

B2a-05

モノデヒドロアスコルビン酸ラジカル測定による水ストレス下のレタス (*Lactuca sativa* LINN) 葉の初期変化の解析
堂前喜章、樋口浩和、縄田栄治、真野純一¹ (京都大・農、¹京都大・食糧科学研)

酸化ストレスの内在性プローブであるモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル(MDA)を電子スピン共鳴法(ESR)により測定することによって、水ストレス下でのレタス葉における初期変化を解析した。

発芽後3週間水耕栽培したレタスの根にポリエチレングリコール 8000(PEG)溶液により水ストレスを与えた後、葉の切片に減圧吸引により0.1mMメチルビオローゲン(MV)を与え、照射下で生成するMDAのシグナル強度を測定した。

室内光照射下、PEG4%~8%、3時間以内の処理では植物体に外見上の変化(しおれ、退色)は現れなかったが、MV+光によるMDA生成はPEG濃度、処理時間に依存して、無処理植物の3倍まで増大した。8%PEG、3時間処理後、植物体を水に戻すとMDAレベルはその後3時間で無処理のレベルにまで減少した。一方、4時間処理では、MDAレベルは3時間処理に比べ減少し、また水に戻してもMDAレベルはそれ以下には減少しなかった。このMDAの不可逆的な変化は、水ストレスによる葉組織の不可逆的な初期変化を反映していると考えられる。

B2a-06

膜脂質の不飽和化は光合成を光阻害から保護する
：その分子機構の解析

Katja SIPPOLA, Eira. KANERVO, Eva -Mari ARO, Zoltan. GOMBOS¹, 村田紀夫¹ (トルク大学、基生研¹)

我々は以前に、*Synechococcus* sp. PCC 7942 を *Synechocystis* sp. PCC 6803 の *desA* 遺伝子 ($\Delta 12$ 不飽和化酵素をコードする) で形質転換すると膜脂質がより不飽和化され、その結果光合成機構は低温耐性になることを報告した。今回の研究では、*Synechococcus* の膜脂質の不飽和化が光化学系II複合体を光阻害(特に低温下における)から保護することを明らかにした。またウエスタンブロット実験の結果は、膜脂質の不飽和化が光化学系II複合体のD1タンパク質のD1:2型の生合成活性を低温下においても高レベルに保つことを明らかにした。またノザンブロット実験の結果は、膜脂質の不飽和化が *psbA* II/III 遺伝子 (D1:2タンパク質の遺伝子) の翻訳を促進することを明らかにした。

B2a-07

海産微細藻の光合成と培地中のNaCl濃度との関係
鈴木聖子、足立恭子、丸山正¹、加藤美砂子²、志津里芳一、宮地重遠 (海洋バイオテクノロジー研・清水研、同釜石研¹、お茶大・理・生²)

高CO₂耐性海産微細藻 *Chlorococcum littorale* の¹⁴CO₂ 固定産物には他の多くの微細藻と異なり、グリセロールが検出された。この合成速度は培地中のNaCl濃度(1.4%)に比例して大きくなったのに対し、澱粉の合成速度は減少した。培地中のNaCl濃度を生育NaCl濃度である3%から0-5%に変化後10分間¹⁴CO₂固定させた場合にも、NaCl濃度と同様に対応したグリセロールと澱粉の合成速度の変化が認められた。また細胞内のグリセロール濃度は、培地中のNaCl濃度の増加(0-4%)に応じて増加(0-15 μ g/ μ l細胞)した。一方海産微細藻 *Chlorella saccharophila* var. *oceanica* では、¹⁴CO₂ 固定産物にリビトールが認められ、この蓄積量は培地中のNaCl濃度(0-3%)に応じて増加した。これらの結果は、海産微細藻類が藻によって異なった浸透圧調整物質を光合成することを示唆する。

B2a-08

コムギ葉の老化過程における弱光環境下でのCF₁の特異的減少は炭酸固定能力に影響を及ぼさない
鈴木雄二、牧野周、前忠彦 (東北大・農・応生化)

昨年度の本大会において、私たちはコムギ葉を老化過程において弱光環境においた場合CF₁が特異的に減少することを報告した。本報告ではこのCF₁の減少が炭酸固定能力に影響を及ぼすかについて述べる。

コムギは人工気象室内で光強度400 μ mol quanta m⁻² s⁻¹にて栽培し、第4葉完全展開後2日目から光強度がそのままの対照区と寒冷紗を用いた弱光処理(100 μ mol quanta m⁻² s⁻¹)区を設け栽培を継続した。第4葉を老化過程を通じサンプルとして使用した。

光飽和、葉内CO₂分圧(pCi)が20PaのRubisco活性化率を測定したところ、対照区と弱光処理区との間に大きな差は見られなかった。更に、光合成速度のpCiレスポンスカーブを測定した。それぞれのカーブについてpCi=9Paの光合成速度で相対化したところ、pCi>60Paの光合成速度は弱光処理区の方が低かったが、初期勾配(pCi=20Paまで)に生育光環境による差は認められなかった。

以上から、コムギ葉の老化過程における弱光環境に対するCF₁の特異的減少は、低CO₂分圧下での炭酸固定能力に影響を及ぼさない程度のものであることが明らかとなった。

B2a-09

カリフラワー水溶性クロロフィル蛋白質の多様性

西尾直美、中山克己、岡田光正(東邦大・理・生物分子)

アブラナ科植物に存在する水溶性クロロフィル蛋白質(WSCP)は22 kDのポリペプチドからなり、乾燥ストレスで誘導される生理機能の不明な色素蛋白質である。これまでに、抽出材料とした器官によりスペクトルやイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出パターンが異なるなど多様な性質を示すことが明らかになっている。最近、31kDと18kDのポリペプチドにもクロロフィルが結合していることを確認し、これまで知られていなかったWSCPの存在を確認した。これらのポリペプチドは、ゲルろ過クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出パターンからWSCPの22 kDポリペプチドと高い親和性をもつことが明らかになり、WSCPのスペクトルの多様性の一因である可能性が考えられた。また、葉と茎からクロロフィルを保持した状態でサブユニットを分離してスペクトルを比較したところ、色素間のエネルギー移動の違いが認められた。これらのエネルギー移動の違いと器官によるスペクトルの違いとの関連について報告する。

B2a-10

THE INVOLVEMENT OF FATTY ACID UNSATURATION OF MEMBRANE LIPIDS IN SALT TOLERANCE OF *Synechocystis*
Suleyman I. ALLAKHVERDIEV and Norio MURATA;
Natl. Inst. Basic Biol., Okazaki 444

The role of membrane lipid unsaturation in the tolerance of the photosynthetic machinery toward salt stress was studied by use of the fatty acid double mutant *desA⁻/desD⁻* of the *Synechocystis* sp. PCC 6803, in which polyunsaturated fatty acids were genetically replaced by monounsaturated fatty acids. The growth of the *desA⁻/desD⁻* cells in 0.5 M NaCl was significantly slower than the wild-type cells. In 1.0 M NaCl, the *desA⁻/desD⁻* cells were unable to grow, whereas the wild-type cells grew but slowly. The increased sensitivity of the mutant cells toward the salt stress was caused by a decrease in the activity of Na⁺/H⁺ antiporter due to the saturation of membrane lipids.

B2a-11

葉緑体のネオキサンチンは全て 9'-シス型である
高市真一、三室守(日本医大・生物、山口大・理)

光合成器官には数種類のカロテノイド色素が存在し、その立体異性は総て全トランス型と考えられているが、ネオキサンチンはシス体である可能性が示唆されている。そこで高等植物から藻類まで約110種の光合成器官、約50種の非光合成器官を分析した。

Chl a/bを含む高等植物、藻類の葉緑体には9'-シス型ネオキサンチンのみ存在し、全トランス型は検出できなかった。Chl a/cを持つ藻類、Chl aのみを持つ藻類、原核藻類からはネオキサンチンを検出できなかった。一方、非光合成器官では9'-シス型のみ、全トランス型のみ、両者存在、存在しないの4種類があった。

従って、葉緑体に存在するネオキサンチンは総て9'-シス型で、全トランス型は存在しないことを示している。系統発生からはChl bの存在と、9'-シス型の存在が一致した。ピオラキサンチンからネオキサンチンへの合成とシス異性化が同時に酵素によりなされていると考えられる。

ネオキサンチンの機能は明確でない。両異性体の吸収スペクトルには差異が少ないので、光捕集や保護などの機能には差異がないと考えられる。一方、9'-シス・ネオキサンチンから合成されたシス ABAは生理活性がある。ネオキサンチンの立体異性はABA合成との関連が大きいことが示唆された。

B2a-12

高等植物のシアン耐性呼吸経路の活性測定

野口航、上田真吾¹、高春心¹、寺島一郎²、吉成正³
(筑波大・生物科学、¹通産省・工業技術院・資源環境技術総合研究所、²大阪大・理・生物、³Wadsworth Center, State University of New York, NY)

高等植物の呼吸経路には、シトクロム経路のほかに、ATPを生産しないシアン耐性経路がある。もし、このシアン耐性経路に全ての電子が流れてしまうと、得られるATPエネルギー量は、最大量の1/2以下に抑えられてしまう。したがって、このシアン耐性経路の寄与率を測定することは、シアン耐性経路の生理的な役割を知るための前提となるばかりでなく、呼吸系から得られるエネルギー生産速度を知る上でも必須である。シトクロム経路とシアン耐性経路のそれぞれ末端酸化酵素は、酸素の安定同位体分別が異なることが知られている。現在、*in vivo*において、それぞれの経路の寄与率を正確に知るためには、この分別の違いを利用するしかない。本研究では、シアン耐性経路の寄与率・酸素吸収速度を同時測定できるシステムを開発した(世界で3カ所目)。このシステムでは、市販の気相型の酸素測定チェンバーから10~20 μLという微量の酸素を取り出し、酸素の安定同位体測定を行うことができる。このシステムを用いて、夜間の呼吸速度の低い陰生植物の葉と速度の高い陽生植物の葉の、酸素吸収速度とシアン耐性経路の寄与率とを測定した。その結果、陰生植物のクワズイモの葉では、シアン耐性経路の寄与率は低く、効率の良い呼吸が行われていることが明らかになった。

B2p-01

アンチセンスRNAによりNADH依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) の発現を変化させたトランスジェニックイネの作出

石井有理、早川俊彦、山谷知行 (東北大・農・応用生物化学)

イネの根における NH_4^+ の同化や、生長中の若い組織での転流窒素の再同化に深く関わっていると示唆されるNADH-GOGATの、生体内での機能の解明を目的とし、その発現を変化させたトランスジェニックイネの作出を試みた。NADH-GOGATのcDNA断片(856bp)を、アンチセンス方向に組み込んだTiプラスミドベクターをもつアグロバクテリウム(*A. tumefaciens*)を用い、イネ(*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki)の形質転換を行なった。その結果、8系統の形質転換カルスが得られ、そのうち4系統については非形質転換カルスよりもNADH-GOGATの蛋白質量が20%~70%減少している傾向が見られた。そこで、これらの系統について再分化植物を育成し、当代におけるゲノムDNAの解析をおこなった。その結果、すべての個体にアンチセンスDNAが組み込まれており、2~6コピーの導入遺伝子がゲノムに組み込まれている事が判明した。

B2p-02

イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 cDNA の構造解析
赤川 巧、早川俊彦、日野陸美、後藤 聡¹、山谷知行
(東北大学・農・応生化、¹フラワースセンター21 あおもり)

イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) は、シンク組織において転流窒素再利用の初期反応に機能し、根においては NH_4^+ の初期同化に関与している事が示唆されている。NADH-GOGAT cDNA は、高等植物ではアルファルファの根粒から単離されているのみで、根粒以外の通常の植物組織内から単離された例はなかった。本研究では、イネ NADH-GOGAT cDNA を単離し、塩基配列の決定を行った。

1 mM NH_4^+ で処理したイネ幼植物根の cDNA library から、当研究室で単離したイネ NADH-GOGAT ゲノム DNA の exon 2 と 17 に相当する領域をプローブとしてスクリーニングを行い、完全長の cDNA クローン (7,047 bp) を単離し、塩基配列を決定した。解析の結果、単離したクローンの塩基配列は、イネ NADH-GOGAT 遺伝子の転写領域と 99.9% 以上が一致し、推定されるアミノ酸配列中には、イネの培養細胞から精製し決定した、NADH-GOGAT のアミノ酸配列が確認された。さらに、推定されるアミノ酸配列は、アルファルファの NADH-GOGAT など高い相同性を示した。

また、イネ NADH-GOGAT ゲノム DNA と cDNA の構造比較、さらに primer extension analysis によって、この遺伝子にはアルファルファには見られない、アミノ酸をコードしない exon が存在する事が明らかとなった。

B2p-03

イネ根におけるグルタミン酸合成酵素タンパク質と mRNA の発現解析
石山敬貴、早川俊彦、山谷知行 (東北大・農・応生化)

イネ根において、 NH_4^+ の供給に伴い、NADH-グルタミン酸合成酵素(GOGAT)が、特異的に根端の表皮と外皮に蓄積されることがアビジン-ビオチン法による免疫組織学的な解析から判明した¹⁾。一方、 NH_4^+ 供給の有無に関わらず中心柱においても、NADH-GOGATとFd-GOGATのシグナルは検出されており、イネ根におけるGOGATの機能の解析がさらに必要である。本報告では、NADH-GOGATとFd-GOGATの mRNA、並びにタンパク質の発現している細胞のより詳細な解析を行った。

先の結果に一致して、イネ根の根端で、 NH_4^+ 供給前には検出されなかったNADH-GOGATタンパク質が、供給後で、主に表皮と外皮に検出された。一方、Fd-GOGATタンパク質は、根端の皮層と中心柱に恒常的に検出された。NADH-GOGATとFd-GOGATタンパク質が、イネ根の根端で相補する状態で存在していることは、二つのGOGATが、根の窒素代謝において機能分担をしていることを示唆する。

さらに、イネ根のNADH-GOGATが、mRNAレベルで発現制御がなされていることより²⁾、現在、*in situ* hybridization法を用いて、NADH-GOGAT mRNAの組織レベルでの解析を行っている。

1) Ishiyama *et al* (1998) *Planta* in press.

2) Hirose *et al* (1997) *Plant Cell Physiol.* 37(7): 1034

B2p-04

イネNADH依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) 遺伝子の窒素による発現制御
広瀬直也、山谷知行 (東北大・農・応用生物化学)

イネ幼植物根におけるNADH-GOGAT遺伝子の発現は、窒素源の供給により顕著に誘導される¹⁾。今回我々は、この遺伝子の窒素による発現制御の制御点をmRNAレベルで調べ、発現誘導に関与する代謝シグナルの同定を試みた。

ガラス室で発芽後26日間種子栄養が枯渇するまで水のみにて栽培したイネ幼植物根に、1mM NH_4^+ を供給し、根のNADH-GOGAT mRNAの変動をノーザン解析した。NADH-GOGAT mRNA蓄積量は、窒素供給後3時間以内で一過性に増加した。この増加は、シクロヘキシミドによる阻害を受けず、新規のタンパク質合成に非依存的であった。一方、この増加は、1mM MSXにより完全に阻害されたが、グルタミンの供給によって阻害効果が解消された。グルタミン以外のアミノ酸や植物ホルモンなどではこのような効果認められなかったことから、グルタミンあるいはグルタミン以降の代謝産物がNADH-GOGAT mRNA蓄積量増加の代謝シグナルとして機能している可能性が示唆された²⁾。現在、代謝シグナルのさらなる探索及び窒素供給によるNADH-GOGAT mRNA蓄積量の増加に対するmRNAの安定性の寄与に関して解析中である。

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

2) Hirose *et al* (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:1295

B2p-05

日本型、インド型、ジャワ型イネの老化葉身におけるグルタミン合成酵素と未抽出葉身におけるグルタミン酸合成酵素のタンパク質含量と組織内分布の比較

小原実広, 梶浦真, 早川俊彦, 佐藤雅志¹, 山谷知行 (東北大・農・応生化,¹東北大・遺生研)

ササニシキの窒素転流には、老化葉身における細胞質型グルタミン合成酵素 (GS1) と若い未抽出葉身などのシンク器官における NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) が、重要な機能を担うと考えられる。予備的な検討から、インド型のある品種では、ササニシキに比較して GS1 含量が高い結果を得た¹⁾。そこで、GS 含量並びに GOGAT 含量の差を明確にするために、日本型、インド型、ジャワ型イネそれぞれ 5, 9, 2 品種を供試して比較した。

ガラス室内にて土耕栽培を行い、約 9.5 齢時に葉身を収穫した。老化葉身における生重当たりの GS1 含量は多くのインド型で高く、一方葉緑体型 GS (GS2) 含量には大きな差異がないことが明らかになった。インド型イネでもササニシキと同様に、GS1 タンパク質は、維管束組織の伴細胞、師部柔細胞、木部柔細胞に、また GS2 タンパク質は葉肉細胞に分布していた。GOGATs 含量と組織内分布に関しては、現在解析中である。

1) Yamaya et al. (1997) *Soil Sci. Plant Nutr.* 1107-1112

B2p-06

イネ形質転換系を用いたイネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) 遺伝子のプロモーター領域の解析

小島創一、高橋史絵、後藤聡、早川俊彦、山谷知行 (東北大・農・応用生物化学)

イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) は、未抽出葉身や登熟初期の穎果の維管束組織に局在する。また、イネ幼植物の根においては、窒素環境に応答してタンパク質及び mRNA の発現量が短時間に著しく増加する。

これら時期特異的・組織特異的発現、および窒素環境に応じた発現制御機構を解明する第一歩として、NADH-GOGAT 遺伝子の開始コドン上流域 3721bp に GUS 遺伝子を連結した融合遺伝子をアグロバクテリウムを用いてイネに形質導入した。R0 世代について GUS 活性の発現する組織を調べたところ、主に葉の維管束組織、根の中心柱に強い GUS 活性が観察された。現在より詳細な解析を行っている。

B2p-07

免疫電子顕微鏡法によるイネ根 NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) の細胞内局在解析
早川俊彦, Laura Hopkins¹, Alyson K Tobin¹, 山谷知行 (東北大・農・応用生物化学,¹Dept. Biol. and Med. Science, St. Andrews Univ., KY16 9TH, U.K.)

NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) タンパク質は、24 時間 1 mM NH_4^+ 処理したイネ幼植物根において、皮層、中心柱柔細胞群に加え、特に表皮、外皮の細胞群で著増する¹⁾。また、イネ根 NADH-GOGAT 前駆体タンパク質は、N 末端に 99 アミノ酸残基のプレ配列を有する²⁾。イネ根における NADH-GOGAT タンパク質の細胞内局在性を検証するため、高度にアフィニティー精製した抗イネ NADH-GOGAT 抗体を用いて免疫電子顕微鏡解析を行った。

24 時間 1 mM NH_4^+ 処理したイネ幼植物根において、NADH-GOGAT タンパク質の分布を示す金粒子は、表皮、皮層柔細胞、中心柱柔細胞群のプラスチドに主に観察された。また、これらのイネ根の各細胞群のプラスチドにおける金粒子の平均標識密度は、約 150 (金粒子数/ μm^2) と、ほぼ同程度であった。これより、イネ根 NADH-GOGAT タンパク質のプラスチド局在が確認された。以上の結果は、イネ根における表皮細胞群での外部供給された NH_4^+ の同化系や中心柱細胞群でのソース組織から転送されたグルタミンの同化系において、プラスチド内の NADH-GOGAT によるグルタミン酸合成反応が重要であることを強く示唆した。

1) Ishiyama et al. (1998) *Planta Inpress.*

2) Akagawa et al. 1998 年度本大会。

B2p-08

トウモロコシのグルタミン合成酵素アイソザイム間での安定性の違いに関わるアミノ酸残基の同定
榊原 均,¹長谷俊治, 杉山達夫 (名古屋大院・生命農学,¹大阪大・蛋白研)

トウモロコシの細胞質基質局在型グルタミン合成酵素 (GS1) は多重遺伝子族を構成しており、窒素源に対する応答から、誘導型 (GS1c, GS1d) と構成型 (GS1a, GS1b) に大別される。両 GS1 分子種はアミノ酸レベルで約 85% の同一性を持つものの、酵素化学的性質は大きく異なる。つまり、GS1d は GS1a に対し高い比活性を持つが、熱安定性、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} の生理的濃度下での 8 量体構造保持力などにおいて極めて不安定である [JBC 271: 29561 (1996)]。本研究では両分子種間での化学的性質の違いを律する領域・アミノ酸残基の同定を試みた。GS1a, GS1d をタンデムに連結したプラスミドを構築し、*recA*⁺ 大腸菌内での相同組換えにより、任意の場所で組換えを起こした GS1a/GS1d のキメラ酵素を多数作製した。キメラ酵素の 2 価金属イオン依存的な安定性を調べ、安定性に変化を与える領域を絞り込んだ。次に、その領域内で、GS1a と GS1d の間で保存されていない 7 つのアミノ酸残基について GS1a 上のアミノ酸を順に GS1d 型へ置換し、その影響を調べたところ、GS1a の Ile₁₆₁ → Ala₁₆₁ への置換体で安定性が大きく低下した。このことは、161 番目の疎水性アミノ酸残基側鎖の性質が、GS1a, GS1d 間での 2 価金属イオン依存的な安定性の違いに深く関与していることを示唆している。

B2p-09

アンチセンスNiRcDNA導入タバコから発生する亜酸化窒素 (N_2O) の代謝経路の解析

五島直樹、向井敏浩、Michel Caboche¹、森川弘道
(広島大・理・遺伝子科学、¹Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA)

亜硝酸還元酵素 (NiR) 活性を欠損させたトランスジェニックタバコ植物 (271株) において、硝酸イオン (NO_3^-) から亜酸化窒素 (N_2O) が生じ、大気中に放出される脱窒反応が起こっていることを、我々はこれまでに同位体質量分析計を用いて明らかにしてきた。この亜酸化窒素の発生経路を推測するために、生育時の光条件を変化させたり、硝酸還元酵素 (NR) の阻害剤であるタングステン酸で処理した271株において、硝酸イオンから亜酸化窒素への発生量を測定した。また、アンモニウムイオン (NH_4^+) の窒素が亜酸化窒素の発生に利用されるかについて調べた。その結果、アンモニウムイオンからの亜酸化窒素の発生は認められず、硝酸イオンは亜硝酸イオン (NO_2^-) を経て、亜酸化窒素に還元されると考えられ、直接もしくは間接的に光エネルギーを利用していると考えられた。この硝酸イオンから亜酸化窒素発生系の経路について考察を行う。

B2p-10

植物における亜硝酸還元酵素を介さない硝酸還元について

高橋美佐、原紀代美、Caboche, Michel¹、森川弘道
(広島大・理・遺伝子科学、¹Lab Biologie Cellulaire, INRA)

亜硝酸還元酵素 (NiR) は硝酸還元系の2番目の酵素で硝酸還元必須と考えられている。我々は、NiR活性を欠く植物も硝酸還元することを見出したので、その結果について報告する。

植物材料として、タバコのNiR cDNAのアンチセンス鎖を導入したトランスジェニック・タバコ植物 (Vaucheret et al. 1992) を無菌条件下で育てて実験に用いた。このタバコはNiR活性を持たない。5週間生育させた植物体を10 mM ^{15}N KNO₃ (10 atm%) を含む培地に移植し、1-2週間培養した後、葉を採取、乾燥後ケルダール分解により調製した還元態窒素画分を同位体質量分析計でも解析した。遺伝子導入していない野生株についても同様に解析した。

その結果、トランスジェニックタバコ植物において野生株とほぼ同じレベルの ^{15}N ラベルの還元態窒素量 (^{15}N 量; 1.62 mg/g DW, ^{15}N 存在比; 2.7 atom% excess) が認められた。この結果はこの植物にはNiRを介さない硝酸還元系が存在することを示唆するものである。

Vaucheret et al. 1992 Plant J. 2: 559-569

B2p-11

植物葉に取り込まれた二酸化窒素ガス窒素の代謝的運命
有村源一郎、五島直樹、森川弘道 (広島大・理・遺伝子科学)

高等植物は大気中の二酸化窒素 (NO_2) を葉から吸収し代謝する能力を有する。これまで、植物に取り込まれた NO_2 は植物中の水と反応して硝酸、亜硝酸イオンとなり、根から取り込まれた硝酸と同様に代謝されると考えられてきた。我々は二酸化窒素に含まれる窒素 (NO_2-N) は植物葉に取り込まれた後、硝酸窒素 (NO_3^-N) とは異なる代謝的運命をたどることを見いだしたので、その結果について報告する。

シロイヌナズナ植物を重窒素ラベルした NO_2 (0.1または4ppm) で曝露後、葉中の全窒素、還元態窒素および硝酸/亜硝酸態窒素画分中の ^{15}N 量を質量分析し、各画分中の NO_2-N 量を決定した。還元態窒素はケルダール分解法により調製した。また、葉抽出液をDowex 50カラム処理で調製した硝酸/亜硝酸態窒素画分をデバルタ合金でアンモニアに還元、コンウェア法により濃縮後、質量分析して硝酸/亜硝酸態窒素画分中の NO_2-N 量を決定した。

その結果、葉に取り込まれた全 NO_2-N の70~75%が還元態窒素、硝酸/亜硝酸態窒素画分は1~2%であり、全窒素 = (還元態窒素) + (硝酸/亜硝酸態窒素) とはならなかった。他方、シロイヌナズナ根に ^{15}N ラベルのKNO₃ (1または50mM) 処理を行った植物葉では、全窒素 = (還元態窒素=40~50%) + (硝酸/亜硝酸態窒素=40~60%) の関係が実験誤差内で成立した。

NO_2-N の「未同定」(全 NO_2-N の25~30%) は、葉抽出液の上澄画分にあること、シンプラスト画分にあること、ゲルクロマトによりアミノ酸またはそれ以下の低分子化合物であることがなどが明らかとなった。現在、この窒素化合物の同定を更に進めている。

B2p-12

従属栄養硝化細菌 *Alcaligenes faecalis* による硝化の生理的意義

榎屋 温、大野泰史、星野芳子、増子大輔、若島正典、庄子和夫、山中健生 (日大・理工・工化)

独立栄養硝化細菌による硝化はエネルギー獲得過程であることがよくわかっている。しかし、従属栄養硝化細菌による硝化の生理的意義についてはまだよくわかっていない。われわれは従属栄養硝化細菌 *Alcaligenes faecalis* IFO 13111 を用い種々の条件下に硝化を行わせ、細胞中のATP量の変動をATPアナライザーにより調べることによりその硝化の生理的意義を明らかにしようとして本研究を行った。この細菌における硝化では、アンモニアからの亜硝酸の生成量の増加に伴い細胞内のATPの減少がみられた。しかし、加えるアンモニアが多くなるほど亜硝酸生成量が増加するというわけではなく、菌体当たりの亜硝酸生成量が高くなるというわけでもなかった。従って、この細菌による硝化はエネルギー獲得のためではないが、単に解毒のためだけでもないらしい。

B3a-01

ウレイド型、アミド型マメ科植物におけるウリカーゼ (nod-35) 遺伝子発現解析

新 康子, Cheng Xiang Guo, 野村美加, 高根健一¹, 河内 宏¹, 田島茂行 (香川大・¹農, 農水省生物研)

ダイズ (*Glycine max*)、インゲン (*Phaseolus*)、ササゲ (*Vigna*) などの根粒では、固定された窒素はウレイド生成に使用されるが、他のマメ科植物根粒ではアミドを転流物質とする。我々は、ウレイド生成の最終段階を触媒する酵素であるウリカーゼ (nod-35) の発現調節について研究してきているが、ダイズゲノムに存在する二つの nod-35 遺伝子 (UR2 と UR9) は様々なダイズ品種根粒で両方とも発現している事、UR9 は根粒組織の発達に伴って発現が感染組織内の非感染細胞特異的に増幅する事を既に報告している。本報告では、ウリカーゼ遺伝子発現をアラントインを通常蓄積しない組織・マメ科植物を含めて比較解析した結果を報告する。ダイズ植物では葉や種子の登熟中にも子葉組織で発現増幅するという事が見いだされたが、アルファアルファなどのアミド生産型のマメ科植物についても、ウリカーゼ遺伝子をクローニングし、組織別の発現解析を行った結果について報告する。

B3a-02

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* A1017 リンゴ酸酵素の生理的役割と遺伝子クローニング

田島茂行, 小佐野薫, 陳凡, 野村美加 (香川大・農)

根粒バクテロイドはスクロース分解利用能を失い、リンゴ酸などの C4-ジカルボン酸を単一の呼吸基質として利用している。我々は既にジカルボン酸を基質として TCA 回路が機能するために必要な補充系酵素群のうち、根粒バクテロイドでは malic enzyme が重要であることを報告しているが、本報告では窒素固定反応へのエネルギー代謝に深く関与していると思われる NAD-malic enzyme の生理学的意義とともに、遺伝子をダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* A1017 からクローニングした結果を報告する。

クローニングのため根粒菌 B.japonicum A1017 よりゲノミックライブラリーを作成し、他の微生物の NAD-malic enzyme の塩基配列で保存されていると思われる領域を元にディジェネレートプライマーを作成し得られた PCR 産物をプローブとして用い、ライブラリーのスクリーニングを行った。現在、遺伝子の解析を行っている。想定される生理的意義についても報告する。

B3a-03

Arabidopsis thaliana からのウリカーゼ遺伝子の単離とダイズ毛状根での発現解析
高根健一, 田島茂行¹, 河内宏 (農水省生物研, ¹香川大・農)

近年、代表的なノジュリンであるレグヘモグロビンにおいて、共生特異的に発現する遺伝子とそうでないものの存在が明らかになり、共生非特異的なヘモグロビン遺伝子は、イネやオオムギにも存在することが報告された。また、昨年、ノジュリンの1つであるウリカーゼについても、コムギから単離、精製された。これらのことから、マメ科以外の植物にも、ウリカーゼ (nod-35) 遺伝子が存在すると考えられた。

そこで、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* cv. columbia) の cDNA 及び、ゲノムライブラリーから、ウリカーゼ遺伝子を単離することを試みた。cDNA ライブラリーからのスクリーニングの結果、9個のポジティブクローンが得られ、最長のインサートを含んでいた cARBUr1 について、その塩基配列を決定した。予想されたアミノ酸配列は、ダイズ nod-35 と 70% の相同性を示した。また、ゲノムライブラリーからスクリーニングを行った結果、6個のポジティブクローンを得た。そこで、翻訳開始点から上流約 2.7Kb を含んでいた gARBUr1 について、ウリカーゼ遺伝子 (gARBUr1) とその近傍の全塩基配列を決定した。その結果、gARBUr1 の構造は、nod-35 と同様に 8 エクソンから成り、スプライシング部位もすべて同じであった。

また、gARBUr1 の翻訳開始点から上流約 2.7Kb を GUS と接続し、このキメラ遺伝子をダイズ毛状根に導入した。その結果、gARBUr1 は、毛状根や根粒の維管束系で発現し、根粒非感染細胞には発現しなかった。

以上のことは、ウリカーゼ遺伝子は全ての植物においてよく保存され、発現していることを示唆している。

B3a-04

ミヤコグサのレグヘモグロビン遺伝子の解析

内海俊樹¹, 永里朋香¹, 宮本旬子², 阿部美紀子¹, 東 四郎¹
(鹿兒島大・理・¹生命化学, ²地球環境科学)

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*, 2n=12) は、根粒菌との共生窒素固定研究におけるモデル植物として注目されている。根粒菌との共生系確立に関わる植物側の根粒特異的発現遺伝子としてノデュリン遺伝子を挙げることが出来る。根粒菌と関わりながら進化してきたと考えられるノデュリン遺伝子の染色体上での配置を明確にすることは、遺伝子発現の調節機構や染色体の系統進化の側面からも非常に興味深い。

本研究では、ミヤコグサを材料として、代表的なノデュリンであるレグヘモグロビン (Lb) の遺伝子を解析した。まず、Lb の cDNA の塩基配列 (591 bp) を決定した。この配列を基にプライマーを合成し、ミヤコグサの全ゲノム DNA より PCR にて Lb 遺伝子をクローニングして塩基配列を決定した。このゲノム由来の Lb 遺伝子と cDNA の配列は完全に一致した。ミヤコグサの Lb 遺伝子は、他のマメ科植物の Lb 遺伝子と異なり、イントロンを持たない可能性があることが判明した。次に、Lb 遺伝子をプローブとして中期染色体試料に対して *in situ* PCR/FISH 法を行った。その結果、2 番染色体に蛍光シグナルを検出することができた。

B3a-05

葉緑体遺伝子の発現に及ぼす coding region の影響

小林基、高岡康子、石倉清秀、加藤見、吉田和哉、新名惇彦
(奈良先端大・バイオ)

葉緑体内での遺伝子発現には、プロモーター領域に加えて構造遺伝子部分が必要な例がある。本研究では、葉緑体遺伝子である *rbcL* および *atpA* について、その遺伝子発現に与える構造遺伝子部分の影響を転写および翻訳レベルで調べた。レポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ (GUS) をコードする *GUS* を選び、*rbcL* と *atpA* のプロモーター領域および 5' 非翻訳領域による各種発現系を構築し、パーティクルガンにより緑藻クラミドモナス葉緑体の形質転換を行った。*rbcL* については、*rbcL* 構造遺伝子部分を含まないものと N 末端から 7 アミノ酸、11 アミノ酸、27 アミノ酸に相当する構造遺伝子部分をそれぞれ含むキメラ遺伝子を、また、*atpA* についても *atpA* 構造遺伝子を含まないものと N 末端から 25 アミノ酸に相当する構造遺伝子部分を含むキメラ遺伝子を構築し、葉緑体に導入した。得られた形質転換体を用いて、葉緑体内での GUS タンパク質並びに GUS 融合タンパク質の蓄積量を調べたところ、*rbcL* の場合、27 アミノ酸を融合した GUS 融合タンパク質が他の 3 種類に比べて蓄積量がかなり多く、*atpA* についても、GUS 融合タンパク質の方が GUS タンパク質より蓄積量が多かった。

B3a-06

ラン藻 *Synechococcus* PCC6301 ゲノムの整列クローンバンクの作製

杉田千恵子¹、金子貴一^{1, 2}、松林 徹¹、木村滋子¹、岡崎富美子¹、原由里子¹、小椋美知^{1, 3}、榎井厚子^{1, 3}、統 順子³、中島けい子³、杉田 麗¹、杉浦昌弘¹

(¹名古屋大学・遺伝子実験施設、²かずさ DNA 研究所、³福山女学園大学・生活科学)

単細胞性ラン藻 *Synechococcus* PCC6301 株のゲノムは 2.7 Mb の大きさをもつ。PCC6301 株のゲノム構造を詳細に調べるために、ゲノムの全領域をカバーする整列クローンバンクを作製することにした。ゲノム DNA を *Pme*I または *Swa*I で切断、または *Pme*I と *Swa*I で 2 重切断して得られた DNA 断片に特異的な λ DashII サプライブラリーを作製した。各サプライブラリーについて、遺伝子プローブやリンキングクローンを起点として、ウオーキング法によりクローンの整列化を進め、現在までに、ゲノム全体の約 70% をカバーする整列クローンバンクを作製した。さらに整列化した領域の遺伝子マッピングを行った結果、PCC6301 株と *Synechocystis* PCC6803 株の遺伝子地図が大きく異なることが判明した。

B3a-07

ラン藻 (*Synechocystis* sp. PCC6803) ゲノム全領域をカバーする高密度遺伝子フィルターの開発と利用
金子貴一、中村保一、佐藤修正、笹本茂美、田畑哲之 (かずさ DNA 研)

単細胞性ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 ゲノムの全塩基配列決定ならびに全遺伝子領域の推定については、昨年度の本大会で報告した。今回は、これらの成果をもとに、400~3,000bp の DNA 断片でラン藻の全ゲノムをカバーする高密度遺伝子フィルターを作製し、様々な条件で転写量が変化する遺伝子のスクリーニングを試みた。高密度遺伝子フィルターは、両末端部分の塩基配列が既知のゲノム配列決定用クローンをゲノムに沿って 5,762 個選抜し、挿入断片部分を PCR で増幅したものをナイロンメンブレンに高密度にスポットプロットすることにより作製した。PCC6803 を光独立栄養条件下で増殖後、暗処理を加えたものと加えなかったものから RNA を抽出した。これを標識し、高密度遺伝子フィルターに対してハイブリダイゼーション実験を行った結果、それぞれ 115 個、165 個のスポットにシグナルを検出した。これらのスポットの位置をゲノム全塩基配列と対応させることによって、各々の条件で転写産物が増減する遺伝子を同定した。

B3a-08

グルココルチコイド誘導系による *ATHB-2* 遺伝子の機能解析

大岸麻紀、岡 穆宏、青山卓史 (京大・化研)

シロイヌナズナの HD-Zip タイプのホメオボックス遺伝子群、*ATHB* は環境刺激応答から形態形成にいたるまでのシグナル伝達に関与していると考えられている。そのうちのひとつである *ATHB-2* は赤外光に富む光によって即座に強く発現誘導されることが知られており、光を介した伸張現象における制御的な役割を果たしていることが示唆される。我々はキメラ遺伝子、*HDZip2VG* を作成した。これは *ATHB-2* の DNA 結合領域、VP16 の転写活性化領域、そしてラットの GR ホルモン結合領域からなる転写因子をコードする。このキメラ遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体に、グルココルチコイドの誘導体である DEX を含む培地で生育させたところ、DEX を含まない培地で生育させた個体は通常の胚軸の形態を示すのに対して、短く水平方向に肥大した胚軸の形態を示した。肥大した胚軸では、個々の細胞は水平方向に伸張しており、細胞層や個々の細胞層の細胞の数に変化はみられなかった。この結果より、*ATHB-2* の DNA 結合領域は胚軸の細胞伸張の方向を決定する機構に関与する遺伝子と認識することが示唆される。我々は改変遺伝子 *HDZip2VG* を導入したシロイヌナズナ形質転換体に DEX を処理することによって転写が誘導される遺伝子を探索している。

B3a-13

タバコ培養細胞においてブラシノライドによって発現量の変化する遺伝子の単離および解析

貴家康尋¹、進藤勇人^{1,2}、室田憲一³、坂田洋一¹、
武長宏¹ (¹東農大・農・農化、²秋田県農試、³鳥取大・乾燥地研究センター)

光独立栄養性タバコ緑色培養細胞(*Nicotiana tabacum* cv. Samusan NN) は、ブラシノライド (BR) 処理によって生育が促進される。BRにより発現が調節される遺伝子を検索する目的で、ディファレンシャルディスプレイを行ったところ、BRによって mRNA の蓄積量の減少する cDNA 断片 (BRD6) が得られた。この断片の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列のホモロジー検索をした結果、植物および微生物由来の ATP 依存性 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) と高い相同性が見いだされた。また、この得られた断片をプローブとして、タイムコースでノザンプロット解析を行ったところ、BR 処理後 3 時間で減少の傾向が認められた。さらに、インタクト植物、光従属栄養性の培養細胞における BRD6 の局在性および挙動の解析結果についても報告する。

B3a-14

G-box 様 ABA 応答性配列 (ABRE) と coupling element 3 (CE3) は塩基配列的にも、機能的にも等価である。

保浦徳晃、浅田美穂子、服部東穂 (三重大・遺伝子実験施設)

LEA と呼ばれる一連の mRNA およびタンパク質は、種子形成後期に ABA によって誘導される。転写因子 VP1 は、LEA 遺伝子や他の ABA 誘導性遺伝子に種子特異性を付与する因子であると考えられている。我々は、イネの LEA 遺伝子の一つ *Osem* 遺伝子のプロトプラストランジェントアッセイによる loss-of-function タイプのシスエレメント解析から、その転写開始点上流約 -170bp の位置に存在する ABA 応答性 MotifA とその下流の region I が ABA および VP1 による調節両方に必要であることをこれまで示してきた。

今回、ABA および VP1 による転写制御メカニズムをさらに詳細に解析することを目的として、我々は *Osem* 遺伝子の ABA および VP1 による活性化に必要最小限の領域として、MotifA およびオオムギの HVA1 遺伝子において ABRE とともに ABA 応答性に必要とされる配列 CE3 を含む 55bp の配列 ABRC (ABA-response-complex) を同定した。この 55bp ABRC 断片の linker-scan 解析の結果、MotifA の変異体 (mut1) および CE3 の変異体 (mut4) において、ABA による活性化が極端に減少した。また、VP1 による活性化も mut1 で見られなくなり、mut4 においても mut1 ほどではないが、活性化が低下した。さらに、MotifA と CE3 配列の相同性に着目し、モチーフ交換実験を行った結果、この二つの配列は機能的にも等価であることが明らかになった。

C1a-01

雌雄異株植物・アサのY染色体における領域特異的なレトロトランスポソンの蓄積

阪本浩二, 福井希一¹, 鎌田博, 佐藤忍 (筑波大・生物, ¹北陸農試・育種工学)

異型化した性染色体をもつ雌雄異株植物のアサを材料に用いて、雄性に関連した DNA 配列の解析を行った。RAPD 法により 155 種類の任意のプライマーのうち 25 種類において、雌株にはなく雄株にのみ存在する 500-1500 bp の DNA 断片が得られた。これらの DNA 断片をクローニングし、ゲノミックサザンプロットングのプロープに用いたところ、8 本の DNA 断片においては、雌雄共通のバンドに加え、雄株に特異的なバンドが検出された。このうち 729 bp の DNA 断片は、特に雄株に強いシグナルが検出され、*MADC1* と命名した。次にアサの根端細胞から得た中期染色体像に対し、*MADC1* をプロープに用いて FISH (fluorescence *in situ* hybridization) を行ったところ、Y 染色体の長腕末端部に明確な蛍光シグナルが 1 対検出された。さらに *MADC1* と TAIL PCR によって得られたその近傍配列を調べたところ、多くの生物種のレトロトランスポソンにコードされている逆転写酵素と高い相関性があった。これらの結果は、レトロトランスポソンの蓄積が性染色体構築と異型化に関わっていることを示唆している。

C1a-02

多幹性アカシアに存在するレトロトランスポソン様配列
越山淳子、日尾野隆 (王子製紙・森林資源研)

林木育種において対象形質の一つである幹形質については、通直性の高いものが望まれる。当社は 1993 年より海外においてユーカリ、アカシア等の熱帯早生樹の植林を積極的に進めているが、特に *Acacia* 属では幹の形状が通直であるものが少なく、根元から分枝したものが多く認められる。我々は、DNA マーカーを用いて幹形質の優れた個体を判定する方法の確立を目指した解析を進めている。今回、ベトナム試験植林地において選抜された *Acacia auriculiformis* の通直個体群、および多幹性個体を材料に用いて解析を行った。通直個体群、多幹性個体から DNA を抽出し、RAPD 法にて解析を行った。800 個のランダムプライマーを用いて、通直個体および多幹性個体を識別可能な多型バンドを 28 個得た。これらについて STS 化するために各多型バンドの塩基配列を決定したところ、一つの多型バンドにおいて約 800bp の ORF 領域を見いだした。このバンドの近傍を解析するため、*A. auriculiformis* ゲノムライブラリーをスクリーニングし、約 17kbp のインサートを有するゲノムクローンが得られた。先に見いだされた 800bp の ORF 領域を含む 4kbp の XbaI フラグメントの塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った結果、既報のレトロトランスポソン配列と高い相関性が認められた。現在、得られたアカシア内在性のレトロトランスポソン様配列について、時期および組織特異的発現レベルでの解析を行っている。

C1a-03

ニンジンにおける transposable element *Tdc* の構造とその発現

伊藤 佳央、Eric Davies¹、
小関 良宏 (農工大・工・生命、¹NCSU)

En/Spm 型である転移因子 *Tdc* はニンジンにおいて 20 コピー以上存在している。その中の 1 つである全長 5.3 kb の *Tdc1* においては 1.56 kb と 0.3 kb の ORF が見い出されている。この *Tdc1*-ORF の直前には CAAT-box および TATA-box を含むプロモーター様配列が存在するが、transient assay により調べたところでは、この部分のプロモーターとしての活性は見い出されなかった。また、4 種類の培養細胞および 4 種類の植物個体について ORF をプロープとした Northern 解析において、約 2.5 kb から約 5.5 kb の長さの異なる転写産物が少なくとも 5 種類見い出された。そこで cDNA ライブラリーからこれら ORF を含むクローンをスクリーニングし、それらの塩基配列を決定したところ、これらに対する転写産物が少なくとも 2 種類以上の *Tdc* コピーから転写おり、それらが転移に関わるタンパク質をコードしていることが考えられた。

C1a-04

Ti プラスミド pTi-SAKURA の構造 (9) : 接合伝子領域及び近傍の構造の特徴

裏地美杉, 服部嘉行, 太田伸之, 鈴木克周, 加藤明¹, 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 T-DNA, Virulence 伝達 (Vir) の他に接合伝子、オパイン分解系伝子等をもつ 200Kb を越える巨大プラスミドであり、Ti プラスミドの成立進化の過程には接合伝達が重要な役割を果たしていると考えられる。我々は、Ti プラスミドの未解明機能の探索とプラスミドの成立起源進化に興味をもちノバリン型プラスミド pTi-SAKURA の全塩基配列を決定した。プラスミドの再編成を含む進化に重要な役割を果たすと考えられる接合伝達系のうち *trb* 伝子群の特徴については昨年度本大会で報告した。接合伝達に必要なもう一つの部位 *tra* 伝子群の構造とその周辺領域の特徴について今回報告する。全ての *tra* 伝子はオクトピン型、ノバリン型ともに同じ順序で配置していることが分かった。しかし各 *tra* 伝子のプラスミド間のホモロジーの程度は 99%~59% と著しく異なり、いくつかの *inc* タイプのプラスミドとホモロジーがあり異なる起源をもつ可能性が考えられる。

tra 領域左側近傍にはリゾビウムの共生プラスミドの伝子やシュードモナスの伝子とホモロジーを示す伝子が検出された。これらの機能についても考察を行いたい。

C1a-05

Ti プラスミド pTi-SAKURA の構造 (10) : virulence 遺伝子群の左右隣接域の構造
服部嘉行、岩田久美、鈴木克周、裏地美杉、大田伸之、吉田和夫 (広島大・理・生物科学)

