1pG06

Mn deficiency induced expression of a gene from *Oryza sativa* roots.

Naqvi, S.M.S[1,2]. and Takahashi, M[2].

[1] JSPS Fellow, [2] Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Osaka Pref. Univ., 1-1-Gakuen-cho, Sakai, Osaka, 599-8531.

Germin-like proteins (GLP) have been reported in different plant species, and the common feature among many of them is their induction during a variety of environmental stresses. A GLP has been found to be induced in Mn deficient tomato roots. In order to know whether or not, the rice plant responds to Mn deficiency by some GLP induction, we performed Northern hybridization using a DNA fragment (~540bp) as probe. The probe was PCR raised from rice genomic DNA using a set of degenerate primers designed after consensus sequences in reported rice GLP genes. After getting differential response under Mn deficiency, a cDNA has been obtained using 3' and 5'RACE from the Mn deficient rice roots. This 934bp cDNA coding for a 224 residues long protein, is highly homologous to *Oryza sativa* GLP6 cDNA, albeit only in the coding region. RT-PCR result has revealed Mn deficiency dependent transcription of its mRNA. Further characterization is in progress.

1pG07

トマト根においてMn欠乏により発現が誘導されるGermin様タンパク質の機能について

佐々木康二、竹上貴史、前嶋　一宏、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り、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、Mn欠乏により発現が誘導される、根の形質膜に存在する金属結合タンパク質断片を単離し、3'-RACE法及び5'-RACE法により、そのタンパク質をコードする全長cDNA(*Mdip1*)をクローニングした。*Mdip1*は、シュウ酸酸化活性や抗菌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。全長*Mdip1*を導入した形質転換タバコは、シュウ酸酸化活性、抗菌活性を有することがわかり、また、シュウ酸の酸化産物であるH_2O_2が、Mnを可給態化する結果が得られたことから、Mn獲得機構において、Mdip1が重要な役割を担うことが示唆された。

1pG08

シロイヌナズナ*bor1-1*変異株の復帰突然変異体の単離と性質

藤原　徹、青木法明、高野順平、安森美帆、野口享太郎、林　浩昭（東大院・農・応用生命化学）

*bor1-1*変異株は、栄養生長、生殖生長に野生型株に比べて高濃度のホウ素（B）を必要とする変異株である。これまでの解析から演者らは*BOR1*遺伝子はBの根から地上部への移行に関わる遺伝子であると推測している。本発表では、*bor1-1*変異株の復帰突然変異株の単離と性質について報告する。

*bor1-1*変異株をエタンメタンスルホン酸による変異原処理して得た約2万株のM2植物を、Bを10 μ M含む水耕液で生育させ、結実した植物を選抜した。この水耕液で育てると野生型株は結実するが、*bor1-1*変異株は結実しない。現在までに、3ラインの復帰突然変異株を得ている。*bor1-1*変異株との掛け合わせの結果から、このうち2ラインは*bor1-1*変異の表現型を回復させる劣性の変異を持っていると推測している。得られた変異株の性質について報告する。

1pG09

シロイヌナズナ高ホウ素要求性変異株*bor1-1*におけるホウ素の吸収と移行

野口享太郎、Frank Dannel[1]、Heidrun Pfeffer[1]、Volker Roemheld[1]、松永俊朗[2]、掛川弘一[3]、石井忠[3]、林浩昭、藤原徹　（東大院・農・応生化、[1]Univ. Hohenheim、[2]農水省・九州農試、[3]農水省・森林総研）

現在までに演者らは、シロイヌナズナの*bor1-1*変異株がホウ素欠乏に感受性を示し、その地上部のホウ素含量が著しく低いことを明らかにしてきた。

そこで、*bor1-1*変異株におけるホウ素の吸収、移行を詳しく解析するためにトレーサー実験を行った。その結果、*bor1-1*変異株の根によるホウ素の吸収は野生型株と同様であったが、地上部へのホウ素の移行が抑制されていた。また、植物体中ホウ素の水溶性および水不溶性画分への分配を調べたところ、*bor1-1*変異株では地上部の水溶性画分のホウ素含量が野生型株よりも低かったが、他の画分では大きな違いは見られなかった。

以上の結果から、*bor1-1*変異株の地上部におけるホウ素含量の低下の原因は、根によるホウ素の吸収やホウ素の主要な結合サイトである細胞壁の異常によるものではなく、ホウ素の根から地上部への移行阻害にあると考えられる。

1pG10

植物の亜鉛欠乏ストレス感受性と難溶性亜鉛化合物溶解物質分泌能の関係

長谷川功、小澤まり子、野口　章、矢崎仁也（日大、生物資源科学部）

亜鉛欠乏に対する植物の耐性機構の解析を目的とし、８種の植物を用いて亜鉛欠乏に対する応答の差異を比較検討した。亜鉛欠乏による生育の抑制が光条件によって大きく異なる植物と、比較的小さい植物があり、ナス、キュウリなどは標準光条件下では比較的生育抑制は小さいが、強光条件下では著しく生育が抑制抑制された。ピーマンやトマトなどは亜鉛欠乏にって、いずれの光条件下でも生育が大きく抑制された。そこで、これらの植物について SOD 活性を比較したところ、亜鉛欠乏時における生育抑制の傾向と SOD 活性の増大との間には関連のあることが示唆された。また、亜鉛に対する感受性と亜鉛欠乏に対する根の応答との関係を検討するため、亜鉛欠乏栽培した水耕残液を用いて、難溶性亜鉛化合物[$Zn_3(PO_4)_2$, $Zn(OH)_2$]の溶解能を測定したところ、感受性とこれらの間には一定の傾向が見られ、亜鉛欠乏時の生育抑制が大きい植物ほど水耕残液による難溶性亜鉛化合物の溶解能が大きく、欠乏時の生育抑制が少ない植物では、難溶性亜鉛化合物の溶解能が小さいことが示された。そこで、水耕残液による難溶性亜鉛化合物の溶解が顕著なピーマンを用い、亜鉛欠除処理に伴う溶解物質の分泌や物質の分離等について検討した。その結果、亜鉛欠除処理後後 12 日目頃から溶解能が顕著に増大し、根から難溶性亜鉛化合物の溶解物質が分泌されていることが示唆された。この難溶性亜鉛化合物の溶解能を、欠乏した元素の獲得機構とすれば、感受性が大きい植物ほど、その能力が高いことを示唆するものと考える。

1pG11

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、高橋正昭
（大阪府大・農・応用生化）

Mn は光合成の O_2 発生に必須で、その欠乏は直ちに植物の生育に影響する。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存在することが期待される。トマト根において、その戦略に関係すると考えら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* は葉・茎には発現せず根においてのみ発現することを RT-PCR により確認した。根を上部・中部・先端部に分けてノーザンブロット解析を試みた。その結果、根の全体に発現しているが、養分吸収が特に盛んだと考えられる先端部分に於いて発現量が多く、また Mn 欠乏に対する応答も各部で異なっていた。根の各部における Mn 含有量とこの応答についての関係に関しても解析を試みた。

さらに、*Mdip1* が Mn によって誘導されるかをノーザンブロット解析、ゲノム中のホモローグをサザンブロット解析で調べ、*Mdip1* の発現の違いについて解析した。

