドのアミノ酸配列に関連して相同性が見出されている．したがって，光化学系II反応中心に結合したβ-カロテンが15シス構造をとっていることが期待される．しかし，光化学系II反応中心から15-シス-β-カロテンを検出する最初の試みは失敗し，紅色光合成細菌の場合と異なり全トランス体が結合していると結論された．

今回，完全な暗所・低温（～４℃）で光化学系II反応中心からβ-カロテンを抽出し，低温で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行い，２次元検出器を用いてHPLC分析を行いつつ，各成分ピークの吸収スペクトルを測定した．その結果，15-シス-β-カロテンが検出された．三重項状態に励起されると「15シス体は量子収率ほぼ1で一方的に全トランス体に異性化すること」が明らかにされているが，クロロフィルは強力な三重項増感剤である．これが，15-シス-β-カロテンの検出を極めて困難にしていた理由である．上記の実験条件下でもなお異性化が進行中であることが推定された．

1aD04

渦鞭毛藻 Alexandorium cohorticula から分離したペリディニン―クロロフィル―蛋白質の分光学的特性

緒方武比古[1]、児玉正昭[1]、小林正幸[2]、野澤庸則[2]、三室　守[3]（[1]北里大・水産、[2]東北大・工、[3]基生研）

＜目的＞　渦鞭毛藻は光合成色素として、水溶性のペリディニン―クロロフィル―蛋白質（ＰＣＰ）を持つ。その機能を裏付ける色素の分光学的な性質、特にペリディニンの特性については解析が進んでいない。この点を明らかにするために新たにＰＣＰを単離して、その諸性質を詳細に検討した。

＜方法＞　渦鞭毛藻 Alexandorium cohorticula からＰＣＰを単離して測定に用いた。吸収、蛍光、円偏光二色性（ＣＤ）、磁気円偏光二色性（ＭＣＤ）について検討した。

＜結果＞　ＰＣＰは、従来、複数のフォームがあるとされていたが、蛋白質分解酵素の存在下ではひとつのフォームのみであった。その一次構造は他の種から分離されたＰＣＰとの相同性は極めて高いが、他のどのアンテナ色素とも相同性がなかった。分子量は３７ｋＤａで、その中に、１２分子のペリディニンと２分子のクロロフィルａが結合していた。

吸収スペクトルを２次微分法により詳細に極大位置を調べると、ペリディニン、クロロフィルａともに複数のバンドで構成されていることが判明した。とくにペリディニンについては、カロテノイドの第２励起準位の振動構造に当てはめて、少なくとも３種類の状態を取っていることが明らかとなった。ＣＤスペクトルは従来、ペリディニンの間に強い相互作用がある事を示すと解釈されていたが、これは妥当ではないことが明らかとなった。またＭＣＤスペクトルから、ペリディニンの第１励起準位は確認できなかった。２分子のクロロフィルａには相互作用がなく、モノマーとして存在することが判明した。

これらの事実を基にして、色素分子の構造、機能と励起状態との関連について議論する。

1aD05

Chlamydomonas reinhardtii のクロロレスピレーションによる光化学系II実効光化学収率の調節

遠藤　剛、浅田浩二（京都大・食研）

*Chlamydomonas reinhardtii*細胞では、暗所でクロロレスピレーションによるpH勾配がチラコイド膜に形成されるため、クロロフィル蛍光の energy quenching (qE)が生ずることを昨年報告した。これは、クロロレスピレーションによるプラストキノンの還元は、光合成のlinear flowに比して低速度であっても、光化学系IIの実効光化学収率を低下させることができることを示している。このような特異なqN形成がみられる*Chlamydomonas*と暗所でqNがない高等植物（エンドウ）の光によるqN誘導を比較した。

エンドウ葉では、暗所でqNはみられず、弱光下では脱共役剤に影響されないqNが誘導された。これはstate 1-2 transitionによると思われる。強光下ではqE（脱共役剤で消失するqN）が誘導された。

一方、*Chlamydomonas*では、暗所ではqEが誘導され、強光下では state transitionが誘導された。結果として弱光下のqNが最小となった。このように、高等植物と単細胞藻類では光による蛍光クエンチングの様式に大きな違いがあることが判明した。

*Chlamydomonas*の暗所でのqN誘導は、呼吸基質である酢酸の添加によって強く促進された。酢酸がクロロレスピレーションの基質となってプラストキノンを還元しているか、あるいはミトコンドリアの呼吸促進が間接的にクロロレスピレーション活性とプラストキノンの還元レベルに影響をあたえているかを現在検討している。

1aD06

好酸好熱性の紅藻イデユココゴメから高度に精製した酸素発生標品の単離とその諸性質

村山　浩、加茂政晴、太田尚孝、榎並　勲　（東京理大・理・生物）

好酸好熱性藻イデユココゴメのチラコイド膜をn-heptylthioglucosideで可溶化し遠心分画により部分的に精製した後、さらにdodecyl-β-D-maltosideで可溶化し一回のDEAEカラム操作により高度に純化した高い活性を示す酸素発生標品を単離した。この標品は、D1・D2を含む反応中心コア蛋白、CP47、CP43の膜蛋白と33kDa、14kDa、11kDaの3種の表在性蛋白から構成されていた。14kDa蛋白は強くヘム染色されるとともに、好熱性ラン色細菌*Synechococcus vulcanus*のcyt *c*550の抗体ともよく反応した。一方、11kDa蛋白は上記ラン色細菌の12kDa蛋白の抗体とは全く反応しなかった。現在、そのN末端アミノ酸配列を決定中である。この標品にはフィコビリン蛋白やそのリンカー蛋白は全く含まれず、高等植物の酸素発生標品に存在する表在性の23、17kDa蛋白も存在しなかった。本標品は、フェニル-*p*-ベンゾキノンを電子受容体とした時、2,000～2,500 μmol O_2/mg chl/hの高い酸素発生活性を示した。また、酸素発生活性にCa依存性はほとんどみられず、フェリシアナイドはよい電子受容体とはならず、DCMUにより完全阻害された。従って、この標品は高い活性をもったnativeな高度に純化された酸素発生標品と言える。紅藻から単離した本標品と高等植物やラン色細菌から単離された酸素発生標品の諸性質を比較する予定である。

1aD07

好熱性シアノバクテリア*Masitigocladus laminosus* より得られる光化学系II複合体

<u>朝　達也</u>，佐藤公行（基生研，岡山大・理・生物）

結晶化による構造解析を最終目標に、熱に対してより安定な標品を得るため、好熱性シアノバクテリアの一種*Masitigocladus laminosus* から光化学系IIコア複合体の単離が試みられた。光化学系IIコア複合体は、55°Cで培養した細胞のフレンチプレス処理により得られるチラコイド膜より、界面活性剤Triton-X100を用いて抽出され、この界面活性剤存在下(0.05%)で行うハイドロキシルアパタイトおよびDEAE-Toyopearlクロマトグラフィーにより、光化学系I、フィコビリタンパクその他の成分を含まない状態まで純化された。この複合体はタンパク成分として、CP47とCP43のアポタンパク、D1とD2タンパク、cytb559 αおよびβサブユニットおよび*psbI* 遺伝子産物を含み、これ以外に、12-15kDaの領域に３本のタンパクが検出された。この標品は、フェオフィチン２分子当たり、約42分子のクロロフィルと８分子のβ-カロチンを含んでおり、色素組成の上でもほぼホウレンソウの光化学系IIコア複合体に一致するものであった。興味ある事実は、生育の最適温度が55°Cであるのに対し、単離された標品の示すDCIP光還元活性(供与体:DPC) およびチラコイド膜の示す酸素発生能は25°C付近に最適値を示した。しかし50°Cでの熱処理により、ホウレンソウ葉緑体の酸素発生能は完全に失活するのに対し、*M. laminosus*では、失活は見られるがその程度は抑えられていた。

1aD08

ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 の光化学系Ⅰ欠失株からの系Ⅱ複合体の単離とその成分解析

<u>池内昌彦</u>（東京大学・教養・生物）

我々はこれまでに高等植物とラン藻の光化学系Ⅱ複合体のタンパク質組成を調べ，系Ⅱの構造の比較解析をするとともに，形質転換型ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 を用いて遺伝子破壊によって機能解析を行ってきた．しかし，このラン藻のチラコイド膜には系Ⅰ複合体など多くのタンパク質が含まれており，これまで純度の高い系Ⅱ標品を調製することは難しく，またその組成解析も十分なものではなかった．今回，W.Vermaas博士（Arizona州立大）より系Ⅰの反応中心タンパク質の遺伝子を破壊した *Synechocystis* 変異株を入手し，系Ⅱ複合体の単離法を検討した．単離したチラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化した後，ショ糖の密度勾配遠心法で分画することによって系ⅡをＡＴＰ合成酵素など他のタンパク質から分離することができた．この系Ⅱ複合体のタンパク質組成は従来の野生株から単離したものとよく似ていたが，さらに１１ｋＤａ，１３ｋＤａの２種の新規タンパク質成分を含んでいた．この系Ⅱ標品の各タンパク質をN末端アミノ酸配列の決定により同定した．その結果，４．１ｋＤａの領域はＰＳⅡ-Mと従来植物で核支配といわれていた４．１ｋＤａタンパク質を含んでいた．また，４．５ｋＤａ領域には*ｙｃｆ８*遺伝子産物が含まれていた．また，１１ｋＤａ，１３ｋＤａタンパク質は表在性と思われる新規タンパク質であった．現在これらの遺伝子のクローニングを試みている．

1aD09

原子間力顕微鏡による好熱性ラン色細菌のチラコイド膜標品の観察

市村　年昭　（工技院・生命工研）

原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）は近年急速に発達してきた走査型プローブ顕微鏡のひとつで、鋭利な探針を物体表面に接触させつつ走査することにより物体表面の微小な形状を測定できる顕微鏡であり、生体物質への適用も盛んになりつつある。本研究では、好熱性ラン色細菌*Synechococcus elongatus*より分離したチラコイド膜標品をタッピングモードＡＦＭにより観察した。

チラコイド膜は、菌体をガラスビーズで破砕し遠心分画により分離し、１%グルタールアルデヒドで固定後純水で洗浄した。新たに劈開した雲母基板上にチラコイド膜溶液を滴下し、自然乾燥した試料を室温、大気中で観察した。2M NaBrで処理した標品では表面が比較的平滑な、厚さ10nm 以下の膜が観察された。これは、一層のチラコイド膜が雲母基板上に平らに付着していることを示している。また、菌体を50mM HEPES緩衝液中で破砕しフィコシアニンが一部残存するように調製した膜では膜表面全体に直径数10nm程度大きさの構造体がやや規則性をもって存在しており、膜全体の厚さが約10～20nmであった。さらに、0.75Mリン酸緩衝液中で菌体を破砕し、フィコビリソームが膜に保持されるるように分離した標品では、表面の構造体の大きさは100nm前後で、全体の厚さは20～40nmであった。これらの結果から、観察された膜表面の構造体は主にフィコビリソーム又はそのコアーと考えられる。また、nativeに近いチラコイド膜表面の形状をＡＦＭにより直接観察できることを示した。

1aD10

光化学系II複合体の二次元結晶化

中里 勝芳[1], 豊島 近[2], 榎並 勲[3], 井上 頼直[4] ([1]新技団・さきがけ研究21、[2]東大・分生研、[3]東理大・理、[4]理研・太陽光)

光化学系II(PSII)複合体の三次元構造を氷包埋低温電子顕微鏡法を用いて高い分解能で解析するためには,良質で1 μm平方を越える大きな二次元(2D)結晶を作製しなければならない。我々はMn-クラスターを含むPSII複合体を材料として、種々の条件下で2D結晶化を試み,比較的良質で2 μm平方を越える大きな2D結晶を再現性よく得る条件を見い出したので報告する。ホウレンソウPSII膜断片をn-heptylthioglucoside (HTG)で可溶化してHTG-PSII粒子を調製し,透析によりHTGを徐々に除去すると2D結晶が得られた。低温電子顕微鏡像の画像解析から得られた2D結晶の平面群は$p22_12_1$(*p2gg*)、格子定数はa=16.7 nm、 b=15.3 nm、 γ =90.0°であった。単位格子内にモノマーが4個存在し,各モノマーが1つのPSII複合体に対応すると考えられる。分解能1.5 nm の投影図が得られ、各モノマー内には少なくとも5つ領域が認められた。

1aE01

アズキ上胚軸アポプラストのアスコルビン酸含量に対するＩＡＡの効果

岩崎郁子、高濱有明夫[1] (九大・理・生物、[1]九州歯大・生物)

アズキ上胚軸（芽生え後３～４日目）上部の切片（14 ㎜）をシャーレに浮かべ、伸長生長およびアポプラストとシンプラストのアスコルビン酸（ＡＡ）とデヒドロアスコルビン酸（ＤＨＡ）含量に対するＩＡＡの効果を調べた。

(1)ＩＡＡ存在下での切片の伸長生長の大きさは、２２時間後では、ＩＡＡ非存在下の約３倍であり、特に、最初の４～５時間で２２時間後の７５％に達した。

(2)アポプラストのＡＡレベルは、ＩＡＡ存在下・非存在下共に切断３時間後にはゼロになった。２２時間後にはわずかながらＡＡが増加した。その増加はＩＡＡで促進された。ＤＨＡレベルは３時間後には最初のレベルの３０％に低下したが、２２時間後には、部分的に回復した。ＩＡＡは２２時間後のＤＨＡの増加も促進した。２２時間後のアポプラストのＡＡとＤＨＡのレベルは１００μＭＩＡＡ存在下で最大になった。

(3)シンプラストのＡＡとＤＨＡのレベルはＩＡＡ存在下・非存在下共に切断後４～５時間で最初のレベルの半分となり、以後ほぼ一定であった。

切断というストレスによってアポプラストでのＡＡの急激な消失（ＤＨＡの相対的な増加）が生じることから、切断によってアポプラストの酸化還元レベルはより酸化的になると考えられる。アポプラストのＡＡとＤＨＡの役割およびそれらの細胞膜を介しての輸送に対するＩＡＡの効果について考察する。

1aE02

根の細胞壁多糖に対するジベレリンの作用(2)—ペクチンの熱解離とヘミセルロースの変動について

谷本英一(名古屋市立大・教養・生物)

根の成長は、ジベレリン合成阻害剤存在下でジベレリン(GA)によって制御できる。GAは根を細く伸長させ、GAがないと根は太る。この形態変化に伴って細胞壁に変化が起こり、これまで、ペクチン(PC)とヘミセルロース(HC)の分子量変化について報告した。今回は、穏和な条件で抽出されたPCの熱解離現象と、分子量分布に対するGAの効果についてさらに詳しく調べた結果、および、HCの分子量変化に対するGAの効果についてエンドウの矮性種（cv. Little Marvel) と正常種(cv. Alaska)の比較結果を報告する。

細胞壁から常温でCDTA抽出されたPCは、セファロース２Ｂカラムの溶出パターンから、分子量５０万以上の高分子重合体であると考えられた。これを、60℃～100℃で2h 処理すると、温度に依存して分子量が徐々に低下し、90-100℃では分子量1～数万にピークを持つ分子に解離した。従って、室温で抽出されてくるPCは、70～80℃以上で不安定になる高次構造をもつ重合体であると考えられる。GA処理根では、このPCの分子量分布が大きくなることから、細長く伸長した根では、太く短い根よりPCの分子重合状態が大きいことが示された。

アルカリ抽出したHCをセファロース４Ｂカラムで分画すると、５０万以上と、１～数万の２つのピークが認められた。根の先端部では、大きい分子量のピークが高いが、根の基部に向かって徐々に低分子のピークが増えた。このことは、細胞齢の進行に伴って、HC分子が小さくなることを示している。GA処理によって、この分子量の低下が抑制され、大きい分子種が多くなる結果が得られた。また、GAのこの効果を、Little MarvelとAlaskaとで比較すると、Little Marvel(矮性種)の方がより顕著にGAの効果が表れた。

1aE03

コムギ幼葉鞘細胞壁結合性フェルラ酸及びジフェルラ酸量に対するアブシジン酸の影響

若林和幸, 保尊隆享, 神阪盛一郎 (大阪市大・理・生物)

我々は、コムギ芽生えに水ストレス(吸水ストレス)を与えると、幼葉鞘細胞壁結合性フェルラ酸 (FA)とジフェルラ酸(DFA)量の増加が著しく抑制されることを報告してきた。さらに、水ストレス条件下では、ＦＡ合成の律速酵素とされるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)の活性の増加が抑制されており、これが壁結合性FA・DFA量の増加抑制の一因となっていることを示してきた。本研究では、この水ストレス条件下での細胞壁のFA・DFA量の増加抑制の機構を調べる目的で、アブシジン酸 (ABA)を与えた時のコムギ幼葉鞘細胞壁のFA・DFA量の変化とPAL活性について検討を行った。

コムギ幼葉鞘の成長は、10^{-6}MのABA処理により水ストレス(60mMPEG)の場合とほぼ同程度抑制された。細胞壁結合性FA・DFA量の増加もABA処理により抑制されていた。さらに、ABAはPALとチロシンアンモニアリアーゼ(TAL)の活性の増加を抑えており、これらの結果から、ABAは水ストレスの場合と同様、PALとTALの活性の増加を抑えることにより、細胞壁結合性FA・DFA量の増加を抑制しているものと考えられた。

1aE04

ブラシノライドによる茎の内部組織の伸長と細胞壁の変化

冨永るみ、櫻井直樹（広島大・総科・自然）

ブラシノライドは、植物の成長や生理機能の促進に強い影響を及ぼす。エンドウ、アズキ、トウモロコシ、キウリなどでは、低濃度でオーキシンと類似の作用を示すことが報告されている。しかし、ブラシノライドは既知の植物ホルモンには認められない生理作用も示し、ホルモンとしての作用様式はまだ充分理解されていない。そこで我々は、ブラシノライドの伸長促進作用に着目し、その作用の解明を目指して以下のような実験を行った。

IAA（10^{-5} M）とBR（2×10^{-7} M）による黄化カボチャ下胚軸切片への伸長促進作用を比較してみると、Tanimoto and Masuda（1971）が明かにしたように、IAAがインタクトの切片のみに作用（19%促進）したのに対し、BRはインタクトの切片（30%促進）にも表皮を取り除いた切片（39%促進）にも伸長促進作用を示した（Tominaga et al. 1994）。表皮のある切片も表皮を取り除いた切片も、それぞれBR処理による伸長がほぼ同じ濃度のマニトールによって止められたので、BRが細胞の浸透ポテンシャルを低下させて切片の伸長を促進しているのではないと考えられる。応力緩和法により細胞壁の力学的性質を測定したところ、BR処理された内部組織が処理後2時間で有意な変化を示した（初期応力が41%、残留応力が39%の減少）。以上の結果は、BRが初めに内部組織に作用して細胞壁の弾性率を低下させ、黄化カボチャ下胚軸切片の伸長を促進していることを示唆している。内部組織に対する伸長促進作用はこれまで他の植物ホルモンでは報告されていないので、BR独特の働きだと思われる。

BR処理による切片の糖含量や糖組成、分子量の変化については目下検討中であるが、今のところどれも顕著な差はみられない。

1aE05

トウモロコシ幼葉鞘成長の光による抑制機構

Mohammad Masud Parvez, 若林和幸, 保尊隆享, 神阪盛一郎（大阪市大・理・生物）

暗所で生育させたトウモロコシ幼葉鞘の成長速度は基部で最大であり、先端部にむかうほど小さかった。これに白色光（5 W m^{-2}）を照射すると、特に基部の成長が強く抑制され、先端部よりむしろ小さい成長速度を示した。白色光による成長抑制機構を明らかにするため、幼葉鞘各部域での細胞壁の力学的性質と浸透パラメータの変化を調べた。暗所で培養した幼葉鞘の細胞壁は、基部ほど小さい最小緩和時間（T_0）及び緩和速度（R）並びに大きい力学的伸展性（Ext）を示した。光照射によって、T_0とRは大きく、またExtは小さくなり、これらのパラメータの軸に沿った勾配は逆転した。一方、幼葉鞘細胞における浸透物質の蓄積は、光照射によって強く阻害された。浸透ポテンシャルは、暗所培養幼葉鞘では基部ほど低いのに対して、光照射した幼葉鞘では全体に上昇し、暗所培養のものとは逆の勾配を示した。幼葉鞘各部域の成長速度と細胞壁の力学的性質並びに浸透ポテンシャルとの間には、高い相関が認められた。これらの結果より、トウモロコシ幼葉鞘の白色光による成長阻害は、特に基部における細胞壁伸展性の低下と浸透ポテンシャルの上昇を介してもたらされることが示された。

1aE06

胚軸の長いシロイヌナズナ*hy* 突然変異体の成長特性

渡辺竜五、保尊隆享、神阪盛一郎、後藤伸治[1]（大阪市大・理・生物、[1]宮城教育大・生物）

一般に白色光は胚軸の伸長成長を阻害する。シロイヌナズナ *hy* 突然変異体は白色光に対する感受性が低いことが知られている。*hy* 突然変異体の成長特性を胚軸細胞壁の力学的性質と関連させて研究した。

4℃，4日間低温処理した種子を暗所22℃で2日間発芽させた。得られた芽生えを明所と暗所に移し、さらに5日間育てた。暗所では野生型は最初の2日間胚軸の伸長速度が高かったが、3日目には成長は停止した。白色光は胚軸の伸長を阻害し、胚軸は実験終了の7日目まで低い伸長速度を保ち、ほぼ直線的に成長した。*hy* 突然変異体も暗所では野生型と同じ成長特性を示したが、白色光下では実験終了の7日目まで野生型よりも高い伸長速度で直線的に成長した。胚軸細胞壁の引っ張り試験の結果、光照射後3時間以内に伸展性の低下が見られた。

現在、細胞壁の糖組成と浸透ポテンシャルに対する光の影響を調べている。

1aE07

ＰＡＬ活性の阻害が二次壁の木化に与える影響について
ヒャクニチソウ単離葉肉細胞培養系を用いて

中島　仁、高部圭司、佐伯　浩　（京大、農、林産）

ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素への分化過程では、二次壁肥厚と肥厚部の木化が短時間のうちに観察できる。この培養系にＰＡＬ活性の阻害剤、2-アミノインダン-2-ホスホン酸を加えた培地（ＡＩＰ培地）で一定時間培養後、細胞を急速凍結置換固定、樹脂包埋した。分化培地（D培地）で培養したコントロールと、ＡＩＰを加えて54時間後にコニフェリルアルコールを投与して（ＡＩＰ＋ＣＡ培地）培養を継続した細胞を同様の方法で試料とし、管状要素のリグニン分布と細胞壁の微細構造とをUV顕微鏡とＴＥＭで観察した。分化が終了する96時間目には、Ｄ培地の管状要素の二次壁肥厚部は明瞭な紫外線吸収を示し、280nm付近に吸収極大が存在していた。ＡＩＰ培地では管状要素の二次壁肥厚部に明瞭な紫外線吸収は認められず、リグニン沈着がかなり抑制された二次壁が形成されていることが示唆された。ＡＩＰ＋ＣＡ培地では管状要素の二次壁肥厚部は明瞭な紫外線吸収を示したが、吸収スペクトルはＤ培地のそれとは異なっていた。二次壁肥厚部では72時間目にはＤ培地とＡＩＰ培地でいずれにもフィブリル様構造が観察された。96時間目にはＤ培地ではこの構造が電子不透過性物質で充填されていたのに対し、ＡＩＰ培地では細胞壁全体の染色性が弱く、ひび割れた様な構造を呈していた。ＡＩＰ＋ＣＡ培地ではアモルファスな電子不透過性の物質が細胞壁のほぼ全体を覆っていた。

1aE08

カボチャの根の細胞壁によるアルミニウムのインビトロ結合

レ・バン・ホア、竹田一彦、桜井直樹（広島大・総科・自然）

アルミニウムはカボチャ根の成長を阻害し、根の先端（５mm）でペクチン画分とヘミセルロースB画分の量を増加させた。非セルロース性多糖類の量的増加がアルミニウムを結合させるのに役立っているかを調べるために、インビトロで多糖類とアルミニウムの結合について研究した。アルミニウムを加え、ペクチン、及びヘミセルロースBをゲルろ過にかけ溶出曲線をモニターした。アルミニウム含量は発光分光分析装置によって測定した。アルミニウムを加えてもペクチンの溶出曲線は変化しなかった。ペクチンに加えたアルミニウムのほとんどは、低分子領域に溶出された。このことは、アルミニウムがペクチンに結合しなかったことを示唆する。アルミニウムはヘミセルロースBの分子量の高分子を引き起こした。さらに、アルミニウムはヘミセルロースBの高分子領域で溶出された。この結果はアルミニウムがヘミセルロースBに結合したことを示唆する。アルミニウムの細胞壁多糖への結合はこれまで確認されていない。我々の実験結果は細胞壁中で、ペクチンではなくヘミセルロースBがアルミニウムと結合し得ることを示した最初の例である。この結合が根に対するアルミニウムの毒性を減少させることに結びつく可能性がある。

1aE09

グリセリン処理ササゲ中空胚軸の力学的性質に対する温度の影響

岡本 朱根，　岡本　尚（横浜市大.総合理学）

低温グリセリン処理ササゲ中空胚軸(Glycerinated hollow cylinder, GHC)の細胞壁には、*in vivo*の臨界降伏圧(Y)と細胞壁の展性(ϕ)に相当する臨界降伏張力(y)と細胞壁の展性(ϕ)というパラメーターが存在し、さらに細胞壁の酸性化によってyは減少、ϕは増大することが明らかになった（Okamoto &Okamoto, 1994）。また熱処理及びタンパク質分解酵素処理を施したGHCを用いた実験から酸性化によるyやϕの変化は細胞壁結合性のタンパク質によって調節されることが示唆された（９４年植物学会年会発表）。

今回ＧＨＣにおけるyやϕの温度感受性を検討したところ、pH6.2の条件下では生理的温度範囲でyやϕには温度依存性がほとんどないが、ｐＨ4.0ではϕは２０℃で最大であり、一方yは３０℃で最小になること、さらに４０℃を越える非生理的温度のもとでは細胞壁の酸性化による力学的性質の変化はなくなることがわかった。

Okamoto, H. & Okamoto, A., Plant Cell & Environ., (1994) 17: 979-983.

1aE10

講演中止

1aF01

イネ幼植物根におけるNADH依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)のアンモニウムイオンに対する応答

丹野宏美、早川俊彦、山谷知行（東北大・農・生物化学）

イネのグルタミン酸合成酵素(GOGAT) とグルタミン合成酵素(GS)の複数の分子種のうち、NADH-GOGATが生育時期や窒素環境の変化に最も鋭敏に応答する[1)2)]。　窒素によるNADH-GOGAT の発現制御を解析する第一歩として、NADH-GOGATタンパク質含量に対する窒素イオンの影響を調べた。

ガラス室で発芽後24日間水耕栽培したイネ幼植物を、無窒素, 1 mM NH_4^+, 1 mM NO_3^- あるいは、0.5 mM NH_4NO_3 で処理し、根及び地上部のNADH-GOGATタンパク質含量の変動をimmuno-blot法で解析した。　また、Fd-GOGAT, GS1, GSr, GS2 も対照として比較した。　72時間まで経時的に収穫した根のDNA，可溶性タンパク質あるいは、新鮮重当たりのNADH-GOGATタンパク質含量とその活性は窒素の供給に伴って増加した。　効果の著しいNH_4^+区では、NH_4^+供給後 3時間目で増加が認められ、24時間目に最大を示した。　根の対照酵素や地上部では、この様なNH_4^+の効果は認められなかった。　GOGAT 反応の基質であるグルタミンや生成物のグルタミン酸を各10 mM の濃度で24時間処理した根では、無窒素区と比較してNADH-GOGATタンパク質は増加するものの、NH_4^+処理に匹敵する効果は確認されなかった。　さらに、1 mM NH_4^+ と250 μM cycloheximideを同時供給後24時間処理した根では、NADH-GOGATタンパク質含量の増加は確認されなかった。

以上から、イネ根のNADH-GOGATタンパク質は直接的にNH_4^+に応答し、極く短時間で*de novo* 合成されていることが示唆された。　現在、この応答を転写レベルで解析している。

1) Hayakawa et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31;1071
2) Hayakawa et al. (1993) Plant Physiol. 101;1257

1aF02

緑藻オオハネモ Bryopsis maxima における窒素代謝酵素群の細胞内分布と酵素化学的性質

井口律子、木村裕子、広瀬美紀、中山克己、岡田光正
(東邦大・理・生物分子)

多核単細胞緑藻オオハネモにおける窒素代謝に関与する硝酸還元酵素(NR)、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)、グルタミン合成酵素(GS)及び、グルタミン合成酵素(GOGAT)について、細胞内分布とこれらの酵素の生化学的性質を調べた。細胞抽出液を、1,400 ×gで遠心分離して得られた沈殿(葉緑体画分)には、細胞内のNR活性とGDH活性のそれぞれ65%と50%が認められた。GS(synthetase活性)とGOGAT(NADH-GOGAT)の活性は葉緑体画分にのみ認められた。NRはNADH 依存性であったが、GDHとGOGATはNADPH 依存性であった。細胞質に存在するGDHは、高等植物ではNADH依存性であるのに対し、この藻のGDHはNADPH 依存性であった。

GDHは、比較的熱に不安定であり、1mMのCa^{2+}により活性に影響を受けず、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}では若干の低下が認められた。またこのGDHは、SH基の化学修飾試薬であるp-chloromercuribenzensulphonat(.1mM) により定量的に失活し、全失活は3.5分後であった。このことより、GDHの活性発現にシステイン残基の関与が示唆された。

1aF03

好温性ラン藻グルタミン合成酵素遺伝子のPCRクローニング

足立 圭, 芦田裕之[1], 柴田 均, 落合英夫, 澤 嘉弘
(島根大・農・応用生物機能, [1]遺伝子実験施設)

グルタミン合成酵素(GS)は、窒素代謝系の中心酵素である。我々はこれまでノンヘテロシストタイプの好温性糸状性ラン藻 *Phormidium lapideum* 由来のGSを精製し、その諸性質を明らかにしてきた。今回は、本酵素の構造と機能の解明を進めることを目的として、本酵素遺伝子をPCRクローニングし塩基配列決定を行った。

P.lapideum 由来GSのN末端アミノ酸配列と、すでにデーターベースに登録されている各種生物由来のGS-Iの相同性領域から、DNAプライマーを作製し、PCRによりGS遺伝子の一部を取得した後、Cassettes & Cassette Primer 法(TAKARA *Sau*3AI Cassette)により上流、下流方向への伸長を行った。これらから得られたDNA配列情報により推定されるアミノ酸配列は、ヘテロシストタイプの糸状性ラン藻である *Calothrix*, *Anabaena* 属由来のGSと81-83%程度、単細胞性ラン藻 *Synechococcus* 属のもので77%と高い相同性が見られた。しかしながら、*Anabaena* GS遺伝子で報告されているような、複数のプロモーターの存在は確認されなかった。また大腸菌などのグラム陽性菌由来のものとは55%程度の相同性であったが、Mn原子、基質、ATPの結合など、活性中心を形成していると思われるアミノ酸残基は *Phormidium* GS においてもすべて保存されていた。

1aF04

登熟ダイズ種子のグルタミン酸脱炭酸酵素によるグルタミン酸の分解代謝

増田亮一（農水省・食総研）

在来ダイズには登熟中の子葉肥大時期にグルタミン酸含量が高くなる種子（ＨＧＬ）が見出される．この遊離グルタミン酸高集積の背景の１つは，貯蔵タンパク質が蓄積する時，子葉のNADH依存性グルタミン酸合成酵素の活性上昇がタンパク質合成よりも時間的に早まるためであることが判明した．

他方，子葉のグルタミン酸の分解代謝ではグルタミン酸脱炭酸酵素（ＧＡＤ）活性に品種間差が見られなった．ところが，ＨＧＬ子葉に供給されるアミノ酸組成はγ-アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）の比率が対照に比べ低く，種皮のグルタミン酸脱炭酸酵素活性も明らかに低い結果となった．種皮の窒素栄養面の役割にはアミド変換作用があり，種皮溢泌液は篩管液のそれとは異なりアスパラギンが低下し，グルタミンが増加する．種皮のＧＡＤ活性は子葉に比べ１桁高く，ＧＡＢＡトランスアミナーゼ活性は子葉の方が逆に高かった．種皮のＧＡＢＡシャントはアミノ酸供給代謝に関与することが考えられる．

植物ＧＡＤにはアイソザイムの存在が予想されるので，ダイズＧＡＤをグルタミン酸-アガロース，カルモジュリン-セファロースのアフィニティークロマトグラフィーを用い部分精製した．ビオチン化カルモジュリンで検出すると，種皮のＧＡＤはカルモジュリン結合型が主であったが，非結合型も検出された．

1aF05

アカパンカビにおけるアミノ酸取り込み系の制御とリジン感受性変異株

定金 豊、大西 卓嗣、中島 秀明（岡山大・ 理・生物）

アカパンカビは多くの栄養要求性突然変異体を用いることにより、アミノ酸の取り込み系や代謝経路について詳しく調べられてきた生物の一つである。アミノ酸一般の透過系の *pmg*、塩基性アミノ酸透過系の *pmb*、疎水性アミノ酸透過系の *pmn* の３つの取り込み系がアミノ酸の取り込みを担っている。しかし取り込み系がどのように制御され、細胞内のアミノ酸量の恒常性を保っているのかは未だよくわからないことが多い。*bd* 株に自然に生じた突然変異（第32回本大会で発表）である lys^{sen} 株は、液体培地中での生長が塩基性アミノ酸リジンによってのみ特異的に阻害され、1mMのリジン存在下ではその生長はコントロールに比べ30%ほどになった。リジンによる生長阻害は培地が酸性側である時のみ見られ、その阻害はpH7.0の培地中では全く起こらなかった。また lys^{sen} と透過系の突然変異体とを交雑して得た子孫株についてリジン感受性を調べたところ、*pmb* または *pmn* と交雑した場合はその性質が1:1に分離したが、*pmg* と交雑した場合はリジン感受性の性質が全体の約25%しか表れなかった。これはリジン感受性の性質が *pmg* の変異によって隠されたことを意味する。lys^{sen} 株の知見からアカパンカビのアミノ酸の取り込み系の制御について考察する予定である。

1aF06

穀物種子におけるデンプン分解機構の解析 - 無酸素発芽条件におけるイネ・大麦・小麦のデンプン分解酵素群の変動

山口淳二1、Lorenzo Guglielminetti2, 升井洋至3、Amedeo Alpi2, Pierdomenico Perata2 （1名大生物分子応答研究センター、2ピサ大学、3山口女子大）

デンプン性穀物種子の発芽時には効率の良いデンプン分解が必要とされる。私たちは、無酸素条件下の種子発芽について解析した結果、α-アミラーゼ活性の誘導がこのデンプン分解における不可欠の過程であることを明らかにした1,2)。一方、デンプン分解は、α-アミラーゼだけでなく、β-アミラーゼ、枝切り酵素、マルターゼ（α-グルコシダーゼ）、フォスフォリラーゼ等の協調作用として進行する。発芽時におけるデンプン分解機構のより精密な解析の第一歩として、これらの酵素の活性の検出と抗体による免疫化学的な解析を行った。

イネ、大麦、小麦種子を無酸素・酸素条件下において発芽させ、そのタンパク質抽出液について酵素活性の検出ならびにイムノブロットによる抗原量の定量を試みた。

α-アミラーゼ： 好気条件下において *de novo* 合成されるが、無酸素条件下においてはイネのみで発現する。

β-アミラーゼ： 大麦・小麦ではすでに乾燥種子において存在するが、イネでは *de novo* 合成される。

枝切り酵素ならびにマルターゼ： イネでは乾燥種子にすでに存在しているが、大麦・小麦では *de novo* 合成される。また、無酸素条件下においては、イネのみで検出される。

以上、発芽時におけるデンプン分解機構について考察する。

1) Planta 188: 611-618 (1992); 2) Planta 191: 402-408 (1993)

1aF07

発芽時におけるイネβ-アミラーゼの発現

伊藤伸一[1]， 山口淳二[1,2] （[1]名大・農・生化学制御 [2]名大・生物分子応答研究センター）

β-アミラーゼは、デンプンの非還元末端に作用するエキソ型酵素である。オオムギにおいては、β-アミラーゼが乾燥種子の胚乳中に遊離型と結合型として存在していることが知られている。しかし、イネβ-アミラーゼでは不明な点が多いことから、今回解析を行った。

吸水後0-8日のイネ種子「台中65号」からの抽出液を用いてザイモグラム解析を行ったところ、4日目以降にのみβ-アミラーゼ活性が検出された。また、オオムギβ-アミラーゼ抗体を用いた解析により、4日目以降の抽出液にのみβ-アミラーゼタンパク質が検出されたが、乾燥ならびに発芽初期の種子においては検出されなかった。これらの結果から、オオムギとは異なり、イネでは遊離型β-アミラーゼが発芽時において*de novo*合成されることが明らかとなった。

一方、今回解析に用いた台中65号と異なり、別の正常イネ品種である「日本晴」ではβ-アミラーゼの活性が確認されなかった。両品種のゲノムDNAを用いたPCR解析の結果からは、β-アミラーゼ遺伝子構造上の両品種間の差異は検出されなかった。現在、β-アミラーゼの転写レベルでの存在を確認するためにmRNAの解析を進めており、それらの結果とあわせて両品種間におけるβ-アミラーゼの発現機構の違いについて議論する。

1aF08

コーヒー葉におけるプリンアルカロイドの生合成と分解経路

芦原坦[1], Ana M. MONTERIO[2], T. MORITZ[3] AND A. CROZIER[2] [1]お茶の水大・理・生物、[2]Div. Biochem. Molec. Biol., Univ. Glasgow, Glasgow, U.K.[3]Dept. Plant Physiol., Swedish Univ. Agric. Sci., Umea, Sweden.

コーヒー *(Coffea arabica)*葉におけるプリンアルカロイドの生合成に関して、異なる代謝経路が提案されている。そこで、今回は種々の^{14}Cでラベルされたプリン化合物を用い、代謝物をHPLCとradioanalyzerで分析し、代謝経路を詳細に調べた。[8-^{14}C]adenine, [8-^{14}C]guanineを用いたpulse-chase実験や、[2-^{14}C]xanthosine (XR)、[2-^{14}C]theobromine (Tb)の実験から、caffeine (Cf) の合成経路は、チャ葉ですでに提案されている AMP → IMP → XMP (or GMP →guanosine) → XR → 7-methylxanthosine (7-mXR) → 7-methylxanthine (7-mX) → Tb → Cf であることが推定された。Theophylline (Tp) や xanthine (X) は、プリンアルカロイド合成の前駆体とはならなかった。これらの結果は、Nazzario & Lovatt が示唆している経路 (Plant Physiol. 103, 1203-1210, 1993) とは異なっていた。

一方、プリンアルカロイドの分解に関して調べた結果、[2-^{14}C]Cf の分解は、少なくとも24時間のincubationでは、みられなかった。[8-^{14}C]Tp や[8-^{14}C]xanthine (X) の代謝から、Tpは、3-methylxanthine を経て、X になり、allantoin、CO_2 へと分解されることが明らかにされたが、これ以外に、Xの一部は、7-mXに変換されるという新たな経路が示された。

1aF09

粟幼葉における1,3-ジアミノプロパンの代謝

Howlader, M.A. Awal, 平沢栄次（大阪市大、理、生物）

単子葉植物に見い出されるポリアミン酸化酵素(PAOase) はスペルミジンを酸化して1-ピロリン、アンモニア、過酸化水素、1,3-ジアミノプロパン（1,3-DAP）に分解する。しかしながら1,3-DAPの代謝は明らかではない。今回、粟の幼葉中にジアミン酸化酵素(DAOase）を新たに見い出し、本酵素が1,3-DAPを3ーアミノプロピオンアルデヒド（3-APA）に酸化分解すること、そして3,-APAをベ-タ- アラニンに酸化するアミノプロピオンアルデヒド脱水素酵素(APADase)を見い出しそれぞれ部分精製を行った。。エンドウのDAOdaseは1,3-DAPを分解し得ないが、粟の本酵素の1,3-DAPに対するKmは 9.1x10^{-5}M、プトレシンのKmは6.3 x 10^{-4}Mであり分子量は約150,000であった。一方、APADaseはNAPを補酵素としNADPとは反応せず、3-APAに対するKmは2.7x10^{-5}M、1ーピロリン(4-アミノブチルアルデヒド）のKmは 4.2x10^{-4}M, NAD (3-APAの場合）のKmは3.8 x 10^{-5}Mであり分子量は約70,000であった。以上の結果よりプトレシン、スペルミジン、スペルミンの代謝にかかわるPAOase, DAOase及びAPADaseの役割について検討した。

1aF10

被陰条件下に対する陽生植物と陰生植物の葉の呼吸代謝系の比較生理学的研究

野口　航、園池公毅、寺島一郎[1]（東大・理・植物、[1]筑波大・生物科学系）

葉の暗呼吸速度が低く抑えられていることは陰生植物が弱光条件下で生存するために非常に重要である。しかし、その背景となるメカニズムについては全く明らかではなかった。本研究では、葉の暗呼吸速度の低下をもたらす要因を明らかにするために、陽生植物ホウレンソウと陰生植物クワズイモをいくつか異なる光条件下（40～500 μmoles /m^2/s）で栽培し、それらの完全展開葉の呼吸代謝系に関する諸性質がどのように変化するのかを詳細に検討した。その結果、ホウレンソウでは夜間の暗呼吸速度が時間とともに減少していくこと、そして被陰条件で成熟した葉では暗呼吸速度が低いことが見いだされ、暗呼吸速度と水溶性の炭水化物量が正の相関が示された。このことから、ホウレンソウでは水溶性の炭水化物量が暗呼吸速度を律速していると結論した。クワズイモではホウレンソウに比べて暗呼吸速度が低く、さらにホウレンソウとは異なり、栽培光強度による暗呼吸速度の変化は小さく、また夜間を通じて一定であった。クワズイモでは、水溶性の炭水化物量や呼吸代謝系の鍵酵素レベルはホウレンソウとは近い値を示したが、葉内窒素濃度がホウレンソウに比べてかなり低い値であることから、クワズイモではタンパク質の代謝回転のためなどのエネルギー需要量が暗呼吸速度を律速していることが示唆された。そしてさらにその役割がはっきりとしていない電子伝達系のAlternative pathwayについても考察する。

1aF11

南極産耐冷菌13A株の呼吸に依存したH^+ポンプとNa^+ポンプについて

松永隆史、高田泰弘、福永典之　（北海道大・理・生物科学）

好気的呼吸を行う生物のエネルギー代謝では、H^+が共役イオンとして中心的役割を担っている。一方、多くの細菌がNa^+/H^+対向輸送系を持ち、一部の細菌ではアミノ酸や糖などとNa^+との共輸送系が存在するなど、Na^+も共役イオンとして働くことが明らかになってきた。今回我々は、南極の特異な塩組成を持つバンダ湖から分離された耐冷菌13A株のエネルギー代謝における共役イオンとしてのH^+とNa^+の役割を明らかにする第一歩として、呼吸に依存したH^+とNa^+ポンプについて調査した。

本菌を25℃でコハク酸を炭素源とするbiotin添加合成培地で培養すると、pH 5から少なくともpH 10までの広いpH範囲で生育した。この培地にH^+イオノフォアのCCCPを添加すると、pH 6.5では2.5 μMで生育が完全に阻害されるのに対して、pH 8.5では5 μMでも正常に生育し、その生育がアルカリpHでCCCP耐性を示すことがわかった。嫌気的に調製した細胞懸濁液に一時的に酸素を与えて内生基質による呼吸を行わせ、呼吸に依存したイオンポンプの働きを懸濁液のpH変化としてモニターした。その結果本菌は、好気的生物に遍在することが知られ、呼吸に伴いH^+を細胞外に排出するH^+ポンプに加え、同様にNa^+を排出するNa^+ポンプを有し、これらの両ポンプが酸性からアルカリまでの広範囲なpHで共に機能していることが明らかとなった。

これら両イオンポンプのいくつかの特徴と本菌の生育に及ぼす塩の影響についても報告する。

1aG01

シロイヌナズナＮＲ、ＮｉＲ遺伝子のNO_2暴露下での発現応答の解析

入船浩平，澤崎達也、田中俊憲，森川弘道（広島大・理・遺伝子科学）

我々は大気汚染好性植物（NO_2 好性植物）の創製を目指して研究を進めている。NO_2 は気孔を介して葉組織で吸収され、硝酸同化関連酵素によりアミノ酸へと同化されると報告されている。しかし、NO_2 暴露下でのこれら硝酸同化酵素遺伝子の発現応答については明らかではない。そこで、NO_2 暴露下での硝酸還元酵素(NR)、亜硝酸還元酵素(NiR) 遺伝子のmRNAレベルでの発現応答をノザン分析法を用いて解析した。また、硝酸誘導による発現応答（対照）との比較を行った。

シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana ecotype C24) を連続光下で播種後５－６週間生育させた。NO_2 暴露は4 ±1 ppm NO_2、 明所、8 時間(9:00-17:00、1回) で行なった。また、硝酸誘導は50mM KNO_3 添加で行った。NO_2 暴露またはKNO_3添加後一定時間毎(0hr-14hr)に葉を回収し、全RNA を抽出した。NR[1] またはNiR[2] cDNA をプローブとしてノザン分析を行なった。

ノザン分析の結果、NO_2 暴露ではNR、NiR ともごく短時間（暴露後15分）にそのmRNA量は上昇し始め、暴露後２時間目以降はmRNA量は減少した。他方、硝酸誘導では同様に短時間にmRNA量の上昇が見られ、その後も８時間目までmRNA量は高いレベルにあった。これらの結果について報告する。

[1] Crawford, et al. (1991) Plant Cell,3:461-471. [2] Tanaka, et al. (1994) DNA sequence (in press).

