

F2p-09

エリシター処理したタバコ葉における液胞プロセシング酵素の発現

池田恵子, 西村いくこ¹, 西村幹夫¹, 道家紀志, 川北一人 (名大院・生農・資源生物機能, ¹基生研・細胞生物)

タバコ植物を疫病菌菌体壁成分 (HWC) や種々のエリシターで処理すると、抵抗反応が誘導されることが知られている。タバコ葉を HWC、サリチル酸、アラキドン酸、ラミナリンで処理したところ、過敏細胞死が認められ、また PR1b、PR2、PI-II の遺伝子の発現誘導がノーザン解析により確認された。次に、液胞タンパク質の成熟化に関わるシステインプロテイナーゼである液胞プロセシング酵素 (VPE) が、タバコ植物の誘導抵抗反応に関与する可能性について調べた。シロイヌナズナ VPE 遺伝子をもとにプライマーを作成し、HWC 処理したタバコ葉 RNA を用いた RT-PCR によりタバコ VPE 遺伝子断片を得た。これをプローブとしてサリチル酸処理したタバコ葉についてノーザン解析を行ったところ、VPE 遺伝子の発現が誘導された。また種々のエリシター処理による VPE 遺伝子の発現誘導について検討した。

F2p-10

タバコ植物における疫病菌菌体壁エリシター誘導性遺伝子の Differential Display 法によるクローニング

竹本大吾, 林 誠¹, 道家紀志, 西村幹夫¹, 川北一人 (名大院・生命農学・資源生物機能, ¹基生研・細胞生物)

タバコ葉を *Phytophthora infestans* 菌体壁成分エリシター (HWC) で処理したところ、ウエスタン解析により処理後 12 時間から PR-タンパク質の蓄積が検出され、2 日後には細胞死が観察された。そこで、HWC 未処理および処理後 12、36 時間のタバコ葉より全 RNA を抽出し、RT-PCR による Differential Screening を行った。132 種のランダムプライマー (12 mers) を用いて RT-PCR を行い、HWC 処理タバコ葉の RNA を鋳型とした場合に特異的に増幅した PCR 産物を得た。ノーザン解析により、これらのうち 2 種が HWC 処理にตอบสนองし発現量の増加が見られた。2 種の遺伝子断片の塩基配列を決定したところ、1 種はフェニルプロパノイド代謝系に関わるシトクロム P450 と同性を示し、1 種は未知の遺伝子であった。さらに特異的プライマーによる RT-PCR 解析により 1 種が HWC 誘導性を示した。この遺伝子断片は、既知の抵抗性遺伝子と同性を示した。

F3a-01

オオムギのベルオキシゾーム型ベタインアルデヒド脱水素酵素 cDNA を導入したイネの作出と耐塩性の解析

林 泰行¹, 田中 章¹, 常富紀子¹, 石谷 学, 高倍昭洋², Angelina A. Nakase, Andre T. Jagendorf, 高倍 鉄子 (名古屋大・生物分子応答研, ¹植物工学研, ²名産大・総合研)

演者らはこれまでイネ科の植物のグリシンベタイン合成系について研究を行って来た。その結果、オオムギのベタインアルデヒド脱水素酵素 (BADH) が C 端に SKL というベルオキシゾームに輸送されるための移行配列を持っていることを cDNA のクローニングにより明らかにした (1)。また本遺伝子をタバコに導入し、免疫電顕により実際にベルオキシゾームに局在することも明らかにした。またグリシンベタインを蓄積しないイネも少量ではあるが、BADH を持ち、クローニングによりイネの本酵素もベルオキシゾーム型であることを明らかにした (2)。

今回オオムギの BADH cDNA をイネに導入した。得られた形質転換体について Northern, Western 及び活性染色法で BADH の過剰発現を確認した。また 150 mM の NaCl 存在下で、24 時間でコントロール及び形質転換イネは葉の先端が枯れ始めるが、BADH の基質であるベタインアルデヒドを 1 mM 添加すると形質転換体のみ緑色を保っていた。また塩ストレス下でベタインアルデヒドを添加した時、形質転換体の根の生育がコントロールに比べて良好であった。

(1) M. Ishitani et al. Plant Mol. Biol. 27, 307-315 (1995)

(2) T. Nakamura et al. Plant J. 11, 1115-1120 (1997)

F3a-02

オオムギのマイクロボディ型ベタインアルデヒド脱水素酵素と局在性の異なるアイソザイム遺伝子の単離とその発現解析

中村敏英, 野村美加¹, Maurice S. B. Ku², 高倍鉄子 (名古屋大・生物分子応答研究センター, ¹香川大・農, ²ワシントン州立大・植物)

耐塩性の高い植物には適合溶質の一種であるグリシンベタインを蓄積しているものが多く、グリシンベタインは高塩濃度下における浸透圧調節を担う重要な物質であると考えられている。高等植物においてグリシンベタインは、コリンからコリンモノオキシゲナーゼ (CMO) とベタインアルデヒド脱水素酵素 (BADH) によって合成される。

BADH は様々な植物で解析が行われており、ホウレンソウやソルガムなどでそのアイソザイムの存在が示唆されている。今回、我々は免疫化学的手法によりオオムギに BADH アイソザイムが存在することを示唆する結果を得た。またオオムギの cDNA ライブラリーからアイソザイム遺伝子を単離した。このアイソザイム遺伝子から推定されるアミノ酸配列の解析から、これまでに単離したオオムギの BADH (マイクロボディ型) (文献 1, 2) と細胞内局在性が異なることが推測された。さらにノーザン解析により様々な環境下での遺伝子発現を調べたところ、この二つの遺伝子の発現様式が異なることを見いだした。

1, Ishitani M., Nakamura T. et al. (1995) Plant Mol. Biol. 27, 307-315

2, Nakamura T. et al. (1997) Plant J. 11, 1115-1120

F3a-03

塩ストレスによるタンパク質脱リン酸化酵素 2C 遺伝子の発現誘導

宮崎さおり, Hans. J. Bohnert¹, 福原敏行 (東京農工大・農・細胞分子, ¹アリゾナ大)

我々は塩ストレスや乾燥ストレスを受けて光合成を C3 型から CAM 型に変化させる塩生植物、アイズプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)から 10 種のタンパク質脱リン酸化酵素のホモログ(MPC1-MPC10)を単離した。MPC2 と MPC5 は塩ストレスで誘導され、主に根で発現していた。MPC8 は葉に特異的に発現していた。大腸菌内で発現させた MPC2, MPC5, MPC6, MPC8 の GST 融合タンパク質はマグネシウムイオン存在下で脱リン酸化の活性を持つことが示され、オキサダ酸によって阻害されなかった。このことはこれらの遺伝子がタンパク質脱リン酸化酵素タイプ 2C をコードすることを示している。現在、MPC2 遺伝子のプロモータ領域を解析している。

F3a-04

水ストレスで誘導されるシロイヌナズナの Cys2/His2 型 Zn-finger 遺伝子群の解析

坂本秀樹・荒木 崇・飯 哲夫・岩淵樹樹
(京大・院・理・植物)

Cys2/His2 型 Zn-finger は、よく解析されている DNA 結合モチーフの 1 つで、動物や酵母では、このモチーフをもつ数多くの転写制御因子が報告されている。

我々は、高等植物における Cys2/His2 型 Zn-finger 蛋白質遺伝子群の役割に関心をもち、シロイヌナズナの AZF1 (*Arabidopsis* Zn-finger protein 1), AZF2, STZ (salt tolerance Zn-finger), 及び、コムギの WZF1 遺伝子を用いて、発現の環境応答に焦点をあてた解析をすすめている。RNA プロット解析、及び whole mount *in situ* RNA ハイブリダイゼーションの結果から、これらの遺伝子は、いずれも根において強く発現しており、低温、乾燥、塩といった水欠乏に関連したストレスに応答して発現レベルが制御されていることが明らかとなった。また、低温や ABA 処理に対する応答性は AZF1 と AZF2 及び STZ で異なり、それらの機能分担が示唆された。

F3a-05

シロイヌナズナの乾燥ストレス耐性および形態形成におけるプロリンの役割

植城時彦^{1,2}, 吉羽洋周³, 真田幸香⁴, 和田敬四郎⁴, 塚谷裕⁵, 角張嘉孝⁶, 篠崎和子⁷, 篠崎一雄¹ (¹理研・植物分子, ²岐阜大・農・生物環境科学, ³日立製作所基礎研究所, ⁴金沢大・理・生物, ⁵東京大・分生研, ⁶静岡大・農, ⁷農水省・国際農研)

微生物と同様に高等植物も、浸透圧ストレスにตอบสนองして細胞内にプロリンを蓄積する。そして内生プロリンの増加にともない、植物はストレス耐性を獲得すると考えられている。しかし、プロリンの植物体での機能に関してはいまだ不明な点が多い。本研究では、植物におけるプロリンの機能の解明を目的として、シロイヌナズナの形質転換体を持ちいてプロリンの機能解析をおこなった。高等植物では、プロリン生合成系の律速段階の反応を触媒する酵素は P5CS (Δ1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) である。シロイヌナズナにおいて P5CS 酵素をコードする遺伝子は乾燥誘導性であることがわかっている。アンチセンス法により P5CS 遺伝子の発現を抑制した形質転換体を作成した。乾燥処理をおこなった後に内生プロリン量を計測した結果、野生型ではプロリン蓄積量が大きく増加したが、形質転換体数ラインではプロリンの蓄積がほとんど見られなかった。プロリン合成能が著しく低いこれらの形質転換体は、顕著な乾燥感受性を示した。一方この形質転換体では、花茎および本葉の葉柄の伸長成長が抑制されており、葉身は扁平な形状を呈し葉柄との境界付近が黄化した。形質転換体の乾燥感受性および形態異常は、外生的に与えた L-プロリンによって相補されたが、D-プロリンによっては相補されなかった。以上の実験結果、プロリンが高等植物の乾燥耐性に寄与していることが直接的に証明されただけでなく、花茎の伸長や葉の成長など植物の形態形成にプロリンが特異的に関与していることが示唆された。さらに、これらの変異形質が L-プロリンのみにより相補され D-プロリンをはじめ他のアミノ酸では相補されないことから、プロリンが乾燥耐性や形態形成にかかわる特定のタンパクの構成要素として特異的に機能していると予想された。

F3a-06

シロイヌナズナの MYC 相同性転写因子 rd22BP1 の転写活性化に関する機能解析

安部洋^{1,3}, 浦尾剛¹, 篠崎和子¹, 細川大二郎³, 篠崎一雄²
(¹農水省・国際農研, ²理研・植物分子, ³農工大・農)

シロイヌナズナの乾燥応答性遺伝子 rd22 の遺伝子発現機構を明らかにするために解析を行なっている。これまでに rd22 遺伝子の 67bp の乾燥応答性のシス領域に存在する MYC 認識配列に特異的に結合する MYC 相同性タンパク質をコードする rd22BP1 遺伝子を単離した。rd22BP1 遺伝子は乾燥処理に対し 10 分という非常に早い時間に誘導された。また rd22BP1 は 67bp の乾燥応答性のシス領域を介した転写活性化能を有している事をプロトプラストを用いた一過性の発現実験から明らかにするなど、rd22BP1 が rd22 遺伝子の乾燥応答性の遺伝子発現に関与している可能性を示してきた。これまで植物においてはいくつかの MYC 相同性転写因子が報告されており、トウモロコシの B タンパク質においては詳細なドメイン解析が行われているが、転写活性化ドメインの存在については明らかにされていない。今回我々は rd22BP1 の C 末端を欠失したタンパク質を用いて転写活性化に関するドメイン解析を行ない rd22BP1 の転写活性化ドメインが N 末端に存在する事を明らかにしたので報告する。

F3a-07

シロイヌナズナにおいて葉緑体に移行する Clp プロテアーゼ調節サブユニットホモログをコードしている遺伝子 *erd1* の発現解析

中島一雄、篠崎和子、篠崎一雄¹

(国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において乾燥1時間以内に発現が誘導される ERD1 cDNA のコードするタンパク質は、Clp プロテアーゼ調節サブユニットと相同性が高く、N末端には葉緑体にタンパク質をターゲティングさせるシグナルペプチド様配列が存在した。ERD1 タンパク質の N 末端 1-105 アミノ酸の遺伝子を green-fluorescent protein (GFP) の遺伝子と融合して、シロイヌナズナのプロトプラストに導入したところ、GFP 蛍光がプロトプラストの色素体に見いだされたことから、ERD1 タンパク質は色素体にターゲティングされることが示唆された。シロイヌナズナのノーザン解析と *erd1* 遺伝子の上流領域 (-723→+164) /β-グルクロニダーゼ (GUS) キメラ遺伝子を導入した形質転換タバコあるいは形質転換シロイヌナズナを用いた解析から、*erd1* 遺伝子のプロモーターには乾燥や高塩といった水ストレスに対する応答性だけでなく、自然条件の老化や人工的な老化である暗処理によっても正に制御されていることが明らかになった。現在 *erd1* 遺伝子プロモーター中の乾燥応答・老化認識シスエレメントの解析を進めている。

F3a-08

シロイヌナズナのブロリンデヒドロゲナーゼ遺伝子 *erd5* の発現解析

佐藤里絵、中島一雄、清未知宏¹、篠崎和子、篠崎一雄¹ (農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

ブロリンは植物が水分ストレス下で浸透圧調節物質として細胞内に蓄積する適合溶質のひとつである。我々はブロリン分解酵素、ブロリンデヒドロゲナーゼの cDNA である ERD5、及びそのプロモーター領域をシロイヌナズナから単離した。これまでに、ノーザン解析及び *erd5* 遺伝子のプロモーター領域をβ-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子と結合し導入した形質転換シロイヌナズナの解析から、*erd5* 遺伝子の発現は乾燥処理で抑制され、吸水及びブロリン処理で促進されること、吸水及びブロリン処理幼植物体においては根や葉で特に強く発現することを明らかにしている。そこで *erd5* 遺伝子の発現機構をさらに明らかにするため、*erd5* 遺伝子のプロモーター・GUS または LUC (luciferase) キメラ遺伝子を導入した形質転換植物を用いて詳しく解析した。その結果、*erd5* 遺伝子は吸水及びブロリン処理を行わない植物において発芽時の根の他、根頭や葯といった生殖器官で強く発現していることが示された。さらに、プロモーター領域に欠失変異を加えて、吸水及びブロリン応答性のシス因子の解析を行った結果を報告する。

F3a-09

耐旱性マメ科カウビーのABA合成に関する乾燥誘導性遺伝子の解析

井内 聖¹、篠崎 和子^{2,1}、篠崎 一雄¹ (¹理研・植物分子、²農水省・国際農研)

高等植物は種々の環境ストレスに対し、生理的応答をすると同時に遺伝子発現レベルでも応答しその変化に適応している。マメ科カウビーは主に西アフリカなどの乾燥地で栽培され、重要な植物性蛋白源として用いられている。

我々はカウビーを実験材料に用い、乾燥によって誘導される遺伝子の機能及び発現の解析を行っている。カウビーでは乾燥条件下で蓄積する ABA のレベルが他の植物に比べて顕著に高い。ディファレンシャルスクリーニング法を用いて乾燥誘導性遺伝子の cDNA を4種類取得した。塩基配列を決定した結果、ABA 生合成に関わるネオキサンチン開裂酵素と高い相同性を示した cDNA (CPRD65) を見出した。ノーザン法による発現解析から CPRD65 遺伝子は乾燥及び高塩濃度処理によって遺伝子発現が誘導されたが、低温や高温処理によって誘導されなかった。乾燥条件下での ABA の蓄積はネオキサンチン開裂酵素の遺伝子の発現誘導により制御されると考えられる。

F3a-10

シロイヌナズナ *rd29B* 遺伝子の乾燥および ABA 応答に関するシスエレメントに結合する bZIP 型タンパク質をコードする cDNA の単離

宇野 雄一¹、篠崎 和子¹、篠崎 一雄² (国際農林水産業研究セ・生物資源¹、理研・植物分子²)

シロイヌナズナの *rd29B* 遺伝子は、乾燥により3時間以内に発現し、アブシジン酸 (ABA) によってもその発現が誘導される。また、ABA 変異体を用いてノーザン解析を行った場合、*aba1* では、乾燥処理によって発現が誘導されず、*abi1* でも、かなり抑制される。これらの結果から *rd29B* 遺伝子の乾燥応答による発現は、主として ABA を介した経路を通して行われるものと考えられる。GUS 融合遺伝子を導入したトランスジェニック・タバコを用いて *rd29B* 遺伝子のプロモーター解析を行った結果、-169 から -93 までの 77 塩基が乾燥誘導に関与していることが明らかになった。この 77 塩基中には、1 個の MYB 認識配列と 2 個の ABRE 配列 (ABA Responsive Element) が含まれており、これらの配列に塩基置換を入れた断片を用いて解析した結果、ABRE が乾燥誘導に関与するシス因子であることが明らかになった。そこで、酵母の one-hybrid 系を用いてこのシス領域に特異的に結合するタンパク質をコードする cDNA を単離した。これらの cDNA の塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、新規の bZIP 型タンパク質をコードすることが確認できた。

F3a-11

シロイヌナズナの乾燥・低温ストレスによる遺伝子発現を制御するシス因子 DRE に結合するタンパク質をコードする遺伝子 DREB の解析
佐久間 洋、劉 強、安部 洋、春日美江、三浦節子、篠崎和子、
¹篠崎一雄

(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

我々は、初期の水ストレスシグナルから遺伝子発現までのシグナル伝達機構を解明するため、水ストレスにより誘導されるシロイヌナズナの遺伝子の解析を行っている。乾燥、塩、低温応答性遺伝子 *rd29A* のプロモーターを解析して乾燥、塩、低温ストレスによる遺伝子発現に関与するシスエレメント、DRE (Dehydration Responsive Element) を同定した。さらに酵母の one-hybrid の系を用いて DRE に結合するタンパク質をコードする DREB1、DREB2 cDNA をクローニングした。DREB タンパク質は EREBP/AP2 に見られる DNA 結合ドメインを保持している。大腸菌中で発現させた DREB タンパク質は、*rd29A* プロモーター中の DRE 配列に特異的な結合特性を示した。DREB1 には 2 つ、DREB2 には 1 つのホモログが存在し、この DREB1 ファミリーの遺伝子は低温により、DREB2 ファミリーの遺伝子は乾燥、高塩濃度により誘導された。また葉肉プロトプラストを用いた転写活性化の実験により、 β -glucuronidase レポーター遺伝子と融合した *rd29A* プロモーターが、DREB によって活性化されることが示された。さらにリコンビナントタンパク質と変異を導入した DRE 配列を用いて、DREB1、DREB2 の認識配列を詳細に解析した。

F3a-12

乾燥、塩、低温ストレス誘導性転写因子 DREB1A, DREB2A を過剰発現させたシロイヌナズナの解析

春日美江、三浦節子、劉 強、篠崎和子、篠崎一雄¹

(農水省国際農研 生物資源部、¹理研 植物分子生物)

我々は、既に乾燥、塩、低温ストレス誘導性遺伝子 *rd29A* のプロモーター領域の解析により、ストレス応答に関するシスエレメント DRE の配列を明らかにし、これに結合する転写因子の cDNA、DREB1A、DREB2A を単離した。今回は、DREB1A、DREB2A を導入したシロイヌナズナの解析について報告する。DREB1A、DREB2A cDNA を、35S⁺ プロモーターを用いてシロイヌナズナに過剰発現させ、それぞれ、18ライン、9ラインのトランスジェニック植物を得た。DREB1A を導入した植物では、全体に矮生の表現形が見られ、特に 3 ラインでは顕著であった。他のラインについても、成長に遅れが見られた。さらにノーザン解析の結果、表現形の強さは導入遺伝子である DREB1A 遺伝子の発現量に応じていることがわかった。また、ターゲット遺伝子である *rd29A* 遺伝子は DREB1A 遺伝子の発現に応じてストレスを与えていないコントロール状態においても発現していた。DREB2A を導入した植物では DREB1A を導入した植物に比べ、*rd29A* 遺伝子の発現量も、表現形も弱かった。

F3a-13

シロイヌナズナの乾燥・低温応答性シスエレメント DRE に結合するタンパク質をコードする DREB1 遺伝子ファミリーの同定及び発現解析
Zabta K. Shinwari、中島一雄、三浦節子、春日美江、篠崎和子、
篠崎一雄¹ (国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

浸透圧ストレスあるいは低温ストレスから遺伝子発現にいたるシグナル伝達機構について明らかにするため、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の乾燥・低温応答性シスエレメント DRE に結合するタンパク質をコードする DREB1 遺伝子ファミリーについて解析した。DREB1A cDNA をプローブにしてゲノミックサザン解析を行うとシロイヌナズナのゲノム中に複数の DREB1 遺伝子が存在することが明らかになった。そこでゲノミックライブラリーをスクリーニングして得られたクローンの解析を行った。その結果、約 8.7 kb の長さのゲノム DNA 中に 3 種類の DREB1 遺伝子 (DREB1A、DREB1B、DREB1C) がタンデムに並んでコードされていることが判明した。ノーザン解析から、これら 3 種の DREB1 遺伝子は低温で発現し、浸透圧ストレスでは発現しないことが明らかになった。さらに、これら 3 種の DREB1 遺伝子の 5' 側上流プロモーター領域には 3 種のプロモーターの間で保存された配列が見いだされた。現在、これら 3 種の DREB1 遺伝子の 5' 側上流領域と GUS レポーター遺伝子を融合させたキメラ遺伝子を導入したタバコおよびシロイヌナズナの解析を行っている。

G1a-01

ニチニチソウ細胞のリン酸吸収時の呼吸と細胞質pHの調節

坂野勝啓、野口航¹、矢崎芳明、清田誠一郎、上田真吾²
(農水省・生物研、¹筑波大学・生物科学系、²通産省・資源研)

ニチニチソウ細胞による無機リン酸の吸収はH⁺との共輸送機構によるので細胞質の酸性化が引き起こされ細胞内pH調節機構が活性化される。プロトンポンプの作動と共に、Malic enzymeによるリンゴ酸の脱炭酸反応(Biochemical pH-stat)が促進されて余分のH⁺を消費し、細胞質の極端な酸性化を阻止している。好気条件下ではリン酸吸収は炭酸ガス生成と酸素吸収を促進する。酸素吸収はシアン耐性で、Alternative pathway respirationがBiochemical pH-stat機構の一部であり、H⁺の最終処理機構であることを示唆している。我々はこの点を確認するために、①シアン耐性呼吸の阻害剤の細胞質pH調節への影響、②ミトコンドリア電子伝達系で、チトクロム系とAOX系への電子分配がリン酸吸収によりどのように変化するか安定同位体¹⁸O/¹⁶Oの分別比を用いて検討している。

G1a-02

植物細胞の細胞質pH調節：呼吸阻害剤の影響
矢崎芳明、坂野勝啓(農水省・生物研)

細胞質pHの調節機構として、細胞膜・液胞膜のプロトンポンプおよびBiochemical pH-statが知られている。低酸素ストレス下ではプロトンポンプよりも、Biochemical pH-statがpH調節に重要な役割を果たすものと考えられる。しかし、Davies(1986)の説では、実質的にプロトンを消費する機構が曖昧であった。我々は昨年の植物学会で、その実体は嫌気条件下では乳酸・エタノール発酵、好気条件下では呼吸であることを指摘した。そこで特にシアン耐性呼吸に注目し、シアン耐性呼吸を阻害した場合の細胞質pHの変化を測定して、Biochemical pH-statとしてのプロトン消費機構を検討した。

ニチニチソウ培養細胞とイネ培養細胞を試料とした。細胞質・液胞pHは、³¹P-NMRを用いて測定した。また、酸素吸収速度は酸素電極法で測定した。

シアン耐性呼吸の阻害剤(nPG;n-propyl gallate)のみでは、細胞質・液胞のpHに変化は見られなかった。シアン感受性呼吸の阻害剤(KCN)では、細胞質の酸性化と液胞のアルカリ化が見られた。その後nPGを加えると液胞のpHに変化は見られないが、細胞質はさらに酸性化した。

この結果は、プロトンポンプがpH調節に重要であると同時に、シアン耐性呼吸もBiochemical pH-statに寄与していることを示唆している。

G1a-03

空色西洋アサガオ花弁の花色変異と液胞膜のプロトン輸送活性

吉田久美、亀田清、前島正義¹、近藤真紀²、難波千代子²、西村幹夫²、近藤忠雄³(福山大・生活・食品栄養、¹名大・農・生、²基生研・細胞生物、³名大・化調機セ)

空色西洋アサガオ(*Ipomoea tricolor*)のツボミは赤紫色で開花に伴い空色に変わる。我々は細胞内微小pH電極を用いて液胞のpH(pH_v)を直接測定し、開花に伴ないpH_vが6.6(ツボミ)から7.7(空色花)へ上昇するために花色が変化することを明らかにした¹⁾。この液胞pH上昇機構の解明を目的に、ツボミおよび開花花弁より表層の色素細胞の液胞膜を調製し、膜上のプロトンポンプについて調べた。免疫プロット、および、免疫電顕の結果から、ツボミと開花花弁のいずれにもV-ATPaseとPPaseが存在した。両酵素の加水分解活性、およびプロトン輸送活性にも開花ステージによる差は殆どなく、空色開花花弁でも、プロトンの液胞内への輸送活性が認められた。このことから、液胞のpH上昇は、他のK⁺等のイオンの輸送によることが示唆された。

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

G1a-04

酵母を用いたヤエナリ液胞膜H⁺-ピロホスファターゼの発現系構築

中西洋一、和田洋*、前島正義(名大院・生命農・生、*阪大・産研)

(目的) 植物の液胞膜H⁺-ピロホスファターゼ(H⁺-PPase)は無機ピロリン酸(PPi)を基質として液胞内にH⁺を能動輸送する酵素である。この酵素は分子量80kDaの単一ポリペプチドからなる単純な構造をしており、基質も単純な高エネルギーリン酸化化合物であることから、プロトンポンプのモデル分子といえる。本研究では人為的な変異導入による構造・機能解析を行う目的で酵母での発現系を構築した。

(方法及び結果) ヤエナリ(*Vigna radiata*)のH⁺-PPase cDNA(VVP2)を酵母*S.cerevisiae*のGAP-DHプロモータをもつベクターに組み込み、酵母で発現させた。発現株の液胞膜画分に1)免疫プロットで反応する特異的なバンド、2)KFに非感受性のPPi水分解活性、3)PPiに依存したH⁺輸送活性が検出され、正常な活性を持つ酵素が発現していることが明らかになった。酵母液胞のH⁺-PPaseによる酸性化の影響についても考察する。

G1a-05

イネ液胞膜H⁺-ピロホスファターゼのgenomic DNAの解析

榎原祥清、川崎信二¹、小林秀行
(農水省・食総研、¹農水省・生資研)

液胞膜H⁺-ピロホスファターゼ (V-PPase) は、植物や光合成細菌に特徴的なプロトンポンプである。いくつかの植物種でそのcDNAがクローニングされ、一次構造が明らかにされているが、genomic DNAの構造については報告がない。我々はイネのBACライブラリーより、既に得られている4種類のcDNAクローン (OVPI, 2, 3, 5) をプローブに用いて、各々に対応するゲノミッククローンを単離した。そのうちのOVPI、OVP2に相当するクローンについてDNA塩基配列を解析した。その結果、OVPI、OVP2ともに、そのORF中に7つのイントロンが存在し、その挿入位置はよく一致していた。7つのうち6つのイントロンは82~170bpの長さであったのに対し、最も上流のイントロンは1,869bp (OVPI)、1,397bp (OVP2) と長いものであった。翻訳開始点より上流の配列をホモロジー検索したところ、イネにおいて塩ストレスで誘導されるタンパク質として単離された、saIIの5'上流域の配列と相同性のある部分が存在していた。他の2つのゲノミッククローンについても解析中である。

G1a-06

シャジクモ液胞膜H⁺-ピロホスファターゼのcDNAクローニングと一次構造比較

松田奈緒、中西洋一、相澤研二、櫻山拓¹、山本啓一¹、三村徹郎²、池田己喜子³、前島正義(名大院・生命農、¹千葉大・理、²橋大、³岡山県大・保健福祉)

液胞膜H⁺-ピロホスファターゼ(V-PPase)は約80kDaの酵素で単純構造のPPIを基質とし、H⁺ポンプの優れたモデル分子として位置づけられる。系統学的に離れた種のV-PPase一次構造を知ることとは分子進化と構造-機能相関の解析に重要な情報をもたらす。そこで緑藻の1種シャジクモ(*Chara*)のV-PPaseのcDNAを解析した。若い細胞のmRNAからcDNA libraryを作成し、既知のV-PPaseで保存性の高い部分をDNAプローブとして目的cDNAをスクリーニングした。*Chara*のV-PPaseは793アミノ酸からなり、一次構造の比較ではオオムギ、ヤエナリ酵素と約70%のidentityを示した。N端が長いという特徴をもち、基質結合部位、DCCDおよびNEM結合部位と推定される残基が保存されていた。遺伝子のコピー数も議論する。

G1a-07

シロイヌナズナ H⁺-PPase 遺伝子の構造解析

光田屋隆、¹柳沢修一、竹安邦夫、佐藤雅彦
(京都大・総合人間・生物科学、¹東京大・総合文化・生命科学)

植物の液胞膜には2種類のプロトンポンプ (V-type H⁺-ATPase と H⁺-PPase) が存在する。前者はATPを加水分解して得られるエネルギーによりプロトンを液胞内に輸送するもので、後者はATP加水分解の副産物ともいえるピロリン酸を加水分解して得られるエネルギーによりプロトンを輸送するという植物に特異的なものである。このポンプは、生体のエネルギー利用効率という観点からも、また、なぜ植物にだけ存在するのかといった観点からも非常に興味深い。我々はこのH⁺-PPase (770アミノ酸からなる分子量8万Daの膜タンパク質で、12の膜貫通領域を持つと推定される) をコードする遺伝子の全長 (約3.1kb) およびその上流領域 (約1.4kb)、下流領域 (約1.5kb) を、インバーテッドPCR法によってクローニングし、その塩基配列を明らかにした。この遺伝子は7つの短いイントロン (80~200塩基対) と8つのエキソンから構成され、第7および第8エキソンには膜貫通領域が含まれず、膜貫通領域をコードしていると考えられている領域のうち1つ (M11) はイントロンによって分断されていた。また、上流領域には転写因子 Dof (DNA-binding domain with only one zinc finger) の結合領域とされるコンセンサス配列が複数存在した。現在、これらの領域に対するDofの結合を原子間力顕微鏡により解析中である。

G1a-08

カサノリ V-ATPase, proteolipid サブユニットの6種類のアイソフォームについて

池田己喜子、馬見公子、渡辺洋子¹ (岡山県大・保健福祉部・栄養、¹川崎医大・生化学)

カサノリは巨大な単細胞の海水中で生育する緑藻類に属する。我々は、高等植物液胞膜と同様にこの生物体の液胞膜には二つのプロトンポンプ、V-ATPase 及び H⁺ 輸送性ピロホスファターゼが存在することを実証した。更に V-ATPase, proteolipid サブユニットの cDNA クローニングを進め、6種類の cDNA クローン (VC1-VC6) を単離した: VC1 (752 bp, ORF; 91-585, 164 aa), VC2 (825 bp, 68-598, 176 aa), VC3 (1,032 bp, 66-560, 164 aa), VC4 (752 bp, 61-567, 168 aa), VC5 (722 bp, 51-554, 167 aa) 及び VC6 (826 bp, 55-561, 168 aa)。これらの一次構造はシロイヌナズナ proteolipid に76%以上一致した。また、相違点は、codon usage, 5' 及び 3' 非翻訳領域にみられ、アミノ酸配列からは二つのグループに分類された: VC1/3 と VC2/4/5/6。3' 非翻訳領域に特異的なプローブを用いたノーザン解析により、それぞれ発現量に差がみられ、4グループに分類できた (VC4/6 >> VC3, VC2/5 >> VC1)。現在、成長段階と発現量を追跡している。

G1a-09

クロスリンカーを用いたヤエナリ液胞膜H⁺-ATPaseの4次構造解析
河村 幸男、吉田 静夫 (北大・低温研)

これまで我々の研究室で、液胞膜H⁺-ATPase (V-ATPase)の低温失活が植物の低温感受性と強く関わっていることを示してきた。V-ATPaseの低温失活機構を知る上で本酵素の4次構造を明らかにすることは重要と思われる。V-ATPaseは、8~13種のサブユニットで構成される複合酵素であり、高次構造はF₀F₁-ATPaseに似ている。F₀F₁-ATPaseはX-線構造解析やクロスリンカーを用いた実験で4次構造の解析が多数おこなわれているが、V-ATPaseの4次構造に関する解析は、動物、酵母などのV-ATPaseを含めてまだあまり進んでいない。今回、クロスリンカーの1つであるDSP(dithiobis(succinimidyl propionate))を用いてヤエナリV-ATPaseの4次構造の解析をおこなった。ヤエナリV-ATPaseのsubunitは9種知られているが、これらの近隣関係のいくつかが分かったので報告する。

G1a-10

植物液胞膜Ca²⁺/H⁺対向輸送体の一次構造と細胞内局在性

上岡華代、中西洋一、前島正義 (名大院・生命農・生化)

Ca²⁺/H⁺対向輸送体は植物液胞膜において、Ca²⁺-ATPaseと共に液胞内へのCa²⁺輸送を担うと考えられている。実際、ヤエナリ実生より単離した液胞膜小胞でも、対向輸送体の高い活性を検出している(本大会1997年度発表)。今回は、対向輸送体のcDNAクローニングを行い、その一次構造を解析すると共に、部分配列に対する特異的抗体を作製し、細胞内局在性を検討した。

ヤエナリ(*Vigna radiata*)の対向輸送体cDNAクローンの塩基配列は約 2kbpであり、読み取り枠から444 aaのタンパク質をコードすることが示唆された。推定アミノ酸配列は*A. thaliana*のCa²⁺/H⁺対向輸送体CAX1、CAX2に高いホモロジーを示した。Southern解析により、ヤエナリでは単一の遺伝子が対向輸送体をコードすることが推定された。対向輸送体に対する特異抗体を用いた免疫プロットでは、約40kDのポリペプチドが液胞膜のみ検出され、液胞膜での局在が明らかとなった。

G1p-01

シャジクモ節間細胞原形質膜の刺激受容初期イオン過程
大川和秋、筒井泉雄¹、野坂修一² (阪大・理院・生物、¹岡崎生理研・生体膜、²滋賀医・麻酔)

シャジクモ節間細胞の刺激受容後の初期イオン過程を電圧固定法により調べている。膜電位を -200mV より 20 mV 刻みに +60 ~ +100 mV まで方形波により 40~100 mSの時間だけ変えたときのイオン電流のパターンの解析結果を報告する。人工池水の組成である KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂, TESbuffer のいずれのイオンも、単独の組成でイオン強度が 0.05 から 0.1 mM 以上であると、膜電位の -100 mV より正側で、時間と電圧に依存した電流パターンが記録された。イオン強度を 0.04 mM に保ち、幾種類か糖により浸透圧のイオンチャンネル開口への影響を調べたが、イオンチャンネルの開口は記録されなかった。初期イオン電流のパターンは時間と、膜電位に依存して 2~5 種類程度に分離することができる。1. 容量電流成分、2. 容量電流成分の 2~20 mS の間に起こる膜コンダクタンス減少、3. -160mV より正側で、少量の主として内向きに流れる成分、4. -80mV より正側で顕著に外向きに流れる成分、5. 時間的に最も遅く現れ、内向きから外向きに変わる成分。年会では 4. の成分について講演する。

G1p-02

画像処理による膨圧秤法を用いた膨圧連続測定法の開発
浅井一視、田沢仁¹、岡崎芳次、岩崎尚彦 (大阪医大・生物、¹福井工大・応用理化学)

シャジクモ細胞の膨圧(P)を膨圧秤法¹⁾に画像処理を適用して連続的に測定する方法を開発した。

膨圧秤法では細胞に荷重(W)をかけてある程度変形(D)させておく。Pが変化するとDも変化するが、この変化を膨圧秤につけたガラス細管の上下の変化として顕微鏡で観察する。Wを変えることによりDを一定に保てば、Pと細胞にかけられているWは比例することになる。そこで我々は、まず、細胞にかけられるWをコンピューター制御のステップモーターによって自動化した。次に、ガラス細管の先端をビデオカメラで撮影し、画像処理をしてガラス管の位置が元に戻るようステップモーターを回転させてWを調節するようにした。この時の回転数を連続的に記録すればPの連続的な変化を測定できることになる。実際に、シャジクモ細胞を使って、その外液の浸透圧を順に上げてPを下げていったとき、その時のモーターの回転数と膨圧P(細胞内外の浸透圧差)は比例することが確かめられた。

1) Tazawa (1957) *Protoplasma* 48:342

G1p-03

電気的中性の法則の分子論的基礎

清沢 桂太郎 (大阪大大学院・基礎工・生物学)

電気的中性の法則は、本来は電解質溶液論における経験則で、ある大きな一定の体積内に存在する陽イオンによる陽電荷は、陰イオンによる陰電荷と等しいというものである。これを膜現象に当てはめると、膜を横切って流れる陽イオンと陰イオンが運ぶ電流の和は、外部からエネルギーが供給されない限り零であるという形になる。この電気的中性の法則は、細胞における受動的、能動的イオン輸送、イオン調節、興奮現象などを分子レベルで、あるいは超分子レベルで解明しようとする時、また、ミトコンドリアでのATP合成機構を説明する化学浸透説を正しく発展させるためにも重要な指導原理となる。この法則の正当性を論じる理論としては、現在のところHanai (1978)による平行平板コンデンサーモデルがあるが、これは電解質溶液内にやや特殊な状態を想定したものと感がある。私は今回Coulombの式から導かれる陽イオンと陰イオンを、最近接距離から ∞ にまで引き離すのに要するエネルギーと、それらの持つ熱エネルギーを比較することによって、電気的中性の法則の正当性を論証することに成功したので、それを報告する。

G1p-04

トウモロコシCa²⁺/H⁺アンチポーター遺伝子のクローニング

松岡隆史¹, 魚住信之^{1,2}, 武藤尚志^{1,2}

(名古屋大学・¹院農, ²生物分子応答研究セ)

トウモロコシには液胞膜の他にも原形質膜にも液胞型のCa²⁺/H⁺アンチポーターが存在することを先に明らかにした。これらのアンチポーターがそれぞれどのような機能を持っているかを明らかにするために、Ca²⁺/H⁺アンチポーターのクローニングを行った。まず既知のCa²⁺/H⁺アンチポーター遺伝子をもとにして相同性の高い領域からPCRプライマーを設計した。トウモロコシのcDNAライブラリーに対してPCRを行った結果、目的の位置にバンドが得られた。そこでこのPCR断片をもとにしてスクリーニングを行ったところ、全長約1.2kbのORFを含むcDNAを得ることができた。これはArabidopsisのCa²⁺/H⁺アンチポーターの一つであるCAX2とおよそ70%のホモロジーを示し、Ca²⁺/H⁺アンチポーターに特有のAcidic motifをもつ11回膜貫通型の膜タンパク質であることが推測された。

G1p-05

液胞酵素APIの自食作用に類似した輸送機構

大隅良典¹, S.V.Scott², D.J. Klionsky², 馬場美鈴³
(¹基生研, UC, Davis, 日本女子大・理)

液胞酵素の多くは分泌経路によりゴルジ体を経て液胞へと輸送される。一方アミノペプチダーゼI (API)は、細胞質から直接液胞へと輸送されることが示されている。

我々は細胞質のバルクの液胞内分解機構である自食作用に必須な遺伝子 (APG) の解析を進めている。それら14個のAPG遺伝子は全てAPIの液胞への輸送にも必須であることが明らかとなった。両者の液胞内への移行過程は飢餓条件による誘導性、速度論、生合成と分解と言った点で明らかに異なる生理作用である。APIの液胞への輸送過程を形態学的に解析した。その結果APIは、合成後直ちに細胞質中に凝集して未知の粒子と大きな複合体を形成する。この複合体は液胞の近傍で膜によって囲まれて直径約150nmの2重膜構造を形成し、液胞膜と融合し内膜に囲まれたAPI構造体を液胞内に放出する。この過程は、マクロオートファジーと全く同一の膜現象である。さらに興味深いことに栄養飢餓条件下には、API構造体は他の細胞質成分とともに選択的にオートファゴソーム内へと取り込まれる。従って2つの異なる経路が共通の分子装置を利用していることが明らかとなった。APIのシグナルペプチドの役割など自食作用様の輸送形態について議論する。

G1p-06

ダイコン細胞膜と液胞膜水チャネルのアイソフォーム遺伝子の発現特性

須賀しのぶ, 土屋知寛, 前島正義 (名大院・生命農)

植物の細胞膜と液胞膜には各々固有の水チャネルが存在する。水チャネルの植物における生理的役割を解明するためには、細胞膜と液胞膜の両水チャネルを同時解析する必要がある。そこで、私たちはダイコン (*Raphanus sativus*) の細胞膜水チャネル (PAQ1, PAQ2) と液胞膜水チャネル (γ VM23, δ VM23) の4種類をクローニングした。両タイプの一次構造の相同性は40%以下であり、細胞膜水チャネルは液胞膜型と比較して分子量が大きくN末端側の親水性領域が30残基ほど長かった。ダイコン実生と塊根を形成する各段階のダイコンにおいて、各水チャネルの遺伝子発現特性を器官別に解析した。両水チャネルともに、ダイコン実生の胚軸、ダイコンの葉脈、葉柄で高く発現していた。また、PAQが比較的高く葉でも発現していたのに対しVM23の発現は低いものであった。これらの特徴から水チャネルの機能について考察する。

G1p-07

ヒメフラスコモにおけるカルシウム貯蔵細胞小器官膜の水チャネル

田沢仁、菊山宗弘¹ (福井工大・応用理化学、¹放送大学・生物)

最近水チャネルが植物細胞の原形質膜及び液胞膜に存在することが明らかにされてきた。本研究は細胞質中の細胞小器官にも水チャネルが存在するかどうかという疑問に答えるために計画された。

ヒメフラスコモの節間細胞を、10 mM KClで処理し、膜興奮性を抑制した。それからCa²⁺キレート剤EGTAを含む等張液(345 mOsm)で液胞を灌流し、その内容をシリコン油中にしごきだした。得られた細胞抽出物にCa²⁺感受性の発光タンパク質エコーリンを少量加えた後、ほぼ等量の低張液(44 mOsm)を注入すると、エコーリンからの大きな発光が光電増倍管で観測された。このことは水和によってCa²⁺貯蔵細胞小器官からのCa²⁺放出が起こったことを示す。この発光は細胞を予め、水チャネルの阻害剤HgCl₂(0.1 mM)で2.5分処理すると、著しく減少した。ところが細胞をHgCl₂処理後直ちに10 mM 2-メルカプトエタノールで洗うと、阻害は見られなくなった。これらの事実は、Ca²⁺貯蔵細胞小器官の水和によるCa²⁺放出に水チャネルが関与していること、言い換えれば、細胞小器官の膜にも水チャネルが存在することを示唆する。

G1p-08

車軸藻細胞のリン酸輸送；リン酸/Na⁺共輸送系の証明とその誘導機構の解析

三村徹郎、大隅良典¹、N.A. Walker²、R.J. Reid²、F.A. Smith² (一橋大・生物、¹基生研・細胞機構、²Dept. Botany, Univ. Adelaide)

車軸藻の単離節間細胞をリン酸を含まない液に保存すると、成長や分裂と独立に細胞膜に高親和性のリン酸輸送系を誘導できることはすでに報告した。

本研究では、この細胞膜リン酸輸送機構の詳細を検討した結果、リン酸がNa⁺との共輸送系で取り込まれる可能性が示唆されたので、それについて報告する。リン酸輸送のNa⁺に対する親和性は約0.2mMである。リン酸取り込みの際に、膜電流の変化が観測されること、また、灌流法により細胞内からATPを除いて起電性H⁺ポンプの活性を止めるとリン酸の取り込み量が大きく減少することから、膜電位により駆動される輸送系と推定された。

また、リン酸取り込み活性の誘導機構について検討した結果、外液リン酸濃度が1mMで、誘導可能な活性の50%が阻害されてしまうこと、誘導には、外液リン酸だけでなく、外液Na⁺の有無も関与することが明らかになった。

G1p-09

イネ硝酸トランスポーターcDNAの単離

田中俊憲、長谷川博¹、井田正二² (長崎県総合農林試験場、¹滋賀県立大・環境科学、²京大・食研)

植物は主要な窒素源である硝酸を、通常根から吸収、利用するが、その吸収は硝酸トランスポーターと呼ばれるタンパク質が関与する。硝酸トランスポーターは、硝酸に対する親和性から、high affinity型とlow affinity型の2種類が存在することが知られているが、その機能構造・発現調節など硝酸吸収についての詳細は不明である。我々は、植物における硝酸吸収のメカニズムを解明するためイネからhigh affinity型の硝酸トランスポーターcDNAを単離したので報告する。