1pG12

酵母の銅吸収変異株*ctr1*の、オオムギ由来のsuppressor、*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、[2]CREST）

昨年の、日本植物生理学会年会札幌大会で、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クローン*SFD1*(*Suppresor of Ferrous uptake Defect 1*)の機能解析について報告した。本講演ではこのSFD1タンパク質の、高等植物における細胞内局在性の解析、アラビドプシス由来のホモログの単離について、報告する。

植物細胞内でのSFD1タンパク質の局在性を調べるために、SFD1とGFP(green fluorescence protein)との融合遺伝子をトランジェントに発現させた。蛍光顕微鏡下で観察すると、融合タンパク質は細胞内小器官に局在していた。ミトコンドリア特異的染色試薬を用いた観察によりこの小器官は、ミトコンドリアであると推定された。アラビドプシスから単離された*SFD1*ホモログの構造解析の結果とあわせて、*SFD1*の高等植物細胞での機能を考察する。

1pG13

コンフォーカルイメージング法によるアデニン・リボースリン酸転移酵素(APRT)の細胞内動態

板井玲子[1]、中西啓仁[1]、西澤直子[1]、吉村悦郎[1]、森　敏[1,2]（[1]東大・院・農学生命科学、[2]CREST）

昨年の札幌大会において、鉄欠乏のオオムギの根で発現誘導されるアデニン・リボースリン酸転移酵素(APRT)のcDNAのクローニングに成功したことを報告した。

この鉄欠乏で誘導されるAPRTタンパク質の細胞内局在を調べるため、３５Sプロモーター・APRT・改変GFP (synthetic green fluorescence protein) のコンストラクトを作製し、これをタマネギ表皮細胞、黄化オオムギ子葉鞘細胞、タバコBY-2細胞などにパーティクルボンバードメント法により導入した。細胞内で遺伝子発現されたAPRT-sGFP融合タンパク質の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss Inc.)を用いて３次元的・経時的に観測した。その結果、これまでの手法では観察され得なかった生きた細胞内動態を得ることができたので報告する。

1pG14

南極産黄緑色藻ヘテロコックスの成長および細胞内溶質含量に対する塩濃度の影響

藤井修平、山本良一、中山伸、安井伸郎、[1] P. Broady（帝塚山短大、[1] カンタベリー大）

南極の土壌から黄緑色藻トリボネマ目ヘテロコックス属に分類される藻類を単離した。成長に対する塩濃度の影響を調べた結果、この藻類は 0～0.8M の濃度範囲で成長が見られ、耐塩性を示すことが分かった。しかし、塩濃度の増加に伴い成長は抑えられた。次に、細胞内溶質含量に対する塩濃度の影響を検討した。質量分析から、この藻類はマニトールを含むことが明らかになった。塩濃度の増加に対応して細胞内マニトール含量が増すことから、この藻類はマニトールを浸透調節物質として利用していると考えられる。

1pG15

塩ストレス誘導性細胞死の初期過程における細胞膜インテグリティーの研究

且原真木,山口峰生,笠毛邦弘 (岡山大・資生研)

プログラム細胞死は、植物細胞において道管形成などの形態形成や病原菌への抵抗性などにおいて中心的な役割をになう重要な細胞機構であると考えられている。著者らはオオムギ根で、塩ストレスによって細胞死が誘導されることを報告してきた（Plant Cell Physiol. 37:169、38:1091）。塩ストレス環境下の他植物種でも似たように細胞死が誘導されることや、また他のストレス（UV など）でもやはり細胞死が誘導されることが報告されており、この現象がかなり普遍的であると思われるので、その初期過程をより深く理解することが重要であると考え、研究をおこなった。

動物細胞のアポトーシスにおいては、核 DNA の断片化に先立って細胞膜インテグリティーの崩壊が起こるとされている。すなわち、通常では細胞膜脂質二重層の細胞質側に局在するフォスファチジルセリン（PS）の局在がくずれ、細胞外から PS に特異的に結合するアネキシン V によって細胞が標識されるようになる。植物細胞でもこのような現象が起こるかどうか、オオムギ根、オオムギ培養細胞、およびイネ培養細胞からプロトプラストを単離して実験をおこなった。熱処理によって膜の半透性を失わせてから標識するとアネキシン V で標識されることから、細胞内に PS が存在することは確かであった。しかし塩ストレス処理によっては、いくつかの条件を試みてみたが、いずれも標識されるようにはならなかった。核の形態変化や FDA 染色性もプロトプラストにおいては、塩ストレスを受けた intact な細胞の反応とは異なっており、プロトプラスト化によって、細胞死誘導機構になんらかの影響があったのではないかと考えている。

1pG16

高濃度 NaCl 処理によるオオムギ根からのグルコース 6 リン酸の漏出

柴坂三根夫、秋山佳子、河崎利夫[1]、笠毛邦弘（岡山大・資生研、[1]四条畷学園女子短大）

高濃度塩類ストレスに対する植物の応答反応を理解するためには、高濃度塩類環境下で障害を受けにくい塩生植物の応答反応と比較することは重要である。我々は以前、オオムギ根は 200mM の NaCl で処理するとアデニル酸や糖リン酸のレベルが低下し、また膜の健全性も損なわれることを報告した。塩生植物アツケシソウの根は 200mM NaCl では障害を受けることはないが、細胞内のグルコース 6 -リン酸(G6P)のレベルはオオムギ同様低下した。今回は G6P の漏出量をオオムギとアツケシソウで調べたところ、オオムギ根では細胞外への G6P の漏出が塩ストレスにより増大したが、アツケシソウでは逆に G6P の漏出が減少した。

この結果はオオムギとアツケシソウの耐塩性の相違に膜の性質が大きく関与していることが示唆している。

1pG17

Vibrio alginolyticus 由来 Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子を導入した淡水性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の耐塩性

加来伸夫[1]，日比野隆[2]，高倍鉄子[3]，中村辰之介[4]，高倍昭洋[1,2]（[1]名城大・総合研究所，[2]名城大・理工，[3]名大・生物分子応答センター，[4]千葉大・薬）

細胞が NaCl や LiCl 等の塩に対して耐性を示すためには、様々な複雑な機構が必要であるが、その機構として細胞内の浸透圧調節、Na^+ や Li^+ の細胞外への汲み出し、および塩による酵素の失活防止などが知られている。本研究では、海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子を導入することにより、淡水性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の耐塩性を向上させることを試みた。

形質転換株の Na^+ および Li^+ の輸送能は、アンチポーター遺伝子非導入株であるコントロール株と比べて増強された。形質転換株とコントロール株は、非塩ストレス条件下ではほぼ同じ速度で増殖したが、LiCl 存在下では形質転換株の方が、NaCl 存在下ではコントロール株の方が速く増殖した。これらの原因を明らかにするために、形質転換株の電子伝達活性の解析を行うとともに、細胞内におけるアンチポーターの局在性についても調べた。これらの結果について報告する。

