

1pB16

光化学系 I 複合体の Accessory subunit は、環境ストレスからランソウを防御する重要なサブユニットである

仲本 準 (埼玉大・理・分子生物)

ランソウ光化学系 I 複合体 (PSI) を構成する、PsaA から PsaM サブユニットの遺伝子のすべてが既に単離され、また、PsaK や PsaM を除く他のすべての遺伝子の各々について、遺伝子破壊株が既に作製されている。これらの変異株を用いて、PSI の機能や構築における各サブユニットの役割が解析されてきた。その結果、PSI の Accessory subunit は、独立栄養的生育や光合成に必須のものではないことが明らかにされた。PsaA、PsaB、PsaC のように電子受容体を持っていないこれらの Accessory subunit の生理的重要性については明らかではない。我々は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の PSI Accessory subunit 欠損株、特に PsaD や PsaE 変異株を用いて、温度や強光がこれらの変異株の生育・生存や光合成活性・特性等に及ぼす影響を調べてきた。これらのサブユニットが強光や高温等の環境ストレス条件下で果たす役割について報告する。

1pB17

耐塩性シロイヌナズナ突然変異体における活性酸素耐性機構の解析

榎根一夫、小林京子、丹羽康夫、大場泰¹、和田敬四郎¹、小林裕和 (静岡県立大・生活健康、¹金沢大学・理・生物)

野生型シロイヌナズ (*Arabidopsis thaliana*, Columbia) 実生は、通常光 (26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 下 200 mM NaCl 添加無糖培地において2週間以内に枯死する。合計22,300の変異原処理系統(ethylmethane sulfonate 処理およびT-DNA挿入変異)を同条件下での生存を指標に選抜し、独立栄養生長が耐塩性になった突然変異体 *ast* (autotrophic salt tolerance) を2系統得た。これら2系統は、遺伝学的解析を行ったところ、quantitative trait loci (QTL) によって支配されていると考えられた。塩が植物に与えるストレスとしては浸透圧が考えられ、*ast* における浸透圧調節物質プロリンの蓄積を測定したところ、野生体と比較して有為な差は認められなかった。一方、塩培地における野生体の生存率は、光などの他の環境要因によって強く影響を受けることを見いだした。このことから、パラコート(メチルピオローゲン)を用い、*ast* の活性酸素耐性について検討したところ、*ast1* は野生体と比べ生存率において約10倍耐性であることを見出した。したがって、*ast* の活性酸素除去能力についてさらに検討を加えた。

2aB01

タバコ葉緑体型CuZn-スーパーオキシドジスムターゼはスーパーオキシド生成部位 (PS I) に局在してはじめて機能する
小川健一^{1,2}、遠藤剛²、金松澄雄³、田中亮一¹、石黒澄衛¹、岡田清孝¹、Dirk Inzé⁴、浅田浩二² (¹京都大・理・植物、²京都大・食研、³南九州大・食品工、⁴Universiteit Gent)

ホウレンソウ葉緑体型CuZn-スーパーオキシドジスムターゼ(chlCuZn-SOD)は葉緑体内でO₂⁻の生成部位(PS I)に接着し存在していることを示してきた(PCP 36: 565-573, 1995)。この接着にはMg²⁺が関与していることをCuZn-SODのチラコイド膜への結合から証明した。ついでCuZn-SODの局在効果をみるため、野生型タバコ(SRI)と葉緑体にミトコンドリア由来のMn-SODを大量発現させたトランスジェニックタバコ(ov-Mn)それぞれにchlCuZn-SODのアンチセンス遺伝子を導入したタバコ(an-chlCuZnおよびov-Mn, an-chlCuZn)を作出した。弱光条件下ではan-chlCuZnとSRIはphenotypeに差はないが、強光条件下ではan-chlCuZnの葉は退色した。さらに葉緑体にMn-SODをもつCuZn-SODが欠失したov-Mn, an-chlCuZnも強光下で光障害を受けた。このことは発現したMn-SODが葉緑体内においてCuZn-SODの局在部位にtargetingされなかったことを示している。このように、SODは葉緑体内でO₂⁻の生成部位に局在することが光障害を防ぐ上で重要であることが示唆された。

2aB02

単細胞紅藻 *Galdieria partita* のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの性質

上田雅美^{1,2}、佐野智²、重岡成³、蔵野憲秀⁴、宮地重遠⁴、河内孝之¹、横田明穂^{1,2} (¹奈良先端大・バイオサイエンス、²RITE・植物分子生理、³近畿大・農・食栄、⁴海洋バイオテクノロジー研究所・釜石研究所)

植物の葉緑体内に吸収されたSO₂は、光合成電子伝達反応に伴う活性酸素の生成を増幅する。この時に発生した大量の活性酸素は細胞内の活性酸素消去系酵素では消去しきれず、細胞に致命的な傷害を与える。*Galdieria partita* は比較的高濃度のSO₂に対して抵抗性を有することからSO₂感受性の植物よりも活性酸素に対する抵抗性が高いと考えられる。そこで*G. partita* から活性酸素消去系酵素の一つであるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)をSDS-PAGEで単一バンドに精製し、その性質を調べた。このAPXはSDS-PAGEおよびゲル濾過の結果、32-35 kDaの単量体であった。基質特異性や阻害剤に対する挙動は、これまでに報告されている高等植物の細胞質型のものにほぼ似ていた。しかし、SH修飾剤であるp-CMBに対しては耐性を有しており、0.5 mMでも約80%もの活性を維持した。また、高温に対して耐性があり、65°Cまで活性をほぼ維持していた。一方、N末端アミノ酸配列はほうれん草のストロマ型に対し、35%の相同性があった。

この研究の一部はPECの委託によるものである。

2aB03

葉緑体に局在するチオレドキシネルオキシダーゼ
—葉緑体における新規な過酸化水素消去系—
山口勝司、西村幹夫（基生研・細胞生物）

私たちはアスコルビン酸ペルオキシダーゼやカタラーゼを中心に活性酸素消去機構の解析を進めている。近年、バクテリアから高等植物やヒトまで至る幅広い生物間で存在する、新しいタイプの抗酸化タンパク質が明らかになってきた。これらはペルオキシレドキシシンと呼ばれ、酵母において、チオレドキシシンを電子供与体としたペルオキシダーゼ活性を持っていることが報告された。今回、私たちはアラビドプシスESTライブラリーより、そのホモログのcDNAクローンを入手し、全長配列を決定した。このcDNAがコードするタンパク質は、他の生物で報告されている2Cysタイプのペルオキシレドキシシンと高い類似性を持ち、さらにN末端に葉緑体への輸送シグナルを持っていた。cDNAを用いて、融合タンパク質を大腸菌で発現させ、解析を進めた。発現タンパク質は大腸菌の還元型チオレドキシシンによって還元され、ペルオキシダーゼ活性を示した。葉緑体にはチオレドキシシンが存在し、照射中、光化学系1からの電子で還元状態となっているので、高等植物の葉緑体ペルオキシレドキシシンは、葉緑体中の還元型チオレドキシシンを電子供与体とする、チオレドキシネルオキシダーゼとして機能していると考えられる。

2aB04

モノデヒドロアスコルビン酸ESR測定による葉緑体のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の評価
大野千晶、真野純一、浅田浩二（京大・食研）

葉緑体で光生成する H_2O_2 がアスコルビン酸(AsA)により消去され生じるモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル(MDA)は光・酸素ストレスの内因性プローブとなる(Heber et al., *Plant Cell Physiol.* 37 (8): 印刷中)。本研究では生葉のMDAのESRシグナルから葉緑体の H_2O_2 消去能を評価することを目的とした。メチルビオローゲン(MV)を与えたホウレンソウ葉の照射下のMDAレベルはAsA酸化速度を、照射後暗所でのMDA生成は蓄積した H_2O_2 によるAsA酸化を反映する。10秒間の照射を5分おきに繰り返すと、照射中のMDAレベルが低下し、照射後のMDA生成が増大した。これらの変化は、MV・照射下の高い H_2O_2/AsA 比によりAsAペルオキシダーゼ(APX)がしだいに失活したことによる、照射中のAsA酸化速度の低下と H_2O_2 蓄積を反映したと考えられた。AsA除去により段階的にAPXを失活させた単離チラコイドを用いて、MV・照射した生葉と同様のMDA生成の変化を再現できた。すなわち生葉でのMV・照射下および照射後のMDA生成は、葉緑体APXによる H_2O_2 消去能の良い指標となる。

2aB05

デヒドロアスコルビン酸を輸送形態とする葉緑体のアスコルビン酸濃縮機構
畑 奈央子、尼子 克己（大阪府大・農・応用生化）

葉緑体中のアスコルビン酸(AsA)濃度は10~50mMと他の組織より高く、光合成電子伝達の際に不可避免的に生じる活性酸素の消去に機能している。AsAを合成するL-galactono-1,4-lactone還元酵素はミトコンドリアに局在するため、葉緑体への何らかのAsA集積機構が必要だが、過去の ^{14}C -AsAを用いた単離葉緑体への取り込みではこの事実を説明できない。我々は今回ヒト培養細胞の様にDHAの促進拡散とDHAのAsAへの還元2段階機構によってAsAが葉緑体に濃縮されている可能性を検討した。

ホウレンソウ単離葉緑体にDHAを添加後照射すると、pH7.6では見られなかった酸素発生がpH6.8で見られた。酸素発生の初速度はDHA濃度、光強度、およびDHAの暗放置時間に依存し、照射後にDHAを添加してもそれに依存した酸素発生は見られなかった。照射前の脱共益剤の添加は酸素発生に影響しなかったが、ヒトGLUT1阻害剤のサイトカラシンBによって抑制された。これらの結果から暗で促進拡散によりDHAが葉緑体内に入り、DHARの作用でAsAが蓄積できると結論した。

2aB06

植物の ζ (ゼータ) クリスタリン様タンパク質のジアミド還元酵素活性
真野純一、E. Babychuk¹、D. Inzé¹、浅田浩二（京大・食研、¹ Gent 大学・遺伝研）

酸化ストレス応答欠損 *yap⁻* 酵母にチオール酸化試薬ジアミドに対する耐性を与えるシロイヌナズナ遺伝子P1, P2, P4は ζ -クリスタリン様タンパク質

(zCLP) 遺伝子であり、酸化的ストレスで発現が誘導されることから、酸化ストレス防御因子と考えられる [*J. Biol. Chem.* 270: 26224 (1995)]。本研究ではzCLPによるストレス防御機構を解明するためP1タンパク質の酵素学的性質を調べた。

大腸菌で発現させたP1タンパク質はモルモット ζ -クリスタリンと同様にNADPHを特異的電子供与体 ($K_m = 10 \mu M$) としてベンゾキノン、ナフトキノン類を還元する活性を示した。o-キノンに対する基質特異性が高く、キノンとセミキノンに1電子還元する。メナジオンは基質とならない。P1タンパク質はジアミドを含むアゾジカルボニル化合物を2電子還元することを新たに見出した。zCLP遺伝子による酵母へのジアミド耐性付与はこの活性によるものであろう。NEM, pCMBによる阻害からジアミド還元活性へのチオール基の関与が示唆された。

2aB07

好熱性ラン色細菌 *Synechococcus vulcanus* の低温感受性

久保英一、菓子野康浩、小池裕幸、佐藤和彦(姫工大・理・生命科学)

Synechococcus vulcanus は至適温度を55℃にもつ好熱性ラン色細菌である。本ラン色細菌のチラコイド膜は *S. elongatus* と同様30℃付近で相分離、10℃付近で固相へ変化すると考えられ、低温に対する感受性が高いと推定される。

上記のことを確かめるために *S. vulcanus* の生細胞を低温処理し、酸素電極を用いて酸素発生活性を測定した。その結果、急冷した細胞と一旦室温で処理した細胞とでは低温に対する耐性に違いがみられた。また対数増殖期にあるものと直線的増殖期にあるものとも違いがみられた。例えば対数増殖期にあるものを0℃におくと酸素発生活性は急激に低下するが、一旦室温においた後に0℃処理すると酸素発生活性の低下が緩やかになった。これらの低温感受性の差の原因について考察する。

2aB08

好熱性シアノバクテリア *Synechococcus vulcanus* の低温・光で誘導される細胞凝集

平野篤、国頭俊爾、井上頼直¹、池内昌彦²(東京電力・エネルギー環境研究所; ¹理研・光合成科学; ²東大・教養・生物)

我々は、好熱性シアノバクテリア *Synechococcus vulcanus* の細胞凝集が、低温により誘導されることを見出した。この凝集は30℃~40℃で形成され、30℃において最も顕著であった。細胞凝集は可逆的で、至適増殖温度55℃に戻すことにより解離した。細胞凝集は暗所では起こらず、光強度と正の相関、細胞濃度と負の相関を示した。また、光合成の阻害剤であるDCMUにより凝集形成に遅延が見られた。タンパク質合成の阻害剤であるchloramphenicolにより凝集形成が遅延したことから、何らかのタンパク質合成が凝集に必要と考えられる。なお、55℃の細胞と30℃の細胞では細胞壁の多糖組成に変化が見られた。一方、理由は明らかではないが、DNAジャイレースの阻害剤であるnalidixic acidにより、55℃でも細胞凝集が誘導された。このような低温+光で誘導される細胞凝集は、低温での光阻害に対する適応である可能性があり、さらに検討を進める予定である。

2aB09

ラン藻 *Synechococcus* のアデニル酸シクラーゼの遺伝子解析

佐々木さおり、片山光徳、大森正之(東大院・総合文化・生命環境)

アデニル酸シクラーゼ遺伝子を欠損する大腸菌株MK1010はラクトース発酵能を欠く。この菌株のラクトース発酵能の回復を指標として、*Synechococcus* sp. PCC 7942のゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、ラクトース発酵能を回復する66種類の陽性クローンが得られ、これらのうち42種類のクローンでcAMPの生成が認められた。このうち最もcAMPレベルの高い1種類のクローンについて塩基配列の全長を決定した。この遺伝子の塩基配列より推定されるアミノ酸配列中には、アデニル酸シクラーゼの触媒領域においてよく保存されているアミノ酸配列が見い出された。全長を決定したポリペプチドは、633アミノ酸をコードしており、2回膜貫通型のシグナル受容体型構造をとると思われる。この構造はすでに単離されている *Anabaena* 7120のアデニル酸シクラーゼ遺伝子CyaAによく似ている。

2aB10

A laboratory model for the rapid disappearance of cyanobacteria in natural blooms

Toshio Sakamoto and Donald A. Bryant

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
The Pennsylvania State University, University Park,
PA 16802, USA.

We have identified laboratory conditions that induce sudden and complete cell death during the stationary phase of growth of the marine unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. Very high levels of peroxides were detected in the bleaching cells. Once the death phase was initiated, the cells were rapidly bleached of all pigmentation within 18 hours. The addition of polyunsaturated fatty acids into the growth medium also triggered a similar death phase for these cyanobacterial cells. Vitamin E suppressed the formation of peroxides and delayed the cell bleaching. These results suggest that the cyanobacterial cells may be rapidly killed by oxidative stress, including lipid peroxide formation. This laboratory model probably provides insights into the mechanism of sudden cyanobacterial bloom disappearance in nature.

2aB11

Cyanophora paradoxa cyanelle から分離した膜系とその性質

安富佳奈子、菓子野康浩、佐藤和彦、小池裕幸
(姫路工大・理・生命)

Cyanophora paradoxa の“葉緑体”であるシアネルはチラコイド膜上にフィコシアニンを持っていること、また包膜の間に細胞壁を持っていることからラン色細菌によく似た性質を留めており、葉緑体の起源を考える上で重要な生物である。しかしこのシアネルの膜の性質についてはほとんど調べられていない。本研究では単離したシアネルをフレンチプレスで破碎し、膜系を分離してその性質を調べた。

膜系は破碎液から浮上密度勾配遠心法により分離した。すると 1.17 および 1.15g/ml の密度のところ緑色と黄色のバンドが分離してきた。これらはその密度と色からそれぞれチラコイド膜と包膜画分であると考えられる。チラコイド膜についてはさらに界面活性剤により光化学系 I と II の分離を試みた。それぞれの画分のタンパク質組成と共に膜の性質について報告する。

2aB12

シロイヌナズナのシアン耐性呼吸末端酸化酵素 alternative oxidase 遺伝子の構造と発現

中園幹生・最相大輔・堤伸浩・平井篤志(東大・農学生命科学)

植物のミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は主経路(チトクロム系呼吸経路)の他に、ユビキノンから直接酸素(O_2)へ電子を渡すシアン耐性(オールタナティブ)呼吸経路が存在する。シアン耐性呼吸経路の末端酸化酵素は alternative oxidase (AOX) と呼ばれ、その遺伝子は核ゲノムにコードされている。本研究では、alternative oxidase のアミノ酸配列で、植物間で高度に保存されている領域に相当するディジェネレートプライマーを作成し、シロイヌナズナ total DNA を鋳型にして PCR を行なった。増幅された PCR 断片をクローニングし塩基配列を決定した結果、4 種類の異なる配列を持つクローンが得られ、少なくとも 4 コピーの AOX 遺伝子(便宜上 AOXa, AOXb, AOXc, AOXd と名づけた)が存在することが示唆された。さらに PCR により得られた断片をプローブにして、ゲノミックライブラリーよりスクリーニングを行ない、AOXa から AOXd の 4 種類の遺伝子を含むそれぞれのゲノミッククローンを得た。それぞれの AOX 遺伝子の発現を調べたところ、AOXa は呼吸阻害剤 antimycin A, $NaNO_3$ 処理により誘導されることが明らかになった。また、AOXb は花芽で特異的に発現していることも分かった。

3aB01

トレンニアの花色の分子育種

鈴木賢一、薛惠民、田中良和、福井祐子、水谷正子、久住高章(サントリー基礎研究所)

トレンニア (*Torenia humilli*) は、花壇苗に利用される園芸植物で、当社でもその一種のサマーウェーブを販売している。サマーウェーブは多くの優れた商品性を持つにも関わらず、3 倍体であることから、従来育種で色幅を拡げるのは困難であったので、分子育種を試みた。

サマーウェーブブルー (SWB) の花卉からアントシアニンを精製し、これらの構造を決定することにより、トレンニアのアントシアニンの生合成経路を推察した。花卉の cDNA ライブラリーからアントシアニン生合成に関わる遺伝子を数種単離した。

カルコン合成酵素とジヒドロフラボノール還元酵素 cDNA をそれぞれ構成的プロモーターにセンス方向に連結したバイナリーベクターを構築し、SWB に導入したところ、コサプレッションが起こり、アントシアニンを生産しない白花個体やアントシアニン量が減少した個体を多数得ることができた。また、花卉にアントシアニンとカロチノイドを蓄積している当社品種系統 T-33 に同じバイナリーベクターを導入したところ、アントシアニンの量のみが減少し、黄色の花を持つ形質転換植物を得ることもできた。

3aB02

ニンジン培養細胞における代謝的分化および形態的分化に関わる *myb* 相同遺伝子の解析

秋元宏文、野澤彰¹、飯田滋²、小関良宏(農工大・工・生命、¹東大大学院・理、²基生研)

myb 相同遺伝子はトウモロコシにおけるアントシアニン合成あるいはアラビドプシスにおけるトリコム分化に関与していることが、近年明らかにされ、*myb* 相同遺伝子が代謝的分化と形態的分化とにわたり広く遺伝子発現を制御していることがわかってきた。そこでニンジン培養細胞におけるアントシアニン合成および不定胚形成細胞由来の cDNA ライブラリーより *myb* 相同遺伝子をクローニングしたところ 5 種類得られた。ノーザン解析の結果、そのうちの 4 種類がアントシアニン合成時に発現しており、1 種類が不定胚形成時に発現していた。また、後者の *myb* 相同遺伝子は不定胚分化初期段階に特異的であることがわかった。これらの *myb* 相同遺伝子のうち、どれがアントシアニン合成系の発現制御に関与しているのか、PAL プロモーター活性に対する効果をトランジェント解析法により調べた。

3aB03

ニンジン変異細胞系における転移因子 *Tdc* の挿入
伊藤 佳央, 小関 良宏 (農工大・工・生命)

多くの培養細胞において、継代培養を繰り返すことにより培養変異が起こりその全能性が失われたり、偶発的に色素合成をおこす細胞が生じることが知られている。我々はニンジン培養細胞において、この原因の一つとして転移因子の転移・挿入があることを見出した。そこでニンジン培養細胞において、オーキシン存在下でもアントシアニン合成を行う変異細胞、及び不定胚形成を誘導する変異細胞を確立し、これらの変異と *Tdc* 転移因子群の挿入との関連について調べた。*Tdc* 挿入された近傍の DNA 断片を得て Southern 解析を行なった結果、*Tdc* のうちいくつかは正常細胞と変異細胞で異なった遺伝子領域に挿入されていることがわかった。また、それら DNA 断片を用いて Northern 解析を行なったところ、いくつかの断片はアントシアニン合成細胞または不定胚形成細胞において特異的に発現していることがわかった。

3aB04

ヤグルマギク培養細胞からの FLS ,ANS cDNA のクローニングとその解析

佐野知子, 戸栗敏博¹, 武田幸作 (東京学芸大・生物、¹キリンビール基盤研)

ヤグルマギク懸濁培養細胞では、紫外線を含む光照射によりアントシアニンの生成が誘導されるが、その際若干のフラボノール合成も誘導される。本研究では、紫外線照射24時間後の培養細胞から作製されたcDNAライブラリー (λ ZAP II) からキンギョソウの *Candi* cDNA をプローブとして、FLS (フラボノールシンターゼ) と ANS (アントシアニンシンターゼ) のクローニングを行った。FLS については ORF (337 アミノ酸残基) を含む全長の cDNA で、これはペチュニアの FLS アミノ酸配列と 68% の相同性を示した。ANS については全長ではないものの、キンギョソウと 77.5% の高い相同性を示すクローンが得られた。ノーザン解析の結果、両者ともに暗所の細胞では検出されず、紫外線照射による誘導が示された。

3aB05

タバコ培養細胞の2,4-Dで活性化される scopoletin glucosyltransferase の精製と諸性質

田口悟朗¹, 井村洋章², 前田佳男², 林田信明², 下坂 誠¹, 岡崎光雄^{1,2}

¹信州大・遺伝子実験施設、²信州大・繊維・応生

タバコ培養細胞 "Bright Yellow" T-13 株は、その細胞中にクマリン配糖体スコポリンを大量に蓄積する。その生合成の最終段階である配糖化は UDP-glucose: scopoletin glucosyltransferase (SGTase; EC 2.4.1.128) により触媒され、2,4-D により活性化を受ける。この活性化機構、及びタバコにおけるクマリンの配糖化の意義を明らかにするため、SGTase の精製を行った。

ホルモンフリーの MS 培地で 2 週間液体振盪培養した細胞に終濃度 1 ppm の 2,4-D を添加して 24 時間培養し試料とした。抽出した粗酵素液を DEAE-cellulose, Hydroxyapatite, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex CL-6B, UDP-glucuronic acid agarose を用いて約 8000 倍まで精製した。この酵素の諸性質及び N 末端のアミノ酸配列を報告する。

3aB06

アベナのポリアミン分解経路

永山烈, 平澤栄次 (大阪市大・理・生物)

アベナなどのイネ科植物にはポリアミン酸化酵素が知られており、最近ではジアミン酸化酵素も含まれていることが報告されている。イネ科のポリアミン酸化酵素はスペルミジンとスペルミンを酸化し、両基質から 1, 3-ジアミノプロパン、そしてそれぞれ Δ -ピロリンとジアザビシクロノナンを生成する。本研究室ではイネ科のジアミン酸化酵素はマメ科の酵素と異なり 1, 3-ジアミノプロパンを酸化してアミノプロピオンアルデヒドにすることを見いだした。またアミノプロピオンアルデヒド、 Δ -ピロリン、ジアザビシクロノナンを酸化して β -アラニン、GABA、アミノプロピルピロリジノネに酸化するアミノアルデヒド脱水素酵素の存在も報告した。

今回、アベナの粗抽出液にアミノプロピルピロリジノネをさらに分解する酵素活性を見だし、精製を行った。

3aB07

形質転換植物のアルカロイド生合成能の改変

八谷輝、高本秀司、橋本隆、山田康之（奈良先端大・バイオ）

低ニコチン変異株のタバコの根において特異的に発現が抑えられている遺伝子の cDNA が 2 クローン単離され、1 つは putrescine N-methyltransferase (PMT) をコードする遺伝子であると同定された。この PMT を初発酵素として、*Nicotiana sylvestris* は主にニコチンを *Atropa belladonna* は主にヒヨスチアミンを蓄積する。もう 1 つのクローン A622 がコードするタンパク質は、マメ科植物の isoflavone reductase (IFR) と高いホモロジーを示すものの、タバコは IFR を持たないため、A622 は NAD(P)(H) を補酵素とする酸化還元酵素をコードすると示唆された。我々は植物の持つアルカロイド合成能力を改変し、かつ A622 の機能を推定することを目的として、両 cDNA を *N. sylvestris* と *A. belladonna* へセンス、又はアンチセンス方向に導入し、形質転換植物の形態、アルカロイド含量、ポリアミン含量を調べた。

PMT の発現を抑制した *N. sylvestris* のニコチン含量は非常に低下していた。PMT を過剰発現させた *A. belladonna* ではヒグリンが検出され、A622 を過剰発現させた *A. belladonna* ではヒヨスチアミン含量の減少が認められた。他の形質転換植物に関しても現在解析を行っている。

3aB08

イソキノリンアルカロイド生合成の分子育種

(1) オウレン *O*-methyltransferase 遺伝子のタバコにおける発現

藤本秀基、佐藤文彦(京大農・農化)

イソキノリンアルカロイドの一つであるベルベリンの生合成経路には3段階の *O*-メチル化による反応が存在する。我々はこれら3段階全てのメチル化酵素の cDNA を単離し、これらの遺伝子を用いたイソキノリンアルカロイド生合成の分子育種を試みている。これまでにエンハンサー配列を反復して持つカリフラワーモザイクウイルス改変 35S プロモーター (E12) の下流に GUS レポーター遺伝子を接続した発現ベクターを用いたパーティクルガンによるオウレン培養細胞への遺伝子導入条件の最適化について検討した。今大会では新たに発見した浸透圧の効果ならびにオウレン培養細胞中で最も高い活性を持つ E12 プロモーターの下流に3種類の *O*-メチル化酵素遺伝子を sense 方向に接続したベクターの構築と同ベクターを用いたタバコ植物体の形質転換を報告する。既にタバコ形質転換体を PCR 解析し、遺伝子が正しく導入されたことを確認するとともに現在酵素活性を評価中である。また、パーティクルガンを用いたオウレン培養細胞の形質転換を図っており、その結果についても併せて報告する。

1) 日本農芸化学会講演要旨集 p85, (1996)

3aB09

オウレン培養細胞からのシトクローム P450 cDNA のクローニングと解析

田中勝、佐藤文彦(京大・農・農化)

オウレンのイソキノリンアルカロイド生合成に関与する3つのシトクローム P450 をコードする cDNA の単離を試みた。まず、植物のシトクローム P450 における保存アミノ酸配列をもとにディジェネレートプライマーを合成し、オウレン培養細胞 cDNA ライブラリーを鋳型とした PCR 反応を行った。さらに、その増幅産物を用いてオウレン培養細胞 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、1.7kbp と 0.8kbp の 2 種類の cDNA 断片を得た。塩基配列を決定したところ、1.7kbp の断片は、488 アミノ酸からなる ORF を含み、N 末端部分にシグナル配列と思われる疎水性領域を持つことからシトクローム P450 の全長をコードすると考えられた。ホモロジー検索の結果、予想されるアミノ酸配列はビスベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系の berbaminine synthase (CYP80) と高い同源性を示した。一方、0.8kbp の断片は、既知のシトクローム P450 との同源性から、C 末端側のみを含む不完全な cDNA 断片であると考えられた。現在、これら 2 つの cDNA を用い、植物体における発現部位の解析ならびに、COS 細胞系を用いた機能の解析を行っている。

3aB10

ジャスモン酸メチルによるムラサキ培養細胞の shikonin 生産に対する誘導効果

矢崎一史、武田賢太¹、田端 守¹

(京大・農・農化、¹京大・薬・生薬)

ジャスモン酸類は、高等植物の様々な生理現象において重要な情報伝達物質として、近年その機能解明が行われている。ムラサキの培養細胞は赤色素シコニンの生産系として工業的に応用されているが、シコニン生合成は Cu^{2+} を添加した Linsmaier-Skoog 培地に、酸性多糖であるオリゴガラクトロン酸を投与することでも誘導される。最近演者らは、ムラサキ培養細胞のシコニン生産がジャスモン酸メチルで用量依存的に誘導されることを明かにした。その誘導パターンはシコニンと副産物であるジヒドロエキノフランとで大きく異なり、前者では数日の lag time の後生合成が誘導されたのに対し、後者では投与直後に生産の上昇が見られた。その効果は、シコニン生産の場合、培養初期より中期以降の投与で強いことが認められた。また、ジャスモン酸メチルは種々の生合成酵素活性に影響を与え、特に鍵酵素である geranyltransferase 活性を著しく誘導した。これらの結果は多糖によるエリシテーションとほぼ一致するものであったが、唯一ジャスモン酸メチルによる誘導には Cu^{2+} の添加が不要であることで異なっていた。

3aB11

緑藻 *Botryococcus braunii* の炭化水素合成系遺伝子の探索

矢野伸一、河田悦和、小嶋洋之（工技院・大阪工技研）

コロニー性緑藻 *B. braunii* は炭化水素を多量に合成・蓄積することで知られており、特に B race が生産するポツリオコッセンと呼ばれる分枝不飽和炭化水素は燃料油生産の原料として期待されている。ポツリオコッセンの生合成系はまだ明らかになっていないが、構造からスクアレンの合成系と関連がある可能性が考えられたので、他の生物のスクアレン合成酵素でアミノ酸配列が保存されている領域から設計したプライマーで PCR を行い、得られた DNA 断片の塩基配列を調べたところ、この断片はスクアレン合成酵素の保存領域を完全に保持している一方、他の生物の酵素とは全く相同性を持たない部分も持っていることが明らかになった。この結果からこの断片がスクアレンではなくポツリオコッセンの合成酵素をコードする遺伝子の一部である可能性が示唆される。

3aB12

シアノバクテリアのポリヒドロキシ酪酸生合成制御
三宅正人・浅田泰男（工技院・生命研）

各種異なる条件で培養された好熱性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. MA19 株(1)から調製した無細胞抽出液に各種代謝中間体を添加し、*in vitro* での PHB シンターゼの活性化を試みたところ、アセチルリン酸によって活性化が起こることが判明した。アセチルリン酸はホスホトランスアセチラーゼ (pta) の触媒作用によりアセチル-CoA と平衡関係にある代謝中間体である。MA19 株の pta 活性を Mayerらの方法(3)によって測定したところ、培養の窒素条件によって大きく変化することが判明した。

以上の結果より、MA19 株の PHB 生合成調節においてホスホトランスアセチラーゼが重要な役割を担っていることが推測された。

参考文献(1)Miyake M. et al. (1996) J. Ferment. Bioeng. 82: p516-518. (2)三宅正人、他. 平成8年度日本生物工学会大会講演要旨集 p331. (3)Mayer M. A. G. et al. (1995) Microbiology 141: p2891 -2896.

3aB13

光独立栄養的ポリエステル生産の代謝

浅田泰男¹・高橋英之²・三宅正人¹（¹工技院・生命研,²地球環境産技研）

生分解性ポリエステルの原料として知られるポリヒドロキシ酪酸(PHB)の生産方法として植物等の光合成能の積極的利用が期待されている。我々は、バクテリアから分離されたポリエステル合成遺伝子群 (phb) を導入したシアノバクテリア(1,2)と自然界から分離された高い PHB 蓄積能を有するシアノバクテリア(3)の代謝系を比較することで、光合成による炭酸ガスからの PHB の効率的生産方法についての考察を行った。その結果、シアノバクテリア由来 PHB シンターゼの K_m 値はバクテリア由来のものに比べ 10 分の 1 程度低いことが判明した。そのほか酵素の比活性、炭素フラックスが生産性に影響することが推察された。

参考文献(1) Suzuki T. et al. (1996) Biotech. Lett. 18: p1047-1050. (2) 高橋英之、他. 平成8年度日本生物工学会大会講演要旨集 p330. (3) Miyake M. et al. (1996) J. Ferment. Bioeng. 82: p516-518.

1aC01

ストレプトアビジンに特異的に結合するタンパク質(78kDa)の分離・精製と構造解析

高瀬徳子、川上馨、阿部俊之助(愛媛大・農・生資)

我々は細胞骨格画タンパク質のなかにストレプトアビジンに特異的に結合するタンパク質(SBP)が存在し、そのタンパク質はエンドウをはじめ動物を含む種々の生物に存在することを報告してきた。またSBPは多くの種類の生物に保存的に見られることから細胞内で何らかの重要な機能を担っていることが推察され、その分子構造と細胞内での機能に興味を持たれる。しかしこれまでSBPの分離・精製法は確立されていなかった。

そこで、このSBPの分子構造と細胞内での機能を調べるため、本研究において、まずエンドウの78kDa SBPの分離・精製を試みた。エンドウの5日目黄化芽生えの第一節間から抽出した細胞骨格画分をPTEを含む高塩濃度のバッファー(CDB:450mM KoAc, 200mM Tris-HCl, (pH 8.5), 25mM Mg(OAc)₂, 0.5mM ATP, 2% PTE)で細胞骨格を解離させたあと遠心し、この上清をアビジンがリガンドとして結合しているアフィニティークラムにアプライした。この結果、SBPはこのカラムに結合した。またこの結合は1mg/mlのピオチンや高塩濃度のバッファーでは溶出できなかったが、グアニジンチオシアン酸(5.5 M)を含むバッファーによりSBPがこのカラムから溶出した。SDS-PAGEとウェスタンブロットでこの溶出タンパク質が78kDaのSBPであることを確認した。現在この精製されたSBPのバンドを切り出しアミノ酸配列分析などの構造解析を行っている。

1aC02

アラスカエンドウより抽出したリボソーム凝集活性タンパク質をコードするcDNAの解析

伊東麻子、安座間喜崇、Eric Davies¹、阿部俊之助

(愛媛大・農・生物資源、¹ノース・カロライナ州立大・植物)

'96年、本会において、アラスカエンドウの黄化芽生えより抽出した、リボソームと結合する性質を持つタンパク質RSP(42.5 kD)の性質と、そのヘパリンアフィニティークラムによる精製について報告した。そこで今回は、このRSPをコードするmRNAのcDNAのクローニングとその構造解析を行った結果を報告する。

まず、RSPの部分アミノ酸配列を元にプライマーを合成し、これと、オリゴdT末端の標識配列に結合するプライマーを用いて、cDNAに対するPCRを行った。その結果、得られたcDNA断片の配列のコードするアミノ酸配列は、RSPの部分アミノ酸配列に完全に一致するが、RNAスプライシングにより生じたと思われる、3'末端の構造が異なる2種類のcDNA断片が得られた。次に、得られたcDNA断片のコーディング領域より、DNAプローブを作成し、エンドウのcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、RSPをコードする塩基配列を含むより長鎖のcDNAが得られた。しかし、その5'末端は確定できなかった。そこで5' RACE-PCRを行った結果、完全長のRSPとみられるcDNAの配列が明らかとなった。この遺伝子の解析の結果、RSPは核酸結合性をもつヒストンH1やRNAの輸送に関与すると考えられるタンパク質Nopp140と、部分的に高いホモロジーを持つことがわかった。一方、この遺伝子を大腸菌を用いて発現したタンパク質の分子量から、RSPは糖鎖やリン酸基のよう何らかの修飾を受けていることが示唆された。

1aC03

ニンジン培養細胞におけるフィブロネクチン様タンパク質の存在について

我妻千尋、西本完、保田浩、増田宏志(帯広畜大・生物資源化学)

植物組織にフィブロネクチン様タンパク質が存在し、それが細胞接着に関与していることが知られている。私達は植物組織、特に不定胚形成過程で細胞間の接着に興味をもっている。そこで、ニンジンの培養細胞を材料にしてフィブロネクチン様タンパク質の存在について検討したので報告する。

ヒトフィブロネクチンをウサギに免疫し、フィブロネクチンに対する抗血清を調製した。得られた抗血清を用いてニンジン培養細胞の粗抽出液に対してウェスタンブロットングを行った結果、分子量29kDのバンドが検出された。このタンパク質を精製して、フィブロネクチンとしての性質をもつかどうかを検討した結果、ゼラチンに対する接着は見られなかった。ニンジンの不定胚形成過程の各ステージの粗抽出液についてウェスタンブロットングを行ったところ、このフィブロネクチン様タンパク質は細胞塊から再生幼植物体までの各ステージに存在していた。また、このタンパク質はニンジン実生にも存在していた。

1aC04

アブシジン酸によって誘導される冬小麦培養細胞の分泌タンパク質に関する研究

桑原 慎子、荒川 圭太、吉田 静夫(北大・低温研)

植物の培養細胞の培地に分泌される細胞外高分子化合物(タンパク質、多糖類など)は、細胞の生育条件によりその組成が変化するため、細胞分化、成長、接着、ストレス耐性などに関する生理的役割について興味を持たれている。アブシジン酸(ABA)処理によって耐水性が増加する冬小麦培養細胞(*Triticum aestivum* L. cv Chihoku)では、培地中に特徴的なタンパク質が分泌されることが明らかとなった。そこで本研究では、これらの分泌タンパク質の一次構造の推定を通して、その生理的役割を解明することを目的とした。

冬小麦培養細胞を50 μM ABA存在下で振盪培養した後の培地と無処理の培地について、タンパク質組成を電気泳動法(SDS-PAGE, NEPHGE)によって調べたところ、両者間で明らかな差異が見いだされた。なかでもABA処理によって分泌が促進されるポリペプチドは、塩基性でかつ比較的分子量のものであった。現在、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー等によりこれらの部分精製を試み、その部分的アミノ酸配列の決定を行っている段階である。

1aC05

二倍性コムギ(*Triticum monococcum*)における未熟種子の果皮、糊粉層、胚に存在するアミロース合成酵素としての56kDaタンパク

藤田直子, 平知明 (大阪府立大学・農学部・応用植物科学)

waxy遺伝子は禾穀類の胚乳および花粉で発現し、アミロース合成酵素をコードしている。waxy mutantは胚乳および花粉デンプンのアミロースを欠失するが、トウモロコシの果皮および胚やイネの葉に存在するデンプンにはアミロースが存在するため、これらの器官、組織には、胚乳や花粉とは別のアミロース合成酵素が存在することが示唆されてきた。本研究では、EMS処理により作成した二倍性コムギ *T. monococcum* の waxy mutant を用いて、未熟種子の果皮、糊粉層、内胚乳、胚のアミロースの有無の確認、結合型デンプン合成酵素の活性測定およびデンプンに結合したタンパクのSDS-PAGEを行った。waxy mutantの未熟種子において、内胚乳以外の果皮、糊粉層、胚に存在するデンプンは濃青色に染まり、アミロースの存在が確認された。開花後5、10日目の果皮、糊粉層と開花後25日目の胚から精製したデンプンは高い酵素活性を示し、このデンプンに結合したタンパクのSDS-PAGEからは、分子量56kDaのタンパクバンドが検出された。この56kDaタンパクはwaxyタンパクに対する抗体に反応し、N末端からのアミノ酸配列はwaxyタンパクと44%の相同性を示した。これらの結果は、56kDaタンパクが果皮、糊粉層および胚に存在する第2のアミロース合成酵素であることを示唆する。

1aC06

葉緑体ストロマにおけるフェレドキシン鉄-硫黄クラスター形成機構の解析

西尾和晃、藤田祐一、中井正人、長谷俊治 (阪大・蛋白研)

フェレドキシン (Fd) は葉緑体内で機能する電子伝達蛋白質で、その活性中心として鉄-硫黄クラスターを有する。細胞質で合成されたFdは、葉緑体に輸送された後、鉄-硫黄クラスターが形成され、アポ型Fdから機能しうるホロ型Fdに変換される。従って、葉緑体はアポ型Fdに鉄-硫黄クラスターを形成する活性を有すると考えられるが、その詳細はほとんど不明である。そこで我々は、ホウレンソウの葉緑体を材料として、アポ型Fdに鉄-硫黄クラスターを形成する活性の探索を試みた。形成活性は、トリチウムでラベルした成熟体サイズのアポ型Fdを小麦胚芽抽出物を用いた *in vitro* 翻訳系で合成し、アポ型Fdからホロ型Fdへ変換された分子を未変性PAGEにより分離し、新たに生じるホロ型Fdのシグナル強度で評価した。葉緑体内において本活性は可溶性画分(ストロマ)に局在し、30℃から40℃の間で最大の活性を示した。ストロマを70℃で30分間前処理すると、この活性は消失した。次にゲルろ過及び、イオン交換クロマトグラフィーの二つの手法によってストロマの分画を行い、本活性の分離を検討した。いずれの手法によっても本活性は、単一のピークとして回収され、その分子量はおおよそ16万と見積もられた。以上の結果は、フェレドキシンへの鉄-硫黄クラスターの形成に、ストロマに存在する何らかの蛋白質因子が関与していることを示している。現在、本活性の詳細な解析を進めるとともに、ホロ型変換過程における葉緑体分子シャペロンの関与についても検討している。

1aC07

真性粘菌フィザルム変形体酸性ホスファターゼの精製
鈴木陽子, 加藤みゆき, 金子堯子 (日本女子大・理・物生)

真性粘菌フィザルム変形体は、暗所飢餓処理下において細胞壁を有する耐性型細胞 (スクレロチウム, Sc) を形成する。変形体から同調的にScを誘導する過程で、細胞内可溶性酸性ホスファターゼはその形成時にはリン酸転移活性が上昇し、その後リン酸転移活性の下降に伴い加水分解活性の上昇が見られる。本研究ではこの酵素を変形体から抽出し、硫酸分画およびDEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーにて部分的に精製した。さらに、nonSDS-PAGEにて酵素を分け取り2つのアイソフォームを得た。これらのアイソフォームについてリン酸転移活性と加水分解活性を中心に、アイソフォームの性質を検討した。

1aC08

Spirodela oligorrhiza の GPI-アンカーをもつ phosphatase は purple acid phosphatase である
岡本貴史、中里洋、森田直樹¹、Guy A. Thompson, Jr.²、奥山英登志 (北海道大大学院・地球環境科学、¹工技院・北海道工技研、²テキサス大・植物)

リン酸飢餓条件下で誘導される *S. oligorrhiza* の100 kDaのphosphataseはグリコシルイノシトール脂質(GPI)-アンカータンパク質である^{1,2}。

本研究で、このphosphataseは、薄い紫色を呈し、550 nmに極大吸収をもつこと、分子内にFeとMn原子をもつ金属酵素であることからpurple acid phosphatase (PAP) であることが示唆された。また、本酵素のN末アミノ配列はシロイヌナズナのPAPと高い相同性を示し、抗シロイヌナズナPAP抗体は本酵素を特異的に認識した。これらの結果は、本酵素がGPI-アンカー構造をもつPAPであることを示している。しかし、本酵素は至適pHを7にもつ点で、既知のPAPとは異なっていた。また、本酵素の活性は部分的に酒石酸塩により阻害された。

¹N. Morita et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1290: 53-62.

²H. Nakazato et al. (1997) *Plant Physiol. Biochem.*, in press.