オオムギのhigh affinity型硝酸トランスポーターcDNAをプローブとしてイネのcDNAライブラリーをスクリーニングし、ポジティブクローンを得た。決定された塩基配列から、得られたクローンは、オオムギのアミノ酸配列と84%のホモロジーを示し、12個の膜貫通領域が存在することが明らかとなった。また、N末領域に、イネ亜硝酸還元酵素と80%の類似性があり、これまで報告のない10残基のアミノ酸配列が認められた。ノザン分析により硝酸濃度によるmRNAの蓄積を観察したところ、20 μMでmRNAの蓄積が観察され、濃度とともにその蓄積量は増加し、500 μMでピークとなったが、それ以上の濃度では減少した。

G1p-10

亜硝酸トランスポーター遺伝子発現レベルが植物の窒素利用効率に与える影響

圓桂子、尼子克己、高橋正昭 (大阪府大・農・応用生)

細胞質での硝酸還元の結果生成した亜硝酸の葉緑体への移行は、硝酸同化の効率を維持し、炭素固定とのバランスを調節するためにも重要な過程である。我々は亜硝酸の輸送を行う緑色組織に特有なトランスポーターcDNA (*Nitr1*)をクローニングした。本研究では、*Nitr1*をセンス、及びアンチセンス方向に導入し、亜硝酸トランスポーターの発現レベルをを改変した形質転換タバコを用いて、植物の成長、窒素同化効率に亜硝酸の輸送量の変化が与える影響について調べた。

T₂、T₃世代を10 mMの硝酸のみを窒素源として、15日間水耕栽培した。アンチセンス株では生育が抑えられ、新鮮重は野生株の1/10、葉中の亜硝酸は3倍、硝酸は1.5倍に増え、一方タンパク量は1/3となっていた。亜硝酸輸送の抑制が窒素同化効率の減少を招いたと考えられた。一方、センス株では生育が促進され、新鮮重は野生株の1.7倍に増えたが、亜硝酸は1/3、硝酸は0.8倍に減少した。以上の結果より亜硝酸トランスポーターの抑制や強化が窒素同化及び生育に直接影響することが示された。*Nitr1*発現量と同化効率との関係も上の結果を支持する。

G1p-11

アルミニウムによるCharaのアルカリバンド形成の阻害
高野睦子、新免輝男（姫路工大・理・生命）

土地の酸性化による植物の傷害の原因としてアルミニウムが一般に認められるようになってきた。アルミニウムの植物に対する初期のターゲットとして細胞膜が考えられている。本研究は植物膜の好適な研究材料であるシャジクモ類の細胞を用いてアルミニウムの細胞膜に対する作用機構を解析することを目的としている。

Charaが中性以上のpH条件で光合成を行うと、炭素源として HCO_3^- が用いられて CO_2 が固定される結果、 OH^- が放出される。 OH^- の放出場所が細胞の特定の部分に限られているために、細胞の表面にアルカリのバンドが形成される。本実験においてはこのアルカリバンド形成に対するアルミニウムの効果を観察することにより、アルミニウムの膜への作用機構について考察した。

Charaの節間細胞を $100\ \mu\text{M}$ の AlCl_3 を含む人工池水で処理し、その細胞を $5\text{mg}/100\text{ml}$ のフェノールレッドを加えた人工池水に入れて光照射した。4時間のアルミニウム処理によって、アルカリバンド形成は完全に阻害された。アルミニウム耐性の植物においては、有機酸が分泌されてアルミニウムが解毒されることが報告されている。また、カルシウムがアルミニウム毒性を下げるということも報告されている。そこで、アルミニウム液にリンゴ酸とカルシウムを加えたところ、アルカリバンド形成は阻害されなかった。このリンゴ酸とカルシウムによるアルミニウムからの保護作用についてさらに解析を行った。

G1p-12

酵母の *smf1* 遺伝子破壊株の機能相補によるシロイヌナズナマンガントランスポーター遺伝子の探索
尼子克己 高橋正昭（大阪府立大・農・応用生化学）

マンガン(Mn)は光合成酸素発生複合体の活性中心に機能する微量必須元素であり、その欠乏は植物の生産性に直接影響を及ぼす。しかし Mn 吸収に関わる遺伝子の情報は鉄や銅など他の金属必須元素のそれに比べ非常に乏しい。我々は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の機能相補法を用いてシロイヌナズナの Mn トランスポーター遺伝子を探索した。

酵母 SMF1 は Mn、カドミウムなどを輸送する細胞膜局在のトランスポーターであり、その欠損株は培地中に EGTA を添加すると生育できない。そこで YPH250 株から *smf1* 遺伝子を含む約 3 kb の領域を PCR で抽出し、*smf1* 遺伝子構造遺伝子の殆ど全てを除く形で *leu2* 遺伝子を挿入した遺伝子破壊株 *smf1* を作製した。確認はサザン分析と EGTA 下での生育により行った。これに、シロイヌナズナのプラスミド(pFL61)型 cDNA ライブラリーをランダムに形質転換させ、EGTA 存在下で生育する形質転換株を選抜した。スクリーニングの結果得られた cDNA の配列について報告する。

G1p-13

シロイヌナズナ高ホウ素要求性変異株 *bor1-1* の解析
野口享太郎、安森美帆、青木法明、茅野充男、林浩昭、藤原徹（東大院・農・応生化学）

シロイヌナズナの変異株を利用することは、ホウ素の生理機能、動態を明らかにするための有力な方法の一つである。我々は現在までに、*bor1-1* 変異株がホウ素欠乏に感受性を示し、花茎頂端部のホウ素含量が野生型株よりも著しく少ないことを明らかにしてきた。このことは、*bor1-1* 変異株ではホウ素の吸収または移行に障害があることを示唆している。

そこで、*bor1-1* 変異株におけるホウ素の移行を解析するために「切り花実験」を行なった。*bor1-1* 変異株および野生型株の花茎を切断し、その切り口からホウ素の安定同位体 ^{10}B を過剰に含むホウ素を吸収させ、吸収量を測定した。その結果、*bor1-1* 変異株では、全ホウ素濃度は野生型株よりも有意に低かったが、新たに切り口から吸収されたホウ素の量に有意な差は見られなかった。このことから、*bor1-1* 変異株では花茎におけるホウ素の移行は抑制されていないことが示唆された。また、新規の変異株の単離についても報告する予定である。

G1p-14

葉緑体包膜ピルビン酸輸送活性の再構成系での検出
大西純一（埼玉大・理・分子生物）

葉緑体包膜に存在すると推定されるピルビン酸輸送体の活性を再構成膜系で検出を試みた。

大麦・小麦・ソルガムの葉肉細胞プロトプラストより葉緑体包膜を単離し、1% Triton X-100 で可溶化し、全タンパクを Freeze-thaw-sonication 法により、Asolectin リポソーム膜に組み込んだ。リポソーム内に蛍光性 pH 指示薬の Pyranine を封入することで、有機酸の輸送に伴う、リポソーム内部の pH 変化を蛍光光度計でモニターした。この系により、包膜のリン酸輸送体による PGA/Pi 交換に伴う、間接的なプロトン移動を検出できた。

外液にピルビン酸を添加したとき内部の酸性化が、上記植物材料由来の包膜全てで見られた。この酸性化は、ピルビン酸のアナログである UK-5099[α -Cyano- β -(1-phenylindol-3-yl)acrylate, Pfizer]により阻害され、包膜の熱処理により失われた。ピルビン酸(アニオン/ H^+ あるいは非解離型の)輸送活性が、 C_3 、 C_4 植物の葉緑体包膜に存在すると思われる。

G1p-15

酵素結合型ATP合成反応に対する有機溶媒等の影響
持丸 真里、斉藤 勇仁、桜井 英博
(早稲田大・教育・生物)

葉緑体ATP合成酵素(CF_0CF_1)の単離 CF_1 は、微酸性pH、高濃度リン酸存在下ではエネルギーの供給無しにATPを合成することができるが、合成されたATPは CF_1 から遊離することができない(酵素結合型ATP合成反応)。いくつかの有機溶媒は、 CF_1 のATP加水分解活性を促進することが既に知られているが、その効果の大きさは有機溶媒の種類や濃度に依存する。

本研究では、 CF_1 のATPase活性に影響を及ぼすいくつかの有機溶媒や、カビ毒テントキシン、オクチルグルコシドなどについて酵素結合型ATP合成反応に対する影響を調べた。その結果、1) ATP合成量への影響; 2) CF_1 の失活; 3) 反応速度への影響が観察された。したがって、ATP合成反応に対する作用様式は、一概に有機溶媒の疎水性度だけでは説明できないことが明らかにされた。更に、アデニンヌクレオチドが CF_1 にもたらす作用についても、研究を行った。反応液中のADPには、高濃度のメタノールやエタノールによる失活から CF_1 をある程度保護する効果があることが明らかとなった。

G1p-16

通過ペプチドをもったD1タンパク質の葉緑体包膜通過機構の解析
呉 国江、渡邊 昭(東大・院・理系・生物科学)

葉緑体を構成するタンパク質のうち、核のDNAによってコードされているものは、細胞質中で前駆体タンパク質として合成された後に葉緑体に輸送される。通常の葉緑体タンパク質前駆体の輸送においては、葉緑体のストロマに存在するATPがエネルギー源として必要であることが知られている。本研究では、通過ペプチドをもった光化学系II D1タンパク質の単離葉緑体への輸送機構の解析を行った。その結果、光照射によって葉緑体内に生じるATPをエネルギー源とすると、その輸送効率が極めて低く、輸送反応液にATPを加えることによって輸送が大きく促進された。キメラD1タンパク質の輸送のATP要求性は、外部から添加したATPをアピラーゼで分解した場合、または、ATPアナログによる阻害実験においても確認された。これらの結果から、キメラD1タンパク質の包膜通過には今まで知られているものとは異なる輸送機構が存在し、その機構が働くには葉緑体外部にATPが必要であることを示唆している。また、D1タンパク質がもつ葉緑体への輸送におけるこのようなATPの要求性は、進化の過程で $psbA$ 遺伝子が葉緑体ゲノムに残された原因のひとつであるとも考えられる。

G1p-17

車軸藻における活動電位発生時の細胞質カルシウムイオンの一過性の増加
菊山 宗弘、田沢 仁¹(放送大学・生物、¹福井工大・応用物理化学)

車軸藻類の活動電位は第一義的には Cl^- チャンネルの活性化によって説明されている。

活動電位発生に際して細胞質内 Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇がある。我々は、この Ca^{2+} 濃度の増加によって原形質膜や液胞膜の Cl^- チャンネルが活性化されることが活動電位発生の機構であると考えてきた(Ca^{2+} -dependent Cl^- channel activation)。

一方、 Ca^{2+} 濃度の増加や Ca^{2+} 電流は活動電位開始から少し遅れて起こるとの報告があり、この見解は Ca^{2+} -dependent Cl^- channel activation に必ずしも肯定的ではない。

本報告では、 Ca^{2+} 濃度の増加が活動電位のごく初期から始まることを示すとともに、 Ca^{2+} 濃度の増加は外部からの Ca^{2+} の流入によって起こることを示す。

G1p-18

胚軸切片における膜電位と生長の浸透ストレス適応反応に及ぼすタンパク合成系、および輸送系阻害剤の影響

¹北村 さやか、²高橋 宏二、^{1,2}加藤 潔 (¹名大・院・人間情報・生物システム、²名大・情文・生物システム)

Cycloheximide や brefeldin A は、伸長生長を阻害することが知られている。道管灌流下におけるササゲ胚軸切片では、IAAによる伸長促進時にこれらの阻害剤を加えると、シンプラスト膜の起電活性に顕著な阻害が、それに続いて生長にも阻害が観察された。さらに、これらの阻害剤の存在下では、浸透ストレスに反応して生起するはずであるシンプラスト膜の過分極と生長の適応回復が完全に抑制された。これらの結果から、ササゲ胚軸切片の浸透ストレスに対する適応反応には、IAAで制御されるタンパクの合成、および輸送が不可欠であることが示唆される。

G2a-01

イネの map-based cloning における相補性検定を簡便化するコスミドベクターの作製
布施拓市^{1,2}, 矢野昌裕¹, 門奈理佐³, 佐々木卓治¹
(¹農水省・生物研(NIAR), ²生研基礎(BRAIN), ³農林水産先端技術研究所(STAFF))

私たちは、アグロバクテリウムや大腸菌中で安定的に増殖可能な Ti-プラスミド pPZP200 を基本骨格として、新しい Ti-コスミドベクター pPZP2CH-lac を作製した。このベクターには、T-DNA 領域に pBluescript II (SK-) のマルチクローニングサイトが組み込まれており、様々な制限酵素が使用可能となっている。このベクターには、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ (HPT) 遺伝子も組み込まれているので、このベクターを用いアグロバクテリウムを利用して標的遺伝子を導入したイネを、ハイグロマイシン B により選抜することが可能である。また、HPT 遺伝子は、レフトボーダーとマルチクローニングサイトとの間に組み込まれているので、非組換え体の数を減らすことができる。このベクターには、最大 40 kb のインサートを挿入することができる。またこのコスミドベクターを用いイネのゲノムライブラリーを作製したところ、平均インサート長が約 3.2 kb のライブラリーを得ることができた。今後、このライブラリーを QTL 解析により得られてきた遺伝子の相補性検定に使用していく予定である。

G2a-02

RDA 法を用いたアカシアゲノム間差異の直接的比較
越山淳子, 日尾野隆 (王子製紙・森林資源研)

近年、アラビドプシス、イネといった植物種においてゲノム解析技術が急速に進歩している。しかしながら、分子遺伝学的方法は解析の対象となる材料集団の確保およびこれを基盤として作成された分子マーカーによる連鎖地図の作製、および遺伝子解析のための効率的なゲノムライブラリーを必要とし、必ずしもすべての植物種において可能である解析方法とは言い難い。多くの生命現象を解析する上で、アラビドプシス等のゲノム解析情報が有用であることは疑う余地もないが、種特異的な現象の解析には応用の限界があると言わざるを得ない。我々は、林木における特異的形質を規定する遺伝子要因を直接的に解析するための手段として、Lisitsyn らにより提唱された Representational Difference Analysis (RDA 法) を適用することを試みた。これまでに提唱されたゲノム比較は、ゲノムのもつ複雑さを考慮することなく解析されることが多かったが、本方法は PCR を併用することで再現性よく増幅されてくる小ゲノム断片を再回収し (アンプリコンの作製)、これを出発材料として解析することによりゲノム上の差異を検出する方法である。今回、ベトナムより入手したアカシア種の兄弟家系より生長性が明らかに異なる個体を 2 系統選抜し、これらのゲノム間の差異について比較検討をおこなった。これまでにアンプリコン作製、サブトラクション比率等の条件検討を行った結果、サブトラクトされるバンドを数個得ている。これらについては、サブトラクションの再現性の検討を含めた詳細な解析条件について検討を行うとともに、得られたサブトラクトバンドを含むゲノム領域の構造解析および遺伝子発現の有無について解析を進めている。

G2a-03

ピオチン化 cap trapper 法によるシロイヌナズナの完全長 cDNA ライブラリーの作製

関 原明, Piero Carninci¹, 西山洋子², 林崎良英¹, 篠崎一雄 (理研・植物分子生物、¹理研・ゲノム科学、²埼玉医科大・眼科学)

シロイヌナズナでは、ゲノムプロジェクトおよび cDNA プロジェクト (EST 解析) が進行している。シロイヌナズナにおいて、これまでに約 36,000 の EST 情報がデータベースに登録されている。しかしながら、EST クローンのほとんどは部分長 cDNA であるため、センス鎖 cDNA を過剰発現させたりする研究には適していない。そこで、ピオチン化 cap trapper 法¹⁾によるシロイヌナズナの完全長 cDNA ライブラリーの作製について研究を進めた。今回の発表では、これまでに得られた結果について報告する。

約 9 μg のシロイヌナズナロゼット植物体由来の mRNA からピオチン化 cap trapper 法を用いて 2.2 × 10⁶ の組み換え体ファージクローンを有する cDNA ライブラリーを作製した。ランダムに選んだ 161 クローンについてベクタープライマーを用いて PCR 法を行ったところインサート DNA の平均長は約 1.2 kbp であった。また、最も長い cDNA として全長 mRNA サイズが 5178 bp のフェレドキシン依存性グルタミン酸シターゼの全長 cDNA の存在が確認された。

ランダムに選んだクローンの塩基配列を調べることで cDNA の完全性を評価した。調べた 111 クローンの内、データベースに報告されていて、かつ 5' 末端付近の配列が報告されている cDNA クローンが 31 個存在しており、その内 29 クローン (約 90% 以上) は ATG の数 10 bp 以上上流まで合成されたクローン (おそらく完全長 cDNA) であった。

1) Carninci et al. (1996) Genomics 37: 327-336.

G2a-04

マイクロダイセクション法を用いて単離したオオムギ第 6 染色体からの α-アミラーゼ遺伝子のダイレクトクローニング
光永伸一郎, 大山秀夫, 福井希一¹ (上越教育大、¹北陸農業試験場)

レーザー光を用いて特定の染色体領域を切断・単離するマイクロダイセクション法、およびそこから領域特異的遺伝子をクローン化するダイレクトクローニングは、植物ゲノム研究を進める上できわめて有効な手法である。そこでオオムギ染色体をモデルとして本法を試みた。

ダイレクトクローニングの標的遺伝子としては、第 6 染色体長腕部に座位する α-アミラーゼ遺伝子 α-Amy1 を用いた。α-Amy1 のシークエンスをもとにプライマーを設計し、マイクロダイセクション法により単離した第 6 染色体を鋳型とした PCR を行った。5 本の染色体を用いた場合、目的の位置 (142bp) に増幅を確認することができた。増幅 DNA 断片は pCRII ベクターにクローニングし、塩基配列を決定した。これに対して 1-4 本の第 6 染色体、5 本の第 7 染色体を用いた場合、増幅は認められなかった。これらの結果は、α-Amy1 が実際に第 6 染色体上に存在することを示すものであり、5 本程度の染色体を用いることにより、そこに位置する標的遺伝子を直接クローニングできることを意味している。

G2a-05

シロイヌナズナのゲノム特定領域に存在する遺伝子へのトランスポゾン挿入変異体系統の作出

本橋合子^{1,2}, 伊藤卓也¹, 関原明¹, 徳崎和子², 徳崎一雄¹ (1:理研・植物分子生物, 2:国際農研)

現在、シロイヌナズナのゲノムの全塩基配列決定が国際協力のもとに進められ、その全塩基配列決定は2002年には完成予定である。全ゲノム塩基配列決定後の効率の良い遺伝子機能解析には、逆遺伝学的手法が重要な位置を占めると考えられる。そこで、シロイヌナズナゲノム塩基配列決定が進んでいる5番染色体に注目し、トウモロコシのトランスポゾンAc/Dsを用いて、遺伝子破壊系統を作製することを目的として以下の実験を行った。

Ac/Dsは、donor siteに近い位置に再挿入するという報告があるため、我々はdonor Ds389-13が挿入している領域をカバーする5番染色体上のYACクローンCIC3B1にたいして、dDNAセレクション法(1),(2)を用いてあらかじめその領域に存在するcDNAを単離した。その結果、kinase, LCN protease, chloride channel protein 遺伝子などを含む73の遺伝子が単離できた。次に、トランスポゼースを供給するためのAc24とDs389-13両親植物体を交配し(3)、F1,F2植物体を得、多数のトランスポゾン挿入系統を作製した。得られたF2植物体より、Tail-PCR法を用いてDs389-13が転移した隣接領域の配列を得、CIC3B1領域において同定された遺伝子の破壊系統のスクリーニングを行った。また、Ds389-13が挿入した隣接領域の配列のホモロジーサーチを行うことで、遺伝子が破壊されているか解析を行った。現在、遺伝子が破壊されていると期待されている系統の表現形質の解析とその遺伝子の発現様式を調べることで、機能解析を進めている。(1)Hayashida et al. (1995) Gene 165: 155-161. (2)Seki et al. (1997) Plant J. 12(2): 481-487. (3)Smith et al. (1996) Plant J. 10(4): 721-732.

G2a-06

トランスポゾンAc/Dsによる挿入変異シロイヌナズナの作出と変異遺伝子の同定

伊藤 卓也, 柴田 大輔¹, 徳崎 一雄 (理研・植物分子生物, ¹三井産業植物バイオ研)

植物においてトランスポゾンは、T-DNAと並んで遺伝子タギング法に広く用いられている。今回我々は、シロイヌナズナのトランスポゾンDs転移系統を多数作出し、挿入変異体を用いて変異遺伝子の機能解析を行ったので報告する。

5番染色体にドナーとなるDs-T-DNAが挿入された親植物系統からDsを転移させ、転移植物を約300系統作出した。Ac/Dsはドナー近傍領域に転移しやすいことが知られており、実際に、約20%がドナー部位を含む約1 MbのCIC7E11/8B11領域に転移していた。昨年度の本大会において我々は、このCIC7E11/8B11領域に存在する遺伝子(cDNA)をcDNAスクリーニング法を用いて網羅的に単離したことを報告した(1)。そこで今回、これら遺伝子への挿入変異体をTAIL-PCR法を用いてスクリーニングしたところ、beta-8 tubulinと機能未知遺伝子の2遺伝子について挿入変異体を得ることができた。またこの他にも、FtsH protease, RPP5, 40S ribosomal protein S13など、多数の遺伝子への挿入変異体を単離することができた。現在、これら挿入変異シロイヌナズナのいくつかについて、表現形質の解析を行っている。

1) 伊藤 卓也 他, 97年度本大会要旨集 p208.

G2a-07

Ac/Ds系トランスポゾンを用いたシロイヌナズナ gain-of-function 変異体作成法の開発

鈴木義人, 橋本裕子, 室犬旭, Gregor Schmitz¹, Klaus Theres¹ (東大・農・応生化, ¹Universitat zu Koeln)

Activation tagging が培養細胞を用いた解析系で成功を収めて以来、遺伝子の活性化に基づく変異体作成法の有効性が高く認識され、現在、シロイヌナズナやイネのtagging line の調製も多くのグループによって行われている。植物遺伝子を外来遺伝子の導入により活性化する場合、activation tagging に見られるエンハンサーによるプロモーターの活性化の他に、プロモーターの導入による隣接遺伝子の転写活性化がある。今回Ac/Ds系トランスポゾンを用い、上記2種の活性化の性質を持つタギングエレメントを作成した。自己安定化の機構により、two element system の場合に付随する手間が省けるとい特徴を有す。Ac/Ds の転移頻度が高いタバコにこのエレメントを導入したところ、T1世代におけるsomatic 転位、およびT2への高いgerminal 転位(25-90%)が認められた。シロイヌナズナでもT1植物の一部でsomatic 転位が認められた。現在、germinal 転位の有無を調べており、転位率や転位の独立性がタギングを行うのに実用的なレベルであるのか否かを明らかにして行く予定である。

G2a-08

イネの伸長DNAファイバーを用いた高解像FISH法による遺伝子コピー数の推定

近江戸伸子¹, 木島暁子^{1,2}, ハンス デヨン³, 福井希一¹ (¹農水省・北陸農試, ²新潟大学・自然科学, ³ワーゲニンゲン大学)

イネFISH法において、数メガベースの解像度の体細胞分裂前中期染色体を用いた方法を基本とし、核から直接、伸長させたDNAファイバー(EDFs)法を用いて、数百ベースの解像度をもつ高解像FISH法を開発した。

Aゲノムに特異的な反復配列(TrsA)とテロメアを、マルチカラーFISH法を用いて、イネ染色体上とEDFs上にマッピングし、同時に画像解析法を用いてDNA長の解析を行なった。EDFs-FISH法によって、TrsAとテロメア配列は同時にビーズ状の蛍光で検出され、イネ染色体の末端構造が明らかにされた。TrsAとテロメアにおける反復数が推定された。

さらに高解像EDFs-FISH法によって、一部分が重なり合うバクテリア人工染色体(BAC)のコンテイングマップの作成が可能となり、ゲノム研究における染色体物理地図上のギャップを解決するための重要な情報を提供すると考えられる。

G2a-09

完全合成改変GFPを発現する形質転換シロイヌナズナの作出
丹羽康夫, 平野貴謙, 清水正則, 小林裕和 (静岡県大・生活健康科学)

独自に完全合成・改変した sGFP(S65T) 遺伝子は、総合した蛍光量もとのクラゲのGFP(green fluorescent protein) より120倍明るいタンパク質をコードしており、一過性発現系を用いた解析結果から、核、プラスチド、ミトコンドリアへの移行シグナルと融合することにより、期待する細胞内オルガネラへの移行を検出することが可能であった。

一方で、GFPには細胞内毒性がみられ、形質転換植物での利用が限定されるとの指摘がある。そこで、sGFP(S65T)について細胞内毒性を検討する目的で、恒常的にsGFP(S65T)を発現する形質転換シロイヌナズナの作出を行った。その結果、GFPの発現レベルが高く、かつ自殖可能な形質転換体を通常の頻度で得ることができた。従って、sGFP(S65T)に関しては、細胞内毒性が認められないことが明らかとなった。加えて、核、葉緑体、ミトコンドリア各々の移行シグナルとsGFP(S65T)との融合タンパク質を恒常的に発現する形質転換シロイヌナズナも得られ、各々について、根、葉、生殖器官のいずれにおいても期待される細胞内オルガネラにおいて、蛍光シグナルが検出可能であることがわかった。

G2a-10

シロイヌナズナゲノムプロジェクトIV: cDNAの大規模解析
浅水恵理香, 佐藤修正, 小谷博一, 成尾薫, 田畑哲之 (かずさDNA研究所)

シロイヌナズナでは、30,000を超えるEST情報が国際データベースに登録されている。しかしながら発現量の差によるクローンの偏りや解析方向の偏りのため、ゲノム配列から遺伝子領域を特定するための情報として充分なものとは言えない。我々は、このような情報を得ることを目的として、均一化cDNAライブラリーとサイズの長いcDNA(3kb以上)がエンリッチされたライブラリーを作製し、これを用いて大規模なcDNA両末端塩基配列情報の蓄積を開始した。

ZAPシステムを用いて、*Arabidopsis thaliana* (Columbia) の3種類の組織からcDNAライブラリーを作製した。これらのライブラリーにGene IIとExonuclease IIIを処理することにより、一本鎖環状DNAのライブラリーを調製した。これに対して挿入配列部分のPCR増幅産物とのself hybridizationを行うことにより、均一化cDNAライブラリーを作製した。また、サイズの長いcDNAを得ることを目的として、cDNAをサイズ分画し、3kb以上の断片を含んだライブラリーを作製した。

これらのライブラリーから得られた末端塩基配列情報と、アノテーションが終了している5番染色体上の領域との相同性検索の結果、今までに相同性のみから予測され、EST情報の蓄積がなかった遺伝子領域や、gene finder programの予測のみpositiveで、遺伝子領域のカテゴリーに入れることのできなかつた領域に相同性を示すクローンが、効率よく得られた。

現在、網羅的な遺伝子領域のカatalog化を目的として、異なる組織のライブラリーの作製や、3末端からの塩基配列の解析を進めている。

G2a-11

植物ゲノムの相補性検定機能を備えた大容量機能性ゲノムライブラリーのイネでの構築とその応用
角田由紀, 左 南修, 秋山康紀, 佐々木典子, 川崎信二 (農水省・生物研)

ポジショナルクローニング法は、植物でこれまで未開拓であった発現量の少ない、形態形成を初めとする各種の調節遺伝子、シグナル伝達系遺伝子等の体系的な単離法を提供するもので、*Arabidopsis* に止まらず全ての植物での適用が今後期待されている。これまで、この手法を用いるにあたって大きな障害となってきた最終段階での効率的な相補性検定法の欠如を埋めるべく、我々は一昨年独自の大容量バイナリーベクターpBGRZを開発し、これによるヒトの40kBのゲノム断片のイネへのゲノム断片の原型を維持した導入に成功したことを報告した。

このベクターの機能を活用して、ゲノム断片のインサートそのものを植物に導入できるような機能性ゲノムライブラリーの構築を試み、高い効率(5×10⁶クローン/μgインサートDNA)で平均40kBのイネのゲノムライブラリーが完成した。1枚のプレートに12,000クローン播くことにより、1プレートでイネの1ゲノム分を収容することが出来る。より大きなインサートも可能であるが、このインサートサイズはBAC等でフィジカルマップが完成した領域において、効率的な候補遺伝子の絞り込みに効果的であり、さらに絞れば目的遺伝子の機能の最終的な確認にも役立つ。この系の完成で、一般の植物でもポジショナルクローニングが遺伝子単離の標準的な手法の一つとなると考えられる。イネのいもち病抵抗性遺伝子の単離の最終段階の絞り込みにこの系を用いた例についても報告する。

G2a-12

シロイヌナズナのゲノム解析プロジェクト
III. 3番及び5番染色体塩基配列解析
佐藤修正, 小谷博一, 中村保一, 浅水恵理香, 金子貴一, 宮嶋伸行, 田畑哲之 (かずさDNA研究所)

我々は高等植物における遺伝情報の包括的理解を目的として、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム全塩基配列決定プロジェクトに着手した。現在、このプロジェクトは国際共同研究として進められており、我々の研究グループでは5番染色体のtop armの一部とbottom armの全長、及び3番染色体top armの約9Mbpの領域のゲノム構造解析を担当することになっている。

配列解析にはインサートサイズが約80kbであるP1及びTACクローンを主として使用している。各染色体上のDNAマーカーで選抜されたクローンの末端配列を解析し、その情報を基にYACクローンとの対応や、隣接するクローンとのオーバーラップを確認することにより、位置情報の確定したクローンを解析用クローンとして使用している。塩基配列の決定はショットガン法により行い、解析サンプル数は約10倍の重複度を基準として設定している。得られた配列情報は、コンピューターを用いた相同性検索、コード領域の予測等の解析結果と共にWWW site [http://www.kazusa.or.jp/arabi/]及び国際データベースに順次公開していている。現在の解析速度は月間700-800kb(確定配列)であり、97年12月までに59クローンについてのデータを公表している。これらのクローンでカバーされる4.5Mbpのゲノム配列中に1,041のタンパク質コード遺伝子が予測され、遺伝子密度は1遺伝子/4,344bpであった。プロジェクトの進行状況について報告する。

G2p-01

イネ細胞質型グルタチオンレダクターゼの遺伝子構造解析と細胞内局在部位

上中弘典¹、中島美恵子¹、森田重人^{1,2}、増村威宏^{1,2}、田中 凜^{1,2} (京府大・農・生資化、²京都農資センター)

グルタチオンレダクターゼ(GR)は、グルタチオンの関与する還元反応により、細胞内の高い還元状態を維持する働きを担う。また、活性酸素消去系酵素の一つとしても知られている。以前我々は、イネGRのcDNAクローン(RGRC2)を単離した。一次構造の解析により、RGRC2は細胞質型のアインザイムをコードすると考えられる。今回、RGRC2に対応する核遺伝子の構造解析を行うと共に、コードするタンパク質が細胞質に局在すること明らかにした。RGRC2遺伝子は、5'エキソンを含む約7kbの遺伝子であった。RGRC2のmRNAおよびタンパク質は、根とカルスで強く検出された。イネ緑葉をオルガネラ分離後、抗イネGR抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、シグナルは主に細胞質画分で見られたが、ミトコンドリア画分でもわずかに検出された。さらに、この抗体を用いて組織中でのイネGRの分布を調べたところ、細胞壁に沿って多くのシグナルが検出された。この分布は細胞質型スーパーオキシドディスムターゼと類似していることから、イネ細胞質型GRは、他の細胞質型活性酸素消去系酵素と協調的に機能している可能性が示唆された。

G2p-02

葉緑体発現型、細胞質発現型グルタチオン還元酵素の抗酸化能力とストレス耐性の比較

山内雄雄、田中博道、青野光子¹、久保明弘¹、田中 凜 (鳥取大・農・植物機能、¹国立環境研)

グルタチオン還元酵素は過酸化水素消去系であるアスコルビン酸-グルタチオンサイクルなどで酸化されたグルタチオンをNADPHにより、再還元する酵素で、葉中では大部分が葉緑体に存在し、植物の抗酸化ストレス耐性に関わっていることが知られている。これまでの研究において大腸菌起源の本酵素遺伝子を葉緑体で発現させても、細胞質で発現させても抗酸化活性に差が認められなかった。今回は植物起源のグルタチオン還元酵素を葉緑体あるいは細胞質で発現させた形質転換タバコを作成し、ストレス耐性について比較した。アラビドプシス葉緑体型グルタチオン還元酵素cDNAもしくは、ホウレンソウ細胞質型グルタチオン還元酵素cDNAをpBI121プラスミドに組み込み、タバコに導入することにより、グルタチオン還元酵素の葉緑体高発現型、細胞質高発現型を作成した。これらの植物のパラコート、低温、乾燥などのストレス耐性を比較するとともに、抗酸化物質と抗酸化能力の変動について調べた結果を報告する。

G2p-03

タバコにおけるマンガンカタラーゼの発現とストレス耐性

田中博道、五十嵐隆夫¹、河野泰久²、山内雄雄、田中 凜 (鳥取大・農・植物機能、¹国立環境研、²島根大・生物資源科学)

植物は種々の環境ストレス下で活性酸素傷害を受ける。カタラーゼは活性酸素の一種である過酸化水素の消去に関わる酵素である。植物を含む殆ど全ての生物のカタラーゼはヘム鉄を含むが、葉中のヘムカタラーゼは強光、低温、乾燥など多くの環境ストレスで失活する。乳酸菌にはマンガンを中心として持つカタラーゼが存在し、この酵素はヘム酵素と比べて、温度、種々の阻害剤に対して、高い安定性を示すことから、マンガンカタラーゼ遺伝子(1)を植物で発現させることにより、ストレス耐性植物の作出を試みた。乳酸菌マンガンカタラーゼ遺伝子をpBI121ベクターに組み込み、タバコで発現させた。本遺伝子を大腸菌で発現させたときには、マンガンカタラーゼ蛋白質は存在するが、カタラーゼ活性は認められなかった。一方、タバコで発現させたときには、カタラーゼ活性が認められた。マンガンカタラーゼ形質転換タバコの種々のストレス耐性について調べた結果を報告する。

1. Igarashi, T., Kono, Y. and Tanaka, K. J. Biol. Chem. **271**, 29521-29524 (1996)

G2p-04

ラン藻の重金属結合タンパク質SmtAの重金属結合数および結合部位の解析

藤井博史、阿部佳代、木村愛子、森田勇人、林秀則 (愛媛大・理・物質学)

ラン藻の重金属ストレス応答には、真核生物の重金属結合タンパク質メタロチオネインと類似のタンパク質が関与している。しかし、その金属結合能に関する詳細な解析は行われていない。そこで、ラン藻におけるメタロチオネイン様タンパク質の機能を明らかにするため、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の SmtA における金属結合数および結合部位の解析を試みた。

解析に用いた SmtA は、GST 融合タンパク質として大腸菌中で大量発現させたのち、切断分離し、精製した。113Cd²⁺ を結合した SmtA の 113Cd-NMR の測定結果から重金属の配位状態が 3 種類存在すると推定された。Zn²⁺ を結合した SmtA を ICP 発光分析により解析した結果、SmtA 1 分子につき Zn²⁺ が 3 原子結合すると推定された。SmtA における 3 原子の重金属に対する配位子と重金属のクラスター構造を推定するため、システイン及びヒスチジン残基をセリンに部位特異的に変異させた SmtA を作製し、それぞれにおける重金属の結合能を解析した。

G2p-05

タバコ BY-2 培養細胞の細胞周期に対する UV-B の影響
網野真一、平英司、大木崇、竹内裕一（北海道東海大・工・生物工）

オゾン層の破壊によって地表面への到達量が増加する紫外線 UV-B (290nm~320nm) は、植物の成長に阻害的な効果を及ぼすことが広く知られている。我々はその成長の素過程のひとつで従来あまり研究されていない細胞分裂に注目し、タバコ培養細胞 BY-2 の同調培養の細胞周期の進行に対する UV-B の影響について検討した。アフィディコリン処理による G1/S アレストを解除して得られる同調培養の開始と同時に UV-B を照射すると、コントロールで培養 7~8 時間後にみられる分裂指数のピークが観察されなくなった。しかし、より低いレベルの UV-B 照射では、ピークの遅延と低下はあるものの、同調的な分裂指数の上昇がみられた。また、UV-B 照射時期を変えると、細胞周期 S 期での感受性が高いことが示唆された。これらは UV-B 照射によって引き起こされた DNA 損傷が、細胞周期の進行を阻害し、一方で損傷の修復が起こっていることを示唆している。実際、光回復を促進すると考えられる青色光を UV-B 照射後に連続的に照射すると、細胞周期の回復の程度が高まった。現在、UV-B による DNA 損傷産物として CPD (cyclobutane pyrimidine dimers) と (6-4)P (pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts) を ELISA 法で定量し、上述のデータとの関連を検討している。

G2p-06

シロイヌナズナの根における紫外線で誘導される形態変化
柴田百合子¹、永田俊文²、鐘ヶ江弘美³、森昌樹³、鎌田博¹、菊池尚志³ (¹筑波大・生物科学、²科学技術振興事業団、³農業生物資源研究所)

播種後 3 週間のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に UV-B (30 μ W/cm²) を照射すると、根の伸長異常、根の膨潤等の形態異常が誘導されることを見出した。根の伸長異常の頻度は紫外線強度によって増加することから、この現象が、紫外線強度に依存した反応であることが明らかとなった。また、エチレン合成阻害剤で前処理を行うと根の伸長異常が観察されないこと、オーキシン阻害剤の前処理を行うと根の伸長異常が観察されなくなること、加えて、エチレン非感受性突然変異体に紫外線を照射した場合、野生株と比較して、根の屈曲および根端細胞の膨潤の程度が低くなるという実験結果から、この現象にエチレンおよびオーキシンが関与していることが示唆された。さらに、活性酸素消去剤の投与によって紫外線照射で誘導される根の屈曲膨潤反応が抑制されることから、根の屈曲および根端細胞の膨潤に活性酸素が関与していることが示唆された。

G2p-07

根組織由来カルスにおいて内在性光合成遺伝子 *RBCS* が発現している新規 *ces* シロイヌナズナ突然変異体
富田英敬、門垣仁和、丹羽康夫、小林裕和（静岡県立大・生活健康科学）

緑葉組織特異的に発現する光合成遺伝子リブローソス-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの小サブユニット遺伝子 (*RBCS*) の組織特異的発現制御機構の解明を目的として、緑葉組織由来カルスにおいて *RBCS* プロモーター制御下のレポーター遺伝子が発現している突然変異体 *ces* (callus expression of *RBCS*) の選抜について既に報告した。この場合は、葉における遺伝子発現産物のカルスへの持込みの可能性が考えられるため、根組織由来カルスにおいて *RBCS* が発現している新規 *ces* 突然変異体の選抜を試みた。

RBCS およびクロロフィル *a/b* - 結合タンパク質遺伝子 (*CAB*) プロモーターの制御下に置いた各種レポーター遺伝子を導入した形質転換体 2-1-6 を用いた。この 2-1-6 の種子を変異原エチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理後、得られた約 8,000 の M2 個体について選抜し、複数の変異体候補を得た。そのうちの 1 つは、レポーター遺伝子発現でモニターされる *RBCS* および *CAB* の発現が、それぞれ 2-1-6 の約 70 倍 および約 10 倍であった。さらに内在性 *RBCS* mRNA 量も 2-1-6 より高い値を示すことを見いだした。

G2p-08

タケノコのペクチンについて
枝重有祐、掛川弘一、石井 忠（農水省森林総合研究所）

単子葉植物であるタケノコの細胞壁は主にセルロース、アラビノキシランと (1 \rightarrow 3、1 \rightarrow 4) - β -D-グルカンから構成されており、ペクチンの含量は双子葉植物のそれに比べて極めて低い。しかし、タケノコのセルラーゼ等による酵素加水分解により、オリゴガラクトツロナイド、ラムノガラクトツロナン I (RG-I) オリゴ糖やラムノガラクトツロナン II (RG-II) が得られており、そのペクチンは双子葉植物と同様に RG-I、RG-II とホモガラクトツロナンを含むと推定されている。本研究ではタケノコ細胞壁の分別抽出物から精製したペクチンを双子葉植物のペクチンと比較し、その差異を検討した。

タケノコ細胞壁のガラクトツロン酸含量は約 2% であった。タケノコのペクチンは 0.05 M Na₂CO₃ により効率的に抽出されず、1 M や 4 M KOH 抽出物にも残存した。0.05 M Na₂CO₃ 抽出物中には RG-II は存在せず、アラビノガラクトナンを側鎖に持つホモガラクトツロナンの断片と RG-II が含まれていた。RG-II は 4 M KOH 抽出物から得られた。また、双子葉植物のペクチンに比べてホモガラクトツロナンが少ないこともわかった。以上のことから、タケノコでは伸長成長時にホモガラクトツロナンが分解されるため、双子葉植物のペクチンと同じオリゴ糖が得られるものの、ペクチン含量が少なくなると推定された。また、RG-I の一部も分解されたため、0.05 M Na₂CO₃ で抽出されなかったのかもしれない。

G2p-09

ギンドロ培養細胞における伸長成長に関連した細胞壁多糖類の合成

掛川弘一, 枝重有佑, 石井忠 (農林水産省・森林総合研究所)

高等植物の細胞壁は細胞の成長とともに活発に代謝されていると考えられる。細胞壁を構成する主要な多糖類のうちキシログルカンの分解や再構築についてはこれまでに多くの知見が得られている。しかし、その他の細胞壁多糖類、特にペクチンと伸長成長の関連については不明な点が多い。ギンドロ培養細胞はその成長過程を分裂成長期と伸長成長期に区別することができる。演者はこれまでにこの培養細胞系を用いて成長過程における細胞壁多糖類の変化について研究し、キシログルカンに加えてペクチン系多糖類のうちガラクトン、アラビナン、アラビノガラクトンといった中性多糖類の代謝が活発に起きていることを明らかにした。しかし、これらの変化は細胞壁多糖類の分解と合成のバランスの変化によるものと考えられる。そこで本研究では伸長成長中の細胞壁多糖類の合成活性を調べることを目的として実験を行った。

伸長成長が活発な継代後8日目の細胞に $[U-^{14}C]$ グルコースを与えてトレーサー実験を行った。培地に添加した $[U-^{14}C]$ グルコースの放射活性は添加後1時間で急激に減少した。細胞に取り込まれた放射活性の多くは細胞の可溶性画分に存在していた。ラベルされた細胞壁を分別抽出して放射活性の分布を調べたところ1Mおよび4M KOH可溶性画分に高い活性が検出された。これは伸長成長が活発な時期にヘミセルロースの合成が活発に起きていることを示している。

G2p-10

落花生根細胞壁構成成分の分析

加藤陽治, 阿江教治¹ (弘前大・教育、農水省・農環研)

落花生は大豆、ソルガム等 비해低リン土壌においてリンの吸収が高い。落花生根の細胞壁は大豆やソルガムの細胞壁に 비해難溶性リン酸の溶解能が高く、その溶解能はこれまでの実験より細胞壁に存在すると考えられる。そこで、その溶解能活性部位を特定するための基礎的知見を得るために、落花生根細胞壁構成成分の分析を行った。

約2ヶ月間砂耕栽培(開花初期)した落花生根から細胞壁を調製した。常法に従いペクチン様物質、ヘミセルロース、セルロース画分に分離し、糖組成分析および糖結合様式分析を行った。また、ドリセラーゼ処理により得られるオリゴ糖断片を同様に分析した。

落花生根細胞壁を構成する主要多糖類は、ラムノガラクトン、アラビノガラクトン、アラビノキシラン、キシログルカンおよびセルロースであった。また、主要フェノール性物質として、p-クマル酸(約1mg/壁1g)がペクチン様物質にエステル結合していることが示唆されたが、フェルラ酸はほとんど検出されなかった。

難溶性リン酸溶解能の細胞壁成分については検討中である。

G2p-11

Structural characterization of Driselase-extracted apple cell-wall fragments

Radnaa Naran and Yoji Kato, Fac.Education,

Hirosaki Univ, Hirosaki 036, Aomori

As we previously reported a minor amounts of ester linked rhamnogalacturonan-hemicellulose complex are present in the apple cell walls.

Apple cell walls free of EDTA-soluble pectins were treated with Driselase, the enzyme which has been shown to be free of esterase activity. The digests were purified by gel filtration and ion-exchange chromatography. The fractions enriched in GalUA, Rha, Ara, Xyl, Gal were subjected to alkaline hydrolysis followed by gel filtration on Biogel P2. The molecular weight distribution of alkali-hydrolysed fractions gave shift to a lower molecular weight compared to intact fractions suggesting the presence of an ester link. The fractions containing ester-linked fragments were further purified and structurally characterized.