1pG18

塩性植物ホソバノハマアカザ(*Atriplex gmelini*)由来のNa^+/H^+アンチポーター遺伝子の単離とその性質

濱田玲，早川孝彦，庄野真理子[1]，夏濤[2]，林泰行，田中章（植工研，[1]農水省・国際農研，[2]農水省・農研センター）

乾燥気候下における可溶性塩類の集積は、植物の生育を阻害するため農作物の栽培に大きな障害となっている。我々は、液胞膜由来のアンチポーター遺伝子を植物に導入することにより、植物の耐塩性機能を高めることができると考え、まず、塩性植物であるホソバノハマアカザ（*Atriplex gmelini*）から液胞膜型のNa^+/H^+アンチポーター遺伝子の単離を試みた。

これまで報告のあったNa^+/H^+アンチポーター遺伝子の内、線虫・ラット・ヒト・CarcinusのNa+/H+アンチポーターと酵母のD9461.40遺伝子のタンパク質をアラインメントし、ホモロジーの高い部分のアミノ酸配列及び核酸配列の比較からミックスプライマーを作製した。これを用いてPCRで遺伝子増幅を行ったところ、約300bpの断片をクローニングすることができた。これを基に、3'及び5'RACE法により、全遺伝子領域の塩基配列を決定したところ、1つのORFを含み1,665 bp（554 amino acids）よりなる分子量61 kDaのタンパク質をコードしていた。データベースとのホモロジー比較により、酵母の液胞膜型のNa^+/H^+アンチポーターや動物、線虫のNa^+/H^+アンチポーターと18-28%のホモロジーを示した。親水性値・疎水性値を見たところ、10個の膜貫通ドメインを持っていることが明らかとなった。また、真核生物のNa^+/H^+アンチポーターに特徴的なアミロライド結合領域のコンセンサス配列を持っていた。これらのことより単離された遺伝子は、液胞型Na^+/H^+アンチポーター遺伝子であることが強く示唆された。現在、単離した遺伝子の機能解析を行う目的で、酵母の欠損株を用いた耐塩性にかんする相補実験を行っている。

2aG01

イネ *HKT1* 遺伝子の K^+、Na^+ 濃度による転写制御

堀江智明，仲山英樹，Julian I. Schroeder[1]，吉田和哉，新名惇彦（奈良先端大・バイオ，[1]Dept. of Biol., UC San Diego）

植物の耐塩性に寄与するイオン恒常性制御において、細胞内への K^+ の摂取、特に高親和性の K^+ 輸送系が重要であると考えられている。そこで、本研究では、イネ(*Oryza sativa* L.) の K^+ 取込み機構と耐塩性との関連を解明するために、高親和性 K^+-Na^+ 共輸送体をコードする *HKT1* cDNA を、通常種である日本晴と耐塩性種の pokkali から単離した (Ni-*rHKT1*、Po-*rHKT1*)。塩基配列から予想される Ni-rHKT1 と Po-rHKT1 のアミノ酸配列は 91% の相同性を有する（コムギ HKT1 と Ni-rHKT1 は 67%）。ノザン解析の結果、日本晴の根における Ni-*rHKT1* mRNA の蓄積量は、K^+ の欠乏によって顕著に増加するが、K^+ 欠乏条件でも 30 mM の Na^+ の存在によって減少することがわかった。現在、Po-*rHKT1* 遺伝子に関して同様の発現解析を行っている。

2aG02

マングローブ懸濁培養細胞における、塩ストレス下での液胞内イオン濃度と液胞形態変化。

堀田万利子，根本節子，SomkidSIRIPATANADILOK[1]，三村徹郎（一橋大・生物，[1]Kasetsart University）

我々は、マングローブ植物（*Bruguiera sexangula*）懸濁培養細胞を用いて、塩ストレス下における耐塩性植物細胞のイオン代謝過程の検討を進めている。無塩アミノ酸培地で継代培養している培養細胞を150mMNaCl添加培地に移すと、塩処理後1日目では一過的に細胞内 Na^+濃度が100mMまで急上昇するが、その後細胞膜 Na^+/H^+アンチポーターの働きによる Na^+の排出が生じ、Na^+濃度が正常状態に戻る（日本植物学会1997）。

本研究では、この塩ストレス下での Na^+の流入・排出過程において、細胞内のイオン分布がどのように変化するかを、プロトプラストとそこからの単離液胞を用いて検討した。塩処理後1日目では流入した Na^+の大半は液胞に蓄積し、同時に液胞 K^+濃度の低下がみられた。Na^+/K^+比は0.4から1.8へと上昇した。この値は1週間後には塩処理前の値近くに回復し、液胞から Na^+が排出されることが分かった。また、この過程における液胞形態を観察したところ、塩処理後1日目で、細胞体積中の液胞体積比が2倍以上に増加した。塩ストレス下での細胞内イオン分布機構とその調節に液胞が果たす役割について考察する。

2aG03

タバコ細胞におけるカルシウム溶液中でのAl処理に伴う原形質膜障害の解析

池側広志，山本洋子，松本英明（岡山大・資生研）

タバコ細胞のAl処理を、単純なCa溶液中で行い、単独ならびにFe(II)共存下でのAl処理による原形質膜障害について検討した。 Al単独処理では、カロースの分泌がみられるが、AlとFe(II)の同時処理でみられる脂質過酸化、カリウムイオンの漏出、Evans blueの取り込み(細胞死の指標) 等の原形質膜障害は見られなかった。 細胞へのAlの集積はAl添加直後から見られ、9時間目には添加したAlのほぼ全量が集積した。集積速度や集積量は、Fe(II)の有無に依存しなかった。Al単独処理12時間目の細胞にFe(II)を添加すると、脂質過酸化は直ちに、細胞死は数時間の遅れで各々促進された。一方、Al単独処理後の細胞を栄養培地に再懸濁し増殖能をみたところ、Al処理9時間目以降から徐々に増殖能を失い24時間目にはコントロール処理の18%まで低下した。Al単独処理24時間目の細胞は懸濁直後から細胞死がみられ、細胞死の約30%が増殖培地中のFe(II)イオンに依存した。以上の結果より、細胞へ結合したAlは、直接ではなく、増殖培地中のFe(II)など他のイオンとの相互作用によって原形質膜障害を引き起こすものと思われる。

2aG04

タバコ培養細胞を用いた脂質過酸化防御機構の解析 I. アルミニウム耐性細胞株の脂質過酸化耐性

山本洋子、岡本庄司、浜田博喜[1]、松本英明（岡山大・資生研、[1]岡山理科大・基礎理学）

タバコ懸濁培養細胞株SLと、SLを親株として分離したAl耐性株107ならびに213を用いた比較研究により、脂質過酸化に対する耐性機構を検討した。アルミニウム(Al)イオンは、細胞膜に結合して、鉄(Fe)イオン(II、III)の触媒する脂質過酸化反応を促進し細胞死を引き起こす。本研究では、脂質過酸化誘発剤としてFe(II)、*t*-Butyl hydroperoxide およびA23187を用いて検討したところ、各々の処理に伴う過酸化脂質生成量ならびに細胞死の程度が、Al耐性株において親株よりも低く、特に213株において顕著であった。従って、これらAl耐性株は、親株よりも高い脂質過酸化抑制能を獲得することによって薬剤耐性を示している可能性が高い。107株にはAlが促進する脂質過酸化に対して抗酸化活性を示すPhenylpropanoidsが蓄積しているが、その主成分はCaffeoylputrescineであると思われる。

