

1pG01

無酸素条件下でのニチニチソウ細胞のリン酸吸収
坂野勝啓、矢崎芳明、清田誠一郎（農水省・生物研）

ニチニチソウ培養細胞による無機リン酸の吸収はプロトンとの共輸送機構による。その速度はこれまでに報告されている植物細胞のどれよりも高い（およそ20 $\mu\text{mol/h/g}$ fresh weight）。このような能動輸送はプロトンポンプの作動に依存するので、たとえば、ATPレベルの低下する無酸素状態ではリン酸吸収は起きないと信じられている。しかし、無酸素（窒素通気）状態でも細胞質pHの変化はわずか(7.5→7.2)であるので、輸送の駆動力となるもう一つのパラメータである膜電位は、ポンプ依存性の電位成分が減少し拡散電位（おそらくカリウムの平衡電位）まで脱分極していても能動輸送を支持できる可能性がある。

無酸素状態で速度は低下するがニチニチソウ細胞は無機リン酸を吸収することができ、このとき培地pHの上昇に加えて、カリウムイオンの放出がみられる。これは共輸送によって流入するプロトンが引き起こした、有機酸の脱炭酸を伴うpH調節の結果であると理解されるが、電気生理学的には膜の脱分極によるものと解釈されよう。以上の結果は、ニチニチソウ細胞は無酸素状態でも細胞内外のpH差とカリウムの拡散電位を駆動力として能動的に無機リン酸を吸収することができることを示している。

1pG02

低リン栄養適応植物ルジグラスのタンパク質解析
増田泰三、米山忠克、片岡健治¹、小松節子²（農研センター・¹国際農研・²生物研）

低リン肥沃度地帯でも良好に生育することのできるイネ科熱帯牧草ルジグラス(*Brachiaria ruziziensis*)について、低リン栄養適応特性に関連して植物体タンパク質の解析を行った。【方法】ルジグラスとリン施用下での生育が良好なパーブルギニア(*Panicum maximum* cv. TD58)を対照として用いて、パーミキュライトとパーライトの1:1混合物を詰めた容量1.6Lのポットに9個体ずつ、0~2.0mMの範囲で5段階のリンレベルの培養液を与えて21日間栽培し、生育およびリン栄養状態に関連して、タンパク質の解析を行った。【結果】①ルジグラスは低リン供給下での生育反応が大きく、生長へのリン利用率も高い値を示すことから、植物体内でのリン有効利用特性を持つと考えられた。②二次元電気泳動により、植物体各器官のタンパク質の泳動パターンの比較を行ったところ、無リン培養液で生育したルジグラスの根で特異的な分子量約40kの酸性タンパク質が検出された。③このタンパク質のN末端および内部アミノ酸配列を分析し、ホモロジー検索を行ったところ、内部アミノ酸配列にはキチナーゼのキチン結合領域やキチンと高い相同性を持つものが認められたが、N末端アミノ酸配列との相同性は認められなかった。

1pG03

クエン酸放出型低リン酸耐性ニンジン培養細胞の糖代謝系の特性

小山博之、瀧田英司、原徹夫（岐阜大・農・植物細胞工学）

リン酸アルミニウムを単独リン酸給源として選抜した低リン酸耐性ニンジン培養細胞は、多量のクエン酸を培地に放出し、野生型細胞が利用し難いリン酸アルミニウムからリン酸を定量的に可給態化する。この細胞は、旺盛なクエン酸放出を維持する何らかの変異を持つと考えられる。

この現象を説明する特性として、低リン酸耐性細胞は、クエン酸代謝に関連する酵素群の内、野生型細胞に比較して、クエン酸合成酵素活性の増加と、NADP-イソクエン酸脱水素酵素活性の低下を合わせ持つ。この内、クエン酸合成酵素の活性は既知の配列に基づき作成したミトコンドリア型クエン酸合成酵素に対する抗血清による免疫滴定により完全に喪失し、滴定曲線は野生型と完全に一致した。このことから、低リン酸耐性細胞はミトコンドリア型クエン酸合成酵素が野生型細胞に比較して過剰に発現している細胞であることが示唆された。

1pG04

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の硝酸同化系オペロンの亜硝酸による活性化に関わる転写制御因子

愛知真木子、小俣連男（名大・農・応用生物学）

光合成生物であるラン藻は主要な窒素源として硝酸イオンを利用している。ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942では、硝酸イオンの同化の過程をつかさどる酵素の遺伝子群が亜硝酸還元酵素の構造遺伝子 *nirA* を先頭にしてオペロン (*nirA* オペロン) を形成している。*nirA* オペロンの上流には、*nirA* と逆向きに転写される *nirB* および *ntcB* 遺伝子から成る *nirB* オペロンが位置しており、硝酸イオンの効率的な同化に必要であることが示されていたが、*ntcB* の具体的機能は不明であった。本研究では、*NtcB* がLysR型のDNA結合タンパク質であることに注目して、*NtcB* と *nirA* オペロンの転写の関係を調べた。*nirA* オペロンの転写はアンモニアの存在下で抑制されているが、アンモニアの除去あるいはMSX（グルタミン合成酵素阻害剤）の添加によって脱抑制され、亜硝酸イオンによってさらに活性化される (Kikuchi, H. et al. J. Bacteriol. 178:5822-5825)。ところが *ntcB* 欠失変異株では、*nirA* オペロンの転写はMSXの添加やアンモニアの除去によって脱抑制はされたが、亜硝酸イオンを添加しても活性化されなかった。以上の結果から、*NtcB* は亜硝酸イオンにตอบสนองして *nirA* オペロンを正に制御する転写因子であると結論した。さらに、「アンモニアの除去」という実験操作が自然界における窒素源の枯渇という環境変化に相当することに注目し、「窒素欠乏による脱抑制」と「基質による活性化」という硝酸同化系遺伝子の二重の制御の環境適応における意義について考察した。

1pG05

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の *nirA* オペロンの転写制御に関わる *cis* element の解析

前田真一、川口由利子、大江孝明、小俣達男
(名古屋大・農・応用生物科学)

Synechococcus sp. PCC 7942 の硝酸同化系遺伝子群から構成される *nirA* オペロンの転写は、アンモニアの存在下では抑制され、培地からアンモニアを除いたりアンモニアの固定を阻害すると脱抑制されて発現する。また脱抑制条件下では、亜硝酸イオンが *nirA* オペロンの転写をさらに活性化する。*nirA* オペロンの上流には、硝酸同化活性の最大発現に必要な *nirB* オペロンが *nirA* オペロンと逆向きに存在し、*nirA* と同様アンモニアによる負の制御を受けている。*nirA* オペロン、*nirB* オペロンの転写活性化には転写制御因子 NtcA が必須で、両オペロンの間の 286 bp の領域には 3 つの NtcA 結合部位 (*nirI*, *nirII*, *nirIII*) が存在する。*nirI* と *nirIII* はそれぞれ *nirA* と *nirB* の転写開始の -10 領域からさらに 23 bp 上流に存在しプロモーターを構成していると考えられるが、*nirII* の機能は不明であった。ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして、*nirII* の *nirA* オペロンの転写制御への関与について解析を行ったところ、*nirII* の配列を変更すると、ルシフェラーゼがアンモニア存在下においても発現するとともに、脱抑制条件下での亜硝酸イオンによる活性促進が起らなくなった。これらのことから、*nirII* は、*nirA* オペロンの転写の抑制と促進の両方に関わっていることが明らかとなった。

1pG06

ラン藻のシアナーゼ遺伝子の窒素による制御

原野よしみ、鈴木石根¹、金子貴一²、小俣達男
(名古屋大・農・応用生物科学、¹基礎生物学研究所、²かずさ DNA 研究所)

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 にアンモニアを与えて窒素充足状態にするとアンモニア固定産物であるグルタミンからカルバミルリン酸を経てシアン酸が生成され、これが窒素充足のシグナルとして硝酸同化系の遺伝子群の転写を抑制するとともに、炭酸同化系の遺伝子群の転写を活性化する。シアン酸は、シアナーゼによりアンモニアと二酸化炭素に分解されるので、シアナーゼの活性発現に及ぼす窒素の影響を調べたところ、シアナーゼ活性の発現は窒素充足条件下では抑制され、窒素欠乏により誘導されることが分かった。このことは、シアナーゼが窒素栄養条件の変化によるシアン酸の濃度の変化を増幅することを示している。次に、シアナーゼ様のタンパク質をコードする *Synechocystis* sp. PCC 6803 の ORF (slr0899) の大腸菌での発現、および *Synechococcus* sp. PCC 7942 の slr0899 相同遺伝子の変異株の表現型の解析により slr0899 とその相同遺伝子がシアナーゼ遺伝子 (*cynS*) であることを確認し、これらの発現調節を調べた。その結果、*cynS* の転写が窒素欠乏条件下で誘導され、窒素充足条件下で抑制されたことから、シアナーゼ活性は遺伝子の転写段階で制御されていると結論した。

1pG07

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の硝酸還元酵素活性はアンモニアの添加によって阻害される

小林正樹、小俣達男、Rocio Rodríguez¹、Catalina Lara¹ (名古屋大・農・応用生物科学、¹Inst. Bioquím. Vegetal y Fotosíntesis, Fac. Biol. Univ. Sevilla-CSIC, Apdo. 1113, 41080 Sevilla, Spain)

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の、硝酸イオン/亜硝酸イオン輸送体はアンモニアを培地に添加すると可逆的に阻害される。この輸送体 (以後 NRT と略す) は、ABC 型輸送体に属し、4 つのサブユニット NrtA, B, C, D から構成されているが、NrtC が活性調節ドメイン (R ドメイン) を持っており、R ドメインのみを欠いた変異株 NC2 は細胞内への硝酸イオンの輸送がアンモニア非感受性となる。アンモニア非存在下で NC2 細胞内への硝酸イオンの蓄積を経時的に測定したところ、細胞内の硝酸イオンプールは 3 分後に最大になった後急速に減少し、6 分後には消失した。NC2 にさらに硝酸還元酵素の変異を導入した変異株 NC4 では蓄積した硝酸イオンのプールは安定に保持された。このことから、NC2 で見られた硝酸イオンプールの減少は硝酸還元酵素によって細胞内の硝酸イオンが同化されたためと結論した。アンモニア存在下では、NC2 でも硝酸イオンプールが最大レベルに保持されたことから *in vivo* では、NR 活性もアンモニアの添加によって阻害されると結論した。

1pG08

葉緑体包膜の亜硝酸輸送の分子機構

村田祐二、尼子克己、高橋正昭 (大阪府大・農・応用生化)

硝酸の還元的同化において、亜硝酸への還元は細胞質で行われ、生成した亜硝酸は直ちに葉緑体内に取り込まれアンモニアに還元される。照射された単離葉緑体は早い亜硝酸の取り込みを示す。我々は暗中でも高濃度の ATP の添加によりこの亜硝酸の葉緑体への早い輸送が生じることを見いだした。本研究では、単離葉緑体の ATP 依存の亜硝酸取り込みを解析し、葉緑体包膜のトランスポーターによる亜硝酸イオンの輸送機構を明らかにした。

50 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 0.33 M ソルビトールを含む調製用メジウムに懸濁した単離葉緑体は、同じ pH に調整された ATP では亜硝酸の取り込みを示さない。しかし、pH 5.5 よりも酸性条件では ATP による亜硝酸の早い取り込みが認められ、ATP と H⁺ 濃度勾配の両方を必要とすることが明らかとなった。亜硝酸の取り込みは ATP の添加により直ちに生じ、約 10 秒後に停止した後、外向きの流出が起こり、その後包膜内外の亜硝酸濃度が平衡化する。亜硝酸トランスポーターのアミノ酸配列には数カ所のリン酸化モチーフがある。トランスポータータンパク質の、亜硝酸と ATP の蓄積で誘導されたリン酸化による閉鎖の可能性についても述べる。

1pG09

亜硝酸トランスポーター形質転換によるタバコの窒素利用効率の変化

岡 桂子, 尼子克己, 高橋 正昭 (大阪府大・農・応用生化)

細胞質での硝酸還元の結果生成した亜硝酸の葉緑体への移行は、硝酸同化の効率を維持し、炭素固定とのバランスを調節するためにも重要な過程である。我々は亜硝酸の輸送を行う緑色組織に特有なトランスポーターcDNA (NiTR1) をクローニングした。本研究では、このNiTR1をセンス、及びアンチセンス方向に導入し、亜硝酸トランスポーターの発現量を増加や抑制、また、非緑色組織で発現させた形質転換タバコを用いて、植物の成長、窒素の吸収や移行、窒素同化効率に亜硝酸の輸送量の変化が与える影響について調べた。

T2, T3世代を10 mMの硝酸のみを窒素源として20日間水耕栽培したところ、アンチセンス株ではコントロールのGUSを発現した株と比べて地上部の高さが約15%、葉数が約20%にまで抑制された。主根の長さはGUS株と同程度だが、側根の発達は非常に悪く窒素欠乏症状を示した。センス株はしおれや根腐れを生じ窒素過剰症状を示した。どの株もアンモニアを含む培地に移すと症状は改善され開花・結実した。形質転換植物の硝酸吸収効率についても報告する。

1pG10

高濃度のカドミウムで培養したトマト細胞から検出されるフィトケラチン合成酵素の性質と機能

伊藤祥子, 井上雅裕, 遠山鴻, 城尾昌範 (愛媛大・理・生物)

植物は重金属ストレスにより金属結合ペプチドであるフィトケラチン(PC)を合成し、金属毒性を消去する。PCはPC合成酵素の働きでグルタチオン(GSH)から合成されると考えられている。私達はこれまで、トマト培養細胞を用いて細胞の成長に対するCdとCuの影響や*in vivo*におけるPC合成活性に関する研究を行ってきた。その結果、トマトの重金属耐性とPC合成酵素活性の間には密接な関係があることが明らかになった。本研究では、0-0.4 mMのCdで馴養したトマト細胞を用いて実際にPC合成酵素を抽出し、その量的、質的違いに注目した。まず粗酵素標品を用いて調べた結果、野生株、耐性株ともに主としてPC₃を合成するPC合成酵素が存在すること、その活性はCdイオンによって特異的に活性化されることが分かった。次に高濃度のCd(0.4 mM)で馴養した耐性株から抽出したタンパク質を陰イオン交換樹脂(HPLC)で分離し、各画分のPC合成活性を測定した。その結果、溶出時間17分目にPC₃を合成する酵素活性と21分目にPC₄を主に合成する酵素活性が分離検出された。PC₂とPC₅の合成活性は検出されなかった。同様のHPLCによる分離を野生株及び低濃度Cd馴養株を用いて試みたが上記のような明確な活性は検出できなかった。以上の結果から、Cdイオンによる酵素の活性化に加えて、質的に異なる酵素の誘導がトマト細胞のCd耐性に重要な機能を持つ可能性が考えられる。

1pG11

酵母 *Saccharomyces exiguus* の成長に対する重金属イオンと窒素源の影響

須合悦子, 井上雅裕, 遠山鴻, 城尾昌範 (愛媛大・理・生物)

酵母 *Saccharomyces exiguus* (THE1-16B) は、フィトケラチン、メタロチオネインなど細胞質性の金属結合物質を合成しないにもかかわらず、高いカドミウム(Cd)耐性を持つ。これまでの研究から、本酵母の特徴として、①主として細胞壁画分にCdを蓄積すること、②0.3 mM Cd存在下でも細胞壁グルカンの代謝が正常に保たれていることが明らかになっている。Cdは細胞壁のタンパク質成分と結合すると予想されるが、詳細は不明である。本研究では、培地の窒素(N)条件を変えて、*S. exiguus*の成長パターン及びCd耐性の変化について調べた。

通常パン酵母の培養に用いられるNリッチなYEYPD培地で培養した場合、*S. exiguus*の成長は指数増殖期から定常期に向けて正常な成長曲線を描いた。ところがN源を少量に抑えた(peptone 0.5%, yeast extract 0.4%)YHG培地で培養した場合、細胞は培養開始後12時間目まで急激に増加した後成長を一旦(約12時間)停止し、その後再び24時間成長するという2段階の成長を行った。次にYEYPD培地成分のpeptoneとyeast extract量を個別に変化させて調べた結果、特にpeptone量の減少によって成長曲線の二相性が現れることが分かった。この条件で0.1~0.4 mMのCdイオンを与えた。Cdは最初の成長には殆ど影響せず、二番目の成長のみを濃度に応じて阻害した。以上の結果から、培地のN源の有無が*S. exiguus*の成長パターン及びCd耐性を左右することが明らかになった。今後は細胞壁タンパク質量の変化及び培地の炭素源の影響について調べる予定である。

1pG12

タバコ培養細胞におけるアルミニウムと鉄による細胞死の解析(I)

池側広志, 山本洋子, 松本英明 (岡大・資生研)

タバコ培養細胞のAl処理を、栄養培地(但しAlと難溶性の塩を形成するリン酸を除く)で行うと、細胞は、アルミニウムと培地中の鉄により相乗的な増殖阻害を受ける。Alによる増殖阻害率は、Al処理細胞およびAl未処理細胞を、ともに処理後通常の培地に再懸濁し、その後の増殖を両者で比較する相対増殖率で求めてきた。この方法は、定量性に優れているものの、増殖阻害が、Al処理中の細胞死によるものなのか、Al処理後の培養中における分裂阻害や養分吸収阻害によるものなのかの区別が出来ない欠点があった。そこで、本研究ではタバコ培養細胞において、直接細胞死を定量する方法を確立するとともに、Al処理に伴う増殖阻害が細胞死によるかどうかを検討した。

Al処理をAlの濃度や処理期間を変えて行い、死細胞のみが取り込むEvans blue(EB)および生細胞のみ発色する3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)で染色後、細胞内の色素を抽出し吸光度を測定し、致死率ならびに生存率を求めた。

その結果、Alによる増殖阻害がAl処理期間中の細胞死によることが明らかとなった。

1pG13

タバコ培養細胞におけるアルミニウムと鉄による細胞死の解析 (II)

山本洋子、池側広志、山口雪子、蜂谷晶子、松本英明 (岡山大・資生研)

タバコ培養細胞を用いて、Fe共存下でのAlによる細胞毒性機構を明らかにする事を目的に、Al添加後、細胞死が最大になる18時間目までの、細胞におけるAlの集積、Feの集積、脂質過酸化、ならびに細胞死の相互関係について検討した。さらに、細胞死にH₂O₂が関わる可能性について、H₂O₂の生産量や、H₂O₂の捕捉剤を用いて検討した。これらの実験結果より、次の様な毒性機構のモデルが考えられる。

AlとFe(IIもしくはIII)を添加後、8時間程度の遅れの後にAl³⁺が原形質膜に結合し始める。Alの結合量に依存して、Alの結合部位で膜構造が変化し、Feイオンによる脂質過酸化反応(ラジカル連鎖反応の促進)を受けやすくなる。その結果、膜の機能が失われ、細胞死に至ると同時に、膜に結合したAlが細胞から漏出した電解質(e.g., リン酸)と沈殿を生じ細胞に集積する。

1pG14

タバコ培養細胞におけるアルミニウム耐性へのグルタチオンの影響について

山口雪子、山本洋子、松本英明 (岡大・資生研)

タバコ培養細胞はアルミニウム(Al)と二価鉄による脂質過酸化によって増殖阻害を起こす。さらに、この増殖阻害はグルタチオン合成阻害剤の処理により大きく増大する。また、Al感受性は細胞の増殖状態によって変動し、定常期やリン酸(Pi)欠乏細胞では一時的なAl耐性を示す。そこで、Al耐性の変化に対するグルタチオンの影響について検討した。

細胞のグルタチオン含量は対数増殖期の初期に一時的な減少があり、Al感受性の最も高い時期と一致した。しかし、対数増殖期中期以降およびPi欠乏細胞に量的変化はなく、Al耐性と相関性は認められなかった。

これに対し、グルタチオン還元酵素(GR)は対数増殖期の細胞に比べ、定常期およびPi欠乏細胞で活性が高かった。さらに、酸化型グルタチオン含量は対数増殖期の細胞においてのみ、Al処理に伴い著しく増加した。

以上のことから、タバコ培養細胞におけるAl耐性には、グルタチオン含量ならびにGRによるグルタチオン再生機能が関与していると考えられる。

1pG15

ハイドランジア葉中におけるアルミニウム結合物質の同定
馬 建鋒、平館俊太郎¹、野本享資²、松本英明 (岡山大・資生研、¹農環研、²サントリー生有研)

ハイドランジアはアルミニウム(Al)集積植物として古くから知られているが、その耐性機構についてはまだ明らかにされていない。本研究はAlが一番多く集積されている葉を用いて、葉中におけるAl結合物質の同定を試みた。葉中のAlの約80%が細胞溶液中に存在していた。²⁷Al-NMRを用いて、インタクトな葉と細胞溶液中のAlの存在形態を観察したところ、いずれの場合においてもケミカルシフトが11~12ppm付近にシグナルが観察された。このケミカルシフトは1:1 Al-クエン酸錯体のものと一致した。またゲル濾過を用いて、細胞溶液中のAl錯体を精製した結果、Alとクエン酸がおおよそ1:1の比で存在していることが明らかとなった。さらに、トウモロコシの根を用いたパイオアッセイ実験においてハイドランジア葉から精製したAl錯体は全く根の伸長阻害をしなかった。これらの結果はハイドランジア葉中においてAlはクエン酸と結合し、かつ錯体形成が体内におけるAlの無毒化機構であることを示している。

1pG16

アルミニウム耐性機構としてのクエン酸の分泌

馬 建鋒、鄭 紹建、松本英明 (岡山大・資生研)

植物のアルミニウム(Al)耐性機構についていくつかの仮説が提唱されているが、未だ明らかではない。我々はAlの形態によって毒性が異なるという点に着目して、根から分泌されるAlキレート物質の探索を行ってきた。その結果、Al耐性植物*Cassia tora*の根からクエン酸の分泌がAlによって誘導されたことが認められた。クエン酸の分泌はAl処理6時間後急激に増加した。クエン酸の分泌量はAl処理濃度に依存し、処理濃度が高くなるにつれ、分泌量も増加した。またクエン酸の分泌はリン酸欠乏によって誘導されず、ランタン(La³⁺)、イッテルビウム(Yb³⁺)によっても誘導されない。さらに、クエン酸の分泌はAl処理を解除した一日後、認められなくなった。これらの結果はクエン酸の分泌はAlによって特異的に誘導されることを示している。アルミニウムイオンはクエン酸と錯体を作ることによって毒性がなくなる。従って、*Cassia tora*において、クエン酸の特異的分泌はAl耐性機構の一つとして考えられる。

1pG17

小麦におけるケイ酸によるアルミニウム害軽減効果の解析

岡本庄司、馬 建鋒、松本英明（岡山大・資生研）

ケイ酸によるアルミニウム (Al) 毒性の軽減効果が多くの植物において認められた。しかし、この軽減機構についてまだ明らかにされていない。本研究は小麦（品種 Atlas66）を用いて、この軽減機構について解析した。30 μ M Al、20時間処理によって、小麦の根の伸長が約70%抑制された。しかし、1000 μ Mのケイ酸の添加によって、根の伸長阻害が軽減された。根のAl含量がケイ酸添加によって減少し、溶液中の毒性のAl³⁺の濃度も低下した。根の乾燥粉末を用いたAl吸着実験において、根へのAlの吸着量はケイ酸の前処理濃度の増加につれ、減少した。これは根へのアルミニウムの吸着サイトがケイ酸によってマスキングされていることを示唆している。現在、in vitroとin vivo系において更なる解析を行っている。

2aG01

空色西洋アサガオの開花に伴う花色変化の機構解明

吉田久美、岡崎芳次¹、加藤潔²、前島正義³、難波千宮子⁴、西村幹夫⁴、亀田清、近藤忠雄⁵（相山大・生活・食品栄養、¹大阪医大・生物、²名大・人間情報、³名大・農・生化、⁴生研・細胞生物、⁵名大・化測機セ）

空色西洋アサガオ (*Ipomoea tricolor*) の蕾は赤紫色で、開花に伴い空色になる。しかし、花卉色素のヘブンリーブルーアントシアニン (HBA)¹⁾に変化はなく、花色の差は生理条件の違いによることが強く示唆された。アサガオ花卉では、色素は上・下層の表皮細胞の液胞のみに均一に溶けており、海綿状細胞は無色である。そこで我々は、細胞内微小pH電極を用いて、液胞のpH (pH_v)を直接測定した。蕾のpH_vは6.6で開花花卉のpH_vは7.6であった²⁾。それぞれの花卉の色は、単離したHBAを対応する緩衝液に溶解したときの色調と極めてよく一致したことから、開花に伴う花色変化は、液胞pHの特異な上昇によることが明らかになった。pH上昇機構の解明を目的に、着色細胞のみを花卉からプロトプラスト化して、液胞膜を調製した。免疫プロットの結果から、蕾と開花花卉のH⁺-ATPaseとH⁺-PPase量には殆ど違いはなかった。各酵素活性および膜のプロトン透過性についても報告する予定である。

1) Kondo, T. et al. (1987) *Tetrahedron Lett.*, 28: 2273-2276.

2) Yoshida, K. et al. (1995) *Nature.*, 373: 291.

2aG02

塩ストレス環境下でのオオムギ根における細胞内 pH とリン化合物の変動

且原真木¹、矢崎芳明¹、坂野勝啓¹、河崎利夫²（岡山大・資生研、¹農水省・生物資源研、²四條囃学園女子短大）

オオムギ（赤神力）の根の細胞内 pH とリン化合物の塩ストレスによる変動を、³¹Pの核磁気共鳴 (NMR) 法によって測定した。300 mM ないし 500 mM NaCl 処理によって液胞はアルカリ化した。細胞質の pH 変動は、検量線への Na⁺ イオンの影響を考慮すると、ほとんどないことがわかった。ストレス開始後一時間で、グルコース-6-リン酸と UDP-グルコースは検出できない程度まで減少した。このような糖代謝への影響が、塩ストレスによる細胞障害機構に直接的な影響は間接にかかわっていると考えられる。

細胞内 pH と同時に細胞外 pH を測定したところ、塩ストレスによる細胞外 pH の酸性化が、液胞内アルカリ化と共に起こっていることがわかった。液胞膜上での Na⁺ と H⁺ の交換反応、および原形質膜でのプロトンポンプの活性化の可能性について考察する。

Katsuhara et al. (1997) Intracellular pH and proton-transport in barely root cells under salt stress: *in vivo* ³¹P-NMR study. *Plant Cell Physiol.* (in press)

2aG03

塩耐性程度が異なる *Nicotiana* 属植物の水ポテンシャル変化と Na⁺、K⁺イオンの蓄積特性

山田茂裕、小森俊之、Patricia N. Myers、今関英雅（日本たばこ産業（株）遺伝育種研究所）

我々は57種の *Nicotiana* 属植物について、塩・乾燥ストレス耐性検定を行い、2種の塩ストレス耐性種 (*Nicotiana paniculata*、*Nicotiana excelsior*) と1種の感受性種 (*Nicotiana arensii*) を選抜した（小森ら、日本育種学会第90回講演会）。今回は、選抜した3種の塩ストレス下における水ポテンシャル変化と Na⁺、K⁺イオンの挙動について調査した結果を報告する。

250 mM NaCl により供試植物に塩ストレスを付与し、5日目まで葉組織における *in situ* 水ポテンシャル変化を測定した。その結果、耐性種である *N. excelsior* は他の2種に比べて、水ポテンシャルの低下速度が緩やかであった。葉茎搾汁液の浸透圧は、5日目には *N. paniculata* と *N. arensii* では約700 mMに達したが、*N. excelsior* では約550 mMであった。搾汁液の浸透圧上昇は Na⁺ 濃度の上昇によるものと考えられるので、葉組織における Na⁺ および K⁺ の蓄積を経時的に測定したところ、*N. paniculata* では他の2種に比べて Na⁺ の蓄積速度、蓄積量、Na⁺/K⁺ 値において著しく高い値を示した。以上の結果から、*N. paniculata* と *N. excelsior* はともに塩ストレスに耐性であるが、それぞれ異なるメカニズムによるものと考えられる。なお、本研究は石油産業活性化センターの委託研究として行われた。

2aG04

タバコ培養細胞における原形質膜内向き整流性 K⁺チャネルの塩ストレス適応

橋野比呂志、副田憲司、村田芳行¹、多田幹郎
(岡山大・農・細胞生理、¹岡山大院・自然科学)

(目的) ナトリウムが原形質膜 K⁺チャネルを経て細胞質内に流入し、細胞内代謝を阻害することは、高等植物の塩ストレス適応機構を考える上で重要である。本研究では、塩ストレス適応への K⁺チャネルの関与を明らかにすることを目的として、塩ストレス適応と非適応細胞の原形質膜 K⁺チャネルの透過性を比較検討した。

(方法および結果) 塩ストレス適応および非適応タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L., cv. Bright Yellow) から酵素法によって単離したプロトプラストを材料として用いた。これらプロトプラストの whole-cell 電流を、パッチクランプ法を用いて測定した。その結果、100mM KCl の symmetry 条件では、以前報告した外向き電流の結果と同様に、塩ストレス適応細胞の内向き電流量は、非適応細胞の内向き電流量よりも少なかった。

2aG05

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の Na⁺/H⁺ アンチポーター

稲葉昌美、坂本 敦¹、村田紀夫¹ (総研大・生命科学、¹基生研)

光合成は、細胞内のイオン濃度によって大きな影響を受ける。Na⁺/H⁺ アンチポーターが光合成の過程で、細胞内の pH と Na⁺濃度の調節においてどのような役割を担っているかは興味深い。最近、Kanekoらによって、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノムの全塩基配列が決定され、他の細菌の遺伝子配列との比較から、sll1689、sll415 および sll1595 の 3つの ORF が、それぞれ Na⁺/H⁺ アンチポーターをコードしていると推定された。これらを同定するために、われわれはまず、プロモーターと推定される領域を含む sll1689 の DNA 断片を PCR によって増幅し、*E. coli* の Na⁺/H⁺ アンチポーター欠損株 NM81 に導入した。この形質転換により、NM81 は高 Na⁺濃度下 (0.7 M NaCl, pH 7.5) での生育を回復した。現在、NM81 とこの形質転換株から反転膜小胞を作製し、それらのアンチポート活性の測定を試みている。

2aG06

グリシンベタインを蓄積できるようになったトランスジェニックイネのストレス耐性

坂本 敦、ALIA、村田紀夫 (基生研)

適合溶質グリシンベタイン (ベタイン) 生合成系の導入は、農作物のストレス耐性向上のための最も有効な遺伝子工学的手法の 1つと期待されている。私たちは昨年度本大会で、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* のベタイン合成酵素コリンオキシダーゼの遺伝子導入により、ベタインを蓄積できるようになったトランスジェニックイネの作出について報告した。これらのトランスジェニック体は、コリンオキシダーゼを葉緑体或いは細胞質に持ち、新鮮葉グラム当り前者は 1 μmole、後者は 5 μmoles のベタインを蓄積した。このように、コリンオキシダーゼを細胞質に持つトランスジェニック体のほうがベタインの生成レベルは高かったが、光合成活性を指標にした塩ストレス耐性については、ベタインを葉緑体に蓄積するトランスジェニック体のほうが優れていた。このことは、ベタイン生合成能付与の遺伝子操作によるストレス耐性能の向上には、その生合成の細胞内局在部位が重要な因子であることを示唆している。

2aG07

塩ストレス適応および非適応タバコ培養細胞内の遊離アミノ酸組成

副田憲司、大熊英治、福田三穂、村田芳行¹、多田幹郎 (岡山大・農・細胞生理、¹岡山大院・自然科学)

高等植物は、高塩濃度環境にさらされると、細胞内にプロリンやベタイン等の代謝を阻害しない物質を蓄積することが知られているが、これらの物質の生理作用については明らかになっていない。今回我々は、塩ストレス適応機構を解明するために、塩ストレス適応および非適応タバコ培養細胞内の遊離アミノ酸組成を調べ、比較検討を行った。その結果、非適応細胞を 100mM NaCl を加えた LS 改変培地 (NaCl 培地) で培養した場合、PRO の濃度は、100mM NaCl を加えない場合と比べて、約 7 倍に増加したが、適応細胞を NaCl 培地で培養した場合、PRO の濃度はほとんど差がなかった。非適応細胞を NaCl 培地で培養した場合、PRO 以外に THR と GLU の濃度が顕著に増加した。

2aG08

耐塩性タバコ培養細胞に特異的に蓄積するタンパク質の分析

神田愛, 竹田恵美, 井田和子 (大阪女子大・基礎理)

灌漑した土地の塩害の進行が世界的な問題となっている。さまざまな作物での耐塩性の向上を目的とした育種が行われているが、耐塩性機構に関して分子レベルではまだまだ不明な点が多い。我々は耐塩性に関与するタンパク質の検出を目的とし、細胞選抜によって耐塩性を獲得したタバコ培養細胞と、非選抜の塩感受性のタバコ培養細胞の膜分画に存在する、タンパク質組成の比較を行った。

タバコ培養細胞(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)の、耐塩性培養細胞(NA)と、塩感受性培養細胞(NI)を材料として用いた。各細胞から分画遠心によりミクロゾーム分画を得た。この分画からタンパク質を抽出し、等電点電気泳動とSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動を行った。タンパク質の検出は銀染色によって行った。NA, NIそれぞれのポリペプチドスポットを比較し、耐塩性を獲得することにより、減少、あるいは消失するタンパク質と、増加するタンパク質が数種類確認された。現在、ラージスケールでのタンパク質の分離・分析を行い、これら違いの認められたタンパク質の同定を試みている。

2aG09

イネ(*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki)を用いた、塩ストレスによる光合成電子伝達活性の阻害機構の解析

田中義人¹, 岸谷幸枝², 高倍鉄子³, 林泰行⁴, 田中章⁴, 高倍昭洋^{1,5} (¹名城大・理工・化学, ²東北大・農, ³名大・生物分子, ⁴三菱化学植物工芸学研, ⁵名城大学総合研究所)

イネは低濃度の塩でも阻害を受けやすい植物でありイネにおける塩ストレス障害の機構を明らかにすることは重要である。塩ストレス下においては、光合成の電子伝達系で生じた電子が炭酸固定に用いられなくなり、活性酸素を生じる可能性が高くなるのが予想される。そこで、光合成活性の阻害と活性酸素の関係に着目して、今回、イネ(*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki)の塩ストレスによる阻害を、変調分光法、光音響分光法等を用いて解析したので、その結果について報告する。

イネを生育させている培地に、強光下でNaClを添加して、塩ストレスを加えた。酸素電極による酸素発生速度の測定、変調分光法および光音響分光法による光化学系IIの量子収率および光合成電子伝達の部分活性等を測定し、塩ストレスによる形態変化と光合成活性の阻害との関係について解析した。

また、光合成活性の阻害と活性酸素の関係について検討するため、酵母由来のマンガンスーパーオキシドジスムターゼ(Mn-SOD)遺伝子をイネに導入した形質転換植物を作製した。この形質転換植物を用いて、塩ストレスとSOD活性の関係、および塩ストレス条件下での光合成電子伝達活性とSOD活性との関係について解析を行った。

2aG10

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 野生株および *ndhB* 欠損変異株における塩ストレス条件下での電子伝達活性
田中義人¹, 日比野隆¹, 小川晃男², 高倍昭洋^{1,3} (¹名城大・理工・化学, ²名古屋大・生物分子応答センター, ³名城大学総合研究所)

ラン藻および葉緑体にはミトコンドリアのNADHデヒドロゲナーゼサブユニットと相同性のある遺伝子が存在するが、その生理的役割についてはあまりわかっていない。我々は、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の野生株および *ndhB* 欠損変異株 (M55) を用いて塩ストレス応答に対するNADHデヒドロゲナーゼの役割の検討を進めている。

ラン藻を高塩濃度の培地に移し塩ストレスをかけると、野生株、変異株ともに光合成の酸素発生速度は著しく低下した。野生株では、塩ストレスをかけてから1~2時間後には酸素発生速度が回復するのに対し、M55では、このような短時間での酸素発生速度の回復はみられなかった。つぎに、変調分光法を用いて、塩ストレス適応過程におけるクロロフィル蛍光、P700再還元速度を測定し、野生株および *ndhB* 欠損変異株の電子伝達活性を比較した。PAMによるクロロフィルの蛍光測定の結果、野生株およびM55とも、塩ストレス直後には、 ΔF の著しい減少が観察された。野生株では、その後短時間で ΔF は回復するが、M55では、回復は、観察されなかった。また、野生株を用いて、P700再還元速度を測定したところ、塩ストレス直後では、光化学系IIからの電子伝達は阻害されていた。これらの過程における循環的電子伝達系、ナトリウムイオンの役割について検討した結果について報告する予定である。

2aG11

耐塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* の分子シャペロン DnaK の性質

日比野隆¹, 石川浩¹, 高倍昭洋^{1,2}

(¹名城大・理工, ²名城大・総合研究所)

耐塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* は幅広い塩濃度(0.25~2.0 M NaCl)で生育可能なラン藻である。私達は、塩耐性と分子シャペロンの関係を明らかにすることに興味をもち研究を進めている。*Aphanothece halophytica* からの *dnaK* 遺伝子の単離についてはすでに報告したので、今回は、その性質について検討した結果を報告する。

Aphanothece halophytica から単離した *dnaK* 遺伝子を pET3d ベクターに組み込み、大腸菌で大量発現させることを試みた。大腸菌で発現した DnaK 蛋白質は、DEAE-Sephacel カラムおよび硫酸分画等を用いて精製した。この部分精製した DnaK 蛋白質を用いて、プラストシアニンおよびラクトースデヒドロゲナーゼのアッセムブリーについて検討した。具体的には、プラストシアニンおよびラクトースデヒドロゲナーゼを尿素で変性させた後、DnaK 蛋白質の存在する溶液で希釈したときの活性の回復を測定した。プラストシアニンは、大腸菌で発現させたものを精製して用いた。これらの結果について報告する。

一方、DnaK 蛋白質を過剰発現したタバコが高温・低温または塩ストレスに対する耐性が付与されるかどうかを検討するため、*dnaK* 遺伝子をタバコに導入した形質転換植物を作製した。この結果についても報告する。

2aG12

火山灰土壌に自生するシロイヌナズナの酸性障害
パターンの解析

戸田智美, 小山博之, 北村訓子, 原徹夫 (岐阜大
・農・植物細胞工学)

シロイヌナズナ植物は酸性ストレスに極めて感
受性が高く, 代表的な系統であるLandsbergでは
pH5を下回ると根伸長が著しく阻害される. 本研
究では, 低pH土壌で生育するシロイヌナズナ幼植
物 (Chitose株) の水素イオンストレスに対する
応答を調べるとともに, 系統間の生育パターンを
比較した.

一般にストレス耐性は幼植物の根伸長を指標と
して評価される. Chitoseを含む数系統を用い,
水素イオンに対する感受性を評価したところ, 幼
植物の根伸長阻害はいずれもpH5以下で顕著に現
れた. また, FDA-PI染色法により障害程度を比較
したところ, ChitoseはLandsbergと同等かそれ以
上に損傷を受けていた.

一方, ChitoseはLandsberg, Columbiaと比較し
て開花が著しく遅く, ロゼット葉の形態も異なっ
ていたことから, Chitoseの低pH土壌への適応は
根端部の耐酸性機構の獲得によるのではなく, 生
育の遅延が大きく関与していると考えられる.

2aG13

ホウレンソウ NIR cDNA を導入したトランスジェニック・シ
ロイヌナズナ植物の二酸化窒素ガス同化の解析
高橋美佐, 井田正二¹, 関原明, 五島直樹, 森川弘道 (広島大・
理・遺伝子科学, ¹京都大・食研)

植物は大気汚染物質の一つである二酸化窒素 (NO₂) ガス
を気孔を通して葉細胞内に吸収し, アミノ酸にまで同化するこ
とが知られている. その代謝には硝酸還元系酵素が関与して
いると考えられている. 本研究ではNO₂ガスを積極的に吸収
同化する大気汚染好性植物を創製することを目的として, 硝
酸還元系酵素の第二酵素である亜硝酸還元酵素 (NIR) を富化
したトランスジェニック植物を育成し, NO₂同化能力の解析
を行った.

植物材料にシロイヌナズナを用い, ホウレンソウ由来の
NIR cDNA を組み込んだプラスミド pSNIRH (CaMV 35S
pro-spinach NIR cDNA-NOS ter; CaMV 35S pro-hpt-
NOSer) を導入したトランスジェニックシロイヌナズナ植物
を育成し, 約20系統の自植後代 (T2-T4 世代) について解析
を行った.

サザンブロット解析により導入したホウレンソウ由来の
NIR cDNA が植物ゲノムに組み込まれていることが確認され
た. ノザンブロット解析, 二次元電気泳動およびイムノアッ
セイを用いた解析により, 導入したホウレンソウ由来の NIR
および内在するシロイヌナズナ NIR が発現していることが確
認された. NIR 活性を測定したところトランスジェニック植
物において野性株より最大1.2倍の活性を持つ系統が確認さ
れた. 4 ppm の NO₂ (¹⁵N-NO₂ を含む) に暴露して, NO₂ の
還元同化能力を同体質量分析法により, 調査した結果, 野性
株よりも最大約1.4倍高いNO₂還元同化能を持つ系統が認め
られた.

2pG01

藍色細菌の概日性リズムの周期を延ばすゲノム
DNA断片の解析

杵名伸介, 近藤孝男, 佐藤晋一, 石浦正寛
(名古屋大・理・生物)

藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC7942 の生物時計
突然変異 SP22 (概日性リズムの周期が野生株の24
時間より2時間短い突然変異) を24時間周期に戻
す活性を持つ野生型ゲノムDNA断片 (2.2 kb) を
クローニングした. この塩基配列と SP22 突然変異
株のゲノムの相同領域を比較したが塩基レベルの
変異は起きていなかった. また, この2.2 kb のゲ
ノムDNA断片を野生株に遺伝子移入したところ概
日性リズムの周期はおよそ2時間のびて26時間に
なった. 現在突然変異 SP22 の原因遺伝子は時計オ
ペロンの F 遺伝子上に存在することが判明してい
るので, この ORF は サプレッサー遺伝子の一種と
考えられる. 1 kb の BamHI 領域を遺伝子移入して
も同じ効果が得られた. この領域に存在する 0.4
kb の ORF を野生株で過剰発現させると, リズムの
周期はおよそ35時間になった. この ORF が周期を
延ばす機能を持っていると考えている.

2pG02

光及び温度パルスによる藍色細菌の概日性リズムの位相
変位

井上千晶, 岡本和久, 杵名伸介, 石浦正寛, 近藤孝男
(名古屋大学 理 生命理学)

概日性リズムが知られる全ての生物において, 光や温
度パルスによるリズムの位相変位が観察される. これは
生物時計の位相が環境の昼夜変動に同調することを可能
にし, より効率のよい生命活動を実現させている.

