2aE08

THE ENVIRONMENT OF THE FOUR NITROGEN ATOMS OF BACTERIOCHLOROPHYLL *a* IN SOLUTIONS AS REVEALED BY ^{15}N-NMR SPECTROSCOPY

Leenawaty Limantara[a], Yoshitaka Kurimoto[b], Kenji Furukawa[b], Toshio Shimamura[c], Hiroaki Utsumi[d], Ingrid Katheder[e], Hugo Scheer[e], Yasushi Koyama[a] ([a]Fac. Sci., Kwansei Gakuin Univ., Nishinomiya 662, [b]KOBELCO Research Ins. Inc., Kobe 651-21, [c]Matsushita Technoresearch Inc., Moriguchi 570, [d]NMR Application Laboratory, JEOL Ltd., Tokyo 196, Japan, [e]Botanisches Institut der Universität München, D-80638, Germany)

The 50 MHz ^{15}N-NMR spectra of ^{15}N-enriched bacteriochlorophyll ***a*** were recorded in twelve different kind of solvents. The ^{15}N-signals of the four nitrogens in the tetrapyrrole rings I, II, III and IV (signals I, II, III and IV) were assigned by the use of correlations with those of the α, β and δ methine ^{1}H's. Signals I and III appeared in the higher field, while signals II and IV appeared in the lower field; the difference in the chemical shifts within each pair of the signals was small. The observation indicates an approximate D_{2h} symmetry of the nitrogen environment with higher electronic density on the ring-I and ring-III nitrogens.

2aE09

紅色光合成細菌 *Rhodospirillum molischianum* の光化学反応中心結合型チトクロムサブユニットの一次構造の決定

永島賢治、嶋田敬三、松浦克美（都立大・理・生物）

多くの紅色光合成細菌の光化学反応中心複合体は、光酸化された後、結合型チトクロムサブユニット中のヘム *c* によって再還元される。このサブユニットの詳細な立体構造は、紅色光合成細菌*Rhodopseudomonas viridis*の反応中心複合体の一部として明らかにされているが、その構造と機能の関係についての研究は少ない。我々は紅色光合成細菌*Rhodospirillum molischianum*を用いてチトクロムサブユニットにおける電子伝達機能について調べてきたが、構造との関係を明らかにするためにこのサブユニットをコードする遺伝子の一次構造を決定し、推定されるアミノ酸配列を*Rps. viridis*のものと比較した。得られたアミノ酸配列中にはヘム *c* に対する４つの結合部位が保存されていたが、*Rps. viridis* や *Rubrivivax gelatinosus*に見られるシグナルペプチダーゼIIの切断認識部位や脂肪酸を結合するシステイン残基は見られなかった。また、*Rs. molischianum*の配列中には*Rv. gelatinosus*の配列と同様に、*Rps. viridis*と比べ、いくつかの欠失が見られた。この欠失は*Rv. gelatinosus*と同様にＬＭコア、特にMサブユニットとの結合部位に多く見られるので、*Rv. gelatinosus*と同じように*Rs. molischianum*のチトクロムサブユニットは*Rps. viridis*に比べて膜面に対する傾きが大きいと考えられる。*Rs. molischanum* の配列と*Rv. gelatinosus*の配列が高い相同性を示すことは、両者の祖先種の間で光合成遺伝子の種間移動があったという我々の考えとよく一致する。

2aE10

Chloroflexus 属の新種 *Chloroflexus aggregans* の光化学反応中心タンパク質の塩基配列決定とその系統的解析

花田智、永島賢治、平石明[1]、嶋田敬三、松浦克美
（都立大・理・生物、[1]コニシ環境バイオ研）

国内温泉よりバクテリアルマット様の密な細菌塊の形成能を持つ好熱性糸状緑色光合成細菌MD-66株及びYI-9株を単離し、形態的・生理的・遺伝的解析から*Chloroflexus(C.)*属の新種であると判断して、*Chloroflexus aggregans*と命名した。今回、この新種の光化学反応中心を構成するタンパク質（L及びM subunit）をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、*C. aurantiacus* 及び紅色細菌のものと比較解析した。

*C. aggregans*と近縁種*C. aurantiacus*の反応中心遺伝子の相同率は82.4% (L subunit), 87.0% (M subunit)と高い値を示した。 さらにアミノ酸レベルで比較したところ、95.6% (L subunit), 95.1% (M subunit)というより高い相同性を示した。

これらの値は16S リボソームRNAの配列比較から得られた*C. aggregans*と*C. aurantiacus* との進化的距離が明確に種レベルの違いを持つことと対照的であった。 一方、これらの光合成器官の分光学的性質に差異が見られなかったことにはよく対応していた。 紅色細菌での近縁種間の同様な反応中心ペプチドの遺伝子比較では、アミノ酸レベルとDNAレベルの相同性はほぼ一致しており、*Chloroflexus*の２種間のような不一致は見られないことから、これら好熱性の細菌では中温性のものとは異なり、その光合成反応中心の蛋白質の変異に熱的なバイアスがかかっており、その結果それらの保存性が高くなっている可能性が考えられる。

2aE11

緑色光合成細菌のクロロソームとその再構成系におけるバクテリオクロロフィルｃの会合過程と最終フォーム

広田雅光，松浦克美，嶋田敬三，Raymond Cox[1]，Mette Miller[1]，三室守[2]（都立大・理・生物，[1]Odense大，[2]基生研）

緑色光合成細菌の光捕集器官クロロソームは，色素の大部分がタンパク質に結合していないという特徴がある．先に，クロロソーム内のバクテリオクロロフィルｃには，吸収極大波長とＣＤスペクトルの異なる２つの主要な高次構造成分が存在することを示した．また，ヘキサノール処理クロロソームにおける色素の高次構造形成の過程で，ヘキサノール除去の速度が最終的な吸収極大波長に大きく影響することを示した．今回，ヘキサノール処理クロロソームおよび，タンパク質を欠く疎水性分画から水相中に再構成した色素－脂質集合体を用いて，色素の会合構造の形成過程と最終フォームを詳しく調べた．

０．６％ヘキサノール処理クロロソームからゆっくりとヘキサノールを除去すると色素の高次会合の回復が起こり，ＣＤスペクトルにおいても２種類の成分の混合型を示した．急速に除去すると，短波長型のみのＣＤスペクトルであった．再構成色素－脂質集合体で有機溶媒（メタノール）除去のスピードと温度を変化させると色素会合体の極大波長は７３０ｎｍから７５０ｎｍと変化したが，ＣＤスペクトルはいずれも短波長型であった．ところが，これをさらにヘキサノール処理後ゆっくりと会合させると，混合型のＣＤスペクトルが再現できた．これらの結果は，クロロソーム中のバクテリオクロロフィルｃの２種類の高次構造がいずれもタンパクの関与なしで形成されること，長波長型はその形成に短波長型の存在が必要で色素がより高次に構造化されていることを示唆している．

2aE12

緑色非硫黄光合成細菌における新しいカロテノイド配糖体エステルの存在

高市真一[1]，辻公博[2]，花田智[2]，松浦克美[2]，嶋田敬三[2]（[1]日本医大・生物，[2]都立大・理・生物）

緑色光合成細菌のカロテノイドについては存在および組成に関する総説はあるが[K.Schmidt (1978) "The Photosynthetic Bacteria" pp.729]，不明確な点も残っている．今回，新しいカロテノイド配糖体脂肪酸エステルを見いだし，その化学構造を決定したので報告する．

Chloroflexus aurantiacus J-10-fl の菌体より色素を抽出し，シリカゲルおよび DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィー，C18 HPLC を用いて各カロテノイドを単離精製し，^{1}H-NMR，FD-MS などの分光法，GLC を用いて同定，定量した[S.Takaichi & K.Shimada (1992) Methods Enzymol., 213:374-385; S.Takaichi (1993) Org. Mass Spectrom., 28:785-788]．

菌体のカロテノイドとしてはβ-carotene 28%，γ-carotene 25%，carotenoid B (1',2'-dihydro-β,ψ-caroten-1'-ol)4%，carotenoid B-G 3% に加え carotenoid B-G-FA 40% を見いだした．この新しいカロテノイド配糖体エステルの構造は carotenoid B の C-1' 水酸基にβ-D-glucoside が結合し，その C-6 水酸基に主に C16:0 と C16:1 の脂肪酸が結合したものであった．以前の分析では鹸化をしていたため見逃したと考えられる．一方菌体脂質は C16:1，C18:0，C18:1 が主成分であった．別の菌株 OK-70-fl も同一組成であった．さらに新種の Chloroflexus aggregans MD-66 にも同様のカロテノイドが存在したが，組成は異なり，結合している脂肪酸も異なっていた．

カロテノイド成分より以下の生合成経路が考えられる．β-，γ-carotene は lycopene の環化によりつくられる．carotenoid B はγ-carotene の水和により作られ，β-D-glucoside，次いで脂肪酸が結合する．

2aE13

緑色光合成細菌 *Chloroflexus* のクロロソームにおけるカロテノイドの種類と機能

辻　公博、高市真一[1]、松浦克美、嶋田敬三（都立大・理・生物、[1]日本医大・生物）

緑色光合成細菌 Chloroflexus aurantiacus の光捕集構造体であるクロロソームは、バクテリオクロロフィル(BChl) c，BChl a，カロテノイドを含む。我々はクロロソームにおけるカロテノイドの構造的・機能的役割に興味を持ち、カロチノイド分子種の光捕集色素としての機能および特異性について調べた。

Chloroflexus のカロテノイドはβ-およびγ-カロテン、OH-γ-カロテンとその配糖体および我々が新たに見出したOH-γ-カロテン配糖体の脂肪酸エステルである。このうち後の３種はクロロソームをうすいＳＤＳで処理することによりBChl aと共に除去されることから、クロロソーム内部の主要成分と考えられる BChl c 集合体周辺には含まれていないことが示唆された。これに対し、β-およびγ-カロテンは BChl c の1/4(mol/mol)前後がＳＤＳ処理したクロロソームに残り、蛍光の励起スペクトルより BChl c へ 80%以上の高い効率で励起エネルギーを転移していることが示された。一方、ニコチンを加えて生育させた菌体中には前駆体であるリコペンが蓄積し、β-及びγ-カロテンと上記のγ-カロテンの誘導体の含量は大きく減少した。しかし、ＳＤＳ処理したクロロソームにはこの少量のβ-及びγ-カロテンが偏在し主要カロテノイド成分であった。このＳＤＳ処理クロロソームにはリコペンも含まれていたが、このリコペンから BChl c への励起エネルギー転移効率は高くなく、クロロソーム中の BChl c 集合体とβ-ないしγ-カロテンとの相互作用は特異性の高いものであることが示唆された。

2aF01

海産ラフィド藻*Heterosigma akashiwo* のヒストンの挙動に及ぼす窒素源の影響

宮城布明、藤伊　正（筑波大・生物）

H. akashiwo は窒素源としてNO_3^-、NH_4^+いずれをも利用して生育することができる。我々はかつてNO_3^-存在下でのみ、分子量26ｋの蛋白質が細胞膜画分で増加することを確認した。今回は、この蛋白質が核のＨ１ヒストンであったことを出発点として、培地中の窒素源（NO_3^-、NH_4^+）により核内に変化が起こりヒストンの挙動が変化することを見出したのでこれを報告する。

Yeda press を用いて細胞を破砕し遠心により分画を行ったところ、NO_3^-で培養した細胞（NO_3細胞）では予想通りＨ１ヒストンはＤＮＡとともに重い画分で回収されたのに対して、NH_4^+で培養した細胞（NH_4細胞）ではＤＮＡと解離して軽い画分に局在した。次に単離核を5mM ＥＤＴＡを含む緩衝液に懸濁し、超遠心によって沈殿と上清に分画した。NO_3細胞ではＨ１ヒストンはＤＮＡとともに沈殿したが、NH_4細胞ではＨ１およびコアヒストンの一部が可溶化した。さらに単離核をmicrococcal nuclease処理して得た断片化クロマチンを用いた時にも同様の結果が得られた。また、単離核から0.4 N 硫酸によるヒストン抽出を行ったところ、NH_4細胞ではコアヒストンが抽出されなかった。

二次元電気泳動の結果、各ヒストンのスポットの位置は一致しており、NO_3、NH_4両細胞間でヒストンの修飾に大きな差は無いと考えられる。これらの結果から窒素源により両細胞間でクロマチンの構造維持に関わる因子に差が生じていることが示唆された。

2aF02

自食作用不能株の新たな単離とその解析

野田健司、大隅良典（東京大、教養、生命）

出芽酵母は植物同様に大きな液胞を持ち、自食作用により、細胞質成分を非選択的に液胞内へ送り込み分解する。細胞は環境の変化を感知し、大規模な膜運動のもとに自食作用を誘導するため、その制御機構には多くの因子の関与が予想されている。既に我々の研究室において自食作用に必須な１５の*APG*遺伝子が同定されている（塚田等、９３年本会）。自食作用の機序に関してより多くの知見を得る目的で、今回新たな単離法のもとに新しい自食作用変異株の単離を行った。液胞膜に局在するアルカリ性ホスファターゼの膜貫通領域を欠失させた変異型アルカリ性ホスファターゼは細胞質中に局在する。この酵素は自食作用の誘導に伴い液胞内へと輸送され、液胞内プロテアーゼによりプロセシングをうけ、酵素活性を獲得する。約36000個の細胞を変異原処理し、この酵素活性を一次指標として自食作用不能株を単離した。現在までに既存の*apg*変異株と異なる５つの相補群に属する変異株が得られている。これらの変異株の解析結果について報告する。

2aF03

出芽酵母の液胞形態形成に関わる遺伝子*VAM6*の解析

中村徳弘、大隅良典、和田　洋　（東大・教養・生物）

出芽酵母の液胞は全細胞体積の約１／４を占める細胞内最大のコンパートメントであり、貯蔵あるいは、分解コンパートメントとしての役割を通して、細胞の恒常性維持に寄与している。液胞の形態形成には少なくとも９つの*VAM*遺伝子が必要であることが示されている。この*VAM*遺伝子群の一つ、*VAM6*遺伝子について、構造及び機能解析を行った。*vam6-1*変異株は液胞が断片化する表現型を示す。そこで、酵母のゲノムライブラリーから、この表現型を相補する野生型遺伝子をスクリーニングした。遺伝子解析の結果、*VAM6*遺伝子は1050アミノ酸（推定分子量 123kDa）からなるタンパク質をコードする新規の遺伝子であった。*VAM6*遺伝子産物の機能を明らかにするため、*VAM6*遺伝子のコーディング領域を酵母の栄養要求性マーカー*LEU2*遺伝子に置換した遺伝子断片を作製し、相同組換えにより遺伝子破壊株を構築しその表現型を解析した。四分子分析の結果、*VAM6*遺伝子破壊株は生育可能であった。また、*VAM6*遺伝子破壊株は大きな液胞を形成できず、多数の小胞状構造を細胞内に蓄積する表現型を示した。

2aF04

酵母の液胞形成に関与する*VAM2*遺伝子の構造と機能

和田　洋　大隅良典（東大・教養・生物）

酵母の液胞形態の形成には少なくとも９つの*VAM*遺伝子の機能が必須であることが遺伝学的解析の結果示されている．今回，私たちは*vam2-3*変異を相補する酵母の染色体DNAをクローニングし，その構造を解析した．遺伝子の構造解析の結果，*VAM2*遺伝子は酵母の第IV染色体上の*PDC2*遺伝子の隣にあることが示された．*VAM2*遺伝子は993アミノ酸からなる推定分子量113.4-kDaのタンパク質をコードする．遺伝学的な解析から，*vam2*変異は液胞タンパク質の選別輸送に欠損を示す*vps39*変異とallelicであることが示されたことから，この遺伝子産物の機能は液胞形態形成のみならず，液胞タンパク質の生合成過程にも関与していると考えられる．Vam2pは19個のAsp，Gluからなる配列(^{79}DDDDDDDDDDDDEDEDDEDE^{97})，塩基性アミノ酸に富む領域(^{239}KKKKKKTRK^{247})をもっている．これらの特徴は核に存在するRNA結合タンパク質に見いだされる．今後，*VAM2*遺伝子破壊株を作成しその表現型を解析するとともに，Vam2pの細胞内局在を解析することによって液胞形態形成におけるVam2pの機能を明らかにしていく．

2aF05

シロイヌナズナの液胞形成に関与する遺伝子の単離

佐藤　雅彦、大隅　良典、和田　洋
（東大、教養、生物）

植物液胞の形成機構の理解は、液胞の機能を考えるうえで重要であるが、それらの分子機構の解明は、あまり進んでいないのが現状である。

一方、酵母では、一連の液胞形成不能株の解析により、液胞の形成機構の分子論的理解が進みつつある。

一連の*vam* 変異株のなかでも*VAM3*は、283アミノ酸よりなるタンパク質Vam3pをコードする。Vam3pはPep12p,Sed5p,Sso1p,Sso2pや動物細胞のsyntaxinと相同性が認められ、膜融合において輸送小胞と標的となる膜との認識、融合に機能すると予想される。

今回我々は、植物の液胞形成機構の分子論的理解をめざす目的で、*VAM3* 相同遺伝子の植物からの単離を試みた。酵母の発現ベクター上に構築したシロイヌナズナcDNAライブラリーを*vam3*遺伝子破壊株に導入し、液胞形態がガラクトース存在下で、正常に復帰する株を選択し、その株からプラスミドを回収し,遺伝子解析を行なった。その結果1209bp中に、805bpのオープンリーディングフレームを持つ挿入断片が回収され、これは268 アミノ酸よりなるタンパク質をコードしていた。ハイドロパシープロットの結果、C末端に膜貫通領域を持つ、Vam3p,Pep12pなどに相同性を持ったタンパク質であった。

2aF06

登熟ヒマ種子の液胞プロセシング酵素および**Aspartic Proteinase**

平岩呂子[1,2]、西村いくこ[1]、西村幹夫[1,2]（[1]基生研・細胞生物、[2]総研大・生命科学）

登熟種子の液胞では種子タンパク質の成熟化に液胞プロセシング酵素(**VPE**)が関わっていることを既に報告してきた[1-3]。**VPE**は前駆体タンパク質のAsn残基のC末端側を切断するcysteine proteinaseである[1]。一方、酵母ではcarboxypeptidaseYなどの液胞タンパク質の成熟化にaspartic proteinaseであるproteinaseAが関与していると考えられている。今回は、精製した**VPE**と**AP**を用いて、両酵素の液胞タンパク質成熟化における役割について比較検討を行った。

プロセシングの基質としては、アラビドプシスの種子タンパク質2S albuminのプロセシング部位Asn-Proを含む18残基の合成ペプチドを用いた。**VPE**はこの部位を切断したが、**AP**はこの切断には関与せず、Phe-Asp間の結合を分解した。免疫電顕の結果、両酵素ともに登熟種子の液胞に局在していることは明らかであるが、**VPE**は液胞内部のpHに近いpH5.5に至適pHを持つのに対し、**AP**はpH3付近に至適pHを示し、pH4.5以上では活性は検出できなかった。最近、ナタネの**AP**が2S albuminのプロセシングに関与しているという報告[4]が出されたが、上記の結果から、2S albuminの成熟化における**AP**の関与は二次的なものと考えられる。高等植物液胞内でのプロセシング機構における**AP**の役割を**VPE**の機能と照らして考察する。

1) Hara-Nishimura, I. *et al.* (1993) *Plant Cell*, 5: 1651-1659.
2) Hara-Nishimura, I. *et al.* (1993) *Plant J.*, 4: 793-800.
3) Hiraiwa, N. *et al.* (1993) *Plant Cell Physiol.* , 34: 1197-1204.
4) D'Hondt, K. *et al.* (1993) *J.Biol.Chem.* , 268: 20884-20891.

2aF07

液胞膜画分に含まれるカルシウムイオン結合性タンパク質の精製と性質

前島正義、武田亜希子　（名大・農・生化）

植物細胞の液胞はカルシウム集積部位としての役割も担っている。Ca^{2+}/H^{+}対向輸送系が、細胞質Ca^{2+}を能動輸送している。その結果、液胞内外には10^4倍の濃度差が形成される。液胞のCa^{2+}集積機構を解析する研究の一環としてCa^{2+}結合性タンパク質を検索したところ、液胞膜画分にCa^{2+}結合性タンパク質染色性の"Stains-all"色素と反応するタンパク質が見出されたので、精製し生化学的な性質を分析した。

ダイコン (*Raphanus sativus*) 塊根から液胞膜を単離し、SDS-PAGEによりタンパク質を分離した後"Stains-all"染色を行ったところ４５kDのタンパク質が赤紫色に染まった。このタンパク質は液胞膜を超音波処理することにより膜画分から遊離した。そこで、目的タンパク質をQAE-Toyopearlイオン交換クロマトグラフィとSephacryl S-100によるゲルロ過を行い電気泳動上完全に精製することができた。このタンパク質は非変性条件下でのPAGEにおいても単分子として挙動し、多量体あるいは他の成分との複合体を形成している可能性はないと判断した。精製タンパク質を転写用メンブレンに吸着させた後、^{45}Caがこのタンパク質に結合することを確認した。Ca^{2+}結合タンパク質群の中のAnnexin familyはCa^{2+}存在下で膜脂質に結合する性質があるが、このタンパク質にはそのような特質はなかった。現在、単離した液胞を用いた局在性の検討実験を進めている。

2aF08

ヤエナリ子葉のα-アミラーゼ合成におけるERの関与

肥塚信也、Edward C. Yeung[1]、千葉一弘、金子康子[2]、田中喜之[3]、諸橋征雄（東京農工大・農、[1]University of Calgary. [2]埼玉大・理・生体制御、[3]農水省・生物研）

デンプンを貯蔵物質としているヤエナリ種子では、アミロプラスト中のデンプンは発芽にともなって細胞質で合成されるα-アミラーゼによって分解される。一方、α-アミラーゼは、疎水性に富むシグナルペプチドと考えられる部分を持つ前駆体タンパク質として合成されることから、ヤエナリ子葉中でのα-アミラーゼ合成において ER が関与している可能性が考えられた。本研究では、この点について検討を加えた。

α-アミラーゼ mRNA は、遊離ポリソーム分画には存在せず、膜結合性ポリソーム分画に局在していた。また、α-アミラーゼ蛋白は、rough ER 分画に存在しており、界面活性剤存在下でのみ、プロテアーゼによって分解された事から、ER の lumen 中に存在している事が示された。また、ER 中に存在するα-アミラーゼは、mature なものと同じ分子量を示した。免疫組織化学的手法により、α-アミラーゼ蛋白の局在性を調べたところ、細胞壁には存在せず、子葉細胞中のアミロプラスト中に局在している事があきらかとなった。このことは、子葉細胞から調製したプロトプラスト中に高いα-アミラーゼ活性が、検出された事からも支持された。従って、ヤエナリ子葉のα-アミラーゼは、エンドウの茎に存在するα-アミラーゼとは異なり、細胞外に分泌されている可能性はないと考えられた。

以上の結果より、α-アミラーゼは rough ER 上で前駆体として合成されると同時に ER lumen 中にプロセスされ、アミロプラスト中に輸送されている可能性が高いと考えられた。

2aF09

イネ種子貯蔵タンパク質シグナル配列の細胞内局在に対する機能解析

牧野英志、田増章吾、中氏恵美、増村威宏、田中國介（京府大・農・農化）

イネ種子貯蔵タンパク質はデンプン性胚乳細胞中の二種のプロテインボディ（PB）に局在しており、PB-I にはプロラミンが、PB-II にはグルテリンがそれぞれ特異的に集積している。昨年度の本大会において、シグナル配列を持たないレポータータンパク質は膜系に輸送されないが、プロラミン、グルテリン等のシグナル配列を持つものは細胞内の特定の膜系を認識し輸送されることを示した。しかし、in vivoにおいてプロラミンmRNAがPB-Iの膜系の認識に関与しているという観察結果もあり、細胞内における部位特異的なタンパク質の局在化のメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、これらをさらに明確にすることを目的とした。

これまでにクローン化した各種のイネ種子胚乳タンパク質cDNAを用い、シグナル配列にレポータータンパク質を融合するように人工遺伝子を構築し、これらのDNAからin vitro転写／翻訳系でタンパク質合成を行い、タンパク質合成の際に、イネ胚乳より調製したオルガネラ成分を加えて、融合ポリペプチドの輸送を行った。さらに反応産物のショ糖密度勾配遠心法による分画、SDS-PAGE、ウエスタン分析を行った。

その結果、シグナル配列に続く胚乳タンパク質の成熟ポリペプチド部分を長くした融合ポリペプチドの輸送効率が高くなった。また、シグナル配列中でアミノ酸を (K→R, T) のように一残基変換した融合ポリペプチドでは膜系への輸送の特異性や効率には大きな変化は生じないことがわかった。現在、貯蔵タンパク質のmRNAの3'非翻訳領域の役割についても解析を進めており、それらの結果についても報告する。

2aF10

カボチャ種子プロテインボディ膜貫通型タンパク質の酵母細胞における発現

井上香織[1,2]、和田洋[3]、西村いくこ[1]、西村幹夫[1,2]（[1]基生研・細胞生物、[2]総研大・生命科学、[3]東大・教養・生物）

カボチャ種子プロテインボディには2種類の膜貫通型タンパク質MP28とMP23が存在し、両者は生化学的に類似している[1)]。演者らはこれまでに、MP28とMP23のcDNAクローニングを行い、両膜タンパク質が共に、インゲンマメやアラビドプシスで報告されているαTIPのホモログであることを明らかにしてきた[2)]。

登熟期のカボチャ種子では、粗面小胞体で合成された貯蔵タンパク質はデンスベシクルを経由して液胞へ運ばれる。この貯蔵タンパク質の蓄積より早い時期に、MP28とMP23は液胞膜へ蓄積される。しかし、高等植物における液胞膜タンパク質の細胞内輸送経路やαTIPの生理学的な機能については不明な点が多い。登熟種子の液胞にみられる２種類のαTIP、MP28とMP23の機能と生合成過程を解明するために、植物と同様に液胞を持つ酵母での発現を試みた。*GAL1*プロモーターの下流にMP28とMP23のcDNAをもつ融合遺伝子を、種々の酵母株に導入した。発現産物量をイムノブロティングで調べた結果、液胞 proteinaseA の欠損株で両タンパク質の蓄積が見られた。また、酵母細胞の蛍光抗体染色により、発現したMP28とMP23は液胞膜に蓄積していることが明らかとなった。

1) Inoue, K. *et al.*, **Plant Journal**, in press (1995).
2) 日本植物生理学会 1994度年会講演要旨集 p.141

2aF11

登熟カボチャ子葉において種子タンパク質の輸送に関与する低分子量GTP結合タンパク質

嶋田知生[1,2]、近藤真紀[1]、西村いくこ[1]、西村幹夫[1,2]
([1]基生研・細胞生物, [2]総研大・生命科学)

演者らは既に、登熟カボチャ子葉から種子タンパク質の細胞内輸送に関与するデンスベシクルを単離し、これに2種類の低分子量GTP結合タンパク質が存在することを報告した[1)]。今回、登熟カボチャ子葉より低分子量GTP結合タンパク質Vpt1pのcDNAを単離し、Vpt1pの局在性と機能を解析した。

得られたcDNAは全長848塩基で、199アミノ酸よりなるタンパク質Vpt1pをコードしていた。Vpt1pは液胞タンパク質の輸送に関わる酵母のVps21pと47%の高い同一性が見られ、Vps21pと同じrab5サブファミリーに属することが明らかとなった。大腸菌で発現させたVpt1pのGTPブロット解析により、これにGTP結合能があることを確認した。ノーザンブロット解析の結果、Vpt1pのmRNAは植物体の根、茎、葉の各組織ではあまり蓄積していないのに対し、登熟子葉で大量の蓄積が見られた。この子葉組織における蓄積量は、登熟期を通して一定しており、発芽に伴って減少していった。Vpt1pの細胞内局在性を調べるために、大腸菌で発現させたVpt1p全長に対する抗血清およびVpt1pのC末端の超可変領域の20アミノ酸からなるペプチドに対する抗血清を調製した。いずれの抗血清を用いても、デンスベシクル膜画分に25kDaと24.5kDaの2本のバンドがイムノブロットで検出された。さらに、これらの抗血清を用いた免疫電顕により、単離デンスベシクルの膜上にVpt1pが存在することが示された。以上の結果より、低分子量GTP結合タンパク質Vpt1pがデンスベシクル膜上に存在し、液胞タンパク質の輸送に関与していることが強く示唆された。

1) Shimada, T. *et al.* (1994) *Plant Cell Physiol.*, 35: 995-1001.

2aF12

マイクロボディ膜に存在する新規のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ

山口勝司、森仁志[1]、林　誠、西村幹夫
(基生研・細胞生物、[1]名古屋大・農)

カボチャなどの脂肪性種子の子葉組織では、光照射に伴いマイクロボディの機能変換がみられる。この変換に伴って膜タンパク質も大きく変動し、分子量31kと28kの膜タンパク質(MP31,MP28)はともにマイクロボディ機能変換時に減少し、特にMP28は完全に消失してしまう。今回、MP31について解析を加え、この膜タンパク質が新規のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)であることが判明したので、その性質と細胞内で果たしている役割を報告したい。

MP31のプロテアーゼ分解ペプチドのアミノ酸配列から、このタンパク質が細胞礎質のAPXと高い相同性があることが分かった。APX活性は単離グリオキシゾーム画分に検出され、オルガネラの単離過程で濃縮された。又、この活性はグリオキシゾーム膜画分に回収された。マイクロボディ中のこの酵素の比活性は、マイクロボディ機能変換により減少し、MP31の特異抗体を用いたイムノブロットの結果と一致した。これらの知見から、現在までに報告されている細胞礎質、葉緑体ストロマおよびチラコイド膜に局在する3つのAPXの他に、マイクロボディ膜に局在する新規のアイソザイムの存在が明らかとなった。単離マイクロボディでのAPX活性にlatencyがみられないことから、APXは細胞礎質側で機能していると考えられ、マイクロボディで生成した過酸化水素が細胞礎質に漏れ出たものを、膜表面で消去していると予想される。

2aF13

機能変換過程におけるマイクロボディ内分解機構の解析

張　征、森　仁志（名大・農・生化学制御専攻）

脂肪性種子子葉組織のマイクロボディは、子葉の緑化に伴い脂肪の分解に関与するグリオキシゾームから、光呼吸に関与する緑葉パーオキシゾームに、直接的に機能変換する。この過程でグリオキシゾームに特異的な酵素はマイクロボディ内で分解されることが予想されるが、その分子機構は明らかにされていない。本研究ではこの分解系を担うプロテアーゼを検出して、その分子機構の解明を試みた。暗所4日、明所2日生育させたカボチャ子葉からPercoll密度勾配遠心法を用いて、サイトゾルや他のオルガネラの混入なく、変換過程にあるマイクロボディを調製し、その抽出液をプロテアーゼ粗標品とした。プロテアーゼの活性は、ビオチン化した精製 malate synthase (B-MS)と各標品を種々の条件下で反応させた後、SDS-PAGE、western blot、ECL-systemに供して、分解されたMSの断片化を指標として検出した。マイクロボディ抽出液とB-MSをSDS、2-ME、glycerol存在下、室温で反応させると経時的にB-MSの分解が検出される。この反応液、あるいはマイクロボディ抽出液を予め100℃で3分間加熱した場合には、このような分解は検出されない。このことはこの分解がタンパク質性の因子によることを、強く示唆している。また、グリオキシゾーム抽出液からはこの分解活性は検出されず、変換過程にあるマイクロボディに特異的であると期待される。マイクロボディを分画すると、この活性はmatrix画分から検出され、さらにこの画分を5-25%ショ糖密度勾配沈降速度法で分画すると、分解活性はcatalaseよりも沈降速度の大きな画分に検出され、プロテアーゼが多量体を形成している可能性が示唆された。ATP依存性などについても報告する。

2aG01

ＳＤＳにより活性化されるトウモロコシ成葉・プロテアーゼの精製と性質

山田隆文、小澤新、太田啓之、増田建、塩井祐三、高宮建一郎（東工大・生命理工）

1992年度の本大会において、我々は、ＳＤＳによって活性化されるトウモロコシ成葉の可溶性プロテアーゼ（39ｋＤａ）の性質を報告した　その後の研究で、同じくＳＤＳで活性化される分子量の異なる別のプロテアーゼを精製したのでその性質を報告する。

本酵素は、イオン交換やゲル濾過などのクロマトグラフィーと電気泳動により精製を行った。その結果、ネイティブ型の分子量は183kDaであり、活性を持ったサブユニットの分子量は約50kDaであった。また、基質としてRuBisCoを用い、ネイティブ電気泳動により精製した酵素の性質を調べた

1）ＳＤＳの効果：至適濃度は0.5%であった　2）ＳＨ試薬の効果：β－メルカプトエタノールによって活性が促進されたその至適濃度は１％であった。また、ＳＨ試薬のみでは活性は発現されなかった。3）界面活性剤の効果：ＳＤＳ以外のイオン性、非イオン性の界面活性剤について調べた結果、活性が顕著に発現するものは無かった。4）ｐＨ依存性：至適ｐＨは弱酸性（ｐＨ５付近）であった。

2aG02

キュウリ緑葉中に発現するプロテアーゼの機能

山内靖雄、木村倫子[1]、末吉邦[1]、杉本敏男[1]、王子善清[1]
（神戸大・自然科学、[1]神戸大・農・生物環境制御）

暗下で発芽した5日目のキュウリ子葉中では、種子貯蔵タンパク質である成熟型11Sグロブリンの限定分解産物が主要なタンパク質として存在している。この後暗下で育て続けた子葉では11Sグロブリン分解物が主要なタンパク質のまま存在していたのに対し、光を照射した子葉ではRubiscoタンパク質が主要なタンパク質となった。この時pI4.0-4.5のプロテアーゼが新たに発現していた。このことはキュウリ子葉では光によって誘導されるプロテアーゼが存在し、それらが光照射による子葉の貯蔵器官から光合成器官への転換の際に必要となるアミノ酸を供給していることを示唆している。

また、光照射されたキュウリ緑葉に主要なプロテアーゼ群として存在するpI4.0～4.5、pI5.0のプロテアーゼについて、既知のプロテアーゼに対して用いられる様々な人工基質を用いて基質特異性を調べた。その結果、pI5.0のものはArg、LeuのC末端側を切断するカテプシンB、パパイン様の活性を持つシステインプロテアーゼであり、pI4.5のものはGluのC末端側を切断するプロテアーゼであることが分かった。キモトリプシン、エラスターゼ様の活性は検出されなかった。これらのプロテアーゼは至適pHを弱酸性に持つことから、液胞に存在し、葉のタンパク質のターンオーバーに関与していると考えられた。

2aG03

ケツルアズキ発芽子葉のシステイン・エンドペプチダーゼ：活性発現に及ぼす植物ホルモン等の効果

種山正登志，岡本龍史，南川隆雄（東京都立大・理・生物）

システイン・エンドペプチダーゼ SH-EP はケツルアズキ（Vigna mungo）発芽子葉で合成される主要プロテアーゼであり，子葉中の貯蔵グロブリンの分解に働く．種子を暗所 27°C で発芽させると 2 日目から活性は急上昇して 3-4 日目にはピークに達し，のち低下する．乾燥種子から胚軸を除き，子葉のみをインキュベートすると，活性発現は極めて低いレベルに抑えられる．ここでは，この胚軸除去による活性抑制の原因を，胚軸のa) シンク機能及びb) 植物ホルモンのソースという二つの面から探るために実験を行った．めばえを 3-60 mM アミノ酸混合液を与えて発芽させると，4 及び 6 日目に測定したエンドペプチダーゼ活性は，アミノ酸濃度に反比例して低下した．SH-EP 抗体を用いた免疫ブロット法では，高濃度のアミノ酸により SH-EP の翻訳後プロセシングにも遅滞がみられた．高濃度のアミノ酸は代謝終産物及び浸透圧ストレスの両面から活性発現を抑えるものと考えられる．また，単離子葉を 10-100 μM GA_3 存在下で発芽させると，活性は発芽子葉のそれに見合うほどに上昇した．1 μM 以上のウニコナゾールは単離子葉，発芽子葉の両方について活性上昇を阻害した．これらのことから，内生ジベレリンがエンドペプチダーゼ活性の発現または分解の抑制に働いていることが予測される．1 μM カイネチン，1-100 μM NAA 等も単離子葉での活性上昇に効果があった．

2aG04

イネ発芽種子からのシステインエンドペプチダーゼREP-1の精製と性質

加藤英樹、南川隆雄（東京都立大・理・生物）

多くの植物で発芽期における種子貯蔵タンパク質の分解にシステインエンドペプチダーゼが主要な働きを担っていることが知られている。我々はこれまでにケツルアズキ発芽子葉で発現する同酵素 SH-EP について研究してきた[1]。SH-EP は、オオムギの発芽期に特異的に発現する EP-B[2] との間に高い相同性があることが示されている。このことから、イネ（*Oryza sativa* cv. Koshihikari）発芽種子にも類似のシステインエンドペプチダーゼが存在し、発芽期の貯蔵タンパク質分解に関与していることが推定されたので、今回その検出と精製を試みた。

イネ発芽種子のエンドペプチダーゼ活性は、乾燥種子では殆ど検出されないが、6 日目から上昇し、18 日目に最大値を示し、その後低下した。次に 9 日目の発芽種子の抽出液から硫安分画、疎水クロマトグラフィによって精製を進め、2 種のエンドペプチダーゼ REP-1 及び REP-2 を分離した。REP-1 についてはさらにイオン交換カラム及びゲル濾過カラムによって精製を進め、36 kDaタンパク質として単離した。REP-1 は免疫学的に SH-EPと相同であり、アゾアルブミンを基質としたとき至適 pH 5.5 を示した。さらに各種阻害剤による影響から、これがシステインエンドペプチダーゼであることが示された。

1. Mitsuhashi W and Minamikawa T (1989) Plant Physiol 89, 274-9.
2. Koeher M K and Ho T-H D (1990) Plant Physiol 94, 251-8.

2aG05

イネ発芽種子システインプロテアーゼの cDNA クローニング

新谷　愛、山内大輔、南川隆雄（東京都立大・理・生物）

種子発芽期には種々のプロテアーゼが貯蔵タンパク質の分解に関わっているが、主要な役割を果たしているのはシステインプロテアーゼであると考えられる。我々はこれまでにケツルアズキ（*Vigna mungo*）発芽子葉から主要システインエンドペプチダーゼ SH-EP を単離し、その発現機構を調べてきた。ここでは、SH-EP に類似のシステインプロテアーゼがイネ発芽種子にも存在するとの推定のもとに研究を進め、それに相当する cDNA クローンを単離したので、その構造及び性質を報告する。

吸水 9 日目のイネ（*Oryza sativa* L. cv Koshihikari）発芽種子から λgt11 cDNA ライブラリーを作製し、抗 SH-EP 抗体を用いて免疫学的スクリーニングを行った。これにより、SH-EP と高い相同性を示すクローン（pRP80）を単離し、全塩基配列を決定した。このクローンは全長 1.4 kbp で、378 アミノ酸残基をコードする ORF が存在した。塩基配列より導き出されたアミノ酸配列を、既報のシステインプロテアーゼと比較したところ、活性部位及びその周辺は非常によく保存されていた。また、シグナルペプチドとプロペプチドに相当する部分も見いだされた。このクローンをプローブにしてイネ発芽期における mRNA 発現の経時変化を調べたところ、発芽 9 日目をピークとする発現パターンを示した。遺伝子数の確認や、ジベレリンによる発現誘導の有無などについても解析を進めている。

2aG06

インゲンマメさやの28 kDa貯蔵タンパク質 (PSP) の誘導合成

鐘佩英，田中哲太郎，山内大輔，南川隆雄 (東京都立大・理・生物)

マメ科植物のさやは未熟種子の保護器官であるが、種子形成期に葉から輸送される養分の一部は、何らかの形でさやに一時的に貯蔵されてから種子に移行すると考えられる。成長中のインゲンマメ植物体から未熟果実を除く処理（除果処理）を行うと、その後に結実した果実のさやに 28 kDaタンパク質 (PSP) が顕著に集積してくる。除果処理によって種子のシンク機能を強制的に縮小させるとその代替として、さやに特殊な貯蔵タンパク質が誘導合成されると推定される。ここでは PSP の性質やその合成誘導について報告する。

開花後、除果処理を 2 週間間隔で 4 回行い、その後、結実した果実 (開花後 22 - 27 日目) よりさやを採取した。 このさやの抽出液を硫安分画、DEAE-セルロースカラム及びゲルろ過カラムにより分画し、PSP を精製した。ここで得られた PSP 画分は SDS-PAGE では単一バンドを与えたが、未変性 PAGE により 3 つの型（A、B、C）に分けられた。このうち A 及び C に対して、それぞれの抗体を調製した。これらの抗体を用いて、種子形成期の各時期における除果処理したさやでの PSP の量的変化と器官分布について調べた。その結果、 除果処理したさやでは種子成熟の後期に PSP は最も多量に蓄積した。また、未処理の植物体ではさや以外の器官に PSP は検出されなかったが、 除果処理すると根及び茎で PSP の蓄積が認められた。PSP 合成量に対するジャスモン酸メチルの影響についても検討した。

2aG07

液胞酵素によるribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenaseの分解

吉田友恵，南川隆雄（東京都立大・理・生物）

Rubiscoは緑葉の可溶性タンパク質の50%近くを占めることから、セネッセンス期に葉から貯蔵器官へ転流する窒素源として重要視されるが、それにかかわる分解系については、まだ十分に解明されていない。ここではインゲンマメ*Phaseolus vulgaris*を用いた実験結果について報告する。

25℃、明所で育てた播種後10日目の芽生えから第一葉を切り取り、25℃、明所または暗所で静置した。また、セネッセンスを促進させるために0.5 mMジャスモン酸メチルを塗布し25℃、暗所で同様に静置した。ついで、葉タンパク質をSDS-PAGE用sample bufferで抽出し、SDS-PAGE/免疫ブロット法で分析した結果、上記のいずれの場合もインキュベーション時間とともに、LSU、SSUともにその量が減少したが、分解産物は検出されなかった。しかし、第一葉のホモジネートを27℃、pH 5.4でインキュベートしたところ、LSUからの 50 kD分解産物が検出された。これらの結果から、セネッセンス期に葉緑体が破壊される際、内部が酸性で種々の加水分解酵素を含む液胞が、急速なRubisco分解に関与することが推定された。そこで、第一葉から単離した液胞画分を精製Rubiscoとともに27℃でインキュベートし、SDS-PAGEで分析したところ、LSUの比較的急速な分解がみられ、50、42、41 kDの分解産物が検出された。

2aG08

イネ種子の登熟と発芽にともなうチアミンとチアミン結合タンパク質の変化

清水まゆみ、吉田豊和、光永俊郎（近畿大・農・食栄）

われわれはすでに植物種子にチアミンと特異的に結合するタンパク質（チアミン結合タンパク質:TBP）が存在し、その結合活性が発芽時に消失することを示した。また、イネ、ソバ、ゴマ種子より TBPを単離し、その性質を明らかにした。これらのうちイネ種子の TBPは分子量約10万で同一分子量のサブユニット２つからなり、リン酸エステル型チアミンを結合せず、遊離型チアミンを特異的に結合する。今回はイネ種子の登熟と発芽にともなう TBPとチアミンの変化を調べた。

登熟中の種子で、チアミンは開花後９日に認められ、25日ごろまで急激に増加し、その後は完熟するまで一定であった。エステル型チアミンが時間経過にともなって増加したが量的にはわずかであり、総チアミンのほとんどが遊離型であった。チアミン結合活性と TBPも登熟とともに増加し、これらの変化はチアミン量と並行していた。活性物質の分子量をゲルろ過で推定したところ、開花後９日で約10万で完熟するまで同一であった。一方、発芽にともないチアミンはエステル型が増加し遊離型が減少したが、総量は変化しなかった。チアミン結合活性と TBPは急減した。ゲルろ過での TBPの溶出位置は徐々に遅れ、低分子化することが確認された。

2aG09

倍数性の異なるコムギ種子の発達過程における*Wx*タンパクの含量とその酵素活性の変化

藤田直子、和田野晃[1]、平知明（大阪府立大学・農学部・応用植物科学、[1]応用生物化学）

*Wx*遺伝子はアミロースを合成するNDP-glucose-starch glycosyltransferase（*Wx*タンパク）をコードしており、穀類の胚乳中のデンプンのモチ性、ウルチ性を決定している。普通系コムギは異質六倍体であり、これらは異なるゲノムをもつ祖先種二倍体が交雑することにより成立したと考えられており、祖先種と考えられている二倍体コムギ、エギロプスおよび四倍体コムギも現存する。倍数体コムギにおいて*Wx*遺伝子は共優性的に*Wx*タンパクを発現しており、開花後15～16日目のデンプンあたりのタンパク量および酵素活性は四倍体は六倍体より高い値を示すことをすでに発表した。今回は種子の発達過程におけるデンプンあたりの*Wx*タンパクの量と酵素活性の変化についての測定を行った。異なるゲノムをもつ二倍体コムギ、エギロプスでは種子の発達過程における酵素活性の継時変化はゲノムにより特異的なパターンを示した。また、ほとんどの二倍体および倍数体において*Wx*タンパクの量は種子形成の初期では少ないにもかかわらず、酵素活性は高い傾向が得られた。これらの継時変化と*Wx*遺伝子のドースとの関係を考察する。

2aG10

高等植物細胞の細胞骨格画分より抽出したリボゾーム凝集タンパク質の性質と構造解析

伊東庸子、阿部俊之助、エリック・デービス[1]　（愛媛大・農・生物資源、[1]ネブラスカ大・生命科学）

エンドウ（Pisum sativum L var. Alaska）の黄化芽生え先端部より抽出した細胞骨格画分には、アクチン、チューブリンなどの細胞骨格タンパク質や、細胞質リボゾームの７０％にものぼる多くのリボゾームが含まれている。この画分を、デタージェントを含む高塩濃度の緩衝液で細胞骨格を解離し、超遠心によりリボゾームを取り除いた後、透析により細胞骨格タンパク質を含むコロイド状物質（ＡＴ）を構成させた。ＡＴは、０－１５０ｍＭK+ を含む緩衝液中で、リボゾームと結合する性質を持つことがわかった。

さらにこのＡＴより、０－１５０ｍＭK+ 存在下で可溶性のリボゾームを凝集沈澱する性質をもつタンパク質（ＲＳＰ）を抽出した。ＲＳＰはＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分子量約４２.５ｋＤａであることがわかった。また、このようなリボゾーム凝集活性を持つタンパク質は、トウモロコシ、タケ及びラット肝細胞等多くの生物種に存在していた。このことから、ＲＳＰは細胞活動において何らかの重要な役割を持つものと考えられた。

そこで、ＲＳＰの構造と機能を明らかにするため、エンドウのＲＳＰを単離精製し、化学分解及び数種のプロテアーゼを用いた加水分解によりペプチド・マップ及びタンパク質の部分シークエンスを得た。遺伝子配列等、ＲＳＰのさらに詳しい分子構造を現在解析中である。

2aG11

日本ニワトコ樹皮レクチンとリシン型リボゾーム不活化タンパク質との関係について

賀来華江、矢頭美砂[1]、田中喜之、田崎清[2]、南栄一、水野洋、渋谷直人（農水省生物研、[2]森総研、[1]筑波大）

日本ﾆﾜﾄｺ樹皮ﾚｸﾁﾝ(SSA)は、2種の異なるサブユニットから成る分子量14万の四量体糖蛋白質であり、Neu5Acα2,6Gal/GalNAc単位を特異的に認識するﾚｸﾁﾝである。私たちは、cDNAｸﾛｰﾆﾝｸﾞによる構造解析の結果、本ﾚｸﾁﾝが植物由来のﾘﾎﾞｿﾞｰﾑ不活化毒性ﾀﾝﾊﾟｸ質と密接な関連をもっていることを見いだしたので、これらの間の関係を中心に報告する。

［方法と結果］日本ﾆﾜﾄｺ樹皮からmRNAを調製し、λgt11ﾍﾞｸﾀｰに挿入し、cDNAﾗｲﾌﾞﾗﾘｰを作成した。精製抗SSA抗体でﾗｲﾌﾞﾗﾘｰをｽｸﾘｰﾆﾝｸﾞした結果、全長1904塩基対、564ｱﾐﾉ酸残基の翻訳領域から成るｸﾛｰﾝを得た。このｱﾐﾉ酸配列と、既知の両ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ及びその内部ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞのN末端との比較から、この両ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄは、1本のmRNAから転写、翻訳された後、ﾌﾟﾛｾｼﾝｸﾞによりそれぞれのｻﾌﾞﾕﾆｯﾄとなることが示唆された。興味あることに、ｱﾐﾉ酸配列のﾎﾓﾛｼﾞｰ検索により、このﾚｸﾁﾝは、毒性蛋白質であるｱﾌﾞﾘﾝ､ﾘｼﾝ前駆体と高い相同性を示し、疎水性ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄは、ﾘﾎﾞｿﾞｰﾑ不活化活性の本体でN-glycosidase活性を持つＡ鎖と、親水性ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄは、ｶﾞﾗｸﾄｰｽ結合活性を持つＢ鎖とそれぞれ高い相同性を示すことが見いだされた。最近、別のニワトコ属植物樹皮中に、このﾚｸﾁﾝとは異なるﾘｼﾝに非常に近い性質をもつ二量体の毒性蛋白質が存在することが報告されており、現在、日本ニワトコ樹皮中におけるこうした毒性タンパクの検索と、これらのタンパクの間の分子進化的関連およびそれらの機能について検討を進めている。

2aG12

講演中止

2aG13

タバコオスモチン様タンパク質の抗菌性及び局在性の解析

小岩尚志、佐藤文彦、阪井康能、加藤暢夫、山田康之（京都大・農・農化）

タバコ培養細胞中に蓄積するオスモチン様タンパク質（OLP）は、TMV感染による過敏感反応に伴って誘導されるタバコPR-5タンパク質の中性アイソフォームである。培養細胞より精製したOLPは単独で種々の糸状菌の生育を阻害する抗菌性タンパク質であることが判明した。その一方で全くOLP非感受性の菌も存在した。OLPの抗菌性は塩によって中和されたが、0.6M マンニトール存在下においても抗菌性は保たれた。

一方、OLPのC末端ペプチド(CTPP)の機能を調べるために天然型遺伝子及びCTPPを除いた変異遺伝子をタバコ及びメタノール酵母に導入した。形質転換植物の細胞内外におけるOLPの蓄積を解析した結果、OLPが細胞内に保持されるためにCTPPが必要であることが明らかとなった。また、これまでにOLPは等電点が異なり、同一のN-末端アミノ酸配列を持つ2種以上のアイソフォームとして検出されていたが、形質転換個体に蓄積するOLPをIEF-immunoblot法により解析したところ野生型植物の根や培養細胞においてみられる中性アイソフォームのほとんどに相当する複数の分子種が検出されたことから、これらのアイソフォームは1種の遺伝子由来であることが明らかとなった。酵母においては天然型遺伝子を導入した場合にはOLPの顕著な蓄積は見られなかったが変異遺伝子を導入することによりOLPが培地に分泌されることが明らかとなった。

2aI01

分岐鎖 α-ケト酸脱水素酵素遺伝子ホモログのシロイヌナズナ緑葉における発現

佐藤篤行[1,2]、伊藤正樹[1]、渡辺昭[1]（[1]東京大・理・植物、[2]名古屋大・農・生化学制御）

分岐鎖 α-ケト酸脱水素酵素は分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）のアミノ基転移の結果生じる分岐鎖 α-ケト酸の酸化的脱炭酸を触媒する酵素であり、分岐鎖アミノ酸の代謝系路の鍵酵素として働くことが知られている。また、メープルシロップ尿症という遺伝病はこの酵素の欠損や変異によって起こる分岐鎖アミノ酸代謝異常症であることが知られているが、この酵素は植物においては全く研究されていない。演者らはシロイヌナズナを暗所に置いたときに発現する遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法によって探索し、暗所に置いた緑葉で特異的に発現する三つの cDNA クローンを得た。このうちの一つは分岐鎖 α-ケト酸脱水素酵素 E1 βサブユニットのホモログであることが明らかとなった。動物においては飢餓時に筋肉で分岐鎖 α-ケト酸脱水素酵素の活性が亢進し、分岐鎖アミノ酸をエネルギー源に利用することが知られている。暗所に置いた緑葉においてグルコースやショ糖、デンプンが消費された後、筋肉細胞と同様にタンパク質の分解によって生じるアミノ酸をエネルギー源として利用するためにこのような遺伝子が働きだすと考えられる。

2aI02

老化特異的に発現する核コード葉緑体タンパク質のcDNAクローンの単離

嶋田幸久、渡辺昭（東京大・理・植物）

緑葉の老化過程において葉緑体は内部構造が崩壊し、大きく変化する。この葉緑体の退化は古くから核遺伝子によって支配されていると考えられてきたが、どのような遺伝子が関与しているのか全くわかっていない。そこで核コードの葉緑体タンパク質のcDNAをスクリーニングする方法を開発し、この方法を利用して葉緑体の老化に関与するcDNAをクローニングすることにした。発芽後約２週間で成熟したハツカダイコンの子葉を暗所に移すと、老化の進行が促進され、新しい遺伝子が発現することが知られている。そこでビオチン－アビジンを用いたサブトラクション法により老化を始めた組織から作製したcDNAの中から、若い葉にも共通して発現しているものを取り除いて老化特異的cDNAを得た。このcDNAをプローブとしてcDNAライブラリをスクリーニングし、老化特異的に発現する約500個のクローンを得た。次にこれらのcDNAクローン中から単離葉緑体の中へ取り込まれるものを選抜する次のような方法を開発した。まず500個のcDNAクローンをいくつかのグループに分け、*in vitro*でラベルしたタンパク質として発現させた。これを単離葉緑体へ輸送し、SDS-PAGEで分離してImaging Analyzerで解析し、そのグループの中に葉緑体へ入るものがあるかどうかを調べた。この方法により、暗処理によって特異的に発現する新しい葉緑体タンパク質をコードするcDNAを得た。