2aG05

タバコ培養細胞を用いた脂質過酸化防御機構の解析 II. Caffeoylputrescineの抗酸化活性

朝倉由香里、山本洋子、松本英明（岡山大・資生研）

アルミニウム(Al)耐性を示す細胞株ALT107は、Alが鉄[Fe (II、III)]共存下に促進する脂質過酸化に耐性である。本研究では、親株に比べ、ALT107株が多量に生産するCaffeoylputrescine (CP)を抽出・精製し、その抗酸化活性を解析した。親株に、CP、Caffeic acid (CA)もしくはputrescineを添加し、Fe(II)共存下のAl処理、脂質過酸化誘発剤の*t*-Butyl hydroperoxideならびにA23187の処理を行うと、これらの処理のいずれにおいてもCPとCAは脂質過酸化および細胞死を抑制したが、putrescine には抑制効果が見られなかった。またCPおよびCAのAlとFe(II)に対するキレート能はわずかであった。以上の結果より、CPの脂質過酸化抑制活性は、CA の部分に依存し、金属イオンのキレートよりも電子供与体として脂質ラジカルの連鎖反応を抑制するものと思われる。

2aG06

タバコ培養細胞を用いた脂質過酸化防御機構の解析 III. アルミニウム耐性変異株のグルタチオンペルオキシダーゼ様活性

山口雪子,山本洋子,松本英明（岡山大・資生研）

タバコ培養細胞はアルミニウム(Al)と二価鉄による脂質過酸化によって増殖阻害を起こす。脂質過酸化耐性を示すAl耐性細胞株ALT107とその親株から調製した蛋白の粗抽出液を用いて、過酸化物消去に関わる抗酸化酵素活性を検討した。ALT107株のカタラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼならびにグルタチオン-S-トランスフェラーゼの各比活性は、親株の1.2～1.8倍とほとんど差が無かった。これに対し、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)様活性は、過酸化水素や*t*-ブチルヒドロペルオキシドの基質に対して親株の3倍以上の高い比活性を示し、ゲル濾過法にて低分子物質を除去することによりさらに増加した。一方、ALT107株のGPx様活性は、培地にセレンを添加しても増加せず、GPx活性阻害剤として知られているメルカプトコハク酸による阻害も受けなかった。なお、ALT107株の細胞内グルタチオン含量は親株と同程度であった。以上の結果より、ALT107株のGPx様活性が脂質過酸化物の消去に関わっている可能性が考えられる。

2aG07

ライムギにおけるアルミニウム耐性遺伝子の座乗染色体の同定

馬　建鋒、武田　真、楊　振明、武田和義、松本英明（岡大・資生研）

ライムギはコムギ連の中でアルミニウム（Al）毒性に対する耐性が最も強いことが知られているが、その耐性機構については未だ明らかにされていない。本研究ではライムギのAl耐性遺伝子の座乗染色体を同定するために、ライムギ（品種Currency）とコムギ（品種Chinese Spring）の交雑から得られた染色体構成の異なるライコムギのAl耐性を評価した。1R、2R、5Rまたは6R染色体がそれぞれコムギのDゲノム染色体に置換された系統のAl耐性はライコムギ親とほとんど同じであったのに対し、3R染色体の短腕(3RS)が3DSに置換された系統のAl耐性は顕著に低下した。このことはライムギのAl耐性遺伝子が3R染色体短腕に座乗していることを示している。次に、3DS.3RL置換型ライコムギ系統（ST22）と完全型ライコムギ系統（ST2）の間でAlに対する根の応答反応を比較した。異なるAl濃度による根の伸長阻害程度には、両系統間で5倍以上の差があることが明らかとなった。また同じAl処理濃度での根の先端のAl含量では、ST22がST2より倍以上の含量を示し、ST2においてAl排除機構が働いていることが示唆された。また、根の伸長に対するAlの影響を経時的に調べたところ、１２時間まで両系統ともAlによって根の伸長が同程度に阻害されたが、その後ST2だけで根の伸長が回復した。このことはST2においてAl耐性機構が誘導されていることを示唆している。さらに他の金属（Cd、Cu、La）による根の伸長阻害程度には両系統間で差がなく、3R染色体の短腕に座乗するAl耐性遺伝子は他の重金属ストレスに効果がないことが示唆される。

2aG08

講演取消

2aG09

NMR分光法によるラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7942の重金属結合タンパク質SmtAの構造化学的研究

藤井博史、阿部佳代、溝尾昌也、森田勇人、小佐田高史[1]、山崎俊夫[1]、京極好正[1]、林秀則（愛媛大院・理工・物質理、[1]阪大・蛋白研）

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7942のSmtAは、真核生物の重金属結合タンパク質、メタロチオネインのホモローグであるが、これまでに解析された真核生物のメタロチオネインとは異なった重金属結合様式をとる可能性がある。そこで原核生物から真核生物への重金属ストレス耐性機構の分子進化を解明することを目的として、SmtAの立体構造解析を行った。

試料として用いたSmtAは、GST融合タンパク質として大量発現させたものを精製し、GSTをスロンビンを用いて切断することで得た。安定同位体標識を行ったSmtAの多次元NMRスペクトルの解析の結果、β-シート構造が豊富に存在することと、他のメタロチオネインよりα-ヘリックスの含有率が高いことが明らかになった。また、12種類の部位特異的突然変異体について^{113}Cd-NMRスペクトルを測定し、各変異体と結合した重金属原子数と重金属原子の配位状態の変化から、重金属結合様式を推定した。これらの結果にもとづいて、SmtAと既知のメタロチオネインにおける重金属結合様式とを比較した。

2aG10

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC7942の転写因子SmtBによる細胞内重金属イオン濃度検知の分子機構

森田勇人、三浦　晃、小佐田　高史[1]、山崎俊夫[1]、京極好正[1]、林　秀則（愛媛大院・理工・物質理、[1]阪大・蛋白研）

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7942は、細胞内の重金属イオン（亜鉛イオン等）濃度が上昇すると、メタロチオネイン様タンパク質 SmtA の発現を誘導する。SmtBは *smtA* 遺伝子の発現を調節する転写因子である。通常SmtBは、二量体の状態で*smtA*遺伝子のオペレーター／プロモーター領域と結合し、SmtA の発現を抑制する。一方、細胞内の重金属イオン濃度が上昇すると、SmtBはこれらの重金属イオンと結合し、認識塩基配列との親和性が低下する。これにより SmtA の発現が誘導される。本研究では、大腸菌において大量発現させた、安定同位体標識されたSmtBを用いて、多次元NMRスペクトルを測定し、亜鉛イオンとの結合に伴うSmtBの構造変化を解析した。これまでに、(1) 1分子のSmtBは2原子の亜鉛イオンと結合する、(2) 1分子のSmtBに1原子の亜鉛イオンが結合した状態は不安定である、(3) 亜鉛イオンとの結合に伴い SmtB の二次構造は殆ど変化しない、(4) アミド末端側のフレキシブル領域に存在するシステイン残基は、亜鉛イオンの配位子として機能する、(5) その他の亜鉛イオンの配位子は、SmtB が二量体を形成する会合面の領域に存在することを明らかにした。