今回, 我々は藍色細菌 (*Synechococcus* sp. PCC
7942) の概日性リズムにおいて光や温度パルスによる位
相変位特性を明らかにした. 材料には時計遺伝子のプロ
モーターに *luxAB* レポーターを接続し, ゲノムに組み込
んだ形質転換体を用いた. 指数成長期のコロニーを12時
間の暗期で同調した後, 様々な時刻にパルスを与えた.
その結果, 3時間以上の暗, 強光, 低温及び高温パルス
が, それぞれ大きな位相変位を引き起こすことが判明し,
藍色細菌では初めての詳細な位相反応曲線を作成するこ
とができた. また, この位相変位特性が真核生物のもの
と似ていることが確認された. 現在, 概日性リズムの位
相変位機構の詳細を解析するために, 入力系に関与して
いる光受容体の探索や, 位相変位が完了するまでの時計
遺伝子の転写活性等について調べている.

2pG03

藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の生物時計遺伝子の相同遺伝子の探索

宇津巻竜也、近藤孝男、井上千晶、井上頼直¹、石浦正寛

(名大院・理学研究科・生命理学,¹理化学研究所)

我々は既に藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の概日性リズムを制御する3つの遺伝子 (*ORF-D, E, F*) を同定する事に成功している。

今回、我々はこの3つのORFをプローブとして用い、サザンブロットング法によって他の藍色細菌において、時計遺伝子の相同遺伝子を探索した。その結果、4種の藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7002、*Synechococcus vulcanus*、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Anabaena* sp. PCC 7120 において、有意なバンドを検出することに成功した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 については、かずさのデータバンクと比較したところ、その塩基配列に複数の相同遺伝子があることを確認した。また、*Synechococcus vulcanus* と *Anabaena* sp. PCC 7120 については、ゲノムライブラリーをスクリーニングすることによりポジティブクローンを得ることに成功した。現在、この2種の藍色細菌について塩基配列を解析中であり、時計遺伝子の保存領域を特定することを試みている。また、保存領域が決まれば他の原核生物や真核生物においても相同遺伝子を探索する予定である。

2pG04

藍色細菌の生物時計オペロンの発現解析

杵名伸介、近藤孝男、石浦正寛

(名古屋大学院、理学研究科生命理学)

バクテリアからヒトに至る生物の活動は生物時計の制御を受け、24時間周期のリズムを示す。我々は、単細胞性藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7942 で生物時計の新しい実験系を開発し、時計の解析を分子遺伝学的に進めている。これまでに *D*、*E*、*F* 三つの遺伝子よりなる「時計オペロン」が時計の中核的な働きを担っていることが明らかになっている。

本研究では、発光バクテリア由来のルシフェラーゼ遺伝子を発光レポーターに用いて、時計オペロンの発現を生物発光として解析した。第一に、プロモーター活性は *ORF-D* の上流と *ORF-E* の上流に存在し、共に24時間周期の概日性リズムを示した。第二に、*D*、*E*、*F* 遺伝子上に変異を持つ突然変異体で調べたところ、短周期変異体では短周期の、長周期変異体では長周期の、無周期変異体では無周期のリズムを示した。

次に、時計オペロンのプロモーター領域を欠失変異体を作製して解析し、負に働くサイレンサーエレメントの存在を推定した。

2pG05

アカパンカビにおけるカルモジュリンアンタゴニスト感受性変異株、*cpz-2* の表現型を抑制する変異株の分離
別府由紀、豊田勝也、小内清、中島秀明(岡山大・理・生物)

新しい時計変異株の分離の試みとして、薬剤感受性変異株の中に時計に対して特有の感受性を示す変異株の分離を試みってきた。カルモジュリンアンタゴニストに対する感受性変異株の分離を行い、その中の一つ、*cpz-2* は成長はこの薬物に対して高感受性、時計は抵抗性を示すことを一昨年の本大会で報告した。またこの変異株は蛋白脱リン酸化酵素の阻害剤であるFK506に対して高感受性であり、温度感受性でもある。この遺伝子のクローニングを試みているが、まだ成功していない。この遺伝子の機能を知るために、サブレッサー株の分離を試みた。intragenic なもの避けるためと、以後の解析を容易にするためDNA挿入法を用いた。そのために二種類のベクターを用意した。現在までに *cpz-2* の表現型を抑制する3変異株を得た。成長についてすべての株は薬剤感受性は正常になっているが、1株は温度感受性については回復していない。これらの株のリズムの性質について報告する。

2pG06

アカパンカビのカルモジュリンアンタゴニスト感受性変異株、*cpz-2* の温度感受性を抑制する遺伝子のクローニング
片桐敏、小内清、中島秀明(岡山大・理・生物)

アカパンカビの *cpz-2* 株はカルモジュリンアンタゴニストであるクロルプロマジンに対して菌糸生長が高感受性を示す一方で、分生子形成リズムのクロルプロマジンによる周期の短縮、位相変化、光による位相変化の阻害については耐性を示す。これらの性質は生物時計のもっとも重要な性質であるので *cpz-2* 遺伝子はアカパンカビの時計機構に深く関ると推測された (Suzuki *et al.*, 1996, *Genetics* 143: 1175-1180)。

今回、我々は *cpz-2* 株の菌糸生長が温度感受性であることを利用して *cpz-2* 遺伝子のクローニングを試みた。その結果、*cpz-2* 株の温度感受性を抑制する約3.4kbのゲノムDNAを得た。RFLP解析の結果、この断片の染色体上での位置は *cpz-2* 遺伝子座とは異なることが明らかとなった。塩基配列を決定したところ、この断片はスペルミジンシンターゼをコードする遺伝子を含んでいた。さらに、培地へスペルミジンを添加することによって *cpz-2* 株の温度感受性が、この断片を導入した形質転換体と同程度に抑制されたことから、*cpz-2* 株が温度感受性になる原因の一つにはスペルミジンの合成に異常が起きている可能性が考えられる。

3aG01

ニンジン gDcPAL1 遺伝子の UV, エリシター、機械的刺激に対する応答

竹田淳子(京大、農、農化) 小関良宏(東京農工大、工、生命工学)

われわれはニンジン培養細胞のアントシアニン合成系をモデルとし、gDcPAL1(-2335)(ニンジンのPAL 遺伝子の1つであり UV-B 応答性を示す)トランジェントアッセイ法によるプロモータ解析から gDcPAL1 プロモータは3つの領域; Modulator 領域、(-570 より上流) UV-B 応答性を示す領域(-320~-190)及び非特異的 UV 応答性を示す領域(-190より下流)からなり、いかにして全長のプロモータがこれらの和として UV-B 特異的応答をしめすかを明らかにした。今回は、このプロモータに関してエリシター、機械的ストレスに対する応答に必要なプロモータ領域を同定した。さらに各種阻害剤の効果を調べることから UV を含むこれら3つの Cues は異なるシグナル伝達系を用い gDcPAL1 遺伝子の発現を誘導していることが明らかになった。

3aG02

植物二次代謝産物による過酸化ストレス保護作用
原口博行, 松原久子, 信岡 梢, 福田愛弓(福山大・工)

植物細胞は、種々の酸化ストレスに対して、活性酸素類の除去酵素や内在抗酸化成分で保護している。一方、植物は種々の二次代謝成分を生産し、それらの中には脂質過酸化抑制やスーパーオキシド除去作用を示すものが存在する。植物二次代謝化合物中に抗酸化物質を検索し、ローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)(1)やタイム(*Thymus vulgaris*)(2)などから、動物組織に対して活性酸素除去作用を伴う抗酸化成分を単離した。今回、これら抗酸化成分の植物細胞内における酸化ストレスに対する作用を検討した。

タバコ(*Nicotiana rustica*) 培養細胞から調製したプロトプラストをロテノンを含む緩衝液中でインキュベートすると呼吸鎖電子伝達鎖から漏出した電子と酸素分子との反応によりスーパーオキシドアニオンが生じる。これはニトロブルーテトラゾリウム(NBT)と反応し細胞が染色される。反応液中に抗酸化作用を有する植物二次代謝物質を添加すると細胞の染色の減弱が認められた。植物病原菌由来のキノン化合物altersolanolsなどはその酸化還元サイクルの過程でスーパーオキシドを生じ細胞毒性の原因となるが(3)、植物抗酸化成分はキノン化合物添加インキュベイト系でも活性酸素を除去した。抗酸化成分を生産する植物組織(タイム葉など)や培養細胞(オリーブ、ローズマリーなど)から調製したプロトプラストにおいては酸化ストレスによる細胞のNBT染色はあまり認められなかった。

(1) H. Haraguchi, et al. (1995) *Planta Med.*, **61**, 333. (2) H. Haraguchi, et al. (1996) *Planta Med.*, **62**, 217. (3) H. Haraguchi, et al. (1996) *Phytochemistry*, **43**, 986.

3aG03

グラニオールは植物細胞にアポトーシスをひき起こす。
高嶋 脩・泉 俊輔・平田敏文(広島大・理・化学)

高等植物の生体防御機構の生化学的解明のために、低分子有機化合物をストレスとした植物細胞の応答反応について研究を行ってきた。今回、グラニオールがカミツレ培養細胞に対して強いアポトーシス誘導能を持つことを見いだしたので報告する。

アポトーシスの判定には、細胞核の断片化およびDNAのラーダー形成を指標にした。その結果、グラニオールに強いアポトーシス誘導能があった。DNAの断片化は、グラニオールを投与してから1時間以内に始まり、4時間後にはほぼ完了した。また、グラニオールによるアポトーシス誘導は蛋白質合成の阻害剤であるシクロヘキシミドやRNA合成の特異的阻害剤であるアクチノマイシンDによりいずれも阻害されなかった。このことからこのアポトーシス誘導に際しては新たな蛋白質合成もRNA合成も必要としないことが示された。

3aG04

イチジク果実の成熟に伴う水の動態変化のNMRによる解析
隈元保子, 井上眞理, 渡辺剛史, 石田信昭¹, 狩野広美²
(九州大・農・園芸, ¹農水省・食品総合研, ²同・農業生物資源研)

細胞の水の運動性は組織の代謝など生理状態を反映していると考えられている。そこで本研究ではイチジクの果実の水のスピン-格子緩和時間(T_1)を生育ステージを追って測定し、水の成分と運動性の変化を解析した。 T_1 はJEOL EX-90 NMRスペクトロメーターで、inversion recovery ($180^\circ - \tau - 90^\circ$ パルス系列)法により、果実を果托と内側の小果に分けて¹H-NMRで、また糖は80%エタノール抽出物を¹³C-NMRにより、常温で測定した。¹H-NMRによると、スペクトル線幅はstage1(緑色未熟)では果托、小果とも広く、果実が肥大・成熟するstage2,3では狭くなった。一方、水分含量には著しい変化は認められなかった。¹H-NMRのシグナル反転をセミログプロットすると、組織の水は T_1 が100msec以下の束縛された成分Iと1000msec以上の運動性の高い成分IIより構成されていることが明らかとなった。運動性の高い成分は果実の肥大に伴い、約1.5secと著しく長くなった。これは果実の成熟に伴う水の運動性を妨げる膜構造の崩壊、高分子化合物の低分子化、及び液胞の発達によるものと推定される。

3aG05

チューリップ組織の水の動態に対する低温処理の影響
渡辺剛史, 井上眞理, 隈元保子, 石田信昭¹, 狩野広美²
(九州大・農・園芸, ¹農水省・食品総合研, ²同・農業生物資源研)

植物組織には緩和時間が異なる数タイプの水が存在することが知られている。低温処理により、チューリップ球根の鱗葉内部の水はMRIで観測され難い状態から観測され易い状態へ変化する (Iwaya-Inoue et al. 1996)。本報告では¹H-NMR (JEOL EX90 NMRスペクトロメーター) で、チューリップ各組織の水の状態を緩和時間 (T_1) 測定により詳しく検討した。水の緩和時間 (spin-lattice relaxation time, T_1) は inversion recovery ($180^\circ - \tau - 90^\circ$ パルス系列) 法によって測定し、水の成分をスペクトル反転過程とシグナル強度のセミログプロットにより解析した。チューリップ球根の水は100ms以下の T_1 をもつ緩和時間の短い成分I、300-800msの中間の成分II、及び1000ms以上の長い成分IIIで構成されていた。各成分は異なるケミカルシフトと線幅をもつピークを示すことから、細胞内で異なるコンパートメントを形成しているものと考えられる。これらの水の成分に対する低温処理の影響及び組織の形態的差異による変化を検討した。

3aG06

GLASS TRANSITION TEMPERATURES IN GALACTOPINITOL AND OTHER NON-REDUCING SUGARS
Ching-Te CHIEN, Li-Kuo SHEN; Division of Silviculture, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nan-Hai Road, Taipei, Taiwan

A novel galactopinitol found in maturing seeds of *Leucaena leucocephala* was suggested to be associated with desiccation tolerance(1). In the present study, the glass transition temperature (Tg) of galactopinitol measured by differential scanning calorimetry was 26°C at 12% water content and 16.4°C at 17% water content (dry weight basis). The Tg value of galactopinitol is significantly higher than Tg value we measured in sucrose, 4.5°C at 5% water content and 2.4°C at 19% water content. A mixture of sucrose/raffinose/stachyose/galactopinitol at a mass ratio of 1/0.3/0.9/0.3 shows the Tg value of 11.8°C at 13% water content, which is higher than Tg value of 4.0°C for another mixture of sucrose/galactopinitol at a mass ratio of 1/0.3 and same water content. As we know glass formation of cytoplasm would have many advantages for stabilizing cellular components in the dry state. The high Tg value of galactopinitol appears to have a glass formation at ambient temperature, and the mixture of above four sugars which discovered abundant in leucaena seeds also show a high Tg value, implying that this dry tolerant seeds probably contain sugar glasses at some certain water contents and storage temperatures.

(1) Chien, Ching-Te et al. *Plant Cell Physiol.*, 37(4): 539-544.

3aG07

原生動物 *Euglena gracilis* の適合溶質トレハロース合成に関するセカンドメッセンジャー
竹中重雄, 有本友香, 谷 亜矢, 田村良行,
増田 渉*, 宮武和孝*, 中野長久*
(羽衣学園短大・食物、*大阪府大・応生化)

淡水に生息する原生動物 *Euglena gracilis* は二酸化炭素に対する高い耐性を持つことを報告してきたが、我々は *E. gracilis* が塩環境に対しても適合溶質トレハロースを合成・蓄積し、細胞内部の浸透圧を調整することにより適応する能力を持つことを見出し、タンパク質リン酸化およびフルクトース-2,6-ビスリン酸が調節因子として機能することを報告した。また我々は *E. gracilis* の細胞内でセカンドメッセンジャーとして、cAMP、IP₃、cADP-リボースが機能することを報告している。今回浸透圧ストレス下におけるこれらセカンドメッセンジャーについて検討を行った。*E. gracilis* を浸透圧ストレス下におき、細胞抽出液中の上記物質の存在について検討を行っている。

3aG08

エンドウ根の水分屈性におけるエンド型キシログルカン転移酵素 (EXGT) 遺伝子の発現
高野 守, 藤井伸治, 西谷和彦¹, 平沢 正²,
高橋秀幸 (東北大・遺生研, ¹鹿児島大・教養,
²東京農工大・農)

重力屈性非感受性のエンドウ (*ageotropum*) の根は水分勾配に反応して正の水分屈性を示す。これまで根の水分屈性は、伸長帯における刺激側と反刺激側の間の細胞壁伸展性の差によっておこることが分かっている。そこで、本研究では細胞の伸長生長に関与すると考えられているエンド型キシログルカン転移酵素 (EXGT) 遺伝子の部分的cDNAをエンドウの根より単離し、その発現と水分屈性の関係を検討した。

RT-PCR法を用いてエンドウmRNAよりEXGT遺伝子の単離を試みた結果、すでに単離されているサイズのEXGT遺伝子と推定アミノ酸配列で90%の相同性をもつ632bpの部分的cDNAを得た。これをプローブとし、ノーザンハイブリダイゼーション法を用いて根の水分屈性とその発現の相関を解析した結果、水分屈性による屈曲が認められる直前に刺激側におけるEXGT遺伝子の発現の増大が認められた。

3aG09

塩ストレスで誘導されるシロイヌナズナの Cys2/His2 型 Zn-finger 蛋白質遺伝子の解析

坂本秀樹・岡南政宏・荒木 崇・飯 哲夫・岩淵樹樹
(京大・院・理・植物)

Cys2/His2 型 Zn-finger は最もよく解析されている DNA 結合モチーフの1つであり、動物や酵母では、このモチーフをもつ、数多くの転写制御因子の例が報告されている。一方、高等植物においても、時期、組織特異性を示す Zn-finger 因子が多数存在することが明らかとなったが、機能の詳細については殆ど理解されていない。

我々は、植物体における Zn-finger 因子群の役割を明らかにすることを目的として、これまでに、シロイヌナズナから Cys2/His2 型 Zn-finger 因子、AZF-1 (*Arabidopsis thaliana* Zn-finger protein-1)、及び、AZF-2 を単離し、形態形成や環境応答に焦点をあてて、解析をすすめている。既に、AZF-1、AZF-2 は、どちらも根において主要な発現が見られることを確認している。今回、新たに AZF-1、AZF-2 が、乾燥、塩ストレス応答遺伝子であることを示唆する結果を得た。これらの解析結果について報告する。

3aG10

シロイヌナズナの乾燥・低温ストレスによる遺伝子発現を制御するシス因子 DRE に結合する蛋白質をコードする cDNA の単離

劉 強、阿部 洋、三浦節子、篠崎和子、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)

乾燥により誘導されるシロイヌナズナの *rd29A* 遺伝子は、乾燥ストレスによって生成されるアブシジン酸 (ABA) によっても誘導されるが、ABA を介さないシグナル伝達系によっても制御されている。遺伝子導入植物の系を用いた *rd29A* 遺伝子のプロモーター解析から、ABA が関与しない発現は TACCGACAT の配列からなるシス因子 (DRE) が乾燥誘導に関与していることが明らかになった。DRE は高塩濃度や低温ストレスによる発現にも関与していたが、ABA による遺伝子発現には関与しないと考えられた。また、この DRE の配列に特異的に結合する核蛋白質が存在することも明らかになった。そこで、酵母の one-hybrid 系を用いて DRE の配列に特異的に結合する蛋白質をコードする cDNA (DREBP) を単離した。2 種の cDNA の塩基配列を決定し、コードされている蛋白質の相同性の検索を行うと、共通の DNA 結合ドメインを有することが明らかになった。また、ノーザン法で解析すると、乾燥や塩や低温ストレス誘導性を示した。

3aG11

シロイヌナズナのプロリンデヒドロゲナーゼ遺伝子 *erd5* の発現解析

中島一雄、佐藤里絵、清未知宏¹、篠崎和子、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)

プロリンは水ストレス下の植物において細胞を保護する適合溶質のひとつである。植物を乾燥した際に起こるプロリンの蓄積は、その生合成系の活性化と分解系の不活性化により起こり、乾燥後再吸水させた際に見られるプロリン含量の減少は、生合成系の不活性化と分解系の活性化により起こる。我々はプロリンからグルタミン酸への変換の第一段階を触媒する酵素プロリンデヒドロゲナーゼの cDNA である ERD5 を、乾燥 1 時間後のシロイヌナズナから単離した。ERD5 mRNA 量は乾燥 10 時間後には減少するが、再吸水させると著しく増加した。また、プロリン処理でも mRNA 量の増加が見られた。*erd5* 遺伝子の発現制御機構を解明するために *erd5* 遺伝子のプロモーター領域と推定される約 1.4kb を含む DNA 断片を単離し、GUS 遺伝子とつなげてシロイヌナズナに導入した。得られた形質転換植物を乾燥した場合には GUS 活性が低下したが、水またはプロリンを含む培養液につけると葉と根において GUS 活性の上昇が認められた。現在、*erd5* 遺伝子のプロリン及び吸水応答シス領域の解析を進めている。

3aG12

イネ篩管液チオレドキシシンh遺伝子の発現の部位特異性
石渡 裕、根本 圭介、藤原 徹、林 浩昭、茅野 充男
(東大院・農学生命科学)

植物体内において、篩管は同化物質の転流だけでなく、植物体レベルでのシグナル伝達にも関わる組織である。篩管中に存在するタンパク質は、こうした機能に重要な役割を演じていることが示唆されている。また篩管液タンパク質は、篩部要素が分化の途中で核やリソソームを失うことから、伴細胞で合成され、細胞間連絡を通して篩管中に移行すると推定されている。

我々は、これまでにイネ篩管液中にチオレドキシシンhが多量に存在し、また、この篩管液チオレドキシシンhが細胞間移動能を有することを示した。このタンパク質をコードする遺伝子は、そのタンパク質の篩管液中の存在量から、伴細胞で強く発現していることが期待された。そこで *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現部位の検出を試みた。この結果、発現は維管束に集中していた。未分化な維管束を持つ若い葉においては篩部を含む維管束全域に、また成熟した葉では維管束中の篩部伴細胞に強く発現が見られた。これらの結果から、篩管液チオレドキシシンh遺伝子の発現は維管束の発達段階に応じて制御されていることが示された。

3aG13

ヒマと小麦の器官と師管液・導管液の $\delta^{13}\text{C}$ 値,
 $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係

米山 忠克^{1,2}・増田 泰三¹・藤原 英司²・L. L. Handley³,
(¹農業研究センター, ²筑波大応生系, ³SCRI,UK)

植物の炭素同位体存在比 ($\delta^{13}\text{C}$) は、炭素の固定や転流の、また窒素同位体存在比 ($\delta^{15}\text{N}$) は、植物の窒素の代謝や転流のインデックスとなる。本研究では、ソース・シンク間の流路である師管と導管の液中の $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ を直接計測し、植物の器官の値と対応させた。

実験方法：ヒマはつくばの圃場で栽培し、夏期数回、茎中央から師管液、茎基部から導管液を採取、植物体は各器官にわけて採取した。小麦はスコットランド作物研究所(SCRI)ガラスハウスでポット栽培された。師管液は茎の上部からアブラムシ法で、導管液は茎基部から採取した。植物器官試料の一部は糖硝酸画分、アミノ酸画分、残さに分画した。これらの $\delta^{13}\text{C}$ 値 $\delta^{15}\text{N}$ 値を ANCA-MS で分析した。

結果：師管液の $\delta^{13}\text{C}$ 値は転流する糖の値を、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は硝酸還元で生成したアミノ酸の値を示しており、葉全体の値とは違っていた。導管液の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、根からリサイクル炭素化合物の値を示し、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は、土壌の窒素の値を反映していると考えられた。子実の $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は師管、導管による炭素、窒素の供給を反映していた。

1aH01

カボチャ下胚軸でのアポプラストとシンプラストの
インドール酢酸濃度

鶴崎健一、増田康子¹、櫻井直樹¹ (福山大・一般
教育、¹広島大・総合科学・自然環境)

外側から与えたインドール酢酸 (IAA) の伸長成長への生理的最適濃度は 10^{-6} ~ 10^{-7} Mであることが知られているが、成長帯での内生IAA濃度は 10^{-8} M程度と低い。IAAの受容体の一部は細胞膜外側に存在しているとの報告もあり、IAAはアポプラスト (AP) に局在して生理作用を生じている可能性がある。APとシンプラスト (SY) でのIAA濃度を調べるために、黄化カボチャの下胚軸切片 (1 cm) を用いて、遠心分離法でAP液を分取し、 $^{13}\text{C}_6$ -IAAを内部標準としてIAA量をGC-SIM-MSで測定した。成長帯の内生IAA濃度はAP (2.3×10^{-7} M) が、SY (0.5×10^{-7} M) の4.6倍であった。IAA (10^{-5} M) で切片を処理すると、APのIAA濃度は4時間後には与えたIAA濃度の75%に達したが、SYでは23%程度の増加であった。これらの結果は、カボチャ下胚軸の成長帯でのIAA濃度はSYよりもAPで高く、生理現象を生じるIAAの少なくとも一部は細胞の外側から働いていることを示した。

1aH02

イネ液体培養のコンディショントメディウム添加による
Rhizoctonia solani の IAA 産生の増大

古川聡子、庄野邦彦¹ (都立短大・化学、¹東京大・総合文化・生命)

我々はこれまでに糸状菌 *Rhizoctonia solani* Kühn が IAA 及びトリプトフォールの高い産生能を有し、それらの生合成がインドールビルビン酸経路によることを明らかにしてきた。また、この経路の酵素の一つであるインドールビルビン酸デカルボキシラーゼを精製し、この経路が *in vivo* で十分働きうることを示した。

今回、*in vitro* のイネ-*Rhizoctonia* 相互作用の実験系で、イネに感染する *R. solani* MAFF 305219 の IAA 産生がイネ(Oc)液体培養のコンディショントメディウム(CM)の添加によって、短時間に著しく増大することが見いだされた。異なった培養期間由来のCMとIAA産生増大との関係、CM中のIAA産生増大因子の性質、寄主植物の異なる *Rhizoctonia* に対するOcのCMの効果、及び各種植物のCMが *R. solani* に対する IAA 産生に及ぼす影響などについて解析を行ったので報告する。

1aH03

モモ茎頂部からの新たなオーキシン結合タンパク質の単離

貴谷 純子、大宮あけみ、菊地幹之、林 建樹 (農水省・果樹試)

オーキシンは植物の重要な成長調節物質であり、その作用機構においてその受容体が重要な機能を果たしていると考えられている。演者らは、モモ茎頂部に存在するオーキシンの受容体の候補として、既に、20kDa (ABP20) と 19kDa (ABP19) のオーキシン結合タンパク質 (ABP) を単離し、その特性について報告した。オーキシンの情報伝達には複数の受容体が機能する可能性が考えられるため、別の画分について調べたところ、ABP19/20 と異なる新たなABPが見出されたので報告する。

モモの茎頂部より抽出した可溶性タンパク質をCM-Toyopearlにかけ、素通り画分を得た。その画分をDEAE-Toyopearlにかけ、KClの濃度勾配により溶出し、オーキシンに対する結合活性を [^{14}C]2,4-Dを用いて測定した。結合活性を有する画分をゲルろ過 (Sephacryl S-300) にかけて、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を結合させたファイニティーカラムにかけた後、2,4-Dを含む緩衝液にて溶出して、オーキシン結合タンパク質 (ABP) 画分を得た。SDS-PAGE上では、ABP画分には、36kDa、37kDa、60kDaの3つのメジャーなポリペプチド (P-ABP36、P-ABP37、P-ABP60) が含まれることが分かった。ゲルろ過の結果 native な状態では、どれも分子量約60kで存在することが推定された。それぞれの部分アミノ酸配列を調べ、ホモロジー検索を行ったところ、P-ABP37とP-ABP60は、それぞれ phosphoribokinase と protein disulfide isomerase とに高い相同性が見出された。P-ABP36については、既知のタンパク質とのあいだに高い相同性は見出さなかった。現在、これらのタンパク質のオーキシンに対する結合特性について検討している。

1aH04

ニンジン 不定胚形成過程における

オーキシン誘導性遺伝子の単離と解析

北宮 絵里、高橋 陽介、長田 敏行

(東京大・大学院理学系研究科生物科学)

ニンジンの胚軸を短時間高濃度の2,4-Dで処理し、続いて植物ホルモンを含まない培地に移して培養することによって、不定胚の形成がみられることが報告されている。この系を利用してオーキシンにより発現が調節される遺伝子の単離、解析を行うことにより不定胚形成の最初の引き金となる分子機構の解析が可能であると考えた。そこで、ディファレンシャルディスプレイ法でオーキシンにより発現が調節される遺伝子を探索し、2つのcDNA断片を得た。そしてこれらのcDNAの塩基配列を決定し、既知の遺伝子とのホモロジー検索を行った。また、これらのcDNAをプローブにいくつかのノーザンブロットによる解析を行った。以上の結果から、得られた遺伝子の脱分化過程における機能について考察する。

1aH05

オーキシンによって誘導される *par* 遺伝子の転写制御機構の解析

酒井達也、高橋陽介、長田敏行（東大・院理系・生物科学）

我々は、オーキシンによる植物の成長、細胞分裂の制御を分子レベルで解明することを目的として、オーキシン誘導遺伝子に着目し研究を進めている。これまでにタバコ葉肉プロトプラストからオーキシンで発現が誘導される遺伝子、*parA*, *parB*, *parC* をクローン化している。

parA, *parC* 遺伝子のオーキシン応答性に関わるシス領域の解析は、タバコ形質転換体を用いて行い、*parA* では 63 bp、*parC* では 173 bp の DNA 領域まで限定することができた。これら領域内には *as-1* 様配列 (*pas-a*, *pas-c*) が存在し、このモチーフはオーキシン応答性に必須だった。しかし、ゲルシフトによる解析では *pas-a* には *as-1* 結合核タンパク質 ASF-1 が結合するが、*pas-c* には ASF-1 とは異なる核タンパク質が結合することが明らかとなった。また、これらの領域が活性オーキシン以外の化学物質にも応答性があるかどうか調べた。

1aH06

オーキシン制御遺伝子 *arca* の機能探索

石田さらみ、高橋陽介、Csaba Koncz¹、長田敏行（東京大、院理系生物、¹マックス・プランク育種研）

arca は、タバコ BY-2 細胞よりオーキシン制御遺伝子として単離されたが、構造的に G_β 様の構造をもち、いわゆる WD40 タンパク質である。最近の知見は、その中でも動物細胞での実験によりタンパク質キナーゼ C (PKC) の受容体タンパク質である RACK1 の植物ホモログであることが分かっている。

一方、シロイヌナズナの T-DNA 挿入突然変異体の中に根の形態に著しい変異の見られる *prl 1* が単離されたが、この遺伝子は *arca* と良く似た構造を持つが、C 末にタンパク質フォスファターゼ結合ドメインを持つ点が異なる (Koncz 未発表)。これら二種のタンパク質と PKC とは特異的応答を示すことが明らかになっている。これらの結果は、PKC を介する信号伝達系が植物細胞にもあることを予測されるのでその意義を議論する。

1aH07

酵母におけるオーキシン制御遺伝子 *arca* homologue の解析

石田さらみ、高橋陽介、長田敏行（東京大学大学院理学系研究科）

分子レベルでのオーキシン作用機構解明の第一歩として、オーキシンにより発現制御を受ける遺伝子 *arca* をタバコ培養細胞 BY-2 株より単離し解析を続けている。構造解析より、*arca* 産物は、G タンパク質β サブユニットに代表される構造である WD-40 リピートにより構成され、真核生物に普遍的に存在している事が明らかとなった。これより、種間を超えて保存された基本的機能を果たしていると推測される。そこで、植物細胞における *arca* 産物の機能を同定するための重要な情報が得られると期待し、遺伝学的解析に適し真核生物のモデルとされる酵母において *arca* の機能解析を行うことを計画した。酵母の *arca* homologue はゲノムプロジェクトにより決定された配列よりクローニングした。本大会では、現在までに得られている結果について報告する。

1aH08

ニセアカシア内樹皮レクチン遺伝子プロモーターによる GUS 遺伝子のタバコにおける発現

吉田和正、毛利 武、西口 満、田崎 清（農林水産省、森林総研）

ニセアカシア（マメ科の落葉広葉樹）の内樹皮（師部）と種子には、それぞれ異なる遺伝子にコードされるレクチンが存在する。このうち内樹皮レクチンは柔細胞に局在することが明らかになっている。本研究では、内樹皮レクチンをコードする遺伝子 (*rlec1*) の組織特異的な発現に関わるシス因子を探索するために、*rlec1* の 5' 上流域、約 820bp (-793bp ~ +26bp) の下流に GUS 遺伝子を結合した融合遺伝子を作製し、タバコに導入した。

得られた形質転換体の中から、茎および葉において高い GUS 活性を示すものについて、組織化学的染色を行ったところ、茎においては維管束の内部師部、および外部師部とその周辺の柔細胞でのみ GUS 活性が認められた。葉での GUS 活性は葉脈の維管束でのみ検出された。これらのことから *rlec1* の 5' 上流域はタバコにおいても組織特異的なプロモーターとして機能し、その発現に関わるシス因子は転写開始点から上流 793bp 内に存在することが示唆された。

1pH01

イネ第二葉鞘を指標としたジベレリンによる葉鞘伸長促進現象の組織化学的解析

松倉千昭、伊藤伸一、根本圭介¹、谷本英一²、山口淳二（名大・生物分子応答研究セ、¹東大・農、²名市大・教養・生物）

イネ科植物の葉鞘伸長現象は種子発芽直後の葉鞘基底部分における旺盛な細胞分裂と縦方向への急激な細胞肥大という2要因から成る、初期形態形成に特徴的な生育過程である。この伸長現象はジベレリンにより促進されることが知られているが、現象面で多数の知見が得られているにも関わらず組織伸長における細胞分裂・細胞肥大の制御機構に関しては依然不明な点が多く残されている。

我々はイネ矮性品種・短銀坊主によるジベレリンバイオアッセイ系（Murakami, 1965）を利用し、第二葉鞘を指標としてジベレリン投与後48時間までの初期葉鞘伸長に及ぼす効果、特に細胞分裂・細胞肥大への影響を組織化学的手法により詳細に解析した。その結果、これらの細胞組織においてジベレリンは主として伸長は細胞の縦方向への伸長に作用し、細胞分裂には殆ど関与していないことが確認された。

1pH02

CHARACTERIZATION OF LIGHT-REGULATED EXPRESSION OF A GA20-OXIDASE OF PEA.

Yuji Kamiya, Tahar Ait-Ali, Shannon Frances, Richard E. Kendrick. Frontier Research Program, RIKEN, Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama, 351-01, JAPAN

Gibberellins (GAs) are important regulators of several aspects of plant growth, such as germination, shoot elongation and fruit development. Light also influences these processes, however, little is known how GAs and light-signal transduction interact in plant cells. To examine the light-regulation of GA biosynthesis, the expression of GA20-oxidase, an enzyme which catalyzes the final steps in the production of active GAs, was examined in pea seedlings. We found that the expression of GA20-oxidase is regulated by light as well as by the developmental stage of the plant. Interestingly, the level of expression is inversely related to the light irradiance. A similar pattern of light-regulation has been observed for the accumulation of GAs. A single red light pulse can induce transcript accumulation and mediation of this response by phytochrome is being examined in wild-type and various mutant plants.

1pH03

アズキ上胚軸切片においてGA₃によって発現量の増加する遺伝子の単離

金田剛史、柿本辰男、柴岡弘郎（阪大・理・生物）

アズキの上胚軸切片はIAA処理によって伸長し、GA₃処理はそのIAAによる伸長を促進する。このGA₃による伸長促進に関与した遺伝子を単離する目的で、ディファレンシャルスクリーニングを行い、GA₃によってmRNA蓄積量の増加する5種のcDNAの単離に成功した。これらのシーケンス解析の結果、2種の遺伝子はジベレリンによってmRNAの蓄積量の増加することが既に知られている遺伝子（*GAST1*, *γ-TIP*）のホモログで、残りの3種は新規の遺伝子であった。新規の遺伝子はタイムコースでのノーザンプロット解析より、GA₃処理による伸長促進の始まる前（GA₃処理後30分）でmRNA蓄積量に差のあるものも含まれている。これらの遺伝子の機能解析に用いる目的でアズキのトランスジェニック植物作製の検討を行っており、現在までにアズキのカルスからのシュート再生に成功している。

1pH04

*OSHI*の過剰発現による内生GA₁量の減少はGA 20-oxidaseの発現抑制を伴っている

草場新之助、村上（嘉納）ゆり子、松岡信¹、坂本知昭²、山口五十磨³、福元将志（農水省・果樹試、¹名大・分子応答、²筑波大・農学研究科、³東大・農）

我々は、以前イネホメオボックス遺伝子*OSHI*がタバコの形態および内生植物ホルモン量を変化させ、その変化が形態変化を引き起こしている可能性を示唆した。さらに、内生ジベレリンA₁ (GA₁) 量の減少が、その生合成阻害による可能性を示した。そこで、*OSHI*による植物形態形成の制御機構を解明するため、*OSHI*の過剰発現がどのような機構でGA₁の生合成を阻害しているのかを解析した。

*OSHI*の過剰発現によりその形態が大きく変化したタバコに対し、GA₁生合成の中間産物であるGA₃₃およびGA₂₀を投与したところ、GA 20-oxidaseの基質であるGA₃₃では伸長を示さなかったのに対し、GA 20-oxidaseの産物であるGA₂₀では非常によく伸長した。また、この形質転換タバコのGA₁およびGA₁₉の内生量を野生型と比較したところ、GA₁が1%以下であったのに対し、GA 20-oxidaseの中間産物であるGA₁₉は25%であった。さらに、タバコゲノムDNAより得たGA 20-oxidaseのPCRフラグメントをプローブとして形質転換体および野生型の茎における発現量を比較したところ、形質転換体では発現量の低下が認められた。これらのことから、過剰発現した*OSHI*はGA 20-oxidaseの発現抑制を介して内生GA₁量を低下させていると推察された。

1pH05

カウレン合成酵素 B はシロイヌナズナの *ga2* 突然変異体を相補する

山口信次郎¹, Tai-ping Sun², 神谷勇治¹

(¹ 理研・フロンティア, ² Dept. Botany, Duke Univ.)

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *ga2* 変異体は、発芽、抽苔、開花の諸過程にジベレリン (GA) を要求する矮性の変異体であり、GA 生合成に欠陥を有していると推定されている。生化学的な解析から、*ga2* 変異体においては、GA 生合成の早期段階を触媒する酵素であるカウレン合成酵素 B (KSB) 活性が、野生型と比較して減少していることが報告されている。そこで、カボチャ (*Cucurbita maxima*) より単離された KSB の cDNA¹⁾ を過剰発現させることにより、*ga2* 変異体の表現型が相補されるかどうかを検討した。35S プロモーターの下流にカボチャの KSB の cDNA を繋いだ融合遺伝子を *ga2* 変異体に導入した。4 つの独立した形質転換体において、ノーザン解析により外来遺伝子の発現を確認した。発芽後約 1 か月の各植物体 (地上部) の粗抽出物中の KSB 活性を調べたところ、*ga2* 突然変異体における KSB 活性は野生型と比較して少なかったが、形質転換体は野生型と同程度の KSB 活性を有していた。これらの形質転換体は、野生型と同様の表現型を示し、発芽、抽苔、開花に GA を必要としなかった。以上の結果は、カボチャの KSB により *ga2* 突然変異体の表現型が相補されたことを示している。この結果は、*ga2* 変異体において KSB 活性が減少しているというこれまでの生化学的研究結果と一致している。

¹⁾ Yamaguchi *et al.* (1996) *Plant J.* 10, 203-213

1pH06

ent-KAURENE SYNTHASE A FROM *Cucurbita maxima* AND ITS INTERACTION WITH *ent*-KAURENE SYNTHASE B

Maria W. SMITH, Shinjiro YAMAGUCHI, Tahar AIT-ALI and Yuji KAMIYA; Frontier Res. Program, RIKEN, Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-01

GAs are synthesized from geranylgeranyl diphosphate in two steps which are catalyzed by two distinct enzymes, *ent*-kaurene synthases A and B (KSA and KSB). Although both enzymes could be isolated separately from plant extracts, *in vitro* studies of their activities suggest that KSA and KSB may associate for the efficient production of *ent*-kaurene. Until now the only cloned KSB gene is that of *Cucurbita maxima*. Hence, to study the interaction between KSA and KSB, we cloned the pumpkin KSA cDNA using PCR primers designed from the conserved regions of KSA sequences from other species. The RT-PCR amplified fragments were used for screening of a pumpkin cDNA library prepared from immature seeds, and 5 cDNAs were cloned. The full-length pumpkin KSA sequence was determined from several clones, however, all clones contained some intervening sequences. A new full-length cDNA was amplified by RT-PCR using RNA from pumpkin hypocotyls and petioles, and then subcloned into the pGEX 4T-3 bacterial expression vector. Selection of bacterial clones resulted in isolation of 6 clones that could produce up to 5 mg of soluble GST-KSA recombinant fusion protein in 100 ml of bacterial culture. This GST-KSA could be isolated by affinity chromatography without loss of the KSA enzymatic activity. To determine what part of the KSA sequence is necessary for enzymatic activity and for possible interaction with KSB, a collection of truncated KSA proteins was prepared by PCR cloning and expression in bacteria. Also, the KSA and KSB cDNAs are being used for the two-hybrid assay of protein-protein interaction in yeast.