2aI03

ハツカダイコンのグルタミン合成酵素遺伝子*Gln1;1*の発現はGln/Gluの細胞内濃度比により制御されている

渡辺明夫[1,2]、林浩昭[3]、渡辺昭[1]（[1]東大•理•植物、[2]名大•農•生化学制御専攻、[3]東大•農•農芸化学）

細胞質局在型グルタミン合成酵素（GS1）は、緑葉の老化過程における窒素の転流に中心的な役割を果たしている。演者らはハツカダイコン培養細胞を用いた実験から、*Gln1;1*遺伝子の発現が培地中の窒素成分に対応して変化することを明らかにした。そこで、HPLCにより細胞中の可溶性アミノ酸の濃度を測定し、*Gln1;1*遺伝子の発現との相関を調べたところ、細胞中に高濃度のグルタミンが蓄積すると、この遺伝子の発現が抑制されること、MSXの添加により細胞中のグルタミン濃度を低下させると、*Gln1;1*の発現量が増加することが示された。また、グルタミン酸を唯一の窒素源として細胞を培養した際にも*Gln1;1*の脱抑制が認められ、この遺伝子は*S. cerevisiae*のGS遺伝子*GLN1*に見られる様に、細胞内のグルタミン濃度とグルタミン酸濃度の相対比によって発現が制御されていることが示された。

2aI04

ダイズ種子貯蔵蛋白質遺伝子を用いたシロイヌナズナ種子登熟過程の遺伝学的解析

南原英司、北宮絵里、Peter McCourt[1]、Kallie Keith[1]、内藤　哲
（北海道大学・農・応用生命科学、[1]Dept. Bot., Univ. Toronto）

シロイヌナズナの*abi3*変異株と*fus3*変異株は種子登熟過程が正常におこらず、種子は耐乾燥性を獲得できない。また、これらの変異株では種子特異的に発現する種子貯蔵蛋白質遺伝子やLEA遺伝子の多くがmRNAレベルで抑えられている。これらのことから、ABI3蛋白質とFUS3蛋白質とは種子登熟過程を調節する重要な構成因子であると考えられている。演者らはこれら蛋白質がどのような作用機作で種子特異的な遺伝子発現を調節しているかを理解するために、生化学的に解析が進んでいるダイズ種子貯蔵蛋白質β-コングリシニンのα'サブユニット遺伝子とβサブユニット遺伝子を用いて解析をおこなっている。α'サブユニット遺伝子とβサブユニット遺伝子をレポーター遺伝子（GUS）と連結したキメラ遺伝子をシロイヌナズナに形質転換した植物を、*abi3*変異株と*fus3*変異株とにかけあわせて、これら導入遺伝子のプロモーター活性を親株と比較した。その結果、ABI3蛋白質とFUS3蛋白質は、どちらもβサブユニット遺伝子とα'サブユニット遺伝子の転写活性化に関わっていることが明らかになった。本会では、他の種子休眠や発芽に異常をきたした変異株を用いた解析結果もあわせて、種子特異的な遺伝子発現におけるABI3蛋白質とFUS3蛋白質の役割について報告する。

2aI05

ダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子発現に及ぼす硫黄、窒素栄養の相互作用

平井（横田）優美、藤原徹、内藤哲[1]、茅野充男（東大・農・応用生命化学、[1]北大・農・応用生命科学）

ダイズ種子貯蔵タンパク質の1つであり含硫アミノ酸含量の非常に低いβ-コングリシニンβサブユニットをコードする遺伝子のプロモータ領域は、形質転換植物で硫黄栄養による発現調節を受け、その発現量は培地の硫黄栄養含量と負の相関がある。この現象は、硫黄の供給量が制限された条件下でも種子に貯蔵されるタンパク質、すなわち有機態窒素の量を保つ機構の一部であると考えられる。硫黄欠乏は相対的な窒素過剰状態であり、βサブユニット遺伝子の発現調節には硫黄栄養と窒素栄養の相互作用が影響していることが考えられる。本発表では、水耕栽培されたトランスジェニック・アラビドプシスにおいてβサブユニット遺伝子の発現が窒素欠乏によって抑制されること、窒素栄養の効果と硫黄栄養の効果とは相加的であることなど、窒素栄養と硫黄栄養のβサブユニット遺伝子発現に及ぼす影響の相関関係について報告する。

2aI06

イネ根フェレドキシン遺伝子の構造と硝酸塩による誘導

土山直美、大森健司、鈴木倫太郎、井田正二（京都大・食研）

高等植物のフェレドキシン(Fd)には多数のisoformsが存在し、その遺伝子発現はフィトクロームの関与する光誘導であることが明らかにされている。葉緑体Fdは$NADP^+$,NO_2^-,SO_3^{2-}還元glutamate synthase反応、不飽和脂肪酸の合成等の電子供与体である。他方、根に発現するFd遺伝子の構造やその機能は不明である。そこでイネ根FNR遺伝子はNO_3^-誘導性であることから、イネ根Fd遺伝子の構造と、ノーザン解析によってNO_3^-誘導について調べた。

イネ葉と根から、それぞれFd cDNAを単離し、それらの塩基配列を決定した。また後者をプローブとして根Fd遺伝子を取得し、その構造を決定した。根FdはNO_3^-によって誘導されたが、NH_4^+では誘導されなかった。これらのことから、イネ根Fd遺伝子は根FNR遺伝子[1]と同様にNO_3^-誘導性であると思われる。

1) H.Aoki and S.Ida (1994) BBA 1183,553-556

2aI07

ＮｉＲ遺伝子を富化したトランスジェニックシロイヌナズナの育成と解析

高橋美佐、石田洋子、諫山俊之、松村晴雄[1]、入船浩平、井田正二[2]、森川弘道（広島大・理・遺伝子科学、[1]旭化成工業・技術研究所、[2]京都大・食研）

我々は大気汚染物質の一つであるNO2を好んで吸収代謝し、唯一の窒素源として積極的に利用するNO2好性植物の創製を目指している。NO2は気孔を介して葉組織に吸収され、硝酸同化関連酵素によりアミノ酸へと同化されることが報告されている[1]。亜硝酸還元酵素NiRはNO2暴露によりごく短時間に発現誘導（ｍＲＮＡレベルの上昇）され、この酵素はNO2同化の鍵酵素の１つと考えられる（入船ら本学会発表）。

本研究では、ホウレンソウNiRcDNA[2]を導入したトランスジェニックシロイヌナズナ植物の育成を行った。CaMV35Sプロモーターの制御下にあるホウレンソウNiRcDNAおよび選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドpSNIRH（CaMV 35S pro-spinach NiRcDNA-NOS ter, CaMV 35S pro-hpt-NOS）およびpNIRH1（CaMV 35S pro-spinach NiRcDNA-NOS ter, CaMV 35S pro-spinach NiRcDNA-NOS ter, CaMV 35S pro-hpt-NOS ter）をシロイヌナズナ根組織にパーティクルガン法を用いて導入した[3]。遺伝子導入２日後、ハイグロマイシンを含む茎葉誘導培地（ＳＩＭ）に移植し、ハイグロマイシン耐性個体の選抜を行った。これらホウレンソウNiRcDNAを核染色体に有するトランスジェニックシロイヌナズナ植物のＲ１、Ｒ２世代についてNO2同化能力およびNR、NiRの酵素活性の解析を行っている。

1)T.Yoneyama,et al. (1978) Report of Special Research Project, NIES R-2:103-111
2)K.Lahners. et al.(1988) Mol.Gen Genet. 212:20-26
3)M.Seki, and H.Morikawa,(1994) Plant Tissue Culture Let.11:206-210

2aI08

タバコのカルシウム依存性プロテインキナーゼ（CDPK） cDNAの単離と遺伝子発現制御

大藤雅章、中北真紀子、中村研三（名大・農・生化）

これまでCa^{2+}-結合性発光タンパク質であるエクオリンを構成的に発現する形質転換タバコを用いたアッセイや組織中のプロテインキナーゼのレベルの変動をプロテインキナーゼの自己リン酸化能を指標に検討し、ショ糖、グルコース、フルクトースなどでタバコ葉切片を処理することによって細胞質Ca^{2+}濃度の上昇が見られること、またこのとき複数種の原形質膜表在性カルシウム依存性プロテインキナーゼ（CDPK）が増加することなどを報告してきた。

そこでタバコ葉切片の糖処理によってその発現が促進又は誘導されるCDPK遺伝子を単離するため、これまでに報告されたCDPK間で保存性の高い領域に対するオリゴヌクレオチドプライマーを設定し、RT-PCRによってCDPKのcDNA断片を増幅し、少なくとも６種をクローン化した。触媒部位の一部の塩基配列の比較から、これら６種のCDPKは互いに60から85%の相同性があることが明らかとなった。現在それぞれのCDPK遺伝子の発現制御を解析中である。

2aI09

スポラミン遺伝子の糖応答性発現に関わるシス制御配列ならびにトランス因子の解析

松永里絵、河合宏紀、森上敦、中村研三 （名大・農・生化）

サツマイモ塊根主要タンパク質であるスポラミンの遺伝子は、高濃度のショ糖によりその発現が誘導される。スポラミン遺伝子のプロモーターと GUS レポーターとの融合遺伝子は形質転換したタバコの葉においても高濃度ショ糖処理に応答した発現がみられる。プロモーターの様々な欠失・挿入・置換変異を使った解析から糖応答性発現には転写開始点上流の A 領域（-266～-255）と B 領域（-192～-171）の双方が、少なくとも 13bp 以上離れて存在することが必要であることが明らかとなっている。このうちの A 領域配列には他の糖応答性遺伝子にも保存された配列 TGGACGG 配列が存在することからその機能に興味が持たれた。

そこで今回は、この TGGACGG 配列の周辺あるいは内部に置換変異を導入し糖応答性発現に必要なシス配列を決定した。また融合遺伝子プロモーターの A 領域を糖応答性発現誘導をうけるサツマイモやシロイヌナズナのβ-アミラーゼ遺伝子のTGGACGG類似配列に置換した。その結果、糖応答性発現誘導にはこの共通配列が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。また、こうしたシス解析と並行して、ゲルシフトアッセイによるトランス因子の解析を行ったところ、A 領域配列に特異的に結合する核タンパク質が検出された。

2aI10

植物遺伝子の糖レベルによる発現制御機構に関する分子遺伝学的解析

三田 悟、平野英之、村野信仁、赤池美紀子、中村研三
（名大・農・生化）

アラビドプシスのβ－アミラーゼはハプロイドあたり単一コピーで存在する遺伝子によりコードされており、ロゼット葉に高レベルの代謝可能な糖を供給することによりその遺伝子発現は顕著な誘導を受ける。植物遺伝子の糖レベルによる代謝的な発現制御機構を分子遺伝学的に明らかにする目的で、アラビドプシスβ－アミラーゼ遺伝子の糖による発現誘導に関する変異株のスクリーニングを行い、誘導が野生株（Col-0 ecotype）に比べて顕著に抑制された突然変異株 *lsi1*と、ショ糖に対する感受性が野生株に比べて高まった突然変異株 *hba1*を単離し、遺伝解析の結果、これらの変異はそれぞれ異なる単一の遺伝子の劣性変異であることが明らかになった。ロゼット葉におけるショ糖、グルコース、フルクトース、デンプンの量は野生株とこれらの変異株の間で顕著な差はなく、さらに *lsi1*と *hba1*では内在性のβ－アミラーゼ遺伝子の発現パターンのみならず、β－アミラーゼ遺伝子のプロモーターとGUSの融合遺伝子の糖レベルによる発現制御も影響を受けることから、これらの変異がβ－アミラーゼの構造遺伝子そのものの変異ではなく、β－アミラーゼ遺伝子の糖レベルによる発現制御をそれぞれ正と負に制御している遺伝子の変異であることが示唆された。またスクリーニングの過程でLandsberg *erecta*（*Ler*）ecotypeではβ－アミラーゼの糖による発現誘導が顕著に抑制されることが明らかになり、*lsi1*と*Ler*のF1ではCol-0 野生株と同じくらいの顕著な誘導がみられたことから、*Ler*におけるβ－アミラーゼの糖による誘導の抑制は*LSI1*遺伝子とは別の遺伝子の劣性変異の結果であると考え、その遺伝子座を*LSI2*と命名した。β－アミラーゼ遺伝子以外の糖誘導性の遺伝子の発現パターンについて解析した結果、*LSI1*遺伝子はGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase、*LSI2*遺伝子はアントシアニン合成系のいくつかの酵素遺伝子の糖による発現制御にも関わることが示唆された。

2aI11

弱低温によるイネ*Wx*遺伝子の活性化とアミロース含量の増大

平野博之[1]，国枝素司[1,2]，佐野芳雄[1]
（[1]国立遺伝研，[2]明大・農）

*waxy (wx)*遺伝子座は，イネの胚乳中のアミロースの合成を支配しており，その遺伝子産物Wxタンパク質はアミロースの合成を触媒するスターチシンターゼである．イネの登熟期に，低温が続くとアミロースが増加し米の品質が低下することが知られている．われわれは，このアミロース含量の増加が弱低温下でWx遺伝子が活性化されるためであることを明らかにした．

*Wx*遺伝子の転写産物は弱低温(18°C) で常温(28°C) の約3倍程度に増加し，その反応は可逆的であった．*Wx*遺伝子の活性化により、Wxタンパク質が大量に生産されるとともに，最終産物のアミロースが増大した．また，弱低温処理する期間が長いほど，Wxタンパク質とアミロースの増加が激しく，両者の間には強い正の相関関係が認められた．*Wx*遺伝子の転写産物の増加は低温（4°C）や高温（35°C）ではほとんど起こらないため，弱低温の活性化は低温や熱ショックに対する反応とは異なると考えられる．Wx遺伝子のプロモーター領域とGUSとの融合遺伝子を導入したトランスジェニック・イネにおいても，この弱低温反応性が示された．したがって，導入したDNA領域に弱低温に反応するシス因子が存在すると考えられる．

2aI12

イネアスコルビン酸ペルオキシダーゼcDNAのクローニングとストレスに対する発現応答

森田重人[1]、上中弘典、横井秀行、増村威宏、田中國介
（京都府大・農・農芸化学、[1]京都大・理・植物）

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）は葉緑体および細胞質において過酸化水素の消去を触媒しており、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）とともに活性酸素による障害の防御に不可欠である。しかしその遺伝子発現に関しては不明な点が多い。

我々はこれまでイネを材料として高等植物のSODの発現応答について解析を行ってきた。本研究ではSODと直接連動しているAPXの発現とその調節機構を解明する目的でイネAPXのcDNAのクローニングを行った。その結果2種類のcDNA (APXC1、C2) を単離しC1については全塩基配列を決定した。C1は全長989bpで249アミノ酸、分子量27.0kDのタンパク質をコードしていた。いずれのcDNAも既知のAPX（細胞質型）と高い相同性があることから、細胞質型のアイソザイムをコードしていると考えられる。イネにはABAに対する応答の異なる2種の細胞質型SOD遺伝子が存在するが(1)、今回単離された2種の細胞質型APXも同様に異なった発現応答を示すことが示唆される。この可能性を検討するため現在ノザンブロットを行ってABA、パラコート、低温に対する発現応答を調べており、その結果についても報告する。

(1) Sakamoto et al. (1994) FEBS Lett. in press

2aI13

オート麦糊粉層プロトプラストを用いたイネ・III型カルボキシペプチダーゼ遺伝子の発現解析

鷲尾健司、石川　鎭（北海道大・地球環境科学・環境分子生物学）

穀物種子の発芽過程において酵素学的特性の異なる５種類のカルボキシペプチダーゼ（ＣＰＤ）が検出される。この内、III型ＣＰＤのみが糊粉層特異的にジベレリン酸（ＧＡ）による発現誘導を受けることが知られている。今回、イネ・ゲノム内より単離されたIII型ＣＰＤ遺伝子を用いてこのプロモーター解析を行った。イネ・III型ＣＰＤ遺伝子のプロモーター断片（－２０５０）に連結されたＧＵＳレポーター遺伝子はオート麦糊粉層プロトプラスト内でＧＡに依存した発現誘導を示した。このＧＡ応答性は限定された最小プロモーター（－２７４～－９０）においても検出されることからＧＡ応答性のシス配列がこの領域に存在することが予想された。この最小プロモーター断片とオート麦糊粉層より調整した核抽出物を用いたゲルシフト・フットプリント解析において、核内因子とプロモーター断片との相互作用は、最小プロモーター内のアデニン残基に富んだ領域で起こっていることが明らかになった。このアデニン残基に富んだ領域にはＧＡ応答性遺伝子間に共通に見出されるピリミジンｂｏｘ、ＴＡＡＣＡＧＡｂｏｘが存在しており、現在これらのモチーフを中心にしてイネ・III型ＣＰＤ遺伝子プロモーター内のＧＡ応答性シス配列の詳細な同定を進めている。

一般講演

第２日　３月29日（水）　午後の部

Ａ会場　生長制御（３）
Ｂ会場　形態形成（２）
Ｃ会場　成長調節物質（１）
Ｄ会場　光合成（６）
Ｅ会場　光合成細菌・シアノバクテリア（２）
Ｆ会場　オルガネラ（２）
Ｇ会場　蛋白質・酵素（３）
Ｈ会場　遺伝子発現（４）
Ｉ会場　遺伝子発現（５）

2pA01

アセトアルデヒド－蛋白質アダクトの形成とオナモミ種子の劣化

張明、永田茂之[1]、江刺洋司、（東北大・理・植物園、[1]北里研究所メデイカルセンター）

植物種子は貯蔵中に種々の揮発性物質を放出するが、その中には種々のカルボニル化合物も含まれる。その内、全ての種子が共通に放出しているものにアセトアルデヒド（MeCHO)があるが、これは種子の老化を促す働きをしている。今回は、主にオナモミ(*Xanthium pennsylvanicum* Wallr.)種子を用い、種子の劣化機構にはMeCHOと蛋白質との非酵素的結合物質の形成・蓄積も関与していることを報告する。

種子の発芽力は貯蔵湿度が高い場合に急速に減少するが、この現象は緩衝液可溶性蛋白質の減少を伴う。つまり、種子の劣化は蛋白質の変性に付随して起るが、MeCHOガスの添加はこれらの進行を助長し、逆に緩衝液に不溶だがUreaやSDSに可溶な蛋白質含有量の増大を惹起する。レタス種子においては老化に伴って、MeCHOはUrea可溶性蛋白質区分において免疫化学的に検出出来るMeCHO-protein adductsの蓄積を惹起したが、MeCHO処理オナモミ種子の場合には寧ろSDS可溶性蛋白質区分中でMeCHO-protein adductの増加が認められた。しかも、このadductは発芽力を完全に失った79年産、ほぼ失った87年産の古いオナモミ種子のSDS可溶蛋白質に多量に存在したが、92年産の活力の高い種子中には僅かしか存在しなかった。以上の事柄から、種子の老化には自己生成のカルボニル化合物による蛋白質の修飾機構が関与している可能性が示唆された。

2pA02

浮稲節間の深水下での成長と酸素との関係

東　哲司[1]，金田康史[2]，角田依子[2]，内田直次[1,2]，安田武司[1,2]
（[1]神戸大・自然科学，[2]神戸大・農）

深水条件下での浮稲の急速な節間伸長には，節間空隙内で濃度の上昇するエチレンが関与している．節間空隙内のエチレン濃度が水中で上昇する要因として，酸素濃度の低下が挙げられており，そのことがエチレン合成を促進するとされている．また，水中でのガス拡散速度の低下も要因の一つと考えられている．我々は，これら二つの要因の重要性を比較するために，深水条件下での浮稲の節間空隙内の酸素濃度とエチレン濃度との関係について調査し，以下のような結果を得た．①浮稲茎切片を明所で深水処理すると酸素濃度はほとんど変化せずに節間が伸長したのに対し，暗所で深水処理したものは急速に酸素濃度が低下したが節間伸長は促進されなかった．節間空隙内エチレン濃度は両処理により上昇し，その量は明所で処理したものの方が大きかった．②無傷植物体を屋外で深水処理したところ，空隙内の酸素濃度は上昇し，光強度の低下と共に減少した．またエチレン濃度は酸素濃度の変化とは関係なく上昇した．③空気中ではエチレンやジベレリン処理による節間の伸長促進は光の影響は受けないが，水中ではこれらのホルモンによる伸長促進は暗所で生じなかった．④暗所で茎切片を深水処理しその水中に通気すると，節間の伸長促進は回復した．以上の結果より，節間空隙内のエチレン濃度の上昇に酸素濃度の低下は必要ないこと，深水下での旺盛な節間伸長にはむしろ酸素の供給が不可欠であることが判明した．

2pA03

浮稲節間の低酸素環境での成長とエチレンとの関係

東　哲司[1]，西富美子[2]，上野覚士[2]，内田直次[1,2]，安田武司[1,2]
（[1]神戸大・自然科学，[2]神戸大・農）

前報で，深水条件下における浮稲節間内でのエチレン濃度の上昇に酸素分圧の低下は必ずしも必要でないことを報告した．しかし，低酸素濃度（3 %O_2）処理が浮稲節間の伸長をもたらすことが報告されており，この現象は低O_2条件がACC合成酵素の活性を増大させることによるエチレン生成の促進の結果であると説明されている．我々は，低酸素条件での浮稲節間の伸長とエチレン発生量との関係を再評価するために実験を行ない，以下のような結果を得た．①浮稲茎切片を低酸素条件で3日間培養すると，節間組織でのエチレン発生の増大と著しい節間伸長の促進が認められた．エチレン生合成の阻害剤であるアミノオキシ酢酸で処理し低酸素条件で培養すると，節間が伸長しない空気中で培養した茎切片よりもエチレン発生量が低下したにもかかわらず，節間の伸長促進は認められた．②浮稲の節間伸長を誘導する深水・ジベレリン・エチレン・低酸素の各処理において，処理１日後に節間組織でのエチレン発生量の増大が認められた．③茎切片を深水処理すると，処理後５時間で飽和した．しかし低酸素処理を５時間行なってもエチレン発生量の増大は認められなかった．以上の結果より，低酸素分圧下での節間伸長の促進は，エチレン発生量の増大とは無関係に生じることが明らかとなった．また，節間組織でのエチレン発生量の増大は，低酸素が特異的に誘導するものではなく，成長が促進されている組織で共通の現象であることが示唆される．

2pA04

キュウリの雌花発現に関わるACC合成酵素遺伝子の探索

蒲池伸一郎、関本弘之、近藤矩朗[1]、酒井慎吾　（筑波大・生物、[1]国立環境研）

雌雄同株異花植物は同一株に雄花と雌花をつけるが、両性の発現がどのように制御されているかはほとんど明らかになっていない。キュウリにおいてはエチレンの内生レベルの上昇が雌花の発現を誘起している可能性が示唆されている。本研究では、キュウリを材料として、エチレンによる雌花発現の調節メカニズムを明らかにすることを目的としており、その第一歩として、エチレン生合成の律速酵素であるACC合成酵素遺伝子のクローニングを試みた。クローニングに際して、どの部位で合成されたエチレンが雌花化に影響するか調べた。キュウリ（品種　れんせい）の未展開葉を含む茎頂部または子葉、第一葉にAVGを処理した。水のみを処理したコントロールでは雌花のみが発現したが、茎頂部または子葉、第一葉のAVG処理ではエチレン生成が減少し、雄花の発現が認められた。その一方で、第一葉展開時に子葉または第一葉を切除しても雌花の発現は認められなかったことより、茎頂部で合成されたエチレンが雌花発現に関与する可能性が示唆された。さらに、キュウリ（品種　王金女神２号）の茎頂部より単離した全RNAより、RT−PCR法により、既知のACC合成酵素遺伝子と部分的に相同性をもつ遺伝子断片を増幅した。この遺伝子の配列はオーキシン処理及び傷害を与えたキュウリの未熟果実より単離したACC合成酵素遺伝子のものとは異なっていた。発現解析の結果、この遺伝子の未展開葉を含む茎頂部での発現は経時的に増加が見られ、発生段階に応じて制御されていることが示唆された。

2pA05

エゾノミツモトソウ種子の発芽を促進するノルボルナジエンと銀イオンの生理作用について

鈴木章方・加藤まゆみ（山梨大・教育・生物）

エチレンは種子の発芽に対して、多くの場合発芽促進に作用するが、まれには発芽阻害に作用する。エゾノミツモトソウの種子はエチレンによって発芽が阻害される極めて珍しい方の例である。そこで、この種子に対する発芽阻害はエチレンの普通の生理作用によるものか、あるいはそれとは別の特殊の生理作用によるのか疑問に思われた。

ノルボルナジエン、並びに硝酸銀および硫酸銀として与えられた銀イオンは、エチレンの生理作用に対して拮抗的に作用する阻害物質である。そこでこの研究では、この種子にエチレンを与えておいて発芽を抑制しておいたところに、ノルボルナジエンあるいは銀イオンを与えて両者の発芽に対する影響を調べてみた。その結果、ノルボルナジエンと銀イオンは、ともにエチレンの発芽抑制作用に打ち勝って、高い発芽率をもたらした。

以上の結果は、エゾノミツモトソウの種子発芽を阻害するエチレンの阻害作用は、通常の生理作用と異なる特殊な副作用によるものではなく、エチレンの普通の生理作用によるものであることを示唆している。また、銀イオンは重金属と同様に通常植物の生長に対しては毒性を示すものであるが、この場合は発芽促進剤として作用する点で注目に値する珍しい現象である。

2pA06

ゼニゴケの培養プロトプラストの安定化と分裂に及ぼすCMC（カルボキシメチルセルロース）の効果

菅原康剛, 福川英司[1]（埼玉大・理・生体制御, [1]現 北海道庁）

ゼニゴケカルスから単離したプロトプラストの培養では，分裂のために培地に活性炭を添加する必要がある．活性炭を含まない培地では，プロトプラストの生存率は短時間で低下する．もし，この培地にセルロース結合性のCalcofluor Whiteや細胞壁合成阻害剤のcoumarinや2,6-DBを添加するとプロトプラストは安定化するが分裂はほとんど起こらない．しかし，これらの物質を添加した培地で培養したプロトプラストを活性炭を含む培地で培養すると分裂を誘導することができる．今回は，さらにCMC（Calboxymethyl cellulose, Aldrich）を培地に添加してプロトプラストを培養した．CMCは，0.1〜0.5%でプロトプラストを安定化する効果があり，平均分子量の異なるCMCを比較したところultra low viscosity（ULV）が最も効果的であった．0.1%CMC（ULV）を含む培地では，プロトプラストから再生した細胞は2〜3回の分裂を起こすことが明らかになった．

2pA07

タバコ培養細胞BY-2の凍結保存

古谷育代, 安原裕紀, 松中昭一　（関西大学・工・生物工）

タバコ懸濁培養細胞BY-2は細胞周期を同調化できるなど細胞生物学の研究材料として有用な多くの性質を持っている。現在BY-2細胞は継代培養によって維持されているが長期間にわたる継代培養によってこれらの性質が変化する危険性がある。いくつかの植物組織や植物培養細胞の凍結保存の報告がなされており凍結保存による遺伝的性質の変化は少ないと考えられている。そこで我々はBY-2細胞の凍結保存を試みた。

対数増殖期のBY-2細胞を0.3 M trehaloseを含む液体培地で20時間前培養した。この細胞を凍害防御剤(10% DMSO, 0.5 M ethylene glycol, 0.4 M sucrose)に懸濁し室温で10分間静置後、クライオバイアルに移し−35℃で1時間静置後、液体窒素で急速凍結し、液体窒素中に保存した。凍結細胞を40℃の水浴中で解凍し、1.2 M sucroseを加え0℃で20分間静置後、寒天培地に移し27℃暗所で培養したところ、およそ5日後にカルスの形成が認められた。このカルスを液体培地に移し懸濁培養を行ったところ、凍結保存前の細胞と同様の増殖を示した。この細胞を通常の7日ごとの継代培養により維持し、aphidicolineとpropyzamideを用いた2段階同調培養を行ったところ、凍結保存前と同様の高い同調率が得られた。現在、最長で30日間の凍結保存に成功しており、この方法によりさらに長期間の保存が可能かどうかを検討中である。

2pA08

バラにおけるメチルβ-D-グルコシドの生理的役割

市村一雄、六笠裕治[1]、木幡勝則、山口優一、藤原隆広、須藤憲一（農水省野菜茶試、[1]農水省北海道農試）

切り花において炭素源は限られているため、糖質の動態を研究することは重要な課題となっている。植物に一般的に存在する代謝糖はグルコース、フルクトースおよびスクロースであるが、われわれはバラにおいてこれらの糖質以外に3つの糖様物質を単離し、NMRによりこのうちの一つをメチルβ-D-グルコシドとミオイノシトールと同定した。もう一つの化合物はCIMS、EIMSおよびNMRのスペクトルよりイノシトールが結合した2糖様物質であると推定された。メチルβ-D-グルコシドが貯蔵炭水化物としての役割を有しているかを明らかにするため、葉を除き、異なる長さに調整した花茎をインキュベートし、花の開花程度ならびに茎中の糖含量を調べた。花茎が長いほど、つぼみはよく開花し、茎中の糖含量はそれに対応して減少していた。メチルβ-D-グルコシドは他の代謝糖と同様に減少していたことより、メチルβ-D-グルコシドとつぼみの開花の間に密接な関係があることが示唆された。またメチルβ-D-グルコシドの標品を花茎に投与すると開花は促進され、このときの溶液中のメチルβ-D-グルコシド含量は減少していた。以上の結果より、メチルβ-D-グルコシドはバラにおいて代謝糖として重要な役割を果たしていることが示唆された。未同定の2糖様物質について構造解析およびその役割の検討を行った結果についても併せて報告する。

2pA09

正常及び矮性トウモロコシの成長とperoxidaseの比較解析

野口猛治・勝見允行　(ICU生物)

正常 (N) 及び矮性トウモロコシ (d1) 幼植物体におけるperoxidaseについて、その特性及びisozymeを比較検討した。細胞壁結合酵素の活性は成長の進行とともに低下した。d1の酵素比活性はNより高く、GA1処理によって低下した。至的pHは6.2前後にあり、Nとd1とでは差はなかった。活性は90C、10分処理によって完全に失活したが、d1の方が熱に対してより安定であった。可溶性酵素の活性は細胞壁結合酵素の活性より高かかった。d1の方がNより低い活性を示し、GA1処理によって活性には差は生じなかった。等電点電気泳動の結果、細胞壁結合酵素には少なくとも5つのacidic isozymesと2つのbasic isozymesがあり、N、d1、d1+GA1の間で差はなかった。他方、可溶性酵素には少なくとも2つのacidic isozymesがあるが、これらは細胞壁結合酵素のisozymeに対応する。可溶性酵素に見られる4つのbasic isozymesのうち、pI 7.7に対応するisozymeはNには欠如し、d1にだけ見られた。GA1処理はこのisozymeの量を減少させた。Tissue printing法によるperoxidaseの検出を行なったところ、表皮及び維管束に多く分布することが分かった。N、d1、d1+GA1の間に特に差はなかった。basic isozymesのあるものはIAA-oxidase活性を持つことが知られているので、pI 7.7のisozymeの性質を検討中であ

2pA10

テッポウユリの自家不和合性機構とストレス反応の関係

鶴原章子[1]、手塚修文[1,2] ([1]名大・大学院人間情報学研究科・物質/生命情報、[2]名古屋大・情報文化・自然情報)

一般に生物はストレスに遭遇すると生体内でO_2^-などのイオンラジカルが多く発生する。このイオンラジカルは生体内の酵素を直接酸化することにより不活性化し、細胞に著しいダメージを与える。スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)がO_2^-を除去することによりO_2^-や・OHの生成も防御することが知られている(Fridovich, 1974)。大沢ら(1984)、中村ら(1985)によると、ゲルマニウム化合物の或る種のものは上記イオンラジカルを除去して一種のイオンラジカルスキャベンジャー様物質として作用することを報告している。そこで、自家不和合性機構解析のアプローチの一つとして、自家不和合性反応は自家受粉後の雌ずいが一種のストレス状態に遭遇して多く発生したイオンラジカルにより異常な生理状態となり代謝調節がスムーズに行われないために生じる事象であると想定できる。この想定に基づいた実験結果により、テッポウユリの自家受粉した柱頭や花柱では他家受粉のものよりキサンチン酸化酵素やSODなどの活性が高いことから、自家受粉により雌ずいでは『押し掛け亭主』の出現ということで一種のストレス現象が起こり他家受粉に比べて多く発生したイオンラジカルによる代謝調節機構の異常が花粉管の伸長抑制を誘導していると考えられる。一方、ある種のゲルマニウム化合物は自家受粉による花粉管の伸長抑制を打破したことから、自家不和合性はストレス反応と密接に関係した機構制御が連動していると思われる。

2pB01

ホウライシダ原糸体の形態形成および微細構造におよぼす遠心過重力の影響

笠原宏一、亀井洋孝、竹内裕一、山田晃弘 (北海道東海大・工・生物工)

ホウライシダ (*Adiantum capillus-veneris*) の胞子から発芽した原糸体は、赤色光照射下では細胞分裂を起こさずに光源方向へ線状に伸長する。赤色光照射下での原糸体伸長中に20 ×*g*の遠心過重力を伸長軸と平行に原糸体先端から胞子方向に作用させたところ、原糸体伸長速度は低下し、分岐した形態の原糸体が多く観察された (Kasahara *et al.* 1995)。細胞内、特に原糸体分岐部分の微細構造について、透過型電子顕微鏡を用いて観察し、20 ×*g*の遠心過重力が原糸体の形態形成におよぼす影響を、対照条件 (1 ×*g*) 環境下で成育した原糸体と比較した。

2pB02

植物根端組織細胞の生理・形態学的研究II.　空隙 (Cavity) 形成率に及ぼす培地の水の量、播種量

(仁木輝緒、梶　隆[1]、拓殖大・工、[1]拓殖大・政経)

エンドウ (Pisum sativum cv. Alaska) の種子を比較的高い温度 (25℃) で発芽・生育させると、根の中心柱の部位に空隙 (Cavity) ができることが明らかにされている。そして、この現象に温度が関わっていることも示されている。しかし、この温度条件下でも、得られる空隙形成率は必ずしも一定ではない。空隙の形成には温度条件の他に種々の要因が関わっているものと考えられる。　空隙形成率に及ぼす要因として、培地 (vermiculite) の水分量と播種量を検討した。培地 の水分量が多くなると (750、1000ml／medium)、わずかに発芽・生育がよくなり、播種量を少なくすると (3.75、7.5g／medium)、発芽・生育は良くなる。これらの条件で、空隙形成率の高まりがみられた。逆に培地の水分量が少ない (250、500ml／medium)、播種量が多い (15、30g／medium)、等の悪環境ではむしろ空隙の形成率は低くかった。
発芽・生育を規定する条件と空隙の形成率との関係を議論する。

2pB03

エンドウ上胚軸カスパリー線形成のbrefeldin Aによる阻害

唐原一郎、柴岡弘郎（大阪大・理・生物）

カスパリー線は高等植物の根の内皮細胞のradial wallに普遍的に存在し、水やイオンの中心柱内での保持を担う構造である。カスパリー線の部分においては細胞膜が細胞壁と特殊な接着をすることに加え、細胞壁にはスベリンなどの疎水性物質が沈着することが知られているが、この分泌経路についての研究は行われていない。近年、動物及び植物細胞においてゴルジを経由した輸送経路を特異的に阻害する物質としてbrefeldin A(BFA)が報告されているので、これを用いてカスパリー線形成にゴルジ経由の輸送システムが関与しているかについて検討した。

暗所で生育したエンドウにおいてはカスパリー線は上胚軸にも形成される。播種後8日間暗所で育てた上胚軸では、フックの屈曲点の下3mmから37mmの部分の内皮細胞においてカスパリー線形成が決定され形成過程が進行していることを既に報告している。そこで播種後8日間暗所で育てた上胚軸の屈曲点の下37mmの位置に糸を通し、その糸を介して200μM BFA溶液を2時間吸収させた。細胞壁の修飾によると考えられるUVによる自家蛍光を指標として時間経過に伴うカスパリー線の発達を調べたところ、無処理区では発達を続けたのに対し、処理区では処理開始後5時間目までに8mm上方へと発達を続けた後一時停止し、30時間目以降徐々に再開した。処理開始後25時間目の上胚軸から切り出した切片を高張液で処理し観察したところ自家蛍光が見られなくなった位置より上部では原形質分離がおきており細胞壁と細胞膜の特殊な接着が存在しないことが明らかとなった。これらの結果はカスパリー線の形成にゴルジを経由した分泌輸送経路が関与している可能性を示唆するものである。

2pB04

管状要素分化における自己分解－阻害剤を用いた解析－

渡辺　選子、福田　裕穂（東北大・理・生物）

ヒャクニチソウ単離葉肉細胞は適当なホルモンを含む培地で培養することによって管状要素へ分化する。この分化過程の後半には二次壁の形成に引き続き、液胞の崩壊、さらに核を含む細胞内容物の分解及び消失、という自己分解が起こる。電子顕微鏡を用いた自己分解過程の解析の結果、自己分解の最も初期におこる現象は液胞の崩壊であり、細胞内構造の変化は液胞の崩壊後から始まることをすでに報告した。今回は自己分解の仕組みを調べるために、自己分解に関連を持つと考えられるタンパクの合成及び分解を阻害したときのオルガネラの崩壊について蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて解析を行った。

自己分解過程ではある種のシステインプロテアーゼ活性が特異的に上昇する。そこでシステインプロテアーゼ阻害剤を二次壁肥厚開始直前、または、直後に加え、自己分解について調べた。二次壁肥厚開始直前に加えた場合、分化する管状要素の割合が低下した。一方、開始直後に加えた場合、分化の割合は変わらなかった。しかし、どちらの場合でも、管状要素は、核のDNAの分解が抑制され、核が消失しなかった。この結果はシステインプロテアーゼが核の分解に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドは液胞の崩壊を遅らせる傾向にあった。現在、この過程を電子顕微鏡を用いて詳細に解析しており、これも合わせて報告する。

2pB05

ニンジン不定胚形成の条件と分化過程について

得字圭彦、熊谷真美、増田宏志　（帯広畜大・生資化）

私達はこれまでにニンジン胚軸切片を2,4-D(1mg/l)で24時間処理し、その後植物ホルモンを含まない培地に移して培養すると、表皮細胞が分裂して直接不定胚を形成することを報告してきた。この系は植物ホルモン非存在下で不定胚誘導の全過程が進行することから、外因的オーキシンを必要とする期間は短いものと考えられる。今回はこの不定胚誘導において胚軸切片の2,4-Dによる前処理の条件について検討し、また不定胚の分化過程を調べたので報告する。

胚軸切片を各濃度の2,4-D(1,5,10,20,50,100mg/l)で前処理時間(5分から24時間)を変え、その後2,4-Dを含まない培地で培養を行った。その結果、2,4-D濃度を高めると短い処理時間で不定胚が誘導されることを見いだした。例えば、100mg/lといった非常に高濃度の2,4-Dでは5分間の処理で不定胚形成の誘導が最大となり、30分間処理では不定胚はまったく形成されなかった。20mg/l以下の2,4-D処理濃度では正常な植物体を再生したが、高濃度(50mg/l以上)では魚雷胚の段階で成長が停止した。一方、不定胚形成における初期の分化過程の観察では、表皮細胞から球状胚形成までの連続観察と、細胞塊から球状胚への発達のSEMによる観察を行ったのでその結果を報告する。

2pB06

カテコールーOーメチルトランスフェラーゼ阻害剤のアサガオ短日開花への阻害様式

井上英子、篠崎真輝　（京大・農・応植）

アサガオ短日開花にカテコールアミン生合成・代謝経路が関与することは昨年の本大会で報告したが、今回は代謝経路で働くカテコールーOーメチルトランスフェラーゼ（COMT）の阻害剤をいくつか用いて日長反応への阻害様式について調べたので報告する。

実験材料としてアサガオのムラサキ系統を用い、種子を常法通り処理した後、発芽した芽生えを中山培地に移植し、２日後に20℃で13時間45分の暗期を１回与えた。COMT阻害剤としては、n-Butyl gallate, Ro41-0960, OR-486 などを用い、アサガオ芽生えの胚軸に貫通させた木綿糸より種々の濃度で投与した。

カテコールアミン生合成経路で働く酵素の阻害剤が暗処理後に全く花成を阻害しないのに対して、今回用いたCOMT阻害剤は暗処理後でも花成を阻害した。しかしこの阻害効果は暗処理後の時間の経過に伴い弱くなり、暗処理後48時間以降ではむしろ花成の促進がみられた。また、暗処理をしたアサガオ芽生えの茎頂を用いてin vitroでノルアドレナリンの変換を行わせ、HPLCで分析したところ、ノルアドレナリンが変換されてできたと思われる未知の物質が検出されたが、この際にCOMT阻害剤を加えると変換が抑えられた。これにより、COMT及びカテコールアミン代謝物が芽での花芽分化に関与していることが示唆された。また種々のカテコールアミン代謝物をアサガオ芽生えに投与した結果についても報告する。

2pB07

パパベリンーフォスフォジエステラーゼ阻害剤ーによるアサガオの長日開花の促進

藤波周、篠崎真輝（京大・農・応植）

短日植物であるアサガオのVioletが連続光下でも貧栄養、強光、低温などにより花芽誘導が可能であり、これらの花成がクロロゲン酸、ピノレジノール、フェルロイルキナ酸などのフェニールプロパノイド含量と密接に関連していること、しかしこれらのフェニールプロパノイドを投与してもすぐに分解されて花芽誘導能力はないことはすでに報告した。これらのフェニールプロパノイド役割は不明であった。一方、ピノレジノールがフォスフォジエステラーゼ活性を阻害することが報告されている。そこで、フォスフォジエステラーゼの阻害剤であるパパベリンのアサガオの花成に対する影響を調べたところ、長日開花を促進することが明らかになったので報告する。

実験材料としてアサガオのViolet, Kidachiを用いた。常法通りに種子を処理し、発芽したseedlingを中山氏の培地または1/200希釈の中山培地（貧栄養）に移植して実験に供した。実験処理は花芽を誘導するのに必要な最低処理日数より少し短い処理（貧栄養、２０℃、１５日、強光、２３℃、１０日、低温、１３℃、５日）を与え、パパベリンは根あるいは胚軸に貫通させた木綿糸を通して投与した。

パパベリンは貧栄養、強光、低温による連続光下での花芽形成を促進し、上記条件下で花芽を形成した。さらに、貧栄養、強光下で増加するクロロゲン酸、ピノレジノール、低温下で増加するフェルロイルキナ酸、低温開花を促進する安息香酸やその誘導体、フェニールプロパノイド類のフォスフォジエステラーゼ活性に対する影響を明らかにし、アサガオの連続光下における花成誘導でのフェニールプロパノイドの役割について論ずる予定である。

2pB08

ネナシカズラ(Cuscuta japonica)の花成反応

田中修，吉川須恵，竹葉剛[1]，古橋勝久[2]（甲南大・理・生物，[1]京都府大・生科・応生，[2]新潟大・理・生物）

寄生植物であるネナシカズラを、Murashige & Skoog (MS)培地の無機塩(濃度はMS培地と多少異なる)，Ｂ５培地の有機物、10% coconut water, 3% sucrose, 1 mg/l kinetin を含む、0.9% 寒天培地（pH 5.8；MS+K 培地）で、継代培養した。継代培養中の植物から、１つの側芽を持つ長さ約1cmの茎を切り出し、MS+K培地で培養した。24時間連続照明下では2カ月培養しても花芽は形成されなかったが、16時間暗期-8時間明期の短日条件下では、10日目に花芽形成が肉眼で認められ、25日目には開花した。この短日処理は、3回で有効であり、これより回数が増加すれば花成率は上昇した。16時間暗期を、暗期開始後8時間目に、15分間白色光で光中断すると花芽形成は完全に阻害された。花成誘導に必要な限界暗期は10-12時間であった。72時間以上の暗期を与えれば、１回の処理で花芽形成が誘導された。これらの花芽形成には、培養液中に含まれるcoconut waterが促進的役割を果たしており、その効果はzeatinで代替できた。

2pB09

Ri形質転換体チコリにおける花芽形成の解析II.
接木による花芽形成刺激の伝達

西村英世、傳住真一、猪口雅彦、加藤次郎（岡山理科大・理・生物化学）

キク科の2年生植物であるチコリ（*Cichorium intybus* L. var. Witloof）は、花芽形成に低温（春化）と長日条件を必要とする。しかし*Agrobacterium rhizogenes*のRiプラスミドによって形質転換されたチコリ毛状根から誘導した再形成体（Riチコリ）は低温を必要とせずに花芽形成を行うことが報告されている。一方、前回の本学会において我々は、Riチコリにおいても日長条件は重要であることを報告した。今回我々は、Riチコリの花芽形成について更に解析を進めた。

まず、Riチコリと花芽を形成している通常体チコリの葉からの不定芽形成時の日長の影響を調査した結果、Riチコリの抽台率に日長の影響が観られ、長日条件下でより多くの抽台が観察された。一方、通常体チコリからの再形成体はいずれの日長条件においても花芽を形成しなかった。このことは、Riチコリ組織に花芽誘導刺激が存在することを示唆すると思われた。そこで、花芽を形成していない通常体チコリの接ぎ穂を、Riチコリの花茎を台木に用いて接ぎ木を行った結果、長日条件下で約２カ月以内に接ぎ穂に花芽形成が起こった。さらに我々は、非誘導条件下でチコリに花芽形成を誘導することが報告されているGA_3について、接ぎ穂に用いたのと同様のチコリshootに対する影響を調査したが、GA_3は日長に関わらず処理開始後１カ月以内に抽台を促したものの、２カ月を経過しても花芽形成は観察されなかった。

2pB10

栄養生長が極端に短い植物の花芽形成前後での茎頂分裂組織における経時変化

林　誠、河野重行、黒岩常祥（東大大学院・理・植物）

高等植物のライフサイクルの中で、栄養生長から生殖生長へ変換する過程は分化・発生の観点から非常に興味深いものがある。従来、日長で花芽形成を誘導できる植物を用いた研究が盛んに行なわれたが、光周性（と春化）の問題は複雑で、花芽形成機構の解析には適していると言いがたい。中性植物であればこれらの問題を回避できるが、長期間の栄養生長のどの時期が決定的であるかを理解するのは困難である。我々はこの点を鑑み、栄養生長が極端に短期間の植物を探査した。その結果、北アメリカの乾燥地帯に生育するキク科の１年草Pectis papposaが材料として適していることが判明した。連続照明下30度で無菌培養すると、播種後わずか６日目には総苞片原基が誘導され、葉序が十字対生から輪生へと移行し、花芽形成へ移行することが示された。今回は、茎頂分裂組織の栄養生長から生殖生長にかけての変化を、テクノビット樹脂包埋切片の蛍光顕微鏡観察によって、細胞レベル、オルガネラレベルで解析した結果について議論する。

2pC01

カボチャ根導管液に含まれる高分子緑化促進物質の精製と特性

神　朝弘，大島　典子，佐藤　忍（筑波大・生物）

高等植物の導管は、根から吸収した水と無機イオンに加え、ホルモン類やアミノ酸等の低分子有機物質を地上部に輸送することが知られている。しかし近年になって、導管液には多糖質やタンパク質のような高分子有機物質が存在することがわかってきた(P.C.P. 1992)。このような根で合成されて地上部器官に運ばれる物質の中には、個体レベルで植物体の生長や分化を制御する生理活性物質が存在すると考えられる。本研究はカボチャ根から採取した導管液より、キュウリ黄化子葉の緑化誘導の系において緑化促進活性を有する新しい高分子生理活性物質を単離し、その構造と生理作用について知ることを目的としている。

播種後３～４ヶ月目のカボチャの茎を切断し、根側から滴下する液を根導管液として用いた。アッセイは、黄化キュウリ子葉に検液を与え、暗黒化で 14 時間培養した後、昼色光下で 5 時間緑化を誘導し、クロロフィルを定量して行った。

根導管液を凍結乾燥によって濃縮した後、Sephadex G−25 を用いたゲル濾過を行ったところ、分子量約 3,000 の位置に促進、分子量約 1,000 の位置に阻害活性が観察された。この促進画分をさらに Sep−pak 及び高速液体クロマトグラフィーによる逆相クロマトグラフィー (C_{18}) にかけたところ 16−18% アセトニトリルで溶出される画分に促進活性が観察された。また、この緑化促進活性は 120 ° C， 20 分の熱処理によっても失われなかった。

2pC02

緑化過程でサイトカイニンによって調節されるタンパク質の分析

宮田　百，佐藤直樹，小林　興（東京学芸大・生命科学）

サイトカイニンは細胞分裂促進、老化抑制、緑化促進などの生理作用をもつが、その作用機構は明らかにされていない。本研究では、サイトカイニンによる緑化促進の作用機構をタンパク質レベルで解析した。切除したキュウリ黄化子葉を暗所でインキュベートし、その後光照射すると誘導期の後に緑化が始まるが、暗所インキュベート時にサイトカイニンの一種であるベンジルアデニン（ＢＡ）を与えると、緑化は誘導期なしに起こることが知られている。この系で、ウエスタンブロッティング法を用いて種々のタンパク質について分析した。葉緑体ＤＮＡ結合タンパク質ＰＤ１はＢＡ処理後５時間程度から減少した。マグネシウムキレーターゼはＢＡ処理後一時的に減少したが、その後増加し、８時間から１８時間の間にコントロールよりも増加した。これらの結果は、ＢＡによる緑化促進にこれらのタンパク質が関与することを示唆している。また、ミトコンドリアに局在する酵素である３－メチルクロトニル－ＣｏＡ－カルボキシラーゼはＢＡ処理後５時間程度から減少したが、このことの意味は今後検討する必要がある。

2pC03

Gliotoxin及び関連化合物のアセト酪酸合成酵素阻害作用

原口博行，浜谷康幸，楠直子，福田愛弓，橋本研介（福山大・工）

植物の生合成過程を阻害する除草剤のうちアミノ酸代謝を阻害する化合物群は栄養代謝阻害型除草剤と称され，その安全性の面からも注目を集めている。アセト酪酸合成酵素(ALS)はそのターゲットの一つであり，我々は微生物二次代謝産物中に酵母ALS阻害物質を検索し，*Aspergillus flavus* DA-11株よりgliotoxinを単離した(1)。また，このALS阻害活性はgliotoxinのdione部分に由来することを明らかにし，関連化合物の活性を比較することによりある種のbenzo-quinone類及びnaphthoquinone類に強力な阻害を見い出した(2)。本報告ではgliotoxin及び関連化合物の植物ALS阻害作用及び植物の生長への影響を検討した。

Gliotoxinは既存ALS阻害除草剤bensulfron methylには及ばないものの*N. rustica* 培養細胞より調製したALSを30 μM でほぼ100%阻害した。なお，酵母ALSに対してはこの10倍の作用を示した。gliotoxinの作用は，*N. rustica* 培養細胞の生育に及ぼす影響を検討したところ，既存ALS阻害除草剤と同様にアミノ酸関連物質の添加により減弱された。また，gliotoxinの生育阻害作用は根に対して特異的であり，この阻害もアミノ酸関連物質の添加により解除された。ALS阻害様式及び関連化合物の植物体への作用は現在検討中である。

(1)H. Haraguchi et al. (1992) Biosci. Biotech. Biochem., 56, 2085.　(2) 山野ら (1993) 日本農芸化学会大会講要 p.194.