1aG02

シロイヌナズナにおけるNO_2暴露によるＧＳ遺伝子の発現の解析

有村源一郎，石田洋子，澤崎達也，関原明，入船浩平，森川弘道（広島大・理・遺伝子科学）

植物体はＮＯ２を気孔から吸収し，ＧＳ/GOGAT系によってアミノ酸へと同化すると報告されている[1]。またシロイヌナズナ植物において，グルタミン合成酵素（ＧＳ）はこれまでに葉，根および発芽種子に特異的に発現する４つのｃDNAが報告されている[2]。ここでは，植物のNO_2同化におけるGS 遺伝子の関与を分子レベルで解析することを目的として研究を行った。

播種後連続光下で4週間生育させたシロイヌナズナ植物茎葉から全ＲＮＡを抽出した。この全ＲＮＡを用いてＲＴ－ＰＣＲ法により４種類のＧＳｃＤＮＡ断片を調整した。次に，それぞれのｃＤＮＡ断片をプローブとしたノザン分析法により，シロイヌナズナ植物をNO_2暴露（４±１ｐｐｍ）したときのＧＳ遺伝子の発現応答を解析した。これらの結果について報告する。

1) T.Yoneyam, et al. (1978) Report of Special Research Project,NIES R-2:103-111.
2)T. K. Peterman and H.M.Goodman (1991) Mol. Gen. Genet. 230:145-154.

1aG03

シロイヌナズナ植物における短時間NO2暴露に応答する遺伝子のcDNAクローニング

澤崎達也，入船浩平，森川弘道（広島大・理・遺伝子科学）

シロイヌナズナ植物において，硝酸同化系遺伝子はNO2暴露により短時間（15分以内）に応答する（入船ら　昨年度，本年度本学会発表）。そこで我々はNO2暴露により，短時間（10分）に発現する遺伝子のサブトラクション法によるcDNAクローニングについて研究をすすめている。

連続光下で生育させたシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* ecotype C24）植物を用い，NO2（4±1ppm）で10分間暴露した植物体（＋）と暴露していない植物体（－）の茎葉からそれぞれpoly(A)$^+$RNAを抽出した後，λZAPIIベクターを用いてcDNAライブラリーを作成した。（＋）ライブラリーを1本鎖ファージミド（10万個クローン）に，（－）ライブラリーを2本鎖プラスミドにトランスファーした。それれら2つのライブラリー同士をサブトラクションすることにより，108個のクローンを得た。それらのクローンのうち22クローンについて，3'末端のシークエンスおよびノザン分析法を用いて現在解析中である。

1aG04

短時間の乾燥ストレスにより誘導されるシロイヌナズナ遺伝子群の解析（その3）

清末知宏、篠崎和子[1]、篠崎一雄（理研・植物分子、[1]農水省・国際農研）

我々は、シロイヌナズナを用いて、短時間乾燥ストレス誘導性遺伝子の解析を行っており、これまでにディファレンシャルスクリーニングにより17種類のcDNAを単離し、HSP70-1、HSP81-2、ubiquitin extension protein、soluble epoxide hydrolaseの遺伝子や、大腸菌のATP-dependent protease regulatory subunit (ClpA)、タバコのparB、トウモロコシのglutathione S-transferase、group II late embryogenesis abundant protein等と類似性のある遺伝子の発現が乾燥ストレス処理によって誘導されることを示した[1)〜5)]。今回、他のcDNAクローンについて解析を進めたのでその結果を報告する。

1) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1214-1220 (1993)
2) FEBS Lett. 335: 189-192 (1993)
3) Plant Cell Physiol. 35: 225-231 (1994)
4) Plant J.6: 259-269 (1994)
5) Plant Mol. Biol. 25: 791-798 (1994)

1aG05

耐旱性マメ科カウピーの乾燥誘導性遺伝子の解析

井内　聖[1、2]、篠崎　和子[3、1]、浦尾　剛[2]、寺尾　富夫[3]、篠崎　一雄[1、2]（[1]理研・植物分子、[2]筑波大・生物科学、[3]農水省・国際農研）

高等植物は種々の環境ストレスに対し、生理的応答をすると同時に遺伝子発現レベルでも応答しその変化に適応している。マメ科カウピーは主に西アフリカなどで栽培され、ダイズと同様に重要な植物性蛋白源として用いられているが、ダイズなどに比べ乾燥に非常に強い植物である。

我々は耐旱性のマメ科カウピーを実験材料に用い、さらに環境ストレスとして乾燥を取り上げ、乾燥によって誘導される遺伝子の機能及び発現の解析を行っている。1ヶ月生育させた植物を10時間乾燥処理し、ディファレンシャルスクリーニングを行った結果、乾燥誘導性のcDNAを10個取得した。現在これらcDNAの塩基配列、及び高塩濃度や低温などの環境ストレスに対する発現について解析を行っている。

1aG06

ラン藻の高温耐性における熱ショックタンパク質 GroEL の役割

林　秀則、村田紀夫（基生研）

ラン藻を致死温度に近い高温で短時間処理すると、その後一定期間は致死温度を越えた高温で生育できる。また至適温度よりやや高い温度で一定期間生育させると、光合成の酸素発生の高温耐性が増大する。このようなラン藻の高温適応における熱ショックタンパク質の役割を解明するために、*groEL*遺伝子を破壊した形質転換体を作製し、その高温耐性を解析した。

ラン藻 *Synechococcus* PCC7002 には 2 種類の *groEL* 遺伝子 (*groEL*-α、*groEL*-β) が存在する。野生株および*groEL*-β を破壊した形質転換体のいずれにおいても、熱ショック処理後、致死温度である48℃での生存率が増大する。しかし形質転換体では野生株を熱ショック処理した場合より生存率が低い。従ってラン藻 *Synechococcus* PCC7002 は *groEL*-α のみでも熱ショック応答の能力を保持しているが、*groEL*-β はこれに付加的に作用して、その能力をさらに強めるものと判断できる。一方、44℃で生育させた場合の酸素発生の高温耐性は野性株と *groEL*-β を欠損する形質転換体において差は認められない。また熱ショック処理しても酸素発生の高温耐性は変化しない。したがって、ラン藻 *Synechococcus* PCC7002 の熱ショックタンパク質、少なくとも *groEL*（チャペロニン60）は酸素発生の高温耐性には関与していないと考えられる。

1aG07

好熱性ランソウ *Synechococcus vulcanus* の熱ショック蛋白質遺伝子の構造及びその発現

田中直樹、仲本準、檜山哲夫（埼玉大・理・生化）

最適生育温度が 50℃付近にある好熱性ランソウ *Synechococcus vulcanus* に“熱”（60-63℃）ショックを与えることにより幾つかの蛋白質が蓄積する（檜山ら：昨年度本大会）。この中で最も顕著に蓄積する 60kDa 蛋白質の遺伝子の一部分をＰＣＲ法で増幅し、この遺伝子断片を用いて転写産物が熱ショックにより増加することを示し、この遺伝子がＨＳＰ遺伝子であることを昨年度の本大会で発表した。我々は、この遺伝子断片をプローブにして、*Synechococcus vulcanus* のゲノムライブラリをスクリーニングし、この遺伝子をクローニングし、上流及び下流域を含む遺伝子の塩基配列を決定したので報告する。このＨＳＰ遺伝子は大腸菌や他のランソウの *groEL* 遺伝子と相同なことから *groEL* 遺伝子の一つであると同定された。この遺伝子の上流には大腸菌の *groES* 遺伝子に類似した遺伝子が存在し、転写産物のサイズからオペロンを形成していると判断された。この遺伝子産物の一次構造の比較やゲノム上の位置から、今回単離された *groEL* 遺伝子は以前我々の研究室で単離された groEL 様遺伝子とは異なることが示された。従って、好熱性ランソウ *Synechococcus vulcanus* にも他のランソウと同様に二種類の *groEL* 遺伝子が存在することが明らかになった。

1aG08

シアノバクテリアにおける *dps* 相同遺伝子の暗所での発現

長谷川実加，佐藤直樹（東京学芸大，生命科学）

シアノバクテリア　Anabaena variabilis Ｍ３株の低温誘導性遺伝子 *cdi* の下流に *dps* 遺伝子が同定された。これは大腸菌で定常期に特有のＤＮＡ結合タンパク質をコードするとされる *dps* と相同である。コード領域をＰＣＲ法で増幅させ、ＧＳＴとの融合タンパク質として大腸菌で発現させた。このＧＳＴ－ＤＰＳの抗体を作製し、*dps* 遺伝子発現調節の研究を行った。液体培養した細胞をＧＳＴ－ＤＰＳ特異抗体によるウエスタンブロットにより分析した結果、遺伝子からの計算値　２０ｋＤａより少し大きい２３ｋＤａと２５ｋＤａの２本のバンドが検出された。このタンパク質の量は培養時間とともに著しく増加した。７５０ｎｍでの濁度　0.3 まで培養した培養液を２つに分け、１つを暗黒状態にし、２４時間培養後ウエスタンブロットを同様に行った。その結果、暗黒化した細胞で著しく濃いバンドが検出された。このことから、細胞の濃さではなく光の明暗が関係し、ｄｐｓ相同遺伝子が暗所において誘導され、発現されることが示唆された。

1aG09

シアノバクテリアのＲＮＡ結合タンパク質遺伝子群の発現と機能

佐藤直樹（東京学芸大・生命科学）

シアノバクテリア類には，ＲＲＭモチーフをもつ低分子量のＲＮＡ結合タンパク質が存在する。本研究では，*Anabaena variabilis* M3株のＲＮＡ結合タンパク質遺伝子(*rbp*)ファミリーの単離と構造の比較，発現調節，および遺伝子破壊による機能の解析を行った。*A. variabilis* には少なくとも７個の*rbp*遺伝子が存在し，そのうち５個(*rbpA1, A2, B, C, D*)を単離した。A1はリボソームタンパク質S21遺伝子rpsUとともにオペロンをつくっていたが，その他の遺伝子は単独で発現していた。前４者がコードするタンパク質は，Ｃ末端にグリシンに富んだドメインを持っていたが，これはＤ遺伝子産物にはなかった。A1とBの転写産物は低温で顕著に増加し，対応するタンパク質のレベルも低温で蓄積した。A1遺伝子の遺伝子破壊を行ったところ，低温でも生育したが，異常な形態の細胞が出現した。現在この細胞について詳細な検討を行っているが，A1遺伝子が細胞分化の制御を行っている可能性が考えられる。

1aG10

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942 の *nirA* オペロンと *rbcL*オペロンの窒素による発現制御

鈴木石根、杉山達夫、小俣達男（名古屋大・農・応用生物科学）

Synechococcus PCC7942 においては、硝酸の輸送と還元に関わる６つの遺伝子が *nirA* オペロンを構成し、その転写は硝酸の還元産物であるアンモニアによって抑制される。それに対し CO_2 の固定酵素である Rubisco をコードする *rbcL* オペロンの発現は、アンモニアによって活性化されることを見出した。アンモニアの両オペロンの発現に及ぼす効果は、アンモニアのグルタミン (Gln) への同化の阻害、あるいは Gln から他の物質へのアミド基の転移を阻害することにより消失した。このことから、Gln からのアミド基転移によって合成される化合物が、両オペロンを制御する代謝シグナルであると推定した。そこで Gln の代謝産物、及びその下流の化合物について両オペロンの発現に対する効果を検討したところ、Gln から合成されるカルバミルリン酸が分解されて生じるシアン酸がそれらの遺伝子の発現を制御することがわかった。これらの結果から、このラン藻には細胞の窒素栄養状態の変化をシアン酸の蓄積量の変化として検知し、硝酸同化系の酵素の生合成を制御するとともに、炭酸同化系の発現を活性化する機構が存在することが明らかになった。

1aH01

ヤナギ科植物にみられるヒトSRYに類似したDNA塩基配列：SB12の雄花特異的発現

篠原健司、二村典宏（森林総研）

哺乳類SRYはY染色体上に存在し、胚の生殖原基を精巣へ発達させる引き金として機能する遺伝子である。我々は、バッコヤナギ(Salix bakko K.)の全DNAを鋳型にし、ヒトSRYの塩基配列に基づいたプライマーを用い、PCR法により増幅、最終的に植物由来のヒトSRYに類似した4種類のDNA断片(SB10,SB12,SB17,SB18)を得た。今回はSB12の発現特性について報告する。

SB12の塩基配列はヒトSRYに約50%の相同性を示すばかりでなく、塩性植物Atriplex nummularia のANJ1 (DnaJ homolog)にも高い相同性を示した。SB12の塩基配列より推定されたアミノ酸配列(50アミノ酸)のうち、39アミノ酸がANJ1のN端のアミノ酸配列に一致し、DnaJタンパク質に共通のJ-domainを持っていた。このSB12をプローブとして、遺伝子の発現の組織特異性を調べると、SB12は雄花でしかも雄ずいに特異的に発現していた。一方、葉、若い枝や根では雌雄にかかわらず、また雌花や雌ずいでも発現のレベルは極めて低かった。さらに、ヤナギ科植物のさし木を用い、SB12の転写産物が熱ショックや塩ストレスにより誘導されるか検討したが、ANJ1と異なり、雌雄の葉、若い枝や根でこれらのストレスにより誘導されることはなかった。以上の結果は、SB12が熱ショックや塩ストレスで誘導されるANJ1と異なる機能を持つ可能性を示唆するものであり、現在雄花のcDNAライブラリーより、SB12のcDNAクローンを単離し、その構造を解析している。

1aH02

雌雄異株植物*Melandrium album* における雄性生殖器官特異的発現遺伝子群の単離と解析

松永幸大、高野博嘉、内田英伸[1]、河野重行、日詰雅博[2]、酒井敦、黒岩常祥（東大大学院・理学系・植物、[1]筑波大・生物、[2]愛媛大・教育・生物）

植物の性染色体の機能や性決定機構の解明は、生殖器官である花の形態形成を理解する上で必要不可欠である。そこで、ヒトと同じXY型の性決定(XY=♂、XX=♀)を行うナデシコ科雌雄異株草本植物*Melandrium album* を材料に用いることにした。高度顕微測光装置で蛍光染色体像を測定したところ、Y染色体はX染色体の1.4倍のDNA量を持ち、ゲノムサイズ(4700Mbp)中、性染色体DNAは16%の割合を占めていた。また、蛍光*in situ* hybridizationにより、rRNA遺伝子は4対の常染色体上に存在し、性染色体上には存在していないことが明らかになった。次に、雄性生殖器官分化を制御する遺伝子を単離するために、雄株の蕾mRNAからcDNAライブラリーを作製した。雄株と雌株の蕾cDNAプローブを用いてディファレンシャルスクリーニングを行った結果、雄性生殖器官に特異的に発現する遺伝子(MR clone)を5つ単離した。雄株の蕾発達段階におけるMR cloneの発現様式は、蕾形成時初期でのみ発現するもの、開花直前で発現するものなど多様であった。また、MR cloneをプローブにゲノミックサザン解析を行ったところ、雌雄で多型を示すものもあったが、すべてのMR cloneが雌雄のDNAにハイブリダイズした。このことから、雄株でのみ発現する遺伝子であっても、必ずしもY染色体上には存在していないことがわかった。

1aH03

ペチュニアの花器官特異的遺伝子群の発現様式の解析

山下博史、竹葉剛、黒岩常祥[1]（京都府立大・応用生物、[1]東京大大学院・理学系・植物）

ペチュニアの花器官は、その形成過程において蕾の長さが 10mm の時に形態学的に大きく変化する。この時に発現する遺伝子の解析を目的として、デイファレンシャルスクリーニングを行い、花器官特異的に発現する遺伝子を６つ単離した。ノーザン解析の結果、これら６つの遺伝子は空間的にも時間的にも異なる発現様式を示し、それぞれが異なる遺伝子であることがわかった。

単離したcDNAの部分的塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行ない、得られた６つのcDNAのうちPFS205はglycine-rich proteinと、PFS301はproteinase inhibitorと高いホモロジーが見られた。ノーザン解析により、この2つのcDNAは4つの器官（萼、花弁、雄蕊、雌蕊）で発現が見られるがPFS205 は花弁で特に強い発現が見られ、PFS301は雄蕊で特に強い発現が見られることがわかった。ホモロジーの見られないcDNAについてはスクリーニングを行い、全塩基配列を決定した。これらの遺伝子の発現には器官特異性が見られ、PFS4は花弁と雌蕊に、PFS12は雄蕊に特異的に、PFS13は花弁に特異的に発現が見られた。さらにこれらの遺伝子における組織特異的発現性を調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

1aH04

イネ葯における遺伝子発現の研究

...特異的発現を示す二遺伝子について...

日原由香子、内宮博文（東大・分生研）

花粉の形成過程では、胞子体、配偶体由来の多くの葯特異的遺伝子が、厳密な制御を受けて発現していると予想される。それらの遺伝子を単離し、発現時期と遺伝子産物の機能との解析を行うことは、花粉形成の機構を解明する上で極めて重要である。そこで我々は先にイネ葯（花粉四分子期から一核期に相当）由来のcDNAクローン500個を任意に選択し、葯とシュート由来のcDNAとハイブリダイズさせることにより、葯でのシグナルがシュートに比べて有意に強いクローンを選択した。さらにノーザン解析を行った結果、花粉一核期の葯で特異的に強く発現する３クローンを検出した。

本研究では、それら３クローンの全長cDNAのスクリーニングを行ったところ、約0.6kbpと約1.6kbpの独立した２つのcDNAが得られた。この内約0.6kbpの遺伝子は480bpのORFを持ち、約17kDaの未知のタンパクをコードすると推定された。またサザン解析を行った結果、ゲノム中に１コピー存在することが示唆された。約1.6kbpの遺伝子についても既知の遺伝子と相同性を持たず、ゲノム中に１コピー存在することが示唆された。

当大会では、これら二遺伝子にコードされたタンパクのアミノ酸配列の特徴、ならびにそれらが葯内で果たしている役割について考察する。

1aH05

根冠で特異的に発現する遺伝子のクローニング

松山崇[1,2]、橋本隆[1]、山田康之[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]京大・農・農化）

根冠組織は植物の根の最先端に位置し、分裂・伸長組織の保護、外界の情報の認識・伝達などに関わる重要な組織である。

その様々な機能を理解するために我々は根冠組織が根本体から物理的に分離できるトウモロコシを実験材料として用い、根冠で特異的に発現する遺伝子のクローニングを行った。まず根冠で発現している遺伝子のcDNAから、根で共通に発現している遺伝子のcDNAをサブトラクションし、根冠組織特異的と考えられるcDNAを得た。さらにデファレンシャルスクリーニングにより根冠特異的に発現すると考えられる遺伝子のcDNAを数種単離し、その塩基配列の決定を行った。また、ゲノミックサザン解析・ノザン解析により、それらの遺伝子の構成・組織での発現を比較・検討した。

1aH06

タバコのホメオボックス配列を含む遺伝子の発現パターン

相田光宏、古金谷敏之、田坂昌生、藤澤久雄　（京大•理•植物）

ホメオボックス（HB）を含む遺伝子の産物は動物の形態形成や細胞分化に重要な役割を果たす転写調節因子であり、ホメオドメイン（HD)と呼ばれるDNA結合領域を持つ。トウモロコシのHBを含む*Knotted-1*（*Kn1*）遺伝子は茎頂で発現し、そこで細胞分化の調節に関わると考えられている。我々は高等植物の栄養成長期の発生のしくみの解明を目的として、タバコからHBを含む遺伝子を単離し、その発現様式を調べた。

*Kn1*遺伝子のHBの保存領域を基にPCRを行い、得られたDNA断片をプローブに用いてcDNAライブラリーのスクリーニングを行なった。得られたcDNAのうちいくつかについて塩基配列を決定したところ、それらはHB配列をもつ2つの遺伝子*NTH1*と*NTH2*に由来していた。*NTH1*遺伝子由来のcDNAにはセンス方向とアンチセンス方向のものが存在した。RNA-RNAハイブリダイゼーションとRT-PCR法を行なったところ、*NTH1*遺伝子のセンスとアンチセンスmRNAはともに茎頂•若い茎および花で検出され、葉ではほとんど検出されなかった。このタンパク質のHD以外の部分とマルトース結合タンパク質をつないだキメラタンパク質を大腸菌で発現させて精製し、これに対する抗体をウサギを用いてつくった。この抗体はNTH1タンパク質を特異的に認識した。これを用いてウェスタン法を行なったところ、NTH1タンパク質は茎頂•若い茎および花で検出された。一方、*NTH2*遺伝子由来のcDNAは長い5'側非翻訳領域と、主にNTH1タンパク質のHDと相同のアミノ酸に翻訳される短いORFを持っていた。ノザンハイブリダイゼーションによると、*NTH2*mRNAは茎頂と花に存在していた。これらの結果から、*NTH1*、*NTH2*遺伝子の発現調節機構について考察する。

1aH07

タバコホメオボックス遺伝子NTH15の機能

玉置　雅紀、草場　新之助[1]、松岡　信[2]（筑波大・生物科学、[1]農水省・果樹試、[2]名大・分子応答）

近年、複数の植物からホメオボックス遺伝子が単離され、動物のホメオボックス遺伝子の機能からの類推により、これらの遺伝子と植物の形態形成との関連が注目されている。

我々は、タバコからホメオボックス配列を持つcDNA（*NTH15*）を単離し、この転写産物がタバコ各組織における未発達な細胞に特異的に発現していることを示した（1994年度日本分子生物学会）。今回我々は、CaMV35Sプロモーターの支配下で*NTH15*cDNAをセンス及びアンチセンス方向に発現するコンストラクトを作製し、これらの導入によるタバコの形態変化を調べた。センスの導入により得られた形質転換植物では、すべての葉及び花について形態異常が観察された。また、これらの形態異常を示した葉ではGA_1の著しい減少が見られた。一方、アンチセンスを導入した植物体においても、葉脈の走り方が異常になった葉や様々な形態異常を示す花が形成された。

以上の結果は、*NTH15*がタバコの形態形成に関与していることを示しており、このことから高等植物においても動物同様、ホメオボックス遺伝子が形態形成の過程に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

1aH08

オーキシン応答遺伝子 *arcA* の遺伝子産物の解析

石田さらみ、高橋陽介、馳澤盛一郎、長田敏行（東京大学大学院理学系)

分子レベルでのオーキシン作用機構解明の第一歩として、オーキシンにより発現制御を受ける遺伝子群を単離し、その機能及び発現制御機構を解析している。タバコ培養細胞BY-2 株では 2,4-D 飢餓・再添加に対する反応として細胞分裂の再開が観察される。この系よりオーキシン応答遺伝子 *arcA* を単離し、構造解析よりその産物は、G タンパク質 β サブユニットに代表される構造である WD-40 リピートを持つタンパク質群のファミリーに属する事を明らかにした。arcA 産物はこのファミリー内で特に高い相同性 (70 %) を持つタンパク質とサブファミリーを形成しており、その内のニワトリ及びラットから単離された遺伝子の産物は活性化した protein kinase C と結合活性を持つ RACKs (Receptors for Activated C-Kinase)であることが事が報告されている。arcA 産物の機能を同定しオーキシン作用との関連を明らかにする事を目的に、大腸菌内で過剰発現させた arcA 産物に対するポリクローン抗体を作製し解析を進めている。本大会では、間接蛍光抗体法及び細胞分画法より示された細胞内局在性等 arcA 産物の特性について報告する。

1aH09

parB 遺伝子のオーキシンに関する二つのシス領域と茎頂、根端での発現　高橋陽介、長田敏行（東京大学大学院理学系）

植物における最も重要な生理活性物質の一つであるオーキシンは細胞分裂、形態形成等、植物の生活環の様々な局面に大きな役割を果たしていると考えられている。我々はタバコ葉肉細胞プロトプラストとタバコ培養細胞 BY-2 からオーキシンで発現が誘導される遺伝子をクローン化し解析してきた。 *parB* はその産物がグルタチオン *S*-トランスフェラーゼの活性を有し、シロイヌナズナの膜画分より見出されたオーキシン結合蛋白質と 57.4% の相同性が認められる。 形質転換タバコを用いた解析の結果 *parB* 遺伝子のオーキシンに関するシス領域は、二つ存在することが示された。 これらの配列は伸長組織からクローン化されたオーキシンで発現が誘導される遺伝子のシス配列とは異なる。 この二つのシス領域は高濃度のオーキシンにしか応答しない 35S プロモーターの *as-1* 等と違い、生理的な濃度で、それぞれ単独で、コアプロモーターにオーキシン応答性を付与する事ができる。 また *parB* の茎頂および根端での発現とオーキシンに関する二つのシス因子の関係、オーキシンに対する応答性の発生段階における変化についても報告する。

1aH10

ヒャクニチソウ葉肉細胞から管状要素への分化転換初期に発現する遺伝子の解析

永田美世・出村拓・福田裕穂（東北大・理・生物）

高等植物の細胞は外界からの刺激に応じて比較的容易に分化転換を行うことが知られている。その中でも柔細胞から管状要素への分化は、植物細胞の分化転換のモデルとして広く研究されてきている。ヒャクニチソウ (*Zinnia elegans* L.)管状要素分化誘導系では、葉肉単細胞がオーキシンとサイトカイニンを含む培地での培養により高頻度かつ同調的に管状要素へと分化する。これまで管状要素分化の研究は、分化中期から後期過程が中心であり、傷害や植物ホルモンといった分化誘導要因が深く関与していると思われる初期過程については解析されていない。

そこで分化初期過程を解析するために、まず分化初期の細胞で強く発現している遺伝子の単離を試みた。そのために、出発材料であるヒャクニチソウ芽生え第一葉と、培養初期にあたる培養12時間目の細胞のmRNAとの間でdifferential screeningを行い、培養後12時間目の細胞でより強く発現する17種の遺伝子に対するcDNAクローンを得た。これらのクローンの部分配列を調べたところ、S-adenosylmethionine synthetaseや、proteinase inhibitorとホモロジーがみられるものがあった。次に、ノーザン解析により転写産物の発現パターンを調べた。その結果、単離直後にすでに発現量が増大するものから培養後6時間目以降に発現量が増大するものまで様々であった。また、発現に植物ホルモンを必要としないクローンもみられた。これらの結果をもとに、分化転換初期における遺伝子発現について考察する。

1aH11

TED2遺伝子の転写産物と翻訳産物の維管束組織特異的局在
－マイクロスライサーによる簡便な免疫染色および*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた解析－

出村　拓，福田　裕穂（東北大・理・生物）

ヒャクニチソウの芽生えの第一葉から機械的に単離した葉肉細胞は、オーキシン(NAA)とサイトカイニン(BA)を含む液体培地中で高頻度かつ同調的に管状要素（道管・仮道管細胞）に分化する。私たちは、この系を用いて管状要素分化過程中期に強く発現する遺伝子の cDNA クローンを単離してきた。また、そのうちの一つTED2のmRNAが、培養系内では二次壁の肥厚に先立って強く発現すること、幼植物体では原形成層と新たに形成されつつある維管束組織に特異的に発現することをこれまでに明らかにしてきた。

今回私たちは、幼植物体に加えて、成長した植物体内でのTED2mRNAおよびTED2タンパク質の局在の解明を試みた。そのために、パラフィン切片を用いるのではなく、数多くの試料を同時に扱える免疫染色および*in situ* ハイブリダイゼーション法を開発し、これを用いた解析を行った。ホルムアルデヒドで固定した植物体から、マイクロスライサーを用いて50～100μmの切片を作製し、再固定後、マイクロチューブ内で免疫染色および*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、成熟した茎において、(1)TED2mRNAは未成熟な管状要素および未成熟な木部・師部繊維に局在して発現していること、(2)TED2タンパク質は、未成熟な管状要素および未成熟な木部・師部繊維だけではなく、成熟した木部・師部繊維にも蓄積されていることが分かった。この結果は、今回用いた手法により比較的簡便にmRNAとタンパク質の両方の局在を解析できること示していると同時に、TED2遺伝子産物が維管束の繊維系の細胞において重要な役割を果たしている可能性を示唆してる。

1aI01

シロイヌナズナサイクロフィリン遺伝子のクローニングと発現解析

中川　強，多田隈　圭，斉藤　武，芦田裕之，川向　誠[1]，落合英夫　松田英幸[1]（島根大・遺伝子，[1]島根大・農・応用生物機能）

サイクロフィリンは免疫抑制剤サイクロスポリンＡの細胞内結合タンパク質である。動物細胞ではサイクロフィリン・サイクロスポリンＡ複合体がタンパク質フォスファターゼ２Ｂを阻害して免疫抑制を行うことが知られている。またサイクロフィリンはペプチジルプロリルイソメラーゼであることでも知られており、細胞中でタンパク質のプロリンイミド結合のシス－トランス異性化を触媒し高次構造形成の補助を行なっていることが推察されている。サイクロフィリンは微生物から動植物にいたるまであらゆる生物に存在し、また細胞の様々な区画に特異な分子種が局在している。植物においても細胞質型、葉緑体型、ミトコンドリア型サイクロフィリンが存在することが示されている。我々は植物のサイクロフィリンの構造、性質、機能を解明することを目的にシロイヌナズナのサイクロフィリン遺伝子のクローニングを進めている。現在までに細胞質型サイクロフィリン遺伝子４種を同定し、３種について塩基配列を決定した。これらの翻訳産物は１７２、１７４、１７６アミノ酸をコードし、７０％以上の相同性を有していた。上流域の塩基配列には顕著な類似性が見られず、それぞれの遺伝子が異なった発現制御を受けていることが考えられた。現在発現パターンを解析中である。

1aI02

イネの三量体Ｇ蛋白質αサブユニットのcDNAクローニング

石川敦司、坪内均、岩崎行玄、旭正
（福井県立大・生物資源）

近年高等植物において、フィトクロームを介する光情報伝達系、青色光情報伝達系、気孔開閉制御情報伝達系、さらに防御反応情報伝達系などに三量体Ｇ蛋白質が関与することが示唆されてきている。これまでに三量体Ｇ蛋白質のうち、αサブユニットに対するcDNAは、双子葉植物のアラビドプシスとトマトから単離されているが、単子葉植物からの報告はなかった。

植物における情報伝達系を理解する上で、単子葉植物の三量体Ｇ蛋白質を解析することは、双子葉植物との比較を含めて重要であると思われる。

我々は、まずPCRによりアラビドプシス三量体Ｇ蛋白質αサブユニットのcDNA断片を増幅した。この断片をプローブにイネの緑葉より調製したcDNAライブラリーをスクリーニングし、イネの三量体Ｇ蛋白質αサブユニットのcDNA、RGA1を単離した。予想される産物のアミノ酸配列は、アラビドプシス（GPA1）とトマト（TGA1）の産物と、それぞれ７７％と８６％のホモロジーを示した。また哺乳類のαサブユニットとは４２％から６９％のホモロジーを示した。GTPとの結合に必要な領域は、高等植物に限らず、哺乳類においても保存されていた。しかし、共役する受容体と相互作用する領域と考えられているC-末端のアミノ酸配列は哺乳類のもののみならず、GPA1とTGA1とも異なっていた。RGA1のmRNAは、イネの根、黄色葉、緑葉に蓄積しており、RGA1は恒常的に発現していると考えられた。

1aI03

イネ液胞膜ピロホスファターゼのcDNAクローニング

榊原祥清、笠毛邦弘（農水省・食総研）

我々は昨年度本大会において、品種の異なるイネ培養細胞の液胞膜ピロホスファターゼ（PPase）活性に対する塩ストレスの影響に差異があること、また、両者でPPaseのアイソマーの発現が異なることを報告した。PPaseのアイソマーの発現とその生理的役割をより詳細に解析することを目的として、イネPPaseのcDNAクローニングを行った。

７日間培養したイネ培養細胞（*Oriza sativa* L. cv. Nipponbare）からcDNAライブラリーを作成した。既知のPPaseのDNA塩基配列よりプライマーを合成し、RT-PCR法によって得られた断片をプローブとして、プラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングを行った。４種類の異なるクローンが得られ、そのうちの２つ（OSVP1、OSVP2）が約2.7kbpの長さを持ち全長をコードしていると推定されたので、これらについて塩基配列の解析を行った。その結果、OSVP1、OSVP2ともアラビドプシスのPPase遺伝子とアミノ酸レベルで90％近い相同性を示し、推定される触媒部位やDCCD結合部位に相当する配列も保存されていた。

現在、これらのアイソマーの発現および生理機能について検討を行っている。

1aI04

イネグルタレドキシンおよび13kDaプロラミン遺伝子のプロモーター領域の特徴

謝志堅、藪下哲成、増村威宏、田中國介（京府大・農・農化）

アリューロン細胞とデンプン性胚乳細胞とは、イネ種子形成時に同一細胞を起源として生長してくるが、形態的、含有成分的に互いに全く異なる細胞に分化する。両細胞の分化に関与する因子を解明するには、それぞれの細胞に特異的に発現している遺伝子群の構造解析を行う必要がある。本研究では、種子登熟過程のアリューロン細胞で特異的に発現するグルタレドキシン遺伝子と、種子登熟中期から後期にかけてデンプン性胚乳細胞のみに特異的に発現するプロラミン遺伝子の構造解析を行い、両遺伝子のプロモーター構造の特徴を明らかにした。

イネ胚芽より核DNAを調製し、核遺伝子ライブラリーを構築した。既に当研究室で単離されているイネグルタレドキシンcDNA（RASC8）、イネ13kDaプロラミンcDNA（RM7）をプローブとしてスクーニングし、グルタレドキシン、13kDaプロラミンの構造領域を含む約4.0kbp, 3.0kbpのDNAを調製した。塩基配列を決定し、両遺伝子構造上の特徴を調査した。これら二つの遺伝子を比べると、グルタレドキシン遺伝子はイントロンを三つ含んでいるが、プロラミン遺伝子はイントロンを含まないことが明らかとなった。またプロラミン遺伝子プロモーターでは、翻訳開始点より500bp上流に穀類プロラミン-300エレメントが見つかった。翻訳開始点の630bp上流にATT配列が10回繰り返されている特徴があった。両遺伝子プロモーターには、ピシリンボックスのようにＴに富む配列が存在した、特にグルタレドキシンでは、Ｔが5個以上連続する配列が多く見られた。

1aI05

イネ根ferredoxin-NADP$^+$ reductase(FNR)遺伝子の構造解析

青木秀之、田中國介[1]、井田正二
（京大・食研、[1]京都府大・農・農化）

我々はイネ葉[1]と根[2]に、それぞれ塩基配列の異なるFNR cDNA(両者の成熟蛋白質の相同性は49%)が存在し、後者はNO_3^-誘導型であることを報告している。NO_3^-誘導の機構を解明する目的で、イネ根FNR cDNAに対応するゲノムDNAの構造解析を行った。

根FNR cDNAをプローブとして、イネゲノムライブラリー(EMBL3)から約15 kbpのゲノムクローンを取得し、コード領域を含む3.9 kbpの塩基配列を決定した。また、primer extension法によって、転写開始点を決定した。cDNAとの比較により、イネ根FNR遺伝子はエキソン(6)とイントロン(5)から構成され、5'領域にはTATA-,CAAT,GC-boxが存在することが判明した。また5'上流領域にはホウレンソウNiR遺伝子のプロモーター領域と相同性の高い配列[ATCAA(A/C)]とその逆配列[(T/G)TTGAT]が数カ所存在した。これらの配列は転写制御因子との結合部位である可能性があるので、ゲルシフト法などによる解析を進めている。

1)Biochim. Biophys. Acta (1994) 1183: 553-556
2)Plant Physiol. (1994) 104: 1473-1474

1aI06

ラン藻 *Plectonema boryanum* の亜硝酸還元酵素の構造と機能

菊地裕之, 鈴木石根, 中西早恵子, 藤田祐一[1], 杉山達夫,
小俣達男（名古屋大・農・応用生物科学, [1]大阪大・蛋白研）

P. boryanum は糸状体を形成するラン藻で、嫌気条件下でヘテロシストをつくらずに窒素固定を行う点、および暗所で従属栄養的に増殖する点が特徴である。このラン藻の亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirA*)をクローン化したところ、654個のアミノ酸から成る分子量 72135 のタンパク質をコードしていた。アミノ酸配列の比較から、(1) *P. boryanum* の亜硝酸還元酵素 (NiR) は他の光合成生物のフェレドキシン(Fd)依存性NiRと相同な領域（アミノ酸残基1～511）とC末端延長部（アミノ酸残基512～654）からなること、(2) C末端延長部のC末端部（アミノ酸残基585～654）は他のラン藻や高等植物の[2Fe-2S]型のFdと30～35%の相同性をもつこと、の２点が明らかになった。*nirA*遺伝子のNiRドメインに対応する部分に薬剤耐性遺伝子を挿入して破壊するとNiR活性と亜硝酸同化能が失われることから、この遺伝子が*P. boryanum* の唯一のNiR遺伝子であると結論された。また、NiRのC末端領域は、還元力の供給が制限される暗所での亜硝酸還元において、NiRドメインへの効率的な電子伝達に関与している可能性が考えられたが、NiRのC末端領域を欠いた変異株は、正常なNiR活性を示し、明所でも暗所でも亜硝酸を窒素源として増殖した。この結果から、*P. boryanum* の NiRのC末端領域はNiR活性にも、暗所での亜硝酸同化にも必須ではないことが明らかになった。

1aI07

緑藻オオハネモ *rbc* L 遺伝子の塩基配列とそのイントロンの特徴

佐藤浩之、永島道明、藤山幸作、奥山知之、中山克己、
岡田光正（東邦大・理・生物分子）

海産の多核単細胞緑藻類、オオハネモ (*Bryopsis maxima*) の葉緑体ゲノムより RuBisCO 遺伝子（*rbc* L）をクローニングし、全塩基配列を決定した結果、475 アミノ酸をコードするORF の中央付近、コドン 268 と 269 の間に 2,467bp のイントロンを含んでいた。オオハネモと同じミル目(*Codiales*)のミル (*Codium fragile*) の *rbc* L にも、同じ位置にほぼ同じ長さのイントロンの存在が報告されているが、その塩基配列の相同性はオオハネモのものとは非常に低く、近縁の種間の分子進化の過程を解析するための、鋭敏な指標となりうる。現在、ミル目における *rbc* L の分子進化を解析するために、ハネモ科 (*Bryopsidaceae*) よりハネモ (*Bryopsis pulmosa*)、ミル科 (*Codiaceae*) よりクロミル (*Codium divaricatum*) の *rbc*L のクローニングを試みている。また、近縁の目として、シオグサ目 (*Cladophorales*) など数種の葉緑体 DNA を用いてサザンブロッティングを行い、このイントロンの緑藻綱における分布を調べている。

1aI08

フタバネゼニゴケ細胞葉緑体DNAのメチル化地図

滝尾進，佐藤敏生（広島大・理・生物科学）

我々が分離したフタバネゼニゴケ（*Marchantia paleacea* var. *diptera*)細胞は暗所でも葉緑体を形成する特徴を持つ．前回は，葉緑体DNAをメチル化感受性および非感受性イソ制限酵素で処理し，感受性酵素でのみ見られる切断片をクローニングし，メチル化部位が*rpoB*, *ndh10*および*psbI*遺伝子内にあることを報告している．今回は，ゼニゴケ葉緑体DNAプローブを用いてフタバネゼニゴケ葉緑体DNA全域にわたりメチル化部位を検討し次の結果をえた．１）*psaA*, *rbcL*, 5srRNA, 16srRNA, 23srRNA遺伝子内の5'CCA(T)GG3'配列がメチル化部位として新たに同定された．２）23srRNA遺伝子は葉緑体全ゲノムにおいてメチル化していたが，他の遺伝子はすべて一部のゲノムでのみメチル化していた．３）培養期間を通じて23srRNA遺伝子は高度にメチル化していたが，同遺伝子の転写産物はいずれの時期にも多量に検出された．以上の結果から，この苔類細胞の葉緑体DNAメチル化は遺伝子の不活性化には関与していないことが明らかになった．

1aI09

酵母*Saccharomyces cerevisiae* の第３番染色体DNA長多型の誘発機構と細胞周期への影響

園山恒久、上井一浩、久冨泰資、壷井基夫（福山大・工・生物工学）

一般に報告されている*S. cerevisiae* の第３番染色体DNA長は350kbpである。しかし、私達の研究室保存株の中に同染色体DNA長が450kbpである株が見いだされた。この株は減数分裂の過程で同染色体DNA長が変動し、胞子クローンでは同DNA長が約100kbp単位で高頻度に多型を起こす。本研究では、450kbpの染色体構造を明らかにすると共に、第３番染色体DNA長の多型が細胞周期にどのような影響をもたらすかを調べた。

450kbpの第３番染色体の制限酵素処理による物理的解析や遺伝学的解析により、第３番染色体右腕の*thr4* 遺伝子から*HMR* 遺伝子までを含む約95kbpの領域が重複して存在していることが明らかとなった。従って、DNA長多型は重複領域において不等組換えが起こるためであると考えられた。染色体DNA長多型を利用して分離した350、450、750および950kbpの第３番染色体DNAを持つ細胞の世代時間を測定した結果、それぞれ117、120、128および138分であった。また、未出芽細胞の割合を測定することにより、350、450および750kbpの株の細胞周期のG1期の長さを求めると、それぞれ25、29および32分であった。以上の結果より、第３番染色体DNA長が長くなるにつれて、細胞周期のG1期の長さが長くなることが明らかとなった。

一般講演

第1日　3月28日（火）　午後の部

A会場　脂質・生体膜
B会場　遺伝子発現（2）
C会場　光合成（3）
D会場　光合成（4）
E会場　細胞壁（2）
F会場　情報伝達
G会場　環境応答（2）

1pA01

キクイモ塊茎組織のカルス形成過程での液胞膜H^+-ポンプ活性の変化．Ⅱ．

上岡華代，長谷　昭　（北海道教育大・函館・生物）

キクイモ塊茎組織のカルス形成過程で液胞膜の2つのH^+-ポンプ（H^+-ATPase及びH^+-PPase）がそれぞれ異なったタイムコースで活性化されることを，日本植物学会第58回大会で報告した．このうちH^+-ATPaseのH^+-ポンプの活性化はカルス化する組織に特異的であるが，H^+-PPaseのH^+-ポンプ活性は傷害反応ともみなされる増大を示した．そこで，組織切り出し後，傷害反応が一段落する5日目までオーキシンなしの培地で培養したのち，オーキシンを含む培地に植え継ぎカルス誘導した組織から液胞膜を単離し，2つのH^+-ポンプ活性の変化を調べた．

ATP依存H^+-ポンプ活性は，植え継ぎ培養開始後ほとんどラグなしに増加し，培養4日目以降では培養開始時の4倍前後の活性を維持した．PPi依存H^+-ポンプ活性もほとんどラグなしに増加し，植え継ぎ後3日目までに2倍以上に増加したが，その後減少した．オーキシンを含まない培地に植え継いだコントロールでは，活性の変化はほとんど認められなかった．一方，これらのH^+-ポンプの基質加水分解活性は，ATPase活性が約2倍に増大したものの，PPase活性にはほとんど変化がなく，H^+-ポンプ活性の独自の活性化機構の存在を示唆した．