1aC09

Spirodela oligorrhiza (ヒメウキクサ) のGPI-アンカーを持つ purple acid phosphatase の遺伝子について 錦織美和、鷲尾健司、岡本貴史、中里洋、Guy A. Thompson, Jr.¹、奥山英登志 (北海道大・地球環境科学、¹テキサス大・植物)

リン酸飢餓状態で誘導される *S. oligorrhiza* の高分子量 phosphatase はGPI-アンカータンパク質である¹。更に本酵素はその生化学的性質と、N末端アミノ酸配列の相同性から Purple acid phosphatase (PAP)であることが明らかにされている。

本研究では、GPI-アンカーを持つPAPの遺伝子をクローニングするため、リン酸飢餓状態で培養し *S. oligorrhiza* からcDNAライブラリーを作り、*Arabidopsis thaliana* のPAP遺伝子をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った。その結果、C末端の配列を含む約1.4 kbpの塩基からなるクローンを得た。アミノ酸配列を調べたところ、*A. thaliana* のPAPと82%の相同性があった。更に、C末端に近接して Ala-Asp-Ser からなる small amino acid の配列があり、Ala がGPI-アンカーの結合サイトであることが予想される。現在、5'RACE法によってN末端塩基配列の決定を試みている。

- 1) Morita et al., (1996) *Biochem. Biophys. Acta.*, 1290: 53-62

1pC01

ハス種子登熟期および発芽期における子葉プロテアーゼ活性の変動

鈴木みゆき、岡本龍史、南川隆雄 (東京都立大・理・生物)

ハス (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 種子は長期間その発芽能を維持できることが知られている。しかし、ハス発芽期の貯蔵タンパク質分解に関与するプロテアーゼについての知見は少ない。そこで発芽期および登熟期にどのようなプロテアーゼが作用しているかを調べるため、数種の蛍光性 (MCA) ペプチドを基質として、その活性を測定した結果、中性付近に至適 pH 域をもつプロテアーゼが完熟種子と発芽 3 週目の子葉中に、酸性領域に至適 pH 域をもつプロテアーゼが後者の子葉中に検出された。また、ケツルアズキ子葉のシステインエンドペプチターゼ (SH-EP) に対する抗体と反応する 22kD ポリペプチドが発芽 1 - 2 週目の子葉抽出液中に検出された。これらの結果は、多くの発芽種子で存在が知られている酸性プロテアーゼおよびそれらとは異なる中性プロテアーゼがハスの発芽種子中に存在することを示唆している。一方、登熟期の種子では発芽期のプロテアーゼとは基質特異性の異なるプロテアーゼが発現していることが推定された。

1pC02

ヒマワリ種子酸性プロテアーゼの精製
朴 恵卿、小林 秀行*、日下部 功
(筑波大、応生化、*農水省 食総研)

動物、微生物の酸性プロテアーゼはその生理的機能等についてよく知られている。しかし植物では大麦、米などで研究されているが、生理的機能についてはよく分かっていない。植物の酸性プロテアーゼは発芽前は種子中に豊富に存在し、発芽中には根、芽を含む全細胞に見られるので 細胞の基礎代謝に大事な役割を果たしていると推測されている。

ヒマワリの種子に存在する酸性プロテアーゼの構造と生理的機能を明らかにする為にヒマワリ種子中に存在するこの酵素の精製を行なった。ペプスタチンアミノヘキシルアガロースカラムとDEAE-セファロースカラムにより精製された本酵素は分子量30 kDaと10 kDaの二つのsubunitから構成され、ヘモグロビンを基質とした時の至適pHは2.5、至適温度は45⁰C、安定pH域は5-6、熱に対しては30⁰Cまで安定であった。両サブユニットのN-末端アミノ酸分析の結果、既に一次構造が明らかになっている大麦種子中の酸性プロテアーゼと70-80%の相同性が認められた。現在発芽させたヒマワリ種子の発芽期の酸性プロテアーゼの活性の変化について調べている。

1pC03

イネの20Sプロテアソームの部分精製とサブユニットの同定
中澤美紀、伊藤健二、平野久 (横浜市大・木原生研)

プロテアソームは細胞内蛋白質分解に関わるプロテアーゼの複合体である。動物や酵母の20Sプロテアソームは α 、 β サブユニット各7種類から構成されていることが知られている。しかしながら、植物ではプロテアソームの存在は知られていないもののサブユニットの同定は成されていない。我々は20Sプロテアソームをイネから単離し、各サブユニットの部分アミノ酸配列を解析することにより、現在までに記載されている動物や酵母のプロテアソームサブユニットと対応させた。20Sプロテアソームはイネのヌカを出発材料とし、超遠心によりリポソームフラクションを得た後、グリセロール密度勾配遠心法により部分精製を行った。部分精製品はSDSの添加により、ペプチダーゼ活性の活性化が見られた。サブユニットは二次元電気泳動により分離しPVDF膜に転写した後N末端アミノ酸配列分析を行った。N末端がブロックされていたものに関しては、二次元電気泳動後のゲルから回収し、クリーブランド法によって断片を得た後にアミノ酸配列分析を行った。各スポットの部分アミノ酸配列をホモロジーサーチにかけ、サブユニットの同定を行った。その結果、 α サブユニット6種類、 β サブユニット10種類を同定した。

1pC04

ダイコンAPSスルホトランスフェラーゼの精製と性質
荒 武, 關谷次郎 (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。しかしまだに高等植物からの単離の報告はない。我々は本酵素の精製を行い、その性質について検討した。

材料としてカイワレダイコンを用い、硫酸分画後、DEAEセルロース、AMPセファロース、フェニルセファロースなどのカラムクロマトグラフィーを用いてAPSスルホトランスフェラーゼをSDS-PAGEで均一になるまで精製した。本酵素の諸性質についての検討結果もあわせ報告する。

APS, adenosine 5'-phosphosulfate

1pC05

STUDY OF S-ADENOSYL-L-METHIONINE: L-METHIONINE S-METHYLTRANSFERASE FROM GREEN BARLEY MALT

Maria João PIMENTA, Yvan LARONDELLE¹, Yuji KAMIYA, Plant Hormone Function, Frontier Research Program, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, 351-01 Saitama, ¹Biochimie de la Nutrition, Univ. Catholique de Louvain, Place Croix du Sud, 2/Bte 8, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

The physiological role of S-methylmethionine (SMM) in plants is not yet fully understood. SMM is produced from methionine and S-adenosylmethionine in a reaction catalyzed by S-adenosyl-L-methionine: L-methionine S-methyltransferase (EC 2.2.1.12). The study of SMM synthesis is very important from the physiological, nutritional and technological points of view. SMM is synthesized during barley germination and the control of its synthesis seems to be the best way to manage the content of the dimethylsulfide off-flavor in beer.

In this communication we present a simple purification scheme for the methyltransferase consisting of a 10-25% PEG fractionation, an anion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose and an affinity chromatography on adenosine-agarose. A final activity yield of 11% and a 1942-fold purification factor were obtained. SDS-PAGE analysis of the adenosine-agarose fractions still revealed the presence of two bands of about 110 kDa and 70 kDa size. The enzyme appears to have a subunit relative molecular mass of 110 kDa since this band follows the enzymatic activity.

1pC06

ジャガイモ塊茎における液胞膜H⁺-pump
遠藤千絵, 箱山晋, 前島正義¹ (農水省・北海道農試, ¹名古屋大・農・生物化学)

我々は、植物の貯蔵器官細胞における液胞の機能を理解するために、ジャガイモ塊茎の液胞膜H⁺-pumpの特性を解析している。

生育過程および収穫後の4℃貯蔵過程のジャガイモ (*Solanum tuberosum* cv. Touya) 塊茎より経時的にそれぞれ液胞膜を調製し、H⁺-ATPase、H⁺-PPaseの基質分解活性、H⁺輸送活性を測定したところ、液胞膜タンパク質当たりの両酵素の活性は、検討した期間を通して高いレベルで存在することがわかった。H⁺-PPase活性は未熟塊茎で多く肥大に伴って半減したが、免疫プロットにより、膜タンパク質当たりのH⁺-PPase量が減少していることがわかった。また、両酵素を液胞膜から可溶化・精製し、そのサブユニット構成を調べたところ、報告されている他の植物種の液胞膜H⁺-pumpと同様、ジャガイモでは、H⁺-ATPaseは10個の異なるサブユニット (分子サイズ100-, 65-, 54-, 41-, 36-, 35-, 31.5-, 17-, 14-, 12.5-kD) から、H⁺-PPaseは分子サイズ75-kDの単一のサブユニットから構成されることが明らかとなった。このように貯蔵器官であるジャガイモ塊茎においても充分量の液胞膜H⁺-pump活性がみられたことから、膜を介した活発な物質輸送の存在が示唆された。現在、液胞膜水チャンネルについても解析しているので合わせて報告する。

1pC07

真核藻類 *Spirogyra* sp. の CuZn-スーパーオキシドジスムターゼの分子的性質

金松澄雄, 小川健一¹, 浅田浩二² (南九州大・食品工、¹京都大・理・分子植物科学、²京都大・食研)

大部分の真核藻類は CuZn-, Mn-, Fe-SOD の3種のSODのうち、CuZn-SODを欠いているが、緑藻の一部や車軸藻には CuZn-SOD活性が認められる。しかしながら、これら真核藻類のCuZn-SODの分子的知見は乏しい。我々は先に、高等植物のクロロプラスト型CuZn-SODアイソザイムはチラコイド膜上に、またサイトゾル型CuZn-SODはアポプラストに局在していることを明らかにしている。陸上植物の祖先と考えられるこれらの真核藻類のCuZn-SODの性質を明らかにすることは、高等植物でのSODアイソザイムの生理的役割と関連して重要である。

Spirogyra は活性染色で3本の CuZn-SOD のバンドを与えた。材料 1.2kg より、イオン交換・疎水クロマト、ゲル濾過等の常法により、2種の CuZn-SOD アイソザイム (SOD I, SOD III) を電気泳動的に均一に精製した。それぞれ、分子量が31,000-32,000で、サブユニット分子量20,000の2量体であった。N-末端アミノ酸配列 (約40残基) を調べた結果、数残基が異なり、両者はチャージアイソマーではなく、異なる遺伝子産物であることが示された。また、N-末端の特異なアミノ酸配列より、クロロプラスト型のSODであることが判明した。このことは、ホウレンソウのクロロプラスト型 CuZn-SOD に対する抗体との反応性でも確認された。以上の結果より、今回、初めてクロロプラスト型 CuZn-SOD に2種のアイソザイムが存在することが示された。

1pC08

サツマイモ培養細胞におけるポリフェノールオキシダーゼの活性化機構とモノフェノール水酸化酵素活性

鈴木啓太, 塩入秀成, 小島峯雄, 野末雅之
(信州大・繊維・応用生物科学)

ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)は、*o*-ジフェノールから*o*-キノンへの酸化反応およびモノフェノールから*o*-ジフェノールへの水酸化反応を触媒する酵素であり、葉緑体のチラコイド膜あるいはチラコイド内腔に存在するといわれている。また、種々の植物で40~45kDの活性型PPOと60~65kDの不活性型PPOが存在することが知られている。

我々は、PPOの*o*-キノンへの酸化反応の活性化機構とその役割を解明するため、サツマイモ培養細胞から活性型PPO(39kDおよび40kD)を精製し、抗体を作製した。照射サツマイモ培養細胞では、活性型PPOが発現するが、それ以外にも不活性型60~66kDのタンパク質が存在することがわかった。60~66kDのタンパク質は、40kD活性型PPOへのプロセッシングおよびSDS添加により活性化される。また、40kD活性型PPOには*o*-ジフェノール酸化酵素活性と共にモノフェノール水酸化酵素活性を有することが明らかになった。これら二つの酵素活性の生理的意義について、現在検討中である。

1pC09

ピーマン果実脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ(CYP74B)のクローニングとその発現

松井健二, 澁谷瑞義, 長谷俊治¹, 梶原忠彦
(山口大・農・応生化、¹阪大・蛋白研)

脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ(HPO lyase)は不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドを開裂し、抗菌活性を有する短鎖アルデヒドを生成する酵素であり、植物の感染防御機構に関与していると示唆されている。我々はこれまでにピーマン果実より本酵素を均一にまで精製し、本酵素がヘム蛋白質であることを見いだした。精製酵素の分光学的特徴はシトクロームP450酵素に酷似していたが、このものを一酸化炭素処理しても450nmの吸収増大はみられなかった。そこで、ピーマン未熟果由来cDNAライブラリーから、本酵素のcDNAを単離した。その結果、全長1.7 kbpで唯一の読み枠を有するcDNA、PL22が得られた。PL22を発現ベクターpTrc99Aに挿入し、大腸菌を形質転換すると、HPO lyase活性が出現し、本cDNAがHPO lyaseをコードしていることが確認された。PL22はP450遺伝子族に特徴的な4つのドメインの内、Domain B、C、Dを有しており、中でもDomain Dにはヘムの結合に与るシステイン残基も確認された。また、flax seed AOS (CYP74A)とアミノ酸レベルで40%の相同性を示した。以上のことからPL22は新規なシトクロームサブファミリーとしてCYP74Bと名付けられた。現在、PL22をプローブとして、ピーマン果実の生育に伴う発現量変化、及び各組織での発現様式を解析中である。

1pC10

講演中止

1pC11

ダイズ共生窒素固定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様式

畑信吾, 泉井桂, 河内宏¹ (京大院・農, ¹生物研)

マメ科植物の窒素固定根粒においてホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)は炭素代謝の中心的役割を果たし、①バクテロイドの代謝基質となる有機酸の供給、②宿主細胞における窒素化合物の炭素骨格やエネルギーの供給、③根粒内や導管における電荷バランスの調整などを行っていると考えられている。私達はダイズ根粒より本酵素遺伝子のcDNAクローニングを行い、根粒特異的に発現する分子種と、根粒以外の器官にも一様に発現する分子種を得た。ノーザン解析を行った結果、前者は根粒形成のかなり初期から発現がみられ、窒素固定が始まる頃にレベルが上昇することが明らかになった。一方、後者の発現レベルは比較的低いままであった。また根粒特異的PEPCのプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行ったところ、この分子種はバクテロイド感染細胞、非感染細胞、皮相細胞、通導組織細胞など、多様な細胞でほぼ同様に発現していることが示された。この分布は、他の多くの根粒特異的タンパク質と対照的であり、本酵素の多面的な役割を反映していると考えられる。

1pC12

ダイズにおける2つのウリカーゼ遺伝子発現
O高根健一、河内宏1、田島茂行
(香川大・生物資源科学、1農業生物資源研)

ダイズ根粒ウリカーゼは、固定窒素の植物地上部への転流において、鍵酵素としての役割を果たすと考えられている。本酵素は、ノジュリン-35 (Nod-35) のホモ-四量体で、根粒内非感染細胞のパロキシゾームに局在することが明らかとなっている。Nod-35遺伝子は根粒特異的に発現すると考えられていたが、我々は発芽中の種子においても同一の遺伝子が発現していることを明らかにした。昨年の本会において、ダイズ (*Glycine max.* (L) cv アキセングク) 根粒には2つのNod-35遺伝子 (UR2, UR9) が存在していることと、これまでのプロモーター解析の結果を報告した。今回は、これら2つの遺伝子の根粒発現段階での発現比較、およびダイズ植物の様々な組織における両遺伝子の発現比較を行ったので報告する。

2つの遺伝子の発現比較は、RT-PCR後、ダイズ根粒ウリカーゼcDNAプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションに供することにより行った。根粒発現段階のサンプルは、3日目の非感染根、3日目の感染根、5、7日目の感染根及び根粒、10日目の根粒を用いた。Total RNA 5ngを逆転写した後、同一チューブ内で定量的PCRを行うため、異なったサイズの増幅産物が合成されるように設計した特異的プライマーを用いてPCRを行った。UR9cDNAをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、UR2の発現量は全てのサンプルにおいてほぼ同じであったが、UR9は根粒の発達に伴い発現が増幅していることが確認された。このことから、根粒の発達に伴い、強く発現が誘導されるのはUR9であることが示唆された。

様々な組織における2つの遺伝子の発現比較を行うため、13日目の根粒、3日目の非感染根の先端、6日目の非感染根、7日目の茎、18日目の葉、茎頂、開花後29日目の種子からtotalRNAを調製し、RT-PCRを行い、サザン解析した。その結果、UR2のバンドは、全てのサンプルから検出されたが、UR9では根粒、種子においてUR2よりも強く発現していることが認められた。

以上の結果から、ダイズ植物の全ての組織に発現しているウリカーゼ遺伝子はUR2であるが、これに対し、窒素固定産物、あるいは窒素代謝産物の量的な増加に伴って発現増幅が顕著に生じるのはUR9遺伝子産物であることが示唆された。

1pC13

エンドウFix⁻突然変異体E135に形成された根粒における窒素同化酵素の活性
萱沼敦生、伊豆原巧、山本浩二、西村真綾、鳥山可菜子 (愛知教育大・生命科学)

マメ科植物の根粒では、窒素固定によって固定された窒素は、最初に、グルタミン合成酵素(GS)とグルタミン酸合成酵素(GOGAT)によって、同化される。われわれは、これまでに、エンドウのFix⁻突然変異体E135を用いて、根粒におけるホスホエノールピルビン酸カルボキラーゼ(PEPC)の活性調節機構を検討してきた。E135に形成された根粒では、PEPCと同じようにGS、NADH-GOGATの活性も正常な根粒に比べ低いことから、これらの酵素についても同様な検討を行った。

エンドウの正常品種Sparkleの根粒では、GSの活性は窒素固定能の発現に伴い増加した。E135根粒では、3週齢では正常な根粒と同様な活性であったが、その後しだいに減少し根よりも低い活性になった。一方、正常な根粒のNADH-GOGATの活性はGSと同様に増加したが、E135根粒では、GSと異なり3週齢から正常な根粒よりも低く、根と同程度の活性であった。高濃度のアンモニアを正常な植物体に添加すると、根粒の窒素固定能はほぼ完全に抑制された。この際、根粒のGSとNADH-GOGATの活性も減少したが、減少の程度はNADH-GOGATの方が顕著であった。低濃度のアンモニアをE135の植物体に添加しても、根粒のNADH-GOGATの活性は影響を受けなかった。しかし、根粒のGSの活性は一時的ではあったが約2倍に増加した。これらの結果から、GSよりもNADH-GOGATの活性の方が窒素固定能に強く依存するが、GS活性の調節に窒素固定産物であるアンモニアが関与することが示唆された。

1pC14

In Situ ハイブリダイゼーション法を用いたアルファアルファ根粒におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびアスパラギンシンセターゼ遺伝子の発現解析

吉岡博文、Lifang SHI¹、Gian TREPP¹、Stephen J. GANTT²、Carroll P. VANCE^{1,3} (名古屋大・農・植物病理、¹Dept. Agro. and Plant Genet., ²Dept. Plant Biol., ³USDA, Univ. Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA)

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼアインフォーム-2(AAT-2)およびアスパラギンシンセターゼ(AS)は、アルファアルファ根粒における窒素同化に重要な役割を果たすことが知られている。今回、有効根粒および植物遺伝子の変異による無効根粒を用いて両遺伝子の発現パターンを調べるため、In Situ ハイブリダイゼーションを行った。

³⁵SでラベルしたAAT-2アンチセンスRNAをプローブに用いて有効根粒の切片をハイブリダイズしたところ、バクテロイドが充満した感染細胞でmRNAの存在を示すシグナルが観察された。しかし、播種後12日以降の無効根粒では著しいシグナルの減少が認められた。一方、ASmRNAは、有効根粒の感染・非感染およびパレンキマ細胞に認められたが、無効根粒ではパレンキマ細胞におけるASmRNAの蓄積が観察されなかった。

1pC15

根粒形成遺伝子の*Agrobacterium tumefaciens*への転移と宿主域拡大
川村亮二、阿部美紀子、内海俊樹、東 二郎
(鹿児島大・理・生)

根粒菌の根粒形成と宿主域を決定する遺伝子群(*nod-gene*)を*Agrobacterium tumefaciens* A136へ移入し、異細菌細胞内での*nod-gene*群発現の制御機構を解明するのが目的である。クローバ根粒菌*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 4S株は*nod-gene*群をmegaplasmid (pSym4Sa, 315kb)上に保有している。このplasmidにTn5を挿入し、A136株へ転移させ、transconjugant AT4S seriesを得た。得られた菌株はすべてA136株由来であることをRAPD法で確認し、感染性を調べたところ、本来の宿主であるクローバ以外のマメ科植物に対しても根粒形成する能力を発揮することが認められた。さらに、AT4Sa株よりH1株(4S株よりpSym4Saを消去した株)へpSym4Sa-Tn5を戻し、野生型へ復元した株も得られた。以上、transconjugantsと植物との関係において、移行したpSymの動向について報告する。

1pC16

従属栄養硝化細菌 *Alcaligenes faecalis* の硝化
に関する酵素

大野泰史、牧野直純、星野芳子、榎屋 温
庄子和夫、山中健生 (日大・理工・工化)

昨年度の本大会では、*Alcaligenes faecalis* からピルビン酸オキシムジオキシゲナーゼを単離し、その若干の性質について報告したが、酵素が不安定なため諸性質の研究が困難であった。今回精製方法を改良して比較的安定な酵素標品を得ることができた。この酵素の分子質量はゲルろ過で180kDa、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で45kDaであった。またこの酵素の精製において、ヒドロキシルアミンと2-オキソグルタル酸 から亜硝酸を生成する活性が、ピルビン酸オキシムジオキシゲナーゼ活性を示す画分とは別の画分にみられた。ピルビン酸オキシムジオキシゲナーゼ活性とヒドロキシルアミンと2-オキソグルタル酸から亜硝酸を生成する活性とは培養時に用いるカルボン酸の種類によって、それぞれ独立に、大きく変動する。

1pC17

Rhodobacter capsulatus *mf* 遺伝子群は新規なエネルギー共役型酸化還元酵素をコードする：暗所での窒素固定における機能
佐伯和彦、熊谷浩高 (阪大・院理・生物)

光合成細菌 *R. capsulatus* のフェレドキシン遺伝子周辺には、光照射下における窒素固定に必須なしかし既知の *nif* 遺伝子とは類似性のない遺伝子群 *m* が存在する。私達は *m* 産物が膜蛋白質複合体を構成することを実験的に示してきた。また、一次構造比較から Rnf 複合体は、プロトン輸送型 NADH キノン酸化還元酵素の膜表面性部分とナトリウム輸送型 NADH キノン酸化還元酵素の膜内性部分のキメラ状構造を持つ、エネルギー共役型 NADH フェレドキシン酸化還元酵素であると予測している。この予測に基づけば、*m* 産物は光照射下のみならず暗所における窒素固定でも重要な機能を担うものと考えられる。そこで、各種の変異株について、フルクトースを炭素源、ジメチルスルホキシドを電子受容体として嫌気呼吸を行わせ、暗所での窒素固定能力を調べた。その結果、すべての *m* 破壊株は痕跡量程度の能力しか持たないことが判明した。また、光合成条件下での窒素固定能力が低下するが喪失しない *fdxM* 遺伝子の破壊株では、暗所でも相当する窒素固定能力の低下が認められた。これに対し、野性型 *mf* 遺伝子を持つが光合成能力を持たない2種の変異株、Y142 (光化学反応中心欠損) と MT-RBC1 (チトクロム *bc₁* 欠損)、いずれも暗所の窒素固定能力を保っていた。これらの株で RnfB と RnfC 産物が発現していることは、Western解析により確認できた。従って、Rnf 複合体の機能は、光化学反応で得られる還元力を単純にニトロゲナーゼ系に受け渡すのではなく、嫌気呼吸の電子伝達系とも接点を持つことが示唆された。

2aC01

キャピラリー電気泳動法による植物葉中の NO_3^- 、 NO_2^- および NH_4^+ イオンレベルの解析
河村義史、高橋美佐、有村源一郎、諫山俊之、入船浩平、五島直樹、森川弘道 (広島大・理・遺伝子科学)

NO_3^- 、 NO_2^- および NH_4^+ イオンは、植物の硝酸同化経路における中間代謝物質である。これら3種イオンの植物葉中でのレベルを解析することは、硝酸同化経路の分子レベルでの理解をさらに深めるために重要であると考えられるが、植物葉中でのこれら3種のイオンレベルを同時に、同種内あるいは他種間で測定、比較した研究例は少ないのが現状である。

本研究では、キャピラリー電気泳動法を用いて植物葉中における NO_3^- 、 NO_2^- および NH_4^+ イオンレベルを測定するため、まずその方法を検討、確立した。その後、同一条件下で育成したシロイヌナズナ、カボチャ、ダントボロギク、ユーカリ・ヴィミナリス、ダイズ、オオムギ、タバコ、イネ、ホウレンソウおよびコムギの10種類の植物について、その植物葉中におけるこれら3種のイオンレベルを測定、比較した¹⁾。すべての植物種について、3種イオンともキャピラリー電気泳動法で検出された。その結果、種間においては特に NO_3^- イオンで約350倍もの差がみられた。また各種内においては、 NO_3^- イオンレベルはすべての種で NO_3^- イオンレベルの $1/10^2$ から $1/10^4$ であった。一方、 NH_4^+ イオンレベルはカボチャとユーカリ以外の種で NO_3^- イオンレベルの $1/10$ から $1/10^2$ で、カボチャとユーカリでは NO_3^- イオンレベルと誤差範囲内で一致した。

1) Kawamura, Y., Takahashi, M., Arimura, G., Isayama, T., Irifune, K., Goshima, N. and Morikawa, H. *Plant Cell Physiol.* 37: 878-880 (1996)

2aC02

シロイヌナズナ植物葉における二酸化窒素ガス代謝機構の解析
有村源一郎、河村義史、入船浩平、五島直樹、森川弘道 (広島大・理・遺伝子科学)

自然界の植物の二酸化窒素 (NO_2) 代謝機構は植物根における硝酸代謝機構をモデルとして考えられており、その同化能力は植物種間で著しい差異が認められる¹⁾。また、植物体を4 ppm NO_2 で8時間暴露した際、高いもので全還元態窒素の7%以上が NO_2 由来のそれに置き換わることを明らかにしている¹⁾。我々は、 NO_2 代謝機構を明らかにし、その同化能力の差異が植物種間における如何なるメカニズムの違いによって生じるのかを解明することを目的としている。

本研究ではシロイヌナズナ (播種後5週間) 植物葉における NO_2 代謝機構を明らかにするため、植物体を同位体ラベルした 4.0 ± 0.1 ppm $^{15}\text{NO}_2$ (環境基準の約100倍) で4時間暴露し、更に大気中に戻し8時間置いた。そして、その植物葉における経時的な総窒素、還元態窒素およびその代謝産物である硝酸態窒素、アンモニウム態窒素の総量およびその中の ^{15}N 量の変化をキャピラリー電気泳動法、ケルダール法および同位体質量分析法の方法等を用いて測定した。これらの結果について報告する。

1) Morikawa et al. (1992) *In* Research in Photosynthesis, Vol. IV. pp. 79-82

2aC03

アンチセンスNiRcDNAを導入したタバコ植物から生じるN₂Oガスの質量分析

五島直樹、陶守満美子、入船浩平、Michel Caboche¹、森川弘道（広島大・理・遺伝子科学、¹Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA）

原核生物やカビなどの微生物では、NO₃⁻やNO₂⁻が生体内で還元され、N₂OやN₂の形で大気中に放出される脱窒反応がおきていることが知られている。この脱窒反応は生態系における窒素循環系の一経路を形成しており、地球環境レベルで窒素サイクルを考える上で、非常に重要な反応であるといえる。これまでに、高等植物における脱窒反応に関する研究は皆無に等しく、植物においてこのような脱窒能力があるか否か、また植物に脱窒能力を付加できるかどうかについてはまったく明らかになっていない。そこで、我々はタバコ植物を実験材料とし、野生株およびアンチセンスNiRcDNA導入株⁽¹⁾について、¹⁵NでラベルしたNO₃⁻含有培地で生育させ、植物体に¹⁵NO₃⁻を吸収させた後、植物体から発生するN₂OおよびN₂の¹⁵N/¹⁴N同位体比をフィニガンマツ社製DeltaC質量分析計で測定した。その結果、アンチセンスNiRcDNA導入株において¹⁵NO₃⁻由来のN₂Oの発生が検出されたので報告する。

(1) H. Vaucheret et al. Plant Journal (1992) 2(4), 559-569.

2aC04

クロレラの硝酸取り込みに対する青色光効果—窒素源の検討
神谷明男（帝京大・薬・化学）

クロレラ (*Chlorella kessleri*) に硝酸を与えると、硝酸は硝酸輸送体により細胞内へ取り込まれ、硝酸還元酵素(NR)・亜硝酸還元酵素によりアンモニアまで還元される。クロレラなどの緑藻は液胞を持たないため、窒素源として硝酸は貯蔵できず、硝酸が培地から欠乏すると硝酸取り込み能は消失する(starved cell)。このstarved cellに青色光を照射するとNRの光活性化、メディウムのpHが酸性化し、硝酸添加の場合は、続いて硝酸取り込みが促進される。メディウムpHの酸性化はATPaseの阻害剤バナジウム酸(V₂O₅、Na₃VO₄)で顕著に阻害された。これらの現象の青色光受容体の候補として、NRIに含まれる補酵素FADが考えられる。

クロレラではNRは硝酸で培養するとその合成が起り、アンモニアの添加によりNRタンパクは急速に消失することが知られている。そこでアンモニアを窒素源として培養したクロレラ細胞で青色光によるpH変化が認められるか検討した。その結果アンモニアで培養した細胞では青色光による顕著なpHの酸性化はクロレラの野生株、黄色・白色変異体ともに認められなかった。またこれらの細胞は培地からアンモニアが消失すると硝酸を取り込むが、青色光によるpH変化は認められない。青色光によるメディウムpH変化とNRの関係を議論する。

2aC05

ラン藻 *Plectonema boryanum* におけるグルタミン酸合成酵素アイソザイムの生理的役割

奥原宏明、松村智裕、藤田祐一、長谷俊治（大阪大・蛋白研）

グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) は、還元力を利用してグルタミンのアミド基を 2-オキソグルタル酸に転移させ、2分子のグルタミン酸を合成する酵素であり、光合成生物において一連の無機態窒素の同化系の最終段階を担っている。我々は昨年の本大会で、ラン藻 *Plectonema boryanum* は、還元力の供給源が異なる 2つの GOGAT アイソザイムとして、フェレドキシン依存型 (Fd-GOGAT) と NADH 依存型 (NADH-GOGAT) を有することを報告した。今回我々は、両アイソザイムの生理的役割を明らかにするため、NADH-GOGAT 欠損株 及び Fd-GOGAT 欠損株を単離し、それらの形質を検討した。

明所では光エネルギーを利用して Fd-GOGAT が、暗所では有機物の分解エネルギーを利用して NADH-GOGAT が、各々優先的に働いていることが期待されたが、両欠損株ともに弱光下 (400 lx) での光独立栄養条件 (世代時間 50 h) においても、暗所での従属栄養条件 (世代時間 65 h) においても、野生株との生育の違いは認められなかった。この結果から、本ラン藻では両 GOGAT アイソザイムは明確には機能分化しておらず、互いの機能を相補しようと考えられる。一方、強光下 (3000~8000 lx) で高 CO₂ (2%) 含有空気を通気した光独立栄養条件では、本ラン藻は世代時間 7 h で急速に増殖することができる。このような条件で生育を比較すると、NADH-GOGAT 欠損株が野生株と変わらなく生育するのに対し、Fd-GOGAT 欠損株は生育に遅れ (世代時間 11 h) が認められるとともに、フィコビリタンパク質の減少が認められた。この結果から、強光、高 CO₂ 濃度という C 同化量が急速に増加した条件において、それに見合う N 同化を行い、最大速度の増殖を逃げるためには、Fd-GOGAT の寄与が必要であることが示唆された。

2aC06

トウモロコシ・グルタミン合成酵素遺伝子群の根における組織レベルでの発現部位の解析

加藤勇治、榊原均、杉山達夫（名古屋大・農・応用生物科学）

植物の細胞基質局在型グルタミン合成酵素(GS1)は多重遺伝子族で構成されており、トウモロコシでは5つの遺伝子の存在が確認されている。これまでの研究により、根における窒素源(NO₃⁻, NH₄⁺)添加に対する各遺伝子の応答性を調べたところ、発現が誘導される分子種(GS1c, GS1d)と、逆に抑制される分子種(GS1a, GS1b)に大別されることが明らかとなった。同じ酵素でありながら、窒素源添加という一つのシグナルに対して異なる応答性を持つことの生理的意義を解明するためには、それぞれの分子種の根での発現部位を組織レベル、細胞レベルで特定することが必須であると考え、In situハイブリダイゼーション法による解析法の確立を試みた。その結果、GS1aは根端付近の部位の根では皮層組織で強く発現していることが明らかになった。また髄や木部、師部でも発現が観察された。これらのことより、GS1aは余剰窒素の再同化と、その転流の際の機構の一部として機能していることが推測された。現在誘導型GS1であるGS1cについて組織レベルでの発現部位の特定を試みている。

2aC07

イネ発芽種子におけるアスパラギン合成酵素の発現

川地太兵, 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)

アスパラギンは植物体中での窒素の貯蔵や輸送体として重要である。我々はイネ発芽種子中の貯蔵タンパク質の分解や転流過程におけるアスパラギン合成酵素(AS)の役割をmRNA量や活性、アスパラギン含量について調べることにより明らかにしようとした。その結果、わずかな量のASmRNAが乾燥種子の胚ですでに存在し、吸水に伴ってその量は急増した。活性やアスパラギン含量も同様の傾向を示した。しかし胚乳では活性が検出されず、アスパラギン含量も変わらなかった。このことから、胚における発芽時の急速なアスパラギン合成の増加は、成長しつつある組織への窒素の供給のために機能しており、ASの活性制御はその目的に沿って行われていると考えられる。

2aC08

イネ aspartate kinase の大腸菌での発現

清田誠一郎, 坂野勝啓 (農水省・生物研)

Aspartate kinase (AK) は、リジン、スレオニンなどのアミノ酸の合成経路に関わる酵素で、活性がスレオニンで阻害される型とリジン阻害型の2つのアイソザイムが知られている。我々は、イネ幼植物葉で、生育に伴って、両アイソザイムの活性比が変動することを見だし、その調節機構の解明を目標に解析を続けている。今回は、イネ Thr-AK cDNA の大腸菌での発現を試みたので報告する。

イネ Thr-AK cDNA の葉緑体移行のためのシグナルペプチドを除き、pET-17b ベクターにつないだものを BL21(DE3)plysS 株に形質転換した。培養後、菌を破碎し、SDS-PAGE で発現を確認した。融合タンパク質のほとんどは、遠心後、沈殿に回収され、不溶化していると思われたが、遠心上澄に AK 活性が確認できた。現在、この AK を精製し、性質の検討を行っているので、それについて報告する。

2aC09

NH₄⁺処理で増加するイネ幼植物根の NADH 依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT) タンパク質蓄積の経時的、空間的変化と細胞内局在性

石山敬貴, 早川俊彦, Alyson K Tobin¹, 山谷知行 (東北大 農 応生化, ¹St. Andrews 大)

1mM NH₄⁺処理したイネ幼植物の根端で NADH-GOGAT タンパク質含量が特異的かつ急激に増加し 24 時間で最大となる。この NH₄⁺添加に応答を示す NADH-GOGAT の組織内分布を調べた。

ガラス室で発芽後、種子栄養の枯渇するまで水耕栽培したイネ幼植物に 1mM NH₄⁺を加え、経時的に処理後 48 時間まで収穫した。この結果、NH₄⁺処理 0 時間のイネ根先端 1cm 付近で、主に中心柱で NADH-GOGAT のシグナルが検出されたが、24 時間後では、中心柱に加え、表皮と外皮に強いシグナルが検出された。また、細胞質型 GS の抗体を用いた染色の結果より、イネ根の先端から 1cm 付近の表皮と外皮には、細胞質型 GS のタンパク質の蓄積が示された。これより、NH₄⁺の添加に伴ってイネ根の表皮および外皮において NADH-GOGAT タンパク質が特異的に蓄積され、表皮と外皮で GS と共約して NH₄⁺の同化において機能していることが強く示唆された。さらに、予備的な結果ではあるが、仏「ゴ-ド」法による免疫電顕の観察では、NADH-GOGAT の分布を示す金粒子がプラスチドにのみ検出された。

2aC10

イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素ゲノム DNA の構造解析

後藤 聡, 赤川 巧, 早川俊彦, 山谷知行 (東北大・農・応用生物化学)

イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) は主に生長中の葉や穂の維管束組織に存在する¹⁾。また、幼植物の根においては窒素環境の変化に応じてタンパク質及び mRNA レベルの発現が鋭敏に増加する²⁾。これら組織特異的発現、ならびに窒素に対する応答の発現制御機構を解明する第一歩として、本酵素のプロモーター領域を含むゲノム DNA を単離し、構造解析を行った。

ササニシキのゲノミックライブラリーからイネ NADH-GOGAT cDNA 部分断片 (タンパク質 C 末端領域) をプローブに用いて 11 個のクローンを単離した。このうちプロモーター領域ならびに遺伝子の全領域を含むと考えられたクローン λ OS42 について塩基配列の決定を行った。その結果、cDNA 部分断片と塩基配列が一致し、また推定されるアミノ酸配列中にはイネの培養細胞から精製した NADH-GOGAT の N 末端のアミノ酸配列が確認された。さらに推定コード領域はアルファルファの根粒特異的 NADH-GOGAT 遺伝子とアミノ酸レベルで高い相同性を示した。一方、プロモーター領域には GCN4 などのモチーフが見い出された。現在プロモーター領域解析のためのベクターを構築中である。

1) Hayakawa et al. (1994) *Planta* 193: 455

2) Yamaya et al. (1995) *Plant Cell Physiol.* 36:1197

2aC11

カボチャ脂肪酸β酸化系酵素の cDNA クローニングとその構造解析

林 潤^{1,2}, 加藤朗¹, 林 誠^{1,2}, 西村幹夫^{1,2} (1基生研・細胞生物, 2総合研究大学院大学・生命科学)

〔目的〕 脂肪酸β酸化系は、アシル CoA オキシダーゼ、エノイル CoA ヒドラターゼ、ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ、チオラーゼの4つの酵素から成り立っている。この代謝系はグリオキシル酸回路の諸酵素とともにグリオキシソームに局在し、長鎖脂肪酸の分解に重要な役割を果たしている。今回、我々は種子の発芽時やセネッセンスの過程における脂肪酸β酸化系酵素の変動を解析するためにその cDNA クローニングを行った。

〔結果〕 我々は既にカボチャ黄化子葉から作製した cDNA ライブラリーよりチオラーゼの cDNA をクローニングし、その構造解析を行った¹⁾。今回、さらにスクリーニングを行い、2378bp からなる新たな cDNA を同定した。この cDNA は、725a.a. のタンパク質をコードしており、脂肪酸β酸化活性のうちエノイル CoA ヒドラターゼ、及びヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼの活性領域を持ち、さらにエノイル CoA イソメラーゼ、ヒドロキシアシル CoA エピメラーゼ活性部位も含むことが明らかになった。現在、ノーザンブロット解析を行うとともに抗体を作製中であり、それを用いた結果をもとにカボチャ発芽子葉における脂肪酸β酸化系の制御機構について考察する。
1) Kato, A., Hayashi, M., Takeuchi, Y. and Nishimura, M. (1996) *Plant Mol. Biol.*, 31:843-852.