2aG11

部位特異的突然変異を導入したラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7942 の転写因子 SmtB の機能解析

三浦　晃、森田勇人、小佐田高史[1]、山崎俊夫[1]、京極好正[1]、林　秀則 (愛媛大院・理工・物質理、[1]阪大・蛋白研)

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の SmtB は、重金属結合タンパク質 SmtA をコードする *smtA* 遺伝子の転写を抑制するリプレッサーで、亜鉛イオンが SmtB に結合した場合、オペレーター/プロモーター領域との親和性を失い、 *smtA* 遺伝子の転写が誘導される。多次元 NMR スペクトルや X 線結晶構造の解析結果から、6 個のヒスチジン残基、3個のシステイン残基が亜鉛イオンの配位子と考えられている。本研究では、これらのヒスチジン残基、システイン残基をそれぞれセリン残基に変異させた SmtB の部位特異的突然変異体を大腸菌で大量発現させ、各変異体について亜鉛イオン、もしくは、オペレーター/プロモーター領域に対する認識特異性、親和性の変化をゲルシフト分析で調べ、各ヒスチジン残基、システイン残基の機能を解析した。その結果、例えばアミド末端側のフレキシブル領域にある 14 残基目のシステイン残基は、亜鉛イオンの配位子としては機能するが、*smtA* 遺伝子のオペレーター/プロモーター領域との相互作用には重要な役割を果たさないと推測された。

2aG12

重金属依存性の酸化障害におけるポリフェノール類の関与

崎浜靖子, 山崎秀雄（琉球大学・理・海洋自然）

Zn, Cd, Al 等の重金属は、植物の生育を著しく阻害することが知られている。特に Al は、酸性土壌における植物生育障害の主要因として広く研究が進められている。しかし、毒性メカニズムの詳細は未だ明らかではない。本研究では、Al 毒性にフラボノイド類やケイ皮酸類などのポリフェノールが関与することを報告する。

オオムギ根の過酸化脂質量は、$AlCl_3$ 処理によってコントロールの約 1.4 倍に増加した。このときの過酸化脂質分解産物は、チオバルビツール酸反応物質（TBARS）ではなく、主に 4-Hydroxynonenal（4-HNE）であった。in vitro のポリフェノール/西洋ワサビペルオキシダーゼ系においても、$AlCl_3$ によるリポソームの過酸化が見られた。$ZnCl_2$, $CdCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ 等の二価金属も、$AlCl_3$ と同様にリポソームの過酸化を促進した。以上の結果は、酸化還元に直接関与しない金属が、ポリフェノール共存下では酸化障害を誘発し得ることを示している。

2aG13

イネのオリゴ糖エリシターシグナル伝達におけるイオンフラックスの制御とタンパク質リン酸化

朽津和幸、菊山宗弘[1]、渋谷直人（農水省・生物研、[1]放送大・生物）

イネ培養細胞において*N*-アセチルキトオリゴ糖エリシターが細胞膜上の受容体[1]で認識されると、膜電位の脱分極[2, 3]、細胞膜を介したH^+ の流入とK^+, Cl^-の流出[4]、プロテインキナーゼの活性化とタンパク質リン酸化（本学会1998年度年会)、細胞質の酸性化 [4]、などの一連の一過性の初期応答を経て、数分以内に活性酸素発生[5]や遺伝子発現が[6]活性化される。活性酸素発生[5]や細胞質酸性化、遺伝子発現[7]はプロテインキナーゼ阻害剤K-252aにより阻害され、プロテインホスファターゼ阻害剤calyculin Aのみで誘導される。イオン選択性電極を用いた実験の結果、オリゴ糖エリシターで誘導される細胞膜を介した一連のイオンフラックスはK-252aによって顕著に阻害された。また同様のイオンフラックスはcalyculin Aのみによっても誘導された。一方膜電位の一過性の脱分極は、K-252aによる顕著な阻害が見られなかった。以上から、エリシター受容体による認識直後の初発反応として膜電位の脱分極が誘導されること、その後の多様なイオンフラックスの誘導にはタンパク質のリン酸化、脱リン酸化を介した調節機構が存在する可能性が示唆された。

[1] Ito *et al. Plant J.* 12:347 (1997); [2] Kuchitsu *et al. Protoplasma* 174:79 (1993); [3] Kikuyama *et al. Plant Cell Physiol.* 38:902 (1997); [4] Kuchitsu *et al. Plant Cell Physiol.* 38:1012 (1997); [5] Kuchitsu *et al. Protoplasma* 188:138 (1995) [6] Minami *et al. Plant Cell Physiol.* 37:563 (1996); [7] He *et al. Mol. Plant-Microbe Int.* 11: 1167 (1998).

2pG01

急激な温度低下による植物体のしおれと回復機構

村井麻理・小沢 聖 (東北農業試験場)

コマツナの耐凍性は、厳寒期には-15℃以下に達するが、低温に順化する前は－3℃程度の軽い凍結にも耐えられない。この未順化の植物体が急激な低温にさらされると、葉が一時的に激しくしおれたり凍害が発生する場合があり、栽培上の問題点になっている。植物が急激な温度低下によりしおれる現象は他の植物種でも見られる一般的な現象で、その原因として葉の気孔開閉機構の異常や吸水障害などが考えられているが、詳細は明らかでない。本研究の結果、コマツナでは、急激な温度低下により植物体が軽い水ストレスを受けると、速やかに気孔抵抗が高まることが確認され、吸水機能の低下がしおれの原因である可能性が示唆された。一方、その後の持続的な低温処理によりしおれから回復した植物体では、低温未順化のものより浸透ポテンシャルが 1MPa 程度も低かった。浸透ポテンシャル低下の大部分はグルコース、フルクトース、シュークロース、ラフィノースなどの糖含量の増加によるものである。細胞内でのこれらの溶質の蓄積は、単に凍害防御物質として機能するだけでなく、浸透ポテンシャルの低下を介して、冷温(0℃以上)条件での細胞脱水と、細胞外凍結による細胞脱水の両方を軽減させる効果を持つと考えられる。

2pG02

ハードニング中の小麦で発現するフルクタン代謝関連酵素遺伝子の単離と解析

川上 顕、吉田みどり（農水省・北海道農試）

低温感受性の植物がでんぷんを葉緑体に蓄積するのに対し、コムギやイネ科牧草などの低温耐性植物は同化産物のほとんどを水溶性多糖のフルクタンとして液胞内に蓄積する。フルクタンは種々のストレス耐性に関わっていることが報告されており、ハードニング中のコムギ品種においてはフルクタンの蓄積量がその耐凍性及び耐雪性に相関する。またフルクタンは０℃近くの低温においてもコムギ組織内で合成されていることが明らかとなっている（Yoshida et.al.1998）。本研究は、フルクタンの蓄積能力の高いコムギ(PI173438)を用いて、低温環境下のフルクタン代謝に関わる遺伝子の単離を試み、自然条件下でハードニングさせたコムギのクラウン部分からフラクタン代謝関連酵素遺伝子と相同性の高いクローンを２種類(WA,WB)単離した。塩基配列の解析から、糖代謝系酵素遺伝子に高く保存されている２つのアミノ酸配列（N-D-P-N-G、W-E-C-P/V-D-F）をそれぞれ持つことが明らかとなった。またクローン WA はオオムギの sucrose:fructan 6-fructosyltransferase と９５%、クローンWBはサトウキビの invertase と６５%の相同性を持つコムギでは新規の遺伝子であった。またクローンWBでは、液胞型の invertase に特異的に保存されている配列を持つことから今回単離された遺伝子も同様の機能を持つことが示唆された。