桜のクラウンゴールから分離されたアグロバクテリアの Ti プラスミド pTi-SAKURA の virulence 遺伝子群の特徴については昨年度本大会で報告した。しかし、アグロバクテリアの Ti プラスミドの Vir (virulence) 遺伝子群と T-DNA については、機能的な重要性からこれまでに複数のプラスミドで構造決定がされているが、Vir 遺伝子群と T-DNA の間の領域については全く未決定の状態であった。Vir 遺伝子群からみて右側隣接域にあたるこの領域および Vir 遺伝子群とアグロシノビニン産生遺伝子群との間 (左側隣接域) の塩基配列をもとに遺伝子を推定したので報告する。

pTi-SAKURA の virE 遺伝子下流から T-DNA のレフトボーダー (LB) の間にはホモロジー検索や GeneMark 分析等により ORF を予測した。その内の 1 つは traR 遺伝子が偽遺伝子化していることがわかった。本 Ti プラスミドには tra 遺伝子群が別の位置にあるので、この結果は Ti プラスミドの成立についての研究の糸口になると期待される。一方、virA 遺伝子の上流には tzs 遺伝子と pin 遺伝子等が存在していた。これらはアグロバクテリアの宿主植物域を広げるのに役立っていると考えられる。

C1a-06

雄性配偶体形成過程で発現する LIM8 遺伝子と相同なシロイヌナズナの遺伝子の単離と解析
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)

我々は雄性配偶体形成に関与する遺伝子の探索を試み、これまでにテッポウユリからサブトラクト法を用いて 18 種類の LIM (Lily messages Induced at Meiosis) 遺伝子の cDNA を単離している。高等植物のアミノ酸輸送担体群と一次構造が類似する LIM8 蛋白質について、抗 LIM8 抗体を作成して蛋白質レベルで解析を行ったところ、LIM8 は花粉母細胞で接合期から四分中期にかけて発現することが明らかになり、細胞内所在についても細胞壁と結合している可能性が示唆された。更に LIM8 の機能および雄性配偶体形成過程における役割に関する新たな知見を得るために、分子遺伝学的解析を行うことを目的としてシロイヌナズナから LIM8 相同遺伝子の単離を試みた。シロイヌナズナの花芽より調製した cDNA ライブラリーから LIM8 遺伝子と類似性の高いクローンが得られ、更にゲノミックライブラリーからこれと対応する遺伝子が単離された。現在、転写産物の蓄積パターンの調査と抗 LIM8 蛋白質抗体を用いた解析を行っており、これらの結果も含めて考察する。

C1a-07

テッポウユリの減数分裂時期に発現が誘導される LIM10、LIM18 遺伝子のプロモーター解析
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)

テッポウユリ (*Lilium longiflorum*) の花粉母細胞特異的に発現する cDNA クローン、LIM10、LIM18 は、その遺伝子産物の推定されるアミノ酸配列から、それぞれ低分子 HSP、HSP70 様蛋白質をコードすると考えられている。我々は、高等植物における減数分裂特異的遺伝子の発現調節機構を調べる目的で、inverse PCR 法、vectorette 法によりテッポウユリのゲノム DNA から、LIM10 と LIM18 の 5' 上流域それぞれ 1.3kb、1.7kb を含む DNA 断片の単離を行った。これら 2 つのクローンの上流域には、TATA ボックス、および光や植物ホルモンなどに応答する様々な誘導性遺伝子のシス配列として働く CACGTG 配列が存在した。しかし、熱誘導性の Hsp 遺伝子のプロモーターに存在するヒートショックエレメントは見出されなかった。

現在、単離した DNA 断片の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを、テッポウユリの葉、花粉母細胞に particle bombardment 法を用いて導入し、各遺伝子の転写調節機構についての検討を行っている。

C1a-08

ユリの花粉形成過程で発現しているリボヌクレアーゼの同定とその性状について
高瀬尚文、平塚和之、堀田康雄 (奈良先端大・バイオ)

花粉形成過程には、染色体運動、遺伝子発現や遺伝的組換え反応といった染色体のダイナミックな変化に加えて、減数分裂のステージの進行に伴う DNA、RNA、蛋白質の合成活性の変動や量的変動が見られる。例えば、減数分裂に入ると、RNA (mRNA) の細胞内濃度は減少傾向を示し、減数分裂終了後には体細胞レベルに回復する。また、減数分裂の進行に伴って蓄積された減数分裂特異的な転写産物が成熟花粉では検出限界以下となることが明らかとなっている。こうした花粉形成の進行に伴う RNA (mRNA) レベルの変動に、ある種の RNA 分解タンパクが関与しているものと予想されているが、その詳細は明らかとなっていない。今回、活性染色法を用いて、花粉形成過程で発現しているリボヌクレアーゼを同定し、その性状を調べた。その結果、減数分裂期の花粉母細胞から調製した細胞抽出物中に 3 種類のリボヌクレアーゼ (12K RNase、23K RNase、36K ssDNase) を同定した。特に、23K RNase は減数分裂の進行に伴う活性変動を示したことから、減数分裂の RNA 代謝において重要な役割を担っていることが予想された。

C1a-09

Laser Pressuer Catapulting法による雌雄異株植物
*Silene latifolia*の花粉単離と花粉1個の雌雄判定
松永幸大、河野重行、黒岩常祥 (東大大学院・理・生物科学)

我々はUVやIRレーザービームを顕微鏡中に導入し、細胞1個、染色体1本、さらにはオルガネラ1個をマイクロダイセクションや光ピンセットで解析する試みを行ってきた。この「顕微操作分子生物学」をさらに発展させるためには、微細加工した試料の敏速回収法の開発が必須である。その一つの方法として光圧力を用いたLaser Pressuer Catapulting (LPC) 法を報告する。まず試料を超薄フィルム上に展開し、回収したい試料の周辺フィルムをUVレーザービームで昇華する。切除された微小フィルムをUVレーザービームの光圧力で上方に打ち上げ、回収用カバーガラスに捕捉させる。このLPC法は従来のマイクロピペット法に比べ、操作をコンピューターモニター上で行えることから一度に複数の試料を容易かつ敏速に回収できる。

このLPC法を用いて雌雄異株植物*Silene latifolia*の花粉を1個ずつ回収し、PCRによる解析を行った。DOP-PCRを用いてプライマーのターゲット配列を増幅させた後、nested PCRを行うことでsingle-copy遺伝子のSTSを花粉1個から検出できた。さらに雄特異的STSプライマーを用いることで、花粉1個の雌雄判定を行った。この"single pollen typing"は性染色体特異的配列の検定やハプロイドゲノム中における遺伝子のコピー数確認にも応用可能と考えられる。

C1a-10

Plumbago auriculata の精細胞形成過程におけるオルガネラの局在様式とその制御機構
齊藤知恵子、永田典子、酒井敦、黒岩晴子¹、黒岩常祥 (東京大・理・生物科学, ¹共立女子短大・文科)

Plumbago auriculata (イソマツ科) の花粉内の二個の精細胞は、中に含まれる色素体とミトコンドリアの量比が著しく異なるため明瞭に区別できる。そこで、減数分裂以降の精細胞形成過程における両オルガネラの局在・分配様式を調べたところ、特徴的な局在を示すステージが三つあることがわかった。1) 小胞子では、色素体は細胞核の周辺に集合し、ミトコンドリアは細胞質中に分散する。2) 中期雄原細胞内では、色素体が栄養核側に集まる。3) 後期雄原細胞内では、栄養核から遠い方の極に色素体が、反対側の栄養核に近い方の極にミトコンドリアが集合する。そのまま分裂が起こって異なる二個の精細胞が形成される。1)-3) のようなオルガネラの挙動を攪乱する阻害剤を検討したところ、微小管破壊剤であるamiprophosphomethyl (APM) 処理が、小胞子内の色素体を分散させることがわかった。しかし APM は、後期雄原細胞のオルガネラの局在様式には影響を与えなかった。以上の結果は、花粉形成過程で色素体とミトコンドリアの挙動はそれぞれ独立に制御され、花粉成熟の進行につれオルガネラの挙動の制御機構が変換する可能性を示唆する。現在、阻害剤処理の前後における微小管のパターンを間接蛍光抗体法を用いて解析中で、オルガネラの局在様式と細胞骨格系の関連について併せて考察したい。

C1p-01

ニンジン体細胞胚形成の初期過程の細胞内変化

我妻 千尋、保田 浩²、増田 宏志 (帯畜大、生物資源科学 ²岩手連大、農)

再生したニンジン植物体を、2,4-Dで短時間処理した後、2,4-DのないMS培地で培養すると胚軸の表皮細胞が分裂して細胞塊が形成され、次いで胚に分化して行く。この体細胞胚形成の最も初期の過程において細胞内の変化をTEMで観察した。分裂前の表皮細胞では、液胞の占める比率が著しく高い。それが2,4-Dの影響を受け表皮細胞が分裂し、細胞塊が形成されるに従い、液胞が小さくなる傾向にある。この過程で細胞質の占める比率が相対的に大きくなる。同時に各種オルガネラも著しく増大し、核も大きくなる傾向にある。さらに、2,4-D処理をしない細胞、細胞塊および球状胚の三段階のものをプロトプラスト調整酵素で処理する方法で核を調整した。これらの調整した核のDNAのDNaseIに対する感受性を検討した。その結果、球状胚で最も感受性が高く次いで胚軸、細胞塊の順であった。

C1p-02

ニンジン (*Daucus carota* L.) の全能性発現にともなうカルモジュリン結合蛋白質の変動
野村浩二、大浦千春、Annick GRAZIANA¹、Benoit RANTY¹、Martine CHARPENTEAU¹、Raoul RANJEVA¹;
(筑波大・農林, ¹Physiol.Vegetale, Univ. Paul Sabatier, 31062 Toulouse)

ニンジン (*Daucus carota* L.) 細胞の不定胚形成にともなうカルモジュリン結合蛋白質 (CaM-bp) の変動を追った。2,4-Dを含む培地中で芽生えの下胚軸から培養細胞を誘導した。継代培養されている細胞を2,4-Dを含まない培地に移植することで不定胚形成を行なわせた。CaM-bp はビオチン標識したカルモジュリンをプローブとして検出した。

培養される前の胚軸では1種のCaM-bpが検出されたが、2,4-Dを含む培地で24時間培養した胚軸からはさらにもう1種のCaM-bpが検出された。2,4-Dを含む培地で継代されている細胞からは後者が主要なCaM-bpとして検出されたが培養前の胚軸に存在していたCaM-bpは検出されなかった。不定胚形成の過程ではCaM-bpのレベルはきわめて低くなった。

顕微鏡観察の結果、2,4-Dを含む培地で増殖だけを行なっている細胞ではCaM-bpは液胞を除いて細胞内全体に分布していた。球状胚になる直前の細胞塊では一部分の細胞にだけCaM-bpが観察された。それらの細胞や球状胚の細胞ではCaM-bpは核内、特に仁の表面に局在することが明らかになった。

C1p-03

形質転換培養細胞を用いたC-ABI3の機能解析
塩田肇、Eun Chang-Ho、鎌田博
(筑波大・生物)

種子における乾燥耐性獲得にはアブシジン酸(ABA)が関与していることが知られているが、種子胚のモデル系と考えられる不定胚は乾燥耐性を欠いている。この原因として、不定胚がABAを合成しないことが考えられる。そこでニンジン不定胚をABAで処理したところ、乾燥耐性を誘導できることが確認された。一般的に種子におけるABAの情報伝達にはVP1/ABI3因子が関与することが知られており、ニンジンにおいてもこれらと類似の遺伝子(C-ABI3)をクローニングすることに成功した。このC-ABI3の機能解析を行うため、C-ABI3を異所的に発現させた形質転換Non-embryogenic Cells(NC)を作成した。この形質転換NCをABAで処理したところ、弱いながらも乾燥耐性が確認された。また、ABA処理した不定胚から単離された数種のABA誘導型遺伝子の発現も確認された。これらのことから、ニンジン不定胚においてもC-ABI3がいくつかのABA誘導型遺伝子の発現を介して、ABA誘導性の乾燥耐性獲得に関与することが示唆された。

C1p-04

不定胚形成におけるホメオボックス遺伝子の役割

香子生彦¹、出村拓¹、福田裕輝² (東京大・理・植物園、¹東京大・理・生物科学)

私たちはニンジン不定胚形成の分子機構の解明にむけて、ニンジンホメオボックス遺伝子 *CHB1-CHB6* を単離し、その発現解析を行ってきた。このうち *CHB1* は心臓型胚、魚雷型胚で、茎頂及び根端の分生組織に発現しており、*CHB2* は心臓型胚のステージで一過的にその発現が上昇することがわかっていて、そこでこれら *CHB1* 及び *CHB2* の不定胚形成における働きを解析するために、CaMV35S プロモーターの下流にこれらの cDNA をセンスおよびアンチセンス方向につないでニンジン胚軸に導入し、そこから不定胚を誘導した。そして、*CHB1* および *CHB2* の過剰発現、発現抑制による形態形成への影響を調べた。その結果、*CHB1* を過剰に発現する形質転換ニンジン幼植物では、子葉が巨大になったり、多子葉になるものが多く見られた。一方、*CHB1* の発現を抑制するような形質転換体では、形質転換体が少数しか得られなかった。また *CHB2* を過剰発現した形質転換体では影響が見られなかったが、*CHB2* の発現を抑制した形質転換体では、その芽生えの胚軸の伸長が阻害された。

さらにこれらの形質転換体を用いて、不定胚形成初期過程における *CHB1*、*CHB2* の役割を解析することにした。形質転換体の芽生えの胚軸を 2,4-D で短時間処理することにより二次不定胚を誘導し、この二次不定胚の初期発育に対する *CHB* 遺伝子発現の抑制および促進の影響について調べた。その結果、*CHB1* をアンチセンス方向に導入した形質転換体からの二次不定胚形成は著しく阻害され、未分化なカルスが形成された。この結果から *CHB1* が不定胚形成誘導の key factor となっていることが明らかになった。また *CHB2* をアンチセンス方向に導入した形質転換体からの二次不定胚は、球状胚以降の発達が阻害された。この結果により、*CHB2* が球状胚から心臓型胚への発達に強く関わっていることが示された。

C1p-05

イネホメオボックス遺伝子 *OSH15* の劣性突然変異の単離と解析

佐藤 豊¹、千徳直樹¹、三浦由雄¹、北野英巳²、広近洋彦³、松岡 信¹ (¹名大・生物分子応答研究セ、²名大・農、³農水省・生物研)

ホメオボックス遺伝子は、ホメオドメインと呼ばれるDNA結合領域を持つ転写因子で、動物において形態形成や細胞分化に重要な役割を果たしている。近年、植物からもホメオボックス遺伝子が数多く単離されており、形態形成との関わりが注目されている。今回、私たちはレトロトランスポゾン *Tos17* を利用したタギング法によりイネホメオボックス遺伝子 *OSH15* の劣性突然変異体を単離した。この変異体が示す表現型と *OSH15* 遺伝子のマップポジションからさらに三つの独立の欠失突然変異体を同定した。これらの *OSH15* 遺伝子座における劣性突然変異体はすべて d6 型と呼ばれる異常な節間伸長パターンを示した。

変異体の節間において組織学的な解析を行ったところ、これらの節間では、表皮細胞の形態および小維管束の走行に異常が見られた。また、表皮の内側に存在する皮層繊維組織の分化が見られなかった。本発表では、以上の結果より *OSH15* の形態形成における機能について考察する。

C1p-06

休眠腋芽に特異的に発現する AD1 の組織内発現様式の解析

円由香、森仁志 (名大院・生命農学・生化学制御)

頂芽優勢はよく知られている現象であるが、その分子機構はほとんど明らかにされていない。我々は休眠腋芽に特異的に発現する遺伝子に注目し、AD1 と名付けた遺伝子を単離し、解析を行っている。

AD1 の mRNA は約 530 塩基からなり、87 アミノ酸残基をコードし、その翻訳産物の相対質量は 8.9 kDa であった。N 末端領域はグリシン(45 残基)に富んでいるが、既知のタンパク質に類似しているものはない。mRNA、タンパク質共に休眠腋芽に特異的に発現し、他の器官では発現していない。また、頂芽の切除により、その発現はすみやかに減少する。

今回は、AD1 の休眠腋芽組織内における局在性を解析した。in situ hybridization から AD1 の mRNA は休眠腋芽の茎、茎頂、葉原基、前形成層の一部に発現していた。更に AD1 の特異抗体を用いてタンパク質の局在性を調べたところ、AD1 タンパク質は休眠腋芽の茎頂、葉原基、前形成層などに局在していた。つまり、頂芽を切除して休眠を解除すると、最初に分裂や伸長を開始する細胞群に局在していると考えられる。また、頂芽の切除により、このタンパク質は腋芽の茎の基部から茎頂に向かって徐々に消失していった。これらのことから、AD1 が細胞の分裂や伸長などの抑制に関与していることが示唆された。

C1p-07

アラスカエンドウの腋芽における癌抑制遺伝子 (Rb) の発現解析

志水佐江、森仁志 (名大院・生命農・生化学制御)

頂芽の切除により、休眠腋芽は細胞分裂、細胞伸長を開始する。我々は、腋芽の細胞周期調節機構を解析することにより、頂芽優勢の分子機構を明らかにしたいと考えている。既に、休眠中の腋芽細胞は細胞周期がG1期で抑制されていること、PCNAとcyclinDとが休眠中の腋芽で特異的に相互作用をすることを明らかにした。さらに、別の細胞周期制御遺伝子に関して解析を行うことは、腋芽の細胞周期調節機構を解析するために不可欠である。そこで、動物において、G1期に癌抑制遺伝子として機能することが知られているRb遺伝子に着目した。我々は、Rb類似遺伝子 (PsRb1) のcDNAをアラスカエンドウより単離し、その塩基配列を決定した。その結果、Rbファミリーに共通のアミノ酸配列が保存されていることが分かった。PsRb1のmRNAは、休眠及び、成長腋芽において検出され、頂芽切除後、15時間後に最大量に達した。これらの結果を基に、腋芽細胞が動物で示されているような細胞周期制御機構によって休眠している可能性を考察する。

C1p-08

ペルオキシダーゼ遺伝子導入による交雑ヤマナラシの成長促進

河岡 明義, 松永 悦子, 吉田 和哉¹, 新名 惇彦¹, 海老沼 宏安 (日本製紙・中央研, ¹奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス)

高等植物には多くのペルオキシダーゼ(PRX)アイソザイムが存在し、その生理学的機能は多岐にわたっている。これまでに、西洋ワサビの *prxC1a* 遺伝子をタバコ・シロイヌナズナで高発現させると、成長が促進されることを示した。今回、この *prxC1a* cDNA を CaMV35S プロモーターの制御下にセンス方向に連結した融合遺伝子を構築した。この融合遺伝子を交雑ヤマナラシ (*Populus sieboldii* x *P. grandidentata*) に導入し、カナマイシン耐性の形質転換体を約 50 個体作成した。得られた形質転換体の葉からゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって導入遺伝子の存在を確認した。まず、形質転換体と野生型との成長を試験管苗を用いて比較した結果、形質転換体の平均背丈は野生型と比較して 17%大きくなっていった。導入した *prxC1a* 遺伝子の発現量は、成長の早い形質転換体で多かった。また、温室での成長試験でも約 30%のバイオマス量の増加が見られた。

C1p-09

アサガオ花成誘導直後の芽に発現する遺伝子の解析
山下 博史、竹葉 剛

(京都府立大学・人間環境・応用生物)

短日植物であるアサガオは、ただ一回の短日処理に感応して花芽をつけるので、成長点での遺伝子発現の変化を時間の単位で追跡できるよい材料である。短日処理後 4 8 時間目の成長点の cDNA ライブラリーを作製し、短日処理した芽と連続光下において芽とから得られた mRNA を用いて、differential hybridization を行った。その結果、花芽形成時のみ発現するクローンを 5 個単離した。得られたクローンについて塩基配列を決定し、既知の遺伝子とのホモロジー検索を行ったが、相同性の高いものは見られなかった。短日処理後 2 4 時間目の花芽から得た mRNA を鋳型に RT-PCR を行ったところ、DNA 断片の増幅が見られ、短日処理後 2 4 時間目にすでに発現していることが明らかになった。さらに空間的、時間的発現様式を明らかにするために *in situ* hybridization を行った。

C1p-10

花成時期遺伝子 *FT* は *TFL1* ホモログである
小林恭士、賀屋秀隆、荒木崇、岩淵雅樹
(京都大・理・植物)

我々は栄養生長から生殖成長への切り替え、すなわち花成がどのような遺伝子によって制御されているのかを知る目的で、シロイヌナズナの突然変異体を用いた研究を行っている。花成時期遺伝子は、その機能欠損により花成の遅延または早化を引き起こすが、我々は特にそのうちのひとつ *FT* に注目して解析を進めている。

これまでに T-DNA 挿入変異株のひとつが *FT* を欠失していること (賀屋ら) を確認し、*FT* を同定した。既知の 3 つのアレル *ft-1*, *ft-2*, *ft-3* 及び新規に単離した *ft-4*, *ft-5*, *ft-6* すべてにおいて点突然変異があることを見いだしている。

FT は、花序分裂組織の維持に関わると考えられている *TFL1* とアミノ酸レベルで 57% の相同性を有していた。また、我々が新たに単離した *TSF* (*TWIN SISTER OF FT*) とは、アミノ酸レベルで 82% の相同性を有していた。

C1p-11

アサガオの茎頂における花芽誘導特異的遺伝子の cDNA クローニング

吉崎美和、古本強、畑信吾、篠崎正輝、泉井桂 (京都大院・農・植物生理)

アサガオ (*Pharbitis nil* Choisy, cv. Violet) は、敏感な短日植物であり、芽生えの段階でも一回の短日処理によって花芽を誘導できる。短日を受感するのは葉であり、葉で生産された花芽誘導刺激は、茎頂の生長点に達して花芽を分化させると考えられている。我々は、このとき生長点で起こる変化に興味を持ち、生長点における花芽誘導の分子機構を解明する目的で、differential screening 法により、花芽誘導刺激が到達したアサガオの茎頂で特異的に発現する mRNA の検出を行った。

アサガオは連続光下で生育させ、発芽後 3 日目に 16 時間の暗処理 (花芽誘導条件) または 8 時間の暗処理 (花芽非誘導条件) をかけ、再び連続光下に戻してから 30 時間後に茎頂を採取した。これらの材料から抽出した mRNA をプローブとして花芽誘導条件の茎頂から作成した cDNA ライブラリーの 2 万クローンをスクリーニングしたところ、10 個の花芽誘導条件で発現量が増加する cDNA クローンと 14 個の花芽誘導条件で発現量が減少する cDNA クローンが得られた。現在、これらの塩基配列と発現様式について解析を進めている。

C1p-12

花成に及ぼす糖の影響

太藤雅章¹、荒木崇²、中村研三^{1,3} (1 基生研・発生物、2 京大・理・植物、3 名大・農・生化)

シロイヌナズナでは「糖は花成に対して促進的に関わる」との指摘がいくつかの総説でなされてきたが、実際それを支持するデータは少ない。最近 Martinez-Zapater が「一部の花成遅延変異体などで培地中の糖で花成遅延が軽減される。」と記述した (FNL 24, Nov. 1997)。実際、*co*, *fd*, *fha*, *fi*, *fwa*, *gi* を 1% ショ糖入りの培地で生育させると、土栽培に比べ *fi* と *fwa* を除き、花成遅延が顕著に軽減され野生型に近い表現型を示した。従って、これらの変異体では栄養分裂組織から花序分裂組織への転換が糖によって促進されたと考えられるが、*Col* と *Ler* の野生型では 0% と 1% ショ糖培地で生育させても花成への糖の影響は殆ど見られない。一方、*in vitro* 培養した *Col*, *Ws*, *Ler* の野生型植物体では少なくとも長日下で培地のショ糖濃度上昇に伴いロゼット葉数が増加し花成が遅延した。ショ糖以外にもグルコース、フルクトースは同様の効果を示し、代謝されないグルコースアナログをショ糖の他に加えても効果はなかったことから、糖の代謝効果の影響であると推定される。*co*, *fd*, *fha*, *fi*, *fwa*, *gi* でも同様の花成遅延が見られた。糖誘導性遺伝子である β アミラーゼ遺伝子の発現にトランスに働く変異により、*in vitro* 培養植物体の葉で β アミラーゼ遺伝子が恒常的に高い発現レベルを示す変異株 *hbal* は、長日・短日、土栽培、ショ糖培地のいずれの条件下でも野生型より少ないロゼット葉をつけて花成した。これらの、花成に糖シグナリングが関与することをより強く示す新しい知見をもとに、本発表では花成における糖の役割について考察する。

C1p-13

花粉管伸長に関わるエキソグルカナーゼ

李一勤、小竹敬久、櫻井直樹 (広島大・総科)

テッポウユリの花粉管伸長は、エキソグルカナーゼ阻害剤であるノジリマイシン (3 μ M)、グルコノラクトンにより 1 分で抑制された。演者らは花粉管の伸長に関与すると思われるグルカナーゼを細胞壁より精製し同定した。花粉管のエキソグルカナーゼは分子量が約 74 kD、最適 pH 5.5 で、オオムギ芽生えのエキソグルカナーゼと良く似た性質 (66 kD, pH 5.0) を示した。また、 β -1,3-グルカンであるラミネリンを良く分解した。花粉管の細胞壁ヘミセルロース画分をメチル化分析したところ、このグルカナーゼの基質と思われる β -1,3-グルカンが検出された。従って、花粉管の伸長には、このエキソグルカナーゼによる β -1,3-グルカンの分解が関与すると予想される。

C1p-14

ダイコンにおいて自家不和合性を打破する CO₂ 誘導遺伝子の遺伝学および分子生物学的解析
新倉 聡、松浦誠司 (株) トーベ

アブラナ科植物の自家不和合性は複対立遺伝子から成る S 遺伝子座に支配されるとともに、CO₂ 処理により打破される (Nakanishi and Hinata 1973)。我々は S 対立遺伝子と CO₂ 処理による打破との関係およびその遺伝様式を調査するため、以下の実験を行った。S 対立遺伝子と CO₂ 処理による自家不和合性打破程度が分離する F₂ 集団を育成し解析したところ、3 種の S 遺伝子型間 (S⁺, S⁰, S⁻) の自家不和合性打破程度に有意な差は認められなかった。またその分離比は 3 (打破されない) : 1 (打破される) の比に良く適合した。以上の結果から、CO₂ 処理による自家不和合性打破は S 遺伝子座とは独立した劣性の一遺伝子に支配されていることが示唆された。

現在我々はディファレンシャルディスプレイ法を用いて、この遺伝子の単離を目指している。

C1p-15

シロイヌナズナを用いた種子発芽の研究
土屋雄一郎、南原英司、内藤哲 (北大・農・応用
生命科学)

我々は種子発芽という現象を、遺伝子発現の変化という観点から理解する事を目的として研究を進めている。休眠中の種子は生理的に不活性な状態で、多くの遺伝子は抑制を受けていると考えられる。一方、発芽時にはそういった遺伝子は活性化され、成長を始めるものと考えられる。このことを検証するため、本研究では、まず吸水後1日目の種子cDNAライブラリーより発芽時にmRNAの蓄積が増加する遺伝子のcDNAクローンを21個単離し、これらの遺伝子の発芽時におけるmRNAの蓄積パターンの変化を調べた。種子形成後期に欠損を示す突然変異株である*abi3*突然変異株と*fus3*突然変異株乾燥種子においてこれらの遺伝子のmRNAの蓄積を調べたところ、多くの遺伝子について*abi3*突然変異株で蓄積レベルが増加する傾向が見られた。これらのことから、休眠時における抑制系の中で*ABI3*遺伝子の果たす役割は比較的大きなものであると考えられた。

C1p-16

コムギ胚芽チアミン結合タンパク質の精製と性質
足立崇、渡辺克美、吉田豊和¹、光永俊郎 (近畿大・農・食
栄、¹現・岐阜大・工・生命工学)

多くの植物種子中においてチアミン結合タンパク質(TBP)の存在が認められている。これまでにイネ胚芽、ゴマ種子、ソバ種子からTBPが精製され、その性質が検討された。その結果、植物種子TBPには植物一般に普遍的な性質と植物種に特異的な性質があると考えられる。そこで、イネ科植物であるコムギの胚芽からTBPを精製し、その性質を調べ、既知のイネ、ゴマ、ソバのTBPと比較することにより、植物種子TBPの特徴について検討した。

コムギ胚芽TBPは比活性で23.4倍に精製され、収率は19%であった。この精製したサンプルを用い諸性質を調べた。分子量120 kDa、サブユニット分子量50 kDaの二量体であると推定された。チアミンとの結合の至適pHは8.0であり、チアミン誘導体、類似体によるチアミンとの結合阻害は受けなかった。これらの性質はイネ胚芽TBPと非常によく似ており、また、植物種子TBPに普遍的であると考えられる性質もそなえていた。さらにアミノ酸組成、TBPの局在性、チアミンとTBPの結合部位について合わせて報告する。

C1p-17

イネグルテリン遺伝子プロモーター中のGCN4モチーフに結合する蛋白質のcDNAクローニングの試み
鈴木章弘、小野寺康之、鷲田治彦、呉伝銀、高岩文雄
(農水省・生物研)

イネ種子貯蔵蛋白質グルテリンをコードする遺伝子は、胚乳組織特異的発現を示す。これ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5'上流-197bpまで必要であることが明らかになっている。さらに、この領域中のGCN4、G-boxそしてACAの各モチーフの作用により組織特異的発現が制御されている。

今回我々は、これらの内GCN4モチーフに結合するbZIP様蛋白質のcDNA単離を試みた。トウモロコシのOpaque-2 (O2) のアミノ酸配列を参考に合成したDNAを用い、イネ種子由来のcDNAを鋳型にRT-PCRを行ったところ、O2と相同性の高い新規のcDNA断片が数種類増幅された。現在、それらについて解析しており、その結果を報告する予定である。

C1p-18

イネ・GA応答性遺伝子のA/Tリッチプロモーター配列に相互作用する低分子量DNA結合タンパク質の解析

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。オート麦糊粉層細胞を用いた実験系により、CPD3遺伝子のGA応答性プロモーター領域は、-180から-140に存在するA/Tに富んだプロモーター配列であることが判明しており、この領域のDNA断片は、オート麦糊粉層細胞より調整した核抽出物と相互作用して、高い易動度のゲルシフト像を示すことが明らかになっている。

強陰イオン交換カラムを用いた核抽出物の部分精製により、オート麦核タンパク質は、恒常的にプロモーター断片と複合体を形成する画分と、GAに依存して複合体形成量を著しく増大させる画分に分離された。更に、サウスウエスタン法を用いた解析により、CPD3遺伝子の転写制御因子の候補としてオート麦のA/T配列結合タンパク質であるPF-1、トウモロコシなどで同定された新規Znフィンガータンパク質であるDofファミリー様タンパク質などが同定された。現在、これらのDNA結合タンパク質群のCPD3遺伝子の転写活性化への関与や、発芽種子における糊粉層細胞内での挙動を解析している。

C2a-01

高温に应答した種子内アブシジン酸合成の促進による冬植物の発芽時期調節機構

吉岡俊人, 及川志保, 遠藤貴司, 佐藤 茂, 羽柴輝良 (東北大・農・環境適応)

種子の発芽は、マクロ環境要因として、気温の季節変化に应答して起こる。われわれは、冬植物種子発芽の温度反応機構を生態生理的に解析した。

生態的解析；冬植物であるミドリハコベの種子は春に形成・散布されて秋に発芽する。散布後、種子の発芽可能温度は高温域へ拡大したが、夏期間、土壌温度は発芽可能温度域よりも5~10℃高く推移した。Fluridone (ABA生合成阻害剤)添加は発芽可能温度域を拡大した。秋には土壌温度域と発芽可能温度域とが重なり、fluridoneの発芽促進効果とABAの発芽抑制効果は低下した。

生理的解析；レタスをモデル植物として高温発芽阻害の生理機構を調べた。発芽適温においてレタス種子のABA含量は速やかに低下したが、発芽が阻害される高温下では高いレベルに保たれた。高温下でも、fluridoneを添加すれば、ABA含量は低下した。レタスおよび広範な冬植物種子の高温下での発芽率低下はfluridoneによって回復した。

以上の結果から、①高温に应答して種子内でABA合成が促進される、②冬植物はこの発芽抑制機構により夏期の発芽を回避していると考えられる。

C2a-02

アラビドプシス黄化芽生えインペルターゼ遺伝子のクローニング 金澤 昭彦¹、三橋 渉^{1,2}、豊増 知伸^{1,2}、梁 泳烈²、神谷勇治² (¹山形大学・農・生物生産、²理研フロンティア)

私達はアラビドプシス (*Arabidopsis thaliana* L.) 茎部生長に興味をもち研究を進めているが、今回は生長細胞のマーカ酵素としてのインペルターゼに注目し、RT-PCR によって同酵素遺伝子をクローニングしたので報告する。アラビドプシス黄化芽生え胚軸より調整したcDNAを鋳型とし、数種類の植物インペルターゼに保存されたアミノ酸配列に基づき合成した縮合プライマーを用いてPCRを行なった。得られたクローンについてシークエンスを行なった結果、これらクローンの推定アミノ酸配列がトマトとニンジンとの可溶性と不溶性の酸性インペルターゼおよびマングビーンとの可溶性インペルターゼとに高いホモロジーが示された。これらをプローブとしてノーザン・ブロットを行ったところ、1つのクローンについて吸水後32時間目以降にシグナルが検出され芽生え生長に伴って mRNA 量が増加することが観察された。また、他のクローンの発現時期についても合わせ報告する予定である。

C2a-03

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を用いたオルガネラの分裂機構の細胞学的解析と、分裂に関わる装置の単離。宮城島進也, 伊藤竜一, 戸田恭子, 高橋秀典, 黒岩晴子¹, 黒岩常祥 (東京大・院・理・生物,¹ 共立女子短大・文科)

葉緑体、ミトコンドリア、マイクロボディーは、既存の構造が分裂することによって増殖する。また分裂中の葉緑体とミトコンドリアの分裂面に、それぞれリング状の構造(葉緑体分裂リング、ミトコンドリア分裂リング)が存在し、分裂をひきおこしていると考えられている (Kuroiwa et al.1995)。

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* は葉緑体、ミトコンドリア、マイクロボディーを細胞内に一つずつもち、明暗同調培養ができる。この系を用いて、葉緑体分裂リングとミトコンドリア分裂リングの構造、形成過程、収縮過程を詳細に観察し、葉緑体、ミトコンドリアの分裂様式を明らかにした。さらに、マイクロボディーを蛍光色素、brilliant sulfoflavinにより特異的に染色する方法を開発し、マイクロボディーの分裂を観察した。

分裂リングを含め、分裂に関わるタンパク質を同定するために、細胞を高度に同調培養し、分裂リングを保存した形で分裂期の葉緑体を細胞から取り出すことに成功し、現在その分画と、分裂期特異的に葉緑体に存在するタンパク質を探索している。

C2a-04

色素体の分裂装置における内部リングの進化的意味 黒岩常祥, 宮城島進也, 伊藤竜一, 高原学 (東大・院・理学系・生物科学)

色素体とミトコンドリア(オルガネラ)は独自のゲノムを含み既存のオルガネラの分裂によって増える。オルガネラDNAが独自の「核」(DNAとタンパク質の複合体)を形成していることは、高分解能蛍光顕微鏡法や抗DNA抗体を用いた免疫電子顕微鏡法によって、最近では容易に観察されるようになった。その結果、色素体とミトコンドリアの分裂は二つの過程、即ちオルガネラの核分裂とオルガネラの基質の分裂(オルガネロキネシス; プラスチドキネシスとミトコンドリオキネシス)、に分けて研究することが可能になった。これまでオルガネラの増殖に必要な分裂装置は見つかっていなかった。1986年我々は単細胞紅藻シアニジウム(*Cyanidium caldarium*)で初めて色素体の分裂装置を発見し、色素体分裂リング(PDリング)と名付けた。PDリングはオルガネラの外側、即ち細胞質に存在していた。その後の研究によりこれは植物界に普遍的に存在していた。1993年には、シアニジウムの仲間シアニヂオスキゾン (*Cyanidioschyzon merolae*)のミトコンドリアに、PDリングに類似した分裂装置を見だし、ミトコンドリア分裂リング(MDリング)と名付けた。従って真核生物の細胞分裂は3つのリング(収縮リング、PDリング、MDリング)によって遂行されていることが明らかとなった。一方原核生物はFtsZリングによって分裂が制御されている。

本研究では、これまで曖昧であったPDリングの内側のリングの微細構造を述べるとともに、その進化的意味について考察する。

C2a-05

講演取消

C2a-06

タバコ Rb の機能解析

中神弘史、関根政実、村上浩子、新名惇彦 (奈良先端大・バイオサイエンス)

動物、酵母を用いた研究の進展により、真核生物の細胞周期制御機構には共通のメカニズムが存在し、植物でも基本的には共通の機構によって制御されているという認識が強くなってきた。しかし、分化との関連で最も重要な制御ポイントである G1 期制御に関する分野は、高等植物では多くの重要な課題が残されている。動物では G1 期に R 点と呼ばれる制御点が存在し、細胞周期の進行の有無を決定づけている。Rb はその中心的な役割を果たしており、転写因子である E2F 等と結合することにより細胞周期の進行を R 点の前で抑制しているが、サイクリン/サイクリン依存性キナーゼによるリン酸化によって不活性化されると、R 点を通過して G1 期から S 期へと進行することが知られている。近年、トウモロコシより Rb 類似遺伝子 (*ZmRb1*) が単離されたことを発端に、植物でも Rb が G1 期制御に中心的に働くメカニズムが存在することが明らかになりつつある。

当研究室においてもタバコより Rb 遺伝子 (*NtRb1*) を単離し、その発現様式の解析等を進めている。*NtRb1* がコードするタンパク質は約 107kDa であり、*ZmRb1* より N 末端側がかなり大きく、酵母の two-hybrid 法により、タバコサイクリン D (*NtCycD1*) と特異的に結合した。現在、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の再構成系を用いて、サイクリン/サイクリン依存性キナーゼによる *NtRb1* のリン酸化の解析を進めている。

C2a-07

イネ培養細胞由来マイクロソーム画分における、ペプチド性細胞増殖因子 phytosulfokine- α 特異的結合部位の解析
松林嘉克、坂神洋次 (名古屋大・農・応用生物科学)

Phytosulfokine- α (PSK- α) は、アスパラガス細胞培養液から単離された硫酸化ペプチドであり、植物ホルモンの存在下、1~10 nM 程度の低濃度で強い細胞増殖誘導作用を示すことが明らかにされている。また PSK- α は、多くの植物種の細胞培養液からも検出されており、植物界においてかなり普遍的な増殖因子であると考えられている。しかしながら、この因子がどのようにして植物細胞の増殖を誘導するのかについては、現在までのところほとんど解明されていない。

我々は、これまでに ^{35}S ラベルリガンドを用い、イネ培養細胞の細胞膜上に PSK- α 特異的結合部位が存在することを明らかにしてきたが、 ^{35}S を用いた場合、高い比活性でラベルすることが困難であるという欠点があった。そこで今回は比活性を 40 Ci/mmol にまで高めた [^3H]PSK- α を新たに合成し、イネ培養細胞由来マイクロソーム画分を用いて結合実験を行なった。まず、結合の pH 依存性を検討したところ、pH4.0 を最大として酸性側で高い特異的結合が観察されたが、逆に中性から塩基性側では結合量はかなり低下した。次に、pH4.0 の条件で種々の濃度の [^3H]PSK- α を与えた場合の特異的結合量を測定し、スキッチャードプロットを行なったところ、高親和性型 ($K_{d1} = 4 \times 10^{-9}$ M; 90 fmol/mg protein) および、低親和性型 ($K_{d2} = 2 \times 10^{-8}$ M; 200 fmol/mg protein) の 2 種類の結合部位が存在することが確認された。

C2a-08

シロイヌナズナ胚軸外植片における *cdc2* 遺伝子発現と細胞増殖能
高橋拓也、杉山宗隆 (東京大・理・植物園)

シロイヌナズナの PSTAIRE 型 CDK ($p34^{cdc2}$) をコードする遺伝子 *cdc2a1* の発現に関しては、細胞増殖そのものではなく増殖能と連関している、という考えがあるが、これは必ずしも実証されているわけではない。一方私たちは、シロイヌナズナの温度感受性突然変異体 *srn2* の表現型解析により、増殖能を一旦失った細胞が再び増殖能を獲得する過程に *SRD2* 遺伝子機能が関与することを示す結果を得ている。そこで本研究では、胚軸外植片の脱分化に伴う *cdc2a1* 発現レベルの変動とそれに対する *srn2* 変異の影響を調べることで、*cdc2a1* 発現と細胞増殖能との関係を検討した。

これまでの報告では、*cdc2a1* プロモーター - GUS キメラ遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを用いた解析により、根では分裂組織のほかには内鞘部分で *cdc2a1* の強い発現が見られるが、胚軸にはそのような発現がないとされていた。しかしながら、RNA ゲルブロット解析、抗 PSTAIRE 抗体を用いた免疫ブロット解析を行った結果、胚軸にもかなりの *cdc2a1* mRNA、 $p34^{cdc2}$ タンパク質が蓄積されていることがわかった。また、総 RNA あたりの *cdc2a1* mRNA、総抽出タンパク質あたりの $p34^{cdc2}$ のレベルはいずれも細胞増殖が始まる頃にはかえって減少する傾向があった。mRNA 量の変化には *srn2* 変異は影響しなかったが、制限温度下で培養した変異体外植片では $p34^{cdc2}$ 相対量の減少の遅延が見られた。*cdc2a1* プロモーター - GUS 形質転換体の胚軸外植片では、はじめ GUS 活性はきわめて低いが、脱分化を誘導すると 1 日以内に中心柱部分で活性の著しい上昇が観察された。この GUS 活性の変動に *srn2* 変異は影響しなかった。以上の結果は、*cdc2a1* 発現レベルと増殖能とは単純な対応関係にはないことを示している。

C2a-09

高等植物におけるM期特異的発現を示す遺伝子のプロモーター解析

伊藤 敬、伊藤正樹、渡邊 昭 (東京大・院・理系・生物科学)

植物のB-typeサイクリンはG2/M期に特異的な発現を示す。この発現はプロモーター領域によって制御されており、ニチニチソウのサイクリン遺伝子(CYM)のプロモーター領域の研究により、9bpからなる塩基配列(MSA element)がM期特異的なプロモーターの活性化に必要かつ十分であると明らかにしてきた。このMSA elementはダイズ、アラビドプシス、タバコなどのB-typeサイクリンプロモーターだけでなく、M期特異的な発現を示すタバコのキネシン様タンパク質をコードするNACK1, NACK2遺伝子のプロモーターにも存在する。そこで、この配列が高等植物のM期特異的発現制御に普遍的にかかわっているかどうかについて解析を行った。ダイズのB-typeサイクリン遺伝子 *cyc4Gm* およびタバコのNACK1遺伝子のプロモーターに存在するMSA様配列に点突然変異を導入した。この変異型プロモーターにレポーター遺伝子としてルシフェラーゼをつないだキメラ遺伝子を作成し、タバコ培養細胞BY-2に導入した。形質転換BY2を同調培養し細胞周期中のレポーター遺伝子の発現を解析した。その結果、MSA様配列に変異を持ったプロモーターではM期特異的活性化が失われていた。このことはMSA elementを介したM期特異的な発現制御機構が高等植物の間で進化的に保存されていることを示している。現在このエレメントに結合するトランス因子を探索中である。

C2a-10

イネの分裂期サイクリンの発現解析と酵母を用いた機能解析

岩本憲和、梅田正明、梅田(原)千景、橋本純治¹、内宮博文 (東大・分生研、¹農水省・生物研)

細胞周期の進行は植物においてもCDKの活性化により厳密に制御されていると考えられている。サイクリンは直接結合することでCDKの活性化を促す因子であるが、これまでになされた植物のサイクリンの単離の報告により植物は動物と比較して多くのサイクリン遺伝子を有することが明らかになっている。

演者らはcDNAライブラリーから新たなイネのサイクリン、*cycOs1*を単離する事に成功した。この遺伝子は510アミノ酸からなるタンパク質をコードしておりそのN末側には細胞周期の時期依存的分解に関与するものと思われるデストラクション・ボックスが、中心部にはサイクリン・ボックスが保存されていることが明らかになった。この*cycOs1*はそのアミノ酸配列からA1タイプに分類され、イネには少なくとも2種類のA1タイプ(*cycOs1*, *cycOs3*)、2種類のB1タイプ(*cycOs2*, *cycOs4*)が存在することが明らかになった。これらのサイクリンの機能的な差異を明らかにする目的で酵母を用いた解析を行い、酵母サイクリン欠損株DL1を全てのイネのサイクリンが相補し、野生株YPH500株の生育に与えるそれぞれのサイクリンの発現の影響に差異が見られることを明らかにした。このことは各サイクリンの機能的な差異を示唆するものであり興味深い。さらに *in situ hybridization* のシグナルとDAPIによる核の像を比較することにより各サイクリンの発現時期にも差異が見られることを明らかにした。これらのデータを元に各サイクリンの機能を考察したい。