2aC12

グリオキシソーム機能欠損突然変異体の単離と解析

林 誠、島山可菜子、西村 幹夫 (基生研・細胞生物)

〔目的〕 高等植物のグリオキシソームは脂肪酸β酸化とグリオキシル酸回路の諸酵素を含んでおり、種子の貯蔵脂肪から発芽に必要なスクロースを作り出す上で重要な役割を果たしている。私達は、高等植物におけるグリオキシソームの機能発現機構を遺伝的に解析することを目的として、グリオキシソーム機能欠損突然変異体の単離を試みた。

〔方法〕 2,4-Dichlorophenoxy butyric acid (2,4-DB) は、脂肪酸β酸化活性によって除草剤2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) に代謝されることが知られている。そこで、2,4-DBに耐性を示し、2,4-Dに感受性を示す突然変異体をスクリーニングした。

〔結果〕 EMS処理されたアラビドプシスのM2種子から、12個体の突然変異体を得た。これらのうち、LR40、LR43、LR47、LR81と名付けた4個体はスクロース非存在下では生長できず、脂肪酸β酸化活性を欠損している突然変異体であることが示唆された。これらの突然変異体のうち、LR40は発芽過程で脂肪酸β酸化酵素のチオラーゼを全く発現していない優性突然変異体であった。また、LR47は高分子量の前駆体型チオラーゼがサイトゾルに蓄積しており、チオラーゼをグリオキシソームに輸送する活性が低くなった優性突然変異体であることが判明した。以上の結果をもとに、アラビドプシスの発芽過程におけるグリオキシソームの機能発現機構について考察する。

2pC01

イネ変異株の葉片に含まれるメナキノン類の同定

柴田勝¹, 津山孝人¹, 岩田伸夫², 小林善親¹ (1九州大・農・林, 2九州大・農・育種)

ナフトキノン類は、主にフィロキノンとメナキノンに大別される。フィトールを側鎖とするフィロキノン(vitamin K₁)は、光化学反応系 I の反応中心の構成成分であり、高等植物やシアノバクテリアに存在している。一方、メナキノンは、バクテリアに幅広く分布しているが、高等植物には見出されていない。しかし、アルコール側鎖の還元状態が異なるクロロフィル(Chl)を蓄積するイネ突然変異株(M249, M134)の葉片に含まれるナフトキノン類を測定した結果、変異株にはフィロキノンがあまり含まれておらず、代わりにゲラニルゲラニオール(GG)などの不完全還元側鎖を有するメナキノン(MK)類が大量に蓄積されていた。さらに、Chl-THGG, Chl-GGを蓄積する変異株M249, M134には、それぞれMK-THGG, MK-GGが最も多く含まれていた。これらの結果から、MK-GGは、Chl側鎖還元酵素により段階的に還元され、フィロキノンとなることが示唆された。

2pC02

フェレドキシンのトマト果実組織内局在性

青木 考、和田 敬四郎 (金沢大・理・生物)

トマト(*Lycopersicon esculentum*)果実には、光合成タイプおよび従属栄養タイプ両者のフェレドキシン(Fd)イソタンパク質が存在し、これらは時間空間的に異なった分布をしている。果実の成長やクロモプラスト形成につれて、従属栄養タイプFdの相対量は増加する。一方、緑色果実を組織ごとに調べると、従属栄養タイプFdはデンプンの豊富な組織に多い。しかしプラスチドレベルでは、緑色組織クロロプラストには従属栄養タイプFdが検出されなかった。この不一致は、緑色組織内に従属栄養タイプFdを含むクロロプラストの別な集団が存在することを示唆するが、その単離には成功していない。そこで本研究では、免疫組織化学的方法でフェレドキシンイソタンパク質の検出を試みた。従属栄養タイプFdは、果実内側のペリカルプにみられるデンプンの豊富なプラスチドに存在が確認された。しかしこのプラスチドには光合成タイプFdも存在した。Fd蓄積の細胞またはプラスチド依存性について、検討を試みる。

2pC03

ラン藻における二つのプロトクロロフィリド還元酵素の機能分化

藤田祐一・高木英典・長谷俊治（大阪大・蛋白質研）

被子植物を除く殆どの光合成生物は、クロロフィル (Chl) の合成系の一段階であるプロトクロロフィリド (Pchl_{id}) の還元系として、還元反応自体に光を要求する光依存性Pchl_{id}還元酵素 (LPOR) と、光に依存しないPchl_{id}還元酵素 (DPOR) を有する。

我々は、先の研究でラン藻 *Plectonema boryanum* から DPOR の三つの遺伝子 (*chlL*, *chlN*, *chlB*) と LPOR の遺伝子 *por* のクローニングを行った。今回、一方のPchl_{id}還元系を欠失させた変異株の形質を解析し、両還元系の機能分化について検討した。

DPOR を欠いた株として *chlL* 欠損株 YFC2、LPOR を欠いた株として *por* 欠損株 YFP12 を用いて、光強度の異なる光独立栄養条件下での生育を野生株と比較した。弱光下 (400 lx) では、いずれの変異株も野生株と変わらず生育し、Chl 含量にも違いが認められなかった。この条件では、両還元系は互いに相補し合うだけの活性を有し、明確な機能分化はなされていないと考えられる。一方、強光下 (4,000 lx) では、YFC2 は野生株と変わりなく生育したが、YFP12 では Chl 合成が遅れ、生育の遅延が認められた。この結果は、強光条件では DPOR に対して LPOR が優先的に使われていることを示唆している。

2pC04

"黄化"ラン藻の緑化過程の解析

加田茂樹・藤田祐一・長谷俊治（大阪大・蛋白質研）

ラン藻は、クロロフィル (Chl) 合成の一過程であるプロトクロロフィリド (Pchl_{id}) の還元系に、光に依存する経路と光に依存しない二つの経路を有する。この内、光に依存しない系に関与する遺伝子を欠失させた変異株は、被子植物と同様、Chl の合成が光に依存するようになる。すなわち、暗所で生育させると、Chl の合成が Pchl_{id} の段階で停止し、あたかも被子植物での黄化葉と類似した"黄化した"ラン藻細胞となる。このような"黄化"ラン藻を明所に移すと、Chl の合成が始まり緑化が開始される。今回私たちは、ラン藻 *Plectonema boryanum* の *chlL* 遺伝子を欠失させた変異株 YFC2 を用いて、緑化過程における Chl と光化学系タンパク質の挙動を解析した。

暗所で生育させた"黄化"YFC2 を、明所に移し、緑化を開始させると、24時間後にはChl量は、野生株の約80%まで回復した。この緑化過程における光化学系タンパク質の動態を33-kDとPsaCについてウェスタン解析により検討した。その結果、33-kDは"黄化"細胞でも検出され、その存在量は緑化過程を通してほぼ一定であったが、PsaCは"黄化"細胞では検出されず、Chl量の増加に伴って急速に増加した。これらの結果は、Chl供給がPSIを構築する上で重要な役割を果たしていることを示唆している。

2pC05

クラミドモナスのクロロフィル *b* 欠損株の解析
伊藤寿、吉田和希¹、田中暢明、田中歩(京大・理・植、¹基生研・培養育成)

高等植物や緑藻はクロロフィル *a* とともにクロロフィル *b* を持つ。光環境の変化に応じてクロロフィル *b* の量は変動し、光合成の集光機能において重要な役割を果たしている。しかしクロロフィル *b* の合成については不明な点が多い。そこでクロロフィル *b* 合成酵素の遺伝子の単離を目的として、クラミドモナスのクロロフィル *b* 欠損株を作製した。

硝酸還元酵素、またはアルギニン合成酵素を欠くクラミドモナスの核DNAに硝酸還元酵素、またはアルギニン合成酵素をコードするDNAをランダムに挿入し、クロロフィル *b* 欠損株を6個体得た。挿入したDNAをタグにして近傍のゲノムDNA、およびその領域にコードされているcDNAを単離し、その解析を行った。

2pC06

らん藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 および *Plectonema boryanum* のMg-キラターゼサブユニット *chlD* 遺伝子のクローニング

増田達、中山雅人、太田啓之、高宮達一郎(東工大・生命理工・生体機構)

クロロフィル合成の第一段階は、ポルフィリン環へのMg原子の配位であり、Mg-キラターゼにより触媒される。Mg-キラターゼ遺伝子に関しては、光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の遺伝学的解析により、*bchl*, *bchH*, *bchD* が同定されている。我々は、これまでにダイズより *bchl*, *bchH* のホモログ *chlI*, *chlH* のcDNAの単離を行い、その全塩基配列の決定を行った。また、これら2つの遺伝子産物が葉緑体可溶性画分に局在すること、また光により遺伝子発現が誘導されることを見出した。しかし、*bchD* ホモログである *chlD* に関しては、これまで *R. sphaeroides* 以外では報告されていなかった。全ゲノム配列の決定された、らん藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 において *bchD* に相同な ORF が存在し、最近、この ORF が PCC6803 の *chlD* であることが示された。そこで、*R. capsulatus* の *bchD* と保存されたアミノ酸配列に対応するプライマーを用いてPCRを行った結果、らん藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 および *Plectonema boryanum* のゲノムを鋳型とした場合において増幅産物が認められた。PCC7942 と *P. boryanum* のPCR産物のアミノ酸配列は、PCC6803 と81%、また *R. sphaeroides* の *bchD* と48~49%の相同性を示したことから、それぞれのらん藻の *chlD* 遺伝子断片であると結論した。現在、ゲノムライブラリのスクリーニングを行い、得られたクローンの配列を解析中である。

2pC07

クラミドモナスクロロフィルb欠損株 (NL-105) でのクロロフィル分解
土井道生, 岡山繁樹 (九州大・理・生物)

紫外線照射により得られたクラミドモナスクロロフィルb欠損株 (NL-105) は生育途中でクロロフィルaの分解による藻体の黄化を引き起こし, 同時に培養液中に赤い色素を排出する。この水溶性の赤い色素はメタノール中で535nmに吸収極大を示し, その分光学的特徴, クロム酸分解産物の分析, 質量分析などの結果からクロロフィルa由来の開環したテトラピロール構造を持つことが示唆された。クロロフィルの分解に伴う赤い色素の蓄積は酸素供給を制限した条件下では抑えられ, かわりにクロロフィリドaが細胞内で過渡的に蓄積され, その後培地中に排出された。これらのことはクロロフィルがクロロフィラーゼの作用によりクロロフィリドに変換され, その後酸素に依存して赤い色素まで代謝されていることを示唆する。本講演では, この変異株より調製された膜画分で見られるクロロフィル分解反応の特徴と生育中に見られるクロロフィル分解-赤色素生成との関連について報告する。

2pC08

大腸菌中で発現させたカリフラワー水溶性クロロフィル蛋白質の性質と mutagenesis による機能アミノ酸残基の解析
佐藤浩之, 中山克己, 岡田光正 (東邦大・理・生物分子)

水溶性クロロフィル蛋白質 (WSCP) の構造やクロロフィルの結合能等を解析するために, カリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) とセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の WSCP cDNA をクローニングし大腸菌中で発現させたところ, クロロフィル結合能を有する組換え WSCP が大量に得られ, その4量体形成がクロロフィルの結合により著しく促進される事を, 昨年度の日本植物学会大会において報告した。今回, RACE法による完全長 cDNA のクローニングを行い, その全塩基配列を決定したので報告する。さらに, WSCP 中のクロロフィル結合部位や, その他, 構造的に重要なアミノ酸残基の同定を行うために, truncation や block deletion, site-directed mutagenesis などを行い, 様々な mutant WSCP を大腸菌中で発現させた。現在それら mutant のクロロフィル結合活性を分析しており, 一定の結果を報告する予定である。

2pC09

ダイコンの水溶性クロロフィル蛋白質の精製・性質と初期的なX線結晶学的研究
尾無清明, 西尾直美, 内田朗, 佐藤浩之, 大西勲 (東邦大・理・生物分子)

水溶性クロロフィル蛋白質 (WSCP) の結晶構造解析を行うために, ダイコンより WSCP を高純度に精製し, 結晶化を試みるとともに, その生化学的性質を調べた。ダイコンの WSCP の分子サイズは, SDS-PAGE で 21 kD, ゲルろ過で 76 kD と測定された。N-末端から 20 残基のアミノ酸配列を決定したところ, WSCP に特徴的な Kunitz 型 protease inhibitor の motif が存在した。ダイコンの WSCP とカリフラワーやマメゲンバイナズナの WSCP の吸収スペクトルを比較すると, 一部の吸収成分の存在量に相違が見られた事から, それらのクロロフィル結合部位の環境が異なっている事が推察された。この事から, 種々の植物の WSCP の立体構造を比較解析する事で, その吸収成分との関連を解析できると考え, ダイコンの WSCP の結晶化を試みた。Crystal Screen による結晶成長の最適条件の検索を行い, 現在までに比較的良好な菱形柱状結晶を得ている。その結晶学的データを得るために, 現在, X線回折実験を行っている。また, 結晶構造解析には蛋白質の一次構造の決定が必須であるため, その cDNA のクローニングも平行して試みている。

2pC10

クラミドモナス葉緑体のチトクロム b6f 複合体及びチトクロム c6 のバイオジェネシスに関与する核コード遺伝子: CCS1
Ola SODEINDE, 井上香織, Beth DREYFUSS¹, Sabeeha MERCHANT¹ (Dept. Biochem. Mol. Biol., Penn State Univ.;
¹Dept. Chem. Biochem., UCLA)

Chlamydomonas reinhardtii には葉緑体のチトクロム b6f 複合体の既知のサブユニットをコードする遺伝子は核ゲノムに3つ, 葉緑体ゲノムに5つ存在する。チトクロム b6f 複合体を構成するサブユニットの生合成及びアセンブリーに関与する核コード遺伝子を明らかにするために, これまでに核ゲノムへの insertional mutagenesis により *Chlamydomonas reinhardtii* のチトクロム b6f 複合体の欠損株を単離している。チトクロム b6f 複合体の欠損に加え, チトクロム c6 タンパク質が野生株に比べて減少している変異株 (ccs1-6) の表現型を相補する野生株の核ゲノム由来の DNA 断片を単離した。核ゲノム DNA 断片 (5.7kb) の塩基配列を決定するとともに, 対応する cDNA (2.3kb) を単離しその全塩基配列を決定した。コーディング領域より推定されるアミノ酸配列のホモロジー解析の結果, ラン藻ゲノム及び紅藻, 褐藻の葉緑体ゲノムにコードされる ycf44 遺伝子産物と 20-30% の相同性を示した。これらの結果から, c型チトクロム, チトクロム f 及びチトクロム c6 の生合成に関与するこの遺伝子を CCS1 (cytochrome synthesis) と命名した。CCS1 遺伝子産物の機能についても併せて考察する。

3aC01

葉緑体核様体の分子構築

佐々木真紀子, 佐藤直樹 (東京学芸大・生命科学)

葉緑体核様体は葉緑体DNA (cpDNA) の機能的な単位であり、cpDNAが盛んに複製される時期にはプラスチド包膜に結合することが知られている。核様体の分子構築を明らかにするため、核様体の解体・再構成を行なった。

核様体をTAN buffer中で単離し、その後様々な塩濃度の溶液により処理した。この過程を、DAPI染色の後、蛍光顕微鏡観察することにより、DNAとタンパク質の集合状態の変化を追跡した。その際、5M NaCl処理により約半量のDNAが遊離し、それと共に70 kDaのタンパク質が回収された。この抽出液を低塩濃度液に対して透析したところ、核様体に類似した複合体が再構成された。この70 kDaタンパク質のアミノ末端配列を調べたところ、新規のタンパク質であることが分かった。このタンパク質をマウスに免疫して抗体を作製した。現在、cpDNAのクローニングを行なっている。

3aC02

プラスチド包膜DNA結合 (PEND) タンパク質の精製

渡辺愛, 佐藤直樹 (東京学芸大・生命科学)

植物のプラスチドには独自の2本鎖環状DNA (cpDNA) が存在し、プラスチド発達の初期段階において、cpDNAはタンパク質と共に核様体構造をとって包膜に結合している。このcpDNAの包膜への結合に関与するDNA結合タンパク質として、PENDタンパク質が同定されている。プラスチドの抽出液より、PENDタンパク質の精製を行った。プラスチド抽出液を陰イオン交換樹脂 (Q-セファロース) のカラムにかけNaClのグラジエントで400~600 mM付近に溶出された画分を、ストレプトアビジン結合磁気粒子とピオチンラベルcpDNA断片との複合体に結合させた。PENDタンパク質は300 mM NaClによって溶出された。SDS-PAGEにおいては、115 kDaのポリペプチドとして泳動されることが判明した。この部分精製品を用いて得られたDNA結合特性などの性質についても報告する。

3aC03

プラスチドDNA結合タンパク質PD2の解析

佐藤直樹, 大嶋公久 (東京学芸大・生命科学)

PEND (plastid envelope DNA-binding) タンパク質の結合領域として同定されたプラスチドDNA断片No. 1を用いたサウスウエスタンスクリーニングにより、エンドウからDNA結合タンパク質cpDNAが3個得られた。その1つがコードするPD2タンパク質(632アミノ酸残基)は、ESTデータベースにもない新規タンパク質で、N末端にbZIP様DNA結合ドメイン、中央部に6回繰り返し配列、C末端に膜貫通ドメインがあった。PD2遺伝子はシングルコピーとして存在し、その発現は未展開葉で高く、葉の成熟に伴って極めて低くなった。抗PD2抗体は、プラスチド核様体の70 kDaタンパク質およびPENDタンパク質と弱く反応し、細胞核のタンパク質とは反応しなかった。PD2タンパク質の正確な細胞内局在については、さらに検討が必要である。ゲルシフト法によるDNA結合特性の測定の結果、PEND、PD2とも、DNA断片No. 1の中央部に結合した。以上の結果は、PD2がPENDと相同なタンパク質であることを示唆している。

3aC04

エンドウのDNA結合タンパク質PD3の解析

品田幸代, 佐藤直樹 (東京学芸大・生命科学)

プラスチドが発達する時期には、プラスチドDNAが包膜に結合するが、この結合に関わるタンパク質としてPENDタンパク質が同定されている。PENDタンパク質結合領域DNA断片をプローブとしたサウスウエスタン法によって、新たなDNA結合タンパク質PD3が発見された。PD3は1629アミノ酸残基からなり、5個のAT-hookモチーフと8個のCxxCモチーフを含んでいた。またそのC末端領域は動植物の未同定タンパク質と高い相同性を示した。ドメインごとに抗体を作成し、イムノブロット解析をしたところ、PD3はプラスチド内で複数のポリペプチドに分かれて存在しており、その主要な部分は核様体に存在していることが示唆された。PD3のプロセシングの切断点等に関してより詳細に知るために、現在、さらに細かい領域ごとに抗体を作成している。また、DNAとの結合に関する実験の結果も報告する。

3aC05

タバコ培養細胞原色素体DNA結合蛋白質の
cDNA解析

土屋明美、三浦順一郎、河野順帆、松岡英明、
根本泰行（農工大・工・生命工）

色素体DNAは細胞内で蛋白質と複合体を形成している。色素体分化の機構を解析する上で、この色素体DNA結合タンパク質の構造と機能を明らかにすることは重要である。本研究ではタバコ培養細胞BY-2株の原色素体に含まれるDNA結合蛋白質のうち、最も量の多い分子量69kDのものについてcDNA解析を行った。そのために、精製した蛋白質から得られた部分アミノ酸配列から degenerated primers を作製し、5' -RACE法および3' -RACE法によりcDNAクローンを得た。塩基配列を決定した結果、この蛋白質はN末端に色素体移行のためと考えられる59アミノ酸残基のトランジットペプチドを持つこと、成熟蛋白質は634アミノ酸から構成されておりその推定分子量は71633、推定pIは9.01であって塩基性蛋白質であることが分かった。また、ホモロジー検索の結果、成熟蛋白質のN末端から570番目のアミノ酸まではシネココッカスとアラビドプシスで報告されている亜硫酸還元酵素と相同性が非常に高いこと、しかしながらC末端の64アミノ酸残基はこの蛋白質に特異的な配列であることが分かった。

3aC06

葉緑体核様体DNA結合性タンパク質CND41の機能解析

— 形質転換植物の培養細胞系を用いた解析

中野雄司¹、木村琢磨^{1,4}、村上真也²、山田康之³、佐藤文彦²、
吉田茂男¹（1理研・植物機能、2京大・農・農化、3奈良先端
大・バイオ、4明治大・農）

タバコ葉緑体核様体DNA結合性タンパク質としてcDNAクローニングされたCND41は、糖により発現が誘導され、植物組織中において葉緑体遺伝子産物と逆比例的な蓄積を示す等の性質が解析されている。また、CaMV35Sプロモーター/アグロバクテリウムの系を用いて、アンチセンス形質転換タバコを作製した結果、スクリーニングされたCND41タンパク質発現量低下株では、野性型株に比べて、緑葉における緑化の促進傾向、数種の葉緑体遺伝子産物の転写量の増加等の共通する性質が検出されている。

続いて、更に詳細な解析を目的としてこれらの形質転換体由来の培養細胞の誘導および細胞系の確立を行った。これらの培養細胞について、抗CND41抗体を用いたウエスタン解析を行った結果、同様にCND41タンパク質発現量の低下が認められた。更に、葉緑体遺伝子群のノザン解析等を行った結果、*psbA*、*psbD/C*、16S-23S rRNAなど数種の葉緑体遺伝子産物において、野性型培養細胞よりも転写量の増加している傾向が認められた。また、葉緑体DNAコピー数の変動は認められなかった。以上の結果、CND41が葉緑体DNA上の遺伝子発現を抑制する機能を持つ可能性が示唆されたと考察している。

3aC07

タバコ葉緑体核様体タンパク質CND41の精製とその
生化学的性質

村上真也、茶谷大志、中野雄司¹、佐藤文彦（京大・
農・農化、¹理研・植物機能）

CND41は、タバコ光混合栄養培養細胞の色素体核様体から同定された非特異的結合性を示すDNA結合性タンパク質である。我々はこれまでにCND41の蓄積と葉緑体遺伝子の発現パターンを比較し、本タンパク質が葉緑体遺伝子の転写を主に制御する因子ではないかと推論している。実際CND41のアンチセンスDNAを導入した形質転換タバコ細胞において、CND41発現の低下と共に葉緑体遺伝子発現の増加が認められるという本仮説を支持する結果も得ている。しかしCND41の生化学的性質には不明な点が多い。そこで今回CND41をよりネイティブな形で精製する方法を検討した。

タバコ光混合栄養培養細胞を50mMリン酸緩衝液(pH7.2)中で磨砕して得た不溶性画分を500mM NaClで可溶化し、CND41粗画分を得た。この画分を陽イオン交換カラムにかけばほぼ単一のCND41を精製した。現在精製したCND41を用いCND41の生化学的性質について検討を行っており合わせて報告する。

3aC08

シロイヌナズナ葉緑体における一過性発現による遺伝子プロモーター強度の評価

吉本光希、境谷真男、磯野協一、丹羽康夫、小林裕和
(静岡県立大・生活健康科学、¹RITE)

光合成遺伝子の多くはプラスチドDNAにコードされており、したがって、光合成機能の改良には、プラスチドゲノムの遺伝子操作と遺伝子発現制御系の開発が不可欠となる。分子遺伝学的解析に適したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用い、各種遺伝子プロモーターの強度を評価するために、パーティクルガンによる葉緑体一過性遺伝子発現系を開発した。

高発現プロモーターとしてバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ系に注目し、減圧浸透法により形質転換した Bensheim および Nossen 系統において、T7 RNAポリメラーゼのN末端に葉緑体移行シグナルを付加した融合タンパク質を発現させた。本形質転換体において、T7 RNAポリメラーゼ認識プロモーターによりβ-glucuronidase (GUS) 遺伝子が発現させ、X-glucを用い青く染色される葉緑体を見出した。さらに、恒常的高発現プロモーターであるシロイヌナズナ葉緑体16S rDNAプロモーター、高発現であることが知られているD1タンパク質遺伝子 (*psbA*) プロモーター、およびバクテリア由来の *tac* プロモーターについても、一過性発現により検討を加えた。また、green fluorescent protein (GFP) の利用についても検討した。

3aC09

シロイヌナズナのミトコンドリア突然変異体における特異的転写産物の解析

坂本 亘, 村田 稔, 本吉總男 (岡山大・資生研)

シロイヌナズナにおいて茎葉に斑入りを起こすことが知られている核の劣性突然変異 *chloroplast mutator (chm)* は、ミトコンドリアゲノムに遺伝的变化を起こす。これまでに、*chm* を母親として野生型と交配した交雑後代において、葉の形がいびつで著しく生育の悪い植物体 (maternal distorted leaf: MDL) を見出し、MDL 変異体のミトコンドリアゲノムでは、野生型と異なったゲノムの再構成が起きていることを明らかにした。このミトコンドリアゲノム再構成は、リボソームタンパク質 S 3 及び L 16 をコードする遺伝子 *rps3* 及び *rpl16* 両遺伝子を含むオペロンの領域に限定され、両遺伝子の発現にも影響していることが考えられた。再構成の結果、MDL 変異体では *rpl16* は *atp9* と共転写されており、*atp9* のプロモーターから転写されていた。また、この共転写物の RNA エディティングを調べたところ、野生型の転写産物と比べて差異は見られなかったが、シロイヌナズナの *rpl16* 遺伝子ではエディティングによって ORF 内に終始コドンが作られていた。

3aC10

液胞膜は膜融合に特殊化された領域をもつ? : VAM 遺伝子産物の細胞内局在性の検討

和田 洋, 中村徳弘 (東大・総合文化・生命環境)

Class II VAM 遺伝子の機能は酵母の液胞形成に必須であり、これら遺伝子の機能を欠く突然変異株は大きな正常な液胞を構築することができず、多数の小さなコンパートメントを細胞内に蓄積するという特徴的な表現型を示す。これらの遺伝子の構造解析、遺伝子産物の機能解析の結果、Vam3p は syntaxin 様タンパク質を、Vam4/Ypt7p を Rab/Ypt のクラスに属する低分子量 GTPase を、また、Vam7p は SNAP-25 と弱い相同性を示すことなどが示されており、これらの遺伝子の機能が液胞形成における膜融合の過程に直接的に関与することが示された。一方で、Vam2p, Vam6p は他のタンパク質と顕著な相同性を示さず、構造からその機能を類推することはできない。Vam2p, Vam6p の動態を epitope-tagging、あるいは green fluorescent protein (GFP) との融合タンパク質の発現などの手法で解析した結果、これらのタンパク質は細胞内で大きなタンパク質複合体を形成すること、また GFP-Vam6p は液胞膜上の数カ所に多く存在することが示された。また、Vam3p も、液胞膜上に均一に分布しているのではないことが免疫蛍光顕微鏡法により示された。以上の観察結果は、液胞膜の一部分が膜融合のために特殊化されている可能性を示している。現在、*vam* 変異株中における VAM 遺伝子産物の細胞内局在性を観察しており、これらの結果をふまえて液胞膜の一部分が膜融合のために特殊化されているのか否かを検討したい。

3aC11

THE COURSE OF REPRODUCTIVE EVENTS IN THE CHLOROPLAST CYCLE OF THE CHLOROCOCCAL ALGA *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* AS REVEALED BY USING INHIBITORS OF DNA REPLICATION

Vilem ZACHLEDER, Shigeyuki KAWANO, Tsuneyoshi KUROIWA, Dept. Biol. Sci., Grad. School Sci., Univ. Tokyo, Hongo 113

The course of chloroplast reproductive events (replication of cpDNA, cp-nuclear division, chloroplast fission) was followed in synchronized culture of the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* grown under various growth conditions. To uncouple reproductive processes in nucleocytoplasmic and chloroplast compartment, fluorodeoxyuridine and nalidixic acid were used for inhibition of DNA replication in cell and chloroplast nuclei respectively. The complete sequences of reproductive processes in chloroplast, including chloroplast fission could be performed in the presence of fluorodeoxyuridine when the reproductive processes in the nucleocytoplasmic compartment were completely inhibited. Thus, the reproductive processes in the nucleocytoplasmic compartment were not a prerequisite for attaining commitment to the reproductive processes in the chloroplast which seemed to be under distinct control from those in nucleocytoplasmic compartment. Using nalidixic acid which inhibited specifically chloroplast DNA replication, it was found that the sequence of chloroplast reproductive processes (preceded by growth step) could be distinguished into several steps: DNA replication step, nuclear division step and chloroplast fission step. This reminded (in spite of its prokaryotic nature) the partition of eukaryotic cell cycle into G1, S, G2, M and CK phases. In algae dividing by multiple fission into more than two daughter cells, several mutually overlapped chloroplast reproductive sequences occurred during one chloroplast cycle again reminded the course of reproductive sequences in eukaryotic part of the algal cell (nucleocytoplasmic compartment).

3aC12

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の細胞分裂周期における葉緑体核 (核様体) の構造/機能変化の解析

酒井敦¹, 鈴木玲奈², 三角修己¹, 東山哲也¹, 黒岩常祥¹

(¹東大大学院・理・生物科学、²東医歯大・医)

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を 12h/12h の明暗周期で同調化すると、暗期 2 時間目から 8 時間目にかけて連続した 2 回の細胞分裂が起こり、細胞数は約 4 倍に増加する。この細胞分裂過程で、葉緑体核 (核様体) の形態はダイナミックに変化する。*Chlamydomonas* の葉緑体核は、明期には粒状の構造をしており、その一部がピレノイドの周囲に集中しているが、細胞分裂に先だって、葉緑体内部に分散した繊維状の構造に変化する。そして、細胞分裂が終了する頃には再び粒状の構造に変化し、明期への移行にともなってその一部が再びピレノイドの周囲に集中するようになる。こうした葉緑体核の形態変化の原因を明らかにするためには、葉緑体核を単離し、その構造解析を行うことが不可欠である。そこで我々は *Chlamydomonas* の細胞壁欠損突然変異体 (*cw15*) を用い、分裂周期の特定の時期にある細胞から、葉緑体および葉緑体核を無傷単離する手法を確立した。また、葉緑体核の構造変化と葉緑体ゲノムの機能制御との関係を明らかにするために、細胞分裂周期における葉緑体の転写・DNA 合成活性の変動を *in vivo* および単離葉緑体/葉緑体核を用いた *in vitro* の系で解析した結果も併せて報告したい。

3aC13

原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の色素体ゲノムの遺伝子クラスター

○太田にじ、黒岩常祥¹ (早稲田大・人科、¹東京大・大学院・理学系・生物科学)

色素体の起源と進化を明らかにするために、原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の色素体ゲノムのうち約100 kbpの塩基配列を決定し、コードされている遺伝子をホモロジー検索により同定した。その結果、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が数多くコードされていることがわかった。原始紅藻である *C. merolae* の色素体ゲノムには、高等植物の色素体ゲノムにコードされている遺伝情報系の遺伝子群と光合成系の遺伝子群の他に、アミノ酸合成系の遺伝子として、*ilvB*、*gltB* などが、脂肪酸合成系の遺伝子として *accD* などが、細胞分裂に関する遺伝子として *ftsH* がコードされていた。また、色素体ゲノム上の遺伝子として初めて、*menA*、*menB* などのビタミン合成系の酵素が発見された。

1aD01

講演中止

1aD02

タバコ細胞におけるエリシターに誘導される活性酸素生成と $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇 佐橋信哉¹、河野智謙¹、魚住信之^{1,2}、武藤尚志^{1,2} (¹名大・院農、²生物分子応答研究センター²)

植物のエリシターシグナル伝達系を解明するために活性酸素発生と $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇の関係を調べた。 Ca^{2+} 依存性発光タンパク質エクオリンを導入したタバコ培養細胞を作製し、キトサン、N-アセチルキトヘキソース、エルゴステロール、シアル酸をエリシターとして与えた。これら全てのエリシター添加は約2分後をピークとする $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇を反映した発光を誘導した。 H_2O_2 を分解する酵素であるカタラーゼ、フェントン反応に必要な Fe^{2+} をキレートする2,2'-ジピリジル、 α -フェナンスロリンによって $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の上昇は阻害された。従ってこれら全てのエリシターによる $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇にはそれに先立つ H_2O_2 と $OH\cdot$ の生成が必要であると考えられる。またキトサン、シアル酸は添加後5秒以内に O_2^- 生成を反映したCLAの発光を誘導した。これらのエリシターによる $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の上昇は O_2^- に特異的なスカベンジャーであるタイロン、 O_2^- 消去酵素であるスーパーオキシドジスムターゼによって阻害されなかった。従ってキトサン、シアル酸による O_2^- の生成は $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の上昇を引き起こすものではないと考えられる。

1aD03

ポリアミンによるタバコ酸性PR-1遺伝子の発現誘導

山川博幹、鎌田博、大橋祐子¹ (筑波大・生物科学、¹農水省・生物研・分子遺伝部)

PRタンパク質は、植物が病原体に感染して過敏感細胞死を起こした時に、特異的に誘導されるタンパク質群である。私達は、サリチル酸で誘導されるタバコ酸性PR-1タンパク質遺伝子の発現制御機構に関する研究を行っている。今回は、この遺伝子発現を誘導する物質として、新たにポリアミンを同定した。

ポリアミンは、膜透過性タンパク質・核酸合成に関与することが知られている塩基性低分子物質で、アルギニンからまずプトレスシンが生成され、これにデカルボキシS-アデノシルメチオニンが作用して、スベルミジンとスベルミンが順次合成されることが知られている。

私たちは、PR1aGUS遺伝子を導入したタバコ葉にポリアミンを処理すると、スベルミンによって特異的にGUS活性が著しく上昇することを見出した。野生型タバコ葉にサリチル酸を処理しても、内在性スベルミン量に有為な変化は検出されず、逆にスベルミンを処理しても内在性サリチル酸量に有為な変化は検出されなかった。また、サリチル酸によるGUS活性の誘導は、スベルミジンやスベルミンにより抑制された。これらのことは、スベルミンによる誘導が、サリチル酸が関与する情報伝達系とは独立した情報伝達系によっている可能性を示唆している。

1aD04

イネ cell death 変異体の解析

高橋章、川崎努、佐藤光¹、島本功 (奈良先端大・バイオ、¹九大・農)

植物は病原体の侵入を認識すると、その感染部位において急速な細胞壊死を伴う hypersensitive response (HR) を起こし生体内での病原体の繁殖を抑制する。その後、感染を受けていない他の部位においても、様々な防御遺伝子の発現等の全身獲得抵抗性 (SAR) が誘導されることが知られている。

我々は、イネ品種金南風にMNU処理によって得られた変異系統の中から、病原体の有無に関わらず葉に自発的な細胞死による壊死斑を形成する変異体約170系統を選抜した。これらの変異系統について、イネいもち病菌の数種のレースに対する抵抗性反応を調べたところ、2系統においてレース非特異的な抵抗性が誘導されていることを見いだした。さらに、ノーザン分析によって、これらの系統ではSARの指標となるLOXやイネのPRタンパク質 (PBZ1) の恒常的な発現が誘導されていることが明らかになった。これらの結果から、得られた変異系統では、抵抗性反応に至るシグナル伝達経路に変異を生じていることが示唆された。

1aD05

イネ培養細胞にエリシター活性を示すイモチ病菌 β -グルカン断片とその生物活性の特徴

山口武志 渋谷直人 (農水省 農業生物資源研)

高等植物では病原菌やウイルスの感染にともなって種々の生体防御系が動員されることが知られている。本研究室ではこれまでに、糸状菌細胞壁のキチンの特定サイズ以上の断片とともに、イモチ病菌 (*Pyricularia oryzae*) 細胞壁をエンド β -1,3グルカナーゼで酵素消化することにより調製した β -グルカン断片混合物が、イネの培養細胞 (BL-2) に対して強いエリシター活性を示し、その活性断片はダイズエリシターである hepta (1-3,1-6) β -glucoside とは異なる枝分かれ構造を有していることを報告した^{1) 2)}。

この β -グルカン断片混合物をゲル濾過と逆相クロマトグラフィーで分離することにより重合度5の画分からグルコペンタオースの異性体由来する複数の活性成分を精製した。これらのオリゴ糖のイネ培養細胞に対するエリシター活性を調べた結果、単独でnmolオーダーで強いファイトアレキシン誘導活性を示すものと、キチンオリゴ糖存在下で顕著な相乗効果を示すものの存在が示唆された。これらの精製 β -グルカン断片の生物活性と構造について現在さらに検討中である。

¹⁾ 山口武志他、95年度日本農芸化学会大会要旨集 p99

²⁾ 山口武志他、96年度日本植物生理学会大会要旨集 p129

1aD06

イネにおける細胞質酸性化によるエリシター誘導性遺伝子の発現

賀道耀、南栄一、矢崎芳明¹、坂野勝啓¹、朽津和幸、渋谷直人 (農水省・農業生物資源研・生物工学部、1同・生理機能部)

N-アセチルキトオリゴ糖はイネ懸濁培養細胞に対して強いエリシター活性を示し、短時間内に特定の遺伝子 (BL2, BL3, PAL) を活性化させる。エリシターの初期作用を解析する過程でこれらの遺伝子が細胞質の酸性化によっても活性化されることを見いだしたので報告する。イネ細胞を低濃度の数種類の酸で処理するとどの場合も一過的にBL3が誘導された。このうちプロピオン酸 (1.5mM) はBL2, PALをも誘導し、エリシター処理とよく似た効果を示した。このとき細胞質pHは³¹P-NMRによる測定で約0.5低下した。プロピオン酸による遺伝子発現誘導は培地中のカルシウムを必要とし、またanion channel blocker, A9-C処理によって強く阻害されたが、蛋白質リン酸化阻害剤であるK252aはエリシターによる遺伝子誘導を阻害するがプロピオン酸による誘導を阻害しなかった。エリシター以外によるこれらの遺伝子の発現誘導は原形質膜H⁺-ATPase阻害剤、エリスロシンB処理によっても観察され、同時に細胞質pHの低下が認められた。またこれらの処理によってはエリシター処理時にみられる活性酸素生成は認められなかった。エリシター処理直後に一過的な細胞質pHの低下が起こること (Kuchitsu et al. submitted) を考えあわせると、細胞質の酸性化がエリシターシグナルの伝達に積極的な役割を果たしていることが示唆される。

1aD07

イネ培養細胞原形質膜に存在するN-アセチルキトオリゴ糖エリシター結合蛋白質のピオチン化による部分精製

伊藤ユキ、賀来華江、渋谷直人 (農水省、生物研)

種々の病原菌細胞壁の構成多糖であるキチンのオリゴ糖 (GlcNAc)₆₋₈ はイネ懸濁培養細胞に対しnMレベルでファイトアレキシンエリシターとして作用する。我々は既にイネ培養細胞原形質膜に、N-アセチルキトオリゴ糖 (GlcNAc)₆₋₈ に高い親和性を持ち、シグナル伝達におけるレセプターとして機能する可能性のある分子量約75kDaの蛋白質をフォトアフィニティーラベルにより同定した。またこの蛋白質にアフィニティー架橋によりピオチンを導入し、アイソトープを用いずに検出する方法を報告している。本実験ではこのピオチン化蛋白質を固定化ピオチンにより精製する方法を検討した。(GlcNAc)₆ のピオチンヒドラジド誘導体を調製し、水性二相分配法で調製した原形質膜と反応させた後グルタルアルデヒドにより架橋反応を行った。原形質膜可溶化物のSDS-PAGEゲルをニトロセルロース膜へブロットし、HRP-アビジン処理し、反応物を化学発光法により検出することにより75kDa蛋白質を検出した。この原形質膜可溶化物を1Mグアニジン存在化でテトラアビジンアガロースと反応させたところ、75kDa蛋白質はほぼ完全に再現性よくゲルに吸着したが、膜蛋白質のほとんどは吸着せず、部分精製することができた。テトラアビジンアガロースに吸着した75kDa蛋白質は、1% SDS存在下加熱することにより溶出でき、ピオチン化75kDa蛋白質の移動度と一致するバンドが他のいくつかのバンドとともに検出された。現在他のクロマトグラフィーを組み合わせることに精製をすすめている。

1aD08

エンドウによる褐紋病菌サプレッサーの認識機構

杉浦徹也¹、木場章範¹、青柳雅昭²、加藤敏朗³、一瀬勇規¹、山田哲治¹、白石友紀¹

(¹岡山大学、²日製産業SIセンター、³新日鉄先端技研)

エンドウ褐紋病菌が胞子発芽液中に生産する1サプレッサー、suppressin A (SupA: GalNAc-O-Ser-Ser-Gly) は、エンドウの防御応答を抑制 (遅延) する。本研究では、エンドウによるSupAの認識機構を明らかにする第一段階として、細胞壁可溶化タンパク質画分とSupAとの相互作用を光学バイオセンサー (IASys: FISIONS) で解析した。その結果、細胞壁中にはSupAと結合する分子が存在し、本結合は外部から与えたSupAにより濃度依存的に阻害された。SupAの構成糖と構成ペプチドを用いた競合実験の結果、SSGは本結合には影響せず、GalNAcは濃度依存的に本結合を阻害した。しかし、その阻害はSupA自体を競合させた場合の1/100程度であった。エリシター処理でエンドウ組織に誘導されるピサチン蓄積に対するこれら構成成分の影響を調べた結果、GalNAcは全く影響しなかったが、2mMのSSGは70%以上蓄積を阻害した。以上の結果は、病原菌シグナルの認識には細胞壁が関与し、細胞壁によるSupAの認識には、糖鎖を中心としたSupAの全体的な構造が重要であること、また、SupAの活性はペプチド鎖が担うことを強く示唆する。

1aD09

Mastoparanによる植物培養細胞応答機構の解析

澤木 賢、石川 敦司、岩崎 行玄、旭 正

(福井県大・生物資源)

近年、高等植物においても光やエリシター等の外界からのシグナル情報伝達が三量体G蛋白質を經由して細胞内へ多くの情報を伝達していることが示唆されている。しかし高等植物三量体G蛋白質の構造・機能に関する生化学的研究は十分になされていない。今回我々はイネ懸濁培養細胞(Oc suspension cell)およびタバコ懸濁培養細胞(BY-2)に、G蛋白質のアクチベータとして知られているMastoparan 7(M7)の添加によって生じる一連の細胞応答機構の解析を試みた。その結果M7添加後数分以内にMBP Kinase活性が増大すること、数時間以内に二次代謝に関与するPAL遺伝子の転写産物の蓄積が増大することが明らかになった。これらの知見は特定のKinase活性化やPAL遺伝子の発現に三量体G蛋白質が関与する可能性があることを示唆している。

1pD01

ゼンマイ胞子葉緑体におけるCa²⁺依存性プロテインキナーゼPK54の性質

蒲池浩之、井上弘 (富山大・理・環境)

Ca²⁺依存性プロテインキナーゼ(CDPK)は、植物のCa²⁺シグナリング系において重要な役割を果たしている。我々は、前本学会(鹿児島1996)において、ゼンマイ胞子葉緑体チラコイド膜を凍結・融解して遊離してくる蛋白質の中に、分子量54kDaのCDPK(PK54)が存在していることを報告した。今回、このプロテインキナーゼの性質を明らかにする目的で、PK54の精製を試みた。チラコイド膜凍結融解抽出物を試料として、硫酸沈殿、DEAE-Toyopearl、Phenyl-Sepharoseにより、histoneIII-Sを基質としたCDPK活性を、470倍にまで精製することができた。精製PK54は、低濃度のCa²⁺で活性化される(ED₅₀=0.5μM)こと、プロテインキナーゼCの阻害剤であるH-7では阻害されず、カルモジュリンのアンタゴニストであるW-7で阻害されることなど、CDPKに特徴的な性質を持っていることがわかった。しかしながら、PK54の精製が進むにつれて、histoneIII-Sを基質としたゲル内リン酸化法による酵素活性の検出ができなくなっていくた。この原因の一つとして、PK54がリン脂質依存性のCDPKであることが予想される。

1pD02

シロイヌナズナrd22 遺伝子の乾燥誘導性のシス領域に結合するMYC 相同性タンパク質をコードするrd22BP1遺伝子の機能解析 安部 洋^{1,2}、篠崎和子¹、浦尾 剛¹、岩崎俊介³、細川大二郎²、篠崎一雄³ (1農水省・国際農研、2東京農工大・農、3理研・植物分子)

乾燥ストレスによる遺伝子発現調節機構を明らかにするため、乾燥により誘導されるシロイヌナズナ rd22 遺伝子の転写調節機構について研究を行っている。rd22 遺伝子は乾燥ストレスによって増加したアブシジン酸(ABA)を介して誘導されるが、その発現には他のタンパク質の合成を必要とする。rd22 のプロモーター解析により、67bp の転写開始領域が乾燥による誘導に必要であることが明らかになった。この67bp のシス領域には2ヶ所の MYC 認識配列と1ヶ所の MYB 認識配列が存在しており、サウスウエスタン法により MYC 認識配列に特異的に結合する MYC 相同性タンパク質をコードする rd22BP1 を単離した。ノーザン法で解析すると rd22BP1 遺伝子は乾燥処理、塩処理、ABA処理により発現が10分以内に著しく誘導された。しかし低温によっては誘導されなかった。この発現様式は rd22 遺伝子と類似しており、しかも rd22 遺伝子より早く誘導された。また、上記の67 bp の乾燥誘導性のシス領域には乾燥処理やABA に応答する、シロイヌナズナの MYB 相同性タンパク質 ATMYB2 も結合することが明らかになった。今回我々は、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過性の実験を行い、rd22BP1 と ATMYB2 が共に rd22 遺伝子の転写活性化に関与している可能性が示唆されたので報告する。

1pD03

Two-hybrid 法によるシロイヌナズナ・フォスフォリパーゼC 結合因子の cDNA クローニングとその機能解析 三上浩司¹、2、平山隆志²、篠崎和子¹、2、篠崎一雄² (農水省・国際農研・生物資源¹、理研・ライフサイエンス筑波センター・植物分子²)

我々はシロイヌナズナが浸透圧ストレスに依存的して発現するフォスフォリパーゼC (AtPLC1)と恒常的に発現している AtPLC2 を単離している。PLC が IP₃ を基質としてセカンドメッセンジャーである IP₃ やDGを産生することで種々のシグナル伝達系に関わることから、ストレス応答とイノシトールリン脂質代謝の関連に興味を持たれた。本研究では、水ストレス応答におけるPLC 活性化機構を解明する目的で、酵母 two-hybrid スクリーニング法により AtPLC 結合因子のcDNAを単離し、さらにその機能解析を行った。スクリーニングの結果、PLC1 と PLC2 の両方に結合する因子、PLCIF-1 (PLC-interacting factor-1) を得ることができた。PLCIF-1 はこれまでに報告のない新規のタンパク質であり、アミノ酸配列からの機能予測ができなかった。しかし、PLIF-1 が AtPLC1 あるいは AtPLC2 と共存すると酵母が aggregate することが観察され、細胞分裂制御系や細胞壁合成系との関わりが予想された。一般に細胞壁にダメージのある酵母は 0.004% SDS を含む培地での生育が良くない。PLCIF-1 は AtPLCs と共存した場合その培地での酵母の生育を劇的に促したが、単独ではそのような効果は見られなかった。従って、シロイヌナズナの PLC-PLIF-1 複合体が、酵母の細胞壁合成系に何らかのかたちで作用していると考えられた。現在、酵母を用いた詳細な解析と植物細胞での機能解析を進めている。

1pD04

シロイヌナズナのPI代謝関連酵素であるホスファチジン酸ホスファターゼ遺伝子の高塩濃度や低温による発現誘導

片桐 健^{1,2}、三上浩司^{1,3}、篠崎和子^{1,3}、篠崎一雄^{1,2}

(¹理研・植物分子、²筑波大・生物科学、³国際農研・生資)

植物において光やオーキシンによってイノシトールリン脂質代謝 (PI代謝) が活性化されることが示されている。最近、その鍵酵素であるホスホリパーゼC遺伝子が単離されるなど、植物のPI代謝に関する分子生物学的、生化学的な研究が進んでいる。

我々はPI代謝を介した情報伝達系における2次メッセンジャーとして機能が示唆されているジアシルグリセロール(DG)とホスファチジン酸(PA)が、リン酸化・脱リン酸化によってそれぞれに変換され得ることに注目した。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、DGをリン酸化してホスファチジン酸(PA)を産生する酵素であり、我々は既に単離したシロイヌナズナのDGK遺伝子が構成的に発現誘導を受けることを明らかにしている(PMB 30: 647-653, 1996)。今回、PAを脱リン酸化してDGを産生するホスファチジン酸ホスファターゼ(PAP)に着目し、シロイヌナズナからこの遺伝子を単離し、その遺伝子発現に関する新たな知見を得たので報告する。単離した約1.3kbのcDNAの塩基配列を決定し、得られたORFが動物のPAPと相同性があることを示した。ノーザン法による解析から高塩濃度処理や低温処理によって遺伝子発現が誘導されることを明らかにした。以上の結果は、高等植物において2次メッセンジャーとして機能し得るDGとPAの量的制御をPAPが塩や低温といった浸透圧ストレスに応答して行っている可能性があることを示唆しており、現在、PAP遺伝子の生理的機能を明らかにすることに着手している。

1pD05

高等植物におけるプロテインキナーゼ遺伝子の解析

: MAPKKについて

松岡大介、有賀逸人、出口真紀、南森隆司、深見泰夫¹、王子善清²、吉川潮³ (神大・自然科学研究科・生機化,¹神大・遺伝子実験施設,²神大・農・環境制御,³神大・バイオシグナル)