G2p-12

ウキクサのアピオガラクトン

東 順一, 田中 修¹ (京都大院・農, ¹甲南大・理)

ウキクサは花芽分化の誘導アッセイ植物として有用である。一方、成分的にみればウキクサはアピオースに富み、アピオースにエステル結合していると考えられているホウ素含量が高い特徴を有している。そこで、ここではアピオースが結合しているとされているアピオガラクトンに注目して細胞壁成分を分析した。

ハイポネックスの0.1%溶液を用い自然日長下25℃で培養したウキクサ (*Lemna gibba* G3) をポリトロンで粉砕し、80%含水アルコール抽出した。この細胞壁画分(ホウ素を804ppm含む)を水、熱水、DMSO、CDTA、0.05M炭酸ソーダ、4%水酸化カリウム及び17.5%苛性ソーダ-4%ホウ酸で順次抽出した。抽出物中のアピオースの分布を分析したところ、いずれの画分にも含まれていることが分かったが、熱水抽出物中に純度の高いアピオガラクトンが存在していることを見だしその構造解析を行った。これまで分解を伴うシュウ酸アンモニウムがその抽出に用いられてきたが、今回熱水抽出により得られたことにより、アピオガラクトンのネイティブな状態の構造解析が可能になった。

G3a-01

ホウ酸-カルシウムイオン-ラムノガラクトロン II 複合体がペクチン質多糖を細胞壁内に保持している

小林優, 中川広宣, 間藤徹, 關谷次郎 (京都大・院・農・応用生命科学)

植物細胞壁中でホウ素 (B) はラムノガラクトロン II (RG-II) とエステル結合することによりペクチン質多糖を架橋している。B-RG-II 複合体はホウ酸とRG-II 単量体を混合するだけで再構成されたが、安定な複合体形成には Ca^{2+} が必要であった。またダイコン細胞壁から単離した複合体はホウ酸と当量の Ca^{2+} を含んでいた。CDTA でこの Ca^{2+} を除去すると複合体は徐々に分解した。これらの結果から、細胞壁中のB-RG-II 架橋は Ca^{2+} によって安定化されていると考えられた。

ダイコン細胞壁を1.5% SDS 水溶液 (pH 6.5) で洗浄すると Ca^{2+} , B, ペクチン質は各々96%, 13%, 6% が溶出した。細胞壁に残存する Ca^{2+} はRG-II に結合していた。さらに残渣を50 mM CDTA (pH 6.5) で抽出すると, Ca^{2+} , B はそれぞれ4%, 80% 溶出し, B-RG-II 複合体は分解した。このときペクチン質は61% が溶出した。以上の結果は, B と Ca^{2+} によるRG-II 領域の架橋構造がペクチン質ネットワークを細胞壁内に保持していることを示唆する。

G3a-02

タバコ培養細胞におけるホウ酸-ラムノガラクトロン II 複合体の分布

高崎美紀, 間藤徹, 小林優, 高部圭司¹, 關谷次郎 (京都大・農・応用生命, ¹京都大・農・森林科学)

ラムノガラクトロン II (RG-II) に対する抗体を用いてタバコ培養細胞BY-2におけるホウ酸-RG-II 複合体の局在部位を検討した。RG-II エピトープは細胞壁の細胞膜近傍に多く存在し、ゴルジ体とその小胞も抗体により標識された。分裂後期から終期の細胞では形成中の細胞板にもRG-II エピトープが検出された。RG-II はゴルジ体で合成されて細胞壁に分泌され、細胞分裂の際には細胞板の形成にともなって合成されていることが示唆された。

ホウ素濃度1 ppm の培地で生育している細胞を低ホウ素培地 (10 ppb) に移植すると、24時間後には約半分の細胞が死んだが、1週間後には細胞は増えており、生き残った細胞が増殖したようであった。培地ホウ素濃度を継代培養ごとに下げ、10 ppb ホウ素で生育する cell line を選抜した。選抜細胞の細胞壁は膨潤して厚くなっていた。RG-II エピトープは細胞壁中に均等に分布しており、コントロール細胞に比べ標識密度が低かった。細胞壁のホウ素含量も低く、RG-II の量との相関が推察された。

G3a-03

ラムノガラクトロン II-ホウ酸複合体中のホウ酸エステルの結合位置

石井 忠, 松永俊朗¹, M. O'Neill², A. Darvill²,

P. Albersheim²

(森林総研, 九農試¹, C C R C, ジョージア大学²)

細胞壁中に存在するラムノガラクトロン II (RG-II) は、ホウ酸エステルを形成してRG-II 二量体 (dRG-II-B) として主に存在する。ホウ酸エステルは4つのアピオース残基の2つに結合しているが、どのアピオース残基と結合しているか不明である。そこでホウ酸エステルが結合したアピオース残基を検出する方法を開発した。細胞壁から単離したdRG-II-B と Pb^{2+} 存在下に *in vitro* に生成したdRG-II-B 及び単量体 (mRG-II) をそれぞれこの方法により分析した。ホウ酸エステルは全てのdRG-II-B において2-O-Me-Xyl を含むアピオース側鎖のみ選択的に結合していた。

G3a-04

真性粘菌変形体の分化過程における酸性ホスファターゼの挙動

鈴木陽子, 田中祐子, 金子堯子 (日本女子大・理・物生)

真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) 変形体の細胞内可溶性酸性ホスファターゼ (APase) には2種類のアイソフォーム (R_m 値: 約0.6および0.7, 分子量: 約57kおよび40k) が存在する。America株変形体に対して暗所飢餓処理を行い、細胞壁を有する耐性型細胞 (スクレロチウム, Sc) を誘導した。12時間毎にサンプリングし、Scの形成率を算定した結果、1.5日めからScを形成を開始し、4日めには90%の形成率を示した。サンプリングした試料から粗酵素を抽出後硫酸分画し活性を測定した結果、変形体からScを形成する過程で酸性ホスファターゼ活性は1.5日めにその活性のピークを示した。スクレロチウム形成誘導開始から終了までを通してアイソフォームの組成は2種類であり、アイソフォーム間の活性比に変動が認められた。

G3a-05

粘菌 *Polysphondylium pallidum* の膜タンパク質 gp64 の分子遺伝学的な機能解析
舟本 聡, 落合 廣 (北大・理学研究科・生物科学)

粘菌 *P. pallidum* は単細胞が集合して多細胞からなる子実体を形成する。この子実体では中心の柄に対して複数の柄(輪生枝)が車軸状に生じる。*P. pallidum* の膜タンパク質 gp64 は多細胞形成に必要な細胞接着に関与する分子として同定され、一方 gp64 は多細胞体形成後の形態形成時に量が減少することが分かっている。私たちは gp64 の機能を明らかにするために、gp64 遺伝子破壊株 (KO)・過剰発現株 (OV1) を作製し、細胞接着や形態形成の影響について検討した。その結果 KO や OV1 に顕著な細胞接着能の変化は検出されなかったが、これらは形態異常を示した。まず、KO は子実体あたりの輪生枝の数が 30% ほど増えている。OV1 は暗所で発生させると輪生枝のない異常に長い構造を示した。この時 OV1 の gp64 の蓄積は顕著であった。この結果は gp64 の消失が形態形成開始の引金となることを示唆する。次に KO の輪生枝を多く形成する性質が分泌性の因子によるものか否かを検討するために、KO と野生株でキメラをつくり輪生枝形成の影響を調べた。その結果 KO の存在で輪生枝をもつ子実体の割合が増加した。また KO はキメラ多細胞体で前部に分布することが明らかになった。多細胞体の前部はオーガナイザーとして機能することが知られている。現在 KO が分泌する物質とそれに関わる情報伝達経路について検討している。

G3a-06

オジギソウ屈曲運動におけるアクチン系細胞骨格の関与
山城佐和子, 神澤信行, 田宮徹, 土屋隆英 (上智大、理工、化学)

オジギソウ (*Mimosa pudica*) の屈曲運動を担うのは、葉枕の柔組織に存在する運動細胞である。これまでに、我々は、アクチン重合阻害剤のサイトカラシン D により、屈曲運動が阻害されることを見いだした。このことから、運動細胞の刺激応答には、アクチン系細胞骨格が関与していると考えられた。そこで、本研究では、主葉枕運動細胞におけるアクチンの動態を明らかにするため、屈曲運動前後における主葉枕の凍結切片を作製した。切片をローダミン-ファロイジン染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、運動細胞内アクチンフィラメントの局在を調べた。その結果、運動前後において、アクチンフィラメントの配向が動的に変化することが観察された。さらに、このような屈曲運動に伴うアクチンの動的変化を調節する機構を解明するため、DNase 1 アフィニティークロマトグラフィーによりアクチン調節タンパク質の検索を行った。現在までに、オジギソウ組織より、カルシウム依存的アクチン結合タンパク質の候補を複数得ており、これらのタンパク質の解析を行っている。

G3a-07

オジギソウ屈曲運動に関するアクチン
亀山一央, 崔賢姬, 神澤信行, 田宮徹, 土屋隆英
(上智大、理工、化学)

これまでに当研究室で観察された、アクチン重合阻害剤によるオジギソウ屈曲運動能の消失より、屈曲運動におけるアクチンの重要性が示唆された。そこで、屈曲運動に関与するアクチンアイソフォームを検索することを目的とした。まず、オジギソウタンパク質抽出液を二次元電気泳動し、アクチンアイソフォームの分離を試みたが、アイソフォーム間の違いは観察されなかった。そこで、RT-PCR により増幅したオジギソウアクチン cDNA 部分配列を決定したところ、オジギソウには少なくとも 3 種類のアクチンアイソフォームが存在することが明らかとなった。

現在、各アイソフォームを比較検討するために、オジギソウゲノムライブラリーから、オジギソウアクチン cDNA 部分配列をプローブとしてスクリーニングを行っている。今後、得られたゲノムライブラリー由来アクチン遺伝子の塩基配列をもとに、屈曲運動に関与するアクチンアイソフォームを明らかにしたい。

G3a-08

高等植物細胞の微小管形成中心：核からの微小管形成を担うタンパク質の同定
石井文晴, 水野孝一 (大阪大・院理・生物科学)

タバコ培養細胞 BY-2 から単離した核を用いて微小管形成中心を担う因子の単離を行ったところ、SDS-PAGE の移動度から推定分子量が約 40kDa のタンパク質であることが推定された。このタンパク質に対する抗体を作製し、核分画をウエスタンブロットで分析すると一本のバンドとのみ交差したので、これを用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングし、そのタンパク質をコードする cDNA のクローニングを行った。その結果、このタンパク質は、279 アミノ酸から成る塩基性タンパク質であることが推定された。また、すでに報告されているタバコヒストン H1 と 92% の相同性を有することと BY-2 において似たタンパク質が他にないことより、この微小管形成中心を担うタンパク質がヒストン H1 そのものであることが示唆された。

G3a-09

加圧凍結-凍結置換法による根端分裂組織分裂準備帯 (preprophase band) の微細構造の観察

峰雪芳宣、村田隆¹、Thomas H. GIDDINGS, Jr.²、

L. Andrew STAEBELIN² (広島大・理・生物科学、東大院・総合文化・生命、²コロラド大・MCD Biology)

分裂準備帯 (PPB) の形成に関与する分子と微小管、細胞膜との空間的な位置関係を知ることは、細胞分裂面の挿入位置決定機構を理解するのに必要である。我々は加圧凍結装置 (Balzers, HPM-010) を用いて根端分裂組織を凍結後、凍結置換法によって固定した組織を樹脂置換し、電子顕微鏡で観察した。様々な条件を検討した結果、タバコの根端のほとんどすべての細胞、また、タマネギ根端の表層から3層目までの細胞で、うまく凍結固定ができるようになった。この方法で凍結固定したものでは、細胞膜がまっすぐで、原形質分離も起こっていなかった。また、PPBを構成する微小管の端の部分に微小管が口を開いた様な像が見られた。この像が *in vitro* で知られている微小管の脱重合過程を *in vivo* で捕えたものか、それとも実験方法による artifact かどうか、今後の検討を要する。

G3a-10

Preprophase band の幅が狭くなる過程におけるアクチン繊維の役割

村田 隆、Thomas H. Giddings Jr.¹、L.

Andrew Staehelin¹、峰雪芳宣² (東京大・総合文化・生命、¹コロラド大・MCD Biology、²広島大・理・生物科学)

Preprophase band (PPB) は細胞分裂に先行して将来細胞質分裂が起こる位置の細胞表層に出現・消失する微小管の帯である。PPB は細胞周期のG₂期に幅広の微小管の帯として出現し、細胞周期の進行とともに幅が狭まって前期には密度の高い微小管の束になる。この微小管帯の幅が狭くなる過程はアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシンにより阻害されることから、アクチンが何らかの形でこの過程に関与していることが予想されているが、その役割は不明である。

タバコ根端細胞においては、アクチンはG₂期には細胞表層全体に存在し、PPB 上ではその配向はPPB の微小管と平行であった。前期にはアクチンはPPB 上から消失したが、他の細胞表層には残っていた。サイトカラシンD (CD) で処理した根端では細胞表層のアクチンは減少したがPPB 上のアクチンは減少せず、前期の細胞でもPPB 上に染色が見られた。CD 処理によりPPB を構成する微小管の間隔は増加したが微小管と細胞膜の距離は影響を受けなかった。以上の結果より、アクチンはPPB の外側でPPB の微小管が細胞膜に沿って広がるのを阻止していると考えられた。

G3a-11

気孔開閉及び孔辺細胞微小管に及ぼすタンパク質リン酸化/脱リン酸化酵素阻害剤の影響

福田めぐみ、馳澤盛一郎、中嶋信美¹、近藤矩朗 (東京大・院理・生物科学、¹国立環境研・地域)

孔辺細胞微小管は日周サイクルのなかで重合/脱重合を繰り返しながら配向変化を示し、気孔開閉運動を制御している (Fukuda *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 39, 1998)。本研究ではタンパク質リン酸化酵素阻害剤であるStaurosporine、DMAPと、タンパク質脱リン酸化酵素阻害剤であるOkadaic acid (OA)、Calyculin A (CA)が微小管構築及び気孔開閉に与える影響について検討した。Staurosporine、DMAPは明け方に再構築される放射状の微小管束を減少させ、夕方では脱重合を強く阻害して放射状の配向を保持させた。また、明け方での気孔開口及び夕方からの気孔閉鎖をともに阻害した。OA、CAはどの時刻においても、配向がランダム化した孔辺細胞の割合を増加させた。気孔開閉への効果として、明け方の開口のみを顕著に阻害した。

H1a-01

トウモロコシのサイトカイニン誘導性二成分系情報伝達因子ZmCip1遺伝子の単離と構造解析

出路 篤, 榊原 均, 杉山 達夫 (名古屋大院・生命農学)

原核生物の主要な情報伝達系である二成分情報伝達系が植物においても重要な役割を果たしていることが、近年明らかになりつつある。我々はトウモロコシから、サイトカイニン誘導性遺伝子の1つとして、二成分系レスポンスレギュレーターホモログであるZmCip1cDNAを単離した。今回、この遺伝子の転写レベルでの発現様式、およびその制御機構を明らかにするための足がかりとして、ZmCip1遺伝子の単離およびその構造解析を行った。ZmCip1cDNAの翻訳領域の一部をプローブとして用い、トウモロコシのゲノムライブラリーよりZmCip1遺伝子を含むクローンを単離した。ZmCip1コード領域および翻訳開始点から上流2kbpまでの塩基配列を決定したところ、ZmCip1遺伝子はイントロンを持たず、また推定TATA-boxがプロモーター領域上に見られた。現在ゲルシフトアッセイ、データベース検索などにより、シス領域の検討を行っている。また、スクリーニングの過程で得られた、ZmCip1と高い相同性を持つλZmRR1、λZmRR2の解析結果についても報告する予定である。

H1a-02

シロイヌナズナのレスポンスレギュレーター遺伝子は無機窒素源及びサイトカイニンにより発現制御を受ける

谷口光隆, 木羽隆敏, 榊原均, 上口智治, 水野猛, 杉山達夫 (名古屋大院・生命農学)

我々は窒素栄養変動に応答したC₄光合成遺伝子の選択的発現にはサイトカイニンを介した情報伝達系が関与していることを明らかにしている。さらに、トウモロコシにおいて無機窒素源あるいはサイトカイニン補填により発現誘導される二成分制御系のレスポンスレギュレーターホモログ遺伝子ZmCip1をクローニングし、ZmCip1が無機窒素源の情報伝達に関与している可能性を示唆してきた。最近、水野らのグループによりシロイヌナズナからも5種類のレスポンスレギュレーターホモログ遺伝子(ARR3~7)が単離されたが、その推定アミノ酸配列はZmCip1と高い相同性を示した。そこで、これらARR遺伝子においても無機窒素源あるいはサイトカイニンにより発現制御を受けるかどうかを調べた。その結果、窒素欠乏状態のシロイヌナズナに硝酸塩を補填することによって、あるいは緑葉にゼアチンをスプレーすることによって葉組織中のARRmRNA量の増大が観察された。したがって、シロイヌナズナのARRはトウモロコシZmCip1と同様な生理機能をもつことが示唆された。

H1a-03

シロイヌナズナにおける新規二成分制御系シグナル伝達因子(HPt)の検索

鈴木友美, 上口智治, 水野猛 (名古屋大院・生命農学)

センサーキナーゼとレスポンスレギュレーターから構成される二成分制御系は、バクテリアにおいて最も普遍的なシグナル伝達系である。この系における情報の伝達は、センサー内のトランスミッタードメインとレギュレーター内のレシーバードメイン間でのHisからAspへのリン酸基の転移に基づいている。最近二成分制御系を構成する新たなHis-Aspリン酸転移単位としてHPtドメインが同定された。HPtドメインはリン酸化されるHis残基を持ち、シグナル伝達の仲介者として機能すると考えられている。この系は永らく原核生物固有の信号伝達系と思われていたが、真核生物においても存在することが最近明らかとなった。シロイヌナズナではセンサーキナーゼがいくつも見つかっており、いずれも植物ホルモン応答に関与すると考えられている。しかし、レギュレーターやHPtドメインの関与については明らかになっていない。そこで我々はこれらの制御系因子がシロイヌナズナにおいても存在すると想定し、HPtドメインをもつ新規シグナル伝達因子の検索を行った。その結果、3種類のHPt遺伝子の候補(AHP1,2,3)を得ることに成功した。現在これらのcDNA及び染色体遺伝子の一次構造と発現様式の解析を行っている。これらの因子の構造的特徴や情報伝達因子としての可能性について考察する。

H1a-04

シロイヌナズナにおける二成分制御系シグナル伝達因子の検索

上口智治, 今村綾, 花木直人, 水野猛 (名古屋大院・生命農学)

センサーキナーゼとレスポンスレギュレーターから構成される二成分制御系 (Two-component system) は、バクテリアにおける普遍的なシグナル伝達系である。この系における情報の伝達は、センサー内のトランスミッタードメインとレギュレーター内のレシーバードメイン間での、HisからAspへのリン酸基の転移に基づいている。最近になって出芽酵母に引き続き、シロイヌナズナにおいてもセンサーキナーゼが発見された。高等植物のセンサーキナーゼ (ETR1, CK11) はいずれも植物ホルモン応答に関与することが明らかであり、高等植物のシグナル伝達機構における二成分制御系の機能的な重要性が強く示唆される。今回我々は、その存在が明らかとなっていない高等植物のレスポンスレギュレーターに注目し、5種類のレギュレーター遺伝子をシロイヌナズナより取得し、ARR (Arabidopsis response regulator) と命名した。さらに大腸菌を用いた解析系で、ARRは*in vivo*、*in vitro*双方においてリン酸転移反応に関与していることを明らかにした。



H1a-05

3量体Gタンパク質 α サブユニットのアンチセンス鎖を過剰に発現させたイネ形質転換体の解析

藤澤 由紀子、石川 敦司、旭 正、岩崎 行玄
(福井県大・生物資源)

近年、高等植物においても、光や病原菌の感染に関するエリシター等の外界からのシグナルが、3量体Gタンパク質を介して細胞内へ情報を伝達している事が、薬剤の投与実験を介して示唆されている。しかしながら、高等植物の3量体Gタンパク質の構造および機能に関して、生化学的、分子生物学的な研究はほとんどない。植物の生活環の個々の器官における3量体Gタンパク質の構造解析、機能解析、およびレセプターやエフェクターとの相互作用の様式の解明は、植物の器官形成を分子レベルで理解する上で必要な条件であると考えられる。

今回、我々は、イネ3量体Gタンパク質 α サブユニットの発現を人為的に抑制した形質転換体の解析から、このシグナル伝達因子の機能推定を試みた。具体的には、35Sプロモーターの下流に3量体Gタンパク質 α サブユニットのcDNA(RGA1)をアンチセンス方向につないだコンストラクトをBinary vector(pBI101-Hm)に導入し、アグロバクテリウム法を用いてイネの形質転換体を得た。得られた形質転換体(T1世代)は、登熟の段階で穂が垂れない、節間が短いなどの表現型を示した。完熟した種子(T2世代)は、粉と胚乳が小さくかつ丸いなどの特徴を有していた。これらのことより、高等植物3量体Gタンパク質は、種子形成の過程で重要な役割を果たしていることが示された。

H1a-06

シロイヌナズナのレスポンスレギュレーターをコードするcDNAのクローニング

浦尾剛、B.Yakubov、宮田伸一、篠崎和子、篠崎一雄¹
(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

これまで原核生物の主な情報伝達系として知られていたTwo-Component Systemが、真核生物でも浸透圧応答や植物ホルモン応答に関与していることが明かにされている。我々はTwo-Component Systemの植物の情報伝達における役割を解析することを目的として、シロイヌナズナからヒスチジinkinase遺伝子の単離を試み、これまでに、ハイブリッド型ヒスチジinkinaseATHK1が、酵母の中では浸透圧センサーとして機能することを明かにした。

そこで今回、ATHK1と共にTwo-Component Systemを構成する他の成分を同定するために、ESTデータベースの検索結果を基にして、シロイヌナズナのレスポンスレギュレーターをコードするcDNAのクローニングを試みた。その結果、現在まで4種類のcDNAをクローニングすることができた。これらがコードするタンパク質は、いずれもN末側に互いに相同性が高いレシーバドメインが存在する植物に典型的なタイプであり、C末側のアミノ酸配列は多様化しているものの、プロリンや酸性アミノ酸に富んだ領域であるといった点で共通性が見られた。また、これらの遺伝子の発現の組織特異性やストレス応答性をノーザン法で調べた結果、根で多く発現している遺伝子や低温によって誘導される遺伝子があった。

H1a-07

シロイヌナズナの HPT ドメインをもつ Two-Component System 構成因子のクローニング

宮田 伸一 浦尾 剛、篠崎 和子、篠崎 一雄¹
(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

two-component system は原核生物の環境応答に用いられるシグナル伝達系として知られていたが、近年、真核生物においても浸透圧応答や植物ホルモン応答に関与していることが明かにされている。我々は、シロイヌナズナから、酵母の中で浸透圧センサーとして機能するハイブリッド型ヒスチジinkinase ATHK1 をクローニングした。

そこで今回は、高等植物における two-component system の構成や機能を明らかにするため、酵母の SLN1-YPD1-SSK1 浸透圧応答系を参考に、ATHK1 の下流の phosphorelay に関わる構成因子のクローニングを試みた。まず、YPD1 の cDNA 配列を元にデータベース検索を行い、3 種類の EST クローンを候補として選抜し、それぞれに対応する 3 種類のシロイヌナズナ cDNA クローンを単離した。これらのアミノ酸配列を YPD1 や他のバクテリアの遺伝子の phosphotransfer mediator 部位と比較したところ、リン酸の受容・伝達に関与する His 残基を含む HPT ドメインが高度に保存されていた。これらの遺伝子の発現の組織特異性をノーザンハイブリダイゼーションで調べたところ、主に根で強く発現していることが確認され、ATHK1 の発現と類似していた。

H1a-08

シロイヌナズナのPI代謝関連酵素であるホスファチジン酸ホスファターゼは根の伸長成長に関与している

片桐 健^{1, 2}、篠崎 一雄^{1, 2}
(¹理研・植物分子、²筑波大・生物科学)

植物において光やオーキシンによってイノシトールリン脂質代謝 (PI 代謝) が活性化されることが示されている。我々は PI 代謝を介した情報伝達系における 2 次メッセンジャーと考えられるジアシルグリセロール(DG)とホスファチジン酸(PA)が、リン酸化・脱リン酸化によって相互に変換され得ることに注目し、植物においてこれらの生理機能を明らかにするために研究を進めている。

ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、DGをリン酸化してホスファチジン酸(PA)を産生する酵素であり、我々は既に単離したシロイヌナズナのDGK遺伝子単離に関する報告をしている^{*}。そして昨年度の年会において、PAを脱リン酸化してDGを産生するホスファチジン酸ホスファターゼ(PAP)遺伝子のクローニング、発現解析に関する知見を報告した。本年会では単離したシロイヌナズナのPAP遺伝子(AiPAP1)を導入したアンチセンス形質転換シロイヌナズナからAiPAP1の機能に関する新たな知見が得られたので報告する。AiPAP1のプロモーター・GUS形質転換シロイヌナズナにおける組織染色解析からAiPAP1遺伝子が根や花茎における伸長領域に特異的に発現していることを観察した。さらにAiPAP1のアンチセンス形質転換植物においては根の伸長が抑制されるという形質が認められた。このことからPAPの機能の一つとして細胞の伸長に関与している可能性が示唆され、現在細胞レベルでの解析を進めている。

^{*}Katagiri et al. Plant. Mol. Biol. 30: 647-653, 1996

H1a-09

ソラマメ孔辺細胞のタイプ1プロテインホスファターゼ触媒サブユニット cDNA の単離

淺沼三和子、木下俊則、和田元、島崎研一郎（九州大・理・生物）

気孔開孔には青色光が有効で、孔辺細胞原形質膜のプロトンポンプを活性化するシグナルとして働く事が知られている。これまでの研究により、青色光に依存した孔辺細胞プロトプラストからのプロトン放出は、タイプ1及びタイプ2Aプロテインホスファターゼ（PP1及びPP2A）の阻害剤であるカリクリンAやオカダ酸により阻害され、その濃度依存性よりPP1が関与することが示唆された。そこで、ソラマメ孔辺細胞からのPP1触媒サブユニット（PP1c）cDNAの単離を試みた。孔辺細胞以外の植物細胞から既に単離されているPP1cにおいて保存されているアミノ酸配列をもとにPCRを行った。その結果、孔辺細胞では少なくとも2種類のPP1c（GCPP1-1, GCPP1-2）が発現していた。さらにGCPP1-1の全長のcDNAの単離を行い、約1.5 kbpのcDNAを得た。GCPP1-1がコードするタンパク質は323残基のアミノ酸からなり、植物の既知のPP1cとアミノ酸レベルで80～90%の相同性を示した。

H1a-10

イネ SNF1 様プロテインキナーゼ(OSK)遺伝子ファミリーの異なる発現制御様式

鐘ヶ江(梶矢)弘美、菊池尚志、高野 誠(農水省・生物研・分子遺伝)

私たちは、イネからSNF1と高い相同性を示すプロテインキナーゼ(OSK)の cDNA(*osk1-5*)を単離し、解析を進めてきた。その結果、イネには3種類の OSK 遺伝子(*OSK1*, *OSK24*, *OSK35*)が存在することが分かり、塩基配列の相同性や組織別の発現パターンから *OSK1* と(*OSK24* と *OSK35*)は別のグループに分類された。現在までのところ、2種類の異なる SNF1 様プロテインキナーゼが報告されているのはイネ科だけであり、これらの複数の分子種が植物体内でどのような役割分担をしているのかは興味をそそるところである。

そこでまず、3種の OSK ゲノムクローン(*gosk1*, *gosk24*, *gosk35*)を単離しその遺伝子構造を比較したところ、*OSK24* と *OSK35* 遺伝子は同様の発現パターン(組織特異性)を示すにもかかわらず、それらのプロモーター領域はほとんど似ていないことが分かった。そこで、発現の特異性を担っている領域を検索するために、*promoter::GUS* を構築し、アラビドプシスとイネに導入して得られた形質転換植物における GUS 遺伝子の発現を比較した。

H1p-01

クラミドモナス炭酸脱水酵素遺伝子CAH1の発現調節変異株の単離

三浦謙治、九町健一、大山莞爾、福澤秀哉
(京大・農・応用生命科学)

*Chlamydomonas reinhardtii*細胞表層の炭酸脱水酵素をコードするCAH1遺伝子の発現は、高CO₂条件(1～5%)で抑制され、低CO₂条件(0.04%)で誘導される。

我々は、CAH1の5'上流域とレポーター遺伝子(*ars*)の融合遺伝子をクラミドモナスに導入した株を既に作成している。この株では、レポーター遺伝子の発現が内在性のCAH1と同様に、低CO₂条件で誘導され、高CO₂条件で抑制される。本研究では、この株にbleomycin系抗生物質耐性遺伝子(*ble*)を遺伝子タギングの指標とし形質転換を行い、Zeomycin耐性株を得た。その中から、高CO₂条件でもレポーター遺伝子を発現する変異株を3株見出した。これらの株では内在性のCAH1も高CO₂条件下において発現していた。この事実は、高CO₂条件でCAH1の発現を抑制する遺伝子が存在することを示唆する。

H1p-02

ラン藻 RNAポリメラーゼ各サブユニット蛋白質の精製

志尾崎紀子、朝山宗彦、白井誠(茨城大・農)

真正細菌のRNAポリメラーゼホロ酵素は、コア酵素とシグマ因子から構成され、遺伝子の転写開始反応を触媒する複合蛋白質である。我々は、精製RNAポリメラーゼを用いたラン藻の *in vitro* 転写実験系の確立とシグマ因子のプロモーター認識能を解析する事を目指している。今回はその手始めとして、単細胞性のラン藻 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803株のコア酵素の各サブユニット(α β β' γ)と全シグマ因子の精製を試みた。PCRで増幅した目的DNA断片を大腸菌の発現ベクターPQE-30のT5プロモーター下流に挿入し、宿主大腸菌M15[pREP4]に導入した。N末端にヒスチジンヘキサマーが付加された目的蛋白質を宿主菌体内で大量発現させ、これをNi-NTAカラムを用いて精製した。現在までにコア酵素の α サブユニットと4種類のシグマ因子の精製に成功した。他の蛋白質についても精製中であり、あわせて報告したい。

H1p-03

ラン藻 RNAポリメラーゼのシグマ因子遺伝子欠損変異株の解析

宮崎愛¹、朝山宗彦¹、白井誠¹、佐塚隆志²、小原取²
(¹茨城大・農、²かずさDNA研・解析技)

ラン藻 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803株は8種類のシグマ因子遺伝子を有している。これらシグマ因子群の中で、slr0653は主要なシグマ因子をコードすると予測されるが、その他のシグマ因子の機能については不明である。そこで各シグマ因子が認識する遺伝子プロモーターを同定する一環として、シグマ因子遺伝子欠損株を取得し、欠損株内の全細胞蛋白質を野生株のそれと比較した。その結果、例えば slI0184遺伝子欠損変異株において、定常期でCO₂固定に関与する蛋白質群の発現量の減少や増加が認められた。この結果は、slI0184遺伝子のコードするシグマ因子が、定常期（栄養源枯渇時）で働く遺伝子のプロモーターを認識している可能性を示唆している。

H1p-04

メタロチオネインmRNAの蓄積量の低下と形態変化
赤星英一、藤原徹、林浩昭、茅野充男（東大院・農・応生化）

メタロチオネイン (MT) は、システイン含量の高い、低分子量蛋白質である。哺乳類や酵母のMTは、過剰重金属の解毒に関与する。また、哺乳類のMTでは、重金属代謝を介した細胞分裂、分化への関与が示唆されている。しかし、高等植物では、MTの生体内での機能に関して、直接的な証拠は得られていない。シロイヌナズナには、3種のMT遺伝子ファミリーが存在する。この1つであるMT2a遺伝子mRNAをセンス、アンチセンス方向に過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作成した。これらのうち、MT2 mRNAの減少が確認された6ライン中4ラインにおいて、花柄基部に形態異常が観察された。この表現型を指標にして、約5,000のEMS処理したM2植物から変異株の選抜を行い、2ラインの候補株を得た。これらの植物についてノーザン解析を行なったところ、いずれのラインでもMT2 mRNAが減少していた。これらの結果は、MT2の減少が花柄基部の形態異常を引き起こした可能性を示している。このことから、シロイヌナズナMT2が細胞分裂、分化に関与する可能性が示唆された。

H1p-05

気孔孔細胞における青色光に依存した蛋白質リン酸化
木下俊則、齋藤雄宏、島崎研一郎（九州大・理・生物）

青色光照射により気孔が開く時、青色光は光情報として孔辺細胞原形質膜プロトンポンプを活性化することが知られている。これまでの研究により、青色光に依存した孔辺細胞プロトプラストからのプロトン放出は、Ca²⁺/カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤である ML-7 により阻害されることが明らかとなり、青色光情報伝達への蛋白質リン酸化反応の関与が示唆されている。そこで、ソラマメ孔辺細胞プロトプラストを用いて、青色光に依存した蛋白質リン酸化反応について調べた。蛋白質のリン酸化レベルの変化は、2次元電気泳動により分離した蛋白質スポットの等電点の差により検出した。その結果、分子量約 80 kDa の蛋白質が青色光照射から 30 秒以内に酸性側へシフトすることが明らかとなった。このシフトは、100 μM ML-7 存在下で阻害されることから、蛋白質のリン酸化により引き起こされているものと推察された。一方、原形質膜プロトンポンプの活性化剤であるフシコクシンは 80 kDa 蛋白質のシフトを引き起こさなかった。また、遠心分離法により 80 kDa 蛋白質の細胞内局在を調べたところ、主にミクロソーム画分に存在していた。以上の結果より、青色光による 80 kDa 蛋白質のリン酸化は孔辺細胞の青色光情報伝達に関与しているものと思われる。

H1p-06

イネ細胞死突然変異体における防御反応の活性化
高橋章、逸見健司、川崎努、四井克彦¹、児玉治¹、佐藤光²、島本功（奈良先端大・バイオ、¹茨城大・農、²九大・農）

我々は、イネ品種南風由来の自発的な壊死斑を形成する変異体から、イネいもち病菌に対してレース非特異的な抵抗性が誘導されている系統を3系統(CM282, CM743, CM761)選抜した。細胞学的解析から、これらの変異体では病原体非存在下においても抵抗性反応で見られる自家蛍光物質の蓄積が高頻度で見られ、また細胞壁にカロースの蓄積が検出された。ノーザン分析では、これらの系統では壊死斑形成時には、防御関連遺伝子であるイネPR1やPBZ1遺伝子の恒常的な発現が誘導されており、さらにイネのファイトアレキシンであるモミラクトンAが有意に蓄積されていることも示された。以上の結果よりこれらの変異体は、抵抗性シグナル伝達経路上の変異体であると考えられる。また、培養細胞を用いた実験から、CM761ではホスファターゼ阻害剤を加えることにより活性酸素種の生産が野生型に比べ顕著に上昇し、キナーゼ阻害剤、およびNADPH oxidase阻害剤 (DPI) によりその効果が抑制された。このことから、CM761はNADPH oxidase活性を制御する信号伝達経路に変異があることが示唆された。CM743では、TUNEL法により細胞の核DNAの断片化が観察され、アポトーシス様の細胞死が起こっていると考えられる。

H1p-07

低分子量 Gタンパク質 Racによる細胞死の誘導
逸見 健司、島山 哲、川崎 努、島本 功
(奈良先端大・バイオ・植物分子遺伝)

植物では病原菌に対する応答としてNADPH oxidaseによる活性酸素の急速な生成 (Oxidative burst) が起こる。これによって産生される活性酸素は殺菌作用を示すだけでなく、過敏細胞死の誘導を含む抵抗性反応のシグナルとなっていることが明らかになりつつある。

貪食細胞の殺菌作用に関する研究からNADPH oxidase複合体の構成成分の1つである低分子量GTP結合タンパク質Racはその活性調節因子として機能していることが報告されている。そこでヒトRac1のアミノ酸配列をもとにイネのEST検索によって3種のcDNAクローン (OsRac) を単離した。これらの遺伝子について機能解析を行なうためにGTPase活性部位の1塩基置換による活性型OsRac遺伝子を構築した。NADPH oxidase活性調節に変異を生じたイネ細胞死変異系統CM265および野生型に対してパーティクルガンを用いて活性型OsRac遺伝子を一過的に導入したところCM265においてのみ病斑形成が誘導された。また活性型OsRac遺伝子の形質転換イネにおいても病斑形成が促進された。さらにTUNEL法によって形質転換イネの培養細胞では細胞死が引き起こされていることも確認され、OsRac遺伝子は細胞死を誘導するシグナル因子として機能していることが示唆された。

H1p-08

稲のプロテインキナーゼ、*who4*は栄養、光、サイトカイニンに加え低温に応答する

大場博樹、池田佳久、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)

小麦の*wpk4*遺伝子はプロテインキナーゼをコードし、その発現は栄養条件および光照射により促進される。これらの情報伝達にサイトカイニンが関与することも示されている。小麦よりゲノムサイズが小さく、遺伝子導入系の確立している稲より*wpk4*ホモログの単離を行ったところ2種のクローンが得られた。それぞれを*who*(*wpk4* homologue)4および*who7*と名付け、特徴付けを行った。WHO4とWHO7はそれぞれ508と520のアミノ酸からなり、プロテインキナーゼの機能領域の後にWPK4と同様、プロリンに富む領域を含み、系統樹から見て酵母から得られている栄養応答プロテインキナーゼSNF1とは異なるサブファミリーに属すると考えられた。*who4*の発現は全身で見られたが、特に葉で高かった。一方*who7*は葉でのみ発現するが、そのレベルは低く、幼植物では葉での発現も低かった。*who4*は*wpk4*と同様に栄養、光照射そしてサイトカイニンに応答することを確認したが、加えて低温処理によっても転写物が蓄積することが判明した。この結果は*who4*が栄養の情報伝達系ばかりでなく、ストレス応答の情報伝達系にも関与していることを強く示唆した。

H1p-09

アブシジン酸により特異的に活性化されるプロテインキナーゼの解析

吉田理一郎、市村和也¹、溝口 剛、篠崎和子²
篠崎一雄 (理研・植物分子、¹筑波大・生物科学、²農水省・国際農研・生物資源)

アブシジン酸 (ABA) はストレスホルモンとして知られ、高等植物における乾燥、低温に対する耐性機構の獲得に重要な役割を担う。ABAによるシグナル伝達にはタンパク質合成を介した経路と介さない経路が知られている¹⁾。我々はタンパク質合成を介さないABAのシグナル伝達機構を分子レベルから解明する手段として、ABAにより活性化されるプロテインキナーゼの単離、同定を試みている。

我々はシロイヌナズナ培養細胞T87を用いてABA (50μM) により1分以内に活性化されるプロテインキナーゼを、ゲル内リン酸化法により検出した。このプロテインキナーゼはミエリン塩基性タンパク質およびヒストンを基質としてリン酸化し、その分子サイズは約45kDaであった。このプロテインキナーゼ活性は一過的ではなく、ABA処理後2時間以内では常時安定した活性を示した。しかしながら、培地からABAを除去すると、その活性は数分以内に低下した。

また、このプロテインキナーゼは、抗ホスホセリン抗体により認識され、抗ホスホチロシン抗体には認識されなかったことから、MAPキナーゼとは異なるタイプのプロテインキナーゼであることが示唆された。

現在、このプロテインキナーゼにおける生化学的性質とABAのシグナル伝達系における役割を解析している。

1) Kazuo Shinozaki and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki (1997) Plant Physiol. 115(2): 327-334

H1p-10

タバコMitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) に関連するキナーゼ遺伝子NPK1の転写パターンの解析

中島麻里奈、平野敬子、坂野弘美、西浜竜一、町田泰則¹(名大・院理・生命理、¹京大院・理・植物)

MAPキナーゼカスケードは細胞増殖などを含む様々な細胞機能に関わるシグナル伝達において中心的な役割を果たしている。このシグナル伝達カスケードはMAPK, MAPKK, MAPKKKと呼ばれる3種類のプロテインキナーゼファミリーで構成される。

NPK1はタバコMAPKKKと構造的機能的に相同なプロテインキナーゼであり、頂端分裂組織や側根の分裂組織などの増殖組織で転写産物が多く検出される。増殖を停止した組織においては検出されないが、植物ホルモン等により細胞分裂を誘導することによって転写が誘導される。このようなことから、NPK1は細胞増殖のプロセスにおいて機能していることが予想されている。

通常の植物体には、チミジンアナログの取り込み実験によってNPK1の転写と細胞分裂にコリレーションが認められたが、発芽時や植物ホルモンによるNPK1の転写誘導はDNA合成阻害剤により抑えられないことが観察され、NPK1が、S期に入ってしまうもしくはG1期に発現することが推察されたので報告する。

H1p-11

ストレスによるシロイヌナズナ MAP キナーゼの活性化と生化学的解析

市村和也^{1,2}、溝口剛¹、吉田理一郎¹、篠崎一雄¹(¹理研・植物分子、²筑波大・生物科学)

我々は、高等植物における環境ストレスによる情報伝達系の解明を目的として、MAP キナーゼ(MAPK)カスケードに注目し解析を行っている。MAPK カスケードは MAPKKK→MAPKK→MAPK という 3 種類のプロテインキナーゼからなるリン酸化カスケードである。MAPK カスケードは動物、植物から酵母に至るまで進化的に保存されており、増殖因子や環境ストレスによる細胞内シグナル伝達で重要な役割を果たしている。

我々は、シロイヌナズナにさまざまなストレスを与え、MAPK 様の活性が見られるか、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)を基質としてゲル内リン酸化法を用いて解析を行った。その結果、傷害、接触、低温、湿度低下の各処理において、分子量約 49kDa のプロテインキナーゼが一過的に活性化することを見出した。

一方、シロイヌナズナではすでに9種類の MAPK をコードする cDNA が単離されている。そのうちの 1 つ、ATMPK3 の遺伝子発現は乾燥、低温、接触、傷害によりすみやかに誘導され、一過的な mRNA の増加を示すことから、ATMPK3 の上記の各ストレス応答に対する関与が示唆されていた。我々は ATMPK3 タンパク質を特異的に認識するペプチド抗体を作成し、免疫沈降を行った。傷害により活性化するプロテインキナーゼ活性は抗 ATMPK3 抗体、および抗ホスホチロシン抗体で回収された。このことから、傷害による ATMPK3 の活性化が強く示唆された。接触、低温、湿度低下に関しては現在解析中である。

H1p-12

イネキチナーゼ遺伝子発現における細胞内 Ca²⁺の関与

斎藤美佳子、松岡英明 (農工大・工・生命工学)

イネ培養細胞にエリシター(100nM)を作用させたところ、細胞内の Ca²⁺濃度上昇が観察された。Ca²⁺濃度変化は Ca²⁺感受性蛍光色素(Fluo-3)で測定した。また Ca²⁺濃度上昇に伴って、キチナーゼ遺伝子が発現することが、レポーターとして組み込んだ GFP 遺伝子の発現によって確認された。次に、この場合の Ca²⁺について、細胞内の Ca²⁺リザーバー(液胞や ER)に由来するものか、あるいは細胞外から流入したのものかについて調べた。即ち、ベラパミル(Ca²⁺チャンネルブロッカー)(100μM)をエリシターと同時に作用させたところ、細胞内 Ca²⁺濃度上昇がわずかに観測されたが、GFP 遺伝子発現は観察されなかった。一方、エリシターを作用させて 30 分後にベラパミルを作用させた場合は、顕著な細胞内 Ca²⁺濃度上昇とともに GFP 遺伝子発現も観察された。従って、細胞内 Ca²⁺リザーバーから仮に供給されたとしても、その Ca²⁺だけでは、エリシターからキチナーゼ遺伝子発現に至るシグナル伝達に有効ではないということがわかった。

H1p-13

ゼニゴケCa²⁺依存性タンパク質リン酸化酵素遺伝子のオルタナティブスプライシング

西山りゑ、水野浩志、岡田祥子、山口知哉、竹中瑞樹、福澤秀哉、大山莞爾 (京大院・農・応用生命)

今回我々は、ゼニゴケにおいてCa²⁺依存性タンパク質リン酸化酵素(CDPK)遺伝子を単離し、そのゲノム構造を明らかにした。ゼニゴケ CDPKは他の植物 CDPKと高い相同性を有し、N末端からリン酸化触媒部位、自己阻害部位、カルシウム結合部位の3つのドメインより構成されている。この遺伝子は9個のエキソンと8個のイントロンより成るが、6番目と7番目(エキソン6A,6B)はアミノ酸レベルで4残基置換しただけのほぼ同一のエキソンで、カルシウム結合ドメイン内のEFハンドと呼ばれるモチーフをコードしている。RT-PCR解析により、エキソン6Aと6Bは互いに除去し合う形でスプライスされ、単一のCDPK遺伝子から2種類のmRNAが作られていることが判明した。又、エキソン6Aを持つmRNAは雄性生殖器官において他の器官より多くスプライシングされていた。さらに、エキソン6A又は6Bのどちらかを含むcDNAを大腸菌内で発現させ、抽出した2種類のタンパク質は、*in vitro*で共にカルシウムに依存したタンパク質リン酸化活性を示した。