1pH07

イネ緑葉中のジベレリン結合蛋白質の細胞内局在と機能解析
小松節子, 増田泰三*, 海野和俊**, 朴杓允**

(農水省生物研, *農研センター, **帝京大・医)

<目的>植物ホルモンの結合蛋白質を介する細胞内情報伝達機構を解析する目的で、我々はすでに³H]標識ジベレリンを用いてリガンドプロットティング法により、イネ緑葉中にジベレリン結合蛋白質を見いだしている。本研究ではジベレリン結合蛋白質の機能を検討するために、抗ジベレリン結合蛋白質抗体を調整して免疫化学的にこの蛋白質の特徴を解析した。<方法>イネ (品種日本晴) 吸水後 2 週間の緑葉から蛋白質を抽出し、二次元電気泳動後ジベレリン結合蛋白質をゲルより回収し、ウサギに免疫後ポリクローナル抗体を調整した。ジベレリン結合蛋白質のリン酸化能の変動については、緑葉から抽出した蛋白質を、[γ -³²P]ATP 含有反応液中でリン酸化後二次元電気泳動を行い、リン酸化パターンを比較した。<結果>ジベレリン結合蛋白質は発芽後 10 日目から 2 ヶ月間の葉鞘・葉身中に、免疫染色法によって認められた。超遠心分離法を用いての分画により、ジベレリン結合蛋白質は細胞質と膜の両画分に存在しているが、主に膜画分で顕著にリン酸化されていることが明らかになった。抗ジベレリン結合蛋白質抗体と抗ジベレリン抗体を用いて免疫電子顕微鏡法により、ジベレリン結合蛋白質とジベレリンは共に、核膜、ミトコンドリア膜、microbody 膜等に存在していることが確認された。

1pH08

蛍光標識化アブシジン酸・ジベレリンとオオムギアリユーロン細胞プロトプラストの相互作用解析研究

浅見忠男, 山本晋¹, Maurizio Pulici, 一瀬勝紀, 瀬戸秀春, 中野雄司, Masumi Robertson², 安藤哲¹, 室伏旭³,

吉田茂男 (理研・植物機能,¹ 東農工大・BASE,

²CSIRO・オーストラリア,³ 東大・応生)

オオムギアリユーロン細胞は植物ホルモンであるジベレリンやアブシジン酸の刺激に対し明瞭な応答をすることから、これら植物ホルモン受容研究に適した材料である。我々はこの受容を可視化することを目的として両植物ホルモンの (FABA・FGA) の蛍光標識化合物を調製し、直接的な細胞との相互作用の解析が可能なアリユーロン細胞のプロトプラストを用いてこれら蛍光標識化合物との相互作用について研究を行った。アリユーロン細胞系において FABA、FGA 共にアブシジン酸やジベレリンと同質の活性を有していた。相互作用についてはフローサイトメーターやセルスキャン型蛍光顕微鏡を用いて解析した結果、FABA や FGA は細胞膜上に結合していることが確認できた。

1pH09

チューリップにおけるガム物質生成に対するジャスモン酸メチルエステルの効果：特にエチレン生成との関係
Marian Saniewski, 宮本健助¹, 上田純一¹
(ポーランド果樹学、花卉学研究所、¹大阪府大・総合科学)

チューリップにおけるガム物質生成に対するジャスモン酸メチルエステル(JA-Me)の影響をエチレン生成の観点から研究した。無傷チューリップの球根、茎、および葉の下部にJA-Meをラノリンペーストとして処理するとエチレン生成が増大するとともにガム物質の生成がみられた。エチレンやエチレンの前駆体である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)およびエチレン生成物質であるエテホンはチューリップ球根におけるガム物質の生成には効果的であったが、茎と葉の基部では効果的ではなかった。JA-Meの効果は、エチレン生合成阻害剤を用いて、エチレン生成をある程度阻害しても認められた。また、低濃度のJA-Meはガム物質の生成に効果的ではなかったが、ACC存在下では効果的であった。以上の事実は、JA-Meによるガム物質生成はJA-Meによって誘導されるエチレンの効果に由来するものではないこと、さらにエチレンはチューリップ組織のJA-Meに対する感受性に影響することを示唆している。

1pH10

エチレンによる浮稲節間の伸長促進と蒸散の関係
東 哲司¹, 原 愛², 山村教子², 内田直次^{1,2}, 安田武司^{1,2}
(¹神戸大・自然科学, ²神戸大・農)

浮稲節間は、高湿度環境でのエチレンあるいはジベレリン(GA)処理により著しく伸長する。しかし、低湿度環境では、GAは節間の伸長を促進するが、エチレンは伸長を促進しない[1]。我々は、この現象がアブシジン酸含量の変動では説明することができないことをすでに報告した[2]。

低湿度条件で細胞が伸長するためには、水中や高湿度条件に比べて植物体からの水分の蒸散量が多くなるので、細胞の成長に必要な膨圧を得るにはより高い浸透圧を要すると考えられる。事実、低湿度環境でGAにより伸長誘導を受けている節間組織では、高湿度条件でGAにより伸長している節間組織に比べて、その浸透ポテンシャルは低い値に維持されており、そしてその浸透調節に、少なくとも糖が関与していることを報告した[3]。

今回我々は、乾燥と加湿条件下でのエチレンとGAによる節間の伸長促進作用の違いと蒸散との関係を調査した。その結果、高湿度条件ではエチレンとGA処理によって蒸散量には差が認められなかったが、乾燥条件下ではエチレン処理によって蒸散量が増大した。これらの結果は、エチレンによる浮稲節間の伸長促進が周りの水分環境によって影響を受けるのは、エチレンによる蒸散の促進と関係のあることを示唆する。さらに深水下での節間の伸長促進は、エチレン量の増大と水中での蒸散量の低下によってもたらされると考えられる。

[1] Plant Cell Physiol 32: 307-309 (1991) [2] J Plant Physiol 146: 323-328 (1995) [3] Physiol Plant: in press

1pH11

黄化ヤエナリ胚軸から精製されたエチレン生成阻害タンパク質の全長cDNAのクローニング及びその発現分析
陳暖、酒井慎吾 (筑波大・生物科学)

黄化ヤエナリ胚軸から分離精製された112kDaのエチレン阻害タンパク質の全長cDNA配列をRT-PCRとRACE-PCR法により決定した。1760ヌクレオチドからなるこの遺伝子は508個アミノ酸をコードするORFを含み、その分子量は54,307と推定された。推定アミノ酸配列のホモロジー検索の結果、報告されているエンドウ豆とアブラナ属の植物における膨圧応答遺伝子と約80%、線虫とヒトの遺伝子と約60%の相同性が認められた。同時に通常のアルデヒド デヒドロゲナーゼと約30%の相同性もあった。遺伝子発現のノーザン分析の結果、種子発芽過程においては、浸水後二日の初期で阻害タンパク質のmRNAが植物全体(子葉、胚軸、根、芽生え)で検出された。そして、発芽後期の遺伝子発現は、特に上胚軸で、連続光照射により制御された。

1pH12

クロモサポニンIによるレタス根の成長促進作用におけるエチレンの関与
鶴見誠二、石沢公明¹ (神戸大・自然科学, ¹東北大・院・理・生物)

エンドウ芽生えから得られるクロモサポニンI(CSI)が、数種の植物の根の成長を促進する作用があること、また、レタス根の成長促進は、細胞壁の伸展性の増大による、細胞の伸長成長の促進であることを既に報告した。今回は、CSIの作用に対するエチレンの関与を検討したので報告する。

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) の芽生えのエチレン生成速度は、 $0.7 \text{ nL } 10 \text{ seeds}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり、CSIばかりでなく、エチレン生合成阻害剤である2-aminoethoxyvinyl-glycine (AVG)、エチレン作用阻害剤である2,5-norbornadiene (NBD)もレタス根の成長を促進し、皮層細胞を細長くする。CSIによる成長促進作用は、 $3 \mu\text{M}$ AVG、あるいは $150 \mu\text{L L}^{-1}$ NBDによって消失し、エチレン添加によって回復する。また、CSIによる成長促進作用は、エチレンの生成速度に対する影響では説明できず、エチレンに対する反応性の低下による。以上のことから、CSIはエチレンの作用を阻害することにより、細胞壁の伸展性を増大させ、細胞の伸長成長を促進していると思われる。

1pH13

メロン果実のエチレン生成機構の解析

加藤俊彦¹、大谷珠代²、川合啓介¹、平林哲夫³、中川弘毅¹、佐藤隆英^{1, 2} (1千葉大・園芸、²千葉大大学院・自然科学、³日本園研)

メロン果実はクリマクテリック果実で成熟に伴いエチレンを生成する。果実のエチレン生成は種子や胎座組織から始まり果肉に広がる。単為結果果実を用いて種子が果実のエチレン生成に与える影響を調べたところ、受粉果実に比べて7日程度遅れた。受粉果実の種子ではエチレン生成がみられた。メロン果実の種子と胎座のエチレン生成を胎座と種子が分離できる着果後17日目より経時的に調べると、胎座組織が崩壊する17日目の胎座と種子においてオーキシン誘導型ACC合成酵素遺伝子 (ME-ACS2、3) が発現していた。さらに種子が成熟する35日目に種子でACCオキシダーゼ遺伝子の発現がみられた。55日頃から果実の成熟に伴うエチレン生成がはじまり、胎座と果肉で傷害型ACC合成酵素 (ME-ACS1) とACCオキシダーゼのmRNA量が上昇したが、さらに、低いながらME-ACS2、3の発現がみられた。これらの結果から果実の成長・成熟とエチレン生成の関連について検討する。

1pH14

RT-PCRを用いたメロン葉のACC合成酵素遺伝子およびACC酸化酵素遺伝子の発現解析

古川 一、尾崎武司、今堀義洋、和田光生、小田雅行 (大阪府大・農・応用植物科学)

エチレン生成経路において、最後の2ステップの反応はACC合成酵素およびACC酸化酵素によって行われる。私たちは、RT-PCR法によって、メロン葉のACC合成酵素遺伝子とACC酸化酵素遺伝子の発現を調べた。この2つの遺伝子では、傷、IAAおよびエチレン処理の後20分でRT-PCR増幅産物が検出できた。ACC合成酵素遺伝子では、RT-PCR増幅産物は30回増幅しないと検出できなかったが、ACC酸化酵素遺伝子では、23回の増幅で検出できた。このことから、メロンの各処理葉において、ACC酸化酵素 mRNAはACC合成酵素 mRNAより、多く含まれていると考えた。

1pH15

ACC合成酵素アイソザイムの解析

立木 美保、森 仁志 (名古屋大・農・生化学制御)

我々はエチレン生成経路の律速酵素ACC合成酵素 (ACS) の発現調節機構を解析することにより、エチレン生成調節機構の解明を試みている。これまでにトマトから6種類 (LE-ACS1b, 2, 3, 4, 6, 7) のACS cDNAを単離し、ノザン解析からそれぞれのアイソザイムの発現が刺激により異なることを明らかにした。しかし、これらのアイソザイムのうち、その発現量がエチレン生成量と必ずしも一致しないものも見いだされ、転写制御のみならず転写後の制御機構も示唆されている。そこで、エチレン生成に実際に寄与しているアイソザイムを検出するためにタンパク質レベルでの解析を試みた。

まず、トマトのアイソザイム (LE-ACS1b, 2, 3, 4) の特異抗体を作製した。得られたポリクローナル抗体をアフィニティ精製し、各々のアイソザイムを特異的に認識する抗体を調製した。これらの抗体は大腸菌に発現させた各々のACS 活性を特異的に捕捉した。そこで、この抗体を用いてトマト果実粗抽出液に含まれるアイソザイム活性を比較したところ、収穫直後の赤色果実では、ACS2およびACS4活性は同程度であったが、収穫後1日以上経過した赤色果実では、ACS4活性は検出されず、ACS2活性のみ検出された。これらの結果は、mRNAの発現様式と一致している。また、エチレン生成量とmRNA量の一致しない場合についても報告する。

1pH16

サイトカイニン処理後短時間で発現が抑制されるbHLHタンパク質をコードする遺伝子の解析

遠山知子、寺本陽彦¹、岡田清孝、竹葉剛¹ (京都大・理・植物、¹京都府大・生活科学・応用生物)

我々はサイトカイニンの作用機構を分子レベルで明らかにすることを目的として、これまでにキュウリ黄化子葉においてサイトカイニン的一种であるベンジルアデニン

(BA) 処理後2-4時間で発現が抑制される遺伝子のcDNA (CR9、CR20、CRR1-86) を単離して、その解析を進めてきた。その中でCRR12は687アミノ酸からなる分子量75.4 kDaのタンパク質をコードしているが、N末端に転写の活性化に必要なプロリン-リッチな領域を、C末端にDNAへの結合に必要な塩基性領域とそれに隣接したヘリックススループヘリックス (bHLH) モチーフを含み、転写調節因子として働くと考えられる。CRR12は、同様にヘリックススループヘリックスモチーフを持つトウモロコシの*R gene family* と20%近くの高同源性があった他、インゲンマメのファゼオリン遺伝子上流のGボックスに結合するタンパク質であるPG1とは56.4%とより高い高同源性があり、PG1の高同源性である可能性がある。今回はCRR12に対応するmRNAの植物体での局在性や、各種ホルモンなどの刺激への応答性など、CRR12の性質について報告する。

2aH01

ISOLATION OF *CHLAMYDOMONAS* MUTANT IMPAIRED AT THE INTERVENING STEP IN ABSICISIC ACID BIOSYNTHESIS

ALIA, Akira KATO, Shinichi TAKAICHI¹, Tony H. H. CHEN², Norio MURATA; Natl. Inst. Basic Biol., Myodaiji, Okazaki, 444; ¹Biological Lab., Nippon Medical School, Kawasaki 211; ²Department of Horticulture, 4017 Ag and Life Sciences, Corvallis, Oregon 97331-7304

Abscisic acid is a sesquiterpenoid plant growth regulator that has been implicated in controlling a wide range of essential physiological processes. Despite considerable progress in the elucidation of ABA biosynthesis pathway, little information is available regarding the gene involved in various steps of this pathway. Present studies were initiated with the aimed to isolate genes involved in various steps of ABA biosynthesis. First, mutants were obtained by random integration of argino succinate lyase gene into the chromosome of a cell wall-deficient (cw15) arginin auxotroph (arg2) of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mutants were screened for the abnormal levels of ABA by using enzyme-linked immuno assay. Several mutants with considerably low ABA content have been isolated after repeated screening. HPLC profile of carotenoids showed no major difference in the levels of xanthophylls in most of these mutants. However, one of the mutant (M526) showed a significant reduction in the level of 9'-cis neoxanthin and all-trans-neoxanthin with concomitant increase in the level of trans-violaxanthin and 9-cis violaxanthin. These results suggest that this mutant is defective in the steps for conversion of violaxanthin to neoxanthin (an intervening step for synthesis of ABA from carotenoids).

2aH02

クラミドモナスにおける violaxanthin の異性化に関与する遺伝子の探索

加藤 彰, Alia, Tony Chen¹,
村田紀夫 (基生研, ¹オレゴン州立大・園芸)

植物細胞内で行われる violaxanthin を neoxanthin に異性化する反応は、植物ホルモンの一種、アブサイシン酸をカロチノイドから生合成する経路に含まれる重要なステップである。我々は、緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) にジーン・タギングを行い、カロチノイド類の組成を分析して、この異性化のステップを失っていると考えられる変異株を見出ししている (M526)。M526 の染色体 DNA からタギングされている領域をプラスミド・レスキューによってクローニングし、この領域を解析した。

2aH03

ジャスモン酸前駆体類とそれらの類縁化合物の生理活性

幸田泰則、喜久田嘉郎、戸嶋浩明¹、市原耿民¹ (北海道大・農・作物生理、¹生物有機)

バレイシヨの塊茎形成は、ストロンの細胞の肥大成長によって開始される。しかし塊茎形成物質として単離されたチュベロン酸(TA)は塊茎形成は促進するが、細胞の肥大成長を引き起こす能力は持たない。一方、ジャスモン酸(JA)は塊茎形成活性も細胞肥大促進活性も持っている。TAは長距離移動型の塊茎形成シグナルであり、*in situ*で塊茎形成を引き起こしているのは、JAであると考えられる。そこで塊茎形成中のストロン及び生育塊茎に含まれるJAの量を測定した結果、TAは多く存在したが、JAはわずかしか検出されなかった。JAそのものではなくJAの前駆体類が塊茎形成に関与している可能性が残されている。そこでまず12-oxo-PDA, OPC-8:0, OPC-6:0, OPC-4:0の塊茎形成活性、細胞肥大促進活性を比較した。12-oxo-PDAはアマ発芽種子を用いてリノレン酸から酵素的に合成し、他は化学合成によって得た。これのJA前駆体類はいずれもJAと同程度の両方の活性を示した。しかし-COOH基側の側鎖が奇数個の炭素を持つOPC-7:0とOPC-5:0は全く活性を示さず、逆に阻害する傾向を示した。

2aH04

単細胞緑藻ドナリエラにおけるジャスモン酸の存在と生理的役割

藤井修平、山本良一、宮本健助¹、上田純一¹ (帝塚山短大、¹大阪府大・総合科学)

単細胞緑藻ドナリエラ (*Dunaliella*) は幅広い塩濃度に適応できる耐塩性藻類である。これまで、ドナリエラにおいて内生生理活性物質の検索がなされてきた。その結果、アブシジン酸の存在が明らかにされ耐塩性との関連が論じられつつある。演者らは、*D. tertiolecta* と *D. salina* を対象に、ガスクロマトグラフ/質量分析計を用いて他の生理活性物質の探索を行い、いずれの種にも新規植物生理活性物質として注目されているジャスモン酸の存在を確認した。これは、ドナリエラにジャスモン酸類の存在を示した最初の報告である。また、より高い塩濃度環境が成長にとって至適な種である *D. salina* は、*D. tertiolecta* に比べて高濃度のジャスモン酸を含んでいた。この事実は、ジャスモン酸がドナリエラの生育や浸透調節などの耐塩性機構に対し何らかの生理的役割を担っていることを示唆するものである。

2aH05

タバコ培養細胞におけるフェニルアラニンアンモニアリアーゼの誘導と遺伝子解析

Manisha Sharan¹、権田恵一¹、情家高史¹、
田口悟朗²、林田信明¹、下坂誠²、岡崎光雄^{1,2}

(¹信州大・繊維・応生、²信州大・遺伝子実験施設)

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) はフェニルプロパノイド生合成経路の初期反応を触媒し、様々なフェノール化合物の生合成を調節している。本研究では *Nicotiana tabacum* の培養細胞におけるジャスモン酸メチルとエリシターに対する応答の違いを検討した。PALは両刺激に対して酵素レベル、転写レベルで誘導されたが、フェニルプロパノイド代謝系の最終産物クマリン類のスコポリン、スコポレチンの生合成を誘導したのはジャスモン酸だけだった。タバコゲノム中のPAL遺伝子の解析を行ったところ、gPAL1、gPAL2と命名した2つのクローンが得られ、small gene familyを構成していることが示された。ノーザン分析を行いgPAL1がジャスモン酸メチルによって誘導されていることが分かった。またプロモーター部におけるジャスモン酸とエリシターの応答領域の解析を行っている。

2aH06

エンドウのブラシノステロイド生合成変異体 *lkb* はステロール生合成に欠陥がある

野村崇人、高津戸秀¹、横田孝雄² (宇都宮大・農・生物生産、¹上越教育大・自然系化学、²帝京大・理工・バイオサイエンス)

エンドウのブラシノステロイド生合成変異体 *lkb* と感受性変異体 *lka* の内生ステロールの解析を行った。*lkb* の茎葉部では、campesterolがwild-typeの11%に低下していた。それに対してその前駆体である24-methylenecholesterolが25倍に蓄積していた。またcampesterolとともに植物の代表的なステロールであるsitosterolとstigmasterolもそれぞれ10%、1%と極めて低下し、その前駆体であるisofucosterolが12倍に蓄積していた。このことによりエンドウLKB遺伝子はステロールの $\Delta 24$ の還元を制御しており、*lkb* のブラシノステロイド欠損はステロール生合成経路の欠陥によることが明らかとなった。また*lkb* の細胞膜画分においても、膜構成成分とされるcampesterol、sitosterol、stigmasterolが低下していた。*lkb* では $\Delta 24(28)$ -sterolsがそれらの代りに構造的役割を演じていると思われる。なお感受性変異体である*lka* の内生ステロールはwild-typeと同じであった。

2aH07

カボチャ下胚軸におけるブラシノライドの伸長促進作用の機構解明

上村千晶、富永み、桜井直樹 (広島大・総合科学)

ブラシノライド (BR) の伸長誘導機構解明のため、黄化カボチャ下胚軸を用いて以下の実験を行った。下胚軸切片を0.2 μ MのBRで処理すると、未処理のものと比較して2倍程度の伸長促進が観察された。この時KCl(3 mM) およびスクロース(10 mM)を加えると、伸長は更に35%相乗的に促進された。切片のシンプラストの溶質濃度は、BR+KCl+スクロースで2時間処理したものが、未処理のものより30%程高い値を示したが、6時間以降では差がなかった。濃度勾配法により調製した液胞膜のATPaseの活性は、0.1 μ Mバフィロマイシンで50%阻害され、0.02 μ MのBRで50%促進された。しかし、PPaseと原形質膜ATPaseの活性には影響がなかった。以上の結果より、ブラシノライドは、液胞膜結合型H⁺-ATPaseを活性化し、KCl、スクロースなどの溶質を取り込むことによって、液胞内の浸透圧を上昇させ、これが伸長生長の原動力となっていると考えられる。

2aH08

アスパラガス花芽化学誘導におけるEFP (Early Flowering Protein) の解析

Dennis Yeo¹、阿部知子、安部弘、桜井成、吉田茂男 (理研、¹埼玉大)

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の種子をチオカーバメート類などの化合物で処理することにより1カ月の実生約80%に花芽が誘導される。薬剤処理により17kDaの蛋白質 (Early Flowering Protein: EF) が特異的に増加し、そのアミノ酸配列を解析したところPR1蛋白質と相同性が高いことが判明した。RT-PCRでこの蛋白質のcDNAをクローニングしたところ、傷害によって誘導されるアスパラガスのPR1蛋白質AoPR1との相同性は57%であった。ノーザン解析を行ったところ、薬剤処理2時間後にはEFP遺伝子の発現確認された。また抗体を作成しEFPの発現を調査したところ、薬剤処理4日間でその発現量は上昇し、実生では花器で強く根部で微量認められた。成株でもその発現は花器および根部に認められ、開花直前の雄花に顕著に観察された。

2aH09

ストレスでつくられる花成誘導因子の構造決定
横山峰幸、山口祥子、猪股慎二、小松一男¹、吉田誠一¹、
阪本興彦、小島清隆²、貝原純子³、滝本敦³ (資生堂薬剤研、
¹資生堂安分セ、²資生堂R&D室、³京都生物研)

ストレスでつくられるFactor C (FC) とノルエビネフリン (NE) の反応物がアオウキクサの花芽形成を誘導することは既に報告した^{*}。FCの構造決定を目指し、軽く乾燥ストレスをかけたアオウキクサ (P441) を水浸した溶液中の成分からアオウキクサ (P151) 花成誘導力を指標にFCの単離を試みた。クロロホルムによる分液およびHPLCの分取により、ほとんどの活性は単一のピークに集中した。純化したFCはNMR、FAB-MS、IRスペクトルなどにより、(12Z, 15Z)-9-hydroxy-10-oxo-12, 15-octadecadienoic acidと同定された。FCは、ストレスによりリノレン酸がlipoxygenaseによって9位の位置にhydroperoxyl化されることにより生成されると考えられる。ストレス下で生じるリノレン酸代謝物はジャスモン酸が注目されているが、ジャスモン酸が生成するためにはリノレン酸の13位がhydroperoxyl化されることが必要であり、FCの作用はジャスモン酸によるものではない。単離したFCとNEをインキュベーションしたとき、FC濃度の減少と花成誘導力の増大化は相関していた。また、FCとNEは等モルずつ反応することが推察された。

^{*}Takimoto, A., Kaihara, S. and Yokoyama, M., *Physiol. Plant.* 92: 624-628. 1994

2aH10

新規植物成長調節物質 Dr6 の作用機構に関する研究
中嶋直子、平館俊太郎 (農業環境技術研究所)

クマツヅラ科のタイワンレンギョウ (*Duranta repens*) から単離された新規の生理活性物質 Dr6 は、トリテルペノイド系のサポニンで、植物に対し成長阻害作用を持つ。本研究では、Dr6 の成長阻害作用のメカニズムを解明するため、植物の形態形成に及ぼすDr6の影響について調べた。0、63、125、250、500、1000 μM のDr6を含む0.5%寒天上にキュウリを播種し、その成長の過程を経時的に観察したところ、125、250 μM で根の伸長抑制と、横方向への肥大の促進がみられた。500、1000 μM では、発芽後、ほとんど成長しなかった。播種2週間後、125、250 μM のDr6を処理したキュウリの根において、細胞内に多量の澱粉粒が蓄積していることが光学顕微鏡下で観察された。このような澱粉粒の蓄積は、無処理区ではみられなかった。このことから、Dr6は、キュウリの根の形態形成および物質代謝に影響を及ぼすことが推測された。本報告ではさらに、キュウリ体内の澱粉、可溶性糖、遊離のアミノ酸含量等の分析結果についても報告する。

2aH11

ベチュニアのグルタミン酸炭酸酵素のアンチセンス遺伝子導入による機能解析
平山壮規¹、馬場晶子¹、Gibson Baum²、Hillel Fromm²、半田高³、高柳謙二³、
高田博志¹
(¹農水省・生物研、²Weizmann Institute of Science、³筑波大・農)

グルタミン酸炭酸酵素 (GAD) はグルタミン酸をγ-アミノブチル酸 (GABA) に変える反応を触媒する。GABAは動物において神経伝達物質の主要な阻害物質であり、またホルモンの放出の制御にも関与しているが、植物においては役割はほとんど分かっていない。ベチュニアからGADの遺伝子 (GAD) をクローニングし、遺伝子産物の活性を検討した結果から、植物のGADは動物のものとは異なり、カルモジュリン結合能を有し、Ca²⁺/カルモジュリンによって酵素活性がコントロールされていることが分かってきた。また、カルモジュリン結合ドメインを削除した遺伝子をタバコで過剰発現させると、GABAを恒常的に生産するようになった結果、短根、花粉の欠如、通常より早い花の萎凋などの変化を示す。

本研究では、ベチュニアGADをカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターにアンチセンス方向につないでベチュニアに導入し、発現を抑制したときに起こる植物体への影響の解析を試みた。アグロバクテリウムを介してリーフディスク法により形質転換を行った結果、ベクターのみを導入したものは正常にカルスを生じ、再分化したのに対して、アンチセンスGADを導入すると、カルス化がほとんど起こらないという結果を得た。このことは、GADおよびGADによって生産されるGABAが植物の生育に必須であることを示唆している。あわせてGADにトランスポゾンが挿入した変異体による機能解析の試みについても報告する。

3aH01

完全合成改変 green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を用いた高等植物におけるタンパク質細胞内局在部位の解析
平野貴謙、清水正則、小林裕和、丹羽康夫
(静岡県大・生活健康科学)

クラゲから単離された GFP (green fluorescent protein) 遺伝子は、基質を必要としない点で、これまでに用いられてきたレポーター遺伝子より優れている。65番目のアミノ酸残基をSerからThrに置換し、以下の特徴を持つよう改変した sGFP(S65T) 遺伝子を完全合成した。(1) 励起波長は、490 nm (青色光) の単一ピークで、クロモフォア形成が速い、(2) ヒト、トウモロコシ、およびシロイヌナズナの核遺伝子における最適なコドンを使用している、(3) 総合した蛍光量がもとのクラゲのGFPより120倍明るい、(4) 主要な制限酵素部位と cryptic intron 部位が除かれている (*Current Biology*, 6, 315-324 and 325-330, 1996)。

パーティクルガンにより、タマネギ表皮細胞、およびシロイヌナズナの葉あるいは根細胞中に導入し、一過性発現を検討した。sGFP(S65T) は、核、葉緑体、ミトコンドリア各々の移行シグナルと融合することにより、期待する細胞内オルガネラへ移行し、局在を高感度に検出することが可能であった。sGFP(S65T) 単独で導入した場合には、細胞質および核にシグナルが検出された。クロロフィル a/b 結合タンパク質あるいは、フィトクロームの全配列を sGFP(S65T) と融合したキメラタンパク質について、その局在を検討している。また、sGFP(S65T) を用いたエンハンサー/ジントラップ系の開発も行っている。

3aH02

精製前駆体を用いた葉緑体への蛋白質輸送の競争阻害実験
広橋利哉、中井正人、藤田祐一、長谷俊治 (阪大・蛋白研)

葉緑体蛋白質の多くは、細胞質ゾルで、そのアミノ末端側に葉緑体局在化のための延長ペプチドが付加された前駆体として合成された後、葉緑体へ移行する。前駆体における延長ペプチドのいかなる構造特性が、葉緑体局在化において重要なものかについては、不明な点も多い。そこで、本研究では、大腸菌において大量発現させ精製した前駆体蛋白質を用いて変性条件及び未変性条件における葉緑体への局在化能の解析を行なった。

まず、トウモロコシのフェレドキシIII (FdIII) 前駆体を大腸菌で大量発現させたところ、大部分は不溶性の封入体形成したが、一部は可溶性の画分に回収された。この可溶性の画分から精製した FdIII 前駆体は、そのスペクトルや電子伝達活性の測定から、鉄硫黄クラスターを有する、ホロ型の FdIII 前駆体であることが判明した。このホロ型 FdIII 前駆体は、小麦胚芽抽出液で合成したいくつかの前駆体蛋白質の単離葉緑体への輸送を競争的に阻害しなかったが、ホロ型 FdIII 前駆体を尿素変性させたところ、顕著な競争阻害が観察された。次に、FdIII 前駆体の延長ペプチドとジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) との融合蛋白質 (FdIII-DHFR 前駆体) を大腸菌において発現・精製して、同様の競争阻害実験を行なった。その結果、FdIII-DHFR 前駆体は、尿素変性した場合だけでなく、DHFR としての活性を有する非変性状態でも、葉緑体への蛋白質輸送を競争的に阻害した。以上の結果は、ホロ型 FdIII 前駆体と FdIII-DHFR 前駆体とは、非変性条件においては、延長ペプチド部分の高次構造や存在状態が異なることを示している。

3aH03

酵母の小胞輸送欠損株を用いた遺伝学的手法によるシロイヌナズナの遺伝子のクローニング
松田憲之、中野明彦 (東京大・院理系・生物科学)

小胞輸送は真核細胞生物において、オルガネラの機能の維持や細胞の拡張のために必須である。酵母を用いた遺伝学的な解析と試験管内で輸送を再構成する生化学的な解析により、そのメカニズムは酵母から動物まで高度に保存されていることが明らかにされてきた。植物においても小胞輸送は必須であり、形態形成との強い関連を示唆する報告も存在する。しかしその分子機構はほとんど分かっていない。

そこでわれわれは酵母の遺伝学的手法を用いて、高等植物由来の小胞輸送に関与する遺伝子の単離を試みた。まず酵母細胞中で発現が制御できるように、シロイヌナズナの cDNA を酵母の GAL1 プロモーターにつないだライブラリーを作成した。このライブラリーをゴルジ体以降の小胞輸送に欠損のある一連の酵母温度感受性 (ts 性) 変異株 (*sec1*, *sec2*, *sec4*, *sec7*, *sec8*, *sec10*, *sec15*) 中で発現させて、ts 性を相補する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、*sec15* 変異株において ts 性を相補する複数のクローンが得られた。クローンのひとつ (15c-10) は RING finger モチーフを持つ新規の膜タンパク質であった。RING finger モチーフ自体の機能はまだ良く分かっていないが、興味深いことに、複数の細胞内輸送に関与する膜タンパク質 (Vps18, Pep5, Pex2 等) 中にもこのモチーフは存在する。現在 RING finger モチーフに着目してこのクローンの解析を行っている。

また、上記以外的小胞輸送の変異株についてもスクリーニングを続けており、その結果についてもあわせて報告したい。

3aH04

小胞体-ゴルジ体間輸送に必須な Sar1 GTPase
-植物 SAR1 遺伝子の優性致死型変異による効果
竹内雅直、中野明彦 (東大・院理系・生物科学)

低分子量 GTPase である Sar1 タンパク質は、酵母における分泌経路の小胞体-ゴルジ体間輸送に必須である。われわれは、植物細胞における分泌のメカニズムを研究するために、タバコ BY-2 細胞をひとつの実験系に選び、タバコ SAR1 遺伝子の cDNA をクローニングした。昨年の本大会で発表したように、タバコ SAR1 遺伝子は、酵母 SAR1 と高い相同性を有し、酵母内で GAP プロモーターの制御下で発現させると、酵母 SAR1 の欠失変異による致死性を相補することができる。しかし、この相補は完全ではなく、温度感受性を示すノーザンブロット解析を行ったところ、タバコ SAR1 は、BY-2 細胞だけでなく、タバコ植物体でもほとんどすべての器官で発現していることがわかった。また、BY-2 ゲノム DNA を用いてのザザンブロット解析を行った結果、高ストリンジエンシーの場合に 3、4 本、低ストリンジエンシーの場合に 4 本から 6 本のバンドが検出されることから、タバコ SAR1 は、単相ゲノムあたり、きわめて類似した遺伝子が 1 または 2 コピーと、さらに少し相同性が低い遺伝子が存在し、ひとつの遺伝子ファミリーを形成しているのではないかと考えられる。われわれは、植物細胞内で優性致死型変異 SAR1 を過剰発現させることによって、細胞内小胞輸送を制御するシステムの構築をめざしている。そのツールとして用いる変異型植物 SAR1 の効果を検討するために、酵母 SAR1 を欠失させ、植物の SAR1 に依存した酵母細胞株を構築し、その細胞内で種々の変異型植物 SAR1 を GAL1 プロモーターの制御下で過剰発現させて生育に対する影響を観察した。その結果、タバコ SAR1 H74L とシロイヌナズナ SAR1 N129I を発現した場合に、優性の生育阻害が観察された。またこの植物変異 SAR1 による優性の阻害効果は、酵母野生型 SAR1 遺伝子に対しても観察された。現在、これらの優性致死変異による効果が、小胞体-ゴルジ体間輸送の阻害によるものであるかどうかを検討している。

3aH05

Ara4 GTPase とその相互作用因子の酵母を用いた解析
上田貴志、松田憲之¹、穴井豊昭²、塚谷裕一、内宮博文、中野明彦¹ (東大・分生研、¹東大・理・生物科学、²筑波大・応用生物)

rab/YPT family に属する低分子量 GTPase は、真核生物に普遍的に存在し、GTP/GDP 結合型の構造変換 (GTPase cycle) を通じて、細胞内の小胞輸送経路における分子スイッチとして機能している。しかし、それらの植物における機能の多くは未解明のままであり、さらに、GTPase cycle の制御機構や、その下流の情報伝達機構についての情報はほとんど皆無であった。

我々は、アラビドプシス由来の rab/YPT family の一員である Ara4 について解析を行ってきた。Ara4 タンパク質は、ゴルジ層板及びその周辺の小胞に局在していることから、ゴルジ体周辺の小胞輸送のステップを制御していると考えられる。Ara4 を酵母の一連の ypt 変異株に発現させると、その生育を著しく阻害する。この現象は、野生型より GTP 固定型の変異体 Ara4 においてより強く見られるが、GDP 解離抑制因子 (GDI) の過剰発現によりある程度抑圧されることから、Ara4 による酵母変異体の生育阻害の一部は、酵母本来の GDI を Ara4 が奪ってしまうために起こることが明らかとなった。本大会では、GDI との結合が不可能となる、あるいは GDP 固定型となるような変異 Ara4 タンパク質についての酵母を用いた機能解析とともに、Ara4 と相互作用する新たな因子についても発表する。

3aH06

酵母のオートファジーに必須なAPG9遺伝子産物の局在の解析

徳永 税、田上 不比人¹、野田 健司、大隅 萬里子¹、大隅 良典（基礎生物学研究所・エネルギー変換、¹帝京科学大・バイオサイエンス）

酵母の液胞は分解コンパートメントとして機能している。細胞はオートファジーにより細胞質成分を非選択的に液胞へ送り込み分解する。オートファジーはオートファゴソームの形成、液胞との融合といった大規模な膜現象を伴い進行するが、オートファジー不能変異株*apg9*変異株ではオートファゴソームの形成が行われない。今回APG9遺伝子のクローニング及び塩基配列の決定を行った。APG9は複数回膜貫通型の蛋白質をコードしており、mycタグをつけたAPG9遺伝子産物（Apg9p）が膜画分に局在することが細胞分画により明らかになった。また、オートファジーが誘導される栄養飢餓条件下にApg9pの局在性が変化することが明らかになった。現在、Apg9pの局在についてさらに詳細に検討している。

3aH07

液胞システインエンドペプチダーゼ中間体のN末端アミノ酸配列決定およびタバコ培養細胞への導入
柚木 篤史、岡本 龍史、南川 隆雄（東京都立大・理・生物）

システインエンドペプチダーゼ SH-EP はケツルアズキ (*Vigna mungo*) 発芽子葉中で発現し、種子貯蔵タンパク質の分解に主要な役割を担っている。SH-EP は 43 kD 中間体として小胞体内腔に局在したのち、39 kD および 36 kD の中間体を経て、33 kD 成熟型として液胞に存在することが明らかにされている。その際に切除される N 末端プロペプチド領域には、液胞への輸送シグナルが存在すると予想される。

今回、各中間体の部分精製を行い、それぞれの N 末端のアミノ酸配列をほぼ決定し、プロセッシング部位の同定を行った。また、SH-EP cDNA をタバコ培養細胞 BY-2 へ導入した結果、活性をもつ SH-EP が発現し、そのプロセッシング様式はケツルアズキ葉中のそれと類似していた。現在、プロペプチド領域の一部を欠失させた cDNA の導入を試みており、N 末端プロペプチドの細胞内輸送における役割の解析を進めている。

3aH08

液胞システインエンドペプチターゼ(SH-EP)における KDEL 配列を含む C 末端プロペプチドの翻訳後プロセッシング

宮腰 信、岡本龍史、南川隆雄（東京都立大・理・生物）

システインエンドペプチターゼ SH-EP はケツルアズキ (*Vigna mungo*) の発芽子葉中で発現し、種子貯蔵タンパク質の分解に働く酵素である。SH-EP 前駆体は翻訳と同時に小胞体内腔に導入され、シグナルペプチドの切除を受けて 43kD 中間体として合成される。中間体はさらに 43kD→39kD→36kD→33kD という多段階のプロセッシングを受け、成熟型酵素として最終的に液胞に局在する。SH-EP の cDNA 塩基配列から導かれるアミノ酸配列の C 末端には、小胞体残留シグナルとして知られる Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 配列が存在するが、成熟型酵素ではこの KDEL 配列を含む 10 アミノ酸残基からなるプロペプチドが切除されている。本研究では、この C 末端プロペプチドのプロセッシングが SH-EP の成熟過程のどの段階で起きるかを、抗 KDEL ペプチドモノクローナル抗体を用いて調べた。その結果、43kD 中間体には KDEL 配列は含まれず、C 末端プロペプチドは翻訳直後に小胞体内で切除されると推定した。

3aH09

タバコ培養細胞の分泌タンパク質
奥島 葉子、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）

タバコ培養細胞 (BY-2) を材料に分泌タンパク質の性質、および分泌の機構を調べた。BY-2は、増殖に伴い、培養液中に多くの塩基性タンパク質を分泌していた。その多くは糖タンパク質であることがレクチン染色により示された。主なタンパク質についてアミノ酸配列を調べたところ、そのうちのひとつはペルオキシダーゼ (POX) であった。しかし、この POX はウエスタンブロットでは、通常のタバコ植物体から検出されなかった。POX を指標として糖鎖と分泌の関係を調べたところ、糖鎖合成阻害剤、プロセッシング阻害剤双方により細胞外への POX の分泌が阻害された。現在、他の分泌タンパク質についても解析を行っている。

3aH10

登熟カボチャ子葉のデンスベシクルに見られるタンパク質 DV100 の解析

山田健志^{1,2}, 嶋田知生¹, Luz Marina Melgarejo^{1,3}, 近藤真紀¹, 西村いくこ^{1,2}, 西村幹夫^{1,2}

(¹ 基生研・細胞生物, ² 総研大・生命科学, ³ コロンビア国立大)

デンスベシクルは、登熟種子において貯蔵タンパク質の前駆体を液胞へ輸送するための小胞である(直径約 300 nm)。この輸送小胞を構成する成分を明らかにすることを目標として、高純度に単離したデンスベシクル中に見出される 100 kDa のタンパク質 (DV100) について解析を行った。

登熟カボチャ子葉より単離したデンスベシクルは種子貯蔵タンパク質である 11S globulin, 2S albumin の前駆体を多量に含んでいる。我々は、次に主要な成分である DV100 のアミノ酸配列を決定し、その配列を基に、登熟カボチャ子葉より cDNA を単離した。この cDNA は、液胞に蓄積している種子貯蔵タンパク質、51-kDa protein の N 末端アミノ酸配列をコードする領域を含み、DV100 が 51-kDa protein の前駆体であることが明らかになった。推定アミノ酸配列より 51-kDa protein はワタヤカカオの vicilins と高い相同性を示した。一方、抗 51-kDa protein 抗体を用いた登熟カボチャ子葉の免疫電子顕微鏡観察の結果、金粒子のシグナルがデンスベシクルと Protein-storage vacuole (Protein body) に見られた。以上の結果より、51-kDa protein は 100 kDa の前駆体として合成され、デンスベシクルを経由して液胞に送られた後、成熟型に変換することが明らかになった。

3aH11

マイクロボディ蛋白質の膜透過機構～オリゴマー蛋白質を輸送する経路の存在

加藤朗、林誠、西村幹夫 (基生研・細胞生物)

細胞壁からオルガネラへの蛋白質輸送には、輸送シグナルの認識、膜透過、そして成熟化の過程が必要とされる。ミトコンドリアや葉緑体における膜透過の過程では、蛋白質が unfold な状態であることが必要とされているが、マイクロボディの膜透過の過程において、蛋白質が unfold な状態であるかどうかは明らかではない。我々は先に、前駆体型マイクロボディ酵素であるクエン酸合成酵素 (gCS) の N 末端輸送シグナルと β -グルクロニダーゼ (GUS) との融合蛋白質を構築、これらを発現する形質転換シロイヌナズナを作製しマイクロボディへの蛋白質輸送機構を解析してきた⁽¹⁾。この中で得た変異融合蛋白質 $\Delta C42$ -GUS (72kD) はマイクロボディへと輸送されるが、シグナル配列はプロセシングされない。我々は $\Delta C42$ -GUS を蓄積する個体と GUS そのもの (68kD) を蓄積する個体とを交配し、次世代植物における $\Delta C42$ -GUS と GUS の細胞内局在性を検討した。次世代植物を細胞分画した結果、マイクロボディ画分に $\Delta C42$ -GUS とともに、本来輸送されないはずの GUS が検出された。GUS は細胞内においては 4 量体を形成することから、輸送シグナルを持たない GUS は輸送シグナルを持つ $\Delta C42$ -GUS とオリゴマーを形成してマイクロボディへと移行したと考えられる。この結果は、マイクロボディ膜にオリゴマー蛋白質をそのまま輸送する特異な輸送経路が存在することを示唆している。

(1) Kato et al., *Plant Cell* 8: 1601-1611 (1996)

1aI01

表層微小管構築における 65 kDa MAP の機能

曾根恒星、近野洋、本村宗己、山本周史*、園部誠司、新免輝男 (姫工大・理・生命,*大阪大・理学研究科)

65 kDa MAP はタバコ培養細胞BY-2から精製された植物微小管付随タンパク質であり、細胞周期を通じて微小管と共存している。表層微小管との共存は単離表層微小管に 65 kDa MAP が含まれていることから示されている。65 kDa MAP は単離表層微小管分画に含まれる kinase によってリン酸化される。そこで、表層微小管構築におけるタンパク質リン酸化の意義を調べるために、BY-2細胞をリン酸化反応に影響を及ぼすと考えられる各種の薬剤で処理し、表層微小管の構築変化を観察した。細胞壁消化酵素液中に薬剤を添加し、90分間細胞を処理してプロトプラスト化し、細胞膜ゴーストを作製して表層微小管を観察した。その結果、6-DMPAP で処理したものでは表層微小管の配向が非常に乱れ、部分的に細胞膜から遊離しているように見えた。このような微小管にも 65 kDa MAP は結合していた。これらの結果から、リン酸化状態にある 65 kDa MAP 表層微小管どうしを架橋し平行な配列を安定化している可能性が考えられた。

1aI02

タバコ培養細胞BY-2における微小管付随タンパク質の同定

五十嵐久子、園部誠司、新免輝男 (姫工大・理・生命)