細胞内情報伝達過程において、蛋白質の磷酸化が重要な役割を演じているということは既知の事実である。しかし高等植物においては、ほとんど解明されていないといっているであろう。本研究室において、高等植物にもPKC様の酵素活性を有する蛋白質が存在するということを示唆した*。そこで我々は、PKCを含むプロテインキナーゼ遺伝子の同定及びその解析を目的とした。まず既知のPKC遺伝子の触媒ドメインにおいて保存されている領域における合成プライマーを作製し、高等植物コマツナ (*Brassica campestris* L) 本葉より mRNA を抽出し、RT-PCRを行い、数種のプロテインキナーゼ遺伝子断片を得た。その中にはPKC-likeキナーゼ断片や今回発表するMAPKKと相同性が高い断片が含まれていた。このMAPKKホモログ断片を鋳型として、シロイヌナズナcDNAライブラリーからのスクリーニングを行った。その結果得られたクローンは、これまで高等植物で報告されたMAPKKとは異なった配列を有し特に動物型MAPKKにおいて保存されている触媒ドメイン中のSXXXS/T配列を有していることから、高等植物における新規なMAPKKであると考えられる。

*Nanmori et al. BBRC 203 p311-318 (1994)

1pD06

WIPKの傷害応答初期過程における信号伝達機能
瀬尾茂美、大橋祐子 (農水省・生物研・分子遺伝部)

我々は植物の傷害及び病原体感染応答の分子機構の解明に取り組む中で、傷害に速い応答を示すMAPキナーゼの一種と考えられるWIPK (wound-induced protein kinase) 遺伝子をタバコより単離した。この遺伝子を導入した植物を作成したところ、この中では内在性のWIPKの働きが抑えられており、この植物体に傷害ストレスを与えても通常傷害で誘導される筈のジャスモン酸 (JA) やプロテナーゼインヒビター-II (*PI-II*) 遺伝子の発現が抑えられていた。この事実は、WIPKは傷害応答のJAシグナル経路を支配することを示唆する。今回、傷害応答のシグナル伝達系におけるWIPKの機能をより明らかにするために、異なったタイプのWIPK遺伝子過剰発現タバコを作成した。この形質転換体では、傷害を与えなくても高いレベルのJAが蓄積しており、*PI-II*遺伝子の恒常的な発現がみられた。また、抗WIPK抗体を用いた解析から、野性型タバコでは傷害によってWIPK活性の一過的な上昇が起きたが、作成した形質転換タバコではその恒常的な活性化が起こることが分かった。これらの結果は、活性化されたWIPKはJAのレベルを調節することによって傷害応答のシグナル伝達系で機能していることを示している。

1pD07

講演中止

1pD08

シロイヌナズナMAPKK 関連遺伝子の解析

市村和也^{1,2}、溝口剛²、篠崎一雄² (筑波大・生物学、²理研・植物分子)

我々は、シロイヌナズナをモデル系に、高等植物におけるMAPキナーゼカスケードの機能解析をおこなっている。MAPキナーゼカスケードはヒトから酵母まで進化的に保存されており、動物や酵母では細胞増殖やストレス応答において重要な役割をはたしている。高等植物よりMAPキナーゼカスケード関連遺伝子群が多数単離されているが、それらの生理学的機能は不明であるだけでなく、キナーゼ間の上下関係についても対応づけられていない。

我々はシロイヌナズナからMAPKK関連遺伝子を新たに4種類単離し、酵母の変異株とTwo-hybrid systemを利用して機能解析を行った。その結果、カスケードを構成する可能性が高い組み合わせ(ATMEKK1→AtMEK/ATMKK2→ATMPK4)が明らかになった。ATMKK2とATMEKK1の共発現は出芽酵母*pbs2*変異株の表現型を抑制する結果が得られていたので、ATMEKK1によるATMKK2の活性化が考えられた。そこでATMKK2の点突然変異体を作製しATMEKK1との共発現を行った。キナーゼネガティブ型ATMKK2、リン酸化配列と予想されるTXXXXTのスレオニンのどちらか片方のみをアラニンに置換したATMKK2の合計3種類を共発現に用いた。いずれの点突然変異によっても共発現による*pbs2*変異形質の抑制は起こらなかった。以上よりATMKK2のキナーゼ活性部位と上記のリン酸化配列がMAPKKとしての機能に重要であることが示唆された。

1pD09

シロイヌナズナMAPKKK ATMEKK1と相互作用する因子の解析

溝口剛¹、市村和也^{1,2}、篠崎一雄^{1,2} (理研・植物分子、²筑波大・生物)

MAP kinase cascadesは酵母から植物、ヒトに至るまで高度に保存され、さまざまな情報伝達系で重要な機能を果たしていることが報告されている。我々は昨年度本学会までに、1) *Arabidopsis* から多数のMAPK, MAPKK, MAPKKK同源性遺伝子を単離し、これらがそれぞれ3~4のサブファミリーに分類できること、2) ATMPK4 (MAPK)とAtMEK/ATMKK2 (MAPKs), AtMEK/ATMKK2 (MAPKs)とATMEKK1 (MAPKKK), ATMPK4 (MAPK)とATMEKK1 (MAPKKK)の間にタンパク質-タンパク質間相互作用が検出されたこと、3) ATMPK4とAtMEKを出芽酵母のMAPK欠変異体*mpk1Δ*中で共発現させることにより機能相補が認められ、AtMEKとATMEKK1を出芽酵母のMAPKK欠変異体*pbs2Δ*中で共発現させることにより機能相補が認められたことから、*Arabidopsis*中でATMPK4 (MAPK)-AtMEK/ATMKK2 (MAPKK)-ATMEKK1 (MAPKKK)がMAP kinase cascadeを構成する可能性を示してきた。

今回我々は、シグナル伝達系においてATMEKK1 (MAPKKK)と相互作用する因子(活性化因子等)の単離を目的として、ATMEKK1とタンパク質-タンパク質間相互作用する因子を酵母two-hybrid systemを用いて3種類単離した。これらはそれぞれATMPK4 (MAPK)、ATMKK2 (MAPKK)、新規のタンパク質(ATMEKK1IP46)をコードしていた。これらの因子との結合に必要なATMEKK1の領域の検討、新規のタンパク質(ATMEKK1IP46)の推定される機能に関して報告する。

1pD10

ソラマメ孔辺細胞より単離した蛋白質リン酸化酵素 cDNA の構造および機能解析

木下俊則、和田元、伊藤正明¹、島崎研一郎 (九州大・理・生物、¹三重大・医)

気孔は青色光照射により開孔するが、この時、青色光は光情報として孔辺細胞原形質膜のプロトンポンプを活性化することが知られている。これまでの研究から、青色光に依存した孔辺細胞プロトプラストからのプロトン放出は、Ca²⁺/カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) の阻害剤により阻害されることが明らかとなり、青色光情報伝達系への MLCK 様蛋白質の関与が示唆されている。そこで、孔辺細胞の MLCK 様蛋白質の遺伝子単離を目的として、ニワトリ砂の由来の MLCK に対するポリクローナル抗体を用いてソラマメ孔辺細胞 cDNA ライブラリーのイムノスクリーニングを行った。その結果、2つのポジティブクローン (VFPK1、VFPK2) を得た。これらの cDNA がコードする蛋白質は、271 残基と 219 残基のアミノ酸からなり、両者間の相同性はアミノ酸配列レベルで 87% であった。これらの蛋白質は蛋白質リン酸化反応に必須とされるキナーゼドメインを保存していたが、MLCK や既知の蛋白質リン酸化酵素との相同性はみられなかった。次に、VFPK1 を大腸菌の発現ベクターに挿入し、大腸菌内で大量発現させたのちゲル内リン酸化法により蛋白質リン酸化酵素活性を調べたところ、VFPK1 にコードされた蛋白質はリン酸化活性を持つことが明らかとなった。以上の結果より、VFPK1 にコードされた蛋白質は新規の蛋白質リン酸化酵素と推定された。

1pD11

栄養ストレスに応答するプロテインキナーゼの特徴

池田佳久¹、鈴木信弘²、小泉望¹、佐野浩¹ (1奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター植物細胞工学、²秋田県立農業短期大学)

コムギ芽生えを光、栄養飢餓あるいはサイトカインで処理すると、セリン/スレオニンプロテインキナーゼである *wpk4* の mRNA が蓄積する。

栄養状態の変化による *wpk4* mRNA の経時変化を詳しく調べたところ、ショ糖および無機塩飢餓により mRNA が3時間以内に蓄積した。逆に、ショ糖および無機塩を添加すると mRNA がそれぞれ3時間以内に減少した。成熟したコムギでは、主に光合成を行なう組織で *wpk4* mRNA が蓄積していた。GSTとの融合タンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。融合タンパク質を用いてリン酸化反応を行なったところ、Mg²⁺イオン依存的に自己リン酸化し、*in vitro*で小麦由来のタンパク質をリン酸化した。

これらの結果より、WPK4タンパク質は栄養の情報伝達経路において、下流の標的タンパク質をリン酸化することで重要な役割を果たしていることが示唆された。

1pD12

マストバランによるタバコ培養細胞の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇とプロテインキナーゼ活性化

¹高橋宏二, ²武藤尚志 (¹名古屋大・情文・生物システム, ²生物分子応答研究センター, 院農)

カルシウム感受性発光蛋白質エクオリンを発現するタバコBY-2細胞をマストバラン処理すると、一過的な細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) 上昇が観察された。不活性アナログMas-17は $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇を引き起こさなかった。この $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇は細胞外 Ca^{2+} を除去しても抑制されなかったが、ネオマイシン処理により完全に抑制された。これらの結果から $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇はマストバランにより三量体GTP結合蛋白質が活性化され、イノシトールリン脂質代謝回転を亢進し、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 流出を引き起こしたものと推測される。

ゲル内アッセイ法によって解析すると、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇に引き続いて、プロテインキナーゼが活性化されることが明らかになった。この活性化はネオマイシン処理によって抑制されたことから、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇を必要とすることが示唆される。

1pD13

ジャガイモ塊茎貯蔵タンパク質パタチンのリン酸化される可能性について

仙田香織, 道家紀志, 川北一人 (名古屋大・農・植物病理)

ジャガイモ植物の誘導抵抗反応発現に至る細胞内情報伝達系に関与するホスホリパーゼ (PL) A2 を探索し、塊茎可溶性画分の PLA2 は貯蔵タンパク質パタチンであると同定した。そこで、誘導抵抗反応に関与する PLA2 の本体がパタチンであるのか否かについて検討した。菌体エリシター処理したジャガイモ塊茎組織では処理後一時的に PLA2 活性が上昇したが、パタチン抗体を用いたウェスタン解析ではパタチンの蓄積量に変化はみられなかった。次に、パタチンがリン酸化により活性化される可能性について調べた。ジャガイモ塊茎可溶性画分中のプロテインキナーゼによりパタチンがリン酸化されるかどうかを、パタチンを基質としたゲル内リン酸化法により調べた。その結果、パタチンが数種のプロテインキナーゼの基質と成り得ることが示唆された。また、可溶性画分について抗ホスホセリン抗体により免疫沈降した後、抗パタチン抗体を用いたウェスタン解析を行ったところ、パタチンが検出され、パタチンのセリン残基がリン酸化される可能性が考えられた。

1pD14

イネゲノムに存在する複数の SNF1 様プロテインキナーゼ遺伝子

高野誠, 鐘ヶ江 (梶矢) 弘美, 船附秀行¹, 菊池尚志 (農水省・生物研, ¹北農試)

タンパク質のリン酸化を介したシグナル伝達系は、植物においても細胞増殖や環境応答などに重要な役割を果たしている。植物細胞にとって基本的な生理機能や代謝に関するプロテインキナーゼ (PK) についてはアラビドプシスで精力的に研究が進められているが、物質生産や貯蔵に関してはシンク/ソース機能の発達した作物が良い系を提供してくれると考えられる。

私たちは、炭素代謝を制御するシグナル伝達系の解明を目的としてイネの PK 遺伝子を検索し、酵母の炭素代謝の異化生成物抑制に関与する SNF1 と高い相同性を示す PK の cDNA を 5 種類単離した。これらは、お互いの塩基配列の相同性より Group I (osk1) と Group II (osk2-5) に分類できる。さらに、Group II 内でも (osk2, osk4) と (osk3, osk5) は明らかに別の遺伝子にコードされていると考えられ、少なくとも 3 種類の遺伝子が存在することが示唆された。

Group I と Group II の発現は異なる組織特異性を示し、植物体内において異なる機能を持つ、あるいは役割分担をしていると考えられる。Group II を構成する各分子種間では組織特異性に違いは見られず、また、アミノ酸配列もほとんど同一である。そこで各々のグループを代表して、osk1 と osk3 を大腸菌で発現させ、いずれもヒストンおよび自己リン酸化能を持つことを証明した。さらに、osk3 は酵母の snf1 突然変異を相補することができた。

1pD15

オオムギ硝酸還元酵素遺伝子発現の硝酸誘導に対する各種阻害剤の効果

末吉 邦, 光山貴志, 杉本敏男, 王子善清 (神戸大・農・生物環境制御)

植物の硝酸還元酵素 (NR) は、硝酸イオンの投与により分のオーダーでその遺伝子の発現が誘導される。我々は、オオムギの切断葉に硝酸イオンとともに種々の濃度の阻害剤を与え、NADH-specific NR 遺伝子の転写産物の誘導蓄積に対するそれら阻害剤の効果をノーザンブロット法で調べた。

無窒素栽培のオオムギ切断葉に 5mM の硝酸塩を与えたところ、NR 遺伝子の転写産物は、投与後 30 分以内に蓄積され、1 時間後には蓄積量が最大に達した。硝酸イオンによる誘導は、カルシウムチャンネルの阻害剤である La^{3+} (10mM)、チロシン/ヒスチジンキナーゼの阻害剤であるゲニステイン (100 μ M)、プロテインフォスファターゼの阻害剤であるオカダ酸、カリクリン A (500nM) で強く阻害された。以上の結果から、NR 遺伝子の発現を誘導する硝酸イオンのシグナル伝達の過程で、細胞内へのカルシウムイオンの流入、細胞内タンパク質のリン酸化および脱リン酸化が必要であると推定された。

2aD01

クラミドモナスは'Green Yeast'となりうるか? : 単細胞緑藻クラミドモナスの高効率形質転換系の開発

下河原浩介, 藤原祥子¹, Arthur Grossman², 白田秀明 (帝京大・医・化学, ¹東薬大・生命科学・環境応答, ²Carneigie Inst., Dept. Plant Biol.)

1990年、K.KindleらによりクラミドモナスでGrassbeads法による核遺伝子の形質転換法が確立された。彼女らの方法による形質転換効率($10^{-2-3}/\mu\text{g DNA}$)は、大腸菌や酵母などの分子生物学のモデル生物と比較して、必ずしも高くはないものの、以来、本生物は、これまで真核光合成生物では不可能と考えられていた分子生物学的アプローチが可能で、新たなモデル生物として、急速に注目を集めつつある。我々は、現在、本生物を利用し、真核光合成生物の様々な環境応答現象を分子レベルで解明すべく、研究を進めている。この生物の分子生物学的モデル生物としての有効性を高めるために、形質転換効率の一層の向上が望まれることは言うまでもない。そこで我々は、本生物でElectroporation法による形質転換の可能性を詳細に検討した。その結果、従来Grassbeads法で実現されていた形質転換効率を約2桁向上させることに成功した。これにより、この材料において、新たに、Genomic libraryを用いた変異遺伝子の相補による直接クローニングの可能性が開けた。

2aD02

ミトコンドリアと核のクロストーク : chloramphenicol-hypersensitive酵母変異株の解析とchloramphenicol処理で誘導される核遺伝子の解析
加藤祥弘, 瓜谷真裕¹, 丑丸敦史 (静岡大・理・生物, ¹静岡大・理・化学)

核と独立に遺伝子を保有している細胞内小器官であるプラスチドとミトコンドリアが核とどのようなクロストークを行っているかは非常に興味深いテーマである。しかしながら、プラスチドまたはミトコンドリアから核に向かうシグナルがいかなるものなのかはまだよく理解されていない。我々は植物細胞におけるこの問題を単純化する目的で、プラスチドを持たない酵母細胞を用いて研究を行っている。ミトコンドリアでの機能不全が引き起こすシグナル伝達を理解するために、まずこの応答が不全になるような変異株を取得する目的で、ニトロソグアニジン処理により変異誘発した約 1×10^4 個の酵母クローンよりミトコンドリア70Sリボソームの特異的阻害であるchloramphenicol (CP)存在下で死にやすいクローンをフロクシンBをマーカーとして単離した。更にこの中から野生株に比べて1 mg/mlのCPを含んだ培地上で生育不全となるクローンを3個単離した。現在、他の翻訳阻害剤に対する感受性を調べるとともに、この変異を相補する遺伝子をクローニング中である。一方、酵母にCPを与えた直後に発現が誘導されてくる遺伝子断片を数種differential display法により単離しているのでこちらの途中経過も報告する。
Email: ushimaru@sci.shizuoka.ac.jp

2aD03

シクロヘキシミドはトウモロコシ低温誘導性遺伝子の1群の発現レベルを高める

トーマス・ベルベリッヒ、原田真理子、草野友延
(秋田県立農短大・生工研)

トウモロコシではこれまでに1群と3種の遺伝子がプラス域の低温処理で発現誘導されることが知られている: 即ち、アンソシアニン色素生産系に関する遺伝子群(PAL, Chs等)、ミトコンドリアのカタラーゼをコードする*cat3*、アルコール脱水素酵素をコードする*Adh1*、bZIP蛋白質をコードする*mlp15*である。今回、我々はCaイオン依存性蛋白質リン酸化酵素遺伝子*ZmCDFK1*の発現が低温で誘導されることを見出した。さらに以下の諸点を明らかにした。

(1) *ZmCDFK1*遺伝子の低温による発現誘導は根でも地上部でも起こる (2) *ZmCDFK1*遺伝子は*mlp15*遺伝子より早く低温で誘導される (3) 蛋白質合成阻害を全く起こさない濃度のシクロヘキシミド(CHX)が*ZmCDFK1*遺伝子と*mlp15*遺伝子の転写物の蓄積を起こす (4) 薬剤特異性を調べたところ、CHXのほかにアニソマイシンが同様の効果を示す (5) *Adh1*遺伝子は低温とともにCHX処理によっても転写物の蓄積がみられたが、*Chs*遺伝子は低温処理でのみ発現誘導がみられた (6) 低温やCHX処理に先立ち、Caイオンキレーターで植物体を前処理すると上述の転写物の蓄積は見られなくなるが激減した。以上の結果は、CHXが低温で誘起されるCaイオン関与のシグナル伝達系を活性化させるシグナル・アゴニストである可能性を示唆した。今後、この作業仮説を検証していく。

T.Berberich & T.Kusano : MGG in press.

2aD04

DEAD-box型ヘリカーゼがbZIP型タンパク質の転写活性化ドメインと相互作用する。

岡南政宏、飯哲夫、岩淵雅樹 (京都大・院・理・生物科学)

GCBモチーフはいくつかの植物GBF/HBP-1a型bZIPタンパク質においてよく保存されたアミノ酸配列である。我々は、タバコ培養細胞を用いた一過的発現系によって、コムギHALF-1とシロイヌナズナGBF1のGCBモチーフを含む領域(E3領域)が潜在的な転写活性化能を持つことをすでに示している。このことは、GCBモチーフを含む領域を介した転写活性化が植物において広く保存されたものであること、また、GCBモチーフと相互作用する転写因子が植物に普遍的に存在することを強く示唆する。

そこで、この転写活性化のメカニズムを解明するために、E3領域と相互作用するタンパク質の同定を試みた。HALF-1のE3領域をプローブとした酵母two-hybrid法によってシロイヌナズナcDNAライブラリーをスクリーニングした結果、DEAD-box型のRNA/DNAヘリカーゼと相同性を示すタンパク質をコードするcDNAが得られた。この全長タンパク質は実際にRNAヘリカーゼ活性を持っていた。本年度では、このヘリカーゼの構造と機能解析の結果を報告する。

2aD05

アラビドプシス *HY5* 遺伝子を過剰に発現する形質転換体の解析

小山時隆、宇佐美竜二、合田和史、岡田清孝 (京都大・理・植物)

我々はアラビドプシスの根の発生及び刺激応答性の分子機構に興味を持って研究している。*HY5* 遺伝子は光信号の伝達系で働くことが知られていたが、我々は根の形態形成および刺激応答性に注目して *hy5* 突然変異体を解析した結果、根および胚軸において以下の5つの野生型 *HY5* 遺伝子の機能を明らかにした。

1, 細胞伸長の抑制。2, 側根の形成の開始および伸長の抑制。3, 器官の二次肥大に伴う細胞増殖の促進。4, 光形態形成の促進。5, 根の屈地性の制御。

さらにT-DNAタギング法を用いて *HY5* 遺伝子がDNA結合モチーフの一つであるbZIP領域を持つタンパク質をコードしており、転写因子として機能していることを明らかにした。

今回、CaMV35Sプロモーターで *HY5* 転写産物を過剰に発現する形質転換体を作成した。本学会では *HY5* 過剰発現形質転換体、野生型植物、*hy5* 突然変異体の三者間での表現型を比較し、*HY5* 遺伝子の植物体内での役割を論じる。

2aD06

光形態形成や根の形態形成に働くアラビドプシス *HY5* 遺伝子の発現

合田和史、小山時隆、岡田清孝 (京都大・理・植物)

我々は根の形態形成機構を明らかにするためにアラビドプシスを材料として研究をすすめる。*HY5* 遺伝子をクローニングしてbZIPモチーフを持つ転写因子をコードすることを明らかにした。*hy5* 突然変異体は、明所下での胚軸の徒長、側根の横地性、側根の増加など根と胚軸に多面的な異常を示す。ノーザン・ブロットイングの結果、花芽、本葉、茎、子葉、胚軸、根、全ての器官での *HY5* mRNA の蓄積がみられた。今回我々は、*HY5* 遺伝子の組織ごとの発現部位を詳細に見るために、*HY5* プロモーターの下流にレポーター遺伝子のGUSをつないだコンストラクトを作り、それを形質転換したトランスジェニック植物を作成した。観察の結果地下部においてはほぼ全ての細胞で発現がみられ、特に維管束では強いシグナルが検出できた。更に我々は *HY5* タンパク質の発現を抗 *HY5* 抗体を利用して組織レベルで観察している。また抗 *HY5* 抗体を用いて *HY5* 遺伝子タンパク質の細胞レベルでの局在を観察している。本学会ではそれらによって得られた *HY5* 遺伝子の発現制御とその産物の局在について報告する予定である。

2aD07

シロイヌナズナのレスポンスレギュレーター遺伝子 (*ARR1, ARR2*) の単離

酒井啓江、青山卓史、岡 穆宏(京大・化研)

細胞は外界からの刺激に的確に応答するため、様々なシグナル伝達機構を有している。原核生物では、環境刺激に応答する細胞内シグナル伝達系として、しばしば二成分制御系 (two-component regulatory system) が用いられる。これは、センサーおよびレスポンスレギュレーターと呼ばれる2つの蛋白質間における特異性の高いフォスフォリレーを介するもので、真核生物における蛋白質リン酸化によるシグナル伝達系とは大きく異なる。二成分制御系はこれまで原核生物に特有のもと考えられてきたが、最近、シロイヌナズナのエチレン応答やサイトカニン応答に関する遺伝子がこの系のセンサー蛋白質をコードしていることが明らかとなった。我々は二成分制御系による蛋白質フォスフォリレーが植物細胞においてどのようなシグナル伝達経路へとつながるのかを解明するため、シロイヌナズナからレスポンスレギュレーター遺伝子の単離を行った。まず、ESTライブラリーの検索により、レスポンスレギュレーターのリシーバドメインをコードすると考えられるcDNA断片を同定し、これをプローブとして用いシロイヌナズナのゲノムライブラリーから相同配列をもつ2つのDNA断片を得た。これらのゲノムおよび対応するcDNAの塩基配列を解析した結果、N末付近に高度に保存されたリシーバドメインをもつ蛋白質をコードする遺伝子 (*ARR1* および *ARR2*) が同定された。現在、これら遺伝子産物が関与するシグナル伝達経路についての知見を得るため、形質転換植物を用いた解析を行っている。

2aD08

トウモロコシにおけるサイトカニン誘導性遺伝子の単離と発現様式の解析

鈴木めぐみ、伊藤置夏、榊原均、杉山達夫 (名古屋大・農・応用生物科学)

我々は窒素回復過程に起こる C_4 光合成遺伝子の転写の活性化は、サイトカニンを介した情報伝達系により制御されていることを示唆してきた。この活性化には新規の蛋白質合成が必要であったことから、この情報伝達系の因子にサイトカニン誘導性のものがあると考え、Differential display法によりこの遺伝子の単離を試みた。窒素欠乏状態の切り取り葉へのサイトカニン処理により誘導される遺伝子 (Cytokinin inducible protein, Cip) を探索したところ複数のクローンを得た。そのうちの1つ、Cip1のmRNAは切り取り葉ではゼアチン処理で誘導され、さらに植物体では窒素回復過程の葉で誘導が確認された。cDNAライブラリーから完全長のCip1 cDNAを単離し、その構造を決定したところ、Cip1はバクテリアの二成分情報伝達系におけるリシーバドメインと高い相同性を示した。これらの結果はCip1が窒素栄養とサイトカニンによる遺伝子発現調節に関与することを示唆している。

2aD09

トウモロコシのサイトカニン誘導性二成分系情報伝達因子Cip1遺伝子の構造と機能解析

榊原均、伊藤置夏、鈴木めぐみ、杉山達夫
名古屋大・農・応用生物学

植物の窒素源に対する応答は、硝酸同化系遺伝子等の硝酸イオン特異的な応答機構の他に、 C_4 光合成系遺伝子等の窒素充足状態に制御される発現応答機構がある。我々は、後者の発現調節にサイトカニンを介したシグナル伝達系の関与を見出した。本研究ではその情報伝達にかかわる因子の一つの候補である、二成分情報伝達系のレシーバー領域と高い相同性をもつCip1について、遺伝子の構造と機能について解析を行なった。Cip1の推定アミノ酸配列は、大腸菌CheYと相同性を持ち、リン酸化による機能発現に必須であるAsp, Lys残基などが保存されていた。蛋白質レベルでの解析を可能にするべく、Cip1 cDNAを発現ベクターに組み込み、大腸菌での大量発現系を構築し、Cip1蛋白質を精製した。現在抗Cip1抗体を作製中であり、結果も報告する予定である。さらにゲノムライブラリーよりCip1遺伝子領域を含む断片をクローニングし、現在5'上流領域の塩基配列を解析中である。

2aD10

シロイヌナズナにおける二成分制御系シグナル伝達因子の検索
上口智治、鈴木友美、梅田裕之、花木直人、水野猛 (名大・農)

センサーキナーゼとレスポンスレギュレーターから構成される二成分制御系 (Two-component system) は、バクテリアにおける普遍的なシグナル伝達系である。この系における情報の伝達は、センサー内のトランスミッタードメインとレギュレーター内のレシーバードメイン間での、HisからAspへのリン酸基の転移に基づいている。最近になって出芽酵母に引き続き、シロイヌナズナにおいてもセンサーキナーゼが発見された。高等植物のセンサーキナーゼ (ETR1, CKI1) はいずれも植物ホルモンの応答に関与することが明らかであり、高等植物のシグナル伝達機構における二成分制御系の機能的重要性が強く示唆される。今回我々は、その存在すら明らかとなっていない高等植物のレスポンスレギュレーターに注目し、その遺伝子をシロイヌナズナより取得することを試みた。ESTバンクを検索することで、現在少なくとも5種類のレギュレーター遺伝子の候補を得ている。また最近二成分制御系を構成する新たなシグナル伝達因子として同定されたAlternative Transmitter分子についても同様の検索を行っている。二成分制御系のこれまでの知見に基づき、これら遺伝子の一次構造上の特徴について考察する。

2aD11

シロイヌナズナのハイブリッド型ヒスチジンキナーゼATHK1のクローニング

浦尾剛、篠崎和子、平山隆志¹、篠崎一雄¹
(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

ヒスチジンキナーゼは、外部からのシグナルをレスポンスレギュレーターのリン酸化を介して細胞内に伝達するセンサータンパク質として機能している。この系は「Two-Component」制御系と呼ばれ、原核生物の主な情報伝達系として知られていたが、最近、酵母の浸透圧応答や植物ホルモンの応答にも「Two-Component」制御による情報伝達系が働いていることが明らかになった。そこで、植物の新たな「Two-Component」制御系を探索する目的で、既知のヒスチジンキナーゼ間の相同性を基に、シロイヌナズナのcDNAライブラリーから新規のヒスチジンキナーゼをコードするcDNA (ATHK1) をクローニングした。アミノ酸配列の解析の結果、ATHK1はキナーゼドメインとレシーバードメインの両方を持つハイブリッド型ヒスチジンキナーゼで、N末側には2箇所の膜貫通ドメインと推定される疎水性領域が存在し、酵母の浸透圧センサーSLN1と構造的類似性が認められた。そこで、ATHK1を酵母の浸透圧応答のsln1温度感受性変異株で発現させたところ、sln1-tsの致死変異を相補することが確認できた。さらに、ATHK1の保存されたHisやAsp残基を他のアミノ酸に置換することによって、その相補性が失われたことから、ATHK1はヒスチジンキナーゼとしての活性を持つものと考えられる。

3aD01

ヒヤクニチソウ培養細胞の管状要素分化過程でスーパーオキシドはリグニン合成時期に生成する
小川健一^{1,3}、中島仁²、高部圭司²、岡田清孝¹、浅田浩二³
(¹京都大・理・植物、²京都大・農、³京都大・食研)

我々はこれまでにハウレンソウ胚軸の木化途上の組織において O_2^- がNADPHオキシダーゼにより生成し、CuZn-SODにより不均化されてリグニン合成に必要な H_2O_2 を供給していることを示してきた(PCP 37: 790-799, 1996)。管状要素分化過程における O_2^- 生成とリグニン形成の時間的経過を解析するためヒヤクニチソウ培養細胞を用い O_2^- 生成の経時的変化を調べた。NBTからのFormazane形成で検出される O_2^- は培養開始後約143時間目から約5時間生じ、その生成時期はリグニンの蓄積時期と一致した。1個の細胞についての O_2^- の生成時間は3分と推算された。CuZn-SOD阻害剤によりリグニン合成が阻害され、リグニン合成のための H_2O_2 供給にCuZn-SODが必要であることが証明された。NADPHオキシダーゼ阻害剤の存在下では添加時期によっては管状要素への分化そのものが阻害された。また、キサントキシダーゼ系により生成させた O_2^- はリグニンの蓄積を促したが、グルコースオキシダーゼ系により生成させた H_2O_2 はそのような効果を示さなかった。これらのことから、 O_2^- は管状要素分化およびリグニン合成開始のシグナルとしても機能することが示唆される。

3aD02

ヒヤクニチソウ細胞の管状要素分化過程におけるアミノペプチダーゼおよびエンドペプチダーゼ活性の変動
南淳、平吹充¹、福田裕穂² (鶴岡工業高専・物質工学、¹ 鶴岡工業高専・工業化学、² 東京大・理・植物園)

管状要素分化は二次細胞壁の形成と原形質の自己分解という二つの過程からなる。私達は以前に、ヒヤクニチソウ細胞の管状要素分化でZ-Phe-Arg-MCAを分解するエンドペプチダーゼ活性が特異的かつ一過的に発現することを報告したが¹、この酵素は自己分解過程に関与していると考えられる。今回は、この他のプロテアーゼが管状要素分化に関与する可能性を探るため、分化過程でのアミノペプチダーゼ活性、エンドペプチダーゼ活性の変動を調べた。

その結果、フェニルアラニンアミノペプチダーゼ活性が分化誘導培地で培養した細胞に誘導されること、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA やBoc-Gln-Arg-Arg-MCAを分解するエンドペプチダーゼ活性が自己分解が進行中の培養72時間目の細胞に多く含まれることが明らかになった。これらプロテアーゼの分化における役割を議論したい。

3aD03

光合成核遺伝子*RBCS* がカルスにおいて発現するシロイヌナズナ突然変異体の選抜と解析
鈴木朗範、富田英敬、丹羽康夫、小林裕和 (静岡県立大・生活健康科学)

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、非光合成組織であるカルスにおいて光合成酵素リブローズ1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼのSサブユニットの遺伝子(*RBCS-3B*)が発現する変異体の選抜を試みた。選抜を効率化するために、*RBCS-3B*のプロモーターの制御下に *hygromycin B phosphotransferase* 遺伝子および β -glucuronidase (*GUS*) 遺伝子を導入した形質転換体(*Columbia*)を作製した。

現在までに、20,000系統以上(個体としてはその約8倍)のethylmethane sulfonate (*EMS*) 変異原処理形質転換体をスクリーニングした。その結果、複数の変異体候補が得られ、それらを *ces* (*callus expression of RBCS*) 変異体と命名した。それらの変異体の中に、X-glucによりカルス組織全体が染色されるもの、およびカルス組織における*GUS*活性が*EMS*未処理形質転換体より約16倍高いものがあった。また、カルスが緑化するものがあり、この変異体においてはサイトカイニンシグナル伝達系が異常になっているのではないかと考える。これら変異体候補の光照射生育個体の形態には、野生株と比べて大きな差は認められなかった。

3aD04

トウモロコシ*cab-m1*遺伝子の葉肉細胞特異的発現制御に関わるトランス因子の解析
椎名隆、法忍考子、豊島喜則 (京大・人間・環境学研究所)

トウモロコシの*cab-m1*遺伝子は、葉肉細胞で維管束鞘細胞の約10倍発現しており、その活性は、転写レベルで制御されている。この葉肉細胞に特異的な転写は、翻訳開始点の1026~850bp上流に存在するMSR領域によって制御されていることが¹、*in situ*トランジェントアッセイによって明らかにされている。本研究では、MSR領域に結合するトランス因子の解析を行った。

MSR領域をプローブに用いたゲルシフト実験から、この領域にシーケンス特異的に結合する蛋白質が存在することがわかった。MSRは、3つの領域からなり(A領域:-1026~-956、B領域:-953~-899、C領域:-897~-850)、A、B領域が共同して*cab-m1*遺伝子の葉肉細胞での転写促進、維管束鞘細胞での抑制に関わり、C領域が転写の細胞特異性をさらに強めていることが知られている。同様に、MSR結合蛋白質は、A領域、B領域に単独では結合できず、その結合にはAB領域が必要であり、C領域が結合をさらに促進していることが明らかになった。この結果は、MSR結合蛋白質が*cab-m1*遺伝子の葉肉細胞特異的な転写制御に深く関わる蛋白質であることを示唆しており、現在、結合配列の詳細な検討を行っている。

3aD05

ニンジンの不定胚の形態形成に影響を与えるタンパク質について
保田浩、増田宏志 (帯広畜大・生物資源化学)

私達はニンジンの再生した植物体からの不定胚形成に関して研究を行っている。現在、不定胚の最も初期の段階の形態形成がどのような機構で行われているかに興味をもっている。この形態形成に影響を与えるものとして不定胚の表層のタンパク質が関与していると推定して実験を進めた。培養8~9日目の前球状胚を調整し、0.5M NaClで3~4分間処理し、その抽出液を透析するとほとんどのタンパク質が沈殿した。この沈殿物は塩で処理しても溶解しなかったが、SDS-PAGE用のサンプル溶液で熱すると溶解した。これをSDS-PAGEで分析すると数種の主要なタンパク質が検出され、それらに対する抗血清を得た。このうちの一種の抗血清を添加した培地で不定胚形成能をもつ細胞塊を培養すると球状胚を形成したが、免疫前の抗血清を添加した場合は、細胞塊からの球状胚形成は阻害される事が分かった。また、市販のbovine γ -globulinを添加した培地でも阻害されることが分かった。免疫前の抗血清を添加した場合の球状胚を形成しなかった細胞塊は、細胞の接着がルーズになっており、これらの細胞塊をさらにSEMで観察した。

3aD06

Ri-プラスミド由来アグロピン合成酵素遺伝子プロモーターの傷害誘導性:情報伝達経路, I
征矢野敬、猪口雅彦、近藤弘清 (岡山理科大・理・生物化学)

アグロピン合成酵素遺伝子(Ri-ags)は、アグロピン型Ri-プラスミドのT-DNA上にコードされるオパイン合成系の遺伝子である。我々は、GUS発現システムを用いて、タバコにおけるRi-agsプロモーターの発現特性の解析を行っている。前大会において、Ri-agsプロモーターは傷害部位に局部的に誘導されるが、既知の傷害シグナル伝達物質であるアブジジン酸、ジャスモン酸及びエチレンによっては誘導されないことを報告した。

今回我々は、傷害誘導の経時変化をmRNAレベルで解析したところ、リーフディスクの切り出し後、1時間以内にGUS遺伝子の誘導が観察された。更に、このmRNAの誘導はタンパク質合成阻害剤、シクロヘキシミドの影響を受けなかった。これらの結果より、Ri-agsプロモーターの傷害誘導は、細胞内に構成的に存在する情報伝達系を介していると考えられた。

次に、この情報伝達過程におけるCa²⁺の関与について調査した。Ca²⁺のキレーター、EGTAで葉片を前処理した後にリーフディスクを切り出したところ、傷害誘導は観察されなかった。この抑制効果は、CaCl₂の添加により回復された。また、傷害誘導はLaCl₃によっても抑制された。これらの結果から、Ri-agsプロモーターの傷害誘導は細胞外からのCa²⁺ influxが関与すると示唆された。

現在更に、この傷害誘導過程におけるタンパク質リン酸化の関与についても検討中である。

3aD07

Synechocystis PCC6803に存在する新規フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの分子特性
村上 晃子, 田茂井 政宏, 武田 徹, 重岡 成 (近畿大・農・食栄)

緑藻およびラン藻はCO₂固定能は高等植物葉緑体の場合と異なり1 mM H₂O₂存在下でも十分に機能しうる。この耐性は、光合成炭素還元系を構成するチオール酵素の非感受性に起因していたり、さらに、ラン藻*Synechococcus* PCC 7942のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase)アイソザイム(F-I, F-II)の分子特性を検討し、F-Iは典型的なFBPase(F-II)と一次構造的に全く異なる新規の酵素であることを明らかにした²⁾。今回、*Synechocystis* PCC6803のFBPaseの分子特性を検討した。

F-I, F-II遺伝子をプローブとしたゲノミックサザン解析より、S.6803ではF-IおよびF-IIに相当するFBPase遺伝子が検出された。しかし、独立栄養条件下で培養したS.6803より調製した粗酵素の陰イオンカラムクロマトを行うと、FBPase活性は1つのピークのみ検出された。抗F-I, F-II抗体によるウエスタンブロッティングでは、F-I抗体のみが交差反応を示した。このことより、独立栄養条件下ではF-I類似のFBPaseのみが機能していることが示唆された。精製酵素は分子量42kDaのサブユニットからなり、細胞質型FBPaseの特異的阻害剤であるAMPによって阻害(K_i=0.57 mM)されたが、Fru 2,6-P₂によっては影響を受けなかった。本酵素はフルクトース 1,6-ビスホスフェートだけでなくセドヘプツロース 1,7-ビスホスフェートも加水分解し、1 mM H₂O₂処理でも活性を保持していた。本酵素遺伝子は388アミノ酸(41474 Da)をコードする1164 bpのORFからなり、推定N末端アミノ酸配列は精製タンパク質の配列と一致した。また、推定アミノ酸配列はS.7942 F-Iと79.6%の相同性を示したが、典型的なFBPaseとは全く相同性を示さなかった。なお、シークエンスの一部はかすきDNA研究所からの情報に基づいた。1) *Plant Cell Physiol.* 36, 1089-1095, 1995, 2) *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 27-36, 1996

3aD08

シロイヌナズナにおける2つのNADPH-P450還元酵素の発現制御と遺伝子構造の解析
水谷正治、太田大策 (日本チバガイギー国際科学研究所)

植物組織中には多数のP450が存在し様々な二次代謝産物の生合成に関与しており、NADPH-P450還元酵素はP450の活性に必須である。我々はシロイヌナズナから2つのP450還元酵素(AR1, AR2)遺伝子を単離し、その発現様式と遺伝子構造を解析した。バキュロウイルス発現系を用いて発現させたAR1およびAR2組みかえ酵素では、cytochrome cおよびNADPHに対するK_m値に差がなく、再構成系において桂皮酸4水酸化酵素(C4H)活性を与えた。AR2遺伝子の発現は傷害および光により1時間以内に3、4倍に増加し、またC4H遺伝子も2時間以内に10倍に増加した。一方AR1遺伝子の発現は処理期間中変化しなかった。両遺伝子構造解析の結果、エクソンの長さおよびイントロンの位置は両遺伝子で良く一致していたのに対し、プロモーター領域に顕著な構造の類似性はみられなかった。特にAR2プロモーターには、PAL、C4H、4CLプロモーターにみられた3つのモチーフ配列(box P, A, L)が存在した。

3aD09

プラスチド ω -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(FAD7)における傷害誘導機構の解析
西内巧、児玉浩明、射場厚 (九州大・理・生物)

シロイヌナズナのFAD7遺伝子は通常、葉緑組織でのみ発現しているが、局所的な傷害を与えると葉緑組織のみならず、茎や根の非緑色組織においても強い発現が見られるようになる。これらの発現は、そのプロモーター領域によって制御されている。各器官でのFAD7遺伝子発現の傷害誘導機構におけるジャスモン酸(JA)の関与について解析を行った結果、葉での傷害誘導はJAに依存せず、反対に根での傷害誘導はJAに依存していることがわかった。FAD7プロモーター領域を5'上流から段階的に欠失させたものを導入したタバコを解析した結果、傷害応答性エレメントは、葉及び茎では-362/-167領域に、根では-520/-363領域に存在することが示唆された。-520/-363領域にはジャスモン酸応答性エレメントと考えられているG-boxに類似した配列が含まれている。この結果はFAD7遺伝子の傷害による発現誘導が、葉と根では異なる傷害応答性エレメントによって制御されていることを示している。

3aD10

イネペルオキシダーゼ遺伝子5'上流領域の傷害
応答性の解析

平賀勲、藤岡唯志¹、伊藤浩之、後藤洋子²、
村上高²、松井博和、本間守、大橋祐子²

(北大・農・生機化、¹和歌山県暖園セ、²農水省・
生物研)

イネペルオキシダーゼ遺伝子(*poxA*)の転写は、傷
害、UV-Cおよび、エテフォンにより誘導される。
本遺伝子のプロモーター領域を段階的に欠失させ
GUS融合遺伝子としてタバコに導入して解析した結
果、転写開始点の111 bp上流までの領域(Af)に
UV-Cに反応するシス配列、その上流にサイレンサ
ー領域が存在することが示唆された。しかし、Af-
GUS遺伝子を導入した組換えタバコ中では、傷害お
よびエテフォンによる応答は見いだせなかった。こ
れは、イネの遺伝子のプロモーター領域である
Afは、タバコにおいては転写促進活性が低いため
であると考えた。

そこで、微小な誘導でも検出可能にするために、
Af領域の上流にカリフラワーモザイクウイルス35
Sプロモーター由来のエンハンサーを連結した遺伝
子が導入された組換えタバコを作成した。このタバ
コ葉では、傷害によりGUS活性の上昇が認められ、
しかもその活性増は木部特異的に認められた。この
結果は、イネ *poxA* 遺伝子のAf領域には、タバコに
おける傷害応答にかかわる塩基配列が存在するこ
を示唆する。

3aD11

GFP 遺伝子をレポーターとしたイネキチナーゼ遺伝子
発現の解析

斎藤美佳子・大井晶夫・松岡英明・渋谷直人¹・西沢洋
子¹(東京農工大・工・生命工学、¹農水省・生物資源
研究所)