H1p-14

ラン藻のアデニル酸シクラーゼCyaCのリン酸化とアデニル酸シクラーゼ活性の促進

笠原賢洋、大森正之(東京大・総合文化・生命環境)

CyaCはラン藻のアデニル酸シクラーゼの1つであり、C末端の触媒部位の他に、バクテリアの二成分制御系の分子であるシグナルセンサータンパク質の機能部位と、これを挟んで二つの応答レギュレータータンパク質の機能部位を持つ。

今回、我々はシグナルセンサータンパク質の機能部位のリン酸化部位と想定される572番目のヒスチジン残基をグルタミン残基に、応答レギュレータータンパク質の機能部位のリン酸化部位と想定される60番目と895番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した変異タンパク質を大腸菌を用いて作製し、リン酸化とアデニル酸シクラーゼ活性との関係を調べた。

CyaCはまず、572番目のヒスチジン残基を自己リン酸化する。このリン酸基は895番目のアスパラギン酸残基に転移された。この895番目のアスパラギン酸残基のリン酸化によってアデニル酸シクラーゼ活性が促進されることが強く示唆された。

H1p-15

シロイヌナズナの花序で発現する受容体型キナーゼ遺伝子の構造および機能解析

竹村美保、浅井拓也、根本恭子、金本浩介、河内孝之（奈良先端大・バイオ）

シロイヌナズナの花序で発現する受容体型キナーゼ遺伝子 *IMK2* と *IMK3* 遺伝子の cDNA ならびにゲノム配列を決定し、構造を解析した。その結果、両者とも受容体としてロイシンリッチリピートを持ち、膜間通ドメインをはさんで、Ser/Thr 型のタンパク質リン酸化ドメインを持つ受容体型キナーゼ遺伝子であることが明らかとなった。また、CAPS マッピングにより両遺伝子が第3染色体上のごく近傍に位置することがわかった。次に、これらが関与するシグナル伝達経路を解明するために、酵母の Two-hybrid 法を用いてキナーゼドメインと相互作用するタンパク質遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、これまでに *IMK3* に対して3つの候補クローンが得られ、2つは RNA ポリメラーゼならびに MADS タンパク質と相同性を示し、残りの1つは既知遺伝子と相同性を示さなかった。また、キナーゼドメインが実際にリン酸化活性を持つかどうかを調べた結果、いずれも自己リン酸化能を持つことが明らかとなった。

H1p-16

カゼインキナーゼ II (CK-II) による葉緑体 ATP 合成酵素のリン酸化

金勝一樹¹、沢田博司、久堀 徹¹
(北里大一般教育,¹東工大資源研)

カゼインキナーゼ II (CK-II) は、遺伝子発現や各種代謝系の制御などを行う多機能なプロテインキナーゼだと考えられている。我々は、葉緑体における CK-II の役割を明らかにする目的で、CK-II によってリン酸化される葉緑体タンパク質の解析を行ってきた。これまでに 30-35 kDa の RNA 結合性因子 (RNP) が、植物種に共通して CK-II の基質となることを明らかにした。前々回の本学会では、部分精製した RNP 画分中の約 56 kDa の polypeptide (p56) が CK-II によってリン酸化されることを新たに報告した。今回、ホウレンソウ葉緑体から各種カラムクロマトグラフィーを用いて p56 を精製し、同定することを試みた。その結果、(1) p56 の N 末端部分一次構造が、葉緑体 ATP 合成酵素 β サブユニット (54 kDa) のそれと完全に一致したこと、および (2) 葉緑体より ATP 合成酵素として単離した画分中の β サブユニットが CK-II によってリン酸化されたことから、p56 は葉緑体 ATP 合成酵素 β サブユニットであると同定した。さらに、ATP 合成酵素 α および γ サブユニットも CK-II によってリン酸化されることが明らかとなり、CK-II はリン酸化を通して、葉緑体 ATP 合成酵素の機能調節に何らかの役割を持つことが予想される。現在、ATP 合成酵素 α 、 β および γ サブユニット中の CK-II によるリン酸化ドメインの特定と、リン酸化が酵素活性に与える影響を調べている。

H1p-17

ソラマメ孔辺細胞の ABA 応答性プロテインキナーゼによる内向き整流性 K⁺チャネル KAT1 のリン酸化

森 泉¹、魚住信之^{1,2}、Julian I. Schroeder³、武藤尚志^{1,2}
(名古屋大・¹院農、²生物分子応答研究セ、³カリフォルニア大サンディエゴ校)

内向き整流性 K⁺チャネル KAT1 の C 末端のリコンビナントペプチドを基質とした、ゲル内リン酸化アッセイ法を用い、ソラマメ孔辺細胞内のプロテインキナーゼの検出を行った。見かけの分子質量が 48 kDa で、ABA によって活性化されるが、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニンによっては活性化されないキナーゼが検出された。このキナーゼは KAT1 の C 末端及びミエリン塩基性タンパクをリン酸化したが、ヒストン、カゼインをリン酸化しなかった。また、スタウロスポリンまたは K-252a で阻害された。キナーゼの活性及び電気泳動上の移動度は Ca²⁺に影響されなかった。このキナーゼ活性は葉肉細胞中には検出されなかった。このキナーゼの性質は以前に報告した ABA 応答性プロテインキナーゼ [Mori and Muto (1997) Plant Physiol. 113, 833-839] の性質とよく一致している。

H1p-18

低温ストレスなどで誘導されるカルシウム依存性プロテインキナーゼの解析

西條雄介、畑信吾、泉井桂 (京都大院・農・応用生物学)

トウモロコシのカルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK) 遺伝子 ZmCDPK7⁽¹⁾ は、低温やシクロヘキシミドにより mRNA 発現が誘導される ZmCDPK1⁽²⁾ とアミノ酸レベルで 97.1% の同一性を示した。サザン解析からもこれら二種類の近縁な CDPK 分子種がトウモロコシゲノムに存在することが確認された。

この CDPK サブファミリーの生理的機能を明らかにするため、同じく単子葉植物のイネから ZmCDPK7 とアミノ酸レベルで 88.6% の同一性を示し、ホモログと推定される OsCDPK7 遺伝子を単離した。サザン解析の結果、この分子種はイネゲノムに単一コピー存在することがわかった。また mRNA レベルが ZmCDPK1 と同様に低温およびシクロヘキシミド処理で葉および根で上昇することが確認された。大腸菌で発現させた組換え体 OsCDPK7 は、ヒストンを基質として Ca²⁺ 依存性のリン酸化活性を示した。次に OsCDPK7 に比較的特異的な C 末端側 103 アミノ酸を同様に発現させて抗原として用い、抗体を作製した。精製した抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、葉・根ともに約 50 kD のバンドが検出された。少なくとも mRNA 発現が誘導されるストレス処理後 3 時間ではタンパク質レベルには変動が見られなかった。現在、OsCDPK7 タンパク質の挙動についてさらに詳細な解析を行っている。

(1) Saijo Y. *et al.* (1997) BBA 1350, 109-114.

(2) Berberich T. and Kusano T. (1997) MGG 254, 275-283.

H2a-01

アラビドプシス *ped2* 突然変異体はPTS2型ペルオキシソームタンパク質の高分子量前駆体を蓄積する

林 誠、鳥山可菜子、近藤真紀、西村幹夫
(基生研・細胞生物)

[目的] すべてのペルオキシソームタンパク質は、細胞質で翻訳された後にペルオキシソーム内へ輸送される。我々は高等植物のペルオキシソームタンパク質の大部分がPTS1またはPTS2輸送シグナルのどちらかを持っていることを明らかにしてきた。PTS1型タンパク質はC末端に特定のアミノ酸配列からなるトリペプチドを持ち、一方、PTS2型タンパク質は、高分子量前駆体として細胞質で翻訳、ペルオキシソーム内に輸送された後、N末端延長ペプチドが除去されて成熟型タンパク質になる。今回高等植物ペルオキシソームタンパク質の細胞内輸送機構について遺伝的解析を試みたので報告する。

[結果] 我々は、2,4-dichlorophenoxybutyric acid 耐性を示すアラビドプシス突然変異体を多数単離している¹⁾。これらの1つ *ped2* 突然変異体は、5番染色体のLFY3とg2368の間に変異遺伝子を持ち、スクロース非存在下では発芽せず、矮性、ペルオキシソーム形態異常などの表現型を示す。*ped2* 突然変異体は、チオラーゼやリノゲン酸脱水素酵素などPTS2型ペルオキシソームタンパク質の高分子量前駆体を細胞質に蓄積していることから、PTS2型タンパク質の輸送が阻害されていることが示唆された。この突然変異体におけるPTS1型タンパク質の細胞内輸送については現在検討中である。これらの結果をもとに、高等植物におけるペルオキシソームタンパク質の細胞内輸送機構について考察する。

1) Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M. and Nishimura, M. 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of Arabidopsis have defects on glyoxysomal fatty acid β -oxidation. *Plant Cell* in press.

H2a-02

植物カタラーゼのミクロポディーへの輸送機構

立部由紀、江坂宗春、真野昌二¹⁾、林 誠¹⁾、西村幹夫¹⁾
(広島大・生物生産、¹⁾基生研・細胞生物)

カタラーゼは、ミクロポディータンパク質の1つである。本酵素は、最近、酸化ストレスに対する防御酵素として注目されているが、その合成、及びミクロポディーへの輸送機構については明確になっていない。

これまでに、3つのカボチャカタラーゼ (*cat1, 2, 3*) のcDNAクローンが得られている。そこで、カボチャの*cat1*カタラーゼのミクロポディーへの輸送機構に着目し、その輸送シグナルを同定することを目的とした。多くのミクロポディータンパク質では、C末端にあるSKLモチーフ(PTS1)が輸送シグナルとして機能していることが明らかになっている。*cat1*カタラーゼのアミノ酸配列中にも、SKLモチーフと類似した配列SHLが認められる。しかし、そのSHLのC末端側に6残基のアミノ酸が付加されている。従って、このSHLがミクロポディーへの輸送シグナルとして機能しているかどうかは不明である。

今回、カボチャ*cat1*cDNAまたはその欠失遺伝子とGreen Fluorescent Protein(GFP)との融合遺伝子をタバコ培養細胞(BY-2)に導入し、それらの形質転換体における融合タンパク質の細胞内局在を調べることにより、カタラーゼの輸送シグナルの同定を目指した。GFPに*cat1*全配列をつけたものは、ミクロポディーに取り込まれた。しかし、*cat1*cDNAのC末端側300アミノ酸をつけたもの、また*cat1*のC末端側9アミノ酸(SHLNVRPSI)を付けたものはミクロポディーへ取り込まれず、細胞質中に観察された。これらのことから、*cat1*タンパク質の輸送には、PTS1以外の輸送シグナルが関与しているものと考えた。

H2a-03

Ara4 GTPaseとその相互作用因子の酵母を用いた解析(II)

上田貴志、内宮博文、中野明彦¹⁾ (東大・分生研、¹⁾理研・生体膜)

Rab/Ypt familyに属する低分子量GTPaseは、GTPase cycleと呼ばれるGTP型、GDP型の構造変換を通し、輸送小胞と標的膜の融合を制御する分子スイッチとして機能している。小胞輸送が正しく機能するためには、このGTPase cycleが厳密に制御され、分子スイッチとしてのon/offの情報が下流に正しく伝達されることが必要不可欠である。我々は、高等植物において小胞輸送が果たす役割と、その分子機構の解明に向けて、Rab/Ypt familyタンパク質の機能解析という側面から研究を行っており、高等植物におけるRabの制御、もしくは情報伝達に与する因子の探索を進めてきた。その結果、これまでに、アラビドプシス由来のRab GTPaseであるAra4と相互作用する因子として、AtGDI1、及びNo.6の単離に成功している(1995、1996年度植物生理学会年会)。本大会においては、それらの因子とAra4との相互作用様式を、様々な変異型Ara4と、相互作用因子のスクリーニングに用いた酵母の系を組み合わせるにより、さらに詳細に解析したので、その結果について報告する。

H2a-04

エンドウのRab/Yptファミリー低分子量GTPase PRA2の酵母を用いた解析

松田憲之^{1,2)}、上田貴志²⁾、内宮博文²⁾、佐々木幸子³⁾、中野明彦¹⁾
(¹⁾理研・生体膜、²⁾東大・分生研、³⁾名古屋大・農)

Rab/Yptファミリータンパク質は、小胞輸送経路で輸送小胞とターゲット膜との融合時に働く低分子量GTPaseであり、真核生物間で広く保存されている。高等植物からも多数のRab/Yptファミリータンパク質が単離され、そのうちいくつかは出芽酵母 *ypt1* 変異株や *ypt6* 変異株の温度感受性を相補できる。一方、シロイヌナズナのRab/Yptタンパク質の1つAra4を一連の酵母 *ypt* 変異株中で発現させると、共通の制御因子GDIを競合するため、逆にその生育を著しく阻害することが上田ら(1)によって報告されている。

PRA2はエンドウより単離されたRab/Yptファミリーに属する低分子量GTPaseであり、酵母のYPT3と60%程度の相同性を示す。酵母の *ypt3* 温度感受性変異株中でPRA2を過剰発現したところ、やはり *ypt3* 変異株の温度感受性を相補するどころか、増殖を阻害することが明らかとなった。野生型の酵母細胞中でPRA2を過剰発現した際にはこの増殖阻害は観察されない。酵母の他のRab/Ypt低分子量GTPaseをコードするSEC4およびYPT1の変異株や、これらのタンパク質の共通の制御因子であるGDIの変異株(*sec19/gdi1*)中でPRA2を過剰発現しても増殖が阻害されることから、Ara4の場合と同様にPRA2が酵母本来の制御因子であるGDIを奪ってしまい、その結果種々の変異株中で増殖阻害が引き起こされているものと考えられる。

1. Ueda et al. (1996) *Plant Cell* 8, 2079-2091

H2a-05

講演取消

H2a-06

糖輸送の分子機構

—イネ単離胚を用いた 糖トランスポーターの発現—
豊福 恭子¹、齋藤 俊和¹、松倉 千昭¹、広瀬 竜郎²、
大杉 立²、山口 淳二¹ (1,名古屋大・生物分子応答研
究センター 2,農水省・生物研)

私たちは、種子胚を用いて糖による遺伝子発現制御とシグナル伝達の植物ホルモンとのクロストーク現象に着目して研究を進めている^{1,2}。今回は胚における糖輸送の分子機構に関する研究を報告する。

単離胚を用いた実験系において *in situ* hybridization やノーザン解析を行った結果、スクローストランスポーター (*OsSUT1*) は節部伴細胞に特異的に発現し、細胞内糖濃度によりその発現が制御されていることが現在までに明らかとなった。

また、3種類のイネグルコーストランスポーター cDNA を単離し解析を進めている。その結果、その遺伝子は細胞膜を12回貫通する膜タンパク質をコードしていることが示唆された。このトランスポーターについてさらにすすめた解析結果を中心に報告する。

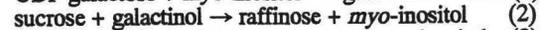
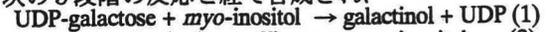
1) *Plant Cell* 9:2197(1997)

2) *Umemura et al. Planta* in press(1998)

H2a-07

キュウリ葉由来ラフィノース合成酵素の精製
野崎基司、大住千栄子、木田隆夫 (味の素・中央研究所)

ウリ科植物の主要転流糖であるスタキオースは次の3段階の反応を経て合成され、



それぞれ(1)ガラクトチノール合成酵素(GS)、(2)ラフィノース合成酵素(RS)、(3)スタキオース合成酵素(STS)により触媒される。GS、STSはズッキーニの葉から精製されているが、RSは単一蛋白質として精製された報告はない。そこで、ウリ科植物の転流糖合成制御を明らかにするためにキュウリよりRSを精製した。

RS活性はパルスドアンペロメトリー検出器を接続したHPLCにてラフィノースを定量することにより測定した。PMSF、ポリクラーラルAT、DTTを加えた緩衝液により葉脈から酵素を抽出した。粗抽出液は陰イオン交換クロマトグラフィー(HiTrapQ、DEAE TOYOPEARL)、ゲル濾過、ハイドロキシアタイトクロマトグラフィーにより精製した。最終的に2590倍に精製されたRS画分が得られ、活性の回収率は12%であった。精製酵素画分はSDS-PAGEにて単一バンドを呈し、その分子量は約90kDaであった。

H2a-08

キュウリ葉由来ラフィノース合成酵素の性質と遺伝子クローニング

大住千栄子、野崎基司、木田隆夫 (味の素・中央研究所)

ラフィノース合成酵素は、スクロースとガラクトチノールからラフィノースを生成する反応を触媒するガラクトース転移酵素で、ラフィノース族オリゴ糖 (RFO; α -1,6-galactosyl_n-Suc; $1 \leq n \leq 7$) 生合成系の鍵酵素の一つと考えられている。RFOはデンプンに次いで広く植物界に存在し、ウリ科植物ではRFOのスタキオースが、スクロースとともに転流糖として機能している。しかし、これまでにラフィノース合成酵素の完全精製の報告はなく、その性質や遺伝情報は不明であった。

我々はキュウリ葉よりラフィノース合成酵素を精製し、反応特性を明らかにした。さらに、内部アミノ酸配列を解析し、アミノ酸配列に基づいたPCRプライマーによるRT-PCRを行い、ラフィノース合成酵素遺伝子断片を得た。これをプローブにキュウリ葉由来のcDNAライブラリーをスクリーニングし、遺伝子をクローニングした。キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子は、784アミノ酸をコードしていた。

H2a-09

NaCl濃度に対する *Nicotiana occidentalis* の二相的な反応
小森俊之、山田茂裕、Patricia N. Myers、今関英雅（日本
たばこ産業(株)遺伝育種研究所）

演者らは、57種の *Nicotiana* 属植物を供試して、水分
ストレス耐性に関する検定を行ってきた（小森ら、日本
育種学会第90回講演会）。その過程で、*in vitro* におけ
る幼苗耐塩性を検定した際に、*N. occidentalis* が培地中
NaCl濃度に対して特異な反応を示すことが明らかとな
った。すなわち、培地中NaCl濃度を75、150、225、300mM
と高めると、他の種は乾物重蓄積が漸減し、限界濃度以
上では枯死したのに対し、*N. occidentalis* は、75mM NaCl
存在下では枯死する一方で、150mM NaCl存在下では枯
死することなく生育を続けた。この二相的な反応につい
ての理解を深めるために、まず、環境要因の影響につい
て調査した。その結果、明条件24℃~30℃で生育させた
場合に、この反応が再現性よく観察されることが示され
た。現在、二相的な反応と植物体内のイオン蓄積との関
連について調査中である。本研究は、石油産業活性化セ
ンターの委託研究として行われた。

H2a-10

Synechocystis sp. PCC 6803 の動物型
Na⁺/H⁺アンチポーター

稲葉昌美¹、坂本 敦^{1,2}、村田紀夫^{1,2}（総研大・
生命科学¹、基生研²）

動物細胞のNa⁺/H⁺アンチポーター（NHEs）は、
成長因子やホルモン、細胞質の酸性化によって活性
化され、細胞質膜のNa⁺勾配を利用してプロトン
を細胞外へ排出する。*Synechocystis* sp. PCC
6803のゲノムにはNHEsのホモログの遺伝子が2
つ見い出されており、細胞内のpHとNa⁺濃度の調
節に重要な役割を担っていると推測される。これら
の遺伝子（*spa1*、*spa2*）を大腸菌のNa⁺/H⁺アンチ
ポーター遺伝子欠損株 EP432 に導入し、Na⁺誘導
性のプロモーターの制御下で発現させたところ、
*spa1*を導入した形質転換株はNa⁺、Li⁺耐性を獲得
した。また、この形質転換株から調製した反転膜小
胞にはNa⁺/H⁺アンチポート活性が検出された。
spa1、*spa2*の遺伝子破壊株の生理学的・生化学的
解析から、それらの*Synechocystis*における役割
を考察する。

H2a-11

ラン藻 硫酸トランスポーター遺伝子の発現調節領域
の同定
鈴木英治、青木三絵、佐藤いずみ（茨城大・理・環境）

ラン藻では、硫黄源である硫酸イオンの欠乏条件に
おいて、硫酸トランスポーターの発現量が増大し、硫
酸イオンの取込み能が向上する。*Synechococcus* sp.
PCC 7942株では、硫酸トランスポーターのサブユニ
ットの遺伝子 *cysA* と *sbpA* は、隣接して逆方向に
配向している。両遺伝子上流領域について、欠失シ
リイズを作成し、それぞれをレポーター遺伝子
gusA に連結して、異なる硫黄栄養条件下における
GUS活性を検討した。

融合遺伝子 *cysA-gusA*、*sbpA-gusA* いずれの場合
についても、生育培地からの硫酸塩の除去により、
GUS活性の増大が認められた。これに対し、コアプ
ロモーターの近傍に存在する逆方向反復配列を含む
24残基を欠失させた際、硫酸の存否にかかわらず
GUS活性は欠乏条件でのレベルと同等の高い値にな
った。従って、硫酸イオンが存在する環境下では遺伝
子上流領域の反復配列に抑制因子が結合し、遺伝子の
発現を抑えていることが示唆された。

H2a-12

タバコ培養細胞およびオオムギ葉肉細胞の原形質膜カルシウ
ム結合挙動と耐塩機構との関係

村田芳行、藤田昌史¹、中谷卓也¹、桂真一¹、小尾一郎¹、角
谷忠昭¹（岡山大・農、¹京都大・農）

塩ストレス非適応および適応タバコ培養細胞ならびにオオ
ムギ葉肉細胞の原形質膜表面のカルシウムの結合挙動につい
て細胞電気泳動法を用いて調べた。カルシウムの結合挙動は、
親和性の異なる2種の部位を持つモデルを用いて解析し、非
線型最小二乗法によって結合パラメータを決定した。

塩ストレス非適応タバコ培養細胞において、Na⁺は、原形
質膜結合カルシウム量の特異的減少を起こした。しかし、塩
ストレス適応タバコ培養細胞およびオオムギ葉肉細胞におい
て、このNa⁺による結合カルシウム量の特異的減少は起きな
かった。

H3a-01

トウモロコシにおける窒素栄養に応答したサイトカイニンの蓄積とその分子種の同定

武井兼太郎、榊原 均、谷口光隆、杉山達夫 (名古屋大院・生命農学)

トウモロコシ葉から単離したバクテリア二成分情報伝達系のレスポンス・レギュレーターホモログ*ZmCip1*は窒素飢餓の植物葉で無機窒素により発現誘導される。一方、この植物の切り取り葉では*ZmCip1*は無機窒素ではなく、サイトカイニンで誘導される。サイトカイニンが主に根で合成されることから、窒素栄養に応答し根のサイトカイニン量が増加し、葉での*ZmCip1*の発現誘導をもたらすという仮説を立てた。これを検証するために、窒素飢餓からの回復過程でトウモロコシ根でのサイトカイニン量の変動を解析し、分子種の同定を行った。水耕で得た窒素飢餓植物に硝酸塩を補填し、経時的に根をサンプリングし、抗サイトカイニン抗体とHPLCによるサイトカイニンを精製した。その結果、窒素補填により複数のサイトカイニンの量が増加した。この画分をさらに精製し、質量分析の結果、イソペンテニルアデノシン-5'-リン酸 (iPMP) を同定した。このサイトカイニンは、窒素補填2時間後に約10倍に増加し、切り取り葉の系で*ZmCip1*を誘導することが判明した。これらは硝酸塩がサイトカイニンで媒介される*ZmCip1*誘導の外部シグナルであることを示唆する。窒素に応答し根で集積するその他のサイトカイニン分子種を同定中である。

H3a-02

硫黄欠乏に応答した遺伝子発現制御と含硫化合物濃度の変動の組織特異性

粟津原元子、金皓衍、茅野充男、林浩昭、藤原徹 (東大院・農・応生化)

高等植物は硫黄欠乏(S欠)にさらされると、正常な生育を保つために、遺伝子発現や代謝活性を変化させると考えられる。本研究では、S欠条件下での遺伝子発現と化合物濃度の変化の関係について検討した。

S欠に応じた遺伝子の発現解析のモデルとして、ダイズの種子貯蔵タンパク質のひとつである、 β コングリシニン β サブユニットタンパク質をコードする遺伝子(β 遺伝子)を用いた。 β 遺伝子のプロモーター断片を含む35Sプロモーター(β -35S)に β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子をつないで、シロイヌナズナに導入し、組織別にS欠に応じた遺伝子発現の変化を調べた。その結果、葉、莖、花でS欠によりGUS活性が増加し、根では増加しなかった。これにより、種子以外の地上部にも、S欠に応じて β 遺伝子の発現を制御する機構が存在することが示唆された。

さらにアミノ酸および硫酸イオン濃度のS欠による変化を測定した。Oアセチル-L-セリン、グルタチオン、システイン、メチオニンおよび、硫酸イオン濃度と、 β -35Sの発現パターンとの相関関係が組織により異なった。このことから、S欠に応答した β -35Sの発現のシグナルとなる化合物が組織により異なる可能性が考えられる。

H3a-03

酵母の銅吸収変異株*ctr1*の変異を回復させるオオムギのcDNA、*SFD1*の機能解析

山口博隆^{1,2}、奥本佐喜子¹、中西啓仁¹、西澤直子¹、森敏^{1,2} (¹東大大学院・農学生命科学、²CREST)

昨年の、日本植物生理学会年会京都大会で、鉄欠乏培地上での、酵母の*ctr1*変異株の成長を回復させる、cDNAクローン*SFD1*(*Suppressor of Ferrous uptake Defect 1*)の単離を報告した。本講演ではこの*SFD1*遺伝子の、酵母をモデル生物とした機能解析と、実際の植物細胞内での機能解析の結果を報告する。

*ctr1*変異株はhigh-affinityな銅のトランスポーターに変異を持っており、銅欠乏状態になっている。そのため二価鉄吸収能の欠損、酸化代謝能の欠損、酸化的ストレスに対する感受性などの変異形質を持っている。*SFD1*を*ctr1*変異株を発現させると、これらの変異形質は部分的に回復された。このことは*SFD1*の発現は*ctr1*変異株の細胞内の銅の利用性を改善させることを示している。実際の植物細胞でも*SFD1*は銅代謝を制御していると考えられる。植物体内での*SFD1*の機能を明らかにするために、*SFD1*を過剰発現させた形質転換植物を作成し解析を行った。またGFP(green fluorescence protein)との融合遺伝子をトランジェントに発現させると融合タンパク質は核に移行することがわかった。これらの結果をふまえて、*SFD1*の高等植物細胞での機能を考察する。

H3a-04

講演取消

H3a-05

講演取消

H3a-07

Synechococcus sp. PCC 7942の*cmp* オペロンの強制発現による高CO₂条件下での高親和性HCO₃⁻ 能動輸送活性の誘導
小俣達男, Dean Price¹, Murray Badger¹, 岡村将人, 郷田
諭, 小川晃男² (名大・農・応用生物科学, ¹Molec. Plant
Physiol., Res. Sch. Biol. Sci., Australian Natl. Univ., ²名大・
生物分子応答研究センター)

CO₂欠乏条件下で誘導される*Synechococcus* sp. PCC 7942
の*cmpABCD*オペロンは硝酸イオン能動輸送体と相同なABC型
輸送体をコードしている。CO₂欠乏条件下で培養した*cmpAB*
欠損株 (M42) のHCO₃⁻ 取り込み活性が示すHCO₃⁻ に対する
親和性 (K_{0.5}=35 μM) が野生株の場合 (K_{0.5}=10 μM) に比
べて有意に低いことから、我々は*cmp*オペロンがHCO₃⁻ の能
動輸送に関与すると推定した (1997年度年会)。本研究では
さらに、硝酸同化系酵素群をコードする*nirA*オペロンのプロモ
ータを*cmpABCD*につなぎ、*cmpABCD*の発現が窒素によって制
御される変異株を作製して、*cmpABCD*とHCO₃⁻ 輸送活性の関
係を調べた。この変異株を硝酸を窒素源として培養したところ、
high CO₂条件のもとで*cmpABCD*が発現し、高親和性HCO₃⁻ 輸
送活性が発現した。このことにより、*cmpABCD*が高親和性
HCO₃⁻ 輸送体をコードすることが明確になった。

H3a-06

アラビドプシス硝酸還元酵素はSer-534依存的に
リン酸化し14-3-3タンパク質(GF14s)と結合する
金丸研吾^{1,2,3}, Wenpei Su², Nigel M. Crawford²
(¹国立遺伝研, ²UCSD, ³現・東京大学分生研)

高等植物硝酸還元酵素(NR)は、暗下におい
て速やかに活性が抑制される。この翻訳後調節に
はNRのリン酸化と14-3-3タンパク質が関与する
ことがホウレンソウNRの研究から示唆されてい
る。本研究ではまずHisタグをつけたアラビドプ
シスNRをメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*で
大量発現させ精製系を確立した。*in vitro*解析の結
果、N末のMoCoドメインとヘムドメインをつな
ぐhinge1領域の保存されたSer-534が活性抑制だ
けでなくリン酸化にも必要なことが明らかとな
った。さらに、アラビドプシス14-3-3タンパク質
(GF14)のうち7分子種についてNRと直接結合す
ることを酵母two-hybrid systemにより証明し
た。この結合能もSer-534に完全に依存しており
hinge1領域のみで十分であった。

これらの結果から、アラビドプシスNRは暗
下でhinge1領域中のSer-534のリン酸化を受け、
ここにGF14sが結合して、NR活性が抑制される
ことが示唆された。

H3a-08

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における炭酸同化系
遺伝子の発現制御の解析
郷田諭, 前田真一, 小俣達男 (名古屋大・農・応用生物化学)

炭素欠乏条件下で誘導される *Synechococcus* sp. PCC
7942 の *cmpABCD* オペロンは HCO₃⁻ 輸送体をコードして
いる。 *Synechocystis* sp. PCC 6803 においては、
Synechococcus sp. PCC 7942 の *cmp* 遺伝子群と相同性
が高く、炭素欠乏条件下で誘導される ORF である
slr0040,0041,0043,0044 がそれぞれ *cmpA,B,C,D* に相
当すると考えられる。 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の
cmp オペロンの 250bp 上流には LysR 型の転写調節因子
をコードする ORF slr0030 (ORF1) が逆向きに存在する。
ORF1 のコードするタンパク質が *Thiobacillus*
ferrooxidans において *rbcLS* の発現を制御している RbcR
とアミノ酸配列で 50% 以上の同一性を示すこと、および
LysR 型の転写調節因子の多くが上流に位置する遺伝子の
転写を制御していることから、ORF1 が炭素欠乏に
応答して *cmp* オペロンの発現を誘導していると推測された。
Synechocystis sp. PCC 6803 には ORF1 の他にも RbcR
と高い相同性を示す ORF slr1727 (ORF2) が存在するの
で、各々を薬剤耐性遺伝子を挿入して壊した株を用いて、
cmp オペロンの発現を調べた。その結果 ORF1 を欠く変
異株では炭素欠乏条件下でも *cmp* オペロンの誘導が起
こらなかったが、ORF2 を欠く変異株では *cmp* オペロンが
誘導された。更に、ゲルシフトアッセイにより ORF1 のコ
ードするタンパク質が *cmpA* の上流領域に結合するこ
とが確かめられた。これらのことから *cmp* オペロンの発現
は ORF1 のコードする LysR 型転写調節因子によって直接
制御されていると結論した。

H3a-09

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 のシアナーゼ欠損変異株における炭酸同化系遺伝子のシアン酸による転写制御

原野よしみ、小俣達男 (名古屋大・農・応用生物科学)

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 にアンモニアを与えて窒素充足条件にすると炭酸同化の鍵酵素である Rubisco をコードする *rbclS* の転写は活性化され、硝酸同化系の酵素をコードする *nirA* オペロンの転写は抑制される。*rbclS* の転写活性化と *nirA* オペロンの転写抑制がシアン酸 (NCO⁻) の添加によっても引き起こされることから、我々は窒素同化代謝の副産物であるシアン酸が細胞内における窒素充足のシグナルとして窒素、炭素同化系の遺伝子発現を制御すると推測した (Suzuki et al. [1996] J. Bacteriol. 178:2688-2694)。しかしシアン酸はラン藻の細胞内ではシアナーゼによって速やかにアンモニアと CO₂ に分解される。そこでシアナーゼ遺伝子 (*cynS*) を特異的に欠損させた変異株を作成し、シアン酸の細胞内での分解を抑制した状態でシアン酸添加の影響を再検討したところ、シアン酸は *nirA* オペロンの転写を抑制しなかったが、*rbclS* およびカルボキシゾーム (Rubisco が局在する構造体) の形成と機能に関与する *ccmKLMNO*、*icfA* の転写は活性化した。一方、無機炭素の輸送に関与する *ndhB*、*cmp* オペロンの転写はシアン酸によっては影響されなかった。以上のことから、シアン酸は炭酸同化系遺伝子群のうちカルボキシゾーム関連遺伝子群を活性化すると結論した。

H3a-10

シロイヌナズナのシアナーゼ遺伝子のクローニング

愛知真木子、西田郁子、小俣達男 (名古屋大・農・生命農学研究科)

シアン酸(NCO⁻)は、窒素同化の中間産物であるカルバモイルリン酸の分解によって生じる化合物で、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942では窒素充足のシグナルとして炭酸同化系の遺伝子群の転写を活性化する。シアン酸をアンモニアと二酸化炭素に分解する酵素であるシアナーゼの発現は、ラン藻では窒素充足条件下で抑制され、窒素欠乏により誘導されるので、ラン藻のシアナーゼは窒素欠乏条件下でシアン酸の蓄積を阻止する役割を持っていると推定される。

そこで次に高等植物におけるシアナーゼの機能を解析するために、我々はシロイヌナズナのシアナーゼ遺伝子のクローニングを試み、ESTクローンをプローブとしてのシロイヌナズナのcDNAライブラリーのスクリーニング、および5'RACE法により大腸菌やラン藻のシアナーゼ遺伝子(*cynS*)と相同性を持つcDNA(accession number AB004568)を単離した。このcDNAは168アミノ酸からなる分子量18,542のタンパク質をコードしており、そのアミノ酸配列は*Synechococcus* sp. PCC7942のシアナーゼと39.7%、大腸菌のシアナーゼと32.7%の同一性を有した。また、このcDNAを発現ベクターに導入してシアナーゼ遺伝子を欠失した大腸菌に形質転換したところ、有意なシアナーゼ活性が検出された。以上の結果から、我々はこのcDNAがシアナーゼをコードすると結論した。さらに、サザンブロット解析から、シロイヌナズナにおいてシアナーゼ遺伝子(CYN)は1コピーであることが明らかになった。現在、CYNの発現調節についての解析を進めている。

H3a-11

クラミドモナスの硫黄欠乏応答変異株 *ars401* の解析
柴垣 奈佳子、John P. Davies¹、Arthur R. Grossman¹、
下河原 浩介²、白田 秀明²、茅野充男、林 浩昭、
藤原 徹 (東京大学・院・農学生命科学、¹Carnegie
Inst. Washington, Stanford Univ.、²帝京大学・医)

本研究の対象とする硫黄欠乏応答変異株 *ars401* は、硫黄欠乏条件下で *Chlamydomonas reinhardtii* が分泌する arylsulfatase を指標に、形質転換体から単離された。*ars401* の持つ変異が硫黄欠乏応答のどの段階に関するものであるかを明らかにするために、硫黄欠乏に対する応答 (aryl-sulfatase の誘導、periplasmic protein の SDS-PAGE パターンの変化、硫酸吸収能の変化) を野生型株 CC125 と *ars401* について調べたところ、*ars401* ではいずれの応答も殆ど示さなかった。このことは *ars401* の変異は硫黄欠乏に応答して起こる一連の反応の、比較的上流に位置することを示唆している。また、*ars401* は、リン酸欠乏に対しては、alkaline phosphatase の誘導などの応答を示すことから、変異が硫黄欠乏に特異的であることが確認された。この *ars401* の表現型は挿入遺伝子と強く連鎖していること、よく似た表現型を示す既知の変異株 *sac1* とは異なる変異であることを確認した。現在、プラスミドレスキューによる変異遺伝子のクローニングを行なっている。

H3a-12

クエン酸放出型低リン酸耐性細胞の糖代謝関連酵素遺伝子の解析

小山博之、瀧田英司、木原智仁、原徹夫 (岐阜大・農・生物資源利用)

ニンジン培養細胞を野生型細胞が本来利用し難いリン酸アルミニウムをリン酸給源として選抜した低リン酸培養細胞は、クエン酸放出速度が野生型に比較して8倍高い。この細胞は、クエン酸代謝に関与する複数の酵素活性が野生型と異なり、クエン酸合成能力が野生型よりも高いと考えられる。これは、細胞内小器官の分画の結果から、ミトコンドリア型CSの増加と、細胞質型NADP特異的イソクエン酸脱水素酵素の活性低下であることが明らかとなった。両細胞における酵素活性の差異は、1) 免疫滴定等の免疫学的解析結果が両細胞で一致すること及び、2) 単離したcDNAの塩基配列が完全に一致すること、3) ゲノム上のコピー数に差異が認められないことから、主に発現制御系に起因する差異であることが推測できる。

H3a-13

人工合成した酵母の三価鉄還元酵素をコードする遺伝子 (*refre1*) のタバコへの導入

太木宏之¹, 山口博隆¹, 中西啓仁¹, 森敏^{1,2}

(¹東大・農学生命科学・応用生命化学 ²CREST)

イネ科以外の高等植物の鉄獲得機構Strategy-Iでは、三価鉄還元酵素により三価鉄の二価鉄への還元を行い、その後トランスポーターで細胞内に取り込む。この第一段階である三価鉄の還元能力を高めることにより、二価鉄を効率よく吸収できる鉄欠乏耐性植物を作出することができると考えた。現在までのところ植物の三価鉄還元酵素遺伝子は単離されていないが、似たような鉄獲得機構を持つ酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では *FRE1* という三価鉄還元酵素遺伝子が Dr. Dancis ら(1992)によってクローニングされている。この *FRE1* 遺伝子をもらい受けタバコに導入したが、coding region の途中でpoly(A)が付加するため完全長のmRNAができなかった。酵母の三価鉄還元酵素 *FRE1* をタバコで発現させるために、新たに設計した *refre1* 遺伝子の全配列を人工的に合成し、CaMV35Sプロモーターにつないでタバコへ導入した。その結果、三価鉄還元活性能の高い形質転換タバコを得ることに成功した。

H3a-14

葉緑体包膜のH⁺濃度勾配依存性NO₂⁻輸送

春木泰志、村田善則、高橋正昭 (大阪府大・農・応用生
化)

NO₃⁻同化では、NO₃⁻還元は細胞質で、続くNO₂⁻還元は葉緑体で行われる。NO₂⁻の葉緑体への取り込みは光照射を必要とするエネルギー依存の過程である。我々は、暗中之での単離葉緑体へのNO₂⁻の取り込みを測定し、NO₂⁻還元反応を除いた輸送反応のみの測定系を確立し、その分子機構について検討してきた。本研究では、輸送反応の初速をより正確に測定できるようにし、NO₂⁻輸送に対するNO₂⁻濃度、pH、脱共役剤、化学修飾試薬等について検討して、NO₂⁻の輸送がキャリアーが関与するH⁺との共輸送であることを明らかにした。

ハウレンソウ単離葉緑体をNaNO₂と一定時間5°Cでインキュベートした後シリコン遠心法によって葉緑体を分離、取り込まれたNO₂⁻を発色法により定量した。

NO₂⁻の取り込み速度は5°Cでは25°Cの約40%に低下した。最初の20秒で取り込み量はピークに達し外液濃度の約2倍になり、その後減少して30分には平衡になるオーバーシュート・キネティクスを示した。pH依存性は2H⁺との共輸送でNO₂⁻が細胞質側酸性のH⁺濃度勾配を利用して取り込まれることを明らかにした。

I1a-01

ガンマ線照射によるバレイショ塊茎 ω -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現

等々力節子、林徹、¹永田俊文、²鐘ヶ江(梶矢)弘美、森昌樹、菊池尚志(農水省・食総研、¹科学技術振興事業団、²農水省・生物研)

ω -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(ω -3 FAD)は傷害、感染による迅速な発現が報告されている。我々は、この遺伝子の応答と活性酸素との関りを探る目的で、バレイショの2つの ω -3 FAD、FAD7(プラスチド)及びFAD3(ミカソウム)、cDNAのクローニングを行い、塊茎のガンマ線照射による両遺伝子のmRNA量の変化を追跡した。0.04-1.0kGyのガンマ線照射により、FAD7及びFAD3mRNA量の一時的な増加が照射2-4時間後に、おおむね線量に依存してみられた。一方、塊茎の切断(傷害)によっても両遺伝子の発現誘導が見られ、FAD3mRNAの増加はガンマ線照射時と同程度であるのに対し、FAD7mRNAの傷害による増加の程度は著しく大きく、また、傷害によるリノレン酸含量の増加が処理後数時間で観察された。以上から、ガンマ線照射はFAD3とFAD7の発現を誘導するが、傷害時とは異なるシグナル伝達経路を介している可能性が示唆された。

I1a-02

傷害によるプラスチド ω -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(FAD7)の発現誘導の分子機構

西内巧、児玉浩明、柳澤修一¹、射場厚(九州大・理・生物、¹東大・総合文化・生命)

FAD7遺伝子はプラスチドにおいてジャスモン酸(JA)の前駆体であるリノレン酸の合成を触媒する酵素をコードしている。シロイヌナズナのFAD7遺伝子は、葉などの葉緑体を含む組織でのみ発現しているが、局所的な傷害処理を与えると、葉のみならず茎や根の非緑色組織でも強く発現する。地上部の葉と茎では、FAD7遺伝子発現の傷害誘導に、JAの生合成は必須ではないが、根ではJAが関与していた。FAD7 promoterを5'上流から段階的に欠失させて解析した結果、葉と茎では-259/-197領域に、根では-520/-363領域に傷害応答性エレメントが存在することが示唆された。さらに、-262/-203領域をプローブとしてゲルシフトを行ったところ、葉から調製した核タンパクでは傷害処理による顕著な変化が見られないが、茎では傷害処理によって顕著に結合量が増加する転写因子の存在が示唆され、その結合領域が-242/-223であることがわかった。また、根ではG-box様の配列を含む-430/-363領域をプローブとしてゲルシフトを行った結果、傷害処理によってのみ検出される複合体が検出された。現在、これらのゲルシフトの結果から推定された傷害応答領域の*in vivo*での機能について解析中である。

I1a-03

Ri-プラスミド由来アグロビン合成酵素遺伝子プロモーターの傷害誘導性:プロモーター解析.I

川崎悦子、征矢野敬¹、猪口雅彦、近藤弘清(岡山理科大・理・生物化学、¹京大・理・植物)

*Agrobacterium rhizogenes*由来アグロビン型Ri-プラスミドのT-DNA領域には、オパイン合成系の遺伝子であるアグロビン合成酵素遺伝子(Ri-ags)がコードされている。我々は、Ri-agsプロモーターとGUS構造遺伝子との融合遺伝子を導入した形質転換タバコを用いて、同プロモーターの発現特性解析を行っている。これまでに、Ri-agsプロモーターは、(1)根およびカルス組織に特異的であること、(2)葉と茎においては傷害により顕著に誘導されること、を報告してきた。

これらの発現特性を制御するプロモーター上のシス因子を同定するため、エクソヌクレアーゼIIIを用いてプロモーター領域を5'上流から段階的に欠失させた。各欠損プロモーター断片を各々GUS遺伝子に結合し、タバコに導入して発現特性を解析した。その結果、根およびカルス特異性はともに、翻訳開始コドンの上流-243 bpから-208 bpの領域で制御されていることが示された。また、傷害誘導性も同じプロモーター領域により支配されていた。このことより、Ri-agsプロモーターの組織特異性と傷害誘導性は、全て同一のシス因子で制御されている可能性が示唆された。この領域にはパンドローム構造が認められたが、既知のシス因子と相同性のある配列は含まれていなかった。

現在、更に詳細にシス因子の同定を進めるとともに、-243/-208間のオリゴヌクレオチドをプローブとしてゲルシフトアッセイを行い、トランス因子の解析を行っている。

I1a-04

タバコの傷害応答遺伝子の解析

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

我々は、前回の年会で、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法(FDD)を用いて、タバコから8つの傷害応答遺伝子のcDNA断片を単離したことを報告した。今回、このうち3つのcDNA断片の5'上流領域を5'-RACE法により取得し、これらの全長cDNAの配列を明らかにした。このうち2つの全長cDNAの配列、および推定されるアミノ酸配列に相同性のみられる遺伝子は現時点で存在しない。