以上の結果は，液胞膜の2つのH^+-ポンプがいずれもカルス化に何らかの役割を担っていることを示しているが，H^+-PPaseは特に培養開始直後のカルス誘導期に関与している可能性が示唆された．

1pA02

キクイモ塊茎のシンク及びソース機能における細胞膜及び液胞膜H^+-ポンプの関与

長谷　昭，上岡華代　（北海道教育大・函館・生物）

キクイモ塊茎は9月から10月にかけて強力にシンク機能を営み，柔組織細胞の液胞中にショ糖を取り込みイヌリンに転換して貯蔵する．一方，冬季間の休眠を経て3月以降はソース機能に転じて成長しつつある芽に養分を供給する．以上の機能には細胞膜及び液胞膜を介しての物質輸送が必須であり，特にシンク機能には活発な能動輸送が伴われていると考えられる．そこで，膜内外のH^+勾配を作り出すことによって膜輸送を駆動するH^+-ポンプの活性を，単離した細胞膜と液胞膜でこれらの機能との関わりにおいて調べた．

細胞膜H^+-ATPaseは塊茎の機能にかかわらず基質分解活性が変化せず，成長しつつある芽の半分以下の活性しか示さず，またH^+-ポンプ活性も液胞膜のATP依存H^+-ポンプ活性の1/10程度であり，シンク・ソース両機能への積極的関与は認められなかった．一方，液胞膜に存在する2つのH^+-ポンプのうち，H^+-ATPaseが特に9月から10月にかけて休眠中の約3倍の高いH^+-ポンプ活性を示し，また3月以降にも活性が増加した．しかしH^+-PPaseは，基質分解活性がH^+-ATPaseの約半分の比活性であるにもかかわらず，H^+-ポンプ活性は低く抑えられていた．

以上の結果は，キクイモ塊茎においてはunloadingされた同化産物がシンプラスト経由で主に輸送されていることを示唆しており，また液胞膜を介しての輸送はH^+-ATPaseが作り出すH^+勾配が主要な駆動力の1つとなっていることを示している．

1pA03

エンドウ上胚軸から単離した細胞膜におけるＡＴＰase活性

樽井　裕、飯野盛利　（大阪市大・理・植物園）

植物細胞膜のＡＴＰase は、成長や環境刺激応答に働く重要な酵素の一つと考えられている。本研究では、エンドウ上胚軸の細胞膜に存在するＡＴＰase の酵素学的性質を調べた。赤色光下、２５℃で６日間培養したエンドウの上胚軸からマイクロソームを調製し、さらに水性二層分配法(５．６ｇ系、４ｍＭ ＮａＣｌ)を用いて細胞膜に富む膜分画を得た。この分画のＡＴＰase活性(Ｋｍ＝０．１ｍＭ)は、Mg^{2+}を要求し、低濃度のバナジン酸によって強く阻害されることから(ＩＣ$_{50}$＝５０μＭ)、細胞膜のＡＴＰase であると考えられる。また、当酵素活性はスペルミジンやスペルミンなどのポリアミンによっても阻害を受けた(ＩＣ$_{50}$(Spd)≒２ｍＭ、ＩＣ$_{50}$(Spn)≒１ｍＭ)。ポリアミンによる阻害は両逆数プロットから競合阻害であることがわかった(Ｋｉ(Spd)＝７７μＭ，Ｋｉ(Spn)＝４１μＭ)。ＡＴＰase活性は、界面活性剤である Softes-12 によって最大２倍に活性化されたが、Triton X-100, phosphatidylcholine によっては顕著な活性化はみられなかった。この活性化は、Ｋｍ値の変化を伴わなかったことから、基質に対する accessibility の上昇によるものと考えられる。

1pA04

イネ培養細胞 H^+-ATPase 再構成膜における H^+輸送能と膜脂質分子の局所的運動性

中村善行、笠毛邦弘（農水省・食総研）

生体膜は、流動性に富むリン脂質二重層中にタンパク質が埋め込まれた動的構造を有している。膜タンパク質の機能は脂質分子との相互作用による様々な影響を受けることが指摘されているが、植物細胞の膜に関してはほとんど報告されていない。我々は、イネ培養細胞よりH^+-ATPaseを単離、部分精製した後、これをアゾレクチンリポゾームに埋め込んだ再構成膜系を用いて、膜脂質層の流動性とH^+-ATPaseの機能との相関について検討を行っている。一昨年の大会では、DPHを用いた蛍光偏光解消測定から脂質層の流動性の低下がATPaseのH^+輸送能を抑制することを報告した。今回は、膜脂質分子の局所的運動性をさらに詳細に調べる目的で、新たにDPHの誘導体で膜表層に近い脂質層に結合するTMA-DPHをプローブとして測定を行い、DPHの結果と比較した。また、5-および16-ドキシルーステアリン酸を脂質層中に取り込ませて脂質層の表層および内部に安定ラジカルを導入し、そのESR(Electron Spin Resonance)スペクトルを解析した。これら二種類の異なる方法による測定から膜脂質層内部の疎水性領域と表層の親水性頭部に近い領域の流動性を個別に検討した。脂質重量の1/200から1/100のATPaseを埋め込むとリポゾーム脂質層の表層の流動性が低下するものの、H^+輸送能には影響が見られなかった。一方、多量（脂質量の1/20）のATPaseを埋め込むと、脂質層内部の流動性が低下し、ATPaseのH^+輸送能も著しく抑制された。以上の結果は、膜脂質層内部の流動性がATPaseの機能に大きな影響を及ぼすことを示唆する。

1pA05

オオムギ根原形質膜のアニオン輸送体の可溶化と再構成

山下耕生、山本洋子、松本英明　（岡山大・資生研）

塩ストレスによってオオムギ根原形質膜のATPase活性が低下したにもかかわらずそのH^+輸送活性は、Cl^-存在下で測定したときにのみ増加した。このことから我々はH^+輸送活性が膜小胞内へのアニオン輸送によって制御されている可能性を示唆した。さらに、このアニオン輸送活性はNIFで阻害された(昨年度本大会)。そこで我々はH^+輸送活性の制御に関わるアニオン輸送を明らかにするためアニオン輸送体の可溶化再構成を試みた。

原形質膜小胞はオオムギ根から水性二相分配法によって調製した。アニオン輸送体は原形質膜小胞をTriton X-100処理後、CHAPSによって可溶化し、透析法によってリポソームへ再構成した。この可溶化再構成により$^{36}Cl^-$輸送活性は約７倍に増加した。また再構成されたプロテオリポソームはH^+輸送活性を示したことから、H^+-ATPaseも同時に再構成されていることがわかった。そこでアニオンによるH^+輸送活性の促進を検討したところ、Br^-》Cl^-＝NO_3^-》グルコン酸の順であった。以上の結果からオオムギ根原形質膜に存在するアニオン輸送体の一つは、Br^-に選択的であることが示唆された。

1pA06

モヤシ豆幼根から単離した液胞膜小胞の方向性および粒径のpH依存性

武田裕一、[1]笠毛邦弘、太田英二（慶応大・理工、[1]食総研・分子情報）

高等植物細胞において液胞は最大の細胞内小器官であり、その内腔は液胞膜に内在するH^+-ATPaseとH^+-PPaseにより酸性に保たれている。これらのH^+ポンプに関する研究には、主に密度勾配法によって単離された液胞膜小胞が用いられきたが、その膜小胞の方向性は必ずしも一定ではなく、またそれを任意に制御することは難しい。ところがイオノフォアとTriton X-100を用いた比活性測定により、膜調製溶液のpHが液胞膜H^+-PPaseの方向性に関与することが示唆された。pHの低下に伴い、right-side outのH^+-PPaseの割合が増加する傾向を示した。またpHの低下とともに液胞膜小胞の粒径は増大した。液胞膜H^+-PPaseの方向性はpHに依存するものと考えられる。しかし、方向性と粒径のpH依存性がほぼ一致したため、粒径（曲率）の寄与も考えられる。これらの可能性をさらに明らかにするために、再構成系を用いての研究を進めている。

1pA07

セイヨウナシ果実液胞膜のプロトンATPase、プロトンピロホスファターゼおよびVM-23の性質と果実生長における役割

白武勝裕　鈴木康生　金山喜則　前島正義[1]　山木昭平
(名古屋大・農・園芸科学, [1]生物化学)

セイヨウナシ果実において液胞は最大の細胞器官であり、同化産物の多くを糖として貯蔵している。　糖は、液胞膜プロトンATPase (V-type ATPase)とプロトンピロホスファターゼ(H^+-PPase)の働きによって生じる電気化学的ポテンシャルにより濃度勾配に逆らって液胞へ輸送される。そこでセイヨウナシ果実よりV-ATPaseならびにH^+-PPaseを精製したところ、それらのサブユニット構成ならびに性質は他の植物種より精製されたものとほぼ同一であった。一方、液胞膜に固有のタンパク質であるVM-23は、水チャンネルと考えられるγ-TIPとアミノ酸配列が類似しているが、ハツカダイコンVM-23に対する抗体を用いたイムノブロット分析により、セイヨウナシ液胞膜にも存在することが明らかになった。そこで、このVM-23に対する抗体を用いセイヨウナシ果実の生長段階でのタンパク質量の変動を調査しところ、新鮮重当たりのVM23のタンパク質量は細胞分裂期に特に多く、その後急激に減少することがわかった。この結果より、セイヨウナシ果実生長においてVM-23は細胞分裂期に重要な働きをしていることが示唆された。現在、これに加え果実生長における二種類のプロトンポンプの役割を明らかにするために、V-type ATPaseとH^+-PPaseに対する抗体を用いタンパク質量の変動を検討中である。

1pA08

登熟期サフラワー種子リゾレシチンアシルトランスフェラーゼ

市原謙一，前　香織，佐野嘉彦，田中國介
（京都府大・農・農化）

登熟期の油糧種子でおこるオレイン酸のリノール酸への不飽和化反応の基質となるレシチンに，デノボで合成されたオレイン酸を供給する酵素リゾレシチンアシルトランスフェラーゼの性質を，登熟期サフラワー種子の膜画分を用いて調べた。

登熟にともなう酵素活性の変化は，トリアシルグリセロール合成活性の変化とほぼパラレルであった。比活性は他のすべてのトリアシルグリセロール合成系酵素の活性 (1) よりも高く，500 nmol/min/mg protein に達した。この高い活性は，デノボで合成されたオレイン酸がグリセロリン酸経路よりもむしろレシチンに多く取り込まれる可能性を示唆している。

反応は，不飽和アシル-CoA (18:1, 18:2) に特異的であり，飽和アシル基 (16:0, 18:0) の取り込み速度はきわめて遅かった。一方，リゾレシチンはそのアシル鎖が飽和であっても不飽和であっても，等しくアシル受容体として作用した。

(1) Ichihara, K. et al. (1993) Plant Cell Physiol. *34*, 557.

1pA09

葉緑体糖脂質合成酵素：酵素の精製およびホスファチジン酸による活性化

下嶋美恵、太田啓之、飯田茂人、荒井健之、増田建、塩井祐三、高宮建一郎 （東工大・生命理工・生体機構）

UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase (UDGT) は、葉緑体膜の主要構成糖脂質である monogalactosyl diacylglycerol の生合成過程を担う酵素である。我々は、昨年の本大会において、キュウリ子葉からの本酵素の精製について発表した。今回、MonoS 及び アフィニティクロマトグラフィを用いた精製法の改良を行い、より純度の高い精製酵素を得ることができたので、報告する。

キュウリ子葉から、lauryldimethylamine oxide により酵素を可溶化し、各種クロマトグラフィ（CM-Toyopearl, MonoS, UDP-hexanolamine affinity 等）により、酵素を精製した。精製倍率は約11,000倍、比活性は、600 nmol/min mg protein 以上、またSDS-PAGEの結果から、精製した酵素の分子量は、45kDaであった。また、前回、ホスファチジン酸による酵素の活性化について報告したが、本条件で精製した酵素を用いた場合、無添加の場合の約100倍程度の顕著な酵素の活性化が認められた。

1pA10

膜貫通部位トラッピング法による膜タンパク質cDNAのクローニング

安村直起[1,2]、船越政男[1]、橋本隆[1]、山田康之[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]京大・農・農化）

膜タンパク質は先導配列（LS）と膜貫通部位を持つことが知られている。

東大医科研の菅野純夫先生から頂いたLSとエピトープを供給する動物発現用ベクターp18Macを用いてcDNAライブラリーを作製し、COS-7培養細胞にトランスフェクションした時、cDNAより膜貫通部位がインフレームに供給されればそのタンパク質は融合膜タンパク質として発現し、細胞表面に提示されたベクター由来のエピトープに対する蛍光抗体法で検出できる。本研究では、トウモロコシの根冠組織から作製したcDNAライブラリーより989クローンを本法によりスクリーニングした結果、膜貫通部位断片が数個得られた。次にこれらのDNA断片を用いて根冠組織を含むcDNAライブラリーから膜タンパク質cDNAをクローニングした。

1pA11

光合成におけるスルホキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）の役割

佐藤典裕、園池公毅[1]、江原友子[2]、長舩哲齊[3]、都筑幹夫、川口昭彦[3]（東京薬大・生命・環境生命、[1]東大・理・植物、[2]東京医大・微生物、[3]日体大・生命研、[4]東大・教養・生物）

スルホキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）は葉緑体脂質の一つであるが、生体膜における役割は不明である。そこで、緑藻クラミドモナスのスルホキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）欠損変異株（*hf-2*）の光合成能を親株と比較した。光化学系Ⅰ活性は差がなかったが、光化学系Ⅱ活性は親株の約6割に減少していた。また電子顕微鏡により、細胞の微細構造を観察すると、*hf-2*は親株に比べて、チラコイド膜が歪曲していた。

親株のチラコイド膜より各光化学系のタンパク質複合体を単離し、複合体に結合している脂質を分析した結果、SQDGは光化学系Ⅰ複合体にはほとんど存在せず、光化学系Ⅱ反応中心複合体と光化学系Ⅱの集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体に局在していた。

以上の結果から、SQDGは、光化学系Ⅱ複合体と結合することによりその活性発現に寄与すること、またチラコイド膜の形態形成に必要であることが示唆された。

1pA12

海産藻類におけるベタイン脂質の分布

加藤美砂子，足立恭子，池本尚人[1]，佐野浩（海洋バイオ研・清水，[1] 同・釜石）

ベタイン脂質はリン脂質や糖脂質と並ぶ極性脂質のグループであり，トリメチルアンモニウム基とカルボキシル基を有する複合脂質として定義することができる。現在までに知られているベタイン脂質は，DGTS (1,2-diacylglyceryl-3-*O*-4'-(*N,N,N*-trimethyl)homoserine), DGTA (1,2-diacylglyceryl-3-*O*-2'-hydroxymethyl-(*N,N,N*-trimethyl)-β-alanine), DGCC (1,2-diacylglyceryl-3-*O*-carboxyhydroxymethyl-choline) の3種である。

このうちDGCCは，我々が，ハプト藻*Pavlova lutheri*から単離，構造決定した新規ベタイン脂質であり，その構造については1993年度の本大会で報告した。本研究は，DGCCの藻類における分布を調べ，その特徴を他の2種のベタイン脂質と比較し，DGCCの生理的役割を考察するために行った。

DGCCの分析を行うにあたって，もっとも大きな問題点は，DGCCのシリカゲルを用いたクロマトグラフィー上での挙動がPC（ホスファチジルコリン）と一致することであった。そのため，CN-シリカゲルカラムを用いたHPLCによる分析を行い，DGCCとPCを完全に分離することに成功した。この分析系で種々の藻類を調べたところ，分析したすべてのハプト藻にDGCCが含まれていることがわかった。一方，PCを検出することはできなかった。これらの知見から，DGCCは*Pavlova lutheri*に特有の脂質ではなく，ハプト藻に普遍的に含まれる脂質であることが示唆された。緑藻，プラシノ藻，褐藻，紅藻，クリプト藻からはDGCCを検出することはできなかった。しかし，4種の渦鞭毛藻からDGCCを検出することができた。この4種には，PCも含まれていることがわかった。以上の結果と，DGCCの脂肪酸組成の特徴について考察する。

1pA13

大腸菌の細胞膜形成に及ぼすアクリフラビンの効果

中村運、[1] 榊剛、[2] 岩野恵　甲南大・生、[1] 北海道東海大・生工、[2] 奈良女大・生

アクリフラビンはアクリジン色素の一種である。大腸菌K12株のアクリフラビン感受性変異種（acrA）と耐性野性種（ acrA$^+$ ）アクリフラビン処理によって、細胞膜から膜の渦巻構造が出現する。アクリフラビンの存在で、全脂肪酸は acrA 細胞で　acrA$^+$ 細胞より著しく含量が増大する。acrA　細胞は、acrA$^+$ 細胞よりも、ホスファチジルエタノールアミンやカルジオリピンの含量が高い。しかし、ホスファチジルグリセロールの場合は逆転する。acrA　および　acrA$^+$ 細胞をアクリフラビンの存在で培養すると、ホスファチジルエタノールアミンとカルジオリピン含量がともに著しく高くなる。しかしホスファチジルグリセロール含量は　acrA$^+$ 細胞でのみ増加する。これらの結果は原核細胞における膜分化の機構に対して示唆的である。

1pA14

低温ストレスと液胞膜の流動性

笠毛邦弘、常盤幸恵[1]、武田裕一[1]、中村善行、太田英二[1]（農水省・食総研、[1]慶応大・理工）

前回低温耐性の弱い品種のイネを用いて、低温ストレスによるプロトン輸送の低下は、低温がATPase分子に直接作用するのではなく、むしろ脂質を介してプロトン輸送の低下を引き起こしていることを報告した。そこで今回は、脂質の変動によって引き起こされる膜の流動性と低温ストレスの相関を液胞膜小胞を用いて明らかにしたので報告する。脂質二重層の運動状態は蛍光偏光解消法とNMRで測定した。蛍光プローブとして疎水部の運動性を反映するDPHと親水部のTMA-DPHをを使用した。DPHとTMA-DPHの偏光度の解析から脂質二重層の疎水部は親水部に比べて温度依存性が強いこと、また低温耐性の強い品種ほど、この温度依存性が強い傾向にあることが判った。また、このような傾向を人工膜リポゾームを用いて明らかにした。

1pA15

低温順化時のトリエン脂肪酸の増加は耐冷性の獲得に重要な役割を果たしている

児玉浩明、堀口吾朗、西内　巧、西村光雄、射場　厚（九州大・理・生物）

シロイヌナズナ葉緑体ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(*FAD7*)を導入した形質転換タバコでは、葉でのトリエン脂肪酸($C_{16:3}+C_{18:3}$)の含量が約10%増加する。このような形質転換タバコでは、1℃、7日間の処理によってタバコ野生株で見られるクロロシスや葉の生長阻害などの低温障害が緩和される(Kodama et al.: Plant Physiol. (1994) 105:601-605)。植物は一般に低温にさらすと膜脂質の多不飽和脂肪酸の含量を増加させることが知られている。そこで野生株と形質転換タバコを用いて低温順化における脂肪酸の変化と耐冷性について調べた。15℃で生育させた野生株の主要な膜脂質のトリエン脂肪酸含量は形質転換タバコと同様の値を示した。さらに15℃で生育した野生株では25℃で生育した野生株で見られた低温障害がほとんど見られなかった。このことは*FAD7*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは、耐冷性を獲得するための低温順化時に見られるのと同様なトリエン脂肪酸の増加がおこり、また同時に葉の正常な生育に必要な耐冷性を獲得していることを示している。

1pA16

コムギ葉細胞の加齢および緑化過程でのα-リノレン酸含量の変化と葉緑体局在型ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現様式

堀口 吾朗、児玉 浩明、川上 直人[1]、西村 光雄、射場 厚（九州大・理・生物、[1]横浜市立大・木原生研）

単子葉植物の葉では、細胞および葉緑体は先端に位置するものほど成熟している。また第1、2葉の伸長は光の有無に関わらず進行する。この性質を利用し、コムギ葉細胞の加齢と光条件が脂肪酸組成およびα-リノレン酸(18:3)生成を触媒するコムギ葉緑体局在型ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(*TaFAD7*)の発現に与える影響を解析した。全脂肪酸に占める18:3の割合は葉の加齢に伴い増加し、緑葉の場合40%から75%に、黄化葉の場合は27%から47%に達した。脂質組成および各脂質の脂肪酸組成の解析から、葉細胞の加齢に伴う18:3含量の増加は緑葉の場合モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGD)の増加とMGD中の18:3の増加の両方によって、また黄化葉の場合、MGDおよびジガラクトシルジアシルグリセロールの増加とこれらの脂質中の18:3の増加によることがわかった。これらの脂質は主にプラスチドに含まれることから、プラスチドの発達に伴う膜脂質の合成および不飽和化が葉細胞の加齢に伴う18:3の増加に結び付いていると考えられる。また黄化葉に光を照射し緑化させると、18:3含量は緑葉の場合とほぼ同じ水準にまで増加した。*TaFAD7* のmRNA量は葉の緑化に伴って、約10倍に増加し緑化に伴う18:3の増加と相関がみられた。一方、明所、暗所生育ともに*TaFAD7* のmRNA量は葉の加齢に関わらずほぼ一定であった。これらの結果は、葉細胞の加齢の場合と緑化の場合に見られる18:3の増加がそれぞれ異なる機構によって制御されていることを示唆する。

1pA17

挿入変異によるラン藻の脂肪酸不飽和化酵素欠損株の作出

田坂恭嗣、Zoltan Gombos、村田紀夫（基礎生物学研究所）

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 には2重結合導入位置(Δ6, Δ9, Δ12, Δ15)の異なる4種類の脂肪酸不飽和酵素遺伝子が存在する。我々は、脂肪酸の不飽和の度合と温度環境との関係を調べるために、挿入変異法を用いてラン藻の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の欠損株を作製した。クローン化されたΔ6不飽和化酵素遺伝子(*desD*)のORF内の *Acc*Iサイトにクロラムフェニコール耐性遺伝子カセットを挿入して、相同組み換えの方法によりΔ6不飽和化酵素欠損株(*desD*$^{-}$)を作製した。また既に作製されているΔ12およびΔ15不飽和化酵素欠損株(*desA*$^{-}$, *desB*$^{-}$)のΔ6不飽和化酵素遺伝子を同じ手法で破壊し、2重の変異体 (*desA*$^{-}$/*desD*$^{-}$ と *desB*$^{-}$/*desD*$^{-}$)を作製した。これらの変異体についてPCRとガスクロマトグラフィにより完全に遺伝子が欠損し、脂肪酸の不飽和化が段階的に停止している事を確認した。

変異体の観察から、低温下での生育に不飽和脂肪酸が必要であることを確認した。

1pB01

タイプⅠエレメントはヒストン遺伝子のS期特異的発現を制御する「必要十分」なシスエレメントである

賀屋秀隆、辻博之[1]、中山卓哉[1]、小野田哲夫、岩淵雅樹[1]（島根大・理・生物、[1]京都大・理・植物）

タイプⅠエレメント(5'-CCACGTCACCGATCCGCG-3')は、コムギ・ヒストンH3遺伝子(TH012)のproximalプロモーター領域で最初に同定されたシスエレメントで、多くの植物ヒストン遺伝子に見いだすことができる。我々は、これまでに変異導入実験(loss of function)よりタイプⅠエレメントがH3遺伝子のS期特異的発現を制御するために「必要」なシスエレメントであることを示してきた。今回、このタイプⅠエレメントがS期特異的発現を制御するエレメントとして「十分」であるか否かを調べるため、以下の様なgain of functionの実験を行った。タイプⅠエレメントを含む30bpのDNA断片を最小プロモーター[CaMV -90 35S(M7)]の上流に3コピーつなぎ、その下流にGUSレポーター遺伝子をもつキメラ遺伝子を作製した。これをTi-プラスミドベクターを介してタバコ培養細胞(BY-2)に導入し、形質転換体を得た。この形質転換体の細胞周期をアフィディコリンにより同調化して、細胞周期におけるGUS遺伝子の発現量の変化をRT-PCR法により調べた。その結果、最小プロモーターのみを持つキメラ遺伝子はconstitutiveにGUS遺伝子が発現するのに対し、タイプⅠエレメントをその上流に持つものはS期特異的に発現量が著しく増加することが観察された。以上の結果とこれまでの結果から、タイプⅠエレメントはH3遺伝子のS期特異的発現を制御するために「必要かつ十分」なシスエレメントであることが明らかになった。

1pB02

細胞分裂に関係する21D7遺伝子の発現

吉川陽子, Maria W. Smith, 伊藤正樹[1], 佐藤茂[2], 駒嶺穆（日本女子大・理・物生, [1]東京大・理・植物, [2]三井業際植物バイオ研究所）

さきに、われわれは、細胞分裂に関係する21D7ニンジン核抗原に対するcDNAを単離した（Smith *et al*, Plant Physiol. 1993, 101 : 809-817）。mRNAレベルでの21D7遺伝子の発現は、ニンジン幼植物、ニンジン培養細胞、ニチニチソウ培養細胞における細胞増殖の活性と高い関連性を示した。タバコ葉肉プロトプラストとタバコ培養細胞BY－2は、細胞分裂に関連する遺伝子の研究に適した材料である。これらのシステムを21D7遺伝子発現の解析に用いるために、われわれは、21D7ニンジンcDNAに相補的なタバコcDNAクローンを単離した。得られたタバコ21D7cDNAは、

1）オーキシン存在下、または、欠乏下で培養したタバコ葉肉プロトプラスト
2）オーキシン添加、再添加により部分的に同調化させたタバコ培養細胞BY－2

より単離したtotalRNAにおける21D7遺伝子の発現様式の解析に使用した。得られた結果をもとに、21D7遺伝子の細胞周期における役割を論ずる。

1pB03

タバコ培養細胞形BY-2を用いた細胞周期依存的遺伝子の解析

伊藤正樹、渡辺昭　（東京大・理・植物）

細胞周期の特定の時期に起こる遺伝子発現、つまり細胞周期依存的発現は、細胞周期の進行の過程でその秩序を維持するために重要であると考えられる。高等植物においては、DNAポリメラーゼδの補助因子であるPCNA、リボヌクレオチドリダクターゼ、及びA-typeサイクリンなどが細胞周期のS期に特徴的に発現し、B-typeのサイクリンはM期に特異的にその転写産物が蓄積することが明らかになっている。

遺伝子が細胞周期に依存して発現するメカニズムを探るためには単一の遺伝子について解析するばかりではなく、複数の細胞周期依存的な遺伝子について解析し、そこで働いている共通のメカニズムが存在するのか否かについて検討する必要があると考えられる。実際に、出芽酵母や高等動物では、S期DNA合成に関わる一群の遺伝子が共通のメカニズムによって細胞周期依存的な発現が指令されていることが知られている。高等植物においてこのようなメカニズムが周期依存的な遺伝子発現に関与しているか否かを明らかにするためには、周期依存的な発現を付与する複数のプロモーターを同定する必要がある。このため、タバコ培養細胞BY-2を用い、プロモーターとレポーター遺伝子からなるキメラ遺伝子を導入した形質転換体を作製し、形質転換体を同調培養することによりレポーター遺伝子の発現の周期依存性について解析した。

1pB04

タバコサイクリンcDNAの出芽酵母における機能解析

Y.Y. Setiady, 山本拓生、関根政実、河内宏[1]、新名惇彦
（大阪大・工・応用生物工学、[1]農水省生物研）

cdc2／サイクリン複合体は真核細胞の細胞周期制御において重要な役割を果たしている。cdc2 とサイクリンはそれぞれ遺伝子ファミリーを形成し、この複合体はセリン／スレオニンキナーゼ活性を持ち、組み合わせの違いによりキナーゼ活性の基質特異性や活性ピークが細胞周期で異なり、細胞内時計のような役割を果たす。

我々はタバコ(Nicotiana tabacum)から3つのサイクリンcDNAを単離し、タバコ培養細胞 BY-2 の同調培養系を用いたノザン解析の結果から、Ntcyc25,27 は Aタイプ、Ntcyc29 は Bタイプサイクリンであることが判明し、昨年度の本大会において報告した。今回は、それぞれのサイクリンの機能解析の一環として、出芽酵母の G1 サイクリン欠損変異株を用いた解析を行った。その結果、正常型タバコサイクリンを酵母内で発現させると生育阻止が見られたが、デストラクションボックスを欠くN末端の変異サイクリンを発現させるとNtcyc27 は相補しないが Ntcyc25,29 は相補性を示した。これらの結果から、タバコサイクリンが *in vivo* で機能していることが示唆された。

1pB05

分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の休止期移行と有性生殖開始に必須の遺伝子群の解析

前川裕美・鵜野葉子・下田親
（大阪市大・理・生物）

分裂酵母は窒素源が枯渇すると細胞周期をG1期で停止し、有性生殖過程へ移行するかもしくはG0期と呼ばれる休止期へと移行する。我々のグループは有性生殖開始と休止期への移行の両方に関与する遺伝子の単離を目的に、接合不能かつ窒素源飢餓条件下で急速に死滅するという表現型を示す*ste12*、*ste13*、*ste14*、*ste15*変異株を単離した。*ste13*遺伝子はRNAヘリカーゼをコードしており、その変異株はG1期停止ができないことがわかっている。そこで、他の変異株についても窒素源飢餓条件下でのDNA含量を測定したところ、*ste14*、*ste15*変異株は*ste13*変異株と同様、G1期停止ができないことがわかった。次に、*ste14*、*ste15*変異を相補する遺伝子を単離した。現在それらの塩基配列等について解析中である。

1pB06

分裂酵母のspo6遺伝子の構造と欠失変異株の性質

中村友浩、下田　親[1]（大阪工大・一般教育、[1]大阪市大・理・生物）

分裂酵母S. pombeの胞子形成に関与するspo6遺伝子はすでにゲノムライブラリーからクローニングされ、塩基配列も決定されている（Kishida & Shimoda, unpublished)。ゲノムDNAの塩基配列から３つのイントロンの存在が推定された。これらのイントロンが実際にスプライスされることを、胞子形成細胞から調製したRNAを用いた RT-PCR法により確認した。さらに興味深いことに、spo6遺伝子のmRNA前駆体は窒素源飢餓の胞子形成条件でのみスプライスされ成熟mRNA(1.4kb)になることがわかった。したがって、spo6遺伝子のmRNAは有性生殖特異的にプロセスされるものと考えられる。

つぎに、spo6遺伝子のコード領域を欠失させた変異株を遺伝子破壊法に基づいて作成した。この△spo6株は、胞子形成が欠損しているが、栄養増殖は正常であることが明らかとなった。

1pB07

パーティクルガン法により得られた形質転換体の染色体ＤＮＡにおける外来遺伝子組込み部位の全塩基配列の決定と解析

清水克哉[1]，川上茂樹，尾崎秀司，五島直樹[2]，
入船浩平，森川弘道（広島大・理・遺伝子科学，[1]現:山陽ｺｶ･ｺｰﾗﾎﾞﾄﾘﾝｸﾞ・研究所，[2]京都薬大・生命研）

我々は、パーティクルガン法により得られた形質転換体を用いて、外来遺伝子組込み部位の解析を進めている。

実験材料としてタバコ培養細胞 (BY-2) にpCaMVNEO (CaMV 35S pro-*nptII*-NOS ter) を導入して得られた形質転換体[1]の１系統 (2-1) を用いた。2-1系統から抽出した全DNAより、外来遺伝子及びその両端のゲノムDNA配列を含む 13.5 kb の断片をクローニングし、塩基配列の決定を行った。その結果、この外来遺伝子組込み部位では、導入したプラスミドがタンデムに２コピー連なっており、また、それを挟むように1.3 kbの相同なゲノムDNA配列が逆向きに向き合う形で存在していることがわかった。さらに、この1.3 kbのゲノム配列には、Scaffold Associated Region (SAR) に特徴的なモチーフであるTOPOII box, A-box, T-box が多数存在していた。また、2-1を含む10系統の形質転換体について、上記1.3 kb 配列内の507 bp 配列(TJ1)をプローブとして、サザン解析を行った。その結果、３系統で*nptII*遺伝子組込み部位にTJ1とホモロジーをもつ配列が認められた。これらの結果について報告する。

1) Iida, A., Morikawa, H., Yamada, Y. (1990) Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 560-563.

1pB08

パーティクルガン法により得られた形質転換タバコ培養細胞の外来遺伝子組込み領域にあるTJ1/TJ2配列のトランスフォーメーション効率におよぼす効果

川上茂樹、清水克哉[1]、入船浩平、森川弘道（広島大・理・遺伝子科学，[1]現、山陽ｺｶ･ｺｰﾗﾎﾞﾄﾘﾝｸﾞ・研究所）

我々は、パーティクルガン法により導入された外来遺伝子の組込み部位の解析を進めている。これまでに，形質転換タバコ培養細胞株では外来遺伝子組込み部位に，Scaffold Associated Region(SAR)に特徴的なモチーフをもつ1.3ｋｂのゲノムDNA断片が，５’側および3’側に互いに逆向きに存在することを見出している(清水ら　本年度本学会発表）。今回、このSAR様配列の外来遺伝子組込みに及ぼす効果について研究した。

1.3ｋｂのゲノムDNA配列にある507 bpのSAR様配列（TJ1)、およびTJ1を含む3'端側の約3.6kbのゲノムDNA配列(TJ2)をpCaMVNEO （CaMV35S pro - *nptII* - NOS ter, 4.4kb)由来のnptII遺伝子発現カセットの両端に組み込んだベクターpTJ1NEO(TJ1-CaMV35S pro -nptII-NOS ter-TJ1,5.7kb)とpTJ2NEO(TJ2-CaMV35S pro -nptII-NOS ter-TJ2,8.3kb)を構築した。これらのベクターおよびpCaMVNEO（対照）をパーティクルガンによりタバコ培養細胞BY-2に導入、2-3週間10ｐｐｍジェネテシンを含む寒天培地で培養し、耐性カルスを選抜した。これらの耐性カルスをランダムに選びNPTⅡアッセイを行い形質転換体であることを確認した。その結果，pTJ1NEO、pTJ2NEO共にpCaMVNEOに比べ形質転換効率は約5倍以上高いことがわかった。

1pB09

植物細胞、組織の飢餓処理はパーティクルガンにより導入したＧＵＳ遺伝子の一過的発現を促進する

森川弘道、黒田宏之[1]、服部悦子[2]、高橋美佐、長谷川正憲、草刈健[3]、西澤秀治[4]（広島大・理・遺伝子科学、[1]京都大・木研、[2]トヨタ自動車・研究部バイオ・ラボ、[3]資生堂・基礎科学研究所、[4]長野県経済連・農業開発室）

パーティクルガンにより導入したGUS遺伝子の発現はターゲット細胞、組織の前培養処理、浸透圧処理または細胞周期など生理学的条件に影響されることが報告されている。今回はターゲット細胞、組織の飢餓処理の効果について研究した結果について報告する。

ミシマサイコ（*Bupleurum falcatum*）培養細胞およびトルコギキョウ（*Eustoma grandiflorum* cv. Glory White）根組織を実験材料として用いた。ミシマサイコ培養細胞はＬＳ培地を基本とする培地（ＢＣＭ）で暗所、26 ℃で振とう培養（130 rpm）し、一週間ごとに継代した。トルコギキョウの根組織片は無菌栽培した１５日齢の実生から切り出した。この根切片の培養はＭＳを基本とする茎葉誘導培地（ＳＩＭ）上で 15h 明／9h 暗条件、26 ℃で行った。これら細胞、組織を窒素、リン酸、糖源またはカリを欠乏する培地（飢餓処理培地）で一定時間培養し、パーティクルガンを用いて常法により、pBI221を導入した。その後、対照培地または飢餓処理培地で培養後、組織化学的にGUS遺伝子の発現を調べた。その結果、いずれの培養細胞、組織においても窒素源などの飢餓処理が導入したGUS遺伝子の発現に大きく効果を持つことが見いだされた。

1pB10

パーティクルガンによるゼニゴケ培養細胞の形質転換

村上英子[1]，関原明，小野莞爾[1]，森川弘道（広島大・理・遺伝子科学，[1]熊本大・理・生物）

ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha* ）は生活環の大半が半数体（n）であり、核ゲノムサイズが比較的小さい(2.4x10^{8}bp)。また、葉緑体、ミトコンドリアゲノムDNAの全塩基配列が報告されるなど分子生物学の研究材料として広く用いられている。今回、パーティクルガン法を用いて、ゼニゴケ形質転換体の育成を行った結果について報告する。

材料として2週間ごとに継代培養しているゼニゴケA18懸濁培養細胞を用いた。継代後4日目のゼニゴケ培養細胞にプラスミドpCH(CaMV 35S pro- *hpt*-NOS ter)を加速圧力200kg/cm^{2}で導入した。導入後、ハイグロマイシンを含む選択培地で選抜し、128個のハイグロマイシン耐性カルスを得た。このうち9系統についてHPTアッセイを行った結果、全系統でHPT活性が検出された。また、*hpt*遺伝子をプローブとしてサザンハイブリ分析を行い、*hpt*遺伝子が染色体へ組み込まれていることを確認した。ゼニゴケ細胞での形質転換効率は比較的高く、一過的に*gus*遺伝子を発現している2500個の細胞あたり18個のトランスジェニック細胞が得られると計算された。

1pB11

in situ **ハイブリダイゼーション法を用いたイネの葉の成長初期段階における*rpoB*遺伝子の発現パターンの解析**

植見健介、水谷明子、西村光雄、射場　厚（九大・理・生物）

高等植物の葉細胞の機能分化と葉緑体の形成は、葉の成長に伴って進行する。葉緑体の形成過程は、葉緑体と核との相互作用によって制御され、個々の遺伝子発現のタイミングの整合も行なわれると考えられる。ノーザンブロッティング法により、イネの葉の各成長過程における葉緑体形成に関与する遺伝子の発現パターンを比較したところ、葉緑体RNAポリメラーゼをコードしている *rpoB* が他の遺伝子に先立ち幼葉の段階で特異的に発現していることがわかった。イネにおいては成長の全期を通じて葉原基の発生と葉の抽出との間に時間的に密接な関係が存在し、葉が抽出を開始する時期(P5)には内部の成長点近傍には常に発生段階の異なる４個の葉原基(P1)ないし幼葉(P2～P4)が存在する。このため、成長点付近の縦断切片を作製することでそれらを一つの視野のもとで同時に観察することができる。この縦断切片に対し *in situ* ハイブリダイゼーションを行なったところ、*rpoB* の発現レベルは葉原基を含む葉の発生段階の初期（P1～P3）では低く、葉が抽出を開始する直前(P4～P5)でピークに達することがわかった。すでに我々は、イネ温度感受性突然変異体である virescent を用いた温度シフト解析から、P4～P5の段階において、葉緑体ゲノムにコードされた遺伝子の発現を全般的に活性化する核からのシグナルの存在について報告している。これらの結果は、*rpoB* の発現が葉緑体分化の最初のプロセスの一つであることを示しており、葉の成長に伴う葉緑体分化のメカニズムを理解する上で、重要な意味を持っていることを示唆している。

1pB12

パーティクルガンを用いた葉緑体RNAポリメラーゼ遺伝子（*rpo*B）の転写調節領域の解析

稲田　仁、関　原明[1]、森川弘道[1]、西村光雄、射場　厚（九州大・理・生物、[1]広島大・理・生物）

高等植物細胞における葉緑体の分化は、核や葉緑体ゲノムにコードされている様々な葉緑体遺伝子の活性化によって開始されると考えられる。その分化の初期の特徴として、特に葉緑体コードのRNAポリメラーゼ遺伝子（*rpo*B）が他の光合成関係の遺伝子より先に発現することが知られている。今回我々は、アラビドプシスの*rpo*Bプロモーター領域の下流にリポーターとしてβ-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子を連結したキメラ遺伝子（pHI111）を作製し、パーティクルガンを用いてタバコ培養細胞（BY-2）に導入することにより、*rpoB*プロモーター領域の解析を試みた。核および葉緑体における遺伝子発現のコントロールとして、それぞれpBI221 (CaMV35S promoter-GUS-NOS terminator)とpTRBCL-GUS (tobacco *rbc*L promoter-GUS-tobacco *rbc*L terminator) を用いた。核における転写阻害剤（α-アマニチン）存在下で培養したBY-2細胞では、pBI221のGUS活性は減少したが、pHI111およびpTRBCL-GUSのGUS活性には変化がみられなかった。また、葉緑体における翻訳阻害剤であるクロラムフェニコールを加えて培養したBY-2細胞では、pHI111およびpTRBCL-GUSのGUS活性は減少したが、pBI221のGUS活性は抑制されなかった。以上の結果より、葉緑体発現ベクターは葉緑体において特異的に発現していることが確認された。我々はこの実験系を用いて、*rpo*Bプロモーター領域を削り込みそのGUS活性に対する影響を調べた。推定上の翻訳開始点から-723番目の塩基より下流の領域に*rpo*Bの転写に必須な領域が存在することが明らかになった。さらに、-723より上流の領域をGUSの発現を指標として解析した結果、*rpo*B遺伝子の転写を抑制する領域と促進する領域が存在することを明らかにした。数種の植物間で*rpo*B遺伝子の上流域の塩基配列を比較したところ、これら二つの領域にはそれぞれ保存された配列が見いだされた。

1pB13

シロイヌナズナの葉緑体局在ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(*FAD7*)のプロモーター領域の解析

西内 巧、中村多紀子、安部 毅、児玉浩明、西村光雄、射場 厚（九州大・理・生物）

高等植物の膜脂質におけるトリエン脂肪酸(18:2,16:2)の生成を触媒するω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現様式や制御機構を明らかにするために、シロイヌナズナの*FAD7*遺伝子のプロモーター領域の解析を行なった。*FAD7*遺伝子のプロモーター領域には、これまでに報告されている光誘導性の遺伝子のシスエレメント(box II,G-box など)に相同性の高い配列がいくつか見いだされた。このプロモーター領域を5'上流から段階的に欠失させたものをGUS遺伝子に結合させた融合遺伝子をタバコに導入した。これによって得られたトランスジェニックタバコを解析した結果、転写開始点から上流-520から-166bpの領域に存在するbox IIおよびG-box様の配列を含む領域に正のシスエレメントが存在しており、またその上流-825までの領域で十分に高い転写活性をもつことがわかった。-825までの領域をGUS遺伝子に結合させた融合遺伝子を導入したタバコについて組織染色を行ったところ、葉肉組織や茎の表皮下の緑色の組織で高い活性が見られたが、葉や茎の維管束系や表皮では活性は見られなかった。さらに、このプロモーター領域は子葉における光の転写制御にも関わっていた。以上の結果は、*FAD7*遺伝子発現の組織特異性および光感受性の調節は主に転写レベルで行なわれること示唆している。

1pB14

タバコ小胞体局在型ω-３脂肪酸不飽和化酵素遺伝子をセンスおよびアンチセンスに発現させた形質転換タバコの解析

濱田達朗、児玉浩明、西村光雄、射場　厚　（九州大・理・生物）

ω-3脂肪酸不飽和化酵素は小胞体と葉緑体に局在していると考えられ、16：2、18：2脂肪酸から16：3、18：3脂肪酸への不飽和化を触媒している。今回、小胞体局在型ω-３脂肪酸不飽和化酵素の生理的な役割を調べるために、タバコ小胞体局在型ω-３脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*NtFAD3*）をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流にセンスおよびアンチセンスの向きにつないだコンストラクト作製し、タバコに導入した。その結果*NtFAD3*のmRNA量は、センスのコンストラクトを導入したタバコではコントロールの約7～8倍程度上昇し、アンチセンスのコンストラクトを導入したタバコではコントロールの約30～90％程度に減少した。これらの発現量の変化が脂肪酸組成に及ぼす影響を報告する。

1pB15

ゴマのステアロイル-アシルキャリアープロテインデサチュラーゼ遺伝子の発現の特異性

湯川　泰、高岩文雄[1]、吉田直民、山田恭司（富山大・理・生物、[1]農水省・生物研）

Stearoyl-acyl carrier protein desaturase（以後SACPD）は高等植物の脂肪酸合成系路で最初に脂肪酸に２重結合を導入し、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合を決定する。本研究では、ゴマ(*Sesamum indicum* L.) の未熟種子からSACPDのcDNAを単離し、その構造を解析し、同時に発現の特異性をノーザンハイブリダイゼーションで調べた。単離したcDNAの塩基配列は高等植物種間で高度に保存されていたが、動物、コウボのΔ9デサチュラーゼとの相同性は認められなかった。種子での発現には時期特異性がみられ、開花後27日の未熟種子で最も転写量が高かった。一方、根、茎、葉、種子について発現量を比較したところ、種子のみで強く転写されていることが確認された。ゲノミックサザンの結果より、アイソザイムの存在が推測されていたが、実際に異なるcDNAクローンを単離することができたので、そのクローンについてもあわせて報告する。