タバコ培養細胞BY-2の脱液胞化プロトプラストであるミニプロトプラストの細胞質粗抽出液に taxol を加えてチューブリンを重合させ、遠心により微小管タンパク質を集めた。微小管を脱重合・再重合させ形成された微小管を 0.6 M NaCl で微小管付随タンパク質を抽出した。これを MonoQ で分画したところ、比較的量の多いものとして 50、65、90、120 kDa のポリペプチドが認められた。65、90kDa のタンパク質は *in vitro* で微小管を束化した。一方、微小管結合タンパク質分画に骨格筋アクチンを加えたところアクチン繊維が束化され、50、90、120 kDa のポリペプチドが結合していることがわかった。これらのポリペプチドはアクチン繊維にも結合する可能性が示唆された。

1aI03

表層微小管-細胞膜の相互作用に関与するタンパク質の同定

園部誠司、本村宗己、五十嵐久子、新免輝男 (姫工大・理・生命)

細胞膜ゴーストは表層微小管のモデル系として有用である。我々はこれまで、表層微小管を除去したタバコ培養細胞BY-2の細胞膜ゴースト上にミニプロトプラストの細胞質抽出物 (extract) を用いて微小管を再生させる系を開発し、細胞膜と微小管の相互作用の研究を行ってきた。

表層微小管を Ca 存在下で低温処理して除去すると、その後の extract 処理によりゴースト上に微小管が再生する。この再生はトリプシン前処理により阻害される。一方、0.6M KCl 処理により表層微小管を除去したゴーストでは微小管再生は見られなかった。これらの結果から、細胞膜上に存在する表在性タンパク質が微小管と細胞膜の架橋に関与していることが示唆された。この架橋タンパク質は微小管付随タンパク質でもありと考えられるので、ミニプロトプラストから調製した微小管付随タンパク質分画を用いて微小管再生実験を行った。その結果、0.6M KCl 処理したゴーストを微小管付随タンパク質分画を加えた extract で処理すると微小管が再生した。このことは、微小管付随タンパク質分画に微小管-細胞膜架橋タンパク質が存在することを示唆している。

1aI04

タバコキネシン様蛋白質TBK5及びTBK10の機能解析
松井啓祐、浅田哲弘、柴岡弘郎 (大阪大・理・生物)

前年会 (1996年、鹿児島) において報告したように、タバコ培養細胞BY-2では少なくとも11種類のキネシン様蛋白質 (TBK1-11) が発現している。TBK5とTBK10のmRNAの蓄積量は、細胞周期を通してほぼ一定であるが、他のTBKsのmRNA蓄積量は分裂期に増加することが明らかになった。今回は、TBK5とTBK10について全配列を決定し、抗体を用いた解析を行ったので報告する。

TBK5のcDNAは、633アミノ酸残基からなる推定分子量71kDaの蛋白質をコードしており、TBK10のcDNAは、703アミノ酸残基で推定分子量79kDaの蛋白質をコードしていた。TBK5、TBK10共に、ポリペプチドの中央部分にモータードメインを持つ、植物ではこれまでに知られていないタイプのキネシン様蛋白質であることが明らかになった。

大腸菌に発現させたTBK5とTBK10を抗原として作製した抗体は、それぞれ74kDaと85kDaのポリペプチドを特異的に認識した。TBK5に対する抗体とTBK10に対する抗体を用いた間接蛍光抗体法観察によって、それぞれの蛋白質が異なる大きさのオルガネラに分布することが明らかになった。このことから、TBK5とTBK10は、細胞質中でオルガネラ輸送に関与することが推測される。

1aI05

ニンジンおよびタバコにおける

β チューブリン・アイソタイプ構成と特徴
岡村昭治、南蘭帝、岡原孝一、飯田孝幸、片岡智晃
(富山医薬大・薬)

チューブリンは微小管を構成するサブユニット蛋白であり細胞周期や細胞分化に伴って細胞のおかれた時間的・空間的情報に従ってコントロールを受けながら重合脱重合を行う。

チューブリンには α 、 β 、 γ の良く似たサブユニットが存在し、主サブユニットである α 、 β は更に複数のアイソタイプより構成されている。高等動物ではそれらが構造や発現の特徴から幾つかのサブクラスに分類されているがその役割については明らかでない。我々は、ライブラリーのスクリーニング及びRT-PCRによりニンジンより4種、タバコより3種の異なった β チューブリン遺伝子をクローン化した。各アイソタイプの特徴を示すC末端部の構造からこれらを2つのサブクラスに分類した。今回はそれぞれの遺伝子に特有な3'-非翻訳部よりプローブを作成し、細胞周期の進行、温度のシフトダウン・シフトアップ、器官分化などに伴って各サブタイプの発現がどのように変化するか検討した結果について報告する。

1aI06

高等植物細胞の核からの微小管形成を担うタンパク質について
中山貴照、水野孝一 (大阪大・院・理・生物)

高等植物細胞では、細胞周期を通じて微小管構造がダイナミックに変化しており、微小管形成中心 (MTOCs) がこれらの構築に重要な働きをしていると考えられている。以前から間期的な時期には核の表面から微小管が形成されていることが報告されており、我々はタバコ培養細胞BY-2から単離した核に微小管形成能が存在すること及び核破砕物の不溶性分画から0.5M NaClで可溶化した分画に微小管形成能が存在することを示してきた。

今回我々は、この微小管形成能をもった因子の更なる精製を試みたところ熱処理(100℃, 5分)に対して安定であったので、熱処理後の可溶性分画をゲル濾過で分画する事により精製した。微小管形成能はトリブシン処理で消失した。活性が存在する分画には40kDaのタンパク質が存在し、SDS-PAGE後のゲルから溶出したものでも活性は保持された。in vitroで40kDaタンパク存在下で形成されたaster状の微小管構造はATPやGTPを加えることにより崩壊したのでこのタンパクによるaster状の微小管構造形成にはリン酸化のような制御機構が考えられる。40kDaタンパクの部分アミノ酸配列には、ヒストンH1によく似た部分が存在した。動物のヒストンH1では40kDaタンパクによって形成されるようなaster状の微小管構造が形成されないため、この活性は植物の40kDaタンパクに特有の性質であると思われる。抗体を作製したので、40kDaタンパクが細胞周期を通じてどのような挙動を示すのかについて調べていきたい。

1aI07

アズキ上胚軸切片の伸長に及ぼすオカダ酸の効果
横井 崇秀、柴岡 弘郎 (阪大・理・生物)

アズキ上胚軸の表皮細胞の細胞質表層微小管は縦方向と横方向とを交互に繰り返すサイクリックな配向変化を行っている。オーキシシン(IAA)による胚軸の伸長はジベレリン(GA)によって促進されるが、このとき微小管が横方向で安定化することが観察されている。このGAによる効果は蛋白質リン酸化酵素の阻害剤によって阻害されることから微小管の配向はリン酸化/脱リン酸化による制御を受けていると考えられる。

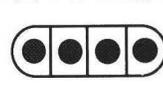
本研究では蛋白質脱リン酸化酵素の阻害剤であるオカダ酸(OA)がアズキ上胚軸の伸長及び微小管の配向に与える影響について検討した。100nMのOAは上胚軸の伸長を阻害したが、OAによる阻害はGA存在下でより顕著であり、OA存在下ではGAによる伸長促進効果はほとんど現れなかった。またOAは縦方向の微小管を持つ細胞の割合を増加した。これらの結果から微小管の縦方向から横方向への配向変化には脱リン酸化反応が関与しており、OAはこの反応を阻害することによって縦方向の微小管の割合を増加させ、胚軸の伸長を低下させたと考えられる。

1aI08

独特の減数分裂様式 (一列に四分割する) を示すヒメジャゴケの分裂面挿入機構
嶋村正樹・出口博則・峰雪芳宣 (広島大・理)

胞子四分子が一列に配列する様式 (図A) のコケ減数分裂は、ヒメジャゴケに特有で、分裂面挿入機構を考える上で興味深い様式である。そこで、本研究ではヒメジャゴケ減数分裂の微小管分布を観察し、相同側型分裂様式 (図B) のジャゴケと比較することにより、ヒメジャゴケの分裂面の挿入機構について検討した。ジャゴケと同様に、ヒメジャゴケの減数第一分裂で出現したフラグモプラストは消失し、細胞板は第二分裂で4個の娘核間に再出現したフラグモプラストによって完成する。ジャゴケとヒメジャゴケの分裂様式の違いを考察するために分裂装置と胞子母細胞の大きさを比較した結果、胞子母細胞を一列に四分割する様式は、ヒメジャゴケの胞子母細胞の幅が狭いことから来る、空間的制限によって分裂装置が一列に並ぶために起こることが示唆された。

図A. ヒメジャゴケ



図B.

ジャゴケ



1pI01

気孔開閉の日周変化に伴う孔辺細胞の微小管の変化

福田めぐみ, 中山享子¹, 浅井尚子¹, 中嶋信美², 馳澤盛一郎, 近藤矩朗 (東京大・理・生物,¹筑波大・生物,²国立環境研・地域)

気孔の開閉運動は孔辺細胞の容積変化により制御されている。この容積変化は一般に孔辺細胞の浸透圧調節によるものと考えられているが、我々は孔辺細胞の細胞骨格系の関与の可能性について検討している。(C.-J. Jiang *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 37:697, 1996)

自然光下で栽培しているソラマメ (*Vicia faba* L.) の葉の裏側の表皮を材料に、抗 α, β -tubulin 抗体を用いた間接蛍光抗体法により孔辺細胞の微小管を観察した。夜明けとともに細胞表層に放射状の配向を示す微小管束が現われた。午前中、気孔開度の増加に伴いこの配向が増加し、夕方から夜にかけての気孔開度の減少に伴い、微小管の核周辺への移行と断片化が起こった。この微小管の挙動の日周変化は、ソラマメを自然光条件から継続暗所に移してもさらに2日間観察され、気孔開度の変化とのあいだに平行関係がみられた。

また、表皮切片を50 μ M プロピザミドで処理すると微小管の断片化が起こり気孔開口が阻害された。一方、10 μ M タキソール処理により微小管の配向が保持され気孔閉鎖が抑制された。

1pI02

イネの brittle culm (鎌要らず) 遺伝子の RFLP マッピング

中村信吾, 川崎信二 (農水省・生物研)

brittle culm (bc) はオオムギやイネなどで良く知られた変異体で、外見は正常であるが稈等の2次細胞壁の肥大が起こるべき部位でセルロースの蓄積が野生型より低下している、十分な強度を持つことができない。1次壁の合成にはそれほど差が見られないことから、セルロース合成系自体よりも2次壁肥大を調節している遺伝子に問題があることが予想され、bc 遺伝子の解析はこうした調節遺伝子の同定と機能解析に結びつくことが期待される。

イネはゲノムサイズが小さく、RFLPマップや我々がイネで開発した BAC (Bacterial Artificial Chromosome) によるゲノムライブラリー、大容量形質転換系等遺伝子のポジショナルクローニングのシステムが完備しているので、多数の bc 遺伝子は良いターゲットになる。今回は、第2染色体の末端部に有ることが知られている bc-3 について、近傍に indica から導入されたいもち病抵抗性遺伝子を持つ準同質遺伝子系統 BL-2 と bc-3 について準同質化された台中65号系の M-11 との F₂ 世代による RFLP マッピングの結果を報告する。

1pI03

樹幹の傾斜刺激によるあて材形成初期に発現する遺伝子の cDNA 解析

馬場啓一, 日尾野隆¹, 伊東隆夫, 伊藤一弥¹
(京大・木研,¹王子製紙・森林資源研)

すでに伸長成長を停止している樹幹は傾斜されると「あて材」という特殊な木部が分化し、本来の位置に戻ろうとする。双子葉類では一般に傾斜上側に引張あて材が形成される。引張あて材ではリグニンを殆ど含まない二次壁が堆積し、セルロースマイクロフィブリルが細胞長軸とはほぼ平行に配列するようになる。あて材の形成にはオーキシンなどの植物ホルモンの関与が示唆されているが、その形成機構についてはほとんど明らかにされていない。我々は傾斜刺激によって木部分化帯で発現する遺伝子の cDNA をサブトラクション法によっていくつかクローニングした。クローニングされた cDNA の塩基配列を決定し、Gene Bank に登録されている既知遺伝子との相同性検索を行なった。その結果、G-box 結合因子や、ユビキチン、S-アデノシルメチオニン合成酵素など、発現調節やストレス応答関連の遺伝子に高い相同性のあるクローンが得られていることがわかった。

1pI04

細胞壁合成に関与する温度感受性突然変異体

加藤 友彦, 佐藤 茂, 高部 圭司¹, 柴田 大輔
(三井植物バイオ研,¹京大・農・林産工学)

細胞壁は植物特有のものであり、その合成は細胞分裂・分化・生長と密接に関係していると考えられる。我々は、細胞壁合成の分子機構を明らかにする目的で、細胞壁合成に関わる突然変異体の単離を行った。

突然変異体の単離は、セルロース合成阻害剤ジクロロベンゾニトリル処理で根端領域が膨らむという形態を指標に行った。EMS (Ethyl methane sulfonate) で変異処理したアラビドプシスの M2 種子 (130,000 個) および T-DNA タグライン (1,000 ライン) をスクリーニングし、変異体7系統を単離した。光学顕微鏡での細胞・組織形態の観察と電子顕微鏡での細胞壁の微細構造の観察を行ったところ、いくつかの系統で細胞壁合成が途中で停止した細胞や、細胞壁の表面が粗く凹凸になっていることが観察された。現在これらの原因遺伝子の単離を行っている。

1pI05

エンドウ上胚軸におけるエンド-1,4-β-グルカナーゼ、エンドキシログルカントランスフェラーゼおよびエクспанシンについて

竹田 匠、酒井 富久美、林 隆久（京都大学・木研）

植物の細胞壁（一次壁）はセルロースマイクロフィブリルをキシログルカンが架橋することにより、その形態が維持されている。一方、植物にオーキシンを作用させると伸長成長が生じる。この際、キシログルカンの遊離に伴い、細胞壁にゆるみが生じることが示唆されている。

我々はエンドウを実験材料とし、伸長成長時に起こる細胞壁のゆるみに関与していると推測される3種類の酵素、グルカナーゼ (endo-1,4-β-glucanase)、エンドキシログルカントランスフェラーゼ (endoxyloglucan transferase)、エクспанシン (expansin) の cDNA から、エンドウの mRNA のレベルを調べた。グルカナーゼおよびエクспанシンは伸長部位において mRNA のレベルが高かったのに対して、エンドキシログルカントランスフェラーゼは伸長部位より下部で mRNA のレベルが高かった。また、オーキシリンによる効果についても調べた。

1pI06

タバコ培養細胞 BY-2 から単離したエンド型キシログルカン転移酵素 (EXGT-N1)

長瀬 悟・岡本 繁久・富田 英津子¹・西谷 和彦（鹿児島大学・教養部、¹連合大学院農学研究科）

エンド型キシログルカン転移酵素 (EXGT) は細胞壁中のキシログルカン架橋の繋ぎ変えを触媒する酵素で、キシログルカン関連タンパク質 (XRP) ファミリーの一員である。XRP の各メンバーは細胞壁構築に於いて中心的な役割を担っていると考えられているが、役割の詳細はまだ不明である。演者らは、細胞増殖過程での細胞壁構築機構の解明を目的として、タバコ培養細胞 BY-2 より XRP タンパク質の単離を進め EXGT-N1 タンパク質を単離した。推定構造より EXGT-N1 は XRP の三つのサブファミリー中のクラス I に分類された。EXGT-N1 は細胞培養の各ステージを通じて発現し、細胞壁中に分泌された。この酵素の反応機構と細胞壁構築に於ける役割について考察する。

1pI07

組み換えシュクロース合成酵素の性質

中井 朋則、外内 尚人¹、土田 隆康¹、森 仁志²、酒井 富久美、林 隆久（京都大・木質研、¹バイオポリマー・リサーチ、²名古屋大・農）

シュクロース合成酵素 (EC 2.4.1.13) は UDP-glucose + fructose ⇌ sucrose + UDP の反応を触媒する酵素で、植物体内では sucrose の合成よりも UDP-glucose の合成にはたらいていると考えられている。本研究では、組み換えシュクロース合成酵素のキネティクスを測定した。酵素標品は cDNA を発現ベクター pEB-20b ヘクローニングしたプラスミド pEB-01 を保持する大腸菌から調製した。活性は、反応液を濾紙電気泳動に供し、生成物を測定することによって行った。UDP-glucose 及び fructose に対する親和性は植物由来の酵素とほとんど変化無かったが、sucrose に対する親和性は約 10 分の 1 に低下していた。そのため、¹⁴C]fructose または UDP-¹⁴C]glucose を用いて sucrose の合成を試みたところ、非対称に標識された sucrose が高収率で得られた。

1pI08

管状要素分化に特異的なペルオキシダーゼ遺伝子 ZPO-C の解析
佐藤 康、福田裕徳¹（愛媛大・理・生物地球、¹東大・理・植物園）

リグニン合成の最終段階のシナミルアルコール類の重合反応はペルオキシダーゼにより触媒されると考えられている。しかし、ペルオキシダーゼには多くのアイソザイムが存在し、ペルオキシダーゼによるリグニン合成機構は未だ明らかになっていない。

これまでに私たちはヒヤクニチソウ管状要素分化実験系を用い、リグニン合成関連ペルオキシダーゼアイソザイム P5 を見だし、P5 の cDNA の単離を試み、ペルオキシダーゼ遺伝子 ZPO-C を単離した。ZPO-C は管状要素分化過程において、分化誘導条件でのみ、リグニン合成に先だって一過的に発現することが示された。さらに、ZPO-C 融合タンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し解析を行った結果、ZPO-C タンパク質は、分化誘導条件でのみ、細胞壁イオン結合性画分で検出されることが示された。

今回私たちは、ZPO-C タンパク質の組織・細胞内局在を、精製抗 ZPO-C タンパク質抗体を用いて解析した。免疫電子顕微鏡観察の結果、ZPO-C タンパク質は管状要素の二次細胞壁及び一次細胞壁外層のリグニン沈着部位に局在することが示され、このことから、ZPO-C のコードするペルオキシダーゼがリグニン合成に関与している可能性が非常に高いことが示された。現在、ZPO-C タンパク質の局在について、組織・細胞レベルでのさらに詳細な解析を進めている。

1pI09

ポプラエンド-1,4- β -グルカナーゼのゲノムDNAクローニング

大宮泰徳、今宿芳郎¹、青山卓史¹、岡 穆宏¹、中井朋則、酒井富久美、林 隆久（京大・木質研、¹京大・化研）

ポプラ培養細胞は細胞壁にエンド-1,4- β -グルカナーゼ活性を有し、オーキシンにより誘導されることが示唆されている。本実験では、ゲノムDNAのクローニング及びその発現形態の解明を目的として実験を行った。ポプラ (*Populus alba* L.) 培養細胞よりゲノムDNAを調製し、 λ ベクターを用いてゲノムライブラリーを作成した。エンド-1,4- β -グルカナーゼに対するcDNAをプローブとしてライブラリーよりスクリーニングを行い、 2×10^7 個のブランクから3個のポジティブクローンを得た。そのうちのひとつから5'上流領域2.5 kbpを含む約5 kbpの遺伝子を単離した。DNAの全塩基配列を解析したところ、構造遺伝子は6個の短いイントロンによって分断された7個のエクソン部分から構成されていた。上流域に β -グルクロニダーゼレポーター遺伝子をつなぎ、形質転換体植物による発現調節を調べた。

1pI10

キュウリ根導管液タンパク質cDNAのクローニングと発現解析
作田千代子、佐藤忍（筑波大・生物）

近年我々は、導管液に多種のタンパク質や糖質が含まれていることを報告した。タンパク質の機能を知ることを目的に、以下の研究を行った。キュウリ（霜不知地這）の根の近くの茎から採取した導管液をラットに免疫して得た抗導管液血清を用いキュウリ根のcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、相同性によって24種類に分類されるポジティブクローンを得た。その中でも、根でのみあるいは根で非常に強く発現しているもの4種類について以下のノーザンブロットによる発現解析を行った。茎頂から4cmのところを切断した胚軸を20倍に希釈したMS培地中で培養したところ、培養開始後4日目に不定根が胚軸の表皮を突き破って伸長してくるが、各遺伝子の発現は、2-4日目に始まり、6-10日目に飽和することが明らかになった。現在、詳細な形態観察を行うことにより、根の組織の発達と遺伝子発現の関係を調査中である。

1pI11

イネ科植物細胞壁結合型のエキソおよびエンドグルカナーゼの精製と同定

小竹敏久、中川直樹、桜井直樹（広島大、総合科学）

イネ科植物のオーキシン誘導の伸長成長には、細胞壁結合型のエキソおよびエンドグルカナーゼが関与することが報告されている。演者らは、暗所で育てたオオムギ芽生え細胞壁より、3M LiClにより、細胞壁蛋白質を遊離し、その中に含まれるエキソおよびエンドグルカナーゼを精製した。両グルカナーゼは、SP-Toyoparlカラムで異なる画分として得られた。SDS-PAGEでは、エキソグルカナーゼは、66kD、エンドグルカナーゼは、31kDを示した。基質特異性は、エキソグルカナーゼは、 β -1,4-、 β -1,6結合にも活性をもつが、 β -1,3結合を最もよく分解するので、エキソ1,3- β -D-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.58) に分類された。エンドグルカナーゼは、1,3:1,4- β -グルカン特異的に作用する、いわゆるリケナーゼ (EC 3.2.1.73) であった。両者の酵素反応分解産物を分析した。その結果、エキソグルカナーゼはグルカンを末端からグルコース単位で分解した。エンドグルカナーゼは、1,3:1,4- β -グルカンの分子量を著しく低下させた。基質分解における両者の相互作用、および、オーキシンによる伸長成長との関連について今後さらに解析するつもりである。

1pI12

イネ発芽種子からの β -グルコシダーゼの精製とその性質
秋山 高（農水省北海道農試）

イネ種子の β -グルコシダーゼ活性は、発芽後5日までに約6倍に増加した。比活性を比較すると、胚乳部よりも若い葉や根で高い活性が認められた。発芽種子から β -グルコシダーゼを、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング(CF)、ゲルろ過などの方法により、SDS-PAGEで見かけ上単一のバンドになるまで精製した。その分子量は約75,000で、CFにおいて約9.0の塩基性の等電点を示した。活性の至適pHは約4.5にあり、至適温度は50^oCであった。精製された酵素は、重合度2から7までのラミナリオリゴ糖の中では、ラミナリビオースを最も良く分解した。一方、本酵素はラミナリンやオオムギ1,3;1,4- β -グルカンなどの多糖類基質に対しては全く活性を示さなかった。

1pI13

ナス科植物細胞壁キシログルカンのキシログルカナナーゼ加水分解法による構造解析

小西照子、三石 安¹、加藤陽治 (弘前大・教育、
¹工技院・生命研)

イネ科あるいはナス科植物細胞壁多糖のキシログルカンは、マメ科植物などのそれにくらべ主鎖β-(1→4)-D-グルカンのGlc残基のC-6位での分岐率が低いことが知られている。しかし、それらC-6位未置換Glc残基の主鎖中での配列については詳細に知られていない。今回はナス科についてこの点を明らかにすることを目的とした。

ナス科に属するピーマン、トウガラシ、ナスおよびトマト細胞壁から 24% KOH可溶性多糖画分を得た。これを *Penicillium* sp. M451キシログルカナナーゼで処理した。処理物を Bio-Gel P-2に供し、キシログルカンオリゴ糖画分を得た。この酵素処理では Glcやセロビオースは生じなかった。これらを *Eupenicillium* sp. M9イソプリメペロース生成酵素で加水分解した。それぞれをパルスドアンペロメトリー検出器を用いたHPLC (カラム: Carbo Pac PA1) により分析した。

得られたキシログルカンオリゴ糖はXylとGlcの他に、AraまたはGalあるいはその両者を構成糖としていた。さらに、これらのオリゴ糖にはC-6位未置換Glc残基の2個の連なりをもつものもあった。このことは4品種に共通であった。これらのことから、ナス科植物キシログルカンのC-6位未置換Glc残基は主鎖の中にある程度規則的に配列していることが示唆された。

1pI14

トウモロコシ幼葉鞘細胞壁からのUV吸収物質の酵素的遊離

宮本健助、Schopfer Peter¹ (大阪府大・総合科学、
¹ Freiburg 大)

伸長しつつある植物の細胞壁では細胞壁多糖分子が活発に代謝されており、その一例として、単子葉植物においては、β-1,3-β-1,4-グルカンの酵素的分解 (autolysis) がよく知られている。しかしながら、他のマトリックス成分の代謝的分解は、ほとんど明らかにされていない。そこで、この点を検討する目的で、グルカンの autolysis が認められる条件で、トウモロコシ幼葉鞘細胞壁における UV 吸収物質の代謝的分解を調べた。

トウモロコシ幼葉鞘から細胞壁標品を調製し 25°C 下、蒸留水で培養を行ったところ、時間と共に培養液中に UV 吸収物質が遊離された。この遊離は、細胞壁標品を加熱などのタンパク質変性処理や低温処理 (0°C) によって阻害された。また、この遊離は、培養液の pH に依存し、pH6.7 に至適 pH が認められた。分光光学的解析の結果、この UV 吸収物質のスペクトルは、230nm 以下に著しい吸収と 260-280nm 付近に肩を有するものであった。薄層クロマトグラフィによる解析の結果、この物質は、高い Rf 値と低い Rf 値を有する 2 種類の物質の混合物であり、その Rf 値は、フェルラ酸のそれとは異なっていた。また、UV 吸収物質は、培養後の細胞壁からも、さらにアルカリ処理することによって遊離された。

以上の結果は、細胞壁に存在する UV 吸収物質を含む高分子物質から、UV 吸収物質が酵素的に遊離していることを示唆している。現在、この物質の遊離と成長との関係、および、その本体について検討中である。

1pI15

トウモロコシ芽生えの成長に伴う細胞壁分解活性の量的質的变化

井上雅裕、ネビンス・ドナルド (愛媛大・理・生物、
カリフォルニア大デイビス校ベジタブルクロブス)

トウモロコシ芽生えの様々な成長時期の幼葉鞘から細胞壁を調製しその糖組成と自己分解活性を調べた。幼葉鞘細胞壁を構成する主要な中性糖成分はアラビノース、キシロース、グルコースである。幼葉鞘あたりの各糖の量は発芽後 5 日目まで増加した。一方、0°C で調製した細胞壁画分を用いて自己分解活性 (糖の遊離活性) を測定した結果、各中性糖成分の分解活性もエッジ進行に伴って増加することがわかった。ただ、細胞壁あたりの分解活性では、特にグルコース成分についてのみがエッジとともに増加し、ペントース成分に関しては発芽後 1、2 日目に高い値を示しその後減少した。各反応の時間変化を 2 時間間隔で調べた。グルコース成分の遊離反応は長時間持続するのに対しペントース成分の遊離は数時間で低下した。また、前者の反応産物の大部分が単糖のグルコースであるのに対し、後者のそれはポリマーとモノマーの両方を含んでいた。このように、質的に異なる複数の分解活性が細胞壁に存在し、成長の異なる時期に発現し、細胞壁の代謝・調節に関与していると考えられる。

2aI01

Yarivフェニルグリコシドによるゼニゴケプロトプラストの安定化と分裂促進

菅原康剛 (埼玉大・理・生体制御)

ゼニゴケプロトプラストを活性炭の含む培地で培養すると、24時間以内に細胞壁を再生し、48時間目頃から分裂を開始する。しかし、培地に活性炭が含まないと、細胞壁は再生されるが、再生細胞の生存率は急速に低下する。ところが、活性炭の代わりにCMC (カルボキシメチルセルロース) やCPW (カルコフロールホワイト) を添加すると再生細胞は安定化し、活性炭培地へ移すと高い分裂率を示す。同様な安定化は、培地に低濃度の細胞壁分解酵素を添加して、再生してきた細胞壁を分解しても観察される。これらの結果から、再生細胞の安定化や分裂促進には、再生された細胞壁が重要な役割を演じていることが示唆される。さらに、活性炭を含まない培地にYariv試薬 (β-glucosyl) を添加すると、再生細胞は安定化し、分裂も促進されることが分かった。これらの結果から、プロトプラストが正常な壁を再生して安定化し、分裂に入る過程にアラビノガラクトタン蛋白が関与していることが示唆された。

2aI02

細胞壁伸展性のクリープ解析：(2) 根、胚軸、葉鞘の伸長生長と粘弾性パラメータの相互比較

谷本英一, 山本良一¹, 山口淳二², 松倉千昭²

(名古屋市立大・自然科学・生体分子, ¹帝塚山短大・食品, ²名古屋大・生物応答研究センター)

ジベレリンによる根の伸長誘導では、細胞壁の粘弾性パラメータのうち、粘性成分の変動が大きいことを既に報告した。本研究では、クリープ解析の粘弾性パラメータの生理・生化学的意味を考えるために、エンドウの根とイネ第2葉鞘のジベレリン誘導伸長、アベナ幼葉鞘とエンドウ茎のオーキシン誘導伸長、さらにエンドウ側根の酸誘導伸長における細胞壁粘弾性パラメータの変動を比較した。その結果、ジベレリン処理した根では細胞壁の粘性率の低下が特に大きいものに対して、IAA処理したアベナ幼葉鞘では、弾性率と粘性率の両方の低下が大きいことが分かった。また、ジベレリン処理したイネ第2葉鞘でも、弾性率と粘性率の両方が低下した。根の細胞壁の伸展曲線では粘性的性質が大きく弾性的性質が小さいものに対して葉鞘と茎では弾性的伸長が相対的に大きいことが分かった。さらに、エンドウの根の細胞壁の *in vitro* 酸伸長においても、pH の低下によって粘性率の低下が起こることが分かった。一方、上記のフォークトのモデルによる現象論的な粘弾性解析の欠点を補うため、Eyringの式を用いて非線形粘弾性の理論的考察を試みたのでそれらの結果も合わせて報告する。

2aI03

オーキシン及び酸によって誘導される細胞壁の力学的性質の変化

田口俊久, 勝見允行 (国際基督教大学・生物)

オーキシンは植物の伸長成長を行っている組織において、アポプラストを酸性化することにより細胞壁の力学的性質を変化させ、伸展性を増加させる。本研究では、オーキシン及び酸が誘導する細胞壁の力学的性質の変化を、細胞壁クリープを測定することによって解析した。明所で育てたカボチャ (*Cucurbita moschata* Duch cv. Shirakikuza) 芽生えの胚軸切片を 10^{-5} M IAA で2時間処理後、50%グリセリン水溶液に浸漬し、-15℃で2週間以上保存したものを測定に用いた。測定は、pH 4.5及びpH 6.8の緩衝液中で行った。クリープ速度は応力に比例して増加したが、その関係は応力が臨界降伏値になるまでの緩やかな増加と、それ以上になったときの急速な増加との2つの相から成ることが明らかとなった。相転移する臨界降伏値を Phase Shift Point (PSP)、クリープ速度変化の傾きを Creep Coefficient (Cm)と呼ぶことにした。pHが6.8から4.5に低下すると、PSPは低下し、Cmは顕著に上昇した。IAA処理を行った切片の場合は、pH 6.8においてのみ、PSPは低下した。一方、Cmは何れのpHにおいてもIAAで影響されなかった。クリープ速度は温度、及びpHに依存し、45℃、pH 4.0付近でPSPは最も低く、Cmは最も高かった。以上の結果は、細胞壁にはある値以上の応力が加わったときに大きく変化する構造があること、IAA及び酸はこの変化を起しやすくなること、酸性条件下でより大きい構造のゆるみが起こる結果、細胞壁の伸展性が高められることを示している。また、この変化の過程にはおそらく酵素反応的なものが含まれていることが示唆される。

2aI04

エンドウ上胚軸の伸長と細胞壁構造の変化

藤野猛史 伊東隆夫 (京都大 木質研)

黄化エンドウマメ上胚軸における伸長領域および伸長停止領域の細胞壁の3次元構成を急速凍結・ディープエッチング法を用いることにより可視化した。さらにペクチン(EDTA抽出画分)、ヘミセルロース(24%KOH抽出画分)の糖組成の変化を明らかにし、細胞成長と構造の変化との関連を調べた。伸長領域では、Cellulose Microfibril (CMF)間は、粒状を呈する物質により満たされていた。この粒状物質はEDTA抽出処理により完全に消失した。EDTA処理された細胞壁は、CMFの骨格構造のみからなる様相を呈した。EDTA抽出液中の糖のほとんどはウロン酸で、中性糖は主にアラビノースとガラクトースであった。伸長停止領域では、CMF間に架橋構造が存在していたが、伸長領域に見られた粒状物質は、ほとんど観察されなかった。さらに24%KOH抽出画分が増加し、特にキシロース量の増加が顕著であった。以上の結果から伸長している細胞壁にはCMF間の架橋構造は存在せず、伸長の停止に伴いCMF間にヘミセルロース性の架橋構造が形成されると考えられた。

2aI05

イネ薬に存在するアラビノガラクトタンブロテイン及び関連オリゴ糖の解析

川口健太郎, 賀来華江¹, 刈屋國男, 箱山 晋, 渋谷直人¹ (農水省・北海道農試, ¹農水省・生物研)

イネ薬の発生過程において、アラビノガラクトタンブロテイン (AGP) に類似した構造を持つオリゴ糖が時期特異的に蓄積する。これより、同じ時期の薬に、オリゴ糖に関連するAGPの存在が予想されたので、その解析を行った結果を報告する。

Yariv 試薬を抗体として用いた一元放射状免疫拡散法によりイネ薬には高濃度のAGPが存在することが確認された。AGPは、特に四分子期の薬に多く検出され、その量は薬1個当たり約8ugと推測された。また、上記オリゴ糖は四分子期以降に蓄積を開始することから、AGPとオリゴ糖は代謝的に強い関係を持つことが推定された。現在、両者の関連をさらに明確にするため、抗オリゴ糖血清を用いて解析を進めている。

2aI06

ギンドロ培養細胞におけるホウ素の細胞内分布

掛川弘一, 金子哲¹, 石井忠, 松永俊朗² (農水省・森林総研,
¹農水省・食総研, ²農水省・農環研)

ホウ素は植物の成長に重要な微量必須元素として知られている。近年、細胞壁中のホウ素の多くは多糖類の一つであるラムノガラクトロナンII (RG-II) のアピオース残基にホウ酸ジエステル結合しており、2分子のRG-IIを架橋していることが報告されてきた。しかし、その役割やどのようにRG-II分子に組み込まれるのかについては明らかではない。本研究ではギンドロ培養細胞系を用いた細胞内のホウ素の分布を調べ、ホウ素-RG-II複合体の形成機構を明らかにすることを目的として実験を行った。

実験に用いた培養細胞は通常100 μ Mのホウ酸を含むMS培地中で培養されている。この細胞をホウ酸濃度が10、5、2、1および0 μ Mの培地で培養すると10 μ Mの濃度では通常と同様の成長を示すがそれより低濃度の培地では成長が阻害された。次に、100および10 μ Mのホウ酸を含む培地で培養した細胞についてホウ素の分布を調べた。その結果、100 μ Mの培養条件では70%近くのホウ素が培地中に残っているのに対して10 μ Mの条件ではほとんど残っていなかった。一方、10 μ Mの条件で培養した細胞のホウ素はほとんどが細胞壁に存在していたが100 μ Mの条件で培養した細胞では細胞壁に加えて可溶性画分にも存在していた。どちらの培養条件でも細胞壁に結合しているホウ素の量はほぼ同じであり、ホウ素飢餓処理を行うと可溶性画分のホウ素が消失することから、ホウ素が可溶性画分にプールされている可能性が示唆された。

2aI07

ダイコン可溶性画分から単離したホウ酸-ラムノガラクトロナンII複合体

金子 哲, 松永 俊朗¹, 石井 忠² (農水省・食総研, 農水省・¹農環研, 農水省・²森林総研)

ホウ素は植物の微量必須元素であり、細胞壁中のホウ素の大部分はペクチンの構成糖の一つであるラムノガラクトロナン-II (RG-II) 2分子をホウ酸ジオールジエステル結合で架橋していることが明らかとなった。我々は、ダイコン可溶性画分にも高分子と結合したホウ素が存在することを見だし、これをDEAE-Sepharose FF, Superdex 75を用いたクロマトグラフィーにより単離した。¹¹B-NMRスペクトルよりホウ素は多糖とホウ酸ジエステル結合していた。単離した複合体は0.2%(w/w)のホウ素を含んでいた。構成糖分析の結果、2-O-メチルキシロース、2-O-メチルフコース、アピオース等RG-IIに特異的な糖が検出された。¹¹B-NMRスペクトルよりホウ素は多糖とジエステル結合していることが明らかとなった。可溶性のホウ酸-RG-II複合体がダイコンの細胞内に存在する可能性があることはホウ酸複合体の機能を考える上で興味深い。

2aI08

ホウ酸-ラムノガラクトロナンII複合体中のホウ酸の結合糖残基

石井 忠, 松永俊朗¹, 掛川弘一
(森林総研, ¹農環研)

シュガービートとタケノコ細胞壁からドリセラゼによって可溶化されたラムノガラクトロナン-II (RG-II) 及びワインから単離されたRG-IIはホウ酸ジエステル架橋により2量体 (ホウ酸-RG-IIホウ酸ジエステル複合体, B-RG-II) を形成している。

ホウ酸が結合する糖残基を同定するため、B-RG-IIとRG-IIをメチル化分析して、両者の糖鎖の結合様式を比較した結果、アピオース残基を除いて違いはなかった。B-RG-IIからは3'-Apiと2,3,3'-Apiが、RG-IIからは3'-Apiのみが検出された。次にB-RG-IIを完全メチル化し、メチルエステルを還元後部分加水分解し、新たに生成した還元末端を還元し、さらに遊離した水酸基をCD3Iにより完全メチル化した。アピオールを含む3種類のオリゴ糖をGC-MSにより同定した。これらの結果より、ホウ酸は二つの異なる3'-結合したアピオース残基のC-2とC-3位とエステル結合することが示唆された。

2aI09

ホウ酸-ラムノガラクトロナンII複合体に対する抗体を用いた免疫電顕
高崎美紀, 河口清香, 小林優, 間藤徹, 關谷次郎, 高部圭司¹ (京都大・農・農化, ¹京都大・農・林産)

ダイコン細胞壁由来のホウ酸-ラムノガラクトロナンII複合体でウサギを免疫して抗体を得た。この複合体はホウ酸で架橋されたRG-IIの二量体であるが、抗体は単量体も二量体も認識した。ダイコン細胞壁のペクチナーゼ加水分解物中ではRG-IIのみを認識した。本抗体とダイコン細胞壁より常法により抽出したペクチンとの反応は弱かったが、ペクチンを脱メチル化すると反応は強くなった。

本抗体とダイコン幼植物根を用いて免疫電顕を行った。この抗体に対するエピトープは全ての細胞の細胞壁に存在した。また細胞壁内では細胞膜側の三分の一に多く存在し、壁の成熟に伴い減少するようであった。エピトープは細胞壁中葉には検出されず、細胞接着には機能していないと判断した。また、ホウ素を多量に要求する伸長中の花粉管やマメ科の根粒にも顕著な量のエピトープが検出された。

2aI10

ダイコン細胞壁におけるペクチン質多糖とカルシウム・ホウ素の相互作用

小林 優, 浅香智之, 間藤 徹, 關谷次郎
(京都大・農・農化)

カルシウム (Ca), ホウ素 (B) を培地から除くと幼根の伸長は直ちに停止する。その応答の速さから細胞の最外層即ちアポプラストにおける機能の存在が示唆されるが、作用機作は明らかでない。そこで細胞壁における Ca の機能解明を目的として細胞壁 Ca のキャラクタリゼーションを行った。

ダイコン根の細胞壁を水, 1 M NaCl, 50 mM CDTA (pH 6.5) に懸濁すると, 18 時間で各々 6, 80, 100% の Ca と 12, 12, 48% のペクチン質が抽出された。以上の結果は, NaCl 可溶性の Ca を除去してもペクチン質の抽出量は増加しないことを示す。CDTA では B も 70% 以上が抽出された。従ってキレーター可溶性ペクチン質は NaCl 不溶・CDTA 可溶性 Ca 又は B により細胞壁に保持されていると考えられた。

次いで NaCl 不溶・CDTA 可溶性 Ca (細胞壁 Ca の約 20%) の形態を知るため, 1 M NaCl で洗浄した細胞壁をペクチナーゼで消化した。その結果 Ca の約半量が B と同じくラムノガラクトン II (RG-II) と結合していた。

2aI11

イネ培養細胞液胞膜の脂質組成およびプロトンポンプ活性におよぼす冷温ストレスの影響

中村善行, 山口峰生¹, 小林秀行, 笠毛邦弘²
(農水省・食総研, ¹筑波大・生物, ²農水省・生物研)

耐冷性の異なるイネ品種の培養細胞を用いて、冷温が液胞膜の脂質組成および液胞膜プロトンポンプ活性に及ぼす影響を調べた。25℃で6～7日間培養した耐冷性品種(日本晴)と感冷性品種(ボロ)の細胞を25℃あるいは5℃でさらに3日間培養し、それらの細胞から液胞膜小胞を調製した。H⁺-ATPase および H⁺-PPase に依存するプロトン輸送は冷温処理によって低下したが、その程度は日本晴よりボロの方が、また PPase より ATPase の方が大きかった。冷温処理をした細胞としない細胞の液胞膜から全脂質を抽出し、その分子種を薄層クロマトグラフィーで分析すると、日本晴、ボロともに冷温処理した細胞において糖脂質 DGDG が減少し、リン脂質 PC, PE の含有率が増加していた。現在、糖脂質、リン脂質の主要分子種についてその脂肪酸組成の分析を行うとともに、再構成膜系を用いて脂質成分の変化がプロトンポンプに及ぼす影響について解析を試みている。

2aI12

カサノリ液胞膜の H⁺ 輸送性ピロフォスファターゼの一次構造について

池田己喜子, 渡辺洋子, 田中喜之¹, 前島正義²
(岡山県大・栄養, ¹農水省・生物資源研, ²名古屋大・農・生化)

高等植物液胞膜には、無機ピロリン酸により駆動される膜結合性プロトンポンプ (H⁺-PPase) が報告されている。Acetabularia acetabulum (カサノリ) は単細胞より成る海棲の緑藻類に属する。演者らは既にこのカサノリにも H⁺-PPase が存在することを生化学的に実証した。今回、RT-PCR による cDNA クローニングを行い、cDNA クローンを得た。このクローンは 3,104 bp より成り、open reading frame は 795 から 2,960 bp であり、721 アミノ酸をコードし分子量 74,406 であった。これまでに報告されている高等植物の H⁺-PPase との相同性はアミノ酸レベルで約 45% であり、N-terminal half の領域での相違が認められ、C-terminal half の領域は保存度の高い構造であった。また、H⁺-PPase family の機能領域の推定(基質結合部位及び H⁺ 輸送路を形成する Glu 残基)並びに分子進化に貴重な情報を提供できるものであった。