ノザン解析により、このうち1つは、傷害処理後、数分でmRNAの蓄積がみられ、数十分で蓄積のピークを迎えることが分かっていたが、今回、さらに詳細な発現パターンを調べた。また、同様の素早い一過性の蓄積パターンを示す4つの傷害応答遺伝子が、我々のFDDの系で確認されており、このうち2種類のcDNA断片を取得し、発現様式を調べた。傷害直後において、このように素早く応答する遺伝子がどのくらいの数発現しているのか分からないが、傷害に対する素早い発現機構や、これらの遺伝子産物が傷害時に果たす役割を明らかにしたいと考えている。現在、残りのクローンの全長cDNAの単離を試みている。

I1a-05

傷害誘導性 ACC 合成酵素遺伝子の発現調節機構の解析
渡邊敬造、酒井慎吾 (筑波大・生物)

カボチャ中果皮組織によるエチレン産生は、物理的傷害により誘導される。我々は、傷害後の中果皮組織より抽出した total RNA、ACC 合成酵素の保存領域を元に作成したプライマーを材料に RT-PCR 法を用いて cDNA 断片 (WSACS2) をクローニングした。WSACS2 をホモロジー検索にかけた結果、既知のカボチャ傷害誘導性 ACC 合成酵素遺伝子 (CM-ACS1) をコードしていることが明らかになった。そこで、ノーザン法により WSACS2 の発現解析をおこなった。その結果、傷害後の組織中での WSACS2 mRNA の合成は、O₂ 産生酵素である NAD(P)H oxidase の阻害剤である dephenyleneiodonium を処理することにより阻害された。また、O₂ 産生系として xanthine と xanthine oxidase を処理した際には、処理後 30 分で強い発現が一過的に誘導された。さらに、傷害後の活性酸素群の産生を化学蛍光法を用いて測定したところ、傷害後、数十秒で O₂⁻ が産生されていることが明らかになった。一方で、ジャスモン酸合成阻害剤を処理した際には、WSACS2 の発現は部分的に阻害された。また、ジャスモン酸、メチルジャスモン酸を処理することによって発現が強く誘導された。

I1a-06

アカシアマンギウムのプロトプラスト単離操作における β -1, 3-グルカン誘導
小名俊博、津田その子¹ (王子製紙・森林資源研究所,¹ 中部電力・電気利用技術研究所)

植物からのプロトプラストの単離において、 β -1, 3-グルカナーゼが必須である系を、アカシアマンギウムを用い見出した。そこで、この必要性について化学的、並びに免疫化学的に検討した。この結果、アニリンブルーと β -1, 3-グルカンに特異的な抗体を用いることにより、 β -1, 3-グルカンがプロトプラスト単離中の、分解酵素との反応性を高めるための試料の細断操作において、傷害誘導されることが判明した。更に、抗体により β -1, 3-グルカンが細胞壁中に局在していることが明らかとなった。以上のことから、 β -1, 3-グルカンがセルロースやペクチンと強い結合を形成したか、または細胞膜を覆ってしまい、通常用いられるセルラーゼやペクチナーゼが細胞壁にアクセス出来なかったため、 β -1, 3-グルカナーゼがプロトプラスト単離に不可欠であったと結論された。

I1a-07

ソラマメ葉肉細胞でのペルオキシダーゼによる 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンの酸化機構
高浜有明夫、鬼木隆幸 (九州歯科大学)

ソラマメ葉に傷害を与えると、メラニン様の黒色物質が 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (dopa) の酸化によって合成される。dopa の初期酸化産物はそのセミキノラジカルであることが知られている。この酸化反応にはペルオキシダーゼが関与していることが、傷害にもなって過酸化水素生成が促進されることから推定できる。しかし、一般的に、ペルオキシダーゼに依る dopa の酸化速度は低いことが知られている。ここでは、細胞内での dopa の酸化機構について解析した結果を報告する。

葉肉細胞プロトプラストに過酸化水素を与えると、先ず、アスコルビン酸が酸化され、それに続いて dopa とカフェ酸エステルが酸化された。4-クマル酸エステルはゆっくりとしか酸化されなかった。単離した液胞ペルオキシダーゼによる dopa の酸化は、カフェ酸エステルと 4-クマル酸エステルによって数十倍促進され、これらのエステルの酸化は dopa で抑えられた。これらの酸化反応の促進および抑制はカフェ酸と 4-クマル酸エステルラジカルと dopa との反応によるものであることが、カフェ酸エステルと dopa のセミキノラジカル消長を追跡することにより確かめられた。以上の結果は細胞内でも dopa はペルオキシダーゼによって生成したカフェ酸や 4-クマル酸ラジカルによって酸化されうことを示している。

I1a-08

大腸菌カタラーゼ遺伝子を導入した形質転換タバコの光・酸素毒耐性機構の解析
宮川佳子、武田 徹、重岡 成 (近畿大・農・食栄)

環境ストレス耐性植物の分子育種の一つとして、我々は大腸菌カタラーゼ遺伝子を葉緑体へ導入した形質転換タバコ (T43-1) を作成した。強光 (1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) と乾燥 (灌水なし) 条件下で、野生株は 24 時間後から光傷害による葉のクロロフィルの分解が顕著に認められたのに対して、T43-1 は 72 時間後まで殆ど影響が認められなかった。野生株の光合成活性、ホスホリプロキナーゼ (Ru5-PK) 活性 (H₂O₂ の標的酵素の一つ) およびクロロフィル蛍光 (F_o/F_m) は著しく影響を受けた。葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (AsAP) の活性は両者ともに認められなかった。

そこで本研究では、形質転換植物のもつ光・酸素毒耐性を明らかにするために、強光と乾燥 (灌水なし) 条件下での初期 (12 時間) の段階および バラコート (MV) 処理後の両株への影響を検討した。強光と乾燥 (灌水なし) により野生株の光合成活性およびクロロフィル蛍光は 12 時間後で既に影響を受けていた。MV (50 μM) を噴霧し、強光 (1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下に置くと、8 時間後の野生株では顕著なクロロフィル分解が認められた。4 時間後の野生株の光合成活性および Ru5-PK 活性はそれぞれ 20%、40% に低下したが、T43-1 では 70%、87% 保持していた。T43-1 では PCR サイクルの他の SH 酵素も高い活性を保持していた。また、葉緑体型 AsAP 活性は両株共に著しく減少した。さらに、全アスコルビン酸 (AsA) 量は野生株では 20-25% の減少が認められたが、T43-1 での減少は認められなかった。細胞内の葉緑体での AsA 局在率 (30-40%) を考慮すると、葉緑体型 AsAP の失活は AsA の枯渇に起因し、T43-1 では発現したカタラーゼが H₂O₂ による酸化的障害を防いでいる事が示唆された。

I1a-09

耐塩性植物 *Mesembryanthemum crystallinum* における
過酸化脂質消去系の発現調節
武田 徹、重岡 成 (近畿大・農・食栄)

耐塩性植物 *Mesembryanthemum crystallinum* (アイスプラント) の塩ストレスと活性酸素代謝の相互関係について検討を行った。塩ストレス下のアイスプラントにおいてアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(AsAP)およびスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)アイソザイムの活性が顕著に上昇した。今回、アイスプラントにおける塩ストレスに対する活性酸素消去系の応答をより詳細にするために、AsAPアイソザイムの転写およびタンパク質レベルの変化を検討した。また、最近植物細胞で見出されているリン脂質ヒドロペルオキシド特異的グルタチオンペルオキシダーゼ様活性についても検討した。

アイスプラントの栽培は既報に従った。ノーザンハイブリダイゼーションのプロープには、ホウレンソウ葉AsAPアイソザイムcDNAおよびアイスプラント細胞質型AsAP cDNAを用いた。播種後6週目のアイスプラントに存在するAsAPの葉緑体型と細胞質型の比は約1:1であった。葉緑体型AsAPは全てストロマ型でありチラコイド膜結合型は検出されなかった。総AsAP活性は塩ストレス付与により7日目で 2.6 ± 0.2 倍に上昇した。この時、ストロマ型および細胞質型AsAPは同様に上昇した。これらの上昇はタンパク質の増加によるものであった。ノーザンハイブリダイゼーションより、細胞質型AsAPは2つ(I, II)存在することが明らかになった。細胞質型I, IIおよびストロマ型AsAPmRNAは塩ストレス付与3日目後それぞれ1.3、2.3および1.7倍上昇していた。また、塩ストレスによりリン脂質ヒドロペルオキシド特異的グルタチオンペルオキシダーゼ活性(41 ± 0.2 nmol/min/mg protein)が検出された。現在、塩ストレスの本酵素の転写レベルに及ぼす影響について検討中である。細胞内過酸化脂質量(TBA値)は塩ストレスにより 1.6 ± 0.2 倍上昇した。

I1a-10

栄養組織の液胞プロセシング酵素は植物ホルモン、傷害、老化により発現が誘導される

山田健志^{1,2}、木下哲¹、西村いくこ¹、西村幹夫^{1,2}

(¹ 基生研・細胞生物、² 総研大・生命科学)

液胞プロセシング酵素(VPE)は、様々な液胞タンパク質の成熟化に関わる酵素で、シロイヌナズナから3種類の遺伝子がクローニングされている(α VPE、 β VPE、 γ VPE)。これまでの研究から β VPEは種子特異的、 α VPEと γ VPEは栄養組織に特異的であることがわかっている。種子のVPEはタンパク質蓄積型液胞において貯蔵タンパク質の成熟化に関与していることが示されている。一方、栄養組織のVPEは分解型液胞においてシステインプロテアーゼやキチナーゼ等の液胞タンパク質の成熟化に関与している可能性が示唆されている。我々は栄養組織に発現する γ VPEの発現様式を詳細に解析することによりその役割を明らかにすることを目標として研究を進めている。

シロイヌナズナ葉を用いて、傷害および老化による γ VPE mRNAの発現パターンを調べた。 γ VPE mRNAは通常低レベルの発現が見られるが、傷害後、6時間で一時的に増加し、その後24時間から再び増大した。この二相的な発現パターンは傷害部のみならず、他の組織にも見られた。葉の老化に伴っても γ VPE mRNAの発現量が増加することがわかった。組織の傷害および老化の過程では、エチレン、ジャスモン酸等の植物ホルモンが関与することが知られている。そこで、エチレン、ジャスモン酸をシロイヌナズナ葉に与えたところ、エチレンによる顕著な発現誘導が認められたのに対し、ジャスモン酸による誘導は低かった。また、エチレン応答性を欠損しているシロイヌナズナ突然変異体 *etr1* ではサリチル酸を与えることによりVPEの発現が観察された。以上の結果を基に、 γ VPEとその標的タンパク質の発現を比較検討する。

I1p-01

植物の低温光傷害時の系I及び系II光阻害において
低温の果たす異なった役割
園池公毅 (東大・院理・生物科学)

植物が過剰な光を受けたときに光合成活性が低下し(光阻害)、この阻害は温度の低下とともに増大する。光阻害の部位は長らく系IIであるとされてきたが、我々は最近、低温感受性植物においては、低温光阻害の部位が系Iであることを見いだした[Plant Cell Physiol. (1996) 37:239-247]。低温がこれらの光阻害においてどのような役割を果たしているのかを調べるために、それぞれの光阻害の温度依存性を調べた。その結果、系I活性は 10°C を境にそれより低温で急激に低下するのに対して、系II活性は 25°C から 0°C にかけてほぼ直線的な温度依存性が見られた。さらに、様々に光強度を変えて温度依存性を調べると、系IIの阻害率は、温度と光強度の両方によって決まる Q_{10} の相対的な酸化還元レベルとよい相関を示したのに対して、系Iの阻害率はほぼ温度だけに依存して決まった。これらの結果は、系Iと系IIの光阻害に関して、低温が全く異なった役割を果たしていることを示す。植物の低温光傷害においては、光合成活性の低下は系I光阻害型のある敷居値以下で起こる温度依存性を示すことを考えあわせると、低温における光合成の失活においても、阻害の程度は主に温度によって決まり、ある一定以上であれば光強度にはよらないことが推測される。

I1p-02

生育温度環境と細胞の加齢に依存したコムギ小胞体局在型 ω -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現
堀口吾朗、川上直人¹、児玉浩明、射場 厚 (九州大・理・生物、¹ 明治大・農・植物工学)

根組織に含まれる大部分の α -リノレン酸(18:3)は小胞体局在型 ω -3脂肪酸不飽和化酵素により生成される。コムギにおいて同酵素をコードする *TaFAD3* 遺伝子の発現量は根端分裂組織で最も高く、その後、細胞の加齢に伴い低下する。全脂肪酸に占める18:3の割合は *TaFAD3* 遺伝子の発現量に対応した変化を示し、細胞の加齢に伴い減少する。一方、コムギの根の脂肪酸組成は温度環境に依存して変化し、 30°C で生育した場合、18:3の割合は約10%であるが、 5°C では50%以上にも達する。そこで、生育温度環境による18:3の割合の調節機構を明らかにするため、種々の温度環境下での *TaFAD3* mRNA量を根細胞の加齢と対応づけて解析した。今回の報告では、コムギの根における18:3の割合の生育温度による調節機構について、*TaFAD3* mRNAの蓄積量が果たす役割と、それ以外の因子が関与する可能性について議論したい。

I1p-03

いもち病菌由来セブレロシドによるエリシター作用の解析

梅村賢司、小川紀子、山内豊蔵、阿部加乃、御堂直樹、古賀仁一郎、岩田道顕、志村勝、小笠原長宏
(¹植物防御システム研究所、²明治製菓^株)

我々は、いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) より単離・精製したセブレロシドがイネのファイトアレキシン (ファイトカサン、モミラクトン) を産生誘導することを見出した。セブレロシドによるエリシター作用をさらに解析した結果、セブレロシドはイネ葉組織への散布処理の場合においても、また液体培養細胞 (コシヒカリ) 系への添加施用によっても濃度依存的なファイトアレキシン誘導能を示した。さらに、セブレロシドを処理することにより、イネのPR蛋白質の一種であるPBZ1蛋白質の発現が葉組織および液体培養細胞で認められた。また、セブレロシドの糖鎖部分を除去したセラミドについても、セブレロシドと比較して比活性の低下はみられたが同様のエリシター活性を示した。

また、セブレロシドはいもち病菌のレースにかかわらず存在すると考えられたことから、イネといもち病菌との相互作用において普遍的なエリシターとして作用している可能性が示唆された。

I1p-04

いもち病菌由来のセブレロシドエリシターの単離精製と構造決定

古賀仁一郎、山内豊蔵、志村勝、大島清美、小川紀子、梅村賢治、菊地美奈子、小笠原長宏 (植物防御システム研)

植物はその病原菌と接触すると過敏感死、ファイトアレキシン生成などの様々な化学的・物理的防御反応により自身を守ることが知られている。これらの防御反応は病原菌が生産するエリシターにより誘導される。演者らはイネのファイトアレキシンであるモミラクトンとファイトカサン¹⁾生成を指標として植物体においてエリシター活性を測定する独自の評価系を確立し、この評価系を用いていもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) からエリシターを単離精製、構造決定をした。その結果、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) の子実体形成因子として知られている²⁾セブレロシドA、Cであることを明らかにした。動物細胞ではセブレロシドを初めとするスフィンゴ脂質は細胞の分化やアポトーシスを誘導することが知られており³⁾、さらに近年、植物の過敏感死がアポトーシスの1種であることが報告されていることから、セブレロシドによるイネの過敏感死はアポトーシスと密接に関連している可能性がある。

- 1) D. Cartwright *et al.* Nature 267, 511 (1977); J. Koga *et al.* Tetrahedron 51, 7907 (1995); J. Koga *et al.* Phytochemistry 44, 249 (1997).
- 2) G. Kawai *et al.* Agric. Biol. Chem. 49, 2137 (1985).
- 3) K. Obata *et al.* Nature 266, 369 (1977); R. De Maria *et al.* Science 277, 1652 (1997).

I1p-05

低温馴化過程で蓄積するクワ皮層細胞のERタンパク質

宇梶徳史、竹澤大輔、荒川圭太、藤川清三、吉田静夫 (北大・低温研)

越冬中の樹木皮層組織ではERと考えられる小胞が多量に蓄積する事が知られている。そこで高い耐凍性を有するクワ (*Morus bombycis*) の粗ミクロソーム画分をショ糖連続密度勾配遠心法により分画したところ、ERのフラクションにおけるタンパク質量が秋から冬にかけて顕著に増加することがわかった。また、SDS-PAGEによる解析では、耐凍性の増加に伴ってERにいくつかの低分子域のタンパク質が増加していることがわかった。このうち蓄積が顕著であった20 kDのタンパク質についてN-末端アミノ酸配列を決定したところ、ER局在性の低分子量熱ショックタンパク質と高い相同性があった。また20 kDタンパク質に対する抗体を用いた実験においてもER局在性と秋から冬にかけての蓄積が確認された。

I1p-06

細胞内糖含量の人工操作によるシロイヌナズナプロトプラストの凍結傷害機構出現頻度の変動

上村 松生・Peter L. Steponkus
Dept of SCAS, Cornell Univ, Ithaca, NY 14853, USA

植物の低温馴化過程で細胞内の糖増加が起こることはよく知られているが、その耐凍性増大に関する役割については定説を見ない。本研究では、糖の低温馴化過程での役割を明らかにするため、暗黒でシロイヌナズナ実生をショ糖液に浸し細胞内糖含量を人工的に変化させた後 (Tumanov & Trunova, Sov Pl Physiol 10:140, 1963)、葉プロトプラストの凍結融解過程での2つの凍結傷害機構 (融解中でのプロトプラストの破壊 (EIL) と凍結脱水によって引き起こされるヘキサゴナルII転移を伴う浸透圧変化反応性の損失 (LOR)) の出現頻度に対する糖の影響を調べた。2°C処理では、EILは低濃度ショ糖液 (≤50mM) に短時間 (1日) 浸すことで減少したが、LOR出現頻度の減少は高濃度のショ糖 (400mM、7日) を必要とした。23°C処理 (400mM) では、EIL出現頻度は全く変化しないが、LOR出現頻度は著しく減少した。35mMショ糖液では糖含量は変化しないが、400mMではショ糖・果糖・ブドウ糖が著しく増加することも判明した。これらの結果は、1) 低濃度のショ糖は低温で起こる原形質膜脂質組成変化を誘導しEIL出現頻度を減少させる、2) LOR出現頻度の減少は糖含量の増加自体でも起こるが、膜脂質変化と糖含量の両者が起こる際に最も効果的に減少すること、を示している。
Supported by a USDA/NRICGP and a US DOE grant.

I1p-07

小麦の新規不凍活性物質の検索

大平万里、星野保、吉田みどり¹、津田栄、扇谷悟、石崎紘三
(通産省・工技院・北工研、¹農水省・北農試)

氷点下の環境に適応している動物では、水の凝固点を下げる不凍タンパク質の存在が広く知られており、そのタンパク質の特性は立体構造にいたるまで詳しく調べられている。近年、植物にも、そのような不凍タンパク質がいくつか見つかり、その特性の解明が待たれている。

我々は小麦由来の不凍タンパク質を単離する目的で、凝固点測定系を確立し、アポプラスト画分から不凍活性のあるタンパク質を検索している。そして、2℃あるいは-2℃の低温処理により顕著に増大する30kDa付近のタンパク質のバンドをSDS-PAGEにより検出できた。

また、熱処理およびプロテアーゼ処理をしたアポプラスト画分にも不凍活性が認められ、タンパク質以外の新規不凍活性物質の存在が示唆された。低温処理によってアポプラスト画分のフェノール化合物濃度が増大することや既知のいくつかのフェノール化合物(没食子酸、コーヒー酸、オイゲノールなど)にも不凍活性が認められることなどから、この新規不凍活性物質はフェノール化合物である可能性が高く、現在同定中である。今後は低温適応におけるこの新規不凍活性物質の生理的役割について調べてゆく予定である。

I1p-08

NMR顕微鏡により可視化されたカエデ越冬芽の凍結様式と各組織の氷核活性

石川雅也、井出博之¹、William S. Price¹、荒田洋治¹、北嶋智美(農水省・生物研、¹機能水研)

NMR顕微鏡を用いてハウチワカエデの冬芽(花芽、葉芽)の凍結様式を観察した。1℃から-21℃まで7℃間隔でプロトン密度画像をとり、さらにその各像間の差を画像化したところ、組織による凍結様式の差が明瞭に画像化された(芽鱗片、枝皮層部=細胞外凍結、木部=過冷却、葉原基、花原基(花序)=器官外凍結)。葉原基、花原基のサイズは温度の低下とともに徐々に小さくなり、これらの組織の基底部分は徐々にシグナルが減少し、これらの組織からの水の移動を示唆していると思われた。試験管法を用いて冬芽各組織の氷核活性を測定したところ、外鱗片が-7.4℃、内鱗片が-10.5℃、花序が-16.3℃で、NMR顕微鏡や示差熱分析から得られた各組織の凍結様式に合目的な値であった。同様の手法をネグンドカエデ等の冬芽にも適用してハウチワカエデの場合と比較した。いずれの場合も組織の凍結様式とその氷核活性は合目的な関係にあり、冬期の植物は氷核活性の分布を制御することにより、組織の凍結様式を決定しているように思われる。

I1p-09

低温貯蔵したバレイシヨ塊茎で発現が誘導される遺伝子: クローニングと発現解析

峯利喜、笠岡啓介、日吉徹、大山暁男(日本たばこ産業(株)遺伝育種研究所)

低温下で長期貯蔵したバレイシヨ塊茎で発現が誘導される遺伝子(CIP353)をディフェレンシャルスクリーニングにより単離した。cDNAがコードするポリペプチドと既知配列との相同性を調べたところ、カドミウム誘導性タンパクと44%の相同性を有していた。CIP353 mRNAは、6℃以下で長期貯蔵した塊茎で強く発現しており、その発現量は塊茎を常温に戻すことにより減少した。生育中の植物の各器官でのmRNAの発現は、低温貯蔵した塊茎に比べ著しく低かった。また、低温処理した*in vitro*植物の葉、茎、根では転写産物の増大は殆ど認められなかった。従って、CIP353遺伝子は、低温貯蔵塊茎では特異的に発現し、温度により発現誘導が制御されると考えられる。また、CIP353遺伝子に対応するゲノムクローンを単離し、そのプロモーター領域の塩基配列を調べたところ、穀類の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域中に見られるGA誘導性のシスエレメントが存在していた。

I1p-10

シアノバクテリアにおけるリボソームタンパク質S21含量の生育温度による調節

佐藤直樹、太刀川隆¹、和田明²、田中歩³(埼玉大理、¹堀之内中、²大阪医科大、³京大)

リボソームはRNAとタンパク質の複雑な複合体で、RNPワールドの名残とも考えられている。リボソームタンパク質の遺伝子は、ゲノム配列の決定により数多くの生物で決められているが、その種類は生物により多少異なり、また、遺伝子に対応するタンパク質がリボソームで確認されているのは、大腸菌などわずかな種に限られている。*Anabaena variabilis*を材料として、リボソームタンパク質を詳しく調べたところ、高温ではS21が1/2になる一方、S5が1.5倍に増加した。S21含量の変化は、*Synechocystis* 6803でも確認された。S5とS21は部分的に類似している。また、S21はプラスチドのリボソームには存在しない。これらの結果は、両リボソームタンパク質が共通の機能をもちながら機能分化しており、それぞれが温度適応において異なる役割を果たしていることを示唆する。

I1p-11

低温および重水耐性酵母細胞における ストレス蛋白質の発現

海野けい子、岸戸崇浩、森岡瑞枝**、関本征史*、根本清光*、奥直人、岡田昌二(静岡県大・薬・放射薬品学、*衛生化学、**東京大学大学院・理・生物科学)

酵母細胞 (*Saccharomyces cerevisiae*) において構成的に発現しているストレス蛋白質の中で、Hsp70 (Ssa1およびSsa2) を欠損させた細胞 (*ssa1ssa2*) は、細胞増殖速度が低下していることが報告されているが、その機構については十分な説明がなされていない。われわれは *ssa1ssa2* 細胞から、増殖速度が野生株細胞と同程度に速くなった変異株細胞を得たことから、ストレス蛋白質の細胞増殖等、細胞内における役割を更に明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

得られた変異株細胞 (S-11) は、親株細胞よりやや大きいサイズのHsp70ファミリー蛋白質、78kDa蛋白質を高度に発現していた。Hsp70の発現に変化が認められたことから、細胞のストレス応答について検討した。その結果、S-11細胞は高温に対する感受性が高く熱に弱い、低温に対しては顕著な耐性を示すことが見いだされた。更に、高濃度の重水は細胞増殖を抑制することが知られているが、S-11細胞は重水に対しても顕著な耐性を示すことも見いだされた。これらストレスに対する耐性発現に78kDa蛋白質が関与している可能性が考えられたことから、次に78kDa蛋白質について検討した。

78kDa蛋白質を精製し、プロテアーゼ処理したポリペプチドフラグメントについてアミノ酸分析を行った。その結果、Ssa1との間に高い相同性が認められた部位もあったが、いくつかのアミノ酸に違いが認められた。S-11のストレス応答性から考えて、78kDa蛋白質はSsa1と構造的には似ているが、その役割は異なる可能性が考えられた。

I1p-12

酵母をモデルとした細胞の低温感知・情報伝達機構の解析
張磊、今井亮三¹、太田明徳、高木正道(東大院農生科・応生工、¹農水省・北海道農試、)

細胞が低温を如何に感知し情報伝達するかについての知見は乏しい。遺伝学的解析の容易な出芽酵母をモデル系としこの問題にアプローチするため、今回は低温で誘導される遺伝子の単離と発現解析を行った。

cDNA subtraction 法により、低温(10°C, 2h)で蓄積するcDNA分子種を単離した。各クローンの塩基配列を求め、データベース上を検索し、その遺伝子を同定した。更にNorthern解析により低温での蓄積を確認した。これまでの解析により、10個の低温誘導性クローンが得られた(LOT1~LOT10)。これらのクローンの中には解糖系酵素、リボソーム関連タンパク質、タンパク質キナーゼ等の他新規な遺伝子2つが含まれていた。またこの中には、植物で低温誘導性が知られている遺伝子が数種、シクロヘキシミド誘導性を併せ持つ遺伝子数種があり、酵母・植物間に共通の低温応答機構の存在が示唆された。詳細な誘導機構の検討についても報告する。

I1p-13

Claithrin assembly proteinとEra GTPase-like proteinの低温誘導性発現

今井亮三、小池倫也、大野清春(農水省・北海道農試)

イネ幼苗における低温ストレスに対する細胞応答を解析することを目的とし、低温誘導性遺伝子のクローニングを行った。25°Cで生育させた発芽後5日目の幼苗に12°C、2時間の低温ストレスを与えた後、根組織よりRNAを抽出しcDNAを合成した。同様に低温未処理区から得たcDNAを用いてサブトラクションを行った。得られたクローンよりNorthern法を用いて2種の低温誘導性クローンを選抜した。塩基配列を求めると、それぞれ Claithrin Assembly protein (AP19)及び Era GTPaseと相同性を示した。AP19はendocytosisへの関与が知られている。また、EraはRas super familyの一員で主に原核生物で見出されている。両遺伝子の1次構造と発現様式について報告する。

I1p-14

レポーター遺伝子を用いたアラビドプシス熱ショックプロモーターの解析

松原 志緒、米田 好文、高橋 卓(北海道大・理・生物科学)

外来遺伝子の一過的な発現および遺伝子タギングへの熱ショックプロモーターの応用を検討する目的で、アラビドプシスのHSP18.2遺伝子プロモーターについて、GUS, LUC, GFPの各レポーター遺伝子を用いて発現誘導を調べた。HSP翻訳開始コドンの直前から850bp上流までのプロモーター断片を用いた結果、1) いずれのレポーターでも、2時間の熱ショック処理から常温復帰後、数時間以降に最も強い活性が誘導される。2) 熱を与え続けた場合には、GFPの活性はほとんど検出されない。3) GUSについて、HSPのN末端領域を含めてタンパク融合にした場合との比較から、高温下での強い活性の誘導には、HSPのN末端コード領域も重要であることがわかった。現在、このプロモーターをT-DNAのRBまたはLBに隣接して組み込んだTiベクターを構築し、形質転換植物の作成を試みている。

I1p-15

ラン藻 *Synechocystis* PCC6803の低分子量熱ショックタンパク質HSP16.6の遺伝子破壊による機能解析

福澤秀哉、小坂英雄、大山莞爾

(京大・農・応用生命科学)

これまで、低分子量熱ショックタンパク質(sHSP)は、*in vitro*では分子シャペロンとして機能することが示されているが、*in vivo*で、どの程度熱耐性に寄与しているのかは明確ではなかった。今回、ラン藻で*hsp16.6*遺伝子の欠失株を作成し、その性質を明らかにしたので報告する。

野生株を42°Cで30分間処理すると*hsp16.6*の転写産物が細胞内に大量に蓄積した。*hsp16.6*の欠失株は、野性株と比較して高温に対する感受性が高くなっていった。45°Cで3時間熱処理した後、30°Cに戻すと、野性株は殆ど生育に影響がないが、欠失株は約60時間にわたり生育が停止した。また、欠失株は獲得性熱耐性が低下していた。大腸菌で発現させたラン藻HSP16.6タンパク質のシャペロン活性についても報告する。

I1p-16

ランソウ熱ショックタンパク質遺伝子の発現調節

仲本 準 (埼玉大学・理・分子生物)

Synechococcus sp. PCC 7942の*hspG*などのHSP遺伝子の破壊株が高温で全く生育不可能になる (Tanaka & Nakamoto, unpublished) ことや、*S. vulcanus*のsmall HSPを導入した大腸菌の熱耐性が増加する (Roy & Nakamoto, unpublished) こと等から、ランソウ HSP 遺伝子の発現は高温適応に重要であると考えられる。しかしながら、ランソウ HSP 遺伝子の発現調節に関する解析は、ほとんど行われていない。

最近、金子や田畑らによってランソウ *Synechocystis* sp. PCC 6803のゲノムDNAの全塩基配列が決定されたが、大腸菌のストレス特異的転写因子 σ^{32} のホモログは存在しなかった。他のランソウにおいても σ^{32} が存在するという報告はない。しかしながら、我々は、*S. vulcanus*の*groEL*やsmall HSP遺伝子が大腸菌内で熱ショックにより発現し、これらの遺伝子産物が顕著に蓄積することを見出した。*S. vulcanus*及び大腸菌において転写された*S. vulcanus* small HSP 遺伝子のmRNAを用いたPrimer extension法により決定された転写開始点上流には、大腸菌(σ^{70})プロモーターのコンセンサス配列と類似した配列が存在した。ランソウには、大腸菌とは異なるHSP 遺伝子の発現調節機構が存在するのではないかと考えて研究を進めている。

I1p-17

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

DnaKとDnaJはともに熱ショックタンパク質であり、大腸菌において分子シャペロンとして機能する。我々は、カワヤナギ(*Salix gilgiana*)からDnaJと相同性を示す2種類のcDNAクローン(pSGJ1, pSGJ2)を単離し、細胞質に局在する47.5kDaのタンパク質(SGJ1)をコードすることを報告した。今回は、DnaK homologをコードするcDNA断片(pSGK1)を単離し、その発現特性をSGJ1のものと比較した。

SGK1とSGJ1の発現の器官特異性を調べると、葉、茎、根、雄花、雌花の全ての器官で、SGK1の発現のレベルはSGJ1のものよりもはるかに高かった。SGK1は、雄花、雌花、根で高い発現がみられ、葉の発現のレベルの約8-10倍あった。茎では葉の約2倍程度であった。一方、SGJ1の発現は雄花で最もレベルが高いものの、他の器官の約2倍程度であった。SGJ1の発現は熱ショックや塩ストレスにより一過的に誘導され、mRNAのレベルは熱ショックで最大約3倍、塩ストレスでは約6倍に増加した。この誘導のレベルは、塩生植物*Atriplex nummularia*のANJ1に比べ著しく低い。一方、SGK1のmRNAは、いずれのストレスでも顕著な誘導はみられなかった。以上の結果は、SGK1とSGJ1の発現が各器官で個別に調節され、熱ショックの影響を受けにくいheat shock cognateとして重要な役割を担っていることを示唆している。

I1p-18

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 の高温感受性変異株における変異の解析

濱田朋子、青野千代美、森田勇人、林秀則 (愛媛大・理・物質理学)

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7002 における高温耐性に関与する遺伝子の同定を目的として、insertional mutagenesis法を用いて高温感受性変異株(SHT1株)を単離した。

SHT1株と野生株とにおいて通常生育温度(30°C)での生育には特別な違いはみられなかったが、やや高めの温度(38°C)で生育させるとSHT1株は野生株と比較して著しく増殖が遅くなった。SHT1株の変異を起こしたDNA領域をプラスミドレスキューにより回収し、塩基配列の決定により変異部位を同定したところ、ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7002 のプラスミドpAQ1に変異が起きていることが明らかになった。また、野生株のpAQ1上には4つの予想されるORFが存在するが、SHT1株ではそのうちの1つが新たに挿入されていた。SHT1株において変異した遺伝子の転写レベル、およびSHT1株と野生株におけるタンパク質の比較の結果などについて報告する。

I2a-01

エンドウのエリシター応答性遺伝子の単離と解析
一瀬勇規、実松史郎、遠藤 愛、岡部武治、久安由美子、関 光、白石友紀、豊田和弘、山田哲治
(岡山大・農)

エンドウ褐紋病菌の生産するエリシターにより発現が誘導される防御応答遺伝子を単離するため、エリシター処理5時間目のエンドウ上胚軸からcDNAライブラリーを構築した。本ライブラリーより differential screening法によってエリシター応答性遺伝子候補のcDNAを90個単離し、それらの部分塩基配列を決定した。その結果、peroxidase, hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP), glycine-rich protein (GRP), endochitinase, polygalacturonase inhibiting protein (PGIP), S-adenosylmethionine synthetase (SAMS), glutathione S-transferase (GST), hypersensitivity-related gene *hsr203J*などの既報の防御応答関連遺伝子と相同性を示す遺伝子の他、Dofドメインを有するZn-finger proteinのcDNAが単離された。本遺伝子産物はその相同性よりDNA結合活性を有する転写制御因子であることが推測される。

I2a-02

エンドウ細胞壁におけるエリシター結合タンパク質の分離と解析
杉本恵、木場章範、豊田和弘、一瀬勇規、山田哲治、白石友紀 (岡山大・農)

エンドウ褐紋病菌由来のエリシター (Eli.)で処理された無傷エンドウ組織にはファイトアレキシン生成等の防御遺伝子の発現を伴う防御応答は起こらないが、イオンの流出や活性酸素生成などが誘導される。また分離細胞壁画分を用いた解析から、本画分に含まれる ATPase やパーオキシダーゼが Eli. 処理によって著しく活性化されることが明らかとなっている。これらのことから細胞壁に Eli. の認識部位が存在することが示唆された。エンドウ上胚軸から調製した細胞壁可溶化画分を Eli 固定化カラムに供試し、結合タンパク質を分離した。SDS-PAGE 後に銀染色を行ったところ、少なくとも7本のバンドが検出された。さらにピオチン化 Eli. を用いた光親和性標識により 60, 50, 40, 30kDa のタンパク質が標識され、本結合は過剰量の非標識 Eli. の存在下で濃度依存的に阻害された。以上の結果からこれらのタンパク質は Eli. に特異的な結合分子と考えられた。現在、これらのタンパク質のアミノ酸配列を調べている。

I2a-03

in vivo footprinting法によるエンドウ PAL・CHS 遺伝子のエリシターおよびサブレッサー応答性シスエレメントの解析
関 光、一瀬勇規、永杉友美、豊田和弘、白石友紀、山田哲治 (岡山大・農)

エンドウのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) およびカルコン合成酵素 (CHS) 遺伝子の転写はエンドウ褐紋病菌由来のエリシターで急速に誘導され、サブレッサーで抑制される。本研究では、これら遺伝子の発現を正や負に制御するシスエレメントを *in vivo* で解析するため、PSPAL1, 2 および PSCHS1, 2 遺伝子のプロモーター領域について LM-PCR (Ligation-Mediated PCR) 法を用いた *in vivo* footprint 解析を行った。その結果、これらの遺伝子のプロモーター上に共通して存在する Box I 配列部分にエリシター処理誘導性のフットプリントが検出された。PSCHS1 プロモーターを用いたトランジェントアッセイでは、Box I 配列に塩基置換を導入すると basal 発現レベルとともにエリシター応答性の極端な低下が観察された。これらの結果から、Box I 配列が防御応答時においてエンドウ PAL および CHS 遺伝子に共通した正の発現制御シスエレメントとして機能していることが示唆された。

I2a-04

細胞壁 ATPase に対する褐紋病菌サブレッサーの種特異的作用 (3) -細胞壁 ATPase 画分中のエリシター、サブレッサー結合タンパク質について-
木場章範、杉本 恵、豊田和弘、一瀬勇規、山田哲治、白石友紀 (岡山大 農)

細胞壁 ATPase (CW-ATPase) 活性はエンドウ褐紋病菌エリシター (E) で非特異的に活性化され、サブレッサー (S) に対して種特異的な応答を示す。このことから、これら病原菌シグナルの受容体が CW-ATPase の近傍に存在すること、また細胞壁が病原菌認識、宿主特異性決定に重要な役割を持つことが推察された。そこで、E、S に対して応答性をもつエンドウ CW-ATPase の精製を試みた。硫酸塩析、ATP アガロースカラム、Mono Q カラムを用いて精製した CW-ATPase は分画前と同様に病原菌シグナルに応答性を示すこと、さらにペルオキシダーゼ (POX) と共精製されることが判った。イムノプロット解析の結果、CW-ATPase の推定分子量は 55kDa、POX は 62kDa であった。さらにピオチン化 E、S を用いた光親和性標識から、CW-ATPase 画分に E および S 結合タンパク質が存在することが判った。以上の結果は、E、S の受容体と CW-ATPase、POX は複合体として存在し、シグナル変換装置を形成していることを強く示唆する。現在 E、S 結合タンパク質のアミノ酸配列を調べている。

I2a-05

エンドウによる褐紋病菌サプレッサーの認識機構(2)
杉浦徹也¹⁾、木場章範¹⁾、青柳雅昭²⁾、豊田和弘¹⁾、一
瀬勇規¹⁾、山田哲治¹⁾、白石友紀¹⁾
(¹⁾岡山大学、²⁾日製産業SIセンター)

IASysを用いた解析により、エンドウ褐紋病菌が胞子発芽液中に生産するサプレッサー、suppressinA (SupA)に特異的に結合するタンパク質が、エンドウ細胞壁中に含まれることは既に報告した(1997年度植物生理学会)。そこで今回は、SupA結合セルを用いて、本タンパク質の精製を試みた。IASysを用いてセルに結合したタンパク質を回収し、SDS-PAGEで解析した結果、分子量57.9kDa, 45.5kDa, 39.3kDaのタンパク質が回収できた。また、これら3種のタンパク質には、ビオチン化SupAが結合することも明らかになった。これら3種のタンパク質のうち39.3kDaタンパク質について部分アミノ酸配列を解析したところ、N末端から15残基の部分アミノ酸配列が得られた。なお、本配列中には、GGGATLというミリスチル化部位が存在したが、EMBL、Swiss Plot、及び、PIRを用いたホモロジー検索の結果、完全に相同なタンパク質は見いだせなかった。以上の結果は、エンドウ細胞壁中にはSupA受容体が存在することを強く示唆している。

I2a-06

りんご斑点落葉病菌の宿主特異的毒素AM-toxinによって誘導される遺伝子の解析
初山慶道・斎藤彰・深沢赤田朝子・小笠原博幸・鈴木正彦
(青森グリーンバイオ)

AM-toxinはりんごの斑点落葉病菌 (*Alternaria alternata*, apple pathotype) の産生する宿主特異的毒素 (HST) である。この菌に感受性のりんごの葉はAM-toxinによって壊死を起こし、菌の侵入を受容化する。この壊死反応には毒素接触後に新たなタンパク合成が必要である。我々はAM-toxinによる細胞死に関与している分子を明らかにするため、AM-toxinによって発現が誘導または増加する遺伝子の単離を試みた。りんご(印度)の無菌培養植物を水またはAM-toxin溶液で処理した材料よりRNAを調製し、簡易ディフレンシャルディスプレイ法によって毒素処理特異的に増加するPCR増幅断片を複数クローニングした。これらをプローブとしてノザン解析を行った結果、毒素処理によるRNAの蓄積が認められた。塩基配列の解析から、これらのクローンには既知の遺伝子と相同性の高いものがあり、そのうち1つは酵母等でmulti drug resistanceに関わるPDR5 like ABC transporterに相同性があった。さらに、毒素による影響をりんごのESTライブラリーのクローンを用いたノザン解析で調べた。その結果も報告する。

I2a-07

TMV感染細胞の過敏細胞死は、葉緑体におけるFtsHメタロプロテアーゼホモログの活性が減少することによって引き金が引かれる
瀬尾茂美、岡本雅次¹⁾、岩野恵²⁾、福井希一³⁾、磯貝彰²⁾、大橋祐子 (生物研・分遣、¹⁾東亜合成・つくば研、²⁾奈良先端大・バイオサイエンス、³⁾北陸農試)

N抵抗性遺伝子を有するタバコ (NNタバコ) がタバコモザイクウイルス (TMV) に感染すると過敏反応 (HR) が起こり、結果、壊死病斑が形成される。しかし我々は、アクチノマイシンD (AMD) 及び熱処理が、TMV感染したnnタバコ (N遺伝子を有さない) やN遺伝子の働かない30℃の高温でNNタバコに、壊死病斑を誘導することを発見している [Virology (1971) 48, 531; Virology (1972) 48, 601]。これらの研究はTMVで誘導されるHRはN遺伝子と無関係に起こること、N遺伝子以外にHRの引き金を引く因子が存在することを示唆した。我々はそのような因子の同定のための研究において、大腸菌メタロプロテアーゼホモログをコードするタバコcDNA (DS9)を得た。この遺伝子産物は健全な葉で高いレベルで葉緑体に局在するが、HRの初期にその量が特異的に減少することが明らかとなった。AMD及び熱処理はそのタンパク量を減少させ、DS9タンパク量を減少させたアンチセンス形質転換植物ではTMV感染後のHRが早く起こった。TMV感染nnタバコにメタロプロテアーゼの阻害剤であるEDTAを処理するとHRが起こった。以上の結果は、TMV感染細胞においてDS9タンパク質のプロテアーゼ活性がある閾値以下になることによって引き起こされる葉緑体の恒常性の崩壊 (おそらく活性酸素種の異常産生を引き起こす) が、その細胞のHRの引き金が引かれるための重要な因子であることを示唆している。

I2a-08

トマトモザイクウイルス (ToMV) の移行蛋白質をリン酸化する宿主側因子の探索
松下保彦、花澤耕太郎、吉岡邦晃、川上茂樹、渡辺雄一郎²⁾、西口正通³⁾、丹生谷博 (東京農工大・遺伝子、¹⁾同・生物生産、²⁾東京大・生命環境科学、³⁾農業生物資源研究所)

植物ウイルスの宿主細胞間移行に関与する植物側因子のうち、ウイルス由来の移行蛋白質をリン酸化する宿主側プロテインキナーゼに着目し解析を行った。トマトモザイクウイルス (ToMV) の移行蛋白質のcDNAを大腸菌発現ベクターに導入後、GST融合蛋白質 (GST-30K) として発現し、グルタチオンセファロースビーズを用いて精製した。精製した蛋白質はビーズに吸着した状態 (GST-30Kビーズ) で、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 葉及びタバコ培養細胞 (BY-2 cell) 抽出液によって*in vitro* でリン酸化を受けた。さらに、これらの抽出液においてGST-30Kビーズに結合し、GST-30Kをリン酸化するプロテインキナーゼの存在が示された。このGST-30K結合性プロテインキナーゼの性質を5種類のキナーゼ阻害剤を用いて調べたところ、ヘパリンによってリン酸化が抑制された。また、ATPと同様にGTPもリン酸基供与体として働いた。これらの結果から、30K蛋白質をリン酸化する植物側のプロテインキナーゼは、カゼインキナーゼIIのようなヘパリン感受性プロテインキナーゼであると予想された。

I2a-09

サテライトRNA遺伝子導入によるウイルス抵抗性トルコギキョウ植物の育成

西原昌宏、阿部善子、鈴木一実、山村三郎（財団法人岩手生化学工学研究センター）

我々はトルコギキョウの優良品種母本作出を目的として本植物の形質転換に関する研究を進めている。今回、CMV（キユウリモザイクウイルス）のサテライトRNAを導入した形質転換トルコギキョウを作成し、本植物のウイルス抵抗性に関する特性評価を行った結果について報告する。

サテライトRNA遺伝子は岩手県内のリンドウ園場のウイルス罹病株より単離したCMV（C7-2株）由来の334bpの遺伝子断片を用いた。パーティクルガン法により、本遺伝子を有するプラスミドp35S-Sat(CaMV35S pro-satellite RNA-NOS ter)をpARK22(CaMV35S pro-bar-NOS ter)と同時に根切片に導入し、13系統の形質転換体を得た。ノザンプロット法およびRT-PCR法により解析を行った結果、サテライトRNA遺伝子の発現の強さは系統間で様々であり、転写産物にはpolyAが付加されていることが示された。次に、形質転換植物を馴化育成し、4系統のロゼットのステージおよび抽だい後の植物葉にCMV(E5株)の純化ウイルス粒子(25 μ g/mL)の接種を行ったところ、病徴の軽減、遅延が認められた。また、ELISA法による解析の結果、形質転換植物の接種葉のウイルス蓄積量は非形質転換体の1/30~1/5であり、本サテライトRNA遺伝子はCMVの増殖を抑制する効果があることが確認された。現在、ウイルス抵抗性の次世代への遺伝について解析を行っているところである。

I2a-10

ラン色細菌スイゼンジノリ群体と緑藻様単細胞性微細藻(第一報)：人工培養系開発の試行と緑藻様単細胞性微細藻の単離

平野篤(東京電力・エネルギー環境研究所)

スイゼンジノリ *Aphanothece sacrum* (SURINGAR) OKADAは、寒天質中に細胞が散在する群体を形成するラン色細菌である。その生息地は熊本、福岡県に限られており、一部(熊本市)は天然記念物に指定されているが、最近、指定地においても絶滅の危機に瀕している。¹⁾そこで、我々は福岡県甘木市産のスイゼンジノリ試料を入手し、人工培養系の開発を試みた。入手試料は表記ラン色細菌の他、糸状性ラン色細菌様微細藻、単細胞性緑藻様微細藻、細菌、線虫などを含んでおり、低温、貧栄養、低照度条件下(10 $^{\circ}$ C, NO $_3^-$ 濃度1 μ M程度, 光強度5 μ Ei/m 2 /s)においてのみスイゼンジノリの選択的な増殖が観察された。また、異なる条件(25 $^{\circ}$ C, NO $_3^-$ 濃度10mM程度, 光強度500 μ Ei/m 2 /s)を用いて、スイゼンジノリによく似た寒天質を分泌する単細胞性緑藻微細藻YM-1株を単離した。

1) 中島信次ら(1995)熊本県水産研究センター事業報告vol. 1994, p210-213

I2a-11

藍色細菌水前寺ノリ群体と緑藻様単細胞性微細藻(第2報)：緑藻様分離藻株YM-1の諸性質と回分培養後期における培養液の糊状化

湯本希典、平野篤、本波康由、国頭俊爾(東京電力エネルギー・環境研究所 地球環境グループ)

藍色細菌水前寺ノリ *Aphanothece sacrum* (Sur.)