1pB16

*DFR*遺伝子のプロモーターに発現を制御された*codA*遺伝子によるネガティブ選抜

小林哲人[1,2]、久島繁[3]、Brenda W. Shirley[4]、市川裕章[1]（[1]農水省・生物研、[2]筑波大・バイオシステム、[3]筑波大・応生、[4]Dept. of Biol., Virginia Tech., USA）

特定遺伝子の発現に関与する突然変異体の単離を効率化するには、ネガティブ選抜マーカーが有用であると考えられる．ネガティブ選抜とは、ネガティブ選抜マーカーを発現している細胞あるいは個体が、ある条件下で生育阻害を示すことを利用する選抜方法である．バクテリアの酵素シトシンデアミナーゼが，タバコ及びミヤコグサ（*Lotus japonicus*）においてネガティブ選抜マーカーとして機能しうることが報告された（Stougaard, 1993）．そこで、*codA*遺伝子の上流に35Sプロモーターをつないだキメラ遺伝子（Stougaard, 1993）をアラビドプシスに導入し，自殖後代（T2，T3世代）において遺伝学的解析およびPCR解析、ノーザン解析を行った結果，アラビドプシスにおいて，*codA*がネガティブ選抜マーカーとして機能することが明らかとなった．

続いて，光に対する遺伝子の発現制御に関与するトランス因子の同定，あるいはシグナルトランスダクションの経路を調べる目的で，ジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子（*DFR*）のプロモーター（Shirley *et al*., 1992）に*codA*をつないだキメラ遺伝子をアラビドプシスに導入し，形質転換体を得た．*DFR*遺伝子はUV-Bあるいは青色光によってその発現が誘導されることが知られている．そこで，得られた形質転換体の自殖後代（T2世代）において，UV-Bあるいは青色光による*codA*の発現誘導を行い，*DFR*プロモーターに発現を制御された*codA*によるネガティブ選抜の系が機能するか調べた．

1pB17

ヘアピン型リボザイムの遺伝子発現抑制効果

久松 伸[1、2]、其木茂則[2]、菊池 洋[1]（[1]三菱化学・生命研、[2]麻布大学・環境保健）

触媒機能を持つRNAをリボザイムと呼ぶが、このリボザイムを特定のRNAを特異的に切断する道具として利用するための研究がなされるようになってきた。我々は、ヘアピン型と呼ばれるリボザイムが遺伝子発現抑制 の道具として利用できるか検討するために、β-glucuronidase (GUS) mRNAを標的とするヘアピン型リボザイムをいくつか設計しところ、これらのリボザイムはin vitroにおいてGUS RNAを切断することができた。

ところでこのリボザイムは、標的RNAと結合する基質結合ドメインと標的RNAの切断を司る触媒ドメインからなっているため、ある種のアンチセンスRNAでもあると考えられる。従ってin vivoにおける遺伝子発現抑制効果が、リボザイムによる切断活性かアンチセンス効果であるかを比較する必要がある。そこで、リボザイムの触媒ドメイン中の１塩基を他の塩基に置換して切断活性を持たないRNA分子を設計し、このRNA分子がリボザイムのコントロールとなるかどうか検討するために、GUS RNAと1塩基置換をしたリボザイムを連結させたRNA分子の自己切断実験を行った。その結果、塩基置換をしたRNA分子は切断能力を持たなくなったため、このRNA分子はin vivoにおけるリボザイムのコントロールになることがわかった。さらに、これらの分子を植物細胞内に導入したのでその結果も報告する。

1pC01

Synechocystis PCC6803のCO_2濃縮に関与する遺伝子のクローニング

加藤 彰[1]，小川晃男[1,2]（名古屋大・農・生化学制御[1]，名古屋大・生物分子応答研究センター[2]）

ラン藻のCO_2濃縮機構において、CO_2とHCO_3^-はそれぞれ別の機構で輸送されると考えられるが、輸送機構は現在のところほとんど不明である。我々はCO_2とHCO_3^-の輸送において基質への親和性が異なること（CO_2>HCO_3^-）に着目し、NTG処理した*Synechocystis* PCC6803よりCO_2輸送能が低い変異株（SC）を単離した。この変異株はCO_2濃度60ppmの条件下では生育できず、またCO_2輸送活性は野生株の約1/3であった。一方、HCO_3^-輸送活性は野生株と同等であった。

pBR322を用いて野生株のGenomic DNA ライブラリーを作成し、SC変異株との相補試験を行なった。その結果、3.9kbpのDNA断片をもつクローンを単離した。我々は、現在、SC変異周辺の塩基配列を決定しつつある。

1pC02

紅藻*Porphyridium purpureum*炭酸脱水酵素を構成する相同な二つの配列のアミノ末端側のみよりなるポリペプチドの*E. coli*内活性発現

三橋敏、宮地重遠(海洋バイオテクノロジー研究所、釜石研究所)

我々はこれまで単細胞性紅藻*Porphyridium purpureum*より炭酸脱水酵素(CA)のcDNAを単離しその一次構造を明らかにした。この酵素はN末端側半分(NCA)とC末端側半分(CCA)が高いホモロジーをもち、活性部位と予想される一組のアミノ酸残基が各々に存在することから、ある原核生物の祖先型CAが倍化融合し単一のポリペプチドとなり一つの酵素として機能していると考えられる。(1994年度年会)。

まず、*E. coli*内においてCAをシグナルペプチドを除いたmatureな形で融合蛋白質として発現させた。得られた活性をもつ蛋白質はnative酵素と同様に、阻害剤をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより精製され、以下の点でnative酵素とほぼ同じ性質を示した。1)数mMのCl^-で活性化されること。2)acetazolamideとethoxyzolamideに対する感受性。3)pH9～10で活性化されること。

次に、NCAのみ、CCAのみを*E. coli*内で発現させることを試みた。その結果、NCAを発現するクローンの粗抽出物中に、CA活性を検出することができた。一方、CCAを合成するクローン中には期待される分子量のポリペプチドが合成されていたにもかかわらず、有意なCA活性は得られなかった。このことから、アミノ酸配列から予想される二つの活性部位は異なった機能をもつものと考えられる。また、NCAの諸性質についても報告する予定である。（本研究は新エネルギー、産業技術総合開発機構の委託研究「細菌、藻類等利用二酸化炭素固定化、有効利用技術研究開発」の一環として行われたものである。）

1pC03

トウモロコシのＰＰＤＫ遺伝子を導入したアラビドプシスの作出と解析

市川裕章[1]、石丸　健[1]、松岡　信[2]、大杉　立[1]
（[1]農水省・生物研、[2]名古屋大・生物分子応答）

ピルビン酸Piジキナーゼ（PPDK)はＣ４植物の炭酸固定系においてピルビン酸をホスホエノールピルビン酸に変換させるＣ４特異的な酵素であり、ＰＰＤＫ遺伝子をＣ３植物に導入した場合、どのように発現し、光合成特性に影響するのかという点は非常に興味深い。我々は、トウモロコシのＰＰＤＫ遺伝子を、CaMV35SあるいはアラビドプシスrbcSプロモーターにつないだ後、それぞれのキメラ遺伝子をＣ３植物であるアラビドプシスに導入し、解析を行った。　ノーザンハイブリダイゼィション及びウェスタンブロッティングの結果より転写、タンパクレベルでの発現が確認された。また、活性にも有為な差異が認められた。現在、得られた形質転換体について光合成速度、他の関連酵素活性等を測定しＰＰＤＫのＣ３光合成に及ぼす影響を検討中である。

1pC04

ホウレンソウ葉緑体からのヘキソース結合タンパク質の単離と性質

岸本　卓也、高橋　正昭（甲南大・理・生物、大阪府大・農・応用生化）

光合成は細胞質で行われる反応を、リン酸トランスロケーターによる葉緑体から細胞質へのジヒドロキシアセトンリン酸の輸送によりサポートしている。さらに包膜のヘキソース輸送系によりグルコースやマルトースとして還元力が放出される可能性も考えられている。包膜のヘキソーストランスポーターを単離し、その分子的性質と輸送の調節機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。

ホウレンソウ単離葉緑体を出発材料とし、表面活性剤存在下で超音波処理し、トランスポーターを含む膜タンパク質を可溶化した。不溶性成分を遠心で除き、表面活性剤を含むバッファーで平衡化したアフィニティーカラムに通してヘキソースに親和性を持つタンパク質を吸着させ、十分に洗浄した後SDSで溶出した。溶出液には、SDS電気泳動により、分子量の異なる３種のタンパク質が認められた。それぞれの分子量は、64、52、29 kDaであった。29 kDaのタンパク質はLHCの１種と思われる。分子量の大きい2バンドのサイズは、これまで発表された貯蔵組織のショ糖やグルコースのトランスポーターのサイズに似ている。相同性などについて報告する。

1pC05

キビ葉の2-オキソグルタル酸/リンゴ酸トランスロケーターのcDNAクローニング

谷口光隆，杉山達夫（名古屋大・農・応用生物科学）

NAD-リンゴ酸酵素型C_4植物キビでは，維管束鞘細胞のミトコンドリアがC_4光合成経路に組み込まれており，ミトコンドリア膜間の高い輸送活性が必要とされる．この活性を維持するための様々なトランスロケーターが維管束鞘細胞ミトコンドリアに存在することが予想されている．我々はこのうちの2-オキソグルタル酸/リンゴ酸トランスロケーター(OMT)のcDNAクローニングを行った．コードされるタンパク質は，分子量32,000であり，ウシミトコンドリアのOMTと同一のアミノ酸で45%，類似のアミノ酸も含めると75%の相同性があった．そのハイドロパシー図もウシのものと良く似ており，膜を６回貫通していると予想された．OMTcDNAの一部分を用いて作製した大腸菌組み換えタンパク質に対する抗体は，ミトコンドリアの膜タンパク質と反応し，今回得られたcDNAがミトコンドリア局在型のOMTであることが示唆された．得られたクローンには介在配列を含むものがあり，スプライシングされないmRNAが蓄積していることがノーザン解析においても認められた．OMTのmRNA蓄積量は葉肉細胞よりも維管束鞘細胞に多く，非光合成器官においては僅かな発現しかみられなかった．さらに葉の緑化過程において他の光合成酵素遺伝子と類似したパターンで誘導され，OMTの光合成機能への関与が期待される．現在，このOMTタンパク質の全長を大腸菌内で大量発現させ，再構成系を用いて輸送活性に関する詳細な解析を行っている．

1pC06

藻類と高等植物における光合成炭素還元系チオール酵素の活性調節機構の比較

武田　徹、山田義揮、重岡　成、横田明穂[1]（近畿大・農・食栄、[1]地球環境研 RITE）

高等植物葉緑体の光合成炭素還元系(PCR)を構成するチオール酵素(フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、NADP-グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ、リブロース 5-リン酸キナーゼ)はフェレドキシン／チオレドキシン系を介した光還元力により活性調節を受け、H_2O_2により容易に酸化失活する。ところが、単細胞真核藻類の *Euglena*、*Chlamydomonas* およびラン藻 *Synechococcus* PCC7942 (*S.* 7942)、*Synechocystis* PCC 6803 (*S.* 6803)のチオール酵素はH_2O_2に対して耐性を有する。したがって、これら藻類チオール酵素の活性調節機構は高等植物のそれと異なることが考えられる。今回、藻類チオール酵素活性に及ぼすジチオスレイトール(DTT)の影響について詳細に検討し、フェレドキシン／チオレドキシン系の光調節機構について高等植物と比較した。粗酵素調製時のDTT添加によるチオール酵素の活性化をホウレンソウ葉と*Euglena*、*Chlamydomonas* 葉緑体およびラン藻 *S.* 7942、*S.* 6803で比較すると、全てのチオール酵素についてホウレンソウ葉の酵素が最も顕著に活性化された。DTTにより活性化した酵素を嫌気的条件下で脱塩カラムによりDTTを除去したところ、ホウレンソウ葉葉緑体のチオール酵素が最も不安定であった。DTTを除去した酵素に再びDTTを添加すると、ホウレンソウ葉葉緑体の酵素は1.8~3.2倍活性化されるのに対し、*Euglena*、*Chlamydomonas* 葉緑体およびラン藻 *S.* 7942、*S.* 6803のチオール酵素は殆ど活性化されなかった。また、DTTを除去したホウレンソウ葉葉緑体のチオール酵素は0.1 mM H_2O_2により完全に阻害されたが藻類の酵素は有意に活性を保持していた。

1pC07

ラン藻*Synechococcus* PCC7942のNADP依存グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの酵素学的および分子的性質

木本みゆき、山本真江、田茂井政宏、石川孝博、武田　徹、平山　修、重岡　成（近畿大・農・食栄）

高等植物の光合成CO_2固定は低濃度のH_2O_2(10^{-5}M)により著しく阻害される。しかし、緑藻およびラン藻の光合成CO_2固定はH_2O_2に対して耐性を有する。最近、これら藻類が有する光合成CO_2固定のH_2O_2耐性は、光合成炭素還元系を構成するチオール酵素のH_2O_2耐性に起因することが明らかになった。今回、ラン藻*Synechococcus* PCC7942(*S.*7942)よりチオール酵素の1つであるNADP依存グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を精製し、酵素学的および分子的性質について検討した。

*S.*7942のGAPDHはイオン交換、疎水およびアフィニティークロマトグラフィーにより、回収率14.9%で346倍に精製された。分子量はゲル濾過より165kDa、SDS-PAGEより41kDaであり、本酵素が同一のサブユニット4量体からなることがわかった。精製酵素はNADHに対しても活性を有し、それはNADPH依存活性の10%であった。精製酵素を0.1 mM H_2O_2で処理しても45%の活性を保持していた。N末端アミノ酸配列(24残基)は高等植物のNADP依存GAPDHと75% の相同性を示した。N末端アミノ酸配列と既報のGAPDHの内部アミノ酸配列の保存領域をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行った。その結果、約460bpのDNAが増幅された。このDNA断片のシークエンスより推定されるアミノ酸配列は既報の高等植物葉緑体のNADP依存GAPDHと60~70%の相同性を示した。現在、全シークエンスを解析中である。

1pC08

Synechococcus PCC7942におけるフルクトース-1,6-ビスホスファターゼのH_2O_2耐性の分子機構

田茂井 政宏、木本 みゆき、石川 孝博、武田 徹、平山 修、重岡 成（近畿大・農・食栄）

高等植物の光合成炭素還元系を構成するチオール酵素は、フェレドキシン／チオレドキシン系を介した光還元力により活性調節を受ける。またこれらの酵素は低濃度H_2O_2(10^{-5} M)により容易に酸化失活を受け、その結果光合成が停止する。ところが、緑藻およびラン藻の光合成CO_2固定は高等植物の場合とは異なり、10^{-3} M H_2O_2存在下でも充分に機能していた。さらにこの耐性は、チオール酵素のH_2O_2に対する非感受性に起因することが明らかになった。そこで、藻類およびラン藻におけるこのH_2O_2耐性機構を分子レベルで明らかにするために、ラン藻*Synechococcus* PCC7942 (*S.*7942)のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase)遺伝子のクローニングを行いその一次構造を決定した。

既報のFBPase遺伝子の保存領域からプライマーを作製しPCR法によりDNA断片を得た。このDNAをプローブとしてスクリーニングを行ったところ、5.5 kbpのDNA断片を持つ陽性クローンが得られた。この断片中には339アミノ酸をコードする1017 bpのORFが存在し、推定アミノ酸は既報のFBPaseと約40%の相同性を示した。これは葉緑体型FBPaseに比べて、細胞質型や*E.coli*のそれに類似していた。また、この遺伝子を発現ベクターを用いて大腸菌で発現させたところ、FBPase活性の約300倍の上昇と、SDS-PAGEにより推定分子量と同じ37 kDaのタンパク質の増加が認められた。本酵素は、フェレドキシン／チオレドキシンを介した光活性化を受ける葉緑体型FBPaseの調節部位(174-Cys-Val-Val-Asn-Val-Cys-179)を欠損していた。ラン藻*S.*7942FBPaseはホウレンソウ葉緑体型と明らかに異なり、光による活性調節が認められなかった。以上より、この調節部位の欠損は、ラン藻FBPaseのH_2O_2耐性機構の原因の一つであることが示唆された。

1pC09

RuBisCO activaseの機能分子形態

山本　宏[1,3]、小林　裕和[2]、川崎　東彦[1]、横田　明穂[3]
([1]大阪府立大・応用生物、[2]静岡県立大・食品栄養、[3]RITE 植物分子生理)

*in vivo*でのRuBisCOの光活性化にはRuBisCO activaseが関与している。RuBisCO activaseはRuBisCOの活性部位に強固に結合したインヒビター(RuBP,XuBP,CA1P等)を解離させることでRuBisCOを活性化に導く。この活性化の過程においてRuBisCO activaseは常にATPを加水分解することが必要であり、またRuBisCOとの複合体を形成することが知られている[1)]。RuBisCO activaseは多くの高等植物において分子量41-42 kDと45-46 kDの2種のサブユニットから構成されるが、タバコでは42 kDのサブユニットのみしか存在しておらず、RuBisCOactivaseの活性発現への両サブユニットの役割、及びその形態に関する知見は殆どないのが現状である。RuBisCOactivaseの機能分子形態を決定することはRuBisCOとRuBisCO activaseの相互作用に関する化学量論的解析に重要であることから、我々はホウレンソウ無傷葉緑体、及び大腸菌発現系から得たホウレンソウRuBisCOactivase isoformsを用いてゲル濾過により機能時のRuBisCOactivaseの分子形態と、RuBisCOとRuBisCO activaseの相互作用に関し検討した。

その結果RuBisCO activaseはATP存在下においてホモダイマーとして溶出されることから2種のアイソザイムとして機能していることが示唆された。また不活性型RuBisCOの存在下ではRuBisCOactivaseは高分子量画分に溶出された。これはRuBisCOとRuBisCO activaseとの相互作用の存在を意味している。

[1)]Yokota and Tsujimoto (1992) Eur. J. Biochem 204, 901-909

1pC10

PHYSIOLOGY OF RUBISCO IN THE DARK: EFFECTS OF pH ON THE INTERACTIONS BETWEEN RUBISCO, CA1P AND INORGANIC PHOSPHATE

Md ANWARUZZAMAN, Yoshihisa NAKANO[1], Akiho YOKOTA. Plant Mol. Physiol. Lab., Res. Inst. Innov. Tech. Earth (RITE), Kizu, Kyoto 619-02, [1]Dept. Appl. Biochem., Univ. Osaka Pref., Sakai, Osaka 593.

RuBisCO requires CO_2 and Mg^{2+} for activation before catalysis. Spontaneous complete activation occurs at pH 8 in the presence of more than 100 μM CO_2 and 10 mM Mg^{2+}. RuBisCO activase promotes the activation at much lower CO_2 concentrations in the light illuminated stroma. In the dark, 30 to 60% RuBisCO is still in an active form. The mechanism of the activation under these conditions has been unknown. CA1P, the nocturnal inhibitor of RuBisCO, is synthesized in the dark to bind to active RuBisCO and thereby keep it inhibited in some plants. However, all of these results were collected at pH 8 which is not the stromal pH in the dark. In the dark, pH is 7 and Mg^{2+} is present at less than 10 mM. In this study, we examined the effects of pH on the interactions between RuBisCO, CA1P and Pi at pH 7. RuBisCO purified from spinach was completely inactive in the presence of air level of CO_2 and 10 mM $MgCl_2$ below pH 7.5. Inclusion of 10 mM Pi significantly promoted the activation of RuBisCO at lower pH's. The interaction of RuBisCO with CA1P was also pH-dependent. CA1P was easily removed at pH 7 from RuBisCO of the crude extract of predawn *Phaseolus vulgaris* leaves by gel-filtration on Sephadex G-75. Pi partially stimulated the binding of CA1P to the enzyme. These results indicate that in the absence of RuBisCO activase function in the dark Pi is very important for physiology of RuBisCO.

1pC11

ホウレンソウ RuBisCO 反応の滴定型カロリメーターを用いた解析

大垣順洋、和田野晃、深田はるみ、高橋克忠、中野長久、横田明穂[1]（大阪府大・農・応用生物、[1]RITE・植物分子生理）

植物RuBisCOの反応は活性が反応開始直後数分の間に緩やかに低下し、その後一定となる二相性を示す。この活性の低下は、触媒部位（s-site）上での反応の進行に伴いRuBisCOの蛋白構造が変化し、機能形態が変わるためである。高濃度(2mM以上)の基質(RuBP)存在下では、触媒部位とは異なる活性調節部位（r-site）にも基質が結合することにより活性の低下が抑えられる。今回我々は、高感度滴定型カロリメーターを用いてRuBisCO反応に伴う機能形態変化の機構を検討した。滴定リガンドには6-ホスホグルコン酸と3-ホスホグリセリン酸を用いた。リガンドが6-ホスホグルコン酸である場合、RuBisCOプロトマーあたり結合部位が二箇所存在することが示された。これらの結合の際の標準自由エネルギー変化は$\Delta G^0_S \approx -7.50$kcal/mol（pH 8.0）、$\Delta G^0_R \approx -6.89$kcal/mol（pH 8.0）であった(25°C)。 さらにRuBisCOの触媒部位をCABPで塞いだ後に6-PGを滴下した場合にも発熱が見られ、この場合はRuBisCOプロトマーあたりの結合部位数は一箇所であった[$\Delta G^0_R \approx -6.56$kcal/mol (pH 8.0)]。これは触媒部位以外にも基質結合部位が存在するという以前からの報告と一致していた。しかし、リガンドが3-PGAである場合発熱はほとんど見られなかった。他の糖リン酸の結合についても検討しており、これらの結果に基づいて植物 RuBisCO の反応機構を考察する。

1pC12

イオンクロマトグラフィーを用いたRuBisCOのSpecificity Factor 迅速決定法

和田野晃、Richard G. Jensen[1]、Wendy Johns[1]、鈴木祥弘[2]、植村康一[3]、横田明穂[3]（大阪府大・農・応用生物、[1]アリゾナ大、生化、[2]東大・理・植物、[3]ＲＩＴＥ・植物分子生理）

リブロース1,5ビスリン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ（RuBisCO）は、光合成による炭酸ガス固定の初発酵素であり、その制御に重要な役割を果たしている。RuBisCOは、基質であるリブロース1,5ビスリン酸のカルボキシラーゼ反応と共に、オキシゲナーゼ反応も触媒し、その比の指標となる(Vc/Kcm)/(Vo/Kom)(τ：タウ）は光合成の効率を考える上で重要である。従って、種々の光合成生物より単離されたRuBisCOのτの決定はこれまでも大きな関心を持たれてきた。しかし、その決定は、二つの反応の生成物である3-ホスホグリセリン酸(PGA)とホスホグリコール酸(PG)の分離が困難で、さらに定量感度が低かったため、ラジオアイソトープを用いてなされてきた。そこで今回、より迅速で正確にτを決定する方法を確立する目的で、DIONEX社のイオンクロマトグラフィーによるPGAとPGの分離及び高感度な検出を試みた。カラムとしてIonPac AS11とガードカラムAG11を用い、溶出液 20 mM NaOHを1 ml/minで分離し、25 mM H_2SO_4 7-11 ml/min で洗浄液を流したメンブラン型アニオンサプレッサーを通した後、Dionex PED システムを用い検出した。PGAとPGは保持時間５～７分で分離定量でき、その検出限界は0.1 nmol程度であった。このシステムを用いて種々の光合成生物のRuBisCOのτを検討したので併せて報告する。

1pC13

光合成生物間におけるRuBisCOのFalloverとその誘発部位の分布

植村康一、樋口隆司[1]、榎本幸人[2]、藤原祥子[3]、浜田仁[4]、横田明穂（RITE・植物分子生理、[1]京大・農化、[2]神戸大・理・臨海実験所、[3]東京薬大・環境生命、[4]富山医薬大・医）

高等植物のRuBisCOにおいては反応中に活性が低下する現象（Fallover）が起こる。一方、微細緑藻、ラン藻ならびに光合成細菌のRuBisCOは一切Falloverを示さない（直線型）。これまでの解析で、FalloverはRuBisCOの機能形態の変化によって起こり、この変化にはRuBisCO大サブユニットの21番と305番のリジン残基が重要な役割をはたしていることを明らかにしてきた。今回、種々の光合成生物間のRuBisCOの反応におけるFalloverの分布を詳細に調べるとともに、Fallover誘発部位と推察されている部位近傍のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、高等植物や非緑色藻類等のFallover型RuBisCOでは21番と305番のリジン残基がよく保存されているのに対し、直線型RuBisCOではその多くがアルギニンもしくはプロリンに変化していた。また、進化上藻類と高等植物の移行期に当たると考えられる接合藻のRuBisCOはFallover型と直線型の中間の性質を示し、アミノ酸配列は21番がアルギニン、305番がリジンであった。これらのことは、接合藻がRuBisCOの進化においても変遷期にある可能性を示しており、この点とRuBisCOの他の諸性質の進化とも関連させて考察する。

1pC14

カルビンサイクルにはリボース-5-リン酸の直接のリン酸化が必須である：リボース-5-リン酸キナーゼ活性の存在

佐野 智、加藤 晃、横田明穂、秋好淳子[1]、柴田 均[1]（RITE・植物分子生理、[1]島根大・農・応用生物機能学）

カルビンサイクルにおいて二酸化炭素の取り込み反応はRuBisCOで触媒されるが、それ以外の他の酵素はRuBisCOのもう一方の基質であるリブロース-1,5-二リン酸(RuBP)の再生産に関与している。最終的なRuBP再生の第一段階は、リボース-5-リン酸(R 5-P)からのリブロース-5-リン酸(Ru 5-P)の生成であり、この反応はR 5-Pイソメラーゼ(R 5-P I)によって触媒される。Ru 5-Pはキシルロース-5-リン酸からも生成される。第二段階はRu 5-Pキナーゼ(PRuK)の触媒する反応であると考えられている。しかし、葉緑体の中にはR 5-P Iの阻害剤である3-ホスホグリセリン酸(3-PGA)が高濃度存在している。

3-PGAおよび基質の濃度から葉緑体内での活性を見積ると、R 5-P Iの関与した反応はほとんど進行しない。すなわち、正常にカルビンサイクルが働くためは、既知の経路以外でもRuBPが再生されていなければならない。一昨年度の年会でRuBPの新しい合成経路に関与すると思われるR 5-Pキナーゼ(PRK)が葉緑体中に存在することを報告した。

そこで、ホウレンソウ葉からPRKを精製したが、この標品にはPRuK活性が共存しており、二つの酵素活性を分別することができなかった。現在、大腸菌内で大量発現したアイスプラントのPRuKを用いて両活性が同じ酵素タンパク質に由来するかどうかを検討中である。

1pC15

葉緑体におけるリボース-1,5-ビスリン酸のリブロース-1,5-ビスリン酸への変換

柴田 均、山下 寛、秋好 淳子、横田 明穂[1]
（島根大・農・応用生物機能学，[1]RITE・植物分子生理）

葉緑体にはリボース-5-リン酸(R-5-P)を基質としてATP から ADP を生成する強い活性がある。一昨年度の年会で、R-5-P 由来の生成物はリボース-5-リン酸(R-1,5 P_2)である可能性を報告した。今回 R-1,5 P_2 のリブロース-1,5-ビスリン酸(RuBP)への変換について報告し、カルビンサイクルにおける RuBP 再生との関連性について考察する。

R-1,5 P_2 を基質として システイン-カルバゾール反応で活性を追跡することで、粗葉緑体画分より、本酵素(仮称 R-1,5 P_2 isomerase) を精製した。R-5-P イソメラーゼとは異なった精製標品が得られた。反応精製物が 280 nm に吸収を示すこと、精製標品の添加に依存して明らかな RuBisCO 活性が出現したことにより、精製物は RuBP であることが確認できた。

これらの結果は R-5-P イソメラーゼ、リブロース 5-リン酸キナーゼ反応を介した R-5-P から RuBP の再生とは異なる経路の存在を示している。高等植物葉緑体においてこの新規ルートがカルビンサイクルで果たす役割の位置付けを行いたい。

1pC16

リブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼのカルボキシソームによる制御とその生理的意義

佐藤良平、姫野道夫、和田野晃（大阪府大・農・応用生化）

光合成炭素還元回路の律速酵素であると考えられているリブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（RuBisCO）は、ラン藻ではカルボキシソームと呼ばれるタンパク質性顆粒に局在している。カルボキシソームは無機炭素濃縮機構において重要な役割を果たしていると考えられているが、RuBisCO活性がカルボキシソームによって受ける影響についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、フレンチプレスで細胞を破砕した後調整した無細胞画分（Carboxysomal RuBisCO）とガラスビーズで細胞を破砕した後調製した無細胞画分（Soluble RuBisCO）のRuBisCO活性を比較することにより、RuBisCOのその存在形態に依存した活性変化について、定量的な知見を得ることを目的とした。

測定の結果、Carboxysomal RuBisCOでRuBisCO活性が経時的に低下する事が明らかとなった。また、Carboxysomal RuBisCOの方がリブロース1,5-ビスリン酸に対する親和性が低かった。これらの結果から、カルボキシソームはRuBisCOのカルボキシラーゼ活性を助ける働きをするばかりでなく、活性を抑制する性質も合わせ持っている事が明らかとなった。さらに、カルボキシソームによるRuBisCO活性低下のメカニズムについて考察する。

1pC17

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942 におけるPhosphoribulokinaseの活性調節様式

西川 圭祐、平橋 智裕、姫野 道夫、和田野 晃 （大阪府大・農・応用生化）

Phosphoribulokinase(PRK)はすべての光合成炭素還元回路(PCR cycle)において、CO_2固定反応の基質となるRibulose 1,5-bisphosphateをRibulose 5-phosphateのATPによるリン酸化により合成する反応を触媒する酵素である。本酵素は高等植物から単離され、約10倍に及ぶ光活性化の機構や代謝中間体の影響について検討されている。しかし、ラン藻PRKは光により約1.2倍にしか活性化されず、このことから、主に代謝中間体により活性調節が行われていると推測できる。本研究ではラン藻 *Synechococcus* PCC7942 からPRKを精製し、本酵素の代謝中間体による影響を調べ、また、精製蛋白質を用いてアミノ酸一次配列を決定し、高等植物における光活性化・ATP結合部位の比較検討を行った。

30℃で培養したラン藻を破砕して得られた粗酵素抽出液を、硫安分画後、陰イオン交換、ゲルろ過、アフィニティーの各クロマトグラフィーにかけてPRKを精製した。この精製酵素を用い、高等植物PRKの阻害剤である6-Phosphogluconate(6-PG)の影響について調べたところ、本酵素はATPに対して非拮抗阻害を示し、更にKi値がpHにより大きく左右された。また、アミノ酸一次配列の結果から、光活性化・ATP結合部位(Cys-16,Cys-55)は認められたが、その間にある数残基が欠落していた。

1pD01

D1タンパク質前駆体C末端プロセッシング酵素遺伝子のクローニング

[1]稲垣言要，[2]森仁志，[1,3]松本哲，[1,3]佐藤公行
（[1]基生研，[2]名古屋大学・農，[3]岡山大学・理）

D1タンパク質前駆体のC末端延長部分の切断除去は、光化学系IIの酸素発生系の構築に必須でる。我々は、D1タンパク質前駆体のC末端に相当する合成ペプチドを切断する活性を指標に、この過程に関与する酵素を精製し、これが、45kDaのサイズで、単量体で機能するタンパク質として同定し、そのN末端と内部配列を決定した（1994年度年会）。

本研究では、まず、この配列情報を元に、ホウレンソウ緑葉mRNAの逆転写産物から、本酵素遺伝子の一部をPCRで増幅した。ついで、その産物をプローブとして用い、ホウレンソウ緑葉由来のcDNAライブラリーから、D1タンパク質C末端切断酵素遺伝子をコードするクローンを単離することに成功し、その塩基配列を決定した。

塩基配列から推定される本酵素のアミノ酸配列は、*Synechocystis* PCC6803の光化学系II欠損株（D1タンパク質のC末プロッセッシング欠損株）を相補するORFとして同定された一つの遺伝子（*ctpA*; Pakrasi *et al.* 1994）のそれと全領域にわたって相同性が高かった。このことは、このORFが、Pakrasiらの予想どうり、この生物のD1タンパク質C末プロセッシング酵素であることを確認するものである。

1pD02

D1 タンパク質遺伝子 *psbA* の random mutagenesis による *Synechocystis* 強光耐性株の作製および耐性機構の解析

鳴坂義弘[1,3]，佐伯真理[2]，小林裕和[1,2]，佐藤公行[1,3]（基生研・情報制御[1]，静岡県大・生活健康科学研究科・食品栄養科学[2]，岡山大・理[3]）

光は光合成反応のエネルギー源であるにも係わらず，光合成生物は強光により光傷害を起こし光合成機能が低下することが知られている．この機構として，光化学系II反応中心D1タンパク質の関与が考えられている．しかしながら，光傷害に関与するD1タンパク質の構造と機能についての知見は皆無に近い．site-directed mutagenesis の限界を考慮するとき，遺伝子にランダムに変異を導入し，生物に返した後，光感受性が異常になった形質転換体を選抜するという方法論は興味深い．光合成植物のモデル系として，高頻度形質転換および多数の形質転換体からの変異株の選抜が容易なラン藻*Synechocystis* PCC 6803 を用い*in vitro* random mutagenesisを試みた．

本ラン藻 *psbA* 遺伝子うち最も発現している*psbA2* に着目し，PCR法，hydroxylamine法，および合成オリゴヌクレオチド法により，*in vitro* random mutagenesisを行ない，*psbA1* および*psbA3* をあらかじめ破壊しておいた株に形質転換により導入した．これらの形質転換体を，野生株が正常に生育できない強光条件下(320μE，30°C，24時間）で選抜し，光耐性株を18株を得た．強光条件下において，野生株では光退色に伴い光合成色素の組成が変化するのに対し，これら光耐性株では，光合成色素組成が通常光条件下に比べてほとんど変化しなかった．さらに，これらの突然変異体における光耐性機構の生化学的解析を行なった．

1pD03

psbA の *in vitro* random mutagenesisにより得られた強光耐性ラン藻株におけるD1タンパク質の構造変異の解析

佐伯真理[1]，鳴坂義弘[2,3]，小林裕和[1,2]，佐藤公行[2,3]（静岡県大・生活健康科学研究科・食品栄養科学[1]，基生研・情報制御[2]，岡山大・理[3]）

光化学系II反応中心の構造と機能の中核となるD1タンパク質は，光照射条件下で代謝回転を増大し，これにより光傷害を回避していると考えられている．現在，この現象は光化学系II反応中心の作動に伴うD1タンパク質の分解(損傷)と，新たなタンパク質の合成と挿入による機能回復(修復)の過程を示すものとして説明されているが，その実体は明らかでない．この実体に係わるD1タンパク質の構造を解明するために，ラン藻*Synechocystis* PCC 6803 を用い，*in vitro* random mutagenesisによる強光耐性変異株を既に選抜している．

多数の変異株について変異が導入された*psbA2* のDNA塩基配列を効率よく決定するために，コロニーからのダイレクトシークエンシング法を開発した．本方法により光耐性株として得られた約47株のDNA塩基配列を決定した結果，同一株と判断されるものが複数存在し，最終的に18の異なる株が選抜されてたことが明らかになった．これらの変異株において，変異がD1タンパク質の限定された部位（1ないし複数箇所）に生じていることが明らかになった．これらの変異はその変異部位から4グループに大別できた．これより光耐性を付与するために重要と思われる変異部位を推定し，site-directed mutagenesisにより野生株に変異を再導入した．これらの実験により，ラン藻の強光耐性能に関与するD1タンパク質の構造に関する知見を得ることができた．

1pD04

通過ペプチドをもったD1タンパク質の単離葉緑体への輸送とD1部分のPSIIコア複合体への組み込み

呉　国江、渡辺　昭（東京大・理・植物）

葉緑体の*psb*A遺伝子にコードされるD1タンパク質は、光化学系Ⅱの反応中心を構成するサブユニットの一つである。このタンパク質の分解および、反応中心への組み込みの機構については未知の部分が多い。演者らは、この問題へのアプローチのひとつとしてトマトのRuBisCO小サブユニットをコードする遺伝子の通過ペプチドと成熟タンパク質のN末端22アミノ酸部分に相当する配列の下流にイヌホオズキの*psb*A遺伝子をつないだキメラ遺伝子を作製し、*in vitro* で発現させたこのD1キメラタンパク質を単離葉緑体へ輸送する実験系を確立した。その結果、このタンパク質は葉緑体のストロマに輸送され、そこで通過ペプチドがプロセシングを受けることが示された。プロセシングされたタンパク質は、その後チラコイド膜に移行して、C末端がさらにプロセシングを受け、PSIIコア複合体に組み込まれることを明らかにした。この実験系を用いることによりD1タンパク質の分解系について新しい情報が得られるものと期待される。

1pD05

系IIの膜蛋白との結合に関与する表在性33kDa蛋白のリジン残基の検索

三浦太郎[1,2]、高橋正太郎[1]、加茂政晴[1]、太田尚孝[1]、井上康則[2]、榎並　勲[1]（[1]東京理大・理・生物、[2]理工・応生）

Ｍｎクラスターの安定化に寄与する表在性３３ｋＤａ蛋白は、静電的結合と水素結合により比較的ゆるく系IIの膜蛋白に結合している。昨年の秋の植物学会において報告したように、我々は、カルボキシル基の負電荷とε－アミノ基の正電荷の化学修飾の実験から、３３ｋＤａ蛋白のリジンアミノ基の正電荷が膜蛋白との結合に重要であるとの結論に達した。そこで、本研究では、膜蛋白との結合接着面に存在する３３ｋＤａ蛋白のリジン残基を同定することを目的にして、単離した３３ｋＤａ蛋白と系II膜蛋白に結合した３３ｋＤａ蛋白をトリニトロベンゼンスルホン酸(ＴＮＢＳ)により処理することにより、３３ｋＤａ蛋白の反応性のある全リジンアミノ基あるいは膜蛋白との結合に関与してないルーメン表面に存在するリジンアミノ基のみの修飾を試みた。ＴＮＢＳ修飾した２種の３３ｋＤａ蛋白をＶ－８プロテアーゼで処理した後、逆相カラムを用いたＨＰＬＣによりペプチド断片を分離した。ＴＮＢＳで修飾されたペプチド断片は３４５ｎｍに吸収をもつので、２種の修飾３３ｋＤａ蛋白のＴＮＢＳ修飾ペプチドを比較することが可能である。その結果、膜蛋白に結合した３３ｋＤａ蛋白ではＴＮＢＳ修飾ペプチド断片は２本しか現れなかったが、単離した３３ｋＤａ蛋白では２０数本のＴＮＢＳ修飾ペプチドが検出された。従って、３３ｋＤａ蛋白に存在する２３個のリジン残基のほとんどは膜蛋白との結合接着面に存在する可能性が強い。これらのリジン残基が一次構造上どのリジンであるかの同定を現在進めている。

1pD06

表在性の33kDa蛋白とCP43蛋白との相互作用：33kDa蛋白によりトリプシン消化からシールドされているCP43蛋白部位の同定

藤利彰彦、加茂政晴、太田尚孝、榎並　勲　（東京理大・理・生物）

表在性の33kDa蛋白を除去した酸素発生標品をトリプシン処理すると、CP43の方がCP47より分解され易くなる事実から、Isogaiらは33kDa蛋白はCP43と結合しており、33kDa蛋白はCP43のトリプシン分解部位をシールドしていると考えた。本研究では、この33kDa蛋白によりシールドされているCP43のトリプシン分解部位を決定することを試みた。$CaCl_2$処理により33kDa蛋白を除去した酸素発生標品をpH6、25℃、150μg/mlのトリプシンで5分間処理すると、CP43が部分的ではあるが特異的に消化され、約35kDaのみかけの分子量のところに分解産物バンドが出現してきた。一方、33kDa蛋白を結合した酸素発生標品を上記条件でトリプシン処理した場合には、LHC IIアポ蛋白を除いてCP43はもちろんどのペプチドバンドもほとんど消化されなかった。分解産物の35kDaバンドはCP43の抗体とよく反応することから、CP43の分解産物であることが分った。この35kDaバンドをゲルから切り出しギ酸で抽出した後、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、この分解産物のN末端配列はCP43のN末端配列と完全に一致した。現在、35kDaフラグメントのC末端配列を決定中であるが、これまでの結果から、Brickerにより提出されたCP43のモデルで示されたルーメン側に露出された大きな親水的領域であるループEが、33kDa蛋白によりトリプシン消化からシールドされているCP43蛋白部位であると結論できる。

1pD07

光合成光化学系Ⅱ複合体のLおよび5.0kDa蛋白質の単離精製

手島圭三、藤井小枝子、赤堀興造（広島大、総合科学）

光化学系Ⅱ複合体（ＰＳⅡ）は約20種のサブユニットから成り、進化上近縁関係にある紅色光合成細菌などの細菌型には存在しない約10種の低分子量サブユニットが反応中心複合体を取り巻いている。これらの低分子量サブユニット群はＰＳⅡのQ_A活性発現に重要であるばかりでなく、ＰＳⅡの電子伝達を円滑にする働きをしていることが示唆されている。しかし、各サブユニットを単離することが難しいために、低分子量サブユニット群の個々の役割は全くわかっていない。そこで、Aragaらの方法によってＰＳⅡから調製した低分子量サブユニット（H、L、5.0kDa、4.1kDaおよびK）含有試料を用いて、4M尿素と界面活性剤存在下でのDEAE-Sephacelイオン交換クロマトグラフィーと、TSKgel-Octadecyl 4PWを用いた水ーアセトニトリル溶媒系の逆相クロマトグラフィー（試料は界面活性剤除去後6M尿素に溶かした）を行い、変性状態ではあるが低分子量サブユニットの分離精製を試みた。

その結果、電気泳動法でも単離するのが非常に困難である分子量約五千の二つのサブユニットを単離することができた。一つは、N末端から15残基の一次構造を調べた（気相シークエンサー、島津PPSQ-10型を用いた）ところ、TQSNPNEQNV ELNRTであり、葉緑体DNAにコードされているL蛋白質の場合と完全に一致した。もう一つは核コードの5.0kDa蛋白質と考えられるが、現在、一次構造を決定中である。

1pD08

光合成光化学系Ⅱにおける H蛋白質の働き

木村幸司、手島圭三、赤堀興造、豊島喜則*
（広島大・総合科学、*京大院・人間・環境学）

光化学系Ⅱ（ＰＳⅡ）から集光性クロロフィル結合蛋白質と膜表在性蛋白質を除いたＰＳⅡコア複合体（ＲＣ複合体）はＰＳⅡと同様のQ_A活性を示す。このＲＣ複合体をさらに可溶化剤を用いて反応中心複合体（ＱＣ複合体）と低分子量蛋白質群（ＱＲ画分）とに解体、再構成の結果、ＱＣ複合体のみでは活性が消滅することから、Q_A活性には低分子量蛋白質の内、H、L、n-4.1kDaのいずれかの蛋白質が必須であることを以前我々は報告した。[1] また強光下において、ＰＳⅡ蛋白質のうちのいくつかがリン酸化されることによりその機能が調節されるが、この際ＱＲ画分に含まれる低分子量蛋白質であるH蛋白質もリン酸化される。そこで低分子量蛋白質の内、H蛋白質に着目し、ＰＳⅡ電子伝達活性における、その機能を明らかにすることを試みた。

ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより単離したH蛋白質を用いウサギポリクローナル抗体を得た。精製した抗H蛋白質抗体をSepharose CL-4Bと反応させ、アフィニティーカラムを作製した。このアフィニテフィーカラムによってＱＲ画分からH蛋白質を除去した低分子量蛋白質群（nonHＱＲ）を調製した。また対照としてＱＲ画分を非抗体結合カラムに通し同様に処理したＱＲ画分（reＱＲ）も調製した。それぞれＱＣ複合体と再構成しQ_A活性を比較したところ、後者ではＲＣ複合体の約５０％回復したのに対し、前者では殆ど表れなかった。この結果はＰＳⅡのQ_A活性にはＬ蛋白質の他にH蛋白質も関与していることを示唆している。