2aI13

ミッチェルの化学浸透説、及びバクテリアの鞭毛回転に関する H⁺ 駆動力説に対する幾つかの素朴な疑問

清沢 桂太郎 (大阪大・基礎工・生物工学)

ミトコンドリアでの ATP 合成に関するミッチェルの化学浸透説及び、バクテリアの鞭毛回転に関する H⁺ 駆動力説は、物理化学的には実現不可能な、或いは曖昧な仮定と考え方の上に構築されてきた。本講演では、これらの学説に対して、つぎの観点から幾つかの素朴な疑問を述べたい。第一は、電気的中性の法則であり、第二は永久機関の不可能性であり、第三は一個のミトコンドリア、水チャンネル、及び、イオンチャンネルでは統計学的に見て Gibbs の自由エネルギー(化学ポテンシアル)が定義できないという事実である。但し、三番目の件に関しては、たとえば、一個の水チャンネルでは Gibbs の自由エネルギーは定義できなくても、n 個の水チャンネルでは実験事実からは Gibbs の自由エネルギーは存在していると考えないとならない。ここで提出された問題は、基本的には植物細胞の細胞膜、及び液胞膜の H⁺ ポンプにも当てはまる。

3aI01

キクイモ細胞膜の2種類のH⁺-ATPaseポリペプチドとC末端ドメインの免疫プロット分析

長谷 昭, 上岡華代¹ (北海道教育大・函館・生物、¹名古屋大・農・生化)

キクイモ塊茎貯蔵組織の培養に伴い、98kDの細胞膜H⁺-ATPaseポリペプチドに加えて、96kDの新たなポリペプチドが出現し、しかもこのポリペプチドはこの酵素のC末端自己阻害ドメインの一部が切除されて出現した可能性があることを、昨年度の本大会で報告した。その後おおよその切断部位を推定するために、最C末端部及びその近傍のN末端側2ヶ所、計3ヶ所のコンセンサス配列に対するウサギ抗血清をそれぞれ調製し、免疫プロット分析を行った。

96kDポリペプチドにおいては、予想に反して最C末端部は保存されていたが、最C末端アミノ酸から約30~50残基及び約60~80残基N末端側のコンセンサス配列に対する抗血清とはほとんどあるいは弱くしか反応せず、この部位が①欠失している、②抗原性を弱めるような修飾を受けている、③独自の配列を持っている、可能性が示唆された。2D-PAGE-免疫プロット分析の結果は、98kDポリペプチドがリン酸化によって96kDにシフトした可能性を否定したが、①と③の可能性については確認できなかった。

一方、同様の96kDポリペプチドは、培養組織のみならず展開中の葉の細胞膜においてもmajorな成分として検出され、キクイモの生理的条件下でも機能している可能性が示された。しかし、塊茎から伸長中の芽や塊茎の皮の細胞膜ではminorな成分であった。今後特に①の可能性について、この酵素の活性化機構との関連において検討したい。

3aI02

塩ストレス適応および非適応タバコ培養細胞の原形質膜H⁺ATPaseの酵素反応特性

Dyah Iswantini, 菅井真人, 角谷忠昭, ¹村田芳行 (京大大学・農、¹岡山大学・農)

原形質膜H⁺ATPaseはH⁺ポンプとして植物細胞の塩ストレス適応過程における原形質内イオン組成の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられ、塩ストレス適応が本酵素の速度論的性質にいかなる変化をもたらすのかは興味深い問題である。一般に膜酵素の反応特性はそれを取り囲む脂質環境に影響されることが知られているから、我々は、単離過程の内在性脂質分解酵素による膜脂質分解を防止した原形質膜単離法を用いて、塩ストレス適応(200 mM NaCl) および非適応タバコ培養細胞から原形質膜を単離し、これらの原形質膜のH⁺ATPaseの基質分解活性およびH⁺輸送活性の速度論的性質およびそれらに及ぼすNaCl, KClの効果と比較検討した。膜蛋白質当たりの基質分解活性、H⁺輸送活性は、ともに塩ストレス適応によって増大すること、本酵素の速度論的性質はNaCl, KCl濃度に依存して変化することが明らかになった。

3aI03

マカラムギ根の細胞膜H⁺-ATPase活性のCa²⁺による可逆的制御

三浦光雄, 木下俊則, 島崎研一郎 (九州大・理・生物)

植物の細胞膜H⁺-ATPaseはさまざまな生理現象に関係しており、多様な機能調節を受けていると考えられる。孔辺細胞の細胞膜H⁺-ATPaseは気孔開孔に関与しているが、最近、ソラマメ孔辺細胞の細胞膜H⁺-ATPaseが生理的濃度の細胞質Ca²⁺により活性調節されている可能性が示された。そこで、Ca²⁺による活性調節機構について、マカラムギ根から水性二層分画法により単離した細胞膜を用いて調べた。まず、細胞膜H⁺-ATPaseのH⁺輸送活性に対するCa²⁺の影響をみたところ、孔辺細胞の場合と同様に、H⁺輸送活性は1μM以上のCa²⁺存在下では強く阻害され、50%阻害濃度は0.35μMであった。このCa²⁺によるH⁺輸送活性の阻害はCa²⁺キレート剤を添加することにより回復し、可逆的な阻害であることが示めされた。また、トリプシン処理によりH⁺輸送活性の上昇した細胞膜においても、Ca²⁺によりH⁺輸送活性は阻害されることが明らかとなった。これらの結果より、Ca²⁺による活性調節は植物の細胞膜H⁺-ATPaseに共通した機構であり、細胞膜H⁺-ATPaseのC末端の自己阻害領域を介さず行われていることが示唆された。

3aI04

シャジクモ節間細胞に電気刺激を与えた時の初期イオン電流の解析——Ba²⁺に感受性を示す成分

大川和秋, 筒井泉雄¹, 野坂修一² (阪大・大学院理学研究科・生物科学、¹岡崎生理学研究所・生体膜、²賀医大・麻酔科)

シャジクモ節間細胞の興奮の主過程に先行するイオン過程を調べている。電圧固定の条件下で膜電位を静止レベル付近(-200mV)より+40~+100mVまで短い方波電圧で変えたとき、-40mVより正側で顕著な外向き電流が流れる。この電流は0.5~1.0mMBa²⁺により抑制される。このイオンチャンネルの開口の時定数(τ_o)、定常電流(I_{ss})の電圧依存性を次式で解析した。

$$I = I_{ss} \times [1 - \exp(-t/\tau_o)]^n$$

nは2から8の間で散らばるが、平均として4の値が予想された。I_{ss}は通常膜電位の-40mVより負側では内向き電流にマスクされているが、実際には-120mV付近より正側で外向きに流れていると予想された。解析したBa²⁺感受性のイオン電流はK⁺チャンネルの開口によると推定している。

3aI05

シャジクモ類における機械刺激受容機構 IV. 電圧固定法の適用

新免輝男 (姫路工大・理・生命)

多くの植物が機械刺激を受容して反応することが知られつつある。また、刺激受容の初期には受容電位が重要な役割を果たしていることが示唆される。私は電気生理学の研究に適した材料であるシャジクモ類の節間細胞を用いて機械刺激によって発生する受容電位の解析を行ってきた。これまでの研究においてカルシウムチャンネルとクロライドチャンネルが受容電位の発生に関与している可能性を示唆してきた。しかしながら、最終的な結論は得られていない。

膜電位変化に関するイオンチャンネルの同定には電圧固定法が有用である。機械刺激受容の解析においては微小電極で膜電位を測定することはほとんど不可能に近いので、私はK-麻醉法を用いて電位を測定することによって解析を進めてきた。K-麻醉法では細胞を二つに仕切ってその電位差を測定する。そのために、仕切りの部分に膜抵抗とは関係ない電気抵抗が存在する(R_s)。 R_s が無視できないほどに大きく、電位固定しても R_s を含めた状態で電位を固定することになり、膜の電位そのものを正確に固定することは難しい。今回、ほとんど R_s の関与なしにK-麻醉法で電位を測定することが可能になったので、電圧固定法によって受容電位を解析することを試みた。

3aI06

車軸藻細胞のリン酸輸送; 単離節間細胞におけるリン酸輸送系の誘導とその機構

三村徹郎, R.J.Reid¹, F.A.Smith¹ (一橋大・生物,
¹Dept. Botany, Univ. Adelaide)

植物細胞を、リン酸欠乏下におくと、細胞膜に高親和性のリン酸輸送系を誘導できることは良く知られている。この誘導過程に関する研究は、これまで多細胞植物体での成長や転流、あるいは培養細胞のような単細胞系でも細胞分裂と共役した形でしか解析できなかったため、細胞内のリン酸濃度との関連が明確ではなかった。本研究では、車軸藻の単離節間細胞を用いることで、成長や分裂と独立に細胞膜にリン酸輸送系を誘導できる系を見いだしたのでそれについて報告する。また、この誘導過程における細胞内のリン酸濃度やpH変化を測定することで、従来考えられていたような液胞リン酸濃度や細胞質pH変化はリン酸輸送系の誘導には無関係であることが明らかになったので、それについても合わせて報告するとともに、植物細胞のリン酸飢餓認識機構について考察を行う。

3aI07

植物ミトコンドリアにおけるリン酸輸送タンパク質のcDNAクローニング

高島令王奈, 畑信吾, 河内宏¹, 泉井桂 (京都大院・農,¹農水省・生物研)

ミトコンドリアへのリン酸の取り込みは内膜に存在する膜タンパク質によって行われ、生物のエネルギー代謝において非常に重要な役割を担っている。すでに数種類の動物や酵母から膜を六回貫通する本タンパク質の遺伝子が単離されているが、植物からこの遺伝子が単離されたという報告はない。

私達は、ダイズにおける根粒特異的遺伝子(nodulin遺伝子) GmN93の分子進化を検証する過程において、偶然、根粒菌に感染していないダイズ根のcDNAライブラリーより偽陽性のクローンを単離した。意外なことに、そのクローンのアミノ酸配列は既知のミトコンドリアにおけるリン酸輸送タンパク質と高い相同性を持ち、機能的に重要であると考えられるドメインも非常に良く保存されているということが分かった。さらにこのダイズのクローンをプローブに用いて、形質転換が容易であるイネ及びシロイヌナズナからも本輸送体タンパク質をコードしているcDNAが得られた。今後は植物細胞における本タンパク質の局在性や生理活性を証明したい。また、植物における本遺伝子発現機構の情報を得るために、ゲノミッククローンの単離・解析も行う予定である。

3aI08

シロイヌナズナ無機リン酸トランスポーター遺伝子の過剰発現によるタバコ培養細胞リン酸吸収の増大
光川典宏, 奥村暁, 白野由美子, 佐藤茂,
柴田大輔 (三井植物バイオ研)

我々は既にシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)から2種のcDNAと5種の遺伝子(*PHT1,2,3,4,5*)を単離している。これら遺伝子の染色体マッピングを行ったところ、*PHT4*と*PHT5*が、リン酸蓄積の変異体である*pho2*遺伝子座の近くにマップされた。そこで、*pho2*変異体のゲノムDNAから*PHT4*と*PHT5*遺伝子のコード領域をPCRで増幅し、塩基配列を決定した。その結果、*pho2*変異は*PHT4*と*PHT5*の変異ではないと考えられた。

シロイヌナズナ無機リン酸トランスポーター遺伝子をCaMV 35Sプロモーターの下流につなぎ、タバコBY-2培養細胞に導入した。この遺伝子が過剰発現した細胞はリン酸吸収速度が上昇し、そのKm値は3.1 μ Mであった。この形質転換細胞は、コントロール細胞よりもリン酸吸収の至適pHが高かった。

3aI09

Arabidopsis K⁺トランスポータのクローニング
魚住信之^{1,2}, Eugene J. Kim³, 山口剛生², Francisco Rubio³, 坪井昭夫⁴, 武藤尚志^{1,2}, Julian I. Schroeder³
(¹名古屋大・生物分子応答研究センター、²名古屋大・大学院農、³Dept of Biology and Center for Molecular Genetics, UC San Diego、⁴基礎生物学研究所)

高等植物は少なくとも2種類のK⁺輸送体、K⁺チャネルとK⁺トランスポータによって細胞内主要イオンK⁺を吸収して膜電位、浸透圧を維持している。我々は*Arabidopsis*由来のK⁺チャネルの構造と機能の解析を行ってきた。一方K⁺トランスポータ遺伝子(HKT1)は小麦から単離されている(Schachtman & Schroeder, 1994 Nature, 370:655)。K⁺輸送能欠損変異酵母に*Arabidopsis* K⁺チャネル遺伝子又は小麦K⁺トランスポータ遺伝子を導入し比較すると前者は後者に比べてCs⁺に対してより高い感受性を示しNa⁺にはより高い耐性を示した。*Arabidopsis*におけるK⁺チャネルとK⁺トランスポータの役割を明らかにするために小麦K⁺トランスポータのアミノ酸配列を利用して*A. thaliana* cDNA libraryよりK⁺トランスポータ遺伝子をクローン化した。その遺伝子の5'末端は欠失していたため、5'RACE法にて全長を単離した。読み取り枠から推定される蛋白質の質量は58KD、10-12程度の膜貫通領域を持ち小麦のそれと極めて類似していた。

3aI10

葉緑体包膜に局在する電子伝達とK⁺輸送の関連
村田善則、尼子克己、高橋正昭 (大阪府大・農・応用生化)

葉緑体包膜には包膜内外のΔpHや膜電位を形成するエネルギー産生系が局在し、光合成基質、産物あるいは葉緑体タンパク質前駆体を輸送し、葉緑体内反応と細胞質反応との連絡にも重要な役割を担っている。以上の機能に加えて我々は葉緑体包膜に複数の電子キャリアーから成る電子伝達系が存在することを示した。本研究では、その機能について検討した結果を報告する。

単離葉緑体は葉緑体外に加えたCyt cを光還元する。この還元はValinomycinによって促進され、K⁺チャネルの阻害剤であるTetraethylammoniumにより抑制された。一方、CCCP、Nigericinの添加効果は見られなかった。また、KClを葉緑体外に添加すると著しくCyt cの還元が阻害された。この結果は葉緑体外へのK⁺の移動がCyt cの還元を律速していることを示している。葉緑体では、光照射時に包膜を介したK⁺とH⁺の交換輸送による葉緑体外へのH⁺の放出が報告されている。本実験の結果より、単離葉緑体によるCyt cの光還元は葉緑体内外のK⁺輸送に関連した反応であり、包膜の電子伝達によってH⁺の輸送あるいは逆方向のアニオンの輸送が駆動されていることが示唆される。

3aI11

植物液胞膜カルシウム能動輸送系の生化学的解析
上岡 華代、田中 喜之、前島 正義 (名古屋大・農・生化、
農水省・生物資源研究所)

カルシウムは様々な細胞機能を調節する重要なイオンであり、種々の情報伝達の初期反応に関与している。植物細胞では液胞が主要なCa²⁺貯蔵部位であり、細胞質のCa²⁺濃度の調節に中心的な役割を果たす。液胞ではCa²⁺-ATPaseとCa²⁺/H⁺antiporterの二つのシステムが液胞内へCa²⁺を能動輸送すると考えられている。そこで、これら二つの輸送体の実体と機能調節を分子レベルで解析することを目的に、液胞膜小胞を用いてそれぞれのCa²⁺輸送機能の解析と比較を行った。

ヤエナリ実生の胚軸から液胞膜小胞を単離し、膜小胞へのCa²⁺輸送を⁴⁵Caを用いた過法で測定した。Ca²⁺能動輸送系の全活性は、ATPを添加しCa²⁺-ATPaseとCa²⁺/H⁺antiporterの両方を駆動させて測定した。Ca²⁺-ATPaseの活性は bafilomycin A₁ (V-ATPase阻害剤) を添加して測定した。Ca²⁺/H⁺antiporterの活性は、H⁺-PPaseによりH⁺濃度勾配を形成させた上でCa²⁺の取り込みを測定した。

ヤエナリ液胞膜小胞のCa²⁺能動輸送系の全活性は、CaCl₂濃度100μMで約20nmol/min/mg、Ca²⁺-ATPaseの活性は約6nmol/min/mgであった。Ca²⁺-ATPaseのCa²⁺に対する見かけのKm値は2.6μM、Ca²⁺/H⁺antiporterでは25μMであった。両活性を比較すると、CaCl₂濃度100μMでは、Ca²⁺/H⁺antiporter活性が高いが、細胞質Ca²⁺の生理的濃度(1μM以下)ではCa²⁺-ATPaseが数倍高い値を得た。これらの結果をもとに両者の生理学的役割を考察する。

3aI12

ダイコン細胞質膜水チャネルの一次構造解析と液胞型分子との比較
○須賀しのぶ、樋口達治、前島正義(名古屋大・農・生化)

多くの植物では液胞膜に多量の水チャネル(aquaporin)が局在している。これに加えて細胞質膜にも固有の水チャネルが存在する。いずれの水チャネルも、植物と水の関係を分子レベルで解明するために不可欠な要素である。私たちは液胞膜の2種類の水チャネル(γ型、δ型VM23)のcDNAを解析したが、今回、同一組織で細胞質膜型と液胞型水チャネルを比較するためにダイコン(*Raphanus sativus*)からcDNAをクローニングし両者の特徴を解析した。

ダイコン幼植物の茎のcDNAライブラリーを作成し、*Arabidopsis*の細胞質膜型水チャネル(PIP)固有の配列をプライマーとし、PCR法でダイコン細胞質膜型cDNAを増幅産物を複数得た。その1つは*Arabidopsis*のPIP1aに類似していた(約520b、アミノ酸120残基一致)が、ダイコン液胞膜VM23とのアミノ酸の一致は40%以下であった。これをプローブとして全鎖長cDNAを得ることができた。水チャネルファミリーに共通するAsn-Pro-Alaモチーフを含むこの分子について、ダイコン液胞膜のγ型、δ型水チャネルおよび他植物種の水チャネルと比較し、その特徴を考察する。

1aJ01

THE METABOLISM OF CARBOHYDRATES IN CEREAL SEEDS UNDER ANOXIA.

Pierdomenico PERATA^{1,2}, Junji YAMAGUCHI², Lorenzo GUGLIELMINETTI¹, Elena LORETI¹ and Amedeo ALPI¹: (1) Dipartimento Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa, Via Mariscoglio 34, Italy; (2) Nagoya University Bioscience Center, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan

The majority of cereal seeds fail to germinate under anoxia, but rice represents an exception to this rule. Little is known about the molecular and metabolic basis for this difference. We conducted a detailed description of the metabolism of carbohydrates in cereal seeds under anoxia. Starch metabolism: our results indicate that only rice seeds possess the complete set of starch degrading enzymes under anoxia, while anoxia-intolerant cereal seeds are unable to degrade starch under anaerobiosis. Sucrose synthesis takes place in the anoxic rice seedlings. We propose that cytosolic sucrose degradation in anoxic rice seedlings takes place mainly through a sucrose synthase pathway. Data will be presented on the effects of anoxia the production of α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, α -glucosydase, enzymes of sucrose metabolism in cereal seeds either aerobic or anaerobic. Data on the effects of anoxia on the processing of the bound-form of barley β -amylase will also be presented.

1aJ02

ゴマ種子のチアミン結合タンパク質の性質

渡辺克美, 筑紫久美, 清水まゆみ, 足立崇,

吉田豊和, 光永俊郎 (近畿大・農・食栄)

ゴマ種子に存在するチアミン結合タンパク質 (TBP) は、イネ種子やソバ種子のTBPに比べ分子量が小さいなど、その性質は他の植物種子のTBPとは異なっている。今回、さらに2、3の性質について比較検討を行ったので報告する。

ゴマ種子からのTBPの単離、精製は従来の方法にしたがって行った。チアミン類似体との結合活性を平衡透析法により求めた。その結果、ゴマ種子のTBPは、他の植物種子のTBPとは異なり、ピリチアミンに対する結合活性をもっていることが明かとなった。また、等電点も他の植物種子のものとは若干異なっていた。

他方、ゴマ種子TBPを構成するポリペプチド鎖(Small鎖)を単離し、そのアミノ酸配列を同定した。その配列はゴマ種子に存在する3種類のTBPにおいて、すべて同じであった。ホモロジー検索を行ったが、既知タンパク質との高い相同性は認められなかった。

1aJ03

シロイヌナズナLEC1遺伝子の胚発生における役割
大藤雅章^{1,2}, Tami LOTAN², Kelly MATSUDAIRA YEE², Maliryn A.L. WEST², Jay DANAQ², Russel RO², J. Lynn Zimmerman³, Robert L. Fisher⁴, Robert B. Goldberg⁵ and John J. HARADA² (¹基礎生物学研究所・発生生物、²University of California, Davis, ³University of Maryland Baltimore County, ⁴University of California, Berkeley, ⁵University of California, Los Angeles)

高等植物における種子形成の過程は、3つの段階、すなわちmorphogenesis, maturation, desiccationに分けられる。Morphogenesis phaseでは細胞分裂がほぼ完了し、胚の形態が決定される。胚はmaturation phaseで貯蔵脂肪や貯蔵タンパク質を蓄積し、desiccation phaseでは乾燥耐性を会得する。シロイヌナズナのLEAFY CO TYLEDON1 (*lec1*)は胚致死変異株で、胚は乾燥耐性を会得できずに死んでしまう。また、貯蔵タンパク質や貯蔵脂肪が減少することからLEC1は胚発生後期において重要な因子であると推定される。

今回我々は*lec1*変異株がmorphogenesis phaseの球状胚期においてsuspensorに異常を見せることを見いだした。このことはLEC1が胚発生初期から胚形成に何らかの影響を及ぼしていることを示唆している。*lec2*や*fusca3*といった他の*leafy cotyledon type*の変異株やそれらの2重変異株を用いた解析結果についてもふれる予定である。また、LEC1遺伝子のクローニングも行っており、その近況について報告する。

1aJ04

シロイヌナズナを用いた種子発芽の遺伝学的解析
南原英司、早間良輔、土屋雄一朗、内藤哲(北大・農・応用生命)

シロイヌナズナの*abi3*変異株と*fus3*変異株は種子休眠能が低下した変異株として遺伝学的に同定された。これら変異株の胚発生後期過程では、種子登熟の遺伝的プログラムの一部が活性化されないのみならず、発芽後の遺伝的プログラムの一部が異所的に進行する。このような変異株の形質が遺伝子発現の変化を伴っているかを検討するために、胚発生後期の*abi3 fus3*二重変異株で野生型株よりも発現量が多い(二重変異株で脱抑制された)cDNAをdifferential display法により検索した。野生型株と二重変異株の未熟果実から調製したmRNAを用いてdifferential displayをおこない、6クローンを単離した。これら遺伝子は全て野生型株では胚発生後期には発現が抑えられており、発芽もしくは発芽後に強く発現することが分かった。このことから、ABI3、FUS3遺伝子産物は胚発生後期に、種子登熟に関わる遺伝子群を活性化すると同時に、発芽もしくは発芽後に発現する遺伝子を抑制するbifunctionalな役割を担っていると考えられる。

1aJ05

OSMYB5 とイネグルテリン遺伝子プロモーター中の AACAMモチーフとの相互作用について

鈴木堂弘, 広瀬咲子, 鷲田治彦, 呉 伝銀, 土岐精一, 高岩文雄
(農業生物資源研究所・生物工学部)

イネ種子貯蔵蛋白質グルテリンの遺伝子は、胚乳組織特異的発現を示す。今までのシス配列解析の結果から、本遺伝子の組織特異的発現には少なくともGCN4, G-boxそしてAACAMの3種のモチーフが必要であると考えられる。また、この内AACAMモチーフは種子ではポジティブエレメントとして、それ以外ではネガティブエレメントとして機能することが示唆されている。本実験では、そのAACAMモチーフに作用するトランス因子の候補であるOSMYB5について解析を行った。

我々がクローン化した*Osmby5*遺伝子のコード領域を発現ベクターに導入し、GSTとの融合蛋白質を得た。そしてこの融合蛋白質の、AACAMモチーフに対する結合能についてゲルリターデーション法にて検討した。AACAMモチーフに点変異を導入し結合活性を調べたところ、変異を導入する塩基によっては結合能が全く消失してしまうものが見られた。これはOSMYB5がAACAMモチーフに塩基配列特異的に結合し得ることを示している。また、RT-PCR法及び*in situ*ハイブリダイゼーション法による*Osmby5*遺伝子の発現解析もっており、それについても報告する予定である。

1aJ06

イネ・ジベレリン酸誘導性遺伝子の転写調節領域の解析とそれに作用するタンパク質因子の検索

鷲尾健司 (北海道大・地球環境科学・環境分子生物学)

イネ・Ⅲ型カルボキシペプチダーゼ (CPD3) 遺伝子は種子発芽時に糊粉層細胞特異的にジベレリン酸 (GA) による発現誘導を受けるGA応答性遺伝子である。この遺伝子より取り出したプロモーター領域は同じ穀物植物であるオート麦より調整した糊粉層細胞プロトプラスト内でGAに依存した一過性の発現誘導を示し、その発現誘導にはCPD3遺伝子プロモーター内のA/Tリッチな配列が関与していることを明らかにしている。

限定されたA/Tリッチな配列内には穀物植物加水分解酵素遺伝子群の5'調節領域の共通配列でありGA応答性シス配列と推定されているTAAACAG/AA配列のコア配列(AACAGA)が含まれていた。現在この配列周辺のGA応答性への関与をイネ糊粉層を用いた実験系で詳細に解析するとともに、この領域と相互作用するイネ糊粉層タンパク質の同定をサウスウエスタン法を用いて進めている。

1aJ07

糖センサーとイネ胚におけるα-アミラーゼ遺伝子の転写抑制

梅村孝明², Pierdomenico Perata¹, 蓬原雄三², 山口淳二¹ (1名大・生物応答セ、2名城大・農)

私たちは、イネ胚を用いたトランジェントアッセイ系を用いて、α-アミラーゼ遺伝子*RAmy3D*遺伝子の糖による転写抑制現象について検討している。解析の結果、α-アミラーゼ遺伝子の糖による抑制現象が、1) 光合成遺伝子で報告されている抑制現象と類似のものであること、2) 内生の糖濃度の低下によっても引き起こされること、3) ヘキソキナーゼの基質となり得ないグルコース類似体では、抑制が起こらないのに対し6位がリン酸化されない2-deoxyglucoseでは抑制が引き起こされること、等が明らかとなった。これらの結果はヘキソキナーゼが糖センサーと深くかかわっていることを示唆している。

ヘキソキナーゼの阻害剤・グルコサミンは、糖による抑制を解除する作用を示すが、糖代謝それ自体には影響を与えない。これらの結果から、グルコサミンが相互作用を示す、解糖系代謝とは無関係のヘキソキナーゼ様糖センサーの存在が想定された。その後の進展についても報告する。

1aJ08

イネ発芽種子システインプロテアーゼの遺伝子構造と発現制御

加藤英樹, 新谷愛, 南川隆雄 (東京都立大・理・生物)

我々は、これまでにイネ発芽種子中で特異的に発現し、種子貯蔵タンパク質(グルテリン)分解に主要な役割を果たすシステインエンドペプチダーゼREP-1を単離精製し、このcDNAを得るとともに他の類似のcDNAを得て、それぞれRP-60及びRP-80と名づけ全塩基配列を決定した。

今回、これらのmRNAの植物ホルモンによる発現応答の解析を行った結果、ジベレリン及びアブジン酸による両mRNAの発現制御が示された。

また、ゲノムライブラリーからそれぞれの遺伝子を得て*Rep1*及び*RepA*と名づけ、塩基配列を決定した。cDNAとの比較から*Rep1*にはイントロンが存在せず、*RepA*は5つのエキソンから成ることが示された。また両遺伝子の上流域には、イネ科種子のα-アミラーゼ遺伝子などで報告されているジベレリン応答の保存配列は見いだされなかった。

1aJ09

イネ未熟種子特異的プロテインキナーゼ遺伝子の機能解析

浅野敬幸¹、川崎努^{2,3}、多田雄一³、島田浩章¹
(¹東京理大・基礎工・生物工、²三井植物バイオ研、³現奈良先端大・バイオサイエンス)

これまでに開花後1~2週間目の約10日間の登熟中期の未熟種子特異的に発現するイネのカルシウム依存プロテインキナーゼ(SPK)の遺伝子が得られている。この遺伝子の発現時期は、種子貯蔵デンプン生合成の最も盛んな時期と重なるため、SPKは、これらの生合成におけるシグナル伝達機構に関与していることが予想される。そこでSPKの生理的役割を調べるため、cDNAを用いてアンチセンス遺伝子を構築した。これをイネに導入し、形質転換植物を作成した。今回は、得られた形質転換植物での導入遺伝子の発現と、それによる形態変化の観察結果について報告する。

1aJ10

転写因子VP1と相互作用するタンパク質のクローニング

保浦徳昇、服部東穂 (三重大・遺伝子)

VP1は*Em*遺伝子などの*LEA*遺伝子、あるいはアントシアニン生合成系の*CI*といった成熟過程の胚で発現する遺伝子の転写活性化因子で、アブシジン酸による制御に関与している。本研究では、VP1が関与する転写制御メカニズムについての知見を得る目的でVP1と特異的に相互作用するタンパク質を酵母Two-hybrid法により、クローニングを試みた。

イネ、トウモロコシおよびシロイヌナズナのVP1(相同)タンパク質の間で、よく保存された3つのドメイン(I、II、III)のうち、IとIIの領域を含む断片と、IIIの領域を含む断片をそれぞれ“bait”に用いてTwo-hybrid法によるスクリーニングを行った。その結果、IIIの領域を含む断片を“bait”に用いたスクリーニングで、このIIIの領域に特異的に相互作用すると思われるクローニングが得られたので、その解析結果について報告する。

1pJ01

アブラナ科植物の自家不和合性に関する花粉側認識物質の探索

原 実、高山誠司、蔡 見植、日向康吉¹、磯貝 彰
(奈良先端大・バイオ、¹東北大・農)

アブラナ科植物の自家不和合性における柱頭側の自他認識物質の候補としてSLG(S-locus glycoprotein)とSRK(S-receptor kinase)が見出されている。しかし、これらと相互作用すると推定される花粉側の認識物質は未だに明らかにされていない。今回、我々は、SLGとの結合活性を指標に花粉側認識物質の探索を行った。

*Brassica campestris*の花粉より花粉表層物質を有機溶媒を用いて抽出した。この抽出物を柱頭から精製したSLGと混合したところ、等電点電気泳動において、SLGのバンドの塩基性側へのシフトが観察された。この結果は、本抽出物中にSLGと相互作用する塩基性物質が存在する事を示唆した。

この相互作用物質の本体や結合の強度・特異性を明らかにする事を目的に、表面プラズモン共鳴センサー(BIAcore, Pharmacia)を用いた解析を行った。その結果、花粉表層物質中にはSLGやこれと相同性を有するSLR1(S-locus related protein 1)と結合する物質の存在が確認された。現在、これら因子の精製を進めると共に、結合強度やS遺伝子特異性等につき解析を進めている。

1pJ02

蛍光色素SYBR Greenを用いた花柱内の花粉管観察法の開発

東山哲也、黒岩晴子¹、河野重行、黒岩常祥

(東京大・大学院理学系・生物科学、¹共立女子短大・文)

被子植物の花粉の約7割は、雄原細胞と栄養細胞からなる2細胞性花粉である。雄原細胞は花柱内を伸長する花粉管の中で分裂し、2つの精細胞となり、卵細胞および中心細胞と重複受精する。花柱内での花粉管伸長過程は、これまで主に1)組織切片の電子顕微鏡観察か2)アニリンブルーなどを用いた押し潰し法による蛍光顕微鏡観察で調べられてきた。しかし、前者では少数の花粉管の微細構造しか観察できず、後者では花粉管の構造の保持が難しいことから、精細胞形成過程や栄養核の挙動を解析することができなかつた。

裸出胚嚢を持つトレンア(*Torenia fournieri*)で*in vitro*重複受精系を開発する際、培地上で発芽した花粉管(*in vitro*)と、一度花柱を通過してから培地上を伸長する花粉管(*semi in vitro*)では、前者で伸長速度の低下、花粉管径の増大、雄原細胞の分裂時期の早期化、精細胞と栄養核の位置の逆転が認められた。そこで、花柱内での花粉管伸長過程(*in vivo*)と比較するために、あらたに核酸特異的染色色素SYBR Greenによる花粉管観察法を開発した。SYBR Greenは非常に輝度が高く、花柱を2つに引き裂くだけで、花粉管の構造を保持したまま精細胞核や栄養核を明瞭に観察することができた。精細胞形成過程や栄養核の挙動を*in vivo*で追えるようになり、その結果1)培地上では雄原細胞の分裂時期が早まること、2)精細胞と栄養核の位置の逆転現象は*in vitro*での異常であることが明らかとなった。

1pJ03

雄性配偶体形成過程において発現する *LIM8* 遺伝子に関する研究

上藤洋敬、高瀬尚文、平塚和之、堀田康雄
(奈良先端大・バイオサイエンス)

我々は配偶体形成に関与する遺伝子の検索を試み、これまでにテッポウユリ (*Lilium longiflorum*) の減数分裂期花粉母細胞で特異的に転写される *LIM* (Lily messages Induced at Meiosis) 遺伝子群に対応する 18 種類の cDNA を単離している。

本研究では減数分裂期の合糸期から四分子期まで mRNA が蓄積している *LIM8* 遺伝子について完全長の cDNA を単離し、機能解析を行った。*LIM8* 蛋白質のアミノ酸配列と疎水性プロファイルはシロイヌナズナのアミノ酸輸送担体 (AAP) ファミリー、及びタバコのアAP 相同遺伝子産物と高い類似性を示した。これらのことから *LIM8* は減数分裂期特異的 AAP として細胞内へアミノ酸を取り込む機能を有することが考えられた。現在、*LIM8* の機能検討のために酵母のヒスチジン輸送変異株を用いて相補性試験を行っている。また、*LIM8* と green fluorescent protein の融合蛋白質を用いて *LIM8* の細胞内所在の調査を行うとともに、抗 *LIM8* 抗体を作成し、それを用いた蛍光抗体法と細胞分画法による *LIM8* の細胞内所在の調査、及び蛋白質レベルでの *LIM8* の発現パターンの調査を行っている。

1pJ04

ユリ花粉母細胞において減数分裂期に発現する *LIM13* 遺伝子産物の解析

○尾形信一、平塚理恵¹、皆見政好、高瀬尚文、平塚和之、堀田康雄 (奈良先端大・バイオサイエンス、¹慈恵医大・生物)

LIM (Lily messages Induced at Meiosis) 遺伝子群は、ユリの花粉母細胞の減数分裂期に転写される遺伝子群である。*LIM* 遺伝子群の中には、既知の遺伝子産物に有意な相同性を示さない新規な遺伝子が含まれており、現在、これら新規な遺伝子の生殖細胞形成過程における役割の解明を試みている。新規な *LIM* 遺伝子の一つである *LIM13* 遺伝子は、その予想されるアミノ酸配列中に核移行シグナル様の配列が存在していた。そこで、*LIM13* 遺伝子産物の細胞内所在を検討するために、*LIM13*-GFP融合遺伝子を作製し、タマネギの表皮細胞にパーティクルガンを用いて遺伝子導入を行った。GFPの蛍光を指標に観察を行った結果、GFPの蛍光が核内に検出された。更に、*LIM13* 遺伝子産物のタンパク質レベルでの発現様式、及び核内での局在を明らかにするために、抗 *LIM13* ポリクローナル抗体の作製を行った。作製した抗体を用い、ユリ花粉母細胞の抽出物に対してウエスタンブロット解析を行った結果、*LIM13* 遺伝子産物は減数分裂期特異的に蓄積していることが明らかとなった。また、間接蛍光抗体法によって、ユリ花粉母細胞内での局在の検討を行ったところ、*LIM13* 遺伝子産物は、染色体上に局在する可能性が示唆された。

1pJ05

ユリの減数分裂期に発現が誘導される *LIM18* 遺伝子の機能解析

皆見政好、平塚理恵¹、高瀬尚文、平塚和之、堀田康雄
(奈良先端大・バイオ、¹慈恵医大・生物)

テッポウユリ (*Lilium longiflorum*) の花粉母細胞特異的に発現する *LIM18* 遺伝子は、その遺伝子産物の推定されるアミノ酸配列から HSP70 様蛋白質をコードすると考えられている。現在までのところ、(1) ユリ花粉母細胞には抗 *LIM18* 抗体が認識する 69kDa、70kDa の蛋白質が恒常的に存在すること、(2) 69kDa の蛋白質の消長は *LIM18* 遺伝子の mRNA レベルでの発現様式と一致すること、(3) 両蛋白質はユリ花粉母細胞の熱処理によって量的変動を示さないことが明らかとなっている。これらの知見に加えて、(4) ユリ花粉母細胞抽出物を二次元電気泳動法により分離後、抗 *LIM18* 抗体を用いたウエスタン解析により、この抗体が認識するシグナルが少なくとも 6 種類花粉母細胞中に存在すること、(5) 花粉母細胞を間接蛍光抗体染色したところ、核内にもシグナルが検出されることが明らかとなった。現在、減数分裂進行過程における *LIM18* の動態を詳細に解析するために、*LIM18* を特異的に認識するペプチド抗体の作成とそれを用いた解析を行っている。また、*LIM18* 遺伝子の発現調節機構を調べる目的で、ユリのゲノミック DNA から *LIM18* 遺伝子の発現制御領域の単離を試みている。

1pJ06

吹掛け絞りアサガオの *CHI* 遺伝子中に挿入した

En/Spm 類縁のトランスポゾン *Tpn2*

星野敦^{1, 2}、飯田滋¹

(基礎生物学研究所¹、総合研究大学院大学・生命科学²)

アサガオには、花の色や模様多くの変異種が存在する。吹掛け絞り (*speckled*) は、クリーム色の地色の上に有色の斑点模様を持つ花を咲かせる園芸的に重要な変異で、トランスポゾンの関与する易変性変異と考えられている。我々はこの斑点模様の形成機構を分子レベルで明らかにすることを目的に *speckled* の単離・同定を試みた。

まず、吹掛け絞りアサガオの色素合成系遺伝子の構造を解析したところ、*CHI* (Chalcone isomerase) 遺伝子中におよそ 7kb の挿入配列が存在し、挿入配列と表現形との間に強い連鎖があることを見いだした。また、吹掛け絞りアサガオの花弁における *CHI* 遺伝子 mRNA の蓄積の低下が見られることから、この構造が吹掛け絞りを与える可能性が高いことが明らかになった。この *CHI* 遺伝子領域をクローニングし、塩基配列を決定することで野性型アサガオと比較検討したところ、トウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* に類縁の新規トランスポゾン *Tpn2* (Transposable element *Pharbitis nil two*) が *CHI* 遺伝子の第 2 イントロン中に挿入していることを確認した。以上の結果より、易変性変異 *speckled* は、*CHI* 遺伝子中に *Tpn2* が挿入した構造であることが示唆された。

1pJ07

AFLP-based mRNA fingerprinting法およびdifferential display法によるマルバアサガオ花卉のキメラ斑形成に関わる遺伝子の探索

土生芳樹¹、田中（深田）幸子¹、久富恵世^{1,2}、飯田滋¹（¹基生研,²総研大）

マルバアサガオには白地の花卉に有色のキメラ斑を生じる変異種が存在し、可動性遺伝因子の関与が予測されている。今回AFLP-based mRNA fingerprinting (AMF)法およびdifferential display (DD)法を用いて、変異型の白地の花とその生殖細胞復帰変異体の赤色花との間で異なる発現様式を示す遺伝子を解析した。AMF法はDD法に比べて結果の再現性が高かったが、最終的に発現様式の異なるcDNA断片を両方法で各々2種ずつ同定した。対応するcDNAの全長を単離して解析した結果、4種のcDNA断片は赤色花で強く発現している同一の遺伝子に由来することが示された。サザン解析から変異型個体とその生殖細胞復帰変異体との間でこの遺伝子領域に構造変化が起きていることが示され、さらにキメラ斑形成に関わる遺伝子座と今回得られた遺伝子との連鎖も観察された。この遺伝子はアントシアニン合成経路の酵素カルコンシンターゼ (CHS) の遺伝子に高い相同性を示した。マルバアサガオには複数のCHS遺伝子が存在するが、以上の結果から今回新たに同定されたCHS遺伝子のキメラ斑形成への関与が示唆された。

1pJ08

トランスジェニックイネのジーン・サイレンシング；アンチセンスRNAの関与

森野和子、Odd-Arne Olsen¹、経塚淳子、島本 功 (NAIST・バイオサイエンス,²Agric.Univ.Norway)

植物に外来遺伝子を導入した場合に、導入遺伝子が不活性化されることがしばしば観察される。これは、相同性の高い遺伝子間の相互作用のために起こると考えられている。

オオムギで単離された糊粉層特異的遺伝子 *Ltp2* (Lipid transfer protein 2) のプロモーターに GUS を融合した遺伝子を導入したイネでは、形質転換第2世代において、多様な表現型を示す不活化が起こった。不活性化の起こった系統内では、表現型が異なる個体間でも、DNA レベルの変化はなかった。最もコピー数の少ない L3.3 系統の導入遺伝子の構造を決定したところ、完全な導入遺伝子をもつ遺伝子座と複雑な構造を持つ遺伝子座が存在することが明らかとなった。この複雑な構造を持つ遺伝子座には完全長のプロモーターに GUS 遺伝子の3'側の一部が逆向きにつながっている領域があった。RT-PCRの結果から、アンチセンスRNAの転写が認められ、この産物がサイレンシングを起こしていると考えられた。

1pJ09

トランスジェニックトルコギキョウ植物の育成とその解析
—外来遺伝子の後代への遺伝について—

西原昌宏、星伸枝、阿部善子、山村三郎 (財団法人岩手生物工学研究センター)

我々はトルコギキョウに有用形質を付与する目的で、本植物の形質転換について研究を進めている。今回、アグロバクテリウム法及びパーティクルガン法により育成した形質転換体の稔性および後代への外来遺伝子の遺伝について解析を行った。

材料はアグロバクテリウム法により実生切片に pIG121Hm を導入して得られた形質転換体及びパーティクルガン法により実生及び根切片に pARK22 とその他の有用遺伝子 (アントシアニン合成関連遺伝子、耐病性遺伝子) を導入して得られた形質転換体を用いた。形質転換体当代の花粉について顕微鏡観察及び発芽培地上での発芽テストを行った結果、形質転換体では正常形態の花粉の数、発芽率とも野性株に比べて低下していることが示された。発芽率は0~80%と系統毎に大きく異なっていた。次に、自家受粉を行った結果、アグロバクテリウム法により遺伝子導入した1系統より蕾あたり約500個の種子が得られた。この種子の発芽率は約7割であり、実生の3/4はハイグロマイシン耐性を示し、組織化学的GUSアッセイによってもGUSの発現が観察された。このことより、導入した外来遺伝子の後代への遺伝が確認された。また、本系統では外来遺伝子は一遺伝子座に導入されていると推定された。一方、パーティクルガン法により遺伝子導入した系統に関しても種子が得られており、解析を行っているところである。