Okada 試料から分離した緑藻様藻株YM-1¹⁾の生育特性を調べる過程で、BG11培地を用いた回分培養の後期において培養液全体が緑色を帯びたまま濁り、糊状になることを発見した。この現象は本藻株が分泌する粘性物質に起因すると考えた。この物質と水前寺ノリの群体を構成する寒天質成分との関連性、および群体形成への本分離株YM-1の寄与に関して興味を持たれる。本報告では、主に本藻株の生育特性と糊化前の培養液の生育環境(藻体濃度など)について述べる。YM-1の最適生育条件として、水温は30 $^{\circ}$ C付近であり、水前寺ノリの値より約20 $^{\circ}$ 高く、明らかに異なっていた。また、生育pH域はそれほど狭くはなかった。糊化は培養後期において生じ、その時の藻体濃度はOD730nmは約12、乾重量で約3.2g/Lであった。

1. 平野篤(1998)日本植物生理学会年会講演要旨集 p.

I2a-12

藍色細菌水前寺ノリ群体と緑藻様単細胞性微細藻(第3報)：緑藻様分離藻株YM-1の糊化培養液のエタノール沈殿物のMALDI-TOF/MSにより判明した質量特性

本波康由、平野篤、湯本希典、国頭俊爾(東京電力エネルギー・環境研究所 地球環境グループ)

水前寺ノリ試料から分離した緑藻様藻株YM-1¹⁾を回分培養し、その増殖後期において糊状となった培養液²⁾のエタノール添加で沈殿した物質をMALDI-TOF/MS(マトリックスアシステッドレーザー励起イオン化/飛行時間型質量計)を用いて分析した。得られた質量スペクトルは、分子量差380をピーク間隔とする規則的な波状曲線を示し、高分子量に移行するにつれて徐々に減衰すると共に、約14 kDaで消滅した。上記結果から、化学組成の知見は未入手ながら、本物質は以下の特性を有すると推定した。すなわち、その単量体は、測定スペクトルの振動周期380に対して水の分子量値18を加えた値である398を有し、かつ、イオウ元素を含有する。物質本体は、単量体複数個の脱水縮合構造を基本とする多糖様化合物の混合体である。

謝辞：測定に便宜を計って頂いた日本パーセプティブ社に感謝致します。

文献：1) 平野篤(1998)日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 2) 湯本ら(1998)同誌 p.

J1a-01

リン酸飢餓で誘導されるヒメウキクサのホスファターゼと細胞膜プロトンATPaseの分布と蓄積

錦織美和、中里洋、長谷昭¹、奥山英登志(北海道大院・地球環境・環境分子生物、¹北海道教育大・函館・生物)

我々は既に *Spirolela oligorrhiza* (ヒメウキクサ) の GPI-アンカーをもつ分子量約100kDa ホスファターゼがリン酸飢餓条件下で誘導されること、このホスファターゼが生化学的な諸性質から purple phosphatase であることを報告している。今回、リン酸飢餓条件下でこのホスファターゼと同様に細胞膜プロトンATPase が誘導されていることが明らかになったので報告する。

ヒメウキクサを 0 mM (-P 植物) 又は 2.5 mM (+P 植物) のリン酸を含む Hoagland 培地を用いて 25°C で 2 週間培養した。回収した植物を固定・脱水・樹脂包埋し、免疫組織化学的に細胞膜プロトンATPase の分布を調べたところ、-P 植物の根の表皮細胞への著しい蓄積が認められた。皮層と内皮及び維管束細胞では +P 植物との差ほとんどなかったことから、細胞膜プロトンATPase はリン酸飢餓により特異的に根の表皮細胞で合成・蓄積されると考えられる。同様に、*S. oligorrhiza* の -P 植物では purple phosphatase も根の表皮細胞で合成・蓄積され、しかもその大部分が細胞壁に分布することが示されたことから、リン酸飢餓条件下で表皮細胞で誘導される細胞膜プロトンATPase はアポプラストで purple phosphatase により生じた無機リン酸の取り込みを担っていると思われる。

J1a-02

単細胞緑藻クラミドモナスのリン酸欠乏順化制御遺伝子の indexed cosmid library を用いた complementation cloning

下河原浩介, Dennis WYKOFF¹, Arthur GROSSMAN¹, Donald WEEKS², 白田秀明(帝京大・医・化学, ¹ Carnegie Inst. Dept. Plant Biol., ² Univ. Nebraska Dept. Biol.)

我々は、単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* より、リン酸欠乏条件下においても、リン酸取り込み能の上昇も、誘導型フォスファターゼの分泌も起こらなくなった、リン酸欠乏順化能欠失変異株 HPR4 を単離した(96年度本年会)。また、エレクトロポレーション法によりクラミドモナスで高効率で形質転換株を得る方法を確立することに成功した(97年度本年会)。今回、この高効率形質転換法を、Nebraska 大学の Weeks らのグループの作成した、クラミドモナス indexed genomic cosmid library によるコンプリメンテーションスクリーニングに利用することにより、この HPR4 変異株の変異を完全に回復する cosmid clone の同定に成功した。この cosmid clone (43 kb) より、HPR4 変異株の変異を相補するのに必要な最少遺伝子 (*PSRI* と命名) 領域 (6 kb) を決定し、サブクローニングした。さらに、この遺伝子領域の全塩基配列を決定した。現在この領域の配列をプローブにして cDNA library のスクリーニングを行っている。

J1a-03

トマト根において Mn 欠乏により発現する金属結合タンパク質の膜移行シグナル

佐々木康二¹、Valeria C. Primo²、岡桂子¹、尼子克己¹、高橋正昭¹ (¹大阪府大・農・応用生化、²Universiada Nacional de Rio Cuarto)

植物は養分の欠乏に対処する多彩な戦略を持っている。トマト根において、その戦略に関係すると思われる、Mn 欠乏により発現が誘導される金属結合タンパク質の cDNA (*Mdip1*) を金属結合部位のアミノ酸配列を参考にしてクローニングした。この *Mdip1* は 27 アミノ酸のプレ配列、MAVFR KMFPL IMVIM TLLAI NSDKA CA、を持つ前駆体をコードし、金属結合部位は成熟タンパク質の N 末端より 29 アミノ酸残基内に存在することが明らかになった。このプレ配列は von Hajne による予測では形質膜を標的にする。Mn 欠乏によって誘導される金属結合性タンパク質の局在を明らかにするために、プロセシング部位を含めたプレ配列を β -glucuronidase (GUS) の N 末端に連結したキメラタンパク質を発現する遺伝子をタバコに導入して、GUS 活性の組織化学的な検出により、*Mdip1* の局在部位を明らかにし、Mn 欠乏時における機能を推定した。

J1a-04

Mn 欠乏時にトマト根に発現する遺伝子群の解析

藤本直、佐々木康二、北野高寛、尼子克己、高橋正昭(大阪府大・農・応用生化)

植物体内において Mn は Fe について要求量の多い微量必須元素であり、光合成の電子伝達に必須で、その欠乏は直ちに植物の生育に影響する重要な機能を持っている。可給態 Mn の供給が制限された土壌では、欠乏に対処する戦略が Mn においても存在することが期待される。我々は植物根の Mn 吸収機構を明らかにすべく、Mn 欠乏時に発現が高められる遺伝子の検索を行った。

発芽後 3 週間完全培地で栽培した後、0, 2, 4, 6, 8, 10 日間 Mn 欠乏処理を行ったトマト根から全 RNA を調製し、Mn 欠乏処理前後のトマト根の mRNA のディフェレンシャルディスプレイを行った。これにより Mn 欠乏時にのみ転写が誘導される mRNA から 3 つの cDNA 断片を得た。これらの塩基配列は、これまでに登録された遺伝子配列と一致するものがなく新規なものであった。Mn 欠乏による転写の誘導はノーザンブロットにより行った。5'-RACE 法を用い、全長 cDNA (*Mdip2-4*) をクローニングし、塩基配列を決定して機能を同定した。

J1a-05

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

MnはFeに次いで要求量の多い植物の微量必須元素である。酸化還元、脱炭酸、加水分解反応触媒中心として機能し、その欠乏は光合成の酸素発生やストレス対応の失活を導く。我々は、根のMn吸収機構を明らかにする目的で、Mn欠乏によって合成が誘導される、根の形質膜に存在する金属結合タンパク質を探索した。1ヶ月間、完全水耕液で栽培した後、Mn欠乏処理されたトマト根より膜画分を調製し、キモトリプシン消化後、金属アフィニティークロマトにより金属結合性ペプチド断片を得た。そのアミノ酸配列を元にプライマーを合成し、Mn欠乏処理したトマト根より調製したRNAを鋳型とした3'-RACE法及び5'-RACE法により、840bpの全長cDNA(*Mdip1*)をクローニングした。*Mdip1*は、シュウ酸酸化活性を持つコムギのGermin(*gf-2.8*)とアミノ酸及びヌクレオチドで高い相同性を示した。*Mdip1*を導入した形質転換植物の根の金属結合性、シュウ酸酸化活性について報告する。

J1a-06

鉄欠乏オオムギ根におけるアデニン・リボースリン酸転移酵素(APRT)の発現
板井玲子¹、鈴木一矢²、山口博隆²、中西啓仁¹、西澤直子¹、森敏^{1,2}（¹東大・農学生命科学、²CREST）

鉄欠乏処理区及び対照区のオオムギ根から抽出したタンパク質を二次元電気泳動した。鉄欠乏処理区で対照区よりも量が増加したものに、分子量18 kDa、pI 5.2のCスポットタンパク質があった。このCスポットタンパク質のアミノ酸部分配列は、植物のアデニン・リボースリン酸転移酵素(APRT)と類似していた。得られたアミノ酸部分配列を基にして、鉄欠乏オオムギ根由来のライブラリからCスポットタンパク質をコードするcDNAのスクリーニングを行い、得たcDNAの配列は、特に同じイネ科であるコムギの既知のAPRTと高い相同性を示した。ノーザン解析により、Cスポットの遺伝子は、鉄欠乏処理区の根で対照区より高い発現をしていることがわかった。サザン解析からは、1コピー以上の存在が示唆された。APRTはアデニンとホスホリボシルピロリン酸とを一段階でAMPへ変換する反応を触媒する。[8-¹⁴C]アデニンを使用したAPRT活性測定では、鉄欠乏処理区の根の粗抽出液において対照区よりも高いAPRT活性が確認された。鉄欠乏オオムギ根ではメチオニンを再生するYang Cycleが活性化されると考えられてきた。Yang CycleではATP消費とアデニン放出が起こることから、Yang Cycleからのアデニン塩基を回収するためにAPRT活性が鉄欠乏条件下で上昇すると考えられる。

J1a-07

塩害イネ根におけるNa⁺の浸入経路の推定
落合久美子、間藤 徹、關谷次郎
（京都大・農・応用生命）

高濃度のNaCl (25, 100mM) を与えた場合、イネ (IR36) 地上部へのNa⁺移行量は培地カルシウム濃度の増加 (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5) に伴って減少した。100 mMのNaCl共存下で、膜を透過しない蛍光色素PTS (ピレントリスルホン酸三ナトリウム塩) のイネ地上部への移行量は、NaClを与えない場合に比べて増加したが、PTSの移行量もまた培地のCa²⁺濃度の増加に伴って減少した。イネ地上部へのNa⁺及びPTSの移行量は吸収実験時の培地のpHに影響された。培地のpHを6.5から4に下げると、地上部へのNa⁺の移行速度は約2倍大きくなったが、このとき根のNa⁺含量には培地pHの違いによる差はなかった。

ここでみられた、培地のCa²⁺濃度及びpHが根からイネ地上部へのNa⁺の移行量に影響を与えるという結果は、根から地上部へのNa⁺の移行にアポプラスティック経路の寄与が大きいことを示唆している。

J1a-08

Ni耐性タバコ培養細胞の選抜とその特性
亀田弥生、中澤亮二、伊藤智子、武長宏
（東京農業大学・農・農化）

タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. BY-2) 培養細胞を用いて細胞レベルでのNi耐性機構について検討を行っている。まず、無選抜細胞の増殖阻止濃度である700 μ Mにおいても生育できるNi耐性細胞を選抜した。本耐性細胞のNi耐性機構と他の重金属耐性機構との関係を検討する目的でCo耐性およびCd耐性の検定を行ったところ、耐性細胞は無選抜細胞よりもCo耐性が高く、Cd耐性は低かった。耐性細胞は培地に添加したNi (700 μ M) の約50%を細胞内に取り込んでいた。吸収されたNiのうち約90%がcell sapに存在しており、そのNi濃度概算値は約1.6mMと植物酵素を失活させる濃度であった。このことからNiは何らかの物質と結合した形態で液胞などに蓄積していることが推測された。また、耐性細胞はNi存在下で培養すると、細胞内の水溶性ヒスチジン含有量が増加することが明らかになった。以上のことから、細胞内においてNiがヒスチジンによりキレート化され無毒化されているものと考えられた。

J1a-09

オオムギにおける¹¹C-メチオニンの転流のPETIS法による検出

中西啓仁¹, Bughio Naimatullah¹, 松橋信平², 石岡典子³, 内田博⁴, 辻淳憲⁴, 長明彦³, 関根俊明³, 久米民和², 森敏^{1,5}
1 東京大学・農学生命科学, 2 原子力研究所・高崎, 3 原子力研究所・RI部, 4 浜松ホトニクス, 5 CREST

ムギネ酸類はメチオニンを出発材料とし、根で生成される。従って、鉄欠乏時には根においてメチオニンの要求性が高まっていることが予想された。PETIS(positron emitting tracer imaging system)法では¹¹C(半減期: 20.39min)のような短半減期の放射性同位元素を用い、トレーサーの移行の結果をみることができるだけでなく、CCDカメラを用いて植物体内でのダイナミックな物質の輸送についても経時的に観察することができる。今回われわれは¹¹CO₂→¹¹CH₃I→¹¹C-メチオニンによって合成した¹¹C-メチオニンをオオムギの葉または根から吸収させ、このPETIS法を用いて、植物体内でのメチオニンの移行性が鉄欠乏処理オオムギにおいて変化するかどうかを調べた。計測の後、植物体はBAS1500で画像解析した。鉄欠乏オオムギではメチオニンは迅速(1時間以内)に下方移行するが、葉の付け根の部分(discrimination center)が強く標識され、根への移行性は非常に低かった。しかし、他の分けつ新葉や主茎の新葉にも迅速に転流していることが認められた。また、根から投与した場合には、大部分が根にとどまり、地上部への移行が少なかった。ここで得られた画像はアミノ酸転流に関して世界で最初のデータであると思われる。

J1a-10

トランスジェニック シロイヌナズナにおける硫酸イオントランスポーター遺伝子の発現抑制
高橋秀樹、渡部晶子、斉藤和季
(千葉大・薬・薬用資源センター)

シロイヌナズナにおいて、硫酸イオントランスポーター遺伝子 *AST68* は、葉及び根の維管束において mRNA の発現がみられ、根における mRNA 発現量が硫酸イオン欠乏ストレスにより増加した[1]。*AST68* の 5'-領域約 3kb と *gus* との融合遺伝子(*APG2*)を導入したシロイヌナズナ形質転換体では、導管に隣接する細胞に GUS タンパク質の蓄積がみられ、*in situ* hybridization の結果と一致した。

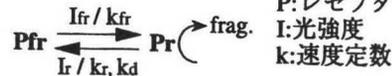
次に、CaMV-35S プロモーターにより *AST68* 翻訳領域をアンチセンス方向で発現させたシロイヌナズナ形質転換体(ATR2)について解析を行った。ATR2 植物 13 ラインのうち、ATR2-1 は野性株と比べ硫酸イオン吸収量が低く、ロゼット葉展開時に子葉の褪色がみられた。野性株では、セレン酸の添加により根における *AST68* mRNA 発現量が増加し、硫酸イオン吸収量が増加する。ATR2-1 の T3 植物は、通常条件では全て野性株と比べ硫酸イオン吸収量が低い。しかし、セレン酸を添加した場合には、野性株と同等の硫酸イオン吸収量を示すものと、吸収量が野性株より低下するものに分かれた。

[1] Takahashi, H. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11102-11107

J1p-01

粘菌変形体フラグメンテーションでのPhytochromeの関与: photo-conversionモデルによる説明
垣内康孝、上田哲男 (名古屋大・人間情報)

真正粘菌 *Physarum polycephalum* の変形体は巨大なアメーバ細胞で、通常は細胞分裂を行わない。しかし我々はある条件で光照射によりこの変形体が均一なサイズの多数のフラグメントに分かれることを見いだした。光情報伝達の仕組みを明らかにする為、我々は光受容体の解明から着手した。300-800 nm に渡ってフラグメント率の波長依存性を調べ、UV-A、青、近赤外が有効であった。このうち近赤外による誘導は同時に赤を照射することで打ち消された。我々はこれをレセプター分子が photo-conversion を起こしているものと考え、次のモデルをたてた:



受容体の総量が不変とすると ($\text{Pr} + \text{Pfr} = \text{Po}$)、 $1/(\text{Pr}/\text{Po}) = 1 + \text{kr}/\text{kfr} * (\text{I} + \text{k})/\text{I} / \text{r}$ が得られる。従ってフラグメント誘導率の逆数は近赤外の単照射では光強度の逆数の、また赤・近赤外の2重照射では阻害光強度の1次関数になる。データはこれらの関係をよく満たしており、モデルの妥当性が示された。以上より赤・近赤外で photo-conversion を起こすもの、すなわちフィトクロム様物質がフラグメンテーションに関与していることが示唆された。

J1p-02

ラン藻 *Anabaena* における赤色光/近赤外光照射による細胞内 cAMP 量の可逆的变化
大森正之、渡辺正勝¹ (東京大・院総合文化・生命環境、¹基生研・培養育成)

最近ラン藻にもフィトクロムに似たタンパク質の存在が指摘されている。我々は、糸状性ラン藻 *Anabaena cylindrica* に赤色光および近赤外光を照射し、照射後 cAMP を抽出して細胞内の cAMP 量を測定した。その結果、赤色光照射では cAMP レベルが急激に減少し、近赤外光照射では逆に増加が見られた。減少は 630nm 付近で最大であり増加は 720nm 付近で最大であった。この変化は、光合成と直接的には関係していなかった。赤色光と近赤外光を同時に照射したところ、それぞれの光の効果が打ち消されたが、赤色光はより弱い光強度で近赤外光の効果を打ち消した。さらに、赤色光/近赤外光、あるいは近赤外光/赤色光と連続的に照射したところ、cAMP 量は可逆的に変化した。この事実は *A. cylindrica* にフィトクロムのようなタンパク質を光受容体とする光信号伝達系が存在すること、光情報は cAMP を合成する酵素であるアデニル酸シクラーゼに伝えられ、酵素活性が調節されることを示唆している。

J1p-03

アラビドプシスHY5タンパク質の機能にC末端領域は重要である

合田 和史、小山 時隆、岡田 清孝 (京都大・理・植物)

アラビドプシスHY5遺伝子は光形態形成、根の刺激応答性、根の形態形成などに重要な役割を持つことが突然変異体の解析よりわかった。

予想されるHY5タンパク質のN末端側にカゼインキナーゼIIのリン酸化部位に共通の配列が存在し、C末端側には転写因子によく見られるbZIPモチーフが存在している。

今回、植物体内でそれらの部位がHY5タンパク質の機能にどのように働いているかを調べるために、欠失型HY5をhy5突然変異体に導入した。カゼインキナーゼIIのリン酸化部位を含むN末端側40アミノ酸を削ったHY5を導入した形質転換植物では突然変異体の表現型である明所下での胚軸の徒長、側根の異常な屈地性を相補することができた。しかし、C末端側のロイシンジッパーのほとんどを残したHY5を導入した個体では相補することができなかった。

以上のことから、我々はHY5タンパク質のC末端が機能発現に重要であると考えている。また、これらの形質転換植物の詳細な表現型を解析中である。

J1p-04

連続光照射によるシロイヌナズナ胚軸伸長制御の素過程の解析

篠村知子、内田憲孝、古谷雅樹 (日立基礎研究所)

茎の伸長の光制御は代表的なHIR(High irradiance response)であり、通常は光を数時間から数日間、植物体に「連続照射」することで効果を測定している。HIRによる伸長抑制の度合は、照射光の強度とは相関があるが、光エネルギーの総量とは相関が見られない。すなわちブンセン-ロスコーの法則は成り立たないとされており、同法則の成り立つ他の多くのパルス光による誘導反応との比較が困難であった。今回輝度の高いLED (Light emitting diode)を近赤外光の光源に用い、暗所発芽させたシロイヌナズナにパルス光 (1~60秒間、0.62~620 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)を3分おきに繰り返し照射することで、ほぼ近赤外光連続照射と同等の胚軸伸長の抑制効果が得られることを見出した。「パルス光の繰り返し照射」による抑制の度合は、照射した光量との間に相関がみられ、ブンセン-ロスコーの法則が成り立っていた。従って、「連続光照射」による胚軸伸長制御の素過程は、種子発芽の光制御などの多くの光誘導反応と同様に、短時間の光照射により波長依存性や必要光量を解析できるようになった。この方法を用いて岡崎国立共同研究機構の大型スペクトログラフによるシロイヌナズナ変異株の解析を行った結果、フィトクロムA(PhyA)による胚軸の伸長抑制が、近赤外光ばかりでなく青色光(400nm)によっても誘導される点はPhyAによる種子発芽誘導の場合と一致するが、その反応を誘導するのに必要な光量は種子発芽に必要な光量の約350倍であることがわかった。

J1p-05

西洋わさび毛状根からのクリプトクローム遺伝子の単離と解析

齋藤 力、田嶋 馨、鎌田 博 (筑波大・生物)

西洋わさび (*Armoracia rusticana*) に *A. rhizogenes* を感染させることで得られる毛状根を明所下において植物ホルモンを含まないMS培地上で培養すると不定芽が形成される。この光誘導不定芽分化においては、光受容体としてフィトクロムが関与していることを明らかにしてきたが、光作用スペクトルでは、近紫外光や青色光にもそれぞれピークがあり、その効果も赤色光と同程度に大きいことから、フィトクロム以外にクリプトクロームが関与していることが示唆された。

そこで、この光誘導不定芽形成におけるクリプトクロムの関与を検討するため、西洋わさび毛状根で不定芽形成頻度の高い部位 (暗所で12週間以上培養した毛状根の基部側) より作成したcDNA library から、アラビドプシスのクリプトクローム遺伝子 (*CRY1*) cDNAをプローブとしてクリプトクローム遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、約2.2 kbpの2種類のcDNAが単離できた。推定アミノ酸配列の長さはいずれも617アミノ酸であり、相互に96%の相同性を示した。また、両者共にアラビドプシスの*CRY2*に対して92%の相同性を示し、*CRY1*とは50%程度の相同性であった。

J1p-06

フィトクロムA分子のAFMイメージ

佐藤雅彦、徳外富由樹、竹安邦夫、眞鍋勝司¹ (京大・総合人間、¹横市大・理)

フィトクロムAは単量体分子量が約12万の色素タンパク質で、溶液中では2量体として存在していると考えられている。フィトクロム分子の立体構造についてはX線結晶解析等はされておらず、その大まかな外形すら良くは知られていない。

我々はフィトクロムの外形を知るため、ほぼ純粋になるまで精製したフィトクロム分子をマイカ劈開面に乗せ、原子間力顕微鏡でタッピングモードで観察した。その結果、光平衡状態のフィトクロムの外形は歪んだ長円形を示し、従来の電子顕微鏡による観察に基づく tripartite 構造 (Jones & Erickson 1989) や、電顕像をX線小角散乱法によりシミュレートして導かれた4つ葉型の構造 (Tokutomi et al. 1989) とは異なる結果を得た。tripartite 構造をとる像はまれに散見されるものの、大きさから判断して、3つの長円構造がたまたま近接している事による可能性が大きいと思われる。

AFM像を画像解析した結果やエピトープ既知の抗フィトクロム単クローン抗体との複合体の像をもとにフィトクロムAの形について議論する。

J1p-07

エンドウ黄化芽生えのPhyA結合タンパク質；
内在性PhyAとの結合

嶋田嵩史、徳富 哲（大阪府大・先端研）

我々はフィトクロム光受容系のフィトクロムから下流へのシグナル伝達機構解明の手がかりを得るべく、エンドウA型フィトクロム（PhyA）と結合するタンパク質（以下BPと略）の検出を試みてきた。これまで、PhyAをリガンドとしてコンジュゲートさせたアフィニティーカラムを用いて、エンドウ黄化芽生え抽出液中から、Pr特異的に結合する複数のBPと、PrおよびPrfとともに結合する少数のBPを電気泳動的に検出し、既に報告した。さらにカラムにコンジュゲートさせたPhyAが光変換能を保持していることを利用してこれらのBPの中で光可逆的にPhyAに結合するものを捜し、Prf特異的に結合するBPの一つ40K-BPが光可逆的にPhyAと結合することを見つけ報告した。

これらのBPは、精製PhyAに対する *in vitro* の結合を指標に得られたが、今回これらのBPが実際に組織内で内在性のPhyAと結合するかどうかを、PhyA抗体を用いた免疫沈殿法により調べた。その結果上記BPの内幾つかが *in vivo* の系でもPhyAに結合することが解ったので報告する。

J1p-08

フィトクロムBの核局在の光制御
長谷あきら（東大・遺伝子）

我々は、エンドウ芽生えを用い、連続赤色光処理によりphyBの核への蓄積が誘導されることを見いだした（長谷、1997年度年会）。そこでまず、黄化芽生えに対する赤色光パルスの効果を調べたところ、連続光処理と同程度のphyBの核局在化が観察された。また、パルス処理後12時間目においても相当量のphyBが核で検出された。次に、赤色光に対する近赤外光の効果を調べたところ、phyBの核移行そのものは近赤外光で打ち消されなかったが、一度上がった核局在phyBレベルが6時間後には暗所レベルに戻った。さらに、連続光処理において赤:近赤外光の比を変化させたところ、赤色光の相対量が増えるに従って核局在phyB量が増加した。以上の結果は、phyBの核移行がphyBの光変換と密接に関連することを示唆している。

J1p-09

GTボックス結合タンパク質の性状に関する研究
村田 純、高瀬尚文、平塚和之、堀田康雄
（奈良先端大・バイオ）

GTボックス結合タンパク質は様々な光応答性遺伝子のプロモーター領域に存在するLRE(light-responsive element)へ結合し、光に応答する転写制御機構において重要なコンポーネントであると予想される。AtGT-1のDNA結合部位は α -helixが3つ並んだtrihelix構造をとり、植物固有の転写因子である可能性が高い。そのmRNAは恒常的に発現し、時期特異性は認められないことから、GT-1活性はリン酸化などの修飾あるいは他のタンパク質との相互作用により制御されていると考えられる。AtGT-1は *in vitro* において多量体を形成すること、また類似したDNA結合能を示すAtGT-2には存在する典型的な核移行シグナルを持たないことから、その核移行の性状等に興味が持たれる。今回は、AtGT-1の核移行シグナルに関する解析結果と、新規GTボックス結合タンパク質のクローニングについて述べる。

J1p-10

強光ストレス順応下におけるジンクフィンガー
蛋白質の誘導発現
飯田朝子、数岡徹、大江田憲治（住友化学、生命研）

シロイヌナズナでは中程度の光ストレスで順応処理をする事により、強光耐性を獲得することが確認された。順応下に誘導発現する遺伝子をDD法でスクリーニングしたところ、カタラーゼ、D2蛋白質の他、転写因子と考えられるジンクフィンガー蛋白質の遺伝子が取得された。この遺伝子のノザンプロット解析を行ったところ、通常の光条件下では、発現は認められないが、1~16時間の中程度の光ストレス（600 μ E/m²s）により誘導されること、1,900 μ E/m²sの強光ストレスにより顕著な発現誘導が認められることが確認された。また、赤色光と青色光の両方によって誘導され、両者の発現レベルに大差は認められなかった。低温、高温、ジャスモン酸処理によっても誘導が認められ、この遺伝子は光以外のストレス耐性にも関わっていることが示唆された。本研究は、通産省からの補助金を受けて、石油産業活性化センターからの委託研究によって実施されたものである。

J1p-11

糖応答性遺伝子 *din1* の転写調節領域の解析と発現量操作の可能性について
安積良隆、小川真史、鈴木秀穂（神奈川大・理・応用生物）

ハツカダイコンからクローン化された遺伝子 *din1* は連続光下では発現しないが、暗処理をした時には強く発現が誘導される。これは光照射下でも光合成阻害剤の投与によって発現が誘導され、暗処理下でも糖処理することによって発現が抑制されることなどから、暗処理時の発現誘導は光合成によって生成される糖の供給がなくなったことによるものであることがわかっている。糖応答に必要なシス配列を探索するために、*din1* 遺伝子上流域を pBI221 に挿入することによって GUS 遺伝子とのキメラ遺伝子を作製した。これをパーティクルガンを用いて植物細胞に導入した。ハツカダイコンを標的とした場合には発現レベルは低かったが、タマネギでは、糖処理をしない時には強く発現し、糖処理をした場合には発現が抑制されることが確かめられた。

J1p-12

シロイヌナズナ *din* 遺伝子群の糖による発現制御
藤木友紀、吉川陽子、伊藤正樹、渡邊昭
（東京大・院・理系・生物科学）

我々は、シロイヌナズナの緑葉細胞で暗黒条件特異的に発現する *din* 遺伝子群の単離と機能解析を通して、暗処理や老化の過程では、新たな遺伝子発現を伴う劇的な代謝系の組み換えが起きていることを明らかにしてきた。

今回、暗黒下の緑葉や老化の進行過程では、光合成能が低下して糖レベルが減少することで *din* 遺伝子の発現が誘導される可能性を示唆する結果を得た。そこでシロイヌナズナの培養細胞を用い、*din* 遺伝子群の糖レベルによる発現制御の詳細な解析を行った。培養液からショ糖を抜いて細胞を飢餓状態にすると、いずれの *din* 遺伝子も極めて早い時間から mRNA 量の上昇が見られた。糖による発現抑制にはヘキソキナーゼによる糖シグナル伝達系の関与が示唆された。しかし、暗処理葉と培養細胞の飢餓処理とでは *din* 遺伝子の発現パターンに違いも見られ、老化葉での遺伝子発現には、より高次の糖の検知機構が介在していることが伺えた。糖による遺伝子発現の制御は、生育環境の変化への柔軟な対応に極めて重要であると考えられる。

J1p-13

フタバネゼニゴケ培養細胞のフィトクロム遺伝子
鈴木崇紀、佐藤敏生、滝尾進¹（広島大・理・生物科学、¹熊本大・理・生物科学）

我々が分離しているフタバネゼニゴケの培養細胞には、クロロフィル量が暗所で 1/10 に低下する黄色株と明暗関わらずに一定の緑色株がある。緑色株は、再分化出来ず、光制御能を欠いた変異株であると考えている。他の裸子植物以下の下等植物と同様に苔類においては、緑化の鍵となるプロトクロロフィリドからクロロフィリドへの還元反応は、反応に光のエネルギーを必要とする核ゲノム由来の POR か、または、必要としない葉緑体ゲノム由来の ChlL, N, B によって触媒される。この両遺伝子は、黄色株においては転写レベルで光制御されるが、緑色株では、*chlLN*, *B* 遺伝子は光制御を欠くが、*por* 遺伝子は明瞭に光制御されるため、両遺伝子の光情報伝達経路が異なると推定される。

我々は、このフタバネゼニゴケの光制御機構を調べるため、フィトクロム遺伝子の分離を試みた。保存性の高い色素団結合部位周辺領域の PCR 産物を得、この領域をプローブとしてサザン解析を行ったところ、このフィトクロム遺伝子はゲノムあたり 1 コピーであると推定された。また、ノーザン解析によると、このフィトクロム遺伝子は黄色株でも緑色株でも暗所で高転写されていた。

J1p-14

完全寄生植物ネナシカズラの光応答性遺伝子の発現パターンの特徴：光応答性と組織特異性
柴田未知恵、若杉達也、多田欣史¹、山田恭司
（富山大・理・生物、¹新潟大・理・生物）

ネナシカズラ (*Cuscuta japonica*) は完全寄生性の被子植物であるが、光合成能が保持されていることがわかっている。この寄生植物においてこれまで我々は、クロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子 (*cab*) および RuBisCO 小サブユニット遺伝子 (*rbcS*)、カルコン合成酵素遺伝子 (*chs*) といった光誘導性が知られている遺伝子の発現様式について解析を行ってきた。本研究では、光抑制性遺伝子として知られているプロトクロロフィリド還元酵素遺伝子 (*por*) および β チューブリン遺伝子 (*tubB*) について光による発現調節を解析した。その結果、*por* と *tubB* の発現はともにネナシカズラにおいても光によって抑制されることが明らかになった。さらに上記 5 種の光応答性遺伝子の発現の組織特異性について調べたところ、光合成に関与する遺伝子のうち *rbcS*, *por* は、光合成を行っている地上部 (莖) で強く発現し、根ではわずかにしか発現していなかった。これに対して *cab* では、莖、根いづれにおいても同程度の発現が認められ、ネナシカズラでの *cab* の発現は、光応答性のみならず組織特異性も失っていることが示唆された。

J1p-15

LARGE SCALE SCREENING OF GENES WHICH ARE ANTAGONISTICALLY REGULATED BY PHYTOCHROME AND A BLUE LIGHT RECEPTOR IN SPORES OF *Adiantum capillus-veneris* L.

Kenko UCHIDA, Takamichi MURAMATSU, Masaki FURUYA
Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395, Japan.

We have screened for genes whose expression was differentially regulated by phytochrome and antagonistically a blue light receptor in the spores of the fern *Adiantum capillus-veneris* L. Imbibed spores were briefly irradiated with red, red/blue or blue light and collected at 8 hr after irradiation. Total RNA was isolated from spores and analyzed by a fluorescent differential display technique. We identified 15 cDNAs that were up-regulated and 4 cDNAs that were down-regulated, following red light treatment, in which the effect of red light were reversed by blue light treatment. These 19 bands showing red and blue light regulation were identified among PCR product amplified using 80 arbitrary PCR primers. We cloned two up-regulated cDNA fragments and used them to screen a cDNA library prepared from spores. These cDNAs showed homology with cell wall-associated extensins and nodulin 26, that encode an aquaporin water channel. Differential regulation of these 2 cDNAs by red and blue light was confirmed by both Northern blot and RT-PCR on spores harvested 8h following light treatments.

J1p-16

PHYTOCHROMES DIFFERENTIALLY REGULATE EXPRESSION OF NUCLEAR GENES ENCODING PHOTOSYNTHETIC- OR CHLOROPLASTIC-PROTEINS IN ETIOLATED SEEDLINGS OF *Arabidopsis thaliana*

Norihito KUNO, Takamichi MURAMATSU and Masaki FURUYA;
Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395, JAPAN

We have investigated the effects of phytochrome A, B and X (PhyA, PhyB and PhyX) on the regulation of gene expression in 6-day-old etiolated seedlings of wild type and phytochrome mutants of *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta*. Seedlings were irradiated with or without a pulse of far-red light, then kept in darkness for 4 hours, and cDNA clones corresponding to the PhyA-mediated very-low-fluence (VLF) response genes were screened using the fluorescent differential display technique. ca. 30,000 cDNA bands were screened, and 25 differentially expressed cDNA bands were identified. Six cDNAs which induced by far-red light were isolated. These cDNAs were identical or highly homologous to known plant genes which have characteristics of nuclear genes encoding photosynthetic- or chloroplastic-proteins. The expression of these genes was photoreversibly induced by low-fluence (LF) red light in *phyA* or *phyA phyB* double mutants. The extent of induction by LF red light in *phyA* mutant was higher than that in *phyA phyB* double mutant. These results indicated that PhyA induces the expression of several photosynthetic- and chloroplastic-genes through a VLF response, and PhyB and PhyX show overlapping effects on induction of those expression through a LF response. In conclusion, the modes of photoperception are distinct between PhyA and PhyB/X. However, both type phytochromes induce the expression of genes which were characterized in this study.

J1p-17

PROPAGATION OF PHYTOCHROME-INDUCED ACTIVATION OF *cab2::luc* GENE EXPRESSION IN TRANSGENIC TOBACCO SEEDLINGS

Ingeborg SCHUETZ, Masaki FURUYA, Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395, Japan.

Bischoff et al. (*Plant J.* 12 839-849, 1997) described the phytochrome induced expression pattern of a *cab2::luciferase* reporter gene in cotyledons of transgenic tobacco seedlings using micro-beam irradiation techniques.

As reported, luciferase activity can be observed throughout the cotyledon following red spot irradiation (spot diameter 25 μ m), indicating that the original light signal is transduced within the plant by a further mechanism. The reaction is red/far red reversible with an escape kinetic typical for phytochrome type II. Far red irradiation has an effect on luciferase activity only when given to the same cells that received an earlier pulse of red light and does not influence the signal transduction.

The pattern and time course of luciferase activity indicate that the gene expression-inducing signal is very rapidly propagated in the cotyledon, even to cells which are very distant from the site of the cells which had received the light pulse.