[1] C.Araga et al. (1993) B.B.A. 1142, 36-42

1pD09

活性酸素による光化学系II Ｄ１蛋白質の分解
---- 切断部位の検討

岡田克彦、山本直樹、徳富（宮尾）光恵（農水省、生物研）

光化学系II（PSII）反応中心のＤ１蛋白質は光照射下で特異的に分解を受け、約23 kDaのN末端断片と約９kDaのC末端断片に切断される。また、PSIIを過酸化水素、一重項酸素などの活性酸素で処理すると、Ｄ１蛋白質が分解を受け光照射下と同様の断片を生成することが知られている。本研究では、Ｄ１蛋白質のC末端断片を比較することにより、強光照射と活性酸素処理によるＤ１蛋白質の切断部位を検討した。

PSII膜標品に強光を照射すると、7.9、9.3 kDaの2種類のC末端断片が生成した、9.3 kDaの断片は強光照射開始直後にのみ検出されたが、7.9 kDaの断片は照射に伴って蓄積した。PSII膜標品を暗所で過酸化水素で処理すると、7.9、9.3 kDaの2種類のC末端断片がほぼ当量ずつ生成した。これらの断片のポリアクリルアミドゲル上の移動度は強光照射で生成した断片と全く同じであった。一方、単離したPSII複合体をローズベンガルの光増感反応で生成させた一重項酸素にさらすと7.9 kDaのC末端断片のみが生成することがわかった。

以上の結果は、Ｄ１蛋白質は強光照射下で約10 アミノ酸残基離れたふたつの部位で切断されること、およびこれらの切断部位は活性酸素による切断部位と同一であることを示している。過酸化水素、一重項酸素ともに光照射下でPSII内部で生成することが知られている。強光照射下ではこれらの活性酸素の作用でＤ１蛋白質の分解が進行すると考えられる。

1pD10

光化学系IIでのスーパーオキシドと過酸化水素の光生成

真野純一，G. C. Dismukes[1]，浅田浩二　（京都大・食糧科学研，[1]プリンストン大・化学）

光化学系II(PSII)H_2O-オキシダーゼが$2H_2O$をO_2に４電子酸化する過程で形成されるペルオキソ中間体はCl⁻除去などでH_2O光酸化を阻害したときにH_2O_2を遊離する可能性がある。光照射にともないPSII酸化側からH_2O_2が生成するかどうかをホモバニリン酸／ペルオキシダーゼにより蛍光法で測定した。

ホウレンソウPS II膜 (BBY-type) では、好気条件下で人工的な電子受容体のないとき，光照射にともない約 2〜4 μmol/mgChl/hの速度でH_2O_2が生成した。これはシトクロム*c*添加により抑制され，DCMU非感受性であった。同じ条件でDMPO-スピントラップESRにより酸素に依存し，DCMUで阻害されないDMPO-OOHの光生成が観察された。すなわち，PSIIでのH_2O_2光生成は還元側のDCMU阻害部位より上流（Q_AおよびPheo）でのO_2のO_2^-への光還元に由来する。DMBQ添加により電子伝達を加速するとH_2O_2の光生成は約3倍に増加した。このH_2O_2光生成は酸素濃度に依存し，H_2O-オキシダーゼ活性に依存しないことからPSII還元側で生じたDMBQのセミキノンラジカルの自動酸化によるものであった。以上のようにPSII酸化側でのH_2O_2光生成は検出限界内で有意に認められなかった。

1pD11

強光照射に伴う光化学系IIの機能的、構造的変化

小野高明[1]、野口巧[1]、中島芳浩[1、2]（[1]理研・太陽光科学 [1、2]植物機能）

光合成光化学系IIは強光照射により極めて容易に失活すると伴に、反応中心を構成するＤ１蛋白質が特異的に損傷をを受けることが知られている（光阻害）。本研究では、光化学系II膜断片を強光で照射したとき、光化学系IIに起こる機能的、構造的変化を様々な手法により解析し、好気的な条件下における光阻害の特徴を明らかとすることを目的とした。酸素発生能でみた光化学系II活性は強光照射により速やかに阻害された。ＦＴＩＲでみたQ_Aのセミキノンアニオン生成の、光阻害のタイムコースは酸素発生能の失活と良く一致しており、Q_Aの機能壊失が酸素発生能阻害の直接の原因であることが示された。一方、熱発光全体の強度は酸素発生の阻害とよい対応を示したが、Q_B^-由来のバンドの強度はより短時間で失われ、Q_BキノンがQ_Aキノンに先だって光阻害を受けることが示された。蛍光レベルは短時間の光照射により著しく低くなったが、酸素発生活性の阻害や、Q_A，Q_Bの機能壊失とは直接的な関連は見いだせなかった。強光照射によりＤ１蛋白質は選択的に損傷を受け、２３、１６ｋＤａ断片を生じた。さらに照射時間を長くするとＤ２蛋白質も損傷を受けると同時に、４３、４７ｋＤａ蛋白質、*cytb*５５９アポ蛋白質、ＬＨＣＩＩなどの蛋白質バンドがＳＤＳ－ＰＡＧＥ上から失われた。しかし、ＦＴＩＲでみた光化学系II全体の蛋白質の構造にはほとんど変化が見られなかった。

1pD12

光化学系II電子伝達系阻害剤PNO8のQ_B部位への結合によるD1タンパク質の特異的分解

中島芳浩[1,2]、吉田茂男[2]、井上頼直[1]、米山弘一[3]、小野高明[1]、（理研・[1]太陽光科学・[2]植物機能、[3]宇都宮大・雑草科学）

光化学系II反応中心タンパク質（D1タンパク質）は、光依存的に高速で代謝回転しており、光照射により選択的に損傷を受け、Q_Bキノン結合部位で特異的に切断・分解されることが知られいる。一方、ある種の系II阻害剤はQ_B部位に結合し、D1タンパク質の分解を抑制することが知られている。我々は種々の系II阻害剤のD1タンパク質の分解に及ぼす影響について検討していたところ、フロログルシノール骨格を持ち、フェノール型系II阻害剤に分類されるPNO8 (*N*-octyl-3-nitro-2,4,6-trihydroxybenzamide)存在下では、完全暗所でD1タンパク質が分解する現象を見い出した。この分解はD1特異的であり,その結果23および9 kDaの2つの断片を生じた。興味深いことにPNO8処理で生じた23 kDa断片は、光依存的なD1タンパク質の分解により生じる断片と同じ分子量を示した。PNO8によるD1タンパク質分解は、酸素の有無には影響されなかったが、低温下や他の系II阻害剤(DCMU)が存在すると著しく抑制された。さらに興味深いことに、セリンタイプのプロテアーゼの特異的な阻害剤であるPMSFによっても抑制された。以上の結果は、PNO8の結合により引き起こされるQ_B部位周辺の構造的な変化が引き金となり、D1タンパク質の特異的かつ自己的な分解が誘導されることを示唆している。

1pD13

光合成光化学系Ⅱ光阻害における機能分子離脱過程

黒岩繁樹、勝原弘樹、手島圭三、赤堀興造（広島大・総合科学）

光化学系Ⅱ（ＰＳⅡ）反応中心では、強光照射の結果として酸化側と還元側で生じる２種類の阻害が知られている。還元側の阻害は酸素存在下で起こり、酸化側の阻害は無酸素条件下でも起こると言われている。我々は、これらの阻害過程について、Q_A光還元活性の減少と機能分子の損傷との関係に注目した。また、ＰＳⅡの非ヘム鉄（Fe^{2+}）を除去した試料を調製し、非ヘム鉄のこれらの機構に及ぼす影響についても考察した。

測定試料の光化学反応中心濃度を高めるため、ＰＳⅡの集光性蛋白質を大部分除去し、さらに、Tris処理を行い、水分解系を失活させ光阻害環境を形成させた試料(TrisRC)とTrisRCよりFe^{2+}を除去した試料（-Fe^{2+}-TrisRC）を調製した。これらの試料について、２０℃で強い赤色光（≧600nm）を照射し、酸素、非ヘム鉄、人工電子供与体（Mn^{2+}）の有無の影響を調べた。測定系には、セリンタイププロテアーゼ阻害剤ＰＭＳＦを１００μM添加した。Q_A活性の時間変化はレーザーフラッシュフォトリシス法により、ΔA_{325}の吸光度変化として観測した。光照射後の試料を陰イオン交換カラムに通し、系より離脱した機能分子を取り除いた後、ＨＰＬＣにより試料中の各機能分子の定量を行った。

酸素存在下、Mn^{2+}非存在下で、PQ_A離脱を伴わないQ_A活性の低下の存在を観測し、そのときβ-カロチンの著しい減少を伴うことを見いだした。また酸素の有無に関わらず、正常な酸化側のモデル系ではβ-カロチンの減少が強く抑えられた。これらの事実に基づき阻害機構について考察する。

1pD14

大腸菌で発現させたLタンパク質によるD1／D2／CP47／Cytb-559／I／(H)光化学系II反応中心複合体のQA機能の再構成

小林 徹、小澤真一郎、椎名 隆、豊島 喜則（京大、人間・環境学研究科）

PSII複合体中の低分子量タンパク質の一つであり、遺伝子psbLによってコードされているLタンパク質は、PSIIにおけるQAの機能発現に不可欠な成分であることは既に報告した。このLタンパク質の作用機構を明らかにするには、過剰発現系を用いて、特定部位のアミノ酸残基を変異する方法は有効である。この目的を達成するために、まずLタンパク質の大量発現系の開発を行った。Lタンパク質単独での発現は困難だったので、目的タンパク質をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させ、それをアフィニティークロマトグラフィーで精製した。ホウレンソウから精製したLタンパク質がトリプシンによって分解しなかったという性質を利用して、N末側のマルトース結合タンパク質をトリプシンで分解した後、イオン交換クロマトグラフィーによってLタンパク質を精製した。この発現Lタンパク質を用いて、in vitroでの再構成実験を行った結果、ホウレンソウから精製したLタンパク質と同様のQA機能回復を示すことを確認した。

このLタンパク質の部位変異体を用いたQA再構成実験の結果と併せて報告する。

1pD15

再構成法によるPSⅡコア複合体QA部位のキノン置換

小澤真一郎、椎名 隆、豊島喜則 (京大、人間・環境学研究科)

PSⅡ複合体には、機能が未同定の低分子量タンパク質が数多く結合している。これら低分子量タンパク質のなかでpsbLにコードされたLタンパク質は、PSⅡ還元側QAの機能発現の必須成分であることを再構成法により明らかにし、すでに報告した。本研究では、QA機能発現の必須成分であるLタンパク質を用いてQA部位のプラストキノン-9(PQ-9)を、数種の外来キノンで置換した系でのQAを介する電子移動活性(QA活性)について調べた。

PQ-9を除去したPSⅡコア複合体(PSⅡ)に、Lタンパク質とdigalactosyldiglyceride(DGDG)を同時に再構成し、QAを数種の外来キノンで置換した。そのQA活性をDPCからDCPIPへの光電子伝達活性と光誘導FT-IR差スペクトルの測定により定量的に調べた。ユビキノン-2(UQ-2)とUQ-10で置換したPSⅡの場合、DPCからDCPIPへの光電子伝達活性は、PQ-9の場合と比較して約70%であった。しかし、UQ-0で置換したPSⅡでは、QA活性は認められなかった。これらの結果は、UQがQA部位で機能するためには、少なくともイソプレノイド単位2個あれば十分であることを示している。メナキノン-4(MK-4)で置換した場合、QA活性が認められず、これまでに報告のある光合成細菌反応中心(RC)QA部位へのMK-4の再構成の結果と異なっている。この結果はPSⅡのQA部位の環境が、RCと比べて異なっていることを示唆している。これら種々のキノン置換PSⅡの電子移動について、光電子伝達活性と光誘導FT-IR差スペクトルの測定結果を基に考察する。

1pD16

強光下におけるPSⅡの還元側電子移動阻害とキノン交換による再活性化

星田尚司、椎名 隆、豊島喜則（京大、人間･環境学研究科）

PSⅡは強光により不可逆的な電子移動阻害を受ける。光化学反応中心の酸化側が保護されている場合、QA部位からのﾌﾟﾗｽﾄｷﾉﾝ-9(PQ-9)の遊離が最初の不可逆過程であるとされているが、その直接的証拠はない。これを光阻害を受けた複合体にQAを再構成する手段を用いて調べた。

反応中心当たり1.7分子のPQ-9を持つPSⅡコア複合体を嫌気条件で10分間強光照射すると電子移動活性は30%に減少した。この複合体（PSⅡ*）を可溶化剤処理により反応中心と可溶化成分に分け、反応中心に既報の方法によりPQ-9を再構成すると活性が50%にまで回復した。光阻害に対する保護効果があるとされるDCMU存在下、嫌気条件で10分間複合体に強光を照射すると電子移動活性は40%に減少した。この複合体に対して同じ方法でPQ-9を再構成すると活性が67%にまで回復した。光損傷を受けていないPSⅡの場合でもQAの再構成処理により、その活性が70%程度になる事を考慮すれば、DCMU存在下での強光照射による電子伝達能の不活性化は、QAの再構成によって完全に回復する事がわかった。これらの結果から、強光下におけるPSⅡの還元側電子移動阻害にはQA部位からのPQ-9の遊離の他に、別の何らかの不可逆過程が含まれている事が示唆された。また、強光照射していないPSⅡとPSⅡ*のQA$^-$／QAに起因する光誘導FT-IR差スペクトルを比較するといくつかのシグナルに違いが見られた。これらの結果をもとに強光照射時に生じるPSⅡの不可逆な変化について考察する。

1pD17

Cl基置換ベンゾキノン誘導体の光化学系Ⅱとの反応

山下真里、菓子野康浩、小池裕幸、佐藤和彦（姫路工大･理･生命科学）

光化学系Ⅱ（系Ⅱ）反応中心とその電子受容体であるプラストキノンとの具体的な反応様式は、まだ解明されていない。そこで、我々はその解明をめざして、まず、プラストキノンのアナログとなるベンゾキノンの種々の誘導体と系Ⅱとの反応を反応速度論的に解析した。ラン色細菌*Synechococcus vulcanus*から得られた結果については、昨年の本大会において報告した。植物型光合成を行う生物の系Ⅱ反応中心は相同性が高いとされているが、先の*S. vulcanus* で見られた反応機構が普遍的なものなのかどうかということを調べるためにホウレンソウを使って解析したので、報告する。

脂質膜およびプールプラストキノンを多く保持した系Ⅱ膜標品（BBY）と、それからヘプチルチオグルコシドを用いて調製した系Ⅱコア標品を材料とした。酸素発生活性のCl基置換ベンゾキノン誘導体濃度依存性を測定したところ、Chloranil以外のキノンでは、キノンが高濃度になると活性の低下が見られた。これは*S. vulcanus* でも見られたもので、同じ反応機構が予想された。また、これを反応速度論的に解析することにより、そして、フラッシュによるQ_Aの吸光度変化、Q_A^-酸化に対応した蛍光の変化のキノン濃度依存性、それらに対するDCMUの効果を測定することで各キノンのQ_B部位との親和性や反応速度を決定することができた。これらは、*S. vulcanus* で得られた結果とよく対応し、ラン色細菌から高等植物まで基本的に同じ反応機構であることが推定された。

1pD18

アルキル化ベンゾキノン誘導体の光化学系IIとの反応

山下真里、佐藤和彦、*米山弘一、菓子野康浩、小池裕幸
（姫路工大・理・生命科学、*宇都宮大・雑草科学研究センター）

プラストキノン-9（PQ_9）は光化学系IIとシトクロムb6/f複合体との間の電子伝達を仲介している本来の電子伝達体である。Q_B部位の構造とそこでのプラストキノンの挙動を明らかにすることを目的として我々は種々のメチルキノン誘導体について好熱性ラン色細菌、*Synehcococcus vulcanus*の光化学系II複合体を用いてQ_B部位に対する親和性を求め、昨年の本大会で発表した。本研究では好熱性ラン色細菌で得られた結果が普遍的なものなのかどうか調べるため、ホウレンソウから調製した標品を用いて測定した結果について報告する。また従来用いていたメチル置換ベンゾキノンのみでなく、より本来の電子伝達体に近い、プラストキノン誘導体（PQ_1～PQ_3）を用いて同様の測定を行い、PQ_9がQ_B部位でどのようにして電子を受け渡しているのかを推定した。

ホウレンソウから調製した、プール量の多いBBYと、そこからHTGを用いて調製した系IIコア複合体の二種の標品を用いた。メチル置換ベンゾキノンのQB部位への親和性は、*S. vulcanus*で求めたそれとあまり違っていなかった。従ってラン色細菌から高等植物に至るまで基本的に同じ親和性でQ_B部位と反応しているということができる。一方プラストキノン誘導体はメチル置換ベンゾキノン類に比べると親和性は高くなるが、イソプレノイド鎖が伸びるほど親和性が増大するがQ_B部位での反応速度が落ちていくことが分かった。得られた結果から推定されるプラストキノンのQ_B部位での反応機構について述べる。

1pE01

エンド-1,4-β-グルカナーゼによる植物細胞壁の分解

林　隆久、松本健彦、馬場啓一、中村信吾[1]、三石　安[2]
（京都大・木質研、[1]農水省・生物研、[2]工技院・生命研）

植物細胞壁の骨格は、キシログルカンとセルロースミクロフィブリルからなるβ-グルカン複合体によって構築されている。両糖鎖はそれぞれゴルジおよび原形質膜で合成された後、アポプラストで結合して、様々な相互作用を営む。両糖鎖が架橋構造を持つ、直接的な証拠は未だ得られていないが、植物の胚軸切片にオーキシンを与えると速やかな細胞伸長が生じ、その際、キシログルカンのターンオーバー（可溶化または低分子化）が起こることが認められている。キシログルカンの分解がセルロースミクロフィブリルのゆるみを生じて伸長を誘導するのだろうか？　逆に、ミクロフィブリルがゆるめば、結果としてキシログルカンに変化が生じるのだろうか？

セルロースまたはキシログルカンを分解する、微生物および植物由来のエンド-1,4-β-グルカナーゼ（俗称セルラーゼとキシログルカナーゼ）を用いてポプラ及びエンドウ由来の細胞壁標品またはそのβ-グルカン複合体の分解を試みた。細胞壁に結合しているキシログルカンはキシログルカナーゼ処理により減少して分子量の低下を示した。一方、セルラーゼ処理は、細胞壁キシログルカンを含む糖鎖の可溶化に効果的であった。

1pE02

ポプラ培養細胞におけるエンド-1,4-β-グルカナーゼの発現

竹田　匠、酒井富久美、林　隆久
（京都大・木質研）

成長している植物細胞の細胞壁・一次壁の基本構造はセルロースミクロフィブリルとキシログルカンが水素結合により結合して、β-グルカン複合体を形成し、細胞の形状や堅さを保っていると考えられている。一方、植物体にオーキシンを作用させると細胞の伸長成長が起こるが、その際キシログルカンのターンオーバー（可溶化または低分子化）が起こるとともに細胞壁にゆるみが生じることが認められている。

エンド-1,4-β-グルカナーゼは非結晶性β-1,4-グルカンを加水分解する酵素であり、キシログルカンでは側鎖（キシロース残基）を持たない部位のβ-1,4-グルコシル結合を認識して分解する。そこで我々は2,4-D,NAA,IAAの3種類のオーキシン処理したポプラ培養細胞(*Populus alba*)を実験材料とし、エンド-1,4-β-グルカナーゼの酵素活性を粘度低下により測定した。また、エンド-1,4-β-グルカナーゼのmRNAの発現をノーザンブロッティングにより調べ、エンド-1,4-β-グルカナーゼの活性と発現との関係を明らかにした。

1pE03

イネ幼葉鞘細胞壁の(1→3),(1→4)-β-D-グルカン分解酵素

陳　磊，神阪盛一郎，保尊隆享（大阪市大・理・生物）

(1→3),(1→4)-β-D-グルカンはイネ科植物に特徴的な細胞壁多糖であり、その分解はオーキシンによる細胞壁のゆるみの原因となると考えられている。気中並びに水中で培養したイネ幼葉鞘細胞壁に含まれるこのグルカンの量を、*Bacillus subtilis* のβ-グルカナーゼとＧＬＣを用いて定量した。グルカン量は幼葉鞘の成長に伴って増加した後、成長の停止とともに減少した。したがって、このグルカンの代謝回転は、インタクトなイネ幼葉鞘の成長調節にも関与しているものと考えられる。

(1→3),(1→4)-β-D-グルカン分解活性は、イネ幼葉鞘細胞壁より1 M NaCl を用いて抽出された。この抽出画分を Con A-Sepharose カラムにかけたところ、水中培養幼葉鞘由来の活性の大部分は結合するが、気中培養幼葉鞘細胞壁から抽出した活性の一部は同カラムを素通りすることがわかった。Con A-Sepharose カラムに結合した両幼葉鞘由来のグルカン分解活性は、MONO-S カラム上でさらに2つの主要な活性画分に分離された。これらの画分によるグルカン分解パターンをＨＰＬＣで分析した結果と合わせて、イネ幼葉鞘細胞壁における(1→3),(1→4)-β-D-グルカン分解には作用様式の異なる複数種のグルカナーゼが関与することが明らかになった。

1pE04

アズキ上胚軸細胞壁の新規キシログルカン分解酵素

田渕彰、神阪盛一郎、保尊隆享（大阪市大・理・生物）

キシログルカンの分解（低分子化）は双子葉植物の茎のオーキシン誘導伸長の原因となる細胞壁のゆるみに必要であることが報告されている。キシログルカン分解酵素を、アズキ上胚軸細胞壁標品より1MのNaClで抽出されるタンパク質画分からFPLCを用いて精製した。活性はMono-Sカラム上で3つに分かれ（S1,S2,S3)、さらにS1,S2画分はSuperose-12カラム上でそれぞれ2つの画分に分かれた。これらの画分をSDS-PAGEにかけたところ、キシログルカン分解活性と同様のプロフィールを示す約32 kDaの主要なバンドが見られた。この酵素は約320 kDaのキシログルカンを約200 kDaに分解したが、低分子量のキシログルカン、カルボキシメチルセルロースおよびヒドロキシエチルセルロースを基質に用いたとき活性はほとんど見られなかった。また、64 kDaのキシログルカンを基質に用いて、半値幅の増加を指標として、エンド型キシログルカン転移酵素活性を測定したが、活性は検出できなかった。以上より、本酵素は新規キシログルカン分解酵素であると考えられる。

1pE05

トウモロコシ芽生えの幼葉鞘の発育に伴う細胞壁グルカナーゼ活性とグルカン自己分解活性の変化

井上雅裕，[1]ネビンス・ドナルド（愛媛大・理・生物，[1]カリフォルニア大学デイビス校ベジタブルクロプス）

単子葉植物の細胞壁に存在するグルカナーゼ活性がオーキシンによる幼葉鞘切片の細胞成長に重要な機能を持つことが示唆されている。本研究はトウモロコシ芽生えの幼葉鞘の発育における細胞壁グルカナーゼ活性と細胞壁グルカン自己分解の役割に着目し、それらの活性変動を時間を追って調べた。細胞壁グルカナーゼ活性は発芽直後の幼葉鞘では低い値しか検出されなかったが、発育が進むに連れて著しく上昇した。また細胞壁のグルカン自己分解活性も増加した。細胞壁自己分解の主要な産物はグルコースであるが、発育初期にはペントースに富む分解産物も検出された。抗グルカナーゼ抗体がグルカン自己分解と細胞成長の両方を阻害することは、幼葉鞘の成長にグルカナーゼが重要であることを示唆する。しかし、発育初期では、その抗体の効果が顕著でないことから成長を制御する別の要因についても調べる必要がある。

1pE06

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）の成長に伴う細胞の可溶性、不溶性分画のグルカナーゼ活性の変化

玉井喜与人，井上雅裕，遠山鴻，城尾昌範，村山徹郎，ネビンス・ドナルド[1]（愛媛大・理・生物，[1]カリフォルニア大学デイビス校ベジタブルクロプス）

細胞の可溶性分画、および不溶性分画におけるグルカナーゼ活性の変化を酵母（*S. cerevisiae*, IS318-4C株）を用いて調べた。酵母細胞は通常24~48時間の液体培養で定常期に入るが、接種する菌体量を増やすとその時間を9~12時間に短縮できる。この条件下で一定時間培養した細胞から可溶性分画を抽出し、ラミナリン、酵母細胞壁標品を基質にグルカナーゼ活性を測定した。また、不溶性分画を細胞壁分画として、その自己分解活性を目安に細胞壁グルカナーゼ活性を測定した。活性測定は分解産物中の還元糖量と全糖量の比色定量によって行なった。その結果、細胞壁分画のグルカナーゼは細胞の指数増殖期に最も高い活性を示した。一方、可溶性分画のグルカナーゼは活性が一旦低下し、再び定常期に向けて上昇した。これらの結果からそれらのグルカナーゼ活性が酵母細胞の成長や代謝において異なった機能を有しているのではないかと思われる。

1pE07

植物ホルモン及びショ糖によるエンド型キシログルカン転移酵素(EXT)遺伝子の発現制御

冨田英津子[1]、岡本繁久、西谷和彦（[1]鹿児島大・連合大学院、鹿児島大・教養）

植物の細胞生長は細胞壁の合成や再編成過程を通じて制御されている。キシログルカンは細胞壁中のセルロース微繊維間を架橋する多糖で、この分子の切断や再結合が細胞壁の構築に必要であると考えられているが、その分子機構の詳細は不明のままである。私達が数年前に単離したエンド型キシログルカン転移酵素(EXT)はキシログルカン架橋の繋ぎ換えを触媒する酵素である。EXT-mRNA及びタンパク質は伸長中の茎で強く発現していることから、酵素EXTはキシログルカンを繋ぎ換えることにより細胞壁の構造を変化させ、最終的に茎の伸長生長の制御に関与していると考えられる。

EXT遺伝子の発現制御機構を解明することを目指し、私達はアズキ茎切片を用いてEXT-mRNA量に影響を与える諸因子の探索を行なった。植物の生長制御は一般に植物ホルモンの支配を受けていることから、EXT発現に対する植物ホルモンの作用について解析した結果、オーキシン及びジベレリンがEXT-mRNA量を増加させることが明らかとなった。この結果はオーキシンやジベレリンによる茎の生長制御にEXTが関与していることを示唆している。また細胞壁合成の材料となるショ糖もEXT-mRNA量を増加させることが明らかとなった。ショ糖は茎切片を伸長させないが細胞壁多糖の合成を促進することから、EXTは細胞伸長を伴わない細胞壁合成過程にも関与していることが示唆された。

1pE08

植物細胞壁分解酵素２種（アラビノフラノシダーゼ、エキソポリガラクツロナーゼ）の遺伝子および生化学的解析

田中玲爾、池田稔、加藤研治、[1]今野晴義（塩野義・油日ラボ、[1]岡山大・資生研）

われわれはペクチン分解酵素であるエキソポリガラクツロナーゼ、アラビノフラノシダーゼの２種のcDNAのクローニングを行なった。（1994日本分子生物学会年会）今回以下の報告をおこなう。

アラビノフラノシダーゼcDNAのクローニングのさいに開始コドン上流の5'領域の長さの違う２種のcDNAが得られている。このcDNAを元にしたプライマーを使ってニンジンの子葉由来のゲノムDNAに対するPCRをおこないそのＮ末端付近の構造を解析した。その結果予想される蛋白質のＮ末端の上流域にイントロンが存在した。短いcDNAの5'端ははイントロンの終わりの部分とほぼ重なっていた。

エキソポリガラクツロナーゼのcDNAにはＮ末端から始まる405アミノ酸をコードするORFが見つかっている。このcDNAの上流部分約1KbをPCR法を用いてニンジンゲノムDNAよりクローニングした結果、cDNAの5'端の上流には開始コドンが見つからず、クローニングされたcDNA中の開始コドンを使って391アミノ酸(MW. 42,614)の蛋白質が作られていることが確認された。また精製したポリガラクツロン酸を基質としてイオンクロマトグラフィーにより分解物を調べた結果、真菌由来のポリガラクツロナーゼとは異なり、この酵素では部分分解の条件でも単量体のみが観察され、エンド活性がないことが確認された。

1pE09

ニンジンにおけるペクチン分解酵素の遺伝子発現とその局在性

池田　稔, 田中玲爾, 三木信夫, 加藤研治, 今野晴義[1]（塩野義製薬・油日ラボ, [1]岡山大・資生研）

植物が有する細胞壁の主要な構成生分であるペクチンは、細胞の一次壁において主にガラクツロン酸から成る酸性多糖である。そのペクチン質が分解されることにより、細胞伸長、成熟、離層形成などの生長反応が誘導されることが明らかにされつつあるが、酵素の遺伝子発現やその作用性に関しては、未解明の内容が多い。そこで本実験では、このペクチン分解酵素（特にエクソポリガラクツロナーゼ、およびアラビノフラノシターゼ）に関して、遺伝子発現や組織細胞が産生保持する酵素の分布・局在を把握し、その作用性を明らかにするために、ニンジンの幼組織を材料として供試し、①mRNAの *in situ* hybridization、②特異抗体による酵素抗体法を実施した。結果、同酵素のmRNAは根や胚軸部分の形成層、内皮、師部組織層などでその存在が顕著であり、同酵素は主に根圏の形成層付近、表皮細胞などの細胞壁部分で観察された。従って同酵素は、高い分裂活性を有する維管束・形成層近傍の細胞群で発現し、産生された酵素がそれらの部位からその周域にかけての組織に局在して機能しているものと考えられた。

1pE10

傾斜刺激下における樹幹木部の形成

－あて材形成に関与する遺伝子の単離－

馬場啓一、日尾野 隆[1]、小名俊博[1]、林 隆久、伊藤一弥[1]（京大・木研、[1]新王子製紙・林木育種研）

樹幹は傾斜されると本来の位置に戻ろうとしてあて材という特殊な木部(材)を分化させる。広葉樹(双子葉類)では一般に傾斜上側に引張あて材が形成される。その部分では、リグニンを含まない二次壁の層が厚く堆積し、セルロースミクロフィブリルが細胞長軸とほぼ平行に配列するようになる。またヘミセルロースの種類も変化する。あて材の形成にはオーキシンなどの植物ホルモンの関与が示唆されているが、その形成機構については知られていない。われわれは抽出液にvabnadyl ribonucleoside comp-lex を加えることにより、収率よくユーカリ樹幹の木部分化帯からRNAを抽出できるようになった。こうして通常に生育中のものと傾斜させて生育させたものの樹幹木部分化帯から抽出したpoly(A)+ RNAを鋳型にそれぞれのcDNAライブラリを構築した。また、傾斜させたものから得られたpoly(A)+RNAのcDNA対して通常に生育中のものの poly(A)+ RNAによるサブトラクションを行なった。サブトラクションは２回行ない、最終的に合成されたcDNAの3.8%のサブトラクテドcDNAが得られた。このサブトラクテドcDNAをプローブに用いて、先のcDNAライブラリからあて材形成に関与する遺伝子の単離を行なっている。

1pE11

セルロース合成阻害剤処理によって誘導されるタンパク質の機能

中川直樹, 桜井直樹（広島大, 総科, 自然）

現在高等植物のセルロース合成に関与する蛋白質の実体と機能に関する知見は皆無に等しい。植物は生命の維持に必要な様々な物質を合成しているが、多くの場合それらの合成量の制御には最終生成物によるフィードバック阻害機構が働いている。セルロースの合成は植物の生育段階、環境条件によって厳密に調節されているためセルロース合成においても同様な負の制御系が存在する可能性は高い。ゆえに、セルロース合成を特異的に阻害する薬剤の処理により負の制御が解除され、セルロース合成に関与する蛋白質や、それらをコードするmRNAの蓄積量が増大することが期待される。

そこで高等植物のセルロース合成を特異的に阻害することが報告されている除草剤ジクロベニルでトウモロコシ暗所芽生えの根を処理し、蛋白質を抽出した。ポリアクリルアミド電気泳動に供しバンドパターンを比較したところ、１μMという低濃度のジクロベニル処理により誘導される蛋白質が二つ見いだされ、それぞれの蛋白質についてＮ末端アミノ酸配列を決定した。一つはエチレン誘導されるアズキ酸性キチナーゼに相同であり、もう一方はコラーゲン様の繰り返し配列があった。現在ジクロベニル処理、無処理の根でデファレンシャルスクリーニングを行っている。

1pE12

種々の植物のアポプラストペルオキシダーゼの基質特異性とＥＳＲにより求めたリグニン組成との関連

高浜有明夫、鬼木隆幸（九州歯科大）

植物アポプラストに存在するペルオキシダーゼ(POX)は細胞壁のリグニン化に関与しおり、この POX の基質特異性はリグニン組成に影響を与えると考えられる。しかし、その基質特異性とリグニン組成との関連は詳しくは調べられていない。ここでは茎あるいは小梢アポプラスト POX 活性の基質特異性を 4-クマル酸（4-CA)、フェルラ酸(FA) それにシナピン酸(SA) を用いて測定した結果と、0.1M 硫酸を含む90%ジオキサンを用いて80-90℃で抽出したリグニンの組成をESR を用いて測定した結果を報告する。

１３種の植物のアポプラストPOX による上の三つの桂皮酸の酸化速度は、一つの例外（アズキ）を除いて FA＞4-CA＞SA の順であった。一般的に SAの酸化速度は FA の 10%以下であったが、タバコとセイタカアワダチソウではその値は 30-40%に達した。アズキでは4-CA の酸化速度が FA の酸化速度より大きかった。

リグニン溶液（pH 13）を$K_3[Fe(CN)_6]$で嫌気的条件で処理後空気で酸化すると、グアヤシル基(G)の ESR シグナルが検出され、過酸化水素で処理するとシリンジル基(S)の ESR シグナルが検出された。これらのラジカルはその微細構造からリグニン末端に存在しており、この末端は硫酸処理によるエーテル結合の切断によって生じたものと推定された。その種々の植物を用いてこの二種類のラジカルのスピン濃度比（G/S）とアポプラストPOXによる FA と SA の酸化速度比を調べたところ、そこには正の相関が認められた。以上の結果に基づいて、細胞壁でのリグニン合成の調節を酵素の基質特異性、リグニン組成、それにリグニン分子内の結合様式の関連を議論していく。

1pE13

タバコ培養細胞における２種類の塩基性細胞壁糖蛋白質 GBGP とエクステンシンの発現様式

武市哲郎、川崎信二　（農水省・農業生物資源研）

タバコ培養細胞細胞壁にはヒドロキシプロリンに富む塩基性糖蛋白質として galactose−rich basic glycoprotein (GBGP) とエクステンシンの２種類が存在する。抗体を用いた組織ブロット法による解析によると、両者はタバコ植物体において明瞭に異なる特徴的な組織分布をしており、GBGP は茎や葉柄の柔組織において厚角組織様の部位に局在し、エクステンシンは茎の表皮に局在している（昨年度本大会）。今回タバコ培養細胞における両者の時間的な発現様式について検討したので報告する。

培養細胞としては、XD−6S, BY−2 の２系統を用いた。この２系統は10日間程度の培養期間においてほぼ同様なS字型増殖曲線を示す。これらを植継ぎ後２～10日間培養し、細胞（壁）から塩溶液によって抽出される分画と培養液中に放出されている分画の両方についてウェスタンブロッティングにより GBGP とエクステンシンの発現を解析した。

GBGP は両系統の細胞においてほぼ全期間認められたが特に４、６日目頃が顕著であり、また XD−6S では８、10日目にやや低分子化しているのが認められた。両系統とも GBGP は培養液中にはほとんど放出されていなかった。定常期になると GBGP の量が増大せずむしろ減少傾向にあることは、GBGP の合成が止まり分解もしくは細胞壁への組み込みが起こっているからかもしれない。

２～６日目の対数期（または誘導期）に両系統で単分子エクステンシンのバンドが認められたが、XD−6S では培養液で顕著であったのに対し、BY−2 では細胞で顕著であった。６～10日目になると両系統の培養液、細胞の双方で広範囲の分子量にわたってスメア状のシグナルが認められ単分子エクステンシンの検出は困難となったが、これはこの時期になるとエクステンシンの高分子化がおこるためと思われる。エクステンシンの総量は両系統とも全培養期間で増加し続けていると思われた。

以上より培養細胞において GBGP とエクステンシンが時間的に変動しながら発現していることが明らかとなった。両者の発現様式は定常期において明瞭に異なり両者の機能の違いが示唆される。また XD−6S と BY−2 の２系統間でやや差異が認められるが、これは XD−6S は 10 細胞以下の小さなクラスターしか作らないが、BY−2 は数十～百細胞以上の大きなクラスターとして増殖することと関係しているかもしれない。

1pE14

タケノコには２種類のアラビノガラクタンプロテインが存在する

藤井康代、東　順一、岡村圭造（京都大・農・林産）

前回は、タケノコ冷水抽出物からのアラビノガラクタンプロテイン（ＡＧＰ）の単離について報告した[1)]。今回は冷水抽出残さからさらに異なった性質を持つＡＧＰを単離したので報告する。

含水アルコール中でホモゲナイズし、冷水抽出した食用タケノコ及び凍結乾燥後80％含水メタノール及び冷水で抽出した伸長中の高さ約６ｍのモウソウチクをさらにシュウ酸アンモニウム、ジメチルスルホキシドで連続的に抽出し、細胞壁画分を残さとして得た。この画分を0.2M$CaCl_2$で抽出後、抽出液を脱塩・凍結乾燥し、塩可溶画分を得た。前回報告した水可溶ＡＧＰ（ＡＧＰ−Ｗ）の場合と同様にゲル ろ過(Sepharose CL-4B) 及び陰イオン交換クロマトグラフィー(DEAE-Toyopearl) に順次チャージし、β-Gal Yariv 抗原と凝集反応を示す塩抽出ＡＧＰ（ＡＧＰ−Ｓ）を得た。このＡＧＰ−Ｓの性質（中性糖の組成、構造及びアミノ酸組成）を調べたところ、このＡＧＰ−ＳとＡＧＰ−Ｗにはいくつかの相違点が確認された。すなわち、中性糖は、主にアラビノース(Ara)とガラクトース(Gal)からなっていたが、その比（Gal/Ara）は、ＡＧＰ−Ｗでは１であったがＡＧＰＳでは1.75であった。メチル化分析の結果と合わせるとＡＧＰ−Ｓの糖部分は分岐がやや少なく、1→3結合が多い(1,3;1,6)ガラクタンを主鎖とするアラビノガラクタンであることがわかった。また、ＡＧＰ−Ｓのタンパク質含量はＡＧＰ−Ｗの3倍になっているが、ＡＧＰに多く含まれるヒドロキシプロリン含量はＡＧＰ−Ｗよりも少なかった。以上の結果、ＡＧＰ−ＳはＡＧＰ−Ｗよりも糖タンパク質的な性質を持ち、抽出されにくい形で存在すると考えられた。また、ＡＧＰ−Ｓは食用タケノコではほとんどみられなかった。

1)藤井ら、９４年度要旨集、p56、1994

1pE15

ダイズ未熟種子におけるレグインスリンの細胞内分布

西澤直子，森敏，小松節子[1]，梶原英之[1]，平野久[1]
（東大大学院農学生命科学研究科，[1]農水省生物資源研）

ダイズ種子に存在する塩基性７Ｓグロブリン（Ｂｇ）は，システインに富む糖タンパク質であり，登熟過程で子葉中に蓄積される．Ｂｇおよび他のマメ科種子やニンジン培養細胞に存在するＢｇ様タンパク質は，インスリンやインスリン様生長因子との結合能を持ち，プロテインキナーゼ活性が認められたところから，植物体中でホルモンレセプターのような機能を持つのではないかと期待された．Ｂｇの抗体を用いた免疫染色の結果，Ｂｇは主に細胞壁のミドルラメラ部分や細胞間隙に存在することが明らかになり，昨年の本学会で報告した．一方，植物中にＢｇと結合するインスリン様ペプチドが存在する可能性を考え，Ｂｇと結合するペプチドの探索と精製を試みたところ，３７残基からなる約４ｋＤａのペプチドがダイズ種子から単離され，レグインスリンと命名された．そこで，レグインスリンのポリクローナル抗体を用いて，ダイズ子葉中の細胞内分布について調べたところ，このペプチドも細胞壁に存在していたが，Ｂｇとは異なり細胞壁中に散在することが明らかになった．

1pF01

イネ苗の脱水誘導低温耐性のシグナル伝達におけるCa^{2+}の放出：カフェイン感受性Ca^{2+}ストアの役割

北川良親、ニールマール・ジョシ、[1]吉崎克明（秋田農短大・生工研、[1]秋田大・医療短大）

インディカ系イネ品種の苗は4°Cの低温に16～24時間置いた後、25°Cに移すと枯死する。これらのイネ苗の根を0.5Mマニトールで10分～1時間処理すると低温耐性を獲得し、枯死しなくなる現象を見出した[1]。インディカ系イネは品種によって同じ脱水ストレスをかけても、低温耐性の程度に差があった。以後の実験はインディカ系の血を持つ「早生統一」を用いて行なった。マニトールは0.5M以上で効果があり、処理時間は10分で十分であるが、マニトール処理後低温に置く前に25°Cで50分位置く必要があった。マニトールの他食塩や庶糖でも効果がみられた。しかし、ABAは100μM用いても全く効果がなかった。各種のCa^{2+}放出ブロッカーでイネ苗を前処理後、マニトール処理したところ、カフェイン、LA^{3+}、ネオマイシンがマニトール効果を顕著に阻害した。ニフェディピン、Ca^{2+}-イオノフォア、イオノマイシンも若干の阻害効果を示したが、リアノジン、タプシカラギンは全く阻害効果がなかった。fura-2処理したイネ苗根におけるCa^{2+}放出量を顕微分光々度計で測定したところ、マニトールによって顕著なCa^{2+}の放出が確められた。また、このCa^{2+}放出はカフェインによって阻害された。これらの結果から、動物細胞で報告されているカフェイン感受性のCa^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR) が脱水ストレスのシグナル伝達に重要な役割をなしていると推定される。

[1] Takahashi et al. (1994) Plant Mol. Biol. 26:339-352.