C2a-11

イネのサイクリン依存性キナーゼの機能解析

山口雅利、梅田正明、梅田(原)千景、橋本純治¹、内宮博文 (東大・分生研、¹農水省・生物研)

サイクリン依存性キナーゼ(CDK)は細胞周期の制御機構に中心的な役割を果たしている。イネでは、現在までに四種類のCDKが単離されているが、その中の一つである *cdc2Os-3* は、転写レベルにおいてG2/M期特異的に発現していることを我々は今までに明らかにした。このような発現パターンを示すCDKは植物でのみ報告されていることから、植物特異的な細胞分裂制御に機能していると考えられる。我々はこの発現パターンがタンパク質及び、キナーゼ活性レベルにおいても対応するか検討するために、培養細胞を用いて解析を行ったので報告する。

ところで、CDKはサイクリンとの結合やリン酸化・脱リン酸化によってその活性が制御されているが、CDK活性化キナーゼ(CAK)は、CDKのT-ループ領域にあるスレオニン残基をリン酸化することによりCDKを活性化型にする。イネのCDKの一つであるR2は、今まで植物で唯一単離されたCAKホモログとして知られていたが、その機能については解析されていなかった。そこで我々は、遺伝学的及び、生化学的な解析により、R2がアミノ酸配列の相同性だけでなくキナーゼ活性の上でも動物などのCAKと相同性があるのか解析を行った。

C2a-12

シロイヌナズナから単離された新規のCDK活性化キナーゼの機能解析

梅田正明、Csaba Koncz²、内宮博文 (東大・分生研、¹Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung)

細胞周期の制御に関わるサイクリン依存性キナーゼ(CDK)は、その活性がサイクリンの結合と特定のアミノ酸残基のリン酸化によって制御されている。CDKの活性化に必須なT-loop上のスレオニン残基のリン酸化はCDK活性化キナーゼ(CAK)によって触媒されるが、植物細胞のCAK活性についてはこれまで全く報告がなく、細胞分裂の活性化におけるCAKの機能についても解析が進んでいない。そこで、本研究ではシロイヌナズナのCAKホモログを単離する目的で、出芽酵母のCAK変異株を利用してシロイヌナズナのcDNAライブラリーをスクリーニングした。

得られたcDNAから予想されたアミノ酸配列は、動物や分裂酵母のCAKと有為な相同性が見られたが、相同性が高い領域はキナーゼドメインに限られており、全体としての相同性はそれ程高くないことが明らかになった。したがって、単離されたcDNA(*cak1At*)は新規のCAKをコードしていると考えられた。*cak1At*を酵母のCAK変異株で発現させたところ、出芽酵母のみならず分裂酵母においてもCAKの変異を抑制することが明らかになった。出芽酵母と分裂酵母のCAKが全く異なる分子種であることを考えると、この結果は非常に興味深い。詳細なキナーゼ活性の解析結果をもとに、*Cak1At*の機能について考察する。

C2p-01

アラビドプシス *ped1* 突然変異体はチオラーゼ遺伝子を欠損する

島山可菜子、林 誠、近藤真紀、西村幹夫
(基生研・細胞生物)

【目的】高等植物のペルオキシソームは、種子の発芽に伴う子葉の緑化過程において、その生理機能をグリオキシソームから緑葉ペルオキシソームへと変換することが知られている。グリオキシソームは脂肪酸β酸化系やグリオキシル酸回路の諸酵素を含み、貯蔵脂肪から糖新生を行う上で重要な役割を果たしている。一方、緑葉ペルオキシソームはグリコール酸経路の諸酵素を含み、光呼吸に関与している。私達は、ペルオキシソームの機能変換機構を遺伝学的に解析することを目的として、ペルオキシソーム機能欠損突然変異体の解析を行っている。

【結果】私達は、前大会において2,4-dichlorophenoxybutyric acidに特異的に耐性を示すアラビドプシス突然変異体について報告した。これらの一つ、*ped1* (*peroxisome defective1*) 突然変異体は、2番染色体の *cop1* 近傍に変異遺伝子を持っている。ゲノム解析の結果から、この領域にはチオラーゼ遺伝子が存在しており、*ped1* 突然変異体ではチオラーゼ遺伝子に1塩基の挿入が起きて第四エクソン内に終止コドンを生じていることが判明した。*ped1* 突然変異体では、発芽過程で発現される各種グリオキシソーム酵素のうち脂肪酸β酸化系酵素のチオラーゼのみを欠失していた。またこの突然変異体では、グリオキシソームから緑葉ペルオキシソームへの機能変換が野生型と比較して遅いことが判明した。以上の結果をもとに、高等植物におけるペルオキシソームの機能変換機構について考察を加える。

C2p-02

シロイヌナズナの排水組織における液胞の機能

木下 哲¹、野口 哲子²、西村 いくこ¹、西村 幹夫¹
(¹基生研・細胞生物、²奈良女子大学・理・生物)

排水組織は水を排出する組織で、葉の縁に存在する。シロイヌナズナでは、湿度を高くし暗所下におくと葉の縁より水が排出されるのが観察できる。自然界では蒸散を抑える条件と吸水を促進する条件下で夜から早朝にかけて観察される。これは植物が蒸散が抑えられた条件下でも、養分を水と一緒に吸収し続けなければならないために必要な現象と考えられている。

我々は液胞プロセッシング酵素 (VPE) の発現が排水組織において顕著なことから、この組織に興味を持っている。VPE 遺伝子は、新たに合成された液胞機能タンパク質が多量に液胞へ運ばれる時期や組織において発現が顕著になる。このことより排水組織の液胞は重要な機能を果たしているものと考えられる。

電子顕微鏡観察により、排水組織の細胞内には発達した液胞と共に、頻りに multivesicular body 様の構造体が見られた。また、VPE プロモーター/GUS を導入した形質転換アラビドプシスを2週間 MS 寒天培地上で培養し、その後、様々なイオンを増加させた培地上で5日間培養した結果、塩、重金属により GUS 活性が上昇し、mannitol や sucrose では変化が見られなかった。現在、液胞及び multivesicular body 様の構造と排水組織における養分吸収の関連を検討している。

C2p-03

高等植物マイクロボディに局在する新規の膜結合型蛋白質

加藤朝¹、山口勝司¹、林潤^{1,2}、林誠^{1,2}、西村幹夫^{1,2} (基生研・細胞生物¹、総合研究大学院大・生命科学²)

【目的】脂肪性種子のマイクロボディは発芽の過程でグリオキシソームから緑葉ペルオキシソームへと機能変換する。この際、内蔵する酵素および膜蛋白質の組成の劇的な変化が観察される。カボチャでは既にグリオキシソーム特異的にみられる膜蛋白質として MP28 および MP31 を報告しているが、発表者らは新たに、グリオキシソーム膜と緑葉ペルオキシソーム膜の両方に局在する26-kDa蛋白質、MP26 をカボチャとシロイヌナズナから見出し、その構造および機能の解析を行った。

【結果】カボチャ MP26 (PuMP26) はマイクロボディ膜に強く結合した蛋白質である。この PuMP26 の N 末端アミノ酸配列を決定し、相同性をもつシロイヌナズナ cDNA を EST バンクから得た。全塩基配列を決定した結果、シロイヌナズナ MP26 (AtMP26) は、286 アミノ酸からなるポリペプチドをコードすること、N 末端延長配列を持つ高分子量前駆体として合成されること、即ち先に発表者らが解析を加えたマイクロボディへの輸送シグナル (PTS2) をもつこと、が明らかになった。さらに AtMP26 の C 末端側領域は、低分子量熱ショック蛋白質 (sHSP) と相同性を有しており、新たな sHSP ファミリーに属することが推定された。現在特異抗体を用いて細胞内局在性および発現、蓄積の変化を解析中である。

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

C2p-04

原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の染色体ゲノムの解析

○太田にじ、佐藤直樹¹、黒岩常祥² (早稲田大・人科、¹埼玉大・理学部・分子生物学科、²東京大・大学院・理学系・生物科学)

染色体の起源と進化を明らかにするために、原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の染色体ゲノムの全塩基配列を決定し、コードされている遺伝子をホモロジー検索により同定した。その結果、高等植物の染色体ゲノムにはコードされていない遺伝子が数多くコードされていることがわかった。原始紅藻である *C. merolae* の染色体ゲノムには、高等植物の染色体ゲノムにコードされている遺伝情報系の遺伝子群と光合成系の遺伝子群の他に、アミノ酸合成系の遺伝子、脂肪酸合成系の遺伝子、ビタミンK合成系の酵素の遺伝子、DNA結合タンパク質の遺伝子などが発見された。

C2p-05

葉緑体核様体の47kDaタンパク質の解析
佐々木真紀子, 品田幸代, 佐藤直樹 (埼玉大・理)

葉緑体は核とは異なる独自のDNAとその遺伝情報の発現系を持ち、タンパク質とともに高度に組織化された核様体構造をとって機能していることが知られている。葉緑体核様体の基本的な構造を明らかにするため、エンドウの核様体に対する抗体を用いたウエスタンスクリーニングを行った。いくつかの部分クローンが得られたが、そのひとつPD4はコンピュータ解析の結果、シロイヌナズナの subtilisin-like protease の一つと高い相同性が見られた。さらにこのcDNAについて、その一部分のペプチドを合成し抗体を作製した。これを用いて諸分画との反応を調べたところ、葉緑体核様体のタンパク質のクローンであることが確認され、核様体の47kDaのタンパク質と反応することがわかった。現在、このタンパク質の精製と全長cDNAの取得を試みている。

C2p-06

葉緑体DNA結合タンパク質CND41の機能解析
-アンチセンス形質転換植物の次世代株の解析
中野雄司¹, 木村琢磨^{1,4}, 村上真也², 金子康子³, 松島久³, 佐藤文彦², 吉田茂男¹ (理研・植物機能,²京大院・農・応生科,³埼玉大・理,⁴明治大・農)

CND41は、植物組織中において葉緑体遺伝子産物と逆比例的な蓄積を示し、葉緑体DNA上の広範囲に結合するタンパク質である。その機能について、今年度はアンチセンス形質転換体の自家交配による次世代株を中心に解析を行った。

形質転換当代においてCND41低発現性の2系統それぞれの次世代株について、リポプローブを用いたノザン解析を行った所、CND41 antisense 遺伝子の顕著な高発現とそれに対応したCND41 mRNAの低発現が認められた。これらのCND41低発現次世代株においては、形質転換当代において認められた *psbA*、23S-16S rRNA など数種の葉緑体遺伝子発現量の野性型株と比較した増加傾向や、植物個体の矮化傾向が遺伝し、この性質はCND41発現量と対応していることが明らかとなった。この結果はCND41の葉緑体遺伝子発現の抑制因子としての機能を追認するものであると考えられた。更に、アンチセンス形質転換植物体における光学顕微鏡による組織観察、走査型電子顕微鏡を用いた緑葉表皮の観察、透過型電子顕微鏡を用いた葉緑体形態の観察を行っている。

C2p-07

タバコ葉緑体核様体タンパク質CND41のプロテアーゼ活性
村上真也, 近藤良彦, 岡田崇, 中野雄司¹, 佐藤文彦 (京大院・農・応生科,¹理研・植物機能)

CND41は、タバコ光混合栄養培養細胞の色素核様体から単離された41 kDのDNA結合性タンパク質である。我々はこれまでにそのcDNAをクローニングするとともに、形質転換細胞を用いた機能解析を行い、本タンパク質が葉緑体遺伝子発現を負に制御する可能性を示唆してきた (Plant Cell, 9; 1673, 1997)。CND41による遺伝子発現抑制機構としては、そのN末端の高リジン配列による葉緑体DNAへの非特異的結合が考えられるが、モチーフ検索により見いだされたプロテアーゼ活性の関与も考えられる。そこで、まずモチーフ検索等の結果を再検討し、アスパラギン酸プロテアーゼ (AP) の活性部位が完全に保存されていること、ならびに代表的なAPである mucoropepsin と全長にわたり約25%のアミノ酸が同一であることを確認した。次いでCND41の活性を測定するため、培養細胞よりCND41の精製を行った。タバコ光混合栄養培養細胞を50mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で磨砕して得た不溶性画分を、500mM NaClで可溶化し、CND41粗画分を得た。この画分を陽イオン交換、疎水性、ヘパリンカラムにより、ほぼ単一のCND41にまで精製した。ついでBSAを基質とし、本精製CND41が酸性域においてプロテアーゼ活性を持つことを確認した。現在CND41のプロテアーゼ活性の詳細な解析を行っており、合わせて報告する。

C2p-08

シロイヌナズナ温度感受性葉緑体形成不全突然変異体 (*chs5*) の解析
荒木直比呂, 楠見 健介, 射場 厚 (九州大学・理・生物)

シロイヌナズナの単劣性突然変異体である *chs5* は、許容温度下 (22℃) で生育させると正常な緑葉を形成するが、制限温度下 (15℃) ではクロロシスをおこした葉を形成する。また、制限温度下における *chs5* の表現型は、温度により不可逆的に決定される。*chs5* のクロロシスをおこした葉組織においては、クロロフィル、カロテノイドの蓄積が著しく阻害され、生重量あたりの葉緑体の主要な糖脂質が大幅に減少していた。一方、葉緑体膜系以外の生体膜に多く含まれるリン脂質の量は野性型と比べて大きな差は認められなかった。透過型電子顕微鏡による細胞内微細構造の観察を行ったところ、葉緑体において極度に小胞化したチラコイド膜構造が認められた。また、ノーザン解析の結果、*chs5* 変異は、核と葉緑体にコードされる光合成関連遺伝子の mRNA の蓄積には、影響しないことがわかった。これらの結果は、*CHS5* 遺伝子が、チラコイド膜の形成、維持に少なからぬ重要な役割を持つことを示唆している。

C2p-09

イネ *zebra* (横縞葉) 突然変異株 CM189 における光傷害
植見健介、佐藤光¹、射場厚 (九大・理・生物、
¹九大・農・遺伝子資源センター)

イネ *zebra* は、屋外での生育において葉組織の一部がクロロシスを起こし、葉の伸長方向に対し垂直に白い縞が生じる変異株である。*zebra* 変異の系統の一つである CM189 を一定の恒温条件 (25℃以上) で生育させると、横縞葉の表現型を呈さず、葉全体がクロロシスを引き起こす。このクロロシスの程度は光強度に依存し、例えば 25℃ の生育温度では低照度 (200 μ E/m²/sec) で野生株と同様の緑葉となるが、高照度 (4,000 μ E/m²/sec) ではクロロシスを引き起こす。これらの結果は、CM189 が高温感受性で、光傷害により葉組織の機能が破壊される突然変異株であることを示唆している。クロロシスを起こした葉組織においてはクロロフィルとカロテノイドの蓄積が著しく阻害され、光合成関係の遺伝子の発現が転写レベルで抑制されていた。葉の発生段階の異なる時期に生育温度を変化させる温度シフト実験を行ったところ、葉の形成の初期過程において表現型が決定されていることが明らかになった。このことは、葉の形成初期に光傷害に対する防御機構の構築が行われる特定のステージが存在し、*zebra* 遺伝子とその構築に重要な役割を持っている可能性を示唆している。

C2p-10

新しいトランジェントアッセイ系によるタバコ *rbcl*
プロモーターの解析
稲田 仁、射場 厚 (九州大・理・生物)

高等植物において、*rbcl* や *psbA* など光合成に関係するプラスチド遺伝子のプロモーターには、大腸菌の σ^{70} プロモーターに存在する -35 および -10 保存配列に類似した配列が見いだされている。このような保存配列は遺伝子の正確な転写に必要であることが、葉緑体 *in vitro* 転写系を用いた研究において報告されているが、*in vivo* における研究はほとんど行われていない。我々は、プラスチド遺伝子の *in vivo* における発現を解析するために、パーティクルガン法を利用した新しいトランジェントアッセイ系を開発した。本大会では、この系を用いて行ったタバコ *rbcl* プロモーターの部分欠失または塩基置換による解析結果を報告する。

C2p-11

コムギ芽生えでは葉緑体分化に依存して葉緑体コード RNA ポリメラーゼのプロモータ認識性が変化する
佐藤淳子、椎名隆、豊島喜則 (京都大院・人間・環境)

葉緑体の分化過程および光環境変化に依存する葉緑体遺伝子の転写制御機構を明らかにする目的で、コムギ芽生えを用いて、葉緑体コードの RNA ポリメラーゼを対象に *in vitro* 転写による解析を行った。

実験 明所で生育後、24時間暗順応させた芽生え (Dark) と、その後2時間、光を照射した芽生え (Light) について、葉の上部組織 (Top) と、下部組織 (Bottom) とに分けて4種類の葉緑体抽出液を調製し、*psbA*、C、D 遺伝子のプロモータとそれに変異を与えたプロモータについて *in vitro* 転写実験を行った。

結果

- 1 Dark・Top: *psbA*、C、D はすべて転写不活性。
Light・Top: *psbA*、D は活性。*psbC* は不活性。
Dark・Bottom: *psbA*、C は活性。*psbD* は不活性。
Light・Bottom: *psbA*、C は活性。*psbD* は不活性。
 - 2 Top と Bottom で活性な RNA ポリメラーゼはそのコアプロモータ構造の認識性が異なっていた。
 - 3 Top の RNA ポリメラーゼの活性は光により可逆的に変化した。
- これらの結果に基づき、その分子機構を検討する。

C2p-12

クロレラ葉緑体遺伝子の RNA プロセッシング
村中俊哉^{1,2}、Wilhelm Gruijssem¹ (Dept. Plant & Microbial Biol., UC Berkeley, ²住友化学・生命研)

クロレラは、細胞内に巨大な一つの葉緑体を持つ単細胞性緑藻である。クロレラの培養工学的、生理学研究に比べ、葉緑体遺伝子発現調節などの分子生物学的研究はほとんどなされていない。一方、ホウレンソウなどの葉緑体遺伝子は、3'非翻訳領域のエンドヌクレアーゼによる切断、それに続くエクソヌクレアーゼによる切断、の2段階によって RNA プロセッシングが起こり、それに係わる核コードタンパク複合体の存在が明らかになってきた。これらの知見から、RNA の正しいプロセッシングが、葉緑体遺伝子の安定的な発現に重要であることが示唆される。そこで、クロレラの葉緑体遺伝子の発現調節を調べる試みとして、クロレラの RNA プロセッシングが高等植物のそれと異なるかどうかを検討した。

Chlorella vulgaris の葉緑体ゲノムにコードされている *rbcl* 遺伝子の 3'非翻訳領域 (3'-*rbcl* とする)、および、3'非翻訳領域のステムループ構造が欠失した変異体 (3'- Δ *rbcl* とする) を作出した。*C. vulgaris* および、ホウレンソウから調製した葉緑体タンパクによって、*in vitro* 転写した 3'-*rbcl*、3'- Δ *rbcl* が、RNA プロセッシングを受けるかを調べた。その結果、3'-*rbcl* は、*C. vulgaris*、ホウレンソウ葉緑体タンパクによってプロセッシングを受けた。また、3'- Δ *rbcl* は、ホウレンソウ葉緑体タンパクによってプロセッシングを受けたが、*C. vulgaris* 葉緑体タンパクではプロセッシングと同時に RNA の分解が生じた。

C3a-01

タバコ培養細胞におけるCND41タンパク質の蓄積と葉緑体遺伝子発現

茶谷大志、勝井順子、村上真也、中野雄司¹、佐藤文彦
(京大院・農・応用生命科学、¹理研)

我々はタバコ緑色培養細胞の葉緑体核様体から、分子量41kDの葉緑体DNA結合性蛋白質CND41を単離し、その機能と発現調節機構の解明を進めている。CND41は120アミノ酸のトランジットペプチドと382アミノ酸の成熟蛋白質からなる核コードの蛋白質である。その成熟蛋白質のN末端にはリジンに富んだ部位が存在し、この部位がDNA結合に必要である。CND41 mRNAは、非光合成組織である根、莖、培養細胞において蓄積し、緑葉や光独立栄養細胞における蓄積は少ない。さらに、CND41アンチセンス遺伝子を導入し、CND41の発現量を低減させた形質転換植物培養細胞において、葉緑体遺伝子発現の増加が見られたことより、CND41が葉緑体遺伝子発現の負の制御因子であると考えられるに至っている。

今回、さらにCND41の発現調節機構を解明するために、培養細胞における詳細な解析を行った。まず、光独立栄養生育の可能なNI株と非選抜NII株を用い比較した結果、対数増殖期のNII株においてCND41の発現量が明らかに高いことがわかり、逆に葉緑体遺伝子産物量は低いことが示された。また、CND41の発現量の多いNII細胞においてCND41発現における糖の影響について検討した。その結果、糖を加えない培地で生育した場合、CND41の発現が抑制されたままであることに対して、培養途中に糖を添加することによって、CND41の発現が誘導されることが明らかとなった。

C3a-02

ミトコンドリア制御遺伝子の解析：チトクロームオキシダーゼ複合体形成に関わる *AtOXA1* の解析

坂本 亘 (岡山大・資生研)

シロイヌナズナの *AtOXA1* 遺伝子は、酵母の *oxa1* 呼吸欠損株を相補することにより得られた遺伝子で、ミトコンドリア呼吸鎖のチトクロームオキシダーゼの活性に必要と考えられる。*AtOXA1* は、422アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており、膜貫通ドメインと予想される疎水性領域が、酵母の遺伝子と比べて、比較的よく保存されていた。ゲノミック配列の解析からは、シロイヌナズナゲノム中には1コピー存在し、9つのエクソン部分からなる全長 2.7 kb の遺伝子構造をしていることが明らかとなった。*OXA1* タンパク質のミトコンドリアへの局在を調べるために、1) *OXA1* を大腸菌内で発現させた融合タンパク質から作製した抗 *OXA1* 抗体による免疫プロット、2) presequence と予想されるアミノ末端側の配列と GFP との融合遺伝子、による解析を行った。また、*AtOXA1* の発現と植物器官形成との関係を調べるため、*AtOXA1* cDNA を CaMV35S プロモーターで過剰発現あるいはアンチセンスに発現する遺伝子をシロイヌナズナに導入し、これらのトランスジェニック植物について解析を行っている。

C3a-03

タバコ培養細胞BY-2の核膜・核マトリクス構成タンパク質の生化学的解析

佐藤友宏¹、前島正義^{1,2} (¹名大院・生命農、²基生研・細胞機構)

核は遺伝子の保持・発現の場であり、細胞分裂にともない消失・再構築をする動的なオルガネラである。植物の核の構成タンパク質に関する知見は限られている。我々はタバコ培養細胞BY-2を材料に核膜画分を調製しその構成タンパク質を解析した。プロトプラスト化した細胞からPercollを用いて核を遠心画分し、次に核をDNase、2M NaClで処理して核膜孔複合体を含むnuclear matrix画分を調製した。これをさらにアルカリ処理、尿素処理をした。各画分に特徴的なタンパク質を見出した。39kDaタンパク質 (np39) は2M NaCl上清に回収され、核内部に局在することが特異抗体を用いた解析で明らかになった。核マトリクスの8M尿素により可溶化される画分の90kDaタンパク質 (np90) が、Ca²⁺結合タンパク質検出薬"Stains all"で明瞭に染色された。同画分にはレクチンConA結合性の200kDaタンパク質 (gp200) も検出された。

C3a-04

C4植物の葉肉細胞と維管束鞘細胞の機能分担に関わる新規遺伝子の探索

古本 強、畑 信吾、泉井 桂 (京大院・農・植物生理)

C4植物は、葉肉細胞において大気中の二酸化炭素の捕集を、維管束鞘細胞において炭酸同化を行っている。このC4光合成の成立に必要なタンパク質として、代謝酵素に関する知見は多く蓄積されているが、その他にどのようなタンパク質が必須であるかということについての知見は少ない。そこで本研究では、葉肉細胞と維管束鞘細胞の機能分担に必要な新規なタンパク質の探索を目的とし、全葉cDNAライブラリーに対して、葉肉細胞プロトプラスト(MCP)及び、維管束鞘細胞群 (Bundle Sheath Strand: BSS) から調製したプローブを用いて differential screening を試みた。

この結果、MCP特異的遺伝子として407クローンを、BSS特異的遺伝子として192クローンを単離した。MCP特異的に発現していることが知られているPEPカルボキシラーゼ遺伝子やCab m1遺伝子、BSS特異的に発現していることが知られているRubisCO小サブユニット遺伝子を確認したほか、メタロチオネインが新規にBSS特異的遺伝子として同定された。これらの他にもホモロジー検索上、未知の遺伝子が得られているので、それらの結果も合わせて報告する。

C3a-05

ヒヤクニチソウから単離した低分子Gタンパク質遺伝子Zerac1およびZerac2は維管束細胞特異的に発現する

中名生 龍子¹、福田 裕穂^{1,2} (¹東京大、理、植物園、²東京大、理、生物科学)

ヒヤクニチソウの芽生第一葉から単離した葉肉細胞は、オーキシンとサイトカイニンの存在下で、高集中度かつ同調的に管状要素に分化する。その際、セルロース微繊維を主成分とする局在化した二次細胞壁が形成される。このセルロース微繊維の沈着のパターンは、細胞膜の内側に存在する微細管の配向によって支配されている事が知られていたが、私たちは、アクチン繊維がこの微細管の配向に深く関わっていることを明らかにしてきた。微細管配向制御に関連するアクチン繊維は細胞膜直下に規則正しいパッチの集合体として出現し、二次壁肥厚に先立ってダイナミックに変化する。しかし、このアクチン繊維の配向変化を制御する仕組みについては不明なままであった。

私たちは、酵母や動物細胞で細胞内のアクチンの配向を制御していると考えられている低分子Gタンパク質の一種であるRho/RacGTPaseがアクチン繊維の配向制御を通して、二次細胞壁パターン制御を行っている可能性を考え、Rho/RacGTPaseのcDNAを単離することを試みた。そして、ヒヤクニチソウ管状要素分化細胞よりこのcDNAを2種類単離し、それぞれをZerac1、Zerac2と命名した。Zerac1およびZerac2のmRNAの経時的な発現レベルを調べたところ、2つのRacGTPase mRNAとも、管状要素分化を誘導するホルモン条件下のみ、しかも二次細胞壁形成直前に一過的に発現することが明らかになった。

つぎに、植物体中でのZerac1およびZerac2のmRNA発現の組織特異性を調べるために、ヒヤクニチソウの幼植物体に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、Zerac1およびZerac2はともに子葉および胚軸の維管束で特異的に発現することが示された。さらに詳細に観察すると、この2つの遺伝子は未発達な維管束では未成熟な篩部と未成熟な木部に発現が見られ、発達した維管束では特異的に分化すると思われる未成熟な篩部での強い発現と篩部を取り囲む細胞でのやや弱い発現が見られた。しかし、成熟した篩部や篩管、伴細胞には発現は見られなかった。このことより、これら2つのRacGTPaseは未成熟な状態の木部および篩部で発現することが明らかになった。

以上の結果からZerac1とZerac2の遺伝子産物が篩管細胞の分化を含む維管束分化の過程で重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。

C3a-06

オーキシン応答領域に結合する bZIP 型転写因子 RSG と相互作用する因子の解析

五十嵐大亮、長田敏行、高橋陽介 (東大院・理・生物科学)

RSG (repression of shoot growth) は *parB* 遺伝子のオーキシンに関するシス領域 AREII に結合するタンパク質の cDNA として one-hybrid 法によりクローン化された。オーキシン応答との関連は未だに明らかではないが、形質転換タバコを用いた解析から RSG はシュートの形態形成に関与していることが示唆されている。RSG は真核生物の転写因子のモチーフの一つである塩基性領域ロイシンジッパー (bZIP) 構造をもつ正の転写因子である。遺伝子の発現調節には転写因子間の相互作用が重要である。シュートの成長に関する転写制御系のネットワークを明らかにするため bZIP 型転写因子 RSG と相互作用するタンパク質の cDNA を two-hybrid 法により単離し解析した。本大会では2種類の遺伝子に関して報告する。

1つは、動物、酵母、植物において、広く保存されている 14-3-3 ファミリーに属するタンパク質群であった。14-3-3 はタンパク質のリン酸化を介した情報伝達系等に関与していることが知られている。RSG と 14-3-3 は *in vitro* でも特異的に結合する。もう1つは、RSG と bZIP 領域での相溶性が極めて高い、新規の bZIP 型転写因子であった。

C3a-07

FAS1及びFT遺伝子を含む複数の遺伝子を欠失している *hot* 突然変異体の解析と FAS1 遺伝子の単離にむけて

賀屋秀隆・小林恭士・荒木 崇・岩淵雅樹

(京都大学・大学院・理学研究科・植物学系)

我々は、頂端分裂組織の構造及び機能維持機構の解明を目的として、シロイヌナズナの T-DNA タグラインから *hot* (*hosoba toge toge*) と名付けた突然変異体を得た。*hot* 突然変異体は、本葉の細化、茎頂分裂組織の分断化、花茎の帯化、萼及び花弁の細化、花成遅延、根端分裂組織の矮化と根の伸長速度の減衰など、頂端分裂組織の構造及び機能維持の異常が原因であると考えられる表現型を示す (賀屋ら、1997年度本年会)。遺伝解析の結果、*hot* 突然変異体は FAS1 遺伝子と FT 遺伝子の両遺伝子に変異が起こっていることが明らかになった。FAS1 遺伝子は頂端分裂組織の構造・機能維持に関わる重要な遺伝子の一つであること (Leyser and Furner, 1992)、FT 遺伝子は開花時期に関わる遺伝子であることがそれぞれ報告されている。ゲノム解析の結果、T-DNA の挿入に伴い第一染色体上の 75.8kb に渡る領域が欠失しており、この領域には、少なくとも13の遺伝子の存在が予測されている。これまでに FT 遺伝子をこの領域中に同定している (小林ら、1998年度本年会)。現在、FAS1 遺伝子のクローニングを進めている。

C3a-08

イネにおける CEN/TFL1 相同遺伝子の単離と解析

中川 繭・根本圭介¹・経塚淳子・島本 功
(奈良先端大バイオ、¹ 東大農)

シロイヌナズナやキンギョソウでは、CEN/TFL1 が花序茎頂における LFY/FLO の機能を抑制することにより、無限花序が形作られている。我々は有限花序をもつイネにおいても、CEN/TFL1 と FLO/LFY の相互作用が花序形態の決定に関与しているのかを知るためにイネの CEN/TFL1 相同遺伝子を単離・解析した。

イネ花芽 cDNA ライブラリーから、CEN と 70% 以上の相溶性を持つタンパクをコードする2つの遺伝子 RCN1、2 を単離した。これらをシロイヌナズナで構成的に発現させると、*lfy* 変異体様の表現型が得られ、LFY 機能の抑制に関して RCN1、2 と TFL1/CEN の機能は保存されていると考えられた。

ノーザン解析を行うことにより、RCN1 と RCN2 では発現の組織特異性が異なることが分かった。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、RCN1 RNA が花序茎頂ではなく、葉の維管束で検出されたことから、CEN/TFL1 と RCN1、2 の発現制御機構は異なっていると考えられた。

RCN1 を構成的に発現させた形質転換イネでは、穎花の着生パターンが乱れた。したがって、イネの花序茎頂では RCN1 は発現していないが、強制的に発現させると RCN1 タンパクはイネ花芽形成過程に作用を及ぼすことが示唆された。

C3a-09

イネOsNAC遺伝子群の構造と発現パターンの解析
菊池一浩, 吉田薫, 上口(田中)美弥子¹, 松岡信¹,
廣近洋彦², 長戸康郎, 平野博之, (東大農学生命
科学, ¹名大生物分子応答研究センター, ²生物研)

ペチュニアのNo Apical Meristem (NAM) 遺伝子やアラビドプシスのCup-shaped cotyledon 2 (CUC2) 遺伝子などのタンパク質に、植物にのみ存在する新規のドメイン (NAC domain) が発見された。namとcuc突然変異体では茎頂分裂組織が形成されず、子葉や花の器官などが融合するなどの表現型を示すことから、NACボックス遺伝子は、植物の形態形成に重要な働きをしていることが示唆されている。

そこで、我々は単子葉植物であるイネにおいてNAC domainを持つ遺伝子 (OsNAC遺伝子) の性質や機能を明らかにする目的で、本研究を進めている。

8種類のOsNAC cDNAについて全塩基配列を決定し、相互比較を行った。また、サザンハイブリダイゼーションの結果からイネゲノム中においてmulti gene familyを形成していること、RT-PCRの結果から各々のメンバーが器官特異的に独自の発現をしていることが示された。この他、OsNAC遺伝子の空間的発現パターンの解析やレトロトランスポゾンTos17を用いたノックアウトシステムの探索についても報告する。

C3a-10

シロイヌナズナのNAC boxを持つ新しい遺伝子AtNAC1の構造と発現

高田 忍、石田 哲也、相田 光宏、藤澤 久雄、
田坂 昌生 (京大院・理・植物)

双子葉植物の器官分離の分子機構はほとんど分かっていない。シロイヌナズナのcuc (cup-shaped cotyledon) 突然変異株の芽生えは、カップ型に融合した子葉が発生し、茎頂分裂組織が形成されない。また、cucでは花器官の片や雄ずいの融合も見られる。この変異株はcuc1とcuc2の二重突然変異株である。CUC2はすでにクローニングされ、ペチュニアのNAM遺伝子と相同な構造(NAC box)を持つことが分かった。そこで、CUC2類似遺伝子がCUC2と同様に器官分離に関わっている可能性があると考え、シロイヌナズナのCUC2類似遺伝子について解析を行った。まずNAC boxをプローブとしてシロイヌナズナのゲノムのサザンプロット解析を行った結果、NAC boxを含む遺伝子が複数存在することが確認された。そこで、そのいくつかを単離し、その中でCUC2に最も塩基配列が似ていると推測されるAtNAC1に対して構造解析と発現解析を行った。その結果、AtNAC1はCUC2とよく似た構造をしており、CUC2同様主として花芽で発現することが解った。このことはAtNAC1がCUC2と機能的にもよく似ていることを示唆している。

C3a-11

SGR2(SHOOT GRAVITROPISM 2) 遺伝子は胚発生にも関与する
加藤壮英、深城英弘、田坂昌生 (京大院・理・植物)

植物のシュートは重力に対して負の屈性を示し、これは重力感受・刺激の伝達・屈曲応答の順で成り立つ。この現象の分子メカニズムを解明するため、シロイヌナズナから花茎の重力屈性変異体を多数単離した。今回、その中のsgr2 (shoot gravitropism 2) について報告する。

今までに単離されたsgr2の10のアレルは全て花茎、胚軸の重力屈性は異常だが、アレルごとに差があった。なお根は正常な重力屈性を示し、シュートも根も正常な光屈性を示した。またシュートには重力屈性に必須な内皮細胞層が存在し、その中にアミロプラストが存在していた。これらはSGR2がシュートの内皮細胞内での重力感受か、内皮細胞から表皮細胞までの刺激の伝達に関与することを示唆する。一方、sgr2の全てのアレルで子葉の枚数や形態の異常な芽生え、形態が異常で発芽しない種子が見られた。胚発生過程を解析したところ、いろいろな時期に大きな空胞をもった胚、異常な分裂面を持つ胚、全体の形態が異常な胚などが観察された。これらの異常は発生にしたがって出現頻度が減少し、逆に異常の多様性が増加していた。さらにほとんどの受精卵の頂端側に大きな空胞があり、最初の不等分裂の分裂面が野生株より基部側にずれていた。このことからsgr2では受精卵に大きな空胞ができたため、その後の胚の分裂面の異常や様々な形態異常が起こったと考えられる。SGR2遺伝子は1番染色体のm254の近傍に位置し、現在染色体歩行による遺伝子の単離を試みている。

C3a-12

タバコホメオボックス遺伝子の過剰発現により
顕在化される葉の形成と葉序との関係
玉置雅紀、西村明日香、相田光宏¹、田坂昌生¹、松岡信
(名大・生物分子応答、¹京大・理・生物・植物)

近年、植物の形態形成に関する分子生物学的アプローチが盛んになっている。我々は、植物の形態形成にホメオボックス遺伝子がどの様に関与しているのかを明らかにすることを目的としている。前年度までに、我々はタバコホメオボックス遺伝子NTH1の構造解析、発現解析及び形質転換を用いた解析を行い、この遺伝子がタバコの形態形成に関与していることを示してきた。今回この遺伝子を過剰発現させた形質転換体を解析する過程において、葉の形成と葉序との関係について興味深い知見が得られたので報告する。

タバコホメオボックス遺伝子NTH1を過剰発現させた形質転換体の葉は主脈がまっすぐ伸長せずに湾曲したが、その湾曲方向は葉序の基本螺旋の方向と関係していた。すなわち、時計方向または反時計方向に発生する葉は、それぞれ右または左の方向に湾曲した。さらに、葉が展開する前に、葉の原基と茎(茎頂分裂組織)を外科的手術により物理的に隔離してやると葉の湾曲は起こらなくなった。これらの結果は、葉の展開に対して葉序が何らかの影響を及ぼしていることを示している。このことをさらに検討するために転換体における葉序を調べたところ、葉序を決めるパラメーターのうち開度(連続して発生する葉原基がなす角度)については転換体と非転換体で違いが見られなかったが、葉間期比(Plastochron Ratio、連続して発生する2つの葉原基の中心と茎頂の中心がなす距離の比)は転換体为非転換体のタバコより増大していることが確認された。さらに、この葉間期比の値が大きくなるほど、葉の湾曲の度合いが大きくなることから、葉の湾曲と葉間期比は正の相関関係があると予想された。

C3a-13

グルココルチコイド誘導系を用いたタバコホメオボックス遺伝子NTH15の機能解析

坂本知昭¹, 玉置雅紀², 上口(田中)美弥子¹, 岩堀修一¹, 松岡信³ (筑波大・農林, ²名大・生物分子応答)

ホメオボックス遺伝子は転写調節因子として真核生物に広く存在し、動物では形態形成に重要な役割を果たしていることが知られている。植物においてもホメオボックス遺伝子が形態形成に深く関与していることが示唆されているが、ホメオボックス遺伝子を中心とした遺伝子のネットワークについてはほとんど明らかにされていない。

タバコのホメオボックス遺伝子NTH15を過剰発現させた形質転換体では様々な形態異常が観察され、内生のホルモンバランスも大きく崩れていることが示されている。そこで、このNTH15の機能についてより詳細に解析するために、NTH15とグルココルチコイド受容体のホルモン結合領域とのキメラ遺伝子を構築し、過剰発現させたNTH15産物の機能を人為的に誘導できる実験系を確立した。これらの形質転換体では、ステロイドホルモン依存的に形態異常が観察され、その濃度すなわち機能的なNTH15産物の量と形態異常の程度には、正の相関関係がみられた。またジベレリン合成系遺伝子などいくつかの遺伝子の発現量にも、機能的なNTH15産物の量との間に正または負の相関が認められた。さらにホメオボックス遺伝子を中心とした遺伝子のネットワークという意味において、これらの遺伝子とNTH15との関係を解析した。

C3a-14

KN1型タバコホメオボックス遺伝子群の発現解析
西村明日香、玉置雅紀、松岡信 (名大・生物分子応答)

我々は植物の形態形成に関与すると考えられているホメオボックス遺伝子をタバコから複数単離し、それらがどの様に形態形成過程に関与しているのかを明らかにするために各遺伝子の解析を進めている。植物のホメオボックス遺伝子はホメオドメインのアミノ酸配列の類似性から複数のグループに分類されるが、我々はそのうち茎頂分裂組織で特異的な発現を示すことが知られているKN1タイプのclass 1遺伝子群に注目して研究を進めている。今回はこれまでに単離した5種類のタバコKN1タイプのclass 1ホメオボックス遺伝子NTH1, 9, 15, 20, 22に関する発現解析結果をまとめて報告する。

まずノーザン解析により発現様式を調べたところ、茎頂、花芽、花、茎等において、各遺伝子がそれぞれ異なるレベルで発現していることが示された。さらに形態形成の場として重要な茎頂分裂組織近傍での発現領域を詳細に解析するためにin situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、NTH15はcorpus領域に特異的に発現していたのに対して、NTH1, 9, 20はメリステム全体、メリステム下部、周縁分裂組織等で弱い発現が観察された。NTH22についてはこの領域での発現は見られなかった。また、これらの結果を明確にするためにNTHプロモーター:GUSを導入した形質転換体を用いた解析も行った。以上を総合してNTH遺伝子群の発現様式から推測される形態形成における役割を考察する。

D1a-01

ホメオボックス遺伝子のイネ形態形成における機能
千徳直樹、佐藤豊、松岡信 (名古屋大、生物分子応答研究センター)

高等植物の形態形成は胚発生時に基本的な体制が構築された後も頂端分裂組織の活動により連続的に器官を形成する。したがって、高等植物の形態形成機構を解明するためには、胚発生時における器官分化機構と、胚発生以降の頂端分裂組織における器官分化機構の両方について明らかにする必要がある。今回、我々は高等植物の形態形成における分子機構を解明するために、植物においても形態形成への関与が示唆されているホメオボックス遺伝子をイネより多数単離し、それらの発現パターンおよび機能の解析を行った。

*in situ*ハイブリダイゼーションによる発現解析から、我々の単離した全てのイネホメオボックス遺伝子は器官形成以前の初期胚において茎頂分化予定領域を他の領域から区別するように発現していた。茎頂の分化後には、これらのホメオボックス遺伝子は茎頂における側生器官の分化領域付近に特徴的な発現を示すことが観察された。また、イネホメオボックス遺伝子を構成的に発現させた形質転換イネを作出したところ、葉に異常な形態が観察された。これらの結果よりイネの形態形成におけるホメオボックス遺伝子の機能について考察する。

D1a-02

ヒャクニチソウ脚部に発現するホメオボックス遺伝子の単離と解析
西谷千佳子¹、出村拓¹、福田裕雄^{1,2} (東京大・理・植物園、²東京大院・理・生物科学)

維管束組織は木部、篩部、形成層から成る複合組織であり、植物体の発生過程で頂端分裂組織に由来する細胞から時間的空間的に厳密に制御されて形成されることから、植物の組織形成の仕組みを考える上で大変興味深い研究対象である。しかしながら、維管束形成を制御する分子機構については、最近研究が始まったばかりであり、特に形態が見分けにくい篩部形成に関する知見は少ない。そこで本研究では、維管束形成、特に篩部形成の仕組みを明らかにするために、動植物の様々な組織形成への関与が示唆されているホメオボックス遺伝子 (*HB* 遺伝子) の単離を試みた。

HB 遺伝子単離の材料としては、すでに維管束組織分化の *in vitro* 系が確立しているヒャクニチソウを用いることにした。まず、根端分裂組織、前形成層、未成熟な維管束を含むヒャクニチソウの芽生えの根端から poly(A)⁺RNA を単離し、*HB* 遺伝子のコンセンサス配列を用いた 3'RACE 法を行った。その結果、9 種類の *HB* 遺伝子の cDNA を単離することができた (*ZeHB1* ~ *ZeHB9*)。また、このうち 8 種類はトマトの二次篩部に発現する *VAHOX1*、ニンジン前形成層に発現する *CHB6* を含む HD-Zip 型の *HB* 遺伝子とよく似た配列をコードしていた。さらに、これらのうち 3 種類について *in situ* hybridization を行ったところ、少なくとも 1 種類 (*ZeHB3*) が未成熟な篩部に特異的に発現していることが分かった。

現在、残りの *ZeHB* 遺伝子の *in situ* hybridization を行うとともに、それぞれの全長の cDNA の単離を進めており、この結果も含めて報告したい。

D1a-03

幼若葉の欠損およびメリステム形成異常を示すシロイヌナズナ *jam* 変異体の解析と遺伝子クローニング
浜田 進¹、工藤 光子¹、尾之内 均¹、町田 千代子^{1,2}、町田 泰則^{1,3} (名古屋大・院・理・生、²キリンビール株式会社基盤研究所、³京都大・院・理・生)

シロイヌナズナのロゼット葉は、幼若葉と呼ばれる丸い葉と成熟葉と呼ばれる細長い葉にわけられる。我々が単離した *jam* 変異体は幼若葉が発生しないという表現型を示す。従って、葉の発生プログラム、特に幼若葉の発生を制御する機構に異常があると考えられる。また、この変異体は抽臺後もいくつかの変異の表現型を示す。花茎には多くのカウリン葉が一方所に固まって発生し、花茎の数も多い。花茎にみられる花は非対象な構造になっており、花の器官数もまちまちである。雄しべは1本しかなく、雌しべはまったくみられない。このことから、花茎や花の器官の発生プログラムも異常であると考えられる。以上述べたような表現型には茎頂メリステムの機能が関与しているかもしれない。この *jam* 変異体は T-DNA を導入した形質転換体から分離されたものであり、変異の表現型と T-DNA の挿入部位が連鎖していることがわかった。そこで、この T-DNA の挿入を指標にして変異の原因遺伝子 *JAM* のクローニングを行った。*JAM* 遺伝子と植物の器官分化の関わりについて考察したい。

D1a-04

シロイヌナズナの茎頂分裂組織の形成と子葉の分離に関わる遺伝子間の相互作用
相田光宏、石田哲也、田坂昌生 (京大院・理・植物)