J1p-18

パーティクルガンを用いたタバコ光化学系Ⅰ核遺伝子 *psaDb*, *psaEb*, *psaHb*の光応答領域の解析
中野真之、中村崇宏、小保方潤一 (北大・地球環境・生態遺伝)

タバコの光化学系Ⅰ核遺伝子, *psaD*, *psaE*, *psaH*は光によってほぼ同調した発現誘導をうける。形質転換植物を用いた研究から *psaDb* 遺伝子は転写開始点上流域と転写領域内にそれぞれ別個の光応答因子をもつことが明らかになっているが、他の系Ⅰ遺伝子の光応答因子についてはまだ何もわかっていない。本研究では *psaDb*, *psaEb*, *psaHb* の光応答領域の機能についてパーティクルガンを用いたトランジェント発現系を使って解析を進めたので、その結果を報告する。まず、*psaDb* の転写上流域にルシフェラーゼ遺伝子を連結したキメラ遺伝子 *psaDb::LUC::NOS* をタバコ黄化幼苗にパーティクルボンバードメント法で導入し、トランジェント発現系における導入遺伝子の光応答特性を検討した。その結果、導入するDNAをメチラーゼ欠損株の大腸菌から調製し、かつ、遺伝子導入前後の暗処理時間を適当に調節することにより、*psaDb* プロモーターの光応答をトランジェント系でも再現し、かつ検出できることがわかった。

J2a-01

Synechocystis sp. PCC 6803のアデニル酸シクラーゼ CyaDは青色光シグナルを伝達する
寺内一姫、大森正之(東京大・総合文化・生命)

ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803を用い光環境の変化に伴う細胞内cAMP量を測定した。*Synechocystis* 6803の野生株細胞を暗所から明所に移すと、数分以内に細胞内cAMP量が増加することが明らかになった。この反応に関与する光質を調べるために、岡崎国立基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いて単色光照射実験を行った。その結果、青色光(450nm)照射によりcAMP量が増加することが明らかになった。

Synechocystis 6803の全塩基配列には、相同性からcAMP合成酵素であるアデニル酸シクラーゼをコードしていると考えられるORFが2つ(*cyaA*, *cyaD*)ある。抗生物質耐性遺伝子の挿入によりこれらの破壊株を作製した。破壊株の光合成生育条件下における細胞内cAMP量を測定した。*cyaD*破壊株でのみ細胞内cAMP量が顕著に減少した。次に破壊株を用いて、光環境の変化に伴うcAMP量の変化を調べた。*cyaA*破壊株は野生株と同様に光によりcAMP量が増加したが、*cyaD*破壊株では増加がみられなかった。このことからアデニル酸シクラーゼCyaDが青色光のシグナルを伝達していることが明らかになった。また*Synechocystis* 6803の野生株は運動性をもちプレート上で明瞭なコロニーを形成しないが、*cyaD*破壊株はプレート上でコロニーを形成するという興味深い表現型を示した。

J2a-02

クロレラの青色光による呼吸促進に対するStaurosporine、K252aの阻害効果
神谷明男(帝京大・薬)

硝酸で培養したクロレラ(*Chlorella kessleri*)に青色光・近紫外光(以下青色光と略)を照射すると、デンプンが分解され、呼吸が増大する。また同時にアンモニアの放出が認められる。アンモニアは同じクロレラの α -amylaseとphosphorylaseのactivatorである。従って、アンモニア生成系が青色光により修飾される可能性がある。

今回青色光によるシグナル伝達をProtein kinaseの阻害剤であるStaurosporine、K252aを用いて検討した。アンモニアで培養したクロレラ(硝酸還元経路は不活性化される)に青色光を照射すると、アンモニアが放出され、呼吸の増大が認められた。また、この青色光による呼吸増大とデンプン分解がStaurosporine、K252aで阻害された。硝酸培養クロレラで青色光による培地の酸性化と硝酸取り込み促進もStaurosporine、K252aで阻害されることを前回報告したが、この現象はアンモニア培養細胞では認められなかった。従って、クロレラで青色光により誘導される現象はProtein kinaseを経由すると思われるが、その下流へのシグナル伝達経路は複数存在すると思われる。

J2a-03

アカパンカビにおける子嚢殻の形態形成に至る光信号伝達の解析
小倉康裕、矢部尚登、蓮沼仰嗣(横浜市大、木原生研、総合理学)

アカパンカビの菌糸を用いて、*in vitro*の光信号伝達の解析系をたてた。青色光照射は15kDaタンパク質のリン酸化を促進した。15kDaタンパク質は精製され、ヌクレオシドニリン酸(NDP)キナーゼであることが判明した。NDPキナーゼのcDNA、NCNDK1が単離され、NDPキナーゼはNCNDK1と名付けられた。NCNDK1が全くリン酸化されない*psp*変異株が単離され、LGVRにマップされた。*psp*変異よりNCNDK1 cDNAがクローニングされた。その推定アミノ酸配列はPro72His変異を含んでおり、NCNDK1 P72Hと名付けられた。NCNDK1およびNCNDK1 P72Hを大腸菌内で発現し、そのタンパク質を精製した。NCNDK1はNDPキナーゼ活性、自己リン酸化活性、およびMBP(myelin basic protein)リン酸化するMAPキナーゼ様タンパク質キナーゼ活性が見出された。しかし変異タンパク質であるNCNDK1 P72HはNDPキナーゼ活性は野生型と変わらないが、自己リン酸化活性、およびタンパク質キナーゼ活性は完全に無くなっていた。以上の解析結果は自己リン酸化活性、タンパク質キナーゼ活性を経由する、新しい信号伝達系の発見を意味し、我々はNDPキナーゼカスケードと名付けた。

J2a-04

クラミドモナス配偶子の活性維持を制御する光の作用スペクトル 齋藤達昭, 山田みゆき¹, 山口史靖², 渡辺正勝², 松田吉弘¹(神戸大・自然科学研,¹神戸大・理・生物,²基生研・培養育成)

以前私達は、クラミドモナス(*C. reinhardtii*)野生株の配偶子形成は、窒素源飢餓と共に光照射を必要とする(光依存性; LD)ことを報告した。一方、光非依存性(LI)変異株は、暗所でも配偶子に分化する。今回は、LD株では、配偶子形成のみならず、配偶子の活性維持にも光が必要であることを報告する。

LD株配偶子の接合能は、暗所に移して6-8時間後にほぼ完全に失われ、光再照射によりすみやかに回復した。一方、LI変異株の配偶子は、暗所に移して10時間後も高い活性を維持した。LD株の接合能維持には0.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 程度の白色光照射で十分であった。基生研の大型スペクトログラフを用いて得た作用スペクトルは、350-370nm付近に高いピークを示し、LD株配偶子の活性維持には、UV-A光受容体が関与していることが示唆された。

J2a-05

ホウライシダ胞子の紫外・青色光による発芽誘導と抑制効果
菅井道三、飯沼知子、鈴木秀幸（富山大・理・生物）

シダ胞子の光発芽は、短時間の赤色光照射により誘導されるが、赤色光照射直後に紫外・青色光を照射すると、発芽は抑制され、さらにその直後に赤色光を照射しても発芽が誘導されない。このことから、シダ植物の胞子発芽には、フィトクロムのほか紫外・青色光吸収色素体が関与することが知られている。

今回、我々は、この発芽抑制に有効である青色域光、紫外域光が発芽抑制に必要な強度より比較的弱い強度で胞子発芽を誘導すること、また、胞子発芽には、この発芽誘導効果と、紫外・青色光受容体による発芽抑制効果とが相互に作用していることを見いだしたので報告する。

基礎生物学研究所大型スペクトログラフより得られた270nm、380nm、440nmの単色光を照射した結果、いずれの波長においても、比較的弱い強度で発芽の誘導が認められ、ある強度以上では発芽率が低下した。これは、*Arabidopsis*種子発芽で認められたphyAによるVLFRと類似の反応がホウライシダでも存在し、それと従来から知られていた紫外・青色光による発芽抑制反応とが相互に関係して光発芽を制御しているのではないかと推測される。

J2a-06

全寄生植物ネナシカズラにおける寄生根誘導の多段階光制御機構
古橋勝久、西本淳、多田欣史、若杉達也¹、山田恭司¹、渡辺正勝²（新編大・理・生物、¹富山大・理・生物、²基生研）

ネナシカズラの寄生根は、近赤外光と接触刺激で誘導されることを、我々は白色蛍光灯下で育てた幼植物を用いた研究で明らかにしてきた。しかし、この寄生根誘導に対する近赤外光の効果は、暗所で育てた植物には見られないことから、他に別の種類の光が必要なことが示唆されていた。今回は、その別の種類の光についての研究結果を報告する。

7日間暗所で育てたネナシカズラの幼植物に、蛍光灯からの白色光 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) を3時間照射し、それに近赤外光 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) を照射して接触刺激を与えても、寄生根は誘導されない。しかし、この白色光を6時間以上(8時間ぐらいで飽和)照射した後に15分間の近赤外光を照射すれば、寄生根が誘導されてくる。白色光の代わりに青色光や赤色光を用いた場合は、青色光 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) では白色光とほぼ同じ効果が得られるのに対し、赤色光 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) は極めて弱い効果しか示さなかった。一方、白色光や青色光が照射された幼植物を暗所に置くと、光の効果はしだいに失われ、12-15時間後には近赤外光による寄生根誘導ができなくなる。しかし、再び白色光が青色光を3時間ぐらい照射すれば、近赤外光の誘導効果は回復する。以上のことから、寄生根誘導にはかなり長時間の青色光と比較的短時間の近赤外光が与えられることが必要ことが明らかとなった。また、光が与えられる順序は、青色光が先で近赤外光が後でなければならないことも確かめられた。このことは、寄生根誘導が異なる光受容体の段階的制御の下で行なわれているを示唆している。

J2a-07

赤タマネギにおける光によるアントシアン系色素の発現
大矢武志、北宜裕、藤代岳雄、本澤安治¹、笹隈哲夫²、真子正史、矢次駿一
(¹神奈川農総研・²トキタ種苗・³横浜市大木原生研)

赤タマネギのアントシアン系色素の発現機構を解明するため、鱗茎からほう芽した莖葉表皮の光による色素発現について検討した。赤タマネギ(湘南レッド)鱗茎部を暗所でほう芽させ、明所(6,500lx、20°C)へ移動すると莖葉表皮組織に色素が発現した。そこで、酢酸・メタノール1:1溶液でこの色素を抽出後、HPLCにより分析した。標準サンプルの溶出プロファイルとの比較から、抽出された色素にはcyanidin 3-malonylgulcoside(Cy3MG)、およびcyanidin 3-malonyllamariboside(Cy3ML)がそれぞれ35及び12%含まれる一方、鱗茎部の色素の構成成分であるcyanidin 3-gulcoside(Cy3G)、cyanidin 3-lamariboside(Cy3L)はほとんど含まれていないことが明らかになった。また、アントシアン系合成のキーエンザイムであるchalcone synthase(CHS)遺伝子の部分cDNA断片を鱗茎部よりRT-PCR法によりクローン化したので、光による色素発現とCHS遺伝子発現との分子レベルでの相互関係について報告する。

J2a-08

UVB感受性イネのDNA損傷(CPD)の光修復能力について
日出間純、John. C. Sutherland¹、Betsy M. Sutherland¹、熊谷忠
(¹東北大・遺生研、²Brookhaven Natl. Lab. USA)

UVB感受性イネ品種(*Oryza sativa* L.)農林1号は、UVB誘導Cyclobutyl pyrimidine dimer (CPD)を修復する光修復能力が、UV抵抗性イネ品種ササニシキと比べ低下している。この要因として、①光修復酵素の構造変異に由来すると考えられる、基質(CPD)-酵素複合体の安定性または光感受性の違い、②生体内での本酵素の発現系の変異による発現量の違い等が考えられる。そこで、①の可能性について検討した。イネ第3葉に、UVB光照射により50CPD/Mbを生成させた後、暗所に種々の時間(秒分オーダー)放置した。暗処理後直ちに、可視光パルス照射して修復されたCPD量を測定することで、基質-酵素複合体を形成し、CPDが修復されるまでの時間を比較した。その結果、ササニシキでは暗処理後1分で、可視光パルスで修復されるCPD量は飽和に達したのに対して、農林1号では同量のCPDを修復するのに15分以上の暗処理を必要とした。またさらに、基質-酵素複合体の温度(0, 28, 45, 60°C)に対する安定性について、一定量CPDを有するλDNAを基質としてin vitroで検討した。その結果、農林1号では45°C以上で活性が低下するのに対し、ササニシキでは、45°Cでは安定であり、60°Cで活性の低下が認められた。以上の結果から、農林1号の光修復酵素は構造上に変異があることにより、その能力が低下している可能性が示唆された。

J2a-09

生育時の光環境がUV誘導CPD生成とその修復に及ぼす影響
姜惠淑、日出間純、熊谷忠（東北大・遺生研）

紫外線 UVB は植物の光合成活性、バイオマスを減少させ、生育傷害を引き起こす。この UVB 効果は同時に照射される可視光強度の増加によって軽減される。本講演では、UVB によって引き起こされる Cyclobutyl pyrimidine dimer (CPD) の動態に着目し、生育時の光環境がイネの① UV 誘導 CPD 生成の感受性、② 光修復能力、③ endogenous CPD level (生育時の光環境下で蓄積された CPD 量) に及ぼす影響について報告する。栽培条件としては、ファイトトン内で 50 と 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の可視光に 1 W/m^2 の UVB 光を付加した区としない区、及び、野外で太陽光に UVB を付加した区としない区を各々設けた。材料として、第3葉を用いた。UV 誘導 CPD 生成の感受性は栽培時の光条件に依存し、可視光を高くすると低下し、可視光に UVB を付加することによってより低下した。また、種々の光条件で生育したイネ葉の UV 吸収物質量と UV 誘導 CPD 生成の感受性との間には、負の相関関係が認められた。一方、光修復能力は生育時の可視光強度の増加に伴い増加したものの、UVB の付加によっては影響を受けなかった。ファイトトン内で生育したイネの endogenous CPD level は、生育時の可視光強度に関係なく UVB 付加により、数倍高くなったが、野外では太陽光に UVB を付加しても影響を受けなかった。以上の結果を基に生育時の光環境が CPD の動態に及ぼす影響について議論する。

J2a-10

ホウキモロコシにおけるシクロブタン型および6-4型ピリミジンダイマー光回復酵素の光制御と波長依存性
姜惠淑, Gunther Buchholz¹, Jom Goss¹, Eckard Wellmann¹ (神戸大・理・生物, ¹BiologieII, Freiburg Univ.)

UV-BはDNAに損傷を引き起こすが、その主要なものはシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)と6-4光産物(6-4PP)である。我々は、ホウキモロコシ(*Sorghum bicolor*)芽生えを用いて、CPDおよび6-4PPの光回復を *in vivo* および *in vitro* で調べた。CPDおよび6-4PPは、各々に特異的な単クローン抗体を用いたELISA法で測定した。

ホウキモロコシ芽生えには、CPDおよび6-4PPに対する別々の光回復酵素が存在していた。CPD光回復酵素の合成はUV-A照射により誘導された。一方、6-4PP光回復酵素の合成は、光に影響されなかった。

各々の光回復酵素の波長依存性を調べるために、ホウキモロコシ部分精製酵素を用いて、340 nmから480 nmの単色光照射を行った。CPD光回復酵素の作用スペクトルは、380 nm から420 nmにピークを持ち、400 nmにおいて最大活性を示した。これは、シロイヌナズナですでに報告されている作用スペクトル(Pang & Hays 1991)と似ていた。6-4PP回復酵素の作用スペクトルはより広いピークを示し、最大活性を示す波長は、長波長側にシフトしていた。

J2a-11

紫外線 UVB がイネの葉内 Rubisco、LHC II の経時変化に及ぼす影響

山口琢也、日出間純、熊谷忠（東北大、遺生研）

これまでに我々は、紫外線 UVB がイネの生育、葉内の全窒素量、可溶性タンパク質量、Rubisco、Chl 含量等に及ぼす影響について、紫外線抵抗性の異なるイネ二品種（抵抗性品種ササニシキ、感受性品種農林1号）を材料に解析を行った (Hidema et al. 1996. Plant Cell Physiol.)。その結果、付加した UVB 量の増加により、全窒素量、可溶性タンパク質量が減少した。また、可溶性タンパク質のうち特に Rubisco 含量が UVB 感受性品種において著しく減少した。一方、Chl 含量は、Rubisco ほど影響を受けないことを見出した。Chl は葉緑体内において、タンパク質と結合し種々のクロロフィルタンパク質として存在している。従って、これらの結果、同じ葉緑体内に局在している Rubisco とクロロフィルタンパク質で、UVB による効果が異なっている可能性が考えられた。そこで、本講演では Rubisco と、Chl の約 50% が結合している Light harvesting chlorophyll a/b binding protein II (LHC II) に着目して、UVB が Rubisco と LHC II のタンパク質の合成と分解に及ぼす影響について、¹⁵N トレーサーを用いた解析の結果を報告する。

J2a-12

UV-B 光に特異的なシグナル伝達系は存在するのか

竹田淳子(京大大学院農) 小関良宏(東京農工大応用生命)

アントシアンやフラボノイド蓄積に関与する作用スペクトルの解析から UV-B 光受容体を介した UV 防御機構の存在が示唆されてきた。我々はニンジン培養細胞のアントシアン合成系をモデルとして合成系の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子の1つ *gDcPAL1* (稀釈効果で誘導される)のプロモータの解析から、転写開始点から-304~-291に存在する Box L 類似配列(L₆)が UV-B 応答エレメントとして機能すること、このエレメントは糸状菌エリシターに対する応答ではエンハンサーとして機能していることを既に報告してきた¹⁾。本報告では各種シグナル伝達系の阻害剤を用いてプロモター活性を測定することにより、同じエレメントに作用する UV-B 及びエリシターさらには類似のエレメントに作用する機械的刺激等のシグナルがどのような伝達経路を経て *gDcPAL1* プロモータを活性化するのかを調べ、受容体が未だ同定されていない UV-B シグナルに関する手がかりを得ることを目的とした。

1) Takeda et al. Photochem. Photobiol. 66,464-470(1997)

2) Takeda and Ozeki in Press..

Sa I (1)

マングローブ培養細胞の高塩濃度下でのイオン・浸透圧調節

三村徹郎 (一橋大・生物)

沿岸性木本植物マングローブの一種、*Bruguiera sexangula* からカルスと懸濁培養系を確立し、マングローブ植物の細胞が、高塩濃度下でどのように振舞うかをイオンおよび浸透圧について検討した。

カルスについては、耐塩性の低いものと高いものの二系統を作製し、両者の耐塩性機構の差の一つが細胞内の K^+ 維持機構にあることを明らかにした。

カルスから作出した懸濁培養系の細胞は、 $NaCl$ を含まない培地で維持した後、 $200mM$ $NaCl$ 存在下に移動してもゆっくりと増殖を続けることができる。懸濁培養系の細胞を高塩条件で処理すると、一過的に細胞内の Na^+ と Cl^- 濃度が上昇する。その後吸収した $NaCl$ の大半を細胞外に排出してから、細胞増殖が始まり、再度細胞内への $NaCl$ の吸収が始まる。最初の Na^+ 排出には Na^+/H^+ 交換系が働いているらしい。また、高塩条件下で、細胞内浸透圧が上昇するが、この上昇にはアミノ酸と糖が寄与していた。

Sa I (2)

酵母細胞内 Ca^{2+} 動態を支える Ca^{2+} 透過性陽イオンチャネル *Mid1* の構造と機能

飯田秀利、佐藤主税¹、神崎 展²、小島 至²

(東京学芸大・教育、¹電総研・超分子、²群馬大・生体調節研)

出芽酵母の接合は性フェロモンである α 因子によって制御される。 α 因子が標的細胞に作用すると、30分後に Ca^{2+} の取り込みが誘導される。*mid1* 変異株は、この取り込みに欠損をもつために、 α 因子作用後に死ぬという表現型をもつ株として単離された。*MID1* 遺伝子産物 (*Mid1*) は4つの疎水性領域をもち、形質膜に存在する糖タンパク質である。全アミノ酸配列に関して、*Mid1* は既知のイオンチャネルと相同性はない。しかし、*Mid1* の膜貫通領域と予想される領域2つは既知のイオンチャネルとの部分的相同性がある。*Mid1* をチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) に発現させ、その電気生理学的性質についてパッチクランプ法で調べた結果、*Mid1* は陽イオン透過性イオンチャネルとして機能することが明らかとなった。したがって、*Mid1* は接合時に必要とされる Ca^{2+} の流入に必須の機能をもつ陽イオンチャネルと考えられる。

Sa I (3)

単細胞植物カサノリの液胞膜輸送系と細胞機能
池田己喜子 (岡山県大・保福部・栄養)

カサノリは巨大な単細胞の海水中で生育する緑藻類に属する。我々はすでに、高等植物液胞膜と同様に、この生物体の液胞膜には二つのプロトンポンプ、 V -ATPase 及び H^+ 輸送性ピロフォスファターゼ (H^+ -PPase) が存在することを実証した。更に cDNA クローニングを進め、 V -ATPase の A, B サブユニットの各々2種類の isoform 並びに proteolipid サブユニットの6種の isoform をコードする全長の cDNA クローンを $5'$ 及び $3'$ -RACE 法により得た。相違点は、codon usage, $5'$ 及び $3'$ 非翻訳領域にみられたが、翻訳されるアミノ酸配列はそれぞれ90%以上一致し、高等植物 V -ATPase のそれぞれのサブユニットに対しても75%以上の相同性を示した。6種の proteolipid サブユニットの mRNA の発現量には違いがみられ、三つのグループに分類された。また、ほぼ全長の H^+ -PPase をコードする cDNA クローン (3,104 bp, 分子量 74,406/721 アミノ酸) を得、ノーザン解析により約 3.2 kb の RNA 種を検出した。翻訳されるアミノ酸配列は高等植物 H^+ -PPase に対するの相同性は低く、*R. rubrum* の H^+ -PPase により高い相同性を示した。

Sa I s(i)

オオセキショウモ葉肉細胞の
光応答性細胞膜プロトンポンプ
原田明子 (大阪大・院・理・生物科学)

淡水産単子葉植物オオセキショウモの葉肉細胞で光刺激により原形質流動が誘発される際には、細胞質内カルシウム量が減少すること、光合成色素とフィトクロムの協働作用により Ca^{2+} が細胞膜を介して細胞外へ放出されることが明らかになっている。また、薬理的解析から、流動誘発時には細胞膜 H^+ ポンプの活性が促進され、その結果形成された H^+ 駆動力を利用して Ca^{2+} が放出されることを示唆する結果を得ている。さらに、ガラス微小電極法で膜電位の過分極反応を解析すると、赤色光、青色光、青色光と近赤外光同時照射のいずれもが有効だった。このことは、細胞膜 H^+ ポンプの活性は主に光合成に依存して促進されることを示す。葉から二層分配法で調製した細胞膜小胞に Brij 58 を加えて反転膜小胞とし、キナクリンの蛍光消光により H^+ 輸送活性を測定した。トリプシン処理により、自己阻害領域を介した活性制御機構を持つ細胞膜 H^+ ポンプが存在することが示唆された。光による細胞膜 H^+ ポンプの活性促進に、この制御が関与しているかを調べるため、暗順応させた葉、赤色光を照射した葉からそれぞれ細胞膜小胞を調製し、 H^+ 輸送活性の V_{max} 、ATP に対する K_m を決定した。

Sa I s(ii)

植物液胞膜Ca²⁺/H⁺ 対向輸送体の構造と酵素機能の解析

上岡華代、中西洋一、田中喜之¹、前島正義 (名大院・生命農・生化、¹農水省・生物資源研)

植物液胞はCa²⁺を数mMの濃度で蓄積し、細胞質Ca²⁺濃度の調節に重要な役割を果たす。Ca²⁺/H⁺対向輸送体は液胞膜において、Ca²⁺-ATPaseと共にCa²⁺の輸送を担う考えられている。

ヤエナリ実生より単離した液胞膜小胞において、対向輸送活性はCa²⁺高濃度でCa²⁺-ATPase活性より高く、細胞質膜とERのCa²⁺取り込み活性と比較しても抜きん出ている。cDNA解析により、ヤエナリの対向輸送体は非常に疎水性が高い分子であり、11個の膜貫通ドメインを持つことが推定された。アミノ酸配列の中央部には酸性アミノ酸に富む領域が存在し、イオン識別・輸送機能への関与が予測される。推定一次構造は、*A. thaliana*のCa²⁺/H⁺対向輸送体CAX1、CAX2に高いホモロジーを示し、ヤエナリのCa²⁺/H⁺対向輸送体は酵母、藍藻、枯草菌等の対向輸送体と同種の分子種に属することが示唆された。

Sa I s(iii)

液胞における細胞質タンパク質分解 野田健司 (基生研、エネルギー変換)

細胞内タンパク質は適宜分解されることで、その活性をdown regulateしたり、あるいは新たに合成されるタンパク質のsourceとなることができる。液胞は細胞内タンパク質分解を中心的に担うオルガネラであり、細胞内タンパク質を液胞へと輸送する過程はオートファジー(自食作用)と呼ばれる。我々の研究室は酵母をモデル系として用い、オートファジーの分子機構にアプローチしてきた。これまでに、オートファジーを誘導する栄養飢餓ストレスシグナルはPIキナーゼホモログであるTorを介している事が明らかになった。さらにオートファジーを担う膜構造オートファゴソームの形成に必須な分子群の解析が進んでいる。

Sa I (4)

遺伝子工学的手法を用いたグリシンベタイン蓄積による植物の耐塩性機構に関する研究
高倍鉄子、林 泰行¹、高倍 昭洋²、田中 章¹
(¹名古屋大学・生物分子応答研究センター、²植物工学研究所、²名城大学・総合研究所)

耐塩性の高い植物の多くが、外部との浸透圧のバランスをとるために、サイトソールにグリシンベタインを蓄積する。グリシンベタインを合成するためには、コリン酸化酵素とベタインアルデヒド脱水素酵素(BADH)が必要である。現在までにBADHのcDNAは性質が良く調べられているが、コリン酸化酵素のcDNAは詳細な解析がなされていない。

そこで演者らは大腸菌のグリシンベタイン合成酵素の遺伝子(*bet* genes)とオオムギから得たBADHcDNAを用いて遺伝子工学的手法を用いて、耐塩性機構に関する研究を進めている。これまでの成果について報告する。

(1) *bet*遺伝子を淡水性らん藻に導入し、細胞内に最大80mMまで蓄積させることが出来、得られた形質転換体は0.4Mの塩濃度でも生育可能であった。この条件では野生株は生育出来ない。塩ストレス下ではPSIIよりもRubiscoの方が失活が早かった。グリシンベタインの蓄積で、Rubiscoの活性の低下が抑制された。

(2) オオムギのベルオキシゾーム型BADHをイネで大量発現させた。この形質転換イネはベタインアルデヒドを与えると、これをグリシンベタインに変換・蓄積し、イネの耐塩性が強化されることが判明した。

(3) 高等植物で発現するように改変した大腸菌の*betA*遺伝子をイネに導入したところ、イネはグリシンベタインをオオムギ並に合成・蓄積し、耐塩性が強化された。

以上の結果に基づき植物の耐塩性のメカニズムについて論ずる。

Sa II (1)

低温に対する植物の応答と適応
—低温による植物リン脂質の生合成制御機構—
西田生郎 (東京大・院理・生科)

植物の低温馴化は、細胞の膜構造の大改変を伴うことはよく知られている。しかし、その分子機構についてはよくわかっていない。我々は、膜の主要構成成分であるリン脂質ホスファチジルコリン(PC)に注目し、その生合成が低温により活性化される機構について研究を進めている。すでに、低温処理したライ麦の根でPCの生合成律速酵素であるCTP:phosphorylcholine cytidylyltransferase (CCT)の比活性が上昇するという報告があるが、その後の詳しい活性化機構については報告がない。本発表では、短時間の低温処理で低温馴化を起こすシロイヌナズナを実験系としてもちい、低温処理にともなうCCT活性の変動について研究した成果を報告する。

Sa II (2)

生体膜の傷害発生機構から植物の凍結適応機構を編る
藤川清三 (北大・低温研)

自然界で起こる平衡凍結は細胞外凍結をもたらす、これにより植物細胞には原形質膜と他の膜 (あるいは原形質膜同士) が異常接近した部位ができる場合がある。異常接近部位の形成は原形質膜の膜構成蛋白質と脂質の相分離発生とともに非2重層脂質構造の形成を引き起こし、細胞レベルでの (凍結) 傷害を導く。この凍結傷害の原因と考えられる膜の異常接近は、凍結脱水による細胞の収縮および細胞外氷晶成長による機械的ストレスがもたらす細胞の変形により起こる。

平衡凍結傷害の主因を、凍結脱水および細胞外氷晶成長による膜の異常接近と考えることにより、低温順化の結果起こる原形質膜脂質の組成変化の役割、糖などの細胞内溶質の蓄積の役割、さらに低温順化後の細胞に凍結ストレスがかかることにより新たに起こるERの構造変化の役割、アポプラストにおける不凍蛋白質蓄積の役割、細胞壁の構造特性変化の役割などが理解しやすくなる。

さらに、植物は自然界での凍結において、平衡凍結後さらに長期間凍結環境に保持されるのが普通である。比較的高温の凍結下で細胞は、未固化の細胞内外の濃縮溶液に長時間さらされることになり、これにより新たな傷害が保持期間に依存して発生する場合がある。凍結傷害発生機構に平衡凍結傷害に加え、凍結下での長期間保持の影響を要因として加えることにより低温順化の役割がより明瞭に理解できるようになると考える。

Sa II s(i)

冬小麦培養細胞のアブシジン酸誘導性分泌タンパク質

桑原 慎子、荒川 圭太、竹澤 大輔、吉田 静夫
(北大・低温研)

アブシジン酸 (ABA) は、乾燥及び低温耐性などのストレス応答と関与する植物ホルモンである。培養細胞にABAを与える乾燥や低温に対する耐性が高まり、それに伴い発現する遺伝子の発現が活性化されることが明らかになってきている。これまでの研究で、冬小麦培養細胞 (*Triticum aestivum* L. cv Chihokukomugi) はABA処理によって、培地中に特徴的な塩基性分泌タンパク質 (wheat ABA-induced secretory proteins ; WAS proteins) を蓄積することが明らかとなった。WAS-1~12 についてN末端アミノ酸配列の解析を行ったところ、WAS-2は小麦を薬剤 (BTH) で処理したときに誘導される WCI-5 遺伝子の翻訳産物と、WAS-3は病原菌の感染や傷害により誘導される PR-5 (Thaumatococcus-like protein) グループと相同性が認められた。今回、WAS-2 について cDNA のクローニングを行ったので報告する。

Sa II s(ii)

好冷菌の低温誘導性遺伝子の発現調節

佐原 健彦、阿部 貴和子、今井 慎、内藤 聡、高田 泰弘、福永 典之 (北大院・理・生物科学)

近年、様々な生物の温度環境への適応についての報告がなされるようになり、幾つかの細菌は極端な温度環境にも分布していることから、これらの研究を進める上でしばしば用いられてきた。現在、細菌の低温適応に関する研究は、常温菌である大腸菌におけるコールドショック蛋白質遺伝子の発現調節についての研究が先駆的であるが、低温細菌の適応機構に関する報告例はほとんどなく、このような細菌が、常に低温下に曝され、さらに0℃付近の環境で生育できる分子機構は未解明のままである。

我々は、北海道・オホーツク海沿岸から好冷菌を単離し、二種類の熱安定性の異なるイソクエン酸脱水素酵素アイソザイムが本菌に存在することを見いだした。そして、それぞれの精製酵素の生理学的研究を行った結果、両アイソザイムの一つが、15℃以下のような低温下で触媒活性が高く、かつ低温誘導性を示すことが明らかになった。さらに、このアイソザイム遺伝子の分子遺伝学的研究により、本アイソザイムの低温誘導性は、この酵素遺伝子上流域に存在する二種類の異なるシス因子によって、転写制御されていることがわかった。

Sa II (3)

植物の低温順化：原形質膜脂質組成と凍結下での膜安定性の関係

上村松生 (Dept. of Soil, Crop & Atmospheric Sciences, Cornell Univ.)

凍結脱水による膜安定性の損失が植物の凍結傷害を引き起こす主要原因であることは定説になっている。凍結脱水により細胞の全ての膜系が不安定化される可能性があるが、その中でも原形質膜は凍結融解過程で細胞の生死が決定される際に中心的役割を果たすため、その機能構造を維持することは最も重要である。低温順化過程で起こる原形質膜脂質組成変化が凍結脱水過程での膜挙動変化をもたらす、その結果、凍結下での膜安定性が増大する。現在までに、我々の研究室では、

(1) 種々の植物 (ライムギ、コムギ、オートムギ、シロイヌナズナ) の低温順化過程で膜傷害機構の出現頻度の減少に深く関連した原形質膜脂質組成変化が起こること、及び、(2) 冬ライムギと春オートムギの遺伝的耐凍性の差異は原形質膜脂質組成の大きな違いと関連していること、を明らかにした。以上のように、原形質膜脂質組成と耐凍性の深い関連は疑うところではないが、低温順化が異なった多くの反応の集合として起こる複雑な現象であることからわかるように、耐凍性は原形質膜脂質組成だけで決定されるものではない。本発表では、耐凍性に関わる他の要因 (例えば、糖の蓄積、低温制御性遺伝子の発現) の膜傷害機構出現頻度に関する影響についても言及する。

Supported by a USDA/NRICGP and a US DOE grant.

Sa II (4)

植物における不凍タンパク質および不凍活性を示す関連物質の検索

星野保、大平万里、¹吉田みどり、¹阿部二郎、津田栄、扇谷悟、石崎紘三（通産省・工技院・北工研、¹農水省・北農試）

越冬性植物では、フルクタンやプロリンなどの糖、アミノ酸の細胞内における蓄積が、耐凍性獲得の大きな要因の一つとしてこれまで考えられてきた。一方、寒冷地に生息する変温動物（魚類、昆虫）においては不凍タンパク質（Antifreeze protein, AFP）と呼ばれる、体液の凍結を直接阻害する物質の存在が古くから知られており、それらはアミノ酸組成およびその構造から5種に分類されている。

近年、植物においてもAFPの活性を示すタンパク質の存在が報告されているが、そのAFP様タンパク質は、既知のAFPに比べて分子量が巨大である事やPRタンパク質（Pathogenesis-Related protein）と相同性がある事から、新たなタイプと考えられている。また、フェノール化合物にも不凍活性が見いだされ、低温処理によりアポプラストにおけるフェノール化合物濃度が増大することから、その生理的な作用の解明も今後の課題である。

Sa I

植物の低温ストレスに対する応答と生体膜

吉田静夫（北大低温科学研究所）

低温や凍結ストレスに耐える能力は北方に生育する植物の分布や生産にとって重要な性質である。北方地域では初期生育期間でも異常な低温に見舞われるし冬には限界を超えた過酷な凍結温度にさらされ、暖地由来の作物などは大きな被害を受ける。あらゆる意味で、生体膜はその複雑かつ繊細な構造ゆえに低温ストレスに対して最も鋭敏に反応するものと考えられている。この意味で、私は植物の寒冷適応機構について細胞膜及び液胞膜の果たす役割に注目して研究してきた。これまで多くの大学院生と研究スタッフとともに行ってきた研究をふりかえってみたい。

Sa III (1)

フラスモにおける膜活動電位の発生と細胞質 Ca^{2+} の作用

菊山 宗弘（放送大学・生物）

車軸藻類の活動電位は第一義的には Cl^- チャンネルの活性化として説明される。活動電位の最初の段階で Ca^{2+} 流入の増加が起こり、この Ca^{2+} が膜に存在する Cl^- チャンネルを活性化させる。実際、シャジクモでは Ca^{2+} の無い液中では興奮性を失う。一方フラスモでは、 Ca^{2+} が無くても他の二価イオンがあれば活動電位を発生できる。

微小電極による活動電位と、エクオリンによる細胞質 Ca^{2+} の増加とを同時測定した。これにより、 Ca^{2+} の挙動をシャジクモとフラスモとで比較しつつ、 Ca^{2+} の活動電位における役割を考察する。

Sa III (2)

プロトプラストの体積変化からとらえた光と植物ホルモンによる高等植物の浸透圧調節
飯野盛利（大阪市大・理・植物園）

高等植物のプロトプラストを用いた私たちの最近の研究成果に基づいて、光(青色光)と植物ホルモン(I A A、A B A)の生理作用には細胞の浸透圧・膨圧調節が一般的な反応として介在している可能性を論じる。

根以外の植物組織の成長中の細胞から得られるプロトプラストは青色光に反応して縮む。幼葉鞘(トウモロコシ、イネ)、胚軸(シロイヌナズナ)、節間(エンドウ)、葉身(トウモロコシ、シロイヌナズナ、エンドウ)、表皮(エンドウ)、葉柄(インゲンマメ)で観測され、反応の経時変化も類似している。葉枕(インゲンマメ)は成長を停止しても同様のプロトプラスト反応を示す。トウモロコシ幼葉鞘とシロイヌナズナ胚軸を用いて詳細に解析した結果、観測されるプロトプラスト反応は、青色光依存の成長阻害に関与していることが明らかになった。また、インゲンマメ葉枕から得られたプロトプラストはI A A処理で膨らみ、A B A処理で縮む。これらの植物ホルモンは葉枕の膨圧運動を誘発する作用をもつ。以上の実験結果は、青色光、I A A、A B Aによって細胞の浸透圧が変化し、それによって膨圧が変化することを示している。更に、これらの因子は、膨圧変化を介して成長制御に働いている可能性を示している。

トウモロコシ幼葉鞘とシロイヌナズナ胚軸のプロトプラストを用いて青色光による体積減少の機構を探った。その結果、(1)HY4遺伝子産物(CRY1)が光受容体として働いている、(2)フィロクロムによって青色光に対する反応性が制御されている、(3)細胞膜の陰イオンチャンネルが活性化され、さらに陽イオンチャンネルが活性化されてイオンが流出し、プロトプラストが縮むという結論に達した。

Sa III (3)

栄養シグナル応答と種子形成の分子生物学
内藤 哲¹, 千葉由佳子¹, 木嶋文子¹, 杉山 裕¹,
南原英司¹, 平井優美², 金 皓衍², 粟津原元子²,
藤原 徹², 林 浩昭², 茅野充男²
(¹北大・農学部, ²東大・農学生命科学)

ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質の一つであるβ-コングリシニンのβサブユニット遺伝子の発現はイオウ欠乏条件下で栽培することにより増加し, *in vitro* の未熟子葉培養でメチオニンにより抑制される。βサブユニットは含硫アミノ酸が大変少なく, この蓄積変化はイオウ栄養の多寡に拘わらず窒素源としての種子貯蔵タンパク質の蓄積を確保するための応答反応であると考えられる。我々はこのβサブユニット遺伝子発現のイオウ栄養応答機構を主にトランスジェニック・シロイヌナズナを用いて解析している。本シンポジウムでは水耕栽培による硫酸および硝酸イオン濃度とβサブユニット遺伝子発現, 遊離メチオニンを過剰に蓄積する突然変異のバックグラウンドでのβサブユニット遺伝子発現等の解析の現状を報告し, 種子形成における栄養シグナル応答の研究を展望する。

Sa III s (i)

トウモロコシ根における窒素栄養に応答したサイトカイニンの蓄積
武井兼太郎 (名古屋大院・生命農学)

トウモロコシ葉から単離したバクテリア二成分情報伝達系のレスポンス・レギュレーターホモログ *ZmCip1* は窒素飢餓の植物葉で無機窒素により発現誘導される。一方, この植物の切り取り葉では無機窒素ではなく, サイトカイニンで誘導される。サイトカイニンが主に根で合成されることから, 窒素栄養に応答し根のサイトカイニン量が増加し, 葉での *ZmCip1* の発現誘導をもたらすと考えた。実際に, 硝酸塩の補填による窒素飢餓からの回復過程において, トウモロコシ根で複数のサイトカイニンが増加していた。これらの分子種の同定の結果から, サイトカイニン代謝系での窒素栄養に応答する部位を考察する。

Sa III s (ii)

細胞壁の力学的性質を制御するタンパク質
岡本 朱根 (昭和薬科大学 生物学研究室)

オーキシン誘導性伸長成長の初期過程では酸成長が重要な役割を果たしている。つまりオーキシン誘導性の細胞壁の酸性化により細胞壁の展性(ϕ)の増大と臨界降伏圧(y)の減少が起こり, 細胞壁が伸展すると考えられる。しかし細胞壁の酸性化による ϕ や y の変化の制御因子は不明である。

in vitro の実験系であるグリセリン処理ササゲ中空胚軸 (GHC) を用いた実験から, *in vitro* の細胞壁においても細胞壁の酸性化によって ϕ が増大し, y が減少することが報告された¹。またGHCを熱やタンパク質分解酵素で処理すると ϕ や y のpH依存性が消失することから, 細胞壁の力学的性質がタンパク質によって調節される可能性が示唆された²。この仮説を検証するため, 我々はササゲ細胞壁から ϕ や y のpH依存性を制御する因子を精製した。その結果, 分子量の異なる2つのタンパク質が ϕ や y のpH依存性を別々に制御することが明らかになった。

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

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

Sa III s (iii)

気孔孔辺細胞における青色光情報伝達
木下俊則, 島崎研一郎 (九州大・理・生物)

気孔は青色光照射により開孔するが, この時, 青色光は光情報として孔辺細胞原形質膜のプロトンポンプを活性化することが知られている。しかしながら, 青色光受容からプロトンポンプ活性化に至る細胞内情報伝達については不明の点が多い。これまでの研究により, 青色光に依存したソラマメ孔辺細胞プロトプラストからのプロトン放出は, Ca^{2+} /カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤である ML-7 やタイプ1/タイプ2 A プロテインホスファターゼの阻害剤であるカリクリン A やオカダ酸により阻害されることが明らかとなった。これらの結果は青色光情報伝達へのプロテインキナーゼ, プロテインホスファターゼや蛋白質リン酸化・脱リン酸化反応の関与を示唆するものである。現在, ソラマメ孔辺細胞プロトプラストにおいて青色光に依存してリン酸化レベルの変化する蛋白質の同定を進めており, これらについても議論する予定である。

Sa III (4)

植物の乾燥ストレス応答の分子機構

篠崎一雄、篠崎和子 (理研、植物分子生物、農水省・国際農研、生物資源)

植物は乾燥や塩などの浸透圧ストレスに細胞や分子レベルで応答し、耐性を獲得している。我々は乾燥などの浸透圧ストレスによる遺伝子発現のシグナル伝達と分子レベルでのメカニズムを解明するため、乾燥ストレスにより誘導される50種のシロイヌナズナの遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子の転写レベルでの発現について解析し、乾燥ストレスによる遺伝子の発現誘導に関してはABAを介する経路と、ABAを介さない経路の少なくとも4種の細胞内シグナル伝達系があることを明らかにした。さらに乾燥誘導に関与する新規のシスエレメントを複数同定した。これらのシス因子に結合する転写因子であるDERB, MYB, MYCをクローニングし、機能解析を行っている。

乾燥ストレスにより誘導される遺伝子にはシグナル伝達に関与する因子、例えばプロテインキナーゼ、ホスホリパーゼCなどが存在しており、これらは乾燥ストレス時の細胞内情報伝達に関与していると推定される。現在までの知見からイノシトール三リン酸やカルシウムがセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達に関与していると考えられる。乾燥ストレス時の浸透圧変化を感知するセンサーの分子レベルでの解析は重要な課題であり、現在、酵母の浸透圧センサーであるSlp1の相同性遺伝子をクローニングし、その解析をすすめている。

Shinozaki K. *Plant Physiol.* 115, 327-334 (1997)

Sa III (5)

膜局在性浸透圧センサーEnvZと情報変換の分子機構

水野 猛 (名大・生命農学)

一般的に細胞にみられる浸透圧応答は基本的な生命現象のひとつであり、外界の浸透圧や溶質の濃度変化から身を守るために重要である。事実、種々の細胞は外界の浸透圧変化に応答するための様々な機構を備えている。いずれにしても、これらの細胞は浸透圧を感知して細胞内に情報を伝達する”浸透圧センサー”なるものを備えているはずである。しかし、浸透圧センサーなるものの実体はほとんど解っていないし、浸透圧という物理的シグナルの感知機構や情報伝達機構が理解されている例もほとんどない。現在までのところ最もよく研究されている浸透圧センサーと呼べるものは、大腸菌のEnvZタンパク質であろう。EnvZは浸透圧に応答した外膜タンパク質の生合成制御に重要な役割を担っている。また、EnvZは最近よく研究されているHis-Aspリン酸転移情報伝達に関わるヒスチジンキナーゼの一種である。今回は、先に強調したような点を考えるために、EnvZが膜局在性の浸透圧センサーとして働く分子機構に関する最近の知見をまとめる。

発 表 者 名 簿

— A —

Abe, Hiroshi	F3a06
	F3a11
Abe, Kano	I1p03
Abe, Kayo	G2p04
Abe, Kazuyuki	D1p05
Abe, Mikiko	B3a04
Abe, Tomoko	E1p06
Abe, Yoshiko	I2a09
Adachi, Kyoko	B2a07
Adachi, Takahiro	F1p07
Adachi, Takashi	C1p16
Ae, Noriharu	G2p10
Agarie, Sakae	A2p11
	A2p12
Aichi, Makiko	H3a10
Aida, Mitsuhiro	C3a10
	C3a12
	D1a04
	D1a09
Aida, Ryutaro	E2a05
Aizawa, Kenji	G1a06
Akagawa, Takumi	B2p02
Akahoshi, Eiichi	H1p04
Akama, Kazuhito	F1p15
	F1p18
Akao, Shoichiro	D1p11
	E2a09
Akashi, Tomoyoshi	E2a08
Akihamo, Tomoya	F1p02
Akiyama, Kohki	G2a11
Akiyama, Machiko	B1a04
Akiyama, Takashi	E1p03
Akutsu, Satoshi	B1p10
Albersheim, Peter	G3a03
Allakhverdiev, Suleyman I.	B2a10
Amagasaki, Fumi	D2a09
Amako, Katsumi	A2a07
	G1p10
	G1p12
	J1a03
	J1a04
	J1a05
Amino, Shin-ichi	G2p05
Andoh, Tetsu	D2p12
Ang, Lay-Hong	D1p18
Aoki, Mie	H2a11
Aoki, Naohito	F1p07
Aoki, Noriaki	G1p13
Aoki, Seishiro	D1p08

Aoki, Toshio	E2a08
	E2a09
Aono, Chiyomi	I1p18
Aono, Mitsuko	F1p17
	G2p02
Aoyagi, Masaaki	I2a05
Aoyama, Junichi	D2a07
Aoyama, Takashi	B3a08
	SVI-04
Arai, Masao	A2p10
Arakawa, Keita	F1a05
	I1p05
Araki, Naohiro	C2p08
Araki, Takashi	C1p10
	C1p12
	C3a07
	D1p07
	F3a04
Araki, Tomoyuki	E1a03
	E1a04
Arata, Hiroyuki	A2p07
Arata, Yoji	I1p08
Arata, Yuto	A2a10
Arimura, Gen-ichiro	B2p11
Aritome, Yoko	E1p07
Aro, Eva-Mari	B2a06
Asada, Kozi	A2a08
	A2p02
Asada, Mihoko	B3a14
	SI-03
Asahi, Tadashi	H1a05
Asai, Kazumi	G1p02
Asai, Takuya	H1p15
Asami, Tadao	D2p12
Asamizu, Erika	G2a10
	G2a12
Asanuma, Miwako	H1a09
Asao, Hiroshi	SI-04
Asayama, Munchiko	H1p02
	H1p03
Astashkin, Andrei V.	A1p06
Awai, Koichiro	B1p07
	E2p02
Awazuhara, Motoko	H3a02
	SVI-02
Ayabe, Shin-ichi	E2a08
	E2a09
Azuma, Jun-ichi	F2a03
	G2p12
Azumi, Yoshitaka	J1p11

— B —

Baba, Kei'ichi	E1p07
Baba, Misuzu	G1p05
Babiychuk, Elena	A2p02
Badger, Murray	H3a07
Ban, Hiroshi	H2a05
Banno, Hiroharu	H1p10
Bartlem, Derek	SI-05
Bauer, Carl E.	B1p08
Bechthold, Andreas	E2a01
Belles-Boix, Enric	A2p02
Bohnert, Hans J.	F3a03
Buchholz, Gunther	J2a10
Bughio, Naimatullah	J1a09
Burnap, Robert L.	A1p14

— C —

Caboche, Michel	B2p09
	B2p10
	D2a10
Carninci, Piero	G2a03
Chang, Lei	I1p12
Charpentreau, Martine	C1p02
Chatani, Hiroshi	C3a01
Che, Hyoni	G3a07
Chen, Lei	E1p04
Chiba, Takako	E2a10
Chiba, Yukako	F1a06
	SI-05
Chilton, Scott	D2p01
Chino, Mitsuo	G1p13
	H1p04
	H3a02
	H3a11
	SVI-02
Chonan, Nobuo	SI-01
Chua, Nam-Hai	D1p02
Cogdell, R.J.	B1a07
Cox, Raymond P.	B1p12
	B1p13
Crawford, Nigel, M.	H3a06

— D —

Daldal, Fevzi	B1p11
Darvill, Alan	G3a03
Davies, Eric	C1a03
Davies, John P.	H3a11
De Bellis, Luigi	F2a10
	F2a11

Deji, Atsushi	H1a01
Demura, Taku	C1p04
	D1a02
	SI-05
Deng, Xing-Wang	D1p18
Desloire, Sophie	D2a10
Dietz, Karl J.	A2a02
Doi, Michio	A3a09
Doke, Noriyuki	D2a06
	F2p08
	F2p09
	F2p10
Domae, Yoshinori	B2a05
Dong, Long-Ying	F2a07