植物が受けたストレスシグナルは、細胞間を伝達する
と考えられている。

演者らはこれまで、植物細胞間でどのような情報伝達
が行われているかを *in vivo* かつリアルタイムで解析す
ることができる多機能型微小電極を開発してきた。本
研究では、その応用の一つとしてイネ培養細胞のエリ
シターに対する応答を測定するために、キチナーゼ遺
伝子のプロモーターにレポーター遺伝子としてグリー
ン蛍光タンパク質(GFP)を組み込んだプラスミド
(pCHI-GFP)を微小電極を用いて定量的に導入し、そ
の発現を *in vivo* で測定する方法について検討した。そ
の結果、pCHI-GFP 導入してから、100nMのエリシタ
ー(*N*-アセチルキトオリゴ糖:7 量体)を添加したと
ころ、12時間後に、GFPの蛍光が認められた。以上の
ことから、この方法により、キチナーゼ遺伝子の発現を
in vivo で観察することが可能であると考えられた。

3aD12

傷害応答の初期段階に関する遺伝子

原光二郎、小泉望、佐野浩(奈良先端科学技術大学
院大学・遺伝子教育研究センター・植物細胞工学)

傷害に対する植物の応答は、植物ホルモン、病害
抵抗などのシグナル伝達系とネットワークを組み、
複雑な系を形成していることが分かってきた。

傷害のシグナル伝達の実態を遺伝子レベルで調
べるため、私たちはタバコの野生体と内在性のサイ
トカイニン量が高い組み換え体とに傷害を与え、遺
伝子の発現量の経時変化を蛍光ディファレンシ
ャルディスプレイ法(FDD)により検出した。ついで、
傷害応答の初期に発現量が変化する遺伝子をクロ
ーニングした。いくつかの遺伝子は一過的に発現が
誘導された。

傷害シグナルは、このような一過的に発現する遺
伝子群の相互作用によって次々と伝えられること
が示唆された。

3aD13

大腸菌カタラーゼ遺伝子を導入した形質転換タバコの環境ス
トレス耐性

武田 徹、義村由紀子、田茂井政宏、鹿内利治¹、三宅親弘²、
佐野 智²、富澤健一²、横田明穂¹、重岡 成(近畿大・農・
食栄、¹奈良先端大・バイオサイエンス、²RITE・植物分子生理)

環境ストレス耐性植物の分子育種の一つとして、活性酸素
消去酵素の強化が注目されている。葉緑体内では低濃度の
H₂O₂は光合成活性を50%阻害するため、アスコルビン酸ペル
オキシダーゼを中心とするH₂O₂消去系を発達させている。し
かし、この系はアスコルビン酸を還元するための還元力を
必要とする。そこで今回、H₂O₂消去にエネルギーおよび電子
供与体を要求せず、H₂O₂に対するKm値の低い大腸菌のカタ
ラーゼ(CAT)遺伝子(*Kat E*)を葉緑体に導入した形質転換タバ
コを作成し、強光および乾燥ストレスによる酸素傷害に対す
る耐性について検討した。

形質転換タバコ(T₁世代)においてサザンハイブリダイゼー
ションおよびPCR法により8検体に *Kat E* が導入されていた。
これらの中でCAT活性が最も高く、かつパラコート耐性を示
した株(T43-1)のT₂世代を作製した。得られた形質転換タバ
コ(T43-1-2)のCAT活性は野生株の3.2±0.4倍であった。ショ
糖密度勾配遠心法およびイムノプロット法より *Kat E* の
葉緑体内での発現を確認した。強光(1600 μmol m⁻² s⁻¹)と乾
燥(灌水なし)条件下で、野生株は12時間後から光傷害による
葉のクロロフィルの分解が顕著に認められたのに対して、
T43-1-2は72時間後まで殆ど影響が認められなかった。この
とき、T43-1-2におけるH₂O₂の標的酵素であるPCRサイク
ルのチオール酵素は野生株のそれらに比べて高い活性を保持
していた。ガス交換およびクロロフィル蛍光の測定からも、
T43-1-2が強光と乾燥ストレスに対して耐性を獲得している
ことが示された。本研究の一部は、PEC/MITIの援助による。

3aD14

ラン藻でのグルタチオン過剰蓄積と酸化ストレス耐性の増強

杉中克昭、高本明子¹、澤 嘉弘¹、柴田 均¹

(鳥取連大・農、¹島根大・生物資源・生命工学)

ラン藻は本来独立栄養生物であるが、培地中のアミノ酸を利用することが出来る。Cysの利用に関する報告はまだないが、Cysを培地に添加することで、グルタチオン(GSH)含量が上昇し、GSH構成アミノ酸、GluとGlyを共存させると、GSH含量はさらに上昇した。GSHは、Cysの貯蔵体、GSH抱合体合成、抗酸化機能の他に、細胞内酸化還元状態変化に基づいたレドックスシグナルとしての機能にも関与しているため、GSHの過剰蓄積は細胞内に多大の影響をもたらすことが予想される。

まずGSH含量と抗酸化能力の発現とに着目し、近紫外線照射や殺菌剤、次亜塩素酸暴露による色素の退色や光合成能力の低下を検証した。細胞内GSH含量が多いほど退色や光合成能力の低下が抑制された。近紫外線で発生する酸素ラジカルや次亜塩素酸を細胞内GSHが直接捕捉できることと、ラン藻においても、GSHが広義の酸化ストレス防御に極めて重要であることを示している。

1aE01

シロイヌナズナ気孔形成変異株の単離と解析
武内洋志, 中川 強 (島根大・遺伝子)

気孔は植物の表面に位置する孔辺細胞により構築され、ガス交換の機能を果たしている。孔辺細胞は代謝および形態が高度に分化した細胞であり、その発達プログラムに大いに興味を持たれる。我々は気孔形成、特に孔辺細胞の発達の分子機構を明らかにすることを目的とし、シロイヌナズナの気孔形成変異株の単離を試みた。

EMS処理したシロイヌナズナM2幼植物体より顕微鏡観察により孔辺細胞の形態に異常が見られる変異株を単離した。一对の孔辺細胞は孔辺母細胞の分裂により生じるが、単離した変異株では一個のC字形の孔辺細胞が気孔を形成していた。またDAPI染色の結果この異常孔辺細胞が2核であることが示され、孔辺母細胞の細胞質分裂が不完全な変異体であることが示唆された。これまでに上述の異常を示す変異株を3株取得したが、それぞれ異常孔辺細胞の出現割合は異なっていた。現在これら3株について解析を進めている。

1aE02

花茎の伸長抑制を示すシロイヌナズナの突然変異株 *fiw* (fireworks)の解析
中村正展, 望月伸悦, 長谷あきら (東大・遺伝子)

植物の形態形成を理解する上で変異体を用いた研究は有効なアプローチである。当研究室では独自にシロイヌナズナのT-DNAタギングラインを作出し、可視的な形態変異に注目して約1000ラインの中から選別を行った。その結果1ラインの花茎の伸長抑制を示す突然変異体を同定し、*fiw* (fireworks) と名付けた。交雑の結果、変異は一遺伝子座に由来する劣性形質の分離を示した。

*fiw*変異体は栄養成長の段階では何ら野生型植物との差異が認められないが、抽だいを始めると花茎、特に三型メタマーと呼ばれる部分の節間の伸長が著しく阻害される。また花茎の伸長は野生型で播種後約43日まで続き莖高約30cmに達するのにに対し、*fiw*では播種後27日で伸長が停止し、莖高は約6cmである。そのため*fiw*変異体では花が莖頂部付近に集合し、鞘が成熟した段階での外観は花火 (fireworks) を連想させる。

1aE03

ねじれ変異遺伝子 *SPR1* のクローニング
立元秀樹 古谷育代 鹿内利治 山田康之 橋本隆
(奈良先端大・バイオ)

我々は今回、ねじれの分子機構を解明することを目的に *SPR1* 遺伝子をクローニングしたので報告する。我々が単離したシロイヌナズナのねじれ変異株 (*sprial1*) は、明所下で生育させた場合、根の表皮細胞層が時計回りにねじれる以外野生株と表現型に違いは認められない。一方、暗所下では根同様のねじれがはい軸や花茎にも生じる。また、ショ糖存在下ではねじれが促進される。ねじれの原因として *sprial1* では恒常的に中心軸の表皮細胞の伸長が促進されるため、内部細胞層との伸長の差を補正しようと表皮細胞層全体が一方方向に傾きねじれが生じることが考えられる。

sprial1 は高速中性子照射によって得られた劣性の変異株である。*SPR1* 遺伝子は2番染色体の北側に位置するマーカーm246に強く連鎖していた (<0.24cM)。m246を含む3つのP1クローンの末端にてRFLPマーカーを作製し、テストしたところ *SPR1* 遺伝子はP1クローンがオーバーラップする内側(約60kbp)に挟まれた。さらにその領域を植物形質転換用コスミドベクターpOCA28でコンティグを作製し、コンティグ上にてRFLPマーカーを作製、テストしたところ *SPR1* 遺伝子は約35kbp内に挟まれた。PCRを用いてその領域をスクリーンしたところ、唯一約0.7kbのDNA欠失が存在しており、この欠失領域を含む野生株由来のコスミドクローンが *sprial1* 変異株を相補することができた。欠失した領域に対応するcDNAを単離したところ *SPR1* 遺伝子は、119個のアミノ酸からなる新規の低分子量タンパクをコードしていた。また、ゲノミックサザン及びESTの解析により *SPR1* 類似遺伝子はタバコ、トウモロコシ、イネなど高等植物に普遍的に存在することが示唆された。

1aE04

シロイヌナズナの花茎・胚軸の重力屈性反応に内皮細胞層は必須である
深城英弘, Joanna Wysocka-Diller¹, Philip N. Benfey¹, 劉耀光², 柴田大輔², 藤澤久雄, 田坂昌生 (京大大学院・理・生物・植物, ¹ニューヨーク大・生物, ²三井物産植物バイオ研)

高等植物のシュートは負の重力屈性反応を示す。我々はこの反応の分子機構を解明するため、シロイヌナズナからシュートの重力屈性反応が異常となった *shoot gravitropism* (*sgr*) 変異体を多数単離し解析を行なっている (Fukaki et al. 1996, *Plant Physiol.*; 1996, *J. Plant Res.*)。このうち花茎と胚軸の重力屈性が消失する *sgr1* 変異体について、花茎・胚軸の切片を観察したところ、デンブ鞘 (重力方向に応じて沈降するアミロプラストを含む内皮細胞層) が欠失または乱れており、野生株のデンブ鞘に存在するような大きなアミロプラストが観察されなかった。そこで、胚軸と根の内皮細胞層が欠失している *scarecrow* (*scr*) 変異体と *short root* (*shr*) 変異体の重力屈性反応を調べたところ、*sgr1* と同様に、根の重力屈性は正常であったが胚軸と花茎の重力屈性が消失していた。*SGR1* 遺伝子と *SCR* 遺伝子がともに第3染色体下部の *CDC2B* 遺伝子近傍にマップされたことから、両者が同一遺伝子である可能性が強く示唆された。そこで *sgr1* と *scr* の相補性検定を行なったところ、両者が同一遺伝子座のアレル変異体であることが判明した。

これまでシュートでは、デンブ鞘細胞が重力感受細胞として働く可能性が考えられてきたが、重力屈性に必要かどうか直接的証拠はなかった。今回の *sgr1/scr* 変異体と *shr* 変異体の解析から、シュートの内皮細胞層からなるデンブ鞘が、花茎と胚軸の重力屈性反応に必須な組織であることが明らかとなり、しかもこれらの細胞層が重力感受細胞として働くことがより強く示唆された。また逆に根の重力屈性反応は内皮細胞層を必要としないことも明らかとなった。*SGR1/SCR* 遺伝子のコードするタンパク質はこれまで知られていない転写因子である可能性が示唆された。そして、少なくとも *SGR1/SCR* と *SHR* の2つ遺伝子が、胚発生過程およびシュート頂端分裂組織や根端分裂組織における内皮の形成にとって重要な働きを担うことが明らかとなった。

1aE05

シロイヌナズナの NADPH オキシダーゼ系 gp91-phox 相同遺伝子欠損変異株の解析

尾之内均、町田千代子¹、町田泰則 (名大院・理・生命理学、¹キリンビール基盤研)

我々は、シロイヌナズナに *Ac/Ds* 転移系を導入して作製したトランスポゾンタギングラインから、成長が遅くなる変異株を分離し、*slow growth (slw)* 変異株と名付けた。*slw* 変異株では胚発生および発芽後の成長ともに遅く、根の成長速度は野生型の約 2分の1である。根の細胞の大きさは野生型と差がみられなかったため、*slw* 変異株では細胞分裂の速度が遅くなっていると考えられる。*slw* 変異は転移した *Ds* 因子と連鎖していることが遺伝学的解析によって示されたので、IPCR法によって *Ds* 挿入部位に隣接する植物ゲノム DNA を単離し、その配列をもとに cDNA を単離し、その塩基配列を決定した。その結果、その cDNA の推定されるアミノ酸配列は哺乳類の食細胞 NADPH オキシダーゼの構成タンパク質である gp91-phox のアミノ酸配列と高い相同性を示した。哺乳類では NADPH オキシダーゼは好中球に存在し、病原微生物を殺菌するための O_2^- を生成する酵素として知られている。現在、*slw* 変異株において O_2^- 生成に異常がみられるかどうか調べている。また、gp91-phox 相同遺伝子の欠損によってなぜ成長が遅くなるのか、 O_2^- 生成の異常が細胞分裂の速度が遅くなることの原因かどうかを明らかにしていきたいと考えている。

1aE06

NgORF13 遺伝子の不定根誘導および葉形態形成への影響

青木誠志郎、庄野邦彦 (東京大学・総合文化・生命)

Nicotiana 属植物の進化の初期、Ngrol 遺伝子群は *Agrobacterium rhizogenes* の感染により植物ゲノムに挿入され、現在に至るまで保存されていると考えられている。これら遺伝子群は *N. glauca* ゲノムから、1986年 Furner らによりクローニングされ1994年我々により NgORF13, 14 領域がシーケンズされた。我々は NgrolB, C, NgORF13, 14 すべてが *N. glauca* において転写されていることを確認している。本発表ではこのうち NgORF13 が機能を保持している事を報告する。(不定根誘導) NgrolB, C, NgORF13, 14 に相同性を持つ Ri plasmid の遺伝子群の導入は多くの植物で毛状根病をひき起こすことが知られている。我々は *N. tabacum* の leaf disk への遺伝子導入により NgrolC, 13, 14 領域が *RirolB* の不定根誘導能を促進することをすでに発表している。本報告ではこの促進は NgORF13 一遺伝子のみで十分であること、および NgORF13 の促進の強さは Ri plasmid の ORF13 のそれと同等であることを発表する。(葉形態形成) カリフラワーモザイクウイルス 35S promoter を利用し *N. tabacum* で NgORF13 の過剰発現を行った。control の P35s-GUS 導入植物に比べ P35s-NgORF13 導入植物では葉の縦方向の伸長が抑制された。葉の変形した器官である花弁、萼、雄蕊、雌蕊にも同様な変化が見られた。開花時期や節間伸長には違いはみられなかった。現在接ぎ木実験によりこの現象の原因をさらに詳しく調べている。

1aE07

ネナシカズラの寄生根形成過程における低分子量ヒートショックタンパク質遺伝子の発現制御
多田欣史、若杉達也¹、古橋勝久、山田恭司¹ (新潟大・理・生物、¹富山大・理・生物)

ネナシカズラは正常な根や葉がないという特異な形態で知られる顕花性の完全寄生植物であり、寄生根を形成し他の植物に寄生する。これまでに我々は、ネナシカズラの寄生根形成には宿主植物は本質的に必要なく、接触と近赤外光の2つの物理的な刺激のみで誘導できること、その光受容体はフィトクロームであることを明らかにしている。

今回我々は、Differential display法により寄生根形成時に特徴的な発現挙動を示す遺伝子の検索を行った。その結果、寄生根組織と非寄生根組織とで顕著に発現レベルが変化するものの一つとして、18kDの低分子量ヒートショックタンパク質遺伝子を見いだした。ネナシカズラでは、通常の生育条件においても、この遺伝子は比較的強い発現を示していた。ところが、寄生根誘導後24時間で、この遺伝子の mRNA 蓄積量は1/10程度に減少し、48時間後にはその発現レベルが回復するといった、寄生根の形成過程と関連した発現挙動を示すことが明らかになった。

1aE08

γ線照射により誘導されるシロイヌナズナの形態変化 I

—アントシアニンの蓄積と毛の新規突出分化—

菊池尚志、¹永田俊文、小松節子、²中嶋信美、³等々力節子、¹林徹、森 昌樹、鎌ヶ江 (規矢) 弘美 (農水省・生物研、¹科学技術振興事業団、²国立環境研、³農水省食総研)

我々はシロイヌナズナを用いて植物の環境ストレスに対する自己防衛反応の解析を行っている。昨年度は大線量(1-3kGy)のγ線照射により、4日以内に植物体にアントシアニンの蓄積がおこり、成葉の表面に新たな毛(trichome)の突出分化が誘導されることを報告した。今年度は以下の結果を報告する。数種の *glabra* 突然変異株 (*gl1, gl2, gl3, ttg*) 及び根毛の形態形成変異株 (*rhd1, rhd2, rhd3, rhd4*) を用いた解析を行った結果、*glabra* 変異株にγ線を照射したところ、*gl3-1* において毛の本数増加が見られた以外は全く毛の増加は観察されなかった。このことはγ線照射による毛の新規形態形成も発生における経路と同様の経路を経ていることを示している。更に根毛の突然変異体である *rhd2* を用いてγ線照射実験を行った場合、*rhd2* は成葉の表面に毛を持たない表現型を示すが(恐らく突出分化型遺伝子の変異の効果と考えられる)γ線照射に伴って毛が新規に誘導された。このことはγ線照射が遺伝子変異の表現型を相補したことを示す。次に毛の存在とγ線照射によるアントシアニンの蓄積量との関係について調べた。その結果、*gl* 突然変異により毛の形成が抑制されている場合の方がアントシアニンの蓄積量が大いことが明らかとなった。このことはアントシアニンの誘導と毛の形態形成がTTG遺伝子の関与以外にも何らかの関係を持っていることを示唆するものと考えられる。

1aE09

γ線照射によって誘導されるシロイヌナズナの形態変化 11

— 根、葉組織の異常形態形成 —

水田俊文¹、等々力節子¹、林豊¹、小松節子²、中嶋信典³、森島樹²、鎌ヶ江(楓矢)弘美²、清池尚志² (JST、長崎、1農水省、食糧研、流通保全、2農水省、生質研、分子、3国立環境研究所)

シロイヌナズナに1-3 K Gyの60 Coのγ線を照射すると、アントシアニン色素の合成誘導やトライコームの形成誘導と同時に、根及び葉組織においても異常な形態形成が誘導される。側根において通常では根毛が誘導されない根冠付近の細胞が膨潤すると共に、根毛組織が大量に形成される。また、葉組織も葉及び葉柄が通常の数倍に肥大する現象が観察されている。これらの反応がエチレン合成の前駆体であるACCの改変によって部分的に再現できることや、そのACCの合成を阻害するAVGをγ線照射の前に植物体に吸収させることによって、異常形態形成を抑制できること、そしてエチレン合成及び感受性変異体ではγ線照射による変異が質、量共に異なること等より、エチレン合成を介したシグナル伝達系がこの異常形態形成の誘導に関与していることが示唆された。また、エチレン感受性変異体の解析より、根の異常形態形成は、組織の膨潤と根毛の形成という異なる2つのステップによって成立している可能性も示された。

現在ガスクロマトグラフィーを用いて、γ線照射によって誘生するエチレンの測定を試みる一方で、γ線照射に特異的にリン酸化されるタンパク質を同定中である

1pE01

タバコホメオボックス遺伝子の単離 及び形質転換体を用いた解析

玉置雅紀、西村明日香、松岡信 (名大・生物分子応答)

近年、植物の形態形成に関する分子生物学的アプローチが盛んになっている。我々は、植物の形態形成にホメオボックス遺伝子がどの様に関与しているのかを明らかにすることを目的としている。前年度までに、我々はタバコホメオボックス遺伝子*NTH15*及び*NTH23*が葉の形態形成に重要な役割を持つことを示してきた。今回新たにタバコより単離したいくつかのホメオボックス遺伝子についての解析結果を報告する。

茎のtotal RNAを用いてホメオボックスのコンセンサス配列をプライマーとしてRT-PCRを行ったところ、いくつかの配列の異なるホメオボックス断片が得られた。これらをプローブとしてタバコの茎cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、新規のタバコホメオボックス遺伝子*NTH9*、*NTH20*、*NTH22*が単離された。これらのホメオボックス遺伝子のホメオドメインは*NTH15*と80~84%の相同性を持ち、*Kn1* class 1 遺伝子群に属することが明らかになった。ノーザン解析によりこれらの遺伝子の発現は茎頂、花芽、茎等に見られ、葉では見られなかった。CaMV 35Sプロモーターの支配下でこれらのクローンをセンスに発現するコンストラクトを作製し、形質転換タバコの形態変化を調べた。その結果、得られた全ての形質転換体において葉の形態異常が観察された。これらの形質転換体の形態異常とホメオドメインの配列の関係について考察する。

1pE02

タバコホメオボックス遺伝子*NTH1*の解析
西村明日香¹、玉置雅紀¹、相田光宏²、藤澤久雄²、田坂昌生²、松岡信¹ (1名大・生物分子応答、2京大大学院・理・生物・植物)

我々の研究室では植物の形態形成に関与すると考えられているホメオボックス遺伝子をタバコ及びイネから多数単離してきた。現在、それぞれの遺伝子が形態形成の過程でどのような役割を果たしているのかを明らかにするために、各遺伝子の解析を進めている。前年度に我々はタバコホメオボックス遺伝子*NTH15*及び*NTH23*についての解析結果を報告した。今回は新たに解析を行った*NTH1*について報告する。

植物のホメオボックス遺伝子はホメオドメインのアミノ酸配列によりいくつかのグループに分けられるが、*NTH1*は*Kn1* typeのclass1に属し、そのうちイネホメオボックス遺伝子*OSH6*及びトウモロコシホメオボックス遺伝子*LG3*と87.8%の最も高い相同性を持つことが明らかになった。また、RT-PCRを用いた解析によりこの遺伝子は茎頂、花芽、花、茎、若葉において発現していることが示されたが、根、老葉では発現が見られなかった。さらに35Sプロモーター支配下で*NTH1* cDNAをセンス方向に発現するコンストラクトを作製しタバコに導入したところ、再生してきた形質転換体の葉の形態に異常が観察された。その表現型は主脈がまっすぐ伸長せず湾曲するというものであったが、その湾曲方向が各形質転換体の示す葉序の方向と相関関係を持っていた。これらの結果より、形質転換体の葉の発生過程における*NTH1*導入遺伝子の影響を考察する。

1pE03

イネホメオボックス遺伝子群の単離と発現解析
千徳直樹、佐藤豊、松岡信 (名古屋大、生物分子応答研究センター)

ホメオボックス遺伝子はホメオドメインと呼ばれる領域を持つタンパク質をコードしている遺伝子群で、多くの動物において遺伝子ファミリーを形成し、形態形成に関与していることが示されている。これまで我々は*OSH1*および*OSH15*と名付けたイネのホメオボックス遺伝子がイネの形態形成に関与していることを明らかにしてきた。今回新たにイネから4つのホメオボックス遺伝子を単離し、それらの染色体における位置を決定した。発現解析とあわせ、トウモロコシのホメオボックス遺伝子との関係を比較する。また、これらの遺伝子の形態形成における役割を調べるために、イネアクチン1プロモーターの制御下でこれらの遺伝子が発現するコンストラクトを作成し、形質転換イネを作成した。これらの結果を*OSH1*、*OSH15*の結果と比較し、考察する。

1pE04

イネホメオボックス遺伝子*OSH15*の形態形成における機能

佐藤 豊¹、田切明美²、千徳直樹¹、松岡 信¹
(¹名大・生物分子応答研究セ、²農水省・生物研)

ホメオボックス遺伝子は、ホメオドメインと呼ばれるDNA結合領域を持つ転写因子で、動物やショウジョウバエにおいて形態形成や細胞分化に重要な役割を果たしている。近年、植物からもホメオボックス遺伝子が数多く単離されており、それらの形態形成との関わりが注目されている。今回、私たちはイネから新たに単離したホメオボックス遺伝子*OSH15*の発現解析および、形質転換植物体を用いた機能解析を行った。

OSH15 cDNAは354アミノ酸残基からなるORFを含んでおり、その予想されるアミノ酸配列はトウモロコシの*RS1*と高い相同性を示した。*in situ* ハイブリダイゼーション法による発現様式の解析から、*OSH15*は茎頂分裂組織、花序分裂組織、花芽分裂組織においてファイトマーの境界にその発現が観察された。また、初期胚において器官分化以前の球状胚にその発現が観察された。*OSH15* cDNAを異所的に発現する形質転換タバコ及びイネを作成したところ葉に異常な形態が観察された。

本発表では、以上の結果より*OSH15*の形態形成における機能について考察する。

1pE05

分裂組織の構造・機能的維持に関わるシロイヌナズナ遺伝子のクローニング

賀屋秀隆、荒木 崇、岩淵雅樹 (京都大学・大学院理学研究科・植物学系)

われわれは高等植物の発生・分化過程において分裂組織が果たす役割を理解することを目的として、シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析を進めている。当該遺伝子のクローニングを容易にするために、突然変異体の選抜はT-DNAタグ・ラインからおこなった。

選抜の結果、成長速度の減退、葉形異常、茎頂分裂組織の分断化、花序・花の形態異常、花成遅延など、植物体地上部の後胚発生過程全般にわたって異常を示すものが一系統得られた。さらに、この系統では根の伸長の減退、根端の刺激応答異常が認められたことから、これは茎頂・根端両分裂組織の構造・機能維持に関わる遺伝子の突然変異体であることが予想される。表現型とT-DNA上の選択マーカーとの共分離解析から、この変異体はT-DNAの挿入によるものであると考えられた。

そこで、この遺伝子をクローニングするために、まずTAIL-PCR法により挿入T-DNAのLBIに隣接する植物ゲノムDNA断片を回収した。次に、これをプローブにgenomic libraryのスクリーニングを行い11kbpのゲノム断片を得た。現在、このゲノム断片をプローブにcDNA libraryのスクリーニングをおこなうとともに、オーバーラッピング・クローンの単離と解析を進めている。

1pE06

講演中止

1pE07

有限花序と無限花序とを決める遺伝的メカニズムの解析

下藤弘嗣、本間 隆、岡 穆宏 (京都大・化研)

花序の形態は花の形とともに、植物の種を特徴づける最も顕著な形質の一つである。中でも花序軸の先端に花を着ける(これを頂花と呼ぶ)有限花序と、そうではない無限花序とはまず最初に分類される特徴となっている。またいろいろな科に属する植物の中に有限花序と無限花序を持つグループがあることから、この形質は進化の色々な局面で独立に獲得されたものと考えられている。しかし有限花序と無限花序のどちらが基本形であるかなど、多くのことはまだ分かっていないのが現状である。

我々はキンギョソウで有限花序になる突然変異に基づいてクローニングされた、*CENTRORADIALIS* (*CEN*) 遺伝子を用いて、野生型が有限花序を持つタバコや、同じく無限花序を持つシロイヌナズナにおいて、その遺伝的メカニズムがどの程度保存されているかを調べている。現在までに、これらの植物ゲノム中に*CEN*遺伝子と高い相同性を示す塩基配列が存在すること、タバコに*CEN*遺伝子を導入した結果、形質転換植物の中に無限花序を持つ個体が得られること、を確かめた。タバコの*CEN*ホモログの機能や発現についてさらに解析を進めている。

1pE08

イネ *LEAFY* 遺伝子 *RLF* (*Rice LEAFY*) の単離と機能解析
小西左江子, 井沢毅, 経塚淳子, 島本功 (NAIST・バイオサイエンス)

シロイヌナズナの *LEAFY* (*LFY*) 遺伝子は、花序分裂組織から花分裂組織への分化誘導の主要な役割を担っている。また *LFY* を *CaMV35S* プロモーターを用いて構成的に発現させると、花序分裂組織が花に転換することから、*LFY* は花芽形成の分化スイッチであると考えられている。そこで本研究では、イネ科植物の花芽形成の分子機構を理解する第一歩として、*LFY* 相同遺伝子をイネから単離し、発現・機能の解析を行った。

花芽特異的 cDNA ライブラリーから、389 アミノ酸の ORF を含むイネ *LEAFY* cDNA *RLF* (*Rice LEAFY*) を単離した。*RLF* のアミノ酸配列は、C 末側約半分で特に高い相同性が認められた。ノーザン解析の結果、未熟な穂でのみシグナルが検出された。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、一次枝梗分化期の花芽の先端部でシグナルが観察された。

形質転換シロイヌナズナでの構成的発現系を用いて、*RLF* が *LFY* と同様の機能を持つかどうかを調べた。作出した形質転換体では、致死、細長い子葉、晩生、エアリアルロゼットの形成等が観察され、予想した *lfy* 様の植物体はなかった。このことから *RLF* の機能は、*LFY* の機能とは異なると考えられた。現在イネ *lfy* 突然変異体の可能性がある変異体の *RLF* の塩基配列を比較し、変異の有無についても解析中である。

1pE09

イネの花の形質形成に関わる *RAP1*, *RAP2* の構造と機能
森田匡一, 経塚淳子, 島本功 (奈良先端大・バイオサイエンス)

われわれは、イネの花の器官形成を決定している分子機構を理解し、イネにおける ABC モデルを構築することを目的として研究を開始した。単子葉植物であるイネでは、シロイヌナズナにおける第 1 whorl (かく片)、第 2 whorl (花弁) に相当する領域には、内側および外皮が形成されていると考えられているが、確かな証拠はない。そこでこの対応関係を明らかにするために、第 1 whorl、第 2 whorl の器官形成に関与するクラス A 遺伝子の相同遺伝子をイネから単離し、これらのイネにおける発現制御および機能を調べている。

未熟な穂由来 RNA より作製した cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、*API* の MADS box、K box およびそれらに挟まれた領域のアミノ酸配列と相同性が高い領域をもつ、独立の 2 つのクローン (*RAP1-A*, *RAP1-B*) と、*AP2* の 2 つのドメイン (*AP2* ドメイン) および、それらに挟まれた領域のアミノ酸配列と相同性が高い領域をもつクローン (*RAP2*) を 1 つ得ることができた。ノーザン解析を行ったところ、*RAP1-A*, *RAP1-B* 共に未熟な穂において強いシグナルが得られた。*RAP2* においては非常に発現量が低いが、すべての組織で発現していると考えられた。また *RAP1-A* をシロイヌナズナにおいて強制発現させると早咲きになり、ターミナルフラワーを形成し、*API* でのそれと同じ表現型を示した。

1pE10

シロイヌナズナ花芽形成遺伝子 *APETALA1* と直接相互作用するタンパク質の単離、解析
澤進一郎, 溝口剛¹, 篠崎一雄¹, 町田泰則², 岡田清孝 (京都大・理、植物応答機構、¹理化学研究所、植物分子生物学研究室、²名古屋大・理、生物)

シロイヌナズナの花芽形成遺伝子として知られている *APETALA1* 遺伝子は MADS BOX ドメインを持つ転写因子をコードしている。しかし、その *APETALA1* タンパク質の分子レベルでの活性制御機構はほとんど分かっていない。そこで我々は *APETALA1* タンパク質と直接相互作用するタンパク質を単離する目的で、Two Hybrid 法を用いてスクリーニングを行った。その結果 3 種類の候補タンパク質が分離された。2 種類はすでにシロイヌナズナで単離、報告されている 65 kD の Protein Phosphatase 2A、regulatory subunit と同じものであった。もう 1 種類は既知のタンパク質とは有為な相同性は見られなかった。

1pE11

アラビドプシスの花のパターン形成における medial 方向と lateral 方向にかかわる突然変異体 F185、F151 の解析
松本任孝, 石黒澄衛, 岡田清孝 (京都大・理・植物)

花の器官発生においては medial と lateral の差があることは今まで知られてきた。たとえば wt では lateral stamen が失われる場合がある。また、*ap2* 突然変異体においては主に medial sepal が心皮化する。F185 では lateral sepal が未成熟と考えられる。また lateral stamen も失われやすい。medial 方向はほぼ正常である。F151 では lateral stamen が失われやすい。がくが細くなるが medial/lateral で差はない。

medial lateral の制御がどのように行われているかを調べるため F185, F151 の解析を行った。まず各突然変異体の表現型の観察を行った。さらに既知の花の突然変異体と double mutant を作り観察した。

また、F185 では lateral sepal と lateral stamen が同時に失われる場合があり、このとき nectary が残っていることが観察される。このことから nectary と stamen の関係をしらべるためにいくつかの花の突然変異体で観察を行った。

1pE12

花のホメオティック遺伝子 *PISTILLATA* の花弁、雄ずい特異的な発現調節機構の解析

本間 隆、岡 穆宏、後藤 弘爾(京都大・化研)

シロイヌナズナの花のホメオティック遺伝子 *PISTILLATA* (*PI*) は花弁と雄ずいの器官形成に主要な機能を果たす遺伝子である。*PI* の発現はステージ 3 の花芽からみられ、花弁、雄ずいの器官形成後も高いレベルで続く。我々は *PI* 遺伝子の発現調節機構を知るために、さまざまな長さの *PI* 遺伝子の 5' 上流領域と *GUS* 遺伝子とを連結した融合遺伝子 (*PI::GUS*) を持つトランスジェニックシロイヌナズナを作製し、花芽における *GUS* 活性の局在を調べた。転写開始点上流 1375bp をもつ *PI::GUS* 遺伝子の発現は *PI* 本来の発現パターンとよく対応していた。上流 218bp まで欠失しても同様の発現パターンを示したが、118bp まで欠失すると *GUS* 活性はほとんどみられなくなった。以上から、*PI* が花弁と雄ずいで発現するためには、転写開始点の上流 218bp が必要であることが分かった。現在、この領域内をさらに詳細に解析している。次に、いろいろな花のホメオティック遺伝子による *PI* 遺伝子の発現調節への影響をみるために、花のホメオティック遺伝子を構成的に発現する植物での *PI* の発現を調べた。その結果、*PI* の発現は異所的に形成されるものも含めて、花弁、雄ずい特異的であることが明らかになった。

1pE13

シロイヌナズナにおける *AGL6* 遺伝子の機能解析

中谷 美徳・荒木 崇・岩淵 雅樹 (京都大学・大学院・理学研究科・植物学系)

AGL6 遺伝子はシロイヌナズナの *MADS* box 遺伝子群の 1 つである。*MADS* box 遺伝子群の多くは花芽形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そこで本研究では、花芽形態形成における *AGL6* の役割を明らかにすることを目的として、*AGL6* の機能喪失変異体や、*AGL6* を異所的に発現させたトランスジェニック植物を作出し、それらの表現型の解析をおこなった。

In situ hybridization の結果より、*AGL6* は萼・花弁の基部や胚珠の内珠皮内皮などで発現していることがわかってきた。*AGL6* 遺伝子のアンチセンス・コンストラクトを導入されたトランスジェニック植物 (アンチセンス植物) では、萼が固く閉じて開かず、花弁は蕾の中で折り畳まれていたが、*AGL6* が本来、強く発現する内珠皮内皮には異常は見られなかった。しかしアンチセンス植物では内生遺伝子の活性がどの程度抑えられているか、という問題があり、表現型の評価が難しい。そこでアンチセンス植物の表現型を参考に、EMS で処理した植物から突然変異体のスクリーニングをおこなった。これまでに得られた独立の 6 系統の *agl6* mutant 候補のうち、少なくとも 1 系統はシークエンスの結果、*AGL6* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換を持つことが明らかになった。現在この系統について、花の形態異常と *AGL6* 遺伝子の突然変異との co-segregation 解析をおこなっている。また、*AGL6* の異所的発現に関しては、*AP3* プロモーターの下流に *AGL6* cDNA をつないだコンストラクトを導入し、*AGL6* を、本来は発現していない雄ずいや胚珠の外珠皮で発現させることを試みている。

1pE14

ジンクフィンガーを一個のみ含むベチユニアの転写調節因子の解析

中川仁、小林見、菅野善明¹、久保健一、高辻博志 (農水省・生物研、¹青森県・グリーンバイオセンター)

ベチユニアにおいて *Cys2/His2* タイプジンクフィンガー (ZF) 型転写調節因子は、25 種以上のタンパク質からなる大きな転写因子ファミリー (EPF ファミリー) を形成している。我々は、それらが植物の分化、器官形成の過程で果たす役割を解明するために逆行性遺伝学的解析を進めている。これまでに、様々な長さのスペーサーによって隔てられた 2-4 個の ZF を DNA 結合ドメインとして有する ZF 型転写因子に関して報告してきたが、今回、ZF を 1 個のみ有する転写因子の遺伝子を新たに単離したので、その構造と発現について報告する。

植物の *Cys2/His2* タイプ ZF 型転写因子の ZF モチーフにおいて高度に保存されている QALGGH 配列に基づくプライマーを用いて、3'-RACE 及び、ゲノム DNA を鋳型とした PCR により ZF をコードする遺伝子断片を単離した。続いて、これらをプローブとして、根あるいは花器官由来の cDNA ライブラリーから全長 cDNA をクローン化し、構造及び遺伝子発現の解析を行った。その結果、今回単離された ZF 型転写因子群は、構造及び発現の特性から二つのグループ (SZFS 及び SZFN) に分けられることがわかった。SZFS タイプのものは 4 種類得られ、構造的にアラビドプシスの雄しべの数の制御に関与する SUPERMAN とより高い類似性を有していた。また発現パターンにおいて、それぞれ雌しべと子房、雌しべ、雄しべに高い器官特異性を示した。一方、SZFN に属する 7 種類の遺伝子の多くは低い発現部位特異性を示した。これらの発現パターンの違いから、二つのグループは、異なるタイプの遺伝子発現調節に関与していると推測される。

1pE15

葯の形成過程において連続的に発現する 7 つの新奇なジンクフィンガープロテインについて

小林見、坂本綾子、久保健一、RYBKA, Zbigniew、菅野善明¹、高辻博志 (農水省・生物研、¹青森県・グリーンバイオセンター)

器官原基が確立された後、雄しべにおける葯および花粉の分化の過程では、体細胞と生殖細胞が同調し、相互作用しながら分化が進行していくが、これらの過程を制御する遺伝子発現の調節機構はほとんどわかっていない。そこで我々は、その調節機構に関わる転写調節因子を同定するため、特に *Cys2/His2* ジンクフィンガー (ZF) タイプ (EPF ファミリー) に焦点を当てて、遺伝子のクローニングを行い、コードするタンパク質の構造および発現パターンについて興味深い結果を得たので報告する。

まず、RT-PCR によって葯において発現している 7 つの ZF プロテインを検出し、さらに全長 cDNA を単離した。コードされているタンパク質の構造として、これまで ZF が 1 個または 2 個のものが報告されているが、ここで得られたものの中には ZF が 3 個または 4 個のものが含まれ、しかも ZF 間の距離が極めて長いという点で新奇的な構造であった。発現解析の結果、7 個の遺伝子はそれぞれが葯および花粉形成の過程の異なるステージにおいて一過的に発現しており、分化の進行に伴って各遺伝子が連続的に活性化していた。葯内における発現の局在性を調べた結果、これら遺伝子の発現は花粉において優勢ではあったが、タベート、葯壁においても認められた。また花粉は、タベート層および葯壁から分離しているにもかかわらず、葯および花粉形成の進行中、これら 3 つの組織における EPF 遺伝子の発現パターンはほぼ同調していた。これらの結果から、葯および花粉形成の各段階において EPF が果たす役割および葯および花粉の分化が自律的に進行する機構を説明する EPF のカスケードを提唱する。

1pE16

雌しべに発現するEPFタイプジンクフィンガープロテインの解析
久保健一^{1,2}、菅野善明³、小林 晃¹、中川 仁¹、坂本綾子¹、
Rybka, ZBIGNIEW¹、西野徳三²、高辻博志¹
(¹農水省・生物研、²東北大・院・工、³青森グリーンバイオ)

ベチュニアのCys₂/His₂ジンクフィンガー(ZF)転写調節因子は、25個以上からなる大きな転写調節因子ファミリー (EPFファミリー) を形成している。これまでに行った遺伝子発現解析や形質転換実験から、これらの転写調節因子の中には植物の器官形成に重要な役割をしているものが含まれると考えられる。今回、雌しべにおける器官形成や生殖過程の制御へのEPFファミリーのメンバーの関与に着目し、雌しべの各組織に選択的に発現するEPF遺伝子について、cDNAクローニング、構造解析、および発現パターンの解析を行った。

以前報告したPCRによって得られたDNA断片の配列を元に、子房由来のcDNAライブラリーから5種類の全長cDNAをクローニングした。cDNAの塩基配列から、ZFを2つ持つ典型的なEPF型ZFプロテインの他に、ZFを3つ持つタイプのもも含まれていることがわかった。発現解析の結果、器官特異性では、このうち4つの遺伝子はほとんど雌しべにのみ発現しており、他の1つは雌しべ以外に花弁および雄しべに弱く発現していた。さらに開花過程における、部位特異性および開花のステージにおける特異性を詳細に解析した結果、子房にのみ発現しているものと子房、花柱および柱頭のいずれにも発現しているものに分かれた。開花過程における経時的な発現の変化では、子房に特異的な遺伝子は発現のピークがつばみの段階に見られ、子房以外に発現しているものは成熟するまで発現レベルが上昇し続ける傾向を示した。現在、器官形成および生殖過程への関与について検討するため、受粉などに伴う遺伝子発現の変化の解析およびトランスポゾン挿入による遺伝子破壊が表現型に及ぼす影響について検討している。

2aE01

コムギ葉緑体における光照射下での Rubisco LSU の活性酸素による断片化

石田宏幸、清水佐知子、牧野 周、前 忠彦
(東北大・農・応生化)

昨年度の本大会において、私たちは、Rubisco LSU が葉緑体破碎液中で、活性酸素の直接作用により N 末領域を含む 37 kD と C 末領域を含む 16 kD のフラグメントに、特異的に分解されることを報告した。本報告では、この LSU の断片化に対する光照射の影響について述べる。

葉緑体破碎液に強光 ($2 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) を照射すると、両フラグメントの生成は大幅に助長されたのに対して、完全な暗所下では、フラグメントの生成は全く認められなかった。次に、単離チラコイド膜画分に Rubisco 精製標品を加え、光照射下でインキュベートしたところ、同様に両フラグメントの生成がみられた。一方、葉緑体破碎液に暗所下で過酸化水素を添加しても、LSU の断片化は認められなかった。

以上のことから、LSU の 37 kD、16 kD 両フラグメントへの分解には、光照射によりチラコイド膜で生成する還元力が必須であることが示唆された。

2aE02

タバコ培養細胞 BY-2 における自食作用の
コンカナマイシン A による阻害
森安裕二 (静岡県立大学・食品栄養科学部)

タバコ培養細胞 BY-2 をショ糖を欠いた培地に移すと、細胞内のタンパク質分解が亢進する。このタンパク質分解の亢進は自食作用に因っていると考えられるが、その詳しい機構はわかっていない。本研究では、液胞型 H⁺-ATPase の阻害剤であるコンカナマイシン A の自食作用に対する効果を調べた。

コンカナマイシン A は液胞の pH を上昇させ、ショ糖欠乏によって誘導されるタンパク質分解の亢進を阻害した。それと同時に、多数の膜小胞が液胞内に蓄積するのが観察された。これらの膜小胞は阻害剤を洗ってやると消滅した。また、このような膜小胞の蓄積は、ショ糖欠乏処理をしない細胞では見られなかった。これらの結果は、植物細胞における自食作用に液胞が関与していることを強く示唆している。

2aE03

タバコ (*Nicotiana tabacum* L. BelW3) 葉のアポプラストでのクロロゲン酸糖化合物の酸化還元レベルのアスコルビン酸による調節
高浜有明夫 (九州歯科大 生物)