双子葉植物の胚発生では球状の胚の上部 2 カ所が子葉原基として隆起し、それらの間に茎頂分裂組織 (SAM) が形成される。シロイヌナズナの突然変異体の解析から SAM 形成に関わる遺伝子がいくつか知られているが、それらの遺伝子どうしの相互作用はほとんどわかっていない。*CUC1* と *CUC2* は機能の重複した遺伝子で、それぞれの単独変異体ではほとんどの芽生えが正常であるが、*cuc1 cuc2* 二重変異体の芽生えは子葉が融合してカップ状になり、SAM を欠失する。このことから *CUC1*・*CUC2* は胚発生において子葉どうしを分ける過程と SAM の形成に関係すると考えられる。*CUC2* はクローニングされ、NAC ボックスという保存配列を持つ。一方、SAM の形成と維持に必須だと考えられている *STM* はホメオボックスを含む遺伝子で、胚発生において SAM の前駆細胞および発生中の SAM で発現する。*stm* 変異体の芽生えは SAM を欠失するだけでなく子葉が基部でわずかに融合することから、*STM* は子葉の分離にも関係すると考えられる。SAM の形成および子葉の分離過程における *CUC1*/*CUC2* と *STM* との関係を探るため、1) *cuc1*、*cuc2*、*stm* の二重および三重変異体の表現型の観察、2) *cuc1 cuc2* 二重変異体での *STM* mRNA の発現パターンの解析、3) 野生型、*stm* 変異体、*cuc1* 変異体、および *cuc1 stm* 二重変異体における *CUC2* の発現パターンの解析を行った。これらの結果をもとに *CUC1*/*CUC2* と *STM* との相互作用について考察する。

D1a-05

シロイヌナズナの維管束形成に関する突然変異体の解析
小泉好可¹, 杉山宗隆¹, 福田裕徳^{1,2} (¹東京大・理・植物園, ²東京大
院・理・生物科学)

維管束は、個体の発生過程において、時間的、空間的な制御の下に形成される。私たちは、シロイヌナズナを用い、このような制御機構を解明することをめざし研究を進めている。

本学会 1996 年度年会において、シロイヌナズナの子葉の道管形成に関する突然変異体を 14 系統単離し、それらが 4 種に類別されることを発表した。子葉組織の顕微鏡観察の結果、これら変異体での道管パターンの異常は、道管形成段階ではなく、前形成層の分化あるいはそれ以前の段階における異常を反映していることが示唆された。たとえば、側脈の道管が所々で途切れている L3302 系統の場合、道管の途切れたところでは管状要素が見られないだけでなく、前形成層を構成するような細長い細胞も観察されなかった。シロイヌナズナでは胚発生の杖型期から逆 U 字型期にかけて、子葉側脈の元となる前形成層が形作られることから、各突然変異の一次影響が現れる時期はこれ以前にまで遡ることができると考えられる。現在、節部の形成パターンや子葉以外の器官における維管束の形態について解析を進めており、その結果も併せて報告する予定である。

また、維管束形成に関わる遺伝子の単離をめざし、T-DNA 挿入系統についてスクリーニングを行ったところ、子葉の外部形態は比較的正常で、側脈の形成が不完全な突然変異体を見出すことができた。この突然変異体についても紹介する。

D1a-06

シロイヌナズナの矮性突然変異体 *chibi* の単離とその解析

中村正展、望月伸悦、横田孝雄¹、長谷あきら (東大・遺伝子、¹帝京大・理工・バイオサイエンス)

植物の形態形成や成長生理を理解する上で変異体を用いた研究は有効なアプローチである。当研究室では過剰発現型 T-DNA ベクターを用いて独自にシロイヌナズナのタギングラインを作成し、下胚軸の伸長抑制を指標として約 2000 ラインの中から選別を行った。その結果 3 ラインの矮性突然変異体を同定し、*chi* (*chibi*) と名付けた。これらの変異体は全て *det2*, *cpd*, *dim* といった既知のブラシノステロイド欠損突然変異体と極めて類似する形態を示した。

chi 変異体の一つ *chi2-1* は唯一優性の変異でありこれは第 1 染色体上腕にマップされた。この近傍に矮性変異の遺伝子座は報告されていない。また変異と挿入 T-DNA とは共分離した。更に、T-DNA 挿入域近傍の内在遺伝子の過剰発現が確認された。現在、この遺伝子の過剰発現が矮化をもたらしたことを確認するため、同遺伝子を過剰発現する遺伝子導入植物を作成中である。

D1a-07

茎の伸長に關与する bZIP 型転写因子 RSG の機能解析
深澤壽太郎、五十嵐大亮、石田さらみ、長田敏行、
高橋陽介 (東大院・理・生物科学)

RSG (repression of shoot growth) は *parB* 遺伝子のオーキシンに關するシス領域 ARE II に結合するタンパク質として one-hybrid 法により単離された。完全長の RSG の機能を阻害するドミナントネガティブ型 RSG を導入した形質転換タバコを作製し解析したところ、RSG は形態形成、特に茎の伸長に重要な役割を果たしていることが示唆された。

RSG は真核生物の転写因子のモチーフの一つである塩基性領域ロイシンジッパー (bZIP) 構造を持つ正の転写因子である。RSG は転写の活性化に關与していると考えられる Phe に続く酸性領域、Ser に富む領域、Gln のクラスターを持つ。このうち Phe に続く酸性領域と Ser に富む領域が独立に転写を活性化できることが酵母を用いた解析により示された。また RSG はタバコ葉肉細胞プロトプラスト内でも AREII に結合し、転写の活性化因子として機能する事が明らかになった。したがってドミナントネガティブ型 RSG を発現する形質転換タバコでは、RSG の標的遺伝子の発現が抑制され、その結果、茎の伸長が阻害されたと考えられる。

D1a-08

ねじれ変異遺伝子 *SPR1* の解析
古谷育代、立元秀樹、増川正敏、鹿内利治、橋本隆
(奈良先端大・バイオ)

我々はシロイヌナズナのねじれ変異遺伝子 *SPR1* の発現と機能を形質転換体を用いて解析した。*spr1* は明所下で育成した芽生えの根の表皮細胞がねじれ、暗所下では根と同様のねじれが胚軸でも生じる。*SPR1* 遺伝子の位置をマッピングにより、第一染色体上端の 37 kb のゲノム領域にまで狭めたところ、*spr1* にはこの領域に 632 bp の欠失があった。この欠失領域を含む野生型の 5.43 kb のゲノム断片を *spr1* に遺伝子導入したところ、幼植物において *spr1* の変異形質が相補された。この欠失によって影響を受けると考えられ、5.43 kb に完全な遺伝子として含まれる遺伝子を *SPR1* と同定した。さらに *SPR1* の機能を推測することを目的として、CaMV35S プロモーターで *SPR1* を過剰発現させた形質転換植物を作製した。また *SPR1* プロモーターで GUS を発現させた形質転換植物も作製した。これらの形質転換シロイヌナズナ系統の形質について報告する。

D1a-09

シロイヌナズナの器官分離に働く遺伝子*CUC2*の花形成過程における発現
石田哲也、相田光宏、田坂昌生（京大院・理・植物）

花はがく片、花弁、雄ずい、心皮の4つのタイプの器官から構成され、それぞれの器官は一つのwhorlの内
で分化する。そしてシロイヌナズナの場合、心皮以外の器官は一つ一つ分離している。我々がシロイヌナズ
ナから単離した子葉の分離ができない*cuc*変異株は、花
形成期でのがく片の分離と雄ずいの分離にも異常を示
す。このことは *CUC* 遺伝子がこれらの器官の分離機構
に働いていることを示唆する。*CUC* 遺伝子の一つ *CUC2*
がコードするタンパク質はNACドメインという保存され
た領域を持つ。*CUC2* 遺伝子産物の花形成過程におけ
る機能を解析するために、この遺伝子の発現様式を *in situ*
hybridizationにより調べた。その結果、*CUC2* が花序
分裂組織とそこから生じた花分裂組織との境界で発現
すること、花分裂組織から花の各器官が形成される時
にそれぞれのwhorl間に発現することが分かった。また
葯、心皮の向い合った面、さらに胚珠でも発現が認め
られた。これらの結果は、*CUC2* が *cuc* 変異株の花にお
いてみられる表現型から予想される場所だけでなく、
より広範囲で発現していることを示している。*cuc* 変異
株の花は自家受粉できない。人工授粉による解析から
花粉は稔性をもつが、雌しべが不稔であることが分か
った。*CUC2* の心皮や胚珠で発現が雌性不稔に関係する
可能性があり、*cuc* 変異株での雌ずいの発生を調べてい
る。

D1a-10

花序形態形成突然変異体 *corymbosa* の解析
鈴木光宏、高橋卓、米田好文（北大院・理・生物科学）

シロイヌナズナは典型的なロゼット型植物であり
栄養成長期から生殖成長期に移ると、花芽の分化と
密接な関係を保ちながら花茎を伸長させ、通常総状
花序の形態をとる。我々は花序の形態形成機構を解
明するため、標準系統として用いられる *erecta* 変
異のように先端に花が密集し散房花序様になる変異
体 *corymbosa* (*crm*) を同定し、現在までに同定し
た2つの座位をそれぞれ *crm1* および *crm2* とした。

これらの変異体の形態的特徴について観察を行っ
たところ、花序の先端部においてのみ散房花序様
になっており、総状花序から散房花序への形態的変化
は *crm1* では小花柄の伸長の欠損、*crm2* では花芽
の数の増加が原因であり、いずれの場合も花芽の分
化と花茎および小花柄の伸長の時間的なずれが散房
花序様になる原因であった。

それぞれの変異の遺伝子座位は、*crm1* は第3染
色体の上腕部に *crm2* は第4染色体の下腕部に位置
することがわかった。*crm2* についてはポジショナ
ルクローニングを目的としたマッピングを行っており、
現在までにCAPSマーカー *g3883* (1.4 ± 0.6 cM)
と *PG11* (5.9 ± 1.1 cM) の間に位置することがわか
った。

D1p-01

シロイヌナズナ花茎伸長過程における *ACL5*
遺伝子の機能解析
半澤芳恵、高橋卓、米田好文（北海道大・
理・生物科学）

植物の花序形態形成過程を解明するために、
シロイヌナズナの花茎の細胞伸長に欠損を持
つ *acaulis5* (*acl5*) 変異株の解析を行った。
acl5 は、*erecta* (*er*) 変異存在下では非常に
強い表現型を示す。一方野生型 *ER* 存在下で
は、節間伸長に著しい回復が見られたが、細
胞伸長の回復は観察されなかった。このこと
から、節間の細胞の供給に *ACL5* と *ER* が何ら
かの形で相互作用している可能性が考えられ
る。現在染色体歩行による *ACL5* 遺伝子単離
を進めており、一つの P1 クローンに存在範
囲が絞られている。また、*acl5* の復帰変異
株、*sac* (*suppressor of acaulis5*) 変異株
を単離した。これらの解析結果を報告する。

D1p-02

ペチュニアの花のホメオティック遺伝子 *BLIND* と *GREEN*
PETAL との間の相互作用
土本 卓、間山 智子、Alexander van der Krol¹、Nam-Hai Chua²、
大坪 栄一（東京大・分生研、¹ Wageningen Agricultural Univ.、
² Rockefeller Univ.）

ペチュニアの *MADS* box 遺伝子である *GREENPETAL* (*GP*)
が完全に欠失した突然変異体の花では、花弁から萼状組織へ
の転換が起こるが、雄葉は野性型のまま変わらない。これは、
GP 遺伝子が第2 whorl の花弁の形成に必要なホメオティック
遺伝子ではあるが、第3 whorl の雄葉の形成には必要ないこ
とを示しており、この点でその相同遺伝子であるアラビドプ
シスの *APETALA3* 等とは異なっている。我々は、*GP* 遺伝子
産物の機能が第2 whorl の花弁の形成に限定されていることに
注目し、これをさらに詳しく解析する目的で、*gp* 突然変異体
と、第2 whorl で花弁上部（リム）が雄葉状組織に変化するが
花弁下部（チューブ）がホメオティック転換を引き起こさず
に残る *blind* (*bl*) 突然変異体との二重変異体を作成したと
ころ、*bl gp* 二重変異体の第2 whorl において *bl* 突然変異体と同
様に雄葉状組織及び花弁組織の形成が観察された。この表現
型は、*bl* 突然変異存在下では、*GP* 遺伝子が第2 whorl にお
ける雄葉状組織および花弁の形成に必要ではないことを示して
いる。これらの結果から、*BL* 遺伝子と *GP* 遺伝子との間の相
互作用について考察する。

D1p-03

ペチュニアの SUPERMAN 様転写因子 PetSPL1 及び PetSPL2 の機能解析

中川 仁、小林 晃、高辻 博志 (農水省・生物研)

高等植物において TFIIA タイプジंकフィンガー(ZF)型転写因子は大きな転写因子ファミリーを形成している。これらの多くは、器官特異的に発現しており植物の分化、器官形成の過程に関与していることが示唆されている。そのうち最もよく解析されているシロイヌナズナの SUPERMAN は、その遺伝子の変異によって、おしべが増加し、めしべが退化することが知られている。またその作用機作としては、花器原基における細胞増殖の制御への関与が示唆されている。昨年度の本大会において、我々はペチュニアから SUPERMAN と類似した4種類の転写因子(PetSPL1, 2, 3, 4)の cDNA を単離したことを報告した。今回は、そのうち構造及び発現が最も SUPERMAN と類似している PetSPL1 及び PetSPL2 について、形質転換植物を用いて行った機能解析の結果について報告する。

CaMV35S プロモーターに PetSPL1 及び PetSPL2 をそれぞれ連結した融合遺伝子をペチュニアに導入したところ、コサブレーションによって内在性遺伝子の発現が抑制された個体、および導入した遺伝子が植物体全体に過剰発現する個体が得られた。PetSPL1 の胚珠および胚盤における発現が抑制された個体では、おしべの数の増加が見られた。また、めしべにおいては、子房の位置と内部の構造に異常が見られ、雌性不稔化していることがわかった。PetSPL2 の発現が抑制された個体でも、めしべにおいて PetSPL1 と同様の異常が観察され雌性不稔化していた。これらの表現型は、シロイヌナズナの SUPERMAN 変異体と類似していることから、ペチュニアにおいては、PetSPL1 と PetSPL2 の両者が SUPERMAN 様の機能を果たしていることが示唆された。一方、PetSPL2 を植物体全体に過剰発現する個体では、植物体が矮化し茎の節間が短くなることが観察された。これらの知見および詳細な発現解析と組織学的解析の結果を考えあわせて、ペチュニア 花器形成の制御における PetSPL1 及び PetSPL2 の機能について考察する。

D1p-04

トマト花芽形成突然変異体 *lfi* の解析

金山喜則、清野貴将、高梨紀子、金浜耕基 (東北大・農・園芸)

lfi トマトはガンマ線照射により得られた花芽形成における突然変異体であり、花序組織の分化後、正常な花芽を形成する代わりに擬葉を多数形成する(種子は東北農試、穴戸良洋博士より提供)。またこの擬葉は、環境条件によっては多肉化し、色、味、香り等が通常のトマト果実と似た組織を作る。そのためこの突然変異体は、花芽形成や単為結果の機構解明に有用であると考えられる。突然変異体の栄養成長には野生型との違いはみられず、花序分化のタイミングも同じであった。その後 *lfi* 花序における分裂組織は擬葉あるいは花序シュートを分化し続け、結果として大きな花房ならぬ葉房を形成した。これら擬葉の形成状態から、*lfi* は花の各器官決定遺伝子ばかりでなく *whorl* 決定遺伝子の発現も抑制されていることが考えられた。一方、擬葉の多肉化は日長と温度によって影響を受けた。また分離比から判断して、*lfi* は単一の劣性遺伝子によって制御されていることが示唆された。

D1p-05

リンゴの花芽形成期における AFL 遺伝子の発現解析

古藤田信博、小森貞男¹、副島淳一、阿部和幸、加藤秀憲、増田哲男、猪俣雄司、和田雅人 (農水省・果樹試・リンゴ支場、¹ 同・国際農研・沖縄支所)

FLORICAULA および LEAFY は、花序分裂組織から花芽分裂組織への移行に重要な役割を果たす遺伝子であることがキンギョウソウおよびアラビドプシスを用いた研究で明らかとなったが、昨年我々はリンゴ‘紅玉’を用いて FLORICAULA/LEAFY に相同な AFL 遺伝子を単離した。

リンゴの花芽分化時期は品種によって異なるが、紅玉の場合7月の下旬から8月の上旬である。我々は新梢茎頂部の形態観察によりこのことを確認した(於盛岡)。開花後約1ヶ月目(6月中旬)から隔週で新梢茎頂部を採取し、Northern hybridization を行った。その結果、リンゴ AFL 遺伝子は紅玉の花芽分化開始期である7月の後半にもっとも強く発現し、その後しだいに減少することが判明した。

現在、形態学的な観察と共に紅玉新梢の茎頂における *in situ* hybridization により上述した遺伝子の発現解析を行っているが、花芽分化期の茎頂に AFL 遺伝子の発現が認められた。

D1p-06

スギ PISTILLATA homolog の発現特性

福井充枝、二村典宏、長尾精文、篠原健司 (農水省・森林総研)

裸子植物の生殖器官の形態形成の仕組みを明らかにするため、スギ(*Cryptomeria japonica*)MADS box 遺伝子の発現の時期や組織特異性について研究を進めている。今回は、2種類の PISTILLATA(*PI*) homolog の発現特性について報告する。

スギMADS box タンパク質に対する2種類の cDNA クローン(pCJMADS1, pCJMADS2)の塩基配列から推定されるアミノ酸配列(MADS box と Kbox を含む170aa)を既存のデータベースのものと比較して系統樹を作製し、どのサブファミリーに帰属するか解析した。その結果、CJMADS1 及び CJMADS2 はともに PI サブファミリーに帰属し、2種類の遺伝子は被子植物の B 遺伝子に相当した。これらの遺伝子はともに small multigene family を構成し、雄花で特異的に発現するが、花粉を全て飛散させた雄花や花粉、雌花や球果では発現しない。また、種子、芽生え(子葉、胚軸、根)や挿し木(葉、茎、根)でもそれらの発現は全く検出できなかった。ジベレリン処理により誘導される花芽分化過程において、雄花と雌花の識別可能な時期(7週目)から発達の後期(25週目)に至るまで雄花で特異的に発現した。以上の結果は、CJMADS1 と CJMADS2 がスギの雄花の形態形成に関与することを示唆している。

D1p-07

萼片表皮細胞が後天的合着を示す突然変異体
*ace*の解析と遺伝子クローニング

中谷美穂・荒木 崇・岩淵雅樹
(京都大・理・植物)

表皮細胞は茎頂分裂組織のL1層に由来し、細胞系譜的にも発生的にも安定である。表皮細胞層は植物体の最外層をなし、他の表皮細胞層や他種生物の細胞等と物理的に接触するが、通常はそれらとの相互作用はおこらない。しかし、雌蕊群の発生過程においては表皮細胞層間の相互作用による後天的合着がおこる。また、雌蕊における花粉受容の際にも、花粉と表皮細胞の相互作用が見られる。

われわれは、表皮細胞層間の相互作用能を雌蕊に限定する機構に興味を持ち、雌蕊以外の器官、特に萼片が後天的合着を示す突然変異体を1系統単離し、解析をおこなった。その結果、少なくとも2つの新規の遺伝子座を同定し、T-DNA挿入システムを用いてそのうちのひとつ、*ACE* (*ADHESION OF CALYX EDGES*)をクローニングした。突然変異体の表現型および*ACE*遺伝子について報告する。

D1p-08

*NgroIB*遺伝子の祖先型機能の2 bp塩基置換による回復：(2) *RiroIB*遺伝子との表現形質の違いの解析

青木誠志郎、庄野邦彦 (東大・総合文化・生命)

*Nicotiana glauca*の*NgroIB*遺伝子群は*Agrobacterium rhizogenes*の*RiroIB*遺伝子群に相同的な配列である。*NgroIB*遺伝子群は*A. rhizogenes*の感染によりタバコ属進化の初期に水平移行し現在まで保存されてきたと考えられている。*RiroIB*遺伝子群の遺伝子導入は植物に毛状根とよばれる形態異常をひきおこすが今日の*N. glauca*はその様な異常を示さない。この矛盾をとくために我々は*NgroIB*遺伝子群の機能の解析を行ってきた。*NgroIB*、*RiroIB*両遺伝子群の機能の比較解析により*NgroIB*遺伝子が*RiroIB*遺伝子のもつ毛状根誘導能力を持たないことがわかった。*NgroIB*遺伝子のコード領域に*RiroIB*遺伝子のプロモーターをつなげたキメラ遺伝子には毛状根誘導能は観察されなかった。しかし*NgroIB*遺伝子の3'末領域に2-bpの塩基置換を行い48アミノ酸残基を翻訳するようにしたものは毛状根の誘導能力の回復が見られた。*NgroIB*の強制発現はタバコになら異常をもたらしませんが、2-bp塩基置換後の*NgroIB*遺伝子は新規な形態異常として葉の上偏生長や花の変形などが観察された。これらの形態異常は*RiroIB*遺伝子の強制発現では観察されなかった。

D1p-09

ネナシカズラの寄生根分化に関わる遺伝子の単離と解析

多田欣史、若杉達也¹、古橋勝久、山田恭司¹ (新潟大・理・生物、¹富山大・理・生物)

寄生植物では、他の植物から水分や養分を収奪するために、寄生根と呼ばれる特殊な吸収器官が分化する。最近我々は、寄生根の分化が同調的に誘導できる実験系を、完全寄生植物であるネナシカズラにおいて開発することに成功した。この同調誘導系を用いることによって現在、ネナシカズラの寄生根分化に関わる遺伝子群の単離と解析をすすめているところである。昨年度の本大会では、寄生根形成の初期に発現レベルが低下する遺伝子のひとつとして同定された低分子量ヒートショックタンパク質をコードするcDNAについて報告した。今回はさらに、寄生根形成時に発現レベルが変化する遺伝子の検索を行い、新たに4種類のcDNAをクローニングした。それらの発現パターンの解析を行ったところ、寄生根形成過程の中期に一過的に発現レベルが上昇するものや、寄生根形成の後期にかけて発現レベルが上昇するものなど、寄生根形成過程の各段階で特異的に発現するcDNAを特定することができた。それぞれのcDNAの完全長クローンを単離し、構造の解析を行った結果についても報告する。

D1p-10

タバコ毛状根で発現する発根関連遺伝子群の解析
中村千春、西村信幸、三嶋雅史、上田忠正、尾中孝、Tsvetanov, Sergei、宅見薫雄、森直樹 (神戸大・農)

毛状根および通常根で選択的にしかも旺盛に発現する独立なcDNAクローンを4種類選抜した。単一遺伝子座に由来し、19 kDポリペプチドをコードすると考えられるクローン*HR2*はタバコの遺伝的腫瘍で発現すると報告された部分クローンと高い相同性を示した。一方、互いに相同で、それぞれ15、19 kDのグリシンリッチな領域を含む疎水性ポリペプチドをコードすると考えられる*HR3S*、*HR4*は、多重遺伝子族に属し、既報の多くのcDNAクローンと相同であった。これらには、タバコのクラウンゴールおよび遺伝的腫瘍から得られたクローンや他植物種の根あるいは体細胞胚で活発に発現するクローンが含まれた。部分配列クローンである*HR6*は、植物のGタンパク質αサブユニット遺伝子と高い相同性を示した。正常植物および毛状根由来再生植物の切断茎を用いたノーザンプロット解析により、これらクローンが毛状根と通常根の発根過程で経時的な発現を示すこと、および*HR2*の発現はオーキシン (IAA) による負の制御を受ける可能性が示唆された。

D1p-11

ミヤコグサ *Lotus japonicus* における飽和的根粒形成変異体の単離の試み

川口正代司、今泉(安楽)温子、庄野邦彦、丹羽忍、生田安喜良²・赤尾勝一郎³(東京大・総合文化、¹東理大・基礎工、²東理大・総研、³農水省・生物研)

器官発生プログラムの有効な解析方法として突然変異飽和法がある。これは、ある器官形成に関し、新たな遺伝子座を検出できなくなるまで変異体を単離することを通じて、発生を制御する遺伝プログラムの全貌を把握する手法である。われわれは、分子遺伝学的解析に好適な形質を有するマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* を用いて、共生的窒素固定器官・根粒の宿主因子の分子レベルでの解明を目指し、可能な限り網羅的な共生変異体のスクリーニングを行ってきた。EMS処理由来の約40,000のM2種子から、今までに30を上回る共生変異体を単離した。それらは、以下のように分類された。

1. 根粒を全く形成しないもの
2. 根粒の原基を多く形成するもの
3. 細胞内共生まで至らない、小さな根粒を形成するもの
4. 細胞内共生までいたるが、窒素固定活性を示さないもの
5. 過剰な根粒を形成するもの

得られた根粒形成変異体の諸形質を紹介し、根粒形成を制御する宿主因子群の全体像を俯瞰する。

D1p-12

シロイヌナズナの気孔形成変異株 *bagel* の解析
武内洋志、中川 強(島根大・遺伝子)

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

一对の孔辺細胞は孔辺母細胞の分裂により生じるが、単離した変異株では一個のC字形の孔辺細胞が気孔を形成していた。このC字形孔辺細胞が2核であったことから *bagel* 変異株では孔辺母細胞の細胞質分裂が不完全であることが示唆された。*bagel 1* と *bagel 3* は共にC字型の異常孔辺細胞を生じる変異株であるが、その出現割合が異なっていた。また変異はそれぞれ1番染色体および4番染色体にマップされた。現在さらにマッピングを進めている。

D1p-13

細胞死抑制遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコの根の形態形成

且原真木、柴坂三根夫、大橋祐子¹、三浦正幸²、笠毛邦弘(岡山大・資生研、¹農水省・生物研、²大阪大・医学)

細胞死が形態形成やストレス応答においてきわめて重要な役割を果たしていることが、最近明らかになりつつある。本研究では、動物由来の2種類の細胞死抑制遺伝子 (*bcl-X_l*, *ced-9*) を過剰発現させた形質転換タバコを作成し、根の発達、道管の成熟、根の代謝における細胞死抑制遺伝子の影響を観察した。なおこれら形質転換体の葉の形態形成・ストレス応答については大橋らが昨年の本大会で発表をしている。

水耕栽培した形質転換タバコの根はやや太くなるが伸長は悪くなり、野生型に比べ縮れた外見を示した。また数本の根が融合したように見えるものがあり、内部では複数の維管束が存在していたり、維管束が部分的に融合したものなどが観測された。また野生型では主要な道管は3本あり、根先端から約3cmで成熟して通道ようになるが、形質転換体では成熟が遅くなり、さらに道管の数が減ったり、維管束中での配置が不規則になるものが多く観察された。

D1p-14

ホウライシダ配偶体細胞における機械的刺激により誘導される葉緑体逃避運動の解析
佐藤 良勝、門田 明雄、和田 正三(都立大・理・生物)

高等植物では、接触、雨、風などによる機械的刺激により組織レベルで様々な現象が引き起こされることが知られているが、個々の細胞がどのように機械的刺激に対して反応するかは、あまり知られていない。我々は、ホウライシダの配偶体細胞を用いて、無傷の細胞の一部分に接触刺激を加えることのできる実験系を確立し、葉緑体が刺激部位から逃避する現象を発見した。葉緑体逃避運動の誘導には、0.3分以下の短時間の刺激で十分であった。葉緑体の刺激部位からの逃避は、刺激後30分以内に開始し、2時間以内に定常状態に達した。個々の葉緑体の動きをトレースしたところ、刺激部位近くの葉緑体は刺激後1時間以内に、運動速度の上昇が見られた。次に、細胞骨格阻害剤の作用を調べると、葉緑体逃避運動はサイトカラシンBにより阻害されるが、コルヒチンおよびアミプロフォスメチルでは阻害されなかった。さらに、微小管とアクチン繊維を蛍光染色し、刺激前後におけるそれぞれの構造を調べたが、明らかな変化は見られなかった。最後に、葉緑体の逃避運動時における他の細胞小器官(ミトコンドリア、表層小胞体、核)の細胞内分布を調べたが、明らかな配置の変化は認められなかった。以上の結果は、機械的刺激により誘導される葉緑体逃避運動が、方向性を有する運動であり、一過的に速度が上昇すること、運動機構としてアクチン-ミオシン系に依存すること、また、葉緑体は他の細胞小器官とは独立に反応することを示唆している。

D1p-15

イネ日長非感受性突然変異体 *se-5* の解析
井澤 毅、及川 鉄男、早間 良輔、岩野 恵、
徳富 哲¹、奥野 員敏²、島本 功 (奈良先端大・
バイオ、¹大阪府大・先端研、²農水省・生物研)

イネ極早生型突然変異体である *se-5* は長日条件、短日条件下共に開花が促進されるが、長日条件下での開花促進が大きく (約 50 日)、日長感受性をほとんど示さない突然変異体である (長日条件下で約 1 週間開花が早い)。*se-5* 突然変異体では、パルス光による幼葉鞘の伸長阻害が観察されず、連続光下でも赤色光と近赤色光で、幼苗の伸長促進が観察された。青色光ではパルス光のみ感受性の低下が観察された。さらに、光パルスによる Cab 遺伝子の発現を調べたところ、少ない光量で、発現の低下が観察された。また、暗所下で育てた幼苗中の光化学的ナイトクローム活性を測定したところ、活性を検出できなかった。イネの PHYA、PHYB が共に染色体 3 番に、*se-5* が染色体 6 番にそれぞれ座乗することから、*se-5* はクロモフォア合成系の突然変異体と考えられる。

D1p-16

シロイヌナズナのプロモータートラップシステムを用いた光応答遺伝子の探索
田中慎一郎、加藤弓佳、望月伸悦、長谷あきら
(東大・遺伝子)

高等植物においては多くの光合成関連遺伝子の発現が光応答を示すことは知られているがその他の遺伝子の光による発現制御に関する知見は不足している。我々は、N. Bechtold (INRA・フランス) によって作出されたシロイヌナズナのプロモータートラップシステムを Nottingham Arabidopsis Stock Centre より入手し、光照射下及び暗所下で一週間ほど生育させ GUS 染色を行い、それぞれの条件で染色パターンが異なる系統の単離を行った。

入手可能な 1480 系統より確立された 3 系統 (N03, N27, N35) 中、N03, N27 では光照射下で強く、N35 は暗所のみで GUS シグナルがみとめられた。また発現は器官特異的であり、N03 は茎頂付近で、他の二系統は下胚軸で発現した。次に生理学的解析を行ったところ、N03, N35 は主に光により N27 は主に糖により発現が制御されていることが分かった。

D1p-17

G タンパク質 *pra2* の光抑制に関わるシスエレメントの解析
稲葉丈人、永野幸生、佐々木幸子 (名大院・生命農学・生化学制御)

pra2 遺伝子は YPT/rab ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質をコードしており、エンドウから単離された。その発現が光により抑制されること、また、暗所生育エンドウの茎徒長部位で特異的に発現していることなどから、暗所での茎の徒長に関与していると考えられている。今回、我々は *pra2* 遺伝子の発現制御機構を明らかにするため、*pra2* プロモーターの解析を試みた。

pra2: LUC 融合遺伝子を持つプラスミドを暗所生育エンドウ茎に導入したところ、ルシフェラーゼの光による抑制及び徒長部位特異的な発現が見られた。光による抑制に関わるシスエレメントを決定するために、様々な 5' 側からの欠失や内部欠失を持つプロモーターの解析を行ったところ、翻訳開始点から -930~-837 の 94bp の領域に光による抑制に必要な配列の一つが存在することが明らかになった。さらに、-789~-487 と -487~-297 の領域に basal な発現に影響するリプレッサー及びアクティベーターがそれぞれ存在することも明らかになった。今回同定された 94bp の領域には、*phyA* や *AS1* で報告されているフィトクロムによる負の制御に必要な TGGG 配列は含まれていなかった。

D1p-18

シロイヌナズナの光形態形成を支配する *COP1* と蛋白質レベルで相互作用する遺伝子 *CIP7* の機能と生体内での役割
山本義治^{1,2}、松井南¹、Lay-Hong Ang²、Xing-Wang Deng²
(¹理研・FRP・分子機構、²米国イエール大・MCDB)

CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1) は、シロイヌナズナの光形態形成を支配する遺伝子であり、光依存性の遺伝子発現、細胞・葉緑体の分化等を暗所下において抑制している。COP1 の生化学的な機能を明らかにすることを目標として、私たちは COP1 と蛋白質レベルで相互作用する遺伝子を far-western 法を用いて単離解析を行った。得られたクローンの一つ、*CIP7* は新規の核蛋白質をコードしており、P/Q に富む領域や酸性アミノ酸のクラスターを持っていた。*CIP7* と LexA との融合蛋白質は酵母において LexA オペレーターによる転写を活性化すること、またその活性化能は植物細胞においても観察されたことから、*CIP7* は転写因子の一種であることが解った。また、*in vitro* での解析により明らかになった COP1 の *CIP7* 結合領域、*CIP7* の発現様式、そして *CIP7* のアンチセンス RNA を導入した形質転換シロイヌナズナの表現型の解析から、*CIP7* は光形態形成の抑制ではなく促進に必要な因子であることが明らかにされた。以上の知見から、暗所下において *CIP7* の転写因子としての活性を抑制することが COP1 の機能の一つであることが提唱された。

D2a-01

エドヒガン及びヤエベニシダレの枝における、内生ジベレリン、オーキシシン及びアブシシン酸の分布
中川 由里子、小林 正智¹、桜井 成¹、横山 敏孝²、橋和
丘陽³、中村 輝子(日女大・理、理研¹、森林総研²、島津製
作所³)

すでに、外生のGA及びGA₃がエドヒガン系サクラ (*Prunus spachiana*) のしだれ性であるヤエベニシダレのしだれ性屈曲を阻止すること、また、エドヒガン系のしだれ性枝及び立性枝の主内生ジベレリンはGAであることを明らかにした。今回は、枝各部位のGAと共にIAA、ABAのレベルについて調べた。しだれ性及び立性の当年枝を先端から順に、頂芽、伸長帯1、伸長帯2伸長停止帯1、伸長停止帯2、3の枝と葉に分けて、各部位におけるGA、IAA、及びABAの含量を、²H₃]GA、²H₃]IAA、²H₃]ABAをそれぞれ内部標準としてGC-SIMにより定量した。

その結果、両枝においてGAとIAAレベルは頂芽と伸長帯1で高かった。また、しだれ性枝のGAレベルは、伸長帯1において立性枝におけるより高く、IAAレベルは伸長帯2伸長停止帯1においてより高かった。このような結果は、しだれ性枝における屈曲誘導に関わる、より大きい伸長能力と関係があると考えられる。ABAレベルは、両枝において伸長帯2伸長停止帯1で最も高く、両枝を比較すると立性枝でより高レベルだった。

D2a-02

サクラの当年枝の成長におけるブラシノライドの作用
津島美穂、中川由里子、重松晴美、堀居奈美子、中村輝子(日女大・理・物生)

すでに草本植物において、様々なブラシノライドの生理作用が報告されている。当研究においては、木本植物サクラを用いて、その成長調節作用を検討した。

実験材料として、エドヒガン系2年生接木の立性の当年枝を用いた。試薬投与方法および成長測定法、また組織化学的方法および偏光顕微鏡による測定方法は、すでに報告したものと同様である。ブラシノライドは、CID tech Research Inc.より購入した。投与量は、0.01~10 μg/芽の範囲を用いた。

立性枝において、枝の伸長は、投与後2週間までは、処理濃度が高くなるほど促進された。葉柄の長さもまた、処理濃度が高くなるほど著しく促進された。さらに、1,10 μg/芽処理枝において、葉柄の捻転、枝の屈曲が認められた。屈曲した枝の組織は、対照と比べ、木部幅の減少、導管密度の増加、また枝上側における二次細胞壁のセルロースマイクロフィブリル傾角の増加が認められた。

立性枝における枝の屈曲現象には、ブラシノライド処理による、伸長促進および木部の支持組織としての発達低下が関係していると考えられる。

D2a-03

エンドウ矮性種 *lk* はカンベスタノール合成阻害にもとづくブラシノステロイド欠損変異体である
北坂幸子、野村崇人¹、James B. Reid²、横田孝雄⁵(宇都宮大・生物生産、¹東京農工大・生物生産、²タスマニア大・植物科学、³帝京大・バイオ)

エンドウのジベレリン感受性突然変異体 *lk* の矮性は、ブラシノライドの投与によって回復した。*lk* の内生ブラシノステロイドをGC-SIMにより定量した結果、カステステロン、6-デオキソカステステロン、6-デオキソティファステロールの含量がそれぞれ野生型の約4分の1、70分の1、6分の1に低下していた。またブラシノライドの前駆体であるステロールにおいても、カンベスタノールとシトスタノールの含量がそれぞれ野生型の約160分の1、10分の1に低下していることが明らかとなった。以上の事実から、*lk* はカンベステロールからカンベスタノールへの変換に欠陥があるために、ブラシノステロイド欠損になった突然変異体であることが判明した。ゆえに、*LK* 遺伝子も *DET2* 遺伝子と同じ機能をコードしているものと考えられる。

D2a-04

ブラシノステロイド生合成変異体 *lkb* および *lk* の生合成欠損部位の解明
野村崇人、北坂幸子¹、高津戸 秀²、横田孝雄³(東京農工大・生物生産、¹宇都宮大・生物生産、²上越教育大・自然系化学、³帝京大・バイオ)

エンドウのブラシノステロイド生合成変異体 *lkb* では、カンベステロール含量が減少し、その前駆体である24-メチレンコレステロール含量が増加している。そこで、*lkb* とその野生型の幼植物に重水素標識した24-メチレンコレステロールを与え、その代謝物をGC-MSを用いて調べた。その結果、野生型からは重水素標識されたカンベステロールが検出されたが、*lkb* からは検出されなかった。これにより *lkb* はカンベステロールの合成に欠陥があることが証明された。

lk ではカンベステロールから合成されるカンベスタノール含量が野生型に比べ減少している。そこで、その幼植物の切片に重水素標識したカンベステロールを与えた。その結果、野生型からは重水素標識されたカンベスタノールが生成されたが、*lk* からは生成されなかった。これにより *lk* はカンベスタノールの合成に欠陥があることが証明された。

D2a-05

シロイヌナズナABA生合成欠損突然変異株の解析

南原英司、内藤哲（北大・農・応用生命）

我々はシロイヌナズナのABA欠損突然変異株を分離・解析している。*aba2-2*突然変異株はABAの生合成欠損突然変異株であり、内性ABA量が新鮮葉、乾燥葉で野生型株と比べてそれぞれ4分の1、30分の1に低下している。*aba2-2*突然変異株の植物体は乾燥し易く、種子は休眠が浅い。ABAの乾燥に対する適応機構を理解するために、乾燥時における野生型株と*aba2-2*突然変異株の遊離アミノ酸濃度を測定した。野生型株を18時間乾燥させるとプロリン、ロイシン、イソロイシン濃度が約100倍に増加した。一方、*aba2-2*突然変異株では同様の乾燥処理でプロリン、ロイシン、イソロイシン濃度は約5倍、25倍、23倍に増加した。野生型株にABAを投与した場合、プロリン濃度が上昇したのに対して、ロイシン、イソロイシン濃度は変化しなかった。ロイシン、イソロイシンの蓄積はABAによって誘導はされないが、ABAによる水分保持はABAと独立に作用するロイシン、イソロイシンの蓄積機構の維持に必要であると考えられた。本会ではこれらの結果と併せ、*ABA2*遺伝子の遺伝学的マッピングの結果も報告する。

D2a-06

病原菌接種およびエリシター処理したジャガイモ植物葉におけるACC合成酵素遺伝子の発現解析
永野陸実、竹本大吾、道家紀志、川北一人（名大院・生農・資源生物機能）

病原菌の侵入を受けた植物ではエチレン生成が増加するが、その生合成系調節機構や機能についてはいまだ不明な点が多い。エチレン生合成系の律速酵素であるACC合成酵素遺伝子(ACS)は種々の植物で多重遺伝子族を形成していることが知られる。ジャガイモ植物と疫病菌の系を用い、疫病菌接種および菌体壁成分エリシター(HWC)処理したジャガイモ葉におけるACSの発現について調べた。まずトマトACS(*LE-ACS*)をプローブとしてノーザン解析を行ったところ、*LE-ACS1A*、*1B*を用いた場合に非親和性菌接種後24時間の葉で、また*LE-ACS1A*、*1B*、*2*を用いた場合に各種エリシター処理葉で転写産物の蓄積がそれぞれ認められた。次にHWC処理後36時間のジャガイモ葉よりcDNAライブラリーを作成し、*LE-ACS2*を用いてジャガイモACSの単離を試みた。

D2a-07

ブロッコリー花蕾の老化におけるエチレンの関与およびACC酸化酵素の性質

葛西優子、青山淳一、松永美枝、渡辺和志、兵藤宏、生駒吉識¹、矢野昌充¹（静岡大・農・生物生産、¹果樹試・カンキツ部）

ブロッコリー (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) 花蕾 (小花) は収穫後室温で急速に老化する。老化は花蕾の黄化によって観察され、アスコルビン酸とクロロフィルの顕著な分解を伴う。老化はエチレンの作用を阻害することにより強く抑制されることから、エチレンが深く関与していることが考えられる。老化の過程でエチレン生成量は増大し、それとほぼ平行してACC酸化酵素の活性も増大した。ブロッコリー小花よりACC酸化酵素を抽出し、酵素学的性質を調べた。

ブロッコリーACC酸化酵素のcDNAを導入したプラスミドで形質転換した大腸菌よりACC酸化酵素を抽出し、精製した。得られた酵素はSDS-PAGEで単一で、37kDaの分子サイズを示した。形質転換体より得られた酵素はブロッコリー花蕾より抽出した酵素とよく似た性質を示した。精製酵素を抗原として抗体を作製し、それを用いてブロッコリー花蕾中のACC酸化酵素の変動を調査した。

D2a-08

キュウリの雌花発現に関与するACC合成酵素遺伝子の発現解析
蒲池伸一郎、酒井慎吾（筑波大・生物）

キュウリには混性型や雌性型品種が存在し、雌性型は優性遺伝子 *Female* (*F*) により制御されている。また、キュウリの雌花発現はエチレンによって誘導され、その性発現パターンは茎頂部のエチレンレベルによって制御されている。我々は、ACC合成酵素遺伝子 (*CS-ACS2*) の茎頂部での発現パターンと性発現パターンとの相関を示した。一方、TrebishらはACC合成酵素遺伝子 (*CS-ACS1*) を単離し、雌性型キュウリでは *F* 遺伝子とリンクする *CS-ACS1G* が存在することを示した。そこで、雌性型 (*FF*) と混性型 (*ff*) の準同質遺伝子系統の茎頂部における *CS-ACS1* と *CS-ACS2* の発現パターンを調べた。その結果、*CS-ACS1* は雌性型の全茎頂部で発現しているのに対し、混性型の茎頂部では発現が検出できなかった。一方、雌性型と混性型の茎頂部における *CS-ACS2* の発現パターンは性発現パターンと相関を示した。これらの結果は、*CS-ACS1G* は *F* 遺伝子として雌性型の雌花発現に関与しており、混性型の雌花発現には *CS-ACS2* が関与している可能性が示唆された。

D2a-09

光発芽レタス種子のジベレリン生合成酵素遺伝子のクローニングとその発現解析 中野健太郎、豊増知伸、三橋渉、尼ヶ崎史、加野京子、大塚稔、川出洋¹、井上康則²、神谷勇治¹ (山形大・農、¹理研フロンティア、²東京理科大学)

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) 種子の光発芽誘導には、ジベレリン(GA)が重要な役割をはたしており、赤色光処理により活性型GAであるGA₁の内生量が増加することが示されている。そこで本研究においては赤色光により促進されるGA生合成段階を明らかにするために、GA生合成の後期段階を触媒するGA 20-酸化酵素(GA₂₀-GA₁₉-GA₂₀)、3β-水酸化酵素(GA₂₀-GA₁)遺伝子をレタス種子よりクローニングし、その発現に対する光処理の影響を調べることを目的とした。赤色光処理したレタス種子0.5gより抽出したmRNAからcDNAを合成しそれを鋳型として上記2遺伝子のそれぞれの保存領域をもとに設計した縮合プライマーを用いたRT-PCRを行なった。その結果、各々の酵素由来のものと推定されるPCR断片が2種ずつ得られ、それをもとにしてそれぞれの全長cDNAをクローニングした。その2種の20-酸化酵素(Ls20ox1, Ls20ox2)、2種の3β-水酸化酵素(Ls3h1, Ls3h2)遺伝子について大腸菌で発現させた組換えタンパク質の活性検定を行なった結果、それぞれの遺伝子産物は予想された触媒活性を持つことが示された。ノーザン解析の結果、Ls20ox1とLs3h1遺伝子が発芽過程では主に発現していることが示され、さらにLs20ox1遺伝子の発現は光処理の影響を受けず、Ls3h1遺伝子の発現量は赤色光処理によって(Pfr形成条件)増加することが明らかになった。以上の結果、レタス種子では赤色光処理により3β-水酸化酵素(Ls3h1)の遺伝子発現が促進され、GA₁の内生量が増加する可能性が示された。

D2a-10

シロイヌナズナにおけるアルデヒド酸化酵素遺伝子ファミリー

瀬尾光範、関本弘之^{1,2}、駒野照弥、S. Desloire³、S. Liotenberg³、A. Marion-Poll³、M. Caboche³、神谷勇治¹、小柴共一 (都立大・理・生物、¹理研・FRP、²東大(院)・総合文化・生命、³INRA・Versailles)

我々はIAAの生合成経路の最終段階にかかわる酵素としてアルデヒド酸化酵素(AO)に注目し、トウモロコシ幼葉鞘からの精製とcDNAのクローニングに成功した。このcDNAから予想されるアミノ酸配列の情報をもとに、シロイヌナズナよりAO cDNAのクローニングを試みた。その結果、3種のAO cDNA(atAO-1, 2, 3)が単離され、また、データベース上でこれらに類似したAOの存在(atAO-4)が明らかになった。これら4種のAO遺伝子について、シロイヌナズナCIC YACライブラリー及びリコンビナントインブリッドラインを利用して染色体上の位置がそれぞれ決定された。ノーザン解析によりこれらAO mRNAの野生株の植物体内、及び、IAA過剰生産突然変異体(*superroot1*)における異なる発現パターンが観察された。これらの遺伝子の植物体における役割について考察する。