— E —

Ebina, Masumi	A1p01
Ebinuma, Hiroyasu	C1p08
	F1p01
Edashige, Yusuke	G2p08
	G2p09
Emi, Takashi	B1p14
Emura, Junji	A2p05
Enami, Isao	A1a04
	A1p07
	A1p15
Endo, Saori	F1p01
Endo, Satoshi	SI-05
Endo, Takashi	C2a01
Endo, Tsuyoshi	A2a08
	A2a10
Endoh, Ai	I2a01
Enokiya, Atsushi	B2p12
Esaka, Muneharu	H2a02
Eun, Chang-Ho	C1p03
Ezura, Hiroshi	D2p11

— F —

Fan, Chen	B3a02
Francisco, Perigio B., Jr.	F2a01
	F2a01
Frigaard, Niels-Ulrik	B1p12
	B1p13
Fujihira, Ken-ichiro	D2p04
Fujii, Hirofumi	G2p04
Fujii, Nobuharu	E3a04
	E3a05
Fujii, Yasuyo	F2a03
Fujikawa, Seizo	B1p01
	I1p05

Fujikawa, Shinobu	E2a07	Furutani, Ikuyo	D1a08	Hara, Kojiro	I1a04	Hayashi, Hidenori	I1p18
Fujiki, Yuki	J1p12	Furuya, Masaki	J1p04	Hara, Satomi	B1p15	Hayashi, Hiroaki	G1p13
Fujimoto, Nao	J1a04		J1p15	Hara, Tetsuo	H3a12		H1p04
	J1a05		J1p16	Hara, Yuriko	B3a06		H3a02
Fujisawa, Hisao	C3a10		J1p17	Hara-Nishimura, Ikuko			H3a11
Fujisawa, Yukiko	H1a05	Fusada, Naoki	A3a06		C2p02		SVI-02
Fujishiro, Takeo	J2a07		A3a07		F2p09	Hayashi, Hiroshi	C2p03
Fujita, Masashi	H2a12	Fuse, Takuichi	G2a01		I1a10		F2a10
Fujita, Minoru	E3a09	Futamura, Norihiro	D1p06	Harada, Keita	E1p09		F2a11
Fujita, Naoko	F2a01		I1p17	Harada, Kyuya	F2a01	Hayashi, Makoto	C2p01
	F2a02	Futsuhara, Yuzo	B3a11		F2a02		C2p03
Fujita, Yuichi	A3a01		D2p02	Harano, Yoshimi	H3a09		F2a10
Fujiwara, Takayuki	B2a03			Haranoh, Kiwamu	B1p16		F2a11
Fujiwara, Toru	G1p13				B1p17		F2p10
	H1p04			Haruki, Hiroshi	H3a14		H2a01
	H3a02			Hase, Akira	J1a01		H2a02
	H3a11			Hase, Toshiharu	A2a05	Hayashi, Takahisa	E1a07
	SVI-02				A3a01		E1a08
Fukaki, Hidehiro	C3a11	Giddings, Thomas H., Jr.	G3a09		B2p08	Hayashi, Tomoya	D3a07
	D2p03		G3a10		SIII-03	Hayashi, Toru,B3a09	I1a01
		Giuntini, Pietro	F2a11	Hasebe, Masako	E1p18	Hayashi, Yasuyuki	F3a01
Fukasawa-Akada, Tomoko	I2a06	Gladish, Daniel K.	D3a01	Hasegawa, Hiroshi	G1p09	Hayashida, Nobuak	E2a07
		Gohda, Kazuhito	J1p03	Hasegawa, Koji	D2p01	Hayashizaki, Yoshihide	
Fukazawa, Jutaro	D1a07	Gohta, Satoshi	H3a07		D3a11		G2a03
Fukuchi-Mizutani, Masako	F2a12		H3a08		D3a12		F2p02
	F2a12	Gombos, Zoltan	B2a06		F2p01	He, Dao-Yao	F2p06
Fukuda, Hideo	E2p08	Goshima, Naoki	B2p09		F2p02	Henmi, Kenji	H1p07
Fukuda, Hiroo	A3a10		B2p11	Hasegawa, Kouji	F2p02		H1p07
	C1p04	Goss, Jorn	J2a10	Hasezawa, Seiichiro	G3a11	Hibino, Takashi	C1a02
	C3a05	Goto, Ken	E1p15	Hashiba, Teruyoshi	C2a01		E1p07
	D1a02	Goto, Nobuharu	D2p07	Hashimoto, Junji	C2a10		G2a02
	D1a05	Goto, Satoshi	B2p02		C2a11	Hidema, Jun	J2a08
	E1a06		B2p06		A2a08		J2a09
	E3a09	Graziana, Annick	C1p02	Hashimoto, Takashi	A2a08		J2a11
	SII-05	Grossman, Arthur	J1a02	Hasimoto, Takashi	D1a08	Higashi, Katsumi	D2p11
		Grossman, Arthur R.	H3a11	Hasunuma, Kohji	J2a03	Higashi, Shiro	B3a04
Fukuda, Megumi	G3a11	Gruissem, Wilhelm	C2p12	Hata, Shingo	C1p11	Higashitani, Atsushi	,E3a05
Fukuhara, Toshiyuki	F3a03	Guo, Chen-Xiang	B3a01		C3a04	Higeta, Daisuke	E2a05
Fukui, Kiichi	C1a01				F2a07	Higuchi, Hirokazu	B2a05
	G2a04				H1p18	Higuchi, Kazuo	E2a10
	G2a08			Hatakeyama, Satoru	H1p07	Hihara, Yukako	B1a01
	I2a07			Hatano, Aya	A1p13	Hino, Mutsumi	B2p02
Fukui, Mitsue	D1p06	Habu, Yoshiki	E2a11	Hatsuyama, Yoshimichi		Hirai, Atsushi	F1p04
Fukuyama, Keiichi	B1p11	Hada, Megumi	J2a10		I2a06	Hirai, Masami Y.	SVI-02
Fukuzawa, Hideya	H1p01	Haga, Ken	D3a09	Hattori, Atsuhiko	E2p09	Hirai, Masashi	F1a03
	H1p13	Hagiwara, Shin-ya	E1p15	Hattori, Tsukaho	B3a14	Hiraishi, Akira	A-02
	I1p15	Hakoyama, Susumu	E1a10		SI-03		B1a04
Funada, Ryo	E3a08	Hamada, Susumu	D1a03	Hattori, Yoshiyuki	C1a04	Hirano, Atsushi	I2a10
Funamoto, Satoru	G3a05	Hamada, Tohru	B1p02		C1a05		I2a11
Furuhashi, Katsuhisa	D1p09	Hamada, Tomoko	I1p18	Hayakawa, Toshihiko	B2p01		I2a12
	J2a06	Hanada, Satoshi	B1p01		B2p02	Hirano, Etsuko	F1p06
		Hanaki, Naoto	H1a04		B2p03	Hirano, Hiro-yuki	F1a09
Furukawa, Kaoru	F2a04	Hanano, Shigeru	SVI-01		B2p05	Hirano, Hiroyuki	C3a09
Furukawa, Toshiko	E2p10	Hanazawa, Kohtarou	I2a08		B2p0	Hirano, Keiko	H1p10
Furumoto, Tsuyoshi	C1p11	Hanba, Yuko	SIV-02		B2p07	Hirano, Takanori	G2a09
	C3a04	Hanzawa, Yoshie	D1p01	Hayama, Ryosuke	D1p15	Hirasawa, Eiji	E2a03
Furusawa, Daisuke	E2a10	Hara, Hideyuki	B1a07	Hayashi, Hidenori	G2p04		
Furusawa, Osamu	E3a08	Hara, Kiyomi	B2p10				

— G —

— H —

Hirata, Yutaka	E1a03	Iba, Koh	C2p09	Imaseki, Hidemasa	H2a09	Ishise, Tatsuaki	E2p07
	E1a04		C2p10	Inaba, Masami	H2a10	Ishitani, Manabu	F3a01
Hiratake, Jun	SIII-04		I1a02	Inaba, Takehito	D1p17		SVI-05
Hiratsuka, Kazuyuki	C1a06		I1p02	Inada, Hitoshi	C2p10	Ishiura, Masahiro	E1p12
	C1a07		SV-04	Inada, Noriko	E1p10		E1p13
	C1a08	Ichimura, Kazuya	H1p09	Inagaki, Yoshishige	F1a08		E1p14
	J1p09		H1p11	Inami, Kaoru	A2p05	Ishiyama, Keiki	B2p03
Hirayama, Takashi	F2p07	Ichimura, Toshiaki	A1a07	Inoguchi, Masahiko	I1a03	Ishizaki, Kozo	E2p03
Hirochika, Hirohiko	C1p05	Ichinose, Katsunori	D2p12	Inomata, Yuji	D1p05		I1p07
	C3a09	Ichinose, Yuki	I2a01	Inoue, Kazuhito	A1a04	Ishizawa, Kimiharu	D2p07
	SI-05		I2a02		B1a04	Isogai, Akira	,I2a07
	B2p04		I2a03		B1p08	Itai, Reiko	J1a06
Hirose, Naoya	B2p04		I2a04		B1p09	Ito, Hisashi	E1a09
Hirose, Susumu	SI-02		I2a05		B1p10	Ito, Masaki	C2a09
Hirose, Tatsuro	A3a13	Ida, Shoji	G1p09	Inoue, Masayasu	E1p18		E1p11
	F1p03	Ide, Hiroyuki	I1p08	Inoue, Tsutomu	D2p08		F1a02
	H2a06	Idera, Shuichi	F1a01	Inoue, Tsuyoshi	A2p01		J1p12
Hirose, Tetsuro	SV-05	Igarashi, Daisuke	C3a06		A2p06	Ito, Takuya	G2a05
Hirota, Masamitsu	B1p12		D1a07	Inoue, Yasunori	D2a09		G2a06
Hisabori, Toru	A2a03	Igarashi, Dasuke	D2p10	Inoue, Yorinao	A1a06	Ito, Tomoko	J1a08
	H1p16	Igarashi, Megumi	SII-05		A1a07	Ito, Yuki	F2p05
Hisamatsu, Shin	F1p17	Igarashi, Naoki	B1p05		A1a08		F2p06
Hisatomi, Yasuyo	E2a11	Igarashi, Takao	G2p03		A1a09	Itoh, Hironori	D2a11
	F1a08	Ihara, Hideshi	D3a07		A1p03	Itoh, Hronori	D2a12
Hisayasu, Yumiko	I2a01	Ihara, Yuri	E1a07		A1p09	Itoh, Masanori	E2p09
Hiyoshi, Toru	I1p09	Iida, Asako	J1p10		A1p13	Itoh, Ryyuichi	C2a03
Hobo, Tokunori	B3a14	Iida, Shigeru	E2a11		A1p14		C2a04
	SI-03		F1a08		A3a08	Itoh, Shigeru	A-02
Hon-Nami, Koyu	I2a11	Iino, Moritoshi	D3a09	Inouye, Chiaki	E1p14		A1a03
	I2a12	Iinuma, Tomoko	J2a05	Inouye, Yoshinobu	D3a03		A1a05
Honzawa, Yasuharu	J2a07	Ikeda, Akira	B3a11	Inze, Dirk	A2p02		B1a04
Hopkins, Laura	B2p07		D2p02	Ishida, Hiroyuki	A3a12		B1a10
Horiguchi, Gorou	I1p02	Ikeda, Keiko	F2p09	Ishida, Nobuaki	B1a04	Itoh, Takao	E2p09
Horii, Namiko	D2a02	Ikeda, Mikiko	G1a06	Ishida, Sarahmi	D1a07	Itoh, Takashi	C2a09
Horio, Tatsuya	B1p11		G1a08	Ishida, Tetsuya	D1a04	Itoh, Yoshinobu	F1p09
Hoshida, Hisashi	A1p10	Ikeda, Takayuki	F1p05		D1a09		SI-02
Hoshino, Tamotsu	E2p03	Ikeda, Yoshihisa	H1p08	Ishida, Tetuya	C3a10	Itoh, Yoshio	C1a03
	I1p07	Ikegami, Isamu	A1a10	Ishii, Ryuichi	A3a13		E2a05
Hoshino, Yoshiko	,B2p12	Ikeuchi, Masahiko	A1p08	Ishii, Tadashi	G2p08	Itoh-Nemoto, Tomoko	A1a01
Hosokawa, Daijiro	F3a06		A1p17		G2p09		A1a01
Hoson, Takayuki	D2p07		B1a01		G3a03	Iuchi, Satoshi	F3a09
	E1p01		B1a02	Ishii, Takeharu	G3a08	Iwabuchi, Masaki	C1p10
	E1p04	Ikoma, Yoshinori	D2a07	Ishii, Yuri	B2p01		C3a07
	E1p09	Ikuta, Akira	D1p11	Ishikawa, Atsushi	H1a05		D1p07
Hosoya, Hiroyuki	B1p01	Imai, Hiroyuki	E2p06	Ishikawa, Mari	F1a06		F1p12
Hosoya, Kazushige	D2p11	Imai, Ryozo	E1p03	Ishikawa, Masaya	I1p08		F3a04
Hotta, Yasuo	C1a06		I1p12	Ishikawa, Takahiro	A2p03	Iwahori, Shuichi	C3a13
	C1a07		I1p13	Ishikawa, Takashi	A1a07	Iwai, Hiroaki	E1p05
	C1a08	Imai, Tsuyoshi	F1a03		A1a08		E1p06
	J1p09	Imaizumi, Nobuyuki	F1p03		A1a09	Iwaki, Masayo	A-02
Hu, Qiang	A1a03	Imaizumi-Anraku, Haruko			B3a05		A1a03
Hyodo, Hiroshi	D2a07		1p11	Ishikura, Kiyohide	B3a05		A1a05
			E2a09	Ishimaru, Ken	A3a13		A1a05
		Imamura, Aya	H1a04		F2a04		B1a10
		Imanishi, Shunsuke	D3a05	Ishioka, Noriko	J1a09		B1p16

Iwaki, Toshio	B1p17	Kamada, Hiroshi	C1a01	Karahara, Ichirou	E1a02		A1p06
Iwamoto, Kuninori	A3a10		C1p03	Karita, Shuichi	F1a03		B1a07
	E1a06		E1p05	Kasahara, Masahiro	H1p14	Kawamoto, Masahide	B1p11
Iwamoto, Norikazu	C2a10		E1p17	Kasahara, Takehide	F1p01	Kawamura, Yukio	G1a09
Iwano, Megumi	D1p15		E1p18	Kasai, Yuko	D2a07	Kawano, Shigeyuki	C1a09
	I2a07		E2p07	Kasamo, Kunihiro	D1p13		SV-01
Iwasaki, Hideo	E1p12		E3a01	Kasaoka, Keisuke	I1p09	Kawaoka, Akiyoshi	C1p08
Iwasaki, Ikuko	A1a03		G2p06	Kashino, Yasuhiro	A1p18	Kawasaki, Etsuko	I1a03
Iwasaki, Naohiko	G1p02		J1p05		B1p14	Kawasaki, Kosei	E2p03
Iwasaki, Toshisuke	A3a14	Kamada, Koichiro	F2a08		B2a02	Kawasaki, Shinji	G1a05
	H2a05	Kameda, Kiyoshi	G1a03	Kashiyama, Taku	G1a06		G2a11
Iwasaki, Yoshiko	B1p15	Kameda, Yayoi	J1a08	Kasuga, Mic	F3a11	Kawasaki, Tsutomu	H1p06
Iwasaki, Yukimoto	H1a05	Kamei, Ayako	B1a02		F3a12		H1p07
Iwata, Kumi	C1a05	Kameyama, Kazuhisa	G3a07		F3a13	Kawata, Yoshikazu	E2a04
Iwata, Michiaki	I1p03	Kaminaka, Hironori	F1p06	Katagiri, Takeshi	F2p07	Kawazu, Tamotsu	F1a02
Iwata, Tatsuya	A1p10		G2p01		H1a08	Kaya, Hidetaka	C1p10
Iwata, Yukiko	E3a02	Kamisaka, Seiichiro	D2p07	Katayama, Yoshihiro	E1a03		C3a07
Izawa, Takeshi	D1p15		D3a07		E1a04	Kazuoka, Toru	J1p10
Izui, Katsura	A2p01		E1p01	Kato, Akira	C2p03	Kiba, Akinori	I2a02
	A2p05		E1p04		F2a10		I2a04
	A2p06		E1p09	Kato, Chihiro	D3a02		I2a05
	C1p11	Kamiya, Akio	A1a10	Kato, Hidenori	D1p05	Kiba, Takatoshi	H1a02
	C3a04		J2a02	Kato, Ko	B3a05	Kida, Takao	H2a07
	F2a07	Kamiya, Yuji	B3a12		SI-04		H2a08
	H1p18		C2a02	Kato, Misako	B2a07	Kihara, Tomonori	H3a12
			D2a09	Kato, Ryoichi	E3a01	Kijima, Fumiko	F1a06
			D2a10	Kato, Takehide	C3a11		SIII-05
			D2a12	Kato, Tomohiko	E1a05	Kijima, Kyoko	G2a08
		Kamo, Masaharu	A1p15	Kato, Yoji	G2p10	Kikuchi, Kazuhiro	C3a09
		Kanagawa, Takahiro	B1p01		G2p11	Kikuchi, Minako	I1p04
		Kanahama, Kouki	D1p04	Kato, Yumika	D1p16	Kikuchi, Shoshi	B3a09
		Kanahama, Kouki	D1p04	Katoh, Akira	C1a04		G2p06
		Kanamaru, Kengo	H3a06	Katoh, Hirokazu	A2a09		H1a10
		Kanamoto, Hirotsuke	H1p15	Katoh, Hiroshi	A1p08		I1a01
		Kanayama, Yoshinori	D1p04	Katoh, Takara	A1p15	Kikuchi, Takao	F1p17
		Kanazawa, Akihiko	C2a02	Katoh, Takara	A1p15	Kikuchi, Yo	F1p17
		Kanegae, Hiromi	B3a09	Katou, Kiyoshi	G1p18	Kikuyama, Munehiro	G1p07
			G2p06	Katsuhara, Maki	D1p13		G1p17
		Kanegae-Kajiya, Hiromi			SII-03	Kim, Hoyeun	H3a02
			I1a01	Katsui, Yukiko	C3a01		SVI-02
		Kanekatsu, Motoki	H1p16	Katsura, Shinichi	H2a12	Kim, Jungsup	SIII-05
		Kaneko, Takakazu	B3a06	Kawaguchi, Kentaro	E1a10	Kimura, Aiko	G2p04
			B3a07	Kawaguchi, Masayoshi		Kimura, Shigeko	B3a06
			G2a12		D1p11	Kimura, Takuma	C2p06
			SVI-01		E2a09	Kinoshita, Tetsu	A1p17
		Kaneko, Takako	G3a04		SII-04		C2p02
		Kaneko, Yasuko	C2p06	Kawai, Maki	D2a09		I1a10
		Kanervo, Eira	,B2a06	Kawaide, Hiroshi	D2a09	Kinoshita, Toshinori	H1a09
		Kaneta, Tsuyoshi	,B3a12		D2a12		H1p05
		Kang, Hyesook	,J2a09	Kawakami, Naoto	I1p02	Kinoshita, Yasuhiro	A2a10
		Kanno, Tatsuo	F1p14	Kawakami, Shigeki	I2a08	Kise, Hideo	B1a04
		Kanno, Yoshiaki	E2a10	Kawakita, Kazuhito	D2a06	Kishido, Takahiro	I1p11
		Kano, Hiromi	B1a04		F2p08	Kita, Nobuhiro	J2a07
		Kano, Kyoko	D2a09		F2p09	Kitae, Kaori	A3a11
		Kanzawa, Nobuyuki	G3a06	Kawamori, Asako	A1p02	Kitajima, Ken	F1p07
			G3a07		A1p04		

Kitamura, Sayaka	G1p18	Koike, Michiya	,I1p13	Koyama, Yasushi	B1a09		
Kitano, Hidemi	C1p05	Koiwa, Hisashi	D2p10	Kozaki, Akiko	F2a08		
	D2p02	Koizumi, Kozi	D1a05		F2a09		
	E1a03	Koizumi, Mika	B1a04	Ku, Maurice S.B.	A2p11		
	E1a04	Koizumi, Nozomu	F1a07		A2p12		
Kitano, Takahiro	J1a04		H1p08		F3a02		
	J1a05		I1a04	Kubo, Akihiro	A1a01		
Kitasaka, Yukiko	D2a03	Kojima, Hiroyuki	E2a04		F1p17		
	D2a04	Kojima, Kayo	B1p16		G2p02		
Kitashima, Tomomi	I1p08		B1p17	Kubo, Akiko	F2a01		
Kitayama, Kaoru	A2p08	Kojima, Soichi	B2p06		F2a02		
Kitayama, Masahiko	A2p08	Komamine, Atsushi	F2a06	Kubota, Mitsuru	D2p11		
Kitsuwa, Takaharu	D2a01	Komano, Teruya	D2a10	Kuchitsu, Kazuyuki	F2p04		
Kiyokawa, Shigeto	E2a10	Komatsu, Akira	F1p02	Kucho, Ken-ichi	H1p01		
Kiyosawa, Keitaro	G1p03	Komatsu, Setsuko	B3a09	Kudo, Mitsuko	D1a03		
Kiyosue, Tomohiro	F3a08		F2p04	Kumagai, Tadashi	J2a08		
Kiyota, Seiichiro	F1a04	Komeda, Yoshibumi	D1a10		J2a09		
	G1a01		D1p01		J2a11		
Klionsky, Daniel J.	G1p05		I1p14	Kumagaye-Yoshizawa,			
Ko, Chun-Sim	B2a12	Komori, Sadao	D1p05	Kumiko	A2p05		
Kobayashi, Akira	D1p03	Komori, Toshiyuki	H2a09	Kume, Tamikazu	J1a09		
Kobayashi, Hideyuki	G1a05	Koncz, Csaba	C2a12	Kunito, Shunji	I2a11		
Kobayashi, Hirokazu	B1p17	Kondo, Hirokiyo	I1a03		I2a12		
	G2a09	Kondo, Maki	C2p01	Kuno, Norihito	J1p16		
	G2p07		G1a03	Kuraya, Yoshiki	B3a10		
Kobayashi, Kei	B3a05		H2a01	Kuriyama, Masamitsu	E3a02		
Kobayashi, Koh	D2p10	Kondo, Noriaki	G3a11	Kuroda, Hirofumi	A3a06		
Kobayashi, Masami	A-02	Kondo, Tadao	G1a03		A3a07		
	B1a03	Kondo, Takao	E1p12	Kuroiwa, Eriko	E3a06		
	B1a04		E1p13	Kuroiwa, Haruko	C1a10		
	B1a10		E1p14		C2a03		
	B1p10	Kondo, Yoshihiko	C2p07		E1p10		
Kobayashi, Masaru	G3a01	Kondoh, Atsushi	F2a05	Kuroiwa, Tsuneyoshi	C1a09		
	G3a02	Konishi, Teruko	E1a08		C1a10		
Kobayashi, Masatomo	D2a01	Kono, Yasuhisa	G2p03		C2a03		
Kobayashi, Masayuki	B1a03	Kosaka, Hideo	I1p15		C2a04		
Kobayashi, Mayumi	E3a05	Kosemura, Seiji	D2p01		C2p04		
Kobayashi, Shozo	A1a02		D3a12		E1p10		
Kobayashi, Toshihiko	E2p07	Koshiba, Tomokazu	D2a10		F1a10		
Kobayashi, Toshihiro	E1p05	Koshino, Yasuhiro	A3a02		SV-01		
Kobayashi, Yasushi	C1p10	Koshioka, Masaji	D2a11	Kusano, Tomonobu	F1a07		
	C3a07	Koshiyama, Junko	C1a02		H1p08		
			G2a02		I1a04		
Kobayashi, Yoshichika			F1p10	Kusumi, Kensuke	C2p08		
	A3a04	Kosugi, Shunichi	C1p13		C2p09		
Kobayashi, Yuji	E2p05	Kotake, Toshihisa	E1p02		SV-04		
Kodama, Hiroaki	I1a02		G2a10	Kusumi, Takaaki	F2a12		
	I1p02	Kotani, Hirokazu	G2a12	Kusumoto, Noriaki	A1a04		
Kodama, Osamu	H1p06		D1p05	Kutsuna, Shinsuke	E1p13		
Koga, Jinichiro	I1p03	Kotoda, Nobuhiro	B3a01	Kuwabara, Chikako	F1a05		
	I1p04	Kouchi, Hiroshi	B3a03	Kuwano, Tomomasa	F1p11		
Kohchi, Takayuki	H1p15		H3a12	Kyozuka, Junko	C3a08		
Koike, Hiroyuki	A1p18	Koyama, Hiroyuki	F1p02				
	A3a01	Koyama, Kazuhiko	B1a06				
	B1p14	Koyama, Yasushi	B1a06				
	B2a02		B1a07				

— L —

Leustek, Thomas	F1a06
	SIII-05
Li, Yi-Qin	C1p13
Limantara, Leenawaty	B1a06
	B1a07
	B1a09
Liotenberg, Sylviane	D2a10
Liu, Hui-Ping	B1p03
Liu, Qiang	F3a11
	F3a12

— M —

Machida, Chiyoko	D1a03
Machida, Yasunori	D1a03
	H1p10
Madoka, Yuka	C1p06
	SII-01
Mae, Tadahiko	A3a12
	B2a08
Maeda, Shin-ichi	H3a08
Maeshima, Masayoshi	C3a03
	G1a03
	G1a04
	G1a06
	G1a10
	G1p06
Makino, Amane	A3a12
	B2a08
Manabe, Katsushi	J1p06
Manago, Masafumi	J2a07
Mano, Jun'ichi	A2p02
	B2a05
Mano, Shoji	H2a02
Manri, Naoki	B1p06
Marion-Poll, Annie	D2a10
Maruyama, Tadashi	B2a07
Masuda, Hiroshi	C1p01
Masuda, Munehisa	B1p09
Masuda, Shinji	B1p08
Masuda, Takao	F2a07
Masuda, Tatsuru	A3a06
	A3a07
	B1p06
	B1p07
	B1p09
	E2p02
	F2a05
Masuda, Tetsuo	D1p05
Masukawa, Masatoshi	D1a08
Masuko, Daisuke	B2p12
Masumura, Takehiro	F1p06
	G2p01

Mato, Masami	E2a05	Matsuura, Katsumi	B1p08	Miyao-Tokutomi, Mitsue		Murakami, Akio	A2a06
Matoh, Toru	G3a01		B1p12		A1a02	Murakami, Hiroko	C2a06
	G3a02		B1p13		A2a01	Murakami, Satoru	A1p08
	J1a07	Matsuura, Seiji	C1p14		A2p04	Murakami, Shinya	C2p06
Matsubayashi, Tohru	B3a06	Matsuzaki, Masahiro	B1p15		A2p11		C2p07
Matsubayashi, Yoshikatsu		Mayama, Tomoko	D1p02		A2p12		C3a01
	C2a07	Mayanagi, Kouta	A1a07	Miyashita, Hideaki	A1a03	Murakami, Yasuko	F2a06
	E2p07		A1a08	Miyata, Shin-ichi	H1a07	Muramatsu, Takamichi	
Matsuda, Nao	G1a06		A1a09	Miyata, Shinichi	H1a06		J1p15
Matsuda, Noriyuki	H2a04	Meshi, Tetsuo	F1p12	Miyauchi, Daiji	E2p09		J1p16
Matsuda, Tsukasa	F1p07		F3a04	Miyazaki, Ai	H1p03	Muranaka, Toshiya	C2p12
Matsuda, Yoshihiro	J2a04	Midoh, Naoki	I1p03	Miyazaki, Saori	F3a03	Murata, Jun	J1p09
Matsuhara, Shio	I1p14	Mikami, Koji	F2p07	Miyazawa, Shin-ichi	SIV-02	Murata, Norio	A2a02
Matsuhashi, Shinpei	J1a09	Miller, Mette	B1p12	Mizoguchi, Tsuyoshi	H1p09		A2p09
Matsui, Minami	D1p18		B1p13		H1p11		B1p18
Matsukawa, Takaya	A1p04	Mimura, Tetsuro	G1a06	Mizuno, Hiroshi	H1p13		B2a06
Matsuki, Rikyu	H2a05		G1p08	Mizuno, Koichi	G3a08		B2a10
Matsukura, Chiaki	D3a06	Mimuro, Mamoru	B1a03	Mizuno, Takeshi	H1a02		H2a10
	H2a06		B2a11		H1a03	Murata, Takao	F2a04
Matsumoto, Satoru	E2a12	Minagawa, Jun	A1p09		H1a04	Murata, Takashi	E3a05
Matsumoto, Yumi	B1p08		A1p13	Mizusawa, Naoki	A2a01		G3a09
Matsumura, Hiroyoshi	A2p01		A3a08	Mochimaru, Mari	G1p15		G3a10
	A2p06	Minami, Eiichi	F2p01	Mochizuki, Nobuyoshi		Murata, Yoshinori	A2a07
Matsumura, Masatoshi			F2p02		D1a06		H3a14
	F2p06	Minami, Masahiro	F1p12		D1p16	Murata, Yoshiyuki	H2a12
Matsumura, Tomohiro	A2a05	Minami, Masayoshi	C1a07		SVI-03	Murayama, Emi	B1p10
Matsunaga, Etsuko	C1p08	Mine, Toshiki	I1p09	Monna, Lisa	G2a01	Murofushi, Noboru	G2a07
	F1p01	Mineyuki, Yoshinobu	G3a09	Mori, Hitoshi	C1p06	Murota, Ken-ichi	B3a13
Matsunaga, Mie	D2a07		G3a10		C1p07		E2p05
Matsunaga, Sachihiro	C1a09	Mino, Hiroyuki	A1p02		E1a08	Muto, Shoshi	E3a03
Matsunaga, Toshiro	G3a03		A1p04		SII-01		G1p04
Matsuoka, Hideaki	E2a01	Mishima, Masafumi	D1p10	Mori, Izumi C.	H1p17		H1p17
	E2a02	Mitsuda, Nobutaka	G1a07	Mori, Masaki	B3a09	Myers, Patricia N.	H2a09
	H1p12	Mitsuhashi, Wataru	C2a02		G2p06		
Matsuoka, Makoto	A2p04		D2a09		I1a01		
	A2p11	Mitsukawa, Norihiro	SVI-01	Mori, Miho	E3a08		
	A2p12	Mitsunaga, Shin-ichiro	G2a04	Mori, Naoki	D1p10		
	C1p05	Mitsunaga, Toshio	C1p16	Mori, Satoshi	H3a03	Nagano, Mutsumi	D2a06
	C3a09	Miura, Kenji	H1p01		J1a06	Nagano, Yukio	D1p17
	C3a12	Miura, Masayuki	D1p13		J1a09		F2a08
	C3a13	Miura, Setsuko	F3a13	Mori, Satosi	H3a13	Nagao, Akinori	D1p06
	C3a14	Miura, Setuko	F3a11	Mori, Tomoko	F1a08	Nagao, Issei	F1p16
	D1a01		F3a12	Morikawa, Hiromichi	B2p09	Nagasato, Tomoka	B3a04
	D2a11	Miura, Yoshio	C1p05		B2p10	Nagashima, Kenji	A-02
	D2a12	Miyachi, Shigetoh	A1a03		B2p11	Nagashima, Kenji V.P.	
Matsuoka, Masayoshi	E2p08		B2a07		I1p11		B1a05
	F1a01	Miyagawa, Yoshiko	I1a08	Morioka, Mizue	F1p12		B1a08
Matsuoka, Takashi	G1p04	Miyagishima, Shin-ya	C2a03	Morisawa, Gaku	G2p04		B1p05
Matsushima, Hisashi	C2p06		C2a04	Morita, Hayato	E2p03		B1p08
Matsushita, Yasuhiko	I2a08	Miyajima, Nobuyuki	G2a12	Morita, Hayato E.	F1p06	Nagashima, Koji	F1p05
Matsuura, Atsushi	F1p07	Miyake, Chikahiro	A2a02	Morita, Naoki	G2p01	Nagasugi, Yumi	I2a03
Matsuura, Katsumi	A-02	Miyamoto, Junko	B3a04	Morita, Shigetoh	G2a05	Nagata, Noriko	C1a10
	B1a05	Miyamoto, Kensuke	D3a07		B2p09	Nagata, Takahiro	A2p01
	B1a08		D3a08	Motohashi, Reiko	B2p09	Nagata, Toshifumi	B3a09
	B1p05		D3a10	Mukai, Toshihiro	A2p10		G2p06
				Murai, Nobuhiko			I1a01

Sasaki, Yukiko	H2a04	Sazuka, Takashi	H1p03	Shigeoka, Shigeru	I1a08	Shinozaki, Kazuo	F3a08
Sasakuma, Tetsuo	J2a07	Schmetterrer, Georg	A2a09		I1a09		F3a09
Sasamoto, Shigemi	B3a07	Schmitz, Gregor	G2a07	Shii, Katuhiko	H1p06		F3a10
Sassa, Naomi	E3a06	Schreiber, Lukas	E1a02	Shiina, Takashi	C2p11		F3a11
Sasuga, Yasuhiro	B3a13	Schroeder, Julian I.	H1p17		E1p16		F3a12
Sato, Akiyo	E2p11	Schuetz, Ingeborg	J1p17	Shikanai, Toshiharu	A2a08		F3a13
Sato, Fumihiko	A2a10	Scott, Sidney V.	G1p05		A3a11		G2a03
	C2p06	Seino, Takamasa	D1p04		D1a08		G2a05
	C2p07	Seki, Hikaru	I2a01	Shimada, Hiroshi	B1p06		G2a06
	C3a01		I2a03		B1p07		H1a06
	D2p10	Seki, Motoaki	G2a03	Shimada, Keizo	A-02		H1a07
	E2a01		G2a05		B1a03		H1a08
	E2a02	Sekimoto, Hiroyuki	D2a10		B1a04		H1p09
Sato, Masahiko	G1a07	Sekimoto, Masashi	I1p11		B1a05		H1p11
	J1p06	Sekine, Masami	C2a06		B1a08		SVI-06
Sato, Naoki	C2p04	Sekine, Toshiaki	J1a09		B1a10	Shinozaki, Masateru	C1p11
	C2p05	Sekiya, Jiro	G3a01		B1p05		D3a04
	D2p10		G3a02		B1p08	Shinozaki, Noriko	H1p02
	I1p10		J1a07	Shimada, Takashi	J1p07	Shinshi, Hideaki	SI-01
	SV-03		SIII-01	Shimamoto, Ko	C3a08		SI-02
Sato, Shigeru	E1a05	Senda, Kaori	F2p08		D1p15	Shinwari, Zabta K.	F3a13
Sato, Shusei	B3a07	Sentoku, Naoki	A2p04		F1p14	Shiota, Hajime	C1p03
	G2a10		C1p05		H1p06	Shirai, Makoto	H1p02
	G2a12		D1a01		H1p07		H1p03
Sato, Tadashi	B2p05	Seo, Daisuke	A1a04	Shimazaki, Ken-ichiro	H1a09	Shiraishi, Tomonori	I2a01
Sato, Takahide	F2a06	Seo, Mitsunori	D2a10		H1p05		I2a02
Sato, Tomohiro	C3a03	Seo, Shigemi	I2a07	Shimizu, Masanori	G2a09		I2a03
Sato, Yoshikatsu	D1p14	Shao, Chun Xue	F1a09	Shimizu, Sae	C1p07		I2a04
Sato, Yutaka	C1p05	Shen, Jian-Ren	A1a06		SI-01		I2a05
	D1a01		A1a08	Shimizu, Tokuro	A1a02	Shiraiwa, Yoshihiro	A3a14
Sato-Nara, Kumi	D2p11		A1p07	Shimmen, Teruo	G1p11	Shiratori, Gen-ichi	F1a03
Satoh, Akira	A3a14		A1p14	Shimogawara, Kosuke	H3a11	Shizuri, Yoshikazu	B2a07
Satoh, Hikaru	C2p09		A1p15		J1a02	Shoji, Kazuo	B2p12
	F2a02	Shiba, Tetsuo	A2p05	Shimogawara, Kousuke		Shoji, Takeshi	SI-04
	H1p06	Shibagaki, Nakako	H3a11		B2a01	Sippola, Katja	B2a06
Satoh, Izumi	H2a11	Shibaoka, Hiroh	B3a12	Shimojima, Mie	E2p02	Small, Ian	F1p18
Satoh, Junko	C2p11	Shibasaka, Mineo	D1p13	Shimomura, Koichiro	E2p07	Smith, F.A.	G1p08
Satoh, Kazuhiko	A1p18	Shibata, Daisuke	E1a05	Shimosaka, Makoto	E2a07	Soejima, Jun-ichi	D1p05
	A3a01		G2a06	Shimura, Masaru	I1p03	Soga, Kouichi	D2p07
	B1p14		SVI-01		I1p04		E1p09
	B2a02	Shibata, Mari	A1p18	Shin, Masateru	A2a04	Sonoda, Masatoshi	A2a06
Satoh, Kimiyuki	A1p16	Shibata, Michie	J1p14	Shinada, Yukiyo	C2p05		A2a09
	A2a11	Shibata, Michio	E2a05	Shindo, Hayato	B3a13	Sonoike, Kintake	B1a01
Satoh, Rie	F3a08	Shibata, Yuriko	B3a09	Shindo, Mika	D2p09		I1p01
Satoh, Shigeru	C2a01		G2p06	Shinmyo, Atsuhiko	B3a05	Sonoki, Sigenori	F1p17
Satoh, Shinobu	C1a01	Shibuya, Naoto	E1a10		C1p08	Soyano, Takashi	I1a03
	D3a02		F2p01		C2a06	Stachelin, L. Andrew	G3a09
	D3a03		F2p02		SI-04		G3a10
	E1p05		F2p03	Shinohara, Kenji	D1p06	Steponkus, Peter L.	I1p06
	E1p06		F2p04		I1p17	Stumpp, Michael T.	A2a03
Satoh, Toshio	B1p03		F2p05	Shinomura, Tomoko	J1p04	Su, Wenpei	H3a06
	B1p04		F2p06	Shinozaki, Kazuo	F2p07	Suga, Shinobu	G1p06
	B1p15	Shigematsu, Harumi	D2a02		F3a05	Sugai, Michizo	J2a05
	J1p13	Shigematsu, Toru	B1p01		F3a06	Sugimoto, Kazuhiko	SI-05
Sawada, Hiroshi	H1p16	Shigeoka, Shigeru	A2p03		F3a07	Sugimoto, Megumi	I2a02

Sugimoto, Megumi	I2a04	Tabata, Satoshi	G2a12	Takaichi, Shin-ichi	A-02	Takio, Susumu	J1p13
Sugita, Chieko	B3a06		SVI-01	Takaichi, Shinichi	B1a04	Takita, Eiji	H3a12
Sugita, Koichi	F1p01	Tabuchi, Akira	E1p01		B1p01	Takumi, Shigeo	D1p10
Sugita, Mamoru	B3a06	Tachibe, Yuki	H2a02		B2a11	Tamaoki, Masanori	C3a12
	F1p15	Tachikawa, Takashi	I1p10	Takaiwa, Fumio	C1p17		C3a13
	SV-05	Tachimoto, Hideki	D1a08	Takamiya, Ken-ichiro	A3a06		C3a14
Sugiura, Masahiro	B3a06	Tada, Yoshifumi	D1p09		A3a07	Tamiya, Toru	G3a06
	F1p15		J1p14		B1p06		G3a07
	F1p18	Taguchi, Goro	J2a06		B1p07	Tamoi, Masahiro	A2p03
	SV-05	Taira, Eiji	E2a07		B1p09	Tanaka, Akira	F3a01
Sugiura, Miwa	A1p09	Tajima, Kaoru	G2p05		E2p02	Tanaka, Ayumi	A3a02
Sugiura, Tetsuya	I2a05	Tajima, Shigeyuki	J1p05		F2a05		I1p10
Sugiyama, Munetaka	A3a10		A2p04	Takanashi, Noriko	D1p04	Tanaka, Hiromichi	G2p02
	C2a08		B3a01	Takane, Ken-ichi	B3a01		G2p03
	D1a05		B3a02		B3a03	Tanaka, Keiji	F2a06
	E1a06		B3a03	Takano, Hiroyoshi	F1a10	Tanaka, Kiyoshi	A1a01
Sugiyama, Tatsuo	B2p08	Takabe, Keiji	E1a05		SV-01		G2p02
	H1a01		E3a09	Takano, Makoto	H1a10		G2p03
	H1a02		G3a02	Takano, Mutsuko	G1p11	Tanaka, Kunisuke	F1p06
	H3a01	Takabe, Teruhiro	F3a01	Takanokura, Yuko	F1p02		G2p01
Sugiyama, Yutaka	SIII-05	Takabe, Tetsuko	F3a01	Takaoka, Yasuko	B3a05	Tanaka, Mika	E2p03
Sutherland, Betsy M.	J2a08		F3a02	Takasaki, Miki	G3a02	Tanaka, Osamu	G2p12
Sutherland, John C.	J2a08	Takada, Shinobu	C3a10	Takase, Hisabumi	C1a06	Tanaka, Shin-ichiro	D1p16
Suyama, Tetsushi	B1p01	Takagi, Masamichi	I1p12		C1a07	Tanaka, Shinichiro	SVI-03
Suzuki, Akihiro	C1p17	Takahama, Umeo	I1a07		C1a08	Tanaka, Toshinori	G1p09
Suzuki, Eiji	H2a11	Takahara, Manabu	C2a04		J1p09	Tanaka, Yoshikazu	F2a12
Suzuki, Hideho	J1p11	Takahashi, Akira	H1p06	Takatsuji, Hiroshi	D1p03	Tanaka, Yuko	G3a04
Suzuki, Hideyuki	A2a05	Takahashi, Fumie	B2p06		SI-07	Tanaka-Ueguchi, Miyako	
Suzuki, Hiroyuki	F1p09	Takahashi, Hideki	J1a10	Takatsuto, Suguru	D2a04		C3a13
Suzuki, Katsunori	C1a05	Takahashi, Hidenori	C2a03	Takeba, Go	C1p09		D2a11
Suzuki, Katunori	C1a04	Takahashi, Hideyuki	E3a04	Takeda, Junko	J2a12		D2a12
Suzuki, Kazumi	I2a09		E3a05	Takeda, Shin	SI-05	Tang, Xiao-Song	A1p03
Suzuki, Kazuya	J1a06	Takahashi, Hiroyuki	E3a07	Takeda, Toru	A2p03	Taniguchi, Mitsutaka	H1a02
Suzuki, Kensaku	A3a05	Takahashi, Koji	G1p18		I1a08		H3a01
Suzuki, Kumiko	E2p05	Takahashi, Masaaki	A2a07		I1a09	Taniguchi, Yasuhito	E1p12
Suzuki, Masahiko	E2a10		G1p10	Takei, Kentaroh	H3a01	Tanimoto, Eiichi	D3a06
	I2a06		G1p12	Takemaru, Ken-ichi	SI-02	Tasaka, Masao	C3a10
Suzuki, Mitsuhiro	D1a10		H3a14	Takemoto, Daigo	D2a06		C3a11
Suzuki, Seiko	B2a07		J1a03		F2p10		C3a12
Suzuki, Shoichi	A2p10		J1a04	Takemura, Miho	H1p15		D1a04
Suzuki, Takanori	J1p13		J1a05	Takenaga, Hiroshi	B3a13		D1a09
Suzuki, Takashi	E3a07	Takahashi, Misa	B2p10		E2p05		D2p03
Suzuki, Tomomi	H1a03	Takahashi, Sakiko	F1p03		F1p11	Tatematsu, Kiyoshi	D2p04
Suzuki, Yohko	G3a04	Takahashi, Seiji	F2p07		J1a08		D2p05
Suzuki, Yoshihito	G2a07	Takahashi, Taku	D1a10	Takenaka, Mizuki	H1p13	Tazawa, Masashi	G1p02
Suzuki, Yuji	B2a08		D1p01	Takeuchi, Atsuko	E2a12		G1p07
Syono, Kunihiko	D1p08		I1p14	Takeuchi, Hiroshi	D1p12		G1p17
	D1p11	Takahashi, Takuya	C2a08	Takeuchi, Yuichi	G2p05	Teramoto, Maki	F1a02
	E2p10	Takahashi, Yohsuke	C3a06	Takeyasu, Kunio	G1a07	Teramoto, Susumu	E2a05
		Takahashi, Yuichiro	A1p11		J1p06		E2a06
			A1p12	Takezawa, Daisuke	F1a05	Terashima, Ichiro	A1a01
			A1p13		I1p05		B2a12
		Takahashi, Yuri	A2p08	Takigawa, Kaori	A2p07		SIV-02
Tabata, Mamoru	E2a01	Takai, Ryota	F2p01	Takio, Susumu	B1p03	Terauchi, Kazuki	J2a01
Tabata, Satoshi	B3a07	Takai, Ryouta	F2p02		E2p04	Theres, Klaus	G2a07
	G2a10						

— T —