2pC04

大麦種子アリューロン細胞における α－アミラーゼ誘導・分泌の制御物質

浅見忠男[1]、吉田茂男[1]、高月昭[2]、陶玲[3]、室伏旭[3]（理化学研究所・[1]植物機能研究室・[2]動物細胞システム研究室、[3]東大・農・応用生命化学）

大麦種子のアリューロン細胞は活性型ジベレリンの刺激により、de novoにα-アミラーゼを合成し細胞外に分泌する。本研究では、α-アミラーゼ誘導・分泌系の機能解明を、この系の特異的阻害剤を分子プローブとして利用することにより行うことを目的とし、まず阻害剤の検討・検索を行った。その結果ウイルス糖蛋白質細胞内輸送阻害物質であるフォリマイシンとブレフェルジンＡが共に糖蛋白質であるα-アミラーゼの細胞外への分泌を阻害することを明らかにした。また、フロログルシノール誘導体、3-アシル-2，4-ピランジオン誘導体と4-ピロン誘導体が、ジベレリンの作用によるα-アミラーゼの誘導を阻害することも明らかにした。フロログルシノール誘導体については、当初その呼吸鎖電子伝達系における強力な脱共役活性が阻害の原因であると考えたが、構造改変した脱共役活性のより強い化合物が阻害活性を示さなかったことより、他の作用によりα-アミラーゼの誘導を阻害していることが示唆された。

2pC05

タバコ培養細胞におけるジャスモン酸類によるプトレシン代謝調節

今西俊介[1],橋爪克仁[2],松林嘉克[3],羽鳥真[3],坂神洋次[3],橋本隆[4],山田康之[4],中村研三[1]　([1]名大・農・生化, [2]現;宝酒造, [3]名大・農・生理活性物質化学, [4]奈良先端バイオサイエンス)

ジャスモン酸類は植物界に広く存在し、実生の成長抑制、葉の老化促進、塊茎形成の促進などの生理活性を示し、特定遺伝子の発現調節や微小管の破壊などの細胞、遺伝子レベルでの作用を有する。我々は、ジャスモン酸メチルエステル(M-JAS)に対する植物遺伝子の短時間での応答やその発現制御機構を解明するため、タバコ培養細胞BY-2において短時間のM-JAS処理により発現が誘導される遺伝子をdifferential screening により単離した。その結果、動物におけるポリアミン(PA)合成系の律速酵素のオルニチン脱炭酸酵素(ODC)と相同性を示すタンパク質をコードするmRNAがシクロヘキシミド存在下でもM-JASにより短時間の内に誘導されることを明らかにしている。

RT-PCR法により、植物におけるプトレシン(Put)合成のもう一つの経路の律速酵素であるアルギニン脱炭酸酵素(ADC)をコードするcDNA断片をクローニングし、その発現制御についても解析した結果、BY-2細胞を50μMのM-JASで処理をするとODCmRNAの蓄積6時間後に最大となるのに対してADCmRNAは殆ど変化しなかった。M-JASによるODCの誘導は培地中の2,4-DをBAに置換することで約2倍となったが、このような条件でもADCmRNAの蓄積は見られなかった。

逆相HPLCによる細胞内のPA含量の解析の結果、M-JAS処理1.5時間後にPutの一過的な増加が見られる他は、24時間のM-JAS処理の有無による顕著な量的変化は見られなかったが、未処理細胞にはほとんどない溶出ピークの化合物の蓄積が見られ、その一つはマススペクトルと溶出時間の解析から、メチルプトレシン(M-Put)であると同定された。M-PutはPutから作られるニコチン合成経路の最初の中間体である。これらの結果はBY-2細胞の、M-JAS処理はODCの誘導によりPutの合成を促進し、PutはPAよりも、ニコチン合成の方に利用されている可能性が示される。

2pC06

ニンジン不定胚形成に及ぼす細胞密度の効果に関する研究

小林俊弘、東克己、佐々木和生、鎌田博、原田宏（筑波大・生物）

ニンジン不定胚誘導系では、2,4-D存在下で培養している37～63μmのembryogenic cells（EC）を、2,4-Dを含まない培地に移植することにより不定胚を誘導することができる。この時、ECを低細胞密度で移植することが重要であり、高細胞密度では不定胚の分化・発達に阻害が見られる。そこで、この高細胞密度下で見られる阻害効果の原因を探ることとした。

阻害要因として、栄養分の欠乏、接触による物理的障害、2,4-Dの持ち込みが考えられたが、いずれも主要な要因ではなかった。高細胞密度で2週間培養した後の培地（HCM）を用い、ECを低細胞密度で培養すると不定胚形成が阻害された。このことは、培地中に不定胚形成の阻害物質が放出されていることを示唆している。

分画分子量3,500の透析膜を用いて、HCMの透析を行った。その透析外液を用いた場合、不定胚形成の阻害が見られたことから、阻害物質は分子量約3,500以下の低分子であることが明らかとなった。透析内液を用いた場合、不定胚形成の促進が見られたことから、高分子不定胚形成促進物質の存在が示唆された。現在、この阻害効果が細胞増殖の阻害によるものであるか否かを検討している。

次に、この不定胚形成阻害物質を精製・単離するための条件検討を進めた。HCMを酢酸エチル、ODS-Column、ODS-HPLCで順次分画を行っているが、阻害物質は微量であり、37～63μmの小細胞塊を用いて、大量のHCMを得ることは難しい。そこで、大量に得られる63～250μmの細胞塊を用いて同様の不定胚形成阻害が見られるか否かを検討した。その結果、63～250μmの細胞塊を用いた場合でも、高細胞密度培養を行った培地で不定胚形成の阻害が見られた。また、この場合であっても溶媒分画を行った酢酸エチル層で阻害が見られたことから、阻害物質が放出されていることが確認された。

2pC07

植物種子分泌液に検出されるアレロパシー活性における有機物・無機物の役割

津布楽洋和[1]、田中宥司[1]、石黒幸雄[1]、塩家仙子[2]、穴井豊昭[2]、長谷川宏司[2,3]（[1]カゴメ総研、[2]筑波大・応生化、[3]植物情報物質研究センター）

発芽種子から分泌され周辺植物のシュートの成長を顕著に促進するアレロパシー物質として、レピジモイドをはじめとする機能物質が広く高等植物に存在している。これら発芽種子が分泌するアレロパシー物質中の有機及び無機物質の貢献度を明らかにすることを目的として、14科24属からなる24種の植物種子の分泌液（有機及び無機物画分）及びその灰化物（無機物画分）を、ヒモゲイトウ下胚軸伸長試験に供し、それぞれの生物活性について比較検討した。

その結果、1）分泌物の活性が、灰化物の活性を上回る植物種（オオイヌノフグリ、パセリ、イネなど）、2）灰化物活性が分泌物の活性を上回る植物種（アスパラガス、カボチャなど）3）灰化物の活性及び分泌物の活性にほとんど差が認められない植物種（ゴボウ、ヒマワリなど）の3つのタイプに分類されたが、多くの植物種において、その分泌液中に含まれる有機物がアレロパシー活性を持っていることが明らかになった。

種子重量と分泌物、灰化物の活性との相関係数は、灰化物が$r = 0.83$、分泌物が$r = 0.66$であり、種子が分泌するアレロパシー活性のうち無機物の活性は種子重量（表面積）に依存するが、有機物の活性は植物種に特異的であることが示唆された。

2pC08

大腸菌で発現させたシロイヌナズナのグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）の酵素活性に対するオーキシンの効果

綿引　雅昭、山本　興太朗　（北大・地球環境科学・環境分子生物）

いくつかの植物GSTはIAAに結合することが知られているが(Bilang et al., 1993, Zettle et al., 1994)、結合したIAAとGST活性との関係は不明である。演者らがシロイヌナズナから単離したGST関連遺伝子*GST4*を（植物学会第57回大会、1992）大腸菌で発現させたところ、遺伝子産物は還元型グルタチオン（GSH）と1-chloro-2,4-dinitrobenzeneに対してGST活性を持つことが判ったので、本産物を用いてGST活性に対するオーキシンの効果を調べた。

GST4蛋白質のGSHと1-chloro-2,4-dinitrobenzeneにたいするK_mはそれぞれ0．86mMと1．37mMであった。GST活性に対する種々のオーキシンの効果を調べたところ、IAAはGSHに対して競合阻害しており、IAAのK_iは1．52mMであった。同様に2，4－Dと1－NAAもGSHに対し競合阻害を示し、2，4－Dが最も効果が強かった。トリプトファンや酢酸ナトリウムは効果がなかった。この競合阻害効果とGSHセファロースに結合したGST4蛋白質がIAAによって溶出されたことから、IAAはGSTのGSH結合部位（G部位）に結合すると考えられる。IAAのK_i値が高かったことから生体内でIAAがGST4の機能に関与している可能性は低いと考えられるが、今回の知見は生体内の他のオーキシンがGST4の酵素活性に関与している可能性を示唆している。

2pC09

タバコ培養細胞BY-2におけるオーキシンにより制御されるプロテインキナーゼの特性

小高圭太、北川峰丈、関本弘之、酒井慎吾　（筑波大・生物）

タバコ培養細胞(*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) BY-2の培地から2,4-Dを除去すると細胞の分裂係数(MI)は減少し、再添加するとMIは最初のレベルまで回復する。この時、BY-2細胞の核に存在するプロテインキナーゼ(PK)活性がMIの変動と同じように変化することを前回報告した。このPKはカゼインを基質に用いた時に最も高い活性を示し、さらにゲル内リン酸化実験より、このPKの触媒活性は40kDのタンパク質であることが確認されている。

本研究では、この40kD PKが2,4-Dにより直接的に調節されていることをさらに明らかとするために、S期およびM期の阻害剤であるアフィジコリンとプロピザミドをそれぞれ2,4-D培地に添加してみた。その結果、これらの阻害剤によりBY-2細胞の増殖は抑えられたが、40kDのPK活性は減少しなかった。これらの結果は、40kDのPK活性が細胞増殖の結果として変動するのではなく、2,4-Dにより直接的に調節されていることを示唆している。現在この2,4-Dで調節される40kDのPKの精製を試みており、その部分精製品を用いてのkineticsなどについても合わせて報告する予定である。

2pC10

エンドウ矮性突然変異体 lka および lkb においては内生ブラシノステロイドのレベルが変化している　横田孝雄，中山真義，大沢朗，鈴木栄一，竹内安智[1]，James B. Reid[2]（帝京大・理工・バイオサイエンス，[1]宇大・雑草科学センター，[2]タスマニア大）

エンドウの単一遺伝子突然変異体である矮性種の lka および lkb は一種のジベレリン感受性変異体であるが，壁の降伏圧が上昇しているなど，その矮性の原因は単純でない。そこで，本研究ではブラシノステロイドとの関係を調べた。Brassinolide の生合成経路はteasterone -> typhasterol -> castasterone -> brassinolide なので，これらのd6体を内部標準として，約5ヵ月半圃場で育てた植物体の茎頂から4～5節以上の部位について定量をおこなった。

その結果 teasterone 以外のブラシノステロイドが lka，lkb，WT (wild type) すべてから検出された。Brassinolideの含量 (ng/kgfw) はWT (840), lka (245), lkb (350) であった。したがって，内生brassinolide の減少が矮性にかかわっている可能性が考えられる。一方，castasterone の含量は WT (2360), lka (3170), lkb (60) であり，typhasterol の含量は WT (995), lka (285), lkb (110) であった。lkaにおいては castasterone の量がWTよりやや多く，castasterone から brassinolide への変換に欠陥があるように見える。またlkb においてはcastasterone, typhasterol ともに含量が低いことから，生合成初期の段階に欠陥があるように思われる

2pD01

Synechocystis sp. PCC 6803チトクロム*c*-550欠失変異株の光化学系II特性

沈　建仁・[1]Wim Vermaas・井上頼直（理研・太陽光科学，[1]アリゾナ州立大）

我々は、チトクロム*c*-550がらん藻光化学系II酸素発生反応に関与する表在性蛋白質の一つであることを報告してきた。これまでに得た結果では、(1) 好熱性らん藻*Synechococcus vulcanus*より精製した光化学系II粒子にチトクロム*c*-550が量的に反応中心蛋白質と1:1で結合していること[1]；(2) チトクロム*c*-550の解離により系IIの酸素発生活性が低下し、低下した活性が*c*-550の再結合により回復すること[2]；(3) *c*-550が表在性の33 kDa蛋白と共にもう一つの表在性蛋白質、12 kDa蛋白質の系IIへの結合に必要であること[2]；(4) らん藻細胞を種々の画分に分けた時、*c*-550が主に系II画分に存在すること[3]；(5) *c*-550の遺伝子には33 kDa のトランジ　ト・ペプチドと高い相同性を持つリーダー・シーケンスがあること(昨年度本大会講演要旨集)、が明らかになった。本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803において、チトクロム*c*-550遺伝子を挿入失活及びデレーションさせることにより、*c*-550欠失変異株を作製し、その生育状態や光化学系II活性を測定した。チトクロム*c*-550の欠失が酸素発生活性を60%減少させただけでなく、系II反応中心の量をも大きく低下させた。その結果、*c*-550欠失変異株の生育速度が著しく低下した。

[1] Shen J.-R., Ikeuchi M. and Inoue Y. (1992) FEBS Lett. 162, 76-80. [2] Shen J.-R. and Inoue Y. (1993) Biochemistry 32, 1825-1832. [3] Shen J.-R. and Inoue Y. (1993) J. Biol. Chem. 268, 20408-20413.

2pD02

Synechocystis sp. PCC 6803系II表在性の 33 kDa蛋白質とチトクロム*c*-550のダブル欠失変異株の作製と性質

沈　建仁・井上頼直　（理研・太陽光科学）

33 kDa蛋白質とチトクロム*c*-550は共にらん藻光化学系IIの表在性蛋白質であり、そのいずれかを欠失させた*Synechocystis* sp.PCC 6803の変異株は、速度が遅いものの、光独立栄養的に生育できることがこれまでの研究で明らかになっている。チトクロム*c*-550の系IIでの機能を解明する研究の一つとして、我々は33 kDa蛋白質と*c*-550の遺伝子（それぞれ*psbO*と*psbV*)を同時に失活させることにより、その両方を欠いた*Synechocystis* 6803の変異株を作製した。得られた変異株は酸素発生活性が野生株の5-10%のみになり、この活性も光照射中非常に早く失活した。さらに、変異株の系II反応中心含量も野生株の約20%までに低下した。その結果、この変異株は光独立栄養的に生育することができなかった。これらのことより、チトクロム*c*-550が33 kDa蛋白質とは独立に系IIで機能しており、そのいずれもがらん藻の酸素発生活性を維持するのに必要であることが分かった。これは、我々がすでに報告した、33 kDa蛋白がなくてもチトクロム*c*-550が系IIに結合することと一致している。

2pD03

架橋剤によるらん藻光化学系IIにおける表在性蛋白質の相互結合部位の研究

韓　甲祚、沈　建仁、[1]池内昌彦、井上頼直
（理研・太陽光科学, [1]東大・教養・生物）

酸素発生に関与する３種の表在性蛋白質を持つ好熱性らん藻*Synechococcus　vulcanus*の光化学系II標品について、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride [EDC]を用いた架橋実験を行った。その結果、高等植物と同じような33 kDa-CP47の架橋産物を得た以外に、次のような架橋産物を得た。(1) 33kDa - cyt (チトクロム) *c*-550 - 12kDa; (2) cyt *c*-550 - 12 kDa; (3) D2 - cyt *c* - 550 - 12 kDa. これらの結果は、らん藻の系IIにおいて３つの表在性蛋白質が相互に近接している事を示唆し、従って演者らが先に示したcyt *c*-550がチラコイド膜の内側に結合していることを支持している。またすでに報告したcyt *c*-550が12kDa蛋白の系IIへの結合に必要であることを考え合わせると、反応中心D2と直接架橋するのはcytc-550であり、従ってD2蛋白質が表在性のcyt *c*-550と結合していることが示唆された。

2pD04

ＦＴＩＲによる酸素発生系の構造解析：ＣＯＯ$^-$配位子と基質H_2Oとの相互作用

野口　巧、小野高明、井上頼直（理研・太陽光科学）

光合成系Ⅱの酸素発生Ｍｎクラスターにおける、アミノ酸配位子及び基質である水の配位構造や相互作用については、未だ不明のままである。本研究では、酸素発生系のS_1状態とS_2状態間の光誘起フーリエ変換赤外（ＦＴＩＲ）差スペクトルをH_2O及びD_2O緩衝液中で測定し、Ｈ／Ｄ交換のスペクトルへの影響を調べた。その結果、ＣＯＯ$^-$配位子の非対称伸縮モードに帰属できる1561cm^{-1}のバンドが、D_2O緩衝液中で約18cm^{-1}の大きな高波数シフトをするのが観測された。H_2Oと水素結合するＣＯＯ$^-$基を持ついくつかのモデル化合物に関し、そのＣＯＯ$^-$非対称伸縮振動バンドへのＨ／Ｄ交換の効果を調べたところ、バルクのH_2Oと水素結合をしている場合、約7cm^{-1}の高波数シフトしか見られないのに対し、金属に配位したH_2Oに水素結合した場合には、20cm^{-1}程の大きな高波数シフトが見られた。このことから、系Ⅱ酸素発生系で見られた18cm^{-1}の高波数シフトは、Ｍｎクラスター上のＣＯＯ$^-$配位子のうちの１つが、Ｍｎに配位しているH_2O分子と強い水素結合を形成していることに由来すると解釈された。この強い水素結合は、基質であるH_2Oからプロトンが解離するのを助け、ＣＯＯ$^-$配位子がこの際のプロトン受容体としての役割を果たしていると考えられる。

2pD05

Ｌｏｗ－ｐＨ処理酸素発生系の磁性種のスピン状態

三野広幸,Andrei V Astashkin,河盛阿佐子,小野高明[1],
井上頼直[1]　（関学大・理,[1]理化学研究所・太陽光エネルギー）

Low-pH処理によりCa^{2+}を除去した水分解系は酸素発生能が阻害され異常なＳ状態を示す．S_2'状態においては超微細構造の狭くなった変形マルチライン信号を観測することができる．また更に高い酸化状態ではマルチライン信号は消失しｇ＝２を中心としおよそ２００Ｇの範囲で幾つかの信号を観測できる．主な成分はｇ＝2　peak to peak１６０Ｇ（S_3'）信号とｇ＜2　ほぼ１００Ｇのpeak to peakをもつ成分（S_4'とする）である．

今回我々はパルスＥＰＲを用いてこれらの磁性種を測定した。パルスＥＰＲにおける信号強度は磁性種のスピンの大きさによってマイクロ波強度依存性が異なる。これを利用することによりスピンの大きさを決定することが可能になる。これによりS_3'信号のスピンは１、S_4'信号のスピンは1/2と決定された。またS_3'信号の分離幅についてはスピン1/2との間の双極子相互作用が最も有力である。これらの情報からS_3'およびS_4'信号の起源とマンガンクラスタ-との関係について議論する．

2pD06

トリス処理ＰＳⅡにおけるチロシンＺ$^+$のＥＰＲ信号及びＫＩＮＥＴＩＣＳのｐＨ依存性

茂森　和士、三野　広幸、Ａｎｄｒｅｉ　Ｖ．ＡＳＴＡＳＨＫＩＮ、河盛　阿佐子（関西学院大・理）

チロシンＤ$^+$とＺ$^+$は同じＥＰＲ信号を示すことが知られている．チロシンＤに比べてチロシンＺはトラップする事が困難なため，チロシンＺの正確な情報はあまり得られていない。トリス処理ＰＳⅡでは，２５３Ｋで５秒間光照射後７７Ｋで急凍する事によってチロシンＺ$^+$をトラップしＥＰＲ信号を観測する事ができる．

我々は，ｐＨ６．５ 付近において チロシンＺ$^+$のＥＰＲ信号に大きな変化が生じる事を観測した．これは，ｐＨを変える事により周辺構造が変化し，β－プロトンによる超微細相互作用の分離幅が変化するためである考えられる．

チロシンＺ$^+$のパルスＬａｓｅｒ照射によるＥＰＲ信号の消失速度とさらに周辺の原子核に関するＥＮＤＯＲの結果を交えてチロシンＤ$^+$と比較し議論する．

2pD07

鉄除去，亜鉛置換，またはＮａＣＮ処理した光合成光化学系Ⅱの第１受容体キノン結合のＥＳＥＥＭによる研究

河盛阿佐子，Andrei V. Astashkin，三野広幸，
黒岩繁樹[1]，赤堀興造[1]（関学大理，[1]広大総合）

ほうれんそうの光化学系Ⅱの受容体キノン鉄を亜鉛置換し，Q_A^-のＥＳＥＥＭ(Electron Spin Echo Envelope Modulation)を８０Ｋで観測した．その変調周波数より２個の窒素核を検出し，一つはﾋｽﾁｼﾞﾝ，他の一つはｱﾗﾆﾝ（Ｄ２蛋白２６１位）と水素結合しており，ﾊﾞｸﾃﾘｱと類似の構造であると検証した．

鉄を除去したときはﾋｽﾁｼﾞﾝの大部，ＮａＣＮ処理によりその全ての信号強度が失われ，他のアミノ酸残基の窒素位置に新たな信号が現われる．これより鉄に配位するﾋｽﾁｼﾞﾝの１個以上がＣＮに置き代わることが判明した．

2pD08

光合成Ｍｎ安定化蛋白質の構造解析（１）　プロテアーゼによる限定分解と構造－活性相関

元木章裕、臼井美奈、島津恒夫、平野昌彦、加藤　栄[1]
（東レリサーチセンター，[1]東邦大・理）

Ｍｎ安定化蛋白質（ＭＳＰ）は、光合成の水分解反応に必須なＭｎイオンの安定化に重要な役割りを果たしているが、その構造や光化学系Ⅱ蛋白質複合体(PSⅡ)との結合部位についてはほとんど解明されていない。今回*Synechococcus elongatus* のＭＳＰを用いてプロテアーゼに対する反応性を調べ、その切断様式と構造、活性との相関について調べたので報告する。

ＭＳＰを温和な条件で種々のプロテアーゼを用いて限定分解すると、Phe156－Gly163の領域で優先的に分解される。この領域はアミノ酸の保存性が良く、二次構造予測によるとループを形成し蛋白質の表面に存在することが推定された。次に、キモトリプシン型Phe156/Leu157 の部位に切れ目を入れた突然変異体を作製してその性質を調べたところ、SDS-PAGEでは２本のバンドに分離するが、変性剤の存在しないNative-PAGE では天然型蛋白質と同位置に単一のバンドで泳動された。また変異体のＣＤスペクトルは天然型と変わらず、二次構造は変化しないことがわかった。このことは156/157 で切断が起きても、蛋白質としてはニックの入った状態で高次構造を保つことが考えられる。一方、この変異体はＰＳⅡへの再構成能を完全に失っており、Phe156周辺のループがＰＳⅡとの結合に重要な役割りを果たしている可能性が高いことがわかった。

本研究は通産省産業科学技術研究制度の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構からの委託を受けて実施した。

2pD09

光合成水分解系でのマンガン配位反応へのアミノ基の寄与

田村典明、小河亜紀子、梶原英子、市丸都　（福岡女子大学・生物）

光化学系IIに存在する水分解系において、マンガン原子(Mn)は触媒として機能している。このMn原子の配位子として反応中心タンパク質のカルボキシル基やヒスチジンのイミダゾール基が報告されているが、これらのアミノ酸残基以外のアミノ酸残基の関与も未だ考えられる。そこで、アミノ基の化学修飾剤であるメチルアセトイミデート(MAI)、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)、N-ヒドロキシスクシニイミドアセテート(NHSIA)を用いて、Mnの配位過程にアミノ基が関与しているかを調べた。その結果、以下のことがわかった。

（１）ヒドロキシルアミン(NH_2OH)処理した光化学系II標品(NH_2OH)の光活性化能(Mn配位能)は，500mMのMAI，1mMのTNBS，20mMのNHSIA処理によって、顕著に失われた。この時、水分解系を介さない光化学系II近傍の電子伝達活性はほとんど影響を受けていなかった。

（２）過酸化水素存在下でのMn→DCIP光還元活性を測定して、マンガン結合（配位）部位へのマンガンの親和性を調べた。その結果、今回用いた化学修飾処理は、マンガンの高親和性部位にのみ影響を与えることが分かった。

（３）化学修飾標品では、33KDa蛋白質の結合能を欠き、また、LHCPと考えられる蛋白質のみかけ上の減少がみられた。

これらのことから、アミノ基の化学修飾処理後の光活性化の減少の原因として、高親和性のマンガン結合部位の消失や、酸素発生活性を発現する役割を持つ33KDa蛋白質が結合できなくなったこと等があげられる。

2pE01

電子吸収・NMR分光法によるバクテリオクロロフィルｃ(BChl c)会合体の研究

溝口　正，小山　泰（関西学院大・理）

緑色硫黄細菌は，特徴あるアンテナ複合体（クロロソーム）を持つ．その主要色素はバクテリオクロロフィル c (BChl c)であり，クロロソーム内でオリゴマーを形成している．BChl c は，他のクロロフィル類と比べてc-9 位にカルボニル基，c-2a 位に水酸基をもち、構造的に会合体形成に適していると考えられる．

今回，電子吸収・^{1}H NMR (400MHz) を用いてBChl c の会合状態を捉えようと試みた．試料として用いた BChl c は *Cb. limicola*より抽出し，HPLC(C18 reverse-phase column, 6～7.5% H_2O in methanol) で各同族体を単離・精製した．

まず電子吸収スペクトルを用いて，クロロホルム・ジクロロメタン・四塩化炭素等非極性溶媒中での会合体形成に伴うスペクトル変化 (高次会合体の形成に起因する Q_y 吸収帯の長波長シフト) を追跡し，含まれる会合体の種類を検討した．この吸収スペクトルの結果から，会合体形成の濃度および溶媒の極性に対する依存性を観測した．これらの溶液中の NMR スペクトルでは，会合体形成によってシグナルのブロードニングが起こり，帰属が困難になる．そこで，1) メタノール-d_4 を使った滴定，2) 試料の濃度変化、を用いて会合体を単量体へと徐々に変化させ，各段階での NMR 測定を行った．

これらの NMR スペクトルについて，BChl c 分子中の電子密度変化および環電流効果を反映するケミカルシフトに着目し，マクロサイクルの受ける影響について検討した．その結果，ある特定の^{1}Hシグナルのシフトおよび，ブロードニング，消失 (α-H, 2a-H) 等の変化が見られた．また，^{1}H-^{1}H ROESYスペクトルを測定し，分子間の NOE シグナルに着目して可能な会合体モデルの提案を試みる．

2pE02

光合成細菌におけるDMSO呼吸系遺伝子の転写制御

宇治家武史　山本勇　佐藤敏生（広島大・理・生物科学）

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* は、dimethyl sulfoxide(DMSO)呼吸を行う。昨年の本大会で報告したようにDMSO呼吸の末端還元酵素であるDMSO還元酵素の遺伝子*dmsC*,*dmsB*,*dmsA*は互いに重なり合い１つのオペロンを形成していると考えられる。最初の遺伝子*dmsC*は、５カ所にヘム結合モチーフであるCXXCH配列を持つC型チトクロームをコードしている。上流には転写制御タンパク質の遺伝子*dmsR*を見いだしている。

今回、まずSDS電気泳動後のヘム染色により分子量44KDaのヘムタンパク質が光合成細菌をDMSO存在下で培養した時のみ検出され、これを*dmsC*遺伝子産物と同定した。次に*dms*オペロンの転写機構を検討した。プライマー伸長法により*dms*オペロンの転写は翻訳領域の157塩基上流のTから開始され、DMSO存在下では転写量の増大を見た。これはDMSO還元活性がDMSOによって誘導されることと一致する。ゲルシフト法により、転写開始点を含む246塩基のDNAと結合するタンパク質が検出され、培養にDMSOを添加すると、その結合量が増加した。一方*dmsR*の転写開始は、*dmsC*遺伝子内から起こっており、DMSO存在下で抑制された。以上の結果は、上記のDNA結合タンパク質がDMSOの存在下で、*dms*オペロンの転写活性化と*dmsR*遺伝子の転写抑制の両方に働いていると考えられる。DNA結合タンパク質が*dmsR*遺伝子産物かどうか検討中である。

2pE03

光合成細菌のペリプラズム局在DMSO還元酵素のアンフォールディングとリフォールディング

松崎雅広、山口陽子、桝井秀雄、佐藤敏生（広島大・理・生物科学）

光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans* のdimethyl sulfoxide（DMSO）呼吸の末端還元酵素であるDMSORは、１分子のモリブデンコファクター (Mo-co) をもつペリプラズム酵素である。私達はペリプラズムに特別なタンパク質フォールディング機構があるかどうかを調べるために、DMSOR精製酵素を酸変性させ、大腸菌シャペロニン*gro*EL、*gro*ESとジチオスレトール (DTT) との相互作用について調べた。 DMSORを30℃、pH-2で処理すると２分以内に、また４M塩酸グアニジン溶液中で処理するとMo-coが遊離し、native電気泳動で移動度の低いタンパク質 (Ⅱ型) となった。Ⅱ型は時間の経過とともにアグリゲーションした。しかし、*gro*EL、*gro*ESの添加によりアグリゲーションが阻害され、さらにDTT の添加により活性型の酵素と移動度が一致するⅠ型に変換された。また、Ⅱ型には２つの状態があり、DTTによって完全還元型になると推定された。ペリプラズム画分の添加によっても*gro*EL 、*gro*ESと類似の現象が認められた。

2pE04

ラン藻での培養光強度によるカロテノイド組成変動

正元和盛，古川健一，小濱由紀子[1]，和田元[1]（熊本大・教育・生物，[1]九州大・理・生物）

高等植物に較べα-カロテン類やエポキシカロテノイドを含まないラン藻は，カロテノイド組成が単純で，カロテノイド代謝を調べる上で好材料の一つと考えられる．このようなラン藻細胞での，培養光強度によるカロテノイド組成の変動を調べた．

単細胞性のラン藻である*Synechococcus* PCC7942および*Synechocystis* PCC6803を材料として用いた。それらのラン藻の培養は，BG-11培地中25°Cで白色蛍光灯下弱光または強光条件下で行なった。*Synechocystis* PCC6803の暗条件での培養はグルコース存在下で行った．カロテノイドは逆相HPLCでメタノール/エタノール勾配移動相で流し，450 nmで検出した．

Synechococcus PCC7942は，弱光下ではβ-カロテンを主成分として含んでいたが，強光下ではゼアザンチンを主成分として含んでいた．カロテノイド/chl a 比でみると，強光下では弱光下の3-5倍に増加した．細胞散乱強度あたりでのゼアザンチン量も増加した．一方、β-カロテンはいずれの場合でも変わらなかった．*Synechocystis* PCC6803では，chl a 比でみると，ザントフィル(ミクソザンチン，エキネノン)は強光下で増加していた．また，β-カロテンも強光下で増加し，*Synechococcus* PCC7942とは異なった様相を示した．暗条件で培養した*Synechocystis* PCC6803の場合には，ゼアザンチンがやや高い以外は定常光での培養細胞のカロテノイド組成とほぼ同様であった．

これらのことは，ラン藻が強光に応答してザントフィル合成を促進させることを示し，細胞膜・細胞壁への蓄積を示唆する．

2pE05

好熱性シネココッカスのアロフィコシアニンに関する研究(2)
アンカータンパク質遺伝子の解析とフィコビリゾームの構成

曽我麻美子、島津恒夫、平野昌彦、加藤　栄[1]
(東レリサーチセンター、[1]東邦大・理)

フィコビリゾーム(PBS)はシアノバクテリアと紅藻に特有の、光合成膜表面に存在する巨大な集光性色素タンパク質集合体である。好熱性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus*のPBSは13種のサブユニットから構成されており、主に色素タンパク質のフィコシアニン(PC)からなるロッド部分と、アロフィコシアニン(APC)からなるコア部分に分けられる。我々は既に*S. elongatus*のPC(ロッド)オペロンおよびAPC(コア)オペロンを単離し、10種のサブユニットについて塩基配列を報告している。今回、コア部分に含まれるアンカータンパク質(L_{CM}^{120})の遺伝子(*apcE*)を単離して塩基配列の解析を行ない、1,139残基からなる全アミノ酸配列を推定した。この配列中には約120残基からなる相同性の高い繰り返し領域が4ヶ所存在しており、ロッド中のリンカータンパク質(L_{RC}およびL_R)のアミノ酸配列と高い相同性を有していた。アンカータンパク質の繰り返し領域の数とL_{RC}をコードする遺伝子数との関係について他のシアノバクテリアとの比較を行うことにより、*S. elongatus*のPBSの構成を推定した。

本研究は通産省産業科学技術研究制度の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構からの委託を受けて実施した。

2pE06

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942 株における窒素栄養状態によるフィコシアニン遺伝子の発現調節

澤木弘道、杉山達夫、小俣達男（名古屋大・農・応用生物科学）

フィコビリソームは、ラン藻のアンテナ色素複合体で細胞内に多量に含まれる。窒素欠乏時にフィコビリソームタンパク質が分解されることから、フィコビリソームは窒素の貯蔵物質としての役割も果たしていると考えられている。我々は、フィコビリソームを構成する主要なタンパク質であるフィコシアニンの遺伝子転写産物（*cpcBA* mRNA）の蓄積量と窒素栄養状態の関係について*Synechococcus* PCC7942を使って調べた。硝酸イオン能動輸送能を欠く変異株 M45 における硝酸イオンの取り込み速度は、外液中の硝酸濃度に比例するので、培地中の硝酸濃度を 7.5mM、15mM、30mM、60mM にして培養し、段階的な窒素欠乏条件にして M45 を培養した。これらの細胞からRNA を単離し、*cpcBA* mRNA の蓄積量を調べたところ、より低い硝酸濃度培地で生育した菌体ほど *cpcBA* mRNA 蓄積量が多かった。このことから窒素欠乏状態では、フィコシアニン含量は低下するもののその遺伝子の転写はむしろ活性化されている、と結論された。

2pE07

POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE FROM *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803.

Fernando ARDILA and Tatsuo SUGIYAMA. Dept. Applied Biol. Sci., Sch. Agric. Sci., Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya, 464-01.

The enzyme Glutamine Synthetase (GS; EC 6.3.1.2) plays a central role in nitrogen metabolism of prokaryotes. Previous studies on the regulation of GS activity in cyanobacteria indicate that is allosterically modulated by the concentrations of different compounds such as aminoacids, nucleotides and divalent cations and, recently, covalent modification through ADP-ribosylation was shown as an inhibitory mechanism of *Synechocystis* GS.

We report the presence in *Synechocystis* sp. PCC 6803 of a soluble component that can completely inhibit GS transferase and biosynthetic activities. This inhibitory action appears to be independent of other enzyme activities since it can be observed either on a crude extract or on a purified GS. No preincubation is necessary and the inhibition can be observed along the 30-min GS enzymatic reaction. While in the case of the biosynthetic activity the plots of relative GS activity against inhibitor concentration gives rectangular hyperbolas, sigmoid-shaped curves are obtained when GS transferase activity is challenged. This inhibitory component was partially purified from a cyanobacterial crude extract by heat precipitation, ultrafiltration, and anionic exchange and reverse phase chromatographies and its molecular mass was estimated between 0.5 and 3 kDa by ultrafiltration criteria.

F.A. is a recipient of a JSPS post-doctoral fellowship.

2pE08

海産ラン藻 *Phormidium persicinum* に溶源化したウィルスの単離

大城 香，藤田善彦[1]（東海大・海洋・海洋科学，[1] 基生研・細胞生物）

ラン藻に感染するウィルス（シアノファージ）の大部分は，毒性ウィルスで、感染した細胞は短時間のうちに溶解されることが知られている。我々は，海産ラン藻 *Phormidium persicinum*（Provasoli株）を宿主とする溶源性ウィルスが存在することを見いだした。 本ラン藻は１０年以上実験室で培養されてきた株で，通常に培養した細胞中にはウィルス粒子は認められない。しかし，細胞を溶源性ウィルスの誘発を引き起こすことが知られているマイトマイシン C を添加した培地に移すと，細胞内にウィルス粒子の出現が観察され、さらに細胞はマイトマイシン C 添加後約５０時間で完全に溶解した。同様の細胞溶解は，細胞を短時間紫外線照射することでも誘発された。これらの結果は，ウィルスの安定な溶源化がこのラン藻で生じていること，マイトマイシン C の添加や紫外線照射が，この溶源性ウィルスの溶菌サイクルを誘発したことを示唆している。細胞の溶解物から単離したウィルスの電子顕微鏡観察から，このウィルスの形態が，直径約30nmの多角形の頭部と約300nmの尾部を持つことが示された。海洋でみられるラン藻の赤潮の消滅に溶源性ウィルスが関与している可能性についても考察する。

2pE09

ラン藻 *Plectonema boryanum* の光に依存しないクロロフィル生合成系に関わる第三の遺伝子*chlB*の同定

藤田祐一、長谷俊治（大阪大・蛋白研）

被子植物を除く多くの植物は、クロロフィル（Chl）生合成系のプロトクロロフィリド（Pchlide）からクロロフィリドへの還元過程に光依存性と光非依存性の二つに系を併用している。私達は、ラン藻*Plectonema boryanum* を用いて光非依存性のPchlide還元系の分子遺伝学的解析を進めており、すでにオペロンを形成する二つの遺伝子*chlL*と*chlN*がこの反応に関与することを明らかにしている。最近、緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*の葉緑体DNAには、本反応に関与する第三の遺伝子*chlB*がコードされていることが示された。*chlB*のホモログと思われるORFは、ゼニゴケやマツの葉緑体DNAにも見つかっている。そこで今回、ラン藻*P. boryanum* からこの遺伝子のホモログをクローニングすることを試みた。ゼニゴケ葉緑体DNAのORF513（*chlB*）断片をプローブとして*P. boryanum* のゲノム・ライブラリーから6.2-kbの*Hind*III断片をクローニングした。その塩基配列を解析した結果、ゼニゴケの*chlB*と73％という高い類似性を示す508のアミノ酸残基をコードするORF（ORF508）を見出した。この遺伝子の欠損株YFB14は上記二つの遺伝子*chlL*や*chlN*の欠損株と同じく、暗所でのみChl合成が停止し、Pchlideを著しく蓄積するという形質を示した。したがって、ORF508はこのラン藻の*chlB*遺伝子であり、光非依存性Pchlide還元反応には、少なくとも*chlL*、*chlN*及び*chlB*という三つの遺伝子が要求されると考えられる。

2pE10

ラン藻 *Plectonema boryanum* における光非依存性プロトクロロフィリド還元反応に関与する *chlL*、*chlN*、*chlB* 遺伝子産物の免疫化学的解析

高木英典、藤田祐一、長谷俊治（大阪大・蛋白研）

クロロフィル生合成の一過程であるプロトクロロフィリド(Pchlide)還元反応には、光依存性と光非依存性という異なる2種の系の存在が知られている。最近、ラン藻や緑藻を用いた分子生物学的研究から光非依存性の系に関与する3種の遺伝子として *chlL*、*chlN*、*chlB* 遺伝子が同定された。私達は光非依存性Pchlide還元反応におけるこれら3種の遺伝子産物の生化学的役割を明らかにする第一歩として、各遺伝子の欠損株が得られているラン藻 *Plectonema boryanum* を用いて、免疫化学的手法による細胞生化学的解析を行った。

P. boryanum の *chlL*、*chlN*、*chlB* 遺伝子各々のコード領域全体を、C末端に6 x His を付加する発現ベクター pQE70 を用いて大腸菌で発現させた。これらの発現産物をキレートクロマトグラフィー等により精製して抗体を調製し、各々の蛋白質の細胞内局在性を検討した。*chlB* 遺伝子産物に対する抗体を用いた結果、膜画分に約 58,000 の分子量を示す蛋白質のシグナルを検出した。これは *chlB* 遺伝子産物の推定分子量 56,819 とよく一致しており、*P. boryanum* の *chlB* 遺伝子産物が膜画分に存在すると考えられる。一方、ゼニゴケの *chlL* ホモログでの解析から *chlL* 遺伝子産物が可溶性であることが報告されており、光非依存性Pchlide還元反応には可溶性画分と膜画分とが必要であることが予測される。現在 *chlL* 及び *chlN* 遺伝子産物の解析や、各々の遺伝子欠損株における他の2種の遺伝子産物の存在状態について解析を進めている。

2pF01

カラマツの chlL 遺伝子の構造と発現

笠井誠、山田恭司、岩崎俊介[1]、徳富光恵[1]、山本直樹[1]
（富山大・理・生物、[1]農水省・生物研）

球果植物の多くは、暗所でもクロロフィルを合成し緑色を呈する。この暗所でのクロロフィル合成には、葉緑体ゲノムにコードされているchlL などの遺伝子群の関与が示されてきた。ところが、例外的に、カラマツの暗所芽生えではクロロフィル合成が見られず、黄化芽生えが生じる。そこで、暗所におけるカラマツの黄化を説明することを目的として、カラマツからchlLと相同性を示すDNA断片をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、chlL 遺伝子に相同な876bpからなるORFを見い出した。また、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列には、保存性の高い機能ドメインとされているATP結合部位や4つのシステイン残基が保存されていた。このように、塩基配列の特性からカラマツの黄化を説明できるような情報を見いだすことはできなかった。

次に、カラマツとクロマツの芽生えでのchlL 遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーション法により比較した。暗所でもクロロフィル合成がみられるクロマツの場合では、明、暗いずれの条件下でも転写が確認できたが、カラマツではクロマツの場合とは異なっていた。すなわち、カラマツの明所芽生えには転写産物は検出できなかった。一方、暗所芽生えでは、クロマツの転写産物よりはるかに大きい転写産物が検出できた。以上のことから、カラマツのchlL の発現についてRNAプロセッシング等の転写以降に異常があることが示唆された。

2pF02

葉緑体包膜のＤＮＡ結合タンパク質の精製

吉田真琴，三角修己，佐藤直樹（東京学芸大，生命科学）

若い葉の葉緑体では，葉緑体DNA（cpDNA）が包膜に結合しており，この結合はcpDNAの複製，娘葉緑体へのcpDNAの分配等に関与していると推測される。本研究ではcpDNAを結合している包膜の130kDaタンパク質（PENDタンパク質）を精製することを試みた。播種後６日目のエンドウ芽生えの先端フック部を刈り取り，無傷葉緑体を単離した。１％NonidetP-40で可溶化し，遠心により核様体を沈殿させた。PENDタンパク質を含む上清を，ヘパリンセファロースおよびDNAセルロースを担体とするアフィニティークロマトグラフィーにかけた。さらにビオチンラベルDNAプローブとアビジン結合磁気粒子を用いた手法によりPENDタンパク質をSDS-PAGEにおける主なバンドの一つとして確認できるまで精製した。

2pF03

SELF SPLICING GROUP I INTRON IN THE *chlL* GENE OF THE GREEN ALGA *Chlorella ellipsoidea.* (IAM C-27)

Meenu KAPOOR, Maki HORIHATA[1], Mari ITO[2], Tatsuya WAKASUGI and Masahiro SUGIURA, Center for Gene Research, Nagoya Univ., Nagoya 464-01, [1]Department of Biology, Faculty of Science, Okaysama Univ., Okayama 700, [2]School of Life Studies, Sugiyama Jogakuen Univ., Nagoya 464.

The *chlL* gene product is involved in the light-independent reduction of protochlorophyllide to chlorophyllide. This gene has so far been found only in the purple photosynthetic bacteria, cyanobacteria and in the chloroplasts of the algae and non-flowering plants. We have sequenced a 5 kbp *Hin*dIII fragment of the *Chlorella ellipsoidea* cpDNA which contains sequence homologous to the *chlL* genes of other organisms. Interestingly, unlike in other organisms, the *Chlorella chlL* gene is interrupted by a 951 bp intervening sequence. The 5' and 3' splice sites of this intron were determined by cDNA sequencing. Secondary structure of the intron revealed the presence of conserved base paired elements P, Q, R, S and the paired helical regions P1 to P10 that are characteristic of group I introns. The *in vitro* synthesized precursor RNA containing the intron undergoes efficient self splicing in the presence of a divalent and monovalent cation and GTP. The products of the *in vitro* self-splicing reaction representing, C-IVS, L-IVS-3'exon, L-IVS, ligated- exons, and 5'exon have been characterized by standard molecular size markers.

2pF04

単細胞緑藻クロレラC-27株(*Chlorella ellipsoidea* C-27)葉緑体ゲノムの構造解析

永井俊幸、伊藤万里[1]、Meenu Kapoor、堀畑真希[2]、續順子[1]、吉永光一[3]、若杉達也、杉浦昌弘（名古屋大·遺伝子、[1]椙山女学園大·生活科学、[2]岡山大·理·生物、[3]静岡大·理·化学）

藻類から陸上植物への進化過程における葉緑体ゲノムの構造変化を解析するために、我々は藻類の中でも陸上植物に比較的近縁な緑藻植物の葉緑体ゲノムの全構造解析を開始し、これまでに単細胞緑藻クロレラC-27株（*Chlorella ellipsoidea* C-27）葉緑体ゲノムの約80%の構造を決定した。クロレラC-27株の葉緑体ゲノムは約154kbpで、リボソームRNA遺伝子群は1コピーしかなく逆位反復配列は存在しなかった。80種以上の遺伝子およびORFが葉緑体ゲノム上に存在し、それらの多くは陸上植物のものと共通であったが、葉緑体分裂に関与すると考えられるMinD遺伝子ホモログなどのように他の植物の葉緑体ゲノムには存在しない遺伝子も見つかった。

2pF05

ヒャクニチソウ単離葉肉細胞の培養における葉緑体DNA合成のサザンブロッティングによる定量的解析

小島慶子、広瀬咲子、駒嶺穆（日本女子大・理・物生）

さきに、われわれはヒャクニチソウ単離葉肉細胞の培養後３０～４０時間にかけて細胞あたりの葉緑体数が倍加するという現象について植物学会で報告した。この葉緑体の分裂は培地中にサイトカイニンとオーキシンを添加することを必要とし、シクロヘキシミド、サイトカラシンBにより、阻害される。また、この葉緑体分裂に先立って培養後２０～３０時間に葉緑体ＤＮＡ合成が起こることがアフィディコリン非感受性画分への^{3}Ｈ－チミジンの取り込みよって明らかにされている。今回、培地のホルモン条件を変えた場合の葉緑体ＤＮＡ合成の相対的な定量化をサザンハイブリダイゼーション法により試みたのでその結果を報告する。培養を始めてから０時間および３０時間後の単離葉肉細胞からトータルＤＮＡを抽出し適当な制限酵素で切断、電気泳動した後、タバコ葉緑体ＤＮＡ断片、およびヒャクニチソウの管状要素分化と関連して発現するＴＥＤ３のゲノムＤＮＡ断片をプローブとし、ＥＣＬサザンハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、サイトカイニン、オーキシン両方を含む培養で、最も葉緑体DNA合成量が多いことがわかった。

2pF06

葉緑体ゲノム上の２つの保存された読み取り枠ｙｃｆ７とｙｃｆ８は新しいチラコイド膜タンパクをコードしている

高橋裕一郎、[1]C. Monod、[1]M. Goldschmidt-Clermont、[2]C. Breyton、[2]J.-L. Popot、[1]J.-D. Rochaix（岡山大・自然科学研究科、[1]ジュネーブ大・スイス、[2]IBPC・フランス）

葉緑体ゲノムの全塩基配列がタバコやゼニゴケなどのいくつもの植物で決定され、多くの遺伝子が同定された。それと同時に、機能が不明な保存された読み取り枠（ｙｃｆ）が10以上存在することも明らかになった。本研究では、緑藻クラミドモナスの葉緑体ゲノムにも存在するｙｃｆ７とｙｃｆ８の発現とその存在部位を明らかにし、その機能の解析を行った。まずそれぞれのｙｃｆを大腸菌に発現させて作った抗体を用いてウェスタン分析を行い、ｙｃｆ７とｙｃｆ８はチラコイド膜に存在する小型のタンパクをコードしていることを示した。さらに、Ｙｃｆ７タンパクはシトクロムｂ$_{6}$ｆ欠損株に検出されず、単離したｂ$_{6}$ｆ標品に濃縮されていることから、この複合体の新しいサブユニットであると結論された。一方、Ｙｃｆ８タンパクは系２欠損株ではその量が著しく減少し、また単離した系２標品に濃縮されていることから、系２複合体の新しいサブユニットであることが示された。ｙｃｆ８を失活させた形質転換体は強光照射下で生育が阻害されることから、Ｙｃｆ８タンパクは系２反応中心の光損傷に対する防御機能を果たしている可能性が示唆された。

2pF07

エンドウ葉緑体における SecA タンパク質ホモログの同定および cDNA クローニング

野原 哲矢、中井 正人、後藤 旭、杉田 大悟、遠藤 斗志也（名大・理・化）

SecA タンパク質は、大腸菌等の原核生物におけるタンパク質の細胞質膜透過反応において中心的な役割を担っている分子量約10万のタンパク質で、主に細胞質に存在している。われわれは昨年の本年会で、光合成を営む原核生物であるラン藻の SecA タンパク質について報告した。本研究では、ラン藻が内共生して生じたと考えられている高等植物葉緑体において、SecA タンパク質ホモログが存在するかどうか解析を行なった。まず、エンドウ葉緑体ストロマ画分に、ラン藻 SecA タンパク質に対する抗体と特異的に反応する分子サイズ約 110kDa のタンパク質が存在することを見出した。次に、エンドウ緑葉から調製した cDNA を鋳型として、これまでに見い出されている生物の各種 SecA に曲通するアミノ酸配列を利用した PCR 法、および 5'-、3'- RACE 法により エンドウ *secA* cDNA のクローニングに成功した。この cDNA によりコードされるタンパク質は、N末端に約 60 アミノ酸残基の延長ペプチドを有する点を除いて、ラン藻 SecA タンパク質と 58%、大腸菌 SecA タンパク質と 48% と高い相同性を示した。この cDNA の *in vitro* における発現産物は、単離したエンドウ葉緑体ストロマにプロセシングを伴って効率よく取り込まれること、得られた cDNA の発現産物を抗原として調製した抗体がエンドウ葉緑体ストロマの 110kDa のタンパク質と特異的に反応することから、得られた cDNA がエンドウ葉緑体の SecA タンパク質をコードするものであると結論した。

2pF08

葉緑体チラコイド内腔へのタンパク質輸送過程における SecAタンパク質ホモログの関与

後藤 旭、中井 正人、野原 哲矢、杉田 大悟、遠藤 斗志也（名大・理・化）

高等植物葉緑体は、二枚の包膜に囲まれ、内部には光化学系複合体等を集積したチラコイド膜が存在している。チラコイド内腔に存在するタンパク質の多くは核のDNAにコードされ、細胞質で前駆体として合成された後、葉緑体の包膜とチラコイド膜を透過して成熟体となる。タンパク質のチラコイド膜透過の経路は、エネルギー要求性から２つに分けられる。ひとつは、酸素発生系の 23K タンパク質に代表される経路で、膜透過の際にプロトン勾配のみを必要とする。もうひとつは、同じく酸素発生系の 33K タンパク質に代表される経路で、プロトン勾配に加えて ATPとストロマ画分を要求する。本研究では、タンパク質のチラコイド膜透過の分子機構を明らかにする目的で、エンドウより単離したチラコイド膜への 23K および 33K タンパク質の *in vitro* での輸送実験を行ない、特に、葉緑体ストロマに存在が確認された SecA タンパク質ホモログの関与について解析した。その結果、33K タンパク質のチラコイド膜透過は、SecA の阻害剤として知られているアジ化ナトリウム、および抗 SecA 抗体で阻害されたが、23K タンパク質の膜透過はいずれによっても阻害を受けなかった。以上のことからタンパク質のチラコイド膜透過には、SecA タンパク質ホモログに依存する経路と依存しない経路が存在することが示唆された。

2pF09

タバコ葉緑体核様体DNA結合性タンパク質CND41の機能解析

中野雄司、村上真也、庄司　翼、山田康之、佐藤文彦（京大・農・農化）

タバコ緑色培養細胞より精製した葉緑体核様体中には塩基性で分子量41kDのDNA結合性タンパク質CND41が存在する。CND41は、そのcDNAのクローニングならびに構造解析の結果、新規のタンパク質であり、120アミノ酸からなるトランジットペプタイド領域を含み、成熟CND41のN末端に存在するリジン高密度領域がそのDNA結合能に関して必須であること、さらに葉緑体DNAに非特異的に結合することなどが明らかとなっている。そこで本研究では、CND41の機能を調べる目的でその発現様式を解析した。

ノザン法による解析の結果、CND41mRNAは葉、茎、根の各組織において蓄積が見られる一方、緑色培養細胞において植物体よりも高い蓄積がみられた。さらに、抗CND41 抗体を用いた解析の結果、 CND41 タンパク質は、植物体においては茎組織において最も多く蓄積し、葉における蓄積は少ないことが明らかとなった。また、通常の緑色、白色両培養細胞において植物体よりも顕著な蓄積がみられたが、Photoautotrophic 培養細胞における蓄積は極めて低かった。この CND41 の蓄積と、葉緑体DNAにコードされるRuBiscoLタンパク質の蓄積量を比較した結果、CND41の蓄積はRuBiscoLタンパク質の蓄積に対して逆比例的な関係にあると考えられた。以上の結果、CND41は糖により発現が調節されており、葉緑体遺伝子発現の負の制御因子である可能性が考察された。

2pF10

タバコ葉緑体核様体DNA結合性タンパク質CND41の発現制御機構の解析

佐藤文彦、庄司　翼、中野雄司、山田康之（京大・農・農化）

タバコ緑色培養細胞より単離された葉緑体核様体DNA結合性タンパク質CND41は植物各組織において特徴的な蓄積パターンを示し、葉緑体遺伝子の発現の負の制御因子である可能性が示唆された。そこで、CND41の発現制御機構について詳細な解析を行った。

まず、CND41と葉緑体DNAのコピー数との関係を明らかにする目的で、タバコ植物体各組織および培養細胞の細胞当りの葉緑体DNAコピー数を解析した。その結果、培養細胞ならびに緑葉において葉緑体DNAが高コピー数存在することが明らかとなったが、CND41蓄積量との間には相関は見い出せなかった。

続いて、糖による発現誘導を解析するため、タバコの切断葉に糖処理を行いCND41の蓄積を解析した。その結果、Sucroseのみならず、Glucose、Fructose処理によっても発現誘導されることが明らかとなり、現在さらに誘導過程ならびに発現制御様式を解析中である。

一方、当研究室において選抜された耐塩性タバコ培養細胞を分析した結果、糖が培地中に存在するにも関わらず、CND41の蓄積量が低下していることが明らかになった。この塩類によるCND41の発現制御機構、またさらにエンドウを用いた光に対するCND41の発現制御機構についてもあわせて報告する。

2pG01

大腸菌で発現させたキュウリ細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの性質

尼子克己・浅田浩二（京都大・食研）

植物のH_2O_2消去に機能するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX) は、基質であるアスコルビン酸 (AsA) がないと速やかに失活する、チオール基修飾試薬である *p*- クロロ水銀安息香酸 (*p*CMB) で完全に阻害されるなどの特徴を持つが、生葉からの大量調製が困難なため、こうした性質の分子機構的な理解は他のペルオキシダーゼに比べて大きく遅れていた。我々は今回、キュウリ細胞質型 APX (cAPX) の大腸菌による大量発現系を構築し、分子的性質を解析したので報告する。

キュウリ cAPX の cDNA を *Not*I 分解、末端平滑化、*Nco*I 部分分解により断片化し、発現ベクター pET8c に挿入し、BL21(DE3)pLysS に形質転換させた。この形質転換体は IPTG 添加約２時間後に最大比活性を示したので、これを集菌し、破砕後硫安分画、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによってチャ葉より精製した cAPX と同等の比活性 (約700 units/mg protein) を持つ、SDS-PAGE で均一な標品 (rcAPX) を得た。

rcAPX は cAPX と同様、AsA 非存在下で失活し、これが Compound-I の不安定性によることを確認した。Soret 帯の吸収スペクトルの変化から、APX の阻害剤である *p*CMB はチラコイド膜結合型 APX では Compound-I の生成を阻害するのに対し、rcAPX では AsA による還元反応を阻害することが示唆された。

現在、APX の部位特異的変異体を作製し、これらの性質について検討しているので、これについても報告する。

2pG02

A NOVEL SCHEME TO ASSAY SOD ACTIVITY

Ching-Nen CHEN, Shu-Mei PAN. Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan,ROC.

A convenient scheme was designed to assay superoxide dismutase(SOD) activity by using polyacrylamide gel electrophoresis and densitometry. After electrophoresis, the staining of SOD activity was carried out by nitroblue tetrazolium system. Different visualizing effects of soak durations on SOD activity were observed in this system and the optimal soak duration was determined to be 15 min for each of the two soak steps. The gels were then scanned by the laser densitometer. The readings corresponding to the SOD activities were obtained by processing the images. A linear curve of the reading against the sample quantity can be plotted. SOD activity of an unknown sample can be calculated by interpolating its reading to the regression curve of SOD standard which was obtained on the same gel. By this easy-doing scheme, multiple samples can be measured and the total or a single SOD isozyme activity can be obtained from a gel. Interference coming from the other antioxidants or proteins in the tissue can be removed during electrophoresis. The deviations of the SOD activity of the crude extract from rice etiolated seedlings and from tobacco leaves, which were measured by the scheme, were less than 12 % (n=3, on 3 gels) and 22 % (n=8, on 3 gels)respectively.

2pG03

RICE MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE ENCODED BY A MULTIPLE GENE FAMILY

Jyh-Cheng CHEN, Daw-Shyng WEI, Shu-Mei PAN.
Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

We have isolated two rice cDNA encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD) distinct from the one previously reported by Sakamoto *et al*. The clones, RMSOD1 and RMSOD2 have 951 and 1352 bps in length. Sequence identity between the two clones is 85.27 % in full length and 98.71 % in the coding region. The 5'sequences prior to the first in-frame start codon (113bp in RMSOD1 and 511bp in RMSOD2) are only 59.29 % identical, but the 3' untranslated regions (142bp in RMSOD1 and 145bp in RMSOD2) have 85.92 % similarity. They encode polypeptides of 232 amino acids with 96 % identity, first 29 residues corresponding to a putative mitochondrial transit peptide. Genomic Southern analysis indicated that the gene encoding MnSODs of rice constitute a multigene family.