D2a-11

タバコホメオボックス遺伝子NTH15によるジベレリン生合成遺伝子、GA20 oxidaseの発現抑制 上口(田中)美弥子¹、伊藤博紀¹、腰岡政二²、大山直美²、松岡信¹ (1名大・生物分子応答、²野菜・茶業試)

我々は、タバコホメオボックス遺伝子(NTH15)の過剰発現が、形質転換タバコの葉に形態異常をひきおこし、また、その葉における活性型ジベレリン(GA₁)が、著しく減少していることを明らかにしてきた(玉置ら、*Plant Cell Physiol.*, 38 (8) 917-927, 1997)。

今回我々は、NTH15とGA生合成との関係を遺伝子レベルで明らかにするために、GA生合成遺伝子の内、2つのGA20 oxidaseおよび1つの3β-hydroxylaseのcDNAを単離した。ノーザン解析の結果、葉で発現するタイプのGA20 oxidase遺伝子(Ntc12)のみが、形質転換体において発現が減少していた。また、形質転換体における葉の形態異常は、GA₂₀または、GA₁を茎頂付近に添加することにより正常型に回復したが、GA₁₉では回復しなかった。以上のことは、NTH15の過剰発現が、葉におけるNtc12の遺伝子発現を抑制し、その結果、活性型GAの減少と、それによる葉での形態異常をひきおこしていることを強く示唆するものである。さらに我々は、*in situ* hybridizationにより野生株のタバコにおけるNTH15およびNtc12の発現部位を特定した。これらのことから、野生株におけるNTH15によるNtc12の発現抑制ならびに側生器官の発生における2つの遺伝子の役割についても考察する。

D2a-12

タバコのジベレリン3β-ヒドロキシラーゼの単離とその解析 伊藤博紀、上口(田中)美弥子、川出洋¹、神谷勇治¹、松岡信 (名大・生物分子応答、¹理化学研究所・フロンティア)

ジベレリン(GA)は、高等植物の発芽、伸長生長、花芽形成等に関与する植物ホルモンの一つとして知られている。近年、GA合成系の酵素のクローニングが盛んに行われており、その発現の制御や細胞内分布が分子レベルで理解され始めている。

今回、私たちはタバコを植物材料に、GA合成系において活性型ジベレリンを生成する最終段階を触媒する3β-ヒドロキシラーゼと推測される部分配列を、ホモロジー解析によって設計したディジェネレートプライマーを用いるPCRにより単離した。続いて、これをプローブとして、タバコのゲノムライブラリーをスクリーニングレグノミッククローンを単離した。このクローンを基に茎頂RNAよりRT-PCRによって合成されたcDNAは、アラビドプシスのGA4およびエンドウのLeと高い相同性を示した。更に、大腸菌内で合成させたこのcDNAの翻訳産物は、反応基質であるGA_{9/20}をGA_{4/1}に変換した。このことから私たちは、この遺伝子が3β-ヒドロキシラーゼをコードしていると結論した。タバコの器官別ノーザン解析によって、この遺伝子の発現は茎頂、花芽、花、茎等に見られ、葉や未成熟な種子においては非常に弱い発現であった。現在、*in situ* ハイブリダイゼーションとプロモーター::GUSによる組織内局在性および形態変化に伴う遺伝子発現制御について検討を行っている。

D2p-01

トウモロコシDIMBOA欠損株における光応答反応
富田横谷香織¹, Scott Chilton¹, 小瀬村誠治², 山村庄亮²,
山田小須弥, 長谷川宏司 (筑波大・応生化,¹North Carolina
State Univ.,²慶應大・理工)

近年、植物の光屈性反応は、光により生成されるオーキシン活性抑制物質の偏差分布に起因する光側組織の成長抑制によって引き起こされるとするBruinsma-Hasegawa説が提唱され、多くの証拠が示されてきている。これらの観点から、これまでに光誘導性成長抑制物質の一つとしてトウモロコシから6-methoxy-2(3H)-benzoxazolinone (MBOA)が単離・同定されている。これまでにトウモロコシ野生株幼葉鞘に一方から光を与えた場合、光側の内生MBOAレベルが影側のレベルよりも高いこと、またMBOAを片側投与した場合に投与された側に屈曲を示すこと等を報告した。今回のMBOAの前駆体である2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one (DIMBOA)を生成しない突然変異株における幼葉鞘の光反応、光屈性反応について野生株と比較しMBOAの光応答反応における役割について検討を行った。その結果トウモロコシDIMBOA欠損株の幼葉鞘は、野生株に比べ、光応答反応が鈍いことがわかった。内生MBOAは野生株と比較して非常に低レベルで存在していた。これらのことから、植物の光応答反応に、光誘導性オーキシン活性抑制物質であるMBOAが大きく関与している可能性が示唆された。

D2p-02

イネの恒常的ジベレリン反応性突然変異体,
'slender rice' の特性と解析

池田 亮・北野英己¹・蓬原雄三・山口淳二²
(名城大・農,¹名大・農,²名大・生物応答センター)

本変異体は日本晴突然変異体で、その形質はあたかもジベレリン(GA)を添加した様なシュートの著しい伸長現象を示すことから便宜上 'slender rice' と命名した。

GA生合成阻害剤のウンコナゾールによる効果を検討したところ、原品種ではシュートにおいて著しい伸長抑制効果が認められたが、slender riceにおいては同様の効果は全く見られず耐性を示した。さらに、胚を取り除いた半切無胚種子を用いた α -アミラーゼ活性の検出を行った結果、slender riceはGA非存在下においてもGA依存型の α -アミラーゼが誘導された。これはGAの存在の有無に関わらず、独立的に α -アミラーゼを分泌するものと考えられた。これらによりslender riceがGAによるシグナル伝達系を常に 'ON' にしている恒常的GA反応性突然変異体(constitutive GA response mutant)である可能性を示唆している。この変異体を解析することによって、GAを媒介とするシグナル伝達系の機構解明の手がかりになるものと考えられた。

D2p-03

シロイヌナズナの新たなオーキシン耐性突然変異体
solitarily root の解析
澤城英弘、田坂昌生 (京大大学院・理・植物)

高等植物においてオーキシンは細胞伸長の制御だけでなく、重力屈性や光屈性反応、側根形成、頂芽優勢など多くの成長・発生過程に関与する。しかしこれらの現象における分子レベルでのオーキシン作用機作についてはほとんどわかっていない。そこで我々はオーキシン反応の分子機構を解明するため、シロイヌナズナから新しいオーキシン耐性突然変異体を単離・解析したので報告する。

シロイヌナズナの *cop4-1* 変異体は、(1) 黄化芽生えにおいて apical hook が開き、(2) 胚軸と根の重力屈性反応が異常になることが報告されていた (Hou et al. 1993)。今回我々はこの *cop4-1* 変異系統において、(3) 側根が形成されず、(4) 胚軸と根の境界領域を除き根毛がほとんど分化しない、という表現型を見出した。戻し交配の後、(1) の *cop4* 変異と (2・3・4) の変異が遺伝的に分離した。そこでこの *cop4-1* 変異系統に起こった (2・3・4) の異常を引き起こす 2 番目の変異を、*solitarily root* (*slr*) と名付け解析した。まず、根の伸長に対する植物ホルモン等の阻害効果について調べたところ、野生株に比べて *slr* 変異体の根はオーキシンである IAA・2,4-D・NAA に強い耐性を示したが、サイトカイニン (BA) とエチレン合成前駆体の ACC に対して野生株とほぼ同様な感受性を示し、ABA に対してわずかに高感受性を示した。また、オーキシンにより発現が誘導されるシロイヌナズナ遺伝子 SAUR-AC1 のプロモーターと GUS との融合遺伝子 (pSAUR-AC1::GUS) の発現を調べたところ、*slr* 変異体の胚軸では外から与えたオーキシンによる pSAUR-AC1::GUS 遺伝子の発現誘導に異常が認められた。*slr* 変異は単一の優性変異であり、既知のオーキシン耐性変異体 (*aux1*・*dwf*・*axr1*・*axr2*・*axr3*・*axr4*)、側根形成欠損変異体 (*alr4*) と異なる第 4 染色体上にマップされた。これらの結果から、SLR 遺伝子がオーキシン反応に特異的に関わる新たな遺伝子座であることが明らかとなった。

D2p-04

オーキシンによる偏差成長異常突然変異体 *msg1* とオーキシン耐性突然変異体 *axr1* や *aux1* との二重突然変異体の生理学的性質

綿引雅昭、藤平健一郎、立松圭、山本興太郎 (北海道大・地球環境・生態環境)

msg1 は、オーキシンを胚軸の片側に塗っても胚軸がまったく屈曲しないシロイヌナズナの突然変異体であり、胚軸がオーキシン耐性を示す。*aux1* や *axr1* はオーキシン耐性突然変異体で、特に *axr1* は胚軸のオーキシンによる屈曲反応が野生型より弱い。胚軸屈曲反応にこれら遺伝子がどのように関与しているか明らかにするため、*msg1-2 axr1-3* と *msg1-2 aux1-7* の二重突然変異体を作製し、その表現型を調べた。その結果、*aux1* 変異は *msg1* の表現型にまったく影響を与えなかった。一方、*msg1 axr1* の葉の形は上偏成長をおこす *msg1* の葉としわの寄る *axr1* の葉の両方の性質を合わせた形になった。胚軸のオーキシン耐性は、野生型 < *msg1* < *axr1* < *msg1 axr1* の順に増加した。*msg1 axr1* 胚軸はオーキシンによる屈曲反応をまったくおこさず、屈地性は野生型より反応が遅くなる *msg1* の表現型を示した。以上の結果から、MSG1 は AXR1 や AUX1 とは独立に働いていることが示唆された。

D2p-05

胚軸屈曲反応が欠損したシロイヌナズナ優性突然変異体 *msg2* の単離とその遺伝学的・生理学的解析
立松圭、山本誠、綿引雅昭、山本興太郎 (北大・地球環境・生態環境)

綿引と山本(1997)はオーキシン片側塗布を利用して胚軸屈曲反応欠損突然変異体 *msg1* を単離した。本研究では、偏差成長とオーキシンの関係を明らかにするために、胚軸屈曲反応を利用して新規の突然変異体の単離を行った。 M_2 種子約 74,000 個をスクリーニングした結果、屈曲反応が欠損した 7 個体が得られた。そのうち 4 個体は *msg1* で、残りの 3 個体は新規の優性突然変異 *msg2* による変異体であった。*msg2* の外形は野生型に似ていたが、稔性は低くなっていた。その胚軸は屈地性を完全に失っており、屈光性も弱くなっていた。*msg2* の黄化芽生えではフック形成が弱くなっていた。*msg2* の胚軸は 2,4-D 耐性を示した。MSG2 遺伝子座は 3 番染色体上の GLABRA1 から 19.8 cM 北側に位置していた。以上のことから、MSG2 遺伝子が胚軸で観察されるすべての偏差成長に関与していることと、オーキシンがそれら偏差成長に関与していることが示唆された。

D2p-06

シロイヌナズナ・オーキシン耐性突然変異体の根の重力屈性異常に対するオーキシンの効果
山本誠、山本興太郎 (北大・地球環境・生態環境)

オーキシン耐性突然変異体 *axr4* (Hobbie and Estelle, 1995) の根は重力屈性が野生型より弱い。培地にオーキシンを加えて、この異常な重力屈性に対するオーキシンの効果を調べた。

axr4 に NAA を与えると、30 nM で根の重力屈性が回復しはじめ、100 nM では野生型とほぼ同様な正常な重力屈性を示した。一方、IAA や 2,4-D を 10 nM から 300 nM 与えても *axr4* の根の異常な重力屈性は変化しなかった。300 nM の IAA や 2,4-D を与えると、野生型の根の重力屈性は弱くなるが、NAA は効果がなかった。*axr4* の根は 30 nM から 300 nM の範囲で IAA や 2,4-D に対してオーキシン耐性であるのに対し、NAA に対してはオーキシン耐性ではなかった。

以上の結果はもうひとつのオーキシン耐性突然変異体 *aux1* の根の重力屈性に対するオーキシンの効果に似ている (Yamamoto and Yamamoto, 投稿中)。*axr4* の作用点はオーキシン流入担体周辺であると考えられる。

D2p-07

クロモサポニンとブラシノライドによるアラビドプシ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、曾我康一²、保尊隆享²、後藤伸治³、神阪盛一郎² (神戸大・RIセンター、¹東北大・院・理・生物、²大阪市大・理・生物、³宮教大・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、レタズ根のエチレンに対する反応性を低下させることによって、根の成長を促進していることを既に報告した。今回は、暗所、ろ紙上で生育させたアラビドプシス (*Arabidopsis thaliana*, Columbia) を用いてエチレンの関与を検討した。また、構造的類似性のあるブラシノライド (BR) との比較をした。

根の成長促進作用における CSI と BR の最適濃度は、それぞれ 100 μ M と 1 nM であり、いずれの場合も根の直径の減少が認められた。CSI は細胞の伸長を促進し、根を真直ぐに成長させるが、BR にはこれらの作用はない。エチレン非感受性変異株である *etr1-1* と *ein2-1* では、CSI と BR による成長促進効果は認められなかった。これらの結果は、CSI と BR による成長促進作用にはエチレンのシグナル系の存在が必要であることを示唆しているが、CSI の作用機構には、BR とは異なった部分がある。

D2p-08

シロイヌナズナのサイトカイニン低感受性突然変異体の単離と機能解析
井上 努、柿本辰男 (大阪大・院理・生物科学)

サイトカイニンは主要な植物ホルモンの 1 つであり、その生理作用として細胞分裂の促進・葉緑体の発達・老化防止・子葉の展開・主根の伸長阻害などがある。サイトカイニンは植物の生育に重要な役割を果たすが、そのシグナル伝達経路についてはほとんど明らかになっていない。サイトカイニンのシグナル伝達経路に関与する遺伝子を同定するため、サイトカイニンに対して低感受性を示すシロイヌナズナの突然変異体 *ckl* (*cytokinin low-sensitivity 1*) を単離した。

高濃度のサイトカイニン存在下で胚軸からカルスを誘導すると、野生型では緑色で肥大化し、その表面には根毛様構造の形成が阻害されるが、*ckl* のカルスは高濃度の kinetin 存在下においても淡黄色カルスを誘導し、その表面は根毛様構造でおおわれていた。根の伸長に着目した実験ではベンジルアデニンに対して 100 倍以上の感受性の低下が見られたが、インドール-3-酢酸やエチレンの前駆体である 1-アミノクロプロパン-1-カルボン酸に対しては野生型と同程度の感受性を示した。野生型と交配し、ヘテロ接合体の表現型を【カルスの緑化】と【主根の伸長阻害】に着目して観察したところ、野生型と *ckl* ホモ接合体の中間の表現型を示し、半優性であることが示唆された。

D2p-09

過剰発現によりサイトカイニン非依存性を与える遺伝子CKI1の機能解析
進藤三佳, 柿本辰男 (阪大・院・理・生物)

シロイヌナズナの遺伝子CKI1 (*cytokinin-independent 1*) はバクテリアでは一般的な情報伝達系である2成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼのファミリーに属し、植物で過剰発現すると、組織培養系でサイトカイニン非存在下でもサイトカイニン反応であるカルスの増殖、緑化、シュート誘導をする。

ヒスチジンキナーゼの保存されたリン酸化部位であり、リン酸基転移に関わっているアミノ酸残基に対応するHis⁴⁰⁵またはAsp¹⁰⁵⁰にアミノ酸置換をもたらすように変異を加えた遺伝子を過剰発現した結果、CKI1の過剰発現でみられた反応がみられなかった。このことから、これらの残基がリン酸化されたCKI1がサイトカイニン反応を引き起こしていることが予想される。

また予備的な実験では、CKI1をアンチセンス方向に発現するように形質転換したシロイヌナズナの中に、組織培養系でサイトカイニンの感受性が低下している可能性のある個体がみられている。

D2p-10

大腸菌により合成させたOLPの精製およびサイトカイニンとの結合活性

小林 興, 五十嵐大亮, ¹佐藤直樹, ²小岩尚志, ²佐藤文彦 (東京学芸大・生命科学, ¹埼玉大・分子生物, ²京都大院・応用生命科学)

これまでの研究で、タバコカルスから二種類のサイトカイニン結合活性を持つタンパク質 (CBP1, CBP2) が得られており、それぞれの分子量、解離定数がきまっている。特に、高いサイトカイニン結合活性を持つCBP2に関しては、そのN末端のアミノ酸配列からosmotin-like protein (OLP) と高い相同性 (92.9%) を持つことが解っている。CBP2が、既に明らかになっているOLPである可能性が高いことから、サイトカイニンとOLPとの相互作用が示されれば、その生理的役割が推定出来ると考える。

本研究では、サイトカイニンとの相互作用を調べる目的で、OLPのcDNAを大腸菌に組み入れ合成させた。組み換えOLPは細胞破壊後、8 M urea で可溶化してSP-Sepharose column で分画し、SDS-PAGE で分析した。その結果、単一のタンパク質として得られた。urea 除去後にサイトカイニン結合活性を調べたところ、OLPがCBP2と同程度の結合活性を持つことが解った。

D2p-11

メロン果実におけるエチレンレセプターホモログの発現解析

奈良久美, 遊橋健一¹, 東克己, 細谷和重, 窪田満, 江面浩 (茨城生工研, ¹東北大・遺生研)

我々は果実の発達・成熟に対するエチレンの役割を探るために、メロンからエチレンレセプターホモログ (MEERS) の全長cDNAを単離し、解析を行っている。エチレンレセプターには、シロイヌナズナ ETRI・ERS 及びトマト eTAE1・NR に代表される2つのタイプが知られているが、MEERSはERS型であった。MEERS mRNAの発現量は、果実の発達初期に増大し、果実の肥大が停止する頃に著しく減少した。また、クリマクテリックなエチレン産生が起きる果実成熟期には発現量が再び増大したが、果実発達初期の発現よりは低いレベルであった。トマトでは、同じERS型遺伝子であるNRの発現量が果実成熟期に劇的に増大することが報告されていたが、果実発達初期にもERS型遺伝子の発現量が増大することがメロンにおいて初めて示された。今後、メロンの果実発達初期、特に細胞肥大が盛んに起きている時期にMEERSの発現量が増大することの意味を探りたいと考えている。さらに現在、メロンからETRIに類似するクローンを単離し、発現解析を行っており、この結果も併せて報告したい。

D2p-12

ビオチン標識化アブシジン酸・ジベレリンとオオムギアリュ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, 一瀬勝紀, 安藤哲¹, 吉田茂男 (理研・植物機能, ¹東農工大・BASE)

オオムギアリュ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。我々はアリューロン細胞におけるこれら植物ホルモンの受容についての解析法を確立することを目的として両植物ホルモンのビオチン標識化合物を調製し (bioABA・bioGA)、直接的な細胞との相互作用の解析が可能なアリューロン細胞プロトプラストを用いて検討を行った。bioABA、bioGAは各々アブシジン酸やジベレリンと同様の活性を有していた。bioABAとプロトプラストとの相互作用については、フローサイトメーターを用いて解析した結果、bioABAは細胞膜上に結合していることが示唆された。bioGAについては現在解析中である。

D3a-01

アラスカエンドウ根の成長、および維管束に於ける空隙形成部位に対する灌水処理影響

仁木 輝緒, ダニエル K. グラデシ¹, 梶 隆² (拓殖大・工・生物工, マイアミ大・植物¹, 拓殖大・政経²)

アラスカエンドウ (*Pisum sativum* cv. Alaska) 種子をバームキュライトに播種後 0 日、5 日、6 日、および 7 日目から灌水処理を施した。そして、種子根の成長、および維管束に於ける空隙の形成部位を調べた。

初めから (0 日) 灌水培地に播種された場合、種子根の成長は通常の培地条件のそれと比べて約 20% 抑制されるが、成長は停止しない。しかし、上記のように、生育途中で灌水処理を行うと根の成長は停止する。その段階で側根の形成、および上胚軸の成長が著しく促進される。

根維管束に形成される空隙は、灌水処理により根端から 1.5 cm の部位に於いて形成し始めていた。そして、灌水処理の時間の長さに応じて空隙の形成位置は伸長していった。また、灌水条件下で生育している種子根には、根毛の形成はほとんどみられず、根直径は通常の培地条件下の生育根に比べて小さかった。

灌水処理の第一義的影響は根を取り巻く環境の酸素濃度低下の誘起を意味する。この観点から根の成長、空隙形成の意義、および部位に対する灌水処理の影響を考察する。

D3a-02

カボチャ根導管液に存在する高分子量緑化促進物質の特性
加藤千尋, 佐藤 忍 (筑波大・生物)

高等植物の導管は水や無機栄養素に加え、根が合成したホルモンや糖質、タンパク質などを地上部に輸送し、個体機能の調節・維持に関わっていることが示唆されている。過去の研究において、カボチャの根導管液中には高分子量のキュウリ黄化子葉の緑化促進活性があることが明らかになっている。本研究では、この高分子量の緑化促進物質の部分精製を行い、その特性解析を行うとともに、植物体に各種環境処理を行うことにより、この緑化制御活性の変動の調査を行った。

カボチャ根導管液のゲル濾過 (Sephadex G-25) で得られた高分子量緑化促進画分 (分子量 3,000~5,000) を逆相クロマト (ODS) にかけて、活性は 30~40% アセトニトリルで溶出された。この活性画分をゲル濾過 (Superdexpeptide) にかけて、活性は単一のピークとして検出され、分子量は 2,500 と算定された。この画分を熱や酸で処理しても失活は見られなかったが、固定化プロテアーゼによる処理では失活が見られ、ペプチド性物質である可能性が示された。

また、窒素欠乏などの環境処理のうち、根に強い乾燥と灌水を繰り返す処理によりこの活性の顕著な増加が見られた。

D3a-03

カボチャ根導管液に存在する新規アミノ酸・メトキシベンジルグルタミン

佐藤忍, 若穂岡尚志¹, 井上幸信¹ (筑波大・生物,¹ 筑波大・化学)

高等植物の根は、生合成した様々な有機物質を導管流に乗せて地上部器官へ輸送することにより、個体の発生や機能調節に関係していると考えられる。我々は、カボチャの根導管液の生理活性検索の一貫として、キュウリ胚軸からの不定根形成を阻害する活性画分中の、新規アミノ酸の同定とその生理活性の調査を行ったので報告する。

2L のカボチャ根導管液を分液して得た不定根形成阻害活性を有するブタノール相を、逆相クロマトグラフィー (ODS/HPLC) で分画し、紫外吸収で単一ピークを示す阻害画分を得た。この画分には、0.2mg の固形物が含まれ、紫外吸収スペクトル、high mass、ESI⁺ mass、¹H-NMR、さらには化学合成品の分析を行い、この画分の主要物質として、新規アミノ酸である、*N*⁶-(4-methoxyphenyl)methylglutamine (メトキシベンジルグルタミン) を同定した。

この化学合成品を 1mM の濃度でキュウリおよびカボチャ芽生えのシュートに胚軸の切り口から与えると、キュウリの不定根形成に対する弱い阻害活性と、カボチャおよびキュウリの第一葉の展開を阻害 (遅延) する活性が見出された。

D3a-04

多電極化学検出器によるアサガオのフロリゲン様物質の動態解析

篠崎真輝 (京大・農・応用生物)

Chailahjan によるフロリゲン説の提唱以来 60 年余りが経過しているが、フロリゲンの実体は依然として不明のままである。特にこれまでに機器分析によりフロリゲンの挙動を示す物質が確認された例はない。以前の本年会で我々はアサガオの日光反応がカテコールアミンの生合成および分解に関与する酵素の阻害剤により阻害されることを報告した。そこで、暗処理に伴うカテコールアミン含量の変化を多電極化学検出器 (esa 社クーロケム II) を用いて測定した。詳細な解析の結果、ドーパ、ドーパミン、ノルアドレナリンの存在は確認出来なかった。しかしながら、子葉の 0.1 N HCl 抽出物中にフロリゲンの挙動、即ち、(1) 限界暗期以後に増加する。(2) 光中断によりその合成が阻害される。(3) 低温 (15℃以下) で暗処理しても合成されない。(4) 暗処理一定時間後 (12-24 時間) には子葉から消失する。(5) 日長反応を阻害する阻害剤 (ethylene, fusaric acid, n-butyl gallate など) によりその合成が阻害される。以上の条件を満たす物質が多数存在するを見いだした。これらの物質は非常に極性の高い領域に溶出し (ODS-C₁₈ タイプのカラムで 1% MeOH, 1% BuOH, 2% AcOH で溶出させると 6 分以内)、従来の検出方法では暗処理に伴う変化を見出すことは出来ない。しかも、これらは多くの電極にわたり検出されるので単電極の電気化学検出器でも検出が困難である。本大会ではフロリゲン様物質の動態と分離、検出方法について報告する。

D3a-05

タバコのポリアミン合成系遺伝子の

シヨ糖による発現誘導

中北真紀子、今西 俊介、中村 研三

(名古屋大・院・生命農・生物化学)

植物のポリアミン合成には、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) による経路に加え、動物にはみられないアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) 経路が存在するが、植物におけるポリアミン合成系遺伝子の発現様式についてはほとんど報告がない。我々は先にジャスモン酸が、タバコ培養細胞において ODC 遺伝子及び S-アデノシルメチオニン合成酵素 (SAMS) 遺伝子の発現を速やかに誘導することを見出している。ODC のゲノミッククローン のプロモーター領域と GUS との融合遺伝子を導入した形質転換タバコ植物個体の組織を GUS 染色したところ、子房や胚珠などにおいて、維管束組織に沿った強いシグナルが検出された。また、切り取り葉にシヨ糖を与えると GUS 活性の顕著な誘導が見られた。そこで、タバコ葉切片を材料に用いてポリアミン合成系遺伝子の糖応答性をノーザンハイブリダイゼーションによって解析した。その結果、シヨ糖、グルコース、フルクトースなどの代謝可能な糖によって、ODC のみならず、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC)、SAMS の各 mRNA レベルの上昇が見られたが、マンニトールではこうした効果は見られなかった。一方、ADC mRNA レベルはいずれの処理によっても大きく変動しなかった。

D3a-06

イネ伸長葉鞘における糖転流機構の解析

松倉千昭、根本圭介¹、谷本英一²、大杉立³

山口淳二 (名大・生物分子応答研究セ、¹東大・農、²名市大・自然科学教育セ、³農水省生物研)

イネ葉鞘の伸長現象は細胞分裂と細胞肥大の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。本研究ではこれら伸長の生理的背景を明らかにするため、伸長葉鞘における細胞内浸透溶質、主要代謝糖含量を測定し、伸長時に観察されるデンプン顆粒の減成と併せてこれらの要因が葉鞘伸長に果たす役割について考察した。葉鞘あたりの可溶性糖含量は伸長開始後比較的初期の段階でフルクトース含量が急伸する形で増加することから、葉鞘細胞内デンプン顆粒の減成産物は一度スクロースに変換された後、維管束系を介して伸長部位へ転流されていると考えられる。スクローストランスポーター遺伝子を用いた *in situ* hybridization でも維管束師部での特異的な発現が確認されていることから、伸長葉鞘において活発な糖の転流が行われていることは確実である。これらの転流産物は伸長後の2次細胞壁構築や浸透圧の維持等の細胞活動に必須の役割を果たすものと考えられる (Matsukura et al. *Planta in press*)。

D3a-07

黄化エンドウ芽生えの可溶性酸性インベルターゼ：精製と部分アミノ酸配列

林智也¹、宮本健助¹、居原秀¹、上田純一¹、神阪盛一郎²
(1大阪府大、総合科学、2大阪市大、理、生物)

インベルターゼは、師管を経た糖の転流制御に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、黄化エンドウ芽生えの糖転流制御における可溶性酸性インベルターゼの役割を生化学的、および分子生物学的側面から解析することを目的に、本酵素の単離、および部分アミノ酸配列の決定を試みた。7日齢黄化エンドウ上胚軸から調製した粗酵素液を塩析後、Butyl Toyopearl、ConA-Sepharose、および Sephacryl S-300 ゲル濾過カラムにより精製した結果、インベルターゼは糖タンパク質であることが示されると共に、比活性で約330倍に精製された。キガバイトでさらに精製された活性画分を、等電点電気泳動 (pH6.7-7.7) 後、活性染色に供した結果、 pI が ca.7.5、7.3、7.1、6.9 の4カ所に活性が検出された。SDS-PAGE 解析の結果、 pI 6.9 および 7.1 に対応するペプチドから、約68 kDa ペプチドが、 pI 7.5 および 7.3 に対応するペプチドからは、それぞれ80、68、42、38 kDa のペプチド、および68、42、38 kDa のペプチドが検出された。ヤエナリ可溶性酸性インベルターゼの抗体を用いて免疫染色を行った結果、少なくとも、68、42、38 kDa のバンドは染色された。このうち、42 kDa ペプチドは、ヤエナリ等の既知インベルターゼと高い相同性を持つアミノ酸配列を有していた。以上の結果から、エンドウ可溶性インベルターゼは、ヤエナリの可溶性酸性インベルターゼに類似した構造を有することが示唆された。

D3a-08

オーキシンを介したチューリップ花茎の成長：特に表皮の重要性

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)

本研究において、チューリップ花茎の成長に対する植物ホルモンの影響を調べた結果、オーキシンと表皮が花茎の成長に重要であることが示された。

抽苔しつつあるチューリップの花茎から、花芽を除去すると、以後の花茎の成長は完全に停止した。0.1% IAA をラノリンペーストとして、花芽を切除した花茎先端部に与えると、花茎は正常に成長した。また、オーキシン投与部位を変化させた実験から、正常な花茎節間の伸長は、オーキシンの投与部域以下で認められた。ジベレリンも花茎成長を促進したが、その効果はオーキシンのそれより低かった。アブジジン酸やバクロブトラゾールは花茎成長を阻害した。花芽を切除し、その切除部位にオーキシンを投与した花茎において、表皮の一部を環状に剥離すると、その部域の成長は阻害された。また、花茎の長軸方向に一部表皮を剥離した場合にも、花茎の成長は阻害された。以上の結果、チューリップ花茎の成長には表皮が重要な役割を果たしていること、さらにその成長は花および葉で生産されるオーキシンによって制御されていることが示唆された。

D3a-09

オーキシン濃度上昇にตอบสนองしたエンドウ節間におけるオーキシン代謝の活性化と成長制御
芳賀 健, 飯野 盛利 (大阪市大・理・植物園)

We have previously demonstrated that growth of pea internodes is only temporarily stimulated in response to applied IAA. The mechanism underlying this short-term growth stimulation was investigated using ^3H -IAA as a tracer. Lanolin containing ^3H -IAA with or without IAA was applied to an apical part of the elongating third internode of red-light-grown pea seedlings. The IAA concentrations used to induce the short-term growth stimulation were 0.3 and 3 mg g⁻¹. The radioactivity due to ^3H -IAA and the total radioactivity were monitored at a zone located below the application site. The distribution toward the epidermis was also investigated by measuring the radioactivity in epidermal peels. It was found that the metabolism of IAA is activated in response to an enhanced tissue content of IAA. This activation was greater at the epidermal side of the internode. The majority of metabolites appeared to be degradation products (not conjugates) that are highly water soluble. In agreement with the growth kinetics, the level of ^3H -IAA in epidermal peels showed an initial increase followed by a decrease.

D3a-10

シロイヌナズナ花形成突然変異体の花茎におけるオーキシン極性移動: その役割と制御
岡真理子^{1,2}, 上田純一¹, 宮本健助¹, 岡田清孝³
(¹大阪府立大・総合科学, ²岡山県生物科学総合研究所, ³京都大・理)

演者らは、花茎先端に花を形成しない *pin* 突然変異体のオーキシン (IAA) 極性移動能が著しく低いこと、野生型植物にオーキシン極性移動阻害剤を処理すると *pin* 突然変異体様の形態が誘導されることから、IAA 極性移動が花形成に重要な役割を果たしていることを示してきた。本研究では、花形成と IAA 極性移動との関係を明確にする目的で、種々の花形成突然変異体を用いて検討した。その結果、野生型と比較して、より多くの種子を形成した *apl* および *clv1* 突然変異体の IAA 極性移動能は高く、わずかにしか、あるいは全く種子を形成しない *ap3*, *ag*, *pi*, *Fl-40*, *Fl-54*, *Fl-89* および *pin* 突然変異体では著しく低かった。野生型から全ての花および種子を除去し、*pin* 突然変異体様の形態にした場合、IAA 極性移動能は著しく低下した。また、*pi* や室温では種子を形成しない *ap3* 突然変異体に、人工授粉により種子を形成させたところ、IAA 極性移動能は部分的に回復した。以上の結果から、正常な IAA 極性移動能は花形成に重要であると共に、花の存在や種子形成等、植物体の成長状態によっても影響を受けることが示唆された。

D3a-11

光屈性刺激に伴うオーキシン横移動説の検証
中野洋, 山田小須弥¹, 富田・横谷香織¹, 長谷川宏司¹ (筑波大・バイオシステム,¹ 筑波大・応生化)

我々はこれまで光屈性がオーキシンではなく、オーキシン活性抑制物質の光・影側での偏差分布によって引き起こされるという Bruinsma-Hasegawa 説 (1989) を提唱してきた。また、オーキシンの偏差分布が原因だとする Cholodny-Went 説 (1937) の基盤となる Boysen-Jensen の実験 (1926) を追試した結果、内生のオーキシンの光側から影側への移動を妨害しても光屈性が起こることを明らかにした。今回は、これまで植物生理学の教科書に広く掲載されているようにオーキシンが光屈性刺激で光側から影側へ横移動するのかどうか明らかにするために、ラベルしたオーキシンを用いて、やはり Cholodny-Went 説の基盤となる Pickard らの実験 (1964) で代表されるラベルしたオーキシンの光側から影側への横移動についてアベナ幼葉鞘を用いて検討を行った。その結果、少なくともアベナ幼葉鞘では投与されたオーキシンの横移動はほとんど起こらないことが明らかとなり、Cholodny-Went 説の基盤となった重要な実験の解釈は誤りであったと考えられる。

D3a-12

オーキシン活性抑制物質ラファヌサンによる頂芽優勢打破機構
中島江理, 小瀬村誠治¹, 山村庄亮¹, 山田小須弥², 富田・横谷香織², 長谷川宏司² (筑波大・バイオシステム,¹ 慶応大・理工・化,² 筑波大・応生化)

頂芽の存在が側芽の成長・分化を抑制する現象を頂芽優勢という。これまでに、頂芽優勢には植物ホルモンのバランスや栄養が関係していることを示す結果が多く得られており、側芽の成長抑制は、頂芽から供給されるオーキシン量と根から供給されるサイトカイニン量のバランスによる影響であると言われている。しかし、頂芽切除後の側芽の成長は、サイトカイニンが供給されるために必要な時間以前に起こるといった結果もあることから、オーキシンやサイトカイニン以外にも、頂芽優勢に関与している物質が存在する可能性が示唆される。

一方、本研究において、根を切除し、根からのサイトカイニンの供給を阻止したエンドウの第二節の側芽において、頂芽切除後 30 分という早い時間に頂芽優勢の打破が確認された。そこで、オーキシン活性を抑制するような物質がこれらの現象に関与している可能性を考え、オーキシン活性抑制物質であるラファヌサンを 2mg のラノリンに混ぜ、エンドウ頂芽、側芽および側芽の上部にそれぞれ投与し側芽の成長への影響を見たところ、全ての処理の場合において、投与後 30 分で側芽の成長が確認された。側芽の上部に投与した場合にも側芽の成長が見られたことから、ラファヌサンが、オーキシンの極性移動をも阻害している可能性が示唆された。実際に、高速液体クロマトグラフィーを用いて極性移動するオーキシン (IAA) 量を定量した結果、ラファヌサンは、TIBA, NPA といった従来のオーキシン極性移動阻害剤と同様にオーキシン極性移動阻害活性を示すことが明らかになった。

E1a-01

ジクロロベニル (セルロース合成阻害剤) は CelA タンパク質を増加させる

中川直樹、坂井直樹 (広島大・総合科学)

高等植物の膜面にはセルロース合成酵素が存在するが、意外にも研究はあまり進んでおらず、むしろバクテリアセルロースの生合成研究が先行している。最近 Pear らは酢酸菌セルロース合成遺伝子とアミノ酸レベルで相同性を示す、植物のセルロース合成遺伝子の候補 (CelA) を見いだした。しかし CelA にコードされたタンパク質に関する生化学的な知見はほとんどなく、セルロース以外の多糖合成酵素である可能性も残る。一方、特異的にセルロース合成を阻害する薬剤としてジクロロベニル (DCB) が知られている。タバコ BY-2 細胞を DCB を 1 μ M 含む培地で継代して生じる DCB 阻害細胞は、セルロースが減少しベクチンとエクスタンシンが増加する。我々は、DCB 阻害細胞と、普通の BY-2 細胞の CelA タンパク質の量を比較することで、CelA タンパク質がセルロース合成に関わるかどうかを判断できるのではないかと考えた。タバコの CelA タンパク質を検出するために、各種植物の CelA 遺伝子の配列中で高度に保存された部分に対する抗体を作成した。malE と CelA の融合タンパク質を大腸菌で発現させてウエスタンブロットを行い、この抗体の特異性は非常に高いことを確かめた。DCB 阻害細胞と正常な BY-2 細胞からそれぞれ調製したミクロソーム画分をイムノブロット解析した。予想に反して、BY-2 細胞ではほとんどシグナルは検出されず、セルロース量のとても少ない DCB 阻害細胞では複数の強いシグナルが検出された。我々は以下の理由により、それらのシグナルがタバコの CelA タンパク質に由来すると考えている。1) 抗体は CelA タンパク質に特異的である。2) 細胞の DCB 処理で量が大きく変化する。3) 分子量が cDNA から計算される値とほぼ一致する。

E1a-02

エンドウ根のカスバリー線にはスベリンとリグニンが存在する

唐原一郎、横山正樹、Juergen Zeier¹、Lukas Schreiber¹
(富山大・理・生物、¹Univ. Wuerzburg・Dept. Biol.・Botany)

カスバリー線は19世紀に存在が記述されて以来生理学・形態学的実験によってアポプラストバリアとしての機能が古くから示唆されているが、それを裏付ける物質的知見は染色による形態観察をのぞいて最近までなかった。二次壁成分としてまずリグニンの存在がSchreiberら(1994)により明らかにされたが、機能を裏付けるために最も重要な疎水性物質であるスベリンについては試みられているもののまははっきりした証拠は得られていなかった。

筆者らは純粋なカスバリー線を得られる材料としてアラスカエンドウを用い、根2000本から外科的手法によりカスバリー線を単離した。BF₃/MeOHを用いたtransesterificationによりスベリン成分を、またthioacidolysisによりリグニン成分を、いずれもGC/MSを用いて調べた。スベリン成分としては、長鎖脂肪酸である、C₁₆からC₂₂までのw-hydroxyalkanoic acids、C₁₆からC₂₂までの1,w-diacids、C₁₆からC₂₂までのcarboxylic acids、C₂₂のalcoholが検出された。スベリンの総量はカスバリー線1 mgあたり29.2 μ g (2.9%(w/w))であり、この含量はこれまでに調べられている、スベリンラメラを発達するタイプの植物の内皮の中でも最も高いものの含量に匹敵する値であった。これにより、カスバリー線は十分アポプラストバリアとしての役割を果たしている可能性が示唆された。リグニンの総量はカスバリー線1 mgあたり26.7 μ g (2.7%)であり、これは道管における含量の半分程度であった。3種類のリグニン単位であるp-hydroxyphenyl (H)、guaiacyl (G)、syringyl (S)単位の比は4.91:5であり、道管のそれとほとんど変わらなかった。

E1a-03

イネ節間柔組織形成異常mutantを用いた細胞壁形成に関与するフェニルプロパノイド代謝系の解析
西窪伸之・荒木智之・平田 豊¹・北野英己²・片山義博 (農工大・院・BASE、¹農工大・農・生、²名古屋大・農)

イネ科植物は、短期間に強度を得るために、他の植物種とは異なり特殊な細胞壁構造を有する。イネ単因子劣性mutantふ系71号は、イネ科独特の細胞壁構造である、多糖類とケイ皮酸由来の物質との架橋結合を異常に蓄積する。イネ科植物の細胞壁における架橋構造の形成を考える上で非常に有用な植物体であることがわかった。また、この異常細胞では単糖組成も通常と大きく異なっており、ふ系71号は細胞壁形成に関わる糖およびフェニルプロパノイドに関わる共通の上位因子の異常が起こるmutantである。今回我々は、フェニルプロパノイド生合成系の調節とともに、シキミ酸代謝経路に着目し、その抗体を作製し、フェニルプロパノイド生合成系とシキミ酸に関与するDAHPh synthaseのふ系71号における両代謝系の関係を考察した。

E1a-04

イネ科における細胞壁形成異常ミュータントを用いたフェニルプロパノイド合成系調節機構の解析
荒木智之、西窪伸之、平田豊¹、北野英己²、片山義博 (東京農工大学院BASE、¹東京農工大・農、²名古屋大・農)

イネ品種フジミノリの γ 線処理後代「ふ系71号」は高温依存的に矮性形質を示し、その際、節間柔細胞が変形し、リグニン様物質が異常蓄積することが明らかとなっている。また、これらの表現型は連鎖解析により単因子劣性遺伝子の支配を受けていることが明らかとなっており、ふ系71号の変異は細胞壁形成に関与する転写因子あるいはシグナルトランスダクション等に関与するかなり高度な制御領域に起因するものであると考えられる。我々はこの突然変異体を用い、細胞壁形成に関わる物質代謝制御解明のため、糖、シキミ酸代謝系及び、フェノール性リグニン様物質を代謝するフェニルプロパノイド合成系の遺伝子支配を明らかにすることを目的とする。

E1a-05

細胞壁合成に関与するアラビドプシス温度感受性突然変異体の解析

佐藤 茂、加藤 友彦、高部 圭司¹、柴田 大輔
(三井植物バイオ研、¹京大大学院・農・森林科学)

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ている。しかしながら、細胞壁合成の分子レベルのメカニズムに関する知見は乏しい。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い、根端が膨らむ変異体7系統(*acw1*~7; *altered cell wall*)を単離した。

*acw1*と*acw2*の根の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。*acw1*では、非許容温度下でUranyl Acetate・クエン酸鉛染色とPATAg染色での染色性の変化と中心柱と皮層の細胞の肥大が観察された。*acw2*では、染色性の著しい変化とともに根組織分化の異常も観察された。

ACWI遺伝子単離ため、コンテイング作製を終え、現在相補テストを行っている。

E1a-06

管状要素分化過程におけるポリガラクトソナーゼの活性変動と遺伝子発現
大平 昌一¹、岩本 剛知²、杉山 康隆¹、福田 裕輔^{1,2} (¹東京大・理・植物園、²東京大院・理・生物科学)

管状要素分化は、二次細胞壁の肥厚とともに一次細胞壁の積極的な分解を伴うことが電子顕微鏡観察により明らかになっている。これまでに私たちは、この細胞壁分解のメカニズムを解明するために、管状要素分化を高頻度かつ同調的に誘導することができるヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の培養系を用い、培養細胞から単離した細胞壁の自己分解に関する生化学的解析を行ってきた。そして細胞壁の自己分解によって生じた遊離糖の分析により、管状要素分化過程ではペクチン質、その中でもポリガラクトソナーゼが極めて活発に分解されていることを示した。また、これに関与する細胞壁分解酵素を塩化カルシウム処理により単離細胞壁から抽出することにも成功した。

今回私たちは、管状要素分化過程におけるポリガラクトソナーゼの活性と mRNA レベルの変動について解析したので、その結果を報告する。まず、分化誘導条件および対照条件で異なる時間培養した細胞壁抽出物についてポリガラクトソナーゼ分解活性を測定したところ、管状要素分化と密接に関連していると考えられる活性の変動が認められた。さらに管状要素分化過程におけるポリガラクトソナーゼ遺伝子の発現を調べるために、PCR法によってヒヤクニチソウポリガラクトソナーゼの cDNA 断片を単離し、これを鋳型に RNA プローブを作成してノーザン解析を行った。その結果、分化誘導条件下でのみ少量のポリガラクトソナーゼ mRNA が蓄積されることがわかった。

E1a-07

ワタ細胞における *pcsA* ポリペプチドの局在
冨永 るみ、井原 由理、酒井 富久美、林 隆久
(京都大、木研)

セルロースは、植物細胞を包み込み、その組織を維持・構築している細胞壁主成分である。この糖鎖は、植物の成長・分化・形態形成に重要な役割を担っている。

我々は既に微生物セルロース合成酵素遺伝子 (*bcsA*) のホモログ *pcsA* をワタ繊維細胞より単離している。この *pcsA* 遺伝子産物に対するポリクローナル抗体を合成ペプチドから調製した。ワタ繊維細胞タンパク質のウェスタンブロットティングから、約 100 kDa のポリペプチドが *pcsA* 遺伝子産物であることが示唆された。一方、ワタ植物組織切片のティッシュ・プリンティングをおこなったところ、細胞膜にそって *pcsA* ポリペプチドが存在した。

E1a-08

シュクロースからのカロース生合成
小西 照子、中井 朋則、森 仁志¹、酒井 富久美、林 隆久 (京都大・木質研、¹名古屋大・農)