1pF02

ラン藻 *Spirulina platensis* のアデニル酸シクラーゼ遺伝子の単離と構造解析

屋代久美子，坂本敏夫，大森正之（東大・教養・生命環境）

糸状性ラン藻 *Spirulina platensis* はcAMPの刺激によって細胞が凝集し、円盤状のマットを形成する。*S. platensis* の滑走運動の制御にcAMPが深く関係していることが考えられる。本研究ではcAMPを合成する酵素であるアデニル酸シクラーゼの遺伝子を本ラン藻より単離し、構造を解析した。

アデニル酸シクラーゼ遺伝子を欠損する大腸菌株MK1010はマルトース発酵能を欠く。この菌株のマルトース発酵能の回復を指標として、*S. platensis* のゲノムライブラリーをスクリーニングした。この結果、マルトース発酵能を回復する7種類の陽性クローンが得られ、これらのうち4種類のクローンでcAMPの生成が認められた。このうち3種類のクローンについて塩基配列の決定を試み、一つについて全長を決定し、他の二つについて部分配列を決定した。三種類の遺伝子の塩基配列より推定されるアミノ酸配列中には、真核生物のアデニル酸シクラーゼの触媒領域においてよく保存されているアミノ酸配列が見い出された。全長を決定したポリペプチドは、一回膜貫通型のシグナル受容体型構造をとると思われる。この構造はすでに単離されている *Anabaena cylindrica* のアデニル酸シクラーゼ遺伝子によく似ている。他の二つの遺伝子においては、触媒領域以外でのアミノ酸配列における相同性は見られなかった。*S. platensis* には、少なくとも機能的に異なった3種類のアデニル酸シクラーゼが存在すると考えられる。

1pF03

ジャガイモ塊茎細胞質画分に存在するホスホリパーゼ A_2 はパタチンである

仙田香織、吉岡博文、道家紀志、川北一人（名古屋大・農・植物病理）

ジャガイモージャガイモ疫病菌の系において、宿主の誘導抵抗反応に至る細胞内情報伝達系にホスホリパーゼ(PL)A_2が関与することが考えられている。PLA_2の本系における詳細な役割を調べるため、ジャガイモ塊茎の可溶性画分に存在するPLA_2の精製を試みた。ジャガイモ塊茎を摩砕・遠心して得た可溶性画分を硫安分画後、DEAE-Sephadex、Butyl Toyopearl、Econo Pac-Qの各カラムクロマトグラフィーにより精製酵素標品を得た。SDS-PAGEにより本標品は単一のバンドを示し、分子量は40 kDa、pI値は約4.75と推定された。エドマン分解法により、精製酵素標品のN末端アミノ酸配列分析を行ったところ、ジャガイモの貯蔵タンパク質として知られるパタチンのアミノ酸配列と高い相同性を示し、精製酵素標品はパタチンであることが示された。パタチンは脂質アシル基加水分解活性をもつことが既に報告されているが、詳細については不明であるため、PLA_1およびPLA_2活性について調べた。その結果、パタチンは両酵素活性とも有するが、PLA_2活性の方がPLA_1活性よりもはるかに高かった。さらに、4種のホスファチジルコリンを用いるPLA_2活性について基質特異性を調べたところ、sn-2位がリノール酸であるものに対するPLA_2活性が最も高く、オレイン酸、パルミチン酸、アラキドン酸の順に活性は低かった。

1pF04

ジャガイモ培養細胞におけるイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC活性

鈴木真紀、吉岡博文、道家紀志、川北一人（名古屋大・農・植物病理）

ジャガイモ植物とその疫病菌の系では、疫病菌非親和性レース接種あるいは菌体壁成分エリシター処理によって一連の抵抗反応が誘導される。抵抗反応発現に至る情報伝達機構には細胞内Ca^{2+}、プロテインキナーゼ、NADPH依存活性酸素生成系、ホスホリパーゼA_2、GTP結合タンパク質が関与することを既に報告しており、更にイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC(PLC)の関与が示唆されている。今回、ジャガイモ培養細胞の膜画分に認められるPLC活性について検討した。活性は、[^{3}H]-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2)を基質として用いる方法により測定した。その結果、Ca^{2+}存在下で本酵素活性は認められ、0.1 mMの濃度で最も高い活性を示した。Mg^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}およびK^+の存在下では活性は認められなかった。pH依存性があり、0.1 mM Ca^{2+}存在下でpH 6.0およびpH 8.0において高い活性を示した。また、PLC阻害剤neomycinおよびbromophenacyl-bromide (BPAB)は、本酵素活性を低下させた。GTP結合タンパク質の調節因子として知られるmastoparanは、20 μMの濃度で本酵素活性を増大させ、ジャガイモ培養細胞の膜画分に存在するPLC活性はGTP結合タンパク質の制御を受けている可能性が示唆された。

1pF05

ジャガイモ塊茎リポキシゲナーゼアイソフォームの反応特性と免疫生化学的解析

古谷聡美、品尾博子、田辺久子、地阪光生、滝波弘一、横田一成（島根大・農・生物資源化学）

ジャガイモ塊茎リポキシゲナーゼは、従来の豆科植物のものとは異なる独特の反応特性と動物のロイコトリエン生成反応のような多機能性も示す。損傷や病原菌の感染による細胞応答に応用することを考えて本酵素アイソフォームに特異的なモノクローン抗体を調製することを試みた。

ジャガイモ塊茎ダンシャク種(*Solanum tuberosum*, var. Dansyaku)の塊茎の酵素抽出物をDEAE-セルロースの陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ、0-0.2 M NaClの直線濃度勾配で溶出し、順にA, BそしてCの３つアイソフォームに分離した。個々のアイソフォーム標品をゲル濾過の高速液体クロマトグラフィーで測定したところ、アイソザイムAとCは50 kDaで、アイソザイムBは80 kDa付近の分子量と算出された。AとCは蛋白質加水分解酵素の作用による分解物の可能性もある。各酵素標品とも4°Cでの安定性にあまり差は認められなかった。リノール酸と各アイソフォームと反応させた生成物を解析するといずれも9-と13-ヒドロペルオキシドの生成比率は、約4:1となった。遊離脂肪酸に対する基質特異性を調べると、各アイソザイムともリノール酸とα-リノレン酸に高い反応性を示したが、リノール酸に対するものと比較して、アイソザイムAとBでは10%以下、Cは40%以下の反応性であった。ハイブリドーマ法で、各酵素を特異的に認識したり酵素活性を制御するモノクローン抗体を作成するための研究を進めている。

1pF06

高等植物における可逆的燐酸化反応を介した細胞内情報伝達経路の解析系の構築

青木幹雄、青山卓史、岡　穆宏（京大・化研）

蛋白質のセリン/スレオニン残基の可逆的燐酸化反応を介した細胞内情報伝達系路は真核生物一般に広く存在する。特に蛋白質脱燐酸化酵素PP1は、代謝・細胞増殖など多くの基本的生命現象に関わっていると考えられている。PP1は触媒および調節サブユニットから成る多量体酵素として細胞内に存在するが、その触媒サブユニットはそれ自身で構成的に脱燐酸化活性があり、生体内での酵素活性の制御は調節サブユニットによる細胞内局在化に依存していることが知られている。我々は、PP1の副次的影響を介さない直接的作用を解析するために、転写誘導系と細胞内局在化の系を組み合わせた形質転換植物を作成し、PP1活性の空間的・時間的バランスを人工的に改変する系（転写誘導・局在化の系）を開発した。この系は、多様な作用のためこれまで個体レベルでの解析が困難であった他の遺伝子産物の解析系としても有用である。具体的には、PP1触媒サブユニットのアミノ末端に代表的オルガネラ（核・葉緑体・細胞質）への移行シグナルを付加した改変PP1遺伝子を作成し、グルココルチコイドステロイドホルモンによる転写誘導系と組み合わせてタバコ植物体に導入し、導入遺伝子産物活性の時間的・細胞内局在的制御を行った。これら形質転換タバコにおける転写誘導後の形態的変化を観察すると共に、発現に燐酸化・脱燐酸化反応の関与が示唆されている情報伝達系路（光・植物ホルモン・損傷・細胞増殖など）の下流に位置する遺伝子の発現への改変PP1遺伝子の誘導による影響について報告する。

1pF07

IDENTIFICATION OF 95KD PROTEIN KINASE HOMOLOGOUS TO ARABIDOPSIS PRO25

Masaaki Fujiki, Solar Energy Research Group, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-01

Arabidopsis pro25 is a 68kD receptor kinase with EGF-like repeats at its N-terminus followed by a single membrane spanning hydrophobic stretch and C-terminal serine/threonine kinase domain (Kohorn, *et. al.* PNAS **89**, 10989-10992). Antibodies raised against the pro25 kinase domain recognized 95kD and 50kD *Arabidopsis* proteins in addition to pro25. Subcellular fractionation and western analysis showed that the 50kD homologue resides in the chloroplast stroma whereas the 95kD protein is associated with the microsomal fraction. Further characterization of the 95kD homologue showed that it is glycosylated and is enriched in leaf tissue and other green tissue to less extent while no detectable amount of 95kD protein was found in root tissue.

In order to isolate the cDNA for the 95kD homologue, lambda gt11 library of *Arabidopsis* was screened with the antibody which strongly recognized the 95 kD homologue and 6 clones have been isolated. Sequence analysis of those clones is now in progress.

1pF08

傷により一過的に活性化されるタバコ46-kDaキナーゼの解析

宇佐美昭二、坂野弘美、[1]萩原 正敏、町田泰則（名大・理・生物、[1]名大・医・解剖）

我々は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)を基質とするインゲルアッセイ法を用いて、傷で一過的に活性化される46-kDaのキナーゼがタバコ成熟葉に存在することを見出した。このキナーゼは極めて早く、一過的に活性化されること、キトサンやサリチル酸など、種々の刺激により一過的に活性化されること、メリステムやカルスなど分裂細胞の多い組織において活性化されていること、双子葉、単子葉植物に広く保存されていることをすでに報告している。（1993年度分子生物学会、1994年度植物生理学会）このキナーゼは、傷などの傷害関連のシグナル、または細胞分裂の制御に関わるシグナルを細胞内に伝える伝達系に関与している可能性がある。現在、この46-kDaキナーゼの生理学的な解析を行うとともに、キナーゼを精製し、その構造解析を行っている。その過程で、インゲルアッセイ法によりみられる46-kDaキナーゼのバンドは、大きさは同じだが、pI値の異なる複数のキナーゼより成ること、サリチル酸による活性化は、１時間目をピークとする一過的な活性化であり、他の活性化とはパターンが異なること、シクロヘキシミドで処理することにより恒常的に活性化されることなどを見出した。これらの結果について報告する。

1pF09

低浸透圧負荷によるタバコ培養細胞の$[Ca^{2+}]_{cyt}$上昇とプロテインキナーゼの活性化

高橋宏二[1]、武藤尚志[1,2] ([1]名古屋大・院農、[2]生物分子セ)

植物の細胞内情報伝達においてCa^{2+}はセカンドメッセンジャーとして中心的役割を演じていると考えられる。我々は、生理的条件下で細胞礎質遊離Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_{cyt}$)変化をモニターできる系としてCa^{2+}感受性発光蛋白質エクオリンを発現する形質転換タバコ培養細胞BY-2株を作出し、この細胞を用いて低浸透圧負荷による一過的な$[Ca^{2+}]_{cyt}$上昇を検出した(1)。本講演においては、更なる詳細な検討の結果について報告する。

約１分後の一過的な$[Ca^{2+}]_{cyt}$上昇(C2)は、負荷する低浸透圧の強度に応じて指数関数的に増加し、また、これに先行する微弱な$[Ca^{2+}]_{cyt}$上昇(C1)が検出された。先に報告したC2を阻害するプロテインキナーゼ阻害剤K-252aの処理(1)は、しかし、C1を阻害しなかった。また、先に低浸透圧によって増加するCa^{2+}は細胞内ストアを由来としていると考察したが、その後の研究の結果、細胞外のCa^{2+}に依存していることが明らかになった。低浸透圧によって、45-, 55-, 60-kDaのプロテインキナーゼが活性化されることも判明した。その活性化パターン、細胞内局在、$[Ca^{2+}]_{cyt}$上昇との関わり等について報告する。

(1) 日本植物学会 1994年度 年会講演要旨

1pF10

ソラマメ孔辺細胞のMAPキナーゼ類似プロテインキナーゼのABAによる活性化

武藤尚志[1,2]，森　泉[2]（名大・生物分子セ[1]，農院[2]）

ミエリン塩基性蛋白(MBP)を基質とするゲル内活性測定法によりソラマメ孔辺細胞プロトプラストに49と46kDaのプロテインキナーゼ（MBPキナーゼ）が検出された。葉肉細胞にもこれらのキナーゼは存在したが、蛋白当りの活性ははるかに低く孔辺細胞で特に強く発現しているキナーゼであると考えられる。MBPキナーゼはMBPを良好な基質としたがヒストンとカゼインはリン酸化され難かった。酵素活性はスタウロスポリン（St）とK-252aによって阻害された。孔辺細胞プロトプラストを1 uM ABAで処理するとMBPキナーゼは１分後に活性化を受け、２分後には最大活性に達しこの状態は少なくとも10分間は維持された。StかK-252aで前処理するとABAによる活性化は認められなくなったので、ABAによるキナーゼの活性化には蛋白リン酸化が関与していると推察される。IAAなどその他の植物ホルモンは活性に影響しなかった。また、Ca^{2+}も活性化に関与しないことを示す結果を得た。一方、剥離表皮細胞にStかK-252aを処理するとABAによって誘導される気孔の閉口が抑制された。

以上の結果は孔辺細胞におけるABA受容から気孔閉口に至るシグナルトランスダクションの過程にプロテインキナーゼカスケードが存在することを示唆している。

1pF11

***Rhodobacter capsulutus*の光化学系の発現を調節するレドックスセンサーとタンパク質リン酸化カスケード**

井上和仁[1,2]、中原昌明[1]、J. Kouadio[2]、C. Mosley[2]、C. Bauer[2]
（[1]神奈川大・理・応用生物、[2]Dept. Biol. Indiana Univ.）

紅色非硫黄光合成細菌*Rhodobacter capsulutus*の光化学反応中心と集光性色素複合体LHI、LHIIの構造遺伝子は*puc*、*puh*、*puf*の3つのオペロンにコードされている。これらのオペロンの転写は好気下で抑制され嫌気下で促進されるが、嫌気下での転写の促進には*regA*と*regB*の2つの調節遺伝子が関与している。予想されるアミノ酸配列から、RegAとRegBはそれぞれ原核生物の転写制御系であるtwo-componentのレスポンスレギュレーターとセンサーキナーゼに特有な構造を持っている。今回、これらの遺伝子をT7系のRNAポリメラーゼを使って大腸菌内で発現させ、その性質を調べたので報告する。RegAはBL21(DE)/plysSで、RegBは5つの膜貫通部分のうち4つをカット(RegB')するようにPCR法でDNAを増幅後C600/pGP1-2/pT7-7でそれぞれ発現させた。精製されたRegB'を6M尿素で変性後、窒素を通気しながら尿素を3Mまで希釈し、DTT、Mg^{2+}を加え、室温で30分間放置し、次いで、4℃で一晩透析して尿素を除いた。これとは別に精製したRegAと再構成されたRegB'に[γ-^{32}P]ATPを加え、室温、嫌気下でインキュベート後、SDSゲル電気泳動、オートラジオグラフィーによって分析したところ、RegB'に依存したRegAのラベルが起こった。RegB'は自己リン酸化能を持つが、この活性は、酸素やフェリシアン化カリウムなどの酸化剤によって失われ、嫌気下でDTTとインキュベートすることにより活性は回復した。

1pF12

GCC box配列によるエチレン応答性遺伝子の発現制御におけるシグナル伝達系の解析

鈴木　馨, 高木　優, 進士　秀明（工技院・生命研）

エチレンによって誘導される植物防御遺伝子の転写制御とシグナル伝達系の解明を目的として研究を行なっており、これまでにエチレン応答性防御遺伝子の発現制御領域に存在する11bpの共通配列(GCC box: TAAGAGCCGCC)がエチレン応答性の制御エンハンサーとして機能することを明らかにし、さらにGCC boxと相互作用をする新規の核タンパク質(EREBP)のcDNAを単離した。このGCC boxとレポーター遺伝子(GUS)の融合遺伝子を導入した形質転換タバコを用いてGCC boxを介したエチレン応答性遺伝子発現のシグナル伝達系を解析した。エチレンによるGUS活性の誘導はプロテインキナーゼ阻害剤によって抑制され、プロテインフォスファターゼ阻害剤によって促進された。エチレン作用の阻害剤存在下でプロテインフォスファターゼ阻害剤を処理した場合にもGUS活性の上昇が見られた。また、タンパク質合成阻害剤を処理した場合エチレンによるGUS活性及びmRNAレベルの上昇が抑制された。これらの結果から、GCC boxを介したエチレン応答性遺伝子発現のシグナル伝達にはプロテインキナーゼの活性化及びタンパク質合成の誘導が必要であり、そのプロテインキナーゼ活性はプロテインフォスファターゼによって制御されていると考えられた。また、エチレン処理によるEREBPのmRNAレベルの変化についても報告する。

1pF13

ディファレンシャルディスプレイ法を用いたジャスモン酸メチルにより誘導される遺伝子の単離と解析

鈴木玄樹、加藤友彦[1]、高野篤生、太田啓之、増田建、柴田大輔[1]、塩井祐三、高宮建一郎（東工大・生命理工・生体機構、[1]三井植物バイオ研）

ジャスモン酸とその関連化合物は、近年高等植物に広く存在する情報伝達因子として研究が進み、特に病害などのストレス応答に関与する物質としてその機能が解明されつつある。リポキシゲナーゼなどジャスモン酸により発現誘導を受ける遺伝子が相次いで単離されているが、ジャスモン酸による遺伝子発現誘導のメカニズムについてはほとんど分かっていない。我々は、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、ダイズ培養細胞からシクロヘキシミドの存在下でもジャスモン酸処理で発現の誘導が起こる遺伝子を新たに単離し、それらの発現誘導のメカニズムの解析を行った。単離した２つのクローン(T6-1,G9)のノーザン解析から、T6-1はジャスモン酸メチル処理後約２時間で、G9は約12時間で発現が最大となることが判った。T6-1,G9の詳細な解析を行うために、現在全長を持つcDNAを単離中である。

1pF14

植物における細胞内輸送解析のモデル系の確立
ーアラビドプシス由来低分子量GTP結合タンパク質の細胞生物学的研究ー

上田貴志、穴井豊昭[1]、塚谷裕一、長谷川宏司[1]、内宮博文（東大・分生研、[1]筑波大・応用生物化学系）

低分子量GTP結合タンパク質は、細胞内の様々な情報伝達経路において、多様で、重要な働きを担っていることが、酵母及び動物細胞を用いた研究から明らかになっている。その中で、分泌や細胞内輸送経路における分子スイッチとして働いているのが、rab/ypt family である。植物においても、多くの rab/ypt family に属する遺伝子がクローニングされているが、植物細胞内輸送系解析のための優れた系が未だ確立されておらず、それらのいずれも細胞内局在さえ明らかにされていない。われわれは、アラビドプシス由来のrab/ypt homologue であるara family の遺伝子産物について、生化学的解析を行ってきたが、さらにその細胞生物学的解析のモデル系として、花粉管伸長という現象に注目した。任意の段階で、遺伝子発現を誘導できるように、アラビドプシス由来の熱ショックタンパク質遺伝子HSP81-1のプロモーターにara-4遺伝子を連結し、それを導入したトランスジェニック植物を作成した。このトランスジェニック植物では、熱ショックによりARA-4が誘導された。さらに、誘導をかけた植物から花粉を採集し、急速凍結置換法によりサンプルを作成し、免疫電顕を行った結果、ARA-4は、主にゴルジ体周辺の小胞に存在することが明らかとなった。

1pF15

フォスファチジルイノシトール３リン酸のタバコ細胞中での遅い代謝回転

松岡　健、中村研三　（名大・農・生化）

フォスファチジルイノシトール３－キナーゼ (PI 3-kinase) は動植物・酵母などの各種生物にその存在が知られ、動物細胞においては、この酵素の産物である３位がリン酸化されたフォスフォイノシチドが細胞膜を介した情報伝達系に関わることが知られている。酵母ではこの酵素が液胞へのタンパク質輸送に必要であることが知られているが、植物細胞でのPI 3-kinase とその代謝産物であるフォスファチジルイノシトール３リン酸 (PI 3-P) の機能については殆ど解っていない。

タバコ BY-2 細胞中の PI 3-kinase の細胞内局在部位を細胞分画法により検討すると、活性の殆どはゴルジ装置画分に回収され、細胞質膜画分には殆ど回収されなかった。我々は最近 wortmannin がタバコ細胞の PI 3-P およびフォスファチジルイノシトール４リン酸 (PI4 -P) の合成を阻害することを報告している。今回、PI 3-P とPI4 -P の代謝回転を wortmannin 存在下または非存在下にタバコBY-2 細胞のリン脂質を^{32}Ｐ－リン酸で標識することにより検討した。90分パルスラベル後に標識されたPI -リン酸の殆どは PI4 -P であり、長時間（24時間）の標識では、PI 3-P が優先的に標識された。wortmannin 存在下に標識した細胞を非標識リン酸とインキュベートすると、標識 PI4 -P は急速に減少したが、PI 3-P の減少は殆ど認められなかった。これらの結果はタバコ細胞においてPI 3-P の代謝回転が PI4 -P に比べ非常に遅いことを意味し、PI 3-P は膜を介した情報伝達ではなくタンパク質の仕分けなどの他の細胞内反応に関与している可能性を示唆している。

1pF16

原形質連絡を通過する物質の分子量限界の制御

藤原　徹，[1]Robert L. Cleland, [2]William J. Lucas
(東大・農・応用生命化学,[1]Botany Dept., Univ. Washington, Seattle, [2]Dept. Plant Biol. Univ. California, Davis)

植物の細胞間に存在する原形質連絡は一般に分子量約１０００ダルトン以下の物質を通過させることが知られている。最近，植物ウイルスのムーブメントタンパク質を利用したマイクロインジェクション実験によって，原形質連絡をタンパク質，核酸などの高分子物質が通過しうることが明らかにされている。このことは，原形質連絡が本来，高分子物質を輸送する能力を持っていることを示している。本発表では，原形質連絡の分子量限界が細胞のATP濃度などによって影響を受けることを示唆する結果について発表する。

1pF17

イネ培養細胞原形質膜に存在する*N*-アセチルキトオリゴ糖エリシター結合蛋白質のアフィニティーラベルによる同定

伊藤ユキ、賀来華江、渋谷直人（農水省生物研）

イネいもち病菌細胞壁の構成多糖であるキチンのオリゴ糖$(GlcNAc)_{7-8}$はイネ懸濁培養細胞に対しnMレベルでフィトアレキシンエリシターとして作用する[1]。我々は既にイネ培養細胞の原形質膜に*N*-アセチルキトオリゴ糖に高い親和性を持つ結合部位が存在し、この結合は細胞レベルでのフィトアレキシンの誘導によく対応する特異性を示すことを見出している[2, 3]。本実験では、この結合部位を単離精製するための第一歩として、フォトアフィニティーラベルによる結合蛋白質の同定を試みた。$(GlcNAc)_8$の^{125}I標識フェニルアジド誘導体を調製し、水性二相分配法で調製した原形質膜と反応させ光化学反応を行った。光照射後の膜をSDSで可溶化し、メタノール沈澱物のSDS-PAGEを行ったところ、オートラジオグラフィーで70KDa付近に単一のバンドが検出された。バンドの濃度から定量したリガンド量は、リガンド濃度に対し飽和型の曲線を示した。この結合は、$(GlcNAc)_8$で阻害され1/2maxは30nMであったが、キトサンオリゴ糖$(GlcN)_8$及び低重合度のキチンオリゴ糖$(GlcNAc)_3$では阻害されず、エリシター活性の糖特異性とよく一致した。このバンドは、メタノール沈澱物をトリプシン処理すると消失することから蛋白質であると考えられる。以上の結果は、この蛋白質がエリシターのシグナル伝達に関与するレセプターである可能性を示唆している。これはキチン由来のエリシター結合蛋白質を同定した最初の報告である。[1] A. Yamada *et al.*, ***Biosci. Biotech. Biochem.*, 57**, 405(`93); [2] N. Shibuya *et al.*, ***FEBS Lett.*, 329**, 75(`93); [3] 恵飛須則明他、94年度年会講要 p. 95.

1pF18

Bracketting of the rice blast resistance genes *Pi-ta*^{2} *and Pi-ta* between close flanking markers and analysis of a cosmid library

K. Rybka[1,2], M. Miyamoto[1,3], Y. Tanaka[1,4], I. Ando[5], A. Saito[6], S. Kawasaki[1,7]
[1]NIAR, [2]Inst. Plant Breed. Poland, [3]Ibaraki Biotech. Inst., [4]Agric. Fac. Okayama U., [5]NARC, [6]Kyushu Agric. Exp. St., [7]JRDC-PRESTO

To understand the mechanism of the **true resistance** of plants against parasites (a very specific and strong plant-microbe interaction determined by a single gene) we are trying to **positionally clone** the rice blast resistance genes as a model system. It was chosen because rice is small in the genome size, and also in the unit genetic length in physical scale (ca. 100 Kb/cM). In the last meeting, we determined the chromosomal positions of representative *indica* derived resistance genes, *Pi-ta*, *Pi-ta*^{2}, *Pi-b*, and *Pi-z*^{t}. This time, we have made up a refined map bracketting the *Pi-ta*, *Pi-ta*^{2} with the close flanking markers from F_2 analyses. By analyzing about 160 susceptible (recessive homo) F_2 individuals from the crossings of Aichi Asahi (+) x Pi No.4 (*Pi-ta*^{2}) and Nourin 22 (+) x Pi NO.4, we find 2 cosegregating markers of *Pi-ta*^{2} and also close flanking markers at 0.3-0.7 cM on the left and at 0.7 cM on the right side. To determine physical distances between them, restriction fragment analysis was done with the rare-cutter enzymes, CHEF-electrophoresis and Southern blotting of the close DNA markers. As a result the left side marker (0.7 cM) seems to be within 45 Kb from the gene, but there was no common bands between the right side marker and the cosegregating marker.

From these results, a cosmid library was constructed and a contig spanning the flanking markers is being constructed.

1pG01

Al ストレスで誘導されるタバコ遺伝子のクローニング

江崎 文一、次田 忍、山本 洋子、松本 英明
（岡山大 資生研）

昨年の本大会で我々はリン酸欠乏処理と Al 処理の併用（Two step-treatment）で発現誘導される 4 クローン（pAL111, pAL139, pAL141, pAL142）を単離し、その内の pAL111, pAL142 は Al イオンストレスで誘導されることを報告した。今回、これら 2 つのの cDNA 断片の塩基配列決定した所、オーキシンで誘導される遺伝子 *parA*, *parB* とそれぞれ一致または高い相同性を示した。このことから pAL142 上にコードされている蛋白質も glutathione S-transferase 活性（GST活性）を持つことが示唆された。さらに最近、同様のスクリーニング法で 5 つ目のクローン、pAL201 を単離した。その塩基配列の結果から、peroxidase 活性を持つことが示唆された。Al 処理により誘導される GST や peroxidase 蛋白質は細胞内に生成した毒性物質や活性酸素の消去などに関与することで Al 耐性に関わっているのかもしれない。

1pG02

タバコ懸濁培養細胞におけるリン酸欠乏およびアルミニウムストレスで誘導される遺伝子の解析

次田 忍、江崎文一、山本洋子、松本英明（岡山大・資生研）

アルミニウム(Al)はリン酸と不溶性の沈殿を生じるためAlストレスはリン酸欠乏状態を引き起こすことが考えられている。本実験ではタバコ懸濁培養細胞(*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun)を用いて、リン酸欠乏とAlストレスで誘導される遺伝子の解析とその遺伝子から推察されるAlによる障害機構について検討した。

単離されたcDNAの塩基配列より、以下の結果が得られた。
(1)推定されるタンパク質の分子量は38kDaである。
(2)この遺伝子はトマトにおいて傷害やABA処理によって誘導されるアニオニックパーオキシダーゼと高い相同性を持つ。
(3)N末側のリーダーペプチドのハイドロパシープロットがトマトのポリガラクチュロナーゼのパターンと一致し、分泌タンパク質である可能性が認められる。

以上の結果を基にAlストレスにおけるパーオキシダーゼ活性について検討した。その結果、リン酸欠乏状態においたタバコ培養細胞のパーオキシターゼ活性が増加し、リン酸を添加することによって活性がコントロールレベルにまで戻ることが認められた。しかしながらAl存在下でリン酸欠乏処理を行なうとパーオキシダーゼ活性は上昇するが、それにリン酸を添加してもコントロールレベルまで戻らなかった。

1pG03

タバコ培養細胞におけるアルミニウムによる脂質過酸化の促進について

蜂谷晶子、山本洋子、松本英明　（岡山大　資生研）

アルミニウム（Al）による増殖阻害効果は2価鉄（Fe^{2+}）の存在によって、相乗的に高まる。さらに、この阻害効果が脂溶性抗酸化剤によって抑制されることから、Fe存在下でのAlによる障害の1つとして膜の過酸化が考えられる。そこで、TBA法によりマロンジアルデヒド（MDA）の生成量を定量し、Al処理に伴う脂質の過酸化について検討した。

Al、もしくはFeそれぞれの単独処理におけるMDAの生成量は、両者を加えないコントロール処理と同程度であったが、AlとFeの同時処理（Al+Fe処理）ではコントロールの24倍に増加した。また、Fe濃度を一定にしてAl濃度を変えた場合、Al濃度の上昇に伴ってMDAの生成量も増加し、さらに、MDAの生成量と増殖阻害率との間に正の相関が見られた。また、Al+Fe処理におけるMDAの生成量を経時的に見たところ、MDAの生成はAlやFeの細胞への集積が開始する10～12時間目あたりから増加し始め、それとほぼ同時に細胞の増殖能力の低下がみられた。

以上の結果から、AlはFeとともに、相乗的に脂質の過酸化を引き起こすこと、その結果、原形質膜の機能が低下し、細胞の増殖が阻害されるものと考えられる。

1pG04

タバコ培養細胞におけるリン酸欠乏によって獲得するアルミニウム耐性の機構について

山本洋子，正元和盛[1]，蜂谷晶子，力石早苗，松本英明
（岡山大・資生研，[1]熊本大・教育・生物）

対数増殖期の細胞（＋P細胞）をリン酸無添加培地で培養することによって得られるリン酸欠乏細胞（－P細胞）は＋P細胞に比較して、アルミニウム（Al）に耐性を示す。2価鉄（Fe^{2+}）存在下にアルミニウム処理を行なった場合、＋P細胞では、（1）Alの集積、（2）Feの集積、（3）脂質の過酸化がみられるが、－P細胞では、これらすべてが抑制されていた。

一方、リン酸無添加培地で培養することにより、－P細胞には抗酸化物質であるβ－カロテンの蓄積がみられ、6日間のリン酸欠乏処理によって＋P細胞の9倍に上昇した。また、＋P細胞であっても脂溶性の抗酸化剤をアルミニウム処理時に添加すると、－P細胞と同様に、上記(1),(2),(3),が抑制され、かつアルミニウムに耐性を示す。

以上の結果から、－P細胞は、β－カロテン等の抗酸化物質を膜に蓄積することにより、アルミニウムと鉄による脂質の過酸化から細胞膜を防禦し、アルミニウム耐性を獲得している可能性が考えられる。

1pG05

アルミニウムによるコムギ根の伸長阻害機構の解析

佐々木昌生、山本洋子、松本英明（岡山大・資生研）

アルミニウム(Al)による根の伸長阻害の機構について、コムギ（*Triticum aestivum* L.）根を用い、伸長域の細胞伸長に着目して検討した。

Al処理（20μM $AlCl_3$、pH4.75）を24または48時間した根において、伸長域の細胞の長さがコントロール（0μM $AlCl_3$）に対し、著しく低下していた。この伸長阻害の起こっている部位においては、リグニン様物質が沈着していることがフロログルシノールで染色することによって観察された。また、Al濃度に依存した伸長阻害の程度とリグニン様物質の沈着の程度が一致していた。さらにAl感受性の異なるコムギ2品種（耐性品種 Atlas 66、感受性品種 Scout 66）におけるAl感受性の程度とリグニン様物質の沈着の程度も一致した。

以上の結果から、Alによる根の伸長阻害の機構として、Alによる根の伸長阻害は細胞分裂よりも細胞伸長の阻害に依存していることが考えられ、根の伸長阻害はAl処理によって誘導された伸長域のリグニン様物質の沈着が細胞伸長を阻害することによって起こることが推察された。

1pG06

講演中止

1pG07

ユーグレナの耐塩性機構について

近藤智裕、竹中重雄、宮武和孝、中野長久
（大阪府大・農・応用生化）

淡水に生息する Euglena gracilis Z は種々の環境変化に対して秀れた適応能力を持つことが知られている。我々は E.gracilis が 200mM の塩（NaCl、KCl）存在下で生存し、塩ストレス負荷直後に貯蔵多糖であるパラミロン（β-1,3-グルカン）が急速に分解されることを見出した。今回、パラミロンからの生成物を同定し、その代謝経路および生理的意義について検討した。

細胞に塩ストレスを与えると 2 時間でパラミロン含量の約 30 %が減少した。^{14}C-グルコースを細胞に取り込ませ、放射性パラミロンを作成した後、塩ストレスを与えてパラミロンからの生成物を検討した。減少したパラミロンの放射活性は可溶性糖画分で回収され、HPLC による分析から生成糖はトレハロースであると同定した。塩ストレスを解除すると蓄積したトレハロースは急速に分解された。またトレハロースの合成量は外部塩濃度に依存することが明らかとなった。よって E.gracilis はパラミロンから適合溶質としてトレハロースを生成し、細胞内に蓄積して塩ストレスに適応すると結論した。

1pG08

高塩濃度下における光化学系Ⅰの循環的電子伝達系

日比野隆[1]，田中義人[1]，石川浩[1]，高倍昭洋[1,2]([1]名城大・理工，[2]名城大・総合研究所)

光化学系Ⅰの循環的電子伝達反応は光エネルギーにより獲得された酸化還元力の分配調節に重要な役割を果たすと考えられるが，その反応にはNADHデヒドロゲナーゼが関与することが示唆されている。我々は塩ストレスと循環的電子伝達反応の関係を明らかにすべく研究を進めているが，今回，1）高塩および低塩濃度の条件下におけるラン藻の循環的電子伝達反応活性，2）NADHデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現について検討したのでその結果について報告する。好塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* を 0.25 - 2.0 Mの塩濃度で生育させたときの光エネルギーの化学エネルギーへの変換効率を光音響分光法(PAS)で測定した。その結果，高塩濃度下で生育中のラン藻は低塩濃度と比較して，700-720nmの光エネルギー変換効率が高いことが明らかになった。また，液体窒素温度でのケイ光スペクトルを測定したところ，高塩濃度下では光化学系Ⅰのアンテナクロロフィルからのケイ光が強いことが明らかになった。我々はすでに*Aphanothece halophytica* のジェノミックライブラリーからndh I，ndh K遺伝子断片を単離しているので，それを大腸菌で発現させた蛋白質を抗原として抗体を作成した。抗体を用いて塩濃度とndh蛋白質の蓄積量の関係，およびndh蛋白質の構造について検討したのでその結果について報告する。

1pG09

浸透圧ストレスによる孔辺細胞の浸透圧調節物質の変化

浅井尚子，中嶋信美[1]，近藤矩朗[1]（筑波大・生物，[1]国立環境研・地域）

植物は乾燥に曝されると気孔を閉鎖して蒸散を抑制する。乾燥による気孔閉鎖には、葉肉細胞や根の細胞で合成され輸送されるアブシジン酸（ＡＢＡ）が関与しているが、孔辺細胞自身が乾燥を受けることも気孔閉鎖に関与している可能性がある。そこで、乾燥が孔辺細胞自身に及ぼす影響について調べた。

ソラマメ(*Vicia faba* L. cv. Otafuku)の葉の裏側表皮を0.4Mマンニトール溶液に浸潤(マンニトール処理)することにより、孔辺細胞に浸透圧ストレスを与え、乾燥の代わりとした。この処理を行うと気孔開度は低下し、その後マンニトールを含まない溶液に移す(処理の解除)と開度は回復した。次に、孔辺細胞の浸透圧調節物質の１つであるリンゴ酸の含有量を測定した。マンニトール処理により表皮のリンゴ酸含有量は増加し、処理解除によって減少した。また、0.4Mソルビトールで処理を行った場合にも、リンゴ酸の増加が観察された。一方、ＡＢＡ処理の場合、リンゴ酸含有量は減少し、処理解除で回復した。リンゴ酸含有量に対してＡＢＡと浸透圧ストレスの影響が異なることから、ＡＢＡによる気孔閉鎖と孔辺細胞が乾燥を受けることによる気孔閉鎖とはしくみが異なることが示唆される。

1pG10

GLYCINEBETAINE ENHANCES SALINITY TOLERANCE OF OXYGEN-EVOLVING COMPLEX OF PHOTOSYNTHESIS IN TRANSGENIC CYANOBACTERIA

Patcharaporn DESHNIUM, Hidenori HAYASHI, and Norio MURATA, Department of Molecular Biomechanics, The Graduate University for Advanced Studies, Okazaki, 444; National Institute for Basic Biology, Okazaki, 444

Glycinebetaine, a quaternary ammonium compound, is an osmoprotectant in halotolerant plants and bacteria. It can protect the photosystem II complex from inactivation under high-salt conditions. To study the effect of glycinebetaine on photosynthesis in *vivo*, we transformed the salt-sensitive cyanobacterium, *Synechococcus* PCC7942, with the *codA* gene for choline oxidase, which can oxidize choline to glycinebetaine. The transformant accumulated glycinebetaine at 60 mM and could grow in the medium containing 0.4 M NaCl (lethal conditions for the wild type). The significant enhancement of salt tolerance of oxygen-evolving complex was observed in the transformant when the cells were treated at 0.4-1.0 M NaCl in the light.

1pG11

イネはグリシンベタインを吸収し、耐塩性を獲得する。

筒井恭子、高倍昭洋[1]、野村美加、岸谷幸枝[2]、高倍鉄子(名古屋大学生物分子応答研究センター、[1]名城大学総合研究所、[2]東北大学農学部)

イネ幼苗は根からグリシンベタインを吸収し、葉に蓄積する。水耕培地に150mMのNaClを加えると、すみやかに葉の色が退色する。しかしながら培地中に15mMのグリシンベタインを加えると、退色は顕著に抑えられた。含水量、クロロフィル含量はともに塩ストレスにより減少するが、グリシンベタインの添加によりその減少速度は遅くなった。又光化学系IIの量子収率が顕著に減少したが、この減少もグリシンベタイン添加により抑制された。グリシンベタインの蓄積量は3μmoles/gFWに達し、イネは強い耐塩性を獲得した。多くのイネ科の植物はグリシンベタインを蓄積するが、イネは蓄積しない。しかしながらイネの先祖はグリシンベタインを蓄積したのかもしれないと演者らは推測している。

1pG12

イネ根のNa^+/H^+ｱﾝﾁﾎﾟｰﾀｰに対するｱﾐﾛﾗｲﾄﾞ誘導体の阻害効果

福田篤徳、小池説夫、田中喜之(農水省・生物研)

Na^+/H^+ｱﾝﾁﾎﾟｰﾀｰは、塩ストレスの回避に重要な働きをしていると考えられており、耐塩性の高い植物であるオオムギやテンサイなどで詳しく調べられている。その働きは、液胞内にH^+濃度勾配を利用してNa^+を能動的に取り込み、細胞内のイオンストレスを調整することにあると考えられている。耐塩性が比較的低い植物であるイネ根の液胞膜に、Na^+/H^+ｱﾝﾁﾎﾟｰﾄ活性が存在することが見い出された。このｱﾝﾁﾎﾟｰﾄ活性は、水耕液栽培のイネを100mMNaClで1時間処理すると対照区より2から3倍上昇した。本研究では、塩処理により誘導されたNa^+/H^+ｱﾝﾁﾎﾟｰﾄ活性について詳細に調べるために、動物細胞のｱﾝﾁﾎﾟｰﾀｰに対する拮抗阻害剤として知られているｱﾐﾛﾗｲﾄﾞの誘導体の阻害効果について検討した。塩処理1時間のイネ根より液胞膜小胞を遠心浮遊法によって調製した。ｱﾝﾁﾎﾟｰﾄ活性は、H^+-ATPaseによって液胞膜小胞内外に形成させたH^+濃度勾配をｱｸﾘｼﾞﾝｵﾚﾝｼﾞの蛍光消光によってモニターし、NaCl添加による小胞内からのH^+の排出を蛍光の回復として測定した。ｱﾐﾛﾗｲﾄﾞの誘導体として、methylisobutylamiloride、ethylisopropylamiloride、hexamethyleneamilorideを使用した。これらの誘導体は、それぞれイネのｱﾝﾁﾎﾟｰﾄ活性を拮抗的に阻害し、その見かけのKi値は耐塩性の高いオオムギで得られた値に近似していた。また、Na^+に対する見かけのKm値はイネとオオムギで似ており、これらの結果から、イネ根の液胞膜に存在するNa^+/H^+ｱﾝﾁﾎﾟｰﾀｰの性質はオオムギのものとよく類似していることが明らかになった。

1pG13

オオムギ根のNa^+/H^+アンチポーター

田中喜之、福田篤徳、小池説夫(農水省、生物研)

オオムギは、作物のなかでは高い耐塩性を有しており、この耐塩性に寄与する機構のひとつとして液胞膜に存在するNa^+/H^+アンチポーターが考えられている。このタンパクは液胞内に形成されたプロトンの濃度勾配を原動力として細胞質のNa^+をH^+と交換し液胞内に取り込みイオンストレスの回避と浸透圧の維持に働くとされ、NaCl処理にともない液胞内pHが上昇することからアンチポーターの存在が確められた。オオムギ根のNa^+/H^+アンチポーターについてNaCl活性変動及び酵素学的性質について報告する。水耕法によりオオムギを1週間生育させた後、0.1M NaClを含む水耕液において生育させ経時的に根を採取した。組織を磨砕後、遠心浮遊法により液胞膜小胞を調製した。プロトン輸送活性およびNa^+/H^+アンチポーター活性は、それぞれｱｸﾘｼﾞﾝｵﾚﾝｼﾞの蛍光消光およびNaCl添加による消光の回復により測定した。NaClを含まない水耕液で生育したオオムギ根のアンチポーター活性は低いレベルで一定していた。NaCl処理により動物細胞で見られる短時間内の活性化が観察された。この活性化はNa^+/H^+アンチポーターのみならずATPaseによるポンプ活性にも見られた。そののちde novo合成と考えられる活性の増加がつづき一日後に最大となり以後減少した。誘導されたアンチポーターについて、拮抗阻害剤であるｱﾐﾛﾗｲﾄﾞ誘導体(methylisobutylamiloride, ethylisopropylamiloride, hexamethyleneamiloride)の阻害効果を調べたところ、拮抗的に阻害され、そのKi値は耐塩性の高いテンサイで得られた値に近いものであった。

1pG14

オカヒジキ葉液胞膜Na^+/H^+アンチポーター

小池説夫、福田篤徳、田中喜之(農水省・生物研)

液胞へのNa^+の蓄積能は耐塩性の植物が備えるべき重要な機能の一つである。この機能を担うNa^+/H^+アンチポート活性の分子レベルでの理解のために、Na^+/H^+アンチポータータンパク質とその遺伝子の単離・同定をめざしている。材料として用いているオカヒジキ(*Salsola komarovii* Iljin)は、海岸の砂地に広く分布する耐塩性のアカザ科の一年草であり、葉液胞膜に高いNa^+/H^+アンチポート活性が存在する。

昨年度の本年会で、動物細胞のNa^+/H^+アンチポーター拮抗阻害剤アミロライドのアナログ「^3H」ーMIA(メチルイソブチルアミロライド)を用いたフォトアフィニティーラベリングにより葉液胞膜小胞にNa^+/H^+アンチポーターの候補タンパク質を見い出し、報告した。今回は、この候補タンパク質に標的を当てつつ、可溶化した液胞膜タンパク質の再構成系によるアンチポート活性測定法を確立して同定を進めたので、この結果を報告する。アンチポート活性は、プロトンポンプにより小胞内外に形成させたH^+濃度勾配をアクリジオレンジの蛍光消光によってモニターし、NaCl添加による小胞内からのH^+の排出を蛍光の回復として測定する。このために、プロトンポンプとして、オカヒジキ葉・モヤシマメ胚軸・カボチャ胚軸等の液胞膜から部分精製したPPase(ピロフォスファターゼ)を用いた。大豆リン脂質とコレステロール(20%w/w)とからなるリポソームにPPaseと、可溶化液胞膜タンパク質のイオン交換クロマトグラフィー等の溶出画分とを同時に再構成させた小胞を用いてアンチポート活性を測定した。

1pG15

トウモロコシC４型ＰＥＰカルボキシラーゼのリン酸化／脱リン酸化による活性調節機構

上野宜久、薮田尚弘、小川紀之、畑信吾、泉井桂
（京都大・農・農生）

トウモロコシC４回路において初期炭酸固定を行うホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC) は明条件下でリン酸化を受け、フィードバック阻害因子であるリンゴ酸に対する感受性が低下することが知られている。我々はこのリン酸化部位がSer-15であること[1] およびリン酸化酵素(PEPC-PK)がCa^{2+}依存性であること[2] を報告した。今回は（１）PEPC-PKの精製と性質、および（２）リン酸化部位および周辺に変異を導入したPEPCの作成と性質について報告する。

（１）Ca^{2+}依存性のPEPC-PKを種々のクロマトグラフィーを経て精製し、純度70%以上の標品を得た。本酵素によるPEPCのリン酸化部位がSer-15であることは、リン酸化酵素のHPLC分析およびN末端合成ペプチドのリン酸化反応によって確かめた。本酵素は分子内にCa^{2+}調節部位をもつと推定された。

（２）PEPC-PKによって認識されるPEPC上のアミノ酸配列について知見を得るため、まずトウモロコシC４型PEPCのcDNAを大腸菌において比較的大量に発現するプラスミドを作成し、つぎにこのプラスミドに部位特異的変異を導入し、Lys-12をAsnやGlyに置換したものおよびSer-15をAspに置換した変異酵素を調製した。これらの変異酵素の性状やリン酸化の有無について検討中である。