2pG04

フェレドキシンとフェレドキシン依存性酵素の相互作用の解析

明石哲行、松村智裕、井手口隆司、長谷俊治（阪大・蛋白研）

電子伝達蛋白質であるフェレドキシン(Fd)は、高等植物の葉緑体において、光化学系Iから受け取った電子を亜硫酸還元酵素(SiR)やFd-$NADP^+$還元酵素(FNR)等のFd依存性酵素へ供与し、各種の酸化還元反応を進行させる。このFdとFd依存性酵素との電子伝達反応中には、両者の静電気的相互作用によって、蛋白質・蛋白質複合体が形成されることが示唆されている。本研究は、この複合体形成に関与する部位の解析を蛋白質工学的手法で行い、相互作用の構造要因を明らかにすることを目的としている。

植物型Fdの構造において、分子進化上保存性の高い８領域に存在する酸性アミノ酸残基（D27, E30, D58, D61, D66/D67, E71/E72, D85, E93）のカルボキシル基をそれぞれ部位特異的変異法によりアミド基に置換したFd改変体を作製した。これらの分子の複合体形成能は、酵素に結合したFdと、結合していないFdとを区別できるゲル濾過クロマトグラフィー法により評価した。その結果、改変体の分子種により、結合力が元のFdと殆ど変化しないものから、大きく減少するものまで変化に富んでいた。その中で、興味深い現象は、E93の改変体はSiRに対する結合力の低下度合が、FNRのそれに比べ大きく、一方、D66/D67の改変体では、これらの酵素に対する結合力低下の関係が逆転していた。このことから、Fd分子上のSiRとFNRとの結合領域は、少なくとも一部では互いに異なっている部分が存在することが示唆された。また、これらの分子は、SiRやFNRの酵素活性の顕著な低下をもたらすことも判明しており、目下複合体形成と電子伝達活性の対応関係を検討している。

2pG05

光と亜硝酸によるフェレドキシン－ＮＡＤＰ⁺還元酵素アイソザイムの調節

金鉄，和田敬四郎　（金沢大・理・生物）

緑豆（*Vigna radiata*）幼植物の葉には二種類のFNRが存在している。それらは分子量，N-末端アミノ酸配列，免疫特性などが異なっているが，in vitroでの機能は似ている。葉におけるFNRアイソザイムの機能を研究するために大根の葉及び根のFNRと特異的に反応する抗体を用いて光と亜硝酸によるFNRアイソザイムの変動を調べた。

緑豆幼植物葉に存在するleaf-type FNRは光照射によってクロロフィルとともに増加し，暗所に置くことにより減少する。一方，root-type FNRは暗所で増加し，光照射によって減少する。両方のアイソザイムは10mM硝酸処理によってはあまり変動しないが，root-type FNRは亜硝酸処理によって活性の増加が見られた。亜硝酸処理による遊離アミノ酸やアンモニアの増加もroot-typeFNRの増加と相関関係があった。緑豆幼植物におけるFNRアイソザイムは光と亜硝酸に対して異なるresponsを示し，これらの結果から，leaf-type FNRは光依存の$NADP^+$還元に関与しており，root-type FNRは硝酸還元に関与しているものと考えられる。

2pG06

高い酸化還元電位の電子供与体を利用する硝酸還元酵素のホウレンソウ葉での存在

村田　祐二、高橋　正昭（甲南大・理・生物、大阪府大・農・応用生化）

光合成の還元力はCO_2固定をはじめ、無機NやSの還元同化、そのほか光合成に必要な分子の輸送にも必要とされる。我々は、葉緑体包膜にストロマから細胞質に向かう電子伝達反応の存在を初めて明らかにした。この電子伝達の機能として細胞質で行われるNO_3^-の還元に対する電子の供与の可能性を検討した。包膜の電子伝達系の酸化還元的性質から、比較的高いEo'のe^-ドナーを利用できるNO_3^-還元酵素(NR)が存在するかどうかを検討した。

還元型Cyt *c* (Cyt c_R)に依存するNO_3^-からのNO_2^-の生成によりNR活性を測定した。Cyt c_R-NRが等張液で破砕された緑葉抽出液の22 x 10^5 x *g*上清に認められた。Cyt c_R、アスコルビン酸 + Cyt *c*はe^-ドナーとなるが、アスコルビン酸はNR活性に対しe^-ドナーとしての効果は示さなかった。NADH-NR活性に対して約40%の活性が緑葉の細胞質に認められた。NR活性の至適pHは7.6で、NO_3^-に対する*Km*は、50 mM HEPES-KOH, pH 7.6,存在下、30 μMでありNADH-NRの示す値に近い。粗抽出液中でのCyt c_R-NR活性の$t_{1/2}$は約10 hであった。

2pG07

トウモロコシ亜硫酸還元酵素の大腸菌での発現

井手口隆司，明石哲行，長谷俊治（大阪大・蛋白研）

同化型亜硫酸還元酵素(SiR)は，S の還元同化において重要な役割を担っており，SO_3^{2-} から S^{2-} を生成する6電子還元反応を触媒する．また，補欠分子族として siroheme と [4Fe-4S] クラスタを備えている．高等植物の SiR は，フェレドキシン(Fd)を電子供与体とし，単一ポリペプチドで構成されている．また，細胞質で前駆体として合成された後，葉緑体ストロマに局在化している．

SiR の反応機構の解析のために，先ず，大量精製を目的として大腸菌での発現を試みた．既に cDNA をクローニングしてあるトウモロコシ SiR は，成熟型酵素のN末端が不明なので，シグナル配列を持たない細菌の酵素のN末端に相当する領域から翻訳される construct を作製し，trc プロモーター下に繋いだ．

IPTG 誘導によって，トウモロコシ由来の成熟型酵素と同サイズ（分子量 65,000）の蛋白質が産生され，SiR 活性がみられた．SiR の発現量が siroheme の供給量に制限されているという大腸菌での知見を基に，大腸菌の siroheme synthase をコードする *cysG* を共発現させることにより，培養時の菌体密度の低下が回復し，菌体量当りの SiR 活性に有意な増強がみられた．この組み換え酵素の Fd に対する Km，および比活性は，トウモロコシ由来酵素との間に差異はみられなかった．

現在，この酵素の基質特異性を決めている構造を明らかにするために，NADPH を電子供与体とする大腸菌 SiR とのキメラ蛋白質を種々作製し，Fd 結合部位の探索を行っている．

2pG08

植物のAPS スルホトランスフェラーゼの新規活性測定法

荒　武、関谷次郎（京都大・農・農化）

高等植物の硫酸同化経路のAPSスルホトランスフェラーゼはチオール基を含む担体にAPSのスルフォ基を転移させる酵素であり、システインやストレスなどによってその活性が調節されていると報告されている。しかし高等植物からの本酵素の精製例はまだない。また現在APSスルホトランスフェラーゼの活性測定には基質として^{35}S-APSを用いる方法しかなく、^{35}S-APSの合成が繁雑であることおよび測定に時間がかかることなどの活性測定上の問題点があげられる。

APSスルホトランスフェラーゼは、DTTを担体として用いた場合遊離亜硫酸イオンを生成するので、この亜硫酸イオンを定量することにした。亜硫酸イオン量は、酵母から部分精製したNADPH依存性亜硫酸還元酵素とキャベツから部分精製したシステイン合成酵素を共役させ、生成したシステインをニンヒドリン反応法で定量することにより求めた。両酵素と0.5 M Na_2SO_4、0.1 M $NaCO_3$、30 mM DTT、4 mM OAS、1 mM NADPHを含む反応液（pH 8.0, 1 ml）を用いて5-300 nmolの亜硫酸イオンを定量することが可能となった。この系に酵素抽出液とAPSを加えることにより、APSスルホトランスフェラーゼ活性を検出することができた。また数種の植物について本法を用いてAPS スルホトランスフェラーゼ活性を測定をしたところ、ほぼ文献で報告されている値を得ることができた。

APS, adenosine 5'-phosphosulfate; OAS, *O*-acetylserine

2pH01

光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides*の*puf* オペロンシス領域結合タンパク質(SPB)のクローニングと解析

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

紅色非イオウ細菌の*Rhodobacter sphaeroides*の*puf* オペロンは光化学反応中心のL鎖とM鎖、集光性バクテリオクロロフィルタンパク質複合体Iのα鎖とβ鎖等の遺伝子をコードしている。昨年度の年会において我々は、*puf* オペロンのシス領域に特異的に結合するタンパク質(SPB)の精製を報告した。

精製されたタンパク質のN末端配列を決定し、オリゴプローブを作製し*spb*遺伝子のクローニングを行なった。得られたクローンより*spb*遺伝子は360bpで、120アミノ酸をコードしていた。塩基配列のデータベースを用いた検索の結果、*spb*遺伝子と有意の相同性を有するものは認められなかった。アミノ酸の配列においては、動物の転写因子である*c-jun*のロイシンジッパーモチーフとの相同性が認められた。その相同性について現在解析中であり、その結果について報告する。また、*spb*遺伝子の様々な条件下での発現をノーザンブロッティングで解析中であり、併せて報告する予定である。

2pH02

葉緑体遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質因子の遺伝子クローニングとその解析

磯野協一[1]，小林裕和[1,2]，佐藤公行[1,3]（[1]基生研，[2]静岡県大・食品栄養科学，[3]岡山大・理・生物）

一般に，植物の葉緑体ゲノムにコードされている遺伝子には，原核生物のプロモーターに特有な -35 および -10 配列があり，また，イネおよびタバコなどの高等植物の葉緑体ゲノムには，大腸菌のRNAポリメラーゼのコア酵素を形成するα，β，およびβ' サブユニットの遺伝子に相同な配列がコードされていることが知られている．そのため，葉緑体中の転写機構は原核生物型であると考えられている．しかしながら，-35 および -10 配列に結合し，遺伝子特異的転写開始に必須なσ因子の遺伝子に相同な配列は葉緑体ゲノムにはコードされていない．したがって，σ 様因子遺伝子は核ゲノムにコードされていると考えられる．そこで，シロイヌナズナを材料としてσ 様因子をコードする遺伝子のクローニングを試みた．

緑葉由来粗葉緑体および根組織由来粗アミロプラスト抽出物を用い，タバコの *psbA* プロモーターに結合する因子があるかどうかをサウスウエスタン法により確認した．その結果，アミロプラスト抽出物から結合因子が検出された．つぎに，タバコ由来の *psbA* プロモーター領域をプローブとして，シロイヌナズナ根組織由来 cDNA ライブラリーの発現スクリーニングを行ったところ，約 3 キロ塩基対 (kb) のコード領域を有するクローンを得ることができた．その遺伝子産物はシロイヌナズ *rbcL* のプロモーターにも結合した．さらに，この cDNA の塩基配列と産物の DNA 結合特性を解析した．

2pH03

タバコ転写因子TGA1aはタバコ無細胞転写系において転写活性を増大させる

山口雄記、山崎健一（名古屋大学、農、分化遺伝）

我々は前々回の本学会においてタバコ無細胞転写系を確立したことを報告し、更に前回の本学会においてこの系がCaMV 35S プロモーターのシス要素(as-1) に応答し、その転写活性を増大させうるものであることを報告した。転写調節の分子機構を解明する上で、シス要素特異的、転写増幅因子特異的な試験管内転写系を利用した転写因子の生化学的機能同定は重要な段階である。

今回、我々はこの転写系においてタバコ転写因子TGA1a が、その特異的結合配列である as-1 要素を有するプロモーターからの転写活性に及ぼす効果について検討した。小麦ヒストンＨ３遺伝子の最小プロモーター上流に２コピーの野生型又は変異型シス要素を連結した合成プロモーターをGフリー配列上流に組み込んだプラスミドを転写鋳型として TGA1a 存在下、非存在下において転写反応を行った。その結果、野生型 as-1 要素をもつ転写鋳型においてのみ TGA1a の添加によって転写活性の増大が観察された。我々はすでに TGA1a がコムギ胚芽「転写系」、ヒト転写系において転写増幅因子として働くことを報告している。今回観察された TGA1a による活性化機構の解析を進め、以前の報告と比較し、考察する。

2pH04

組み換えタバコ TATA ボックス結合蛋白質(TBP)の試験管内における機能の解析

岩滝暢子、山口雄記、山崎健一（名古屋大学・農・分化遺伝）

真核生物の転写装置に伝えられる様々な転写増幅信号が TFIID 複合体を経由しているという報告例が徐々に増え続けており、その中心分子である TBP の重要性も再認識されつつある。

昨年度までに、タバコの RNA ポリメラーゼ II による転写調節機構の分子レベルでの解明を目的として、TBP をコードするタバコの cDNA クローンを単離し、植物種間における構造的類似性について報告した。

この後、この cDNA を大腸菌発現ベクターに組み込み、TBP の大量生産を行い精製後、独自に開発したタバコ試験管内転写系に加えることにより、転写装置を再構成した。この再構成系では、TFIID 複合体は熱によって変性しており、TBP で置き換わっていると考えられるので、転写増幅信号の伝わり方の変化などについても検討中である。

2pH05

植物熱ショック蛋白質遺伝子の転写調節機構の解析

志水佐江、山口雄記、山崎健一（名古屋大学・農・分化遺伝）

アラビドプシスのHSPプロモーターをGUS遺伝子の上流にもつプラスミドをタバコ培養細胞(BY-２)へエレクトロポアレーション法により導入し、熱ショック後、24時間培養してＧＵＳ活性を測定した。その結果、40℃の時最も高いＧＵＳ活性が観察され、コントロールである28℃の時の約18倍であった。このことは、導入されたHSPプロモーターがBY-２細胞内で熱に応答して、その転写量が上昇することを示す。

BY-2から粗核抽出液を調製し、HSPプロモーターのDNA断片をプローブとしたモビリティーシフトアッセイを行った。その結果、DNA蛋白質複合体を確認した。この粗核抽出液を熱処理したところ熱に依存して、DNA蛋白質複合体量が増加した。このことは、熱処理によって、DNA結合蛋白質のDNA結合能が増加することを示す。このDNA結合蛋白質をHSEカラムで精製し、タバコ試験管内転写系に加えた時の、HSPプロモーターからの転写活性に与える影響について検討中である。

2pH06

シロイヌナズナのbHLH型転写因子のクローニング

浦尾剛、篠崎和子[1]、篠崎一雄
（理研・植物分子生物、１農水省・国際農研）

シロイヌナズナの乾燥誘導性遺伝子*rd22*のプロモーターの乾燥応答性領域には、MybとbHLH型転写因子の認識配列が存在している（昨年度の本年会で報告）。最近の研究によって、Mybは他の転写因子と協調的に標的遺伝子を活性化する例が示されていることから、MybとbHLH型転写因子が協調的に働いて*rd22*の発現を調節している可能性が考えられた。

そこで、我々はシロイヌナズナのbHLH型転写因子の遺伝子をクローニングするために、キンギョソウのbHLH型転写因子DELのcDNAをプローブとしてシロイヌナズナのゲノムライブラリーをスクリーニングしたところ、１種類の陽性クローンを単離することができた。塩基配列の解析から予測されるアミノ酸配列を比較すると、確かにトウモロコシやキンギョソウのbHLH型転写因子と相同性が見られた。RT PCR法により発現の器官特異性を調べたところ、主に花と種子で発現していることが分かった。また、ゲノムDNAのサザン解析の結果から、この遺伝子と相同な関連遺伝子は存在しないものと思われる。

2pH07

イネbZIPタンパク質遺伝子*Osbz8*のアブシジン酸による発現誘導はタンパク質合成を介さない

中川　仁、服部束穂　（三重大・遺伝子）

胚発達後期に特徴的に発現するLEA遺伝子群や、乾燥あるいは低温などのストレスに応答して発現する遺伝子の多くは、ABAを介してその発現誘導を受ける。これまでコムギの*Em*、あるいはイネの*Rab16*や*Osem*といったABA応答性遺伝子において同定されているABA応答性に関わるシスエレメント(ABRE)は、ACGTG配列を含み、GBFタイプのbZIP型タンパク質が結合することが予想されている。我々は、GBF型bZIPタンパク質の保存配列に対応するオリゴヌクレオチドをプローブに用いて多数のbZIP型タンパク質クローンを得、そこから実際にABREに作用するbZIP型タンパク質クローンを探し出す試みを進めている。現在のところ、成熟過程のイネ胚cDNAライブラリーより２つのクローンを得たのみであるが、その内の１つ*Osbz8*はABAにより誘導を受けるbZIP型タンパク質をコードしていることが分かった。*Osbz8*は成熟過程の胚に加えて、未処理の植物体の根、地上部、培養細胞中でも低いレベルで発現していたが、ABA処理によりどの組織、細胞でも強く誘導を受けた。培養細胞を用いた実験ではその発現誘導は、３０分より早く始まり、シクロヘキシミドによって阻害されなかったことからタンパク質合成を介していないものと思われる。一方、*Rab16*や*Osem*の発現はABAを与えてから３０分以降に始まり、その誘導はシクロヘキシミドによって、それぞれ９０%および　６０%阻害された。これらの結果は、*Osbz8*がABA誘導性遺伝子発現に関わる転写制御因子である可能性を強く示唆している。

2pH08

転写制御因子ＶＰ１による制御に関わるシス配列Sph box　の塩基配列要求性の解析

服部束穂，江崎香葉，寺田智子（三重大・遺伝子）

トウモロコシアントシアニン制御遺伝子*C1*の転写はアブシジン酸(ABA)により調節されている。この*C1*プロモーターのABAによる制御には転写制御因子VP1が関与する。これまで我々は、この*C1*プロモーターのABA/VP1による制御にはGT repeat (GTGTCGTGTC)とSph box (CATGCATG)と呼ぶ２つの隣合って存在する配列が重要であることを、培養細胞プロトプラストでのトランジエント発現系を用いた"loss-of-function"タイプの実験により示している。今回我々は、Sph boxの機能およびその塩基配列要求性を詳細に解析するために、"gain-of-function"タイプの実験を、上述のトランジエント発現系を用いて行った。すなわち、Sph boxの２回および４回繰り返し配列それぞれをCaMV35Sの"minimal promoter"につないだSph_4TATAおよびSph_2TATA融合プロモーターを作製し、VP1による活性化を調べた。その結果、Sph_4TATAおよびSph_2TATAは、VP1によって強く活性化されることがわかった。つぎに、Sph_2TATAについて２塩基置換の"scanning mutant series"を作製し、Sph boxの塩基配列要求性を明らかにした。これらの解析の結果は、Sph boxに特異的に結合する因子の同定とクローン化を行うに当たって、重要な知見となることが期待される。また、Sph boxは、他の多くの種子特異的プロモーターに保存されており、トランスジェニック植物を用いた解析から、その重要性が指摘されているが、本研究でその機能が培養細胞プロトプラストのトランジエント発現系で解析できるようになったことの意義は大きいと思われる。

2pH09

転写制御因子VP1の転写活性化ドメイン欠失変異体はドミナントネガティブ効果を示す

寺田智子、服部束穂（三重大・遺伝子）

VP1は、*Osem*など種子成熟期においてアブシジン酸(ABA)による調節を受ける遺伝子群の発現に関わる転写制御因子である。その発現は通常種子特異的であるが、我々はイネVP1遺伝子(*Osvp1*)の発現が、イネ懸濁培養細胞(Oc細胞)でも見られることを転写産物レベルおよびタンパク質レベルで確認している。また、イネＥｍ遺伝子(*Osem*)が、Oc細胞においてABAにより強く誘導を受けることも見いだしている。(OS)VP1は、DNAに直接結合せず、ABA応答性シス配列に特異的に結合する因子と相互作用することにより転写の活性化を引き起こすものと推定されている。この推定が正しいとすれば、OSVP1の転写活性化ドメインを欠失した変異タンパク質(OSVP1ΔAD)の過剰発現は、Oc細胞におけるABA誘導性遺伝子発現を抑制するものと予想される。そこで実際に、OSVP1ΔADの発現プラスミドを*Osem*プロモーター：GUS(Osem-GUS)融合レポーター遺伝子と同時にOc細胞プロトプラストにコトランスフェクトしたところ、Osem-GUSのABA誘導に対する顕著なドミナントネガティブ効果が認められた。次にOSVP1ΔADにさらに様々な欠失を加えることによりドミナントネガティブ効果を示すのに必要なOSVP1の領域を同定することを試みた。その結果、ドミナントネガティブ効果を示すためには、OSVP1のアミノ酸２２０から３８８の間の領域が重要であり、この領域がタンパク質ータンパク質相互作用に関与している可能性が示唆された。

2pI01

トマト 1- アミノシクロプロパン -1- カルボン酸合成酵素遺伝子とその特異的発現

川北一人、[1]Athanasios Theologis（名古屋大・農・植物病理、[1]Plant Gene Expression Center, USA）

エチレン生合成系の律速酵素である 1-アミノシクロプロパン -1- カルボン酸 (ACC) 合成酵素 (EC 4.1.1.14) の遺伝子は、トマトにおいては少なくとも 6 種から成る多重遺伝子族を形成していることが既に知られている。今回、新たに 3 種の遺伝子 *LE-ACS6*、*LE-ACS7*、*LE-ACS8* を PCR 法により単離した。合わせて 9 種のトマト ACC 合成酵素遺伝子のうち、*LE-ACS1A*、*3*、*5*、*6*、*7* の発現がインドール酢酸 (IAA) 処理したトマト実生において誘導された。嫌気性条件下では組織特異的に異なった発現が認められた。すなわちトマト実生において *LE-ACS2*、*3*、*5*、*7* が、トマト未熟果実において *LE-ACS2*、*3*、*5* が、トマト成熟果実において *LE-ACS1A* の発現がそれぞれ誘導されたのに対し、成熟果実において *LE-ACS4* の発現が抑制された。IAA 処理トマト実生における *LE-ACS3* の発現誘導は処理後 2 時間以内に認められ、IAA 濃度に依存した。さらに、オーキシン非感受性トマト変異株 (*dgt*) を用いた実験で、実生を IAA 処理しても ACC 合成酵素 mRNA の蓄積はみられず、このことに起因して *dgt* の一連の生理的・形態的変異が引き起こされるものと推定された。

2pI02

中性PR-5、OLP遺伝子の組織特異的発現はエチレン応答性とリンクしているか

北島サキト、佐藤文彦、山田康之（京大・農・農化）

病原菌感染に応答して植物はさまざまなPR (pathogenesis-related)タンパク質を生産する。タバコの中性PR-5であるオスモチン様タンパク質(OLP)は、健全葉ではストレスシグナル物質であるエチレンにより発現誘導を受ける一方、根あるいは培養細胞においては恒常的発現を示す。

OLPタンパク質のこのような組織特異的発現制御機構の解明を試みるためにタバコの祖先種である*Nicotiana sylvestris*のゲノムライブラリーよりOLP遺伝子を単離し、すでにOLP遺伝子プロモーター領域2.1kb::GUS融合遺伝子を*Agrobacterium tumefaciens*をもちいてタバコに導入し、このプロモーター領域にエチレン応答性、根および培養細胞における恒常的発現を制御するシス因子が存在することを明らかとした (94年度本大会)。本年度は根および培養細胞における発現がエチレンを介在するものであるかを明らかにするため、エチレン応答性シス因子と考えられた2つのAGCCGCC配列を部位突然変異により破壊した変異プロモーター::GUS融合遺伝子をタバコに導入し、得られた形質転換タバコの各組織におけるGUSの発現様式を解析した結果を報告する。

2pI03

四角豆のキチナーゼｃＤＮＡのクローニングとその遺伝子発現について

寺本貴則、江坂宗春（広島大・生物生産）

四角豆培養細胞の液体培養で、培養後期に大量に分泌されるタンパク質が認められた。Ｎ末端のアミノ酸配列を決定したところ、本タンパク質は植物のクラスⅢキチナーゼの一つであることが示唆された。

そこで、本タンパク質のｃＤＮＡクローニングを行った。得られた陽性クローンの塩基配列を決定した結果、本クローンは、２５残基からなるシグナルペプチドと２７３残基のアミノ酸をコードするクラスⅢの酸性キチナーゼ（ｐＩ＝４．０）クローンであることが判明した。

このクローンをプローブとして、ノーザンブロット解析を行った結果、四角豆の培養細胞では、培養後期に大量のｍＲＮＡが認められた。したがって、本キチナーゼは、細胞の老化ストレスによって誘導されることが示唆された。また、四角豆植物体での組織特異性について調べた結果、根組織に酸性キチナーゼｍＲＮＡが検出されたが、乾燥種子や葉および茎組織には本ｍＲＮＡはほとんど検出されなかった。さらに、本キチナーゼの抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果から、葉に傷害ストレスを与えるとキチナーゼタンパク質が増大することが示された。

2pI04

高等植物由来アスコルビン酸酸化酵素遺伝子の発現

加藤　直洋、　江坂　宗春　（広島大・生物生産）

アスコルビン酸酸化酵素はウリ科植物に高い活性を有している酵素である。我々は、ウリ科植物以外の植物として、初めてタバコ培養細胞ＢＹ－２よりアスコルビン酸酸化酵素cDNAをクローニングした。タバコ由来のアスコルビン酸酸化酵素の比活性はウリ科植物のそれよりも低いことが示唆された。

ノーザンブロット解析の結果、タバコ植物体（ＢＹ－４）の組織におけるアスコルビン酸酸化酵素遺伝子の発現は若葉で発現している他、根などの組織でも発現していることが示唆された。

カボチャアスコルビン酸酸化酵素ｃＤＮＡを３５Ｓプロモーターの下流につなげ、タバコ培養細胞ＢＹ－２ゲノムに導入したところ、カボチャ由来のアスコルビン酸酸化酵素が発現することが示され酵素活性も増大した。本cDNAを大腸菌に導入しアスコルビン酸酸化酵素発現について調べた。アスコルビン酸酸化酵素タンパクがウエスタンブロット解析により検出されたものの酵素活性は認められなかった。

2pI05

カボチャのカタラーゼｃＤＮＡのクローニングとその発現様式

山田尚子[1]、瀬戸口雄二[1]、北林雅夫[1]、江坂宗春[1]、槻木竜二[2]、西村幹夫[2]
（[1]広島大・生物生産、[2]基生研・細胞生物）

カボチャなどの脂肪性種子では、光照射に伴いミクロボディの機能変換（グリオキシゾームから緑葉ペルオキシゾームへ）が行われる。私たちはミクロボディ酵素の一つであるカタラーゼの３つのカボチャｃＤＮＡクローン（ｃａｔ－１，２，３）を得た。予想されるアミノ酸配列からＣＡＴ－２と３は９４％のホモロジーを示したが、ＣＡＴ－１と２およびＣＡＴ－１と３はそれぞれ７６％、７８％と低い値を示した。それぞれのクローンの３′非翻訳領域をプローブにしてノーザンブロットを行った結果、ＣＡＴ－１は吸水後急激にｍＲＮＡ量が増大し吸水２日目に最大となった。一方、ＣＡＴ－２，３は吸水後ほとんど変化が見られなかった。また、黄化子葉と光照射した緑化子葉のｍＲＮＡを比較した結果、ＣＡＴ－１では有意な差が見られなかったのに対し、ＣＡＴ－２，３では緑化子葉のｍＲＮＡ量の方が黄化子葉のｍＲＮＡ量より多かった。このことからＣＡＴ－２，３は光により誘導されることが示された。以上の発現様式からＣＡＴ－１はグリオキシゾーム型、ＣＡＴ－２，３は緑葉ペルオキシゾーム型のカタラーゼである可能性が示唆された。

2pI06

チャ*Camellia sinensis*の葉におけるCHSとPALのmRNAの応答

竹内敦子，松元哲，早津雅仁[1]（農水省・野菜茶試，[1]農水省・草地試）

チャ*Camellia sinensis*のカルコンシンターゼ（CHS）のmRNAが、光および糖に応答して葉で増加することを、昨年度の本学会年会で報告した。今回は、若い葉に光と糖を同時に与えるとCHS mRNAが相乗的に増加することに、注目した。糖に対する応答については、様々な糖を若い葉に与えて調べた。CHS mRNAは、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ショ糖、マルトースを与えた時、増加し、3-O-メチルグルコースと2-デオキシグルコースに対しては、ソルビトール、マンニトールと同様に、わずかしか増加しなかった。よって、糖に対する応答は、グルコースおよびフルクトース等の構造がシグナルとして働くのではなく、糖の増加による植物体内の変化が引き起こしたものと示唆される。一方、光に対する応答については、連続光下でのCHS mRNAの増加が見られたが、その増加は糖による増加よりも少なかった。光による増加のほとんどは、阻害実験の結果から、光合成によって産生された糖に対する応答ではないと示唆される。光による増加は、他の植物種と同じく、直接的な遺伝子発現誘導と考えている。以上のことより、光と糖によるCHS mRNAの相乗的な増加の原因は、光あるいは糖単独では起こらない代謝の変化か、遺伝子発現あるいはシグナル伝達の段階にあると想定している。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）についても、同様の解析を進めている。

2pI07

アントシアン合成の光制御ー特にPALプロモータのUV光による制御

○竹田淳子　吉田和市[1)]　小関良宏[2)]
（京大農化、京大理[1)]、東大教養[2)]）

我々は、岡崎の大型スペクトルグラフを用い反応ー光量曲線の解析から、ニンジン培養細胞のアントシアン合成が、合成系の鍵酵素であるPAL, CHS遺伝子のUV-B光受容体を介した活性化によりもたらされることを示してきた。今回は、この系にトランジェントアッセイ法を組み込むことにより、fast PAL (pal-10及びpal-54)のプロモータ解析を行った。PAL geneの5′上流プロモータ領域には、異なるUV光により特異的に促進される2つの領域(-395 ～-285; 280nmが最も有効及び-285 ～ -143; 260nmが最も有効に働く)が存在し、それぞれには、Hahlbrock らがパセリで示したUV-responsive elementsが含まれる。UV域の単色光を用いた本研究から、このUV-responsive elementsの一つがUV-B responsive elementであり、他がUV damage signalに関連するものと考えられる。-395より上流域に存在する促進効果についても言及する。

2pI08

バラのフラボノイド合成にかかわる酵素遺伝子のクローニング

田中良和、福知正子、福井祐子、Timothy A. Holton[1]、久住高章（サントリー基礎研究所，[1] Florigene）

バラ(*Rosa hybrida*)は、切り花としてはもっとも重要な植物種であり、その花弁に含まれるフラボノイドについては、詳しく調べられている。その合成経路を分子レベルで理解するために、品種カーディナルの花弁由来のcDNAライブラリーから、カルコンシンターゼ(CHS)、ジヒドロフラボノール 4-リダクターゼ(DFR)、フラボノールシンターゼ、アントシアニジンシンターゼ(ANS)のホモログをペチュニアのそれぞれ対応するcDNAを用いてクローニングした。

花弁の各発育段階のノザン解析から、これらの遺伝子は、花弁中のアントシアニンやフラボノールの合成と並行して発現しており、花弁が開き始める時期にもっとも強く発現していることがわかった。カーディナルでは、葉、トゲ、ガク、花柱、雄ズイなどにもアントシアニンが見られ、これらの組織でもCHS、DFR、ANSのmRNAの存在が確認できた。

また、ペチュニアのDFRがペラルゴニジンの前駆体であるジヒドロカンプフェロール(DHK)を還元できないために、天然のペチュニアにはペラルゴニジンがほとんど含まれない。バラのDFR cDNAをバイナリーベクターにクローニングし、DHKが蓄積しているペチュニアに導入したところ、花色が変化し、ペラルゴニジンを含むペチュニアを得ることができた。

2pI09

シロイヌナズナの新規P450遺伝子の単離と発現様式の解析

水谷　正治、太田　大策、Eric Ward[1]、佐藤　了
日本チバガイギー国際科学研究所
[1]Agricultural Biotechnology Research Unit, Ciba-Geigy Corp.USA

植物組織中には多数のシトクロムP450(P450)酵素が存在し、リグニン、フラボノイド、ステロール、ジベレリン等の二次代謝産物の生合成、及び植物による薬物の解毒に関与している。しかしながら、多くのP450は発現量が少なく酵素の精製が困難であるため、数例しかP450遺伝子は単離されていない。これまでに我々はmung beanから桂皮酸４水酸化酵素(P450C4H)を精製しそのcDNAをクローニングしている。　今回は、分子生物学的手法を用いシロイヌナズナから多数の新規P450遺伝子を単離し、その発現様式を解析した。

動物のP450においてよく保存されているヘム結合領域およびN末端付近のprolineクラスター領域のアミノ酸配列に対するオリゴDNAプライマーを用い、シロイヌナズナ幼苗由来のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行った結果、複数の異なるDNA断片が得られた。これらのDNA断片を用いてcDNAライブラリーをスクリーニングし、多数の新規P450のcDNAを得た。これらP450の生理的活性を明らかにする第一段階として、各器官（根、葉、花等）、光、傷害等による各P450の発現様式を解析したところ、各々のP450では発現様式が異なり、一部のP450では光による発現の誘導、傷害処理による誘導がみられた。

2pI10

イネ　アデニレートキナーゼ遺伝子の発現応答解析

川合真紀、内宮博文　（東大･分生研）

植物は光、温度、水、栄養条件等、常に変動する様々な環境条件の元での生育を余儀なくされている。我々は、環境ストレス下におけるアデニンヌクレオチド代謝を解析する目的で、ＡＴＰ+ＡＭＰ↔２ＡＤＰの反応を触媒するアデニレートキナーゼ（EC 2.7.4.3, 以後ＡＫと省略）に注目し、研究を進めている。ＡＫは生体内でＡＭＰをリン酸化してＡＤＰを生成し、アデニンヌクレオチドのバランスを維持する上で重要な酵素である。本研究では、イネ（*Oryza sativa* L.）のＡＫ遺伝子を用い、種々のストレス下での発現解析を行なった。その結果、冠水等の環境ストレス下でＡＫ活性が上昇する事を明かにした。動物等では、ＡＫの発現は生育条件に関わらず常に一定であると報告されており、イネにおけるＡＫの活性上昇は植物特有の現象として注目される。また、この研究ではさらに、ＡＫ遺伝子をセンス、アンチセンス方向に組み込んだトランスジェニックイネを作成し、ＡＫタンパク質の発現量と植物の生長に密接な関係の有ることを明らかにしたので報告する。

一般講演
第３日　３月30日（木）

一般講演

第3日　3月30日（木）　午前の部

A会場　電気生理・イオン輸送
B会場　成長調節物質（2）
C会場　光生物学
D会場　光合成（7）
E会場　植物・微生物相互作用
F会場　オルガネラ（3）
G会場　環境応答（4）
I会場　遺伝子発現（6）

3aA01

インゲンマメ葉枕細胞における光パルス誘導電位変化の作用スペクトル

西崎友一郎，[1]渡辺正勝，[1]久保田　守，[1]山宮公子（神戸学院大・人文，[1]基生研・大型スペクトログラフ室）

インゲンマメ(Phaseolus vulgaris L.)の葉枕は光照射により，葉が光の方に向くような膨圧運動をする。この光による膨圧調節に関与する光受容体を同定するために作用スペクトルの測定を試みた。

葉枕では光による細胞の膨圧減少に先立って必ず細胞膜電位の脱分極がみられるので，作用スペクトルを求めるのにこれを指標にした。特にパルス光を照射すると光量に応じて脱分極が量的に起こることを確かめているので，強度の異なるパルス光（30 s）照射による脱分極の大きさと各波長光のエネルギーの関係を求めた。単色光照射には岡崎国立共同機構・基礎生物学研究所の大型スペクトログラフをもちい，電位測定は葉枕を空気中に保ったまま行った。

300 nm から 730 nm の波長域（20 nm ごとの測定)の光のうち，520 nm 以上の長波長側の光による電位変化はほとんど見られなかった。つまり赤色光や近赤外光はほとんど影響がなかった。青色光領域では 460 nm を頂点に，より短波長側で 360 nm まで，長波長側で 520 nm まで下降するような形の作用スペクトルが得られた。そして短波長側で 380 nm と420 nm に小さなピークが認められた。　これらの特徴は植物にみられるいくつかの光反応系のうちのBlue type の作用スペクトルに一致する。

3aA02

シャジクモ節間細胞原形質膜においてステップ電圧変化時に流れる初期イオン電流

筒井泉雄[1]、大川和秋、野坂修一[2]（[1]岡崎生理研・生体膜、阪大・理・生物、[2]滋賀医大・麻酔科）

シャジクモ節間細胞原形質膜に電流固定法を適用し、電流刺激により細胞の興奮を観察する時、刺激直後に少なくとも次の３つの出来事がほぼ同時進行する。1.Ca^{2+}の膜からの遊離、2.起電性H$^+$ポンプのコンダクタンスの減少、3.K^+チャンネルの開口（1994年度年会報告）。これらの一連の出来事が膜の脱分極の初期過程であり、引き続きCa^{2+}チャンネル等の電位依存性のチャンネルの開口により、脱分極がさらに進み、この細胞の活動電位が誘発されると予想される(Plant Cell Physiol. 投稿中)。私達は細胞の興奮の主過程の前に起こる各過程の時間分離とイオン電流の成分を分離するための予備実験と測定器の改善とを進めている。

現在の測定器の応答は電圧固定の条件下で、ステップ電圧変化後、約1mS以降の電流の時間経過に対して信頼できる程度である。この測定器のもとで記録された電流は、1.膜にシリーズな抵抗が存在するために現れる容量電流（約2mSの時常数を持ち、定常電流は減衰する。この時常数から、シリーズ抵抗は1-1.5kohm･cm^2、膜コンダクタンスは150μS/cm^2、膜容量は2μF/cm^{2}の材料が多い）。2.約100mSのステップ電圧変化を膜に与えたとき、膜電位の-160mVより負側ではほぼ静止膜コンダクタンスを反映すると思われるイオン電流。3.膜電位の-80mV程度より正側で、ステップ電圧後約5-15mS後より、外向きに顕著に流れるイオン電流。4.容量電流を差し引いた時に分離される内向きの電流成分、の４種に大別出来る。

年会においては、前述の3.の電流成分についての報告をする予定である。現在、この電流の主成分をK^+と予想し、実験系の確立を進めている。この電流は薬剤効果としては10-20μMLa^{3+}、0.5-1mMBa^{2+}による抑制を受けることに特徴があり、TEAの1mM程度では抑制効果が明確でない。また、この電流成分は実験中に突如、特定の電圧においてその絶対量が変わることがあるが、その理由は現在不明である。

3aA03

シャジクモ類における後過分極の発生機構

新免輝男（姫路工大・理・生命）

植物における活動電位の発生機構はシャジクモ類において最も活発に研究されてきた。その結果、活動電位における脱分極には主としてカルシウムチャンネルとクロライドチャンネルの活性化が関与していることが明らかとなってきた。脱分極に続く再分極はこれらのチャンネルの不活性化によって起こる。また、ミルフラスモにおいては再分極にカリウムチャンネルの活性化が関与しており、活動電位の直後に膜電位が静止電位よりも一時的に負になる後過分極が発生する。起電性イオンポンプの活動によって静止電位がカリウムの平衡電位よりも負になると後過分極は見られなくなる。また、後過分極のピークにおいてはカリウムチャンネルの活性化のために膜抵抗が著しく小さくなる。

本研究において、カタシャジクモの活動電位発生時にカリウムチャンネルの活性化では説明できない後過分極が発生することを明らかにした。カタシャジクモの後過分極はミルフラスモの後過分極とは次のような点において著しく異なる。（１）静止電位が－２００ｍＶより負であっても後過分極が発生する。（２）後過分極のピークにおいて膜抵抗が増大する。これらのことより、カタシャジクモにおける後過分極は主として拡散チャンネルの不活性化によって発生するものと結論した。

3aA04

酸アエロゾルによる、木部側細胞膜電位および道管液カリウム濃度の変化

水野暁子、加藤　潔[1]　（日本福祉大・女子短大、[1]名古屋大・情報文化・自然情報）

ミトリササゲ下胚軸から切り取った軸片を道管灌流しながら、木部側細胞膜電位および道管溢出液のカリウム濃度を測定した。塩酸水溶液から発生させたアエロゾルを与えると、２～３分の内に木部側細胞膜電位は脱分極しはじめ、３０分から１時間の間に数十ｍＶに及ぶ脱分極が起こる。この脱分極は膜電位の受動的拡散電位成分の減少によって起こるものである。

一方、酸アエロゾルを与えると数分で道管溢出液のカリウム濃度が高くなる。なお、これらの反応は、器官表面のクチクラの有無に関わらず観察される。

以上の結果は、酸アエロゾルによる脱分極が細胞膜プロトンポンプを阻害することによるのでなく、細胞膜の受動的透過性を大きくすることによって起こることを示している。またその結果、細胞膜を通って道管へのカリウムの流失が引き起こされるものと考えられる。

3aA05

59Fe-エビハイドロキシムギネ酸を用いたオオムギにおける鉄の吸収と移行の動態

森敏，Bughio Naimatullah, 西澤直子，東京大学大学院農学生命科学研究科，113　文京区弥生1-1

Fe欠乏条件下で，イネ科植物がムギネ酸類を分泌することが発見された１９７２年以前までに行われた，イネ科植物におけるFeの吸収移行に関する実験の大部分は，Fe-EDTAかFe-citrateを投与して行われている．これらのFe-合成キレートは根圏で一度Feがムギネ酸類と配位子交換した後，Fe-ムギネ酸そのものとして吸収されることが現在明らかにされつつある（イネ科植物によるこの鉄吸収メカニズムを「Strategy-II」という）．このことはこれまでの実験で，短時間（例えば３０分以内）の吸収移行実験がうまく行かなかった真の理由が，吸収段階そのものが律速になっていたためであることを示している．したがって，これまでに得られているイネ科植物による鉄の吸収実験は，すべて再検討が必要である．本研究では「59Fe-エピハイドロキシムギネ酸」を用いて，鉄の吸収実験を様々な角度（植物の鉄栄養状態，植物の齢，光条件，投与部位，投与時期，阻害剤）から検討した結果，得られた新しい知見について報告する．

3aA06

ニチニチソウ培養細胞における無機リン酸取り込みに対する阻害剤及びヒ酸の影響

降旗　敬、直井由紀、桜井英博（早稲田大・教育・生物）

ニチニチソウ培養細胞におけるリン酸取り込みには、構成的に見られる低親和性成分(Km≒47μM)と、リン酸を追加して（最終濃度で1.25-2.5mM）培養した細胞（+Pi細胞）にはほとんど見られないがリン酸を含まない培地での培養（-Pi培養細胞）で誘導される高親和性成分(Km≒3.0μM)の２種類が存在する[1)]。

２種類のリン酸取り込み系は、共にFCCP（脱共役剤）、DES（細胞膜H^+-ATPase阻害剤）などによって強く阻害され、両性分が共にH^+との共輸送系であることが示唆された。

リン酸アナログとして知られるヒ酸に関しては、リン酸取り込み系の変化（異なるリン酸栄養条件下での生育、あるいは高親和性取り込み成分の遺伝的欠失など）によってヒ酸感受性が変化するという報告がある。そこで、われわれが見い出した２種類のリン酸取り込み成分について、ヒ酸による阻害効果に差が見られるかどうかについて調べた。細胞膜におけるリン酸取り込みは、ヒ酸によって競争阻害されると考えられ、予備的実験では、Dixon plotによる解析から、高親和性成分に対する見かけの*Ki*は約20-30μM程度と見積もられた。しかし、ヒ酸存在下でリン酸取り込みのタイムコースを詳しく調べたところ、高濃度（100　μM以上）のヒ酸存在下では、リン酸取り込み速度が５分以内に低下したので、*Ki*についてはさらに検討が必要である。速度の低下はヒ酸が細胞膜にかかるH^+勾配を下げることによる二次的影響だと考えられる。

1)Furihata *et al.*(1992) *Plant Cell Physiol.* 33, 1151-57

3aA07

海産ラフィド藻*Heterosigma akashiwo*細胞膜画分における ATP依存的Na^+輸送活性

庄野真理子、原諭吉[1]、和田雅人、藤伊正　（筑波大・生物、[1]東京医科歯科大・医・生化）

海産の単細胞鞭毛藻*H. akashiwo*細胞膜画分に、ATP依存的Na^+輸送活性が存在することを、リポゾーム内へのNa^+輸送を測定することにより確認したので報告する。

精製した細胞膜画分を sucrose monolaurate を用いて可溶化し、100mMのKCl存在下でphosphatidylcholineを用いてリポゾームに再構成した。^{22}Naのリポゾーム内への輸送活性は3mMの$MgCl_2$及び様々な濃度のNaCl、ATPを含んだ反応液中(pH7.0、30℃、3min)で測定を行った。その結果、輸送活性のNa^+に対する*km*値は約7mM、ATPに対する*km*値は約400μMであった。この輸送活性は、5μMのFCCPを加えても阻害されなかったが、200μMのバナジン酸により完全に阻害され、ATP依存的輸送であることが確認された。

同じ*H. akashiwo*の細胞膜画分には、バナジン酸により阻害されるがウワバインでは阻害されないNa^+-ATPaseの活性が存在しており、その活性のNa^+に対する*km*値は約3mM、ATPに対する*km*値は約800μMであった。このNa^+-ATPaseは、Na^+の存在下で140kDaのリン酸化反応中間体を形成し、K^+またはADPにより脱リン酸化されることからP-typeのATPaseであると考えられる。

このたび確認されたATPに依存的なNa^+の輸送活性とNa^+-ATPaseの活性は、ともに*H. akashiwo*の細胞膜画分に存在し、その生化学的性質が似ていることから、同じ分子による反応であり、動物のNa^+/K^+-ATPaseと同様に*H. akashiwo*の細胞からのNa^+の排出に拘わっている可能性を強く示唆している。

3aA08

酸性溶液による単細胞性緑藻ミカヅキモの伸張阻害

縄田　朋樹（東北大・医療技術短期大学部）

三日月状のこの細胞は，細胞分裂直後は極端な左右非対称の形であるが，分裂した面で伸張して再び三日月状の細胞にもどる。この伸張の進行は培養液の pH 7.5 を下げていくと，pH の低下に伴って阻害されていく。50％の伸張阻害（pH 7.5での伸張量の1/2）は約 pH 5 で見られた。一方，アルカリ性側の pH（pH 10.2まで）は伸張には何ら影響を与えなかった。

伸張阻害がおきる pH 6～4 の範囲でも，原形質流動の様子や細胞膜電位は pH 7.5 のものとほとんど変わりがなかった。これらとは対照的に，細胞の伸張領域に流れ込む内生イオン電流は pH の低下のある値で大きく増加した。（すでに pH 7.5 で生じている内生イオン電流は，そのかなりの部分が Ca^{2+} によって運ぶばれていることが分っている。）

膜結合ｶﾙｼｳﾑの分布を調べるために，蛍光色素 CTC（ｸﾛﾛﾃﾄﾗｻｲｸﾘﾝ）50 μMを加えた種々の pH 溶液で１５分間細胞を染色した。その結果，酸性溶液中で染色した細胞だけに，その伸張領域で特に強い蛍光，すなわち膜結合ｶﾙｼｳﾑ量の増加がおきていることが分った。酸性溶液でもあらかじめ Ca^{2+} を除去しておくと，強い蛍光は検出されなかった。また，中性～アルカリ性の pH 溶液中で染色した細胞では強い蛍光は検出されなかった。

これらのことから，酸性溶液でおきる細胞の伸張阻害には，おそらく伸張領域での Ca^{2+} のインフラックス増加と膜結合ｶﾙｼｳﾑ量の増加が関係していると考えられる。

3aA09

シャジクモの水チャンネル特性 II

田沢仁、浅井一視[1]、岩崎尚彦[1]（福井工大・応用理化学、[1]大阪医大・生物）

最近植物の細胞膜にも水チャンネルを構成すると思われるタンパク質が発見され、その水透過性は動物の水チャンネル同様Hg^{2+}によって顕著に阻害される(Kammerloher et al. 1994)。シャジクモの水透過性もHg^{2+}阻害を受ける(Wayne and Tazawa 1990)。Zn^{2+}も同様の阻害効果を持つ(Rygol et al. 1992)。われわれは1993年度の年会でZn^{2+}は水の内向き(Lpen)及び外向きの透過性(Lpex)を共に阻害し、膜の水透過に対する極性には影響しない事を報告した。今回はZn^{2+}の作用機作についての新しい事実と、イオン特に一価カチオンと水との相互作用の可能性について報告する。主としてオオシャジクモの節間細胞を用いた。

Zn^{2+}は外からは作用せず、細胞に入って細胞質側から作用する。即ちその作用に方向性がある。Zn^{2+}の阻害作用はCa^{2+}によって打ち消されない。このことはZn^{2+}の膜透過の通路はCa^{2+}とは異なる事を示唆する。膜興奮性を抑えるPb^{2+}は(Shimmen and Tazawa 1977)、水透過性に影響しない。一方高濃度のK^{+}(50 mM)は水透過性を20-30%増大させる。果たして水が一価イオンチャンネルを透過するのかどうかを検討した。

3aA10

汽水産車軸藻類シラタマモ節間細胞の低張処理に伴う膨圧調節の抗ドナリエラCDPK抗体による阻害

岡崎芳次, 湯浅高志[1]、武藤尚志[1]、岩崎尚彦（大阪医大・生物、[1]名古屋大学生物分子応答研究センター）

汽水産車軸藻類の一種シラタマモ(*Lamprothamnium succinctum*)の節間細胞の低張処理に伴う膨圧調節には、細胞質遊離Ca^{2+}濃度の増加を必要とする。本実験では、Ca^{2+}依存性タンパク質リン酸化酵素(CDPK)が膨圧調節に関係しているかどうかを、緑藻類の一種ドナリエラ（*Dunaliella tertiolecta*）のCDPKに対するウサギ抗血清を用いて検討した。抗CDPK抗体はCDPK活性を阻害することがDunaliellaでわかっているので（湯浅・武藤、投稿中）、これをシラタマモ細胞の細胞質に微量注入して低張処理に伴う膨圧調節に対する効果を調べた。低張処理は抗血清を注入して一晩細胞を培養した後行った。対照実験としてはpreimmune 血清を注入した。

抗CDPK血清を注入した細胞では、低張処理によって細胞質遊離Ca^{2+}濃度の増加を反映する細胞質流動の阻害は起きたが、膨圧調節はほぼ阻害された。対照の細胞では膨圧調節の阻害はほとんどみられなかった。Western blottingによってシラタマモ細胞には抗*Dunaliella* CDPK抗体と反応する53 KDaのタンパク質があり、同じ質量のタンパク質にCa^{2+}に依存しHiston H1をリン酸化する活性が検出された。

以上の結果はシラタマモ細胞にもCDPKが存在して低張処理に伴う膨圧調節に寄与している可能性を示唆した。

3aA11

ソラマメ葉気孔孔辺細胞における青色光依存のプロトンポンプ活性のABAによる阻害

高 暢孝[1]、木下俊則[2]、奥達雄[1]、島崎研一郎[2]（[1]九州大・農・農林生物物理、[2]九州大・理・生物）

ソラマメ葉のウラ側表皮から単離した孔辺細胞プロトプラストにおける青色光に依存するプロトン放出は、ABA添加により６５%阻害された。その阻害はABAを添加してからの時間が長いほど大きくなりABAの濃度に依存した。一方、１０μMのABAの濃度ではメディウムのpHをpH5.4から7.2まで変化させても、その阻害の大きさはほとんど同じであった。しかし、１μM以下のABAの濃度では阻害はpHに依存した。例えば、ABAの濃度が０.01μMの時、青色光依存のプロトン放出はpH5.4では約３０%阻害されたがpH7.2では阻害されなかった。そこで、種々の阻害条件でのABAHおよびABA^{-}の濃度を計算すると、ABAHが６nM存在するとABAによる阻害がほぼ飽和し、ABA^{-}の濃度には依存しなかった。原形質膜のプロトンポンプを活性化するカビ毒プシコクシン（１０μM）を添加すると孔辺細胞からプロトンが放出される。このとき、この活性はABAにより３０%阻害されていた。

以上の結果は、ABAは青色光に活性化されるプロトンポンプを阻害することにより気孔開孔阻害するとともに、気孔閉鎖を誘発すること、ABAによる阻害はABAHによる作用であることを示唆している。メディウム中のカルシウムの有無の条件での、ABAの効果、単離原形質膜のプロトンポンプに対するABAの作用についても報告する予定である。また、このようなABAによる青色光依存性プロトンポンプ活性の阻害はソラマメ葉のオモテ側表皮気孔孔辺細胞でもほぼ同様に観察された。

3aA12

青色光に依存する孔辺細胞からのプロトン放出のカフェイン、小胞体膜Ｃａ$^{2+}$-ＡＴＰａｓｅ阻害剤による阻害

島崎研一郎・高 暢孝[1]・奥　達雄[1]（九州大・理学部・生物、[1]九州大・農学部・農林生物物理）

気孔孔辺細胞プロトプラストからの青色光に依存するプロトン放出は気孔開孔の駆動力を与える。我々は、薬物を用いた研究からこの情報伝達系にＣａ$^{2+}$/カルモジュリン依存のミオシン軽鎖キナーゼ様の蛋白質が関与することを報告した。カルモジュリンが活性化されるには細胞質Ｃａ$^{2+}$の濃度上昇が必要であり、そのＣａ$^{2+}$の由来について調べた。プロトプラスト懸濁液のＣａ$^{2+}$濃度を低下させたり、プロトプラストを洗う事によりＣａ$^{2+}$を除いたり、あるいはカルシウムチャネルブロッカーを添加しても青色光依存のプロトン放出は阻害されなかった。また、外液にカルシウムイオノフォアを添加してもプロトン放出は誘導されなかった。しかし、細胞内のカルシウムストアーのＣａ$^{2+}$を枯渇させる作用のあるカフェイン、また小胞体膜Ｃａ$^{2+}$-ＡＴＰａｓｅの阻害剤であるシクロピアゾニック酸やブチルヒドロベンゾキノンは青色光に依存するプロトン放出を阻害した。この時、これらの薬剤はプロトンポンプそのものは阻害しなかった。以上の結果から、これらの薬物により細胞内カルシウムストアーのＣａ$^{2+}$が枯渇し、青色光依存のプロトン放出が阻害されたと推察された。