シュクロース合成酵素 (SuSy: EC 2.4.1.13) は $\text{UDP-glucose} + \text{fructose} \rightleftharpoons \text{UDP} + \text{sucrose}$ の反応を触媒する酵素で、細胞壁糖鎖前駆体 UDP-glucose の生合成に関与することが示唆されている。今回、ヤエナリ由来の SuSy の Ser-11 を Glu にタンパク工学的に改変し、UDP-glucose の合成反応を活性化したミュータントシュクロース合成酵素 (MuSuSy) を得た。本研究では、MuSuSy 存在下、ワタ (*Gossypium hirsutum*) 由来のカロース合成酵素を用いてシュクロースからのカロース合成を試みた。

カロース合成におけるシュクロースの親和性は、シュクロース合成酵素における親和性よりもはるかに高く、シュクロースから生成した UDP-glucose の代謝回転が速くなることが示唆された。

また、ワタ繊維細胞内のシュクロース量と UDP-glucose 量を比較したところ、両者には相関関係が認められた。

E1a-09

タバコ培養細胞のエンド型キシログルカン転移酵素の多様性

伊藤寿、西谷和彦（東北大・理・生物）

エンド型キシログルカン転移酵素（EXGT）はセルロースに架橋しているキシログルカンを切断し、他のキシログルカンにつなが換えることによって細胞壁の伸展を可能にしていると考えられている。我々はタバコ培養細胞 BY-2 を用いて EXGT の多様性を調べた。

タバコ培養細胞のアポプラスト液に、分子量や等電点の異なる数種類の EXGT が存在することが、アズキの EXGT より作られた抗体を用いて明らかとなった。また既に単離されているタバコ芽生えの EXGT の遺伝子をプローブとしてタバコ培養細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、ほぼ同じ配列を持つ遺伝子が二つ単離された。これら複数の EXGT の機能の違いの解析を試みている。

E1a-10

葯の発生過程におけるアラビノガラクトタンブロテインの代謝と局在性

川口健太郎、渋谷直人¹、箱山 晋（農水省・北海道農試、¹農水省・生物研）

イネ葯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）及びアラビノガラクトオリゴ糖が高濃度に時期特異的に蓄積する。葯の発生におけるこれら糖質の生理機能を解明するため、その代謝及び組織局在性について解析したのでその結果を報告する。

AGP 及びオリゴ糖は、四分子からの小胞子放出という花粉細胞の形態変化に同調してそれぞれ濃度が変動し AGP は減少、オリゴ糖は増加した。また、12℃の低温処理はその変動を特異的に阻害する効果があった。また、抗オリゴ糖血清を用いて糖鎖の組織局在性を蛍光抗体法により解析した結果、葯を構成する細胞の壁周縁部に蛍光が認められた。イネ以外の植物の葯を材料に用いた解析結果も含め、葯の発生における AGP の役割について議論する。

E1p-01

アズキ上胚軸細胞壁に存在する4種のキシログルカン分解酵素画分の性質

田淵彰、神阪盛一郎、保尊隆享
（大阪市大・理・生物）

植物細胞壁中にはキシログルカン分解に関与する様々な酵素が存在することが報告されている。アズキ上胚軸細胞壁から1 M のNaClで抽出したタンパク質画分を Mono-Sカラムで分離すると、キシログルカン分解活性を示す4画分（S1, S2, S3, S4）が得られる。各画分の性質について検討した。S1, S2, S3はキシログルカン分解/転移酵素（Tabuchi et al. PCP, 38: 653, 1997）から構成され、アズキ上胚軸細胞壁中の全キシログルカン分解活性の約70%を占めていた。一方、S4画分は他の画分と異なった作用様式を示した。キシログルカン分解活性は上胚軸の成長とともに増加し、成長が止まるとその増加も止まった。上胚軸の齢や部位によって各画分の活性がどのように異なるか調べたところ、成長段階の遅い時期や成熟部位ではS1の活性が高く、反対に成長段階の早い時期や伸長部位ではS4の活性が高かった。これらの結果から、キシログルカン分解活性は上胚軸の成長に伴って変化し、特にS1及びS4画分における活性の変動が全活性の変化に貢献していることが明らかとなった。

E1p-02

オオムギ幼葉鞘におけるエンド及びエキソグルカナーゼのホルモンによる発現

小竹敬久、中川直樹、櫻井直樹（広島大・総科）

オーキシンにより誘導される伸長成長には、イネ科植物の細胞壁主要成分である1,3:1,4-β-グルカンの分解が関与する。演者らはこれまでに、オオムギ芽生えの細胞壁より、1,3:1,4-β-グルカン分解活性をもつ、エンドグルカナーゼとエキソグルカナーゼを抽出精製した。今回、両者の遺伝子発現とオーキシン誘導の伸長成長との関係をノーザン法で調べた。オオムギ幼葉鞘では、エキソグルカナーゼはよく発現していたが、エンドグルカナーゼはほとんど発現していなかった。また、オーキシン処理でエキソグルカナーゼの発現は変化しなかった。従って、オーキシンは少なくとも両者の発現を直接制御している可能性が低いと思われる。

E1p-03

イネ発芽種子由来エンド-(1→3)-β-グルカナーゼ
cDNAのクローニング
秋山 高、今井亮三 (農水省北海道農試)

エンド-(1→3)-β-グルカナーゼは、植物病原菌の細胞壁を分解することによる生体防御機構や正常な花粉形成に必要な四分子期花粉外膜の溶解など、種々の生理過程で重要な役割を果たすと考えられている。我々は新鮮な米糠から塩基性 (pI>10.4、分子量 33 kDa) 及び酸性 (pI 4.0、分子量 29 kDa) のエンド-(1→3)-β-グルカナーゼを精製し、そのN末端一次構造を明らかにしてきた。今回はイネエンド-(1→3)-β-グルカナーゼcDNAを得る目的で、イネ発芽種子cDNAライブラリーをオオムギエンド-(1→3)-β-グルカナーゼGII cDNAをプローブに用いてスクリーニングした。イネエンド-(1→3)-β-グルカナーゼのほぼ全長を含むと考えられる二つの cDNA、*gln1* (推定: pI 9.2, 305アミノ酸残基) 及び *gln2* (推定: pI 4.3, 319アミノ酸残基) は、全一次構造で比較した場合、オオムギエンド-(1→3)-β-グルカナーゼ GII cDNA (306アミノ酸残基) とそれぞれ 74% 及び 65% の類似性が認められた。また、すでに精製された塩基性イネエンド-(1→3)-β-グルカナーゼのN末端一次構造 (26残基) は、*gln1*の塩基配列から推定された一次構造と一致した。

E1p-04

光によるイネ幼葉鞘の成長と(1→3),(1→4)-β-D-グルカン分解の抑制
陳 磊、神阪盛一郎、保尊隆享 (大阪市大 理 生物)

(1→3),(1→4)-β-D-グルカンはイネ科植物に特徴的な細胞壁多糖であり、その分解はオーキシンによる細胞壁のゆるみみの原因となると考えられている。我々はこれまでに、気中培養および水中培養イネ幼葉鞘の成長能力とこのグルカンのレベル、また細胞壁グルカナーゼ活性とグルカン量の変動との間に高い相関あることを報告した。本研究では、これらの間の関係をさらに解明するため、イネ幼葉鞘の成長、グルカン量、そしてグルカナーゼ活性に対する光の影響を解析した。白色光照射によりイネ幼葉鞘の成長は抑制される。光条件にかかわらず、幼葉鞘細胞壁に含まれるこのグルカンの量は成長の初期に急速に増加し、その後減少した。グルカンの量のピークはグルカナーゼの活性のピークより1日前に見られ、グルカン量の変化がグルカナーゼ的作用によってもたらされていることが示唆された。暗所で生育した幼葉鞘のグルカナーゼ活性は明所のそれより常に高いレベルにあった。そして、グルカナーゼ活性とグルカン量の変化や幼葉鞘の成長との間には高い相関が見られた。以上の結果から、光照射によってグルカナーゼ活性が低下する結果グルカン分解が阻害され、イネ幼葉鞘の成長が抑制されることが示された。

E1p-05

細胞接着性の弱いニンジンNon-embryogenic callusにおけるメチル化ペクチンとカルス表層のペクチンの減少
岩井宏暁、小林俊弘、鎌田博、佐藤忍 (筑波大・生物)

ニンジン培養細胞のEmbryogenic callus (EC) では、細胞同士の堅い結合が見られるが、ECを継代培養して得られた不定胚形成能力を失った株、Non-embryogenic callus (NC) では、細胞の接着性が弱くなり、恒常的に細胞間の分離がおきる。細胞壁多糖の生化学的解析の結果、ペクチン酸性糖主鎖よりも、中性糖側鎖が、細胞間接着に積極的に関与していると考えられた。そこで、本研究では、電子顕微鏡 (TEM, SEM) を用い、2細胞株間の細胞壁、カルス表層の構造、およびルテニウムレッド染色 (ガラクトロン酸のカルボキシル基を認識) による組織化学的解析を行った。その結果、細胞接着性の弱いNCでは、細胞壁全体がルテニウムレッドにより強く染色された。一方ECでは、アルカリ処理により初めて細胞壁全体および分泌小胞がルテニウムレッドにより染色され、ペクチンが高度にメチル化されていることが示された。またECのみで、アルカリによる脱メチル化処理によりルテニウムレッドによる染色性を示す物質がカルス表層に存在することが観察された。次に、走査電子顕微鏡を用いて観察したところ、ECにおいてのみ不定形の物質がカルス表層の細胞表面全体を覆うように存在していた。しかし、NCにおいては、接着領域においてわずかに付着しているにとどまっていた。

E1p-06

半数体プランバギニフォリアを用いた細胞間接着に関連するミュータントの作出と形態学的解析
岩井宏暁、阿部知子¹、吉田茂男¹、佐藤忍 (筑波大・生物, ¹理研)

多くの種の培養細胞では、継代を続けることにより、形態形成能力の消失と同時に細胞間の接着性が弱くなることが観察される。なかでもニンジン培養細胞の自然変異体Non-embryogenic callusでは、ペクチンの中性糖側鎖の構造と量に変異が生じていることが判明している。本研究では、*Nicotiana* 属中で最小のゲノムを持つ *Nicotiana plumbaginifolia* の半数体植物を材料として用い、不定芽形成能力を失うと同時に、細胞間接着性の弱くなった looseな細胞塊を形成するミュータントの作出と、ペクチンに注目した形態学的解析を行った。1) 半数体 *N.p.* の葉切片に、理研リングサイクロトロンを用いて重粒子線 (窒素) の照射を行うことにより変異を誘発し、不定芽誘導培地にて培養したところ、細胞間接着性が弱く不定芽形成能力を失ったペースト状のカルスが、10Gyの線量で5.1%の葉切片に出現した。また、同じく半数体 *N.p.* の葉切片に、ハイグロマイシン耐性マーカーを有するT-DNAをアグロバクテリウムを介して導入したところ、9.3%の葉切片に同様のカルスが出現した。2) T-DNAの導入により得られた変異カルス株の細胞壁について、光学顕微鏡、走査電子顕微鏡による形態観察および、透過電子顕微鏡を用いたルテニウムレッド染色 (酸性糖染色) による組織化学的観察を行った。その結果、変異細胞株では、細胞間が分離しており、細胞表面に繊維状の物質が付着していることが観察された。一部の変異株では、ルテニウムレッドによる染色性が弱いものがみられた。

E1p-07

傾斜樹幹内であて材形成中に特異的に発現する遺伝子の探索

豊田純一郎、有留洋子、
馬場啓一、日尾野 隆¹、伊東隆夫
(京大・木研、¹王子製紙・森林資源研)

肥大成長を続ける樹幹は傾斜刺激によって、細胞壁成分が通常の木材とは異なるあて材を形成する。これまでに傾斜刺激によって木部分化帯で発現する遺伝子のcDNAをクローニングしたが、刺激直後に得られたものは、あて材を形成しない部分にも発現がみられた。そこで、今回はあて材を継続的に形成している傾斜後2週間目の木部分化帯を用いてサブトラクション・プローブによるcDNAクローニングを試みたところ、あて材形成中の木部分化帯で特異的に発現しているものがいくつか見出された。現在、得られたクローンの塩基配列を読み、相同性検索をおこなっているが、既知遺伝子との相同性は低いものが多い。

E1p-08

細胞壁の力学的性質を制御するタンパク質の単離と精製

中里(岡本) 朱根、中村 卓造(昭和薬科大・生物)

グリセリン処理ササゲ中空胚軸(GHC)を用いた実験から、細胞壁結合性のタンパク質が細胞壁の展性(ϕ)や臨界降伏張力(y)などの力学的性質のpH依存性を調節していることが示唆されている^{1,2}。その仮説を検証するため、それら細胞壁の力学的性質を制御するタンパク質の単離と精製を行った。

その結果、仮定的に ϕ 、 y -proteinと名付けられた、分子量の異なる2種類のタンパク質が ϕ と y のpH依存性を別々に制御していることが示された。また、現在それらのタンパク質に対する抗体を作成中であり、その抗体を用いて行った実験の結果についても合わせて報告する予定である。

¹Okamoto, H. & Okamoto, A., *Plant Cell & Environ.* (1994) 17: 979-983.

²Okamoto, A. & Okamoto, H. (1995) *ibid.* 18: 827-830.

E1p-09

過重力によるアズキおよびトウモロコシ芽ばえの成長抑制機構

曾我康一、原田景太、若林和幸、保尊隆享、
神阪盛一郎 (大阪市大・理・生物)

地上の1 gの重力下で、誕生・進化してきた高等植物の成長調節機構は重力に強く依存していると考えられる。本研究では重力による成長調節機構を明らかにするために、アズキおよびトウモロコシの芽ばえに100 gの過重力を与え、その成長および細胞壁の物性を測定した。過重力処理によりアズキ上胚軸、トウモロコシ幼葉鞘、中胚軸のいずれの器官においても伸長成長が著しく抑制された。また、これらの器官の細胞壁の伸展性は過重力処理により低下した。さらに、過重力は細胞壁マトリックス多糖の分解の抑制、ならびにアポプラスト溶液のアルカリ化を引き起こした。以上の結果より、植物の茎では過重力により細胞壁多糖の代謝回転が抑制されて、細胞壁の伸展性が低下し、伸長成長が抑制されること、また、細胞壁多糖分解の抑制にアポプラストのアルカリ化が関与する可能性が示された。

E1p-10

イネ葉に共通に存在する老化プログラムの時間的解析

稲田のりこ、酒井敦、黒岩晴子¹、黒岩常祥
(東京大・院・理・生物科学、¹共立女子短大・文科)

イネ(*Oryza sativa* cv. Nippon-bare)の子葉鞘一個体の中では、老化は先端から基部、内側葉肉細胞から外側表皮に向かって進行し、維管束周辺では著しく遅れる。この時、緑化する葉肉細胞内では、老化の極初期に葉緑体DNAが減少し、その後細胞核が凝縮・分解される。これら各現象の起こる時期・速度は、子葉鞘一個体の中でも、老化時期の差により異なる(Inada *et al.* 1998)。これら老化に伴う諸現象の一般性を検証するため、普通葉である第二葉を用いて同様に解析を行った。

維管束形が著しく発達している第二葉では、先端から基部への縦軸の老化勾配のみが明瞭に観察され、横軸及び葉の表裏についての老化時期の違いは見られなかった。テクノビット切片を用いた細胞観察の結果、同一横断切片上での全ての葉肉細胞は同じ挙動を示し、上述の、子葉鞘で見られたのと同様の過程を経て老化が進行してゆくことがわかった。以上の結果により、イネの葉の全ての葉肉細胞に於いて、同一の老化プログラムが存在することが強く示唆された。

E1p-11

シロイヌナズナを用いた緑葉の老化に関する
遺伝子の探索

吉田聡子、伊藤正樹、渡邊 昭（東京大・院・理系・生
物科学）

高等植物の緑葉の老化は活発な遺伝子発現を伴う積極的な過程である。様々な環境ストレスが老化を誘導することが知られており、植物にとって緑葉の老化は環境への適応戦略という意義があると考えられる。私達は今回、シロイヌナズナロゼット葉を材料に、老化にともなって発現が上昇する遺伝子をディファレンシャル・ディスプレイPCR法によって探索した。その結果、9つのcDNAクローンを単離した。これらのcDNAは、老化葉で発現が上昇していることがノーザンブロット解析によって確認された。これらのcDNAに対応する遺伝子をyl (yellow leaf specific gene)と名付けた。得られたcDNAの塩基配列を決定したところ、 β -グルコシダーゼやチトクロームP450に相同性もつものや、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼが含まれていた。さらに、yl遺伝子が、暗処理や植物ホルモン処理などの老化誘導処理に対してどのように応答するかを解析した。本大会では、cDNAクローンの単離とその発現パターンの解析について報告する。

E1p-12

藍色細菌の生物時計蛋白質KaiABC間の相互作用
岩崎秀雄、谷口靖人、石浦正寛、近藤孝男（名大院・理・
生命理学）

藍色細菌*Synechococcus* sp. PCC 7942の時計遺伝子クラスター*kai*は三つの連続した遺伝子*kaiA*, *kaiB*, *kaiC*からなる (Ishiura et al, 1998)。我々は酵母two-hybrid系および*in vitro*のアッセイ系を用いて、KaiABC蛋白質が様々な組み合わせで相互作用することを見出した。さらに、KaiABC三成分からなる高次複合体を形成しうること明らかにした。

興味深いことに、多くの時計変異がマッピングされたKaiCではその前半部分CIと後半部分CIIが似ており、重複構造をとっている。CIとCIIは、ともにKaiA, KaiB, KaiCと相互作用したほか、CI-CI間、CI-CII間、CII-CII間でも相互作用が見出された。さらにKaiAとの相互作用に必要な領域を、重複構造上の対応する部分に二カ所同定することに成功した。これらの相互作用はKaiAあるいはKaiC上の複数の時計変異により著しく影響を受けた。

以上の事実は、*kai*遺伝子群にコードされる3種の蛋白質が相互作用し、協調して生物時計の発現に寄与することを強く示唆するものである。

さらに本学会では、古細菌のゲノム中に存在する*kaiC*類似遺伝子産物の解析についても併せて報告する。

E1p-13

藍色細菌*Synechococcus* sp. PCC 7942の概日時計遺伝子群
*kaiABC*のフィードバック制御機構の解析
杵名伸介、近藤孝男、石浦正寛（名古屋大・理・生物）

我々はこれまでに、藍色細菌*Synechococcus* sp. strain PCC 7942の概日時計遺伝子群*kaiABC*の発現が、概日リズムを示し、さらに、KaiA, KaiB, KaiC蛋白質がその制御に関係することを明らかにしてきた。今回、その3つの時計蛋白質の機能を調べるために、*kaiABC*各々の遺伝子破壊と過剰発現を行い、*kai*遺伝子群の遺伝子発現を生物発光レポーターで調べた。*kaiA*, *B*, *C*それぞれを遺伝子破壊すると*kaiA*プロモーター(P_{kaiA})、*kaiBC*プロモーター(P_{kaiBC})由来の生物発光リズムが消失した。このことから、各*kai*遺伝子産物が自身の発現リズムにとって必須であることが示された。一方、*kaiC*遺伝子を大腸菌プロモーター P_{trc} で過剰発現すると、 P_{kaiBC} の転写活性を完全に抑制した。また、*kaiA*を過剰発現すると P_{kaiBC} 活性は上がり、破壊するとリズムが見られなくなると共に、活性が著しく低下した。

これらの結果から、KaiC蛋白質は自身の発現を抑制する機能を持ち、逆にKaiAは、*kaiB*, *kaiC*の発現を促進する機能を持つことが示唆された。KaiA蛋白質が持つ、時計遺伝子の発現活性化機能は、これまでに見つかった時計遺伝子には見られないもので、時計機構を解明する上で重要なものである。我々は、KaiC蛋白質が自身の発現を止め、その後、KaiA蛋白質がKaiB, KaiC蛋白質を再び発現させることが概日時計の振動を作り出していると考えている。

E1p-14

藍色細菌の概日リズムの光による位相変位の作用スペクトル

井上千晶、岡本和久、石浦正寛、近藤孝男
(名古屋大学大学院・理・生命理学)

概日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。この機能により生命は概日時計の位相を環境の昼夜変動に同調させ、より効率のよい生命活動を実現させている。前回我々は原核生物である藍色細菌の概日リズムにおいても、光や温度パルスによる位相変位がみられることを報告した。

今回、我々は藍色細菌の光による位相変位応答の入力系の機構を明らかにするために、その作用スペクトルの解析を行った。材料には指数成長期にある藍色細菌(*Synechococcus* sp. PCC 7942)を用いた。12時間の暗期で同調後、連続明(50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)におき、暗パルスにより大きな位相変位が起こる5時間後に様々な光強度(0.03-40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)、波長を持つ単色光(260-750 nm)を5時間照射してその位相変位を調べた。その結果、殆どの光は、5時間の暗パルスと同様に大きな位相変位(10時間前後)を誘発したが、青色光と赤色光はその位相変位を抑制することが明らかになった。現在さらに詳細な波長依存性を調べ、この位相変位応答機構に関与する光受容体の同定を試みている。

E1p-15

ユーグレナの細胞分裂周期の概日制御

(萩原伸哉、後藤健¹、北大・理・生物、¹帯畜大・教養・生物)

単細胞生物からヒトまで様々な生物の細胞分裂のタイミングは概日リズムを示す。単細胞藻類 ユーグレナ (ミドリムシ) において細胞分裂が1日の特定の時間 (主観的夜又は、光合成能がより低くなる時期) にのみ起こり、その残り半分の時間 (主観的昼) には起こらない事が知られている。

そこで、私たちはそのようなタイミングがどのように制御されているかを、初めて報告する。

私たちは、LD:1、1サイクル、25℃の条件下で、26時間の自由継続周期を示して分裂をしている培養を用いて実験した。フローサイトメトリーにより、3日間、2時間毎に個々の細胞中のDNA含量を測定し、主観的昼の間 (13時間) S₂/M期の細胞集団がその場に止められた状態にあることを見出した。細胞がサーカディアン制御下でない時、S期とG₂/M期の進行に必要な時間はそれぞれ3時間であるので、概日リズムが主観的昼の間、これら2個所の進行を止めているので、私たちは、主観的夜の間のみ細胞分裂が起こると結論づける。

E1p-16

生物時計による葉緑体 $psbD$ 遺伝子の転写制御

中平洋一、椎名隆、豊島喜則 (京大院・人間・環境)

コムギ葉緑体コードの $psbD$ 遺伝子の転写産物量の変化が概日リズムを示すことを見出し、生物時計による葉緑体での遺伝子発現制御の存在を、高等植物において確認した。

明暗周期後、恒明条件 (LL) に移したコムギ芽生えでは、 $psbD$ 転写産物量は早朝に極大、早晩に極小となる概日リズムを示し、このリズムは少なくとも3サイクル継続した。恒暗条件でも、約1.5サイクルの顕著なリズムが検出された。LL条件のコムギ芽生えから経時的に調製した葉緑体抽出物を用いて $psbD$ 遺伝子の転写活性を*in vitro*で測定した結果、活性は周期的な変動を示し、転写産物量の概日リズムが、少なくとも転写段階で制御されていることが分かった。さらに、種々の変異を導入した鋳型DNAについての*in vitro*転写実験から、生物時計による $psbD$ 遺伝子の転写制御に関わる特異的なプロモータ構造の存在が示唆された。

E1p-17

シロイヌナズナの $PnC401$ 相同遺伝子の単離と発現解析
小野公代、小野道之¹、小口太一、鎌田博 (筑波大・生物、¹秋田農短大・生工研)

我々は、光周性花成誘導機構を解析する目的で、アサガオ (*Pharbitis nil* cv. Violet) より、短日性花成誘導条件に特異的な発現を示す遺伝子として $PnC401$ を単離した¹⁾。 $PnC401$ は既知の遺伝子とは同源性が無い。その mRNA は葉に特異的に存在し、短日処理である16時間暗期中に一過性の増加を示し、連続暗期中では日周変動を示す。本研究では、 $PnC401$ の機能等を明らかにする目的でシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) から相同遺伝子を単離して、発現解析等を行った。

シロイヌナズナの EST 中に高い同源性を示すクローンが1個登録されたため、この配列に基づいてシロイヌナズナのゲノムライブラリーより $AtC401$ を単離した。サザン解析の結果、 $AtC401$ はアサガオと同様に1コピーであった。 $AtC401$ の mRNA は地上部のみで検出され、特に花と葉に多く蓄積していた。 $AtC401$ の mRNA の葉における蓄積量は日周変動を示し、そのピークは明期開始から14時間目程度であり、光合成関連の CAB (chlorophyll a/b-binding protein) とは好対照を示した。さらに、アサガオの $PnC401$ とは対照的に、これらの変動は連続明期中では持続したが、連続暗期中では停止した。 RFLP マッピングの結果、 $AtC401$ は第5染色体の上腕に位置した。座位は既報の突然変異体とは一致しなかったが、この領域は花成関連の多くの座位や QTL があり、関係が示唆された。

1) K. Sage-Ono et al., Plant Physiol., in press

E1p-18

シロイヌナズナの germin-like protein 遺伝子の単離と発現解析
小野道之、小野公代¹、小口太一¹、長谷部雅子、徐正君、上田健治、鎌田博¹、井上正保 (秋田農短大・生工研、¹筑波大・生物)

germin-like protein (GLP) は、植物界に広く存在する生理機能が不詳のタンパク質である。アサガオの $PnGLP$ の mRNA は葉に特異的に存在し、短日処理である16時間暗期中に一過性の量的増加を示し、連続暗期中では日周変動を示す。本研究では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から $PnGLP$ の機能等を明らかにする目的で相同遺伝子を単離して、発現解析等を行った。

保存領域の PCR 増幅によって得られたゲノム断片をプローブとして、シロイヌナズナのゲノムライブラリーより2種の遺伝子 $AtGLP1$ (= $ATGER1$ ¹⁾) と $AtGLP2$ (= $ATGER3$ ¹⁾) を単離した。 $PnGLP$ とのアミノ酸配列の同源性はそれぞれ59%と54%であり、サザン解析の結果いずれの遺伝子もゲノムあたり各1コピーであった。 $AtGLP1$ と $AtGLP2$ の mRNA は地上部全ての器官で検出され、特に花と葉に多く蓄積していた。 $AtGLP1$ と $AtGLP2$ の mRNA の葉における蓄積量は日周変動を示し、そのピークは明期開始から約12-16時間であり、CAB とは対照的であった。さらに、短日植物アサガオの $PnGLP$ とは対照的に、これらの変動は連続明期中では持続したが、連続暗期中では停止した。 RFLP マッピングの結果、 $AtGLP1$ と $AtGLP2$ はそれぞれ、第1染色体の下腕、第5染色体の上腕に位置した。座位は既報の突然変異体とは一致しなかったが、 $AtGLP1$ と $AtGLP2$ がアミノ酸配列で64%一致して発現様式も似ていることから、互いに相補するためとも考えられた。 ^{1) Membré et al., (1997)}

E2a-01

暗黒下特異的 発現遺伝子 LEDI-2 cDNA の構造と発現解析

矢崎一史、松岡秀明、佐藤文彦、

Andreas Bechthold¹、田端 守¹

(京大院・農・応用生命、¹京大・薬・生薬)

ムラサキの培養細胞は赤色素シコニンを多量に生産し、植物培養細胞による物質生産系として最初の工業化の例となった。このシコニン生合成は、光により強く抑制されることが知られる。演者らは、光による二次代謝の負の調節機構を解明することを目標とし、subtractive hybridization 法によって暗黒下で強く発現する一連の遺伝子を単離した。それらの内、最も強い暗黒下特異性を示したクローン LEDI-2 は鎖長約 700 bp で 114 個のアミノ酸からなる ORF を有していた。このアミノ酸配列は、植物の根で特異的に発現する ZRP3 や PVR5 等と有意の類似性を示しており、これらと同様に疎水性が高く、膜結合性であることが予想された。ムラサキ細胞におけるその発現は光照射下ではほぼ完全に抑制されることが、暗黒下での mRNA の蓄積パターンはシコニンの生産誘導曲線とほぼパラレルであることが明らかとなった。この遺伝子産物の植物細胞内での機能を解明するため、新たにムラサキの形質転換系を確立し、GUS 遺伝子を用いて機能解析のための基礎知見を得た。

E2a-02

ムラサキ毛状根における LEDI-2 遺伝子の発現と機能解析

松岡秀明、佐藤文彦、矢崎一史

(京大院・農・応用生命科学)

ムラサキ培養細胞におけるシコニン生産は、暗黒下でのみ誘導される。我々は、このシコニン生合成とともに暗黒下特異的に発現する遺伝子 LEDI-2 を単離し、その遺伝子産物とシコニン生産との相関について解析を行っている。今回、本遺伝子の機能解明のため、*Agrobacterium rhizogenes* を介して LEDI-2-antisense 遺伝子をムラサキに導入し、形質転換毛状根を作成した。

まず、培養細胞と同様に培養毛状根においても LEDI-2 の発現が光により強く抑制されることが、及びその発現誘導がシコニン生産の経時変化と類似していることを確認した。得られた antisense クローンのうち、数クローンにおいて LEDI-2 mRNA レベルの低下と、シコニン生産性の低下傾向が認められた。また、根の部位特異的 northern analysis、並びにシコニン蓄積量の検定を行ったところ、シコニン含量の高い毛状根基部において LEDI-2 の mRNA レベルが同様に高いことが明らかとなった。現在、より強力に LEDI-2 の発現を抑制すべく新たなデザインのアントセンスベクターを導入した形質転換毛状根について LEDI-2 mRNA レベルの検定を行っている。さらに、LEDI-2 mRNA の根の組織レベルでの特異的発現部位を詳細に解明するため *in situ* hybridization を行っている。

E2a-03

アサガオのプトレシン合成経路

平澤栄次、吉田泉 (大阪市大・理・生物)

高等植物のプトレシン (1, 4-ジアミノブタン) 合成には 2 種の経路、すなわち①オルニチンが脱炭酸されて直接生成される経路と、②アルギニンが脱炭酸されてアグマチンとなり、次に連続的に加水分解されて N-カルバモイルプトレシンからプトレシンが生成する経路が知られている。動物ではほとんど①であり、バクテリアでは両方の経路が報告されている。高等植物では、1 種の植物に①と②の両方の経路があることが報告されており、なぜ 2 種の経路が存在するかは明らかではない。本研究室では、高等植物の葉でのプトレシンからスベルミジン合成系酵素の光誘導を報告し、この光誘導系ではプトレシン合成は②の経路であり、②の律速酵素のアルギニン脱炭酸酵素が光誘導される。アルギニンから生成されたプトレシンは S-アデノシルメチオン (SAM) の脱炭酸物からアミノプロピル基を受け取り、スベルミジンが生成される。スベルミジン合成の律速酵素である SAM 脱炭酸酵素も光誘導されるが、光照射時の葉のポリアミンの役割は明らかではない。今回、2 種のプトレシン合成経路の役割を明らかにするために、アサガオの各器官のプトレシン合成系酵素活性を調べると共に、環境条件の変化における①と②の酵素活性の変動を検討した。

E2a-04

Spirulina platensis のゲノムライブラリーの作成及びカロチノイド生合成系遺伝子のクローニング

河田悦和、矢野伸一、小嶋洋之 (工技院・大阪工技研)

スピルリナは、糸状体のラン藻の一種で、内陸の高アルカリ湖に自生し、モノカルチャーを形成する。その特徴から商業培養されている数少ない微細藻類の一つであるが、その利用は健康食品などにとどまり、今後の高度利用のために遺伝子レベルでの解析が期待されている。しかしスピルリナは他の糸状体のラン藻類と同じく、多量に多糖類を分泌し、ゲノム DNA 自身も高度にメチル化されているために、ゲノム DNA の精製及びそのライブラリーの作成が困難であった。そこで通常は PCR 産物のクローニングに用いられている TA クローニングベクターを用いて容易にライブラリーの作成が可能であることを見いだした。また、このライブラリーを用いてカロチノイド生合成系遺伝子のうちフィトエン合成酵素遺伝子 (*crtB*) とフィトエン不飽和化遺伝子 (*crtP*) がクローニングできたので報告する。

E2a-05

ケツルアズキ実生からの UDP-ガラクトース：フラボノイド 3-O-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードしている cDNA の単離およびその性質

間藤正美、小関良宏¹、伊藤佳央¹、樋下田大介¹、吉玉國二郎²、寺本進²、間竜太郎、柴田道夫（農水省・野菜茶試、¹東京農工大・工・生命工学、²熊大・理・生物科学）

フラボノイドの配糖体化は花色の多様化およびフラボノイドの安定化に重要な働きをしている。これまでに、UDP-グルコース：フラボノイド 3-O-グルコシルトランスフェラーゼ (UF3GT) および UDP-ラムノース：フラボノイド 3-O-ラムノシルトランスフェラーゼ (RT) をコードしている遺伝子の単離報告はあるがこれら以外のフラボノイド配糖体化酵素をコードする遺伝子の単離報告はない。

我々はケツルアズキ実生より、UDP-ガラクトース：フラボノイド 3-O-ガラクトシルトランスフェラーゼ (UF3GaT) をコードしている cDNA を単離した。この cDNA を大腸菌で発現させ、タンパクを抽出したところ、本酵素タンパクは高い UF3GaT 活性を示した。なお、本酵素タンパクは低い UF3GT 活性も示した。

E2a-06

シネラリアの葉における UDPG:シアニジン 3-O-グルコシルトランスフェラーゼの精製と諸性質
緒方潤、寺本進、吉玉国二郎（熊本大、理、生物科学）

シネラリア (*Senecio × hybrida*) の葉から UDPG: cyanidin 3-O-glucosyltransferase を約 312 倍まで精製した。この酵素の最適 pH は 7.5 であった。また シアニジンと UDPG に対する K_m 値はそれぞれ 0.33 mM と 0.20 mM だった。Sephacryl S-200 で測定したこの酵素の分子量は 52 kDa だった。シアニジン以外のアントシアニンに対する活性は低かったが、フラボノールのケルセチンに対しては、シアニジンの約 48% の活性がみられた。活性は Al^{3+} 及び Zn^{2+} によって促進され、 Mn^{2+} 及び Hg^{2+} によって阻害された。また、活性は PCMB によって阻害され、2-メルカプトエタノールの同時投与によって阻害が打ち消されることから、酵素の活性部位に SH 基の関与が示唆された。この酵素は開花直前の葉で最も高い活性がみられた。

E2a-07

タバコ培養細胞のクマリン取り込み機構の解析
田口悟朗、藤川 忍²、矢澤照義²、林田信明²、下坂 誠¹、岡崎光雄^{1,2}（信州大・遺伝子、²信州大・繊維・応生）

【目的】タバコ培養細胞 Bright Yellow T-13 はクマリンの一種であるスコポレチン生産能を持ち、ホルモンフリーで生育する。この細胞の振盪培養系では、ジャスモン酸メチル処理したときや、細胞が定常期に近づくにつれ、培地中にスコポレチンを放出する。一方、2, 4-D の投与により、培地中のスコポレチンは 12 時間程度で培地中より消失する。この、2, 4-D に惹起されるスコポレチン取り込み現象について検討した。

【結果及び考察】¹⁴C 標識したスコポレチンを作製し、2, 4-D 処理した細胞に投与したところ、スコポレチンは速やかに細胞内に吸収され、スコポリンとして蓄積された。一方、2, 4-D 処理しない細胞では、ほとんど取り込まれなかった。この結果から、2, 4-D 投与後の培地からのスコポレチンの消失は細胞内に取り込まれた結果であること、また、すぐに分解されるのではないことが明らかとなった。

各種阻害剤の実験の結果から、この取り込みはエネルギー依存の輸送であった。また、この 2, 4-D に惹起される取り込み現象は、スコポレチン及び類縁のクマリン類でのみ観察され、ケルセチンやクロロゲン酸などでは起こらなかった。これらのことから、タバコ細胞には 2, 4-D で活性化されるクマリン特異的な輸送システムが存在すると推察される。

E2a-08

フラボノイド合成系の cytochrome P450: (2S)-flavanone 2-hydroxylase と isoflavone 2'-hydroxylase cDNA の同定

明石智義、貫井憲之、青木俊夫、綾部真一（日本大・生物資源・応用生物）

フラボノイド生合成には多くの cytochrome P450 (P450) が関与しているが、一部を除いて酵素タンパクや遺伝子は未同定である。マメ科カンゾウ (*Glycyrrhiza echinata* L.) 培養細胞ではエリシター刺激によりレトロカルコン合成系の P450, licodione synthase (LS) が誘導される。私達は最近数種の P450 cDNA をカンゾウからクローニングした [1]。

本研究ではこれらを真核細胞で発現させ、機能を検討した。その結果 CYP93B1 タンパクが (2S)-フラバノン (liquiritigenin, naringenin) の C-2 位の水酸化反応を触媒した。反応生成物 (licodione, 2-hydroxynaringenin) は酸処理で容易にフラボンに変換され、LS 反応が flavone synthase II の前半の反応と同一でその実体が (2S)-flavanone 2-hydroxylase であることがわかった。また formononetin と daidzein の C-2' 位の水酸化反応を触媒する P450 が得られ、プレロカルパン合成系の isoflavone 2'-hydroxylase であることが明らかになった。

[1] Akashi T et al. (1997) Plant Sci. 126, 39; Plant Physiol. 115, 1288.

E2a-09

茎におけるアントシアニンの蓄積が低下した
ミヤコグサ突然変異体の特質
青木俊夫、川口正代司¹、今泉（安楽）温子²、
綾部真一、赤尾勝一郎²（日本大・生物資源・応用
生物、¹東京大・総合文化、²農水省・生物研）

植物のフラボノイド代謝系は種々の外部環境への
適応において重要な役割をはたしている。本研究で
は、栄養器官でのフラボノイド代謝調節機構を遺伝
学的手法を用いて明らかにすることを目的として、
マメ科植物のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) B-129
'Gifu'系統のアントシアニン生合成変異体を作成し
た。本系統の茎は開花・結実期にシアニン配糖体
により赤く着色し、また幼植物の胚軸も貧栄養状態
で着色することを確かめた。種子のEMS処理により
得られたM2種子1,400粒から無肥料条件で幼植物
を育成し、一ヶ月後に茎の色に着目して個体を選抜
した。茎にアントシアニンが全く蓄積しないものや
僅かに蓄積するものなど数系統が得られた。遺伝解
析の結果、4系統を単因子劣性遺伝の変異体として
同定した。フラボノイド成分組成など各変異体の特
質について報告する予定である。

E2a-10

キクのアントシアニン合成系酵素遺伝子のクローニングと発現解析
菅野善明・千葉貴子・古澤大介¹・肥田一雄・清川繁人¹・鈴木正彦
(青森グリーンバイオ・青森大・工)

キクの花色の分子育種を目的として、アントシアニン合成系酵素
遺伝子のcDNAのクローニングおよび花弁における発現解析を行った。
赤い花弁のキク品種、芳香の花弁由来のcDNAライブラリを作成し、
CHS, CHI, F3H および DFR のクローニングを行った。キク CHS は 389
アミノ酸残基からなり、ブドウ CHS と 84.2% の相同性を示した。ま
た、キク F3H は 364 アミノ酸残基からなり、シロイヌナズナ F3H と
70.9% の相同性を示した。CHI および DFR については全長ではないが、
リンゴ CHI と 61.1%、ガーベラ DFR と 70.7% の相同性を示すクロー
ンがそれぞれ得られた。

花色の異なる 3 品種（赤：芳香、黄：天寿および白：精雲）にお
いて花弁を发育段階によって 5 つのステージ（蕾から満開時まで）
に分け、4 種遺伝子の発現パターンをノザンプロットにより解析し
た。CHS および CHI は 3 品種で同様の発現パターンを示し、ステージ
1 あるいは 2 で発現が最大となり、その後发育段階が進むに連れ減
少した。これに対し、F3H と DFR の 2 つの遺伝子は天寿および精雲
では全ステージを通してほとんど転写産物が認められなかったが、
芳香では全ステージを通して発現し、特にステージ 2 および 3 で強
い発現が見られた。これらの結果から、天寿および精雲では F3H お
よび DFR 遺伝子の転写が誘導されないかあるいは抑制されている可
能性が示唆された。

E2a-11

マルバアサガオのカルコンシンターゼ遺伝子に挿入
された Ac 様トランスポゾンの解析
土生芳樹、久富恵世、飯田滋（基生研）

マルバアサガオ (*Ipomoea purpurea*) には白地
の花弁に有色のキメラ斑を生じる変異体が存在する。
我々はアントシアニン合成経路の酵素をコードする
遺伝子の 1 つ CHS-D のイントロン内に挿入されたト
ランスポゾン Tip100 の脱離が花弁のキメラ斑形成の
原因であることを明らかにした。今回、Tip100 の構
造と転移様式の解析を行った。Tip100 は末端反復配
列 (5'-CAGGGGCGGAG-3') と標的配列の塩基数
(8bp) からトウモロコシの Ac 類縁のトランスポゾ
ンであると推定された。Tip100 の内部にコードされ
るタンパク質の推定アミノ酸配列と Ac ファミリー
のトランスポゾンの転移酵素との間には部分的な相
同性も見いだされた。キメラ斑の出現頻度の高い個
体の体細胞では Tip100 内部および CHS-D 遺伝子内
の様々な位置に Tip100 様因子の新たな挿入が起
きており、Tip100 が近傍および姉妹染色分体間で
転移することを示唆している。

E2a-12

ショ糖と光によるチャ CHS 遺伝子発現誘導
竹内敦子、松元哲（農水省・野菜茶試）

高等植物での糖あるいは光による遺伝子発現制御
は多いが、同時に糖と光が存在した時の発現制御で
は、両者がどう関わるのかあるいは関わないのか
は解明すべき問題である。今までの研究から、両
者の関わりは各遺伝子で異なる予想されるが、光
誘導された発現が糖によって抑制・増強される遺
伝子で関わり方を考えると、糖は光のシグナル伝
達経路中の因子あるいは光による発現制御の活性
化因子に働きかけて抑制・増強するのかもしれない
し、光とは全く別の伝達経路を経て別の制御因子
で発現を制御するのかもしれない。以上のことは、
シグナル伝達、発現制御の機構解明だけでなく、
光は植物には必須であり糖は光合成（炭酸同化）
で合成され植物体内で輸送されることから生理
学的にも重要である。

チャ *Camellia sinensis* の葉において、CHS の遺
伝子発現が、PAL、DFR と同調的に、光およびショ
糖によって誘導され、その誘導は両者の存在でさ
らに増強されることを明らかにしてきた。今回は、
ショ糖と光が CHS 遺伝子発現誘導にどのように働
きかけるのかについて発表する。

E2p-01

アラビドプシスのリポ酸合成酵素 cDNA
のクローニングとそのキャラクターゼーション
安野理恵, 和田 元 (九大・理・生物)

リポ酸はミトコンドリアに存在する酵素複合体(ピルビン酸脱水素酵素、グリシン脱炭酸酵素など)に補酵素として結合している。いずれの酵素複合体も呼吸代謝系において重要な機能を担っており、リポ酸はその活性発現に必要な不可欠である事から、生体内で極めて重要な物質である事がわかっている。しかし、真核生物においてリポ酸が細胞内のどこで、どのように合成されるかについては、ほとんど不明である。

本研究では、アラビドプシスからリポ酸合成酵素をコードした cDNA(LIP1)をクローニングし、そのキャラクターゼーションを行った。LIP1 cDNAには、374 アミノ酸残基からなるタンパク質がコードされており、そのアミノ末端側にはミトコンドリアへの移行シグナルと思われる配列が見出された。また、RT-PCR、ウェスタン分析などの解析から、LIP1 遺伝子は主に葉と花で発現しており、タンパク質も主にこれらの器官に局在することが明らかになった。

E2p-02

葉緑体膜の主要糖脂質合成に関与する MGDG Synthase のゲノム遺伝子の単離および発現
栗井光一郎、下嶋美恵、太田啓之、増田達、高宮達一郎 (東工大・生命理工・生体機構)

我々は最近葉緑体膜主要糖脂質である MGDG の合成を担う酵素、UDP-galactose: diacylglycerol galactosyl transferase (MGDG Synthase) のクローニングに成功したが、今回その発現解析を行うため以下の実験を行ったので報告する。

1) キュウリ MGDG Synthase は光によって活性レベルで誘導されることが明らかとなっているが、今回その遺伝子の発現レベルでの解析を行った。この遺伝子は発現量が少ないため RNase Protection Assay 法により解析した。その結果発現レベルにおいても光によって誘導されるが一過的であり、活性レベルでのプロファイルと異なるということがわかった。このことから転写、翻訳後の活性化機構が存在することが示唆される。

2) 前回大会で報告したシロイヌナズナの MGDG Synthase 遺伝子についてゲノム遺伝子の単離を行った。このゲノム遺伝子は5つのイントロンを含んでおり、そのプロモータ領域には光誘導型遺伝子の上流域に存在することが知られている GATA box、GT1 box が見いだされた。また、サイズより MGDG Synthase cDNA の単離を行い、現在その発現解析を緑色ダイズ培養細胞 SB-P を用いて行っているのもそれについても報告する予定である。

E2p-03

DHA産生好冷性細菌 *Vibrio marinus* MP-1株の
脂肪酸合成酵素遺伝子のクローニング

上野晃生¹、森田直樹²、田中美加²、川崎公誠²、湯本勲²、扇谷悟²、星野保²、石崎絃三²、奥山英登志^{1,2}
(¹北大・地球環境、²工技院・北工研)

一般に細菌において、脂肪酸の *de novo* 合成に関わる遺伝子のいくつかは脂肪酸合成酵素遺伝子群 (*fab* クラスター) を形成しており、その構成遺伝子と各々の遺伝子の並び方はよく保存されている。多価不飽和脂肪酸(PUFA)成分としてドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA) を産生する好冷性海洋細菌 *Vibrio marinus* MP-1株 (以下MP-1株) を用い、脂肪酸の *de novo* 合成に関わる遺伝子のクローニングを試みた。

既知の細菌 *fab* クラスター内で保存性の高い領域を基に作製したプライマーを用いてゲノムPCRを行ったところ、マロニル CoA-ACP トランスアシラーゼ (FabD) と β -ケトアシル-ACP リダクターゼ (FabG) 遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を有する配列を得た。この断片をプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングしたところ、*fabD* の上流には *rpmF*、*plsX* が、*fabG* の下流には *acpP*、*fabF* がそれぞれ存在し、*rpmF*、*plsX*、*fabD*、*fabG*、*acpP*、*fabF* の順番で並んでいた。これは既知の細菌 *fab* クラスターと類似の構造を持っていた。このことからMP-1株には、他の細菌同様、*fab* クラスターが存在すると考えられる。

E2p-04

ゼニゴケ細胞の低温によるC20多価不飽和脂肪酸の増加
猿渡 真、滝尾 進、小野莞爾 (熊本大・理・生物科学)

高等植物では、 α -リノレン酸等の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の増加が低温適応に関与することが知られている。コケ植物は高等植物とは異なり、アラキドン酸(ARA)やエイコサペンタエン酸(EPA)等のC20PUFAをもつ。また、これらの脂肪酸も低温により増加することが報告されているが、その合成機構も機能も不明である。

本研究では、コケ植物の低温適応におけるC20PUFAの役割を知る第一歩として、ゼニゴケ細胞(A18株)の低温培養による脂肪酸組成の変化を調べた。1) 25℃における α -リノレン酸、ARA、EPA含有率(mol%)は、それぞれ17%、9%、3%であった。2) 15℃では、これらのPUFA含有率は増大したが、その他の脂肪酸の含有率は変化が無いか、または低下していた。3) 細胞を葉緑体面分と葉緑体以外の面分に分け脂肪酸組成を調べたところ、ARAとEPAでは低温による含有率の増大は葉緑体面分のみに見られた。4) 両面分の脂質分析において、糖脂質は葉緑体面分のみに、フォスファチジルエタノールアミンは葉緑体外面分のみに、フォスファチジルコリンは両面分に検出された。ARAとEPAは、これらのいずれの脂質にも検出されたが、低温による含有率増大は、葉緑体面分の脂質のみに見られた。以上の結果より、ゼニゴケ細胞の低温条件下におけるC20脂肪酸の高次不飽和化は、おもに葉緑体において活性化されていることが示唆された。

E2p-05

耐塩性タバコ培養細胞の膜脂質組成に関する研究

小林雄二¹、鈴木久美子^{1, 2}、室田憲一³、坂田洋一¹、武長宏¹ (1東京農大・農・農化、2千葉大・園芸、3鳥取大・乾燥地研究センター)

0.2M NaCl添加培地で選抜した光独立栄養性タバコ緑色培養細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) は、無選抜の細胞と比較して脂質含有量および不飽和脂肪酸含有率が高く、また単離チラコイド膜においては、高塩濃度下において光合成活性を維持する。そこで、脂質含有量および不飽和脂肪酸が、高塩濃度下での光合成活性の維持に及ぼす影響を検討するために、選抜、無選抜間のチラコイド膜の脂質組成および脂肪酸組成について比較、検討した。選抜細胞のチラコイド膜は、無選抜に比べてC16:0およびC18:2脂肪酸含有率が低く、C18:3脂肪酸含有率が高い。また、チラコイド膜の脂質組成および各々の脂質分子種の脂肪酸組成においても差異が認められた。このことから、チラコイド膜の脂質組成または不飽和脂肪酸組成の変化が、高濃度の塩に対する光合成活性の維持に関与していることが考えられた。

E2p-06

シロイヌナズナのスフィンゴ脂質の解析
今井博之 (甲南大・理・生物)

グルコセレブロシドは分子内にグルコース、長鎖塩基、2-ヒドロキシ脂肪酸をもつスフィンゴ脂質で、植物の細胞膜脂質の主要な構成成分の一つである。演者らは以前に低温に強い植物の葉のグルコセレブロシドにおいて、不飽和の2-ヒドロキシ脂肪酸を検出し、植物の低温感受性と不飽和脂肪酸との関連性を示唆した(1)。本研究では、シロイヌナズナのロゼット葉よりグルコセレブロシド分離し、構成脂肪酸と構成スフィンゴイドおよび分子種組成を解析した。構成脂肪酸として、2-ヒドロキシテトラコセン酸(24h:1)が最も多く、これは、低温に強いコムギやライムギの脂肪酸組成と類似していた。構成長鎖塩基は4-ヒドロキシ-シス-8-スフィンゲニン[t18:1(8c)]が主要成分であった。以上の結果から、シロイヌナズナのロゼット葉のグルコセレブロシド組成は、低温に強いコムギやライムギの組成(2)とよく似ていた。

(1) H. Imai, M. Ohnishi, M. Kinoshita, M. Kojima and S. Ito (1995) *Bioaci, Biotech. Biochem.*, 59:1309-1313.