タバコ葉のアポプラストにはアスコルビン酸(AA)、デヒドロアスコルビン酸(DHA)それにクロロゲン酸(CGA)様の化合物が存在していた。アポプラストの [AA+DHA] 量と [AA]/[AA+DHA] 比は加齢に伴って減少したが、シンプラストではこれらの量比に大きな変化は見られなかった。他方、CGA 様物質のアポプラストでの量は加齢に伴って増加したが、シンプラストでは大きな変化は見られなかった。加齢が進んだ葉ではアポプラストに酸化型のCGAが見つかった。この酸化型のCGAが検出されるときはAAは検出されなかった。シンプラストには酸化型のCGAは検出されなかった。これらの結果はアポプラストでの酸化型のCGAの検出可能かどうかはAAの存否に依存していることを示している。アポプラストのペルオキシダーゼ活性の加齢にともなう増加から、この酵素がCGA酸化に関与している推測される。タバコ葉に vacuum infiltrate したフェリシアン化カリが経時的に還元されることは、CGAの酸化に必要な過酸化水素は細胞膜を介しての電子伝達反応によって供給されている可能性を示唆している。

2aE04

DAD-1は植物の細胞死抑制遺伝子か？

西村哲、井沢毅、島本功 (奈良先端大・バイオサイエンス)

動物においては、プログラム細胞死が個体発生、生体防御に不可欠な細胞制御機構である。高等植物においても同様に、様々な生理過程において細胞死が重要な機能を果たしていることがわかってきている。

DAD-1(defender against apoptotic death)はヒト、ハムスター、センチュウにおいてプログラム細胞死の抑制機能を持つ遺伝子として同定されたもので、動物の細胞死関連遺伝子の中で唯一、植物でも相可遺伝子が確認された。我々はこのDAD-1イネ相可遺伝子(RDAD-1)を用いて、植物のプログラム細胞死の制御機構の解析を行っている。

イネ花芽cDNAライブラリーからRDAD-1cDNAを単離し、塩基配列を決定した結果、RDAD-1はアミノ酸レベルでヒトDAD-1、線虫DAD-1と47%、酵母OST2と29%の相同性を示し、オリゴ糖転移酵素(OST)のサブユニットの一つであると考えられる。RDAD-1はイネゲノム中に1コピー存在し、毛根で最も強く、カルス、根、胚乳、若葉、成葉の順で強く発現していることがわかった。DAD-1の*in vivo*での機能を探るため、センス、アンチセンスRDAD-1を強制発現する形質転換イネを作成した。その結果、センスRDAD-1形質転換イネでDAD-1の高発現が確認できた。しかし、アンチセンスを導入したイネではアンチセンス自身が発現しているが、センスDAD-1の発現量減少は観察できていない。現在さらに形質転換イネの詳細な解析を行っている。

2aE05

動物の細胞死抑制遺伝子*bcl-xL*および*ced-9*を導入したタバコで観察されるUV-Bおよびパラコート耐性

K.A.Malik, 三浦正幸¹、大橋祐子

(農水省・生物研・分子遺伝部、¹筑波大・基礎医学・分子神経生物)

植物における細胞死の機構については、不明な点が多い。我々は植物の細胞死が、動物で研究が進んでいるプログラム細胞死関連遺伝子の影響を受け得るかを調べるために、ヒト及び線虫由来の細胞死抑制遺伝子、*bcl-xL*および*ced-9*cDNAを、高発現プロモーターに連結し、タバコに導入して多数の組換え体を得た。これらの植物の自殖次世代について、導入遺伝子の発現をウエスタンまたはノーザン解析によって確認した。通常のタバコの葉にUV-Bを照射したり、スーパーオキシド発生型除草剤であるパラコート処理を行うと、葉の表面が傷害を受けたり、葉がしおれ退緑する。しかし、組換え体の中でも導入遺伝子産物の発現レベルの高い植物では、これらの処理に対して、明らかな耐性が認められた。耐性の程度と導入遺伝子発現のレベルに相関があることから、動物由来のこれら遺伝子が植物の中でも機能し、これらの遺伝子を過剰発現させた動物で観察されたようなストレス耐性を植物に付与することが示唆された。

2aE06

動物由来の細胞死抑制遺伝子を導入したタバコ植物で観察される葉の形態異常

村上高, Kamal A. Malik, 三浦正幸¹, 大橋祐子 (農水省・生物研・分子遺伝部、¹筑波大・基礎医学・分子神経生物)

我々は、植物におけるプログラム細胞死の実態を知るため、まず、ヒトおよび線虫由来の細胞死抑制遺伝子*bcl-xl*および*ced-9*が植物中でも機能するかどうかを調べた。これらのcDNAを、植物中で働く高発現プロモーターに連結してタバコに導入したところ、多数のカナマイシン耐性個体を得ることができた。興味あることには、これら再生体では、幼若植物の葉の奇形が有意に多く、新たに形成される上位葉で奇形は減少した。自殖次世代においては、傷を与えずに注意して育てた植物では、幼若期および成熟期を通じて、奇形率は対照に比べて明らかに多かった。奇形は、葉の中肋から側脈分離時のバランスの異常に基づくものが殆どであった。茎頂の切断により出させた腋芽について観察すると、奇形の出現率は主茎のそれに比べて格段に増加した。これらの結果は、動物由来のこれらの遺伝子が植物で機能し、葉の発生・分化にも関与するとともに、傷ストレスがこれらに影響を与えることを示すものと考えられる。

2aE07

ニンジン懸濁培養細胞におけるコンディショニングファクターの不定胚分化に対する作用

内田史小里、牧久恵、内倉直美、大菅康一¹、萱野暁明²、田部井豊²、田中喜之²、鎌田博³、駒嶺稔(日本女子大・理・物質生物科学、¹三菱重工業・基盤技術研、²農水省農業生物資源研、³筑波大・生物学系)

ニンジン培養細胞において37~63μmのembryogenicな細胞塊を分画し、オーキシンを含まない培地で不定胚分化を誘導すると、球状胚までは90%以上同調するが、球状胚以降の分化は必ずしも同調性はよくない。さらに高密度の球状胚からの魚雷型胚への分化頻度は著しく低くなる。これは球状胚以降の分化の誘導には、細胞塊密度が関係し高密度下では不定胚から培地中に不定胚分化を阻害する因子(CF: Conditioning Factor)特に低分子因子が分泌されることが示された。阻害的なCFの不定胚に対する作用を調べるため、この低分子画分を含むConditioned Medium(CM)中で培養した時に得られた不定胚と球状胚、魚雷型胚の間でポリペプチド種の相違を二次元電気泳動法で比較したところ、いくつかの違いが見出された。次に、不定胚分化過程での遺伝子発現へのCFの影響を調べるため、球状胚、魚雷型胚及CMの低分子画分中で培養した球状胚について、ディファレンシャル・ディスプレイ法による解析を行ったところ明らかな遺伝子発現の差が見出されたので、その結果も報告する。

2aE08

不定胚分化初期に特異的に発現するCEM6遺伝子の機能解析

阿佐美淳、山越薫、佐藤茂¹、出村拓²、牧久恵、駒嶺穆 (日本女子大・理・物生、¹三井業際バイオ研、²東北大・理・生物)

ニンジン培養細胞において、分画で得られた embryogenic な細胞塊からオーキシンを含まない培地中で高頻度・同調的に不定胚分化が誘導される系をわれわれの研究室では確立している。この系を用いて不定胚分化初期に特異的に発現する遺伝子 cDNA クローンを subtractive screening によって単離した。そのうちの 1 つ CEM6 クローンがコードするタンパクは、グリシンリッチで N 末端側にシグナルペプチドをもち、82% が疎水性アミノ酸から成り立つことがわかっており、ノザン解析などから明らかにされたその発現パターンから、CEM6 がコードするタンパクは細胞分裂と対応して発現する細胞壁または細胞膜のタンパクであることが予想される。

われわれは CEM6 の機能解析のアプローチとして、*in situ* ハイブリダイゼーションにより不定胚分化の各段階の CEM6 mRNA の局在の解析を試みた。CEM6 mRNA は球状胚から魚雷型胚で強く発現し、また不定胚の表皮組織に特異的に局在し、これは特に魚雷型胚で非常に顕著であった。これらの結果とオーキシン添加による CEM6 mRNA の発現の変動等の結果から、CEM6 の機能について論ずる。

2aE09

ホメオボックス遺伝子の導入によるニンジン不定胚および幼植物体の形態異常

得字圭彦¹、日渡祐二²、川原良一³、福田裕穂¹ (¹東大・理・植物園、²東北大院・理・生物、³理研・ジーンバンク)

我々はニンジン不定胚形成系を用いて、植物の胚発生の分子生物学的な解析を行ってきた。ホメオボックス遺伝子は動物の胚発生時のパターン形成において転写調節因子として重要な役割を果たしていると考えられているが、我々はホメオボックス遺伝子が植物においても胚発生のプログラムを制御しているのではないかと考え、ニンジンから 6 個のホメオボックス遺伝子 (CHBs: CHB1-6) を単離した。CHBs は DNA 結合部位と考えられているホメオドメインに隣接して、ロイシンジッパーモチーフを持つ HD-Zip タイプの遺伝子であった。不定胚形成過程でのノザン解析と *in situ* hybridization によって、CHB2 は心臓型胚で特異的に強く発現し、CHB1 は球状胚から心臓型胚、魚雷型胚とステージが進むにつれて、茎頂と根端の分裂組織に局在していくことが明らかになった。このような興味深い発現を示すホメオボックス遺伝子の胚形成における役割を明らかにするため、我々が最近開発したニンジン不定胚への迅速な遺伝子導入法を用いて CHB 遺伝子を導入した。35S プロモーター支配下で CHB1 および CHB2 をセンスおよびアンチセンスに発現するコンストラクトを作製し、アグロバクテリアを介してニンジン芽生えに導入し、そこから不定胚を誘導した。その結果、CHB1 のセンス方向の RNA を多量に発現させた形質転換体では子葉に形態異常が見られた。また、CHB2 をアンチセンス方向に発現させた形質転換体では胚軸部位に形態異常が見られた。これらの結果をもとに CHB1 と CHB2 の胚形成における機能について考察する。

2aE10

ニンジンの光合成関連遺伝子のクローニングと不定胚分化過程における発現解析

佐藤久美、出村拓、福田裕穂¹ (東北大院・理・生物、¹東大・理・植物園)

ニンジン不定胚分化過程では後期魚雷型胚以降に光にตอบสนองした緑化が観察される。そこでニンジン不定胚分化過程における光合成組織の構築機構に迫るため、光合成関連遺伝子のクローニングと発現様式の解析を行った。

まずニンジンから、色素体コードの *rbcl*、核コードの *cab* 及び NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (*por*) を PCR 法によりクローニングした。次に、暗培養 (D) または 24 時間明培養 (L) した各ステージの不定胚のノザン解析を行った。*rbcl* はすべてのステージ及び光条件下で発現が見られた。*cab* は球状胚、心臓型胚、初期魚雷型胚を通して、D、L どちらもほぼ一定のレベルで発現していたが、後期魚雷型胚以降は D での発現が見られず、L の場合のみ発現がみられた。したがって、*cab* 遺伝子は不定胚分化後期になると、暗所での発現が抑制され、光にตอบสนองして発現するようになると考えられる。*por* は初期魚雷型胚以降に発現が見られ、L の方が D よりも発現量が多かった。さらに *in situ* ハイブリダイゼーションにより、これらの遺伝子発現の組織特異性を解析したところ、*rbcl* は心臓型胚で、子葉に、魚雷型胚では子葉の柔細胞や胚軸の皮層に強い発現がみられた。*cab* は初期魚雷型胚で、子葉のつけねに、後期魚雷型胚では茎頂、子葉柔細胞、胚軸の皮層の一部に発現が見られた。一方 *por* は後期魚雷型胚や幼植物の子葉柔細胞、胚軸の皮層や維管束柔細胞において強い発現が観察された。これらの遺伝子の発現様式をもとに、不定胚における光合成組織の分化について考察する。

2aE11

休眠腋芽における細胞周期制御因子の解析
志水佐江、森仁志 (名大・農・生化学制御)

頂芽が切除されると休眠していた腋芽は細胞伸長細胞分裂を伴って、成長を開始する。動物や酵母では G1 期に重要な細胞周期制御ポイントが存在することが示されており、休眠中の腋芽にも同様な制御機構が推測される。我々は、細胞周期制御因子群の mRNA の発現様式の解析より、休眠中のほとんどの腋芽細胞は細胞周期が G1 期で抑制されていることを既に明らかにした。

休眠中の腋芽細胞内の細胞周期制御因子の相互作用を解析することを目的とし、PCNA、cyclin D、cyclin B、cdc2(PSTAIRE 配列)の特異抗体を調製した。その結果、cyclin B、cdc2(PSTAIRE 配列)は成長中の腋芽には検出されるが、休眠中の腋芽にはほとんど検出されなかった。一方、PCNA、cyclin D は休眠中の腋芽細胞にも検出された。さらに、PCNA 特異抗体カラムを用いることにより、休眠中の腋芽抽出液中には PCNA と cyclin D とが複合体を形成していることが示唆された。これらの結果を基に、腋芽細胞が動物で示されているような細胞周期制御機構によって休眠している可能性を考察する。

2aE12

休眠腋芽に特異的に発現するAD1遺伝子の解析
田由香, 森仁志 (名大・農・生化学制御)

頂芽優勢は植物生理学上、古くから知られている現象であるが、その分子機構はほとんど明らかにされていない。我々は先に頂芽の切除により、腋芽で発現の変化する遺伝子群の中から特に興味深い変動をするAD1、2、3を単離した。

AD1と名付けた遺伝子は、休眠中の腋芽で特異的に発現し、他の組織ではほとんど検出されない。また、頂芽の切除により、その発現はすみやかに減少する。AD1のmRNAは、約530ntであり、35アミノ酸(ORF1)及び25アミノ酸(ORF2)の短いORFしか取り得ない。我々はこのmRNAの翻訳される可能性を調べるために、CaMV35Sプロモーターの下流に、ORF1及び、ORF2をGUSとtranslational fusionとなるようにつないだ。これらをパーティクルガン法を用いて、モヤシの胚軸に導入し、GUSの一過性発現を解析した。その結果、ORF1-GUSの場合のみGUSの発現が観察され、ORF1の35アミノ酸が翻訳される可能性が示唆された。そこで、このORF1に対する特異抗体を調製した。現在、この抗体を用い、休眠腋芽組織から、ORF1に対するペプチドの検出を試みている。

2aE13

生長促進作用を持つ西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ遺伝子のイネへの導入

北浦千枝子, 小川秀之¹, 吉田和哉, 新名彦彦 (奈良先端科学技術大学院大学・バイオ,¹大阪大学大学院・工)

西洋ワサビは多くのペルオキシダーゼ (PRX) アイソザイムを有するが、当研究室で単離したC1a PRX (*prxC1a*) 遺伝子 (cDNA) をタバコとシロイヌナズナで高発現させると、生長が促進され、タバコでは開花時期も早くなった。そこで本研究では、その普遍性を調べるために*prxC1a*遺伝子を実用単子葉植物のイネに導入した。

遺伝子導入は横井と鳥山によって確立されたアグロバクテリウム感染法に従った。宿主イネの品種はキヌヒカリとヤマダニシキを用いた。CaMV 35S プロモーター-*prxC1a*融合遺伝子をpBI101Hmに挿入したバイナリープラスミドをアグロバクテリウム EHA101 に導入し、イネの胚盤由来カルスに10 ppm アセトシリノゴン存在下で感染させた。両品種においてハイグロマイシン耐性の再生個体が得られ、サザンハイブリダイゼーションにより*prxC1a*遺伝子の導入を確認した。また、葉の粗抽出液を等電点電気泳動に供し、泳動後のゲルを4-chloro-1-naphtholと過酸化水素を含む溶液に浸しPRX活性染色を行った。その結果、C1a PRX精製標品と同じpI 7.8の位置に形質転換体特異的な活性バンドを検出した。現在、形質転換体第一世代より採取した種子を播種し、形質転換イネの生長速度とPRX活性との相関について観察中である。

3aE01

オートムギ及びコムギ幼葉鞘における重力屈性：刺激角度依存性と autotropic straightening の関与
樽井 裕, 飯野盛利 (大阪市大・理・植物園)

Gravitropism of oat and wheat coleoptiles was studied in relation to the angle of displacement or the stimulation angle (SA). The plot of the initial curvature rate against the sine of the SA up to 90° showed a non-linear curve, the slope decreasing with SA. As the SA is enhanced beyond 90°, the curvature rate decreased, and the relationship between the sine of SA and the curvature rate was identical to that obtained for SAs smaller than 90°. The results indicated that the component of gravity that is perpendicular to the coleoptile's long axis is perceived as the gravitropic signal. In both oats and wheat, the rate of curvature dropped sharply before the coleoptiles tip reached the vertical position. The curvature then progressed at a much lower rate until the tip reached the vertical, and during this late phase of gravitropism, the apical to middle parts of the coleoptile began to straighten. It appeared that autotropic straightening competes with gravitropism as the coleoptile tip approaches the vertical.

3aE02

疑似微小重力環境下におけるアラビドプシス花茎のオーキシン極性移動

岡真理子, 宮本健助, 林智也, 上田純一, 山本良一¹, 保尊隆享², 神阪盛一郎² (大阪府大・総合科学,¹帝塚山短大・生物,²大阪市大・理)

オーキシン極性移動に対する微小重力刺激の影響を明らかにすることを目的として、放射性IAAを用いてアラビドプシス花茎のオーキシン極性移動能に対する種々の重力刺激の影響を調べた。

1g重力下で生育させたアラビドプシスの花茎切片においては頂端側から基部側への典型的なオーキシン極性移動が認められた。花茎切片を水平に置いた場合、あるいは、3-Dクリノスタット上における疑似微小重力環境下に置いた場合、オーキシン極性移動ほとんど影響されなかった。また、放射性IAAを花茎頂端からバルスラベル処理によってあらかじめインタクト植物に取り込ませた後、花茎切片を調製し、3-Dクリノスタットによる疑似微小重力刺激の影響を調べた結果、極性移動能は1g重力下のものとほとんど変わらなかった。以上の結果は、オーキシンの極性移動のシステムが既に発達していると考えられる1g重力下で生育させた植物体では、それ以後に与えられた重力刺激の影響を受けないことを示唆している。現在、微小重力環境下で生育させたアラビドプシス花茎のオーキシン極性移動能について検討中である。

3aE03

キュウリ芽生えの重力形態形成時における*ETR1*類似遺伝子の発現
藤井伸治、高橋秀幸(東北大学・遺伝生態研究センター)

キュウリの芽生えにおいて特徴的な現象として以下のものがある。1) 種子中の成熟胚の胚軸は湾曲しておらず、フック形成の向きが発芽時の重力の向きによって決まる。2) 芽生えの下胚軸基部に形成される突起状組織(ベグ組織)が重力の向きによって形成部位が決まる。これらの重力形態形成にエチレン及びオーキシンが関与していると考えられている。

我々はこれらの重力形態形成におけるエチレン作用を理解することを目的として、エチレンレセプタであるシロイヌナズナより単離された*ETR1*遺伝子(Chang *et al.*, 1993)に注目し、キュウリより*ETR1*類似遺伝子の部分的cDNAを2種(9-12, 9-10)単離した。ノーザン解析により以下の結果が得られた。i) 種子を水平に置き発芽させた場合、フックの外側に比べ、フックの内側、すなわちベグ形成側において、9-12及び9-10のmRNA蓄積量が減少することを見出した。一方、種子を垂直に固定し発芽させた場合、吸水48時間後まではフックが形成されず、支持台側(フックの内側の対照実験区)と支持台の逆側(フックの外側の対照実験区)において9-12及び9-10のmRNA蓄積量の減少は認められなかった。ii) 種子を水平に発芽させ、フックが形成・維持されている吸水後36, 48時間後の胚軸の頂端側において9-12及び9-10のmRNA蓄積が認められ、フックが開いている吸水後72時間後の胚軸の頂端側においてこれらのmRNAの蓄積量が減少していた。これらの結果からキュウリ芽生えの重力形態形成時に、エチレンレセプターの遺伝子発現が制御されていることが示唆された。

3aE04

突然変異体エンドウ(*ageotropum*)の根の伸長と屈曲に対するカルシウムの作用

Charles L. Stinemetz, 高橋秀幸, 菅 洋(東北大・遺生研)

重力屈性を欠損したエンドウ(*ageotropum*)および野生種の根の根冠に10 mMのカルシウムを含んだ寒天片(Ca²⁺)を不均等に処理すると、根はすべてCa²⁺とは反対側に屈曲し、この場合、Ca²⁺側伸長帯の成長促進を伴う。一方、Ca²⁺を根の初期伸長域(DEZ)に不均等に処理すると、野生種の根はすべてCa²⁺側に屈曲するが、*ageotropum*の根はDEZに処理されたCa²⁺にまったく反応しない。同様にして、カルシウムキレート剤をDEZの片側に処理すると、野生種の根はキレート剤とは反対側に屈曲するが、*ageotropum*の根は反応しない。これらの結果は、根の伸長・屈曲に対するカルシウムの作用の二面性と同時に、DEZにおけるカルシウム勾配が重力屈性の発現に関与していることを示唆している。

3aE05

樹木シュートの姿勢制御因子としての表面成長応力
- 負重力屈性発現挙動の力学モデル
山本浩之、吉田正人、奥山剛(名大・農・応用生物)

傾斜している樹木シュートは、傾斜の上側または下側の二次木部に“あて材”と呼ばれる特異な組織を形成する。そこでは異常に大きな内部応力(成長応力)が発生する。これが、固く木化した木本植物における重力屈性あるいは傾斜重力屈性の発現の原因となっているものと思われる。しかしながら、このことを、力学的考察にもとづいて定量的に証明した例はない。そこで本研究では、シュートの時間的・空間的成長パターンを自重増加による曲げモーメントと成長応力発生による回復モーメントとの拮抗作用と考えることにより、木本植物シュートにおける負重力屈性の発現挙動を力学的に定式化することを試みた。その結果、

(1) あて材部に発生する特異的に大きな成長応力は、木本植物シュートの負重力屈性あるいは傾斜重力屈性の発現において、本質的な役割を有している。すなわち、伸長・肥大成長による自重増加や葉の繁茂などによるたわみ(しだれ)を補償するのに十分な大きさの曲げモーメントを与える。

(2) 木本植物シュートに発生する成長応力は、種に固有な樹形を発現・保持する上で、重要な役割を有している。すなわち、シュートの時間的・空間的成長パターンの発現は、最終的には、あて材の形成とそこに発生する特異な成長応力によって力学的に制御されている。

3aE06

エドヒガン系サクラのGA₃処理枝における負の重力屈性と成長応力

吉田正人、山本浩之、奥山剛、中村輝子¹(名大・農、¹日女大・理)

GA₃処理による負の重力屈性発現における成長応力の役割を理解するため、ヤエベニシダレ当年枝を用いた。成長応力はストレインゲージ法により評価し、それによる枝曲率と断面二次モーメントも測定した。引張の成長応力がGA₃処理枝と未処理枝の上側で測定されたが、その値は処理枝の方が大きなものであった。両枝とも枝上側の木部に引張あて材が形成されていたが、GA₃処理枝のみが髓付近にも引張あて材が存在していた。引張成長応力は引張あて材の発達によって発生すると考えられており、これらの結果から、GA₃処理によって負の重力屈性が発現したのは、枝上側で引張あて材細胞が発達し、これによる大きな引張の成長応力が枝を上向きにするモーメントとなったと思われる。また、このとき成長応力の役割は枝を上向ける働きだけでなく、肥大成長による自身の重みの増加を支える働きもしていたと考えられる。

3aE07

ザンセツシダレモモにおけるジベレリンによる負の重力屈性の発現

津島美穂, 吉田正人¹, 中村輝子 (日女大・理・物生, ¹名大・農)

エドヒガン系サクラにおけると同様に、モモにおいても、ジベレリンが負の重力屈性を誘導するかどうかについて検討した。材料は、モモ (*Prunus persica*) のしだれ性、ザンセツシダレおよび立性を用いた。組織化学的な方法および偏光顕微鏡による測定方法は、すでに発表した。しだれ性枝は、当年枝伸長開始初期は、枝はしだれず上方成長を行う。やがて、自重を支え切れずに伸長停止部位でたわむ。外生のGA₃およびGA₁はしだれ性屈曲を阻止する。ジベレリン処理枝において、枝上側に偏った偏心成長、形成層活性の高まり、木部繊維細胞の分化、二次細胞壁のセルロースマイクロフィブリル傾角の減少が認められた。ジベレリン処理枝において、枝上側木部に成長応力が発生して、枝を上方へと引っ張り上げていることが示唆された。但し、モモにおけるジベレリン効果は、いずれもサクラにおける効果に比べると小さく、また、サクラにおいて認められたようなえて材は誘導されなかった。

枝上側におけるマイクロフィブリル傾角減少に基づく、上向きの引張成長応力を生ずる木部組織は、樹種により異なることが、すでに傾斜刺激を用いて報告されているが、今回の研究により、化学刺激によっても同様の結果が得られることが明らかになった。

3aE08

シダレヤナギにおけるジベレリン処理による負の重力屈性の誘導

森美穂, 中村輝子 (日女大・院・理)

当研究室において、サクラ・モモにおけるジベレリンによるしだれ性の成長制御機構が研究されてきた。本研究では、サクラ属以外の樹木における植物ホルモンの作用を検討するためにシダレヤナギ (*Salix babylonica*) の当年枝を用いて、ジベレリンおよびオーキシンの成長に及ぼす影響を調べた。

シダレヤナギの当年枝において、しだれ性は伸長帯における偏差成長によるのではなく、伸長停止帯における機械的な強度不足により生じていることが示唆された。さらに、処理をしなくても枝上側に偏る偏心成長を行っており、ある程度自重を支える能力をもっていることが明らかとなった。

GA₃、IAA処理により、しだれ性屈曲が阻止され枝は上方成長に転じた。しだれ性屈曲阻止現象は、枝上側木部における繊維細胞二次細胞壁のセルロースマイクロフィブリル傾角の減少にもとづく、上側における上向きの引張成長応力すなわち負の重力屈性の発生により生じたものと考えられる。

このような結果より、ヤナギにおいては何ら処理をしなくてもしだれ性枝が偏心成長を行っており、サクラやモモとは異なり、自重を支える能力をある程度有していることが明らかとなった。さらに、シダレヤナギにおいてもサクラ、モモと同様に上向きの引張成長応力の誘導に枝上側におけるマイクロフィブリル傾角減少が重要であることが示唆された。

3aE09

ヒャクニチソウ培養細胞の細胞分裂は活性酸素によって制御される

小川健一^{1,3}、中島仁²、高部圭司²、岡田清孝¹、浅田浩二³ (京大・理・植物、²京大・農、³京大・食研)

動物の細胞分裂時にO₂⁻が生成し、細胞分裂との関係が示唆されているが、植物細胞での報告はまだない。我々はヒャクニチソウ単離葉肉細胞を用いNADPHオキシダーゼにより生成するO₂⁻が細胞分裂のシグナルとして機能することを明らかにしたので報告する。ヒャクニチソウ葉肉細胞を単離して管状要素誘導培地で培養すると脱分化し、2分裂したのち細胞は膨潤し、二次細胞壁を形成して管状要素となる。細胞の単離直後からNADPHオキシダーゼの阻害剤Diphenyleneiodonium (DPI) が存在すると細胞分裂が阻害された。DPI存在下であってもキサンチンオキシダーゼ系により生成させたO₂⁻やグルコースオキシダーゼ系によって生成させたH₂O₂によって分裂が促された。H₂O₂により分裂した細胞はO₂⁻により分裂した細胞に比べ褐色を帯び細胞障害を起こしたように観察された。このように、NADPHオキシダーゼが生成したO₂⁻またはH₂O₂が細胞分裂を開始させることが示唆された。

3aE10

植物ヒストン遺伝子のS期特異的転写制御に関わるOct配列の存在意義

田岡健一郎、賀屋秀隆、荒木崇、飯哲夫、岩淵雅樹 (京大・院・理・生物科学)

Oct配列は、植物ヒストン遺伝子の上流域に常に見出される8bpの配列で、その存在様式から3つのタイプに分類されている。我々はすでに、OctとHex配列が対をなすタイプIエレメントがS期および分裂組織特異的な転写制御に関わるシス配列であることを明らかにしている。しかし、Oct配列をそのコアにもつ11bpのタイプIIエレメント及びOctとCCAAT配列が15bp離れて存在するタイプIIIエレメントの機能については不明であった。そこでこれらのエレメントを上流に持つ35Sコアプロモーター/GUSキメラ遺伝子を作製し、タバコに導入した。細胞周期を同調化させた培養細胞におけるGUS mRNAの発現、幼植物体のGUS染色の解析からタイプII, IIIエレメントともにS期および分裂組織特異的な転写を規定し得ることが明らかとなった。以上の結果をふまえ、Oct配列の役割について考察する。

3aE11

イネの *cdc2* ホモログの細胞周期依存的な発現制御
梅田正明、梅田(原)千景、山口雅利、橋本純治¹、内宮博文
(東京大・分生研、¹農水省・生物研)

植物は一生を通じて常に細胞分裂の停止と開始を繰り返すことによってその形態を形成し、生命活動を維持している。我々は特に非分裂組織からの分裂開始に注目して、細胞周期に関与するサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) の発現解析を行っている。

イネでは我々が最近発表したcDNAクローンも含めて、全部で4種類の *cdc2* ホモログ (Os1, Os2, *Oscdc2*, R2) が単離されている。そこで我々は、イネの幼植物体の根を材料に用いた *in situ* hybridization によって組織レベルの発現解析を行った。クローン間での相同性の高いドメインが存在するため、プローブは主に3'-非翻訳領域を用いて作製した。根端分裂組織における発現を解析したところ、Os1, Os2, R2は殆ど組織全体で発現していたものの、発現量はかなり低いものと考えられた。一方、*Oscdc2*では、スポット状の比較的強いシグナルが観察された。一般に、分裂組織では各細胞が同調せずに活発に分裂を繰り返しているため、隣接する細胞が同じ細胞周期のステージにある可能性は低い。したがって、*Oscdc2*で見られたスポット状のシグナルは*Oscdc2*が細胞周期のある特定のステージで強く発現するために、対応する細胞でのみシグナルが検出された結果と考えられる。Os1, Os2はサイクリンと相互作用するPSTAIREドメインが保存されているのに対して、*Oscdc2*はアミノ酸置換が起こっている。これはキンギョソウで提唱されたPSTAIREドメインに基づく発現パターンの分類モデルとよく合う。しかしR2はPSTAIREドメインが保存されていないが、PSTAIREタイプの細胞周期非依存的な発現パターンを示した。したがってR2は新規のCdkとして細胞周期において別の役割を担っている可能性が考えられる。酵母の変異株を用いた相補実験の結果も合わせて報告し、それぞれのCdkの機能について考察する。

3aE12

B-type サイクリン遺伝子のM期特異的な発現に関わる制御機構
伊藤正樹、岩瀬政行、渡邊 昭 (東京大・院・理系・生物科学)

細胞周期の特定の時期にだけ発現する遺伝子、いわゆる細胞周期依存的な遺伝子が近年、高等植物からも複数単離されている。しかし、その周期依存的な発現がどのようなメカニズムによって制御されているのかについては全く明らかにされていない。演者らは、ニチニチソウの同調培養系を用いて、B-typeサイクリン遺伝子 (*CYM*)がM期特異的に発現すること、また*CYM*遺伝子のタバコのホモログ (*Nt-CYM*)がタバコ培養細胞BY2の同調培養系で同様にM期に発現すること、さらにこのニチニチソウの*CYM*遺伝子の上流域462 bpがタバコ培養細胞中でレポーター遺伝子にM期特異的な発現を付与することを明らかにしてきた。そこで、この*CYM*遺伝子上流域462 bpを5'および3'側からdeletionした欠失型プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子と融合させ、複数のキメラ遺伝子を作製した。これらをアグロバクテリアを介した方法でBY2に導入した。得られた形質転換体を同調培養し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、改変型プロモーターのM期依存性について解析した。この結果、M期依存性に関するエレメントは462 bpの中に複数存在すること、上流域-80までの非常に短い配列がM期依存的な発現を付与できることを明らかにした。現在、この上流域-80までの配列を用いて、M期依存的な発現に関わるシスエレメントの同定を行っている。

3aE13

タバコの Rb cDNA の単離と発現解析
村上浩子、関根政実、新名博彦 (奈良先端大・バイオサイエンス)

【目的】 真核生物の細胞周期制御は、基本的には共通の機構が存在することが明らかとなりつつある。細胞周期制御において中心的な役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ (CDK) は、サイクリンと複合体を形成することにより、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性が制御されている。動物ではS期の直前にR pointと呼ばれる制御点があり、細胞周期を進行するか停止するかを決定している。G1期の停止はRbが制御しており、G1サイクリンがRbをリン酸化することによってS期の移行が決定されることが判明した。つい最近、トウモロコシからRb類似遺伝子 (*ZmRb1*) が単離され、植物でもRbがG1期制御に中心的に働くメカニズムの存在が示唆された。本研究では細胞分裂の重要な制御ポイントであるG1期制御の分子機構を解明することを目的として、タバコ (*Nicotiana tabacum*) からRb cDNA を単離し、その発現様式の解析を行った。

【方法及び結果】 トウモロコシから単離された*ZmRb1*の一部をプローブとして、タバコ培養細胞BY-2のcDNAライブラリーをスクリーニングした結果、1個のクローンが取得された。その塩基配列を決定した結果、Rbファミリー遺伝子に共通して保存されているポケット領域が存在することが分かった。また、動物ではRb蛋白質はRb結合モチーフ (LXCXE) を介してサイクリンDと結合することから、two hybrid法を用いて調べた結果、タバコRbとサイクリンDが結合することが判明した。現在、タバコRb類似遺伝子の発現様式を解析している。

3aE14

タバコ細胞の増殖制御: NPK1プロテインキナーゼ (MAPKKK) とNAK1キネシン様タンパク質の相互作用
石川雅樹、西浜竜一、坂野弘美、町田泰則 (名大院・理・生命)

タバコのNPK1プロテインキナーゼ (690 a.a.) は、その推定されるアミノ酸配列から、N末端側のキナーゼ領域、C末端側の非キナーゼ領域に分けることができ、キナーゼ領域は、アミノ酸配列に関してMAPKKKと類似しており、またその発現は出芽酵母のMAPKKKの変異株を相補できる。最近、我々はNPK1の活性化因子としてNAK1キネシン様タンパク質のcDNAをクローニングした。推定されるNAK1タンパク質 (959 a.a.) は、N末端側にはキネシンのモータードメインと高い相同性を示す領域をもっており、C末端側は、新奇な配列をコードしている。また、酵母を用いた遺伝学的生化学的な解析からNPK1の活性化には、NAK1のC末端側とNPK1の非キナーゼ領域が必要であることが分かっている。このことからNPK1の非キナーゼ領域は、キナーゼ活性の調節領域であると考えられる。我々は、NAK1によるNPK1の活性化はそれらの分子間相互作用によるという仮説を立て、酵母のtwo-hybrid systemを用いてこれを検討し、さらに相互作用に関与する領域を同定することを試みた。その結果、NAK1の685-756 a.a.の領域と、NPK1の最もC末端側の627-690 a.a.の領域で相互作用していることが分かった。さらにその領域では、coiled-coil構造をとりやすいことがそのアミノ酸配列から推定された。以上のことから、NPK1はNAK1とのcoiled-coil構造を介した相互作用によって活性化されるものと推測される。さらに、NAK1と相互作用するNPK1以外の因子が存在すると考え、これらをスクリーニングしている。

1aF01

日長感受性に関わる遺伝子 *CONSTANS* のイネ相同遺伝子の単離と解析

早間 良輔, 井澤 毅, 島本 功 (奈良先端大・バイオ)

長日植物シロイヌナズナの日長感受性が失われた変異株から得られた *CONSTANS* (*CO*) 遺伝子は、開花促進作用を持ち、長日条件下における発現が増加することが知られている。短日植物においても同様の機能が存在するかを知るために、我々は *CO* 相同遺伝子を代表的な短日植物であるイネから2クローン単離した。これらの二つのクローン *RCO1* および *RCO2* は、それぞれ354及び400アミノ酸から構成されており、N末端部分に *CO* と共通の二つの "C-X2-C-X16-C-X2-C" の Zinc Finger Motif が存在した。この部分を比較したところ約53%の類似性が見られた。さらにC末端部分の34アミノ酸からなる領域において、*CO* と約80%の類似性が見られる高度に保存された領域が見つかった。

現在、*CO* の相同遺伝子 *RCO1* および *RCO2* を過剰発現するイネ及びシロイヌナズナの形質転換体を作成し、開花に対する影響を調べている。また、イネにおける *RCO1* および *RCO2* の発現様式も解析する予定である。

1aF02

青色光及び赤色光によるトウモロコシ幼葉鞘の成長抑制

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

私達は、暗条件下で育てたトウモロコシ芽生えに白色光を照射すると、幼葉鞘の成長が強く抑えられ、その際、細胞壁の伸展性と細胞液の浸透濃度が低下することを報告してきた。今回、これらに対する青色光及び赤色光の影響について検討を行った。

青色光及び赤色光 (共に5W m²) は、共に幼葉鞘の成長をほぼ同程度抑制し、特に暗所で成長の速い基部での抑制が大きかった。この時、青色光と赤色光は、細胞壁の伸展性をほぼ同程度低下させており、特に基部で、その低下が大きくなっていた。また、青色光と赤色光共に、細胞液の浸透濃度を低下させた。この青色光及び赤色光の成長、細胞壁伸展性及び浸透濃度に対する効果は、いずれも光照射後1時間以内に見られる早い反応であった。さらに、幼葉鞘の各部位の成長速度と細胞壁伸展性及び浸透濃度との間で高い相関が見られたことから、青色光及び赤色光は細胞壁伸展性と浸透濃度の双方を低下させることにより、幼葉鞘の成長を抑制することが示された。

1aF03

BLUE LIGHT-INDUCED SHRINKING OF PROTOPLASTS FROM *Arabidopsis* HYPOCOTYLS AND PHYTOCHROME-DEPENDENT EXPRESSION OF THE BLUE LIGHT RESPONSIVENESS

Xiaojing WANG, Moritoshi IINO; Botanical Gardens, Fac. Sci., Osaka City Univ., Kanano-shi, Osaka 576

The protoplasts isolated from hypocotyls of *Arabidopsis thaliana* seedlings (red light-adapted) were incubated under continuous red light, and their volume was monitored. When treated with a 30-s pulse of blue light, these protoplasts transiently shrank, showing a minimal volume 5 min after the blue light treatment. The protoplasts also shrank when exposed to continuous blue light, but again transiently showing a minimal volume about 10 min after the onset of blue light. The protoplasts isolated from the *hy4* mutant of *Arabidopsis* did not show any shrinking response to blue light, indicating that the observed blue-light response is directly related to the light reception system responsible for the blue light-dependent inhibition of hypocotyl growth. Furthermore, no blue light-dependent shrinking took place in the protoplasts isolated from the *phyA/phyB* double mutant, suggesting that phytochrome is required for the establishment of the blue light-reception system.