3aA13

ラン藻*Synechococcus* PCC7942 の硝酸イオン能動輸送系におけるNrtAの役割

前田真一、小俣達男（名古屋大･農 ･応用生物科学）

Synechococcus PCC7942 の硝酸イオン能動輸送体は、NrtA,B,C,Dの４種類のタンパク質から構成され、そのうちNrtB,C,DはABC型輸送体の膜貫通型タンパク質、ATP結合性タンパク質と類似性がある。NrtAは、N末端に疎水性のシグナルペプチド様配列を持つ親水性タンパク質であり、NO_3^-を窒素源として培養した細胞では主要な細胞膜タンパク質であるので、基質結合タンパク質として細胞膜の外表面で機能していると推定された。そこで、N末端の疎水性領域を削除したNrtAを大腸菌で発現させ、その基質結合活性を平衡透析法により測定したところ、NrtAはNO_3^-だけでなくNO_2^-とも結合することが示され、また、*nrtA*を欠いた変異株では、NO_3^-は取り込めず、NO_2^-の取り込みも著しく低下した。これらの結果は、NrtAはこの輸送系の基質（NO_3^-, NO_2^-）結合タンパク質であることを示唆している。

3aB01

カネフォラコーヒーの体細胞胚形成におけるエチレンの役割

畠中知子，東哲司[1]，内田直次[2]，安田武司[2]（姫工大・自然・環境研，[1]神戸大・自然科学，[2]神戸大・農）

カネフォラコーヒーの葉切片からの体細胞胚形成におけるエチレンの役割を検討した．葉切片からの体細胞胚形成は，植物成長調節物質としてサイトカイニンのみを含む培地で培養することにより得られる．この培養期間中，葉切片は常に少量のエチレンを発生しているが，このエチレンを吸着剤を用いて除去すると，サイトカイニンで誘導される体細胞胚数は減少した．エチレン作用の抑制剤（銀イオン），エチレン合成の抑制剤（コバルトイオン）を添加すると，体細胞胚形成が抑制された．エチレンガス処理（12 ul/l）によって体細胞胚形成数は増加し，またコバルトイオンの抑制効果をある程度まで打ち消すことができた．我々の結果は，コーヒーの葉切片培養においてエチレンが体細胞胚形成に関する重要な役割を担っていることを示している．

3aB02

メロン種子におけるエチレン生成について

岡学、加藤俊彦、石木康史、平林哲夫[1]、中川弘毅、佐藤隆英（千葉大・園芸、[1]日本園芸生産研）

メロン果実はクリマクテリック型の成熟を示す果実で未熟期に収穫しても適度の条件に置くと大量のエチレンの生成が起こり成熟する。メロンにおいて果実の成熟は中心部分（種子や胎座）からはじまることを昨年の本大会で報告した。本研究は果実の成熟に対する種子の影響を調べるために果実の成長に伴う種子でのエチレン生成について検討した。メロン果実の成長は受粉後、肥大期、種子の成長期、糖の蓄積期、成熟の順に起こる。果実を種子、胎座にわけ各々の組織におけるエチレン生成を測定した。種子の成熟期に種子よりエチレンの生成がみられた。In vivoにおける活性の測定やイムノブロッティングによりACCオキシダーゼが顕著に増加する事が分かった。種子におけるエチレン生成は種子の成熟に伴い減少するが果実の成熟に伴って再び増加した。このことは種子におけるエチレン生成が果実の成熟に関与すること示唆している。

3aB03

メロンのオーキシン誘導型1ーアミノシクロプロパンー1ーカルボン酸(ACC)合成酵素遺伝子のクローニング及びその解析

石木康史、山本光章、中川弘毅、佐藤隆英(千葉大・園芸)

オーキシンは、エチレン合成経路の律速酵素であるACC合成酵素の合成や活性を増進し、植物組織でのエチレン生合成に影響を与えている。本研究では、オーキシン処理を施したメロンの黄化芽生えから全RNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成し、ACC合成酵素の共通配列に基づいて作成された合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCRを用いて2種類のACC合成酵素のcDNA(pME-ACS2, 3)を単離した。

pME-ACS2は、ヤエナリより単離されたオーキシン誘導型ACC合成酵素遺伝子(VR-ACS1)とアミノ酸レベルにおいて非常に類似していた(74.6%)。 pME-ACS3は、西洋カボチャより単離されたオーキシンにより誘導されるACC合成酵素(CM-ACS2)と非常に類似していた (94.1%)。２つのACC合成酵素遺伝子はRNA ブロット解析によりメロン黄化芽生えにおいて、オーキシンにより誘導されると示唆された。

3aB04

ヤエベニシダレの当年枝におけるＩＡＡの分布

早乙女真紀、菊地原優子、橘和丘陽[1]、横山敏孝[2]、中村輝子（日本女子大・理、[1]島津製作所、[2]森林総研・多摩）

すでに、ヤエベニシダレ（*Prunus spachiana* (Lavallée ex H. Otto) Kitamura f. *spachiana* cv. *Plenorosea*）の２年生接ぎ木の当年枝を用いて、1,10 μg/芽のＩＡＡ処理は、枝の節間数、伸長および伸長方向への効果を示さないこと、また、数種類のサクラの成木の頂芽および幼植物の下胚軸におけるＩＡＡの存在を確認している。今回は、より広範囲の濃度のＩＡＡを用いて、枝の節間数、伸長および伸長方向への効果の再検討を行い、さらに、ヤエベニシダレの２年生、３年生接ぎ木の当年枝におけるＩＡＡの分布をHPLC, GC-MSを用いて調べた。0.01～1 μg／芽のＩＡＡ処理は、枝の節間数、伸長および伸長方向に効果を示さず、10 μg/芽の処理では伸長への抑制効果が認められた。また、伸長期間中の当年枝の頂芽、先端の伸長帯、中間部および基部におけるＩＡＡ量は、２年生、３年生ともに先端の伸長帯において最も多く認められた。その他の部位においては、頂芽から基部に向けての勾配が認められた。いずれの部位においても、３年生の方が２年生よりもＩＡＡ量が多いことが確認された。さらにオーキシン関連物質としてインドールエタノール（ＩＥｔ）の存在を確認した。

3aB05

シダレヤナギ、ザンセツシダレ（モモ）およびヤエベニシダレにおけるしだれ性の比較

中村輝子、早乙女真紀、古宇田京子、近藤彩子、原由里子、田中秀明[1]、横山敏孝[2]（日本女子大・理、[1]日本花の会、[2]森林総研・多摩）

すでに本大会において、ヤエベニシダレおよびザンセツシダレ（モモ）を用いて、しだれ性につき報告を行ってきた。今回はさらに、シダレヤナギを加え、これらの当年枝を用いて、その成長過程の分析、GA_3およびＩＡＡの効果、木部分化および細胞壁組成に関する観察、実験を行い、これらのしだれ性につき比較検討した。

いずれにおいても、しだれ性の枝の屈曲は、伸長帯における偏差成長によりひきおこされているのではなく、機械的固さの不足、すなわち支持組織における肥大成長の異常により生じている可能性が示された。サクラ属の両植物においては外生のGA_1およびGA_3が屈曲阻止を行ったが、シダレヤナギにおいては、ＩＡＡも単独で屈曲阻止を行った。また、サクラ属の両植物において、GA_1およびGA_3による木部分化、すなわち細胞壁の化学的、物理的性質およびあて材形成におよぼす効果は異なっていた。

3aB06

日本型イネ幼苗の伸長におけるエチレンとジベレリンの関係

古川浩二[1]，梁　泳烈[2]，神谷勇治[2]，桜井　成[1,3]，高橋信孝[2]（[1]埼玉大大学院●理工学研究科，理化学研究所●[2]国際フロンティア，[3]植物生活環制御）

イネ(*Oryza sativa* L.) 幼苗の内生ジベレリン（GA）をウニコナゾールにより抑制し，エチレンとGA_1を処理するとGA_1のみの処理よりも伸長が促進された。この結果から，エチレン存在下におけるイネ幼苗の伸長促進は，GAに対する反応性が上昇するため引き起こされると考えられた。また，エチレンにより伸長が促進されるにも拘わらず，伸長活性をもつGA_1の内生量の減少が認められた。

そこでエチレンがイネ幼苗中のGAの代謝および反応性にどのような影響を与えるかを調べた。GA_1の前駆体であるGA_{53}，GA_{44}，GA_{19}およびGA_{20}と不活化されたGAであるGA_8をウニコナゾール処理をしたイネ幼苗に点滴処理し，伸長に対する影響を調べた。４種のGA_1前駆体はGA_1と同様に伸長を促進し，エチレンの存在下において伸長はさらに促進された。しかし，GA_8では伸長促進は認められなかった。また，プロヘキサジオンによりGA_{20}からGA_1への代謝を阻害したところ，GA_{20}とエチレンを与えても伸長促進は認められなかった。これらの結果から，エチレン存在下においてもイネ幼苗中の活性型GAはGA_1であることが確認された。

今後，[^{14}C]または[^{3}H]標識のGAを用いて，エチレンのGA変換に対する影響を調べる予定である。

3aB07

THE ROLE OF GIBBERELLINS IN THE SUBMERGENCE RESPONSE OF *RUMEX PALUSTRIS*

Jan RIJNDERS, Young-Yell YANG[1], Gerard BARENDSE, Rens VOESENEK, Kees BLOM, Yuji KAMIYA[1]
Dept. Ecol., Nijmegen Univ., Nijmegen, The Netherlands,
[1] FRP, RIKEN, Wako, Saitama 351-01, Japan

Rumex palustris is a species of the cosmopolitan genus *Rumex* that occurs at the lowest elevation levels in the floodplains of the river Rhine in the Netherlands. Enhanced petiole elongation of *R. palustris* when sumerged in water was previously found to be mediated by a rise in endogenous ethylene levels. Both submergence and ethylene treatment may increase endogenous gibberellin (GA) levels in *R. palustris*. We therefore attemped to identify and quantify the endogenous GAs of *R. palustris* under submergence and ethylene treatment. The full scan GC-MS analysis of GAs in shoots indicated the presence of GA_1, GA_4, GA_{19}, GA_{20}, and GA_{53}. Quantification of endogenous GA levels in petiole tissue 24 h after drained, submerged or high ethylene (5 ppm) treatment was performed with GC-SIM. A clear increase of physiologically active GAs, GA_1 and GA_4, was observed in *R. palustris* petioles upon both submergence and ethylene treatment compared with plants grown under drained conditions. These results show that ethylene production induced by submergence stimulates GA biosynthesis in petioles of *R. palustris*.

3aB08

Gibberellins and Pea Seed Development

Stephen M. Swain[1], John J. Ross[2], Yuji Kamiya[1] and James B. Reid[2]

[1] Plant Hormone Function, RIKEN, Wako-shi, Saitama 351-01, Tokyo, Japan. [2] Dept Plant Science, University of Tasmania, GPO Box 252C, Tasmania, Australia.

The gibberellin (GA) deficient mutations, *lh* and lh^i, have been used to investigate the role of the GAs in seed development of the garden pea (*Pisum sativum* L.). The *lh* and lh^i mutations reduce the activity of the GA biosynthesis enzyme, kaurene oxidase. Both mutants possess a dwarf phenotype due to a 90% reduction of endogenous GA_1 levels in developing shoots compared with wildtype (WT) plants. By contrast, the severity of the *lh* and lh^i mutations differs in developing seeds. Endogenous GA_1 and GA_3 levels in the embryo/endosperm of young seeds (a few days after fertilization) are reduced by 50% (*lh*) and 90% (lh^i). Seeds homozygous for lh^i do not grow as fast as WT seeds and are more likely to abort during development, due to altered embryo and/or endosperm development. Fertilizing lh^i plants with WT pollen dramatically increases GA_1 and GA_3 levels in the embryo/endosperm and restores normal seed development. The less severe *lh* mutation does not effect seed abortion, but may slightly reduce embryo growth. These results suggest that GAs play an important role early in pea seed development by regulating embryo growth.

3aB09

イネのカウレン合成酵素AのcDNAクローニング

山口信次郎[1,2]、神谷勇治[2]、Tai-ping Sun[3]、山根久和[4]、室伏旭[1]
([1]東京大・応用生命化学、[2]理研・フロンティア、[3]Duke大、[4]東京大・生物生産工学研究センター)

ジベレリン（GA）生合成の最初の重要なステップは、ゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）がコバリルピロリン酸（CPP）を経てカウレンへ変換される過程であり、それぞれカウレン合成酵素AおよびBにより触媒される。我々は、イネ（*Oryza sativa L.*）におけるGA生合成の制御機構研究の一環として、アラビドプシス（*Arabidopsis thaliana L.*）より得られているcDNAクローン（pGA1-29, Sun and Kamiya, *Plant Cell*, 1994）をプローブとしてイネのカウレン合成酵素AのcDNAクローニングを試みた。

pGA1-29のテルペンシクラーゼの保存領域を含む約0.5kbをプローブとして弱い条件でゲノムサザン解析を行ったところ、1コピーに相当するバンドが認められたので、同条件でイネの葯より調製したcDNA libraryをスクリーニングした。得られたクローン（pRKA-0、2.1kb）の塩基配列を部分的に決定したところ、アラビドプシスのpGA1-29と非常に高い相同性（アミノ酸配列で66%のidentity）が認められた。ノーザン解析の結果、約2.8kpのmRNAが検出されたことから、pRKA-0は5'側が欠けたクローンであると考えられたので、現在、より全長に近いcDNAクローンを得るべくスクリーニングを行っている。最終的には、*E.coli*で過剰発現を試み、GGPPからCPPへの変換活性を確認する予定である。

3aB10

カボチャ未熟種子からのカウレン合成酵素BのcDNAクローニング

斎藤臣雄[1,2]、山口信次郎[1,3]、安部　弘[2]、桜井　成[2]、室伏　旭[3]、高橋信孝[1,2]、神谷勇治[1]（[1]理研・フロンティア、[2]理研、[3]東大・農・応生）

演者らは、カボチャ未熟種子からカウレン合成酵素Bを精製し、その限定分解断片から5カ所の部分アミノ酸配列を決定した。この配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、カボチャ未熟種子のtotalRNAを鋳型にしたRNA-PCRを行った。特異的に増幅した471bpのcDNA断片をクローニングして塩基配列を調べたところ、プライマーの配列以外に前記のアミノ酸配列を含んでいたことから、目的のcDNA断片と判断した。これがコードするアミノ酸配列は、*Arabidopsis thaliana* のカウレン合成酵素Aと高い相同性を示し、他のテルペン環化酵素において保存されている共通配列も含んでいた。このcDNA断片をプローブとするカボチャ未熟種子mRNAのノーザン解析において、2.8kbの転写産物を検出した。現在、全鎖長cDNAのクローニングを試みている。

3aB11

オオムギ幼葉鞘の細胞壁に存在するインドールアセトアルデヒド酸化・還元活性

鶴崎健一、桜井直樹[1]（福山大・一般教育、[1]広島大・総科・自然環境）

矮性オオムギ突然変異（Uzu）の幼葉鞘中のIAA量の少ない原因を検討するために、IAA量を制御すると考えられるIAAの合成に関与する酵素の活性を正常系統と比較した。前年度年会にて1000×gで遠心した後の上清では、正常系統とUzuで活性に差が見られないことを報告した。今回は10000×gでの沈澱画分に注目して活性の比較を行った。播種後3日目の幼葉鞘を磨砕し、10000×gで遠心した後、沈澱を50mM Tris-HCl (pH 7.2)の緩衝液に懸濁したものを粗酵素標品とした。基質として、IAA合成の直前の前駆物質と考えられるインドールアセトアルデヒド（IAAld）を用いた。IAAldを酸化しIAAに変換する活性をはUzuで正常系統の約半分であったが、還元しインドールエタノール変換する活性は、Uzuで正常系統の約2倍にであった。したがって、10000×gで沈澱する細胞壁画分にIAAldを酸化、還元する酵素が存在することが分かった。また、この活性は加熱処理によって失活した。さらに界面活性剤（1% Nonidet P-40)、1M NaCl、50mM $MgCl_2$では可溶化することができなかった。したがって、この活性は細胞壁への細胞質などの混入によりものではなく、細胞壁にかなり強固に結合したものと考えられる。また、UzuのIAA合成活性が正常系統の約1/2であることから、UzuでIAA量の少ない原因は細胞壁に結合したIAAldを酸化する活性の阻害である可能性が示された。

3aB12

根圏微生物 Enterobacter cloacae においてL-トリプトファンはＩＡＡ生合成経路の前駆体である

古賀仁一郎，庄野邦彦[1]，足立堯[2]　（明治製菓［現：植物防御研］，[1]東大・教養・基礎科学，[2]明治製菓・生物科学研）

植物ホルモンであるインドール酢酸（ＩＡＡ）が前駆体としてL-トリプトファンから合成されているという説には疑問点が多い。我々は Enterobacter cloacae がインドールピルビン酸経路（L-トリプトファン→インドールピルビン酸→インドールアセトアルデヒド→ＩＡＡ）を経由してＩＡＡを生産し、その第２ステップである indolepyruvate decarboxylase が鍵酵素であることを明らかにした[1)]。そこで、E. cloacae においてL-トリプトファンがＩＡＡの生合成経路の前駆体であることを明らかにするために E. cloacae より L-tryptophan aminotransferase を精製し、その性質検討を行った。この酵素はα-ケトグルタル酸をアミノ受容体、グルタミン酸をアミノ供与体とし、可逆的にL-トリプトファンをインドールピルビン酸へ変換し、正方向の反応での L-トリプトファンに対するＫｍ値(3.3 mM)は逆方向の反応のインドールピルビン酸に対するＫｍ値(24μM)の138倍であった。in vitro の酵素反応では、精製された L-tryptophan aminotransferase と indolepyruvate decarboxylase により効率よく L-トリプトファンからインドールアセトアルデヒドへ変換され、L-tryptophan aminotransferase の活性を一定にしても、indolepyruvate decarboxylase の活性の上がる割合に従って L-トリプトファンからインドールアセトアルデヒドへの変換量も上昇した。以上の結果は L-トリプトファンがインドールピルビン酸経路の前駆体であり、L-tryptophan aminotransferaseがこの経路に関与していること、そしてこの酵素は indolepyruvate decarboxylase によって制御されていることを明らかに示している。

1) J. Koga, T. Adachi and H. Hidaka, Agric. Biol. Chem. 55, 701 (1991); J. Koga, T. Adachi and H. Hidaka, Mol. Gen. Genet. 226, 10 (1991); and J. Koga, T. Adachi and H. Hidaka, J. Biol. Chem. 267, 15823 (1992).

3aB13

シロイヌナズナの花形成とオーキシンの極性移動

上田純一、岡真理子、宮本健助、岡田清孝[1]、志村令郎[1,2]
（大阪府大・総合科学、[1]基生研・遺伝子、[2]京大・理）

野生型シロイヌナズナ種子を EMSで処理して得られた多くの突然変異体の中から、花茎の先端部に花がまったく形成されない、あるいはきわめて異常な花が形成される pinと呼ばれる突然変異体が分離された。演者らはこの pin突然変異体を用いて、植物の花形成と植物ホルモンとの関係を明らかにすることを目的として本研究を実施した。

pin 突然変異体の内生オーキシンレベルを調べた結果、野生型にくらべ、その含量の低下が認められた。また、pin 突然変異体様植物はオーキシンの作用阻害剤（PCIB）によっては誘導されないものの、オーキシン極性移動阻害剤（HFCA、NPA、TIBA）によって誘導された。事実、pin 突然変異体およびオーキシン極性移動阻害剤を用いて誘導された pin様植物の花茎におけるオーキシンの極性移動能は低かった。さらに、HFCAを用いた一連の移植実験から、花形成には発芽 5～12日目の芽生えにおいて、正常なオーキシン極性移動の存在が必要であることが明かとなった。しかしながら、pin 突然変異体および HFCA 誘導の pin様植物体に外生的にオーキシン（IAA, NAA, 2,4-D）あるいはサイトカイニンを添加しても、野生型への回復は認められなかった。

3aC01

シロイヌナズナの近赤外光過敏感突然変異体の単離

細野信也、倉田哲也、山本興太朗（北海道大・地球環境科学・環境分子生物）

光形態形成の光受容体フィトクロムは複数の分子種からなり、各分子種は種々の生理反応に対し役割分担をしていると考えられているが、そのシグナル伝達系は不明な点が多い。本研究では、フィトクロム遺伝子族の内phyA系のシグナル伝達機構を解析するために、近赤外光に対して過敏感反応を示す突然変異体の単離を試みた。

速中性子照射処理したＭ$_2$世代を、弱近赤外光下で７日間生育させ、野生型より下胚軸の伸長が抑制される個体をスクリーニングした。その結果、暗黒下、弱近赤外光下の両方で下胚軸伸長が野生型より抑制される２３個体が得られた。これらの変異体におけるアントシアニンの蓄積量を比較したところ、暗黒下では野生型と同様ほとんど蓄積が見られないが、近赤外光下では色素量が野生型より増大している変異体が９個体得られた。これら個体の下胚軸長について光強度依存性を、近赤外、赤、青色光に関して測定した結果、これら３種のどの光に対しても野生型より強い伸長抑制がすべての個体で見られた。アントシアニンの蓄積に対する過敏感反応の原因としては光シグナル伝達系におけるシグナルの増幅異常やフィトクロムの過剰発現などが考えられる。

3aC02

光による根の伸長制御反応

倉田　哲也、山本　興太朗　（北海道大・地球環境科学・環境分子生物）

根の光形態形成現象において屈光性や伸長成長に関する研究が行なわれてきている。トウモロコシでは光が根の伸長阻害を起こすことが知られている（Schwart and Schneider, 1985）。そこで、本研究ではシロイヌナズナにおける根の伸長成長に対する光の効果を調べた。

連続白色光下で育てたシロイヌナズナ芽生えでは、暗黒下と比較して下胚軸は伸長阻害が起こるのに対し、根では伸長促進が起こる。このことは、光の伸長成長に対する効果が地上部と根では異なることを示している。また、根の伸長促進に対して効果的な光は青色光と赤色光であった。次に、この伸長促進が光合成系による効果であるか否かを検討するために、カロチノイド生合成阻害剤ノルフルラゾンを培地に添加し、葉緑体生合成を抑えた状態で伸長を調べた。その結果、クロロフィル量が暗黒下レベルになるノルフルラゾン濃度で生育させた根はノルフルラゾンを与えないで育てた芽生えの根より短くなるものの白色光下の方が暗黒下より有意に長いことがわかった。このことから、根の伸長成長は光合成系以外の光化学系でも制御されていることが示唆された。次に、フィトクロム欠損変異体で根の伸長を調べたところ、ｐｈｙＢ欠損変異体では連続赤色光下での伸長促進はみられなかった。このことから、連続赤色光による根の伸長促進はＰＨＹＢにより制御されていると考えられる。

3aC03

シロイヌナズナ単離葉におけるクロロフィル減少に対する近赤外光と暗黒の影響

木立真敏，井上康則，榎並　勲[1]，塩井祐三[2]，（東理大・理工・応生，[1]東理大・理・生物，[2]東工大・生命理工）

従来、葉の老化の研究は暗黒で引き起こされる老化を中心に行われてきた。しかし、暗黒以外に近赤外光によっても老化が引き起こされ、自然環境における植物の老化を知る上で近赤外光の影響を調べることは重要である。本研究ではシロイヌナズナの単離葉を用いてクロロフィル減少に対する近赤外光と暗黒の影響を解析した。まず、クロロフィル減少に対する光の効果について調べた。赤色光は白色光と同様にクロロフィルの減少を抑制するが、近赤外光と暗黒は逆に誘導し、何れの場合も全クロロフィル量は4日後に1/2程度に減少する。Arnon (1949) の方法でクロロフィルa:bを調べると、白色光・赤色光・暗黒下では単離直後とほぼ同じ2.5を維持しているが、近赤外光下においては1.5に減少していた。クロロフィル減少の時間経過に関しても暗黒下では48時間以降に減少が観察されるのに対し、近赤外光下では24時間目ですでに観察される。次に各光条件でHPLCによりクロロフィルa,bを単離し、量比を直接比較した結果、近赤外光下で真にクロロフィルa:bが減少することが示され、クロロフィルa,b以外の分解産物と考えられる物質のピークパターンも近赤外光と暗黒で異なっていた。このことから暗黒と近赤外光下におけるクロロフィル減少機構が異なることが示唆された。現在、近赤外光の受容体について検討中である。

3aC04

光信号の伝達を促進するアラビドプシス突然変異体の単離

市川裕章、中村拓、長谷あきら[1]（農業生物資源研、[1]理研フロンティア）

植物の光形態形成の分子機構を解明していく上で、光形態形成の突然変異体を用いた分子遺伝学的アプローチは有効な研究手法のひとつである。光信号の伝達に関与する突然変異体としてはアラビドプシス由来の*hy5*、*det*、*cop*、トマトの*hp*などが挙げられる。この内HY5（*HY5*遺伝子産物）は光受容体からのシグナル伝達を促進あるいは増強する機能を有すると想定されているのに対し、HPでは光信号の伝達を抑制すると考えられている。従って植物細胞には光信号の伝達を抑制するタンパク質と促進するタンパク質が共存し、それらが直接または間接的に相互作用することにより、光環境に応じた光形態形成を示すと仮定される。本研究では始めにアラビドプシスにおいてもトマト*HP*遺伝子に相当する遺伝子、すなわち光信号の伝達を抑制する機能を有する遺伝子が存在するか否かを確かめるため、想定した遺伝子の機能が欠損した（光信号の伝達を促進する）突然変異体を単離することを試みた。EMS処理したアラビドプシスM2種子(約35,000粒；1,000 x 13 M1種子由来)をMS培地に播種し、低赤色光含量で青色光域を含まない黄色蛍光灯(National FL20S・Y-F)を連続照射(約40 μmol/m^2/sec)下で約8日間生育させ、胚軸の伸長が抑制される個体を選抜した。その結果34系統が第1次候補として選抜され、M3後代植物を再度黄色光下、あるいは赤色光下および暗黒下で生育させた。内2系統では、黄色および赤色光下で胚軸の伸長が強く抑制されるにも関わらず暗黒下では野生型と区別が付かず、既に報告されている*det*あるいは*cop*変異体とは明らかに異なっていた。これらの系統では黄色蛍光灯照射(50-55 μmol/m^2/sec)下でのアントシアニン含量も個体ベースで野生型の約2-3倍に上昇していた。またウエスタン解析等の結果、連続赤色光による茎の伸長制御に関与するPhyBタンパク質含量や分子量は、突然変異体と野生型の間で有意差がなかった。以上のことから、本突然変異体はフィトクロムからの信号伝達に関する変異を有することが示唆された。これら2系統の遺伝学的解析を現在実施中である。

3aC05

アラスカエンドウ、シロイヌナズナを用いた光信号伝達の解析

○浜田徹、田中紀史、野口貴文、蓮沼仰嗣（横浜市大・木原生研）

アラスカエンドウの暗発芽種子上胚軸第3節間を切り出し、赤色光(660nm)、0, 10, 50, 100 μmole/m^2/secで20秒間光照射を行った。フィトクロムの光可逆性を見る場合は赤色光(100 μmole/m^2/sec)20秒間照射後、近赤外光、0, 0.1, 0.2, 0.4 μmole/m^2/secで180秒間照射した。その後、粗膜分画、可溶性分画を調製した。水性二層分配法により、原形質膜分画を精製した。各分画に対して4×10^{-8}M[γ-^{32}P]ATPより0℃15秒のリン酸化を行った。それを一次元また二次元電気泳動により分画した。原形質膜分画および粗膜分画の15kDa蛋白質のリン酸化が赤色光により促進され、赤色光-近赤外光の連続照射ではそのリン酸化は抑制され、光可逆性を示した。二次元電気泳動でもこの結果は確認された。15kDa蛋白質は自己リン酸化活性を持ち、ラットのヌクレオシド2リン酸キナーゼ(NDPキナーゼ)の抗体と交叉した。同様にシロイヌナズナ野生株、hy2, hy4, hy5の暗所芽生え、上胚軸を用いて赤色光による15kDa蛋白質のリン酸化を粗膜分画および可溶性分画で調べた。野生株ではリン酸化の活性増加が3倍あるのに対して、hy2, hy4, hy5ではリン酸化は暗黒下のものと同程度であった。NDPキナーゼは自己リン酸化され、リン酸転移により蛋白質キナーゼとして作動する。光受容体はNDPキナーゼを抑制すると考えられる。

3aC06

Light-dependent growth of primary rhizoids in gametophytes of the fern *Dryopteris paleacea* Sw.

Stefan TURNWALD*, Robert SCHEUERLEIN* and Masaki FURUYA**
* Phillips-Universität Marburg, FB Biologie, Karl-von-Frisch- Straße, 35032 Marburg, Germany
** Advanced Research Laboratory, Hitachi Ltd., Hatoyama, Saitama 350-03, Japan

Phytochrome-mediated germination of spores of *Dryopteris paleacea* Sw. results in several developmental events, e.g. chlorophyll formation, mitosis, proliferation and emergence of the rhizoid [1,2]. Rhizoid elongation is another Pfr-mediated response which can be separated in time from the initial one [3].

After induction of rhizoid elongation with continuous red light (cR), the average length of the rhizoids will increase for approx. three more days, when irradiated with saturating far red pulse (FRp) and stored in darkness (D). A red pulse (Rp) applied immediately after FRp has a promoting, FR-reversible effect on the final length. In rhizoids which already stopped growth due to FRp and storage in D Rp reinduces elongation in FR-reversible manner. In addition fluence response characteristics of Rp are presented.

The obtained results are useful for the setup of the two-celled developmental stage of *Dryopteris* gametophytes as an experimental system to study phytochrome-initiated signal transduction, including cell to cell communication investigated with microbeam irradiation techniques.

[1] Furuya,M. (1983), Photomorphogenesis in Ferns, in Shropshire, W. and Mohr, H., Encyclopedia of Plant Physiology **16**: 569-600;
[2] Dürr, S. and Scheuerlein, R.(1990), Photochem. Photobiol. **52**: 73-82;
[3] Miller, J.H. and Miller, P. M. (1963), Plant and Cell Physiol. **4**: 65-72.

3aC07

微光束照射により誘導される葉緑体運動の解析

加川貴俊・和田正三[1]（理研・FRP・分子機構、[1]都立大・理・生物）

ホウライシダ前葉体を2日間暗条件下で培養すると、葉緑体は細胞を分かつ細胞壁に集まり、前葉体表面にはほとんど観察されなくなる。葉緑体が存在しない細胞表面の一部分に赤または青色光の微光束を1分間照射すると、その後の暗期に葉緑体は照射された場所に向かって移動する(Kagawa and Wada 1994)。この結果は照射された場所から葉緑体に向かって何らかの情報が伝達されていることを示唆している。そこで、本研究ではこの情報の物理的性質を調べるために、照射強度の異なる微光束（Φ10μm）で葉緑体運動を誘導し解析した。赤色光を照射した場合、18Jm^{-2}の光量では照射の中心位置から約20μm以内に位置する葉緑体は照射部位に向って移動した。光量の増加に伴い遠方の葉緑体も移動し、誘導可能な距離は1800Jm^{-2}で45μm程度であった。一方青色光は、60Jm^{-2}では葉緑体の運動をほとんど誘導しなかったが、1800Jm^{-2}の光量では35μm程度離れて位置する葉緑体が動き出した。赤・青色光ともに、照射した光量の違いは中心方向への葉緑体運動の速度にほとんど影響を与えず、約0.3 μm·min^{-1}であった。これらの結果から、光情報が変換して細胞内を伝達される情報の効果は照射した光量に応じて有効範囲が限られるが、動き出した葉緑体の移動速度は一定であることが示された。

Kagawa and Wada (1994) J Plant Research in press

3aC08

青色光によるフシナシミドロの側枝誘導と微小管の配向変化.

高橋文雄，菱沼佑，片岡博尚[1]（山形大・理・生物，[1]東北大．遺伝生態研セ）

黄緑色藻に属する管状ケノサイト，フシナシミドロ(*Vaucheria*)の側枝形成は青色光によって誘導される（Kataoka 1975）．細胞の一部を低強度の青色光で照射すると15分以内にそこに葉緑体が集まり，6-7時間後に照射域の中央から突起が生じ側枝となる．光強度が高くなると，葉緑体は離散し，側枝は明暗の境界付近から発生する．Blatt (1980, 1981) は照射域からのイオン電流の流出とアクチン繊維の細網化が葉緑体集合に先立つことを見つけ，Kicherer (1985) は照射域での電流の方向が照射2時間後内向きに転じ，電流流入が数時間以上持続することが側枝形成に必須であることを見いだした．　我々は，*V. terrestris* と *V. dichotoma*を材料として，Sonobe & Shibaoka (1989) の細胞骨格安定化処理法を応用して，青色光による側枝誘導における微小管の配向の変化を蛍光抗体法で観察することに成功した．細胞骨格を形成する微小管は軽く波打つ疎な長さ100-200 μmの束として細胞軸に平行に配向しているが，先端半球で収束し最先端には達しない．細胞基部の青色光照射域で微小管束は30-50 μmに細片化し，配向はランダムとなった．側枝発生後，微小管束は再び長く細胞軸に平行に伸びていた．分岐点において，主軸から分かれ側枝内へ側枝の細胞軸に平行に入り込んでいる微小管束が見られた．葉緑体運動と側枝誘導の全過程を通しての微小管束の動態を解析中である．

3aC09

ラン藻に存在する近紫外線増感化合物

野田哲治、柴田均、松井佳久[1]、尾添嘉久[1]、杉中克昭
落合英夫（島根大学・農・応用生物機能学、[1]生物資源化学）

ラン藻に、近紫外線照射（294-395 nm）すると、GroEL翻訳産物をはじめとする一連の近紫外線ショックタンパク質を生成する。この応答は H_2O_2 の添加でも起こるので、増感反応を介した活性酸素種の生成を示唆した。事実、単細胞性の *Synechococcus* PCC7942 と糸状性の *Phormidium lapideum* の intact cell、その抽出液、ゲル濾過でタンパク分離後の水溶性低分子画分に近紫外線を照射すると O_2^- が生成することを、Cyt·*C* の還元やヒドロキシアミンから亜硝酸イオンが生成する系で確認した。近紫外線照射下での O_2^- 生成能力でモニターしながら、調製用の TLC、HPLC によってこの化合物を精製した。約 1 kg の *P. lapideum* から 1 mg の標品を得た。この画分は、324 nm に吸収極大を持つので、S-324 と命名し、O_2^- 生成能も確認できた。

GC/MS と NMR 解析の結果、S-324 は分子量 164 のヘテロ環状化合物であることが判明した。その構造内には多くの二重結合と窒素を含んでおり、それにより、近紫外部での高い吸収（ε_{324}・8500 $M^{-1}cm^{-1}$）を持つと考察された 。

3aC10

ナスの芽生えでのフラボノイドによる紫外線ＤＮＡ損傷の防御

深沢利江子、東近由紀子、森　俊雄[1]、武田幸作（東京学芸大学・生物、[1]奈良医科大学・RI 中央実験室）

我々はこれまでに紫外線（>300 nm)を含む光で育てたナスの芽生えは、紫外線を含まない光の条件下で育てた芽生えに比較してフラボノイドを多く蓄積しており、紫外線に対して耐性を示すことを報告した。本研究では、ナスの芽生えにおけるフラボノイドの蓄積と紫外線（ＵＶ－Ｂ）照射によって生じるＤＮＡ損傷、即ち, Cyclobutane dimer （Ｃｄ）および 6-4 Photoproduct（6－4Ｐ）の形成量との関係を調べた。ＵＶ－Ａを含む光（＋ＵＶ）と含まない光（－ＵＶ）、14Ｌ－10Ｄで育てた芽生えの子葉で、＋ＵＶの子葉はフラボノイド蓄積量が多く紫外線耐性を示す。子葉に紫外線ＵＶ－Ｂを照射後直ちに凍結してＤＮＡを抽出し、ＤＮＡ中のＣｄおよび6－4Ｐをそれぞれのモノクローナル抗体で測定した。　ＵＶ－Ｂの照射により子葉にＣｄおよび6－4Ｐが検出されるようになり、そのレベルはＵＶ－Ｂ線量に比例して増加した。－ＵＶの子葉ではＣｄ、6－４Ｐともに＋ＵＶの子葉に比してレベルが高く、Ｃｄでは約4倍の値を示した。この結果は、フラボノイドが紫外線によるＤＮＡ損傷を防御していることを示している。

3aC11

ホウキモロコシにおけるUV-B-DNA損傷の回復

秦 恵，鈴木満博[1]，亀岡正[2]，七條千津子，田中修[1]，橋本徹[3]
（神戸大・理・生物，[1]甲南大・理・生物，[2]島根大・理・生物，[3]神戸女子大・家政）

ホウキモロコシ（*Sorghum bicolor*, Acme Broomcorn種）芽生えでは、UV-Bによりアントシアニン合成が誘導され、照射光量が大きくなると阻害される（橋本ら1991）。このアントシアニンの合成誘導には関与しないが、阻害にはピリミジンダイマーが関与していることをすでに報告している（植物学会 1994）。今回は、形成されたピリミジンダイマーの照射後の量的変動について報告する。

暗所で3日間生育させた芽生えにUV-Bを照射した後、暗黒下および青色光下に置き、DNAを抽出し、DNA中のシクロブタン型ピリミジンダイマー（CPD）および6-4光産物（6-4PP）の量をモノクローナル抗体を用いてELISA法で測定した。CPDも6-4PPも照射直後に最も多く、青色光下に置いたものでは半減期約0.5時間で減少したが、暗黒下でも約1時間の半減期で減少した。暗所におけるCPDの減少は温度の影響を受けることから、ホウキモロコシ芽生えでは光なしで作動するダイマー修復機構の存在が示唆される。

3aC12

ホウキモロコシのアントシアニン形成誘導－Pfr作用の増幅因子のUV-Aによる生成について

恩田 祥子、七條 千津子、橋本 徹[1]、（神戸大・理・生物、神戸女子大・家政[1]）

ホウキモロコシ暗黒芽生えは、100秒程度の赤色光(R)によってアントシアニンを形成する。この系で我々は、Pfrとは異なり、それ自体ではアントシアニンを形成しないが、その量に比例してPfrの作用を増幅する因子αの存在することを見い出した。そしてこの因子の生成にはPfrが関与することを昨年の本大会で報告した。今回は、UV-A光受容体も類似の増幅因子を生成する可能性を調べた実験結果を報告する。

増幅因子は因子誘導のため、異なる波長の光を照射し、これによって生ずるかもしれないPfrを遠赤色光によって打ち消した後、さらに一定光量のRによって一定量のPfrを与えて生成するアントシアニン量によって定量した。①増幅因子生成の作用スペクトルには660 nmの他に375 nmにもピークが認められた。②375 nmピークにはフィトクロムおよびUV-A光受容体の関与の可能性があるが、光量応答曲線は660 nm曲線のプラトーより高いレベルに達した。③フィトクロムによって誘導される増幅因子α生成を飽和するRを照射しながらUV-Aを与えた場合でも、UV-Aによる増幅因子はその光量に依存して増大した。④③と同様実験をUV-Aを含まない青色光で行ったが、その効果はUV-Aに比べてはるかに小さかった。これらの結果からPfr作用を増幅する因子はフィトクロムだけではなく、青色光・近紫外光受容体とは異なるUV-A光受容体によってもつくられると考えられる。

3aC13

赤色酵母 Rhodotorula minuta におけるカロテノイド生合成の光制御機構：細胞膜エルゴステロールの役割

山下澄子、荒見真一郎、秦恵、中馬誠、多田幹郎（岡山大学・農）

酵母 R. minuta におけるカロテノイド生合成光制御に関わる光受容体の検討過程で、細胞膜のエルゴステロール（Erg）が光分解を受けることを見い出した。本研究では、このErgの光分解について、波長及び光量依存性を調べると共に、光感応能（一定の照射光量当たりのカロテノイドの誘導合成量）を調べ、その結果を得た。

（1）カロテノイドの光誘導合成、細胞膜Ergの光分解、SDSミセル中のErgの光分解の3つの作用スペクトルは極めて近似している。

（2）酵母の光感応能は照射光量の増大に伴って低下し、その低下の光量依存性は、酵母細胞でのErgの光分解の光量依存性と類似のパターンを示す。

（3）光照射によって減少した酵母のErg含有量は、照射後の暗所培養によって比較的早く回復し、それに伴って光感応能も回復した。

以上のことから、赤色酵母 R. minuta におけるカロテノイド生合成の光制御に関わる光化学反応において、Ergは光受容体及び反応基質としての役割を果たしていると推察した。

3aD01

CLONING OF THE LIGHT-DEPENDENT PROTOCHLOROPHYLLIDE REDUCTASE FROM THE CYANOBACTERIUM *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803.

Jon Y. SUZUKI[1,2], Carl E. BAUER[1], [1]Dept. of Biology, Indiana University, Bloomington, IN 47405 USA. [2]Present address: Center for Gene Research, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-01.

The chlorophyll biosynthetic pathway of plants, algae and cyanobacteria consists of intermediates in common to the bacteriochlorophyll biosynthesis pathway of purple photosynthetic bacteria. Based on this observation, we attempted to clone chlorophyll biosynthesis genes by functional complementation of bacteriochlorophyll biosynthesis mutants of the purple, non-sulfur photosynthetic bacterium, *Rhodobacter capsulatus*. To this end, a genomic library of *Synechocystis* sp. PCC 6803 was constructed in a cosmid vector pPUFHC which contains a promoter for the high level expression of heterologous genes in *R. capsulatus*. A 1.5 kbp fragment of the *Synechocystis* genome was found to complement *R. capsulatus* mutants in *bchL*, *bchN*, and *bchB*, genes purported to encode subunits of the light-independent protochlorophyllide reductase. Sequencing of this clone revealed an open reading frame of 318 amino acids which had high amino acid identity (up to 56%) to the light-dependent protochlorophyllide of plants. This finding confirms earlier observations that the light-dependent protochlorophyllide reductase of plants like the light-independent enzyme is of prokaryotic origin[a,b].

a. Fujita, Y. *et al.* (1992) Plant Cell Physiol. 33:81-92.
b. Suzuki, J. Y. & Bauer, C. E. (1992) The Plant Cell 4:929-940.

3aD02

キュウリ NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (NPR) のcDNAクローニングと構造解析

黒田浩文、増田建、太田啓之、塩井祐三、高宮建一郎（東工大・生命理工・生体機構）

NPRは、クロロフィル合成系のプロトクロロフィリドからクロロフィリドへの変換を触媒する。我々は、キュウリを材料にしてNPRの解析を行っている。今回は、NPR・cDNAの完全な構造遺伝子を含む全塩基配列を決定し、その構造解析を行った。塩基配列の解析結果から、このcDNAクローンは1,423 bpの塩基からなり、40 bpの5'非翻訳領域、1,194 bpの翻訳領域および189 bpの3'非翻訳領域を含むことが判明した。翻訳領域は398残基のアミノ酸をコードしており、推定される分子量は43,073 Daであった。アミノ酸レベルで、アラビドプシス、エンドウおよびオオムギのNPRとそれぞれ81%、83%、73%と高い相同性を有しており、NPRの機能に必要であると報告されている４つのシステイン残基も他の植物と同様の位置に保存されていた。また、N末端から64残基までトランジットペプチドと推定される配列が確認された。また、ノーザンハイブリダイゼーションにより、生育段階を追ったmRNAの発現量について解析を行った結果、暗所および明所のどちらで生育させた場合でもその量は３日目まで増加し、その後減少した。この結果から、NPR遺伝子の発現は、光だけでなく生育段階によっても制御されていることが示唆された。現在、生育段階および光条件の違いによる発現量の変化について詳しく解析しており、その結果についても報告する。

3aD03

キュウリ・フェロキラターゼの大腸菌での発現とその解析

鈴木琢雄，増田建，井口八郎[1]，太田啓之，塩井祐三，高宮建一郎（東工大・生命理工・生体機構，[1]京大・理・生物物理）

フェロキラターゼはプロトポルフィリンⅨにFe^{2+}を配位し，ヘムを合成する反応を触媒する．高等植物におけるフェロキラターゼは，まだ精製されておらず，その詳細な酵素学的性質や細胞内局在性については解明されていない．*E. coli* フェロキラターゼ欠損株との機能的相補性により，キュウリ・フェロキラターゼcDNAが単離された (*Plant Physiol.* 105: 769-770)．我々は，このcDNAを用いて，キュウリ・フェロキラターゼの大腸菌での機能的発現を行ったので今回報告する．

cDNAのトランジットペプチドを除いた成熟蛋白質領域をPCRで増幅し，1.2 kbpのDNA断片を得た．この断片を，Glutathione S-transferase（GST）との融合蛋白質発現ベクターであるpGEX-2Tに組み込み，酵素の大量発現を試みた．DNA断片を挿入したベクターの塩基配列を決定した結果，フェロキラターゼの成熟蛋白質領域がin-frameに組み込まれたことが確認された．IPTGにより誘導をかけ蛋白質を発現させたところ，62 kDaの蛋白質の発現が認められた．トロンビンによりGST領域を切断した蛋白質は約40 kDaであった．この蛋白質はフェロキラターゼ活性を有していたため，遺伝子が機能的に発現していることが示唆された．活性発現の温度による効果について検討したところ，低温（20℃）での培養が有効であった．また，活性は融合蛋白質の状態で認められたが，トロンビン切断によっても変化が認められなかったことから，N-末端側のGSTの付加はフェロキラターゼの活性に影響を与えないと推測された．現在，得られた蛋白質に対する抗体を用いて細胞内局在性を検討中である．

3aD04

クロロフィリドのフェオフォルビドへの変換反応：Ｍｇ－脱離物質の存在とその反応様式

塩井　祐三，富田　紀彦，土屋　徹，高宮　建一郎（東工大・生命理工・生体機構）

我々は先にシロザ（*Chenopodium album*）の抽出液には強いクロロフィル分解活性が存在すること，最終産物としてピロフェオフォルビドが蓄積し，その分解過程はクロロフィル*a*－クロロフィリド*a*－フェオフォルビド*a*－ピロフェオフォルビド*a*の順序で酵素的に変換されることを^{14}Ｃ－クロロフィル*a*を用いて示した．

本講演ではクロロフィリドからＭｇを脱離する活性を持った物質がシロザのアセトンパウダー抽出液に存在することを発見したので，その反応の性質について報告する．

フェオフォルビドの生成は分光的あるいはＯＤＳを用いたＨＰＬＣによって測定した．

Ｍｇ－脱離活性は分画分子量５０００のフィルターのろ液に約９４％の活性が回収されることから低分子の物質であることがわかった．さらに活性は粗抽出液中では熱失活を起こしたが，ろ液では熱安定であった．至適ｐＨは７．０．クロロフィリド*a*，*b*，バクテリオクロロフィリド*a*は基質となるが，クロロフィル*a*，*b*，プロトクロロフィリド*a*，Ｍｇ－プロトポルフィリンは基質とならなかった．

3aD05

Mgキラターゼのサブユニットをコードするダイズ *mchI* および *mchH* 遺伝子の解析

中山雅人、増田建、佐藤直樹[1]、山形裕士[2]、Chris Bowler[3]、Nam-Hai Chua[3]、太田啓之、塩井祐三、高宮建一郎（東工大・生命理工・生体機構、[1]東京学芸大・物質生命科学、[2]神戸大学・農、[3]Rockefeller Univ.）

クロロフィル合成の第一段階は、ポルフィリン環へのＭｇの配位であり、Mgキラターゼにより触媒される反応である。Mgキラターゼについては、その生化学的な性質はほとんど解明されていないが、光合成細菌の色素突然変異体の解析により *bchI* および *bchH* 遺伝子産物がそれぞれサブユニットとして機能していることが示唆されている。我々は、高等植物におけるMgキラターゼのサブユニット構成およびその生化学的機能の解明を目的として、光合成細菌の *bchI*, *bchH* の相同遺伝子の単離を行い、それぞれ、*mchI*, *mchH* と名付けた。今回は、*mchI* の遺伝子構造について主に報告する。*Arabidopsis* の *cs*（*bchI*）遺伝子をプローブとして、ダイズcDNAライブラリーより1.9 Kbpの *mchI* cDNAを得た。このcDNAは約45 KDaのタンパク質をコードしており、*Arabidopsis* のアミノ酸配列と約80％の高い相同性を有していた。また、N末端にトランジットペプチドと想定される配列が認められた。*Anabaena* のBchI抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行った結果、クロスリアクトする約41 KDaのバンドがダイズの葉緑体画分に認められた。これより、この配列は葉緑体へのソーティングシグナルであることが示唆された。また、*mchI* および *mchH* 遺伝子の発現をノザンブロット解析で調べたところ、光による誘導が認められた。今後、これらの遺伝子の解析により、Mgキラターゼのサブユニットとしての機能を解明できるものと期待される。

3aD06

フェオフォルビドをピロフェオフォルビドへ変換する新しい酵素の存在と性質

渡辺 賢司，高宮 建一郎，塩井 祐三
（東工大・生命理工・生命理学）

クロロフィルの分解経路には，フェオフォルビドからピロフェオフォルビドへの変換ステップが存在することが知られているが，その詳細な知見は得られていない．我々は，シロザ（*C. album*）のアセトンパウダー抽出液にフェオフォルビド変換活性が存在することを見いだし，その性質について調べたので報告する．

反応の測定はHPLCで行った．カラムはODS，溶出液はメタノール:2M 酢酸アンモニウム(95:5,v/v)，色素の検出は蛍光検出により行った(Ex. 410 nm; Em. 675 nm)．

フェオフォルビドと酵素溶液を30 ℃で反応させると，ピロフェオフォルビドと，保持時間が3.6分の未知の成分(以下，tR3.6と呼ぶ)が生成してくる．tR3.6はフェオフォルビドと同じ吸収スペクトルを示すが，その構造はまだ同定されていない．tR3.6は，非酵素的にピロフェオフォルビドに変換することから，フェオフォルビドがピロフェオフォルビドに変換される時の中間体と思われる．tR3.6生成の至適pHは7.5，フェオフォルビドaに対するK_Mは12.5 μMであった．tR3.6の生成はメタノールで阻害された．メタノールは反競争阻害剤として働いているものと思われる．

我々は便宜上，この酵素をフェオフォルビダーゼと呼び，精製を進めている．

3aD07

キュウリ子葉プラスチドにおける5-アミノレブリン酸合成酵素系のベンジルアデニンによる促進機構

増田建、太田啓之、塩井祐三、辻英夫[1]、高宮建一郎（東工大・生命理工・生体機構、[1]神戸女子大・一般教育生物）

我々はサイトカイニンの一種であるベンジルアデニン (BA) による、クロロフィル合成系の初発段階である5-アミノレブリン酸 (ALA) 合成系の促進機構について検討を行ってきた (*Plant Cell Physiol.* 35: 183-188)。今回は、ALA合成系を構成する3段階の各酵素活性に対するBAの効果について報告する。

BA処理した子葉より得たプラスチドのglutamyl-tRNA synthetase (GRS) 活性は、無処理のものに対し約2倍増加していた。しかし、RNase Aにより基質である内在性の$tRNA^{Glu}$を分解し、RNase inhibitorを処理後、新たに等量の$tRNA^{Glu}$を加えると、BA処理、無処理ともに全く同じ活性を示したことから、GRS活性の促進は、$tRNA^{Glu}$の増加によることが示唆された。次に、glutamyl-tRNA reductase (GTR) 活性について検討を行った結果、BAによる活性の上昇が認められた。ノザンブロットにより、BA処理によるGTR遺伝子産物の発現の増加が認められたため、GTR活性の上昇はBAによるGTR遺伝子の発現の増加によるものと考えられた。また第3段階を触媒するglutamate 1-semialdehyde aminotransferase活性は、BAに対して影響を受けなかった。以上の結果、BAによるALA合成系の促進は、その律速段階であるGTR活性の増加に主に依存していると考えられた。

3aD08

クロロフィルbからaへの変換に対するクロロフィルタンパク質合成の影響

伊藤寿、大塚達之、田中歩 （京都大・理・植）

クロロフィルタンパク質複合体のアポタンパク質は、クロロフィルと結合しないとチラコイド膜上で分解される。そのためアポタンパク質の蓄積はクロロフィルの供給によって部分的に調節されている。それに対して、アポタンパク質のクロロフィル合成に対する効果は不明である。一方、クロロフィルの合成はアミノレブリン酸より始まり、クロロフィライドがフィトールとエステル結合し、クロロフィルaが合成され、その一部がクロロフィルbに変換されることによって完成する。合成されたクロロフィルaとクロロフィルbは決められたアポタンパク質に取り込まれるが、クロロフィル合成の最終段階がアポタンパク質によって調節されているかは不明である。以前我々は、単離葉緑体においてクロロフィルbからクロロフィルaへの変換に成功した。そこで今回はこの反応がアポタンパク質によって調節されているかを調べたので報告する。アッセイ中のアポタンパク質合成の影響を調べるためタンパク質合成の阻害剤の存在下で、この変換活性を調べた。また。様々な緑化過程の組織から葉緑体を単離して、変換活性の変化を測定し、アポタンパク質の量との関係を調べた。その結果、クロロフィルbからクロロフィルaへの変換はアポタンパク質とは無関係に進行することが示された。

3aD09

クロロフィルアルコール側鎖の還元による植物の光耐性能の獲得

新家勝，津山孝人，北川恭浩，小林善親 （九大・農・林）

クロロフィルのアルコール側鎖の還元が植物機能にどのような影響を与えるかについて、側鎖の還元状態が異なるクロロフィルを蓄積するイネ突然変異株２種を用いて解析した。光合成活性は、側鎖としてゲラニルゲラニオール(GG)をもつ変異株とフィトール(P)をもつ野性株で大きな差はない。しかし、光ストレスに対する感受性に大きな違いがあり、側鎖の還元により植物は、光に対する耐性能を獲得する。この原因を明らかにするために、Ｐ７００、Q_Aの酸化還元状態、色素および坑酸化剤の定量を行った。変異株に光ストレスを与えると、Ｐ７００の活性の低下、ＱＡの過剰還元が起こり、最終的にクロロフィルの減少により枯死する。光ストレスにより坑酸化剤であるα-トコフェロールおよびβ-カロチン含量は、変異株において著しく低下する。しかし、アスコルビン酸量は、変異株、野性株で差はなかった。これらの結果をもとに、アルコール側鎖の還元と光耐性能との関係について考察する。

3aD10

Dunaliella salina LHC II のクロロフィルフォームとエネルギー転移

三宅　健，中山　克己，岡田　光正　（東邦大・理・生物分子）

緑藻と高等植物の光化学系 II 集光性色素タンパク質 (LHC II) のアポタンパク質は、高い相同性を示すが、色素組成は大きな多様性をもつ。緑藻ダナリエラの LHC II は、含まれるクロロフィルの分子数が他の LHC II の約半数であり、その色素組成は生育光の強度によって大きく変化することが知られている。そこで、この LHC II を精製し、色素組成、クロロフィルフォームの構成、エネルギー転移について調べた。