1) FEBS Lett. 259, 241 (1990), 2) ibid. 302, 86 (1992)

1pG16

Caffeineは細胞質のCa^{2+}濃度上昇とは無関係に*Nitella*の細胞質流動を阻害する

加藤薫、菊山宗弘（放送大学・生物）

ミルフラスモ(*Nitella axilliformis*)の細胞質流動は細胞質のCa^{2+}濃度上昇で停止する。一方、動物細胞のERからのCa^{2+}遊離を促すcaffeineでも、流動が阻害される事が報告されている。本研究では細胞質流動の流速と細胞質のCa^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)に対するcaffeineの作用を検討した。

Ca^{2+}を含む溶液中でcaffeineを投与すると$[Ca^{2+}]_i$の上昇と細胞質流動の流速の低下が生じた。$[Ca^{2+}]_i$の上昇は外液のCa^{2+}に依存し、EGTAを含む溶液中では小さくなった。一方、流速の低下は、外液のCa^{2+}とは無関係で、EGTAを含む溶液中でも見られた。EGTAを注射した細胞をEGTAを含む溶液中に置いてcaffeineを投与すると、$[Ca^{2+}]_i$の上昇は生じなかったが、流速の低下は生じた。上記のいずれの場合も、caffeineを洗い流すと流速は投与前のレベルに回復した。これらの事実から、caffeineは細胞質のCa^{2+}濃度とは無関係に細胞質流動を阻害する事が示唆される。

1pG17

液胞はヒメフラスモ細胞質の水和によるカルシウム動員には関与しない

菊山宗弘、島田希代、田沢仁[1]（放送大学・生物,
[1] 福井工大・応用理化学）

ヒメフラスモでは、細胞質が吸水すると一過性の細胞質カルシウム濃度の上昇 ($\Delta[Ca^{2+}]_c$) が起こる。 この $\Delta[Ca^{2+}]_c$ は細胞質の水和による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} の放出 (Hydration Induced Ca^{2+} Release; HICR) による。本研究では HICR に液胞が関与しているか否かを検討した。

10 mM KCl で長時間処理したヒメフラスモの節間細胞にエクオリンを注射した。この細胞をさらに短時間 5 mM EGTA で処理した後、３つのプールを持った液胞潅流用のチェンバーの上に細胞を置き、中央プールをシリコンオイルで満たした。膨圧消失後、液胞をソルビトールで等張 (300 mOsm) とした Ca^{2+} を含まない人工池水で潅流・置換した。次いで低張 (150 mOsm) の Ca^{2+} を含まない人工池水で潅流したところ、顕著なエクオリンの発光が認められた。 このことは HICR 機構には液胞は直接には関与していないことを示している。

1pG18

シャジクモ類細胞質の水和によるカルシウム動員

島田希代、菊山宗弘、田沢仁[1]（放送大学・生物,
[1] 福井工大・応用理化学）

ヒメフラスモにおいては、細胞横断浸透または浸透的膨潤の際に細胞質流動が停止する。これは、細胞質の水和によって細胞内の貯蔵器官よりカルシウムの動員が起こり細胞質カルシウム濃度の上昇が起こるためと考えられている。そしてこの現象はヒメフラスモに特異的なものであるとされていた。

今回われわれはミルフラスモとオオシャジクモを用いて浸透的膨潤などによって細胞質を水和させたところエクオリンの発光が見られ、細胞内のカルシウム動員を確認することが出来た。ただしこれらにおけるエクオリンの発光強度すなわち、細胞質カルシウム濃度の増加の程度はヒメフラスモと比較すると非常に小さいものであった。この結果は、細胞質水和によるカルシウム動員はヒメフラスモに特異的なことではなく、他のシャジクモにも普遍的な現象であるという可能性を示している。

一般講演
第２日　３月29日（水）

一般講演

第2日　3月29日（水）　午前の部

A会場　生長制御（2）
B会場　形態形成（1）
C会場　環境応答（3）
D会場　光合成（5）
E会場　光合成細菌・シアノバクテリア（1）
F会場　オルガネラ（1）
G会場　蛋白質・酵素（2）
I会場　遺伝子発現（3）

2aA01

シロイヌナズナ*phyB*変異株の茎の重力屈性反応について

深城英弘、田坂昌生、藤澤久雄　(京大・理・植物)

植物の茎は重力刺激に対して負の屈性反応を示す。この分子機構を解明するために、我々はシロイヌナズナを用いて生理学的・遺伝学的解析を行なっている(94年度本学会)。この植物の野生株は花茎と胚軸が負の重力屈性を示す。最近、胚軸の重力屈性反応にフィトクロムBのPr型が必要であることが変異株を用いた解析によって示された(Liscum et al., 1993. Plant Physiol.103:15-19)。そこで本研究では、花茎の重力屈性反応にもフィトクロムBのPr型が必要かどうかを明らかにするために、野生株(Landsberg *erecta*)とフィトクロムB欠損変異株*phyB-1*の重力屈性反応について調べた。白色光下で生育した*phyB-1*変異株の胚軸は異常な重力屈性反応を示した。それに対して、*phyB-1*変異株の花茎は野生株と同様に正常な重力屈性反応を示した。また*phyB-1*変異株の根も異常な重力屈性反応を示した。これらの結果から、*PHYB*遺伝子は根と胚軸の重力屈性反応に必要であるが、花茎の重力屈性反応には必要でないことが示唆された。このことは胚軸と花茎の重力屈性反応の機構の一部が遺伝的に異なるという我々の仮説(94年度本学会)を支持する。

赤色光下で生育した野生株の胚軸はフィトクロムBがPfr型になっているために正常な重力屈性反応を示さない(Liscum et al., 1993)。そこで花茎の重力屈性反応に対する赤色光の影響を知るために、現在、赤色光下で生育させた野生株の花茎および赤色光で処理した野生株の花茎の重力屈性反応について調べている。また*PHYA*遺伝子の花茎の重力屈性における役割についても*phyA*変異株を用いて解析している。

2aA02

光依存型重力屈性を示すトウモロコシ一次根の暗下における重力刺激による内生の拡散性IAAの求基的移動とCa^{2+}の役割

鈴木　隆、村田　透、高橋宏之(山形大・教育)

我々は、光依存型重力屈性を示すトウモロコシの一次根が暗下でも重力刺激によって伸長が抑制されること、さらに、この伸長抑制には根冠アポプラストにおけるH^+と遊離型Ca^{2+}の濃度上昇が関与していることを明らかにした。しかし、伸長域で伸長抑制を制御している物質については不明である。

根端1mmを除去した5mm切片を用いて、根端側にCa^{2+}やIAA、ABAを含む寒天片を付け、伸長に及ぼすこれらの効果を調べたところ、IAAだけが切片の伸長を抑制した。この結果は、IAAの伸長抑制への関与を示唆している。そこで、内生の拡散性IAAの動向と重力刺激との関係を調べた。暗下で重力刺激を与えた根の先端から3mmまでの各1mm切片を脱イオン水に浸し、拡散してくるIAAを内生の拡散性IAAとして、インドロ-α-パイロン法と蛍光検出フローインジェクション分析法を用いて測定した。1-2mmと2-3mm切片における拡散性IAA量は、重力刺激後それぞれ20分と40分で最大になる一過性の変化を示した。そこで、根冠におけるCa^{2+}と拡散性IAAの動向との関連性を調べるため、根冠を10mM緩衝液やCa^{2+}を含む10mM緩衝液、5mM EGTAで処理した。緩衝液だけやEGTA処理区では、重力刺激による拡散性IAAの求基的移動は観察できなかった。一方、Ca^{2+}を含む緩衝液処理区では求基的移動が観察された。これらの結果は、重力刺激によるIAAの求基的移動に根冠アポプラストでのCa^{2+}の上昇が関与していることを示唆している。

2aA03

根の水分屈性における水ポテンシャル勾配の根冠による感受とカルシウムの役割

高野　守・高橋秀幸・菅　洋(東北大・遺生研)

根の水分屈性における水分勾配感受機構を明らかにするために，1 mm^3の寒天片に各種濃度のソルビトールあるいはカルシウムを含ませ，それを重力屈性欠損突然変異体のエンドウ(*ageotropum*)の根冠あるいは伸長帯の片側に付着させて根の屈曲を調べた．

その結果，ソルビトールを伸長帯に不均等に処理すると，根は比較的高濃度のソルビトールを含む寒天片側にわずかに屈曲した．一方，根冠処理では，0.5-2 MPaのソルビトール寒天片によって，根はソルビトールとは反対側に屈曲することがわかった．この根冠へのソルビトール処理による根の屈曲は，EGTAの前処理によって阻害され，EGTAをカルシウムで置き換えると回復した．また，根冠の片側にカルシウムを含んだ寒天片を与えると，根はソルビトールの場合と同様にカルシウム寒天片とは反対側に大きく屈曲した．このカルシウムによる根の屈曲は，一定の水ストレスを前処理として与えることによって促進された．

以上の結果から，根の水分屈性は根冠による水ポテンシャル勾配の感受によって生じ，その感受機構にカルシウムが関与するものと考えられた．

2aA04

エンドウ(Pisum sativum L.)の根の水分屈性における屈曲の機構

平沢　正，高橋秀幸[1]，菅　洋[1]，石原　邦(東京農工大・農，[1]東北大・遺生研)

重力屈性を欠くエンドウの突然変異種 Ageotropum を用い，一定の空気湿度勾配を維持できる実験系で根が水分屈性によって屈曲する機構を，(1),(2)式に基づいて検討した。

$dV/Vdt = m(\Psi p - Y)$--(1)，　$dV/Vdt = L(\Psi o - \Psi w)$--(2)

(dV/Vdt:相対生長速度(V:細胞の体積)，　m,Y:それぞれ生長している細胞の細胞壁の伸展係数と降伏圧，L:水伝導度，Ψp, Ψw, Ψo:それぞれ生長している細胞の膨圧，水ポテンシャルおよび生長している細胞に水を供給する組織の水ポテンシャル)

水分屈性によって高湿度側に屈曲しつつある根の伸長部の相対生長速度は低湿度側が高湿度側に比較して大きかった。そこで，根を縦に二分割して高湿度側と低湿度側に分け，それぞれの生長のパラメータを測定した。その結果，(i) 根の伸長部，成熟部の水ポテンシャルは，それぞれ高湿度側と低湿度側との間で相違はなく，(2) 式から組織の水伝導度が低湿度側で大きいと推察された。(ii) 根の伸長部の膨圧と降伏圧は高湿度側と低湿度側とで相違はなく，伸長部の細胞壁のplastic extensibility は低湿度側で大きかった。

以上のことから，水分屈性における根の屈曲は，低湿度側が高湿度側に比較して組織の水伝導度が大きく，伸長部の細胞壁の伸展係数が大きいことによって起こることがわかった。

2aA05

全暗条件における藍色細菌*Synechocystis* sp. PCC 6803の概日性リズム

青木摂之、近藤孝男、和田元[1]、石浦正寛
(基礎生物学研究所、[1]九州大・理・生物)

Synechocystis sp. PCC 6803（以下6803と略記）は形質転換可能な単細胞性藍色細菌である。我々は、6803の*dnaK*遺伝子（ヒートショック蛋白質の一つDnaKをコードする）のプロモーターを含むDNA断片の下流に発光細菌のルシフェラーゼ遺伝子（*luxAB*)を遺伝子発現のレポーターとして接続し、この融合遺伝子(*PdnaK::luxAB*)によって野生型の6803を形質転換した。形質転換体からの発光の変動を解析することによって6803の*dnaK*遺伝子の発現が生物時計により制御されていることを明らかにした（前回の年会で報告）。

6803は光合成による光独立栄養生活を営み、通常全暗条件においては生育できないが、グルコース存在下で増殖し一日2時間ずつ光照射時間を短くしていけば、最終的に一日10分間の弱光パルスを与えるだけで従属栄養生活が可能になる。この株を上記の*PdnaK::luxAB*で形質転換した。数日に渡って一日の同じ時刻に15分間の弱光パルスを形質転換体に与え、その後全暗条件に置くと約一日周期の発光リズムが観察され、最低４日間は継続した。また15分の光パルスによって発光リズムの位相は変化した。現在、この光による位相変位の波長依存性を解析中である。

2aA06

藍色細菌*Synechococcus* sp. PCC7942の短周期型生物時計突然変異体SP22の相補遺伝子のクローニングとその解析

沓名伸介、青木摂之、近藤孝男、石浦正寛
基礎生物学研究所

ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ藍色細菌*Synechococcus* sp.PCC7942（以後AMC149と呼ぶ）の短周期型生物時計突然変異体SP22（周期が２２時間になった株）の変異を相補する遺伝子をクローニングするために、ゲノムDNAライブラリーを大腸菌との接合を利用してSP22に遺伝子移入し、ゲノムに組み込んだ。形質転換体の中から周期が野生型（約２４時間）に戻った相補体SP22Cを分離した。SP22Cのゲノム DNAを調製し、ベクター部分のpBR322をプローブに用いていろんな制限酵素で切断し、SP22C のゲノムDNAのSouthernblotting解析を行なった。ベクターの外側で切れる制限酵素*Kpn*Iで切断し、T4DNAライゲース で環状化し、組み込まれたDNAライブラリー断片をプラスミドpS1K1として大腸菌に回収した。突然変異体SP22をpS1K1で形質転換すると、２４時間周期に相補された。したがってpS1K1はSP22の相補遺伝子を含んでいる。他の突然変異体に対してもpS1K1を遺伝子移入したが、突然変異形質は相補されなかった。現在pS1K1を解析中である。

2aA07

ゲノムDNAライブラリーによる藍色細菌の生物時計変異の相補

石浦正寛、青木摂之、沓名伸介、近藤孝男（基礎生物学研究所）

バクテリアルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ藍色細菌*Synechococcus* sp. PCC7942を変異原EMSで処理し、生物発光リズムの周期や振幅、波形などが異なる多様な突然変異体をおよそ４０種類分離した(Kondo *et al.*, 1994. *Science*266:1233-1236)。この藍色細菌は交雑できないので、これらの変異が異なる遺伝子座に位置するかどうかは、現時点では明らかでない。これらの変異を相補する遺伝子をクローニングするために、置換型や自己増殖型のゲノムDNAライブラリーを作成し、各突然変異体に遺伝子移入して、それぞれ相補体を探索した。その結果、これまでに２０種の変異で相補体が得られ、そのうち４つの遺伝子を大腸菌に回収した。現在これらの遺伝子が異なる遺伝子であるかどうかを遺伝子移入で確認しつつあり、遺伝子の解析についても報告したい。

2aA08

概日性時計による藍色細菌の遺伝子発現制御：ルシフェラーゼによるプロモータートラップ

近藤孝男、Y.LIU[1], N. F. TSINOREMAS[2], Carl.H. JOHNSON[1], Susan S. GOLDEN[2], 石浦正寛　(基礎生物学研究所, [1]Vanderbilt 大 生物、[2]Texas A&M University, 大 生物)

我々は概日性時計によって制御される遺伝子群を包括的に解析することを試みた。まずゲノムのランダムな小断片とルシフェラーゼの融合遺伝子を作製し藍色細菌のゲノムに挿入した。プロモーター領域を挿入されたクローンはその強度に依存して生物発光を示す。冷却CCDカメラでスクリーニングし、我々は約800個の発光クローン、即ち、ルシフェラーゼ遺伝子によって発光するプロモーターのライブラリ-を得た。これらのライブラリ-クローンの生物発光の時間経過を調べると、過半数がAMC149と同じ位相のリズムを示した。この藍色細菌の概日性時計は*psbAI*遺伝子と同じパターンで多くの遺伝子の転写を制御しているようである。また１０%程度のクローンは４時間位相が前進しており、２０%程度のクローンは１０時間ほど前進していた。従って藍色細菌の概日性時計は少なくとも3つの異なった時刻に遺伝子発現を活性化していると思われる。今後、これらのプロモーターおよびその下流遺伝子の解析を行なうことにより、将来は概日性時計による遺伝子発現制御の全体像を把握したいと考えている。

2aA09

アカパンカビのクロルプロマジン変異株のリズムの性質

鈴木さくら・片桐 敏・中島秀明　（岡山大・理・生物）

アカパンカビの概日性の分生子形成リズム（21.6時間）は、クロルプロマジン（ＣＰＺ）などのカルモジュリンアンタゴニストでの処理により、位相変化が起きる。このことから、アカパンカビの時計機構にはカルモジュリンが関与している可能性が強いと考えられる。したがって、カルモジュリンアンタゴニストに対する感受性が変異した株では、その部位が変異して、その結果リズムの性質が変わる可能性のあることが期待される。この想定のもとに、ＣＰＺの感受性変異株の分離とその解析を試みた。レプリカ法により17,000コロニーを調べた結果、高感受性変異株としてcpz-1、*cpz-2*、cpz-3の3株の分離に成功した。これら3株はすべて単一遺伝子変異株であり、その遺伝子座はそれぞれ異なっていた。これらの株の、分生子形成リズムの周期、位相は阻害剤による処理を行わなかった場合、野生株と変わらなかった。ついで、ＣＰＺによる分生子形成リズムへの影響を調べた。この結果、*cpz-2*では、ＣＰＺによる、位相変化、周期の短縮、光による位相変化の阻害、のいずれも観察されず、時計機構に関してはＣＰＺに対して不感受性であることがわかった。*cpz-2*が単一遺伝子変異株であることから、これら3つの反応には同じ一つの遺伝子が関与していると考えられる。一方、cpz-1は低濃度のＣＰＺで大きな位相変化と周期の短縮を起こし、ＣＰＺ高感受性である可能性を示した。また、cpz-3は野生株と同様のＣＰＺ感受性を示した。現在、*cpz-2*に関して、その感受性を利用してコスミドライブラリーからのシブセレクションによるクローニングを試みている。

2aA10

アカパンカビの第三染色体の中心体領域に位置する *acr-2* および *thi-4* 遺伝子のクローニング

秋山正志、中島秀明　（岡山大・理学部・生物）

我々はアカパンカビの第三染色体の中心体領域に位置する時計遺伝子、*prd-1* への染色体歩行の第一段階として、近傍に位置すると考えられる２つの遺伝子、*acr-2*（acriflavin 耐性）と *thi-4*（thiamine 要求性）遺伝子のクローニングを行った。*acr-2* 変異株由来のコスミドライブラリーを用いたシブ選択の結果、最終的に異なる２つのコスミドから、野生株に acriflavin 耐性を与える 4.8kb の KpnI 断片と *thi-4* 変異を相補する 3.2kb の SalI 断片を得た。RFLP 分析の結果、これらの断片は第三染色体の中心体領域に位置づけられ、互いに連鎖していることが確認された。

現在、ゲノムの塩基配列を決定するとともに、cDNA クローンの同定およびノーザン解析を行っている。

2aA11

アカパンカビの硫黄代謝に関わる遺伝子、*cys-9*、のクローニングとその解析

小内清、高柳健二、中島秀明　（岡山大・理・生物）

アカパンカビの概日性リズムは分生子形成リズムとして観察され、これまでに多くの時計変異株が分離されている。これらは周期のみに着目して分離され、ほとんどの場合、生長や基礎代謝に異常を持たない。しかし、時計機構が基礎代謝から独立しているのか未だ不明である。硫黄代謝に異常を持つシステイン要求性変異株、*cys-4* 株と *cys-12* 株、でも周期の短縮が報告されているが（Feldman and Widelitz, 1977）、これは生長の低下する硫黄源の半欠乏条件下の現象である。

我々は、硫黄代謝変異株の一つである *cys-9* 株で周期の短縮を見いだした。この周期の短縮は、硫黄源の欠乏状態に依存せず、生長が野生株と同等に回復する条件下であっても観察された。そこで、硫黄代謝の時計機構への関与を分子レベルで検証するために、はじめに *cys-9*+遺伝子のクローニングを試みた。その結果、*cys-9*+遺伝子を含むゲノムDNA断片(約2.4kb)を同定し、その全塩基配列を決定した。現在、単離したcDNAの塩基配列の決定を行っている。また、遺伝子破壊やノーザン解析等も行い、この遺伝子の時計機構への関与を検討した。

2aA12

アサガオ芽生えにおける dihydrokaempferol-7-*O*-β-D-glucoside の日長処理による移動量の変化

中西　史、藤伊　正　（筑波大　生物）

我々は先にアサガオの花芽形成促進物質としてdihydrokaempferol-7-*O*-β-D-glucoside（DHK-glc）を同定し、あわせてこの物質の子葉での含量は日長処理により変化しないことを発表した。今回ＥＤＴＡ法により子葉からの師管滲出液を採取し、日長処理によるＤＨＫ-glcの移動量の変化を調べ、アサガオの花芽分化の特性を活性物質の移動から解析することを試みた。16時間の誘導暗期処理によりＤＨＫ-glcは暗処理開始後12時間目以降2-3倍の上昇を示した。この上昇は暗期終了後8時間ほど維持された後、もとのレベルまで減少した。16時間暗期中に光中断処理を行ったものやより短い時間の暗処理では、暗期開始後12時間目でのＤＨＫ-glcの一時的な上昇は見られたものの直ちに減少した。これらの結果はアサガオの花芽分化時に物質の移動段階での制御が存在する可能性を示すものである。

2aA13

コムギ非休眠性突然変異系統の種子胚で消失したタンパク質のcDNAクローニングと発現解析

川上直人、野田和彦（横浜市大・木原生研）

休眠を持つコムギの系統、北系1354の種子胚には蓄積するが、北系1354より得られた非休眠突然変異系統、および休眠を持たない品種チホクコムギの種子胚には蓄積しないタンパク質、ポリペプチドeを見いだした。このタンパク質の機能を解明するため、内部アミノ酸配列をもとに作成した縮重プライマーを用い、RT-PCR法によりcDNA断片を増幅した。このcDNA断片をプローブとして発現解析を行ったところ、黄化葉、緑葉、根、および胚以外の種子組織での発現は見られず、胚でのみ1.1kbの転写産物が見いだされた。胚においては、種子発達過程の中期で最も高い発現が見られた。休眠を持つ完熟種子を吸水させても、この転写産物量に変動は見られないが、後熟により休眠を失った種子を吸水させた場合、つまり発芽過程では速やかに消失した。これらの発現様式は、この遺伝子が種子の休眠と関わりを持つことを予想させる。完全長cDNAを単離するため、RT-PCR法で得られたcDNA断片をプローブとし、発達中期の種子胚から調製したcDNAライブラリーをスクリーニングした。完全長と思われる7クローンを選抜し、その制限酵素地図を作成したところ、少なくとも3種に分類された。

2aB01

mRNAディファレンシャルディスプレイ法による頂芽優勢関連遺伝子の検索

上口（田中）美弥子、森仁志（名大・農・生化学制御専攻）

頂芽の切除が、側芽の成長を引き起こすことは植物生理学ではよく知られた現象である。この現象は、主にオーキシンによる抑制とサイトカイニンのよる誘導のバランスによって制御されていると考えられているが、その分子機構はほとんど明らかにされていない。我々は微量発現遺伝子の検索方法として最近注目されているディファレンシャルディスプレイ法を用いて関連遺伝子の検索を試みた。

播種後6日目のアラスカエンドウの頂芽を切除した後、経時的に側芽からRNAを調製して鋳型とした。PCR反応は^{35}S-dATP存在下で、プライマーとして4種のCCCGGATCC(T)15-(G/A/C)(G/A/T/C)および任意に選択した12merオリゴヌクレオチドの組合わせを用いた。PCR産物を6%urea-PAGEで解析したところ、頂芽切除後の側芽でのみ発現量の変化を示すPCR産物が検出された。その発現量の変化は、頂芽切除後1時間で最大になるものから、24時間まで徐々に増加するものなど様々であった。それらのPCR産物をクローニングしてノザン解析を行ったところ、いくつかのクローンについては頂芽切除後の側芽で特異的に発現していることが確認された。

現在、発現量の変化を示すクローンをさらに検索し、発現様式を比較すると共に、完全長cDNAのクローン化を行っている。

2aB02

Ac 因子と部位特異的組換えを利用したシロイヌナズナ突然変異体の分離

尾之内均、小泉順、工藤光子、町田千代子[1]、町田泰則（名大・理・生物、[1]新技術事業団さきがけ研究21）

我々はトウモロコシのトランスポゾン *Ac* 因子と醤油酵母の R/RS 部位特異的組換え系を利用して、シロイヌナズナにおいて *Ac* 挿入変異や欠失変異を誘導し、形態異常を示す変異株の分離を行っている。そのためにまず、RS 配列（組換え酵素 R タンパク質により認識される 58 bp の配列）を含む非自律因子 dAc-RS ともう一つの RS 配列を持つ T-DNA ([RS/dAc-RS]T-DNA) を作製した。それをシロイヌナズナに導入し、その中からこの T-DNA が第一染色体マップポジション 80 付近に挿入された系統について、*Ac* 転移酵素遺伝子を持つシロイヌナズナと交配し、dAc-RS の転移を誘導した。現在までに dAc-RS が転移再挿入した個体が 100 系統得られており、その中から 4 種類の形態異常を示す変異株が分離されたが、そのうち 3 種類は dAc-RS の挿入による変異ではないことが既にわかった。また、dAc-RS の転移距離を物理的に測定したところ、これまでに 27 系統中 11 系統は dAc-RS が元の位置から 1000 kbp 以内の近傍に転移していることがわかった。さらにそのうちの 6 系統では元の位置から 10 kbp 前後の非常に近い部位に転移していた。また、12 kbp 離れた部位に転移した dAc-RS を持つ個体を R タンパク質遺伝子を持つシロイヌナズナと交配し、RS配列間の組換えを誘導したところ、F1個体の体細胞において 12 kbp の染色体の欠失が検出された。現在、dAcRS が近傍に転移した他の系統についても染色体の欠失を誘導し、表現型の変化がみられるかどうか調べている。

2aB03

*OSH1*遺伝子を導入したタバコでの内生植物ホルモン量の変化

草場新之助、村上（嘉納）ゆり子、松岡信[1]、 玉置雅紀[2]、山口五十麿[3]、福元將志（農水省・果樹試、[1]名大・分子応答、[2]筑波大・生物科学、[3]東大・農・農化）

イネホメオボックス遺伝子*OSH1*は、イネ、アラビドプシス、タバコ等においてその形態を変化させることから、植物の形態形成に重要な役割をもつ遺伝子であることが示唆されているが、その作用機構は明らかになっていない[1)2)]。我々は、このような形態変化の機構を明らかにする目的で、*OSH1*の導入により形態が変化したタバコを用いて、内生植物ホルモン量の解析を行った。対照及び*OSH1*導入タバコ葉についてインドール酢酸(IAA)、アブシジン酸(ABA)はGC/MSによる内部標準法、ジベレリン(GA)1、4及びサイトカイニンであるゼアチン(Z)、ゼアチンリボシド(ZR)はELISA法により定量した。対照と比較して*OSH1*導入タバコでは、形態変化の程度が大きくなるほどGA_1,GA_4は少なくなり、ABAは多くなった。また、Z（活性型）量が増加するとともに、ZR（不活性型）に対するZの比（Z/ZR）が増加した。一方、*OSH1*導入タバコにGA_3を与えた場合、節間伸長の回復、葉の形態の部分的な回復が認められたが、対照と同程度までには回復しなかった。これらのことから、OSH1による形態変化には複数の植物ホルモンが総合的に関与していると考えられる。

1)Matsuoka et al., Plant Cell 5, 1039-1048 (1993)
2)Kano-Murakami et al., FEBS 334 , 365-368 (1993)

2aB04

シロイヌナズナのサイトカイニン高感受性変異株の単離と解析

久保　稔、柿本辰男　（大阪大・理・生物）

植物ホルモンの１種であるサイトカイニンには組織培養系において、カルスの緑化、シュート誘導などの作用が観察されるが、その分子機構についてはほとんど知られていない。そこで私たちは、これらの機構について調べるために、シロイヌナズナを用いてサイトカイニンに対する感受性が変化した突然変異株の単離を試みた。野生型の場合、オーキシンと高濃度のサイトカイニンを含むカルス誘導培地での培養で、サイトカイニンの効果の一つであるカルスの緑化がみられるが、サイトカイニン濃度を低くした条件下ではこの現象はみられない。そこで、EMS により変異処理をしたシロイヌナズナ・ランズバーグ株のＭ２世代の10日目の芽生え(80,000 株)の下胚軸から得た切片を低濃度のサイトカイニンを含むカルス誘導培地（2,4-D 200ng/ml,kinetin 25ng/ml)上で、光条件下で11日間培養し、緑色で増殖の早いカルスを選び、個体再生を経て、Ｍ３種子を得た。そのうちの７系統については、低濃度のサイトカイニンを含むカルス誘導培地でその形質が遺伝することを確認した。また、そのうちの１系統についてはシュート誘導についてもサイトカイニンの影響を調べ、低濃度のサイトカイニンを含むシュート誘導培地でもシュート誘導が起こることが観察された。現在、得られた変異体の変異の起こった染色体上の部位のマッピングをおこなっている。

2aB05

過剰発現によりシロイヌナズナにサイトカイニン非依存性を与える遺伝子

柿本辰男　（大阪大学・理・生物）

シロイヌナズナのカルスにサイトカイニンを作用させるとカルスの増殖、緑化、シュート形成がおこる。野生型シロイヌナズナのカルス５０,０００個をアグロバクテリアを用い、pPCVICEn4HPT (Richard Walden に頂いた)で形質転換した。pPCVICEn4HPTにはCaMVのエンハンサーが４つタンデムに入っており、形質転換にともなって植物ＤＮＡに挿入され、周辺の植物ＤＮＡの転写を活性化すると考えられている。サイトカイニンに関連した遺伝子の近傍に挿入されればサイトカイニン非依存的にサイトカイニンの作用が現われることが期待される。私は上記の形質転換カルス５０,０００個をスクリーニングすることによってサイトカイニン非依存的にカルスの増殖、緑化、シュート形成を行なう変異体を５個体得た。これらの形質転換体は不稔であった。挿入ＤＮＡが１コピーであった変異体よりpPCVICEn4HPTの植物ＤＮＡに挿入された部分とそれに隣接する植物ＤＮＡ９ｋｂを含む１５ｋｂのＤＮＡを回収した。このＤＮＡ断片を野生型シロイヌナズナに導入したところ、やはりサイトカイニン非依存的なカルスの増殖、緑化、シュート形成が起こった。これらの結果よりここで回収されたＤＮＡ断片には過剰発現によりシロイヌナズナにサイトカイニン非依存性を与える遺伝子が含まれていると考えられる。現在この遺伝子のクローニングを行なっている。

2aB06

葉形態形成に関する遺伝子間相互作用 --アラビドプシスを用いた発生遺伝学的解析

塚谷裕一・松浦京子[1]・柘植知彦・内宮博文（東京大・分生研、[1]東京理科大・基礎工）

葉は、シュートの形態形成を考える上で重要な鍵となる器官である。しかし見かけの単純さに反して、双子葉植物の葉の発生様式は複雑であり、その発生を司る仕組みは未だ解明されていない。我々はその解明をめざし、双子葉植物のモデルとして好適な材料であるアラビドプシス(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)を用いて、葉の形態形成に関する発生遺伝学的解析を進めている。

これまで葉の展開過程において、葉細胞の体積増加を司る因子として*ACL1*, *LAN1*遺伝子、また葉細胞の伸長方向を極性に基づいて制御する因子として*AN*, *ROT3*遺伝子の存在を明らかにしてきた。葉の形態形成を司る遺伝的ネットワークをさらに明らかにするためには、鍵となる遺伝子についてさらに同定を進め、相互作用を決定してゆく必要がある。特に*AN*遺伝子に関しては、我々の発生遺伝学的解析から、未知の遺伝子と相互作用することが予測されている。そこで今回、*an*変異体をさらに変異原処理することによって、*AN*遺伝子と相互作用する新たな遺伝子の同定を試み、いくつかの候補を得たので、これらについて報告する。また、これまでに単離した変異体について二重変異体を作成した結果も併せて、葉の形態形成を司る遺伝的ネットワークについて考察する。

2aB07

シロイヌナズナの子葉形成異常突然変異株*cup*の解析

石田哲也、田坂昌生、藤澤久雄　（京都大・理・植物）

双子葉植物は胚発生の過程で球状の胚から二枚の子葉を形成する。私たちは子葉形成における調節機構を明らかにするために、シロイヌナズナ(Landsberg *erecta*)から二枚の子葉が縁で融合してカップ状になった(カップ型)突然変異株を単離し、その形態から*cup*と名付けた。カップ型の芽生えはカップ状の子葉の中心に頂芽分裂組織が存在せずそのまま死に至る。この突然変異株の系統を維持しているヘテロ接合体の次世代の表現型を調べたところ、その芽生えの約1/4がカップ型となり、残り約3/4の多くは野生型の芽生えではあるが一部は二枚の子葉の片側の縁どうしが融合したハート型の子葉を持つ(ハート型)芽生えとなった。ハート型の芽生えは正常な発生を行い、次世代の表現型の解析よりそのほとんどがヘテロ接合体であることが解った。このことから*cup*変異は不完全優性であり、ホモ接合体はカップ型となりヘテロ接合体の一部はハート型となると考えられる。またシュート形成能の有無を調べるためカップ型の芽生えの胚軸からカルスを誘導し植物体を再生させたところ、ほぼ正常な葉および花茎が形成された。しかし花の器官では、がくの融合・おしべの融合や数の減少などの様々な異常が見られた。このことは*CUP*遺伝子産物が(1)子葉形成だけでなく花器官形成過程の調節にも関与している(2)頂芽分裂組織形成には直接関係しないことを示唆している。シロイヌナズナの融合した子葉を形成する突然変異株として、すでに*pin1-1*と*emb30*(*gnom*)が取られている。*cup*変異と*pin*変異との相補性試験を行なったところ、*CUP*遺伝子と*PIN*遺伝子は異なることが示唆された。現在*cup*変異と*emb30*変異との相補性試験を行なっている。

2aB08

シロイヌナズナの根再分化に関する温度感受性突然変異体の解析

杉山宗隆（東北大・理・生物）

シロイヌナズナの胚軸を数日間 CIM（カルス誘導培地、0.5 mg /L 2,4-D と 0.1 mg/L カイネチンを含む B5 培地）で前培養後、RIM（発根誘導培地、0.5 mg/L IBA を含む B5 培地）に移植すると、外植片全体に旺盛な不定根形成が誘導される。この根再分化を指標としたスクリーニングにより、Landsberg *erecta* 株の EMS 処理後代において、6 系統（L2304-2、L3210-6、L3452-1、L3470-3、L3496-2、L3615-2）の温度感受性突然変異体を見いだした。単離した変異系統はいずれも、22℃（許容温度）では高い頻度で不定根を形成したが、27℃（制限温度）ではほとんど不定根を形成しなかった。交配実験の結果、これら各系統の温度感受性はそれぞれ異なる遺伝子座における劣性突然変異に起因する事が明らかになった。生理的特性も系統によって異なり、L3210-6 と L3496-2 の根再分化は CIM での前培養時に制限温度に曝露すると阻害されたが、L2304-2 では RIM へ移植後の温度が再分化に強く影響した。他の系統においては、とくにどちらか一方の培養段階でのみ温度の影響を受けるということはなかった。CIM で長期間培養を続けたときに起きる胚軸からのカルス形成に関しては L3452-1 以外の全系統が温度感受性を示したのに対し、同様の培養条件下で誘導される根外植片からのカルス形成は L2304-2 と L3210-6 の 2 系統でのみ温度感受性であった。

2aB09

シロイヌナズナの温度感受性突然変異体*srd2*の細胞増殖特性

小澤正一、杉山宗隆、福田裕穂（東北大・理・生物）

私達は、器官再分化の初期段階を遺伝学的に解剖することを目的とし、シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析を行っている。シロイヌナズナの組織培養系では、根あるいは胚軸をカルス誘導培地(CIM)で4日間前培養後、苗条誘導培地(SIM)に移植することにより苗条再分化を、発根誘導培地(RIM)に移植することにより根の再分化を効率よく誘導できる。*srd2*は、このうち根外植片における苗条再分化を指標として単離した温度感受性突然変異体の1つで、22℃(許容温度)では苗条を再生できるが27℃(制限温度)では再生できない。これまでの解析から、*srd2*は根からの苗条再分化、胚軸からの苗条再分化、根の再分化、カルス形成が温度感受性となるが、根からのカルス形成では温度感受性を示さないことがわかっている。根外植片でカルス形成が正常に起こることから、*SRD2*が細胞増殖の進行全般に関与しているとは考えにくい。他の変異体の表現型を考え合わせると、胚軸外植片がはじめ器官再分化能も増殖能ももたない状態(IC)にあるのに対し、根外植片は根再分化能、増殖能をもつ(苗条再分化能はもたない)状態(CR)にあり、CIMでの培養によって起きるIC→CRの移行に*SRD2*が関与すると推理できる。組織学的な解析によれば、制限温度曝露の*srd2*の細胞増殖に対する影響は、培養4日目で既に認められる。この結果も、*SRD2*がカルス形成のごく初期の段階またはカルス形成能の獲得段階に関与していることを示唆している。現在は、胚軸からのカルス形成過程において*SRD2*が関与する段階をさらに特定すべく解析を行っている。

2aB10

シロイヌナズナを用いた根毛の形態変化と根端の細胞伸長に関与する遺伝子の解析

石黒澄衛、岡田清孝、志村令郎[1]（基生研、[1]京大・理）

垂直に立てた寒天培地の表面を這って下向きに伸びているシロイヌナズナの根では、根毛は短く、根の軸に対して垂直に伸びる（寒天面型）。 しかし、根が空中にとび出した場合には、根毛は長く、根の軸に対して斜め前方に伸びるようになる（空中型）。 このような根毛の形態変化がどのようなしくみで起こるのかを明らかにするため、突然変異体を用いた解析を行った。 EMS で突然変異処理した種子をスクリーニングしたところ、寒天面型と空中型の変化が起こらない変異体（class 1）および、空中型は正常に生じるが、寒天面上では根毛を生じない変異体（class 2）を単離することができた。このうち、class 2 には *aux1* 突然変異体が含まれており、寒天面型の根毛の生成にはオーキシンが何らかの役割を持っていることが示唆される。現在これらの変異体の遺伝学的な解析を進めている。

agr1 は根の重力屈性が消失した変異体であるが、我々の単離した *agr1* の allele である *agr1-52* は、ショ糖を含む液体培地中で培養すると、表皮と皮層の細胞が膨張し、根が膨らんで根毛も消失する。この変異体についても解析を進めているのであわせて報告する。

2aB11

シロイヌナズナの根の光屈性突然変異体の遺伝学的解析

和田拓治、河合明子、石黒澄衛、岡田清孝、[1]志村令郎 （基生研・遺伝子第一，[1]京大・理・生物物理）

寒天培地上で一方向から光を照射するとシロイヌナズナの主根は光と反対の方向に屈曲して伸びる性質がある（負の光屈性）。根の光屈性に関する遺伝的な制御機構を明らかにするために、我々はEMS処理をしたシロイヌナズナをスクリーニングし、根が光屈性を示さなくなった３つの突然変異体を分離した(*rpt1*, *rpt2*, *rpt3*)。遺伝学的な解析により、これら３つの突然変異体はそれぞれ異なる遺伝子座の変異によって起こった劣性の変異であることが解った。

このうち*rpt1*突然変異体では、他の２つの変異体とは異なった形質が観察された。赤色光と緑色光を照射したときに根だけではなく胚軸も光屈性を示さなくなった。さらに根の障害物回避の反応にも異常がみられた。また*rpt1*遺伝子は**CAPS**法により第３染色体上に位置することが解った。*rpt2*および*rpt3*変異体の胚軸の光屈性および障害物回避反応は正常であった。

以上のことより*rpt1*遺伝子は、他の２つの遺伝子とは異なった作用機構をもっていると考えられる。現在これらの変異体間での二重突然変異体を作製中である。

2aB12

アサガオの易変性変異に影響を与える遺伝因子の探索

高橋咲子[1]、稲垣善茂[1,2]、飯田　滋[1]
([1]東理大・基礎工・生物工、[2]東大・薬)

我々は、雀斑系の絞り花アサガオの易変性変異 *a-3^{flecked}* は、色素生合成系のＤＦＲ－Ｂ遺伝子内に 6.4 kp の Ｅｎ／Ｓｐｍ類縁の転移因子Ｔｐｎ１が挿入した構造であって、花の器官形成時にＴｐｎ１が転移脱離することによりＤＦＲ－Ｂ遺伝子が再活性化されることが絞り模様の形成機構であることを明かにし、ＤＦＲ－Ｂ遺伝子やＴｐｎ１の構造上の特徴を昨年度の本大会で報告した。さらに、体細胞変異による絞り模様の激しさに関する遺伝学的観察やＴｐｎ１の構造から、Ｔｐｎ１のＤＦＲ－Ｂ遺伝子からの転移脱離の頻度とタイミングに影響を与える未知の遺伝因子の存在が示唆された。絞り模様形成の分子機構の詳細を解明するために、この未知の遺伝因子の同定を試みており、そのためのアプローチと得られた結果をもとに絞り模様形成の分子機構ついて考察する。

2aB13

マルバアサガオの易変性変異と転移因子

久富恵世、笠原基知治、飯田　滋　(東理大・基礎工・生物工)

花の絞り模様は、転移因子が関与する易変性変異によることが多い。１９１０年代後半より古典遺伝学的研究が行われている易変性変異 *a^{flaked}* をもつ条斑系マルバアサガオは、白地に有色の絞り模様を生じる。しかも、この易変性変異 *a^{flaked}* は、野性型のＡとのヘテロの場合には薄色地に濃い有色と白色のスポットやセクターを生じる。我々は易変性変異 *a^{flaked}* の構造を解明する目的で、アントシアニン色素生合成系遺伝子上のＲＦＬＰを探索した結果、条斑系マルバアサガオのＤＦＲとＡＮＳの両遺伝子領域のＤＮＡが再編成を起こしていると思われる結果を得た。この内の後者はＡＮＳ遺伝子の下流に約 0.25 kb のＤＮＡ配列が挿入し、さらにその内部に約 0.6 kb のＬＴＲをもつレトロトランスポゾンが挿入したと思われる構造であった。これらの挿入ＤＮＡ配列の構造上の特徴と意義について考察する。

2aB14

出芽酵母*PPF3*遺伝子破壊の出芽パターンに与える影響の解析

頼藤徹也、大隅良典　(東大・教養・生物)

酵母*Saccharomyces cerevisiae* a,α細胞は、互いに相手の分泌する接合フェロモンの作用により、接合能を獲得しa/α細胞を生成する。a細胞は、α細胞が分泌するαフェロモンの作用によりプロジェクションと呼ばれる鋭い突起を形成する。この極性成長のメカニズムを明らかにするために突起形成不能変異株を単離解析し、少なくとも三つの遺伝子*PPF1/SPA2, PPF2, PPF3*がこの過程に関与していることを見いだした。

*PPF2, PPF3*遺伝子産物の機能をさらに解析するために*PPF2, PPF3*遺伝子のクローニング、塩基配列の決定を行いその破壊株を作成した。*PPF2*破壊株、*PPF3*破壊株は単離されていた変異株と同様に突起形成不能を示した。また*PPF3*破壊株は弱い細胞質分裂異常を示し出芽パターンにも異常が見られた。今回特に*PPF3*破壊株に見られた細胞質分裂異常と出芽パターンの関係について解析を行った。

*S. cerevisiae*の出芽パターンは接合型により決まっている。a、α細胞は直前の出芽のすぐ隣(axial)に出芽を形成するがa/α細胞では直前の出芽のすぐ隣(axial)またはほぼ180度逆の位置(polar)に出芽を形成する。*PPF3*破壊株のうちで細胞質分裂異常を強く示している細胞は出芽パターンも大幅に乱れていることが観察された。特にa/α細胞でのaxial型の出芽がpolar型に変化していることが分かった。このことはa、α細胞でのaxial型の出芽とa/α細胞でのaxial型の出芽の機構は一部異なることを示しており、また*PPF3*遺伝子産物はa/α細胞でのaxial型の出芽位置決定に関与していることを示している。

2aC01

ユーグレナアスコルビン酸ペルオキシダーゼの分子的性質

石川孝博、永井 正浩、新宮原桃子、武田 徹、平山 修、重岡 成　(近畿大・農・食栄)