1aF04

西洋わさび毛状根からのフィトクロム遺伝子の単離と解析・II: *PHYB*, *PHYE* の解析

齋藤 力, 原田 宏, 鎌田 博 (筑波大・生物)

西洋わさび (*Armoracia rusticana*) に *A. rhizogenes* を感染させて得られた毛状根は、植物ホルモンを含まないMS培地上で明所下で培養すると、不定芽が形成される。この光誘導不定芽形成には、光受容体としてフィトクロムが関与していることを光作用スペクトルの作成、フィトクロム活性の測定などにより明らかにしてきた。さらに、この現象に関与するフィトクロムの分子種を明らかにするため、西洋わさび毛状根より作成したcDNA ライブラリーを用いてフィトクロム遺伝子のスクリーニングを行い、これまでに *PHYA*, *PHYC* を西洋わさびより単離してきた。

そこで、これ以外のフィトクロム遺伝子の単離を行うため、アラビドプシスの *PHYB*, *PHYD*, *PHYE* のcDNA断片をプローブとしてスクリーニングを行ったところ、*PHYB* と相同性を持つ *ArPHYB4*, *ArPHYB15* および *PHYE* と相同性を持つ *ArPHYE7* が単離できた。また、*ArPHYB4* および *ArPHYB15* は、5' 非翻訳領域の長さの違う同じクローンであった。

1aF05

完全寄生植物ネナシカズラの色素体ゲノムにおける光合成関連遺伝子の構造と機能：*ndh*遺伝子の欠失および偽遺伝子化

四方幸治, 若杉達也, ¹ 古橋勝久, 山田恭司 (富山大・理・生物, ¹ 新潟大・理・生物)

完全寄生植物であるネナシカズラは、光合成による独立栄養生活を営むことができない。しかし、その色素体ゲノムには、ほとんどすべての光合成系遺伝子に相同な配列が存在している。本研究では、まず光化学系 I, II の遺伝子など 10 種の光合成系遺伝子についてノーザン解析を行った。その結果、すべてについてシグナルを得ることができた。このことから、これらの光合成系遺伝子は、実際に転写もされていることが明らかとなった。次に *ndh* 遺伝子群についてサザン解析を行った。*ndhB* 遺伝子ではシグナルが検出されたが、コード領域内に大きなギャップを含んでおり、偽遺伝子になっていると考えられた。一方、*ndhB* 遺伝子以外の 10 種の *ndh* 遺伝子ではシグナルが検出されず、全部もしくは一部の領域が欠失している可能性が示された。以上の結果は、完全寄生植物であるネナシカズラの色素体ゲノムにおいて、光合成系遺伝子は機能的に保持されているが、*ndh* 遺伝子群は選択的に欠失していることを示唆している。

1aF06

完全寄生植物ネナシカズラ (*Cuscuta japonica*) の芽生えの光応答特性 (I) : 伸長生長およびクロロフィル合成の様式

山田恭司, ¹ 多田欣史, 成沢雅広, 若杉達也 (富山大・理・生物, ¹ 新潟大・理・生物)

一般の被子植物の芽生えでは、光照射によって、子葉の展開・クロロフィルの合成・光合成関連遺伝子の発現が促進されるが、胚軸の伸長は抑制される。*C. japonica* は、完全寄生性の被子植物であり、宿主植物に絶対に依存しなければ生存できないにもかかわらず、光合成能力を保持している。本研究では、このような特殊性をもつ *C. japonica* の芽生えにおける光応答の特徴を明らかにするために、芽生えの伸長生長およびクロロフィル合成に対する光照射の影響を調べた。明条件下あるいは暗条件下で種子を発芽させ、それぞれの芽生えの長さおよびクロロフィル含量を測定し、比較した。その結果、*C. japonica* の芽生えでは、伸長生長は被子植物一般の場合と異なり、光による抑制を受けないが、クロロフィル合成の方は光による促進を受け、一般の被子植物の場合と同様であることが明らかとなった。この事実から、*C. japonica* における光のシグナル伝達が、被子植物一般の場合とは異なった経路で行われている可能性を示している。そのような可能性は、赤色光・青色光・近赤外光の連続照射下での芽生えの伸長生長の結果からも支持された。

1aF07

完全寄生植物ネナシカズラ (*Cuscuta japonica*) の芽生えの光応答特性 (II) : 光応答性遺伝子の発現パターン

若杉達也, 柴田未知恵, 成沢雅広, 多田欣史¹, 山田恭司 (富山大・理・生物, ¹ 新潟大・理・生物)

ネナシカズラ (*Cuscuta japonica*) は完全寄生性の被子植物であるが、光合成も行っている。最近、ネナシカズラの芽生えでは胚軸伸長などにおける光応答反応が一般の植物と異なっていることが示唆された。そこで、光合成系遺伝子をはじめとする光応答性遺伝子の光による発現調節についても解析を行った。クロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子 (*cab*) の構造と発現について調べた結果、ネナシカズラの *cab* 遺伝子産物は一般の被子植物のものと構造的に類似していた。一方その発現については、ネナシカズラでは暗所で育てた芽生えにおいても、明所で育てた芽生えと同様の *cab* mRNA の蓄積が見られ、一般の植物の場合とは異なっていた。このことから、ネナシカズラにおいては光合成系遺伝子の発現に関わる光シグナル伝達の経路が一般の植物と異なっている可能性が示唆された。さらに RuBisCO 小サブユニット遺伝子 (*rbcS*) とカルボン合成酵素遺伝子 (*chs*) の構造と発現についても報告する。

1aF08

フシナシミドロ多核細胞の青色光照射域で誘発される核分裂と分枝

高橋文雄, 菱沼佑¹, 片岡博尚 (東北大・遺生研, ¹ 山形大・理・生物)

黄色植物に属する管状多核細胞フシナシミドロ (*Vaucheria*) の基部の一部を青色光 (BL) で照射すると、照射域にすばやく葉緑体が集まり (Senn 1908)、その後 (5-7 時間) 照射域の中央から 1-数本の枝が発生する (Kataoka 1975)。我々は蛍光抗体法と DAPI 蛍光法を用いて、BL によって起こる微小管 (MT) と核の形態や分布の変化を解析した。MT は葉緑体集合時 (<20 分) には変化しないが、BL 開始 3-5 時間後に配向が乱れ、やがて消滅する。莫大量の核は皮層原形質中で均等に分布しており、葉緑体の移動中も、BL 照射域へ移動することはない。代わりに、BL 照射域に存在する核全てが、照射 1-2 時間後に同調的に分裂を開始した。隣接する非照射域では全く分裂は観察されなかった。12hL/12hD の明期開始 2-4 時間後、試料の約 10% で先端から基部に向かう分裂波がみられた。残りの試料での核の運命や、通常の核分裂周期と BL 誘発核分裂との相関を検討する。

1aF09

植物根組織細胞の生理・形態学的研究, (I V) 培地中の水によるエンドウ根組織中の空隙形成率の変化。
仁木 輝緒、梶 隆 (拓殖大学・工、政経)

著者らはこれまでエンドウ (*Pisum sativum* cv. Alaska) の根に形成される空隙について、その形成の要因を探ってきた。前回 ('95, '96)、培地に加える水の量を変えることにより、根の成長量が増し、空隙形成率が高まることを報告した。今回は根の成長を促進させる培地の水の量と、空隙形成の関係をより明らかにするため、加える水の量を多くし、空隙の形成との関係を調べた。

2 のビーカにパーメキュライトを入れ、培地の水の量を 750, 1,500, 2,200 ml とすると、根の成長は 1,500 ml までは増加を示す。1,900, 2,200 ml では 1,500 ml での成長以上の増加はみられなかった。なを、培地に加える水の量 2,200 ml は水がパーメキュライトの上面より上で、滯水状態を示している。空隙の形成率は培地の水が 1,225 ml までは 20-30 % である。しかし、培地水の量が増えると空隙形成率は飛躍的に高まり 1,900, 2,200 ml では 80-100 % となった。

これらから、空隙の形成の要因を議論する。

1pF01

眼点を欠損したブラシノ藻 *Mesostigma* が示す走光性の
特徴 (方向認識性、光感度、波長依存性) について
松永茂、渡辺哲、宮村新一、堀輝三 (筑波大学・生物科学系)

【導入】 緑色鞭毛藻およびブラシノ藻の走光性に関する光受容体はロドプシンであるとされている (Kreimer 1994, Deininger et al 1995) が、走光性における眼点の機能については、その多くが未だ推測により議論されている。

【目的】 4 株のブラシノ藻 *Mesostigma* を観察したところ、この内の 1 株に眼点が光学顕微鏡レベルで認められなかった。そこでこの株の走光性を解析したところ、他の株と異なり、入射光に対して垂直な方向に走性を示した (diaphototaxis)。この特異な走性は hydroxylamine 処理により他の株の走光性と同様に阻害されたので、この株は光受容体の変異を起こしていないと判断した。そこで本研究は、この眼点欠損株と他の株の走光性の特徴を比較することにより、走光性における眼点の機能を探る事を目的として行った。

【結果】 1) 眼点の有無による光感度の差: 正常な株の緑色光域 (500nm ~ 580nm) での光感度は眼点欠損株に比べ平均で 16.4 倍 (S.E ± 6.2) 高い値を実測した。これは眼点により光のコントラストが強められるとする説を支持する。2) 眼点の有無による波長依存性の違い: 眼点欠損株は青色光 (400nm-480nm) に対する感度が極度に低く、この波長域の作用スペクトルの形が他の株と大きく異なることを見出した。よって眼点は特に青色光を著しく強めている可能性が考えられる。

1pF02

短日植物 *Ipomoea trifida* に見出された連続照明下で常に花芽形成するプロトクローン
関屋公子、尾崎葉子、丹羽勝、丸橋亘、横田国夫¹
(茨城大・農、¹茨城県生工研)

短日植物であるサツマイモ近縁野生種 *Ipomoea trifida* K221 系統のプロトプラスト再分化植物で、*in vitro* 連続照明下で常に花芽形成するクローンを見出した。この性質は、腋芽培養の繰り返しや、脱再分化過程を経ても維持された。このクローンの植物の各葉腋に存在する主芽と副芽のうち、主芽には包葉様の構造が見られた。また、全ての葉を展開前に切除しても、植物は *in vitro* で花芽形成することを確認した。このクローンの植物をアサガオ バイオレット系統を台木として接木し、連続照明下で育成したところ、葉切除した接穂すべてが着蕾した。このクローン植物と短日性の *I. trifida* との F₃ 3 個体を *in vitro* 連続照明下で育成したところ、そのうち 1 個体が花芽形成した。

1pF03

分子内に二重結合を有する新規ポリアミン
藤原伸介、米山忠克¹ (四国農試・資源利用研、¹農業研究センター・栄養診断研)

細胞の分裂・増殖や分化のみならず、細胞が恒常性を維持するうえで重要な役割を果たすポリアミンについては、これまでに様々な類縁物質が自然界に見出されている。我々も近年アズキの根粒内に新規のトリアミン (4 アミノブチルカダベリン) の存在を見出した¹⁾。豆科植物の根粒内にはまだその他未知のポリアミンが含まれており、今回はそれらの中で分子内に二重結合を有するものについて報告する。

キマメやフジマメ根粒の酸抽出液をベンゾイル化して HPLC 分析を行うと、プトレシンとスベルミジンの間に複数の未知ピークが出現した。ポリアミンを含フッ素誘導体に変換し GC 分析を行った場合にもこのような未知ピークが現れた。これらの成分は、陽イオン交換樹脂に強く吸着することから、ポリアミン同様強塩基性物質であった。GC-MS における既知ポリアミンとの開列パターンとの比較やフラグメントイオンの解析から、一つはスベルミジンの、今一つは根粒内の主要ポリアミンであるホモスベルミジンの各々分子内に二重結合を有する新規のポリアミンであることが分かった。

1) Fujihara, S. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:9932-9938.

1pF04

スギAGAMOUS homologの雄花での特異的発現
福井充枝、二村典宏、向井 謙、長尾精文、Y. Wang、
篠原健司（農水省・森林総研）

裸子植物の生殖器官は被子植物のものと形態的に全く異なる。裸子植物の生殖器官の形態形成の仕組みを明らかにするため、スギ(*Cryptomeria japonica*)のホメオティックタンパク質に対するcDNAをクローニングし、その発現特性について解析している。

シロイヌナズナのMADS box遺伝子の塩基配列に基づきプライマーを合成し、スギの未発達な雄花及び雌花より単離したpoly(A)⁺RNAを鋳型にし、RT-PCRを行い、スギ由来のMADS boxに相当する2種類のcDNA断片を得た。これらをプローブとして、最終的に2種類のMADS boxタンパク質に対するcDNAクローン(pCJAG1, pCJAG2)を単離した。CJAG1及びCJAG2は、MADS boxタンパク質に特徴的なMADS boxとK boxを持ち、それぞれ23.6kDa及び22.0kDaのタンパク質をコードする。これらのMADS boxのアミノ酸配列を既知の情報と比較すると、シロイヌナズナAGAMOUSのものと同様に、AGAMOUS homologであると推定された。CJAG1とCJAG2は互いにC末端以外の領域で高い相同性を示したが、CJAG2にはMADS boxとK boxの間の領域で9アミノ酸残基の欠失が見られた。CJAG1とCJAG2は生殖器官でのみ発現し、葉、若い茎、根での発現は全く検出できなかった。また、これらの遺伝子はジベレリン処理により誘導されるスギの花芽分化過程で、雄花と雌花の識別可能な時期から発達段階の後期に至るまで雄花で特異的に発現した。

1pF05

シロイヌナズナ Clp プロテアーゼの葉緑体の老化に関与する可能性について

中林一美、伊藤正樹、渡邊 昭、篠崎一雄¹（東京大・院・理系・生物科学、¹理研・植物分子）

葉緑体の退化は様々な環境要因によっておこり、様々な現象が高度に制御されながら進行していく過程である。中でもタンパク質分解はその進行に大きな影響を持つと考えられる。大腸菌で知られる Clp プロテアーゼは調節サブユニットの ClpA、プロテアーゼ活性を担う ClpP からなっており、植物では ClpA は核に、ClpP は葉緑体ゲノムにコードされている。これまでにシロイヌナズナの自然老化、また暗処理によって誘導した老化において、ClpA 遺伝子 *erd1* が発現誘導されることを報告した。

本研究では、*erd1* タンパク質および ClpP に対する抗体を作製し、シロイヌナズナ緑葉の老化におけるこれらのタンパク質の蓄積量の変化を解析した。その結果、植物体を暗処理することによって *erd1* タンパク質はその遺伝子の転写産物量の変動と一致した量的増加が確認された。一方 ClpP はその転写産物量と同じく大きな変動は見られなかった。また非変性条件下におけるイムノブロット解析により、これらのサブユニットが大腸菌で報告されているのと同様に、葉緑体内で巨大会合体を形成していることが確認された。

1pF06

ホウレンソウ葉のマイクロボディ型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの分子の性質と生理的意義
吉村和也、吉井真人、三浦登貴子、田茂井政宏、石川孝博¹、
武田 徹、重岡 成（近畿大・農・食栄、¹和医大・生化）

高等植物のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(AsAP)は葉緑体チラコイド、ストロマおよび細胞質にアイソザイムとして局在する。最近、カボチャおよび綿子葉のマイクロボディ面にAsAP活性が存在することが報告された。そこで今回、ホウレンソウ緑化子葉のcDNAライブラリーより、高等植物のAsAPと反応する抗*Euclena*細胞質型AsAPモノクローナル抗体(EAP1)を用い¹⁾、マイクロボディ型AsAP(mAsAP)cDNAの単離および解析を行った。また、大腸菌での発現系を構築し、リコンビナント酵素の特性を緑化子葉マイクロボディのmAsAPと比較検討した。さらに、AsA再還元系についても考察した。

イムノスクリーニングの結果、cDNAクローン(SAP30)は286個のアミノ酸(推定分子量31507 Da)をコードする858bpのORFからなり、推定アミノ酸配列は綿子葉mAsAPのそれと83.7%の相同性を示した。C末端に疎水性の高い配列が認められた。ホウレンソウ緑化子葉から調製した粗酵素を用いたショ糖密度勾配遠心法により得たマイクロボディにはAsAPおよびモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAsAR)が認められた。マイクロボディの界面活性剤およびトリプシン処理より、mAsAPはMDAsARと共に細胞質側に局在していることが明らかになった。大腸菌より部分精製したリコンビナント酵素はネイティブのmAsAPと同様の酵素学的性質を示し、AsA欠乏下においても比較的安定であった。1) *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 69-75 (1996)

1pF07

ホウレンソウ葉の葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼアイソザイムはC末端領域の選択的スプライシングを受ける
吉村和也、藪田行哲、本田貴弘、田茂井政宏、石川孝博^{*}、
武田 徹、重岡 成（近畿大・農・食栄 ^{*}和医大・生化）

我々は今までに抗*Euclena*細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(AsAP)モノクローナル抗体を用いて、ホウレンソウより葉緑体チラコイド(tAsAP)、ストロマ(sAsAP)、マイクロボディおよび2つの細胞質型AsAPアイソザイムcDNAをクローニングした^{1,2)}。その中で、葉緑体型AsAPアイソザイムはトランジットペプチドを含むN末端から364アミノ酸残基が1つのC末端アミノ酸を除いて同一であった。さらにtAsAPは、sAsAPよりC末端側に70残基長く、疎水性の高い領域を含んでいた。以上より、2つの葉緑体型AsAPは同一のDNAにコードされ、各々のmRNAはC末端側の選択的スプライシングによって生成されることが示唆された。そこで、ホウレンソウゲノムDNAライブラリーより葉緑体型AsAP遺伝子の単離を試みた。

tAsAPのcDNAをプローブとし、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行い、バンドが認められた約3-6 kbpのEcoRI処理断片から、パーシャルゲノムライブラリーを作製した。スクリーニングにより約4.6 kbp(PAsAP1)、3.5 kbp(PAsAP2)、5.6 kbp(PAsAP3)の3つの断片が得られ、これらは全AsAP遺伝子のそれぞれ異なる領域を含んでいた。PAsAP3の解析の結果、C末端側には先ずsAsAPのC末端アミノ酸および非翻訳領域を含むエキソン、11 bpのイントロン、そしてtAsAPの疎水領域を含む翻訳および非翻訳領域からなるエキソンの配列が認められた。また、それぞれのエキソンはポリAシグナルを含んでいた。以上より、葉緑体型AsAPアイソザイムは選択的スプライシングを受けていることが明らかになった。1) *FEBS Lett.* 367, 28-32 (1995), 2) *FEBS Lett.* 384, 289-293(1996)

1pF08

イネごま葉枯病菌における光応答 cDNA の単離
木原淳一、熊谷 忠 (東北大・遺生研)

イネごま葉枯病菌 *Bipolaris oryzae* の孢子形成は、栄養菌糸段階と一定の成熟段階に達した分生子柄の2つの発育段階で、UV-B と青色光の拮抗的な光調節反応 (マイコクローム系) によって調節されることが知られているが、この光調節反応に関する遺伝子発現については全く知られていない。そこで、イネごま葉枯病菌における UV-B 光と青色光に対する光応答遺伝子の探索を行った。PDA 培地で4日間暗黒下培養したコロニーに BLB light を1時間照射し、0、4、8時間暗黒下で培養した菌体から mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成した。ブランクハイブリダイゼーションによる Differential Screening を行った結果、UV-B 照射によって転写量が増加する遺伝子 (*uvi-1*) を単離した。この cDNA は全長 985 bp で 184 アミノ酸からなる ORF をコードしており、genomic DNA には2つのイントロンが含まれていることが明らかとなったが、このアミノ酸配列と有為な相同性を示す既知遺伝子は現在までのところ見いだされていない。本大会では、光照射にともなう *uvi-1* 遺伝子の発現パターンを中心に報告する。

1pF09

シロイヌナズナ *LONG HYPOCOTYL 1* 遺伝子の機能解析
村本拓也、Howard M. Goodman¹、横田明穂、河内孝之
(奈良先端大・バイオ、¹ハーバード医大)

植物の赤色光の受容体フィトクロムは、遺伝子ファミリーにコードされるタンパク質とテトラピロール化合物のクロモフォアからなる。クロモフォア生合成系の変異により、明所で胚軸が伸長する変異体 *long hypocotyl 1 (hyl)* がシロイヌナズナにおいて単離されているが、我々は染色体上にマップされる遺伝学的な位置に基づいて、*HY1* 遺伝子を単離した。*HY1* 遺伝子がコードするタンパク質はホ乳類のヘムオキシゲナーゼに相同性を示し、N 末端側にトランジットペプチドを持つ可溶性のプラスチド局在タンパク質と考えられた。ヘムオキシゲナーゼは動物においてはミクロソームに存在し、ヘムからビリベルジンを生成する反応を触媒する酵素で、植物においてはフィトクロムのクロモフォア生合成に必要な酵素であると考えられているが、その実態についてはあまりわかっていない。GFP をレポーターとして *HY1* 遺伝子産物の細胞内局在を調べたところ葉緑体に局在が認められた。また、*HY1* 遺伝子の RNA レベルでの発現は光によって制御されなかった。現在は組み換え *HY1* タンパク質のヘムオキシゲナーゼ活性の解析とタンパク質レベルでの発現の解析を行っている。

1pF10

単子葉植物イネにおける光形態形成に関与する *COP1* 遺伝子の単離とその解析
柘植知彦、吉積毅¹、Deng Xing-Wang²、松井 南 (理研・フロンティア・分子機構、¹帯広畜産大・草地生産、²Dept. of Biol. Yale Univ.)

双子葉植物の光形態形成過程の研究は、変異株が単離され更にこれらの変異に関与している遺伝子が同定されたことによって分子レベルでの解析が可能となった。*COP1* 遺伝子は、このようにして同定された遺伝子の一つであり、3つの機能ドメインを保持している (n-末端より、zinc-binding ドメイン、coiled-coil ドメイン、WD-40 と相同性の高いドメイン)。アラビドプシスの *COP1* 遺伝子の変異は、暗所条件下で通常認められない、明所型の形態形成や遺伝子発現を示す。

我々は、双子葉植物と異なる光形態形成過程をもつことが知られている単子葉植物において、*COP1* 遺伝子が担う役割を明らかにする目的で単子葉植物であるイネから *COP1* 遺伝子を単離して解析している。単離された *COP1* 遺伝子はイネゲノム中に1コピー存在しており、アラビドプシスと同様に単一の遺伝子であることが明らかとなった。また、アラビドプシスとの比較により、イネ *COP1* 遺伝子の3つのドメインはすべて高い相同性で保存されていることが明らかになった。本大会では、単離された *COP1* 遺伝子の構造解析の報告と発現について議論する。

1pF11

エンドウ芽生えの単離核におけるフィトクロム B 及び A の検出とその光制御
長谷あきら (東大・遺伝子)

我々は最近、シロイヌナズナを用いてフィトクロム B (PhyB) に核移行活性があることを見いだした (Sakamoto & Nagatani, 1996)。本研究では、核の単離がより容易なエンドウを材料に、明および暗条件下で育てた芽生えより核を単離し、抗エンドウ・フィトクロム抗体を用い、単離核に含まれる PhyB と PhyA の量を調べた。その結果、PhyB は明条件下のみ核に見いだされた。さらに、暗所で育てた芽生えを赤色光下に移したところ、照射開始後2~4時間で核中の PhyB 量は明レベルにまで増加した。一方、暗所でも少量の PhyA が核に見いだされたが、その量は光処理により減少した。この PhyA に関する結果は、エンドウ単離核を用いた過去の研究結果とよく一致しており (Nagatani et al., 1988)、核単離操作中の PhyA の混入による可能性が高い。

1pF12

ホウキモロコシのアントシアニン形成に関わるフィトクロムの二つの効果

七條千津子¹, 恩田祥子¹, 西村陽子¹, 久保田守², 渡辺正勝², 橋本徹¹ (神戸大・理・生物,¹神戸女子大・家政,²基生研)

ホウキモロコシ暗黒芽生えでは赤色光 (R) パルス照射によってアントシアニン形成を引き起こす。この時、活性型フィトクロムPfrの他に、それ自体ではアントシアニンを形成しないが、Pfrの作用を増幅する未知の因子CRSが生成される。CRS生成の光受容体及び生成の仕組みに関する実験を行ったところ次のような結果を得た。CRS生成は(1)作用スペクトルにおいて660 nmにピークを示した。(2)10秒のR照射直後のFRによっては全く打ち消されなかった。しかし(3)RとFRの同時照射においてはPfr/Ptotに比例した。(4)レーザー照射装置を用いた0.1秒のR照射直後のFRではほぼ完全に打ち消された。(5)照射時間に関係なく約100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で飽和した。(5)R照射時間が長くなるほど増大した。以上のことから、ミリ秒オーダーの速いPfr反応によりCRSは生成されるが、その生成量は光強度と照射時間に依存することから、CRS生成が終ると直ちにPrに戻るか、あるいは極めて速くPrとして新しく生成されるようなフィトクロム (phy) 分子種がこの反応に関わっていると考えられた。従って、ホウキモロコシ芽生えのアントシアニン形成は、このphyと半減期約6時間のphyによって制御されていると考えられる。

1pF13

赤色光、近赤外光によるシダ胞子の発芽誘導

飯沼知子¹, 西脇陽子¹, 岡本和久¹, 菅井道三 (富山大・理・生物,¹名古屋大・理・生物)

シロイヌナズナの種子発芽にはPHYA、PHYBを介するVLF、LF反応により制御されていることが知られている。

シダ植物でも複数のフィトクロム分子種の存在が明らかになりつつあるが、それぞれの役割は不明である。今回、我々は数種のシダにおいて胞子発芽が赤色光(R)のほか、長時間の連続近赤外光(FR)によっても誘導されることを見いだしたので報告する。

ミズワラビ、カニクサ、モエジマシダ、*Anemia*の4種のシダ胞子はRにより発芽が誘導され、FRにより可逆的に抑制されるほか、いずれも12時間程度の連続FR照射によっても発芽が誘導された。これは高等植物のLFRとHIRに相当する反応ではないかと考えられる。これに対し、ホウライシダではFRによる発芽誘導は認められなかった。これらの事実からシダ胞子発芽にも複数のフィトクロム分子種が関与していることが示唆される。

1pF14

シダ植物の青色光受容色素タンパク質遺伝子の単離・解析

鐘ヶ江健¹, 朴鉉淑¹, 和田正三 (都立大・理・生物)

青色光は高等植物の光屈性や胚軸伸長の抑制、気孔の開閉など数多くの生理反応に影響を及ぼすことが知られているが、青色光受容色素タンパク質遺伝子としてはアラビドプシスのCRY-1(HY4)、CRY-2遺伝子が単離されているにすぎない。我々はこれまでシダ配偶世代を用いて、青色光による多様な生理反応を解析してきたが、この単純な体制を利用した細胞レベルでの青色光情報伝達系の解明を目的として、シダ植物における青色光受容色素タンパク質遺伝子の単離と解析を進めている。

我々は、ホウライシダ・ゲノムライブラリーよりCRY-1遺伝子類似の配列を有する陽性クローンを単離し、5種の独立なグループに分けられることを報告している(昨年度本会)。これらグループの発現と遺伝子構造を明らかにするために、5'-,3'-RACE法を用いて各グループ遺伝子の単離を試みた。その結果、ホウライシダ配偶世代の全RNA画分から上記5グループすべてに対応する3'-RACE産物をクローニングすることに成功し、内3種のcDNA全長の塩基配列を決定した。その塩基配列から、これらの遺伝子はこれまでに報告されている青色光受容色素タンパク質遺伝子と同様に、N末端側に光修復酵素(Photolyase)類似の配列を持ち、C末端側に約200アミノ酸が付加された構造を有することが明らかとなった。

1pF15

ホウキモロコシにおけるUV-B照射によるDNA損傷と回復-光回復酵素の誘導

秦 恵¹, Eckard Wellmann¹, 橋本 徹²

(神戸大・理・生,¹Freiburg Univ,²神戸女子大・家政)

成層圏オゾン層の破壊に伴って増加するB領域紫外光(UV-B)の生物への影響が懸念されている。UV-Bは植物に成長阻害をはじめ様々な形態形成を引き起こすが、UV-Bによる損傷のうち最も致命的であると考えられるDNAの損傷とその回復については、植物においては不明な点が多い。ホウキモロコシ(*Sorghum bicolor* Moench)芽生えでは、UV-B照射によりアントシアニン形成の阻害やコイル形成(異状生長)が引き起こされるが、これらの現象にはDNA損傷が関与していることをすでに報告している(Hada et al. 1996)。今回はDNA損傷の光回復と光回復酵素の誘導について調べた。

DNA損傷は、シクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)と6-4光産物(6-4PP)に特異的な単クローニング抗体を用いてELISA法で測定した。UV-B照射で生じたCPDと6-4PPは回復光照射下では非常に速い回復を示したが、暗黒下でもかなり速い回復が見られた。UV-B照射の前にUV-A-可視光を照射した植物では、前照射をしないものよりCPDの光回復が速かった。しかし6-4PPの回復は前照射の影響を受けなかった。さらに光回復酵素活性を調べたところ、UV-Aを照射した植物では青色光を照射したものより高い活性を示した。この両者で6-4PPの回復酵素活性には差がなかった。これらの結果より、ホウキモロコシ芽生えにおいてCPDと6-4PPの光回復酵素は別であり、このうちCPD回復酵素は、UV-Aにより誘導されることが示唆された。

1pF16

イネの葉位、葉齢の変化に伴う、UVB誘導DNA損傷とその修復能力の動態

日出間 純, 熊谷 忠 (東北大・遺生研)

紫外線UVBによるDNA損傷の頻度とそれら修復速度との関係は、植物生育阻害に直接的に関わる問題として重要である。これまでに、UVBがイネの生育に及ぼす影響について生育調査した結果、幼植物時期(5から6葉まで)に受けるUVBは、イネ個体の生育を大きく左右する。また、葉内のタンパク質の大部分は、葉の出葉時から完全展開時までの短期間に合成されるため、葉の展開中に受けるDNA損傷はタンパク質合成、さらには生育に大きな損傷を与えることが予想される。そこで、まずイネの単葉、個体レベルにおいて、発芽時からの葉位、葉齢の進行に伴うUVB誘導DNA損傷(Cyclobutyl Pyrimidine Dimers (CPDs)の生成)の頻度について検討した。イネ(*Oryza sativa*)ササニシキの発芽後4日目から、第6完全展開時まで経時的にサンプリングし、UVB(セルロースアセテートフィルムを使用)10 W/m², 15 min.照射によって生成されるCPDs量を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測定した。その結果、葉位の違いにおいては、発芽直後より、第2, 3, 4葉(完全展開葉)においてCPDs生成量は高く(およそ25 CPDs/Mb)、第5葉以降の葉では10 CPDs/Mb程度であった。また、第6葉の出葉時、展開時、完全展開時及び老化時における、CPDs生成量は、展開時において最も高いことがわかった。現在、修復速度の動態について検討中である。

1pF17

イネにおける紫外線UV-B誘導DNA損傷とその修復機能との関係について

姜惠淑, 日出間純, Betsy M. Sutherland¹, 熊谷忠 (東北大・遺生研, ¹Brookhaven National Lab., Biology, USA)

紫外線により損傷したDNA(Pyrimidine Dimers)は光修復酵素または光に関係なく除去修復酵素により修復される。本研究では、イネ葉の紫外線UV-B単独照射、または可視光との同時照射によるDNA損傷量(Cyclobutyl Pyrimidine Dimers (CPDs))の変化、及びその修復速度について検討した。材料として、環境調節実験室内の紫外線無照射区で栽培されたイネ(*Oryza sativa*)ササニシキの完全展開した第3葉を用いた。また、CPDs量は、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測定した。まずUV-B光(nonfilter UVBランプ: Toshiba FL20SE)によるUVB dose response curveを測定したところ、6 W/m², 15 minの照射でおよそ30 CPDs/MbのCPDsが生成した。この条件(初期ダイマーレベルが30 CPDs/Mb)において、光、及び暗修復速度について測定したところ、光修復(Blue lampsのみ: 60 μmol/m²/s)は照射後5分で、また暗修復は24hで初期ダイマー量の半分が修復された。一方、UVB光と共にBlue lampsを同時に照射した場合のCPDsの生成量はUVB光単独と比較して減少し、またBlue lampsにUVB光を加えた場合の光修復速度は遅くなった。

以上の結果及び、種々の環境条件下(UV照射区、野外条件)で栽培されたイネ葉についても検討を加え、DNA損傷と修復速度との関係について議論する。

2aF01

植物におけるスクアレン合成酵素の構造と発現様式について
畑信吾, 三宮一室¹, 河内宏², 松岡信¹, 山本直樹², 泉井桂
(京大院・農, ¹名大・生物分子応答, ²農水省・生物研)

スクアレン合成酵素は真核細胞の小胞体に存在し、多くのイソプレノイドを合成する共通経路から専らステロールを合成する経路へ代謝を分岐させる重要な酵素である。私達は以前、植物から初めてシロイヌナズナの本酵素cDNAを単離し、大腸菌に酵素活性を発現させた(1)。今回はそのプローブを用いて、イネ、トウモロコシ、ダイズにおける本酵素のcDNAクローニングを行い、それらの構造を動物や酵母の本酵素と比較した。その結果、植物の酵素は独自のグループを形成し、そのなかでも単子葉植物と双子葉植物は異なるサブグループを形成することが明らかになった。イネの本酵素mRNAレベルをノーザン解析した結果、①分裂組織を含む器官で高い発現がみられる ②乾燥ストレスやABA処理によって発現が上昇する ③黄化葉で有意に検出されるmRNAレベルは光照射により低下する。この光照射による負の応答は、代謝経路において本酵素の直前の反応を触媒するファルネシルニリン酸合成酵素(2)と対照的な挙動であり、興味を持たれた。

文献1. Nakashima, T. et al. PNAS 92, 2328 (1995)

2. Sanmiya, K. et al. BBA in press (1997)

2aF02

光による葉緑体RNAポリメラーゼ認識シス配列の変化 ~ 光応答転写の一機構 ~

角山雄一, 馬場恭子, 中平洋一, 米田章登, 椎名隆, 豊島喜則

(京大院・人間・環境学研究所)

コムギ葉緑体psbD遺伝子(光化学系II複合体D2蛋白質をコード)の転写は光により活性化される。一方psbA遺伝子(D1蛋白質をコード)は恒常的に発現する。psbAプロモーターには、原核生物のσ⁷⁰型転写開始因子が認識する-35, 10領域が存在するが、psbDプロモーターの-35領域には存在しない。本研究では光応答転写とプロモーター構造の相関を明らかにするために、変異プロモーターを鋳型に用いたin vitro転写実験を行った。psbAの-35領域をpsbD型に置換すると、暗処理後の芽生えからの葉緑体抽出液では転写活性が著しく減少したが、光照射した芽生えの葉緑体抽出液では活性に変化が見られなかった。この結果は、葉緑体内に異なったシス配列(-35領域)を認識する性質の異なる複数のRNAポリメラーゼが存在し、光応答転写がそれらの間での変換により制御されている可能性を示唆するものである。これらのRNAポリメラーゼを、葉緑体抽出液から硫酸分画後疎水カラムクロマトグラフィー処理により部分的に精製し、その性質を調べた結果も報告する。

2aF03

イネ核局在性蛋白質受容体遺伝子の光応答的発現

庄子和博¹, 岩崎俊介², 内宮博文³, 松木吏弓⁴, 徳富(宮尾)光恵⁴, 山本直樹⁴(¹電中研, ²新潟大・理, ³東大・分生研, ⁴農水省生物研)

核蛋白質の核移行に必要な細胞質因子の一つとして出芽酵母 SRP1 や *Xenopus* importin が同定されており、これらの蛋白質は核蛋白質が持つ核局在化配列(NLS)を認識・結合する受容体と考えられている。我々は、既に SRP1/importin と相同性を示すイネの #61L cDNA を単離し、更に大腸菌で発現させた#61L 蛋白質(GST-#61L 融合蛋白質)が NLS を認識、結合することを明らかにした。相同性検索の結果、ランダムシーケンスによる部分塩基配列のデータベース中から#61L cDNA 以外に SRP1/importin に相同性を示す AD752 cDNA の存在を見いだすことができた。このクローンの全塩基配列決定により、#61L と AD752 は互いに相異なる cDNA クローンであった。#61L 遺伝子は光の正の制御を受けていたので、AD752 遺伝子についても光応答を調べたところ、光の負の制御が明らかになった。即ち、明所で生育させた芽生えを暗所に移すと時間の経過とともに転写レベルは増加し、逆に暗所適応後、明所に戻すと転写レベルは減少した。以上の結果より、イネには SRP1/importin 様蛋白質をコードする遺伝子が少なくとも2つ存在し、それぞれの遺伝子は光応答の点で異なる役割を担っていると考えられた。

2aF04

トウモロコシの Dof DNA 結合タンパク質を介した光応答性組織特異的遺伝子発現調節機構

柳澤 修一, Jen Sheen¹

(東大・総合文化・生命, ¹Massachusetts General Hospital)

Dofタンパク質群は、新しいZnフィンガー型のDNA結合ドメイン(Dofドメイン)を共有するタンパク質のファミリーであり、最近、幾つかの植物種からcDNAクローンが単離され植物内で様々な遺伝子発現に関与することが示唆されつつある¹⁾。トウモロコシの転写因子MNB1aは、最初に同定されたDofタンパク質でありその遺伝子は構造的に発現している。一方、Dof2は既に同定された12個のDofタンパク質中でMNB1aと最も高い相同性を示し、葉中に比べて茎と根での発現が格段に強い。今回、MNB1aの機能を解析した結果、N-末端側のDof DNA結合ドメインは*in vivo*でもそれだけで機能すること、C-末端側が転写促進ドメインであることが明らかとなった。Dof2の転写促進活性は検出できなかったが、MNB1aと*in vivo*で競合的にDNAと結合する事から、Dof2は阻害因子として働き組織的特異的な遺伝子発現に関与する可能性が示唆された。また、MNB1aは、C4PEPC遺伝子プロモーターを含む、幾つかの葉で高い活性を示すプロモーターに*in vivo*で結合することが明らかとなった。更に、MNB1aの転写促進活性は緑葉で高く黄化葉で低く、この違いはDNAに対する結合能によると判断された。GFPを用いた実験からMNB1aは緑葉でも黄化葉でも核に局在していると考えられたことから、核内の調節機構によってMNB1aのDNA結合活性が変化しMNB1aは光に応答した転写促進を行っている可能性が示唆された。

(1) Yanagisawa (1996) Trends in Plant Science, 1, 213.

2aF05

赤色酵母 *Rhodotorula minuta* におけるエルゴステロール代謝の光制御

中馬誠、興津敬之¹、村田芳行、多田幹郎¹
(岡山大院・自然科学、¹岡山大・農)

酵母 *R. minuta* を長波長紫外光の連続照明下 26°C で培養した場合、細胞膜エルゴステロールの光化学分解とその分解を補う生合成が同時に進行していることを明らかにした。そして、その分解と合成の速度は共に照射光強度に比例していることを推察した。

本研究では、光および温度を制御することによってエルゴステロールの分解と合成をそれぞれ独立に調べた結果と、異なる光強度下での連続培養した菌体において [¹⁴C]化合物を用いたラベルチェイスの結果に基づいて、上記の推察を確認した。また、阻害剤を使用して、エルゴステロール生合成の光制御機構について調べた結果も併せて報告する。

2aF06

暗所特異的に発現する分岐鎖α-ケト酸脱水素酵素遺伝子の糖による発現制御

藤木友紀、伊藤正樹、渡邊昭

(東京大・院・理系・生物科学)

シロイヌナズナの暗所特異的遺伝子として単離した *din3*, *din4* のコードするタンパク質は、動物や微生物の分岐鎖α-ケト酸脱水素酵素複合体(BCKDH)の2つの異なるサブユニットと高い相同性を持っていることを先の大会で報告した。分岐鎖α-ケト酸はVal, Leu, Ileの脱アミノ化によって生じ、アセト酪酸やスクシニルCoAを経由してエネルギー源として利用される。BCKDHはこの代謝経路の鍵酵素である。動物では飢餓状態や高タンパク質含量の摂餌でその酵素活性が上昇することから、エネルギー供給に重要な役割を担っていると考えられている。しかし植物での解析は殆どなされていなかった。

暗所に置いた植物でその遺伝子発現が誘導されることから、糖飢餓の影響について検証した。その結果、*din3*, *din4* の発現が糖の存在下で抑制される一方、光合成阻害剤により明所でも発現することを確認した。さらに *din3* を大腸菌で発現させてポリクローナル抗体を作製し、ウェスタン解析によって暗処理など様々な生理的条件下でのタンパク質の蓄積を観察した。得られた結果より植物の糖飢餓における本酵素遺伝子の生理的役割について考察する。

2aF07

青色光に依存したラン藻*Synechocystis* PCC6803の従属栄養条件下での増殖

和田元, 奥村典子¹, 正元和盛¹, 渡辺正勝² (九大・理・生物,¹熊大・教育・生物,²基生研)

Synechocystis PCC6803は、光独立栄養条件および混合栄養条件下(グルコースを培地に添加し、連続光のもとで培養)で増殖できるラン藻であるが、この株を混合栄養条件下で増殖させた後に暗条件に移し、1日に1回だけ短時間(数分間)の光パルスを与えてやると従属栄養的に増殖するようになる。この光パルス従属栄養条件下での増殖は、培地に添加したグルコースに依存し、光合成電子伝達系の阻害剤であるDCMUを培地に添加しても影響を受けない。したがって、光パルスが光合成に利用され、それによって増殖が促進されるのではなく、光パルスは増殖を促進するためのシグナルとして働いているものと考えられる。

本研究では、この光パルス従属栄養条件下での増殖にどのような波長の光が有効であるかについて調べた。その結果、この条件下での増殖は青色光によって促進され、赤色光は有効でないことが明らかとなった。このことは、このラン藻に青色光受容系が存在することを示している。また、このラン藻の青色光受容系に関連している遺伝子群をクローニングする目的で、光独立栄養条件および混合栄養条件下では増殖できるが、青色光に依存した光パルス従属栄養条件下では増殖できない変異株の分離も行なった。それらの変異株の性質などについても報告する。

2aF08

ラン藻*Anabaena*における近赤外光照射による細胞内cAMPレベルの変化

大森正之、渡辺正勝¹ (東京大・院総合文化・生命環境,¹基生研・培養育成)

糸状性ラン藻 *Anabaena cylindrica* に異なった波長の光を照射し、照射後一分おきにcAMPを抽出して細胞内のcAMP量を測定した。通常、暗所での細胞内cAMP量は、100pmol/mgChl.前後である。この細胞に異なった波長の光を照射して、細胞内のcAMP量がどのように変化するかを検討した。その結果、670nm以下の光照射ではcAMPレベルが急激に減少し、2分後には照射前の数分の一以下にまでなるが、720、730nmの光照射では逆に増加が見られた。この事実は*Anabaena cylindrica*

に光信号伝達系が存在すること、その光センサーの得た情報はcAMPを合成する酵素であるアデニル酸シクラーゼに伝えられることを示唆している。ラン藻より単離されたアデニル酸シクラーゼ遺伝子の中で、CyaCは光シグナルの伝達に関与する可能性が指摘されている。光シグナルがCyaCの活性を調節する機構について考察した。

2aF09

近紫外光によるナスの生理作用の活性化

塩崎紀子、手塚修文 (名古屋大・人間情報・環境システム)

太陽光を利用したフィールド実験によりナスの生理作用に及ぼす近紫外光の影響について調査を行った。UV透過フィルムおよび不透過フィルムで被覆したビニールハウス2棟(+UV区、-UV区)でそれぞれ育成したナス(*Solanum merongena* L. cv. Kurumeohnaga)を用いて、生理・生化学的アプローチによる比較実験を行ったところ、+UV区で光合成・呼吸活性や硝酸還元酵素(NR)活性が高かった。これらはピリジンヌクレオチド依存酵素の関与する代謝系と密接に関係していることから、ピリジンヌクレオチド(NAD、NADP)含量を測定した結果、やはり+UV区でその含量に促進がみられた。さらにこれらのレベルの上昇はNAD合成系の活性化と深く関わっているという知見を得た。

以上の結果より、現在、地表に到達している太陽光中の紫外線(Solar UV)は、植物の生長に必須のピリジンヌクレオチド代謝系において重要な役割を演じているものと考えられる。

2aF10

Anabaena variabilis のRNA結合タンパク質RbpA1の配列特異性

川上弘人、佐藤直樹 (東学大・生命)

シアノバクテリア*Anabaena variabilis* M3株のRbpA1タンパク質はRNA recognition motif(RRM)タイプのRNA結合タンパク質であり、低温培養時に大量に蓄積される。本研究では、RbpA1タンパク質のRRMに結合しうる一本鎖RNA塩基配列を検索した。GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)-RbpA1融合タンパク質をグルタチオン-セファロースカラムに吸着させたものに、ランダムな20塩基を含むRNAプローブを結合させた。塩により溶出されたRNAをRT-PCRにより増幅後、T7ポリメラーゼにより転写して次のプローブとした。このサイクル(SELEX法)を6回繰り返した。これにより19種類の塩基配列を得た。プローブと融合タンパク質の結合は、UV cross-linkingによって確認された。コンセンサス配列として得られたA-[C/A]-C-X₀-2-Cは、従来RbpA1に結合することが知られているポリUやポリGとは異なっていた。

2aF11

シアノバクテリア *Anabaena variabilis* M3株におけるRNA結合タンパク質遺伝子群の解析

圓山恭之進、佐藤直樹¹、太田にじ、飯野徹雄（早大・人科、¹東学大・生命）

シアノバクテリア *Anabaena variabilis* M3株には、RNA recognition motif (RRM) タイプのRNA結合タンパク質群をコードする *rbp* 遺伝子が8個存在する。本研究において、これら全ての *rbp* 遺伝子をクローン化し、塩基配列を決定した。*rbpD* を除く7個の *rbp* 遺伝子の産物では、C末端にグリシンに富んだ領域が存在した。また、RRMモチーフに特徴的なRNP1領域、RNP2領域の他にも保存性の高い領域が存在することが明らかになった。生育温度を高温（38℃）から低温（22℃）に移すと、*rbpD* を除く7個の *rbp* 遺伝子の転写産物量が著しく増加した。転写産物レベルは *rbpA1*、*rbpA2* ではその後も維持されたが、*rbpA3*、*rbpB*、*rbpC*、*rbpE*、*rbpF* では、転写産物の蓄積は一過性であった。また、それぞれの *rbp* 遺伝子5'非翻訳領域には共通の配列が存在し、低温調節に関連する可能性が示唆された。

2aF12

低温で誘導される *rbpA1* 遺伝子の5'非翻訳領域に結合するタンパク質の解析

中村あや子、佐藤直樹（東京学芸大・生命科学）

シアノバクテリア *Anabaena variabilis* M3株の生育温度を38℃から22℃に変化させると、RbpA1等のRNA結合タンパク質(Rbp)群が著しく蓄積する。Rbpはシアノバクテリアに広く存在し、この株では8個のメンバーからなる遺伝子ファミリーを形成している。*rbpA1* におけるリポーター遺伝子を用いたプロモーター解析の結果、これは転写レベルでの誘導であり、その誘導には *rbpA1* の5'非翻訳領域の配列が必要であることが明らかになった。また、この領域には低温誘導性 *rbp* 遺伝子群によく保存された配列が存在する。この保存配列をプローブとしてゲルシフトを行なったところ、38℃で培養した細胞抽出液から、DNA結合タンパク質が検出された。硫酸分画と陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、DNA結合タンパク質を部分精製し、その性質を調べた。

2pF01

植物の非宿主抵抗性発現における細胞骨格の重要性 (1)
小林裕子、小林一成、久能均（三重大・生物資源・植病）

エンドウうどんこ病菌 *Erysiphe pisi* (P) をその非宿主である5種類の単子葉植物及び3種類の双子葉植物に接種すると、この菌はいずれの植物にも侵入を試みるがそのほとんどが失敗し、侵入地点にはパピラが観察された。さらに、これらの植物の表皮細胞のアクチン繊維を染色すると、菌が侵入に失敗した細胞では、アクチン繊維が侵入地点を中心に放射状に配向していた。そこで、アクチン繊維が植物の抵抗性発現に関与しているか否かを検討するために、これらの植物をアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン(Cyto) A~E で処理した結果、いずれかのCyto処理によってPが吸器を形成するようになった。また、通常これらの植物に侵入を試みるが失敗するP以外の非病原菌についても検討した結果、Cyto処理することによっていずれの検定菌も感染できるようになった。さらに、Cyto処理し、原形質流動が完全に停止したオオムギ及びコムギ子葉鞘を10mM CaCl₂ に移して24時間培養後にPを接種するとこれらの細胞の抵抗性も回復した。以上の結果から、アクチン繊維は植物の非宿主抵抗性発現に深く関与していることが強く示唆された。

2pF02

プロベナゾールによるタバコおよびアラビドプシスの全身獲得抵抗性の誘導

吉岡啓子、仲下英雄、桐淵協子、山口勇（理研）

プロベナゾール (PBZ) はイネにいち病抵抗性を誘導する農薬として知られている。我々はこのPBZの誘導する抵抗性の解析を目的として、PBZがタバコ (*Xanthoxanthin*) およびアラビドプシス (*Col-0*) に全身獲得抵抗性 (Systemic acquired resistance) を誘導するか否かについて検討した。まずタバコ、アラビドプシスにPBZを処理し、その後PRタンパク質遺伝子の発現、サリチル酸の生産について解析した。また、タバコについてはタバコモザイクウイルス (TMV) による壊死斑形成について測定した。その結果、両植物においてPRタンパク質遺伝子の発現が認められ、サリチル酸も増加傾向にあった。また、TMVによる壊死斑はPBZ処理により縮小し、サリチル酸処理で観察される現象と類似しており、過敏感細胞死が早まっていることが示唆された。以上のことから、PBZはタバコ、アラビドプシスにおける全身獲得抵抗性のアクティベーターであることが判明した。