2pG03

イネと冬コムギからのオオムギ *blt101* 遺伝子ホモログのcDNAクローニングとその発現解析

小池倫也、川上顕、今井亮三、[1]大野清春
（農水省・北海道農試、[1]生物研）

冬コムギなどの越冬性植物では数々の低温誘導性遺伝子の存在が報告されている。これら低温誘導性遺伝子またはそのホモログがイネに代表される低温感受性植物にも遺伝子として存在するのかどうか、あるいはそれらが低温やその他のストレスによる発現誘導を受けるのかどうかについての知見は少ない。我々は冬コムギとイネからオオムギ(cv. Igri)の低温誘導性遺伝子 *blt101* と相同性を持つ cDNA クローンの単離を試み、それぞれの低温による発現誘導性について検討した。冬コムギ(PI173438)の cDNA クローン *wpi-6*(54 amino acids) は 5.9kD の酸性(pI 6.42)且つ疎水性の高いペプチドをコードしており、*blt101* とアミノ酸配列が完全に一致した。一方イネの cDNA クローン*osr-8*は*blt101* よりもC末端側が長い8kD (72 amino acids), pI 4.74 のペプチドをコードしていると推定された。blt101, wpi-6, osr-8 間では osr-8 の C 末端コード領域を除いて、アミノ酸配列がよく保存されていた。ノーザン解析の結果、4°C 処理をした冬コムギ(cv. Chihoku)では処理時間に依存して *wpi-6* とハイブリダイズする転写産物の蓄積が認められた。しかしイネでは *osr-8* は低温によっては発現が誘導されなかった。

2pG04

アラビドプシス Mitochondrial Uncoupling Protein をコードする新規遺伝子の単離

渡辺明夫、中園幹生、平井篤志（東大院・農学生命科学）

Uncoupling Protein（UCP）は哺乳類の褐色脂肪細胞などに多く見られるミトコンドリア内膜タンパク質で、電子伝達系により形成されるプロトン勾配を ATP 合成から脱共役させることで呼吸基質のもつ化学エネルギーを熱へと変換する働きを担っている。最近の報告から植物のミトコンドリアにも UCP が存在することが示され、プロトン勾配と ATP 合成を uncouple させる活性を持つことが確かめられた（*Nature* vol. 375, 24, 1995, vol. 389,135-136,1997)。また、UCP をコードする c DNA がアラビドプシスからも単離されており、その転写産物の蓄積が低温処理により増加することが示されている。一方でサザン解析などの結果から、アラビドプシスには UCP のアイソフォームは存在せず、単独の核遺伝子によりこのタンパク質がコードされているものと考えられていた。しかし、この知見は哺乳類で少なくとも３種類の UCP アイソフォームが存在し、それぞれが異なった組織で機能している事実とは異なっていた。

私たちは今回、アラビドプシスの新たな UCP アイソフォームをコードする c DNA の単離に成功し、高等植物でも哺乳類同様、複数の UCP アイソフォームが存在することを明らかにした。さらに、緑葉を低温環境下におくことでこのアイソフォームの転写産物の蓄積が顕著に増加することも確認した。本発表では主にアラビドプシス UCP 遺伝子の発現様式について報告する。

2pG05

低温馴化過程で蓄積するクワ（*Morus bombycis* Koidz）の ER タンパク質

宇梶　徳史、竹澤　大輔、荒川　圭太、藤川　清三
（北大･低温研）

演者らは ER の季節変化と耐凍性獲得との関連性について興味を持ち、研究を進めてきた。現在までの研究で、非常に高い耐凍性（LT_{50}＞-80°C）を示す冬期のクワ皮層細胞では、ER 内に特異的に蓄積する 2 つの主要なタンパク質、WAP20 及び WAP27、の存在を明らかにした。WAP20 に関しては cDNA の解析により、低分子量の熱ショックタンパク質と高い相同性を示すことを既に報告した。今回、WAP27 についても同様に cDNA クローンを単離して解析したところ、group 3 LEA タンパク質に共通してみられる、11 アミノ酸残基の繰り返し構造を有する親水性タンパク質であることが明らかになった。したがって WAP27 は ER 局在型の group 3 LEA タンパク質の 1 種であると考えられた。

2pG06

キクイモ塊茎を凍結処理することによって減少する細胞膜タンパク質（FSP-3）に関する研究

荒川圭太、花崎充、吉田静夫（北海道大・低温研）

致死的な凍結傷害を受ける温度（-10℃）まで緩速凍結したキクイモ（*Helianthus tuberosus* L）の塊茎（LT_{50}: -8℃）を、融解することなくそのまま細胞膜の抽出に供試してそのタンパク質組成を調べると、凍結組織由来の細胞膜画分では未凍結組織由来のものに比べて複数の高分子量タンパク質バンド（Frost Susceptible Proteins: FSPs）が減少することをすでに報告している。しかし、この FSPs の減少と植物の凍結傷害との関連性については何も明らかにされていない。

そこで本研究では、FSPs の中で最も量的に多い分子量 120 kDa の FSP-3 を未凍結組織の細胞膜画分より単離して、その特異抗体を調製し、イムノブロット法によって凍結処理に対する FSP-3 の挙動について分析した。その結果、塊茎を-3℃から-5℃、-10℃へと緩速凍結した場合、各凍結組織から調製した粗ミクロソーム画分の FSP-3 含量は徐々に減少する傾向を示した。

2pG07

発芽初期のアズキの低温障害

小嶋道之[1]、鹿島信康[1]、相沢修[1]、松川勲[2]、村田吉平[2]、伊藤精亮[1]（[1]帯畜大・生資科、[2]十勝農試・豆ニ科）

アズキは低温感受性植物であり、発芽期、4～5 葉期、開花期に受ける低温障害が収量に著しく影響を受けることから、各時期の低温障害機構を解析している。低温感受性の異なるアズキ 2 品種の発芽体を低温条件（昼 15℃、10h／夜 10℃、14h、75%遮光）で生育させた時、発芽期に低温に強い品種「アカネダイナゴン」の脂肪酸の不飽和型／飽和型の値はコントロールと同様に増大するが、発芽時に低温感受性品種である「斑小粒系-1」ではほとんど変化しないことを見出した。発芽時の低温ストレスにより、両品種の MGDG/PC 値ともにコントロールのそれよりも低かった。MGDG の脂肪酸組成は品種で異なっており、後者のそれはコントロールと同様であったが、前者のそれは 18:3 の割合が低く、16:0 の割合が高かった。低温に弱い品種である「斑小粒系-1」の発芽初期の生育阻害には、葉緑体脂質の合成系の阻害が関与しているのかもしれない。