＜結果＞　チラコイド膜を0.8%ジギトニンで可溶化し、DEAE-Toyopearl, Superose 6, Resource Q による一連のカラムクロマトグラフィーによって LHC II を精製した。弱光で培養した標品は、Chl *a/b* 比が約1.8 とクロロフィル *b* を多く含み、28，26，23 kDa の３本のポリペプチドから構成されていた。吸収スペクトルの極大は673 nm で、３つのクロロフィル *a* 成分 (Ca 661, Ca 670, Ca 682) と、クロロフィル *b* 成分 (Cb 650) から構成されていた。蛍光スペクトルは、長波長側の成分 (Ca 682) から最も強い発光が観察された。

現在、色素組成やクロロフィルフォームについて高等植物や緑藻オオハネモの LHC II との比較を行っている。

3aD11

イネの葉の老化に伴うクロロフィル a/b 比の低下

山崎淳也，上村保麿，山崎武信，加藤栄（東邦大・理・生物）

葉の老化に伴い，クロロフィル a/b 比が低下することが古くから知られている．クロロフィル a/b 比の低下は，クロロフィル a のみを持つ反応中心複合体に対してLHC-Ⅱが相対的に増加することを示す．本研究ではこの現象の生理的意義を明らかにするため，葉齢の異なるイネの第3葉から第6葉を用い実験を行った．(1)老化に伴い，葉面積当たりの光合成活性とクロロフィル含量は減少し，クロロフィル a/b 比も3.7から3.0へ低下した．しかし，反応中心当たりの光合成活性は低下しなかった．(2)クロロフィル当たりのP-700含量および系Ⅰ電子伝達活性は低下しなかったが，系Ⅱ電子伝達活性，C550量およびチトクロムｆ量は葉齢の進行に伴い減少した．その結果，系Ⅱ/系Ⅰの比が減少した．(3)クロロフィル a/b 比の低下に伴い，系Ⅱ反応中心の中で大きなアンテナサイズを持つαセンターの割合が増加した．αセンターは電子伝達に関与するが，βセンターはプラストキノンプールを還元しないとされているので，これは，老化に伴い系Ⅱ/系Ⅰ比の減少するのに対し，相補的に，アンテナサイズが大きく，活性系Ⅱ反応中心の割合が増加することを示す．つまり，クロロフィル a/b 比の低下は，系Ⅱ/系Ⅰ比の減少により生じた電子伝達系のアンバランスを部分的に解消する補償的変化であると考えられる．

3aD12

クラミドモナスにおけるクロロフィルの退色と赤色色素の生成

土井道生、嶌紗穂美[1]、中村和郎[2]、岡山繁樹（九州大・理・生物、[1]大分短大・園芸、[2]レスブリッジ大・カナダ）

Nakamuraらにより分離された*Chlamydomonas reinhardtii*の光ーメチオニン感受性変異株のひとつＮＬ１０５株はクロロフィルｂを欠いている。この変異株は生育途中（対数期後期）に緑色が退色し、藻体が黄化する特徴を持つ。これは葉緑体中のクロロフィルａ含量の減少に対応しており、同時に培地中に数種類の水溶性の赤色色素の蓄積がみられる。これらの赤色色素は逆相クロマトグラフィーで分離精製され、主成分は535、385、275ｎｍに吸収極大、570、500、320ｎｍに肩を持つ吸収スペクトルを示す。これまで、(1) 赤色色素の培地中への排出はクロロフィルの退色の開始とともに始まる、(2) クロロフィルの退色開始の時期は培養液中の炭素源と窒素源の量に依存する、(3) クロロフィルの退色過程そのものには光は直接関与しない、(4) 野生株でも類似した色素の生成がみられることを明らかにしてきた。以上の結果と部分的に精製した色素標品の可視と赤外領域の吸収スペクトルの特徴、クロム酸酸化分解物の解析、クロロフィル生合成阻害剤を用いた生育実験からこの赤色色素は直鎖型テトラピロール構造を持つと推定された。現在、赤色色素の構造、生成経路とクロロフィル退色過程との関連性および生理的意義について検討中である。

3aD13

クロロフィル-ａ代謝産物：*IN VITRO*での蛍光クロロフィル代謝産物 (FCCs) の生成

足立　勝、中林健一[1]、下川敬之（宮崎大・農，[1]宮崎大・教育・化学）

エチレン誘導そして老化葉におけるクロロフィルの酸化開裂機構は、未解明のままである。これは主に*in vivo*と*in vitro*においてクロロフィル代謝産物の検出が困難なことによる。

エチレン処理したカイワレダイコン（*Raphanus sativus* L.)幼植物体の子葉よりクロロフィル-ａ代謝酵素を抽出し、この酵素反応における O_2^-の関与を研究した。この酵素は、クロロフィル-ａ代謝に H_2O_2 と 2,4-ジクロロフェノ-ル (2,4-DCP) を要求する。*In vitro*でのクロロフィル代謝産物を明らかにするため、三次元蛍光スペクトル解析技術により、反応生成物を追跡した。物質は固有の三次元蛍光スペクトルを示すので、そのため実験には、分光蛍光光度計（HITACHI:F-4500)を使用した。そのスペクトル測定では、H_2O_2/2,4-DCP存在下での、Chl-a酸化酵素反応に伴い、蛍光クロロフィル代謝産物(FCCs: Ex 350nm/Em 455nm)の蓄積が示された。この結果より、この反応系においてクロロフィルの酸化開裂が起きていることが示唆される。

3aE01

キュウリモザイクウイルス(Y系統)の増殖に関与する宿主因子に異常をきたしたアラビドプシス突然変異株の遺伝学的解析

吉井基泰, 石川雅之, 内藤哲
(北海道大学・農・分子生物学)

ウイルスの増殖には宿主由来の因子が関与していることが示唆されているが、その宿主因子に関する知見はほとんど得られていない。そこで我々は、代表的な植物RNAウイルスの1つであるキュウリモザイクウイルス(CMV)-Y株の増殖に関与する宿主因子を同定するために、遺伝学的解析の容易なアラビドプシスを宿主に用いてCMVの増殖効率の悪い突然変異株のスクリーニングを行った。

EMS突然変異誘起処理して得られたM_2植物約4500株の中から、野生株(Col-0)に比べてCMVのコート蛋白質が遅れて検出される変異株を、2株分離した。これら2つの突然変異株 (RB568, RB663) の遺伝学的解析の結果、生じた変異は異なる相補群に属し、それぞれ核ゲノム上の劣性1因子に支配されていることが明らかになった。これら突然変異株について、タバコモザイクウイルス(TMV)の増殖を調べた結果、TMV-Cg株の増殖には大きな影響を与えないことが分かった。

3aE02

稲由来新規ファイトアレキシン（ファイトカサン）の単離と構造決定

古賀仁一郎，志村勝，大島清美[1]，小川紀子，五味修一[2]，山内豊蔵，菊地美奈子，小笠原長宏
（植物防御システム研、[1]デンカ生研、[2]明治製菓・薬品総合研）

ファイトアレキシンは植物が病原菌に感染される時に生成される抗菌性防御物質の1つである。今までに稲から単離されているファイトアレキシンとしてはピマラン骨格を有するモミラクトンA・B、オリザレキシンA・B・C・D・E・S、フラバノン骨格を有するサクラネチンなどが知られられているが、どの種類のファイトアレキシンが病害抵抗性に大きく寄与しているがか明らかにされていない。

そこで、演者らは非親和性いもち病菌(*Pyricularia oryzae*, race 031)を感染させた時に抵抗性を示した稲の葉に生成されるファイトアレキシンの中から活性の強い物質を検索した結果、モミラクトンA・B、および4種の未知物質を分離した。この4種の未知物質はGC-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、IRによる分析の結果、カサン骨格を有する新規物質であることが明らかとなった。本発表においてはこれらの物質（ファイトカサン）の立体構造とその構造と抗菌活性との関係について報告する。

3aE03

新規ファイトアレキシン（ファイトカサン）の稲における分布及びいもち病感染の抑制

山内豊蔵，志村勝，古賀仁一郎，小川紀子，菊地美奈子，小笠原長宏（植物防御システム研）

演者らは稲の葉に非親和性いもち病菌(*Pyricularia oryzae*, race 031)を感染させた時に活性の強い新規ファイトアレキシン（ファイトカサン）が生成されることを見い出した。ファイトカサンはいもち病菌に感染したあらゆる稲の品種から分離されることから、稲における普遍的なファイトアレキシンであることが示唆された。また、その生成量は多く、いもち病菌胞子発芽阻害活性も強いことから稲において病害抵抗性に大きく寄与しているものと考えられる。いもち病菌の感染実験においては数ppmの投与により、いもち病菌の感染が抑制された。本発表においてはファイトカサンの性質検討といもち病菌感染防除効果について報告する。

3aE04

レクチン刺激によるファイトアレキシン誘導

豊田和弘、三木啓子、一瀬勇規、山田哲治、白石友紀（岡山大農）

植物細胞におけるエリシターの受容・認識機構を解析する目的で、4種のレクチン（PSA、PHA-P、PNA、Con A）のエンドウ上胚軸組織におけるファイトアレキシン(ピサチン)蓄積に対する作用を調べた。この結果、いずれのレクチンで処理してもピサチン蓄積が誘導された。しかし、Con Aによるピサチン蓄積はその認識糖　D(+)-mannose、methyl-α-D-mannoside、や methyl-α-D-glucoside で阻害されたが、他の3種のレクチンによる誘導はそれらの認識糖で阻害されなかった。そこで、Con Aの作用を詳細に調べたところ、Con A刺激によるピサチン蓄積はエンドウ植物の防御応答を阻害するバナジン酸（P型ATPase阻害剤）、ベラパミル（Ca^{2+} チャンネル阻害剤）、ネオマイシン（PI 代謝系阻害剤）およびエンドウ褐紋病菌 *Mycosphaerella pinodes* の生産するサプレッサーで阻害されることが明らかとなった。以上の結果は、エリシターの受容・認識機構の解析に Con A が有用であることを示している。

3aE05

エンドウ病害抵抗性とイオン変動について　天野政史、豊田和弘、一瀬勇規、山田哲治、白石友紀（岡山大・農）

エンドウ褐紋病菌の生産するエリシター（E）はエンドウ原形質膜に存在するPI代謝系を活性化し、動的抵抗性を誘導することが判っている。今回は、イオン変動と防御応答との関係を明らかにする目的で、エンドウのファイトアレキシンであるピサチンの生産を指標に、数種イオノフォアとイオンチャンネル阻害剤の影響を調べた。この結果、グラミシジンDとバリノマイシンはピサチン蓄積を抑制しなかったが、モネンシンとナイジェリシンは顕著に抑制することが判った。一方、E処理後15分にモネンシンを添加した場合には抑制効果が半減した。また、K^+チャンネル阻害剤のピサチン蓄積抑制効果は低かったが、Na^+チャンネル阻害剤は顕著に抑制した。そこで、エンドウ組織周辺におけるイオン変動を調べたところ、E処理後30秒以内にNa^+の一過的流出と流入が認められた。また、E処理によりK^+の流出とpHの一時的な低下と1分以降での上昇が認められたが、K^+の変動はNa^+の変動に比べて緩慢であった。これらのイオン変動はエンドウの防御応答を阻害するモネンシンやNa^+チャンネル阻害剤、さらにPI代謝系の阻害剤であるネオマイシンの共存下で顕著に抑制された。以上の結果を総合すると、Eによって誘起される防御応答には、イオン変動、特にNa^+変動が関与しているものと推察した。

3aE06

細胞壁画分ATPaseに対する褐紋病菌サプレッサーの種特異的作用（2）～部分精製ATPaseに対するサプレッサーの作用～

木場章範、豊田和弘、一瀬勇規、山田哲治、白石友紀（岡山大・農）

エンドウ褐紋病菌が生産するサプレッサー(S)はエンドウの防御応答を種特異的に阻害し、エンドウに感受性を誘導する。細胞壁画分を調製し、本画分のATPase（CW-ATPase）活性に対するSの効果を調べた結果、阻害は種特異的であることが判明した。今回は、エンドウとササゲの細胞壁からNaClでCW-ATPaseを可溶化し、本画分におけるATPase活性とこれに対するエリシター（E）とSの作用を解析した。11種の酵素を指標に本可溶化画分の純度を調べた結果、原形質膜の混入は3％以下であった。本画分のATPase活性はEで非特異的に上昇した。一方S処理によって、エンドウCW-ATPase活性は抑制され、ササゲでは逆に上昇することが判明した。すなわちSによるCW-ATPaseの阻害は種特異的であった。本可溶化画分を硫安塩析、限外ろ過後、陰イオン交換HPLCで分画した結果、それぞれの画分とも複数の活性ピークが認められた。部分精製CW-ATPase画分に対するSの効果を調べた結果、分画前と同様に特異性が認められた。以上の結果はCW-ATPaseの活性化や阻害、防御応答の誘導および抑制、また種特異性の間には深い関連があることを強く示唆している。

3aE07

エンドウ*PAL*遺伝子の発現制御機構

下拂孝治・尾崎美穂・村上泰弘・加藤久晴・一瀬勇規・白石友紀・山田哲治　（岡山大農）

フェニルプロパノイド合成経路の第一鍵酵素であるphenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) 遺伝子は、エンドウにおいては少なくとも3つのメンバーからなる小さな遺伝子ファミリーを形成しており、そのうちの2つのメンバー(*PSPAL1*,*PSPAL2*)は、植物病原菌の生産するエリシターにより発現が誘導されサプレッサーにより抑制される。これまでに*PSPAL1*,*PSPAL2*のプロモーター上流に存在するエリシター応答性シス領域の同定を*in vitro*の系において行ってきたが、今回はそれらの実験結果を更に裏付けるために形質転換植物における*PSPAL*のプロモーターの解析を行った。*PSPAL*のプロモーターにGUS遺伝子を連結させたキメラ遺伝子を導入した形質転換タバコでは、根で多量のGUS転写産物の蓄積が観察されたが茎では少量だった。この傾向は組織化学的観察においても見られた。また、本形質転換タバコに非病原菌を接種したところ、接種部位の周りにのみ一時的なGUSの発現が見られたが、病原菌を接種した場合では、病徴の拡大と共にその周辺細胞において高いGUS発現が見られた。以上のことからエンドウ*PSPAL*はタバコにおいても類似した発現調節を受けているものと考えられる。

3aE08

エリシターによるエンドウカルコン合成酵素遺伝子の転写制御機構

關 光，一瀬勇規，白石友紀，山田哲治(岡山大・農)

エンドウの防御応答遺伝子の一つであるカルコン合成酵素(CHS)遺伝子は、エンドウ褐紋病菌由来のエリシターによって転写が誘導される。この転写の制御機構を解明するために、エンドウのＣＨＳ遺伝子、*PSCHS1*についてプロモーターの転写制御領域とトランスに働く核内DNA結合タンパク質について解析した。その結果、*PSCHS1*のエリシターによる転写誘導には転写開始点の-242から+78の領域が必要であった。更に-242から-182の61塩基のDNA断片をCaMV35SのミニマルプロモーターとCAT-nosのキメラ遺伝子に連結させるとCATの発現が増高した。また、ゲルシフトアッセイによってこのDNA断片はエリシター処理エンドウ組織の核抽出物と移動度の遅い複合体(LMC)を形成した。しかしながらこの61塩基中に部位特異的な塩基置換を導入すると核抽出物とのLMC形成能は失われた。以上の結果は、61塩基のDNA断片は転写制御に重要であることを示している。

3aE09

エンドウFix⁻根粒におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの発現

岡田康志、菅沼教生、金山喜則[1]（愛知教育大・生命科学、[1]名古屋大・農）

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）は、マメ科植物の根粒において、バクテロイドの窒素固定反応に必要な炭素化合物を生成する、また、固定された窒素を同化するための炭素骨格を供給する役割を担っており、窒素固定反応と密接な関係にある。われわれはこれまでに、エンドウのFix⁻突然変異体E135に形成される根粒ではPEPCの活性が著しく低いことを明らかにした。このことは、根粒のPEPCの活性が窒素固定能によって制御されていることを示している。そこで、根粒におけるPEPCの発現調節機構を明らかにするために、E135根粒におけるPEPCの活性、酵素タンパク質量、遺伝子の発現を、植物の成長過程を通して検討した。

正常品種Sparkle の根粒では、PEPCの活性は窒素固定能の発現に伴い増加した。ところが、E135根粒では、PEPCの活性は2.5 週齢まではSparkle 根粒と同様に増加したが、その後急激に減少し、根と同じレベルに達した。次に、PEPCに対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、酵素タンパク質量を調べたところ、Sparkle 根粒では、PEPC活性の増加に伴いPEPCタンパク質量も増大した。一方、E135根粒では、PEPCタンパク質量はSparkle 根粒に比べ少なかったが、根よりも多かった。さらに、PEPCのアイソザイムを活性染色により検討したが、Sparkle 根粒、E135根粒、根のいずれも染色された位置は同じ移動度であった。PEPC遺伝子の発現は、ノーザンブロッティングによって解析を行っている。

3aE10

nod gene 発現産物に対する宿主植物の応答

山下広哲，阿部美紀子，内海俊樹，東　四郎（鹿児島大・理・生物）

根粒菌が宿主植物に感染する初期段階では，宿主植物の根圏分泌物中のフラボノイドにより根粒菌の *nod* gene の発現が誘導され，Nod metabolite(abb. NM)が生産される。この NM は，宿主植物根に作用し，特異的フラボノイドの分泌促進，根毛のカーリング(Hac)や変形(Had)，皮層細胞の細胞分裂の促進を引き起こす。*Rhyzobium. l.* bv. *vciae R. fredii, R. melilotii* および *Bradyrhyzobium japonicum* などでは既にその構造が報告されている。 本研究では，クローバ根粒菌の *nod* gene を 5,7,4'-trihydroxyflavone (apigenin, API)により誘導し，生産された NM(構造未解明)を分離した。それをクローバの芽生えに添加し，生ずる宿主植物の応答について観察を行った。その結果，誘導効果の判明している 7,4'-dihydroxyflavone(DHF)の場合と同様に API でも効果的 Hac, Had が誘導されることが明確になった。そこで菌の生産する NM の所在を明確にすべく API を誘導物質として クローン化した 4S株の *nod* genes を保有する III(pC4S8)株を培養し，培養液上清(supernatant, SUP)と，細胞より浸透圧ショック法で抽出した periplasma 分画(PEP)のそれぞれの n-BuOH 抽出物をクローバ芽生えに添加し Hac, Had についての詳しい観察を行った。その結果 Hac, Had は，その特徴から３つのタイプに分けられること，その中で顕著な Hac, Had を引き起こす物質は菌体の periplasma 分画の NM にのみ含まれることを確認した。さらに HPLC により NM 中の有効成分の分離，精製をすすめ，また Hac, Had のタイプと *nod* gene 発現とのかかわりについて解析した。

3aE11

クローバ根粒菌の染色体に組込んだ根粒形成遺伝子群の遺伝子発現

内海俊樹、阿部美紀子、東 四郎（鹿児島大・理・生物）

クローバ根粒菌の根粒形成遺伝子群（*nod* genes）は、Sym plasmidという巨大プラスミド上に存在する。一方、ダイズ根粒菌、熱帯産の根粒菌では *nod* genesは染色体上に存在している。本研究では、クローバ根粒菌の*nod* genesを染色体に組込み、その遺伝子発現について検討した。溶原性ファージの*attP*部位と *nod* genesを連結したプラスミドpCINod1を構築し、これを根粒形成欠損株であるH1株に導入したところ、根粒形成能を獲得したCNH1株を得た。CNH1株のサザン解析により、染色体に*nod* genesが組込まれていることを確認した。CNH1株の根粒形成過程の観察により、染色体に組込んだ*nod* genesが完全に機能したことが明かとなった。染色体への組込みに関するファージ遺伝子についても言及したい。

3aE12

ミヤコグサ*Lotus jaonicus* の根の細胞分裂に関与する生理活性物質

川口正代司、安楽温子、庄野邦彦（東京大・教養・生命）

ミヤコグサ*Lotus jaonicus* は、分子遺伝学的解析に好適とされる美しいマメ科植物である。われわれは、この植物を用いて、根粒菌との共生的窒素固定系における宿主側の因子の解明、及びマメ科植物特有の形態形成機構の解明を目指し研究を進めている。今までに、*Lotus jaonicus* における植物ホルモンの基礎的な応答機構の解析より、ジベレリンがの根の皮層細胞の分裂を促し、根瘤様構造を誘導すること、またこれらの根瘤様構造は１５mMのＫＮＯ$_3$の投与によって完全に抑えられる事を見いだしてきた（1994年植物学会発表）。今回は主にジベレリン合成阻害剤処理により誘導された実生における新奇な形態について発表する。ジベレリン合成阻害剤としてはウニコナゾールとアンシミドールを使用した。両阻害剤ともに３ｘ１０$^{-5}$Ｍの濃度処理で主根と下胚軸に瘤状構造が著しく誘導された。内部形態の観察より、これらの構造は非常に伸長生長の阻害された側根及び不定根であると判断された。しかしながら、ジベレリン生合成阻害剤処理で誘導されたこれらの構造は、外部からのジベレリンの投与によってはほとんど回復されず、３ｕＭのブラシノライドにより回復されることが見いだされた。これらの結果より、*Lotus jaonicus* の根における内鞘細胞の増殖とそれに続く側根及び不定根形成は、ブラシノライドの減少により誘導されるという可能性が示唆された。今回検出された根の細胞増殖に関する植物ホルモンの新たな応答機構は、今後の分子遺伝学的解析の一つの指標になるものと思われる。

3aE13

ナワシログミに共生する窒素固定菌フランキアの純粋分離

福本　勉・和田富吉[1]・吉田重方[1]・武藤直紀（旭化成工業㈱・ライフサイエンス総研、[1]名大・農）

環境保全問題が取り沙汰される中、木本植物の早期育成が望まれている。フランキア（*Frankia*）は非マメ科木本植物に共生して窒素固定を行うことが知られているが、マメ科作物に共生する根粒バクテリアに比べて研究が大きく遅れている。その理由として、フランキアの純粋分離の困難さがあげられる。今回、我々は緑化木として利用することを目的としてグミに着目し、ナワシログミ（*Elaeagnus pungens*）根粒よりフランキアを分離することを試みた。その結果、分離菌は次のような特徴を有していた。1）分岐した菌糸を持ち、ところどころに胞子を含有する胞子のうを有していた。2）ナワシログミに対する接種試験より根粒が着生した。3）着生根粒はアセチレン還元活性を有し、窒素固定能が認められた。以上より、分離菌を放線菌フランキアと同定できた。分離したフランキアを接種して根粒を着生したナワシログミは、無窒素Hoagland培地中においてもフランキア無接種区の植物体に比べて著しく良好な生育を示した。着生根粒の切片を光学顕微鏡で観察したところ、根粒細胞内のフランキアが観察された。我々はすでにハンノキ属植物（ヤシャブシ、ハンノキ）に共生するフランキアの分離にも成功しているが、これらの分離フランキアについては法面緑化、不毛地の緑化等への利用を目的とした開発研究を進めている。

3aF01

小胞体ーゴルジ体間輸送に必須な Sar1 GTPase (1)
ー酵母とシロイヌナズナ遺伝子の機能解析

中野明彦，齊藤知恵子（東大・院理系・植物）

SAR1 は，演者が約８年前に全く新しいタイプの低分子量 GTPase をコードする酵母遺伝子として発見したものであり，タンパク質の分泌経路において，小胞体からゴルジ体への小胞輸送に必須である．これまでに，無細胞輸送系や変異株を用いた詳細な解析を行い，その産物タンパク質（Sar1p）は GTP を結合した活性型の状態で小胞体からの輸送小胞の出芽・形成に働き，その後，輸送小胞の膜上で GTP を GDP に加水分解して自らは小胞体膜にリサイクルすることによって，ゴルジ体へのターゲティングを進めることを明らかにしてきた．また，Sar1p の活性を調節する因子である，GDP/GTP 交換因子 Sec12p，GTPase 活性化因子 Sec23p についても，その役割を詳しく解明することができた．現在，タンパク質の分泌経路に働く GTPase 群として，優に 100 を越えるメンバーが知られているが，その GTPase サイクルが小胞輸送で果たす役割の理解は，Sar1p において最も進んでいると言って過言ではない．

最近，*SAR1* の相同遺伝子が，菌類から高等動植物にいたるまでのさまざまな種において続々と発見され，その構造がきわめてよく保存されていることが明らかになってきた．たとえば，シロイヌナズナの *SAR1* 遺伝子（*At-SAR1*）は，酵母の遺伝子とアミノ酸レベルで 64% が同一であり，実際，d'Enfert により酵母の *sec12* 変異を抑圧する遺伝子として単離されたものである．この *At-SAR1* 遺伝子が，酵母 *SAR1* 遺伝子の機能を代替できるかどうかについて検討を行った．まず，*At-SAR1* の cDNA を酵母の *PGK1* プロモーターの下流につないだプラスミドを，酵母の *SAR1* および関連遺伝子群の変異株に導入し，変異の相補および抑圧を調べた．その結果，*At-SAR1* は，酵母 *SAR1* の温度感受性変異，欠失変異のいずれも相補できなかったが，酵母 *SAR1* と強い遺伝的相互作用を持つ *SEC16* の温度感受性変異を弱く抑圧した．

3aF02

小胞体ーゴルジ体間輸送に必須な Sar1 GTPase (2)
ータバコ培養細胞 BY-2 における優性致死変異を用いたアプローチ

竹内雅宜，八代田英樹，高橋陽介，長田敏行，中野明彦
（東大・院理系・植物）

Sar1 GTPase の機能を，高等植物において理解することは，酵母における分泌機構の知見を高等真核細胞へ敷衍するばかりでなく，多細胞系におけるタンパク質輸送の意義を解明していくための一つの試金石になるのではないかと考えられる．そのための第一歩として，酵母で優性致死の表現型を与えることがわかっている点変異を植物の *SAR1* 遺伝子上に作成し，これを，発現調節の可能なプロモーターの支配下で植物細胞に導入するアプローチを開始した．

酵母の *SAR1* 遺伝子において，T54A, D73V, N132I という変異は，野生型酵母で発現させたときに，増殖を阻害し，同時に小胞体からゴルジ体への小胞輸送を停止させるものである．シロイヌナズナ *SAR1* 遺伝子の cDNA に，これらの優性致死変異に相当する変異を部位特異的変異誘発により導入し，熱ショックプロモーター HSP18.2（米田好文博士より恵与），あるいはジャスモン酸誘導性プロモーター CDI（中村研三博士より恵与）の下流につないだ Ti プラスミドを作成して，アグロバクテリウムを用いてタバコ培養細胞 BY-2 に導入した．現在，いくつかの BY-2 形質転換体が得られ，その解析を進めている．

一方，タバコ細胞内での Sar1p の機能を解析していくためには，タバコーシロイヌナズナというヘテロなトランスジェニック系に依存するだけでなく，タバコ細胞自身が持つ *SAR1* 遺伝子についての知見も必須である．シロイヌナズナの *SAR1* cDNA の断片をプローブに用い，BY-2 の cDNA ライブラリーについてクロスハイブリダイゼーションを行うことによって，タバコの *SAR1* 遺伝子と思われるクローンをいくつか分離した．

3aF03

イネの核マトリックスとこれに残存するDNA

野村港二、斉藤渉、増田清[1]、井上正保[1]
(筑波大・農林、[1]秋田農短大・細胞工学)

核マトリックスに存在するDNA結合部位と、これに結合しているDNAであるmatrix association region (MAR) の解析は高等植物では今後の課題である。その第一歩として、イネ (*Oryza sativa* L. cv. Blue Bonnet) の 懸濁培養細胞から単離精製した細胞核を材料とし、核マトリックスを調製し、これに結合しているDNAのクローニングを試みた。イネの細胞核から核マトリックスを調製するには制限酵素を使ってDNAを消化するなど極めて緩和な条件でクロマチン成分を抽出することが必要であった。一方、核膜を溶解した単離核のDNAを消化する前に、LISなどでヒストンを抽出して長いクロマチンDNAが核外にまで伸長した核ハローと称される構造を得ることは比較的容易で、動物の細胞核での方法を改変することで核ハローを得ることができた。イネ細胞核のMARは、制限酵素によるDNAの消化と高濃度のNaClによる処理で得た核マトリックス、LISによってヒストンを溶解して得る核ハローをさらに制限酵素処理して得た核マトリックス相当の構造のそれぞれをさらにRNase処理した後に残存するDNA断片として得ることができた。

3aF04

原始紅藻*Cyanidium*及び*Cyanidioschyzon*の色素体ゲノムの*rbcL*遺伝子近傍の比較

太田にじ、黒岩常祥（[1]早大・人総研、[2]東大大学院・理学系・植物）

原始紅藻類の*Cyanidium caldarium* 及び *Cyanidioschyzon merolae* は、細胞体制が単純で、細胞核DNA含量が最も少ない真核生物の一種であり、色素体はラン藻に類似している。そのため、これらの植物を用いて、色素体ゲノムを解析し、他の生物と比較すると、真核生物の起源と進化を色素体の細胞内共生の観点から明らかにすることが可能となる。はじめに、*Cyanidium* の色素体ゲノムの物理的地図を作成した。このゲノムは高等植物とほぼ同じ150kbpの環状DNAで、約5kbpの短い逆位反復配列を持つことがわかった。

また、この二種類の植物において、色素体ゲノムに特徴的な遺伝子である*rbcL*及びその近傍の塩基配列各々約8kbpを決定したところ、両植物の色素体ゲノムはともに5'側から順に*trnK*、*trpA*、ORF369、*trnT*、*rps4*、ORF248、*trxM*、*rbcL*、*rbcS*、*cfxQ*、*trnC*、*trnL*、*ilvH*をコードしており、それぞれの遺伝子の相同性も高かった。これらのうち、*trpA*、ORF369、ORF248、*trxM*、*rbcS*、*cfxQ*、*ilvH*は高等植物の色素体ゲノムにはコードされていない遺伝子である。*trpA*が色素体ゲノムにコードされている一方で、*trpB*は細胞核にコードされていた。以上の結果は細胞内共生説を強く支持し、祖先型ラン藻が共生後比較的早い時期に*trpB*を含む多量の遺伝子を消失したこと、その後、さらに*trpA*、*trxM*、*rbcS*、*cfxQ*、*ilvH*のような遺伝子を徐々に細胞核へ移行させたことが推測される。また、*Cyanidium*と*Cyanidioschyzon*は細胞分裂の様式やゴルジ体の有無などいくつかの点で異なる。このことは、色素体ゲノムの進化は細胞核ゲノムの進化に比べて遅いことを示唆している。

3aF05

ミトコンドリアと色素体の分裂装置：真核生物における細胞質遺伝の基盤

黒岩常祥、伊藤竜一、戸田恭子、黒岩晴子[1]（東大大学院・理・植物，共立女子短大，生物）

1985年にｸﾗﾐﾄﾞﾓﾅｽを使って母性遺伝の機構に関する一つのモデル（選択的消化説）を提唱した。接合後雌由来の細胞核においてmRNAが発現し、これに基づいてタンパク質が合成され、これがｲﾝｼﾞｭｰｻｰとなってﾇｸﾚｱｰｾﾞCを活性化し、雄由来の葉緑体DNAが分解するという考えである。これは有性生殖を行う生物にとっては基本的な機構であると考えられる。しかし真核生物の無性生殖、有性生殖を通じて細胞質遺伝の基本として考えなければならないのは、ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱと色素体の増殖の機構である。

我々はﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱの分裂に必要な分裂装置（ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱ分裂ﾘﾝｸﾞ；MDﾘﾝｸﾞ）を原始紅藻Cyanidioschyzon merolaeで発見した。MDﾘﾝｸﾞは巾50nm厚さ10nmの閉鎖環である。MDﾘﾝｸﾞの収縮によって、ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱはその中央でくびれ分裂した。MDﾘﾝｸﾞの形成には電子密度の高い顆粒（ﾐｸﾛﾎﾞﾃﾞｨ）が直接関与していた。葉緑体にも分裂ﾘﾝｸﾞが出現した。Cyadnidium caldarium の場合には、ﾐｸﾛﾎﾞﾃﾞｨと分裂ﾘﾝｸﾞの形成の間に小胞が介在することが分かってきた。このことから、ｵﾙｶﾞﾈﾗの増殖は、細胞核情報→ER→ｺﾞﾙｼﾞ？→ﾏｲｸﾛﾎﾞﾃﾞｨ→（小胞）→分裂ﾘﾝｸﾞの形成→分裂ﾘﾝｸﾞの収縮→ｵﾙｶﾞﾈﾗの分裂といった一連の連鎖反応の結果で起こることが分かった。

3aF06

タバコ培養細胞BY-2におけるアミロプラスト分化誘導機構の解析

酒井敦、河野重行、黒岩常祥（東大大学院・理・植物）

タバコ培養細胞BY-2は、オーキシン（2,4-D; 0.2 mg/l）を含む通常の液体培地中では活発に増殖し、その色素体は培養の全期間を通じて未分化な原色素体の状態を保つ。これに対し、オーキシンを含まずサイトカイニン（BA; 1 mg/l）を添加した改変培地中では、細胞はほとんど増殖せずに著しく肥大し、その色素体は大量のデンプンを蓄積してアミロプラストへと分化する。植物ホルモンの調節によりアミロプラストの形成が誘導される機構を明らかにするために、培地中の植物ホルモン濃度がBY-2の増殖とアミロプラストの発達におよぼす影響を詳細に検討した。その結果、2,4-D は細胞の増殖を促進し、細胞の肥大とアミロプラストの発達を抑制すること、BAは 2,4-Dと逆の作用を示すことが明らかになった。また、アミロプラストの発達と細胞の増殖率の低下は密接に関連していた。したがって、BY-2においてアミロプラストが形成されるのは、ホルモン条件の変化により細胞の増殖率が低下した結果、合成されるデンプンが蓄積し続けるためではないかという可能性が考えられる。この可能性を検討するために、真核型DNA ポリメラーゼの阻害剤、アフィディコリンを添加して強制的に細胞増殖を停止させ、デンプンの蓄積に及ぼす影響を調べた。しかし、本来アミロプラストの発達が誘導されないホルモン条件下では、細胞の増殖を停止させてもデンプン含量は増大しなかった。この結果は、BY-2におけるアミロプラスト分化の誘導が、細胞の増殖率とは独立に制御されていることを強く示唆している。

3aF07

タマネギ根端分裂細胞の細胞分裂進行に伴うオルガネラ分布の変化

相生久，山下正兼[1]，長濱嘉孝[2]，峰雪芳宣(広島大・理・生物科学，[1]北大・理・生物科学，[2]基生研・生殖)

細胞分裂の際に細胞が持っている個々のオルガネラを二つの娘細胞にうまく分配するのが細胞質分裂の一つの重要な働きと考えられる。細胞分裂の際にミトコンドリアや葉緑体がランダムに分布していると仮定した場合，ミトコンドリアや葉緑体を持たない細胞が出現する頻度は，自然界で特定のオルガネラを欠いた細胞の出現頻度に比べずっと少ないことが知られている(Birky 1983)。このことは細胞分裂の際に個々のオルガネラをうまく二つの娘細胞に分配する仕組みが存在することを示唆する。しかしその仕組みについてはほとんど分かっていない。この解析をするためには，まず個々のオルガネラの空間的分布の変化を細胞分裂進行に伴って調べる必要がある。最近，我々は螢光抗体法でタマネギ根端細胞の特定の膜系を染色できる抗体を見つけた。そこで，この抗体で染色されるオルガネラの細胞分裂進行に伴う細胞内分布の変化を共焦点レーザー走査顕微鏡を使って調べた。このオルガネラは分裂間期には細胞質にランダムに分布しているように見えるが，分裂前期になると核の両極に集中する。やがて，後期になって染色体が分かれ始めると再び細胞全体に分布する。アクチン重合阻害剤のサイトカラシンDではこのオルガネラ分布様式に顕著な変化は見られなかったが，微小管重合阻害剤のオリザリンでオルガネラの分布様式が影響を受けることがわかった。

3aF08

高等植物の根におけるゴルジ体の動態のテクノビット法による解析

河津　維、河野重行[1]、黒岩常祥（東大大学院・理学系・植物、[1]東大大学院・理学系・広域理学）

ゴルジ体は細胞分裂や細胞内外への分泌に深く関わっており、細胞分化の過程でその数・分布等が変化することが知られている。ゴルジ体の研究は、主に電子顕微鏡を用いてなされており、組織・細胞の極小部位の観察にとどまっているため、組織・細胞全体における挙動は完全に把握されていない。そこで、ゴルジ体の形態・挙動を光学顕微鏡で観察する方法（テクノビット $DiOC_6$－DAPI二重染色法）を開発した。この方法を用いてタバコ培養細胞BY-2においてゴルジ体が分裂後期に成熟しつつある細胞板付近に集まり、細胞板を成熟させていることが分かった (Kawazu *et al.*, Protoplasma in press)。組織分化に果たすゴルジ体の機能を調べるために、トウモロコシ (*Zea mays*) ・タバコ (*Nicotiana tabacum*) の根端分裂組織広域におけるゴルジ体の動態を調べた。その結果、根端細胞でもゴルジ体は分裂終期に細胞板付近に局在していることが確認された。さらに、根冠起源部と表皮細胞ならびに表皮細胞に隣接した根冠細胞においてゴルジ体の密度が他の組織細胞に比べて高いことが分かった。また、ゴルジ体の大きさは各組織においてほとんど変わらないが、根冠周辺部では約1.7倍に大きくなることも分かった。ゴルジ体経由の輸送の特異的阻害剤として知られているBrefeldin A (BFA) をタバコの根に処理した。高濃度（10 μM）では根の伸長が停止した。低濃度（1 μM）では、ゴルジ体の数が減少し、根冠組織の縮小、皮層細胞において分裂方向の異常が観察された。これらの結果は、ゴルジ体の組織内分布が、根の組織分化に関わっていることを示している。

3aF09

根端での細胞分化に伴うrRNA量の変化の高解像度 *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析

藤江誠、河野重行、黒岩晴子[1]、黒岩常祥（東京大学・理・植物、[1]共立女子短大・生物）

根端分裂組織では細胞分裂の活発化に先行して、先端部でミトコンドリアでのDNA合成が活発に行なわれ、1Mbp以上のDNAを含む巨大ミトコンドリアが根端先端部で生じる (Fujie et al., 1993)。シロイヌナズナでは根端分裂組織の最先端の中心細胞とその直上部の細胞が静止中心を形成している。 静止中心では細胞核のDNA合成は非常に不活発だが、DNA合成を高解像度に調べると、オルガネラのDNA合成はどの細胞でも観察され、細胞核でのDNA合成以外の機能を果たしていることが示唆された (Fujie et al., 1993b)。そこで、DNA合成の活性とrRNAの密度との関係を静止中心を含めた根端での個々の細胞で調べた。従来の方法では組織内において個々の細胞内の特定のRNAの密度を調べるのは困難であるので、テクノビット樹脂に包埋した切片とdigoxigeninでラベルしたプローブを用い、間接蛍光抗体法で検出する超高解像度の *in situ* ハイブリダイゼーション法を開発した。顕微蛍光定量装置を使ってRNAの密度を半定量的に調べることも可能である。この方法を用いて細胞質の25SrRNAの密度を調べたところ、中心細胞で密度が最も低く、分裂組織中部の活発に増殖する細胞では密度はその約5倍になった。細胞が分裂組織を離れ分化が進行すると、細胞質でのrRNAの密度は急激に低くなった。レタスの根端分裂組織においても同様の25SrRNAの密度の変化が観察された。これらの変化は、rRNAはその転写速度か細胞内での保存性が細胞の増殖活性に伴ってダイナミックに変化していることを示唆している。色素体の23SrRNAをプローブとして、オルガネラのrRNAの密度を調べたところ葉肉細胞に比較するとその密度は著しく低かった。

3aF10

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942 の *ffh* 遺伝子のクローニング

杉田　大悟、中井　正人、遠藤　斗志也　（名大・理・化学）

ラン藻は、細胞内に細胞質膜とは独立したチラコイド膜系を持つ原核生物である。したがって、細胞質膜に移行するタンパク質と、チラコイド膜に移行するタンパク質は、機能すべき正しい部位に「局在化」しなければならない。われわれは現在までに、大腸菌等の細胞質膜上でタンパク質膜透過装置を構成するSecYおよびSecAタンパク質のホモログタンパク質が、ラン藻において、細胞質膜とチラコイド膜の両膜系でタンパク質の膜透過に関与していることを示唆する結果を得ている。そこで本研究では、原核細胞におけるタンパク質分泌機構に関与するもうひとつの因子であるSRP（シグナル認識粒子）が、ラン藻細胞内でのタンパク質仕分けに関与しているのかどうか明らかにする目的で、まず、大腸菌等で見つかっているSRP54タンパク質のホモログ(Ffh)について遺伝子レベルで検索した。

進化的に保存された領域に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCR法によりラン藻*ffh*遺伝子の部分断片をクローニングすることに成功した。この断片を用いてラン藻のゲノムDNAライブラリーから全長 *ffh* 遺伝子を含むクローンを単離し、その全塩基配列を決定した。予想されるアミノ酸配列は、大腸菌のFfhと45.2%、アラビドプシスの葉緑体のCP54と50.4%のホモロジーを示した。現在、作成した抗体を用いて、*ffh* 遺伝子発現産物のラン藻細胞内局在部位を解析中である。

3aF11

アラビドプシスシャペロニン10のcDNAクローニングとその発現

河本恭子[1]、槻木竜二[1]、嶋田知生[1,2]、西村幹夫[1,2]（[1]基生研・細胞生物、[2]総研大・生命科学）

シャペロニン10 (Cpn10) はシャペロニン60 (Cpn60) とともにタンパク質の折りたたみに関与している。大腸菌を始め種々の生物でこのシャペロニン・システムの存在が知られているが、真核生物においてはCpn10はCpn60ほど大量に存在しないため解析が遅れている。今回、我々はアラビドプシスのCpn10について解析を行なったので報告する。

アラビドプシスのcDNAライブラリーを大腸菌のGroESの温度感受性突然変異株に導入し、温度感受性を相補する形質転換体をスクリーニングした。得られたcDNAは全長702塩基であり、98アミノ酸からなるタンパク質をコードしうるORFを含んでいた。ホモロジー解析の結果、このタンパク質はラットのミトコンドリアCpn10に高い相同性を示した。得られたクローンのコードするタンパク質をN末端にヒスチジンタグを付けた形で大腸菌内で発現させ、ニッケルカラムを用いて精製し抗体を作製した。発現産物はオリゴマーを形成していることがゲルろ過カラムにより確認された。アラビドプシスを細胞分画し、作製した抗体でイムノブロットを行なったところ、得られたクローンにコードされたCpn10はミトコンドリアに局在していることが判った。ゲノミックサザンブロット解析により、このミトコンドリアCpn10の遺伝子はゲノムあたり1コピーであることが示唆された。ノーザンブロット解析から植物体の各組織におけるmRNAの蓄積量に大きな違いは見られなかったが、ロゼッタ葉におけるmRNAの蓄積量が熱ショックによって大きく増加することが明らかとなった。

3aF12

緑化カボチャ子葉で発現されるヒドロキシピルビン酸レダクターゼのcDNAクローニング

林　誠、槻木竜二、森　仁志、近藤真紀、西村幹夫
（基生研、細胞生物）

［目的］ヒドロキシピルビン酸レダクターゼは、ヒドロキシピルビン酸をグリセリン酸に変換する反応を触媒する酵素である。この酵素は、光呼吸を行うグリコール酸経路の一部として光合成組織の緑葉ペルオキシソームに局在する。また、カボチャの場合、発芽直後の黄化子葉には本酵素活性は低く、子葉の緑化過程において顕著な活性の誘導が見られる。そこで、ヒドロキシピルビン酸レダクターゼの細胞内局在化および発現調節機構を解析するために本酵素のcDNAクローニングを行った。

［結果］緑化カボチャ子葉のcDNAライブラリーをイムノスクリーニングした。その結果、全長をコードする２つのｃＤＮＡを単離することに成功し、それぞれをHPR1、HPR2と名付けた。HPR1とHPR2の塩基配列は非常に相同性が高いが、HPR2にはタンパク質のＣ末端をコードしている部分に17bpの塩基の挿入があった。この挿入配列のために、HPR1とHPR2ではＣ末端のアミノ酸配列に違いが見られた。さらに、カボチャ子葉の緑化過程におけるこれら２つのヒドロキシピルビン酸レダクターゼの発現調節についても検討を加える。

3aF13

タバコN-エチルマレイミド感受性因子(NSF)ホモログのクローニングと機能解析

佐藤　豊、松岡　健、中村　研三　　（名大、農、生化）

N-エチルマレイミド感受性因子(NSF)は、輸送小胞がそのターゲット膜と融合するのに広範に必要とされる細胞質因子と考えられている。NSFは、ほ乳類、酵母等いくつかの真核生物からクローニングされており、推定されるアミノ酸配列はそれぞれ高い相同性を示している。

今回、我々はタバコからNSFホモログのクローニングをPCR法により行った。CHO細胞由来のNSF及び出芽酵母のNSF相当するSEC18のアミノ酸配列を元に縮重オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、タバコ懸濁培養細胞BY-2のcDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、約440bpのDNA断片が増幅された。増幅断片の塩基配列を決定した結果、2種類の配列が得られた。NSFと高い相同性を示したDNA断片をプローブとして、タバコ懸濁培養細胞BY-2のpoly(A)⁺RNAから構築したcDNAライブラリー50万をスクリーンしたところ，5個のポジティブクローンが得られた。最もインサートの長かったクローンの塩基配列を決定した結果,2585bpのcDNA(NtNSF)に730アミノ酸残基のORFが含まれており、このORFのアミノ酸配列はNSF及びSEC18とそれぞれ、44.4%,44.8%のホモロジーを示した。

現在、我々はタバコ植物体及びタバコ懸濁培養細胞BY-2にNtNSFを過剰発現させたとき、及びアンチセンスRNAによりこの遺伝子の発現を抑制させたときの植物のタンパク質の分泌、タンパク質の液胞への蓄積、及び成長への影響を解析中である。

3aG01

紫外線ＵＶ－Ｂがイネの生育及び葉身Rubisco含量に与える影響

姜　恵淑，日出間　純，熊谷　忠（東北大・遺生研）

演者達は，これまで，アジア栽培イネ（*Oryza sativa* L.）の生態型のうち日本型水稲グループには紫外線に対して強い抵抗性を示す品種が多数含まれていること，日本型水稲グループの中にも品種間差異が存在し，ササニシキは強い紫外線抵抗性を示すがササニシキと近縁な農林１号は弱い抵抗性を示すことを見出し，いろいろな生理的，遺伝的解析を行ってきた（Physiol. Plant. 91, 234, 1994）．ところで，これらはUV-Cを約10%含む紫外線UV-Bを用いて得られてきた成果である．本研究では，環境調節実験室内で，カットフィルター（UV31，UV29），セルロースジアセテートフィルムを用いてUV-Cを除去した紫外線UV-Bが，ササニシキ，農林１号の生育及び葉身Rubisco含量に及ぼす影響を解析した．

UV-Cを除去した紫外線UV-BはUV-Cを少量含む場合に比べ，程度は低いが，両品種のFW，DW，分げつ，草丈などの生育を抑制した．また，４週間栽培した後のイネの最上位完全展開葉（主幹第８葉）を用い，葉身窒素含量，Rubisco含量の分析を行った結果，葉身全窒素，Rubisco量は，両品種とも照射UV-B量の増加に伴い減少した．

以上のような結果に基づいて，イネのUV-B量の増加に対する応答について考察する．

3aG02

イネ幼植物の302 nmＵＶ単色光によるＤＮＡ損傷とその光修復

日出間　純，John G. Trunk[1]，John C. Sutherland[1]，
Betsy M. Sutherland[1]，熊谷　忠（東北大・遺生研，
[1]ブルックヘブン米国立研究所・生物）

紫外線抵抗性の異なるイネ（*Oryza Sativa* L. cv）２品種の，紫外線UV-BによるＤＮＡ損傷（ピリミジンダイマーの生成）の頻度と青色光によるＤＮＡ損傷の修復速度について解析を行った．材料として，紫外線抵抗性の強いSasanishikiと抵抗性の弱いNorin 1の第３葉（完全展開葉）を用いた．　ピリミジンダイマー（ＰＤ）の定量は，Sutherlandらにより開発されたUV endonucleaseを用いたアルカリパルスフィールド電気泳動法により行った．まず初めに単色光照射装置を用いて302 nmの単色光照射量に対するピリミジンダイマー生成量の UV Dose Response Curveを測定した．次に，得られたUV Dose response CurveからＰＤの生成量がおよそ30 PD/mbとなるように302 nmの単色光をイネ葉に照射した．照射後，直ちに青色光ランプの下または暗所下に移し，ＰＤ消失のtime courseを測定した．

その結果，両品種のUV Dose Response Curveは一致し，紫外線抵抗性の異なる２品種間において，302 nm単色光により誘起されるＰＤ生成の感受性に差異は認められなかった．ところが，青色光照射後５分以内の光修復速度を比較すると，抵抗性の強いSasanishikiの方が，Norin 1よりも明らかに速いことがわかった．これらの結果は，光修復速度の差異が両品種間の紫外線抵抗性の差異の主な要因の１つとなっている可能性を示唆した．

3aG03

UV-B 照射によるキュウリ子葉の DNA 損傷

竹内裕一, 村上美奈, 二階堂修[1]（北海道東海大・工, [1] 金沢大・薬）

フロンガスなどの大気中への放出による成層圏のオゾン層の破壊は、太陽からの放射のうち、UV-B と呼ばれる 290 ～ 320 nm の波長域の紫外線の地表面に到達する量を増加させる。植物に UV-B を照射するとその生長が阻害されることが報告されているが、UV-B による植物の DNA 損傷については不明の点が多い。

われわれは、cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) と pyrimidine-(6-4)-pyrimidine photoproduct ((6-4)photoproduct) に特異的な単クローン性抗体を用いて、UV-B 照射による植物の DNA 損傷について検討した。キュウリの黄化子葉に UV-B を照射した後、DNA を単離し、ELISA 法により CPD と (6-4)photoproduct の生成量を測定した。UV-B と同時に可視光を照射すると、CPD の生成量は大きく減少したが、(6-4)photoproduct の生成量の減少量はわずかであった。これら DNA 損傷に影響を与える要因について報告する。

3aG04

UV-B 照射による植物の生長阻害における活性酸素の関与

久保裕嗣, 竹内裕一[1]（北海道東海大・理工学研究科・環境生物科学,[1] 北海道東海大・工・生物工学）

UV-B は植物の生長を阻害することが広く知られているが、植物の UV-B に対する適応や耐性のメカニズムに関する研究はあまり行われていない。我々は先に、UV-B（290 ～ 320 nm）が *in vitro* で培養したキュウリ子葉の生長を阻害し、その時脂質の過酸化の指標であるマロンジアルデヒドが増加することを明らかにした。この結果は UV-B の生長阻害に活性酸素が関与することを示唆していると考えられる。本研究では、活性酸素の消去に関わる還元物質（グルタチオン、アスコルビン酸）と酵素活性（SOD、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ）が、UV-B 照射や生育温度によりどのように変動するかを測定した。その結果、UV-B 照射によりアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の増加がみられ、UV-B 照射により細胞内で活性酸素が生成していることが示唆された。

3aG05

ブドウ培養細胞におけるサリチル酸によるアントシアニン合成の誘導

郡　佳世子、作田正明、清水　碩　（お茶の水大・理・生物）

植物は、病原菌の感染に対し種々の防御機構を発現するが、サリチル酸はその応答に関与するシグナル物質と考えられている。この防御機構のうち、二次代謝産物の生成による抵抗性の発現は、誘導性の防御反応の典型的な例のひとつである。我々は、ブドウ培養細胞にサリチル酸を投与すると、アントシアニン蓄積が著しく促進されることを見出した。そこで今回、アントシアニン合成系のPALおよびCHSの両酵素に注目し、サリチル酸の投与による両酵素の活性変動を調べた。培養7日目の細胞を100μMサリチル酸を含む培地に移植すると、アントシアニン蓄積は24時間以内に上昇し、定常期の7-9日目でピークとなり、蓄積量はコントロールの約40倍に達した。このとき、PALは７日目でピークとなりその活性はコントロールの約12倍であった。また、CHSは9日目でピークとなりその活性はコントロールの約7倍であった。サリチル酸のアナログであるacetylsalicylic acidは、アントシアニン蓄積に対しサリチル酸と同様の効果を示すが、この場合においてもやはりPAL、CHSともに活性の上昇が見られ、そのレベルはサリチル酸とはほ同程度であった。これらのことより、サリチル酸によるアントシアニン蓄積の促進は、アントシアニン合成の誘導によるものであることが明かとなった。現在、両酵素のmRNAレベルについて解析を行っている。

3aG06

イチゴ培養細胞におけるアントシアニン生産へのコンディショニングファクターの効果

桜井美栄、森司[1]、鬼山和彦（石川島播磨重工業・技研、[1] 北大・水産）

イチゴ培養細胞におけるアントシアニン生産へのコンディショニングファクターの効果を調べるため、細胞をＬＳ培地で培養した後にフィルターろ過して得られた培養ろ液を用いて培養した。その結果、培養５日目から８日目の培養ろ液を用いた時、細胞へのアントシアニンの蓄積量が高くなった。このアントシアニン合成量を高くする効果は、培地中の培養ろ液の割合を多くするに従って促進された。１００%培養ろ液で培養した時の細胞当たりのアントシアニン含量は、培養ろ液を加えない新鮮なＬＳ培地で培養した時と比較して、培養開始後５日目には約８倍となった。この培養ろ液を１０分間煮沸して培養液として用いても、煮沸しないで用いた時と比較して、細胞増殖量にもアントシアニン含量にも変化を与えなかった。このことから、この培養ろ液中に存在するアントシアニン合成を促進する物質は、耐熱性であると考えられる。さらに、この培養ろ液を凍結乾燥して新鮮培地中に加えることにより、ボトル当たりのアントシアニン総生産量を高めることができた。また、イチゴ培養細胞のアントシアニンの主色素は、ペオニジン－３－グルコシドとシアニジン－３－グルコシドであることがわかっている。この二つの主色素の組成比が、培養ろ液を培地中に添加する量に従って変化するということもわかった。