2pF03

植物の過敏反応におけるエチレンの重要性
大坪憲弘、瀬尾茂美、仁木智哉、大橋祐子
(農水省・生物研・分子遺伝部)

我々は植物の過敏反応に伴って生成するエチレンの機能を調べるために、TMV感染タバコで壊死病斑が形成される際のエチレン合成量の変動を詳細に調べてきた。その結果、エチレン合成は病斑形成開始のシグナルを受けて1時間以内に始まり、ある閾値を超えた量のエチレンが病斑形成に必須であることを明らかにしている。一方、ACCをエチレンに転換する酵素であるACCオキシダーゼのcDNAの単離し、病斑形成に伴うエチレン合成が遺伝子発現のレベルで制御されていることや、生成したエチレンが塩基性PR-1蛋白やタイプIIプロテアーゼインヒビターをコードする一部の抵抗性関連遺伝子の発現を制御していることなどを明らかにしている。

今回、エチレン合成が促進あるいは抑制された形質転換タバコを用いた解析を行ったので報告する。ACCオキシダーゼ遺伝子cDNAをセンスまたはアンチセンス方向に組み込んだ高発現ベクターをアグロバクテリウムを介してタバコに導入し、22個体のセンス植物と12個体のアンチセンス植物を得た。センス植物では全体的にエチレンの過剰生産によると思われる弱い黄化と組織の軟弱化の傾向が見られ、特に発現の強い1個体で明確な葉の形態異常が見られた。このような個体ではTMVの感染率が低下した。一方、アンチセンスRNAを強く発現する2個体ではエチレン合成量の低下に起因すると思われる病斑形成の抑制が観察された。これらの結果より、エチレンは病斑形成及びウイルス抵抗性の誘導という2つの機能を持つと考えられる。

2pF04

塩基性PRタンパク質遺伝子の転写を司るEREBP遺伝子のゲノム構造と発現の解析

北島佐紀人、高木優¹、進士秀明¹、佐藤文彦²

(京大・RIセ、¹工技院・生命工学研、²京大・農・農化)

タバコのDNA結合性タンパク質EREBP1~4はPR(Pathogenesis-related)タンパク質の組織特異的あるいはエチレン応答性発現に関与する転写因子である。一方、EREBP mRNAの蓄積も組織特異的あるいはエチレンにより制御される。そこで、EREBP遺伝子の発現制御機構を解明する目的で、ゲノム遺伝子の単離と発現の解析を行った。

タバコ(*Nicotiana tabacum*)の祖先種のひとつである*N. sylvestris*のゲノムライブラリーを、タバコEREBP1~4のcDNAをプローブとしてスクリーニングし、3つのクローンλ18a, λ18c, λ15Lを得た。ORFの推定アミノ酸配列は、EREBP2, 3, 4のcDNAのそれらに対しそれぞれ92, 93, 77%のアイデンティティを示した。いずれの遺伝子にもイントロンは存在せず、それらの5'非転写領域には、互いに相同な領域は認められなかった。現在、各プロモーター::GUS融合遺伝子を導入した形質転換タバコを用いて、これらの組織発現とエチレン応答性を解析しているので併せて報告する。

2pF05

エンドウの防御応答における活性酸素の意義
稲田温子、藤井匡寛、木場章範、一瀬勇規、山田哲治、白石友紀(岡山大 農)

植物の病原菌に対する初期防御応答の1つとして活性酸素の生成が挙げられる。無傷のエンドウ葉をエンドウ褐紋病菌のエリシターで処理すると、5分以内にO₂⁻の生成が認められ、この生成は本菌の生産するサプレッサーで抑制された(1996年植物生理学会)。そこで今回は、エンドウの複数の防御応答に対する数種の活性酸素消去剤の効果を調べた。タイロン、マンニトール、アスコルビン酸は有傷エンドウ組織にエリシターで誘導されるピサチンの蓄積にはほとんど影響しなかった。一方、分離細胞壁画分をエリシターで処理した場合に誘導される感染阻害物質の生成はタイロン、マンニトール、SODにより顕著に阻害された。さらに、無傷組織表層にエリシターで誘導される局所的な抵抗化もこれらの消去剤によって阻害された。以上の結果より、感染過程で生産される活性酸素は、ファイトアレキシンの蓄積誘導には関与せず、むしろエンドウ組織表層における感染阻害因子の生成と局所的抵抗化に深く関わっていることが強く示唆された。

2pF06

エンドウの防御応答に対する合成モデルエリシターの影響

木場章範¹、稲田温子¹、竹田忠紘²、金光卓也³、一瀬勇規¹、山田哲治¹、白石友紀¹

(¹岡山大 農、²共立薬大薬、³名市大薬)

エンドウ褐紋病菌の柄孢子発芽液中に生産されるエリシター(E)はβ-D-Glc(1→6)-α-D-Man-α-D-Man(GMM)がセリンを介してペプチド鎖とO-グリコシド結合した高分子糖ペプチドである(Matsubara and Kuroda 1987)。本研究では、E活性の最小単位を明らかにするため、上記の三糖を基本単位とした9種の糖ペプチド(SG)を合成し、エンドウの防御応答に対する影響を調べた。何れのSGもファイトアレキシンを誘導したが、その活性はモル濃度当りではEと比べて弱かった。一方、無傷組織をSGで処理した場合、GMM-Ser(SG1)を除くGMM-Ser-Pro(SG2)~(GMM)₃Ser3-Pro3(SG9)は局所的な抵抗化を誘導し、GMM-Ser2-Pro2(SG4)~SG9はin vivoでO₂⁻生成を誘導した。さらに、SG4~9はin vitroで細胞壁ATPaseを活性化し、組織でのO₂⁻生成、および感染阻害作用との強い相関性が認められた。以上の結果から今回用いたSGはモデルEとして有用であるものと考えられる。

2pF07

タバコ培養細胞を用いたキシラーゼによる細胞死誘導機構の解析

矢野 明^{1,2}、鈴木 馨¹、内宮博文²、進士秀明¹

(¹工技院・生命研・植物分子生物、²東大・分生研・細胞機能)

植物の重要な感染防御応答である過敏感反応死の分子機構はほとんど解っていない。我々は防御反応のシグナル伝達を解析する過程において、品種特異的に過敏感反応様の応答を引き起こすエリターとして知られている *Trichoderma viride* 由来のキシラーゼが、タバコ培養細胞 (XD6S) の 47kDa プロテインキナーゼ (47kD-PK) の活性化、活性酸素の発生、防御遺伝子の発現、さらには細胞死を誘導する事を見出し、これを過敏感細胞死過程のモデル実験系としてその分子機構の解析を進めている。

プロテインキナーゼの阻害剤及びカルシウムチャンネル阻害剤は、エリターによる 47kD-PK の活性化を抑制すると同時に細胞死の誘導も抑制した。しかし NADPHoxidase 阻害剤は過酸化水素の蓄積を阻害したが、47kD-PK の活性化及び細胞死はともに抑制しなかった。一方、蛋白質分解酵素阻害剤は細胞死を阻害したが 47kD-PK の活性化及び過酸化水素の蓄積は阻害しなかった。

2pF08

ダイズ根粒に特異的な SUPERMAN ホモログについて

河内 宏、程 憲国¹、田島茂行¹、高辻博志

(農水省生物研、¹香川大農)

マメ科植物根粒の形成過程で特異的に発現が誘導される一群の遺伝子は *nodulin* 遺伝子と総称され、根粒形成と共生窒素固定の成立に重要な役割を担うと考えられている。私たちはさきに、ダイズ根粒から多くの新規 *nodulin* 遺伝子を単離したが (MGG, 238:p.106, 1993)、そのうちの一つ、GmN479 は、アラビドプシスの花器形成に関与する転写調節因子 SUPERMAN (sup) のファミリーに属すると思われる Zn-finger 蛋白質をコードしていた。GmN479 は窒素固定活性の発現とほぼ同時期に Lb など多くの後期 *nodulin* 遺伝子とともに発現するが、mRNA のレベルはきわめて少ない。発現部位を特定するため、本遺伝子のプロモータと GUS のキメラ遺伝子をダイズ毛状根に導入した結果、根粒の感染細胞においてのみ GUS 活性を認めた。一方、GmN479 と Sup とのホモロジーに基づいて、マメ科植物のうちで現在もっとも安定した形質転換系が確立されている *Lotus japonicus* (ミヤコグサ) のゲノムから PCR 法によって、Sup ファミリーに属すると思われる 4 種の互いに異なる DNA 断片を得た。これらをプローブとしてノーザン分析を行ったところ、少なくともそのうち 1 種は根粒にのみ発現しており、予想されるアミノ酸配列も GmN479 と類似していた。そこで、この cDNA を用いて *L. japonicus* の形質転換実験を行っている。

2pF09

根粒形成過程に異常を示す 11 系統のミヤコグサ

Lotus japonicus 突然変異体

今泉 (安奈) 温子、川口正代司、小岩弘之¹、赤尾勝一郎²、庄野邦彦 (東京大学・生命環境、¹岩手生物工学研、²農業生物資源研)

マメ科植物・根粒菌共生機構に関与する共生関連遺伝子の研究は、これまで主に根粒菌側において発展してきたが、宿主植物の根粒器官形成に直接関与している遺伝子及びその機能の解析はほとんど進んでいない。

本研究において我々は、根粒菌との初期相互認識から、根粒器官形成に到る過程に宿主植物側のどのような遺伝子が関与し、共生関係を成立させているかを解明することを目的として、分子遺伝学的解析に好適な形質を有する、マメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* B-129 'Gifu' を用いて、共生変異体の作出を行った。

ミヤコグサ (B-129 'Gifu') 種子を EMS 処理し、得られた 17,000 の M2 種子についてスクリーニングを行った結果、根粒形成過程に異常を示す変異体 11 系統を単離した。これら 11 系統は、根粒を全く着生しない変異体 (Nod⁻)、少数の根粒を着生する変異体 (Nod[±])、窒素固定活性を有さない根粒を着生する変異体 (Nod⁺Fix⁻) の三段階に分類された。現在進行中の交配実験より、現時点で、宿主と根粒菌の初期認識に少なくとも 3 つの遺伝子が、根粒の窒素固定の機能発現において少なくとも 2 つの遺伝子が関与していることを確認した。さらに、これら変異体の表現型の詳細な解析から、根粒菌との初期認識から窒素固定開始に到る根粒器官形成過程が少なくとも 5 段階に分けられることが示唆された。

2pF10

酵母細胞における外来性蛋白質・ルシフェラーゼの発現の変化とストレス蛋白質の関与

海野けい子、保坂 真穂、岸戸 崇浩、岡田 昌二、Susan Lindquist¹ (静岡県大・薬・放射、¹シカゴ大・HHMI)

ストレス蛋白質は分子シャペロンとして、細胞内で重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。しかし、最もよく調べられている 70 kDa のストレス蛋白質 (hsp70) においても、ファミリー蛋白質間での機能の違い、あるいは相補性についてはいまだ不明な点も多い。

hsp70 の機能を更に明らかにするため、構成的 hsp70 の SSA1 と SSA2 を欠損した酵母細胞 (ala2) を用い、ルシフェラーゼの発現について検討を行った。その結果、ala2 細胞では野生株細胞に比べ顕著に活性が低下していたことから、ルシフェラーゼ蛋白質の発現における hsp70 の関与が示唆された。そこで蛋白質発現における hsp70 の役割について検討を行い、以下の結果を得た。1) 酵母細胞に熱処理等のストレスを与えると、hsp70 の発現増大に伴い、ルシフェラーゼ活性が高まった。2) ala2 細胞では SSA 蛋白質の他のメンバーである SSA3/4 の発現が高まっているが、その発現量に比例してルシフェラーゼ活性が高まっていることが見いだされた。3) 他の hsp70 ファミリー蛋白質である SSB および KAR2 とは相関性が見られなかった。4) ala2 細胞では hsp26、hsp90、hsp104 等のストレス蛋白質の発現が顕著に増大していたが、これらの発現量とルシフェラーゼ活性の変化との間には相関性は見られなかった。これらのことから、ルシフェラーゼの発現には hsp70 を必要とし、SSA1 および SSA2 の欠損は部分的には SSA3/4 で補うことができることが示された。

一方、ルシフェラーゼの活性増大に比例して細胞増殖速度は遅くなったことから、SSA3/4 の発現増大は ala2 細胞の増殖速度を低下させる一因になっていることも示唆された。

2pF11

遺伝子のポジショナルクローニングのための機能検定に必要な、長いゲノム断片によるイネの形質転換法の確立

秋山康紀¹, 中村信吾¹, 鈴木隆夫^{1,2}, Iwona Wisniewska^{1,3}, 佐々木典子¹, 川崎信二¹

(¹農水省・生物研, ²サカタのタネ, ³味・ランド 植物育種研究所)

ポジショナルクローニング法はこれまで困難であった情報伝達・調節・形態形成・農業形質等に関わる遺伝子の単離を実現するものであり、植物生理学分野でも広範な応用の可能性がある。我々は、イネのいもち病真性抵抗性遺伝子のポジショナルクローニングによる単離を目指して、これまでにイネゲノムのBAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターによる平均挿入長 155kb, ゲノム相当のゲノムライブラリーの作製と遺伝子近傍の 5-800 kb に及ぶ DNA contig の形成を行ってきた。しかし、最終段階で contig に含まれる遺伝子の機能検定を行うための効率良い形質転換系が存在しなかったため、*Agrobacterium* を用いて長い染色体断片をイネに形質転換できるバイナリーベクターを開発した。実際にヒトの 40kb の染色体断片を、DNA の再編成も起こさずに効率良くイネに形質転換することができた。現在、このシステムを用いて優性の抵抗性遺伝子を含んだ、コスミドより安定なサブゲノムライブラリーを構築して、目的遺伝子の同定を試みている。

3aF01

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子発現の低温誘導機構の解析

鈴木石根, Malay K. Ray, Dmitry A. Los, Michael Malakhov, 村田紀夫 (基礎生物学研究所)

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 の培養温度を低下させると多価不飽和脂肪酸の合成に関わる不飽和化酵素遺伝子 *desA*, *desB*, *desD* の発現が誘導され、細胞膜脂質を構成する脂肪酸の不飽和化が促進される。これは低温による膜脂質の流動性の低下を補償するための最も重要な適応機構であると考えられるが、これまで低温検知の機構およびその情報伝達の機構は明らかにされていない。そこでまず、低温により最も顕著に発現が誘導される ω 3 不飽和化酵素遺伝子 (*desB*) プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*) を融合した株を作製し、*desB* 遺伝子の発現を発光により検出できる系を開発した。この株の染色体上にスペクチノマイシン耐性遺伝子をランダムに挿入することにより変異を導入し、*desB* 遺伝子の発現に異常をきたした株を約60株選別した。それらの変異株の細胞膜の脂肪酸組成を比較したところ、通常の培養温度 (35°C) においても多価不飽和脂肪酸含量の高い4株が得られた。このことは不飽和化酵素遺伝子の発現調節に高温条件下で発現を抑制する機構の存在を示唆するもので、現在原因遺伝子の同定を試みている。

3aF02

Trans- AND cis-INTERACTIONS IN THE TEMPERATURE-DEPENDENT EXPRESSION OF DESATURASE GENES

Michael MALAKHOV, Dmitry LOS, Norio MURATA; Natl. Inst. for Basic Biology, Okazaki 444

Expression of the *desB* gene for the ω 3 desaturase in *Synechocystis* PCC6803 is up-regulated during acclimation to low temperature. In order to identify DNA regions which are responsible for the regulation of transcription of the desaturase gene, we prepared mutant strains of *Synechocystis* that carried the *desB* gene with altered sequences in the 5'-upstream regions. We found that the region between -96 to -20 bp (as referred to the transcription start) was involved in the regulation. The DNA-mobility shift assay with the DNA fragment corresponding to this region demonstrated the presence of several specific DNA-binding proteins. One of these proteins was active at 22°C but not at 34°C. Another one was active both at 22°C and 34°C. This protein required a minimum 15 bp DNA fragment (positions -38 to -24 bp) for the formation of a stable DNA-protein complex. Single-base mutagenesis of this 15 bp fragment indicated that substitution of any nucleotide in the sequence GCCTTC (-32 to -27) abandoned formation of DNA-protein complex, whereas single- or multiple-base substitutions in surrounding sequences (-38 to -33 and -26 to -24) had no effect on binding.

3aF03

ラン藻 *Synechococcus* PCC7002 に存在する2種類のGroELホモログのシャペロン機能

嘉数江美子, 福嶋葉月, 林秀則 (愛媛大学・理・物質理学)

熱ショックタンパク質 GroEL (HSP60) はほとんどの生物に保存されており、部分的に変性したタンパク質の再生や新たに合成されたタンパク質の高次構造形成を助する分子シャペロンの機能がある。ラン藻には大腸菌の *groEL* 遺伝子のホモログとして2種類の *groEL* 遺伝子 (*groEL-1*, *groEL-2*) が存在するが、両者の機能の違いは知られていない。本研究ではラン藻の2種類の *groEL* 遺伝子産物について、シャペロン機能について解析した。

Synechococcus PCC7002 の GroEL-1 と GroEL-2 に His タグを結合したものを大腸菌において大量発現させ、精製した。それぞれを単独でリン酸緩衝液中に保持し、形成される多量体のサイズを Superose 6 HR カラムによって分析した結果、大腸菌の GroEL の14量体よりもやや小さい多量体の存在が観察された。一方尿素によって変性させた α -グルコシダーゼに各 GroEL を添加し、再活性化の割合を解析した結果、いずれの GroEL にも再活性化能があり、シャペロンとしての機能があると推定される。現在、それぞれの GroEL ホモログに関して、ラン藻の可溶性タンパク質に対するシャペロン機能に差があるか検討中である。

3aF04

Synechococcus sp. PCC 7942の新しい低分子量HSP遺伝子および*htpG*の解析

田中直樹、檜山哲夫、仲本準（埼玉大・理・分子生物）

我々は、ランソウ*Synechococcus* sp. PCC7942から、未知の低分子量HSP遺伝子を単離した。その遺伝子は、推定分子量8.3kDaのタンパク質をコードすることから、*hsp8.3*と命名した。

*hsp8.3*のプロモーター部位には、 σ^{32} によって認識される熱ショックプロモーターに類似の配列やインバーテッドリピート配列は存在しなかった。また、*hsp8.3*は、45℃、15分の熱ショック(通常の培養温度は30℃)により転写産物量が10倍増加した。

Hsp8.3の機能を解析するために、*hsp8.3*にカナマイシン耐性遺伝子を挿入して破壊した変異株を作成した。変異株と野生株を高温処理(40~50℃)したときの生存率を調べたところ、変異株は42℃以上で顕著に低下した。したがって、Hsp8.3は細胞の高温耐性に関与することが示唆された。

さらに、我々は、真核生物の*hsp90*に相同性のある遺伝子、*htpG*をPCRにより増幅した。*htpG*は、熱ショック(45℃,15分)により、転写産物量が数倍増加した。現在、*htpG*の全構造とその発現を解析中である。

3aF05

好熱性ランソウ*Synechococcus vulcanus*の低分子量HSPの精製およびその遺伝子の解析

Sanjit K. Roy、田中直樹、檜山哲夫、仲本準
(埼玉大・理・分子生物)

好熱性ランソウ*Synechococcus vulcanus* (培養温度50℃)に熱ショック(63℃)を与えると、細胞内に60、16および12kDaのタンパク質が顕著に蓄積する。その内の一つである16kDaのタンパク質(HSP16)を精製し、そのN末端および内部アミノ酸配列を決定したところ、高等植物や酵母の低分子量HSPに相同性があることが明らかになった。現在、精製したHSP16を用い、その生化学的な性質および機能、とりわけ分子シャペロンとしての機能を解析している。

次に、HSP16のN末端および内部アミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、*Synechococcus vulcanus* ゲノムを鋳型にして、PCR法により130bpのDNA断片を増幅した。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列はN末端および内部アミノ酸配列と一致した。したがって、このPCR産物はHSP16の遺伝子の一部であると断定した。このPCR産物をプローブとして用い、ノーザンブロット解析をした結果、*hsp16*の転写産物量は63℃の熱ショックにより顕著に増加した。現在、*hsp16*の全構造を解析中である。

3aF06

クロレラ *lea* 遺伝子導入による形質転換タバコの作出

本城賢一、永石賀子、松本弘子、波多野昌二（九州大学・農学部・食糧化学工学科）

演者らはクロレラ(*Chlorella vulgaris* C-27)の耐凍性獲得に強く関与していると考えられるHIC6蛋白質(LEA蛋白質; Late Embryogenesis Abundant)について報告してきた。今回、本蛋白質の耐凍性獲得への関与を明確にするために、LEA蛋白質をコードする*hiC6*遺伝子をCaMV35Sプロモーター下流に結合し、アグロバクテリウムを介してタバコへ導入し、耐凍性付与を試みた。

得られた形質転換体10個のクローンについて、サザンブロットングおよびウェスタンブロットング解析を行い、このうち4個のクローンで、*hiC6*遺伝子の導入およびHIC6蛋白質の発現を確認した。これらの形質転換体における本蛋白質の発現量は少なくとも可溶性蛋白質の0.01~0.1%を占めた。本蛋白質の発現により、形質転換タバコの凍結開始点は野生型のものとは比べ、約0.5℃下がることが示された。現在、耐凍性獲得の程度を調べるため、形質転換タバコのLT₅₀を測定している。

3aF07

タバコの葉緑体局在性低分子量熱ショックタンパク質のcDNAクローニング

イービョンヒョン
李 炳顯, 山本 直樹, 徳富(宮尾)光恵 (農水省・生物研)

生物を高温にさらすと様々な熱ショックタンパク質(HSP)の合成が誘導される。高等植物においては、15-30kDaの低分子量HSPが熱ショックで誘導される主要なHSPであり、細胞質、小胞体、ミトコンドリア、葉緑体それぞれに局在する低分子量HSPが合成される。本研究では、タバコ(*Nicotiana tabacum* cv. SR-1)より葉緑体局在性低分子量HSP(CiHSP)のcDNAクローンの単離を行った。

ペチュニアのCiHSPの遺伝子断片をプローブとして用いて、2種類のcDNAクローンを単離した。そのうちひとつは、CiHSPをコードすると仮定するとコード領域に1塩基の挿入があり、そこでフレームシフトを生じることがわかった。このフレームシフトを無視すると、2種類のcDNAから推定されるアミノ酸配列は89.7%相同であり、葉緑体内への移行のためのトランジットペプチド、すべての低分子量HSPに特徴的なコンセンサス領域I、II、および、CiHSPに特徴的なコンセンサス領域IIIをもつことがわかった。ゲノミックDNAのPCR実験の結果から、*N. tabacum*は2種類の異なるCiHSP遺伝子をもつこと、一方、祖先種である*N. sylvestris*と*N. tomentosiformis*はそれぞれひとつの遺伝子のみをもつことがわかった。このことは、*N. tabacum*のふたつのCiHSP遺伝子はそれぞれ、*N. sylvestris*と*N. tomentosiformis*に由来する可能性が示唆された。

3aF08

カワヤナギDnaJ homolog の発現特性
二村典宏、篠原健司（農水省・森林総研）

我々は、カワヤナギ(*Salix gilgiana*)から大腸菌のDnaJと相同性を示す2種類のcDNAクローン(pSGJ1, pSGJ2)を単離した。pSGJ1とpSGJ2は、酵母のDnaJ homologであるYDJ1/MAS5に43.7%の相同性を持つ47.5kDのタンパク質(SGJ1)をコードする。pSGJ2はpSGJ1の完全長の塩基配列に加えて三つのイントロンと考えられる領域を含んでいた。pSGJ2はSGJ1の前駆体mRNAに対するcDNAクローンと考えられる。SGJ1の転写産物(1.7kb)は雄花で多く発現し、他の器官での発現のレベルは低かった。生殖器官の発達過程でSGJ1の発現を調べたところ、雄花では三種類の異なるサイズの転写産物(2.5kb, 1.7kb, 1.1kb)が検出されたが、雌花では一種類のサイズの転写産物(1.7kb)が発達段階の初期にのみ発現していた。また、1.7kbの転写産物は雄花の各発達段階を通じて恒常的に発現しているのに対し、1.1kbの転写産物は発達段階の初期に、2.5kbの転写産物は発達段階の後期にそれぞれ特異的に発現していた。SGJ1の発現は熱ショックや塩ストレスによって一過的に誘導され、mRNAのレベルは熱ショックで最大約3倍、塩ストレスでは約6倍に増加した。この誘導のレベルは塩生植物 *Atriplex nummularia* 由来の *ANJ1* に比べ、著しく低い。以上の結果は、SGJ1がカワヤナギの生殖器官の発達段階において、熱ショックによる影響を受けにくいheat shock cognateとして重要な役割を担っていることを示唆している。

3aF09

マイナス温度に曝されたコムギで誘導されるハードニングの第2ステージとフラクタン代謝
吉田みどり、阿部二郎（農水省、北海道農試）

厳寒地での越冬植物のハードニング過程には少なくとも2つのステージが存在し、各ステージに関わる遺伝子が異なることが提唱されている。演者らは、自然条件下で生育したコムギのハードニング過程は、組織の水分量の減少を伴って耐凍性が向上する第1ステージと水分量は減少せず水の束縛度を高めることで耐凍性が増加する第2ステージに分かれ、後者は最低気温がマイナスになる時期に誘導されることを明らかにした(Yoshida et al. 1997)。このハードニング後期に耐凍性を向上する耐凍型品種と向上しない耐雪型品種を用いて、ハードニング中の組織内の糖の成分と主要蓄積多糖類であるフラクタンの代謝に関わる酵素SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase), Invertase, FEH (fructan exohydrolase) 活性を調べた。両者はハードニング中に糖を蓄積するが、マイナス気温に曝される時期になると耐雪型はフラクタン、耐凍型は単・二糖類含量の増加が顕著になった。人工環境下で2℃でハードニングさせたコムギを-4℃及び-8℃で処理すると、葉またはクラウン組織で、SSTとFEHの活性の変化の動向とそれらの活性のレベルに、マイナス温度環境で耐凍型と耐雪型の差異が現れた。

Yoshida et al. (1997) *Physiol. Plant.* in press.

3aF10

Anacystis nidulance由来アシル脂質アサチユラーゼ遺伝子を導入したタバコの耐冷性

藤井敏雄、西澤治、東瑞恵、関口桂子、戸栗敏博
(キリンビール基盤技術研究所)

植物の耐冷性は生体膜、とくにチラコイド膜における脂質の不飽和度と関連が深いことが示唆されている。我々はラン藻 *Anacystis nidulance* より $\Delta 9$ acyl-lipid desaturase 遺伝子(des9)を単離し、CaMV35S promoter、RuBisCo small subunit のtransit peptideを用いてタバコ形質転換体を作成、その耐冷性について検討した。形質転換植物の脂肪酸を分析すると葉、茎、根において対照には存在しない palmitoleic acid (16:1 cis) が検出され、脂質全体の不飽和度が5~10%上がっていた。脂肪酸組成の変化はPG等の主として葉緑体自身で合成される脂質のみならず、PC、PE等の主として細胞質小胞体で合成される脂質でも見られた。また種々の耐冷性検定を行ったところ、形質転換体は対照に比較して低温傷害を受けにくかった。さらに15℃、10℃という低温において対照に比して有意に成長性が優っていた。25℃の成長性では対照と有意な差は認められなかった。低温以外のストレスに対する抵抗性について現在検討中である。

3aF11

低温馴化過程におけるオーチャードグラスのタンパク質組成の変動

荒川圭太、吉田静夫（北大、低温研）

牧草などとして利用される多年生草本植物のオーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.) は、秋から冬にかけて低温馴化の過程で耐凍性が著しく増加する。これにともなってタンパク質組成も大きく変動することが知られているが、耐凍性との関連性については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、耐凍性獲得に関連のあるタンパク質の生理機能について解明することを目的とし、低温馴化過程で誘導されるタンパク質の解析を開始した。今回は、とくに耐凍性において重要とみなされている細胞膜のほか、可溶性画分やアポプラスト領域のタンパク質組成の変動について注目した。

1996年6月から12月にかけて野外からオーチャードグラスを採集し、耐凍性(LT₅₀)の検定を電解質漏出法によって行なったところ、LT₅₀は-3℃から-19℃まで顕著に増加した。そこで、この組織から細胞膜画分や可溶性画分を抽出し、SDS-PAGEで解析したところ、各画分において低温馴化過程で増加するタンパク質が複数検出された。現在、アポプラストタンパク質を含むものと考えられている酸性溶液抽出画分の解析と併せ、低温誘導性のタンパク質について生化学的解析を試みている。

3aF12

凍結による細胞質の酸性化とその要因
村井麻理・吉田静夫 (北大・低温研)

植物が細胞外凍結による脱水ストレスを受けるとき、細胞内環境が可逆的あるいは不可逆的に変化することが予想される。本研究では、細胞生存に重要と思われる細胞質 pH の凍結融解過程における変化を、蛍光レシオイメージ法により測定し、その要因について検討した。

冬コムギ葉肉細胞から単離したプロトプラストでは、低温馴化の有無に関わらず、細胞質 pH は凍結により低下することが明らかになった。しかし、その低下は低温未馴化の細胞においてより劇的であった。さらに低温未馴化の細胞では、細胞質 pH の低下が比較的小さい細胞群と、温度の低下につれて大きく低下する細胞群が見られた。後者は融解過程において pH の回復が見られず、融解時に細胞崩壊に至るものも多かった。このように、細胞質の pH が凍結中に不可逆的に低下することは、傷害に関連した重大な変化が凍結中に発生したことを示唆している。

細胞質 pH の低下をもたらす要因には、3つの可能性が考えられる。第一は、凍結脱水にともなう細胞質溶液の濃縮と温度の低下による、酸・塩基の解離定数の変化である。第二は、細胞質 pH がある限界以下に低下すると、pH 低下をさらに加速する何らかの要因が発生することである。第三は、細胞膜・液胞膜の損傷または膜輸送機能の低下である。今後は、これらの要因の相互関係を考慮しながら、凍結による細胞質の酸性化と細胞傷害との直接的な因果関係について明らかにしたいと考えている。

3aF13

ABAにより冬小麦懸濁培養細胞の細胞膜中に蓄積する 19-kDa 細胞膜タンパク質と耐凍性の関係
小池倫也、竹澤大輔、荒川圭太、吉田静夫 (北大・低温研)

本研究は、冬小麦 (*Triticum aestivum* L. cv. Chihoku) の懸濁培養細胞を ABA 処理することによって誘導される耐凍性の発現機構を解明することを目的とする。我々は耐凍性誘導に伴って起こる細胞膜タンパク質の変化に注目し、50 μ M ABA 存在下、23°C で 5 日間培養した冬小麦懸濁培養細胞は LT50 が -21.6°C という、高い耐凍性を獲得した。この培養細胞から細胞膜と重く膜画分を単離し、SDS-PAGE による膜タンパク質の分析をおこなったところ、ABA 処理した培養細胞由来の細胞膜に 19-kDa のタンパク質が顕著に蓄積することが明らかになった。そこでこの 19-kDa 細胞膜タンパク質 (AWPM-19) を高純度 SDS-PAGE により精製し、N 末端のアミノ酸配列を決定した。さらに、AWPM-19 をコードする cDNA クロノンを ABA 処理した細胞から調製した cDNA ライブラリーから PCR により単離した。この cDNA クロノン (WPM-1) は 18.9-kDa の疎水性タンパク質をコードしており、4つの膜貫通ドメインと高い pI 値 (10.2) を有するものと推定された。WPM-1 mRNA の発現レベルは 50 μ M ABA 処理を開始して数時間で劇的に高まった。このことは WPM-1 が ABA 応答性遺伝子のファミリーに属することを示唆する。以上の結果は ABA によって誘導される細胞膜タンパク質が小麦培養細胞の耐凍性の発現に関与する可能性を示唆するものであった。

3aF14

温度ストレスにより誘導される遺伝子の
Differential Display法による検索
松尾友明、永山美香 (鹿児島大・農・生環)

ハウレンソウとフダンソウは、21°C を境にして生育量が逆転する。21°C より高温ではフダンソウの生育の方が良好で、逆に低温ではハウレンソウの生育が良好となる。著者らは、両者が高温、低温に耐性になるために特異的に発現する遺伝子があるのではないかと予想し、両者の温度に対する反応の違いを遺伝子の発現レベルで調べるため、Differential Display法を適用した。

ハウレンソウは 18°C で生育後 4°C、フダンソウは 24°C で生育後 33°C の温度処理をし、試料を得た。各試料から RNA を抽出し、cDNA を合成後、PCR 法で増幅した。得られた DNA 断片を clean gel で分離し銀染色で検出後、それぞれのバンドの違いを比較した。特徴的な変化を示すバンドを切り出し、PCR 法で再増幅した後、得られた DNA 断片の塩基配列を調べ、遺伝子の同定を試みた。

1aG01

鉄欠乏オオムギ根におけるムギネ酸生合成経路の研究VI
：ニコチアナミンアミノ基転移酵素の遺伝子配列と発現
高橋美智子、山口博隆、中西啓仁、西澤直子、森敏
(東京大・農学生命科学)

鉄欠乏条件下でイネ科植物の根から放出される“ムギネ酸”の生合成経路上の酵素、ニコチアナミンアミノ基転移酵素はニコチアナミンからデオキシムギネ酸のケト体への反応を触媒し、鉄欠乏ストレスによってこの酵素活性が誘導される。われわれは、このニコチアナミンアミノ基転移酵素の精製を試み、ニコチアナミンアミノ基転移酵素と思われる三つのペプチドの部分アミノ酸配列を決定した。この部分アミノ酸配列から推測して作成したプライマーを用いて、鉄欠乏処理したオオムギの根から作ったcDNAを鋳型にPCRを行った。これで生じた遺伝子の断片をプローブにして、鉄欠乏処理したオオムギの根から調整したcDNAライブラリーからスクリーニングし目的のcDNAを得た。この遺伝子は約1.6kbpで、酵母に導入すると酵素活性を発現した。また、ノーザン解析ではこの遺伝子の転写産物が鉄欠乏ストレスで増大することがわかった。

1aG02

酵母の鉄吸収変異株*ctrl1*の生長を回復させるオオムギのcDNAクローン
山口博隆、塩入孝之、森敏
(東京大・農学生命科学、名古屋大・薬)

1996年の鹿児島大会で、演者らは、酵母の鉄吸収変異株を利用した、「ムギネ酸・鉄」のトランスポーターの遺伝子のスクリーニング系について発表を行なった。今回の発表では、そのスクリーニングの結果単離された、オオムギのcDNAクローンについての解析の考察を行なう。

酵母の鉄吸収変異株*ctrl1*は、high-affinityな銅の吸収能が欠損しているため、high-affinityな二価鉄の吸収機構が働かない。そのため、二価鉄の利用性の低い培地上では生育することができない。この*ctrl1*変異株に鉄欠乏条件下で栽培したオオムギ根から作成した、cDNAを発現させ、二価鉄の利用性を制限した培地上で生長が回復したものを選抜した。その中の一つから回収したcDNAクローンは再現性よく*ctrl1*変異株の生長を回復させることがわかった。この現象は培地中の鉄キレートが、ムギネ酸でなくても、クエン酸、EDTA、メシル酸アフェロキサミンの場合でも観察された。cDNAの塩基配列を決定すると、cDNAの全長は1924 bpで、452のアミノ酸からなる未知のタンパク質をコードしていると考えられた。ノーザン解析によって、オオムギの根においては鉄の栄養条件によらず、この遺伝子の転写物はほぼ同量存在することが分かった。これらの結果から、このcDNAは、「ムギネ酸・鉄」と特異的に相互作用するものではないが、オオムギの根において、鉄の吸収、あるいは鉄の代謝、利用性に関与している、新規のタンパク質をコードしていると考えられた。

1aG03

鉄欠乏オオムギの根において特異的に発現する
ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の解析
鈴木一矢、板井玲子、鈴木宏一郎、中西啓仁、森敏
(東京大・農学生命科学)

オオムギの根を鉄欠乏状態におくことにより、そのタンパク質の組成の変化を二次元電気泳動で調べた。そしてその変化が増加傾向にあるものに7つについて着目し解析を行った。この中でも、最もその増加が顕著であった“W spot”について報告する。アミノ酸配列分析の結果、このスポットはポテト・ミトコンドリア由来のギ酸デヒドロゲナーゼ(FDH)に高いホモロジーを示したので、得られたアミノ酸配列をもとにcDNAライブラリーからこれをクローニングし、全DNAの塩基配列を決定した。この結果、この塩基配列はこれまでに知られているFDHの配列と比較してアミノ酸配列のレベルで50-80%程度のホモロジーを示し、この遺伝子はFDHと考えられた。この遺伝子についてノーザンハイブリダイゼーションによる解析を行ったところ、鉄欠乏の根においてのみ発現が認められ、鉄供給の根、葉、および鉄欠乏の葉では発現は認められなかった。さらにFDHの活性を未変性ゲル上で測定したところ、ノーザンハイブリダイゼーションの結果と一致して、鉄欠乏の根においてのみ活性が認められた。このことから、オオムギの鉄欠乏の根において、FDHがその活性を持って特異的に発現していることが明らかになった。

1aG04

Synechocystis sp.PCC 6803のCP43'及びフラボドキシシン遺伝子破壊株の作製及び表現型の解析
鈴木豊子、仲本準(埼玉大・理・分子生物)

鉄ストレス条件下では、ランソウなどの微生物はフラボドキシシンを誘導し、フェレドキシシンを代替すると考えられている。単細胞性のランソウでは、フラボドキシシン遺伝子(*isiB*)は光化学系IIのCP43に類似したタンパク質CP43'をコードする*isiA*遺伝子の下流に存在し、鉄欠乏下でのみ発現する*isiAB*オペロンを構成している。

本研究において、我々はCP43'やフラボドキシシンの鉄欠乏条件下での機能を明らかにするために、*isiAB*及び*isiB*を不活性化させた変異株を、遺伝子ターゲティング法を用いて作製した。現在それら変異株の生化学的解析を行っている。

また、かずさDNA研究所により報告された*Synechocystis* sp.PCC 6803に存在する5種類のフェレドキシシンと相同な遺伝子のうち、3種類についてノーザン・プロット解析を行い、これらの鉄欠乏条件下での転写制御に関する解析を進めている。

1aG05

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 における硫酸透過酵素サブユニット遺伝子の発現調節
鈴木英治, 青木三絵, 内山久美子 (茨城大・理・生物)

ラン藻において、硫黄源である硫酸イオンの取り込みに関与する硫酸透過酵素は、ペリプラズムの基質結合蛋白質、細胞膜貫通サブユニット、および細胞質のATP加水分解サブユニットからなり、それぞれ *sbpA*, *cysT/W*, および *cysA* 遺伝子によりコードされている。*Synechococcus* PCC 7942 株の *sbpA*, および *cysA* 遺伝子は染色体上で隣接し、逆方向に転写される。両端に *sbpA*, および *cysA* 遺伝子の 5' 末端を含む遺伝子間領域のDNA断片を用いて、レポーター遺伝子 *gus* (β -グルクロニダーゼ) との翻訳融合遺伝子を構築し、ラン藻に導入して、形質転換株での、GUS 活性を測定した。

sbpA-gus 融合遺伝子を持つ形質転換株での GUS 活性は、硫黄十分条件と比較して硫黄欠乏条件で大きく増大した。これに対し、*cysA-gus* 融合遺伝子を持つ形質転換株では、いずれの硫黄条件においても、高い GUS 活性が認められた。従って、*sbpA* と *cysA* 遺伝子のコード領域間 199 bp 中には、両方向に配向したプロモーターが存在し、そして硫黄欠乏時における調節様式は、両者の間で異なることが示唆された。

1aG06

低硫酸イオン環境におけるシロイヌナズナ硫黄同化系遺伝子群の発現応答
高橋秀樹, 笹倉紀子, 渡部晶子, 奥山律子, 斉藤和季 (千葉大・薬・薬用資源センター)

高等植物は外界から硫酸イオンを取り込みシステイン、メチオニンを生合成する。演者らはこれまでに、シロイヌナズナから配列の異なる3種の硫酸イオントランスポーター遺伝子 (*AST12*, *AST56*, *AST68*) を単離し、低硫酸イオン環境下で *AST68* の mRNA 発現量が根部特異的に約9倍まで増加することを明らかにした。すなわち、植物は低硫酸イオン環境に適応して、根において *AST68* の発現量を増加させることによりS源の補給を行っていると考えられる。さらに *AST68*, *AST56* は酵母の硫酸イオントランスポーター欠損変異株を相補し、*GAL1* プロモーターによりガラクトース培地中で³⁵S硫酸イオンを細胞内に取り込むことが確認された。また、硫黄同化系の他の遺伝子の発現応答について調べたところ、*AST68* に加え、APS還元酵素(*APR1*)、セリンアセチル転移酵素(*SAT1*)の mRNA 発現量が低硫酸イオン環境下で顕著に増大した。*APR1* は、硫酸還元系と硫酸転移反応系の分岐点に位置することから、低硫酸イオン環境下では硫酸還元/システイン合成の方向に調節が行われると考えられる。*SAT1* の生成物であるO-アセチルセリン(OAS)は原核細胞では硫黄代謝系の正の誘導物質であることが知られており、OASによるシロイヌナズナにおける硫黄代謝系遺伝子の発現応答についても報告する。

1aG07

シロイヌナズナの硫黄同化経路に関わる遺伝子群の栄養条件による発現制御の解析
中村達夫, 原田英美子, 山口 夕, 小泉 望, 佐野 浩
(奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター・植物細胞工学)

植物は無機の硫黄化合物からシステインを合成する経路を備えており、この同化経路に関わる遺伝子群が明らかにされつつある。私たちは、硫黄同化経路の制御を総合的に理解するために、シロイヌナズナの遺伝子(硫酸トランスポーター、ATPスルフィラーゼ、システイン合成酵素)についてノーザンプロット解析を行った。環境中の窒素源や硫黄源に対して発現量が増加することを確認した。さらに、報告されている全ての遺伝子(APSキナーゼ、PAPS還元酵素、亜硫酸還元酵素、セリンアセチルトランスフェラーゼ)について同様の実験を行っている。ATPスルフィラーゼを過剰発現させた組換えタバコを作製し、硫黄化合物に対する応答を調査中である。

1aG08

トマト根においてマンガン欠乏により発現が誘導されるタンパク質
北野高寛, 佐々木康二, 尼子克己, 高橋正昭 (大阪府大・農・応用生化学)

MnはFeに次いで要求量の多い植物の微量必須元素である。酸化還元、脱炭酸、加水分解反応触媒中心として機能し、その欠乏は光合成の酸素発生やストレス対応の失活を導く。Mnの土壌中からの吸収と必要とされる葉肉細胞への輸送の機構は不明で、我々は根形質膜に局在すると思われるMnトランスポーターを明らかにする目的で、Mn欠乏によって合成が誘導される金属結合タンパク質のスクリーニングを行ってきた。その結果、Mn欠乏処理したトマト根において1種類の膜タンパク質を同定することができた。そのタンパク質の性質について報告する。

あらかじめ1か月間完全水耕液で栽培した後、10日間Mnのみの欠乏処理を行なったトマト根より膜成分を調製した。可溶性膜成分のプロテアーゼ処理ペプチド断片のアフィニティークロマトにより金属結合性ペプチドを得た。そのアミノ酸配列に対して作成したオリゴヌクレオチドとオリゴ(dT)をプライマーとして、Mn欠乏処理したトマト根より調製したRNAを鋳型とするRT-PCRを行い、Mn欠乏により転写が誘導されていることを確認した。このPCR断片をクローニングしてその性質を決定した。