2pG08

NMR顕微鏡によるシュロ葉の微細凍結様式の解析

石川雅也, 井出博之[1], William S. Price[1], 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、葉が過冷却で耐寒する植物、シュロの葉身の微細凍結様式を観察した。1～-21℃まで7℃間隔でプロトン密度画像を撮り(解像度31μm)、必要に応じて更に各像間の差を画像化した。表皮及び維管束通同組織は-10℃前後で凍結し、示差熱分析での最初のピークに相当した。他の葉肉組織等は-16℃まで安定な過冷却状態にあることが判った。葉肉細胞の凍結は非対称的に生じた。向軸側の柵状組織がまず-16～-19℃凍り、背軸側の海綿状組織は-19～-21℃で凍結した。柵状組織の凍結は繊維組織の周囲から開始するように観察された。また、下皮や維管束厚膜細胞は-22～-25℃まで過冷却した。これらの組織の凍結が熱分析での２次ピークを形成している。葉肉細胞の凍結は致死的で凍結傷害も向軸側に先に現れ、NMR画像での葉肉細胞の凍結温度域に合致した。シュロ葉肉細胞の凍結の単位は細胞或いは細胞群であると考えられ、維管束で囲まれたユニット構造は無関係であった。NMR顕微鏡は凍結の時間空間分布を微細に画像化できる。

2pG09

ウンシュウミカン（*Citrus unshiu* Marcov.）の低温応答遺伝子のcDNAクローニング

原　正和, 若杉佳功, 生駒吉識*, 矢野昌充*, 小川一紀*, 久保井徹（静大農・人環科, *農水省・果樹試カンキツ部）

カンキツ属*Citrus*には低温耐性を示すものが多いが、低温ストレスに関する遺伝子は単離されていない。ウンシュウミカンの低温適応の分子機構を明らかにするため、低温応答遺伝子を単離しその発現を調べた。ウンシュウミカン果皮のcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、dehydrinファミリーに属し、*Poncirus* COR19と相同なタンパク質CuCOR19のクローンを単離した。CuCOR19は、171アミノ酸残基からなる親水性タンパク質であり、リジンに富むモチーフを含む繰り返し構造と核移行性シグナルに似た配列をもっていた。本遺伝子は、ウンシュウミカンの成木地上部のあらゆる組織で発現していたが、果皮と節間での発現が強かった。ウンシュウミカンの葉を低温処理すると、本遺伝子の発現量は1日以内に増加し、5日後には最大となった。低温処理した葉を室温に戻したところ、mRNAの蓄積は速やかに減少した。

2pG10

コムギ根組織のα-リノレン酸の割合と小胞体局在型ω-3脂肪酸不飽和化酵素タンパク量の成育温度に依存した変化

堀口吾朗、川上直人[1]、児玉浩明、射場　厚（九大・理・生物、[1]明治大・農・植物工学）

高等植物の根組織のα-リノレン酸 (18:3) の全脂肪酸に占める割合は低温によって顕著に増加する。根組織に含まれる 18:3 の大部分は小胞体局在型ω-3 脂肪酸不飽和化酵素によって生成される。今回、同酵素をコードするコムギの *TaFAD3* 遺伝子の温度環境による発現様式を mRNA およびタンパクレベルで解析した。根端分裂組織を含む根の先端部では18:3 の割合は 30°C で 28% だったものが 10°C では 58% と大幅に増加した。しかし、この部分の *TaFAD3* mRNA レベルは 10°C と 30°C で比較してもわずか 1.4 倍程度の増加にとどまった。これに対し、根の先端部のミクロゾーム画分に含まれる TaFAD3 タンパクは 10°C では 30°C の約 7.5 倍多く蓄積し、低温による 18:3 の割合の増加は TaFAD3 タンパク量によって調節されていることが示唆された。これらの結果は、温度依存性の *TaFAD3* 遺伝子の翻訳または翻訳後調節が存在し、それが根端部での TaFAD3 タンパク量、最終的に 18:3 の割合を調節していることを示唆する。

2pG11

光化学系Ⅱ表在性タンパク質を欠損したラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803の高温耐性

木村愛子、森田勇人、林　秀則
（愛媛大院・理工・物質理）

光合成機能のなかで最も熱に影響されやすいのが酸素発生の過程であり、その熱安定性は植物全体の高温ストレス耐性と密接に関連していると考えられる。ラン藻の場合、この酸素発生複合体の熱安定性には、ルーメン側にあるマンガンクラスター近傍の表在性タンパク質、PsbO (33 kDa タンパク質)、PsbV (cyt c-550)、PsbU (12 kDa タンパク質) が関与していると考えられる。そこで、ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803について、これらのタンパク質をコードするそれぞれの遺伝子を破壊した形質転換体を作製し、それぞれの高温耐性を解析した。高温環境下で生育した場合、野生株では熱失活が起きる温度が上昇するが、Δ*psbU*株では熱失活温度の上昇は見られなかった。これは、12 kDaタンパク質が酸素発生系における高温環境への適応に必須の成分であることを示唆している。Δ*psbO*株、Δ*psbV*株においては、光合成活性が低いと同時に、熱失活の温度そのものも野生株より低く、光化学系Ⅱ複合体の熱安定性が大きく低下しているものと考えられる。

3aG01

ランソウ HtpG の機能

仲本　準　（埼玉大・理・分子生物）

我々は *Synechocystis* sp. PCC 7942 から *htpG* 遺伝子をクローニングし、本学会で既に発表した（田中直樹ら、1997 年度年会）。他の HtpG や Hsp90 と比較すると、本遺伝子の、ゲルダナマイシン結合ドメインを含む N 末端側の配列は高度に保存されていたのに対して、オリゴマー形成に関与すると考えられている C 末端側の配列には高い相同性は検出されなかった。ランソウ *htpG* 破壊株は、高温（45°C）及び低温（16°C）において、生育が著しく阻害された。また、通常の生育温度でも変異株の生育は阻害され、細胞当たりのフィコシアニン量が減少していた。この遺伝子産物を大腸菌で大量に発現させ精製した。非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析を行い、これが二量体を形成することを確認した。現在、HtpG の分子シャペロン活性の測定やこれが相互作用するランソウタンパク質の同定等を行っている。

3aG02

高等植物の葉緑体局在型低分子量熱ショックタンパク質を発現させたラン藻の高温耐性

天野剛志、森田勇人、林秀則（愛媛大院・理工・物質理）

低分子量熱ショックタンパク質(sHSP)は、高温ストレスによって発現が誘導される 15～30 kDa のタンパク質である。高等植物には、細胞内局在性が異なる5種以上の sHSP が存在する。他の生物より種類が多く、植物に特有の役割を果たしていると考えられている。これらの中で葉緑体に局在する sHSP の機能を明らかにするため、シロイヌナズナのHSP21 をラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 において発現させ、高温耐性に対する効果を解析した。