1pJ10

日本産 *Ti* プラスミドゲノムの構造解析 (3) :

制限酵素地図の構築と遺伝子マッピング
鈴木克周、太田伸之、服部嘉行、裏地美杉、前田康昇、加藤明¹、吉田和夫 (広島大・理・生物科学、¹北海道農試)

アグロバクテリアの感染による高等植物への *Ti* プラスミドの *T-DNA* 移行は高等生物で唯一知られている生物界を越えた遺伝子移行現象である。この *Ti* プラスミドの全構造と機能の解明と系統進化的興味から、桜の木から採取された日本産 *Agrobacterium tumefaciens* の *Ti* プラスミド (p*Ti*-S AKURA) のクローンバンクをラムダファージベクターを用いて作成した。このバンクのクローンを整列化し、制限酵素地図と遺伝子地図を作成することに成功したので報告する。

整列化クローンの塩基配列のホモロジー分析の結果、プラスミドの半分の領域上に *Tra* 遺伝子群・*accA*・*Vir* 遺伝子群・*T-DNA*・*Op* 等質化遺伝子群・*Trb* 遺伝子群・*RepABC* が順に存在することがわかった。このうち複製に関与する遺伝子 (*repABC*) を含む数個の遺伝子をノバリン型プラスミドでは初めて見出すことができた。

残り半分の領域を占める他のプラスミドと遺伝子データベース上でホモロジーを示さない領域の解析結果についても触れたい。

1pJ11

日本産Tiプラスミドのゲノム構造解析(4) :
T-DNA領域の構造解析
大田伸之、鈴木克周、服部嘉行、裏地美杉、
前田康昇、¹加藤明、吉田和夫
(広島大・理・生物科学、¹北海道農業試験場)

Tiプラスミドはバクテリアから高等植物へDNAの移行をおこなう極めてユニークなプラスミドである。このプラスミドの全塩基配列の決定を行い、構造と機能及び系統の解析を行う目的で、日本産ノバリン型アグロバクテリアMAFF301001からTiプラスミドpTi-SAKURAを調製し、19個のオーバーラップするDNA断片を含むクローンからなるλファージライブラリーの構築を行った。

本研究では、整列ライブラリーの内、クローン1D6、1E6、1F2、4H10、1A9及びこれらのPCR産物を用いてこのプラスミドのT-DNA領域及びその周辺のシーケンスを行ない、ここにその結果を報告する。

塩基配列を決定しホモロジー検索を行った結果、Nox、Ocd、tms遺伝子を見いだした。これらはオクトピン型、ノバリン型Tiプラスミドの持つ遺伝子と70%以上のホモロジーが確認された。

1pJ12

日本産Tiプラスミドのゲノム構造解析(5) : vir遺伝子領域の解析

服部嘉行、大田伸之、裏地美杉、前田康昇、
¹加藤明、鈴木克周、吉田和夫
(広島大・理・生物科学、¹北海道農試)

本報告では、ファージベクターを用いて構築したpTi-SAKURAのライブラリーに対して、ボーター配列を含むDNA断片をプローブに用いたブランクハイブリタイゼーションを行った。シグナルの現れたブランク、1A5、1D1、1E10、2B5を単離し、大腸菌に感染させ、感染させた大腸菌からファージDNAを抽出し、塩基配列を決定し、そのホモロジー解析を行った。その結果、塩基配列を決定したDNA断片は、vir領域であり、virB、D、G、Eの順に並んでいることが分かった。また、同じノバリン型のTi plasmidのpTiC58とは88~100%のホモロジーがあり、オクトピン型のTi plasmidのpTi15955、pTiA6NCとは80~87%のホモロジーがあった。その内、特にvirB7遺伝子の塩基配列で解析を行ったところ、pTiC58とは100%のホモロジーがあり、pTi15955、pTiA6NCとは86.9%のホモロジーがあることが分かった。

1pJ13

クラミドモナスDNAメチルトランスフェラーゼの精製と特徴づけ

中野由佳、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)

クラミドモナスの葉緑体DNAは母性遺伝によって伝わる。また配偶子形成に伴って、雌の葉緑体DNAのみがメチル化を受けることが知られている。このことから母性遺伝の分子機構は、メチル化による雌由来DNAの保護ではないかと推定されたが、確証はない。私たちは母性遺伝とメチル化の関係解明を目的とし、DNAメチルトランスフェラーゼの精製、特徴づけを行った。高メチル化変異株Me1+を破砕し、DEAE-Toyopearl、Affi-Gel Blue、Mono-Qカラムを用いて1300倍以上に精製した。至適pH、基質特異性、メチル化を受ける塩基配列について調べた。現在、アミノ酸配列の決定を行っている。

1pJ14

キュウリ MGDG synthase に対する抗体を用いたホウレンソウ MGDG synthase の解析
北川史二郎、下嶋美恵、太田啓之、増田建、高宮建一郎
(東工大・生命理工・生体機構)

monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) synthase, UDP-galactose: diacylglycerol galactosyltransferase は葉緑体膜の主要構成糖脂質である MGDG を合成する酵素である。この酵素については、これまでホウレンソウを材料として2つのグループが精製を試み、それぞれ異なる20kDa前後のタンパク質を MGDG synthase として報告していた¹⁾。我々はキュウリを材料として本酵素の精製およびクローニングを初めて行い、キュウリ MGDG synthase がこれらとは全く異なる47kDaのタンパク質であることを明らかにした²⁾。今回我々はキュウリ MGDG synthase に対する抗体を用いてホウレンソウの同酵素に対する解析を行ったので報告する。

大腸菌で発現させたキュウリの成熟タンパク質を抗原としてウサギから抗血清を得た。この抗血清を使用してウェスタン・ブロッティングを行ったところ、ホウレンソウにおいて47kDa前後に活性と一致する一本のバンドを検出した。このことからホウレンソウにおいても、MGDG synthase はキュウリと同様47kDa前後のタンパク質であることが明らかとなった。また我々はキュウリ MGDG synthase が phosphatidic acid (PA) によって顕著に活性化されることを明らかにしているが、ホウレンソウでも同様な活性化が起こることを見出した。

¹⁾ É. Maréchal et al. (1991) C. R. Acad. Sci. Paris 313 : 521-528

²⁾ T. Teucher and E. Heinz (1991) Planta 184 : 319-326

³⁾ M. Shimojima et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press

1pJ15

葉緑体膜の主要糖脂質合成酵素、MGDG Synthase のシロイヌナズナでのクローニング
粟井光二郎、太田啓之、下嶋美恵、増田建、高宮建一郎（東工大・生命理工・生体機構）

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) は高等植物の葉緑体膜の 50% を占める主要脂質であり、地球上で最も含量の高い極性脂質であるといわれている。我々は最近キュウリにおいてこの MGDG の合成を担う UDP-galactose : diacylglycerol galactosyltransferase (MGDG Synthase) のクローニングに成功したが¹⁾、今回シロイヌナズナから新たに本酵素の cDNA を単離したので報告する。キュウリ MGDG Synthase の ORF をコードする断片をプローブとし、シロイヌナズナ成葉の cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、全長 1647 bp のポジティブクローンを得た。このクローンはキュウリ MGDG Synthase とアミノ酸配列で 61% の相同性を示し、キュウリと同様 N 末端に葉緑体移行シグナルと思われる領域を有していた。推定される成熟タンパク質部分の分子量は 47,200 Da であり、キュウリ MGDG Synthase とはほぼ一致するが、ホウレンソウ精製酵素でのこれまでの報告^{2) 3)} とは全く異なる結果となった。現在、成熟タンパク質領域を用いて、大腸菌での発現を行っており、それについても報告する予定である。

- 1) M. Shimojima, H. Ohta, A. Iwamatsu, T. Masuda, Y. Shioi and K. Takamiya *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press
- 2) É. Maréchal, M. A. Block, J. Joyard and R. Douce (1991) *C. R. Acad. Sci. Paris* 313 : 521-528
- 3) T. Teucher and E. Heinz (1991) *Planta* 184 : 319-326

1pJ16

高発現プロモーターを用いたマイクロソーム ω -3 デサチュラーゼ遺伝子 (*NtFAD3*) のタバコにおける過剰発現
濱田達朗、児玉浩明、射場 厚（九州大・理・生物）

ω -3 デサチュラーゼはリノール酸からリノレン酸への不飽和化を触媒する。すでに我々は、*NtFAD3* cDNA をセンスおよびアンチセンスに発現させることによってタバコのリノレン酸含量を増減させることが可能であることを報告している¹⁾。今回、リノレン酸含量がさらに増加した形質転換タバコを作製するため、CaMV35Sプロモーターよりも強い転写活性を持つ E12 Ω プロモーターの下流に *NtFAD3* cDNA をつないだコンストラクトをタバコに導入した。この形質転換タバコのリノレン酸含量は、野生型と比較して葉で 56% から 68% に増加し、特に根では 15% から 57% へと顕著に増加していた。葉の脂質分子種ごとのリノレン酸含量を測定したところ、葉緑体膜に主に局在する糖脂質における増加はわずかであったのに対し、マイクロソーム画分の脂質の主成分であるリン脂質において顕著な増加がみられた。

- 1) Hamada et al. (1996) *Transgenic Res.* 5: 115-121

1pJ17

アシル-脂質型、アシル-CoA 型 $\Delta 9$ 不飽和化酵素と相同性のあるタンパク質遺伝子のクローニング
水谷正子、田中良和、芦刈俊彦、久住高章、村田紀夫¹（サントリー 基礎研究所、¹基礎生物学研究所）

ステアリン酸の $\Delta 9$ 位に不飽和結合を導入する $\Delta 9$ 不飽和化酵素は、基質の形に応じてアシル-ACP 型、アシル-脂質型、アシル-CoA 型の 3 つに分類される。高等植物においては、アシル-ACP 型の酵素がこの不飽和化反応を行なうとされてきた。しかし我々がバラから得た cDNA RP4 やアラビドプシスから得た cDNA ADS1、ADS2 がコードするタンパク質は、ランソウのアシル-脂質型 $\Delta 9$ 不飽和化酵素や動物や酵母のアシル-CoA 型酵素と相同性があり、高等植物のアシル-ACP 型酵素や他の脂肪酸不飽和化酵素とは相同性はなかった。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、バラの RP4 遺伝子は開花後の花卉で特異的に発現していた。またアラビドプシスの ADS1 ADS2 遺伝子は植物体全体で発現しており、さらに光や温度の影響を受けるようであった。

Fukuchi-Mizutani, M., Savin, K., Cornish, E., Tanaka, Y., Ashikari, T., Kusumi, T., Murata, N., (1995) *Plant Mol. Biol.* 29, 627-635

2aJ01

シロイヌナズナの MAR 結合タンパク質の同定と解析

茂田一郎、飯 哲夫、岩瀬雅樹
（京都大・院・理・生物科学）

染色体 DNA は、MAR と呼ばれる特定の領域を介して、核内骨格様構造である核マトリックスと結合している。その結果形成されるループ状の構造は、遺伝子発現制御におけるある種の機能単位に相当すると考えられている。我々は、高等植物の遺伝子発現制御機構における MAR と核マトリックスとの相互作用の役割を解明することを目的として、MAR に結合するタンパク質の同定とその解析を進めている。シカクマメキモトリブシンインヒビター遺伝子 (WCI-3b) の 5' 上流域に見いだした MAR の一部をプローブとして、酵母の one-hybrid system を用いたスクリーニングを行ったところ、シロイヌナズナより MAR 結合タンパク質をコードする cDNA を 2 種類単離した。これらのタンパク質のうち一方は複数の AT-hook モチーフを持ち、もう一方は AT-hook と zinc finger 様のモチーフをそれぞれ一つずつ持っていた。これらの解析結果について報告する。

2aJ02

シロイヌナズナのゲノム解析プロジェクト
I. 物理地図の作製と塩基配列決定法
佐藤修正, 小谷博一, 中村保一, 浅水恵理香, 金子貴一, 宮嶋伸行, 田畑哲之 (かずさDNA研究所)

我々は、植物型独立栄養生物の遺伝情報の包括的理解を目的として研究を進めており、これまでに酸素発生型の光合成を行うラン藻の全ゲノム塩基配列を決定した。そこでさらに高等植物での解析を行うことを目標として、モデル植物であるシロイヌナズナの全ゲノムの塩基配列決定プロジェクトに着手した。現在、このプロジェクトは国際共同研究として進められており、我々は5番染色体の短腕の一部(約4Mb)と長腕の全長及び3番染色体のゲノム構造解析を担当することになっている。

ゲノム構造解析を行うに際し、我々は、YAC及びP1コンティグの作製と塩基配列の決定とを平行して進めている。YACコンティグは、各染色体上のDNAマーカーを利用してクローンを選抜し、さらに、選抜したクローンの末端配列情報を基にしてウォーキングを行うという方法で作製している。また、P1コンティグの作製では、DNAマーカーからウォーキングを行うことに加えて、コンティグを形成しているYACクローンをプローブとしてP1クローンを選抜し、サブライブラリーを作製することによりコンティグの作製の効率化を計っている。塩基配列の決定は、P1クローンをを用いて行っており、5番染色体の複数の地点から選抜されたP1クローンについて、ショットガン法を用いて解析を進めている。96年12月現在、1Mbを越える配列データを取得している。プロジェクトの進行状況について報告する。

2aJ03

シロイヌナズナのゲノム解析プロジェクト
II. ゲノム情報解析と解析データ公開システムの開発

中村保一, 宮嶋伸行, 佐藤修正, 小谷博一, 金子貴一, 浅水恵理香, 田畑哲之 (かずさDNA研究所)

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のゲノムサイズは100 - 150 Mb と推定されている。現在、シロイヌナズナゲノムの全塩基配列決定を目的としたゲノムプロジェクトが国際的な協力のもとに進められている。我々の研究グループでは、500 kb/month (6 Mb/year) のペースで塩基配列を決定し、得られた配列データは相同性検索及びコンピュータプログラムによるコード領域の予測データとともに即時公開する予定である。この際、これまで遺伝子単位の塩基配列を対象とした情報解析方法では、大量のデータを効率よく処理することは難しい。そこで我々は、ゲノムプロジェクトから生産される膨大な塩基配列から遺伝情報を抽出し、再構成して提供するまでの一貫したシステムの開発を行った。本講演では、JAVA/CGIにより、インタラクティブなデータの検索、表示を可能とした WWW site の構成と、それを実現するためのデータ処理システムについて報告する。

2aJ04

cDNAセレクション法によるシロイヌナズナ第5染色体由来のYACクローン5F11 DNA上の発現遺伝子の同定およびトランスポゾンタギング法による遺伝子の機能解析

関原明、伊藤卓也、林田信明¹、加藤紳子、柴田大輔²、篠崎一雄 (理研・植物分子生物、¹信州大・繊維、²三井業際植物バイオ研)

モデル植物であるシロイヌナズナでは、ゲノムの構造解析や、遺伝子歩行のための環境が整備されつつある。このような背景の下に、特定のゲノム領域に由来するcDNAを体系的かつ効率的に選択する方法の開発の必要性が指摘されている。我々は、これまでにシロイヌナズナ由来のYAC、コスミドクローンのDNAの結合したDNAラテックス粒子を用いてcDNAを選択する事により、染色体の領域特異的なサブライブラリーを作製する方法、および作製したライブラリーからcDNAクローンを単離する方法を開発している。本発表では、シロイヌナズナゲノムの第5染色体上に位置するCTR1遺伝子を含む約530 kbの領域をカバーするYACクローン5F11を用いて実験を行った。これまでにCTR1遺伝子を含む26種類のcDNAを単離した。単離されたcDNAの中には、Zinc finger タンパク質やキニンソウのGENタンパク質とホモロジーをもつものなど、新しい遺伝子が15個存在していた。これら遺伝子の内部にトランスポゾンDsが転移した系統のスクリーニングを現在進めている。さらに、変異体の表現型と遺伝子の構造から遺伝子の機能解析を行う計画である。

2aJ05

アラビドプシス・ゲノムの特定領域に存在する遺伝子群へのトランスポゾン挿入変異体の系統的作出方法の確立へ向けて

伊藤卓也、関原明、林田信明¹、加藤紳子、柴田大輔²、篠崎一雄 (理研・植物分子生物、¹信州大・繊維、²三井業際植物バイオ研)

近年、アラビドプシスのゲノム解析研究は、連鎖地図、物理地図の作製が進展し、全ゲノム塩基配列の決定へと移行しつつある。全塩基配列が決定されると、個々の遺伝子の機能及び、それら相互作用がより重要なテーマとなることが予想される。このような理由から現在、個々の遺伝子の機能解析のための環境整備が求められている。環境整備の一つとして、全遺伝子に対してT-DNA、トランスポゾンなどでタグされた挿入変異体バンクの作出が挙げられる。

我々は、アラビドプシス・ゲノムの特定領域に存在する遺伝子の網羅的単離法¹⁾と、トランスポゾン(Ds)転移による挿入変異体の作出法²⁾を組み合わせ、それら遺伝子へDsが挿入されたラインの系統的作出方法の確立及び、変異遺伝子の機能解析を目指している。今回、第5染色体にdonor Ds-T-DNAが挿入された親植物体³⁾の、挿入部位付近をカバーするYAC DNA クローン(CIC 3A3, 8B11)に対してcDNAセレクション法⁴⁾を用い、各領域に特異的なcDNAサブ・ライブラリーの作製、cDNAの単離、部分塩基配列の決定をしたので報告する。その結果現在までに、CIC3A3領域に19遺伝子を単離した。その中にはFK506 binding protein, flavonol synthase, calnexin, CCAAT binding transcription factor, RNA helicase のホモログが含まれていた。CIC 8B11については6遺伝子を単離し、そのうちの1つはserine carboxypeptidaseのホモログであった。現在、CIC 3A3, 8B11領域にDsが転移した植物系統を作出中であり、今回同定された遺伝子へのDs挿入変異体のスクリーニングを計画している。1) Hayashida et al., Gene (1995) 165, 155-161. 2) Smith et al., Plant J. (1996) 10, 721-732.

2aJ06

シロイヌナズナサイクロフィリンの機能解析

齊藤 武¹、芦田裕之¹、田中克典²、川向 誠²、松田英幸²、中川 強¹ (島根大¹・遺伝子、²生物資源科学)

サイクロフィリンはポリペプチド中のプロリンイミド結合の異性を触媒するプロリルイソメラーゼとして、哺乳類では細胞内の各コンパートメントでタンパク質の高次構造形成、あるいはホルモンレセプターや転写因子などの構造変換を介した活性調節に関わることが示唆されている。

我々は植物におけるサイクロフィリンの分子種の構成や機能を明らかにすることを目的とし、これまでにシロイヌナズナから3種の細胞質型サイクロフィリン遺伝子 (*ATCYP1*、*ATCYP2*、*ATCYP4*) を、さらに今回新たに *ATCYP5* をクローン化し、その構造を決定した。*ATCYP5* の N 末端に存在する疎水性アミノ酸に富む延長ペプチド領域と GFP の融合蛋白質をタバコ BY2 で発現させたところ、核の周辺で蛍光が観察されたことから *ATCYP5* は小胞体あるいはゴルジ体へ移行する分子種であると考えられた。現在最終的な局在部位と、遺伝子の発現様式について解析している。

2aJ07

シロイヌナズナにおけるプロリルイソメラーゼ遺伝子の発現調節

多田隈圭、齊藤 武、芦田裕之、田中克典¹、川向誠¹、松田英幸¹、中川 強 (島根大¹・遺伝子、²島根大¹・生物資源科学)

プロリルイソメラーゼはプロリンイミド結合のシーストランス異性を促進する酵素で、哺乳類、菌類、植物など多数の生物種に存在している。プロリルイソメラーゼには大別して3種類のものが知られているが、その中のサイクロフィリンのものについてはシロイヌナズナで7種類がクローン化されている。これらのうち5種は細胞質に、1種は葉緑体に、他の1種は小胞体に局在する分子種である。今回はシロイヌナズナの5種の細胞質型プロリルイソメラーゼのうち *ATCYP1*、*ATCYP2* および *ATCYP4* の3種について発現様式およびその制御に関わるシス配列の解析を行った。

上記3種の開始コドン上流域を GUS 遺伝子に連結し、シロイヌナズナで発現させたところ、それぞれ特異的な発現パターンが観察された。*ATCYP1* では維管束系で、*ATCYP2* では若い葉、頂端組織および根端組織、*ATCYP4* では若い葉と根で非常に強い発現が観察された。さらにこれらのクローンについて上流域からの deletion を行い、解析を進めている。

2aJ08

アラビドプシスのヒスチジン生成系の第2及び第3段階を触媒する複機能酵素遺伝子の単離と構造解析

藤森 功、太田大策 (日本チバガイギー 国際科学研究所)

我々は、これまでに高等植物のヒスチジン (His) 生成系に関与する酵素遺伝子を単離してきた。ここでは、その中で未だ同定されていなかったステップを触媒する酵素遺伝子のクローニングについて報告する。生成系の第3段階を触媒する phosphoribosyl (PR)-AMP cyclohydrolase (*hisI*) 活性が欠損した大腸菌変異株をアラビドプシスの cDNA ライブラリーで形質転換することにより、この欠損変異を相補する cDNA を得た。得られた cDNA は 281 アミノ酸からなる ORF をもち、一次構造の N 末端領域は微生物の *hisI* に、C 末端領域は His 生成系の第2段階を触媒する *hisE* (PR-ATP pyrophosphorylase) にそれぞれ相同性を示した。すなわち、この cDNA がコードするポリペプチドは、His 生成系において連続する2段階の酵素反応を触媒する独立したドメインからなっており、その N 末端には葉緑体移行シグナル様配列が見られた。遺伝子構造解析により、これら2つのドメインと葉緑体移行シグナル様配列のそれぞれの機能をコードする DNA 断片は、2つのイントロンによって分断されていることが分かった。本遺伝子は成長過程全般で発現しており、特に、根において強い発現が見られた。

2aJ09

植物ズブチリシンの遺伝子クローニングと構造解析
上杉直紀、坂和憲、山形裕士

(神戸大・農・生物機能化学)

セリンプロテアーゼは、動物や微生物で重要な機能を有するが、植物起源の酵素についての報告は少ない。我々はこれまでに、メロンの果実中に大量に蓄積するズブチリシン様セリンプロテアーゼであるククミシンについて、酵素学的、生理学的研究を行うとともに一次構造を報告した⁽¹⁾。さらにデータベース検索により、ククミシンと構造上の類似性を有する植物遺伝子がいくつか見い出され、ズブチリシン様セリンプロテアーゼ (植物ズブチリシン) が植物界に広く分布していることが明らかになった。そこで植物ズブチリシンの構造と機能に関する知見を得るため、今回シロイヌナズナゲノムライブラリーからデータベース中の部分配列をプローブとして、セリンプロテアーゼ遺伝子のクローニングを行い、2個のクローン (ASP45,48) を単離した。ゲノミックサザン解析の結果からも、シロイヌナズナには2つ以上のズブチリシン様セリンプロテアーゼ遺伝子の存在が示唆された。ASP48の塩基配列から推定されたアミノ酸配列はククミシンと40%の相同性を示し、ククミシンとは異なりイントロンは存在しなかった。さらに発現部位や発現時期についても報告する。一方、ズブチリシン様セリンプロテアーゼの完全長を含むイネの EST クローン (農水省) についても塩基配列を決定した。これらの結果を総合して、植物ズブチリシンの構造と機能を比較する。
(1) H. Yamagata et al. J. Biol. Chem., 269, 33725-33731 (1994)

2aJ10

遊離メチオニンを過剰に蓄積する

シロイヌナズナ突然変異株 (*mtol-1*) の解析

I. メチオニン生合成関連遺伝子発現の解析

千葉由佳子, 木嶋文子, 山本紋子, 南原英司,
内藤 哲 (北大・農・応用生命)

植物にとってメチオニンはタンパク質の構成単位、メチル基供与体となるのみならず、エチレンの前駆体としても重要なアミノ酸である。本研究は野生型株の40倍の遊離メチオニンを蓄積する *mtol-1* 変異株を利用してメチオニン生合成の制御機構を明らかにすることを目的としている。メチオニンの生合成に関わる4つの酵素に注目し、そのmRNAの蓄積を *mtol-1* 変異株と野生型株と比較した。

その結果、*mtol-1* 変異株では cystathionine γ -synthase (CS) 遺伝子のmRNAレベルが野生型株の2~4倍になっていることが明らかになった。また、野生型株では外施のメチオニンによってCS-mRNAの蓄積が抑えられるのに対し、*mtol-1* 変異株では高いレベルを維持したままであった。以上の結果から、野生型株にはメチオニンがシグナルとなって、CS遺伝子のmRNAレベルを抑える制御機構が存在し、*mtol-1* 変異株ではその機構が働かなくなっているために遊離メチオニンが過剰蓄積すると考えられる。さらに、*mtol-1* 変異とCS遺伝子は、ともに第3染色体の上端にマップされることが分かり、両者が同一座である可能性も考えられる。

2aJ11

遊離メチオニンを過剰蓄積するシロイヌナズナ突然変異株 (*mtol-1*) の解析

II. メチオニン蓄積パターンの解析

太田垣聡, 南原英司, 内藤 哲
(北大・農・応用生命)

シロイヌナズナの *mtol-1* 突然変異株は栄養生長期にロゼット葉で野生型株の約40倍の遊離メチオニンを蓄積するが、生殖生長期にはロゼット葉の遊離メチオニン濃度は野生型株と同レベルにまで低下し、代って茎頂部・果実に遊離メチオニンを過剰に蓄積する。*mtol-1* 突然変異株のロゼット葉を葉位別に遊離メチオニンを定量した結果、開花前の新しいロゼット葉のみ高濃度の遊離メチオニンが蓄積し、開花後では新しいロゼット葉においても高濃度の遊離メチオニンは見られなかった。このことから、*mtol-1* 突然変異株での遊離メチオニン濃度は栄養生長期から生殖生長期への変換に伴う変化以外に、栄養生長期内でも分化的な制御を受けており、この制御は生殖生長期への変換に伴って消去されると考えられる。また、花芽形成遅延突然変異株 (*gi-2, co*) と *mtol-1* 突然変異株の二重突然変異株および短日条件での解析結果も併せて報告する。

2aJ12

waxy遺伝子のスプライシングに関するシストランズの因子

一色正之, 森野和子, 中島みどり¹, 井沢毅, 佐藤光², 島本功 (NAIST・バイオサイエンス、¹植工研、²九大・農)

イネ waxy 遺伝子はデンプン合成酵素をコードしており、二つの対立遺伝子 *Wxa* と *Wxb* が知られている。*Wxa* はインディカ、*Wxb* はジャポニカに分布しており、mRNA、タンパク質レベルで *Wxa* は *Wxb* の10倍高い。この二つの対立遺伝子の発現の差の原因は5'非翻訳領域中にある第1イントロンの5'スプライス部位が *Wxb* ではTTに変化しているためと考えられた。そこで、塩基置換をこの5'スプライス部位に導入した改変遺伝子の発現解析より、発現の違いは第1イントロンの1塩基の変異によると結論した。

du-1, du-2 はアミロース量の低下を引き起こす突然変異体として知られている。この突然変異体中のmRNAを解析したところ、この突然変異体はいずれも *Wxb* の第1イントロンのスプライシング効率が著しく低下していた。また、*du-2* の影響は胚乳のみで見られ、花粉では見られないことから、組織特異的な因子と考えられる。さらに、これら二つの突然変異は5'スプライス部位のTT変異を持った *Wxb* mRNAにだけ影響を与え、変異を持たない *Wxa* mRNAには影響を与えないことがわかった。

2aJ13

高次の遺伝子構造を介した *Gln1;1* promoter の活性制御機構の解析

渡辺明夫^{1,2}, 渡邊昭¹ (¹東大・院・理・生物科学、²名大・農・生化学制御)

ハツカダイコンの *Gln1;1* 遺伝子は細胞質局在型グルタミン合成酵素をコードしており、緑葉の老化過程などで維管束特異的に発現していると考えられている。我々はこのような発現機構を明らかにするため、*Gln1;1* の5'上流領域とGUS遺伝子のtranscriptional fusionを作製してアラビドプシスに導入し、GUSの活性を測定した。しかし、この融合遺伝子では、*Gln1;1* promoter はほとんど機能できないことが示された。一方、*Gln1;1* の3'非翻訳領域には核マトリクス結合領域に特徴的な配列が存在する。そこで、この配列を上流の融合遺伝子下流に結合してアラビドプシスに導入したところ、維管束特異的なGUSの活性が認められた。また、*Gln1;1* の5'側領域とGUS遺伝子のtranslational fusion (第1、第2イントロンを含む) を導入した場合には、維管束以外の部位で強いGUS活性が認められた。以上の結果から、*Gln1;1* promoter の活性は、イントロンや3'下流の配列から形成される遺伝子の高次構造に強く影響を受けていることが示唆された。

3aJ01

トマトのフルクトキナーゼ cDNA のクローニングと mRNA の糖による誘導及び果実内局在

金山喜則, Alan B. Bennett¹ (東北大・農・園芸, ¹カリフォルニア大・デービス校)

シンクでのスクロース代謝においてフルクトキナーゼは、スクロース合成酵素・インベルターゼから供給されるフルクトースの代謝に必須であるとともに、スクロース合成酵素のフルクトースによる活性阻害を回避する役割を担っている。トマトからクローニングされたフルクトキナーゼ Frk 1 と Frk 2 は ATP 結合ドメインと基質認識ドメインを持ち、ポテトフルクトキナーゼとのアミノ酸レベルでの相溶性はそれぞれ 55%、93%であった。果実成長中の Frk 1 mRNA レベルの変動は小さかったが、Frk 2 はデンプン合成の盛んな果実成長初期に高いレベルを示した。In situ ハイブリダイゼーションの結果、Frk 1 mRNA は局在性を示さなかったが、Frk 2 は胚乳及び種子周辺部と、デンプン粒の多い組織で高い発現が見られた。Frk 1、Frk 2 mRNA は糖の添加により増加したが、タイムコースや糖濃度に対する反応性に大きな違いは見られなかった。以上のことより、両遺伝子は組織の糖レベルに反応して発現するが、Frk 2 はさらにデンプン合成と種子成長に深く関わっていることが示唆された。

3aJ02

シロイヌナズナのフルクトース-6-フォスフェート 2-キナーゼ / フルクトース-2,6-ビスフォスファターゼ (F6P, 2-kinase / F2,6BPase) をコードする cDNA の単離

寺本真紀, 稲田のりこ, 伊藤正樹, 渡邊昭 (東京大・院・理系・生物科学)

フルクトース2,6-ビスフォスフェートは、糖代謝に重要な調節物質だということがほ乳類と菌類で知られている。この物質は解糖系と糖新生系のそれぞれに関わる酵素を活性化、阻害化することで作用する。植物においては、しよ糖の合成過程で糖の振り分けに重要な役割を果たしていることが知られている。この物質は F6P, 2-kinase により合成され、F2,6BPase により分解される。高等動物には、この二つの活性を持つ二機能性酵素 F6P, 2-kinase / F2,6BPase が存在する。

我々は、ディファレンシャルディスプレイ RT-PCR 法を用いて、暗所においてシロイヌナズナのロゼット葉で発現する幾つかの cDNA 断片を単離した。その中に、動物の F6P, 2-kinase / F2,6BPase の一部分とホモロジーを持つものを見出した。その転写産物レベルは 24 時間の暗処理によって約 2 倍に上昇した。そこで、シロイヌナズナロゼット葉の cDNA ライブラリーを用いて、この遺伝子の全長を含む cDNA を単離し、全塩基配列を決定した。その結果、動物の酵素で知られている F6P, 2-kinase と F2,6BPase の活性領域が植物のものでもよく保存されていることが示された。

高等植物においては、この二機能性酵素が存在する証拠はあったが、その一次構造に関する情報は得られていない。我々は、この蛋白質の構造解析の結果と暗黒条件下での緑葉の細胞におけるこの蛋白質の生理学的役割について述べる。

3aJ03

シロイヌナズナ葉緑体光合成遺伝子の組織特異的発現に関する σ 因子遺伝子の解析

磯野協一¹, 清水正則², 横田明穂^{1,3}, 小林裕和² (1)RITE・植物分子生理, (2)静大・生活健康科学, (3)奈良先端大バイオサイエンス)

高等植物における葉緑体光合成遺伝子は、 α , β , β' , および σ サブユニットからなる大腸菌型 RNA ポリメラーゼによって転写されると考えられる。それらサブユニットのうち、 α , β , および β' に相溶性の高いタンパク質をコードする遺伝子は、タバコおよびイネの葉緑体ゲノムに確認されている。多細胞植物の σ 因子については、それらのタンパク質が確認されているもの、遺伝子については未だ同定されていない。

我々は、シロイヌナズナの非光合成組織における葉緑体光合成遺伝子の発現が、主として転写段階で制御されていることを明らかにしている。この制御機構を解明するには、葉緑体 RNA ポリメラーゼ σ 因子の遺伝子クローニングが必須であると考え、したがって、シロイヌナズナ σ 因子遺伝子のクローニングを試みた。細菌間で保存されている σ 因子のアミノ酸配列を、シロイヌナズナ EST (expressed sequence tags) データベースに対してホモロジー検索したところ複数の EST が見つかった。これら cDNA 塩基配列の情報をもとにシロイヌナズナ葉組織 cDNA ライブラリー (4x10⁵) からのスクリーニングを行った。その結果、大腸菌 RNA ポリメラーゼ σ 因子に高い相溶性を示すタンパク質をコードする cDNA を得ることができた。さらに、ゲノミック DNA をクローニングし、また本遺伝子は第 1 染色体にコードされていることを明らかにした。葉および根組織におけるこの遺伝子の mRNA 量をノーザン解析により調べたところ、根組織ではそれは検出限界以下であった。したがって、非光合成組織における葉緑体光合成遺伝子の発現は、この σ 因子の発現量に依存している可能性が示唆される。

3aJ04

タバコ *psaDb* リーダーは小麦胚芽抽出液中でも翻訳エンハンサーとして作用する

大瀧みちる, 小保方潤一 (北大・地球環境科学)

psaDb はタバコの光化学系 I 核遺伝子である。この遺伝子の 5' リーダー配列は mRNA の翻訳開始頻度を上昇させる翻訳エンハンサーとして機能することが形質転換タバコの系で見い出された [Yamamoto et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 12466]。真核生物の mRNA においてこれまで翻訳エンハンサーが見つかった例は殆どなく、そのメカニズムの解明も進んでいない。そこで本研究では *psaDb* リーダー配列がどのような分子機構で翻訳を促進しているのかについて、*in vitro* 翻訳系を用いて解析を行った。レポーター遺伝子の 5' 上流にこのリーダー配列を挿入したキメラ遺伝子を作成して *in vitro* で転写、翻訳を行った後、レポーター蛋白質の合成量を測定した。その結果、*psaDb* のリーダー配列は *in vitro* 翻訳系においても mRNA の翻訳効率を上昇させることが明らかになった。次に、このリーダーの作用に対する 5' cap と 3' poly(A) の影響を調べたところ、翻訳エンハンサー効果はこれらの有無とは無関係に生じることが分かった。現在はこの翻訳エンハンサーに特異的に作用する因子があるかどうかについて検討を進めている。

3aJ05

ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 の *psb D/C* 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写調節因子の同定

森田勇人、林秀則 (愛媛大・理・物質理学)

光合成は植物独自の光エネルギー変換システムであり、その機能の“維持”には核と葉緑体の遺伝子の発現調節が重要であるが、その詳細な機構については不明な点が多い。本研究では、ラン藻における光合成関連遺伝子の発現制御機構を解析し、その知見と葉緑体における対応する制御機構に関する知見とを比較することによって、光合成関連遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的とする。

ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 の培養液 20 l より回収した菌体を 1M NaCl を含む Tris 緩衝液に懸濁し、超音波破砕後、高速遠心、硫酸分画の処理を行うことで、可溶性画分を抽出した。この画分からヘパリンカラムを用いたアフィニティークラムクロマトグラフィーにより DNA 結合タンパク質を含む画分を回収した。この画分から PCR により増幅した *psbD/C* 遺伝子のプロモーター領域を含む約 1kbp の DNA 断片と結合するタンパク質をゲルろ過法によって分離し、*psb D/C* 遺伝子のプロモーター領域と選択的に結合するタンパク質を単離した。現在、これらのタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、そのアミノ酸配列の解析を進めている。

3aJ06

Synechococcus PCC7942のグルタチオン合成酵素遺伝子破壊株の表現型

奥村典子、正元和盛、和田元¹ (熊本大・教育・生物、¹九州大・理・生物)

グルタチオン合成酵素は、 γ -グルタミルシステインとグリシンからグルタチオンを合成する反応を触媒する酵素である。我々はこれまでの研究において、*Syn.* PCC7942よりこのグルタチオン合成酵素をコードした遺伝子(*gshII*)をクローニングし、その構造解析を行ってきた。本研究では*Syn.* PCC7942でのグルタチオンの機能を明らかにするために、*Syn.* PCC7942のグルタチオン合成酵素遺伝子破壊株を作製し、その破壊株の性質を調べた。

野生株と破壊株の細胞内グルタチオン含量を測定した結果、野生株においてはグルタチオンが検出されたが、破壊株においては検出されなかった。しかし、両株の光独立栄養条件下での増殖を調べたところ、破壊株は細胞内にグルタチオンが検出されないにもかかわらず野生株と同様に増殖した。このことは、この培養条件下ではグルタチオンが細胞の生育に必要な不可欠ではないことを示している。また、野生株と破壊株に含まれる色素を分析した結果、細胞当たりのクロロフィル a と β カロテンの含有量が破壊株においては野生株と比べて減少していた。

3aJ07

イネ dehydroascorbate reductase 遺伝子のクローニングと解析

浦野純一、丑丸敬史 (静岡大・理・生物)

アスコルビン酸(As)は植物細胞における活性酸素除去に必要な電子供与体として働く。dehydroascorbate reductase (DHAR)はAsのレベルを維持するために重要である。一方、種々の酵素[thioltransferase (glutaredoxin), protein disulfide isomerase, 還元型Kunitz-type trypsin inhibitor]がDHAR活性を示すことが報告されているが、現在のところ植物よりDHAR遺伝子はクローニングされていないため、植物DHARがこれらの酵素と構造的に似ているものなのかどうかは不明である。我々は植物DHAR遺伝子の一次構造を決定するための第一歩として、イネDHARを精製した(Ushimaru et al. 1997, in press)。今回はimmunoscreeningの結果、イネ芽生えcDNAライブラリーより単離されてきたクローンの解析結果を報告する。

Email: ushimaru@sci.shizuoka.ac.jp

3aJ08

フタバネゼニゴケのCuZn-スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の構造と銅による発現調節

田中克幸、滝尾 進、山本 勇、佐藤敏生 (広島大・理・生物科学)

高等植物のCuZn-スーパーオキシドジスムターゼ(CuZn-SOD)の葉緑体局在型は細胞質局在型より種間での保存性が高いことから、原始的な構造を維持していると考えられている。私達は、フタバネゼニゴケ培養細胞のCuZn-SODは細胞質に局在するが、そのN末端アミノ酸配列は葉緑体局在型に類似していること、また、同酵素は、培地中の銅欠乏により細胞内ですばやく失活・分解されることを報告している。本研究では、同植物のCuZn-SOD遺伝子を単離し、その構造と銅による発現制御について調べ、以下の結果を得た。①得られたクローンには486bpのORFが存在し、そのORFは161アミノ酸残基をコードしていた。②そのアミノ酸配列は補欠金属との結合部位などのCuZn-SODにとって機能上重要な残基をすべて保存していた。③そのアミノ酸配列は、細胞質局在型との相同性に関して低い値を示したが、高等植物の葉緑体局在型とは高い値を示した。これらのことから、フタバネゼニゴケCuZn-SODは、その全アミノ酸配列においても葉緑体局在型と同様な、分子進化上原始的な構造をもつことが確認された。④細胞内でのCuZn-SOD遺伝子転写レベルは培地中の銅濃度に依存して増大した。

3aJ09

非光合成細胞・組織に発現するフェレドキシンNADP⁺レダクターゼ(FNR)遺伝子:イネ胚とタバコ培養細胞のFNR cDNAクローニング
井田正二、青木秀之、熊田アンリオバディア、土山直美、増村威宏¹、田中國介¹(京大・食研、¹京府大・農・農化)

FNRは酸素発生型光合成電子伝達系の最終段階においてNADPHを生成するフラビン酵素として知られている。しかし最近数種の植物根にもFNRが存在することが明らかになった。我々はイネ葉と根のFNRは器官特異的に発現する異種遺伝子産物であることを明らかにしている^{1, 2)}。演者は、1970年にイネ胚からFNR様酵素を単離精製し、その特性を報告した。今回は、開花14日目のイネ登熟種子胚のcDNAライブラリーからFNR cDNAを単離した³⁾。イネ胚FNRの葉と根FNRとの相同性は49%と90%である。

我々はまたイネ根FNR mRNAはNO₃⁻によって誘導されることを報告した²⁾。従属栄養細胞・組織のFNR遺伝子の発現機構を詳細に検討する目的で、先ずタバコ培養細胞(BY-2)のFNR cDNAをクローニングした。単離したクローンはアミノ酸375残基をコードする1.4 kbの完全長FNR cDNAであった。BY-2 FNRのイネ葉、根、胚FNRに対する相同性は、それぞれ50%、88%、88%である。このことから従属栄養細胞・組織に発現するFNRには高い相同性があることが判明した。BY-2 FNR遺伝子発現の誘導因子については検討中である。

1) Plant Physiol. 104, 1473-1474 (1994) 2) BBA 1183, 553-556 (1994)

3) Plant Physiol. (PCR96-115) 112, 1399 (1996)

3aJ10

トウモロコシ根で硝酸によって誘導されるフェレドキシン遺伝子のクローニング
松村智裕、榊原均¹、杉山達夫¹、長谷俊治 (阪大・蛋白質研、¹名大・農・応生科)

高等植物のフェレドキシン(Fd)には、光合成型と非光合成型の2つのアイソフォームが存在する。根などの非光合成器官に存在するFdは、亜硝酸還元酵素(NiR)やグルタミン酸合成酵素(GOGAT)などのFd依存性酵素へ電子を伝達する。我々は、トウモロコシ根において硝酸によって誘導されるFdを見出し、その遺伝子を単離したのでここに報告する。