3aG07

Euglena gracilis Z の高CO_2環境への適応

浜崎和恵、竹中重雄、宮武和孝、中野長久
（大阪府立大、農、応用生物化学）

E. gracilis は種々の炭素源を利用し生育することのできる真核光合成生物である。我々は*E. gracilis* の高CO_2条件下での生育の可能性について検討した。高CO_2条件下での光独立栄養的な生育は40%CO_2以下では通常大気条件(0.04%CO_2)と比較して良好であった。一方、光従属栄養的な生育には顕著な変化はみられず高CO_2環境への適応には光合成能力の向上が伴うことが示唆された。そこで細胞内成分について検討した結果、細胞当りのRuBisCO、クロロフィル含量の高CO_2条件下での増加がみられた。また光合成による酸素発生について検討した結果、無機炭酸に対する見かけのK_m値は高CO_2条件で上昇したが、V_{max}は変化しなかった。

以上の結果から我々は高CO_2条件下での光合成能の上昇は光合成に関連する細胞内成分の合成が促進されるためであると考え、さらに検討を行っている。

3aG08

異なる光、窒素条件下での個葉の窒素、炭素の利用と生育環境の変化に対する応答

小野清美、渡辺昭（東京大・理・植物）

窒素と炭素は植物の成長にとって重要な資源である。個体はこれらを外から取り込む他に、古い葉のタンパクを分解して新しい葉に転流したり、光合成を活発に行っている葉から成長中の葉に光合成産物を転流する。本研究ではヒマワリを人工気象室で生育させ、光条件として、強光（450 μmoles・m^{-2}・s^{-1}）弱光（150 μmoles・m^{-2}・s^{-1}）、窒素条件として高窒素（12 mmol NO_3^-・$plant^{-1}$）、低窒素（1.2 mmol NO_3^-・$plant^{-1}$）を組み合わせ、第一葉の窒素、炭素量の変化や、その変化が生育条件によってどのように異なるかを調べた。第一葉の葉面積当たりの窒素量は、強光で低窒素ほど速く減少したが、個体の成長量に対する変化として表すと、同じ窒素条件では光条件に関わらずほぼ同様の変化を示した。炭素については強光のものほど変化が大きく、特に強光低窒素条件では一時的な炭素化合物の増加がみられた。このとき糖含量は光合成の低下に伴って減少したものの、強光低窒素の場合、グルコースの含量が増加する傾向がみられた。ここで強光低窒素条件に注目して異なる時期に低窒素から高窒素条件に移したところ、広い範囲の期間にわたって第一葉の光合成の低下がある程度抑えられ、そのとき葉面積当たりの窒素量は増加しないが、炭素量が減少している傾向がみられた。窒素供給量の増加は光合成活性の低下を抑えるが、その結果得られる光合成産物はもともと第一葉に存在していたものとともに若い葉の成長に使われていると思われる。

3aG09

ABAにより誘導されるコムギ懸濁培養細胞の19kD細胞膜ポリペプチドの精製の試み

小池倫也，荒川圭太，吉田静夫（北大・低温研）

我々は昨年度の大会において，常温下でコムギ懸濁培養細胞（*Triticum aestivum* L. cv Chihoku）をアブシジン酸（ABA）で処理すると，ABAを与えないものに比べて耐凍性が-5°Cから-20°C近くまで顕著に増大し，それに伴って細胞膜19-kDポリペプチドが新たに出現することを報告した．

これまで細胞膜タンパク質が耐凍性に果たす機能的役割について報告された例はないので，我々はこの19-kDポリペプチドの分子構造と機能を明らかにする研究を開始した．

今回，その第一段階として，細胞膜画分からの19-kDポリペプチドの単離精製を行うことにした．19-kDポリペプチドは 0.2M NaCl, 1%(v/v) Triton X-100, 0.1%(w/v) lyso-phosphatidilcholine に対して難溶性であったが，2% SDS では可溶化された．そこで細胞膜を0.2M NaCl, 続いて 1%(v/v) Triton X-100 で洗ったあとの不溶性画分を直接 SDS-lysis buffer で可溶化し，Prep Cell (Bio-Rad) を用いて分子サイズによる分画を行った．回収画分をTricine-SDS-PAGE で分析したところ，通常のSDS-PAGEでは単一に見えた19-kDは少なくとも５本のポリペプチドからなることが判った．これらのバンドの内，最も量的に多い１本のバンドをelectroelution によりゲルから回収した．現在，この単離標品の部分的アミノ酸配列の決定が進行中である．

3aG10

キウリ子葉中の光呼吸系酵素の発現に対する光酸化の影響

肥塚信也、本田久志、諸橋征雄（東京農工大学・農）

緑葉が強光下に置かれると、葉緑体中のクロロフィル、グラナ構造及びリボゾームの消失等数多くの傷害がみられ、光酸化によって葉緑体の破壊を生ずる。さらに、核コードの葉緑体蛋白質の合成の急激な減少がみられる。このことから、健全な葉緑体の存在が、光合成に関連した、核コードの葉緑体蛋白質の発現には必要であるとされている。光呼吸は光合成と密接に関連した代謝系で、葉緑体・パーオキシソーム・ミトコンドリアの三つのオルガネラの協同的な作業によって成立している。従って、葉緑体が光酸化によって傷害を受けたとき、他のオルガネラに存在する光呼吸系の酵素の発現がどのような影響を受けるかを知ることは、オルガネラ間の協調関係を知る上で興味深い事である。本研究では、この点について検討を加えた。

カロチノイド合成阻害剤であるノルフルラゾン（NF）の存在下で4日間生育させたキウリ芽生えを 1日間白色光下に置いたところ、光酸化の現象が観察され、子葉は緑化せず、クロロフィルの蓄積はほとんど見られなかった。光呼吸系の酵素でありパーオキシソームに局在するヒドロキシピルビン酸レダクターゼ、グリコール酸オキシダーゼの活性は、NF 未処理の子葉では光照射により強く誘導されたが、NF 処理の子葉では、その誘導は阻害された。一方、ミトコンドリアに局在する、光呼吸系の酵素であるグリシンデカルボキシラーゼとセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの活性は、NF 未処理・処理のいずれの子葉でも光照射により強く誘導され、その増加の程度は同じであった。現在、各酵素のタンパク量・mRNA 量の変動について検討しているが、パーオキソーム局在の光呼吸系の酵素の発現とミトコンドリア局在の酵素のそれとの間には、異なった制御を受けている可能性が示唆された。

3aG11

セレン酸耐性シロイヌナズナ突然変異株の単離

本多　親子、藤原　徹、内藤　哲[1]、茅野　充男
（東大・農・応用生命化学、[1]北大・農・応用生命科学）

本研究は、硫酸のアナログであるセレン酸に耐性を示す突然変異株を単離することにより、硫酸の吸収および代謝の機構を遺伝学的に解析すること目指している。野性型シロイヌナズナ（ecotype Columbia）は、200 μ Mのセレン酸を含み硫酸は含まないMS培地上では、根がわずかに伸びるものの子葉の展開は見られない。EMS処理後のM2種子約9万粒の中から、この条件下でも5日目あるいは6日目に緑色の子葉を展開する62個体の種子を得た。このうちM3世代でも耐性を示すものは9個体であった。いずれの株についても、子葉を展開する植物の出現頻度にはばらつきが見られた。戻し交配を1回行った後も耐性株がある頻度で出現し、セレン酸耐性が遺伝することが確認された。得られた耐性株のM3世代について $^{35}SO_4^{2-}$ の吸収実験を行ったところ、野性型株と比べて吸収能が低下しているものと、低下していないものが存在することが明らかとなった。

3aI01

シロイヌナズナ*RBCS*根組織発現突然変異体の選抜

増田拓也，丹羽康夫，佐伯真理，菅原由行，小林裕和
(静岡県大・食品栄養科学)

分子遺伝学的解析に適したモデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用い，光合成遺伝子として，リブロース 1,5 - 二リン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ (rubisco) の S サブユニット遺伝子 (*RBCS-3B*) およびクロロフィル *a/b* 結合タンパク質遺伝子 (*CAB1*) に注目した．

効率よく変異体を選抜するために，これらプロモーターの制御下にそれぞれ薬剤耐性遺伝子である hygromycin B phosphotransferase 遺伝子 (*hph*) および bialaphos 耐性遺伝子 (*bar*) を置き (P_{RBCS}-*hph* および P_{CAB}-*bar*)，また，可視化マーカー遺伝子である β-glucuronidase 遺伝子 (*uidA*) およびホタル luciferase 遺伝子 (*luc*) を置いたキメラ遺伝子 (P_{RBCS}-*uidA* および P_{CAB}-*luc*) を作製し，シロイヌナズナ (Columbia) に導入した．形質転換体において，*hph*，*uidA*，および*luc* は，本来の *RBCS-3B* および *CAB1* と同様に葉組織特異的に発現していることを確認した．特に *hph* 遺伝子に関しては，葉組織特異的に発現したため，根は hygromycin B に対し感受性を示した．そこで，形質転換体を変異原処理し，根が hygromycin B に対し耐性を示す変異体を選抜した．これらの中に，X-gluc により側根基部あるいは維管束が染色される数株が含まれていた．これらにおいて，*RBCS* 遺伝子の組織特異的発現制御が異常をきたし，根における遺伝子発現抑制機構が解除されていると考えられた．

3aI02

シロイヌナズナ *RBCS* 低発現突然変異体の選抜と解析

小林京子，栂根一夫，丹羽康夫，小林裕和 (静岡県大・食品栄養科学)

植物光合成遺伝子発現制御シグナル伝達機構を解明するために，モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた分子遺伝学的解析が有効であると考える．代表的な光合成遺伝子であるリブロース 1,5-二リン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ (RuBisCO) Sサブユニット遺伝子 *RBCS* の発現に着目した．

葉組織特異的発現の顕著な*RBCS-3B* のプロモーター (上流を含む約1.5 kbpのDNA領域) の制御下にアルコール脱水素酵素遺伝子 (*ADH*) を置き，シロイヌナズナ (Bensheim, *ADH-*) に導入した．形質転換体実生は，allyl alcohol 添加培地に移すと枯死したため，*ADH* の発現の結果毒性アルデヒドacrolein が生産されたものと考えられ，本負選抜 (自殺遺伝子)　実験系が有効であると考えられた．稔性を有する約10の形質転換体のうち上記方法による選抜が容易な系統をホモ接合にした後，種子を変異原ethylmethane sulfonate (EMS) 処理およびγ線照射に供した．合計約 20,000 系統の選抜を終了し (中性子照射種子も含めさらに選抜を継続している)，約 40 の *RBCS* 低発現突然変異体候補を得た．そのほとんどは光合成能の低下により独立栄養生長不可能であった．したがって，突然変異体はヘテロ接合体として保存した．Northern hybridization の結果，これら突然変異体のうちいくつかは，葉組織における*RBCS* の発現量が低いことを明らかにした．

3aI03

シロイヌナズナのフィトクロム分子種に特異的な
単クローン性抗体の作製とその応用
- 暗所吸水中の種子におけるPHYAおよびPHYBの量的変化 -

半澤宏子、[1]長谷あきら、篠村知子、古谷雅樹
（日立製作所・基礎研、[1]理研・国際フロンティア）

フィトクロムには複数の分子種が存在し、それらは互いに異なる機能を示すことが、突然変異植物を用いた研究から明らかになってきた[1]。篠村らはPhyAおよびPhyB欠損変異体の光発芽反応を解析し、吸水直後の種子ではPhyB依存の発芽制御のみが観察され、暗所吸水48時間後にはこれに加えてPhyAによる光により敏感な発芽制御が認められることを発見した[2]。この結果は、暗所吸水中にフィトクロムA蛋白質（PHYA）が蓄積してくる可能性を示唆しているが、抗エンドウPHYA単クローン性抗体を用いた実験では、吸水種子中のPHYAを検出することが出来なかった[2]。そこで、本研究では1)シロイヌナズナPHYAのC末端側608アミノ酸相当をGSTとの融合蛋白質として大腸菌に発現させ、これを抗原として抗シロイヌナズナPHYA単クローン性抗体を複数作製した。2)得られた抗体（mAA1）を用いて種子中のPHYAの量的変動を調べたところ、PhyA反応が見られない吸水直後では PHYA が検出されなかったが、暗所吸水48時間目では相当量のPHYAが検出された。

現在、PHYAおよびPHYBについて詳しい経時的量的変化を調べており、フィトクロム分子種の量と光反応との関係を更に明らかにしたいと考えている。

1)Furuya et al., (1993) Ann. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol. 44 : 617-645
2)Shinomura et al., (1994) Plant.Phisiol. 104 :363-371

3aI04

フィトクロムAによる*cab*遺伝子発現の光制御

濱里史明、篠村知子、*Joanne Chory、古谷雅樹（日立製作所・基礎研究所、*Salk Institute）

環境の光情報を受けて生体機能を制御するフィトクロム(Phy)には複数の分子種が存在する[1)]。我々は最近フィトクロムA(PhyA)およびフィトクロム(PhyB)の*in vivo*作用スペクトルや光可逆的反応に著しい違いがあることをアラビドプシス種子の光発芽について発見した[2)]。本研究の目的はクロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子(*cab*)の光発現誘導に対するPhy分子種特異的作用を解析することである。アラビドプシスPhyA欠損変異株*fre1*[3)]およびPhyB欠損変異株*hy3*[4)]を材料に岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いて行なった実験の結果、1) 光量0.1 μ mol/m^{2}の赤色光(667nm)照射によりPhyAは*cab*の発現を誘導するが、PhyBはしないこと、2) 近赤外光(726nm)の照射によりPhyAは*cab*の発現を誘導するが、PhyBはしないこと、3) 照射赤色光量(0.1～10^4 μ mol/m^2)に応じてPhyA依存の*cab*発現量が増加することを明かにした。これらの結果は、PhyAがPhyBに比べて数桁微弱な光量の赤色光に感受性を示し、またPhyBと異なり赤色光と近赤外光のいずれによっても反応が誘導されるという特徴が、遺伝子発現の誘導という分子レベルの現象においても種子の光発芽と同様に存在することを初めて示したものである。

1) Furuya (1993) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44:617-645、2) 篠村ら(1994) 日本植物学会第58回大会 研究発表記録 p174、3) Nagatani et al. (1993) Plant Physiol. 102: 269-277、4) Reed et al. (1993) Plant Cell 5: 147-157

3aI05

mRNAの5'末端に挿入されたポリ(U)配列は翻訳効率を上昇させる

長尾一生,山本義治,小保方潤一（北大・地球環境科学）

タバコの光化学系Ⅰ遺伝子である*psaE*はmRNAの5'末端にゲノムにはコードされていないポリ(U)配列を持っている（Obokata *et al*.投稿準備中）。今回、この配列の機能を調べるためにGUSレポーター遺伝子の転写開始点近傍に$(U)_{20}$を挿入したキメラ遺伝子を作成し、タバコに導入して形質転換植物体（M0世代）中での発現を調べた。成熟葉でのGUS活性を測定したところ、$(U)_{20}$を挿入した遺伝子の活性は未挿入のものに比べて4.5倍ほど上昇していた。一方、両者の遺伝子について、形質転換植物体中でのGUS mRNAの量をRNase保護実験の手法で比較したところ、大きな差異は認められなかった。これらの結果は、転写開始点近傍に挿入された$(U)_{20}$が、GUS mRNA分子あたりのGUSタンパク質の生産量、すなわちGUS mRNAの翻訳効率を上昇させたことを示している。現在この現象のより詳しい分子機構を探るために、*in vitro*タンパク質合成系を用いて、種々のキメラ遺伝子由来のmRNAの翻訳実験を進めており、それらの結果についてもあわせて報告する予定である。

3aI06

葉緑体遺伝子の転写後制御機構における34 kDa RNA結合性タンパク質(p34)の生理機能発現に関する生化学的解析

金勝一樹, 道家建二郎, 江角明由[1], 大槻健蔵[1]
(北里大·教養·生物, [1]北里大·衛生·遺伝生化)

前本学会(筑波1994)において、ホウレンソウ葉緑体CK-IIの特異基質として精製された分子量34kDaのタンパク質(p34)は、葉緑体mRNA3'末端のプロセシングを制御するRNA結合性タンパク質[ribonucleoprotein(RNP)]であることを報告した。今回、(1)ssDNA-celluloseカラムクロマトグラフィーを用いてp34を効率良く精製すること、(2)p34のCK-IIによるリン酸化を介した生理的役割を明らかにすることを目的として本研究を行なった。まず、ssDNA-celluloseカラムクロマトグラフィーを用いた精製法により、(1)粗抽出画分中のp34は選択的かつ効率的に精製されること、および(2)p34はCK-IIとcopurifyされることなどが明らかとなった。これらの実験結果から、p34はCK-IIと複合体を形成していることが示唆された。本精製法を用いて、異なる生物種(ゼニゴケおよびトウモロコシ)の葉緑体からCK-IIによって特異的にリン酸化されるRNPを精製したところ、ホウレンソウp34と等しい等電点(pI4.8)を持つ分子量33 kDa(ゼニゴケ)および35 kDa(トウモロコシ)のRNPが検出された。さらに、p34に対する抗体を用いたwestern blot法での解析結果から、p34は光依存的に誘導されることが明らかになった。以上の実験結果から、(1)葉緑体における転写後制御機構に関与するRNPは光照射によって誘導されること、および(2)このRNPは植物種に共通して存在し、CK-IIによるリン酸化を介してその生理活性が発揮されていることが示唆された。

3aI07

ラン藻のグループⅠイントロンをもつロイシンｔＲＮＡ遺伝子のマッピング：*Synechococcus* PCC 6301と*Synechocystis* PCC 6803の物理地図

杉田 護1、羅 麗君1、金子貴一1,2、松林 徹1、杉浦昌弘1,2（1名大・遺伝子、2かずさＤＮＡ研究所）

ラン藻*Synechococcus* PCC6301からグループⅠイントロンをもつロイシンｔＲＮＡ遺伝子を単離した。同遺伝子は34 bpの5'エキソン、240 bpのグループⅠイントロンと50 bpの3'エキソンからなる。ロイシンｔＲＮＡ遺伝子の上流74 bpに74コドンのＯＲＦが存在することを見いだした。その推定アミノ酸配列はラン藻 *Synechocystis* PCC6803の無機炭素輸送に関与する遺伝子*ictA*産物のそれと66.2%のアミノ酸が同一であることから、このＯＲＦを*ictA*と同定した。ロイシンｔＲＮＡ遺伝子を含むいくつかの遺伝子を別に作製した*Synechococcus* PCC 6301と*Synechocystis* PCC 6803ゲノム地図上にマップした。

3aI08

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC6301の低分子RNAの解析

渡辺恒暁、杉田　護、杉浦昌弘
（名古屋大学遺伝子実験施設）

我々は、単細胞性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC6301 の全RNAをショ糖密度勾配遠心法およびゲル電気泳動で分画し、4種類の低分子RNAを単離した。そのうち約200nt と約440nt の低分子RNAについて、Donis-Keller 法により、5'末端塩基配列を決定した。その配列をもとにプローブを合成し、ゲノムライブラリーから低分子RNAをコードするクローンを単離し、DNAの塩基配列を決定した。ホモロジー検索の結果、これらの遺伝子は既知のどの低分子RNAとも相同性が見られず、ラン藻に特有の新しいRNA分子種であることが示唆された。そこで、生体内の機能を調べるために、それぞれの遺伝子破壊株を作成し、表現型を解析した。

3aI09

タバコ核内RNA結合蛋白質RZ-1 とその複合体の解析

花野　滋、杉田　護、杉浦昌弘
(名古屋大学遺伝子実験施設)

タバコRZ-1は、RNA結合ドメインとZnフィンガーモチーフをもつRNA結合蛋白質である。我々は、昨年の本大会で、RZ-1が核に局在することを報告した。今回、RZ-1の機能を明らかにする目的で、タバコ培養細胞BY-2から核を単離し、グリセロール密度勾配遠心法を用いて、RZ-1が核内で複合体を形成しているかどうかを調べた。その結果、RZ-1は約50Sの大きさをもつ分子として存在することが明らかになり、RZ-1が核内でほかの蛋白質やRNA成分と複合体を形成している可能性が示唆された。そこで、RZ-1複合体に含まれるRNAや蛋白質成分についてさらに解析したので合わせて報告する。

3aI10

***IN VITRO* TRANSCRIPTION OF PLANT RNA POLYMERASE I-DEPENDENT rRNA GENE IS SPECIES-SPECIFIC**

Hao FAN, Kimitaka YAKURA[1], Masako MIYANISHI[1], Mamoru SUGITA and Masahiro SUGIURA, Center for Gene Res. Nagoya Univ., Nagoya 464-01, [1]Dept. Biol., Fac. Educ., Kanazawa Univ., Kanazawa 920-11, Japan

An *in vitro* transcription system derived from tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultured BY-2 cell nuclei, that has recently been developed (Fan & Sugiura, EMBO J. in press), supports transcription of the RNA polymerase I-dependent tobacco rRNA gene. The transcription initiation site determined *in vitro* was found at residue A which corresponds to that lying within the consensus sequence surrounding plant pre-rRNA putative initiation sites. The tobacco rRNA gene is actively transcribed in the tobacco nuclear extract while the broad bean rRNA gene is inactive in the heterologous system, indicating that plant RNA polymerase I-dependent transcription is species-specific.

3aI11

DEVELOPMENT-DEPENDENT TRANSCRIPT ACCUMULATION RESULTS FROM DIFFERENT PROMOTER ACTIVITIES IN TOBACCO PLASTIDS

Sanjay KAPOOR, Antonio VERA and Masahiro SUGIURA
Center for Gene Research, Nagoya Univ., Nagoya 464-01.

During transition from proplastid to chloroplast the transcript levels of several genes undergo dramatic increase. Though this increase in the levels of transcripts has been shown for several genes, ambiguity still exists about the level at which regulatory controls act to affect this phenomenon, be it gene copy number, RNA polymerase activity, stability of transcripts etc. In the present investigation, we demonstrate that the development-dependent differential usage of promoters might play a significant role during plastid differentiation. Besides the promoter regions with typical chloroplast -10 and -35 motifs, we have found two novel promoter regions, upstream of *atp*B and 16s rRNA genes, in tobacco chloroplasts. The -10 and -35 regions of these promoters are distinctly different from the chloroplast consensus -10 and -35 motifs but interestingly, these regions show considerable homology among each other. Unlike usual (consensus-type) promoter regions the relative levels of transcripts initiating from these promoters do not differ among total RNA populations of tobacco leaf chloroplasts and proplastid-containing BY-2 cells. Therefore, we propose that these two promoter regions might belong to a set of promoters which are responsible for the basal transcription activity in the proplastids, whereas, during plastid differentiation into chloroplasts a different set of promoters are utilized by the transcription machinery.

3aI12

サイトカイニンとＡＢＡをシグナルとするトウモロコシ *C4Ppc1* の発現制御機構の解析

大川泰一郎[1]、武井兼太郎、杉山達夫（東京農工大・農[1]、名古屋大・農）

トウモロコシ葉のＣ４型PEPCase 遺伝子(*C4Ppc1*) の発現は、 窒素栄養に応答して選択的に誘導される。 葉肉細胞の核にコードされているこの遺伝子の発現誘導には、 主に根で合成されることが知られているサイトカイニンが不可欠である。 このことは窒素に応答して根のサイトカイニン量が増加し、葉に運ばれ*C4Ppc1*の発現誘導をもたらす可能性が考えられる。 またサイトカイニンにより*C4Ppc1*の転写活性はtransient であることから、いくつかの光合成遺伝子の誘導を抑制するABAが負のシグナルとして関係することが考えられる。 本研究では、窒素に応答した *C4Ppc1* 発現の植物ホルモンを介したシグナル伝達経路を明らかにするために、根、葉の内生の サイトカイニンがどのように変化するのか、また、サイトカイニン を正のシグナルとする *C4Ppc1*発現の誘導にABA が負のシグナルとして作用するかどうか解析した。窒素欠乏状態から硝酸投与による窒素回復の過程で、 根の遊離型サイトカイニンである ゼアチン（Z）、リボシルゼアチン（RZ）は増加し、とくに量的にも多いRZが著しく増加した。このことから、 窒素に応答して根の内生のサイトカイニンレベル が 高まることが確かめられた。 窒素欠乏状態の切断葉にZ、ABAをそれぞれ与え 、run off assay による 単離核の転写活性の測定を行った結果、*C4Ppc1*の転写活性は Zにより上昇し、ABAにより抑制された。Zによるこの遺伝子の転写活性の上昇は、Z処理 1ｈ後の ABA 処 理により完全に抑制されることから、ABA はサイトカイニンによる*C4Ppc1*の遺伝子の発現誘導に対して負のシグナルとして作用することがわかった。 現在、葉内の内生サイトカイニン、ABA レベルとPEPCase遺伝子の転写活性との関係およびサイトカイニン依存の*C4Ppc1*転写のシグナリング成分を解析中である。

3aI13

植物の窒素トランスポーター・ファミリーに相同性を示す緑葉の光誘導遺伝子

高橋　正昭（大阪府大・農・応用生化）

植物には光合成の機能や、昼夜などの環境変化に対応するために光誘導される遺伝子がある。光照射開始後数時間して葉で合成されるmRNAの１つは484アミノ酸を含むをコードする。8箇所の膜貫通領域をもつこの疎水性タンパク質は、最近明らかにされた高等植物のシンクの組織に特異的な硝酸、または、ヒスチジン・トランスポーターと、アミノ酸配列にホモロジーを持つことが明らかになった。本実験では、大腸菌で発現させたタンパク質に対して作成した抗体を用いて、植物体内での局在の組織特異性を調べ、また、酵母を形質転換して細胞膜に発現させたこのトランスポーター様タンパク質の機能を調べた。p*Mal*に挿入して大腸菌内で合成されたタンパク質に対して作成し、アフィニティー精製した抗体は葉緑体の60 kDaタンパク質に反応した。アミノ酸配列から推定されるサイズの一致は、この遺伝子産物が葉緑体に局在していることを示す。Nのトランスポーターとのホモロジーより、この膜タンパク質の機能を調べるため、*Saccharomyces cereviciae*をp*AA5*プラスミドを用いて形質転換し、このタンパク質を細胞膜に持つ酵母の、類縁のN化合物に対する輸送活性について検討した。

一般講演

第3日　3月30日（木）　午後の部

A会場　細胞骨格
B会場　遺伝子操作
C会場　光合成（8）
D会場　光合成（9）
E会場　細胞壁（3）
F会場　代謝（2）
G会場　環境応答（5）
H会場　遺伝子発現（7）
I会場　遺伝子発現（8）

3pA01

タバコ懸濁培養細胞 BY-2 を用いた微小管構築に関わるタンパク質の解析

熊谷　史 、 高橋　陽介 、 室伏　拡 、 馳沢　盛一郎、長田　敏行　（東京大学　理学系研究科）

表層微小管は植物細胞の形の決定に重要な役割を果たしていると考えられているが、その構築には未だ不明な点が多い。我々は、高度に同調化させたタバコ BY-2 細胞の M/G1 期における微小管形成過程の追跡により、表層微小管構築過程の動態を明らかにしてきた。また、このときの微小管の構造と挙動を共にしている 49-kDa のタンパク質はウニ中心体由来の 51kDa タンパク質と免疫学的に交差するが、この 51kDa タンパク質の抗体を用いて単離された cDNA は真核生物の EF-1α と極めて高い相同性を示すことがわかった。

現在、新たに作成した 49-kDa タンパク質のポリクローナル抗体を用いて *in vitro* での微小管形成におけるこのタンパク質の役割を解析しているので、その結果を踏まえて、表層微小管の構築機構について考察する。

3pA02

ジャスモン酸による馬鈴薯塊茎細胞の表層微小管の配向変化

高橋 淳, 藤野介延, 喜久田嘉郎, 幸田泰則 (北大・農・植物)

植物細胞の肥大方向は、細胞壁最内層のセルロースミクロフィブリル(MF)の配向により規定され、MFの配向は、細胞の表層微小管(MT)の配向により制御されると考えられている.

我々は、これまでの本大会において、ジャスモン酸(JA)が馬鈴薯塊茎組織片の細胞を著しく肥大させること、同過程において、細胞のショ糖含量と細胞壁構成成分の含量が顕著に増加すること、セルロース合成阻害剤や細胞骨格阻害剤はJAによる細胞肥大を阻害すること等を報告してきた. これらのことは、JAによる細胞肥大に、細胞壁合成および細胞骨格が密接に関与することを示唆するものである.

今回、馬鈴薯塊茎組織片の細胞のMTの配向に及ぼすJAの影響を検討した. 抗α-チューブリン抗体、FITC標識二次抗体を用いて組織片を蛍光染色した結果、0タイムの組織片では、MTを確認できる細胞が少なく、確認できる細胞では、その配向に規則性が見られなかった. JA処理後1日目では、MTが培地接触面と平行に並んでいる細胞の割合が多く、2日目以降に顕著に見られる細胞肥大の伸長軸と直角に配向していた. 一方、無処理区では、MTの配向に規則性が見られなかった.

上記実験結果から、JAは細胞の表層微小管の配向を制御し、細胞の伸長方向を規定した後、旺盛な細胞壁構成成分の合成を誘導して、著しい細胞肥大をもたらしているのではないかと考えられた.

3pA03

細胞膜に存在する特異的チューブリンを含むリング状構造物

二木杉子、　水野孝一　（大阪大・理・生物）

アズキ上胚軸の細胞膜には二次元電気泳動で細胞質チューブリンとは等電点が大きく異なる特異的なチューブリンが存在し、IAA+GA_3 処理による伸長生長の促進と共にこの細胞膜チューブリンの isoform が変化する。この細胞膜チューブリンがリング状をした構造物のなかに組み込まれていることは免疫電顕の観察から推測された。リング状構造物は Ca^{2+} とUDP-glucose の存在下で大量の多糖繊維を形成する。in vitro での多糖繊維合成はセルロース合成阻害剤である 2,6-DCBN により阻害効果が確認できなかった。また、β-1,3-glucanase 処理により大部分の多糖繊維が消失したが断片化した一部の繊維が残存した。この短い繊維はセルラーゼ処理によりたちまち消失した。以上の事実より形成される繊維の大部分はβ-1,3-glucan であるが一部はセルロースである可能性が考えられる。このことは、リング状構造物が terminal complex である可能性を示唆すると思われる。このリング状構造物を構成するタンパク質に対する抗体がいくつか得られたのでこれらの細胞内分布や細胞壁形成に対する影響を報告したい。

3pA04

特異的チューブリンを有する細胞膜以外の膜系

水野孝一、二木杉子　（大阪大・理・生物）

アズキ上胚軸切片組織のチューブリンを二次元電気泳動で分析すると二群に分けることができる。酸性側に等電点を有するグループ（A）は可溶性のいわゆる細胞質微小管を構成するものであるが、これらより塩基性側に大きくずれた等電点を有するグループ（B）は膜系に組み込まれたものであると考えられる。アズキ上胚軸切片は IAA により伸長するが GA_3 添加でさらに著しく促進される。このような IAA+GA_3 処理切片では処理後約4時間でグループ（B）のチューブリンは消失してしまう。細胞膜に組み込まれたチューブリンはグループ（B）に属するがその含量は相対的に少量でありまたホルモン処理で消失することはないのでグループ（B）のチューブリンの大部分は他の膜系に存在するものと推測された。しょ糖密度勾配遠心で分画すると主に液胞膜と思われる膜系に存在することがわかった。ホルモン処理による伸長生長や抗微小管剤による細胞肥大などの現象を考えると、液胞膜のチューブリンは水チャンネルの制御因子として働いているのではないかと考えられる。

3pA05

担子菌ヒトヨタケ二核菌糸の対合分裂及び先端成長におけるアクチンの役割

田部　茂，鎌田　堯　（岡山大・理・生物）

先端成長は、菌類の最も基本的な成長様式である。担子菌ヒトヨタケは、２核が対合分裂を繰り返しながら先端成長する。間期の二核菌糸では２核は約20μmの距離を保っているが、分裂期に入ると２核は互いに接近し、クランプ形成を伴う対合分裂を行う。本研究では、ヒトヨタケの二核菌糸の成長・対合分裂に伴って、アクチンがどのように挙動するかを免疫蛍光法を用いて調査した。

間期には、菌糸先端にアクチンが局在し、アクチンキャップを形成していることが知られている。しかし、２核の接近する前期初めに、核の周辺にアクチンが集合し、クランプの形成開始とともに消失するという新たなアクチンの局在が本研究で明らかになった。また、核周辺へのアクチンの集合時に、アクチンキャップが非常に薄くなっていることがわかった。前期から中期にかけては、形成中のクランプ細胞の先端にアクチンキャップが、終期には、隔壁形成予定部位にアクチンリングが一時的に現れるが、これらの時期には菌糸先端のアクチンキャップは存在していた。この細胞周期の進行に伴って、先端成長の速度が変動していることがわかった。

3pA06

オオセキショウモの原形質流動モーター蛋白質活性

高木慎吾、横田悦雄[1]、新免輝男[1]、永井玲子（大阪大・理・生物、[1]姫路工業大・理・生命科学）

淡水産の単子葉植物オオセキショウモの葉肉細胞では、原形質流動の誘発・停止がフィトクロムと光合成系色素とによって協働的に制御されている[1)]。赤色光連続照射による流動誘発時には、細胞質基質のカルシウム含量が減少し、近赤外光照射による流動停止時には増加する[2)]。暗所で細胞をA23187処理すると、原形質流動は細胞外液のCa^{2+}濃度が10^{-6}M以下の時に誘発・維持され、10^{-5}M以上では停止する[3)]。原形質流動の軌道は、細胞膜直下に敷設された微小繊維の束状構造体である[4)]。そこでF-アクチンと相互作用するモーター蛋白質の探索を行なった。葉組織を破砕後、超遠心上清分画に骨格筋F-アクチンを加え、共沈殿分画からＡＴＰ添加によって解離する成分を、ヒドロキシルアパタイトカラムにより濃縮した[5)]。最終粗分画は、ＡＴＰに依存したin vitroでのF-アクチンの滑り運動を起こす活性を示した。この運動は、10^{-5}M以上のCa^{2+}濃度で阻害された。

1)Takagi et al. (1990) Plant Physiol. 94:1702
2)Takagi, Nagai (1985) Plant Cell Physiol. 26:941
3)Takagi, Nagai (1986) Plant Cell Physiol. 27:953
4)Takagi, Nagai (1983) J. Cell Sci. 62:385
5)Yokota, Shimmen (1994) Protoplasma 177:153

3pA07

ユリ花粉管からの135-kDaアクチン結合タンパク質の単離

高原啓一郎、横田悦雄、新免輝男　（姫路工大・理・生命）

アクチン繊維の形態は機能に応じてダイナミックに変化する。このような形態変化、あるいは細胞内での重合、脱重合などの調節は、アクチンそのものの性質によるのではなく、アクチン調節タンパク質を介して行われている。しかし植物細胞において、プロフィリン以外のアクチン調節タンパク質に関しては全くわかっていない。花粉内では花粉管の伸長過程において、アクチン繊維の形態が様々に変化することが知られている。従ってアクチン繊維の形態変化の調節機構あるいはそれを担っているアクチン調節タンパク質を研究するには適した材料である。我々はユリ花粉管から、ニワトリ胸筋より調製したF-アクチンを用いた共沈法とカラム操作により分子量135-kDaのアクチン調節タンパク質を精製した。このタンパク質はニワトリ胸筋から調製したF-アクチンに結合し、ATPあるいはCa^{+2}が存在してもF-アクチンから解離しなかった。また135-kDaタンパク質に対する抗体は、ユリ花粉管の粗抽出画分中の他の成分とは反応しない。これらの結果は、このタンパク質が花粉管ミオシン重鎖あるいはその分解産物では無いことを示す。またF-アクチンは135-kDaタンパク質により束化された。従ってこのタンパク質はアクチン調節タンパク質の中の束化因子のカテゴリーに分類されると考えられる。以上の結果から135-kDaタンパク質は、花粉管内に存在するアクチン繊維の束構造を形成する因子であると思われる。

3pA08

高等植物細胞内における170-kDa重鎖からなるミオシンの同定と局在

横田悦雄，R. McDonald[1]，B. Liu[1]，B. A. Palevitz[1]，三村徹郎[2]、新免輝男（姫路工大・理・生命，[1]ジョージア大・植物，[2]一橋大・生物）

原形質流動は、細胞内の小器官や物質等の輸送を担っており、その流動力の発生には多くの場合アクチン-ミオシン系が関与している。我々は、ユリ花粉管から170-kDa重鎖からなるミオシンを単離した。同様なミオシン分子種が他の高等植物にも存在し原形質流動に関与していることを170-kDa重鎖に対する抗体を用いたイムノブロット法及び間接抗体法を用いて調べた。ニチニチソウ培養細胞から、部分精製した運動活性を有するミオシン画分あるいは粗抽出画分には、抗ミオシン抗体と特異的に反応する分子量170-kDa成分が検出された。またツユクサ花粉管、シロイロナズナの葉茎及び培養細胞、タバコの花粉管及び培養細胞(BY-2細胞)から調製した粗抽出画分にも抗体と特異的に反応する170-kDa成分が存在していた。更に間接抗体法により170-kDa成分の細胞内の局在を解析した結果アクチン繊維上に分散している細胞小器官に170-kDa成分が主に存在していることが明らかになった。面白いことにユリ、タバコの花粉管では、細胞小器官の他に、花粉管の先端部に170-kDa成分の偏在が観察された。これらの結果から、170-kDa成分を重鎖とするミオシン分子種が広く高等植物細胞内に存在し、原形質流動の力発生に関与しているモーター分子であることが示唆された。

3pB01

シロイヌナズナの染色体の特定領域に由来するcDNAライブラリーの解析

林田信明，鷲見芳輝[1]，和田忠士[1]，半田宏[1]，篠崎一雄（理研・植物分子生物、[1]東工大・生命理工）

モデル植物であるアラビドプシスでは，ゲノム上の詳細な連鎖地図の作成やコンティグの作成，YAC，コスミッドおよびP1ファージベクターを用いたライブラリーの作成が行なわれ，ゲノムの構造解析や，遺伝子歩行のための環境が整備されつつある。このような背景の下に，特定のゲノム領域に由来するcDNAを体系的かつ効率的に選択する方法の必要性が指摘されている。前回の本学会で我々は，ラテックス粒子に共有結合したアラビドプシス由来のYACのDNAを用いて，PCRによって増幅したcDNAを選択することにより，染色体の領域特異的なサブライブラリーを作成する試みを報告した。本発表では，アラビドプシスの第５染色体にマップされる125kbpのYACクローンEG10D9を用いて作成したサブライブラリーについて、そこから回収したcDNAクローンの解析結果を報告し、その解析法も含めてラテックス粒子を用いる方法の実用性について議論する。

3pB02

クロモソームウォーキング法による遺伝子のクローニングを簡便化するＴｉ－プラスミド自動変換ラムダファージベクターシステム

布施拓市、児玉浩明、林田信明[1]、篠崎一雄[1]、西村光雄、射場　厚（九州大・理・生物、[1]理研・植物分子）

最近、ＲＦＬＰなどの連鎖地図に基づいた遺伝子のクローニングがシロイヌナズナを実験材料にして行われるようになった。この技法においては、最終のクローニングのステップで、標的とする遺伝子座に対する相補性の検定を、突然変異株に対して行なわなければならない。この相補性の検定を簡便化するために新しいラムダファージベクターシステム（λＴＩ）を作製した。このシステムには、Cre-*lox* site-specific recombinationを利用して、ラムダファージを植物体にそのまま導入可能なＴｉ－プラスミドに自動的に変換することができる。λＴＩベクターで作製したゲノムライブラリーやcDNAライブラリーは標的とする遺伝子が存在する酵母人工染色体（YAC）DNAを直接プローブとして用いてスクリーニングすることが可能であり、得られたポジティブクローンを直接突然変異株に導入することができるので、今後、相補性の検定を簡便化する強力な手段の１つになるであろう。

3pB03

シロイヌナズナおよびトウモロコシにおける誘導可能な部位特異的組換え系の開発

丹羽康夫，小林裕和，Jen Sheen[1]（静岡県大・食品栄養科学，[1]Dept. Mol. Biol. Mass. General Hospital）

パン酵母が保有する２μプラスミド上には，FLP/FRTと呼ばれる部位特異的組換え系がコードされている．FRT部位は，FLPと名付けられた48 kDaの組換え酵素の基質となる．FLPを介して，任意の細胞で特定の遺伝子を活性化あるいは不活性化することができれば，発生過程の解析の有用な手段と成り得る．また，致死的な遺伝子を特定のステージ以降において発現させることも可能となる．FLPの組換え活性を，ルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標として確認した．すなわち，5' から3' に向かって，カリフラワーモザイクウイルス35SRNAプロモーター-FRT配列-β－グルクロニダーゼ遺伝子-FRT配列-ルシフェラーゼ遺伝子という構造のプラスミドを作成した．ここで用いたルシフェラーゼ遺伝子は，FLPにより組換えが起こらないと発現しない．他方，シロイヌナズナの熱ショックプロモーターの制御下に置いたFLP組換え酵素遺伝子を作成し，FRTにより不活性化されたルシフェラーゼ遺伝子とともに，シロイヌナズナ葉とトウモロコシ葉肉細胞プロトプラストに導入した．いずれの細胞においても，ルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導は，熱処理に依存したものであった．現在，上述した２つのキメラ遺伝子をシロイヌナズナに導入し，染色体上に組み込まれた場合でも熱誘導による組換えが起きるか否かを検討している．

3pB04

Saccharomyces 属酵母における２つの複製起点を有する環状プラスミドの形質転換能

久冨泰資，和田裕，壺井基夫（福山大・工・生物工学）

私達の研究室では、*Saccharomyces* 属酵母における種の分化機構を明らかにすることを目的に、２種の酵母（*S. cerevisiae*, *S. exiguus*）を材料に用いて、それらのゲノムや遺伝子の比較解析を行っている。私達は、*S. cerevisiae* のマーカー遺伝子や複製起点をいろいろな組み合わせで連結し、*S. exiguus* の栄養要求性突然変異体に対して形質転換実験を行って、以下の実験結果を得ている。①*S. cerevisiae* の*LEU2* 遺伝子、染色体DNAの複製起点(ARS)、2μmプラスミドのオリジンをそれぞれ単独で有する環状プラスミドは、*S.exiguus* 細胞に対して高い形質転換能を示す。②上記の断片を同時に２つ有する環状プラスミドは、*S. exiguus* 細胞に対して非常に低い形質転換能しか示さない。

これらの結果は、１つの環状プラスミド上に２個の複製起点が存在するdiARSプラスミドでは、その複製機能が阻害されること（diARS効果）を示唆している。

そこで、この現象を*S. cerevisiae* で検証する目的から、*S. cerevisiae* の複製起点を２個有する環状プラスミドを作製し、*S. cerevisiae* 細胞に対して形質転換実験を行った。その結果、diARSプラスミドは、通常のmonoARSプラスミドに比べて、著しく形質転換能が低下することが明らかとなった。

3pB05

ラン藻 Phormidium lapideum におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現

芦田裕之、小暮寿実子[1]、中川　強、澤　嘉弘[1]、落合英夫[1]
（島根大・遺伝子実験施設、[1]農・応用生物機能）

ラン藻（シアノバクテリア）は酸素発生型の光合成を営むことのできる原核生物である。近年、様々な遺伝子がラン藻より単離され、その遺伝子構造が解明されている。

本研究では、広くレポーター遺伝子として用いられているルシフェラーゼ遺伝子を発現させることにより、ラン藻の遺伝子発現制御機構を解明することを目的としている。

Phormidium lapideum と同じLPPグループに属する糸状性ラン藻 Phormidium foveolarum 由来プラスミド pPF1と、カナマイシン耐性遺伝子を持つ大腸菌ベクター pHSG298 を用い、シャトルベクターを構築した。さらに、このシャトルベクターにホタル由来（luc）および発光細菌由来（luxAB）のルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、ラン藻の形質転換を行った。形質転換法としてはエレクトロポレーション法を用いた。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、ルミノメーターによる経時的測定により確認した。

この結果、コントロールにくらべ３－５倍高い発光値を示す形質転換体が得られた。しかし、その発現は一過性のものであり、数日後では発光はみられなかった。また、これらの形質転換体から全ＤＮＡを抽出し、ＰＣＲ法を用いた遺伝子増幅により遺伝子断片が導入されていることを確認した。

3pB06

光感受性ラン藻変異株によるゼニゴケ葉緑体未同定遺伝子*orf320*の機能解析

李 根植[1]、福澤秀哉[1]、蔡 晃植[2]、磯貝 彰[2]、大山莞爾[1,2]
（[1]京大・農化，[2]奈良先端大・ﾊﾞｲｵｻｲｴﾝｽ）

これまで数種の葉緑体ゲノムの全構造が決定されているが、機能が不明な遺伝子が残されている。本研究ではラン藻を葉緑体のモデル生物としてとらえ、ゼニゴケ葉緑体未知遺伝子*orf320*の機能解明を目的とした。

Synechocystis PCC6803株から、*orf320*と相同な遺伝子*orf334*をクローン化し、そのコード領域にカナマイシン耐性遺伝子を挿入して遺伝子破壊を行った。野性株が正常に増殖する光照射下(32 $\mu Em^{-2}sec^{-1}$)でこの変異株は、クロロフィルが極度に減少し、コロニーの白色化が観測された。弱光条件下(3$\mu Em^{-2}sec^{-1}$)で生育した変異株の酸素発生速度は約25％に、呼吸速度は約50％に低下していた。細胞からポルフィリン画分を抽出し分析したところ、変異株ではプロトポルフィリン IXの含量が野生株の1.5倍に増加していた。以上の結果から、この変異株ではヘム生合成経路の傷害が示唆された。

3pB07

光合成細菌分泌ベクターの開発によるヒト･チトクロムc_1の発現

熊谷浩高[1]、佐伯和彦[1]、鈴木　寛[2]、小澤高将[2]、松原　央[3]
（[1]阪大･理･生物、[2]名大･医･生化第二、[3]岡山理大･理･生物化学）

チトクロムc_1はミトコンドリア複合体IIIのサブユニットとして呼吸鎖電子伝達系の重要な構成成分である。本研究では光合成細菌*Rhodobacter capsulatus*を宿主としたヒト・チトクロムc_1発現系の構築を試みた。すなわち、多種のc型チトクロムを恒常的に発現する、*R. capsulatus*を宿主として、チトクロムc_2遺伝子*cycA*のプロモーター部分及び分泌シグナル コード部分をもつベクターを構築し、ヒト･チトクロムc_1の成熟タンパク質さらにヒト・チトクロムc_1 C末端の疎水的領域を欠く改変体のペリプラズム局在タンパク質としての発現を検討した。

まず，チトクロムc_2分泌シグナルと大腸菌の*phoA*との融合遺伝子を含むプラスミドを作製し、ベクター機能の有効性を確認した．次にこのベクターにヒト・チトクロムc_1のcDNAから成熟タンパク質コード領域，及びC末端の疎水的領域コード部分直前に終止コドンを導入するようにPCR増幅した断片をそれぞれサブクローニングし，pHKS22とpHKS23を作製した．これらを*R. capsulatus*に導入し、菌体総タンパク質を試料としてWestern解析を行った結果，抗ヒト・チトクロムc_1血清と反応するそれぞれ特有のバンドを検出できた．そこで、pHKS23を含む*R.capsulatus*株のペリプラズム分画を調製して部分精製を試み、還元-酸化差スペクトルで553nm及び523nmにピークを示す分画に、抗ヒト・チトクロムc_1血清と強く反応するポリペプチドが濃縮されることを確かめた．従って，C末端短縮型の組換タンパク質はペリプラズムで発現していることが示された．

3pC01

高CO_2生育条件下におけるC_3,C_4植物の炭素代謝関連酵素活性の変動

柄澤英治、金井龍二　　（埼玉大・理・生化）

高CO_2環境（600 ppm程度）において高等植物がどのような影響を受けるかを調べる研究は多い。しかし、われわれはより高濃度のCO_2条件下における植物の応答を知るため、C_3植物とC_4植物それぞれ3種類を高CO_2（1％CO_2）条件下で2-3週間生育させて、光合成および光呼吸関連酵素、さらに活性酸素消去系の酵素活性を測定し、同じ光・温度条件下に大気中で生育させたコントロール植物との比較を行った。

C_3植物オオムギでは、高CO_2による生育速度、クロロフィル量、可溶性タンパク質量の変化は見られなかった。活性の顕著な変動を示した酵素はカタラーゼで、処理後1～2日で急減し、1週間後にはコントロールの約50％にまで低下した。その他の光呼吸グリコール酸経路の酵素、カルビン回路の酵素（RuBP-カルボキシラーゼ、$NADP^+$-グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ）およびグルタチオンレダクターゼの活性に大きな変化は見られなかった。

C_4植物ソルガムでも、高CO_2によるクロロフィル量、可溶性タンパク質量の変動は少なかったが、後半では生育の遅れが見られた。カタラーゼ活性は、コントロールの80-60％にまで低下し、グルタチオンレダクターゼ活性は増加する傾向があった。C_4ジカルボン酸経路の酵素では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性はコントロールの70-60％に低下したが、$NADP^+$-マリックエンザイム活性は変化しなかった。

一方、オオムギおよびソルガムを高O_2（63-65％O_2, 500-550 ppm CO_2）条件下でも生育させたが、カタラーゼ活性に大幅な変動は見られなかった。

高CO_2によるカタラーゼ活性の低下は、その他のC_3植物（コムギ、イネ）やC_4植物（キビ、ギニアグラス）でも見られたので、高等植物で広く見られる現象であると思われる。

現在、各植物のカタラーゼ・アイソザイムを電気泳動により分離し、高CO_2条件下でどのような影響を受けるかを調べている。

3pC02

通性CAM植物 *Mesembryanthemum crystallinum* のC$_3$型とCAM誘導植物における葉肉細胞葉緑体ピルビン酸取り込み活性の比較

山下 卓、是枝 晋、金井龍二　（埼玉大・理・生化）

通性CAM植物 *Mesembryanthemum crystallinum* L.（アイスプラント）は、高濃度のNaCl添加による水分ストレスによってC$_3$型光合成からCAM (Crassulacean Acid Metabolism) 型光合成に転換する。CAM型葉肉細胞葉緑体内ではピルビン酸からホスホエノールピルビン酸（PEP）を生成するピルビン酸・リン酸ジキナーゼ活性が高くなることが知られているが、CAM誘導されたアイスプラントでは、ピルビン酸を葉緑体内に取り込む過程が不明である。しかし、C$_3$植物の葉肉細胞葉緑体には、光に依存したピルビン酸の能動輸送系があることが知られている。そこで、われわれは、C$_3$型およびCAM型アイスプラントの無傷葉緑体による、暗所および光照射下でのピルビン酸取り込み活性を測定し、比較検討した。

発芽後6－7週間 水耕培地（20mMNaClを含む）で成育させたアイスプラントを、350mMNaClを含む培地に移して塩ストレスをかけた。約2週間後、CAM誘導の指標となる夜間の炭酸固定酵素PEP-カルボキシラーゼと昼間の脱炭酸酵素NADP-マリックエンザイムの葉生重量あたりの活性は、塩ストレスをかけていないC$_3$型植物体に比べ、それぞれ、45倍、10倍に上昇していた。

これらのC$_3$型、CAM型植物体それぞれの葉肉細胞プロトプラストから葉緑体を単離し、フェリシアナイドテストにより平均95%以上が無傷であることを確かめた。シリコンオイル層遠心法を用い、これらの葉緑体に暗所または光照射下で[^{14}C]ピルビン酸を与え、30秒間の取り込みを測定したところ、C$_3$型植物の葉緑体では、光照射の有無にかかわらずピルビン酸取り込みがほとんど見られなかった。それに対し、CAM型植物の葉緑体では、暗所でわずかなピルビン酸取り込みが見られ、この取り込みは光照射により約4倍に促進された。

以上の結果は、*Mesembryanthemum crystallinum* のCAM誘導に伴ってその葉緑体には光依存性のピルビン酸取り込み活性が誘導されていることを示す。

3pC03

ベンケイソウ型酸代謝のリンゴ酸輸送-脱炭酸系の概日リズム

荒田博行、古谷陽子、西村光雄（九大・理・生物）

CAM植物は、夜間 phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP-C) により CO_2 を固定し、リンゴ酸にして液胞にたくわえる。昼間は気孔を閉じて液胞のリンゴ酸を脱炭酸し、カルビン回路による光合成の炭素源としている。CAMの特徴的な一日を周期とするリズムは、昼夜の環境の変化のない恒常条件でも持続する。この概日リズムを形成する機構として現在知られているのは、PEP-Cのリン酸化である。私たちは、PEP-C以外にも内在性の計時機構によって制御されている過程はないのかどうか、特にリンゴ酸の液胞からの排出、脱炭酸の過程に焦点を当てて調べた。*Kalanchoë daigremontiana* は、CO_2 のない環境でも、リンゴ酸の脱炭酸により得られる CO_2 を用いて光合成を行い、酸素を発生する。CO_2 のない条件下での酸素発生速度は夜は低く、朝になると高くなる。このリズムは連続明条件でも持続した。また、同じ条件下で見られる液胞のリンゴ酸濃度やpHのリズムと比較した場合、リンゴ酸濃度が極大になった（pHが極小になった）後に CO_2 に依存しない酸素発生の極大があらわれる。このような結果は、リンゴ酸の輸送系か脱炭酸系も概日リズムによって制御されていることを示唆している。

3pC04

Source-sink モデル植物のsink-limit条件における光合成速度低下の機構に関する研究

山口輝、葛西身延、澤田信一（弘前大・理・生物）

ダイズ（Glycine max Merr.）の初生葉を用いて、一枚の葉と根だけからなる単純なソース・シンク・モデル植物を作成した。このモデル植物に連続照明下で光合成を行わせ、連続してソース能を持たせる事によって、シンク能を低下させた場合（シンク・リミット条件）葉の光合成速度は低下する。Sawadaら(1990,1992)は、このシンク・リミット条件下における光合成速度の低下が主にRuBPcaseの不活性化による結論した。

本研究では、シンク・リミット条件下で光合成速度の低下したモデル植物の周囲のCO_2濃度を高めることが（350-2600ppm）光合成活性とRuBPcase活性にどのように影響するかを検討した。

シンク・リミット条件下に置かれていた葉の光合成速度はCO_2濃度上昇に伴って増加した。また、不活性化していたRuBPcaseはCO_2濃度の上昇に伴って回復した。これらの結果はシンク・リミット条件下で光合成速度の低下した葉への高濃度CO_2投与がRuBPcaseの活性化に有効であることを示唆するとともに、シンク・リミット条件での光合成速度の低下の主な原因がRuBPcaseの不活性化によることを支持する。

Sawada et al. (1990) P.C.P. 31:697-704.
Sawada et al. (1992) P.C.P. 33:943-949.