(2) H. Imai, M. Ohnishi, K. Hotsubo, M. Kojima and S. Ito (1997) *Bioaci, Biotech. Biochem.*, 61:351-353.

E2p-07

ペプチド性植物細胞増殖因子 (PSK- α) のペラドンナ毛状根の生育とアルカロイド生産に及ぼす影響

佐々木和生、石瀬達晃、小林俊弘¹、松林嘉克²、坂神洋次³、下村謙一郎³、梅津博紀、鎌田博¹ (青森大・工・生物学、¹筑波大・生物、²名大・農・農化、³国立衛研・筑波)

Phytosulfokine (PSK)- α は、アスパラガスの葉肉細胞培養液から単離された5つのアミノ酸残基からなるペプチド性細胞増殖促進因子であり、低密度で細胞培養を行う際に必要なconditioned mediumの主たる因子であると考えられている¹⁾。また、PSK- α は、ニンジン²⁾の不定胚誘導時に促進的に働くなど、いくつかの植物において生理活性があることが示唆されている。

本研究では、ペラドンナより誘導した毛状根に、PSK- α を処理し、その生育とトロパンアルカロイド生産に対する影響を検討した。

毛状根の生育は 10^{-7} ~ 10^{-10} MのPSK- α を投与することによって、ほとんど影響を受けなかった。しかし、トロパンアルカロイドの生産は、 10^{-8} 、 10^{-9} MのPSK- α を投与することによって、コントロールの1.4倍に増加した。このことから、PSK- α が単に細胞増殖を促進するだけではなく、二次代謝産物(ヒヨスチアミン)の生産性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

¹⁾Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7623

E2p-08

二酸化炭素リサイクル系を付与した組み換えラン藻によるエチレンの生産
小川隆平、坂井美穂、松岡正佳、福田秀雄 (熊本工大・工・応用微生物)

我々は細菌*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2のエチレン生成酵素(EFE)を発現する組み換えラン藻*Synechococcus* sp. PCC7942を用いて、二酸化炭素のエチレンへの変換について研究を行って来ている。細菌のEFEは2-オキソグルタル酸→エチレン+3CO₂の反応を触媒するので、TCA回路中間体が奪われ、かつCO₂が無駄に放出されることになる。そこで、CO₂固定系として、大腸菌のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)遺伝子および大腸菌炭酸脱水酵素(CA)遺伝子をシャトルベクターpUC303に連結したプラスミドを作成し、組み換えラン藻PCC7942-IEK2-2を形質転換した。なお、PCC7942-IEK2-2株はPCC7942 R2-SPcの染色体の光化学系IIの*psbAI*遺伝子のORFをEFE遺伝子のORFとカナマイシン耐性遺伝子に置換した株である。得られたそれぞれの形質転換ラン藻のCO₂固定能、増殖速度、エチレン生成速度について報告する。本研究は独創的産業技術研究開発促進事業(NEDO)の助成を受けた。

E2p-09

各種薬用植物に含まれるメラトニン様物質とマリーゴールドにおけるイオントラップ型液体クロマトグラフ質量分析法によるメラトニンの同定

服部淳彦, 宮内大治, 和田勝, 伊藤茂¹, 伊藤正則²
(東京医科歯科大・教養・生物, ¹医用器材研, ²聖マリアンナ医大・化学)

我々は最近、脊椎動物の松果体ホルモンであるメラトニンが、各種食用植物に存在することをラジオイムノアッセイ (RIA), ラジオレセプターアッセイ (RRA) および高速液体クロマトグラフィーの手法を用いて明らかにした。本研究では、まず17種の薬用植物において、メラトニン様物質がどれくらい含まれているかをRIAおよびRRA法により検索した。その結果、マリーゴールド、ストローフラワー、クローブなどに比較的高濃度に含まれていることが明らかとなった。次に、マリーゴールドにおいて、メラトニン分子そのものが存在することを確認するために、イオントラップ型液体クロマトグラフ質量分析計を用いて測定した結果、メラトニンの溶出位置にメラトニン由来と推定される m/z 174 と m/z 216 の開裂イオンが検出された。

E2p-10

イネ-Rhizoctonia solani 相互作用によってイネの根より放出される物質による *R. solani* の IAA 合成量の増大

古川聡子 庄野邦彦¹ (都立短大・化学, ¹東大大学院・広域科学)

我々はこれまでに糸状菌の *Rhizoctonia solani* が IAA を産生すること、その主な生合成経路がインドールピルビン酸経路であること、そしてその生合成量がイネ懸濁培養細胞 (Oc) の培養液中の物質によって増大することを明らかにした。

今回我々は、イネ (コシヒカリ) の根と *R. solani* を共存させることによってイネから放出される物質が、*R. solani* の IAA 産生を増大させることを見出した。その物質は分子量約三万で、タンパク質もしくは関連の物質と思われる。IAA 量増大の割合は、培養液を与えた系の場合より大きく、早い時期からその蓄積が検出された。また、市販の多糖分解酵素の中に上記と同様の作用を示すものが存在する事も分かった。なおこの系において、トリプトフォールも IAA より約 12 時間遅れて蓄積が増大してくることもわかった。

E2p-11

ダイズ種子 β -コングリシニンの集積制御に及ぼす窒素欠乏と植物ホルモンレベルの関係
大竹憲邦・佐藤明世・大山卓爾 (新大, 農, 応生)

根粒非着生系統ダイズ T201 を用い、窒素供給量が種子の内性ホルモン濃度と貯蔵タンパク質集積に及ぼす影響を調査した。窒素欠乏植物では種子発育中期から後期に種子に ABA が高濃度に集積するとともに β -コングリシニンの β -サブユニットの集積が抑制された。窒素欠乏植物の種子中では発育初期から中期に IAA も高濃度に存在していた。未熟子葉の液体培養系に添加した ABA に対する応答性を調べたところ、窒素欠乏の植物から得た種子では ABA による β -サブユニットの集積抑制効果を示したが、十分に窒素を与えた植物から分離した種子では ABA の β -サブユニット抑制効果は見られなかった。未熟子葉に対して 2, 4-D を投与するとタンパク質の集積が抑制され、特に β -サブユニットが抑制された。従って、窒素欠乏ダイズの種子では正常な種子と比べて ABA, IAA 濃度が高くなるとともに β -サブユニット集積に対する応答性も異なっていた。

E3a-01

ニンジン毛状根における Ca^{2+} 依存性のタンパク質燐酸化
加藤良二, 奥山かおり, 鎌田博¹
(山形大・教育・生物, ¹筑波大・生物)

ニンジン毛状根を破碎・遠心操作 (85 K xg) し、得られた上清を Centricon で濃縮・脱塩した (可溶性分画)。それに [³²P]-ATP を加えて、1mM EGTA, 1mM Ca^{2+} 又は 1mM Ca^{2+} + 800nM Calmodulin 存在下でそれぞれ Incubate し、in vitro のタンパク質燐酸化反応を行わせた。そして、SDS-PAGE 及び Autoradiography にかけた。結果は、 Ca^{2+} 依存性の燐酸化反応によって、65, 57.5 及び 52kd のタンパク質が燐酸化されていた。また、同様にして得た可溶性分画に 100 μ M の濃度に W-7 又は W-5 を加えて Incubate し、タンパク質燐酸化反応を行った。W-7 は3種のタンパク質の燐酸化を強く阻害したのに対し、W-5 はそれらの燐酸化を阻害しなかった。次に、4, 16 又は 25 °C 下で毛状根の先端切片を培養した後、それらから可溶性分画を調整してタンパク質燐酸化反応を行った。結果は、高い温度下で培養した毛状根ほど、即ちその生長率の大きいものほど、3種のタンパク質の燐酸化の程度が高くなった。更に、毛状根の先端切片を、各濃度の W-7, W-5 又は TMB-8 を含む培地上でそれぞれ培養した。30 μ M の W-7 は毛状根の生長を強く阻害したのに対し、100 μ M の W-5 はその生長を僅かに阻害した。また、10⁻⁵M 以上の濃度の TMB-8 はその生長を阻害した。以上の結果から、 Ca^{2+} 依存性の燐酸化反応による 65, 57.5 及び 52kd のタンパク質の燐酸化が、毛状根の生長に深く関わっていると結論づけられる。

E3a-02

タバコの若い葉や茎に存在する糖誘導性 Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ

岩田由紀子¹, 栗山雅光¹, 大藤雅章², 中村研三^{1,2} (1 名古屋大・生命農・生
化, 2 基生研・発生物)

我々は先に、タバコ葉でのシヨ軸による遺伝子発現の誘導には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ (CDPK) が関与している可能性を示した。また、タバコ葉には少なくとも8種類の CDPK mRNA が発現していることを cDNA 断片の解析から明らかにしている。シヨ軸による遺伝子発現の誘導への CDPK の関与を解析するために、mRNA レベルで糖誘導性が見られたタバコ CDPK 断片の GST との融合タンパク質に対する抗体 (抗 NICDPK08 抗体) を作成した。

抗 NICDPK08 抗体と反応したいくつかのタバコタンパク質のうち、見かけの分子量 57kDa の可溶性タンパク質は若い葉に多量に存在するが、葉の齢が進むにつれて著しく減少する特徴を示した。茎においても 57kDa タンパク質は、成長点に近い茎でより多量に存在し、下部の茎では減少していた。これらの結果から、57kDa タンパク質は若い組織で特異的に蓄積していると考えられる。

57kDa タンパク質は、成熟したタバコ葉では若い葉に比べて著しく減少しているが、切り取った成熟葉にシヨ軸・グルコース・フルクトースなどの代謝可能な糖を与えると増加した。しかし、マンニトールやソルビトールなどを与えた場合には増加は見られなかった。更に、切り取り葉にそれぞれシヨ軸・マンニトール・水を与え 57kDa タンパク質レベルの経時的変化を調べたところ、マンニトールや水で処理した場合には、57kDa タンパク質は 24 時間後にわずかに増加したが、シヨ軸で処理した場合、6 時間後にはすでに 57kDa タンパク質の蓄積が見られた。 β -amylase:GUS 融合遺伝子を導入したトランスジェニックタバコでは、種々の糖による GUS 活性の誘導と 57kDa タンパク質の増加は、よく相関していた。これらの結果から、57kDa タンパク質は糖誘導性の CDPK であり、シヨ軸シグナルの伝達、シヨ軸の転流を受ける若い組織 (シンク) の成長・発達に何らかの役割を担っている可能性があると考え、更なる解析を進めている。

E3a-03

糖負荷によるタバコ培養細胞 $[Ca^{2+}]_c$ の上昇とプロテインキナーゼ活性化

武藤尚志 (名古屋大・生物分子応答研究センター, 大学院生命農学研究科)

アポエクオリンを発現するタバコ培養細胞 BY-2 の細胞膜質にカルシウム依存性発光蛋白質エクオリンを構成させ、糖を負荷した際の $[Ca^{2+}]_c$ 上昇を観察した。対数増殖期の細胞では、高濃度の糖を与えても $[Ca^{2+}]_c$ 上昇は観察されなかったが、定常増殖期の細胞では高濃度の糖によって $[Ca^{2+}]_c$ 上昇が起こった。対数増殖期の細胞でも蔗糖を除いた培地で一夜培養し、蔗糖飢餓状態にすると糖による $[Ca^{2+}]_c$ 上昇が観察されるようになった。シンク的状態の細胞が糖にตอบสนองすることを示しているように見える。糖誘導の $[Ca^{2+}]_c$ 上昇は培地中の Ca^{2+} を除くと起こらず、 La^{3+} によって阻害された。これらのことは $[Ca^{2+}]_c$ 上昇は細胞外の Ca^{2+} がカルシウムチャネルを通して流入したことを示唆している。プロテインキナーゼ阻害剤 K-252a やスタウロsporin は糖による $[Ca^{2+}]_c$ 上昇を阻害した。また、インゲルアッセイによりプロテインキナーゼ活性上昇が示された。

E3a-04

キュウリ芽ばえの重力形態形成時における遺伝子発現の解析
藤井伸治, 高橋秀幸 (東北大学・遺伝生態研究センター)

ウリ科植物のベグ形成およびフック形成は、重力によって制御される重力形態形成である。これらの重力形態形成にはオーキシンおよびエチレンが重要な役割を果たしている可能性を示してきた。そこで、キュウリ芽ばえの重力形態形成におけるオーキシンおよびエチレンの作用を明らかにするため、オーキシンによって発現が制御される *Aux/IAA* 遺伝子群、ならびにエチレン受容体 (*ETR1*) 様遺伝子の単離と発現解析を行った。

キュウリ芽ばえから得られた *Aux/IAA* 遺伝子群のうち、ダイズの *Aux22* 遺伝子とコード領域において推定アミノ酸配列で 46% の相同性を示す *CsAux22* については、オーキシン飢餓処理によってその mRNA 量が減少し、オーキシン処理によって mRNA 量が顕著に増加した。この mRNA 量の変動を芽ばえの発育段階を追って検討した結果、ベグおよびフック形成が開始される吸水 24 時間後の胚軸において発現が認められた。その後、吸水 36 時間後、48 時間後の芽ばえでは発現が減少し、吸水 72 時間後の伸長している胚軸において再び mRNA の顕著な蓄積が認められた。また、キュウリから 2 種 (9-12, 9-10) のエチレン受容体 (*ETR1*) 様遺伝子を単離して解析した結果、9-12 は、アラビドプシスの *ETR1* に対し推定アミノ酸配列で 81% の相同性を示し、原核生物の環境応答を担う 2 成分制御系として知られているヒスチジンキナーゼ及びレシーバードメインに類似した領域を有していた。一方、9-10 は、アラビドプシスの *ERS1* に対しコード領域において推定アミノ酸配列で 70% の相同性を示し、その C 末端側にはヒスチジンキナーゼに類似した領域が存在していたが、レシーバードメインに類似した領域を欠いていた。現在、これらの遺伝子発現とベグ・フック形成との関係を解析しているため、それについても報告する。

E3a-05

キュウリ芽ばえのベグ形成と細胞骨格の関係
小林真由美¹, 村田 隆¹, 藤井伸治¹, 東谷篤志¹,
高橋秀幸¹ (1 東北大・遺生研, 2 東大・総合文化研究科)

ウリ科植物の芽ばえのベグ (peg) は、重力形態形成として下胚軸基部の皮層細胞の成長極性が変化して形成される突起状組織である。本研究では、ベグ形成と細胞骨格の関係について解析をおこなった。

ベグが形成された吸水 36 時間後のキュウリ芽ばえでは、ベグ細胞およびベグ化しない皮層細胞の表層微小管が、細胞の伸長方向に対して鉛直方向に配向していた。コルヒチン処理により、ベグ形成が阻害され、表層微小管が崩壊し、皮層細胞の形状が丸くなるのがみとめられた。ベグ形成が肉眼的にみとめられる直前の吸水 24 時間後の芽ばえでは、ベグ形成部位における皮層細胞の成長極性の変化がみとめられる以前に、表層微小管の配向が変化していることがわかった。したがって、ベグ形成時の皮層細胞の伸長方向の変化には、表層微小管の配向の変化が必要であると考えられた。一方、サイトカラシン D の処理によってもベグ形成が抑制され、ベグ形成におけるアクチンミクロフィラメントの関与も示唆された。

E3a-06

疑似微少重力下におけるサクラの成長 I

佐々奈緒美、黒岩英里子、山下雅道¹、山田昇弘²、中村輝子
(日本女子大・理、¹宇宙研、²放送大)

本研究では、3-Dクリノスタットを用いた疑似微少重力下におけるサクラ (*Prunus jamasakura*) の成長、および疑似微少重力下でのジベレリンの作用についての実験を行ったので報告する。

疑似微少重力下で生育させたサクラでは茎の伸長および葉面積が増大した。茎での木部幅は減少し、樹皮および髓幅は増大した。木部では、繊維細胞二次細胞壁のセルロース微細繊維傾角およびセルロース含量比が増加し、茎は屈曲した。これらの結果から、伸長成長および木部の二次肥大成長は重力に大きく依存していることが示唆された。これまでに、地上で重力に反応できないサクラのしだれ性枝にジベレリンを与えると、しだれが直り、枝が上方成長することが明らかになっており、ジベレリンが重力刺激伝達に関与することが示唆されている。そこで、疑似微少重力下で生育しているサクラにジベレリンを投与し、その作用についても調べた。疑似微少重力下で生育しているサクラではジベレリン投与による伸長促進効果は対照と同様に認められた。しかし木部の二次肥大成長においては、対照に見られるようなジベレリンによる木部幅の増加は認められなかった。これらの結果から、重力刺激がなくてはジベレリンによる木部の発達促進がおこなないことが示唆された。

E3a-07

根の重力屈性の信号伝達系における IAA の可逆的な代謝反応

鈴木 隆、高橋宏之、小野美和子 (山形大・教育)

我々は、トウモロコシの光依存性重力屈性の信号伝達系に、根冠アポプラストにおける H^+ と Ca^{2+} の交換反応が関わっている可能性や組織間伝達物質として拡散性 IAA が関与していることを報告した。しかし、根冠における拡散性 IAA 含量が非常に少ないことから、我々は、重力信号伝達系に根冠における可逆的な IAA の代謝反応 (結合型 \leftrightarrow 拡散型) の存在を考えている。本研究は、この点を明らかにするため、トウモロコシ (Golden Cross Bantam 70) の一次根を用い、根端の結合性 IAA の動向に及ぼす重力刺激の影響を調べた。根端切片 (0-1, 1-2, 2-3 mm) を材料とし、各切片より分画した細胞壁をアルカリ処理し、抽出される IAA を結合性 IAA としてジクロロメタンで分画後、インドロー α -パイロン法と蛍光検出フローインジェクション分析法を組み合わせた系で定量した。結合性 IAA 量は、0-1mm 切片でのみ重力刺激 20 分後に最下点を持つ一過性の変化を示した。この結果や、この変化に及ぼす Ca^{2+} の影響などを基に、重力屈性の信号伝達系における IAA の可逆的な代謝反応の関与の可能性を考察する。

E3a-08

ヤナギのループ処理枝におけるあて材誘導

森美穂、古澤治*、船田良*、中村輝子
(日本女子大・理、*北海道大・農)

すでにシダレヤナギ (*Salix babylonica*) において、サクラ属のしだれ性枝におけると同様に、ジベレリン処理により、枝幅増加および木部繊維細胞の物理的・化学的性質の変化が生じ、あて材が誘導され、負の重力屈性が発現することを報告した。本研究では、枝をループ状に曲げて、その木部組織の変化を解析し、あて材誘導につき検討を行った。

挿し木の当年枝を植物材料として用いた。約 300mm の枝をループ状に曲げて固定した。組織化学的分析、細胞壁成分の定量およびセルロースマイクロフィブリル (MFs) 傾角の測定によりあて材形成を確認した。

二次細胞壁の MFs および表層微小管については、走査電子顕微鏡および共焦点レーザー走査顕微鏡を用いてさらに解析を行った。

また、3D-クリノスタットによる疑似微少重力環境下で培養した枝の木部組織についての解析も行った。

E3a-09

管状要素分化における自己分解 (I)

in vitro で形成された管状要素における穿孔の存在と位置に関する新事実—
中島 仁、高部圭司¹、藤田 稔¹、福田裕穂

(東京大院・理・生物科学、¹京都大院・農・森林科学)

穿孔とは接続した 2 つの道管要素の間の細胞壁が分化の過程で全面あるいは部分的に消失して生じた孔 (あな) をいう。これらは維管束植物が通水機能を確保するために必要不可欠なものであり、道管要素の組織構造学的特徴ともなっている。ヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans* L.) 単離葉肉細胞の管状要素への分化誘導系では管状要素は自己分解過程の最終段階で核を含む一切の細胞内容を消失する。分化開始より 6 時間毎の細胞を回収し、細胞内側からの観察を可能とするため凍結マイクロームで切断片を作製して走査電子顕微鏡観察した。最終的な分化率は 54% で、培養各段階毎に約 100 個の細胞を観察した結果、せん孔はほぼ全ての管状要素が細胞内容を失う培養 72 時間目以降の管状要素のみに存在することが示唆された。それらのせん孔は細胞長軸末端部のいずれか一方のみの一次壁部分に単せん孔状あるいは篩状に観察された。分裂後にその娘細胞のいずれもが管状要素へと分化した細胞では互いに隣接する細胞壁の一次壁部分と、そこから丁度反対側に位置するどちらか一方の細胞の細胞長軸末端部の一次壁部分にせん孔が観察された。この培養系では管状要素がたとえ単細胞であっても道管要素の特徴を有している点で非常に興味深い。これらのせん孔が細胞末端部のほぼ決まった位置に開くという観察結果はさらに興味深い。とりわけ分裂後に分化した管状要素でのせん孔の位置は細胞間相互作用の存在に加えて細胞の極性をも示唆する重要な知見である。

F1a-01

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 のイソクエン酸リアーゼ遺伝子の解析

井寺 修一, 松岡 正佳, 小川 隆平 (熊本工大・工・応用微生物)

イソクエン酸リアーゼ (ICL) はリンゴ酸合成酵素と共にグリオキシル酸経路を構成し、脂肪酸の分解で生成するアセチル CoA の代謝に関与する。ICL をコードする遺伝子は細菌や植物を含む多種類の生物に見出されるが、ゲノム配列が完全に知られたラン藻株 *Synechocystis* sp. PCC6803 には同定されていない。私達は他種のラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 に少なくとも 3 種類の ICL ホモログの遺伝子があることを PCR と Southern 分析から見出した。ICL1-3 遺伝子と名づけた 3 つの遺伝子はコード領域内に I-IV のアミノ酸保存領域を含んでいた。さらに pUC303 を保持する *Synechococcus* sp. PCC7942 株を光独立栄養条件下 0.4-0.8% エタノールを含む BG-11 培地で培養したとき、細胞内に ICL 活性が検出されることより、PCC7942 株では C2 化合物の代謝に ICL が関与していることが示唆された。

F1a-02

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の解析

河津 維, 寺本真紀¹, 伊藤正樹, 渡邊 昭 (東大・院・理・生物科学, ¹海洋バイオテクノロジー研究所)

生物は、必要なエネルギーを恒常的かつ安定に得るために、細胞内の解糖と糖新生の方向を調整する。その方向を決める因子として、フルクトース-2,6-ビスフォスフェートが知られている。この物質はフルクトース-6-フォスフェート 2-キナーゼにより合成され、フルクトース-2,6-ビスフォスファターゼにより分解され、細胞内濃度が調整される。この 2 つの活性をあわせ持つ二機能性酵素フルクトース-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をコードすると推定される cDNA を、高等植物で初めてシロイヌナズナからディファレンシャルディスプレイ RT-PCR 法を用いて得、*fkfbp* と名付けた。*fkfbp* 遺伝子はゲノム中に 1 コピーしか存在せず、またその転写は暗処理ならびにそれに伴う糖飢餓により誘導された。これらのことは *fkfbp* が細胞内で酵素として働き糖レベルの調整をしている可能性を示唆している。現在、その酵素活性の測定を含めた生理学的解析を行っている。

F1a-03

サツマイモ L-ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼ cDNA のクローニング

今井 剛, 荻田 修一¹, 白鳥 元一, 布目 司, 平井 正志, 大羽 和子² (野菜・茶試, ¹三重大・遺伝子, ²名古屋女子大)

植物におけるアスコルビン酸合成経路は未解明であるが、L-ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼ (EC1.3.2.3, GLDHase) が生成の最終反応を触媒する key 酵素であると推定されている。サツマイモ塊根より精製した GLDHase を V8 プロテアーゼ処理し、4 種のペプチド断片を得、これらの N-末端アミノ酸配列を決定した。これに基づく混合プライマーのうち S3B+A1D により増幅された 0.8 kb 断片は、動物のアスコルビン酸合成の最終反応を触媒する グロノラクトンオキシダーゼ (EC1.1.3.8, GLO) の一部と推定アミノ酸配列で 29% 一致した。RACE 法により 5' 上流 0.66 kb, 3' 下流 0.85 kb の塩基配列を決定した。開始コドン上流および終止コドン下流の配列より設計したプライマーにより増幅された 2.1 kb 断片は、581 アミノ酸よりなる 66 kDa タンパク質 (GLO との相同性: 22%) をコードしており、精製酵素の部分アミノ酸配列 4 種を含むことから GLDHase をコードする cDNA であると結論した。

F1a-04

cDNA CLONING OF ALTERNATIVE OXIDASE FROM CULTURED CELLS OF *Catharanthus roseus*.

Seiichiro KIYOTA, Katsuhiko Sakano. Lab. of Stress Physiology, Dep. of Plant Physiology, Natl. Inst. of Agrobiological Resources, Tsukuba, Japan.

We isolated cDNA clones of alternative oxidase (AOX) from cultured cells of *Catharanthus roseus*. We constructed cDNA library from mRNA isolated from 3-day-old cells. Oligonucleotides for PCR, primers were designed on the basis of nucleotide sequences of tobacco AOX (Vanlerbergh and McIntosh, 1994, S71335). The PCR product was used as probe for screening. We sequenced several clones of many candidates of AOX screened and found all the nucleotide sequences that we sequenced were identical. The sequence has high homology to AOX of other plants.

Result of RT-PCR indicated that AOX was expressed at similar level during 1 to 7 days after transfer to new medium.

AOX of soybean (Finnegan et al, 1997 Plant Physiol. 114:455-466) and *Arabidopsis* (Saisho et al, 1997 Plant Molecular Biology 35:585-596) have been reported to be encoded as multigene family. DNA blotting with the same probe indicated that several isozymes also exist in *Catharanthus*. However, identical sequence of all the isolated AOX and the steady expression during culture suggests that only one of the isozymes of AOX is expressed in the culture of *Catharanthus*.

F1a-05

冬小麦培養細胞においてアブシジン酸により誘導される分泌タンパク質 WAS-2 の遺伝子クローニング

桑原 慎子、竹澤 大輔、荒川 圭太、吉田 静夫
(北大・低温研)

冬小麦培養細胞 (*Triticum aestivum* L. cv Chihokukomugi) は、ABA 処理によって培地中に 16~120kDa の塩基性タンパク質 (wheat ABA-induced secretory proteins ; WAS proteins) を新たに蓄積することが明らかとなった。主要なタンパク質成分のひとつである WAS-2 は、分子量が 25kDa で強塩基性であった。また、N 末端 20 残基におけるアミノ酸配列から、小麦のウドンコ病を防止する薬剤 (BTH) 処理によって誘導される WCI-5 遺伝子の翻訳産物と相同性があり、WAS-2 は耐病性に関与するタンパク質であることが示唆された。さらに、cDNA クローンの単離を行い、その発現様式について検討したところ、WAS-2 は ABA 及び NaCl 処理により mRNA が顕著に増加することが確認された。

F1a-06

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*) の解析
千葉由佳子、木嶋文子、石川真理、Thomas Leustek¹、Roger Wallsgrrove²、南原英司、内藤 哲(北大・農・応用生命科学、Cen. Agric. Mol. Biol., Rutgers Univ.¹、AFRC Inst. Arable Crop Res.²)

我々は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*) を用いて、メチオニン合成制御機構に関する知見を得ることを目的とした研究を進めている。これまでに、メチオニンの生合成に関わる酵素のひとつである Cystathionine γ -synthase (CGS) をコードする遺伝子の mRNA 量が *mtol-1* 変異株では増加していることが分かった。また、野生型株では CGS 遺伝子の mRNA 量が外施メチオニンによって抑えられるのに対し、*mtol-1* 変異株では影響が見られなかった。以上の結果から野生型株にはメチオニンが何らかのシグナルとなって CGS 遺伝子の mRNA レベルを抑える機構が存在し、*mtol-1* 変異株ではその機構が働かないために遊離メチオニンがかように蓄積するものと考えられる。一方、*mtol* 変異と CGS 遺伝子がともに第3染色体の上端に位置していることがわかり、この結果を考慮して CGS 遺伝子の塩基配列を野生型株と *mtol-1* 変異株と比較した。その結果も併せて報告する。

F1a-07

タバコ培養細胞の分泌タンパク質の同定と特徴づけ
奥島葉子、小泉 望、草野友延、佐野 浩
(奈良先端大・遺伝子教育研究センター)

私たちは、タバコ BY-2 培養細胞を材料として用い、植物細胞からの新規分泌タンパク質の検索を行っている。前回は培養液に分泌された分子量 38 および 40kDa のペルオキシダーゼの同定について報告した。今回、新たに同定した分子量が 65 および 30kDa のタンパク質について報告する。これらのタンパク質について、相当する cDNA を単離したところ、予想されるアミノ酸配列は、それぞれエキソグルカナーゼ (オオムギ) と WCI-5 (コムギ) に 75% と 50% の相同性を示すことが判明した。エキソグルカナーゼ遺伝子のタバコ植物体での組織特異性を調べたところ、各組織で恒常的な発現がみられた。WCI-5 遺伝子は当初 BTH で誘導される遺伝子群の一つとして同定されたものだが、私たちはタバコ WCI-5 ホモログ遺伝子が傷害ストレスに応答し、葉で mRNA が蓄積することを確認した。

現在、各遺伝子の発現様式について、さらに解析を行っている。

F1a-08

アサガオとマルバアサガオの *DFR* 遺伝子領域のゲノム構造について
稲垣善茂、久富恵世、森友子、小関良宏¹、飯田滋 (基生研、¹農工大・工・生命)

アントシアニン生合成系路の酵素 Dihydroflavonol 4-reductase をコードする *DFR* 遺伝子は、アサガオとマルバアサガオのゲノム上では、*DFR-A*、*DFR-B*、*DFR-C*、の3つの遺伝子がタンデムに並んでいて、その内の真ん中に位置する *DFR-B* 遺伝子が、花や茎、葉などで色素合成に関わる遺伝子である。

今回、アサガオの 17 kb にわたる *DFR* 遺伝子領域の全塩基配列を決定した。その結果、3つの遺伝子のいずれもが6つのエキソンより構成され、プロモーターやターミネーターと考えられる配列も存在した。また、マルバアサガオの *DFR* 遺伝子領域のゲノム構造についても現在解析中であるが、現在までに得られた結果は、アサガオとマルバアサガオの種分化が起る以前に非相同的組換えにより3コピーの *DFR* 遺伝子がタンデムに並んだ構造となり、その後挿入や欠失を含む多様化を起ったことを示唆していた。

F1a-09

イネ科植物の進化におけるWx遺伝子のイントロンの欠失

平野博之, 卯春学, 山口雪子¹, 荻原保成², 佐野芳雄³ (東大・農, ¹岡山大・資生研, ²横浜市大・木原生研, ³北大・農)

イネやトウモロコシのWx遺伝子は14個のエクソンと13個のイントロンから構成されているが、オオムギのWx遺伝子では第5および第8番のイントロンが存在しない。一方、双子葉植物におけるWx遺伝子に相当するジャガイモのGBSS遺伝子ではこれらのイントロンが含まれている。このことは、オオムギが他のイネ科植物から分岐した進化過程で第5および第8のイントロンが欠失したことを示唆している。進化の過程でこれらのイントロンがいつ欠失したのか、またどの程度頻繁にイントロンの欠失が起こるのかを明らかにする目的で、新たに6種のイネ科植物のWx遺伝子の塩基配列を決定し、進化系統樹を作製するとともにイントロンの有無を検討した。その結果、イネ科の進化過程でイントロンの欠失が少なくとも4回起こっていることが示され、イントロンが頻繁に欠失することが示唆された。

F1a-10

好熱好酸性原始紅藻の硫酸同化系酵素SAT, OASTLの分子細胞学的研究

戸田恭子、高野博嘉、黒岩常祥 (東京大・理学系・生物科学)

植物や微生物は、硫酸イオンをとりこみ、セリンからシステインを合成する硫酸同化という機能を持つ。システイン合成に関わるセリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) と、OASチオールライエース (OASTL) には高等植物では3つのイソタイプがあり、2つの酵素活性は、葉緑体、ミトコンドリア、細胞質の3分画で検出される (Saito, *et al.*, 1996)。しかし、遺伝子がどのイソタイプをコードし、遺伝子の発現制御がどの分画の活性と関るのか、各遺伝子がゲノム上のどこに位置するのか、明らかでない。

好熱好酸性原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* は、細胞内に、核、葉緑体とミトコンドリアを一つずつ持ち、ゲノムサイズは14 Mbpと植物の中では最小のもの1つで、タンパク質の局在や、ゲノミックDNAの解析に適している。この紅藻は420 kbpから2050 kbpの17本の染色体を持ち、最小の1番染色体には、葉緑体に存在するSATの遺伝子がコードされている (Toda, *et al.*, 1998)。そこで、OASTL遺伝子の存在およびSAT遺伝子とのゲノム上の関係を調べ、両遺伝子のイソタイプを探索した。一番染色体DNAを鋳型にして、ディジェネレートPCRを行った結果、OASTL遺伝子を検出した。現在、一番染色体を8塩基認識酵素で切断し、この2つの遺伝子の位置関係を調べている。また、ゲノミックDNAを用いたディジェネレートPCRで、SAT遺伝子とOASTL遺伝子には少なくとももう一つのイソタイプがあることがわかった。

F1p-01

MATベクターの改良と植物への遺伝子導入

杉田耕一、松永悦子、遠藤さおり、笠原健秀、海老沼宏安

(日本製紙・中央研)

*ipt*型MATベクターは、アグロバクテリウムの*ipt*遺伝子と、それを除去するための酵母部位特異的組換えR/RS系から構成されている。*ipt*遺伝子はサイトカイニンの過剰生産を引き起こし、頂芽優性を消失した多芽体を形成する。*ipt*型MATベクターでは、第一に多芽体形成を標識に遺伝子導入組織を選抜し、第二にR/RS系により*ipt*遺伝子が消失し正常に伸長発根したマーカーフリー形質転換体を得られる。初期の*ipt*型MATベクターでは、*ipt*遺伝子と組換え酵素R遺伝子発現のためCaMV 35Sプロモーターを用いていた。本発表では、両者のプロモーターを置換し、不定芽分化効率・多芽体形成効率・マーカーフリー出現効率を比較検討した結果を報告する。また、選抜マーカーとして用いた*ipt*遺伝子は、再分化効率を向上させるという優れた性質があることも合わせて報告する。

F1p-02

カンキツ液胞型H⁺-ATPase A, B, c subunit 遺伝子の発現解析及び果実における酵素活性の測定

山本浩¹、小山和彦¹、小松晃²、高野倉裕子¹、大村三男²、秋濱友也¹ (1. 明治大・農, 2. 果樹試カンキツ部)

育種上、重要な形質の一つである甘みに着目し、糖代謝・糖蓄積関連酵素遺伝子群の解析を行っている。葉で合成された大部分の糖はスクロースとして転流し、砂じょうの液胞内へ蓄積するとされている。その際、プロトン勾配を作ることで2次的に糖を液胞内へ導くのが液胞型H⁺-ATPaseと液胞膜H⁺-PPaseであると考えられている。

本研究において、植物間で比較的広く同定・解析されているA, B, c subunit 遺伝子を果実由来cDNAライブラリーより単離し、ノーザンブロット解析により各subunit遺伝子間にて器官・時期における発現の違いが認められた。また、酵素活性を測定し、果実における糖蓄積との関連について考察した。

F1p-03

イネ葉鞘におけるショ糖合成系遺伝子の発現量の変化

高橋咲子、広瀬竜郎、今泉信之¹、大杉立
(農水省・生物研、¹ジャバインターグラス)

イネの葉鞘は出穂前にはデンプンを蓄積し、出穂後は蓄積したデンプンをショ糖に再合成して穂に送り出すことが知られている。葉鞘では、出穂期を境にデンプン合成系からデンプン分解・ショ糖合成系へと代謝経路の切り替えが起きているものと思われる。

我々はイネよりショ糖合成のキーエンザイムである細胞質型フルクトース-1,6-ビスフォスファターゼ (FBPase) の遺伝子をクローニングし、その発現パターンを調べたところ、葉身・葉鞘などのソース器官で強い発現がみられた。次に出穂前後に3-4日おきに採取した葉鞘サンプルを用いて、デンプンおよびショ糖含量とFBPase 遺伝子の発現量の経時変化を調べたところ、デンプン含量が増加から減少へと変化する出穂期にFBPase 遺伝子の発現量が増大することが明らかになった。このことから、出穂前後の葉鞘において、FBPase 遺伝子の発現量とデンプン分解・ショ糖合成が密接に関連していることが示唆された。

F1p-04

シクロヘキシミドによるシロイヌナズナ *alternative oxidase(AOX)* 遺伝子の転写誘導
最相大輔・堤伸浩・平井篤志・中野幹生(東大院・農学生命科学)

高等植物ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系には、シアン感受性のシトクロム系呼吸経路と、シアン耐性のオルタナティブ呼吸経路の2つの経路が存在する。シアン耐性呼吸経路の末端酸化酵素は、*alternative oxidase(AOX)* と呼ばれ、この遺伝子は核ゲノムにコードされている。前回の本大会において、シロイヌナズナ *AOX* 遺伝子は核ゲノム上に少なくとも4コピー存在しており、それらは植物体の各組織で異なる発現制御を受けており、またシトクロム系呼吸経路の阻害剤であるアンチマイシン A や NaN_3 に対して異なる発現応答を示すことを報告した。さらに、これまでにシロイヌナズナ *AOX* 遺伝子のうち *AOX1a* が、80S リボソームを標的とするタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドによって、転写が誘導されることが明らかとなった。本研究では、ノーザンハイブリダイゼーションにより、*AOX1a* mRNA の蓄積量に対する、シクロヘキシミドの濃度効果および蓄積量の経時変化についての解析を行った。

F1p-05

キクイモ由来レクチン(HTA)のcDNAクローニングとジャスモン酸依存性発現
中川良二、八十川大輔、池田隆幸、長島浩二(北海道立食品加工研究センター)

植物由来レクチンはマメ科を中心に多くのものが得られているが、その生理機能は依然として明らかではない。我々はHTAの生理機能の解明を目的に研究を行っており、これまでにカルス由来のレクチンを精製し、その性質を明らかにしてきた¹⁾。今回は、HTAのcDNAクローニングとそのジャスモン酸依存性発現について報告する。

精製レクチンをウサギに免疫して得た抗血清をプローブとして、キクイモカルスcDNA発現ライブラリーをスクリーニングし、幾つかのポジティブクローンを単離した。これらは、全て同じ塩基配列のcDNAを含んでいた。本cDNAのコードするポリペプチドの分子量及びアミノ酸組成がHTAと良く一致し、大腸菌で発現させた組換えポリペプチドがHTAと同一の糖鎖認識特異性を示したことから、本cDNAがHTAをコードしていると結論した。また、HTAの推定アミノ酸配列が既知植物レクチン及びジャスモン酸誘導タンパク質とホモロジーを示したことから、カルスをジャスモン酸添加培地で培養し、その濃度に依存したレクチン活性の増加を認めた。このことから、HTAがジャスモン酸誘導タンパク質であろうと考えられた。

¹⁾ R. Nakagawa et al. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 259. (1996)

F1p-06

イネ酸素ストレス防御遺伝子の5'-共通配列のもつシス活性のレドックス応答
森田重人^{1,2}、平野悦子¹、横井秀行¹、上中弘典¹、増村威宏^{1,2}、田中国介^{1,2} (1京都市大・農・生資化、2京都府農資センター)

我々はこれまでにイネにおいて、酸素ストレスの防御に関与する細胞質型スーパーオキシドディスムターゼ (*sodCc1*)、細胞質型チオレドキシシン、グルタレドキシシンのそれぞれの遺伝子の5'-上流域に、28bpから成る相同性の高い配列が共通に存在することを明らかにしている。我々はこの共通配列がレドックス制御に関与するシス-エレメントである可能性を検討している。この配列がシス-エレメントとして機能しているかどうかを明らかにするために、共通配列を含む *sodCc1* プロモーターの一部をCaMV 35Sプロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子の5'に連結したレポーターコンストラクトを用いてトランジェントアッセイを行った。その結果、共通配列をもつコンストラクトのルシフェラーゼ活性は、35Sプロモーターのみのbasalな活性と比べて1.5倍に上昇していた。この活性上昇はDTT処理によりbasalレベルと同程度に抑えられた。一方パラコート処理により35Sプロモーターの2.7倍の活性上昇がみられた。これらの結果から、この共通配列が酸化還元に応答するシス-エレメントであることが示された。

F1p-07

イネ種子bZIP型タンパク質の遺伝子構造解析とACGT
エレメント結合特異性

中瀬昌之、松浦 敦、安達貴弘¹、北島 健、青木直
人、松田 幹 (名大院・生命農学、¹東京医歯大・難
治疾患研)