先の研究で、我々は、培地に硝酸を加えていないトウモロコシの根には、5種のFdイソタンパク質の中でFd IIIのみが発現していることを明らかにしている。硝酸誘導したトウモロコシ根からタンパク質を抽出し未変性PAGEによって解析すると、Fd IIIとは移動度が異なるがFd IIIに対する抗体と反応する新規のFdイソタンパク質、Fd VIがFd IIIと同程度存在することが確認された。このFd VIのcDNAを単離し、Fd IIIとともにノーザン解析を行ったところ、Fd VIは、硝酸誘導によってmRNAの蓄積量が増加したが、Fd IIIのmRNA蓄積量は一定であった。さらにこれらFdの核遺伝子を単離し、5'上流域の塩基配列を決定したところ、Fd VIにのみ硝酸還元酵素(NR)やNiRの遺伝子の5'上流域に見出される配列と相同性の高い配列が存在した。

トウモロコシの根には硝酸誘導型Fd VIと構成的に発現するFd IIIの2分子種が存在し、Fd VIは根の硝酸同化反応に電子を供給するための特別な役割を担っているのかもしれない。

3aJ11

形質転換トウモロコシを用いたPEPC及びPPDK遺伝子の発現解析

伊澤桂、谷口光隆、Maurice S. B. Ku¹、Jenq-Horng Lin²、斉藤秀章³、石田祐二³、太田象三³、小鞠敏彦³、松岡信⁴、杉山達夫 (名古屋大・農、¹Washington St. Univ., ²Nat. Chung-Hsing Univ., ³日本たばこ・遺伝育種研、⁴名古屋大・生物分子応答研)

C4光合成酵素の発現は光により誘導され、組織及び細胞特異的な調節を受けている。このC4特異的な遺伝子発現調節機構を解析するための足掛かりとして、トウモロコシC4型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)遺伝子の5'上流666bpまたはピルビン酸リン酸ジキナーゼ(PPDK)遺伝子の5'上流930bpの後にGUS遺伝子をつないだ融合遺伝子を用いてアグロバクテリアを用いてトウモロコシに形質転換した。GUS活性の組織間分布を調べたところ、葉身における活性は茎や根に比べて顕著に高かった。さらに葉身切片のGUS活性染色の結果、GUSの発現は葉肉細胞でのみ起こっていることが明らかとなった。以上の結果は、PEPC及びPPDK遺伝子のうち、導入した5'上流領域中にC4特異的な遺伝子発現調節に関するシス配列が存在することを示している。

3aJ12

トウモロコシC4型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の細胞特異的な転写調節因子の探索
谷口光隆、杉山達夫 (名古屋大・農・応用生物科学)

トウモロコシC4型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(C4Ppc1)の5'上流670bp中に、葉肉細胞特異的な転写調節に関わるシス配列が存在することが明らかとなった(本大会、伊澤ら)。したがって、C4Ppc1の細胞特異的な発現はトランス因子の細胞間分布の差が一因である可能性が考えられる。そこで本研究では、C4Ppc1の5'上流領域に結合する核タンパク質の分布に葉肉細胞と維管束鞘細胞で違いが見られるかどうかを調べた。

トウモロコシの黄化葉、緑化葉及び緑葉より葉肉細胞プロトプラストと維管束鞘細胞群を単離後、各細胞から核タンパク質を調製し、C4Ppc1の5'上流をプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。その結果、葉肉細胞または維管束鞘細胞に特異的なシフトバンドが複数個検出された。これらのシフトバンドは緑化に伴うC4Ppc1の転写誘導に協調した様式でシグナル強度が変動するとともに、C4Ppc1の発現しない根の核タンパク質を用いては検出されなかった。これらのシフトバンドの形成に関与する核タンパク質が、C4Ppc1の細胞特異的な転写調節に関わるトランス因子の候補となりうるかどうかを考察する。

3aJ13

トウモロコシ幼葉鞘のアルデヒド酸化酵素遺伝子の解析
関本弘之、瀬尾光範¹、瀧尾擴士²、神谷勇治、
小柴共一¹（理研・FRP、¹都立大・理・生物、²理研・
生体分子）

トウモロコシ幼葉鞘より、アルデヒド酸化酵素 (AO) を精製し、そのアミノ酸配列を決定し、AO をコードすると思われる二種の cDNA を単離した。得られた cDNA の一方 (zmAO1) は 1358 個の推定アミノ酸配列を含み、予想される分子量は約 147k であり、牛から単離された AO とアミノ酸レベルで 30.8% の相同性を示した。もう一方の cDNA (zmAO2) は、zmAO1 及び牛の AO とアミノ酸レベルでそれぞれ 83.7%、31.0% の相同性を示した。これらの cDNA は、様々な生物種のキサンチン脱水素酵素 (XDH) とも 30% 程度の相同性を示しているが、XDH で想定される基質結合部位とは保存性を示さなかった。ノーザン解析の結果、zmAO1 は根で、zmAO2 は子葉鞘でその遺伝子発現が強く見られた。植物では、IAA 及び ABA の生合成への AO の関与が示唆されていることから、AO 遺伝子群のいずれかが、これらの機能を担うと考えられる。実際、2 つのアミノ酸配列で前述の基質結合部位に違いが見られており、現在これらがコードする蛋白質の機能の確認を試みている。さらに、トウモロコシの情報をもとにアラビドプシスからも AO の cDNA クローニングを進めているが、これも含めその一つ一つについて生体内での役割を明らかにするために、特に IAA や ABA 合成に関する変異株を利用した研究を進めている。

3aJ14

タバコ亜硫酸還元酵素 cDNA のクローニングとその発現様式
米倉圭子、田中良和、芦刈俊彦、久住高章、長谷俊治¹（サントリー基礎研、¹大阪大・蛋白研）

植物において硫黄はアミノ酸や補酵素の合成に必須な元素であるが、その同化的代謝経路については不明な点が多い。

われわれは、同化型硫酸還元系酵素の一つである亜硫酸還元酵素 (SiR) に着目し、その生理的機能の解明を目的としてタバコ SiR cDNA の単離を試みた。タバコの葉由来 cDNA ライブラリーをトウモロコシ SiR cDNA をプローブとしてスクリーニングしたところ複数の陽性クローンを得た。塩基配列を決定したところ、その推定アミノ酸配列はトウモロコシ、アラビドプシスおよびランソウ由来の SiR と有意な相同性を示した。また、タバコ葉より精製した SiR の N 末端アミノ酸配列と一致する領域が存在した。

ノーザン解析より、SiR 遺伝子発現のタバコにおける器官特異性を調べたところ、葉、茎、根のどの器官においても同程度の mRNA の蓄積が見られ、SiR は構成的に発現していると考えられた。また、硫黄欠乏条件下において SiR mRNA の量は上昇し、他の硫酸還元系酵素と同様、硫黄欠乏により SiR の発現は誘導されることが確認された。

發表者名簿

— A —

Ait-Ali, Tahar 1pH02
 " 1pH06
 Alia, 2aG06
 " 2aH01
 " 2aH02
 Alpi, Amedeo 1aJ01
 Anwaruzzaman 1pB07

— B —

Babiychuk, Elena 2aB06
 Badger, Murray SVI-04
 " 1aB08
 Banik, M. SII-02
 Bauer, Carl E. 1aA04
 " 1aA03
 " 1pA13
 Baum, Gideon 2aH11
 Benfey, Philip N. 1aE04
 Bennett, Alan B. 3aJ01
 Berberich, Thomas 2aD03
 Bryant, Donald A. 2aB10
 Buchanan, Bob B. SVI-05

— C —

Caboche, Michel 2aC03
 Camp, W.V. SVI-03
 Chamnongpol, S. SVI-03
 Chamowitz, Daniel SVIII-02
 Chen, Tony H.H. 2aH01
 " 2aH02
 Chien, Ching-Te 3aG06
 Chory, Joanne SV-07

— D —

Danao, Jay 1aJ03
 Davies, Eric 1aC02
 Deng, Xing-Wang 1pF10
 " SVIII-02
 Dreyfuss, Beth 2pC10
 Dzuba, Sergei A. 2aA05
 " 2aA13

— F —

Fincher, G.B. SII-02
 Fischer, Robert L. 1aJ03
 Foyer, Christine H. 1pB09
 Frances, Shannon 1pH02
 Fromm, Hillel 2aH11

— G —

Gantt, Stephen J. 1pC14
 Goldberg, Robert B. 1aJ03
 Goodman, Howard M. 1pF09
 Grossman, Arthur 2aD01
 Gruissem, Wilhelm SV-05
 Guglielminetti, Lorenzo 1aJ01

— H —

Handley, Linda 3aG13
 Harada, John J. 1aJ03
 Harvey, A.J. SII-02
 Høj, P.B. SII-02
 Hrmova, M. SII-02
 Huber, Steven C. SI-05

— I —

Inzé, Dirk SVI-03
 " 2aB01
 " 2aB06
 Iswantini, Dyah 3aI02

— K —

Kendrick, Richard E. 1pH02
 Kim, Eugene J. 3aI09
 Koncz, Csaba 1aH06
 Ku, Maurice S.B. 1pB01
 " 3aJ11

— L —

Lara, Catalina 1pG07
 Larondelle, Yvan 1pC05

— M —

Limantara, Leenawaty 2aA01
 Lin, Jenq-Horng 3aJ11
 Lindquist, Susan 2pF10
 Loreti, Elena 1aJ01
 Los, Dmitry A. 3aF01
 " 3aF02
 Lotan, Tami 1aJ03

— M —

Madigan, Michael T. 1pA01
 Malakhov, Michael 3aF01
 " 3aF02
 Malik, Kamal A. 2aE05
 " 2aE06
 Maxwell, K. SVI-04
 Melgarejo, Luz Marina 3aH10
 Merchant, Sabeeha 2pC10
 Montagu, M.V. SVI-03
 Myers, Patricia N. 2aG03

— N —

Nevins, Donald J. 1pI15

— O —

Olsen, Odd-Arne 1pJ08
 Osmond, B. SVI-04
 Osyczka, Artur 1aA07
 " 1aA08

— P —

Parvez, Mohammad Masud 1aF02
 Perata, Pierdomenico 1aJ01
 " 1aJ07
 Pimenta, Maria João 1pC05
 Price, Dean 1aB08
 Pulici, Maurizio 1pH08

— R —

Ramazanov, Ziyadin 1aB07

Ray, Malay K. 3aF01
 Reid, R.J. 3aI06
 Ro, Russel 1aJ03
 Robertson, Masumi 1pH08
 Rodoriguez, Rocío 1pG07
 Roy, Sanjit K. 3aF05
 Rubio, Francisco 3aI09

— S —

Saniewski, Marian 1pH09
 Schopfer, Peter 1pI14
 Schroeder, Julian I. 3aI09
 Sharan, Manisha 2aH05
 Sheen, Jen 2aF04
 Shen, Li-Kuo 3aG06
 Shi, Lifang 1pC14
 Slooten, L. SVI-03
 Smith, F.A. 3aI06
 Smith, Maria W. 1pH06
 Sodeinde, Ola 2pC10
 Stinemetz, Charles 3aE04
 Strotmann, Heinrich 3aA13
 Sun, Tai-ping 1pH05
 Surpin, Marci SV-07
 Sutherland, Betsy M. 1pF17

— T —

Takaichi, Shinichi 2aH01
 Thompson, Guy A., Jr. 1aC08
 " 1aC09
 Tobin, Alyson 2aC09
 Trepp, Gian 1pC14

— V —

Vance, Carroll P. 1pC14

— W —

Wang, Xiaojing 1aF03
 Wang, Y. 1pF04
 Wellmann, Eckard 1pF15
 West, Maliryn A.L. 1aJ03
 Willekens, H. SVI-03

Wisniewska, Iwona 2pF11
 Wysocka-Diller, Joanna
 1aE04

— Y —

Yee, Kelly M. 1aJ03
 Yeo, Denis 2aH08

— Z —

Zachleder, Vilem 3aC11
 Zbigniew, Rybka 1pE15
 " 1pE16
 Zimmerman, J.L. 1aJ03

— あ —

相澤 幸子 3aA02
 相田 光宏 1pE02
 " SIII-03
 愛知真木子 1pG04
 青木 考 2pC02
 青木誠志郎 1aE06
 青木 秀之 3aJ09
 青木 三絵 1aG05
 青柳 雅昭 1aD08
 青山 卓史 1pI09
 " 2aD07
 " SVIII-03
 青山 浩 2pA01
 赤池 光博 1pA01
 " 1pA02
 赤尾勝一郎 2pF09
 赤川 巧 2aC10
 明石 哲行 1pA08
 赤堀 興造 2aA11
 " 2aA12
 " 2aA13
 東江 栄 1pB02
 秋元 宏文 3aB02
 秋山 康紀 2pF11
 秋山 高 1pI12
 浅井 尚子 1pI01
 浅香 智之 2aI10
 浅田 浩二 1pC07
 " 2aA10
 " 2aB01
 " 2aB04
 " 2aB06
 " 3aA09
 " 3aA10
 " 3aA11
 " 3aD01
 " 3aE09
 浅田 哲弘 1aI04
 浅田 泰男 1aA05
 " 1aA06
 " 3aB12
 " 3aB13
 浅野 敬幸 1aJ09
 旭 正 1aD09
 阿佐美 淳 2aE08
 浅見 忠男 1pH08
 浅水恵理香 1pA07
 " 2aJ02

浅水恵理香 2aJ03
 安座間喜崇 1aC02
 芦刈 俊彦 1pJ17
 " 3aJ14
 芦田 裕之 2aJ06
 " 2aJ07
 東 順一 1pB10
 東 哲司 1pH10
 東 瑞恵 3aF10
 足立 崇 1aJ02
 穴井 豊昭 3aH05
 阿部俊之助 1aC01
 " 1aC02
 阿部 二朗 3aF09
 阿部 知子 2aH08
 安部 洋 1pD02
 安部 弘 2aH08
 阿部 洋 3aG10
 阿部美紀子 1pC15
 阿部 善子 1pJ09
 尼子 克己 1aG08
 " 1pG08
 " 1pG09
 " 2aB05
 " 3aI10
 " SIV-03
 天野 豊己 3aA13
 荒 武 1pC04
 荒川 圭太 1aC04
 " 3aF11
 " 3aF13
 荒木 崇 1pE05
 " 1pE13
 " 3aE10
 " 3aG09
 " SVII-04
 有賀 逸人 1pD05
 有馬 大輔 3aA12
 有村源一郎 2aC01
 " 2aC02
 有本 友香 3aG07
 粟井光一郎 1pJ15
 安藤 哲 1pH08

— い —

李 炳顯 3aF07
 飯田 滋 1pJ06
 " 1pJ07
 " 3aB02

飯田 孝幸 1aI05
 飯沼 知子 1pF13
 飯野 徹雄 2aF11
 飯野 盛利 1aF03
 " 3aE01
 五十嵐久子 1aI02
 " 1aI03
 池内 昌彦 2aA09
 " 2aB08
 池内 充 2aA03
 池上 勇 2aA04
 池側 広志 1pG12
 " 1pG13
 池田 篤治 1aB05
 池田己喜子 2aI12
 池田 佳久 1pD11
 諫山 俊之 2aC01
 伊澤 桂 3aJ11
 井澤 毅 1aF01
 井沢 毅 1pE08
 " 2aE04
 " 2aJ12
 石井 忠 2aI06
 " 2aI07
 " 2aI08
 石井 龍一 1aB06
 石浦 正寛 2pG01
 " 2pG02
 " 2pG03
 " 2pG04
 石川 敦司 1aD09
 石川 尚 2pA02
 " 2pA03
 石川 孝博 1pF06
 " 1pF07
 石川 浩 2aG11
 石川 雅樹 3aE14
 石黒 澄衛 1pE11
 " 2aB01
 " SVII-05
 石崎 公庸 1aB09
 石沢 公明 1pH12
 石田 さらみ 1aH06
 " 1aH07
 石田 哲也 SIII-03
 石田 信昭 3aG04
 " 3aG05
 石田 宏幸 2aE01
 石田 祐二 3aJ11
 石山 敬貴 2aC09

石渡 悟 1pB15
 石渡 裕 3aG12
 泉井 桂 1pC11
 " 2aF01
 " 3aI07
 " SI-04
 伊豆原 巧 1pC13
 磯貝 彰 1pJ01
 磯野 協一 3aC08
 " 3aJ03
 板井 玲子 1aG03
 井田 和子 2aG08
 井田 正二 2aG13
 " 3aJ09
 一瀬 勝紀 1pH08
 一瀬 勇規 1aD08
 " 2pF05
 " 2pF06
 " SVIII-04
 市原 耿民 2aH03
 市村 和也 1pD08
 " 1pD09
 市村 年昭 2pA03
 一色 正之 2aJ12
 泉 俊輔 3aG03
 伊藤 一弥 1pI03
 伊藤 健二 1pC03
 伊藤 繁 1pA04
 " 1pA05
 " 1pA14
 " 2aA05
 " 2aA13
 伊藤 祥子 1pG10
 伊藤 伸一 1pH01
 伊東 隆夫 1pI03
 " 2aI04
 伊藤 卓也 2aJ04
 " 2aJ05
 伊藤 置夏 2aD08
 " 2aD09
 伊藤 寿朗 SVII-05
 伊藤 寿 2pC05
 伊藤 浩之 3aD10
 伊藤 正明 1pD10
 伊藤 正樹 1pF05
 " 2aF06
 " 3aE12
 " 3aJ02
 伊藤 ヌキ 1aD07
 伊東 庸子 1aC02

伊藤 佳央 3aB03
 稲垣 言要 3aA06
 稲垣 冬彦 1pA16
 稲田 温子 2pF05
 " 2pF06
 稲田のりこ 3aJ02
 稲葉 昌美 2aG05
 井上 香織 2pC10
 井上 和仁 1aA03
 " 1aA04
 " 1pA01
 " 1pA02
 " 1pA13
 井上 達也 1aB09
 井上 千晶 2pG02
 " 2pG03
 井上 弘 1pD01
 井上 雅裕 1pG10
 " 1pG11
 " 1pI15
 井上 眞理 3aG04
 " 3aG05
 井上 頼直 1pA15
 " 2aB08
 " 2pA01
 " 2pA02
 " 2pA03
 " 2pA12
 " 2pG03
 " 3aA05
 猪口 雅彦 3aD06
 猪股 慎二 2aH09
 射場 厚 1pJ16
 " 3aD09
 今泉(安楽)温子 2pF09
 今宿 芳郎 1pI09
 今関 英雅 2aG03
 今堀 義洋 1pH14
 井村 洋章 3aB05
 入船 浩平 2aC01
 " 2aC02
 " 2aC03
 岩城 雅代 1pA04
 " 1pA05
 " 1pA14
 " 2aA05
 " 2aA13
 岩崎 郁子 1pB12
 岩崎 俊介 1pD02
 " 2aF03

岩崎 行支 1aD09
 岩崎 美子 1aA01
 岩瀬啓一郎 3aA01
 岩瀬 政行 3aE12
 岩田 伸夫 2pC01
 岩瀨 雅樹 1pE05
 " 1pE13
 " 2aD04
 " 2aJ01
 " 3aE10
 " 3aG09
 — う —
 呉 伝銀 1aJ05
 上岡 華代 3aI01
 " 3aI11
 上口 智治 2aD10
 上杉 眞紀 2aJ09
 上田 純一 1pH09
 " 2aH04
 " 3aE02
 上田 貴志 3aH05
 上田 雅美 2aB02
 上野 修 1pB02
 上野 宜久 SI-04
 上藤 洋敬 1pJ03
 上村 千晶 2aH07
 魚住 信之 1aD02
 " 3aI09
 宇佐美竜二 2aD05
 丑丸 敬史 2aD02
 " 3aJ07
 宇治家武史 1aA02
 臼井 美奈 2pA09
 臼田 秀明 2aD01
 内海 俊樹 1pC15
 内倉 直美 2aE07
 内田 朗 2pC09
 内田史小里 2aE07
 内田 直次 1pH10
 内宮 博文 2aF03
 " 2pF07
 " 3aE11
 " 3aH05
 内山久美子 1aG05
 宇津巻竜也 2pG03
 梅田 裕之 2aD10
 梅田 正明 3aE11
 梅田(原)千景 3aE11

梅村 孝明 1aJ07
 浦尾 剛 1pD02
 " 2aD11
 裏地 美杉 1pJ10
 " 1pJ11
 " 1pJ12
 浦野 純一 3aJ07
 瓜谷 真裕 2aD02
 海野 和俊 1pH07
 海野けい子 2pF10

— え —

江頭 宏和 1pA12
 越後 仁 1aB01
 榎並 勲 2pA10
 " 2pA11
 " 2pA12
 榎屋 温 1pC16
 遠藤 千絵 1pC06
 遠藤 剛 2aB01
 " 3aA09
 " 3aA10
 " 3aA11

— お —

王子 善清 1pD05
 " 1pD15
 " 2aC07
 大井 晶夫 3aD11
 大江 孝明 1pG05
 大江田憲治 SI-02
 大岡 宏造 1pA01
 " 1pA14
 " 1pA15
 大川 和秋 3aI04
 大川 秀郎 3aA12
 大河 浩 1pA09
 " 1pA10
 大岸 麻紀 SVIII-03
 大熊 英治 2aG07
 大嶋 公久 3aC03
 大菅 康一 2aE07
 大隅萬里子 3aH06
 大隅 良典 3aH06
 太田 象三 3aJ11
 太田 大策 2aJ08
 " 3aD08
 太田 じじ 2aF11

太田 にじ	3aC13	岡田 清孝	3aE09	小関 良宏	3aG01	加藤 彰	2aH01
大田 伸之	1pJ10	"	SVII-05	小田 雅行	1pH14	"	2aH02
"	1pJ11	岡田 昌二	2pF10	小内 清	2pG05	加藤 潔	2aG01
"	1pJ12	岡田 光正	2pC08	"	2pG06	加藤 栄	2pA09
太田 尚孝	2pA10	岡南 政宏	2aD04	小野 高明	2pA06	加藤 敏朗	1aD08
"	2pA11	"	3aG09	"	2pA07	加藤 俊彦	1pH13
"	2pA12	岡原 孝一	1aI05	尾之内 均	1aE05	加藤 友彦	1pI04
太田 啓之	1pJ14	岡部敬一郎	1aB06	小保方潤一	3aJ04	加藤 紳子	2aJ04
"	1pJ15	岡村 昭治	1aI05	小俣 達男	1aB08	"	2aJ05
"	2pC06	岡村 将人	1aB08	"	1pG04	加藤 英樹	1aJ08
太田垣 聡	2aJ11	岡本 和久	1pF13	"	1pG05	加藤 大和	1pA09
大瀧みちる	3aJ04	"	2pG02	"	1pG06	"	1pA10
大谷 珠代	1pH13	岡本 繁久	1pI06	"	1pG07	加藤みゆき	1aC07
大坪 憲弘	2pF03	岡本 庄司	1pG17	小山 時隆	2aD05	加藤 康之	3aA13
"	SVIII-05	岡本 貴史	1aC08	"	2aD06	加藤 勇治	2aC06
大藤 雅章	1aJ03	"	1aC09	恩田 祥子	1pF12	加藤 陽治	1pI13
大西 勲	2pC09	岡本 龍史	1pC01			加藤 祥弘	2aD02
大野 千晶	2aB04	"	3aH07			金井 龍二	1aB03
大野 泰史	1pC16	"	3aH08			金山 喜則	3aJ01
大橋 敬子	1pB13	岡山 繁樹	2pC07	甲斐 元士	1pB02	鐘ヶ江 健	1pF14
大橋 祐子	1aD03	尾形 信一	1pJ04	貝原 純子	2aH09	鐘ヶ江(梶矢)弘美	1aE08
"	1pD06	小川 一樹	1pB07	嘉数江美子	3aF03	"	1aE09
"	2aE05	小川 健一	1pC07	柿本 辰男	1pH03	"	1pD14
"	2aE06	"	2aB01	賀来 華江	1aD07	兼子健太郎	1pB06
"	2pF03	"	3aD01	"	2aI05	金子 哲	2aI06
"	3aD10	"	3aE09	角谷 忠昭	3aI02	"	2aI07
"	SVIII-05	小川 晃男	1aB08	掛川 弘一	2aI06	金子 貴一	1pA07
大場 泰	1pB17	"	1pA09	"	2aI08	"	1pG06
大宮あけみ	1aH03	"	1pA10	影山奈津子	SVII-05	"	2aJ02
大宮 泰徳	1pI09	"	2aG10	笠毛 邦弘	2aI11	"	2aJ03
大森 正之	2aB09	"	3aA11	菓子野康浩	1pA12	金子 堯子	1aC07
"	2aF08	小川 秀之	2aE13	"	2aB07	金子 武行	1aA05
大山 莞爾	1aB09	興津 敬之	2aF05	"	2aB11	金田 剛史	1pH03
岡 穆宏	1pE07	奥島 葉子	3aH09	梶 隆	1aF09	金松 澄雄	1pC07
"	1pE12	奥原 宏明	2aC05	梶原 忠彦	1pC09	"	2aB01
"	1pI09	奥村 彰規	2pA11	片岡 健治	1pG02	金光 卓也	2pF06
"	2aD07	奥村 晁	3aI08	片岡 智晃	1aI05	狩野 広美	3aG04
"	SVIII-03	奥村 典子	2aF07	片岡 博尚	1aF08	"	3aG05
岡 桂子	1pG09	"	3aJ06	片桐 敏	2pG06	鎌田 博	1aD03
岡 真理子	3aE02	奥山英登志	1aC08	片桐 健	1pD04	"	1aF04
岡崎 光雄	2aH05	"	1aC09	片山 光徳	2aB09	"	2aE07
"	3aB05	奥山 剛	3aE05	加田 茂樹	2pC04	蒲池 浩之	1pD01
岡崎 芳次	2aG01	"	3aE06	且原 真木	2aG02	上江洲彰久	1pA12
岡田 清孝	1pE10	奥山 律子	1aG06	勝見 允行	2aI03	神阪盛一郎	1aF02
"	1pE11	小椋 賢治	1pA16	加藤 明	1pJ10	"	3aE02
"	1pH16	尾崎 武司	1pH14	"	1pJ11	神谷 明男	2aC04
"	2aB01	尾崎 葉子	1pF02	"	1pJ12	神谷 信夫	2pA01
"	2aD05	小澤真一郎	2pA04	加藤 朗	2aC11	神谷 勇治	1pC05
"	2aD06	小関 良宏	3aB02	"	3aH11	"	1pH02
"	3aD01	"	3aB03	加藤 彰	1pA09	"	1pH05

— か —

神谷 勇治	1pH06	菊池 尚志	1aE09	久保 英一	2aB07	小島 清隆	2aH09
〃	3aJ13	〃	1pD14	久保田 守	1pF12	小嶋 洋之	3aB11
亀井 綾子	2pA12	菊地 幹之	1aH03	熊谷 忠	1pF08	小島 峯雄	1pC08
亀田 清	2aG01	岸谷 幸枝	2aG09	〃	1pF16	小竹 敬久	1pI11
加茂 政晴	2pA11	岸戸 崇浩	2pF10	〃	1pF17	小谷 博一	1pA07
賀屋 秀隆	1pE05	木嶋 文子	2aJ10	熊谷 浩高	1pC17	〃	2aJ02
〃	3aE10	北浦千枝子	2aE13	熊崎 茂一	2aA04	〃	2aJ03
萱野 暁明	2aE07	北川史二郎	1pJ14	熊田アンリオバディア		児玉 浩明	1pJ16
刈屋 國男	2aI05	北島佐紀人	2pF04		3aJ09	〃	3aD09
川合 啓介	1pH13	北野 勝彦	1pA09	隈元 保子	3aG04	小西左江子	1pE08
川上 馨	1aC01	北野 高寛	1aG08	〃	3aG05	小西 照子	1pI13
川上 弘人	2aF10	〃	SIV-03	藏野 憲秀	1pB12	小林 晃	1pE14
川北 一人	1pD13	北宮 絵里	1aH04	〃	2aB02	〃	1pE15
川口健太郎	2aI05	北村 訓子	2aG12	黒岩 繁樹	2aA11	〃	1pE16
河口 清香	2aI09	吉川 潮	1pD05	黒岩 常祥	1pJ02	小林 一成	2pF01
川口正代司	2pF09	木下 俊則	1pD10	〃	3aC11	小林 京子	1pB17
川口由利子	1pG05	〃	3aI03	〃	3aC12	小林 秀行	1pC02
川崎 信二	1pI02	木原 淳一	1pF08	〃	3aC13	〃	2aI11
〃	2pF11	木場 章範	1aD08	〃	SV-01	小林 裕和	1pB04
川崎 努	1aD04	〃	2pF05	黒岩 晴子	1pJ02	〃	1pB17
〃	1aJ09	〃	2pF06	桑原 慎子	1aC04	〃	3aC08
河崎 利夫	2aG02	〃	SVIII-04	桑原 朋彦	3aA01	〃	3aD03
川瀬 芳恵	1aA09	木村 琢磨	3aC06	〃	3aA02	〃	3aH01
河田 悦和	3aB11	経塚 淳子	1pE08	〃	3aA03	〃	3aJ03
川地 太兵	2aC07	〃	1pE09			小林 正樹	1pG07
河野 重行	1pJ02	〃	1pJ08			小林 正美	1pA01
〃	3aC11	清沢桂太郎	2aI13			〃	1pA04
河野 智謙	1aD02	清末 知宏	3aG11	小池 裕幸	1pA12	〃	1pA05
川原 良一	2aE09	清田誠一郎	1pG01	〃	2aB07	小林 優	2aI09
〃	SIII-01	〃	2aC08	〃	2aB11	〃	2aI10
川向 誠	2aJ06	桐淵 協子	2pF02	小池 倫也	3aF13	小林 裕子	2pF01
〃	2aJ07			小泉 望	1aG07	小林 善親	1pB05
河村 義史	2aC01			〃	1pD11	〃	2pC01
〃	2aC02			〃	1pJ13	小松 一男	2aH09
川村 亮一	1pC15	日下部 功	1pC02	〃	3aD12	小松 節子	1aE08
河盛阿佐子	2aA05	草野 友延	2aD03	〃	3aH09	〃	1aE09
〃	2aA12	草場新之助	1pH04	小岩 弘之	2pF09	〃	1pG02
〃	2aA13	久住 高章	1pJ17	小岩 麻里	1aB07	〃	1pH07
〃	2pA07	〃	3aB01	幸田 泰則	2aH03	駒嶺 穆	2aE07
姜 恵淑	1pF17	〃	3aJ14	河内 孝之	1pF09	〃	2aE08
神田 愛	2aG08	楠元 範明	1pA02	〃	2aB02	小鞠 敏彦	3aJ11
菅野 善明	1pE14	朽津 和幸	1aD06	河内 宏	1pC11	小森 俊之	2aG03
〃	1pE15	杳名 伸介	2pG01	〃	1pC12	小山 博之	1pG03
〃	1pE16	〃	2pG02	〃	2aF01	〃	2aG12
		〃	2pG04	〃	2pF08	小山 泰	1pA16
		国頭 俊爾	2aB08	〃	3aI07	〃	1pA17
		久能 均	2pF01	河野 順帆	3aC05	〃	2aA01
		久保 健一	1pE14	高本 秀司	3aB07	〃	2aA02
		〃	1pE15	小柴 共一	3aJ13	〃	2aA03
		〃	1pE16	小島 佳代	1pB04	是枝 晋	1aB03

— き —

近藤 孝男	2pG01	坂野 勝啓	1aD06	佐藤 淳子	SV-02	椎名 隆	SV-02
"	2pG02	"	1pG01	佐藤 隆英	1pH13	塩入 孝之	1aG02
"	2pG03	"	2aC08	佐藤 敏生	1aA01	塩入 秀成	1pC08
"	2pG04	"	2aG02	"	1aA02	塩崎 紀子	2aF09
近藤 忠雄	2aG01	坂本 敦	2aG05	"	3aJ08	四方 幸治	1aF05
近藤 矩朗	1pI01	"	2aG06	佐藤 直樹	2aF10	鹿内 利治	1aE03
近藤 弘清	3aD06	坂本 綾子	1pE15	"	2aF11	"	1pB09
近藤 真紀	3aH10	"	1pE16	"	2aF12	"	3aA09
		阪本 興彦	2aH09	"	3aC01	"	3aD13
		坂本 俊	2aA01	"	3aC02	梅根 一夫	1pB17
		坂本 敏夫	2aB10	"	3aC03	重岡 成	1pF06
		坂本 知昭	1pH04	"	3aC04	"	1pF07
		坂本 秀樹	3aG09	佐藤 矩行	SIII-04	"	2aB02
		坂本 亘	3aC09	佐藤 光	1aD04	"	3aD07
		"	SVII-03	"	2aJ12	"	3aD13
		作田千代子	1pI10	佐藤 浩之	2pC08	茂森 和士	2aA12
		桜井 成	2aH08	"	2pC09	七條千津子	1pF12
		桜井 直樹	1aH01	佐藤 文彦	2pF04	尻無 清明	2pC09
		桜井 直樹	1pI11	"	3aB08	品田 幸代	3aC04
		"	2aH07	"	3aB09	篠崎 一雄	1pD02
		桜井 英博	1pA02	"	3aC06	"	1pD03
		"	1pB15	"	3aC07	"	1pD04
		佐々木康二	1aG08	"	SV-04	"	1pD08
		"	SIV-03	佐藤 康	1pI08	"	1pD09
		佐々木さおり	2aB09	佐藤 豊	1pE03	"	1pE10
		佐々木典子	2pF11	"	1pE04	"	1pF05
		佐々木真紀子	3aC01	"	SIII-02	"	2aD11
		佐々木幸子	SI-01	佐藤 里絵	3aG11	"	2aJ04
		笹倉 紀子	1aG06	佐藤 良平	1aB05	"	2aJ05
		佐島 徳武	1pA17	佐野 智	1pB10	"	3aG10
		"	2aA02	"	2aB02	"	3aG11
		佐藤 昭夫	2aA08	"	3aD13	篠崎 和子	1pD02
		佐藤 和彦	1pA12	佐野 知子	3aB04	"	1pD03
		"	2aB07	佐野 浩	1aG07	"	1pD04
		"	2aB11	"	1pD11	"	2aD11
		佐藤 公行	2aA13	"	1pJ13	"	3aG10
		"	3aA04	"	3aD12	"	3aG11
		"	3aA05	"	3aH09	篠崎 忠治	1pA02
		"	3aA06	"	SVIII-05	篠原 健司	1pF04
		"	SVI-01	佐橋 信哉	1aD02	"	3aF08
		佐藤 久美	2aE10	澤 進一郎	1pE10	芝 幹夫	2aA02
		佐藤 茂	1pI04	澤 嘉弘	3aD14	柴岡 弘郎	1aI04
		"	2aE08	澤木 賢	1aD09	"	1aI07
		"	3aI08	澤田 信一	1aB01	"	1pH03
		佐藤 忍	1pI10	三宮 一幸	2aF01	柴田 大輔	1aE04
		Satoh, Shinobu	SII-04			"	1pI04
		佐藤 修正	1pA07			"	2aJ04
		"	2aJ02			"	2aJ05
		"	2aJ03			"	3aI08
		佐藤 晋一	2pG01			柴田 均	1pB10

高津戸 秀	2aH06	瀧尾 擴士	3aJ13	田中 國介	3aJ09	柘植 知彦	1pF10
高梨 寿	2aA10	"	SVIII-02	田中 直樹	3aF04	"	SVIII-02
高根 健一	1pC12	滝尾 進	3aJ08	"	3aF05	津島 美穂	3aE07
高野 誠	1pD14	瀧田 英司	1pG03	田中 暢明	2pC05	土田 隆康	1pI07
高野 守	3aG08	瀧本 敦	2aH09	田中 勝	3aB09	土屋 明美	3aC05
高橋 章	1aD04	田切 明美	1pE04	田中 良和	1pJ17	土屋雄一朗	1aJ04
高橋 宏二	1pD12	宅見 薫雄	1pB06	"	3aB01	筒井 泉雄	3aI04
高橋 秀夫	SV-03	田口 悟朗	2aH05	"	3aJ14	堤 伸浩	2aB12
高橋 秀樹	1aG06	"	3aB05	田中 義人	2aG09	角山 雄一	2aF02
高橋 英之	3aB13	田口 俊久	2aI03	"	2aG10	"	SV-02
高橋 秀幸	3aE03	武井兼太郎	SI-03	田中 喜之	2aE07	坪井 昭夫	3aI09
"	3aE04	武内 洋志	1aE01	"	2aI12	津山 孝人	1pB05
"	3aG08	竹内 雅宜	3aH04	"	3aI11	"	2pC01
高橋 文雄	1aF08	竹澤 大輔	3aF13	田中 亮一	2aB01	鶴崎 健一	1aH01
高橋 正昭	1aG08	武田 賢太	3aB10	田中(深田)幸子	1pJ07	鶴見 誠二	1pH12
"	1pG08	武田 幸作	3aB04	谷 亜矢	3aG07		
"	1pG09	竹田 恵美	2aG08	谷口 光隆	3aJ11		
"	3aI10	竹田 淳子	3aG01	"	3aJ12		
"	SIV-03	竹田 匠	1pI05	谷本 英一	1pH01		
高橋 正宏	2aA06	竹田 忠績	2pF06	"	2aI02		
"	2aA08	武田 徹	1pF06	田畑 哲之	1pA07		
高橋 美佐	2aC01	"	1pF07	"	2aJ02		
"	2aG13	"	3aD07	"	2aJ03		
高橋美智子	1aG01	"	3aD13	"	SVII-01		
高橋 康弘	1pA08	武田 憲昌	SVII-05	田端 守	3aB10		
高橋裕一郎	2aA07	竹中 重雄	3aG07	田部井 豊	2aE07		
"	3aA04	竹葉 剛	1pH16	玉置 雅紀	1pE01		
高橋 陽介	1aH04	田坂 昌生	1aE04	"	1pE02		
"	1aH05	"	1pE02	"	SIII-02		
"	1aH06	"	SIII-03	田村 良行	3aG07		
"	1aH07	田崎 清	1aH08	田茂井政宏	1pF06		
高浜有明夫	2aE03	田島 茂行	1pC12	"	1pF07		
高島令王奈	3aI07	"	2pF08	"	3aD07		
高部 圭司	1pI04	多田 幹郎	2aF05	"	3aD13		
"	2aI09	"	2aG04	樽井 裕	3aE01		
"	3aD01	"	2aG07				
"	3aE09	多田 雄一	1aJ09				
高倍 鉄子	1pB07	多田 欣史	1aE07				
"	2aG09	"	1aF06				
高倍 昭洋	2aG09	"	1aF07				
"	2aG10	多田隈 圭	2aJ07				
"	2aG11	立元 秀樹	1aE03				
高宮建一郎	1pJ14	立木 美保	1pH15				
"	1pJ15	田中 章	2aG09				
"	2pC06	田中 垂矢子	1pA07				
高本 明子	3aD14	田中 步	2pC05				
高柳 謙二	2aH11	田中 克典	2aJ06				
高山 誠司	1pJ01	"	2aJ07				
田上不比人	3aH06	田中 克幸	3aJ08				
瀧尾 擴士	2pA12	田中 寛	SV-03				

戸栗 敏博 3aF10
 戸嶋 浩明 2aH03
 戸田 智美 2aG12
 等々力節子 1aE08
 " 1aE09
 外内 尚人 1pI07
 富澤 健一 1pB07
 " 1pB09
 " 3aD13
 富田英津子 1pI06
 富田 英敬 3aD03
 富永 るみ 2aH07
 鞆 達也 2aA13
 豊島 近 2pA03
 豊島 喜則 2aF02
 " 2pA04
 " 2pA05
 " 3aD04
 " SV-02
 豊田 勝也 2pG05
 鳥山可菜子 1pC13
 " 2aC12

— ど —

土井 道生 2pC07
 道家 紀志 1pD13
 堂前 直 2pA12
 " SVIII-02
 土山 直美 3aJ09

— な —

内藤 哲 1aJ04
 " 2aJ10
 " 2aJ11
 中井 朋則 1pI07
 " 1pI09
 中井 正人 1aC06
 " 3aH02
 中馬 誠 2aF05
 中川 強 1aE01
 " 2aJ06
 " 2aJ07
 中川 直樹 1pI11
 中川 仁 1pE14
 " 1pE16
 中川 弘毅 1pH13
 中里 勝芳 2pA02
 " 2pA03

中里 洋 1aC08
 " 1aC09
 中澤 美紀 1pC03
 中澤 康至 2aA08
 仲下 英雄 2pF02
 中島 一雄 3aG11
 中島 仁 3aD01
 " 3aE09
 中島 秀明 2pG05
 " 2pG06
 中嶋 直子 2aH10
 中嶋 信美 1aE08
 " 1aE09
 " 1pI01
 中島みどり 2aJ12
 中園 幹生 2aB12
 中谷 悦子 3aA07
 中谷 美穂 1pE13
 中西 啓仁 1aG01
 " 1aG03
 中野 明彦 3aH03
 " 3aH04
 " 3aH05
 中野 雄司 1pH08
 " 3aC06
 " 3aC07
 " SV-04
 仲野 廣美 1aB02
 仲野 広美 1pB06
 中野 雄喜 2pA05
 中野 由佳 1pJ13
 中野 長久 3aG07
 中林 一美 1pF05
 中平 洋一 2aF02
 " SV-02
 中村あや子 2aF12
 中村 信吾 1pI02
 " 2pF11
 中村 達夫 1aG07
 中村 史 1aA05
 中村 輝子 3aE06
 " 3aE07
 " 3aE08
 中村 徳弘 3aC10
 中村 正展 1aE02
 中村 保一 1pA07
 " 2aJ02
 " 2aJ03
 " 2aI11
 中村 善行 2aI11
 仲本 準 1aG04

仲本 準 1pA11
 " 1pB16
 " 3aF04
 " 3aF05
 中山 克己 2pC08
 中山 享子 1pI01
 中山 貴照 1aI06
 中山 雅人 2pC06
 永井 徹 1aA03
 永石 賀子 3aF06
 長尾 精文 1pF04
 永島 賢治 1aA04
 " 1aA07
 " 1aA08
 " 1aA09
 " 1pA06
 長瀬 悟 1pI06
 永田 俊文 1aE08
 " 1aE09
 長田 敏行 1aH04
 " 1aH05
 " 1aH06
 " 1aH07
 長谷あきら 1aE02
 " 1pF11
 " SVIII-01
 " SV-07
 " SIII-02
 長戸 康郎 3aB06
 永山 烈 3aF14
 永山 美香 3aA05
 鳴坂 義弘 1aF06
 成沢 雅広 1aF07
 " 2aG01
 難波千宮子 1aJ04
 南原 英司 2aJ10
 " 2aJ11
 南森 隆司 1pD05

— に —

仁木 輝緒 1aF09
 仁木 智哉 2pF03
 " SVIII-05
 西内 巧 3aD09
 西尾 和晃 1aC06
 西尾 直美 2pC09
 西口 満 1aH08
 錦織 美和 1aC09
 西澤 治 3aF10