3pC05

クロレラの光合成によるCO2利用機構のpH変動に対する適応

佐藤 朗、白岩善博（新潟大・理・生物）

3％CO2を含む空気を通気培養した単細胞緑藻*Chlorella regularis* C-533(東大分生研)を0.03％ CO2を含む通常の空気条件下に移すと、光合成のCO2に対する親和性の増大がみられた。一般に、微細藻類における低CO2条件への適応は、細胞内に無機炭素を蓄積するCO2濃縮機構と細胞外からRubiscoへのCO2供給速度を促進する働きをもつカルボニックアンヒドラーゼ（CA）の誘導によることが明かにされている。しかし、*Chlorella regularis*の場合、（1）低CO2条件への移行によるCO2濃縮活性の誘導は2.5倍程度で、CA活性の方がより大きく増大した。更に、このCAの誘導は、pH8では大きかったがpH5.5ではほとんど増大しなかった。また、（2）pH8で低CO2条件へ移行された場合でも、高CO2条件での培養がpH8であった細胞の方が、pH5.5であったそれに比べてCA誘導が高かった。一方、（3）高CO2条件で生育させた細胞（高CO2細胞）は、pH8とpH5.5のいずれにおいてもCA活性は非常に低かった。また、高CO2細胞の有するCAは、ほとんど細胞表面のCAであった。

（4）低CO2細胞の光合成の$K_{1/2}$（CO2）は、培養時のpHに依らずほぼ一定で、高CO2細胞のそれよりもはるかに小さかった。光合成のV_{max}は、低CO2条件への適応に伴い2－3割程度減少した。

以上より、光合成CO2利用機構の、低CO2条件に対する適応メカニズムが、外界のpHに応じて変化すること、および、アルカリ条件下では主にCAの誘導が、酸性域では他の未知の要因の誘導によることが明かとなった。

3pC06

円石藻の生育および光合成に及ぼす石灰化阻害剤(HEDP)の影響

西沢徹哉、檜原明子、小林寛、白岩善博（新潟大・理・生物）

CaCO3 結晶成長阻害剤 ((1-Hydrooxyethylidene) bisphosphonic acid, HEDP)を与えると円石藻*Emiliania huxleyi* および *Gephyrocapsa oceanica* におけるココリス(細胞表面に形成されるCaCO3殻)生成の阻害が見られた。しかしその時、細胞数の増加は1mM HEDP 添加により、*Gephyrocapsa* では抑制されたものの、*Emiliania* ではそれほど大きな影響は認められなかった。HEDPは、*Emiliania* の最大光合成速度には影響せず、*Gephyrocapsa* に於ても、僅か20%程度の阻害であった。一方、CO2 律速条件下では、*Emiliania* の場合、HEDP添加により1.3-1.5倍に光合成O2 発生が増大した。また、この促進は、低O2条件より高O2 条件において大きかった。石灰化能を有しない微細藻（*Chlamydomonas, Chlorella*）の光合成および生育は共に、石灰化を阻害する1mM程のHEDPによっては抑制されなかった。しかし、*Anabaena* に於ては、いくらかの阻害が見られた。但し、円石藻および*Anabaena* の場合、5 mMでは最大光合成速度が抑制されたことから、高濃度では、光合成系を阻害する効果のあること明かとなった。しかし、*Chlamydomonas* の光合成は10 mM HEDP存在下でも抑制されなかった。

細胞表面のココリスを酸処理して得た*Emiliania* のプロトプラストを培養し、その生育曲線を作成したところ、intact細胞と同じであった。また、NaHCO3に対する光合成のキネティックスも同様であった。以上から、細胞表面のココリスの有無は、*Emiliania* の光合成には影響を与えないことが、これらの影響は円石藻の種により異なることも明かとなった。

3pD01

光呼吸は光傷害防御のための重要な機構である

竹葉　剛、木崎暁子[1]（京府大・生科、[1]京大・農生）

光は光合成のエネルギー源であるが、同時に植物にとって光は極めて危険な存在でもある。光による傷害を防御するために、熱エネルギー消散機構・活性酸素消去系等、いくつかの機構が知られているが、光呼吸も光傷害防御の重要な機構であることが明らかとなった。

光呼吸を行う条件下で、酸素濃度を下げて光呼吸ができないようにすると、急速で強い光阻害が起こることが、クロロフィルの蛍光を観測することにより観察された。同じことは、光呼吸経路の阻害剤及びCalvin 回路の阻害剤存在下でも観察された。

C3 植物の中には、光呼吸能の高い植物（トマト・カボチャ等）と低い植物（キウリ・サラダナ等）とがある。前者には、光呼吸経路の鍵酵素の一つであるグルタミン合成酵素（GS2）含量が高く、後者は低い。これら植物の光傷害に対する耐性とGS2 含量との間には相関が認められる。また、GS2 を増強した形質転換タバコは光傷害により耐性である。

光呼吸の光傷害回避の機構は、CO_2 の供給が制限された条件下で、光呼吸（C2）経路とCalvin（C3）回路とが一つのC2/C3 回路を形成していると考えるとよく説明できる。

3pD02

熱帯植物オウゴンガジュマル生葉黄金化機構：デヒドロアスコルビン酸還元酵素活性の不全による葉緑体老化の促進

山崎秀雄，平敷（へしき）りか，崎浜靖子，池原規勝（琉球大・理・生物）

熱帯植物であるオウゴンガジュマル（*Ficus microcarpa* L. f. cv. Golden Leaf）の生葉は、弱光生育化では野生型と区別できない緑色葉であるが、強光生育下では特徴的な黄金葉を呈するようになる。本研究では、１）黄金化葉緑体の微細構造の特徴が加齢により生じる老化葉緑体のものと類似していること、２）オウゴンガジュマルでは葉緑体のアスコルビン酸再生系の不全（DHA還元酵素活性の欠損）による活性酸素除去系の失活（SODs, sAPX, MDA還元酵素、アスコルビン酸量）が強光環境条件で起こっていること等を報告する。高等植物の強光耐性機構における葉緑体DHA還元酵素の生理的重要性について考察する。

3pD03

リン酸欠乏ストレスのトウモロコシに及ぼす影響について、III.リンと窒素の移動－老化との関連において

臼田秀明　（帝京大学、医、化学）

トウモロコシをリン酸欠乏下（0.001mMPi）で生育させ、窒素とリン酸の地上部での移動について、コントロール（0.5 mMPi）と、播種後12－30日まで2日毎に比較した。結果は、地上部全体、あるいは、抽出したそれぞれの葉身とその他の部分（葉鞘、鞘葉、茎、未抽出の葉身）に分け、まとめた。（以下の括弧内の数字はコントロールに対する％である）。リン酸欠乏により、播種後30日で、地上部全体としては、新鮮重 (38)、Chl含量(Chl) (31)、全リン含量(TP) (5)、エステル化－リン含量(EP) (12)、酸可溶性リン酸含量(ASP) (1)、全窒素含量(TN) (38)、可溶性タンパク－窒素含量(SPN) (23)、不溶性タンパク－窒素含量(ISPN) (30)となった。若い葉身（第５葉）では、播種後30日で、新鮮重当たりの、ASP (4)は著しく低下したが、EP (46)、Chl (125)、TN (115)、SPN (85)、ISPN (105)にはあまり影響を与えなかった。一方、古い葉身（第２葉）では、播種後30日で、葉身当たりの、ASP (5)、EP (4)、Chl (9)、TN (42)、SPN (9)、ISPN (21)はいずれも大きく低下した。リン酸欠乏下で生育した植物の地上部全体のTPは実験期間中ほぼ一定であった。以上の結果から、リン酸欠乏により古い葉身からリンの移動が盛んに起こり、リン含量が極めて低くなり、葉身からの窒素の移動開始が早められ、老化が促進されたと考えられる。即ち、トウモロコシでは葉身のリン酸含量は葉身の老化をコントロールする要因の一つと結論された。この結果は、ダイズではリン酸欠乏が、葉の老化に影響を与えないという結果(Plant Physiol. 98: 1128-1132)と異なっている。それらについて考察する。

3pD04

高等植物における高温処理による光合成系の変化

山根由裕、菓子野康浩、小池裕幸、佐藤和彦（姫路工業大学・理・生命科学）

草本類が高温に曝されると、光合成系が最も強く影響を受けることが知られている。しかし光合成系が高温処理によってどの様な影響を受け、それがどの様な手段で観察できるかについては、あまり多くのことはまだ知られていない。

本研究ではホウレンソウを材料に、高温に曝した時及びそれを室温に戻した時に、それが葉緑体にどの様な影響を与えるのか、またそれが蛍光の種々の指標にどの様な変化をもたらすのかを中心に調べた。

生葉の温度を上げながら蛍光を測定すると、４４℃付近から急激にF_0が上昇（一部可逆的）したが、５６℃付近から減少に転じた。一方F_Mは３６℃付近から不可逆的に減少した。ところが無傷葉緑体では、F_0は３４℃付近から上昇し、５０℃付近から減少するという様に生葉と同様の傾向が見られたが、可逆性はなくなり、変化が始まる温度も低温側にシフトしていた。また、F_Mは生葉の場合と同様、３４℃付近から不可逆的に減少の一途をたどった。また生葉においては、３８～４０℃で３分照射後の蛍光強度がF_0を下回る過剰な消光が見られた。その他の蛍光指標においても色々な変化が観察された。これらの蛍光指標変化と葉緑体の高温による変化との関係について報告する。

3pD05

ラン藻 *Synechococcus* PCC7002およびダイズ培養細胞における光合成の高温耐性

西山佳孝[1,2]、林秀則[1]、渡辺正[2]、村田紀夫[1]　（[1]基生研、[2]東大・生産研）

高温に適応した植物およびラン藻では、光合成活性が高温に対しより耐性となる。ラン藻 *Synechococcus* PCC7002では、高温で生育した細胞から単離したチラコイド膜に、酸素発生の高温耐性が保持される。このチラコイド膜を低濃度のTriton X-100で処理すると高温耐性が失われるが、その際遊離した成分を膜に添加することにより高温耐性が回復する。昨年の本大会では、この回復に必要な成分の一つがチラコイド膜に存在するシトクロム*c*-550であることを報告した。また、シトクロム*c*-550は酸素発生の高温耐性を保持するのに必須の成分ではあるが、高温適応に伴う酸素発生の高温耐性にはシトクロム*c*-550以外の成分が直接関与していることが示唆された。現在、高温に適応した*Synechococcus* PCC7002のチラコイド膜から低濃度のTriton X-100により遊離する成分が、低温で生育した細胞のチラコイド膜に酸素発生の高温耐性を付与することを見い出しており、これに関する成分の単離、同定を進めている。

また、ダイズ培養細胞においても、培養温度の上昇に伴って酸素発生の高温耐性が獲得される適応現象を観察し、ラン藻に見られる光合成の高温適応との比較を進めている。

3pD06

種々の環境要因によるラン藻でのPSI/PSII量比の変化

村上明男・藤田善彦（基生研・細胞生物）

ラン藻*Synechocystis* PCC 6714のPSI/PSIIの量比はPSII励起光下での生育により高(PSI/PSII=3-4)、PSI励起光下での生育で低く(約1)なる。一方、PSIIとCyt *b*6-*f*複合体の量比(約1)は変化しない。また、Cyt oxidase活性はPSI含量の変動とパラレルに変化する。この光質による変化と同じ変化が他の生育条件を変えることによっても生起することを見いだしたので報告する。高いPSI/PSII量比をもたらす低CO_2条件はPSI量の増加を引き起こしており、同時にCyt oxidase活性も高めることが判った。また、高NaCl濃度(0.5M)下での生育はCyt oxidase活性の増強とともにPSI量の増加をもたらした。この変化は暗所で従属栄養的に生育した細胞でも見られた。これらのストレス下では循環電子伝達が増強されることから、光質の場合と同じストレスを電子伝達状態に与えることが考えられ、様々な光合成条件に対応したPSI/PSII量比の変動に共通の調節機構が存在することを示唆した。

3pD07

ラン藻 PsaA/B ペプチドの翻訳後制御

相澤 克則、藤田 善彦（基生研・細胞生物）

ラン藻 *Synechocystis* PCC6714 の場合、生育光質による光化学系 I (PSI) と系IIの量比の調節は、PsaA/Bペプチドの合成速度の変化による。既にPsaA/Bペプチドの翻訳制御が示唆されたが、今回は他の制御点の可能性も検討したので報告する。

PSI 光、PSII光で生育した *Synechocystis* PCC6714 細胞について翻訳活性を持つ PsaA/BペプチドのｍＲＮＡの含量を調べた所、有意な差は見られなかった。また、ｍＲＮＡ分解の半減期も、両細胞間でほぼ同一であった。従って、*psaA/B* の転写やｍＲＮＡの分解の部位は制御されないと思われる。 次に、アセンブリー時のクロロフィルの供給量による、アポ蛋白質の安定化制御の可能性を検討した。ラン藻 *Plectonema boryanum* のプロトクロロフィライド (Pchlide) 暗還元欠損株について、クロロフィルの供給量とPsaA/B ペプチド合成速度との対応関係を調べたところ：（1）暗処理でクロロフィルの供給を停止させると Pchlide の蓄積とともに、PsaA/B ペプチド合成速度の低下が顕著に起こった。しかし、全蛋白質の合成速度の低下は少なかった。（2）暗処理後、光照射すると、Pchlide の急速な減少と PsaA/B ペプチド合成速度の再加速が顕著に起こった。これに対し、全蛋白質の合成速度は余り変化しなかった。これらの事実は、クロロフィル配位による PsaA/Bアポ蛋白質の安定化制御を示唆する。

3pE01

ニンジン培養細胞におけるペクチン多糖と
細胞接着性との関わり

菊池　彰、[1]枝重有祐、[1]石井　忠、藤伊　正、佐藤　忍
（筑波大・生物、[1]農水省森林総研）

近年我々は、不定胚形成能力や細胞の接着性に差のあるニンジン培養細胞を用い、細胞壁ペクチンの構造と機能の探索を行ってきた。これまでに、Embryogenic callus(EC)とNon-embryogenic callus(NC)間で構成糖に違いが認められた約1,300 kDのペクチン多糖を精製、メチル化分析からその中性糖側鎖の構造を推定すると共に、この多糖にキシロガラクツロナンが含まれている事を見いだした。本講演では、ペクチン多糖の両領域のうち、どちらが細胞の接着性に関連しているか、また細胞接着性にペクチンとヘミセルロースとの相互作用が関与するかについて検討を行ったので報告する。

EC、NC、及びその中間的性質を有する数種のニンジン培養細胞株を用いて、各細胞株の平均細胞集塊サイズと1,300 kDペクチン多糖中に含まれる各構成糖の含有量との相関を調べた。その結果アラビノースとキシロースには正の、ガラクトースには負の、更にアラビノースとガラクトースの含有比については正の相関が見いだされ、細胞集塊性には、中性糖側鎖とキシロガラクツロナンの両者が関連していると考えられた。更にヘミセルロース分子に相互作用するペクチン分子の探索を行いその構造を推定するため、ヘミセルロース画分を得、その構成糖分析を行った。その結果、ECにのみ、多量のガラクツロン酸がアラビノースと共に検出された。これらの結果から、ECに於いては、アラビノースを多く含む側鎖を持つペクチンがヘミセルロースと相互作用しており、この相互作用がECの細胞接着性をNCに比べて高めている要因であると考えられた。

3pE02

細胞壁ペクチン中に存在するエステル結合について

石井　忠、枝重有祐、掛川弘一　（農林水産省・森林総研）

植物細胞壁を構成する多糖類の一次構造はかなり詳細に研究されてきたが、細胞壁多糖類相互の共有結合や疎水結合については不明な点が多い。これらの結合のうちエステル結合はアルカリ性水溶液を用いて細胞壁を抽出するため、その存在はこれまでほとんど無視されてきた。本研究ではペクチン多糖類に結合しているエステル基の構造と機能について検討した。

タケノコ、シカモアカエデおよびポテトより細胞壁を調製し、それらをドリセラーゼにより加水分解した。加水分解物をＤＥＡＥ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ＭｏｎｏＱおよびＢｉｏ－ＧｅｌＰ－４カラムで分析してオリゴ糖を単離・精製した。オリゴ糖の構造を構成糖分析、メチル化分析、ＦＡＢ－ＭＳ，ＮＭＲにより解析した。タケノコ、シカモアカエデおよびポテトの細胞壁からはそれぞれアセチル基を含むラムノガラクツロナン由来の数種のオリゴ糖が単離された。アセチル基はガラクツロナン酸残基の０－２位に主に置換していた。アセチル基を除去したオリゴ糖は水不溶性になったので、ペクチン中のアセチル基は細胞壁の生理的性質に重要な役割を果たしていることが示唆された。エステル結合した疎水性基を含むガラクツロン酸３糖と４糖が３つの細胞壁試料中に存在した。疎水性基の1つはアセチル基であった。ホモガラクツロン酸がアセチル基等の疎水性置換基を持つことはペクチンが細胞膜と密接な関係になりうることを示唆している。

3pE03

タケノコ細胞壁のキシログルカン

枝重有祐、掛川弘一、石井　忠　（農水省、森林総合研究所）

キシログルカンは双子葉植物では一次壁の約20％を占める主要な多糖類である。一方、単子葉植物であるイネ科植物の細胞壁ではキシログルカンの存在を示唆する報告はあるものの、キシログルカンをそのまま単離・精製した報告はない。本報告ではタケノコ細胞壁からキシログルカンを単離することを試みた。

除デンプン、脱タンパクしたタケノコ細胞壁を0.05M Na_2CO_3溶液で脱ペクチンした後、1MKOHと4MKOHでヘミセルロースを抽出した。4MKOH抽出物中のキシランをイオン交換カラム（QAE-Sephadex A-25）で除去後、キシログルカンをヨウ素で沈澱させた。沈殿物を熱水に溶解後、GPC(BIO-Gel A-5m)で分画した。得られた多糖類はグルコース37.4％、キシロース38.2％、アラビノース17.0％含み、4-および4、6-結合したグルコースのほか、4-および3、4-結合したキシロース残基を含んでいたため、キシログルカンとアラビノキシランから成ると推定された。このフラクションを精製したセルラーゼとキシラナーゼで分解し、分子量変化と分画物の糖組成および糖鎖結合様式を検討した。キシラナーゼ処理により分子量は低下し、高分子量部分はグルコース53.0％、キシロース26.1％、アラビノース10.2％含み、キシログルカンの純度は高くなった。しかし、アラビノキシランに由来すると考えられる4-および3、4-結合したキシロース残基が少量検出された。

3pE04

ギンドロ培養細胞における成長にともなう細胞壁多糖類の変化

掛川弘一，枝重有祐，石井忠（農林水産省・森林総合研究所）

高等植物の細胞壁は様々な多糖類やタンパク質、フェノール性化合物などから成っており、細胞の成長や形態形成に関与していると考えられている。伸長（肥大）成長に関連した細胞壁多糖類、特にキシログルカンの代謝についてはこれまでに多くの知見が得られている。しかし、その他の構成成分の変化やその代謝機構、伸長成長との関わりについては未だ不明な点が多い。本研究では肥大成長の制御機構を明らかにすることを目的として細胞の成長にともなう細胞壁多糖類の変化を調べた。

実験に用いたギンドロ培養細胞は継代後７日目までは活発な細胞分裂を行うが７日目以降はほとんど分裂せず細胞の体積を増大させる。この培養細胞から経時的に細胞壁を単離し、ペクチン、ヘミセルロースA(HA)およびB(HB)の各画分を得た。構成糖分析を行ったところどの画分においても分裂成長期から肥大成長期に移行する時期（継代後６－８日目）において変動パターンに大きな変化がみられた。特にHA画分においてグルコースの割合が分裂期、肥大成長期で大きく変化することが明らかになった。また、成長が活発な時期にペクチンとHA画分の多糖類が低分子化することも明らかになった。これらの結果から細胞成長にともなう細胞壁多糖類の代謝について考察する。

3pE05

ダイコン由来ホウ素ー多糖複合体の構造解析

小林 優，間藤 徹，東 順一[1]
（京都大・農・農化，[1]京都大・農・林産）

ダイコン根細胞壁からペクチン分解酵素によって可溶化されるホウ素-多糖複合体を，ホウ素含量を指標としてイオン交換・ゲル濾過クロマトグラフィーで精製した．この複合体を0.1 *N* HCl，25 ℃で短時間処理すると分子量がおよそ1/2に低下しホウ素が脱離した．この複合体ではホウ素はすべて4配位のホウ酸エステルとして存在する[1]．したがって，このホウ素ー多糖複合体は2本の多糖鎖がホウ酸エステルによって架橋された二量体で，希塩酸処理によってエステル結合が加水分解される結果，単量体が生成するものと推測した．

多糖成分の構成糖分析を行ったところアピオース，2-*O*-メチルフコース，2-*O*-メチルキシロース，2-ケト-3-デオキシ糖が検出され，この多糖断片がいわゆるラムノガラクツロナンII（RG-II）に由来することが示唆された．存在する結合様式およびTFA分解フラグメントの特徴は，Albersheimらによって報告されたRG-IIのもの[2]と極めてよく似ていた．

1) T. Matoh et al. (1993) *Plant Cell Physiol.* 34: 639-642
2) V. Puvanesarajah et al.(1991)*Carbohydr. Res.* 218: 211-222

3pE06

(1→3,1→4)-β-グルカンおよびアラビノキシランとセルロースの複合体形成

平井則子、Geoffrey B. Fincher[1]、林　隆久
（京都大・木質研、[1]Univ. of Adelaide）

単子葉植物の細胞壁にはキシログルカン以外に多量の(1→3,1→4)-β-グルカンおよびアラビノキシランが存在している。(1→3,1→4)-β-グルカン糖鎖には、(1→4)-β-グルコシル残基の密な部分があり、この部位はセルロースとの水素結合が可能である。アラビノキシランは、(1→4)-β-キシランすなわちセルロースの各グルコース残基６位の炭素が無いだけでよく似た直鎖状のコンフォメーションをとる糖鎖を主鎖としているため、セルロースと水素結合することが推察される。本研究では、これら糖鎖の一次壁における機能を糖鎖複合相互作用から明らかにすることを目的とした。

アニーリングの実験により、アラビノキシランはほとんどセルロースに結合しなかったが、(1→3,1→4)-β-グルカンは濃度の増加とともに非晶性および結晶性セルロースに結合する量が増加した。β-グルカンとセルロースの結合は、アラビノキシランの存在によって阻害されなかった。

3pE07

天然セルロースの新しい合成の場

木村　聡、○伊東隆夫（京都大・木質研）

セルロースは植物細胞では原形質膜で合成ならびに結晶化されることが知られる。植物と対比するために動物界で唯一セルロースを生産するホヤを用いてセルロースの生成の仕組みを調べた。ウエダイトヒキホヤ（*Metandrocarpa uedai*）のセルロース性の皮のうの内側に隣接する表皮には内部に繊維構造を有するglomerurocyte と呼ばれる細胞が点在する。制限視野電子線回折により、glomerurocyte 中の繊維構造はセルロースIからなるミクロフィブリル（ＭＦ）の束であることが確認された。超薄切片法によりglomerurocyte の中の大きな液胞には疎に並んだＭＦが観察された。液胞が細く絞り込まれたところでＭＦは集合し束ねられていた。*glomerurocyte*の周囲をほぼ同心円状に取り囲むＭＦの束はそれぞれ単位膜で囲まれていた。以上より、ＭＦは液胞の中で合成、結晶化され、液胞が細く絞り込まれることにより束ねられると推測された。また、絞り込まれている液胞の周囲には液胞膜を裏打ちするように微小管が観察され、液胞の絞り込みおよび伸長に何らかの関与が示唆された。

3pF01

カンショのL-ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼはフラビン酵素である

今井剛、平井正志、大羽和子[1]（野菜茶試、[1]名古屋女子大）

植物におけるアスコルビン酸生合成経路は未解明であるが、L-ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼ（EC1.3.2.3，GLDHase)が生合成の最終段階を触媒するキー酵素であると推定されている。GLDHaseのタンパク化学的性質を明らかにするため、カンショ塊根(10kg)のミトコンドリアより超音波処理による可溶化、ゲル濾過、DE52イオン交換クロマトグラフィー、及びヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、比活性600倍に精製した。

SDS/PAGEで分子量約50000のタンパクバンドがGLDHaseと推定され、これは2D/PAGEにより、等電点が5.8付近のスポットに分離された。精製酵素溶液は448nmと373nmに吸収極大をもち、リボフラビンとほぼ一致するスペクトルを与えた。さらに酵素活性はアクリフラビンで阻害され、リボフラビンまたはFADで回復したことより、GLDHaseがフラビン酵素であると推定できる。動物と酵母の相同機能酵素もフラビンタンパクであるので、これら3つの酵素が、共通の祖先型より進化した可能性が推定された。カンショGLDHaseは、L-ガラクトノラクトンに特異的で、L-グロノラクトンに対する相対反応速度は1%にすぎなかった。酵素タンパクのN末端はブロックされていた。

3pF02

アブラナ及びイネデヒドロアスコルビン酸還元酵素の比較

浦野純一、加藤祥拡、丑丸敬史（静岡大・理・生物）

低温感受性の植物が低温ストレスを受けると成長阻害、細胞死といったダメージを受ける。キュウリ果実では、低温保存中に酸化型アスコルビン酸（DAs）が増加し、アスコルビン酸（As）総量（As+DAs）は低下する。またDAsを還元する酵素であるデヒドロアスコルビン酸還元酵素（DAR）は、低温処理した小麦、Zea diploperennisでその活性が増加することが知られている。このように、低温ストレス下でも生体内のAsの酸化還元比を一定に保つことが必須と思われるが、DARはそれに関して重要な働きを担っていることが示唆されている。我々は低温ストレス耐性におけるAsの関係を論じる目的で、DARに着目し研究を行った。DARの活性を14種類の野菜で調べた結果、アブラナ、ブロッコリーなどの比較的低温を好む植物の緑色組織でその活性が高いことが分かった。このことから、アブラナを材料として用いDARを粗精製した。比較対照として米ヌカから粗精製したDARを用いた。DAs及びGSHに対するKm値、pH依存性にも差異は見られなかった。また活性測定時の温度を変化させ、両者の低温における活性の低下の程度を比較した。しかし、両者に顕著な違いは認められなかった。このように、アブラナでは酵素量を多くして低温下のDAR活性を維持していることが示唆された。

3pF03

イネ・デヒドロアスコルビン酸アイソザイムの精製

加藤祥拡、浦野純一、丑丸敬史　（静岡大・理・生物）

植物の活性酸素消去系の酵素においては特に葉緑体で研究が進んでおり、いくつかの酵素の遺伝子もすでにクローニングされている。酸化されたアスコルビン酸の還元はこの系において重要なステップであり、デヒドロアスコルビン酸還元酵素（DAR)はこれを触媒する。我々は米ヌカからDARを精製したので今回、その結果を報告する。

米ヌカ粗精製液を硫安分画（40-80%飽和硫安）後、DEAE-Sephacel (0-50mM KCl)およびPhenyl-Sepharose (40-20%飽和硫安）によるカラムクロマトグラフィーによって分画した。500倍に精製された結果、SDS-PAGEで約26 kDaの単一のメインバンドとして得られた。この精製DARを用いて現在抗体を作成中である。

3pF04

コウキクサにおけるアスコルビン酸と蓚酸の生成

斉藤和実(京都大・ＲＩセンター)

コウキクサは蓚酸(OA)を蓄積するが、その生合成経路の詳細は不明である。まず、コウキクサに投与したアスコルビン酸(AA)およびOAの標識前駆物質の代謝を調べた。すでにホウレンソウ等でAAの前駆物質であることが認められたD-[1-^{14}C]グルコソンは、コウキクサでもAAに代謝された。またL-[1-^{14}C]AAは効率良く蓚酸に取り込まれたが、グリシン、セリンへは取り込まれなかった。一方、[2-^{14}C]グリコール酸はOAには取り込まれず、グリシン、セリンに取り込まれた。

D-[1-^{14}C]グルコソンによるタイム・コース実験では、代謝期間内に減少した標識AA量は、可溶性および不溶性の標識OAの増加量にほぼ相当し、AAからのOA生成反応は、中間代謝産物としてグリコール酸あるいはグリオキシル酸を経ないことが示唆された。

一方、コウキクサにカルモデュリン阻害剤のクロルプロマジンを作用させた場合、AA含量の著しい低下が認められたが、その作用機作は不明である。

3pF05

高等植物におけるC-C結合開裂で生成する有機酸への^{18}Oの取り込み

大本純子、斉藤和実、栗原紀夫(京都大・ＲＩセンター)

ペラルゴニウムで認められるL-アスコルビン酸(AA)の蓚酸とスレオン酸への酸化的開裂反応はオキシゲナーゼによると考えられているが、直接的な証拠はほとんど無い。また、ブドウや豆で知られる同様な開裂反応では、5-ケト-D-グルコン酸(5KGA)からL-酒石酸(TA)が生成する。これらの反応においては、C-C鎖の開裂端は、いずれもカルボキシル基となる。

これら開裂反応機作へのオキシゲナーゼの関与を知る目的で、ペラルゴニウムにL-[1,6-^{14}C]AA、また豆葉に[1-^{14}C]5KGAを、$^{18}O_2$あるいは$H_2{}^{18}O$と同時に投与し、各代謝生成物はメチル化した後GC-MSで分析した。

発表においては、各代謝産物中に取り込まれた^{14}Cと^{18}Oの濃度から、各植物組織における開裂反応機作について考察する。

3pG01

ホウレンソウ低温誘導タンパク質 COR85 の機能と存在様式

数岡徹，大江田憲治　（住友化学・生命工学研究所）

低温順応させたホウレンソウの緑葉において顕著に低温誘導される 85 kDa のタンパク質（COR85）は Group II LEA タンパク質の仲間であり、低温処理期間中の COR85 の蓄積量は植物体の凍結耐性と相関する。COR85 は native-PAGE において 300 kDa 付近に検出され、ゲルろ過法において 350 kDa 付近で検出されたことから、COR85 は細胞内において多量体を形成している可能性か示唆された。

COR85 の凍結感受性酵素 LDH（lactate dehydrogenase)に対する凍害防止活性の強さを評価するため、PD50 というパラメーター（10 μg/ml の LDH の凍結による失活を 50% リカバーするのに必要なタンパク質濃度）を用いて、他のタンパク質の凍害防止活性と比較した。その結果、COR85 は検査した９つのタンパク質の中で、最も凍害防止活性が高かった。また、凍害防止活性が高いほど、そのタンパク質のアスパラギン酸とグルタミン酸の含量が高いという一般的な傾向が見られた。一方、免疫沈降の結果から、COR85 は他のタンパク質とも相互作用している可能性が示唆された。おそらく、このような酸性アミノ酸残基を介してタンパク質分子表面や内部に水分子を大量に保持した COR85 が脱水ストレス感受性タンパク質に相互作用することにより、そのタンパク質を保護していると考えられる。

3pG02

低温処理によるキュウリ子葉の液胞膜H^+-ATPaseの失活

河村幸男，荒川圭太，吉田静夫（北大･低温研）

ヤエナリ（*Vigna radiata* L.)の黄化実生では、低温傷害初期過程において液胞膜H^+-ATPaseの活性低下が見られる。同様の現象がインディカ型のイネ培養細胞でも知られている。しかし、液胞膜H^+-ATPaseの低温失活が熱帯、亜熱帯産の低温感受性の植物に特徴的な性質かどうかはまだ明確ではない。そこで本研究では低温感受性の高い植物として知られるキュウリ（*Cucumis sativus* L.)の子葉を用いて、液胞膜H^+-ATPaseの低温失活について調べた。キュウリ子葉を暗黒条件下で低温処理（０°C)したところ、液胞膜H^+-ATPaseの活性が初期過程で著しく低下した。次に、液胞膜画分を用いて免疫学的解析を行なったところ、低温失活と平行してperipheralなサブユニット（V1 sector)を構成するタンパク質の減少がみられた。このことは液胞膜H^+-ATPaseの低温失活がV1 sectorの遊離に起因するという可能性を示す。以上のことは、ヤエナリの結果と一致する。さらに、光条件下では暗黒条件と比較して低温傷害が著しいことが見られた。現在、光の効果と液胞H^+-ATPaseの低温失活について検討中である。

3pG03

コマツナ(*Brassica campestris* L.)の耐凍性に関連する生理的諸要因の解析

村井麻理，荒川圭太，吉田静夫（北大・低温研）

植物の耐凍性と生体物質に関する平行関係から、耐凍性を支配する生理的要因は単純ではなく複数の因子が相互に関連しているものと推定される。近年、細胞の凍結傷害の機構が明らかになるにつれて、その防御機構も植物種間でそれぞれ異なる可能性も示唆されている。そこで本研究では、耐凍性の増加が比較的小さいコマツナを植物材料にして、種々の要因が耐凍性増加に対してどの程度寄与しているかについて明らかにし、コマツナの耐凍性獲得機構を特徴づけることを目的とした。今回は、低温馴化の過程における糖、アミノ酸、脂質、可溶性タンパク質（特に熱安定性タンパク質）および生体膜タンパク質の組成変化と耐凍性との関係について報告する。

20℃～29℃の温室で育成させたコマツナの3葉、4葉の耐凍性（LT_{50}）は、の低温処理（4/2℃、8日間）により-5.5℃から-9.3℃に高まった。これと平行して、浸透濃度は336 mOsmから474 mOsmに、糖含量は9.5 mg/g FW から32.7 mg/g FW にそれぞれ増加した。このことから糖含量の増加は浸透濃度の増加量の約70%を占めることが明らかになった。一方、可溶性タンパク質の組成には大きな変化が認められなかったが、熱安定性タンパク質においては52kDのタンパク質が耐凍性の増加にともなって顕著に蓄積することが明らかになった。なお、脂質の変動および生体膜タンパク質については現在検討中である。

3pG04

低温により誘導されるイネ実生のクロロシスに認められる色素体形成異常について

吉田理一郎，菅野　明，藤川清三'，佐藤雅志，亀谷寿昭（東北大・遺生研，'北大・低温研）

栽培イネ(*Oryza sativa* L.)の中に低温条件下で新しく抽出する葉にクロロシスを生じる品種がいくつか認められる。我々はこの現象の発現機構を解明するために、クロロシス感受性品種を低温暗所で育成し、その実生における色素体の形態および遺伝子発現にどのような異常が認められるかを検討した。

TEMにより色素体内部構造を観察したところ、低温(15℃)暗所で生育させた実生では、プロラメラボディやプロチラコイド膜の発達が認められなかった。また、この色素体を単離し、その全タンパク質をSDS-PAGEで解析したところ、常温(25℃)で豊富に蓄積していた36kDのタンパク質が特異的に消失していた。色素体にコードされている遺伝子の発現に関しても低温による異常がみられ、mRNAの蓄積、あるいは転写後のプロセシング、スプライシングが抑制されていた。しかし、興味深いことに*rpo*遺伝子は低温により逆に強く発現していた。核支配の色素体タンパク質NADPH-プロトクロロフィリド酸化還元酵素遺伝子の発現は低温による影響を受けなかった。

以上のことから、クロロシス感受性品種では暗所における色素体(エチオプラスト)形成の機構が低温により何らかの阻害を受けていることが示唆された。

3pG05

レタスの芽生えの生長に対する低pHの影響

山岡　恵子，木村　恭子，澤井　香里，井上　康則（東理大・理工・応生）

近年日本でも酸性雨の影響が注目され、研究が行われているが、純粋な低pHの植物の生長に対する影響を調べた研究は殆どなかった。本研究では、レタス（品種Grand Rapids）の根系の生長に対する低pHの影響を解析した。レタス種子をメッシュ上に播種し発芽させた後、条件を変えた培地に移し、生体重量あるいは根毛量・側根量等に対する効果を測定した。異なるpH条件下（3.0～5.5）で連続白色光下、暗黒下で3日間培養（25℃）したところ、pH3.5以下では根は生長せず、3.5～4.75の範囲の白色光下では根の伸長阻害が起こった。そのpH領域では側根と根毛が多量に発現してきており、主根の生長阻害を補償していると考えられる。暗黒下では根毛発現が殆ど見られなかったため、pH4.0で光強度を変化させたところ、約6Wm^{-2}以上で根毛の発現量は最大となった。また、光照射時間の効果を見ると、根毛形成は3時間、根毛生長は24時間で飽和に達した。光は根毛形成誘導と根毛生長の両方に作用を持つと考えられる。更に根毛発現の時期を知るためにpH4.0で根毛発現量の時間変化を調べたところ、根毛は培地交換後約5時間目に発現し始め24時間目まで密度は増加し、48時間後には根毛総量が飽和に達した。また、根毛発現の時間と場所を決定するために1時間おきに同一個体の写真撮影を行った。その結果は、pH変換より約7時間以前に形成された基部の表皮細胞は、低pHに反応して根毛を形成する能力を失うことを示唆している。

3pG06

アカパンカビにおける光信号伝達の生化学的および遺伝学的解析・・・ps15の*in vitro*での被リン酸化活性と屈光性との関係

小田和司、蓮沼仰嗣（横浜市大・木原生研）

我々は*in vitro*において青色光照射によりリン酸化が促進される約15kDaタンパク質群(ps15)を見出している。さらに青色光に全く応答しない突然変異株*wc-1*及び*wc-2*から抽出した膜分画を用いて*in vitro*においてps15のリン酸化の光応答が相補できた。そこでps15と*wc-1,-2*産物の関係を調べるため野生株およびps15が存在する*wc-1*の6株,*wc-2*の3株から膜分画を抽出して非平衡pH勾配電気泳動(NEPHGE)を行い各株のps15の特性を検討した。その結果,ps15はNEPHGEによって4本のバンドに分離され、泳動度において野生株と*wc-1,-2*株で差がなかった。しかし、最も強くリン酸化されるバンドが野生株と*wc-1,-2*株で異なっていた。この結果から*wc-1,-2*産物はps15の構造遺伝子ではないが、ps15の活性を制御すると推論された。一方、その他の*wc-1*のうち1株ではps15の活性が極めて弱く、もう1株ではps15の活性は全く認められなかった。*wc-2*の1株ではps15の活性が極めて弱く、しかもその他のリン酸化される蛋白質全ての活性が弱く、自己リン酸化活性も全く見られなかった。これらのps15の活性が強く抑えられた*wc-1,-2*の3株の変異は*wc-1,-2*遺伝子上の変異とは考えにくく、これらを便宜上△*ps15-1,2,3*と名付けた。さらにps15の活性の生理学的機能を明らかにするため、△*ps15-1*を用いて子嚢殻から出る突起(beak)の屈光性を調べた。その結果野生株は屈光性が見られたが、△*ps15-1*は屈光性に異常が見られた。

3pG07

アカパンカビの光信号伝達体ps15の生化学的特徴付け

市村和也、小田和司、蓮沼仰嗣（横浜市大・木原生研）

アカパンカビの野生株,*wc-1, wc-2*　変異株菌糸の粗膜分画を用いて、青色光によりps15のリン酸化が促進されることを明らかとした。またps15の被リン酸化活性が完全にない　△*ps15-1*変異株は屈光性に異常を生ずることを示した。野生株(*bd*)の菌糸110gから粗抽出液を作製し、硫安分画(80%)沈澱、DEAEセルロースtypeIIのフロースルー、さらにブルーセファロースCL-6Bの活性分画、さらにその活性のピーク分画を濃縮し、トリシン-SDS-PAGEにより、ps15の2つの蛋白質バンドを分離した。上方のバンドはN-末端アミノ酸配列が21まで決定され、2つの蛋白質の存在が判明した。下方のバンドからはN末端アミノ酸配列が22まで決定された。ブルーセファロースの活性分画は銀染色により、まだ2- 3種の蛋白質の混在がある。それを用いて生化学的特徴付けを行った。活性分画をリン酸化し、トリシンSDS-PAGEで分画した後に、上方および下方のバンドから蛋白質を抽出した。酸処理後に、薄層クロマトグラフィーでリン酸化されたアミノ酸を決定した。両方のバンドともにP-Serを含んでいた。活性分画に[γ-^{32}P]ATPとGDP, CDPまたはUDPを入れると、GTP, CTP, UTPを生成し、NDPキナーゼの活性を含むことが判明した。ps15は抗ラットNDPキナーゼ抗体と交叉反応を示した。さらにこの活性分画をトリシンSDS-PAGEで分画後にゲル内で自己リン酸化を見ると、自己リン酸化能を有した。青色光受容体はps15の自己リン酸化能を制御する示唆が得られた。

3pH01

アンチセンスSLG遺伝子を用いたアブラナ科植物の形質転換と自家不和合性の打破

柴博史，真鍋麻里，渡辺正夫[1]，日向康吉[2]，鈴木昭憲，磯貝彰（東大院・農学生命科学，[1]東北大・農，[2]奈良先端大・バイオサイエンス）

アブラナ科植物の自家不和合性は、胞子体型の自家不和合性を示すことが知られ、1遺伝子座のS複対立遺伝子系によってその機構が説明されている。この機構に関与する物質として、柱頭特異的な発現を示すS糖タンパク質(SLG)およびS糖タンパク質を細胞外ドメインにもつSレセプタープロテインキナーゼ(SRK)の存在が挙げられているが、それらの具体的な機能は明らかでない。演者らはこれらの物質の機能を明らかにすることを目的にアンチセンスSLG遺伝子を自家不和合性を示すアブラナ科植物に導入を試み、その結果、自家不和合性を打破することに成功した。

アブラナ科植物*B. campestris* S^8ホモ系統株の柱頭から単離したSLG^8をコードする遺伝子を柱頭特異的な発現を示すSLGプロモーターの下流域にアンチセンスに配置した植物導入用ベクターを作製した。これをバイナリーベクター法によって自家不和合性を示す*B. rapa* (syn. *B. campestris*)の子葉または胚軸に導入した。その結果、形質転換体が1個体得られ、これは自家和合性へと変化していた。また内在性のSLGおよびSRKの発現量を調べてみたところ、両者の顕著な低減が観察された。このような結果からSLGおよびSRKは自家不和合性に関わる柱頭側の認識機構としての役割を果たすものと推察される。

3pH02

Riアグロピン合成酵素遺伝子プロモーターの組織特異性の解析

鹿田貴弘、猪口雅彦、加藤次郎
（岡山理科大学・理・生物化学）

*Agrobacterium*が感染して生じる腫瘍組織で産生されるオパインのうち、アグロピンの産生はTiプラスミドにもRiプラスミドにもコードされている。オクトピン型Tiプラスミド由来のアグロピン合成酵素遺伝子(*ags*)の発現特性は、カルス組織及び再分化植物体の成長点で特異的に発現することを既に報告した。更に前回の本大会において、我々はアグロピン型Riプラスミド由来の*ags*遺伝子の発現特性を解析し、高圧濾紙電気泳動法によるアグロピン産生量及びノーザン法による転写産物量は、いずれも毛状根、カルス、再分化植物体の根で多いことを発表した。今回は、GUSレポーター遺伝子を用いてプロモーターレベルでRi-*ags*の発現特性を解析した。

Riプラスミド*ags*遺伝子プロモーターとGUS遺伝子との融合遺伝子をタバコに導入し、各種組織・器官におけるGUS活性を蛍光法により測定したところ、アグロピン産生量、転写産物量と同様に毛状根、カルス、再分化植物体の根で強く発現し、葉、茎では植物体上のいずれの部位でも弱い発現しか観察されなかった。

またGUS活性の発現部位を組織化学的に観察したところ、Ti-*ags*プロモーターでは根端と茎頂の成長点に局在していたのに対し、Ri-*ags*プロモーターでは成長点での活性は認められず、根の伸長帯部分に強い活性が見られた。現在更に詳細に発現部位の解析を進めている。

3pH03

Ｔｉ及びＲｉプラスミド由来アグロピン合成酵素遺伝子(*ags*)の発現に及ぼす植物ホルモンの影響

征矢野敬、猪口雅彦、加藤次郎（岡山理科大・理・生物化学）

オクトピン型Ｔｉプラスミド、アグロピン型Ｒｉプラスミド上のT-DNAには、共にアグロピン合成酵素遺伝子(Ti-*ags*、Ri-*ags*)がコードされており、遺伝子配置や塩基配列の類似性から同一起源であると考えられる。しかし、両*ags*のプロモーター領域は全く異なる塩基配列を有している。現在までに我々は、両者の発現の組織、器官特異性について調査し、Ti-*ags*はカルス、Ri-*ags*では根及びカルスにおいて強く発現することを報告してきた。このことは、両*ags*遺伝子の発現が各々のプラスミドによる病徴のクラウンゴールと毛状根に適応したことを示すと思われる。

今回、我々はTi-*ags*、Ri-*ags*のプロモーターとGUS構造遺伝子との融合遺伝子を導入した形質転換タバコを用いて、両*ags*プロモーターの各種植物ホルモンに対する反応性について比較調査した。当初、両*ags*遺伝子共にカルスにおいて発現することからカルス誘導に用いたNAAあるいはBAによる発現誘導が期待されたが、２４時間植物ホルモンに浸したリーフディスクによる調査の結果、両者は活性化されなかった。しかし、カルス誘導条件で発現の経時変化を調査したところ、共に４日目以降には発現が増大した。しかし経時的発現パターンは、両*ags*プロモーター間で明らかに異なっていた。

3pH04

ニンジンの不定胚形成過程における遺伝子発現制御の解析

藤井伸治、内宮博文（東大・分生研・細胞機能）

ニンジンの培養細胞系では2,4-Dによりカルスが誘導され、2,4-Dを除去することにより不定胚の形成が誘導される。本実験系は、高頻度かつ同調的に不定胚を誘導可能なことから、培養細胞における胚発生のモデル系として用いられている。本研究は、ニンジンの不定胚形成に伴う遺伝子の発現制御機構を解明することを目的として、*Agrobacterium rhizogenes*のRiプラスミドに存在する*rolC*遺伝子プロモーター（転写開始点から5'上流域約-850bp)と*uidA*遺伝子(β-グルクロニダーゼ)とを連結したキメラ遺伝子をニンジンに導入し、その発現様式を解析した。その結果、GUS活性の上昇が、PEMsから球状胚、球状胚からハート型胚が形成される過程で観察された。

不定胚形成に伴う発現の活性化が検出された最小領域である-255bpから転写開始点側を含む領域に注目し、この領域へのDNA結合活性をゲル シフト法により解析した。その結果、不定胚の各発生段階でのDNA結合活性には、いくつかの異なるパターンが認められた。即ち、１）カルスで最大のDNA結合活性を示し、PEMsと球状胚では低いDNA結合活性が認められるもの、２）球状胚においてDNA結合活性が最大となるもの、３）明確な規則性を示さないもの、の３通りのパターンが認められた。これらのうち２）は本プロモーターの発現活性が上昇する球状胚でDNA結合活性が最大となることから、正の制御因子として機能するものと予想される。

3pH05

ディファレンシャル・ディスプレイ法によるナスの不定胚誘導時に特異的に発現する遺伝子の単離と構造解析

樋山貴浩[1,2]、John C. Afele[1]、斉藤猛雄[3]、萱野暁明[1]、田部井豊[1]、高岩文雄[1]、高柳謙治[2]、西村繁夫[1]
（[1]農水省・生物研、[2]筑波大・農林、[3]農水省・野菜茶試）

植物の不定胚形成を制御する遺伝子は培養初期に発現し、その発現量は比較的少ないことが予想される。我々は、ナス（*Solanum melongena* L.）の不定胚誘導時に特異的に発現する遺伝子を同定するために、ディファレンシャル・ディスプレイ法を適用した。

エンブリオジェニックカルス（EC）誘導後０から10日までの子葉からRNAを抽出し、$(T)_{12}GC$をプライマーにcDNAを合成した。これを鋳型に[α-^{32}P]dCTPを含む反応液で$(T)_{12}GC$と10merのランダムプライマー（RA５）との間でPCRを行った。８％ポリアクリルアミド変性ゲルを用い電気泳動し、Ｘ線フィルムに感光させた結果、EC誘導後４日以降に特異的なバンドが数種検出できた。これをTAベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、インサートの両端にランダムプライマーの配列は完全に保存されていたが、ポリAに相当する配列は検出されなかった。現在、これらのDNA断片をもとに、EC誘導後７日の子葉から作成したcDNAライブラリーより全長のcDNAクローンの単離を行うとともに、その発現様式について解析中である。

3pH06

不定胚性花粉に特徴的なリン酸化蛋白質のcDNA単離

京　正晴、湯浅泰和、前田　剛（香川大、農、生物資源）

タバコの単離未成熟花粉を用いた不定胚誘導においては培養初期に数日間の飢餓処理が必要である。この時期には正常な花粉発生過程では見られない一群のリン酸化蛋白質（EPa-d）が出現する。それらを部分精製し電気泳動した後PVDF膜上に転写して得た標品を用いてN末端アミノ酸配列を決定したところいずれもきわめて類似性の高い蛋白質であった。マルバタバコの未成熟花粉を用いた場合にも同様のリン酸化蛋白質（EP1-6）が出現するがそれらのN末端アミノ酸配列もきわめて類似しており種を越えて共通の機能を有すると考えられる。EPbのN末端アミノ酸配列からオリゴDNAを合成しそれをプローブとして不定胚性花粉のcDNAライブラリーからcDNAを単離しその塩基配列を調べたところ504bpのORFが確認され167アミノ酸からなる約19kDa,pI8.4を示す蛋白質が推定された。これらの値はEPbの２次元電気泳動上での位置からの予想とは一致しないが、C kinase, A(orG) kinase, casein kinase IIによるリン酸化部位がそれぞれ2,1,2箇所、糖鎖結合部位が2箇所推定されており、リン酸基、糖鎖の付加によって分子量、等電点がシフトした結果と考えられる。ホモロジー検索の結果、 stellacyanin, blue copper-binding protein, cupredoxin, などと約30%の相同性が認められたがこれらの蛋白質に共通して存在する４箇所の銅結合部位がEPbには認められないことから機能は異なっていると考えられる。

3pH07

ニセアカシアのレクチン遺伝子ファミリィを構成する遺伝子の構造

吉田　和正、田崎　清（農水省　森林総研）

マメ科の落葉樹であるニセアカシア（*Robinia pseudo-acacia*）は、内樹皮（師部）と種子でそれぞれレクチンを合成し蓄積する。両者は免疫学的に区別されるタンパク質であり、種子レクチンが登熟過程で合成されるのに対し、内樹皮でのレクチン合成は季節的な制御を受けている。

現在、内樹皮におけるレクチン遺伝子の器官特異的および季節的な発現調節に関わるシス因子を解析することを目的として、遺伝子のクローニングを進めている。レクチン関連遺伝子は約５種類のメンバーからなるファミリィを構成することが推定されているが、これまでに、２つのレクチン遺伝子（*rlec4*および*rlec5*）を単離し塩基配列を決定した。*rlec4*と*rlec5*のオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列は、内樹皮レクチンのcDNAから推定される配列とそれぞれ61%、81%のホモロジーがあり、CaおよびMnの配位に関わると想定されるアミノ酸残基は完全に保存されていた。さらに*rlec4*と*rlec5*にはそれぞれTATAボックスやポリAシグナルに類似する配列が存在することから、両者はレクチン遺伝子ファミリィのメンバーであると考えられる。

3pH08

ニセアカシア樹皮レクチンｃＤＮＡのタバコでの発現

田崎　清[1]、吉田和正[1]、小柴共一[2]、山本直樹[3]（[1]農水省・森林総研、[2]都立大・理・生物、[3]農水省・生物研）

糖鎖を特異的に認識し、結合する蛋白質であるレクチンは植物の種子以外にも球根や樹木の樹皮などで蓄積することが明らかになっている。今回、演者らはニセアカシア(Robinia pseudoacacia）の樹皮に蓄積するレクチンのｃＤＮＡをタバコに導入し、発現されたレクチンについて調べたので報告する。

３５Ｓプロモータの下流にレクチンｃＤＮＡを結合し、Tiプラスミドに導入してからタバコの形質転換体を得た。レクチンｃＤＮＡを発現しているタバコの葉、茎及び根の抽出液はウサギの赤血球に対する凝集活性を示した。さらに、この抽出液をウエスタン・ブロット法で分析すると２９ｋＤａ付近に樹皮レクチンに対する抗体と反応するバンドが認められた。この分子量はニセアカシア樹皮レクチンのサブユニットの分子量に相当した。タバコで発現しているレクチンはラクト・アガロースによるアフィニティクロマトで単離することができた。単離されたレクチンはsuperdex 200でのゲル濾過に際して、ゲルに対する弱い吸着を示した。しかし、この吸着はラクトースの存在下では見られなくなり、単一のピークとして溶出されたレクチンの分子量は１１２ｋＤａと推定された。タバコから単離したレクチンのアミノ末端から９残基のアミノ酸配列はニセアカシア樹皮レクチンのものと同一だった。以上の結果はタバコに導入されたレクチンのサブユニットがニセアカシアの場合と同様に４量体を形成していることを示唆した。

3pI01

イネ黄化芽生えの光応答型遺伝子群の単離と同定

岩崎俊介, 笠井誠[1], 斎藤陽子, 田中喜之, 松岡信[2], 徳富(宮尾)光恵, 山本直樹（農水省・生物研, [1]富山大・理・生物, [2]名大・分子応答）

黄化芽生えが光照射により緑化する過程には, 核および色素体各々のゲノムにコードされている遺伝子の協調的発現が必要であり, それらを統御する光情報の受容・伝達機構の解明を目指した分子遺伝学的解析が近年精力的に進められてきた。光応答型核遺伝子としてはリブロース二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット（*rbcS*）やクロロフィルa/b結合蛋白質（*cab*）が代表的であるが, それ以外の発現量の少ない遺伝子についても情報を得るために, １４日間暗所で発芽させたイネ黄化芽生えに３時間の白色光を照射することにより転写産物量の増加する遺伝子のcDNAのクローニングをサブトラクション法により行なった。得られた約２００クローンについてグループ分けを行なうとともに, 生育時の光条件による発現様式の違いをノーザン法により調べた。その結果, 黄化芽生えでは発現していないが光照射した植物では発現しているもの, 緑化の過程で一過的に発現がみられるもの, 黄化芽生えでも発現しているが光照射した植物で発現量の増加するもの, の３タイプに分類できることがわかった。現在順次, 塩基配列決定と相同性検索が進行中であるが, *rbcS*や*cab*以外に, 緑化過程の早い時期に発現することが知られているELIPs, RuBisCO activase, グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素, プラストシアニンやフェレドキシンなどの光合成関連遺伝子が同定された。