イネ登熟期種子において発現するbZIP型タンパク質
REB (rice endosperm bZIP)は、トウモロコシ種子の
転写調節因子OHP(Opaque2 heterodimerizing prote-
in)とアミノ酸レベルで73%の相同性を示し、イネ種
子 α -グロブリン遺伝子プロモーターに特異的に結合す
る。今回我々は、REBをコードするゲノミッククロー
ンの単離と構造解析、およびACGTエレメントに対す
るREBの結合特異性を調べた。

REB cDNAをプローブとしたイネゲノミックライブ
ラーのスクリーニングによりREB 遺伝子を単離し
全塩基配列を決定した。そのエキソン/イントロンの
数と境界はトウモロコシのOpaque2 遺伝子および
OHP遺伝子と一致したが、5'非翻訳領域には塩基配
列の相同性は見られなかった。*E.coli* で作製したREB
組み換えタンパク質を用いて種々のACGTエレメント
に対する結合特異性をゲルシフトアッセイにより調べ
た結果、REBはG-boxとC-boxに強く結合し、また
ACGTコア配列の外側の塩基の違いにより結合特異
性が変化することが明らかとなった。さらに、REBは
Opaque2とヘテロ二量体を形成すること、およびそ
のヘテロ二量体もACGTエレメントに結合すること
を示唆する結果が得られた。

F1p-08

イネ葉緑体RNAポリメラーゼ σ 因子遺伝子の機能
解析

角山 雄二、戸澤 謙、若狭 暁 (農水・農業研究センター)

高等植物の葉緑体には原核生物型、バクテリオ
ファージ型の少なくとも二種類のRNAポリメラー
ゼ(RNAP)が存在し、光合成関連遺伝子の転写は、
主に原核生物型RNAPが司ると考えられている。
このRNAPのコア酵素を構成すると考えられる
 $\alpha, \beta, \beta', \beta''$ の各サブユニットの遺伝子は葉緑体ゲノ
ムにコードされているが、転写開始に必須な σ 因
子は、葉緑体移行シグナルペプチドをN末端に有
する核コードの遺伝子として単離された。

イネ σ 因子遺伝子*sigA*の転写産物の解析から、
その発現は緑葉特異的で、かつ強い光依存性を示
すことが明らかにされ、この遺伝子産物(SigA)が
葉緑体中で光合成関連遺伝子群の転写調節に密接
に関与していることが示唆された。そこで、SigA
の葉緑体局在性と葉緑体遺伝子の転写調節への直
接的関与を証明する事を目的とし、免疫学的手法
ならびに過剰発現タンパク質を用いた試験管内転
写系を用いて解析を行ったので結果を報告する。

F1p-09

RNAポリメラーゼIIのC末端繰り返し構造部分
(CTD)と相互作用するタンパク質群の精製

鈴木博之^{1,2}、伊藤嘉信¹、西 則雄²、山崎健一¹

(¹北大・地環研・環境分子、²北大・地環研・資源
化学科)

RNAポリメラーゼIIは11~12個のサブユニッ
トからなり、その最大サブユニットのC末端には7
アミノ酸を1 unitとするペプチド繰り返し構造部分
(CTD)が存在する。このCTDには転写の情報を仲
介する因子やmRNAのプロセッシングに関与する因
子が結合することが酵母や人では知られている。

そこで、我々はCTDと相互作用するタンパク質
群が植物にも存在するかどうかを明らかにするため
に化学的に合成されたCTDを用いてアフィニティ
カラムを作成した。このカラムにタバコ培養細胞
BY-2からの核抽出液をかけてCTDと特異的に相互
作用するタンパク質群の精製を行った。その結果、
CTDと相互作用するタンパク質が11分子種確認さ
れた。現在、これらのタンパク質の機能の一端を明
らかにするために、タバコ *in vitro* 転写系を用いて
これらのタンパク質群が転写の情報を仲介する機能
を有しているのかどうかを確認しているところであ
り、これらの結果もあわせて報告する予定である。

F1p-10

タバコ ETHYLENE-INSENSITIVE3 ホモログは配列特異的なDNA結合転写
活性化因子として機能する

小杉俊二、大橋祐子 (農水省・生物研・分遺・戦略基礎)

アラビドプシスにおけるエチレン情報伝達の解析において最も下流に位
置すると考えられる ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3) は、転写因子であ
ることが予想されているが、それが核に遷在するという以外、具体的
な知見はまだ得られていない。タバコPR1a 遺伝子のプロモーター領域に
結合するタンパク質因子として単離したTEIL は、最近クローニングされ
た EIN3 遺伝子をコードするタンパク質と高い相同性を持つことが明らか
となった。TEIL (615 aa) は EIN3 (628 aa) とアミノ酸配列にして63%
同一であり、特に280アミノ酸からなるN末の領域では90%の高い相同
性を示した。deletion mutant protein を作製し、TEIL のDNA結合領域
を求めたところ、N末の300アミノ酸からなる領域がDNA結合に必要で
あった。この領域はEIN3との間で高度に保存された領域と一致していた。
random binding site selection 法によって決定したTEILの至適DNA結
合配列は、PR1aプロモーター中に存在する結合配列よりも数倍高い結合
能を示した。この consensus 配列を4コピー持つ fragment を
CaMV35S minimal promoter の上流に挿入し、レポータープラスミドと
してタバコ葉肉プロトプラストに導入したところ、TEILの結合力の弱い
mutant fragment の場合と比べて7-10倍の転写活性の上昇が認められ
た。同時にTEILを過剰発現させたところ、さらに2から3倍の転写活性
化が起こった。この結果はTEILが転写活性化因子であることを示してい
る。以上の結果は、TEILがEIN3のタバコhomologueであり、EIN3が
sequence specific なDNA結合能を持つ転写活性化因子であることを示
唆している。また、現在TEILのアンチセンス遺伝子導入タバコ植物体が
得られており、その解析結果から推測されるTEILの標的遺伝子について
報告したい。

F1p-11

マメプロテアーゼインヒビター遺伝子プロモーターに結合するホメオドメインタンパク質の解析
坂田洋一, 桑野知昌, 大類太郎, 内藤 哲¹, 武長宏 (東農大・農・農化, ¹北大・農・応用生命)

シカクマメの種子および塊根に多量に蓄積するKunitz型キモトリプシンインヒビター(WCI)をコードする遺伝子のプロモーター領域にはPHDフィンガータイプのホメオドメインタンパク質(WBHD1)が結合する。WBHD1と同様の構造をもつタンパク質はトウモロコシ, アラビドプシスおよびバセリにも存在することが報告されており, 植物において重要な役割を果たしていると考えられているが, 未だその機能については明らかになっていない。

GSTとの融合タンパク質として大腸菌内で発現させたWBHD1タンパク質は, PHDフィンガーを欠失してもDNA結合能を失わなかったことから, PHDフィンガーはDNA結合能以外の機能をもつと推測された。また, WBHD1はWCI遺伝子の5'上流1.0kbpの領域の複数箇所に結合したが, WBHD1遺伝子のmRNAの蓄積は種子, 塊根および葉において観察され, WCI遺伝子の発現パターンとは異なっていた。

F1p-12

コムギ及びシロイヌナズナ由来のMAR結合タンパク質のDNA結合領域と細胞内局在に関する解析
森澤 学, 南 昌宏, 飯 哲夫, 岩 渕 雅樹
(京都大・院・理・植物)

真核生物において、クロマチンDNAは、MAR (matrix attachment region) 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クスと結合し、その結果、一種の機能単位が形成されると考えられている。我々は、MARと核マトリクスの相互作用に関する理解を深めるため、MAR結合能を持つ核マトリクスタンパクを同定することとした。今回は、すでにcDNAクローン化しているMAR結合タンパクのうちコムギのAH8とシロイヌナズナの1D04に関する解析結果を報告する。AH8には、新しいタイプのZn-finger様構造とAT-hookが見出されるが、MARとの結合には両モチーフともに重要であることが示された。また、細胞内局在を特異抗体による蛍光組織染色法により検討した結果、主に核に局在していることが明らかとなった。トランスポゼースとの相同性が見られる1D04のMARとの結合活性についても報告する予定である。

F1p-13

タバコ rDNA スペーサー領域に結合するタンパク質
中村剛経, 矢倉公隆 (金沢大・教育・生物)

真核生物の rDNA スペーサーには、転写プロモーターや転写制御に関わるシスエレメントが存在し、RNA ポリメラーゼ I 及び種々の転写因子が結合すると考えられている。

我々は、植物 RNA ポリメラーゼ I の転写因子の同定を目的に、タバコ rDNA スペーサー領域中の、主に転写開始点 (TIS) 周辺に結合する核タンパク質の探索を、ゲルシフト分析により行った。その結果、TIS を含む -41/+139 及び TIS の上流 -135/-41 の領域に特異的に結合するタンパク質の存在が明らかになった。また、TIS の上流に存在する AT-rich (72%) 領域には、二本鎖 AT-rich DNA 配列に親和性を持つタンパク質が結合する事が確認された。一方、TIS の下流に存在する 3 タイプのリピート配列のうちの 2 つを含む +894/+1035 の断片にも特異的に結合するタンパク質が存在することが明らかとなった。

今後は、これらのタンパク質の詳細な解析を行って行く予定である。

F1p-14

Gene Silencing の分子機構 : RNA の直接的な関与
萱野達夫, 内藤 哲, 島本 功¹ (北大・農・応用生命, ¹奈良先端大・バイオ)

我々はイネ Oc 細胞株を材料として用い、相同性に依存する遺伝子の不活性化の分子機構を解明することを目的としている。現在までに、レポーター遺伝子として GUS 遺伝子を持つ形質転換細胞系統を得ている。それら全ての系統について GUS 活性を測定したところ、活性の高い高発現系統と、低発現系統に分類することができた。低発現系統における GUS mRNA 量の低下は、転写後調節による事が判明した。また、高発現系統株に対して、さらに GUS 遺伝子導入し経時的に GUS 活性を測定した結果、Oc 細胞株では GUS 活性の上昇が見られるのに対して、高発現系統株では活性が減少する傾向が見られた。同様に、GUS RNA および複数の、異なった欠損を持つ GUS RNA を導入したところ、3'末端を欠損している RNA 分子を導入した場合、導入後、数時間のうちに急激な GUS 活性の減少が観察された。現在、導入後における GUS RNA 分子の解析を進めている。

F1p-15

植物 tRNA 遺伝子の *in vitro* 転写・プロセッシング系の開発

湯川泰、赤間一仁¹、杉田護、杉浦昌弘（名大・遺伝子、¹島根大・生物資源・生物科学）

植物の tRNA 遺伝子発現の分子機構を明らかにするため、タバコ培養細胞 BY-2 株の核抽出液より無細胞 (*in vitro*) の転写・プロセッシング系を開発した。BY-2 の核抽出液と、シロイヌナズナの tRNA^{Ser} 遺伝子を用いて、*in vitro* で効率的に転写する反応条件を確立した。また、この転写系は、前駆体 tRNA のプロセッシングやスプライシングの活性も有していた。前駆体 tRNA の 5' 末端のプロセッシングは、転写と同時に速い反応として進行するので、核抽出液から RNase P 活性を部分分画して、5' 末端のプロセッシング過程を解析した。スプライシングは *Nicotiana rustica* の tRNA^{Tyr} 遺伝子を使用し、転写とスプライシングが同時に進行する条件を決定し、この条件のもとでイントロンを含むシロイヌナズナの tRNA^{Tyr} と tRNA^{Met} 遺伝子が、正確に転写とスプライシングをすることを確認した。本研究により初めて、植物の tRNA 遺伝子の転写からプロセッシング・スプライシングまでを、植物の *in vitro* 系で解析することが可能となった。

F1p-16

タバコ葉組織でのトランジェントアッセイ系を用いたポリ(U)型翻訳エンハンサーの機能解析

長尾一生 小保方潤一（北大・地球環境科学）

β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR) に挿入されたポリ(U)配列は形質転換植物体中で mRNA の翻訳効率を大きく促進する翻訳エンハンサーとして作用する。植物では 5' 末端近傍にポリ(U)配列をもつ mRNA も見つかり、このポリ(U)型翻訳エンハンサーの遺伝子特異性や作用メカニズムには興味もたれるが、一方、形質転換植物を用いた実験系ではその研究の効率に限界がある。今回、我々はパーティクルガンを用いたトランジェントアッセイ系を用いることによって、植物組織中でのポリ(U)型翻訳エンハンサーの効果を簡便に検定する方法を確立した。5' UTR にポリ(U)配列を挿入した GUS 遺伝子はトランジェントアッセイ系でもコントロール遺伝子に比べて高い発現を示したが、ポリ(G)、ポリ(A)、ポリ(C)ではこのような効果はみられなかった。さらに、5' UTR や開始コドン周辺の塩基配列、レポーター遺伝子の種類、ポリ(U)の長さ、などがポリ(U)型翻訳エンハンサーの機能にどのような影響を与えるのかについて報告する。

F1p-17

Arabidopsis thaliana アスコルビン酸ペルオキシダーゼ mRNA に対するヘアピン型リボザイムの設計

菊地孝雄、久松 伸、青野光子¹、久保明弘¹、佐治 光¹、菊池 洋²、其木茂則（麻布大・環境保健、¹国立環境研、²豊橋技科大・工）

リボザイムと呼ばれている触媒機能を持つ RNA は、RNA の特異的な配列を切断する。現在知られているリボザイムの中で、ヘアピン型リボザイムは最も切断効率が良いと報告されていることから、特定の遺伝子発現を抑制する道具として期待されている。今回、植物細胞内におけるヘアピン型リボザイムの切断効率と特異性を調べるために、*Arabidopsis thaliana* アスコルビン酸ペルオキシダーゼの mRNA に対してヘアピン型リボザイムを設計した。また、リボザイムの触媒ドメインを 1 塩基置換して活性を持たなくした RNA も、リボザイムのコントロールとして設計した。設計したリボザイムは試験管内において基質 RNA を切断したが、リボザイムのコントロールとして設計した RNA は全く切断しなかった。現在、このリボザイムが植物細胞の中で機能するか検討中であり、あわせて報告したい。

F1p-18

植物 tRNA に見い出された例外：細胞質ヒスチジン tRNA は T Ψ C ループに C₅₄ を持つ

赤間一仁、湯川泰¹、杉浦昌弘¹、Ian Small²（島根大・生資・生物科学、¹名大・遺伝子、²Station de Genetique et d'Amelioration des Plantes, INRA, Route de St-Cyr, F-78026 Versailles Cedex, France）

シロイヌナズナの tRNA^{His} をコードする核遺伝子は、T Ψ C ループに C₅₄ を含むことが報告されている（赤間、谷藤、1989）。しかし、ほとんど全ての tRNA に対応する位置の塩基は U がその誘導体であり、植物（ルービン）で唯一知られている細胞質 tRNA^{His} もまた、U₅₄ を持つ。これらから、シロイヌナズナの遺伝子は当初、偽遺伝子と考えられたが、我々は様々な手法を用いて、植物 tRNA^{His} とその遺伝子の分子構造、発現、機能を再検討した。その結果、シロイヌナズナを含めて高等植物の tRNA^{His} 遺伝子は C₅₄ を持つこと、そして、この塩基は RNA レベルでも保持されていることが示唆された。また、tRNA^{His} は生体内でアミノアシル化されていることを確認した。さらに、タバコ培養細胞由来の核抽出液を用いて、シロイヌナズナ tRNA^{His} 遺伝子の C₅₄ を T₅₄ に置換した変異遺伝子と野生型遺伝子の転写活性を比較したところ、変異遺伝子は野生型よりも 5 倍以上の転写が見られた。

F2a-01

登熟中のイネ胚乳におけるイソアミラーゼ(ISA)の精製およびその性質

藤田直子, 久保亜希子¹, P. B. Francisco Jr., 中北真紀子, 原田久也¹, 中村保典 (生物研, 千葉大・園芸)

胚乳デンプンにかわってグリコーゲン様多糖を蓄積するイネの突然変異体 *sugary-1* の解析から, 枝切り酵素 (starch debranching enzyme) はアミロペクチン合成過程で不可欠な酵素であることが示されている (Nakamura et al, 1996, 1997). 枝切り酵素にはプルナーゼとイソアミラーゼ(ISA)の2タイプが存在する. ISAはアミラーゼの混入下では酵素活性を測定することが困難であり, また酵素が不安定であるため, 特に高等植物においてその研究実績が少なく, これまでジャガイモ (Ishizaki et al, 1983) およびトウモロコシ (Doehlert & Knutson, 1991) でのみ報告されているにすぎない.

本研究では, 登熟中のイネ胚乳からISAを精製し, 精製酵素の性質を明らかにした. 1) HPLCなどを用いて精製を行った結果, イネISAはSDS-PAGEによって分子サイズ83kDaの単一のバンドを示し, このバンドはトウモロコシISAの抗体に反応した. 2) イネISAはゲル濾過カラムによる分子サイズは400~500kDaを示したため, オリゴマーを形成していると予想された. 3) イネISAはアミロペクチンとグリコーゲンを基質に用いた場合, 酵素活性を示したが, プルランを基質に用いた場合, 酵素活性は検出されなかった. 4) イネISAは至適反応温度は30~35°C, 至適pHは6.5~7.0であり, ジャガイモISA (至適反応温度; 50°C, 至適pH; 5.5~6.0) とは異なる性質を示した.

F2a-02

イネ *sugary-1* 変異による胚乳アミロペクチン構造変異の解析
久保亜希子, 藤田直子¹, 原田久也, 松田智明², 佐藤光³, 中村保典¹

(千葉大・園芸, ¹生物研, ²茨城大・農, ³九州大・農)

イネ *sugary-1* 変異体は胚乳にフィトグリコーゲンを蓄積することが知られており, アミロペクチン合成過程の解明に有用な材料である. starch debranching enzyme (SDE) にはプルナーゼ (PUL) とイソアミラーゼ (ISA) の2種類がある. 我々は既に, *sugary-1* 変異の原因酵素としてPULの可能性を示す結果を報告してきた (Nakamura et al. 1996, 1997).

本研究では, 同一遺伝子座の変異によるもの, 様々な表現型を示す *sugary-1* 変異体を用い, アミロペクチン合成過程におけるSDEの関与についてさらに詳しく調べた.

1. SDEの一方であるISAを部分精製し, Native-PAGE/活性染色に供した結果, ISAについても活性の顕著な低下が認められた. しかし, PUL活性が *sugary* 性と正の相関を示すのに対し, ISA活性は相関を示さなかった.

2. イネ *sugary-1* には同一胚乳内にアミロペクチン (AP) とフィトグリコーゲン (PG) を蓄積する両細胞領域をもつ系統がある. HPAEC-PAD法で分析した結果, AP領域とPG領域のポリグルカン構造は明確に異なっていた. また, *sugary-1* 変異体のAPは親品種のAPと異なる分子構造をもつことが示された. フィンガープリント法によりPUL活性を測定した結果, PG領域ではAP領域に比べ低いことが示された.

以上の結果から, PUL, ISAの両SDEのAP合成過程への関与が強く示唆された.

F2a-03

タケノコのβ-グルコシダーゼ
藤井康代, 東 順一 (京都大院農)

タケはイネ科の多年生単子葉植物で最も進化した植物の一つである. タケは多年生であるにもかかわらず, わずか数カ月で伸長成長が終了するという特徴を持っている. 単子葉植物の成長に関する研究例は双子葉植物に比べ少なく, 未だ不明な点が多い. 今回はモウソウチクのタケノコにおいて高い活性を持つβ-グルコシダーゼ (G1) を単離, 精製した.

モウソウチクのタケノコを蒸留水でホモゲナイズして抽出後, さらに0.5M塩化ナトリウム溶液で24時間4°Cで抽出した. それぞれの抽出液から粗酵素 (可溶性粗酵素; SE, イオン結合性粗酵素; IE) を調製した. G1の活性はp-ニトロフェノール-β-D-グルコピラノシドを基質として測定した. SE, IEのG1の比活性はそれぞれ0.104および0.359 μkat/mg proteinであった. native-PAGEで活性染色を行ったところ, SE, IEともに同じ場所に活性のある一本のバンドが認められた. そこでIEをゲル濾過, イオン交換クロマトグラフィーし, G1活性の高いタンパク質を得た. このタンパク質をnative-PAGE電気泳動に供し活性を示す単一なバンドとして確認した. 精製した酵素について至適温度, 至適pH, 温度安定性等の性質について調べた.

F2a-04

トウモロコシSPS遺伝子を導入したイネ止葉のSPSタンパク及び活性の変化
小野清美, 古川かおる¹, 村田孝雄¹, 石丸健, 小沢憲二郎, 大川安信, 大杉立 (農水省・生物研, ¹岩手大・農・作物)

ショ糖は光合成の主要な終産物の一つであり, また主要な輸送形態である. ショ糖合成は様々な酵素の制御を受けているが, ショ糖リン酸合成酵素 (SPS) は, ショ糖合成系の鍵酵素の一つである.

エレクトロポレーション法により, トウモロコシのSPS遺伝子を導入した形質転換体イネ (日本晴) を作出した. 自然光下で生育させT2世代及び野生型イネの止葉について, SPSタンパク量及び活性の変動を調べた.

PCR及びノーザンハイブリダイゼーションによりトウモロコシのSPS遺伝子が導入されている形質転換体を選抜した. これらのイネの止葉葉身についてトウモロコシSPS抗体に対するウエスタンブロッティングを行ったところ, 野生型イネではバンドが検出されず, 一方, 形質転換体ではトウモロコシSPSのタンパクレベルでの発現量が高い系統と低い系統が得られた. また, 低い系統ではイネ本来のSPSタンパク量も減少していた. さらにSPS活性をLunn and Hatch (1997) の方法で測定したところ, 野生型イネと比べ, 最大活性の高い系統と低い系統が得られ, それらはタンパクの発現レベルとほぼ一致していた. これらの個体の止葉葉身のショ糖, デンプン量の変動について現在解析を行っている.

F2a-05

SDSにより活性化されるトウモロコシ・プロテアーゼのモノクローナル抗体による精製

山田隆文、太田啓之、近藤篤、増田建、高宮建一郎（東工大・生命理工）

我々はSDSによって特異的に活性化されるトウモロコシ・プロテアーゼに関して研究を行っている。今回、本酵素のサブユニット構造、および酵素の活性化におけるSDSの役割や安定性に及ぼす影響について興味深い知見を得たので報告する。

酵素の精製は、活性を吸着するモノクローナル抗体を調製し、この抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィにより行った。その結果、本酵素は40, 15, 13kDaの3つの異なるサブユニットからなることが明らかになった。酵素の活性発現にはSDSが必須である。しかし、酵素を0.1%のSDSと合成基質の存在下、5分間ブレインキュベーションすると、この処理によって活性化された酵素は、SDSをもはや活性発現に必要としないことが明らかとなった。その活性化はSDS (0.1%) 存在下での反応における値と同程度であった。酵素は活性が発現しないpH8付近では安定であるが、至適pH (4.9) 付近では不安定化し、特にSDSの存在下で顕著に不安定化した。この不安定化は可逆的なインヒビターであるロイペプチンの存在下で処理を行い、その阻害効果を除いた後、活性測定を行った場合でも抑制されないことから、自己消化に起因しないことが示唆された。ところが、合成基質を共存させるとその不安定化は緩和することが明らかになった。この事は生体内において、酵素は基質が存在するとき安定であるが、基質が消費される、すなわち役割を終えると酵素は不安定化することを示唆している。

F2a-06

イネ培養細胞からの26Sプロテアソームの精製とその特徴付け

柳川由紀、大橋明子、村上安子¹、小口圭子²、駒嶺穆²、田中啓二³、佐藤隆英、中川弘毅（千葉大・園・生物生産、¹慈恵医大・生化二、²日本女子大・理・物質生物、³都・臨床研・化学療法）

26SプロテアソームはATP依存的に細胞内で短寿命タンパク質や異常タンパク質を分解する多触媒性プロテアーゼ複合体として知られている。現在、高等植物で26Sプロテアソームが精製されているのは双子葉植物であるホウレンソウのみである。そこで、単子葉植物であるイネから26Sプロテアソームの精製を行った。

イネ培養細胞（対数増殖期）を材料として用い、超遠心、Bio-Gel A-1.5mアガロスクロマトグラフィ、グリセロール密度勾配遠心を行いイネ精製26Sプロテアソームを得た。本酵素は α 型と β 型と思われる2分子種の存在が確認され、他起源の類似していた。しかし我々のデータは、動物や酵母とは異なり、イネ26Sプロテアソームがラット由来のオルニチン脱炭酸酵素（ODC）を分解しない、あるいは分解の程度が低いという結果を示した。高等植物では、ODCの認識あるいは分解機構が異なっている可能性が示唆された。

F2a-07

トウモロコシの根型PEPカルボキシラーゼ：組換え体酵素の性状解析

董 龍英、増田隆男、畑 信吾、泉井 桂（京都大院・農・応用生物科学）

トウモロコシの根に主として発現するPEPカルボキシラーゼ（PEPC）分子種のcDNA [1] をpETシステムに組み込み、大腸菌に発現させて酵素を精製したのちタグ部分を除去した。21 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteinの比活性を有する本酵素標品のPEPや Mg^{2+} に対する K_m 値は、C4型PEPCのおよそ10分の1であった。一方、 HCO_3^- に対する K_m 値は、C4型PEPCの約半分であった。グルコース 6-リン酸とグリシンは根型PEPC活性には大きな影響を及ぼさなかったが、C4型PEPC活性を約2倍に上昇させた。pH 7.0におけるリンゴ酸に対する50%阻害濃度は、根型が0.2 mMで、C4型は0.4 mMであった。両分子種にC3型PEPCを加えてハイドロバシープロフィルを比較したところ、これらの速度論的違いは、アミノ酸配列が異なるいくつかの領域に起因している可能性が考えられた。これらの結果はC4型PEPCの分子進化にも示唆を与えるかもしれない。根型PEPCも、他の分子種と同様に動物のcAMP依存性プロテインキナーゼやトウモロコシ葉のプロテインキナーゼによってリン酸化され、リンゴ酸に対する感受性の低下が示された。

[1] 日本植物生理学会1996年度年会講演要旨集 p. 112

F2a-08

エンドウのアセチル-CoAカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼに関する研究

瀧田浩一郎、木崎暁子、永野幸生、佐々木幸子（名大院・生命農学・生化学制御）

植物の新規脂肪酸合成はプラスチド内で起こる。合成の律速段階の反応を触媒するアセチル-CoAカルボキシラーゼ（ACCase）は、光合成と同調して光により活性化される。光化学系Iで発生した電子がチオレドキシンを還元し、これがACCaseを還元して活性化させる。

そこで我々は、還元部位を特定するため、組み換え型による酵素の再構築を試みることにした。いろいろな種について活性とシステイン残基保存の相関を調べたところ、ACCaseの反応の一部を触媒するカルボキシルトランスフェラーゼ（CT）にその標的がある可能性が高いと考えた。そこで、ACCaseのCTを構成するCT α 、CT β サブユニットに着目し、個々の一次構造を決定した。

核ゲノムコードのCT α トランジットペプチドが付加されていると考えられる。CT β 抗体でCT α タンパク質を共沈殿させてN末端のアミノ酸配列を決定した。また、CT β は葉緑体ゲノムコードなのでRNAエディティングの可能性があった。RT-PCRとGenomic PCRを行い、比較したところカサドでセリンからロイシンへの変換が見つかった。これらの情報に基づいて、組み換え型タンパク質の発現用ベクターを構築した。

現在、大腸菌での発現を試みており、さらに試験管内でCT活性の測定を検討中である。

F2a-09

葉緑体アセチル-CoA カルボキシラーゼの光活性化機構

木崎 暁子, 佐々木 幸子 (名大院・生命農学・生化学制御)

植物には葉緑体に局在する原核生物型アセチル-CoA カルボキシラーゼ (ACCase) と細胞質ゾルに局在する真核生物型 ACCase の二つの型が存在している。植物の脂肪酸合成は葉緑体で行われている。葉緑体の ACCase は、脂肪酸合成の律速である最初の反応を触媒している。植物の脂肪酸合成は明暗で調節されているが、これは葉緑体の ACCase が光によって活性化されるためである。そこで、ACCase の活性化に葉緑体特有の光のシグナル伝達系であるレドックスカスケードが関与していると推定された。この可能性を検討した結果、ACCase が還元剤である DTT によって活性化すること、さらに DTT によって還元された大腸菌のチオレドキシニンによっても活性化することがわかった。しかし、DTT の作用は特異的ではないので、ほかの影響も考えられた。

そこで、ACCase の還元による活性化をさらに調べた。その結果、チオレドキシニンレダクターゼによって酵素的に還元されたチオレドキシニンによってもこの酵素が活性化されることがわかった。また、ACCase は葉緑体に存在するチオレドキシニンによって活性化されることがわかった。これらの結果は、葉緑体内において、光のシグナルがフェレドキシニン/チオレドキシニン系を介して ACCase を活性化することを示している。

F2a-10

グリオキシソームに局在する脂肪酸β酸化系酵素アシルCoAオキシダーゼ

林 潤^{1,2}, Luigi De Bellis^{1,3}, 山口勝司¹, 加藤朗¹,

林 誠^{1,2}, 西村幹夫^{1,2} (1基礎生物学研究所・細胞生物,

²総合研究大学院大学・生命科学, ³ピサ大学・イタリア)

【目的】 動物細胞において、脂肪酸β酸化系はペルオキシソームとミトコンドリアに存在している。ペルオキシソームのβ酸化系はアシルCoAオキシダーゼ、エノイルCoAヒドラターゼ、ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ、チオラーゼの4つの酵素から成り立っている。動物細胞のペルオキシソームでは短鎖長 (C8以下) のアシルCoAは代謝されず、短鎖長のアシルCoAはミトコンドリア内で分解される。植物細胞では、脂肪酸β酸化系は脂肪性種子の子葉に存在するグリオキシソーム内に局在し、グリオキシル酸回路の諸酵素とともに糖新生に重要な役割を果たしている。β酸化系酵素のうち、エノイルCoAヒドラターゼ、ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ、チオラーゼは、いくつかの精製されたcDNAクローニング解析が行われているが、アシルCoAオキシダーゼに関しては解析が進んでいない。今回、我々はアシルCoAオキシダーゼの性質を解析した。

【結果】 昨年の本大会において、我々はカボチャ黄化子葉から作製したcDNAライブラリーよりアシルCoAオキシダーゼのcDNAをクローニングし、その構造解析を報告した。特異抗体を用いた解析から、このタンパク質は長鎖特異的アシルCoAオキシダーゼであることが明らかになった。¹⁾更にグリオキシソームに局在する短鎖特異的アシルCoAオキシダーゼを同定し、そのcDNA解析を行った。カボチャ発芽子葉における2種のアシルCoAオキシダーゼのノーザンブロット、ウェスタンブロット解析より、これらのオキシダーゼはβ酸化系酵素であるチオラーゼと同様に変動することが明らかになった。これらの結果をもとに植物細胞における脂肪酸β酸化系の発現制御機構について考察する。

1) Hayashi, H., et al. J. Biol. Chem., in press (1998)

F2a-11

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PEROXISOMAL SHORT-CHAIN ACYL-COA OXIDASE FROM PUMPKIN

Luigi DE BELLIS^{1,3}, Hiroshi HAYASHI^{1,2}, Pietro GIUNTINI^{1,3}, Makoto HAYASHI^{1,2}, Mikio NISHIMURA^{1,2}

¹Dept. Cell Biol., NIBB, and ²Dept. Mol. Biomechanics, Grad. Univ. Advanced Studies, Okazaki 444, ³Dip. Biologia Piantae Agrarie, 56124 Pisa, Italy.

Acyl-CoA oxidase is a key enzyme in peroxisomal plant β-oxidation. It allows plant peroxisomes to completely oxidise acyl-CoA chains, while animal peroxisomes, lacking short-chain acyl-CoA oxidase activity, are unable to process acyl-CoA shorter than octyl-CoA (C8). The enzyme was purified by hydrophobic interaction, affinity, hydroxylapatite, and cation exchange chromatography. It is revealed that pumpkin short-chain acyl-CoA oxidase is a tetrameric enzyme consisting of four apparently identical 47-kDa subunits; it is specific for acyl-CoA chains below 10 C, with maximum activity on C6 substrate. Therefore, it appears structurally dissimilar to known peroxisomal acyl-CoA oxidases and to previously purified plant acyl-CoA oxidases. Anyway, the enzyme is clearly located in pumpkin peroxisomes.

F2a-12

シロイヌナズナ由来のチトクロム b5、NADH:チトクロム b5 還元酵素 cDNA の単離と組換え体タンパク質による電子伝達
水谷正子、田中良和、久住高章 (サントリー基礎研究所)

NADH からチトクロム b5 還元酵素 (CBR) の補酵素 FAD を経てヘム蛋白質であるチトクロム b5 へ至る電子の流れは、ER における重要な電子伝達系の1つであり、高等植物においては、脂肪酸の不飽和化や水酸化、炭素鎖の伸長反応に電子を供給している。我々は、これまでに報告されている動物の CBR およびチトクロム b5 のアミノ酸配列と相同な配列をシロイヌナズナの EST に見出し、シロイヌナズナの CBR をコードすると考えられる cDNA およびチトクロム b5 をコードすると考えられる cDNA を得た。これらシロイヌナズナ由来の cDNA を昆虫細胞および大腸菌で発現させ、膜結合型の組換え体蛋白質を精製した。これら組換え体蛋白質はそれぞれ、CBR、チトクロム b5 に特徴的な吸収スペクトルを示し、さらにこれら組換え体酵素を用いて *in vitro* で CBR による NADH からチトクロム b5 への電子伝達を再構成することができた。

F2p-01

新規エリシター応答性イネ遺伝子 EL5

高井 亮太、南 栄一¹、長谷川 宏司、渋谷 直人¹ (筑波大・応生化、¹農水省・農業生物資源研)

イネいもち病菌細胞壁の骨格を形成するキチンのオリゴマー (N-アセチルキトオリゴ糖) は、イネ培養細胞に対して種々の生体防御反応を引き起こす。そこで本研究ではこの系の情報伝達機構の解析を目的として、エリシター処理後に短時間で発現する遺伝子の単離を試みた。

サブトラクション法により、エリシター処理後 15 分以内で mRNA 量が増加するクローンをいくつか単離した。その候補の中で EL5 と命名したクローンを解析した。EL5 の mRNA は無処理の細胞ではほとんど発現しておらず、エリシター処理後約 60 分でピークに達し、その後速やかに減少するという一過性の発現を示した。次にこの cDNA をクローニングして塩基配列を決定したところ、そのアミノ酸配列は ring フィンガーモチーフをもち、また転写活性化ドメインとみられる酸性領域や高プロリン領域も存在するため、転写調節因子であると推測された。

F2p-02

エリシター応答性イネ遺伝子へのオリゴキチンエリシターからのシグナル経路

南 栄一、賀 道輝、高井亮太¹、山田小須弥¹、長谷川宏司¹、渋谷直人 (農水省・農業生物資源研、¹筑波大学)

イネ培養細胞はキチンオリゴマーをエリシターとして認識し、ファイトアレキシン生成等の生体防御反応を展開する。この系においては PAL、β-グルカナーゼ等のほかにも、エリシター処理 15 分以内に発現が誘導されるユニークな初期遺伝子群 (EL2, EL3) が単離されている。これらを分子マーカーとして、エリシターから遺伝子発現に至るシグナル経路の解析を行った。その結果 a) EL2, EL3, PAL は弱酸処理による細胞質酸性化、及び蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤、カリクリン A によって発現が誘導されるのに対し、β-グルカナーゼは応答しなかった; b) 蛋白質合成阻害剤、シクロヘキシミドを前処理すると PAL、β-グルカナーゼのエリシター誘導はキャンセルされたが EL2, EL3 の誘導は阻害されなかった。従ってこれら初期遺伝子の発現には de novo 蛋白質合成は必要としないものと考えられた。

F2p-03

イネ培養細胞におけるグルカン系およびキチン系エリシターのシグナル伝達経路について

山口武志 渋谷直人 (農水省生物研)

高等植物では病原菌やウイルスの侵入にともなって種々の生体防御系が動員されることが知られている。本研究では特定サイズのキチン系オリゴ糖とイモチ病菌 (*Pyricularia oryzae*) 細胞壁より調整した β-グルカン断片がイネ培養細胞 (BL-2) に対して強いエリシター活性を示すこと¹⁾、キチン系オリゴ糖についてはイネ細胞原形質膜中に特異的に結合する受容体が存在すること²⁾、分離精製し構造決定したエリシター活性 β-グルカン断片は β-1-3 結合を主鎖、1-6 結合を側鎖とする枝分かれ構造を有し、大豆のエリシターとは逆の構造であったこと、さらに β-グルカン断片がキチン系オリゴ糖存在下でファイトアレキシン合成誘導に対して顕著な相乗効果を示すことを報告してきた³⁾。

キチン系とグルカン系のシグナル伝達には、何らかのクロストークが存在することが示唆されたので、イネ培養細胞に対するそれぞれの生物活性を活性酸素の生成について解析した結果、キチン系オリゴ糖が 10nM で強い活性酸素誘導活性を示したのに対して、β-グルカン系はその 1000 倍という高濃度でもほとんど活性を示さなかった。上記の濃度においてはどちらも強いファイトアレキシン誘導活性を有することから、キチン系とグルカン系エリシターの間にはシグナル伝達の初期過程において重要な差異のあることが示唆された。

¹⁾ 山口武志他、97年度日本植物生理学会大会要旨集 p 118

²⁾ Y. Ito et al. *Plant J.*, 12, 347 (1997)

³⁾ 山口武志他、第19会糖質シンポジウム講演要旨集 p 72

F2p-04

イネのオリゴ糖エリシターシグナル伝達に伴うプロテインキナーゼの活性化とタンパク質リン酸化
朽津和幸、小松節子、渋谷直人 (農水省・生物研)

イネ培養細胞において N-アセチルキトオリゴ糖が細胞膜上の受容体 [1] で認識されると、膜電位の脱分極 [2, 3]、細胞質の pH 変化 [4] その他、一連の一過性の初期応答を経て、数分以内に遺伝子発現が活性化される [5]。プロテインキナーゼやプロテインホスファターゼに対する阻害剤を用いた実験 [6] から、オリゴ糖シグナル伝達過程にタンパク質のリン酸化、脱リン酸化反応が関与すると考えられた。オリゴ糖エリシター処理に伴って数分以内に特異的にリン酸化されるタンパク質が、二次元電気泳動法により見出された。そこでオリゴ糖処理した細胞を SDS で処理、抽出し、基質タンパク質を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離した後、ゲル内リン酸化法でプロテインキナーゼの検出を試みた。その結果、myelin basic protein を基質とし得る低分子量のキナーゼが、活性オリゴ糖エリシター処理後 1 分程度で活性化されることが明らかとなった。不活性オリゴ糖アナログでは活性化が見られなかったことや阻害剤実験の結果から、オリゴ糖エリシター受容体により活性化されるシグナル伝達過程にこのプロテインキナーゼが関与している可能性が示唆された。

[1] *Plant J.* 12:347 (1997); [2] *Protoplasma* 174:79 (1993); [3] *Plant Cell Physiol.* 38:902 (1997); [4] *Plant Cell Physiol.* 38:1012 (1997); [5] *Plant Cell Physiol.* 37:563 (1996); [6] *Protoplasma* 188:138 (1995).

F2p-05

イネ培養細胞原形質膜に存在するN-アセチルキトオリゴ糖エリシター結合蛋白質のアビジンアフィニティークロマトグラフィーによる精製

伊藤ユキ、渋谷直人（農水省、生物研）

キチンオリゴ糖(GlcNAc)_{6,8}はイネ懸濁培養細胞に対しnMレベルでフィトアレキシンエリシターとして作用する¹⁾。我々は既にレセプター候補として、イネ培養細胞原形質膜に存在しN-アセチルキトオリゴ糖に高い親和性を持つ分子量約75kDaの蛋白質をアフィニティークロマトグラフィーにより同定した²⁾。

本実験では、この蛋白質をアビジンアフィニティークロマトグラフィーにより電気泳動的に単一バンドに精製したので報告する。まず、ビオチン化試薬として(GlcNAc)₆のビオチンヒドロラジド誘導体を調製し、水性二層分配法により調製した原形質膜と反応させた後グルタルアルデヒドによる架橋反応で固定化した。この原形質膜の可溶化物をSDS-PAGE後ニトロセルロース膜へブロットしHRP-アビジン処理したところ、化学発光法により分子量75kDaのビオチン化蛋白質が検出された。この蛋白質はリガンドへの結合性などから以前に同定された75 kDa蛋白質と同一物であると考えている。この原形質膜可溶化物を1Mグアニジン塩酸存在下でテトラアビジンアガロースと反応させたところ、ビオチン化蛋白質は再現性よくゲルに吸着し8 M グアニジン塩酸 (pH1.5) またはフェノール処理により溶出できた。溶出画分の限外ろ過またはメタノール沈殿による濃縮物のSDS-PAGEを行うと、銀染色によりビオチン化蛋白質の移動度と一致する単一バンドがアビジンのバンドとともに検出された。現在この精製蛋白質の性質の決定をすすめている。1)A.Yamada et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57,405(93) 2)Y.Ito et al.,*The Plant J.*,12,347(97)

F2p-06

種々の植物細胞原形質膜におけるキチン系エリシター結合蛋白質の存在とエリシター応答性：エリシター結合蛋白質の生体中の機能

岡田光史^{1,2}、伊藤ユキ¹、松村正利¹、渋谷直人¹（¹農水省生物研、²筑波大）

我々はこれまでに、キチンのオリゴ糖、(GlcNAc)_{7,8}が強いエリシターとしてイネの生体防御反応を誘導すること、また、イネ培養細胞原形質膜中には分子量約75kのキチンオリゴ糖高親和性結合蛋白質が存在していることを報告してきた。本研究ではこの75kDa蛋白質の生体中での機能を推定するために、種々の植物細胞におけるこの蛋白質の存在とエリシター応答性の対応関係を検討した。

水性2層分配法により調製した原形質膜を用い、アフィニティークロマトグラフィーによりキチンオリゴ糖結合蛋白質の存在を調べたところ、イネの葉と根、コムギの葉、オオムギ、ニンジン、ダイズの各培養細胞において類似の性質を持つと思われるキチンオリゴ糖結合蛋白質の存在が示された。一方、タバコ、ナス、ソルガムの各培養細胞ではこうした蛋白質の存在は検出されなかった。

さらに、エリシターによる活性酸素産生を指標としてこれらの植物培養細胞のキチンオリゴ糖に対する応答性をみたところ、この応答性と結合蛋白質との間に極めて良い対応関係が見いだされた。以上の結果は、このキチンオリゴ糖結合蛋白質がエリシターの受容体として機能していること、また、植物間におけるエリシター応答性の差異が受容体レベルで決まっている可能性を示唆するものである。

F2p-07

シロイヌナズナホスホリパーゼC結合因子の機能解析
高橋征司^{1,2}、三上浩司³、片桐健^{1,2}、平山陸志¹、篠崎一雄^{1,2}
(¹理研・植物分子、²筑波大・生物化学、³基生研)

高等植物において、植物ホルモンなど種々の細胞外からの刺激によりイノシトールリン脂質代謝 (PI代謝) が活性化され、ホスホリパーゼC (PLC) によるPI (4, 5) P₂の代謝産物であるイノシトール3リン酸 (IP₃) の量が増大することが報告されている。我々がすでに単離しているシロイヌナズナの2種のPLC (AtPLC1S、AtPLC2) のうちAtPLC1Sは浸透圧ストレス依存的発現を示すことなどから、PLCが浸透圧ストレス応答のシグナル伝達に関与していることが示唆される。そこで、浸透圧ストレス応答におけるPLC活性調節機構を解明するため、酵母のTwo-hybrid systemによりPLC相互作用因子をスクリーニングしたところ、AtPLC1SとAtPLC2の両者に結合できるAtPLC1F1が単離された。

このAtPLC1F1について全長のcDNAをクローニングしたところ、534 bp、178 aa から成る、既知のタンパク質と相同性のない新規のタンパク質であることが分かった。大腸菌内で生成させたAtPLC1F1およびAtPLC1S、AtPLC2の組換えタンパク質を用いて *in vitro* における活性測定を行ったところ、AtPLC1F1は各々のPLC活性を上昇させることが確認できた。このことより、AtPLC1F1を介した植物独自のPLC活性調節機構の存在が示唆される。これらAtPLC1S、AtPLC2およびAtPLC1F1について植物内における機能を解明するため、それぞれの形質転換植物を作製した。現在これらの形質転換植物について解析を行っている。

F2p-08

ジャガイモ塊茎に存在するホスホリパーゼA₂活性に対するマストパランの影響
仙田香織、道家紀志、川北一人（名大院・生農・資源生物機能）

ジャガイモ植物とその疫病菌の系においては、宿主の誘導抵抗反応発現に至る細胞内情報伝達系にホスホリパーゼ (PL) A₂ が関与し、リノール酸カスケードの初発酵素として主導的役割を担っていると推定される。今回、菌体エリシター (HWC) 処理したジャガイモ塊茎膜画分に認められるPLA₂ 活性に、GTP結合タンパク質が関与するかどうかについて検討した。GTP結合タンパク質の活性化因子であるマストパランとその不活性化型アナログ Mas-17 を用いて PLA₂ 活性に対する影響を *in vitro* 系で調べたところ、HWC 処理区より調製した膜画分でマストパランによる PLA₂ 活性の増大がみられた。次に、PLC 阻害剤ネオマイシンあるいはプロテインキナーゼ阻害剤スタウロsporinをあらかじめ膜画分に処理した後、PLA₂ 活性に対するマストパランの影響について調べた。その結果、両阻害剤前処理によりマストパランによる PLA₂ 活性の増大はみられなかった。従って、本系の PLA₂ 活性は PLC、プロテインキナーゼなどの情報伝達系を介して GTP 結合タンパク質の制御を受けている可能性が示唆された。