西澤 直子 1aG01
 西沢 洋子 3aD11
 西谷 和彦 1pI06
 " 3aG08
 西野 徹 1aB05
 西野 徳三 1pE16
 西浜 竜一 3aE14
 西原 昌宏 1pJ09
 西村明日香 1pE01
 " 1pE02
 西村いくこ 3aH10
 西村 哲 2aE04
 西村 真綾 1pC13
 西村 幹夫 2aB03
 " 2aC11
 " 2aC12
 " 2aG01
 " 3aH10
 " 3aH11
 西村 陽子 1pF12
 西村 芳樹 SV-01
 西本 完 1aC03
 西脇 陽子 1pF13
 丹羽 勝 1pF02
 丹羽 康夫 1pB17
 " 3aC08
 " 3aD03
 " 3aH01

— ね —

根本 圭介 1pH01
 " 3aG12
 根本 泰行 3aC05

— の —

野口 巧 1pA15
 野坂 修一 3aI04
 野澤 彰 3aB02
 野末 雅之 1pC08
 野田 健司 3aH06
 信岡 梢 3aG02
 野村 崇人 2aH06
 野村 美加 1pB01
 野本 享資 1pG15
 " SIV-02

— は —

箱山 晋 1pC06
 箱山 晋 2aI05
 橋野比呂志 2aG04
 橋本 純治 3aE11
 橋本 隆 1aE03
 " 3aA09
 " 3aB07
 橋本 徹 1pF12
 " 1pF15
 橋本 秀樹 2aA02
 長谷 昭 3aI01
 長谷 俊治 1aC06
 " 1pC09
 " 2aC05
 " 2pC03
 " 2pC04
 " 3aH02
 " 3aJ10
 " 3aJ14
 長谷川実加 3aA03
 長谷川みき 1pA11
 馳澤盛一郎 1pI01
 畑 信吾 1pC11
 " 2aF01
 " 3aI07
 " SI-04
 畑 奈央子 2aB05
 葉田野 郁 3aA04
 波多野昌二 3aF06
 秦 恵 1pF15
 蜂谷 晶子 1pG13
 八谷 輝 3aB07
 服部 明彦 1pA02
 服部 束穂 1aJ10
 服部 嘉行 1pJ10
 " 1pJ11
 " 1pJ12
 花木 直人 2aD10
 土生 芳樹 1pJ07
 濱田 達朗 1pJ16
 早川 俊彦 2aC09
 " 2aC10
 林 隆久 1pI05
 " 1pI07
 " 1pI09
 " SII-05
 林 建樹 1aH03
 林 徹 1aE08

林 徹 1aE09
 林 智也 3aE02
 林 秀則 3aF03
 林 秀則 3aJ05
 林 浩昭 3aG12
 林 潤 2aC11
 林 誠 2aC11
 " 2aC12
 " 3aH11
 林 泰行 2aG09
 林田 信明 2aH05
 " 2aJ04
 " 2aJ05
 " 3aB05
 早間 良輔 1aF01
 " 1aJ04
 原 愛 1pH10
 原 光二郎 3aD12
 原 徹夫 1pG03
 " 2aG12
 原 英之 2aA05
 " 2aA12
 " 2aA13
 原 正之 1aA05
 " 1aA06
 原 実 1pJ01
 原口 博行 3aG02
 原田英美子 1aG07
 原田 宏 1aF04
 原田真理子 2aD03
 原野よしみ 1pG06
 原納 究 1pB04
 半田 高 2aH11

— ば —

馬場 晶子 2aH11
 馬場 恭子 2aF02
 " SV-02
 馬場 啓一 1pI03
 坂野 弘美 3aE14

— ぱ —

朴 鉉淑 1pF14
 朴 恵卿 1pC02
 朴 杓允 1pH07

— ひ —

東 四郎 1pC15
 東山 哲也 1pJ02
 " 3aC12
 " SV-01
 樋口 達治 3aI12
 久富 恵世 1pJ07
 久堀 徹 3aA13
 菱沼 佑 1aF08
 日出間 純 1pF16
 " 1pF17
 日向 康吉 1pJ01
 日原由香子 2aA09
 日尾野 隆 1pI03
 日比野 隆 2aG10
 " 2aG11
 姫野 道夫 1aB05
 " 1pB04
 檜山 哲夫 2aA06
 " 2aA08
 " 3aF04
 " 3aF05
 平井 篤志 2aB12
 平石 明 1aA09
 " 1pA04
 " 1pA05
 " 1pA06
 平賀 勲 3aD10
 平澤 栄次 3aB06
 平沢 正 3aG08
 平田 敏文 3aG03
 平館俊太郎 1pG15
 " 2aH10
 平塚 和之 1pJ03
 " 1pJ04
 " 1pJ05
 平塚 理恵 1pJ04
 " 1pJ05
 平野 篤 2aB08
 平野 貴謙 3aH01
 平野 久 1pC03
 平野 昌彦 2pA09
 平畠 壮規 2aH11
 平林 哲夫 1pH13
 平吹 充 3aD02
 平山 隆志 1pD03
 " 2aD11
 広瀬 咲子 1aJ05
 " 1pB01

廣瀬 哲郎 SV-06
 廣橋 利哉 3aH02
 日渡 祐二 2aE09
 " SIII-01

— ふ —

深城 英弘 1aE04
 " SIII-03
 深見 泰夫 1pD05
 深見 佳枝 1pA15
 福井 充枝 1pF04
 福井 祐子 3aB01
 福澤 秀哉 1aB09
 福嶋 葉月 3aF03
 福田 愛弓 3aG02
 福田 哲也 2pA10
 福田 裕穂 1pI08
 " 2aE09
 " 2aE10
 " 3aD02
 " SIII-01
 福田 三穂 2aG07
 福田めぐみ 1pI01
 福元 將志 1pH04
 藤井 修平 2aH04
 藤井 敏雄 3aF10
 藤井 伸治 3aE03
 " 3aG08
 藤井 匡寛 2pF05
 藤岡 唯志 3aD10
 藤木 友紀 2aF06
 藤澤 久雄 1aE04
 " 1pE02
 " SIII-03
 藤田 直子 1aC05
 藤田 祐一 1aC06
 " 1pA08
 " 2aC05
 " 2pC03
 " 2pC04
 " 3aH02
 藤野 猛史 2aI04
 藤原 伸介 1pF03
 藤本 秀基 3aB08
 藤森 功 2aJ08
 藤原 徹 SIV-04
 藤原 祥子 2aD01
 藤原 敬之 1pB15
 藤原 徹 3aG12

藤原 英司 3aG13
 二村 典宏 1pF04
 " 3aF08
 蓬原 雄三 1aJ07
 船附 秀行 1pD14
 降旗 敬 1pB15
 古川 聡子 1aH02
 古川 一 1pH14
 古谷 育代 1aE03
 古橋 勝久 1aE07
 " 1aF05
 古本 強 SI-04

— へ —

賀 道耀 1aD06
 逸見 隆博 3aA07

— べ —

別府 由紀 2pG05

— ぼ —

法忍 孝子 3aD04
 保坂 真穂 2pF10
 星 伸枝 1pJ09
 星田 尚司 2pA05
 星野 敦 1pJ06
 星野 芳子 1pC16
 細川大二郎 1pD02
 保尊 隆享 1aF02
 " 3aE02
 堀田 康雄 1pJ03
 " 1pJ04
 " 1pJ05
 保浦 徳昇 1aJ10
 堀 輝三 1pF01
 本城 賢一 3aF06
 本田 貴弘 1pF07
 本間 隆 1pE07
 " 1pE12
 本間 守 3aD10

— ま —

馬 建鋒 1pG15
 " 1pG16
 " 1pG17
 " SIV-02

前 忠彦 1aB02
 " 1pB06
 " 1pB13
 " 1pB14
 " 2aE01
 前島 正義 1pC06
 " 2aG01
 " 2aI12
 " 3aI11
 " 3aI12
 前田 真一 1pG05
 前田 康昇 1pJ10
 " 1pJ11
 " 1pJ12
 前田 佳男 3aB05
 牧 久恵 2aE07
 " 2aE08
 牧野 周 1aB02
 " 1pB06
 " 1pB13
 " 1pB14
 " 2aE01
 牧野 直純 1pC16
 正元 和盛 2aF07
 " 3aJ06
 増田 泰三 1pG02
 " 1pH07
 " 3aG13
 増田 隆男 SI-04
 増田 建 1pJ14
 " 1pJ15
 " 2pC06
 増田 宏志 1aC03
 " 3aD05
 増田 康子 1aH01
 Masuda, Yoshio SII-01
 増田 涉 3aG07
 増村 威宏 3aJ09
 町田千代子 1aE05
 町田 泰則 1aE05
 " 1pE10
 " 3aE14
 " SI-02
 松井 啓祐 1aI04
 松井 健二 1pC09
 松井 博和 3aD10
 松井 南 1pF10
 " SVIII-02
 松浦 克美 1aA04
 " 1aA07

松浦 克美 1aA08
 " 1aA09
 " 1pA03
 " 1pA05
 " 1pA06
 松枝 昭治 1aB09
 松尾 友明 3aF14
 松尾 道憲 3aA10
 " 3aA11
 松岡 大介 1pD05
 松岡 英明 3aC05
 " 3aD11
 松岡 信 1pB01
 " 1pB06
 " 1pE01
 " 1pE02
 " 1pE03
 " 1pE04
 " 1pH04
 " 2aF01
 " 3aJ11
 " SIII-02
 松木 吏久 2aF03
 松倉 千昭 1pH01
 " 2aI02
 松崎 雅広 1aA01
 松田 憲之 3aH03
 " 3aH05
 松田 英幸 2aJ06
 " 2aJ07
 松永 幸大 SV-01
 松永 茂 1pF01
 松永 俊朗 2aI06
 " 2aI07
 " 2aI08
 松原 久子 3aG02
 松村 智裕 2aC05
 " 3aJ10
 松本 任孝 1pE11
 松本 英明 1pG12
 " 1pG13
 " 1pG14
 " 1pG15
 " 1pG16
 " 1pG17
 松本 弘子 3aF06
 松本 有美 1aA04
 間藤 徹 2aI09
 " 2aI10
 " SIV-01

円 由香 2aE12
 真野 純一 2aA10
 " 2aB04
 " 2aB06
 真柳 浩太 2pA02
 " 2pA03
 丸橋 亘 1pF02
 圓山恭之進 2aF11

— み —

米 華玲 3aA11
 三浦 謙治 1aB09
 三浦順一郎 3aC05
 三浦 節子 3aG10
 三浦登貴子 1pF06
 三浦 正幸 2aE05
 " 2aE06
 三浦 光雄 3aI03
 三上 浩司 1pD03
 " 1pD04
 三角 修己 3aC12
 水澤 直樹 2pA08
 水谷 正子 1pJ17
 " 3aB01
 水谷 正治 3aD08
 水野 孝一 1aI06
 水野 猛 2aD10
 溝口 正 1pA16
 溝口 剛 1pD08
 " 1pD09
 " 1pE10
 道井 貴子 1pA08
 三石 安 1pI13
 光川 典宏 3aI08
 光永 俊郎 1aJ02
 光山 貴志 1pD15
 皆川 純 3aA05
 南 淳 3aD02
 南 栄一 1aD06
 皆見 政好 1pJ04
 " 1pJ05
 南川 隆雄 1aJ08
 " 1pC01
 " 3aH07
 " 3aH08
 南園 帝 1aI05
 峰雪 芳宣 1aI08
 三野 広幸 2pA07
 三村 徹郎 3aI06

三村 徹郎	SII-03
宮入 祥夫	1aB04
三宅 淳	1aA05
〃	1aA06
三宅 親弘	1pB08
〃	3aD13
三宅 正人	3aB12
〃	3aB13
宮腰 信	3aH08
宮下 三幸	1aB01
宮嶋 伸行	1pA07
〃	2aJ02
〃	2aJ03
宮武 和孝	3aG07
宮地 重遠	1pB12
〃	2aB02
宮村 新一	1pF01
宮本 健助	1pH09
〃	1pI14
〃	2aH04
〃	3aE02

— む —

向井 讓	1pF04
武藤 尚志	1aD02
〃	1pD12
〃	3aI09
村井 麻里	3aF12
村上 晃子	3aD07
村上 真也	3aC06
〃	3aC07
〃	SV-04
村上 高	2aE06
〃	3aD10
村上 浩子	3aE13
村上(嘉納)ゆり子	1pH04
村木 功	1aB01
村田 紀夫	1pJ17
〃	2aG05
〃	2aG06
〃	2aH01
〃	2aH02
〃	3aF01
〃	3aF02
村田 稔	3aC09
村田 祐二	1pG08
村田 善則	3aI10
村田 芳行	2aF05
〃	2aG04

村田 芳行	2aG07
〃	3aI02
村中 俊哉	SI-02
村松 伸一	1aB02
村本 拓也	1pF09
村山 英未	1pA13
室伏 旭	1pH08

— め —

飯 哲夫	2aD04
〃	2aJ01
〃	3aE10
〃	3aG09

— も —

毛利 武	1aH08
茂田 一郎	2aJ01
望月 伸悦	1aE02
〃	SV-07
持丸 真里	1pB15
元木 章裕	2pA09
本橋 健	3aA13
本村 宗己	1aI01
〃	1aI03
本吉 總男	3aC09
森 敏	1aG01
〃	1aG02
〃	1aG03
森 仁志	1pH15
〃	1pI07
〃	2aE11
〃	2aE12
森 昌樹	1aE08
〃	1aE09
森 美穂	3aE08
森川 弘道	2aC01
〃	2aC02
〃	2aC03
〃	2aG13
森田 直樹	1aC08
森田 勇人	3aJ05
森田 匡一	1pE09
森野 和子	1pJ08
〃	2aJ12
森安 裕二	2aE02

— や —

矢崎 一史	3aB10
矢崎 芳明	1aD06
〃	1pG01
〃	2aG02
安田 武司	1pH10
保田 浩	1aC03
〃	3aD05
安富佳奈子	2aB11
柳澤 修一	2aF04
矢野 明	2pF07
〃	SVIII-06
矢野 伸一	3aB11
藪崎 義康	3aA12
藪田 尚弘	SI-04
藪田 行哲	1pF07
山川 博幹	1aD03
山川 昌康	2pA08
山形 裕士	2aJ09
山口 勇	2pF02
山口五十磨	1pH04
山口 勝司	2aB03
山口 祥子	2aH09
山口信次郎	1pH05
〃	1pH06
山口 淳二	1aJ01
〃	1aJ07
〃	1pH01
〃	2aI02
山口 剛生	3aI09
山口 武志	1aD05
山口 博隆	1aG01
〃	1aG02
山口 雅利	3aE11
山口 峰生	2aI11
山口 夕	1aG07
山口 雪子	1pG13
〃	1pG14
山越 薫	2aE08
山下 魏	2pA08
山田 恭司	1aE07
〃	1aF05
〃	1aF06
〃	1aF07
山田 健志	3aH10
山田 茂裕	2aG03
山田 哲治	1aD08
〃	2pF05
〃	2pF06

山田 哲治	SVIII-04
山田 水奈	3aA07
山田 康之	1aE03
〃	3aA09
〃	3aB07
〃	3aC06
〃	SV-04
山中 健生	1pC16
山村 三郎	1pJ09
山村 教子	1pH10
山本 紋子	2aJ10
山本 勇	1aA02
〃	3aJ08
山本 浩二	1pC13
山本 周史	1aI01
山本 晋	1pH08
山本 直樹	1pB06
〃	2aF01
〃	2aF03
〃	3aA08
〃	3aF07
山本 浩之	3aE05
〃	3aE06
山本 泰	3aA07
山本由弥子	3aA06
山本 洋子	1pG12
〃	1pG13
〃	1pG14
山本 義治	SVIII-02
山本 良一	2aH04
〃	2aI02
〃	3aE02
山谷 知行	2aC09
〃	2aC10

— ゆ —

柚木 篤史	3aH07
-------	-------

— よ —

横井 崇秀	1aI07
横田 明穂	1pB07
〃	1pB08
〃	1pB09
〃	1pB10
〃	1pF09
〃	2aB02
〃	3aA09
〃	3aD13

横田 明穂	3aJ03	若尾 紀夫	1pA05
横田 国夫	1pF02	"	1pA06
横田 孝雄	2aH06	若杉 達也	1aE07
横山 峰幸	2aH09	"	1aF05
吉井 真人	1pF06	"	1aF06
吉岡 啓子	2pF02	"	1aF07
吉岡 博文	1pC14	若林 和幸	1aF02
吉田 和市	2pC05	我妻 千尋	1aC03
吉田 和夫	1pJ10	鷺尾 健司	1aC09
"	1pJ11	"	1aJ06
"	1pJ12	鷺田 治彦	1aJ05
吉田 和正	1aH08	渡辺 愛	3aC02
吉田 和哉	2aE13	渡辺 明夫	2aJ13
吉田 久美	2aG01	渡部 晶子	1aG06
吉田 茂男	1pH08	渡邊 昭	1pF05
"	2aH08	"	2aF06
"	3aC06	"	2aJ13
"	SV-04	"	3aE12
吉田 静夫	1aC04	"	3aJ02
"	3aF11	渡辺 克美	1aJ02
"	3aF12	渡辺 剛史	3aG04
"	3aF13	"	3aG05
吉田 誠一	2aH09	渡辺 哲	1pF01
吉田 豊和	1aJ02	渡辺 正勝	1pF12
吉田 真	1aA07	"	2aF07
"	1aA08	"	2aF08
吉田 正人	3aE05	渡辺 洋子	2aI12
"	3aE06	和田敬四郎	1pB17
"	3aE07	"	2pC02
吉田みどり	3aF09	和田 光生	1pH14
吉積 毅	1pF10	和田 元	1pD10
吉原経太郎	2aA04	"	2aF07
吉村 和也	1pF06	"	3aJ06
"	1pF07	和田 正三	1pF14
義村由紀子	3aD13	和田 洋	3aC10
吉本 光希	3aC08	和田野 晃	1aB05
米倉 圭子	3aJ14	"	1pB04
米田 章登	2aF02		
米山 忠克	1pF03		
"	1pG02		
"	3aG13		

— り —

劉 強	3aG10
劉 耀光	1aE04

— わ —

若尾 紀夫	1pA04
-------	-------

日本植物生理学会1997年度年会準備委員会

青山卓史	京都大学・化学研究所
浅田浩二 (委員長)	京都大学・食糧科学研究所
荒木 崇	京都大学大学院・理学研究科
泉井 桂	京都大学・農学部
岩淵雅樹 (会計監査)	京都大学大学院・理学研究科
遠藤 剛 (総務)	京都大学・食糧科学研究所
岡 穆宏	京都大学・化学研究所
岡田清孝	京都大学大学院・理学研究科
後藤弘爾	京都大学・化学研究所
斉藤和實	京都府立大学・農学部
佐藤文彦 (プログラム編集)	京都大学・農学部
佐藤雅彦	京都大学・総合人間学部
椎名 隆	京都大学大学院・人間環境学研究科
篠崎眞輝	京都大学・農学部
関谷次郎	京都大学・農学部
竹葉 剛	京都府立大学・生活科学部
田坂昌生	京都大学大学院・理学研究科
田中 歩	京都大学大学院・理学研究科
田中國介	京都府立大学・農学部
豊島喜則 (会場)	京都大学大学院・人間環境学研究科
畑 信吾	京都大学・農学部
幡野恭子	京都大学・総合人間学部
林 隆久 (ミキサー、懇親会)	京都大学・木質科学研究所
福澤秀哉	京都大学・農学部
藤沢久雄	京都大学大学院・理学研究科
間藤 徹	京都大学・農学部
真野純一 (会計)	京都大学・食糧科学研究所
三原 等	京都大学・農学部
飯 哲夫	京都大学大学院・理学研究科
矢崎一史	京都大学・農学部

日本植物生理学会1997年度年会および 第37回シンポジウム講演要旨集

発行日：1997年3月20日

発行者：日本植物生理学会1997年度年会準備委員会

〒611 京都府宇治市五ヶ庄 京都大学食糧科学研究所

印刷所：中西印刷（株）〒602 京都市上京区下立売通小川東入

日本植物生理学会1997年度年会の開催にあたり、多くの企業・団体より寄付等のご援助を頂きました。ご協力まことに有り難うございました。ここにお名前を掲載し感謝申し上げます。(2月18日現在 順不同)

株式会社 ラボ

株式会社 雨林製作所

関西電力株式会社

三井石油化学工業株式会社

株式会社 クボタ

大阪ガス株式会社

住友化学工業株式会社

アサヒビール株式会社

株式会社 植物工学研究所

理研化学工業株式会社

山発産業株式会社

旭光通商株式会社

藤沢薬品工業株式会社

キッコーマン株式会社

東洋紡績株式会社

株式会社 京都サイエンス

高山製作所

株式会社 関西総合環境センター

日本薬品開発株式会社

井上科学振興財団

情報処理印刷

ワープロ・データベース フロッピー・磁気テープが印刷へ直結

中西印刷株式会社

取締役社長 中西隆太郎

京都本社 602 京都市上京区下立売通小川東入ル
tel.075-441-3155 fax.075-441-3159
東京連絡所 tel.東京03-3815-7465

海外出張(国際会議・交換訪問・外国人の招聘)

▶▶▶ 96年度より科研費で出張旅費が計上出来ます ◀◀◀

- ◎ **学術、業務渡航のプロ集団** あらゆる手配に精通したスタッフが、素早くご案内致します。
- ◎ **最新のシステム** 社内LANにEメール、CRS(予約端末)等を導入し、的確な手配を行います。
- ◎ **格安航空券** 全ての方面に利用できます。航空会社と直取引きのため、格安で提供できます。
- ◎ **査証(ビザ)の取得代行** 交換訪問(J-1、J-2)など各国のビザを取得致します。
- ◎ **旅客運賃見積書無料作成** (大蔵省様式1のBの4)翌日には送ります。

秋から春のキャンペーン:ヨーロッパ

Y2料金485,000円でビジネスクラスにアップグレード
オランダ航空 又は、英国航空



ジーティーセンター

(株)業務渡航センター(京都府旅券事務所西入)
〒604 京都市中京区錦小路通烏丸西入占出山町305・ヤマチュウビル1F
TEL(075)223-3535/FAX(075)223-2801
E-mail:gtcenter@mbox.kyoto-inet.or.jp

■営業時間▶平日/9:30~18:00 土曜/9:30~15:00(日・祭日及び年末年始休業) ※営業時間外の予約・お問合せはE-mail&Faxにて受付させて頂きます。

CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS

Formerly known as *Progress in Growth Factor Research*

Editors

Michael B. Sporn, *Professor of Pharmacology and Medicine, Dartmouth Medical School, USA*
Jan T. Vilcek, *Professor of Microbiology NYU Medical Center, USA*

Aims & Scope

本誌は、急速に発展しつつある成長因子、サイトカイン研究の最新の成果を伝えます。評価レビュー、現状解説レビュー、編集者へのレター、会議報告などを掲載し、信号形質導入、細胞の成長、分化、胚形成、免疫、腫瘍形成、臨床医学などさまざまな分野でのサイトカイン、成長因子の重要性に重点を置きます。

Abstracting/Indexing

BIOSIS/Biochemistry & Biophysics Citation Index/Index Medicus/MEDLINE/Research Alert

Bibliographic Information

1997: Volume 8 in 4 issues/ISSN: 1359-6101/Subscription Price: NLG 603.00

本誌のコンテンツを無料でお届けします

ContentsDirect



●無料 ●電子メールにて提供 ●現在約320誌が対象 ●雑誌発行日の2~4週間前 ●発行のたびに更新 ●提供される情報: 著者名/論文名/雑誌名/特別号名/巻数/号数/ページ/発行予定日

ContentsDirect対象雑誌のリストのご請求: CDhelp@elsevier.co.uk
ContentsDirectへのお申し込み: CDsubs@elsevier.co.uk
(下記項目を英文でお知らせ下さい)

●お名前 ●電子メールのアドレス ●ご住所 ●ファックス番号
●入手希望の雑誌名



◆ご注文は、最寄りの洋書店へお願いいたします。 ◆お問い合わせは、下記まで。

エルゼビアサイエンスジャパン

〒106 東京都港区東麻布1-9-15 東麻布1丁目ビル4F

☎ 0120-383-608 FAX 03-5561-5047 E-mail: info@elsevier.co.jp

S. Huneck, Langenbogen/Saalkreis, Germany; I. Yoshimura, Kochi, Japan

地衣類の同定

Identification of Lichen Substances

1996. XI, 493 pp. 67 figs., 20 tabs. Hardcover ¥42,900 ISBN 3-540-60811-7

近年知られるようになった約700種に関する単離、同定、構造分析についてのハンドブック。まず始めに地衣類代謝物の分析に関する重要な手法について解説し、次に同定や違いの重要な点を述べると共にあらゆる地衣類の分析的、分光学的データを収載している。また地衣類の専門家だけでなく、他の代謝産物の基礎としての地衣類を用いる化学者にとっても貴重な資料であり、地衣類の同定に関して化学分析的な鍵となると同時に、環境汚染問題研究のため生物学的モニタリングする際に地衣類を用いる研究者にとっても大変価値のある参考文献としてお勧め。

Contents 1. Introduction 2. Identification of Lichen Substances 3. Data of Lichen Substances / Literature / Addenda / Subject Index

植物学 生化学 環境科学

好評発売中

H. Mohr, P. Schopfer, University of Freiburg, Germany (Eds.)

植物生理学

Plant Physiology

1995. X, 629 pp. 698 figs. 144 tabs. Hardcover ¥10,780 ISBN 3-540-58016-6

植物生理学に関する現象をより深く理解するための基礎をまとめた、植物科学分野の特に卒業生レベルを対象にしたテキスト。植物の生理学的機能を説明するために実験的データと近年の仮説や理論をまとめた、教科書の決定版。なお、本書は現在第4版が好評を博しているドイツ語版からの翻訳である。

"The new translation in to English will enable a much broader access to this very instructive treatise of plant physiology...it is most profitable for advanced students and teachers who are interested in the fundamentals of plant life."

Journal of Plant Physiology

"Few would not learn something new from it"

The New Phytologist

好評発売中

Graduate Text

H. Wagner, S. Bladt, University of Munich, Germany

天然薬用植物分析

Plant Drug Analysis

A Thin Layer Chromatography Atlas

2nd ed. 1996. XV, 384 pp. 184 figs. in color Hardcover ¥32,780 ISBN 3-540-58676-8

標準的天然薬用植物のクロマトグラムに関する多数のカラー写真を含むことが特徴。薬用植物を分析する研究者にとって、未知の薬物を同定し、また既知の薬物の成分や純度をモニタリングする際、極めて有効なリファレンスとなるだろう。また掲載されているすべての薬物は薬局方の規格に適合しているため掲載内容は非常に信頼のおけるものである。薄層クロマトグラフィ技術の専門家でなくともごく一般的な器具や試薬を用いるだけで、十分な実験知識を習得できる。

"... a unique and remarkable collection ...an invaluable guide"

"...a required text for any laboratory concerned with the analysis of medicinal plant products"

Irish Pharmacy Journal

好評発売中

2nd ed.

W. Larcher, University of Innsbruck, Austria

植物生態生理学

Physiological Plant Ecology

Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups

3rd ed. 1995. XVI, 506 pp. 348 figs. Hardcover ¥7,480 ISBN 3-540-58116-2

生物学、生態学、地理学、農学、森林科

学関係の学生向。

好評発売中

Advanced Textbook

S. Grillo, A. Leone, Portici, Italy (Eds.)

植物における物理的ストレス

Physical Stresses in Plants

Gene and Their Products for Tolerance

1996. X, 276 pp. 18 tabs. Hardcover ¥21,780

ISBN 3-540-61347-1

環境的ストレスにより引き起こされる、植物の分子レベルでの反応をまとめたもの。その研究内容は遺伝子組み替えや遺伝子導入の結果起こる遺伝子発現にまで及ぶ。

好評発売中

Springer Lab Manuals

M. Clark, University of Cambridge, UK (Ed.)

植物分子生物学

Plant Molecular Biology

A Laboratory Manual

1996. Approx. 360 pp. 38 figs. 1 in color 16 tabs. Softcover ¥13,200 ISBN 3-540-58405-6

分子生物学に関する技術—遺伝子工学、植物細胞遺伝学—を包括。入門編に始まり、実験に移し易いプロトコールと総合的なトラブルへの対処法を紹介している。初心者や実験に携わる方にお勧め。

12月出版予定



Springer

お問い合わせは

イースタン・ブック・サービス (株)

〒113 東京都文京区本郷 3-3-13 Tel: 03-3818-0861 Fax: 03-3818-0864

4月刊行予定 「植物細胞工学シリーズ」 第6号は実験プロトコール

●植物試料の調製から観察までのポイントとコツを詳しく図解!

植物の細胞をみる実験プロトコール

(仮題)

【監修】 福田裕穂 (東京大学理学部付属植物園) ・ 西村幹夫 (基礎生物学研究所) ・ 中村研三 (名古屋大学農学部)

◆国際判 ◆約200ページ ◆予価3,600円

◆内容予定

巻頭カラー口絵

1. 一般的細胞観察法

光学顕微鏡/SEM/共焦点レーザー顕微鏡

2. 遺伝子とその発現を観る方法

核の染色とDNA合成活性の測定/ *in situ* hybridization/細胞レベルでGUS活性を観る方法/LUXを用いた遺伝子発現の解析法

3. 細胞内での機能タンパク質観察法

間接蛍光抗体/DIG法による細胞内タンパク質の局在解析法/免疫電顕法/Tissue print immunoblot/GUS/GFPを

用いたタンパク質のオルガネラへの輸送の観察法と解析法

4. 細胞内構造の構築と機能の観察法

微小管とアクチン繊維/細胞膜ゴーストを用いた細胞骨格の観察/細胞壁の観察/plasmodesmataの機能の観察/パッチクランプによるチャンネルの解析/細胞内オルガネラの生体観察/pHの変化の観察/細胞内カルシウム濃度変化の観察

付録

有用細胞培養とその利用法: タバコBY-2培養細胞/染色試薬一覧/遺伝子ベクターのマップと入手先



秀潤社

〒106 東京都港区西麻布4-15-21 第6興和ビル7階
TEL.03-3409-6121 (代表) FAX.03-5485-7715

植物ホルモン ハンドブック 全2巻

高橋信孝・増田芳雄共編

A5判 上巻 672頁 定価 9270円

下巻 448頁 定価 7210円

セット価格 定価 14832円

植物ホルモンの化学、生理、生化学および農業・園芸への応用など研究成果の概要と主要な文献を整理してまとめた。上巻では総論およびジベレリン、オーキシン、サイトカイニンについて、その研究状況を紹介。下巻では、アブシジン酸、エチレン、プラシノステロイドおよび天然植物生長調節物質、除草剤、植物化学調節剤について、化学、合成と代謝、個体から分子レベル迄の生理作用等を主要な文献と共にまとめた。

微生物バイオテクノロジー

A. N. Glazer & H. Nikaido共著

斎藤日向 他共訳

B5・480頁 定価 7828円

農学・医学・薬学・化学工学など、多分野にわたる微生物バイオテクノロジーを体系づけて集大成した解説書。カリフォルニア大学バークレー校のテキストとして1995年に出版された原書の翻訳で、最新の情報が満載。

プロテインバイオテクノロジー

=単離, キャラクタリゼーション, 安定化

F. フランクス編/若林俊樹監訳

A5・448頁 定価 6180円

In vivo, in vitroのタンパク質を取り扱う種々の手法の基礎的な事柄から経済・臨床・科学技術面までを詳述。これら諸問題への独自の包括的なアプローチにより、タンパク質化学の全貌が掌握できる他に類をみない書。

〒102 東京都千代田区九段南4-3-12

培風館

TEL (03) 3262-5256 振替 00140-7-44725

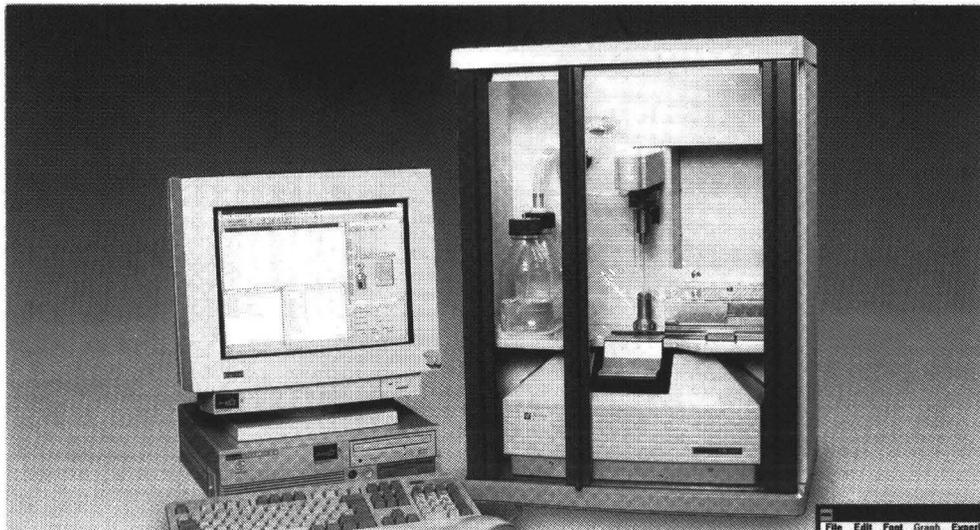
日製産業



生体分子間相互作用解析装置

IAsys Auto+

ご好評いただいているIAsysキュベットシステムに
オートサンプラータイプが新登場!!

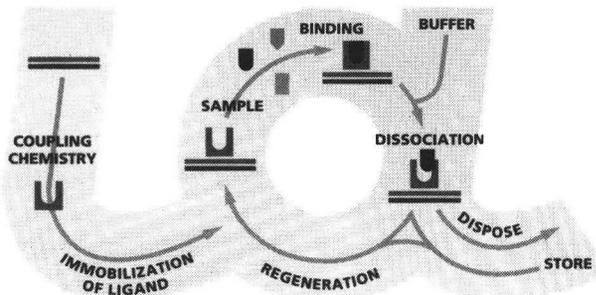
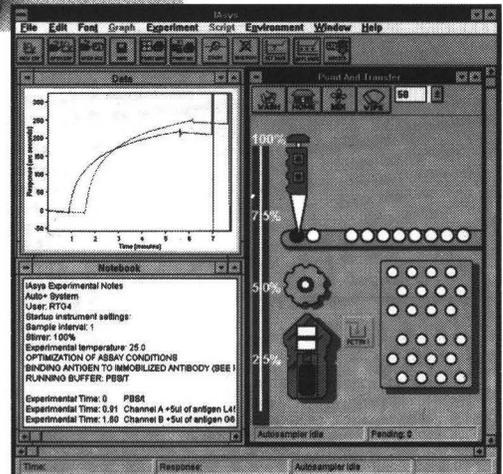


IAsys Auto+ provides the best in choice and flexible performance for real-time biomolecular interaction analysis.

生体分子間の相互作用をリアルタイム、
ノンラベルでモニターします。

従来の機能に加えて

- 2サンプル同時測定
- Point and Transfer (PAT), Adaptive Sequence Kontrol (ASK)の採用で、測定条件検討から全自動の High Throughput Screeningまで柔軟に対応
- 96穴マイクロプレート2枚装着可能



分子-分子間、分子-細胞間等の

- * 分子認識
- * 親和性解析
- * カイネティクス
- * 濃度検定
- * 多分子、多段階相互作用

の研究効率が飛躍的に向上

お問い合わせは

日製産業株式会社
科学システム輸入部
(03)3504-7713

本社 〒105 東京都港区西新橋1-24-14 電話 東京(03)3504-7211(ダイヤルイン)

事業部 札幌(011)221-7241 仙台(022)264-2211 筑波(0298)23-7391 北関東(0486)53-2341 西関東(0426)43-0080
 横浜(045)451-5151 新潟(025)241-3011 北陸(0764)24-3386 名古屋(052)583-5841 京都(075)241-1591
 大阪(06)366-2551 四国(0878)62-3391 広島(082)221-4514 九州(092)721-3501 沖縄(0988)78-1311

研ぎ澄まされて、純米大吟醸の頂。

月桂冠の初代、大倉六郎右衛門。
山城国、笠置荘から伏見に出て酒造りを始めた。
屋号「笠置屋」。時に寛永十四年（一六三七年）。
以来、酒造り一筋。ひたすら旨い酒を追い求め続け
いま、初志に立ち返り思いのすべてを込め
酒造りの頂点たる吟醸酒の逸品を極めました。
研ぎ澄まされて、純米大吟醸の頂。



お酒は20歳になってから。
お酒はおいしく適量を。



清酒 1,800ml 1,000円 価格に7%の消費税(消費税込)

月桂冠
笠置屋

純米大吟醸

月桂冠
笠置屋

月桂冠
笠置屋

純米大吟醸

月桂冠株式会社

Visit Our Home Page

JSPP AND PCP
ON THE WEB

at

<http://www.nacos.com/jspp>

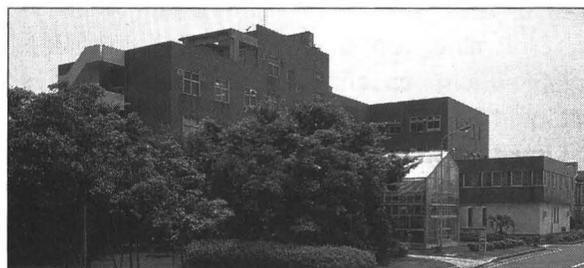
Information includes:

1. Titles and abstracts of papers in current issues of *Plant and Cell Physiology* and PAPERS IN PRESS
2. Instructions for contributors to *Plant and Cell Physiology*
3. Membership application to Japanese Society of Plant Physiologists
4. The 1997 annual meeting in Kyoto

21 世紀の食品には
心と体に健康的な
”賢いおいしさ“が必要です。
私達は植物性の
油脂とたん白で
新しい生活産業を考える
知的フロンティア集団。
新ベジテーションの潮流を
築きあげます。



つくば研究開発センター



阪南研究開発センター

■不二製油の主要製品

食用油、精製油、製菓用油脂、チョコレート、マーガリン、植物性クリーム、
植物性チーズ、粉末状大豆たん白、粒状大豆たん白、繊維状大豆たん白、
大豆たん白食品、大豆からあげ

不二製油株式会社

本社／大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号 TEL.(06)213-8151(代表)
支店／東京・福岡・名古屋 営業所／札幌・仙台・広島

ラジオアッセイ(^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{45}Ca , ^{32}P , ^{51}Cr , ^{125}I)とルミネッセンスアッセイに激変をもたらした
マイクロプレート
シンチレーション/ルミネッセンスカウンター

トップカウント (Top Count) HTS

超高速・大量・正確・測定に

- ラジオアッセイ及びルミネッセンスアッセイを、マイクロプレートを用いて一度に同時に最大12ウェルずつ測定することができます。
- 384ウェル、96ウェル、24ウェルマイクロプレートの使用が可能です。



◆下記のような最先端の研究、開発に画期的な役割を果たします。

■ **Luminescence**

- Reporter genes
- Immunoassay
- Luminescent ELISA
- DNA Capture
- ATp assays
- Cell assays
- Bioluminescence
- Glow luminescence

■ **Liquid Scintillation**

- Liquid samples:
- Enzyme assays
 - Chromium release
 - Fraction collection

-Perfusion assays

- Dual label DPM

■ **Coated-well assays:**

- RIA/IRMA
- Antibody bound receptors
- Protein adhesion
- Biotin-streptavidin
- PCR screening

■ **Filtration assays:**

- Cell proliferation
- Receptor binding
- Cytotoxicity by DNA degradation
- Multiscreen[®] arrays
- Precipitates

■ **Tissue culture:**

- Adherent cell proliferation
- Whole cell receptor binding
- Drug uptake
- Membrane transport
- Cell adhesion

■ **Solid Scintillation**

■ **Enzyme assays**

■ **Chromium release**

■ **Fraction collection**

■ **Supernatants**

■ **SPA**

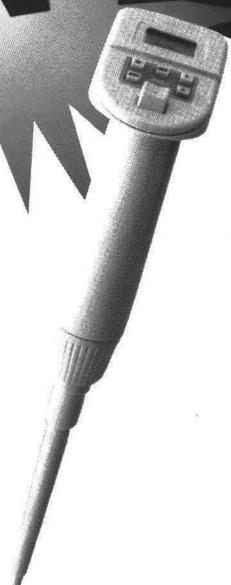
■ **Flash Plate[™] Assay**

上記各応用例毎の“文献”が多数用意(#TCA-001~028)されております。ご請求下さい。

電動デジタルピペット EDP2

ピペッティングテクノロジーが
更に一歩前進!

- 連続分注可能
- 容量設定が簡単
- より精度よく、再現性よく
- 約100,000回ピペッティング可能
- スピードは高速、標準の2種類



モデル	推奨使用範囲	最小設定	適合チップ	本体価格
E2-10	0.5 μ l ~ 10 μ l	0.02 μ l	RT-10	45,000円
E2-25	2.5 μ l ~ 25 μ l	0.1 μ l	RT-96	45,000円
E2-100	10 μ l ~ 100 μ l	0.2 μ l	RT-96	45,000円
E2-250	25 μ l ~ 250 μ l	1 μ l	RT-96	45,000円
E2-1000	100 μ l ~ 1000 μ l	2 μ l	RT-200	45,000円
E2-2500	250 μ l ~ 2500 μ l	10 μ l	RC-2500	45,000円

※各モデル共、リチウム電池標準付属

●日本総代理店

WAKEN 和研薬株式会社
WAKENYAKU CO., LTD.

管理本部 〒606京都市左京区一乗寺築田町38番地の7
(西日本営業部) TEL. (075)721-8111(代) FAX. (075)721-8189
東日本営業部 〒101東京都千代田区神田須田町2丁目1番地本間ビル8F
(東京営業所) TEL. (03)3258-0291(代) FAX. (03)3258-0440
本社 (075)721-8111(代) 京阪奈 (0774)65-2521(代) 滋賀 (0775)68-2481(代)

●製造元
RAININ 社
INSTRUMENT CO., INC.

nacalai tesque
The quality for certainty.

細胞生物学シリーズカタログ

カタログ
配布中

アポトーシス } 関連製品を
シグナル伝達 }

多く取り揃えました。

カタログのご請求は下記まで。

ナカライテスク株式会社
604 京都市中京区二条通烏丸西入ル
お問い合わせ先 TEL(06)381 8121

北営業所 TEL(075)231-5301
南営業所 TEL(075)922-1171
滋賀営業所 TEL(0775)81-3610
京阪奈営業所 TEL(0742)35-2001
大阪営業所 TEL(06)381-3621
神戸営業所 TEL(078)351-1222

東京営業所 TEL(03)3242-5881
神奈川営業所 TEL(0462)72-2022
埼玉営業所 TEL(048)468-7785
岡山営業所 TEL(086)254-1418
福岡営業所 TEL(092)474-2341