単細胞真核生物ユーグレナはカタラーゼや既知の非特異的ペルオキシダーゼを持たず、細胞質にアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)を唯一のH_2O_2消去酵素として局在させている。ユーグレナではオルガネラで生成したH_2O_2は細胞質に移行したのち、APXにより消去される。[1]またユーグレナAPXは酵素学的にも高等植物APX(細胞質型)と共通の性質を持つうえにユーグレナ特有の性質を有し、進化的にもたいへん興味深い。

これまでに我々はユーグレナを用いて光などの環境ストレスや補欠分子族の鉄イオンによりAPX活性が発現･誘導されることを明らかにした。[2]今回、APXの発現･調節機構の分子レベルでの解明を目的に、精製APXより、モノクローナル抗体(mAb)の作製と内部アミノ酸配列等の分子的性質の検討を行った。

作製したmAb(EAP 1-8)はイムノブロットの結果、高等植物の細胞質型および緑藻クラミドモナスAPXと交差反応した。EAP 1はホウレンソウ葉緑体型AsAPとも反応したことから、高等植物両アイソザイムに共通のエピトープを認識することが示された。内部アミノ酸配列を検討したところ、一部の配列で高等植物細胞質型APXと相同性の高い領域が確認された。現在、cDNAクローンの解析を試みている。

1) Phytochemistry 33:1297-1299. (1993)　2) Plant Sci. 93:25-29. (1993)

2aC02

ホウレンソウにおけるペルオキシダーゼをコードする1.2kbp cDNAの解析

坂井康祐、三千典子、石川孝博、武田　徹、平山　修、重岡　成（近畿大・農・食栄）

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）は植物・藻類に広く分布し、過酸化水素代謝に関与している。APXは葉緑体型および細胞質型のアイソザイムが存在しているが、それらの発現調節およびストレス応答機構はほとんど明らかにされていない。

今回、高等植物の細胞質型および葉緑体型APXと交差反応を示す抗ユーグレナ細胞質型APXモノクローナル抗体をプローブとし、市販のホウレンソウcDNAライブラリーからイムノスクリーニングを行った結果、1.2kbpの陽性クローンを得た。このクローンは927bpのORFを含み、309のアミノ酸をコードしていた。推定アミノ酸配列から、既報の細胞質型APXと約50%、シトクロム*c*ペルオキシダーゼ(CCP)と約30%の相同性を示し、本クローン(PX）がペルオキシダーゼであることが示唆された。PXは既報のペルオキシダーゼのヘム結合に関与する末部および基部Hisに特有のアミノ酸配列を保持していた。また、4ケ所の糖鎖結合部位と4ケ所のcys残基が存在していた。一方、APXの安定化に関与するCys-32およびCCPと細胞質型APXに特有のTrp-179は保存されていなかった。

大腸菌でPXを発現させ、Western blottingを行ったところ、推定分子量とほぼ一致する35kDaのバンドが確認された。発現PXの基質特異性は、グアヤコールに対するアスコルビン酸の活性比が約1.6倍であり細胞質型APXと類似していた。本酵素はアスコルビン酸非存在下において、54時間活性を保持していた。

2aC03

ラン藻*Synechococcus* PCC 7942のカタラーゼの酵素学的性質と分子特性

陸田　径典、木本みゆき、石川　孝博、武田　徹、平山　修、重岡　成　（近畿大・農・食栄）

ラン藻はH_2O_2消去酵素としてアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)とカタラーゼ(CAT)が存在するものとCATのみを含むものに分類できる。今回、ラン藻*Synechococcus* PCC 7942よりCATを精製し酵素学的および分子的性質について検討した。

本酵素はイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過により、電気泳動的に均一にまで精製された。分子量は150 kDaであり、均一なサブユニットからなる2量体であった。Km 値は14.2 mMであり他の生物由来のものに比べ低値であった。Kcat/Km値は動植物のCATやAPXの値と比べてほぼ同じオーダーであった。ヘムタンパク阻害剤（NaN_3、KCN）およびCATの特異的阻害剤（アミノトリアゾール）により阻害された。本酵素は403 nmにヘムタンパクに特有の吸収極大をもち、ジチオナイトの添加による吸収極大の移動は認められなかった。ラットおよびカボチャ由来のCAT抗体は本酵素と反応しなかった。そこで、原核細胞由来のカタラーゼ-ペルオキシダーゼ遺伝子の保存領域より作製したプライマーを用いてPCR法を行なったところ、1.2 kbpのDNA断片の増幅が認められた。この断片のシークエンスから推定されるアミノ酸配列は既報のカタラーゼ-ペルオキシダーゼと高い相同性を示した。現在、本酵素遺伝子のシークエンスの解析を行なっている。

2aC04

サイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼのアンチセンスＤＮＡを導入したタバコのパラコート感受性

佐治　光、青野光子、久保明弘、田中　浄、近藤矩朗（国立環境研）

我々は、植物の光酸素ストレス耐性における活性酸素消去系酵素の役割を遺伝子導入法を用いて解析している。昨年の植物学会第５８回大会で、シロイヌナズナのサイトゾル型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（ｃＡＰＸ）遺伝子をタバコ（品種ＳＲ１）に導入し、この酵素を葉で過剰生産している組換え植物を作成したこと、またこれらの組換え体と対照の非組換え体の間で除草剤パラコートに対する感受性に差がなかったことを報告した。

今回は、このｃＡＰＸのアンチセンスＤＮＡをタバコに導入し、葉におけるｃＡＰＸ量が対照よりも少ない組換え体を２系統得た。これらの植物の葉のパラコート感受性を、パラコート処理した葉片からの電解質の漏出速度によって調べたところ、対照と比べパラコート感受性が高まっていることがわかった。従って、すでに明らかにされているスーパーオキシドジスムターゼやグルタチオンレダクターゼに加えて、アスコルビン酸ペルオキシダーゼも植物の光酸素ストレス耐性に関与していることが示唆された。

2aC05

２種類の活性酸素消去系酵素遺伝子を導入したタバコのパラコート耐性

青野光子、佐治　光、田中國介[1]、近藤矩朗、田中　浄（国立環境研、[1]京都府大、農、農芸化学）

活性酸素消去系の酵素であるグルタチオンレダクターゼ（GR）やスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）は、除草剤などによって植物に引き起こされる光酸素ストレスに対する耐性に重要な役割を果たしていると考えられている。我々はこれまでに、大腸菌GR遺伝子を導入したGR活性の高いトランスジェニックタバコが大気汚染ガスの二酸化硫黄や除草剤パラコートに対して対照よりも高い耐性を持つことを示している。また、SODもパラコート耐性とその活性との相関が報告されている。今回、イネサイトゾル型SODのcDNAを導入したタバコと大腸菌GR遺伝子を導入したタバコを交配し、これら２つの酵素の活性が高いタバコを作出した。このタバコのパラコート耐性などの性質について報告する。

2aC06

グルタチオンレダクターゼ遺伝子を導入したトランスジェニックヤマナラシにおける光酸素ストレス耐性

松永悦子、遠藤さおり、海老沼宏安、青野光子[1]、佐治光[1]、近藤矩朗[1]（日本製紙中央研究所、[1]国立環境研究所）

植物の光酸素ストレスによる障害には活性酸素が関与していると考えられている。グルタチオンレダクターゼ（ＧＲ）は植物の活性酸素解毒系に関わる重要な酵素であり、大腸菌ＧＲ遺伝子を導入したトランスジェニックタバコにおいて光酸素ストレス耐性が高まったことが報告されている。

我々は樹木への遺伝子導入により大気浄化能の高い街路樹及び公園緑化木の育成を目指した研究を進めている。材料として日本製紙が育成した *Populus* 属のエリートクローンである交雑ヤマナラシ・キタカミハクヨウを用い、アグロバクテリウム法により、大腸菌ＧＲ遺伝子を導入したトランスジェニックヤマナラシを作成した。これらについて葉を材料としたＧＲ活性の測定を行い、クローンの一次スクリーニングを行った。ＧＲ活性の高いトランスジェニック植物をフラスコより馴化し、除草剤パラコートに対する抵抗性試験を行ったところ、コントロール植物に比べて明らかな抵抗性を示した。さらに、SO_2 ガス暴露の予備実験からもトランスジェニック植物への大気汚染耐性の付与が示唆される結果を得ているので合せて報告する。

2aC07

O3によるエチレン生成と酵素活性の変化

裴　公英、近藤矩朗[1]、中嶋信美[1]、石塚皓造（筑波大･農、[1]国立環境研･地域）

O3に暴露したトマト植物におけるエチレン生成と傷害との関係について検討を行った。エチレン生成はO3暴露によって促進されたが，エチレン生成阻害剤のaminoethoxyvinylglycine(AVG)の処理によってO3による傷害とエチレン生成は完全に抑制され，O3によって生成したエチレンは1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)経路で生合成され，傷害の誘導に関わっている可能性が高いことを昨年の日本植物学会において報告した。

本実験において，活性酸素のscavengerであるTiron処理を行ったところ，エタン生成は抑制されたが，エチレン生成の抑制は見られなかった。また，O3暴露によってACCsynthase素活性は増加し、ACCoxidase活性も増加する傾向が見られた。O3暴露によるこれらの酵素の遺伝子発現の変化について検討した結果についても報告する。

2aC08

ホウレンソウ葉における細胞質型CuZn-スーパーオキシドジスムターゼの細胞内分布

小川健一、丑丸敬史[1]、金松澄雄[2]、浅田浩二[3]（京都大・理・植物、[1]静岡大・理・生物、[2]南九州大・食品工、[3]京都大・食研）

ホウレンソウのCuZn-SODは葉緑体型と細胞質型のアイソザイムをもつが、葉緑体型SODはO_2^-の生成部位であるチラコイド膜のストロマ側表面に存在していることを急速凍結及び免疫金標識-電子顕微鏡を用いて明らかにした。細胞質型CuZn-SODの機能の理解のために、今回は同様の方法を用いて細胞質型CuZn-SODのホウレンソウ葉での細胞内分布を明らかにしたので報告する。

葉緑体型CuZn-SODの金標識は葉緑体に、Mn-SODの金標識はミトコンドリアに特異的に見られたが、細胞質型のCuZn-SODの金標識はこれらの細胞]小器官には存在しなかった。細胞質型のCuZn-SODの標識は、成熟した柵状組織や海綿状組織の細胞では細胞膜表面や細胞壁などのアポプラストに存在し、細胞質に富んだ成熟途上の細胞では液胞近くの細胞質にスポット状にかたまって存在していた。維管束細胞の細胞壁二次肥厚部は特に強い標識が認められた。アポプラストに存在するSODは、小胞によるエクソサイトシスで分泌されると考えられるが、実際どのように細胞外に輸送されているのかは今後の課題である。また、核にも金標識が認められることから、CuZn-SODは核のDNAのO_2^-による修飾を防御していると考えられる。

2aC09

トウモロコシチラコイド膜での赤外光によるフェレドキシン依存、Antimycin A感受性Cytochrome b559還元：Menadiol還元性、低電位Cytochrome b559はFerredoxin-Quinone Reductaseである。

三宅親弘、Ulrich Schreiber[1]、浅田浩二（京都大食研、[1]Würzburg大）

Tagawaら[*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1963) 49: 567-572]により見いだされた光化学系Ｉでのferredoxin(Fd)依存の循環的電子伝達はその発見以来、生理的役割(例えば、ATP/NADPH生成比の調節、またΔpH形成による光化学系ＩＩの量子収率の調節)が解明されてきたが、Fdと系間電子伝達系との間の電子担体についてはいまだに明かでない。我々は、LED-photodiode array spectrophotometerを用いて循環的電子伝達活性の高いトウモロコシ葉肉細胞葉緑体［Asada et al. *Plant Cell Physiol.* (1993) 34: 39-50］のチラコイド膜Cytochromeの酸化還元を測定し、Antimycin A感受性で赤外光により光還元されるFdによって還元されるCytochromeを同定した。

好気条件下、チラコイド膜に赤外光を照射し、光化学系Ｉを励起するとCytochrome f酸化を示す554 nmをピークとする吸光度減少が見られた。しかし、Fd(5 μM)添加によって560 nmをピークとする吸光度上昇が見られ、Cytochrome b559が還元型Fdにより還元されることが明かとなった。このFd依存Cytochrome b559還元はAntimycin A(1 μM)により阻害された。Fdにより還元されるCytochrome b559はAscorbate(Em +80 mV)により還元されず、Menadiol(Em -10 mV)により初めて還元されることから光化学系ＩＩ複合体で機能しているCytochrome b559と異なることが明かとなった。さらに、Fdにより還元されたCytochrome b559はDuroquinoneにより酸化されることから、この低電位Cytochrome b559は光化学系Ｉでの循環的電子伝達においてFdとPlastoquinoneとの間の電子担体、すなわちFerredoxin-Quinone reductaseであることが明かとなった。

2aC10

低酸素処理に対するイネ芽生えオルガネラの応答

丑丸敬史[1]、森田重人[2]、柴坂三根夫[3]、辻英夫[4]（[1]静岡大・理・生物、[2]京都大・理・植物、[3]岡山大・資生研、[4]神戸女子大・一般教育・生物）

水中で発芽したイネ(*Oryza sativa*)芽生えでは、ミトコンドリア、特にプラスチドの電子伝達系(ETS)は空気中で発芽した芽生えに比べ未発達だが、芽生えを空気中へ移すと急速に発達することをすでに明らかにしている。今回は、好気的に発芽したイネ芽生えを水中下に移した後のこれらの消長を報告する。6日間空気中で発芽した芽生えをその後水中に移しても幼葉鞘の伸長等の形態的変化はほとんど認められず、1日後には100%であった生存率はその後下がり始めた。1日水中処理によりalchol dehydrogenase活性は2.5倍増加したが、その値は6日間水中で発芽した芽生えの2%程度に過ぎなかった。ミトコンドリアETSの指標であるcytochrome *c*、cytochrome *c* oxidaseおよびグリオキシゾームの指標であるisocitrate lyaseのレベルもこの処理によっての著しい減少は認められなかった。しかしながら、プラスチドETSの指標であるferredoxin-NADP$^+$ reductaseは20%に低下した。このように、(1)好気的条件で発芽の進んだ芽生えは低酸素処理を施しても形態、代謝とも好気型から嫌気型に変わりにくいこと、(2)しかしプラスチドは、低酸素感受性のオルガネラであることが示唆された。

2aC11

低酸素処理に対するイネ芽生え活性酸素消去系の応答

丑丸敬史[1]、小柴共一[2]、兼松澄雄[3]、浅田浩二[4]、柴坂三根夫[5]、辻英夫[6]（[1]静岡大・理・生物、[2]都立大・理・生物、[3]南九州大・園芸、[4]京都大・食研、[5]岡山大・資生研、[6]神戸女子大・一般教育・生物）

水中で発芽したイネ(*Oryza sativa*)芽生えでは、6種類の活性酸素消去系酵素の活性は空気中で発芽した芽生えに比べ低いが、芽生えを空気中へ移すと増加する(Ushimaru et al. *Plant Cell Physiol.* 33: 1065-1071)。今回は、好気的に発芽したイネ芽生えを水中下に移した後の活性酸素消去系酵素の消長を報告する。水中処理1日後のsuperoxide dismutase(SOD)、monodehydroascorbate reductase、dehydroascorbate reductase、gulutathione reductaseの活性は低下したが、そのレベルは6日間水中で発芽した芽生えに比べると高かった。一方、ascorbate peroxidaseの活性はほとんど変わらず、catalaseの活性は増加した。これらの酵素の抗体を用いて行ったウエスタンブロットも同様な傾向を示した。このように、好気から嫌気に移されたイネ芽生えは、嫌気下で発芽時した芽生えと異なる消長様式を示し、これらの酵素活性が単純に酸素分圧によって制御されていないことが明らかになった。またSODでは細胞内局在性の異なるアイソザイム間で消長が異なることが示されたが、cytochrome *c* oxidase、isocitrate lyase、ferredoxin-NADP$^+$ reductaseの消長と比較した結果、それが局在するオルガネラの発達と相関が認められた。

2aC12

イネ芽生えの活性酸素消去系の低温処理に対する応答

老平浩子、丑丸敬史　（静岡大・理・生物）

低温ストレスは葉緑体やミトコンドリアの電子伝達系を乱し、活性酸素の発生を増加させると考えられている。活性酸素は、多くの細胞構成成分と反応し障害を引き起こすが、その防御機構として活性酸素消去系を持つ。トウモロコシにおいては低温ストレスでH_2O_2が蓄積し、catalaseの活性が増加したという報告がある。また、ホウレンソウにおいては低温処理でcatalase活性は減少するが、ascorbate peroxidase (APX)活性は増加したという報告がある。今回、我々はイネを材料に用い、H_2O_2消去に働くcatalase、APXとH2O2をリグニン生合成等に利用するguaiacol peroxidase (GuaPX) に着目して、これらの酵素の活性に及ぼす低温ストレスの影響に関して調べた結果を報告する。

2aC13

低酸素ストレス下での植物培養細胞の細胞内ｐＨとエネルギー代謝の^{31}Ｐおよび^{13}Ｃ　ＮＭＲによる解析

矢崎芳明、坂野勝啓（農水省・生物研）

低酸素ストレス（酸素通気停止）下で、イネ(Oryza sativa var. musasikogane)、ニチニチソウ(Catharanthus roseus)およびタバコ(Nicotiana tabacum var. BY-2)培養細胞の細胞内ｐＨの変化は、イネの細胞は液胞がアルカリ化せず細胞質の酸性化が小さいこと、タバコとニチニチソウ細胞は細胞質の酸性化・液胞のアルカリ化の結果、細胞質と液胞のｐＨ差が消失することをこれまでに報告してきた。今回はさらに^{13}Ｃ　ＮＭＲを用いて、培地中の１－^{13}Ｃ－グルコースを取り込ませた細胞の代謝産物を追跡し、低酸素ストレス下での細胞内ｐＨの変化と解糖系（エネルギー代謝）の最終産物に着目して比較した。

酸素通気を停止すると、細胞質の酸性化が小さいイネでは乳酸がほとんど蓄積せず、主にエタノール発酵のみを行う結果エタノールの蓄積が顕著であった。さらにアラニン、ＧＡＢＡ（γ－アミノ酪酸）が^{13}Ｃ　ＮＭＲスペクトルで検出された。^{31}Ｐ　ＮＭＲスペクトルではＡＴＰもわずかながら検出された。一方、ニチニチソウとタバコ細胞では乳酸とエタノールが蓄積するが、乳酸の蓄積はタバコ細胞の方が多く、このことは細胞質の酸性化および細胞質と液胞のｐＨ差の消失がタバコ細胞の方がすばやく起きる一つの原因になっているものと考えられる。また、ＧＡＢＡは^{13}Ｃ　ＮＭＲスペクトルでは検出されず、イネの細胞ほど蓄積しないことがわかった。また、^{31}Ｐ　ＮＭＲスペクトルではＡＴＰは検出されなかった。

2aD01

新に見出された光化学系Ⅰの5kDaサブユニット

湯本健司、仲本　準、檜山哲夫（埼玉大・理・生化学）

昨年度の本大会で我々は、光化学系Ⅰ反応中心標品から構成するサブユニットを、Hydroxyapatite カラム（旭光学 HP40）を使って単離する方法を発表した。この方法に改良を加えた結果、難しかったPsaCの単離も可能となった。その際あるフラクションにSDS-PAGEで調べると分子量5 kDa程度の小さな蛋白が相当量出て来ることが分かった。

光化学系Ⅰの反応中心標品は、植物種や調製法の違いなどによりいくつかのサブユニット組成の違う標品が得られることが知られている。大別すると大サブユニット（PsaA/B）のみで構成される標品（略称ＣＰ１）及び２万以下の各種小サブユニットを含む標品（略称ＰＳ１）がある。我々は以前ホウレンソウ葉緑体から光化学活性のあるＣＰ１をSDS処理あるいはNaI処理によって調製する方法を発表した（*Z. für Naturforsch. 48c (1993) 374-378*）。これらの標品は、SDS-PAGEで調べる限り小サブユニット（PsaC/D/E/F など）を完全に欠いていた。しかしSDS-PAGE像を詳細に見ると5 kDa付近のバンドが観察されまたその濃度はＰＳ１におけるものと殆ど同じであった。単離標品のアミノ酸配列分析の結果ほぼ全残基が判明した。データベース検索の結果類似配列はORFも含めて見当たらず未知の蛋白と考えられる。配列から非常に疎水的と思われまた0.1%程度のSDSによっては分離しないことからPsaA及びPsaB蛋白とかなり強固に結合していると考えられる。PsaOと命名し光化学系Ⅰの活性との関係について現在検討中である。

2aD02

Ｐ７００の酸化型または還元型のみを特異的に変性させることは可能か？

池上勇（帝京大・薬）

P700はChl-aの二量体であり、psaAとpsaBに対応する二つのポリペプチド鎖の間に位置し、各々の鎖に属するヒスチジン残基と配位結合していると考えられている。光化学系Ⅰ粒子からアンテナ色素を抽出して得たP700濃縮粒子ではP700の安定性が著しく低下することが知られている。最近、このP700の不安定性を利用して、P700の失活の機構を調べ、P700が還元型のときにP700を特異的に変性させ、P700が酸化型のときには変性させない処理条件を見出した。この効果はP700結合部位の局所電荷が、酸化条件下では$P700^+$の存在により影響されることを反映していると思われる。

1) 炭素数12の飽和脂肪酸（ドデカン酸）の陰イオン性誘導体（sodium laurateなど）及びこの脂肪酸を持つ脂質はいずれも同様な効果を示した。炭素数が10以下の脂肪酸を含む誘導体ではP700の変性効果は見られない。

2) この効果は、ｐＨが８以上で見られ、ｐＨ７以下ではP700の酸化型も還元型と同様に変性する。また、コール酸系の両性表面活性剤（CHAPSなど）を少量加えることによって失活の進行は直ちに抑制された。

3) P700の失活に伴って、P700及びP700当り約２分子のChl-a（A_0 と Chl-a-683?）の吸収が短波長シフトした。

2aD03

加熱処理による系Ⅰ反応中心複合体の色素変性

小林正美、岩城雅代[1]、伊藤　繁[1]（東大・工・化生、[1]基生研）

光化学系Ⅰ粒子をエーテル処理すると**P700, A_0**とその近傍のクロロフィル（Chl）のみが存在するような**P700−rich**な標品（Chl *a*/P700 ≒ 10）が得られる。光化学系Ⅰ粒子およびエーテル処理した標品にはChl *a*のエピマーであるChl *a'*が1分子存在するが、その機能についてはよくわかっていない。ところで、エーテル処理した光化学系Ⅰ標品を加熱処理するとP700活性が低下する。そこで本研究では、光化学系ⅠにおけるChl *a'*の機能を明らかにすることを目的として、熱処理した系Ⅰ標品の色素変性を精密に分析した。

【実験方法】　光化学系Ⅰ粒子はホウレンソウから単離し、凍結乾燥した後に、水飽和80%程度のエーテルを用いてアンテナ色素を抽出した。この標品を30～50℃で10分間加熱処理した。色素の分析は、順相HPLCを用いて行った。

【結果と考察】　加熱処理の温度が上昇するにつれてP700活性は低下した。加熱処理をしない標品のP700活性を100としたときの、各標品のP700活性は次の通りである：75（30℃）、50（35℃）、25（40℃）、7（45℃）、5（50℃）。エーテル処理した標品には、Chl *a'*とChl *b*が1分子存在するが、熱処理による変性は観察されなかった。これに対しChl *a*は、35℃で約1個、40℃で約2個、そして45℃で約3個が酸化され、$C13^2$−OH−Chl *a*に分子変性した。また、アルゴン下で熱処理をしてもChl *a*の減少が観察されたが、$C13^2$−OH−Chl *a*の生成は検出されなかった。以上の結果より、加熱処理によるP700活性の低下は、Chl *a'*の変性によるものではなく、ある特定のChl *a*が高温に対して不安定であることが一因だと強く示唆される。

2aD04

緑色イオウ細菌 *Chlorobium* の光化学反応中心複合体

[1]大岡宏造，[1]亀井正一郎，[2]松原央，[3]岩城雅代，[3]伊藤繁
([1]大阪大・理・生物，[2]岡山理科大・理・生化，[3]基生研)

緑色イオウ細菌の光化学反応中心は，構造・機能の上で高等植物や藍色細菌の光化学系Ⅰ反応中心との類似点が指摘されている。我々はこれまで *C. limicola* の反応中心複合体の粗精製標品を用い，3種類のFe-Sセンター(F_X, F_A, F_B)とP840に直接電子を渡すチトクロム*c*の存在を明らかにしてきた。また2個のサブユニット(コアタンパクとチトクロム*c*)からなる複合体標品(CRC-2)の分光学的諸性質についての報告を昨年度の本大会において行った。しかしながらFe-Sセンターが酸素に対して不安定であるため，電子伝達経路を構成する他の成分やその反応機構については未だに不明な点が多い。今回我々は嫌気操作を導入することにより，反応中心標品の精製を再度試みることにした。膜からの可溶化条件等，基本的には我々が以前報告した方法を用いることにし，材料はタンパク質の安定性が期待できる好熱性 *C.tepidum* に変更した。

精製標品は5個のサブユニット(65, 41, 31, 22, 18 kDa)から構成され，18 kDaサブユニット以外はそれぞれコアタンパク(65 kDa)，FMOタンパク(41 kDa)，F_A/F_Bタンパク(31 kDa)，チトクロム*c*(22 kDa)であることがわかった。レーザー閃光照射実験からは，チトクロムcからP840への電子伝達速度は$t_{1/2}$ = 110 μsであった。またFe-SセンターA, Bの存在もEPRにより確認することができた。

2aD05

生育光環境による光化学系Ⅰ光阻害耐性の変化

園池公毅、石橋百枝、渡辺昭（東大・理・植物）

先にわれわれは、低温感受性植物であるキュウリの葉に、4℃において数時間 200 μ mol•m^{-2}•s^{-1}程度の穏和な光を照射すると、光化学系Ⅰが選択的に失活することを見い出した[1, 2]。この系Ⅰの光阻害は、チラコイド膜に光照射した場合には、低温耐性植物であるホウレンソウにおいても引き起こされることから、低温感受性部位は系Ⅰそのものではなく、系Ⅰを生体内で保護する機構であることが推測された。この低温感受性部位を明らかにするため、キュウリと同じく低温感受性植物であるインゲンを材料として用い、生育光環境を変化させることによって、Chl 量や Rubisco 量などの光合成関連のコンポーネント量の異なる植物体を育て、その際の系Ⅰ光阻害の阻害率を測定した。その結果、1）弱光で育てた植物ほど系Ⅰ光阻害がかかりやすいこと、2）阻害率の変化は処理時の光強度によって異なること、3）系Ⅰと系Ⅱの比、および、葉面積あたりの Rubisco 量は生育環境によって変化するものの光阻害の阻害率とは相関がないことなどが明らかとなった。また、同じ材料で、低CO_2／光処理を行なっても系Ⅰの阻害が引き起こされないことも示された。これらの結果は、炭酸固定反応が低温や低CO_2処理で失活することが、系Ⅰの光阻害の直接的な原因であるという仮説を否定する。

[1] Terashima et al. (1994) *Planta* **193**, 300-306
[2] Sonoike and Terashima (1994) *Planta* **194**, 287-293

2aD06

クラミドモナス葉緑体遺伝子 psaB の部位特異的形質転換

悴山博之、高橋裕一郎[1]（岡山大・理・生物、[1]自然科学）

系Ⅰ反応中心を構成する PsaB タンパク上の561と570番目のCys は、PsaA タンパクの2つの Cys と共に鉄・硫黄中心 Fx を結合していると考えられている。本研究では、PsaB タンパクの2つの Cys の機能を解析するために、それぞれを Ser に置換した2種類の形質転換体を緑藻クラミドモナス（Chlamydomonas reinhardtii) 野生株から作出した。まず、psaB 遺伝子の下流にスペクチノマイシン（Spc）耐性を与える選択マーカーを挿入し、さらに C561S 又は C570S の変異を導入した形質転換ベクターを作製した。それをパーティクルガンで葉緑体へ導入し、形質転換体を Spc 耐性を指標に単離した。得られた形質転換体の蛍光誘導期現象の測定により、C561S 株では完全に系Ⅰ活性が失われているが、C570S 株にはわずかに残っていることが示された。一方、光独立栄養条件下で前者は全く生育できず、後者は比較的弱い光照射下でわずかな生育を示した。また、両者の従属栄養成長の光感受性には明らかな差が認められた。ウエスタン分析によると系Ⅰ反応中心タンパクは C561S では検出されず、C570S にはわずかに存在した。以上の結果から PsaB の Cys の置換により系Ⅰ複合体は不安定となり、その蓄積量が減少することが示された。

2aD07

***Synechocystis* sp.PCC 6803 光化学系１複合体サブユニット欠失変異株を用いた研究（２）**

仲本準、長谷川みき、檜山哲夫（埼玉大・理・生化）

光化学系１複合体（光依存性プラストシアニン（チトクロームｂ６）：フェレドキシン酸化還元酵素）は、１０種以上のポリペプチド（Ａ～Ｎ）から構成されていると考えられているが、幾つかを除いて、それらの機能は明らかになっていない。我々は、形質転換型ランソウ *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて、“サブユニット”Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｉ及びＬの機能を明らかにするために、Ｉ及びＬ遺伝子のクローニング、Ｉ遺伝子破壊株の作製、さらにＤ、Ｅ、Ｆ及びＩ遺伝子破壊株の生理生化学的研究を行ってきた。今回も昨年度に引続きＤ、Ｅ及びＦ遺伝子破壊株を用いて、各々のサブユニットの欠失が、①ランソウの生育②細胞の光合成③チラコイド膜及び光化学系１複合体ポリペプチド組成に及ぼす影響を調べたので、その結果を報告する。チットニスらの報告（*J.Biol.Chem.* **264**, 18381）とは異なり、Ｄ欠失株は光独立栄養的生育が可能であった。これらの株と野生株の光合成特性（光飽和曲線、量子収率、最大光合成速度）に大きな相違は見られなかった。ところが、Ｄ及びＥ欠失株のチラコイド膜の P700 の閃光照射後の暗所における吸光度変化を調べたところ、野生株と異なっていた。これらのチラコイド膜のサブユニット組成を調べたところＤ欠失株にはサブユニットＣが検出されなかった。サブユットＣは光化学系１に必須のものであることが明らかにされていることから、サブユニットＤは *in vitro* においてはサブユニットＣの安定化に必須であるが、*in vivo* では必須ではないことが示された。

2aD08

光化学系１反応中心での電子移動とマーカス理論
：(1) 初期反応の最適化機構

岩城雅代[1]・熊崎茂一[2]・吉原經太郎[2]・撰 達夫[3]・伊藤 繁[1]（[1]基生研・[2]分子研・[3]鳥取大学 工学部）

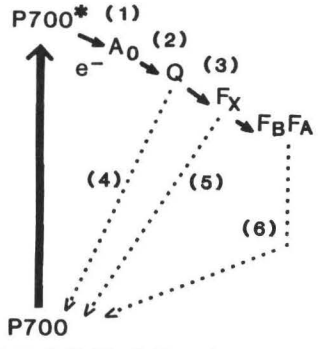
光化学系１反応中心では光で P700が励起されP700*(Chl$_2$)⇒ A0(Chl) → Q(phylloquinone)→FeS の電子移動が起こる。A0−Q間の自由エネルギー差は小さい(-0.2--0.3eV)が、逆反応が抑えられ、超高速で反応が進む。この反応の最適化機構とタンパクの役割を検討した。【方法】ホウレンソウ系１反応中心のキノンを酸化還元電位の異なる人工キノンに置き換え、ps−ns レーザ閃光分光法で $A0^- \rightarrow Q$ の速度定数を測定した。【結果】(1) フィロキノン、あるいはメナキノンの反応中心で最高速度 (23 ps) が得られた。これからA0−Q間距離は約 7.8Åと推定された。(2) また、マーカス理論で予測されるベル型の速度定数 vs 自由エネルギー曲線が得られた。反応系全体とタンパクの 再配置エネルギーはそれぞれ 0.3eVおよび 0.12 eVと計算された。A0−Q結合部位のペプチドの誘電率がこの小さい再配置エネルギーの値を決めていると考えられる。

2aD09

光化学系Ⅰ反応中心での電子移動とマーカス理論
：(2) 全反応の最適化機構

伊藤 繁[1]・岩城 雅代[1]・星名 哲[2]（[1]基生研・[2]金沢大．理．生物）

光化学系Ⅰ反応中心では5段階の電子移動反応（図）が逐次的に起こり、室温では効率よく酸化還元力が分離される。これらの各反応とその逆反応の温度依存性を300－4Kで測定し、反応系全体の最適化機構を検討した。



【方法】ホウレンソウより光化学系Ⅰ粒子とFeS-A,Bを除いたコア複合体を調製し、レーザ分光および、ESRで反応速度と温度依存性を測定した。

【結果】(1)、(2)、(4)の各反応はほとんど温度依存性を示さなかった。一方、(3)、(5)、(6)の各反応は強い温度依存性を示した。これら素反応の電子移動速度定数と温度依存性(活性化エネルギー)の関係とマーカス理論から反応系全体の最適化機構を検討した。

2aE01

*Roseobacter denitrificans*27Rから由来した二次突然変異株の単離と性質

蓬田宏樹，中埜健次郎[1]，西村浩二[1]，島田裕士[1]，塩井祐三[1]，高宮建一郎[1]（東工大・生命理工・生命理学・[1]生体機構）

昨年の本大会で*Roseobacter denitrificans*をＥＭＳ処理して得られた２７Ｒ株は不安定で，色調の異なるいくつかの二次突然変異株が生ずることを報告した．今回はそれらの二次突然変異株の単離とその性質について報告する．

色調には赤系二種，緑系二種，黄系二種，橙系二種の計八種あることを確認した．またそれ以外に二種異なる系統の株を得ている．それぞれの株の安定性は，野性型に比べると幾分不安定なものもあるが，多くは変異率が0.01%以下であり，２７Ｒの変異率（0.1%以上）に比べると明らかに低い．またこれらの株の中で親株である野性型や２７Ｒ株に復帰するものは見られなかった．さらに，アセトン－メタノールの全細胞抽出液の吸収スペクトルと薄層クロマトグラフィーで分離後の各色素成分の吸収スペクトルから，それぞれが含む色素を同定した．バクテリオクロロフィル（Bchl）生合成経路のいくつかの中間体（プロトクロロフィリド類，フェオフォルビド類，など）が，それぞれ少しずつ異なった組み合わせで蓄積していることが観察された．以上のことから，これらの二次突然変異株はBchl生合成経路に何らかの障害を持っており，そのため最終産物であるBchlに到達する前の段階で，部分的にまたは完全に止まっていると思われる．その結果Bchlもその中間体も同時に存在すると考えられる．この変異の機構については現在までのところ不明である．

2aE02

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* における光合成遺伝子*puf*オペロンの発現様式の解析

西村浩二、島田裕士、太田啓之、増田建、塩井祐三、高宮建一郎（東工大・生命理工・生体機構）

様々な環境条件下における好気性光合成細菌*Roseobacter denitrificans*の光合成色素の蓄積様式は、*Rhodobacter sphaeroides*など紅色非イオウ細菌の場合とはいくつかの点で異なることが生理・生化学的に実証されている。我々はこれらの違いをその*puf*オペロンの発現様式に着目して、分子生物学的手法を用い遺伝子レベルで解析を試みた。

その結果*R. denitrificans*では主として*puf*BAの転写産物（約0.5kb）の蓄積が認められ、*R. sphaeroides*のように*puf*オペロンの全長（約2.7kb）をコードするmRNAの蓄積は認められなかった。また*puf*BAのmRNAのレベルは、*R. sphaeroides*の約40%程度であった．さらにそのレベルは、細菌懸濁液を暗所から明所へ移行させると著しく抑えられた。また酸素濃度の異なる条件下でのmRNAのレベル、*puf*BAのmRNAの転写開始および終結点については現在解析中である。本大会では以上の事項について*R. sphaeroides*と比較して報告する。

2aE03

Rhodobacter capsulatus のフェレドキシンⅠ遺伝子（***fdxN***）下流には窒素固定に必須な２つの遺伝子が存在する

佐伯和彦　（阪大・理・生物）

生物窒素固定にはニトロゲナーゼ以外にも，この酵素の成熟あるいは還元力の供給に関わる多くの遺伝子産物が必要である．著者らは，*R.capsulatus*ニトロゲナーゼへの電子供与体と考えられる8鉄フェレドキシンの遺伝子解析から，*fdxN*下流に既知の他の細菌の*nif*遺伝子とは相同性を持たない複数の窒素固定遺伝子が存在する可能性を示してきた(*1*)．一方最近，Schmehlらは窒素固定に必須な単一の遺伝子の存在を報告した(*2*)．著者らの塩基配列決定では，*fdxN*下流には159と366残基の蛋白質をコードする2つのORF-D1と-D2が存在する．作製済のORF-D2内への6株に加え，ORF-D1内への薬剤耐性遺伝子(*neo*)挿入株2種を作製した結果，いずれも窒素固定では成長不能(Nif$^-$)だった(NH_4^+による成長は可能)．どの株も*fdxN*のプロモーター領域から2つのORFを含むプラスミドにより相捕(Nif$^+$となる)された．ORF-D2の一部を5'下流から欠くプラスミドを用いると，ORF-D1へ転写方向に*neo*を挿入した株のみがNif$^+$となった．また，ORF-D2を完全にしかしORF-D1の一部を3'上流から欠く断片を*R.capsulatus*の*puf*-プロモーターに連結したプラスミドを用いると，ORF-D2破壊株のみがNif$^+$となった．以上の結果は，ORF-D1と-D2が新たな窒素固定遺伝子であることを示している．これらを*rnfX*と*rnfY*と名付けることを提唱する．

(1) Saeki *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 12889-12895
(2) Schmehl *et al.* (1993) *Mol. Gen. Genet.* **241**: 602-615

2aE04

スフェロイデンのシス-トランス異性体の三重項増感光異性化の量子収率

藤井　律子・小山　泰（関学大理）

光合成におけるカロテノイドの光保護作用では，過剰なエネルギーを散逸するために光反応中心複合体内で15シス体が選択されている．これを説明するために，共役二重結合10個で対称中心を持つβ-カロテンでは，過渡吸収・過渡ラマンスペクトルの解析と三重項増感光異性化の量子収率の測定より，15シス体から全トランス体への三重項状態を経由した一方的な光異性化の傾向が示されている．そこで我々は，二重結合9個で非対称形のスフェロイデンを用い，異性体の三重項増感光異性化の量子収率を測定した．

紅色光合成細菌*R. sphaeroides*菌体から抽出した全トランス体，及びそれをヨウ素増感光異性化して精製した13'シス体，光反応中心複合体から暗闇の中で抽出した15シス体の三種の異性体に，三重項増感剤としてアントラセンを加え，一定面積にほぼ平行にしたNd:YAGレーザーのパルス光を当て，順次高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した．各異性体の分離・精製には，水酸化カルシウムで充填したカラムを5～8%アセトン/*n*-ヘキサンで展開したHPLCを用いた．

その結果，量子収率は15シス，13'シス，全トランス体の順に大きく，全トランス体はほとんど異性化しないのに比べ，シス体は全トランス体へ一方的に異性化した．また，この3つの異性体は，励起2μ秒後に同じ過渡吸収スペクトルを示したので，シス体は三重項状態で非常に効率よく全トランス体へ異性化し，共役鎖が短いためにβ-カロテンよりも速く異性化することがわかった．

2aE05

クロロフィル *a*, *b* とバクテリオクロロフィル *c* の励起一重項ラマンスペクトル

佐鳥　徳武，溝口　正，小山　泰（関西学院大・理）

励起状態のクロロフィル類は光合成初期過程において，エネルギー伝達，電荷分離，エネルギー散逸に関わっている．これらのメカニズムを解明するには各状態における分子構造に関する情報が必要である．今回，エネルギー伝達に関与する一重項状態のラマンスペクトルの測定をクロロフィル（Chl）*a*, *b* とバクテリオクロロフィル（BChl）*c* について試み，構造，電子吸収スペクトルの似ているChl *a*，BChl *c* と Chl *b* との比較を行った．

Chl *a*, *b* はほうれん草から抽出，精製しベンゼンに溶解し，BChl *c* は緑色硫黄細菌 *Chlorobium limicola* から抽出，精製しエタノールに溶解した．クロロフィル類は非常に蛍光を発しやすく蛍光のバックグランドのためにラマン線が隠れてしまうため，試料を高濃度（10^{-2} ～ 10^{-3} M）に調製し，回転セルに入れ窒素パージし室温でラマン測定を行った．Chl *a*, BChl *c* は390 nm，Chl *b* は439 nmのピコ秒パルス光（パルス幅 ～50 ps，繰り返し1kHz）を用い，測定光の光子密度を変化させることによって，励起状態の分布を変化させて過渡種のラマンスペクトルを得た．この過渡種はパルス幅，クロロフィルの寿命から考えて一重項状態であると帰属した．

Chl *a* と BChl *c* は吸収スペクトルが非常に似ていることから S_1 状態の構造も似ていると予想される．C_a-C_m 伸縮振動（ring-breathing）に注目すると，$S_0 \rightarrow S_1$ の遷移にともなって，両方とも低波数シフトするが，吸収スペクトルの異なるChl *b* も同様のシフトを示した．このことからクロロフィル類のマクロサイクルの分子構造が側鎖に関係なく，似た S_1 の構造をとっていると予想される．

2aE06

RESONANCE RAMAN SPECTROSCOPY OF THE *CIS-TRANS* ISOMERS OF β-APO-12'-CAROTENAL

Ying HU and Yasushi KOYAMA*
Fac. Sci., Kwansei Gakuin Univ., Nishinomiya 662

Resonance Raman spectroscopy is a powerful technique to study the cis-trans configurations and the intermolecular interactions of carotenoids bound to pigment-protein complexes. We studied a set of cis-trans isomers of β-apo-12'-carotenal, the conjugated chain of which has a length inbetween those of β-carotene and retinal, in order to examine whether the configurational key Raman lines which have been established for β-carotene are still valid for β-apo-12'-carotenal. We recorded the Raman spectra of all-*trans*, 9-, 13-, 15-, 13'-mono *cis* and 9,13-, 9,13'- and 13,15-di*cis* isomers at liquid nitrogen temperature by the use of the 488.0 nm line of an Ar^+ Laser. The following key Raman lines (for the all-*trans* and mono *cis* isomers) were found in common between β-apo-12'-carotenal and β-carotene. The following Raman line changed systematically from the all-trans or a peripheral-cis isomer toward a central-cis isomer: (1) The in-phase C=C stretching Raman line shifts to the higher frequencies in the order, all-*trans* ~ 13'-*cis* < 15-*cis* < 9-*cis* < 13-*cis*. (2) The C-C streching Raman line around 1160 cm^{-1} decreses in intensity in the order, all-*trans* > 13'-*cis* > 15-*cis* > 9-*cis* > 13-*cis*. (3) The C-C streching Raman line around 1135 cm^{-1} increases in intensity in the order, all-*trans* < 13'-*cis* < 15-*cis* < 9-*cis* < 13-*cis*. The key Raman line of 15-*cis* configuration was also found around 1250 cm^{-1}. The Raman lines of dicis isomers are also discussed.

2aE07

TRANSIENT RAMAN SPECTROSCOPY OF ^{15}N-SUBSTITUTED BACTERIOCHLOROPHYLL *a*: AN EMPIRICAL ASSIGNMENT OF T_1 RAMAN LINES

Leenawaty Limantara[a], Yasushi Koyama[a], Ingrid Katheder[b] and Hugo Scheer[b] ([a]Fac. Sci., Kwansei Gakuin Univ., Nishinomiya 662, [b]Botanisches Institut der Universität München, Munich, Germany)

^{15}N-substituted bacteriochlorophyll ***a*** (BChl ***a***) was extracted from the cells of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 grown in a medium containing ^{15}N-ammonium sulfate and yeast concentrate. The T_1 Raman spectra of ^{14}N- and ^{15}N-BChl ***a*** were obtained as the difference spectra of high-power minus low-power of one-color, pump-and-probe measurements using 420 nm, 5 ns pulses. A set of empirical assignments of the T_1 Raman lines were made based on shifts upon $^{14}N \rightarrow {}^{15}N$ substitution. The S_0 Raman spectra of the two BChls were also obtained by using the 457.9 nm CW beam, and a set of assignments of the S_0 Raman lines were given for comparison.