HSP21 の cDNA から移行シグナルを除いたコード領域をラン藻に導入して、HSP21 を構成的に発現させた。通常の生育温度（30℃）では、形質転換体の生育が野生株よりわずかに遅かった。しかし、48℃の高温で1時間処理したのち 30℃ に戻した場合、野生株はほとんど生育しなかったのに対し、形質転換体は生育した。野生株では、45℃、１時間の熱ショック処理を行えば、48℃、1時間の高温処理に対する耐性ができるのに対し、形質転換体ではラン藻自体の熱ショックタンパク質の発現が誘導されていない状態でも、高等植物の sHSP によって高温処理から細胞が保護されていると考えられる。

3aG03

高等植物における高温ストレスによる生体膜の構造変化

山根由裕、菓子野康浩、小池裕幸、佐藤和彦（姫路工業大学・理・生命科学）

植物の生葉に高温ストレスを与えると、LHCIIのPS II反応中心複合体からの解離とPS II反応中心の熱失活が、光合成系の主要な変化として起こることが分かっている。しかし、これらのタンパク質複合体の変化と膜構造の変化との対応関係は、これまではっきりとは調べられていなかった。そこで、細胞膜、葉緑体包膜、チラコイド膜の透過性の変化およびグラナスタッキングの構造変化の起こる温度について、ホウレンソウを材料にして調べた。

無傷葉緑体における515 nmでカロテノイドのエレクトロクロミックシフトの温度依存性を追跡すると、吸収変化の緩和速度が38°C付近より促進され、この温度でチラコイド膜の膜透過性が増大したことを示したが、これはLHCIIの解離が起こる温度と一致した。また、750 nmでの濁度は、50°Cで劇的な変化が起こり、葉緑体包膜がこの温度で変性することを示している。この50°Cという温度は、因果関係は不明だが、PS II反応中心の失活が起こる温度であった。

チラコイド膜を用いて、グラナ構造の変化を750 nmでの濁度変化で測定したところ、グラナの構造変化がチラコイド膜の他の構造変化よりも先に起こることが示された。一方で、細胞膜の透過性は、50°Cまでは影響を受けないことが示唆された。

3aG04

大麦における熱ストレスによるグリシンベタインの誘導
高倍鉄子、平井珠美[1]、Angelina Alvarez-Nakase、鈴木朗範、市原茂幸[1]、日比野隆[2]、田中義人[2]、高倍昭洋[2]
（名古屋大・生物分子応答研究センター、[1]名城大・農、[2]名城大・総合研究所）

大麦は塩、乾燥、低温ストレスにより、適合溶質グリシンベタイン（GB）を蓄積する。これまで植物が熱ストレスでGBを蓄積するかどうかは明らかにされていない。そこで大麦（春名二条）において熱ストレスでGB蓄積の誘導が起きるかどうかについて検討を行った。

発芽後７日目の大麦を湿度７０％に保った人工気象器の中で、温度を２５℃、３２℃、３７℃、４２℃と変化させ、４日間生育させた。葉におけるGBの蓄積量を調べた結果、３７℃で最も多くGBを蓄積していた。このときGBは２５℃（コントロール）のときよりも４倍に増大していた。さらに３７℃でGBの蓄積量の経時変化を調べたところ、１週間後にはコントロールの８倍にまで増加した。熱ストレスは低温ストレスと同様に水分含量の低下をともなっていた。大麦においては塩、乾燥、低温ストレスだけでなく、熱ストレスでもGBの蓄積が誘導されることが判明した。

3aG05

シロイヌナズナ *HSP18.2* 遺伝子の熱ショックに応答した翻訳制御
團迫智子、加藤晃、庄司猛、吉田和哉、新名惇彦
（奈良先端大・バイオ）

熱ショック遺伝子の発現は、熱ストレスに応答して、そのプロモーター領域に保存されている熱ショックエレメントに熱ショック転写因子が結合し、転写が活性化されることによって、主に制御されている。シロイヌナズナから単離された *HSP 18.2* 遺伝子は、植物に特徴的な低分子量熱ショックタンパク質をコードしている。本研究では、この *HSP 18.2* プロモーターおよびその 5'-非翻訳領域（5'-UTR）を GUS 遺伝子に連結し、熱ショック遺伝子発現における 5'-UTR の機能をタバコ培養細胞 BY2 を用いて調べた。5'-UTR を 10 bp まで欠失させた場合、転写レベルでは完全長 5'-UTR と同様に熱ショックに応答して、転写物の蓄積量が増加するにもかかわらず、GUS 活性の上昇が見られなかった。このことから、*HSP 18.2* 遺伝子の発現が転写レベルだけでなく、翻訳過程においても制御されている可能性が示唆された。

3aG06

CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL -LOCATED SMALL HEAT SHOCK PROTEIN FROM TOMATO (*Lycopersion esculentum* L.)
LIU Jian and Mariko SHONO
JIRCAS-OKINAWA Subtropical Station; Ishigaki 907-0002

A cDNA library was constructed with tomato leaf treated at 40°C for 6h. One clone, mt-sHSP, was screened out from the cDNA library with the probe of tomato mitochondrial-located sHSP gene conservative region. The probe was obtained by RT-PCR. According to phylogenetic analysis, the mt-sHSP gene was classified as a new member of plant mitochondrial-located sHSPs. Northern-blot was conducted to check the transcription of mt-sHSP gene in tomato. Additionally, GST fusion gene expression system was used to construct the recombinant gene for characterization of molecular chaperone function of Mt-sHSP. Mt-sHSP was cleaved from fusion protein by PreScission protease and purified. A high activity of molecular chaperone of Mt-sHSP *in vitro* was observed.

3aG07

葉緑体局在性低分子量 HSP の構成的発現
李炳顯，長谷川実加，山本直樹，徳富（宮尾）光恵（農水省・生物研）

葉緑体局在性低分子量 HSP（CtHSP）は，高温条件下でのみ発現する蛋白質であり，分子シャペロンとして機能すると考えられている。CtHSP を構成的に発現する形質転換タバコを作出し，高温ストレスに対する CtHSP の効果を検討した。

クロロフィル蛍光を指標として，緑葉の光合成系の高温耐性を検定した。緑葉葉片を高温にさらすと F_0 レベルが増大し，F_v レベルが低下する。５分間の処理で F_0 レベルが２倍に増大する温度，F_v レベルが 1/2 に低下する温度ともに，CtHSP の構成的発現で２度高温側にシフトした。この結果は，CtHSP が光化学系 II の高温耐性を増大させることを示している。次に，シャーレ内で生育させた幼植物の高温耐性を検討した。幼植物を 52 ℃で 45 分間処理したのち通常の生育条件（25 ℃，光照射）に移すと，葉が徐々に退色し数日で枯死にいたる。処理後暗所で生育させると再び正常に生育を始めることから，高温処理後の植物の枯死は光酸化ストレスによると考えられる。すべての非形質転換体が枯死する条件で 50%以上の形質転換体が生存したことがわかり，CtHSP が光酸化ストレスを抑制する可能性が示された。

本研究の一部は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた。

3aG08

タバコ・レトロトランスポゾン*Tto1*の病傷害ストレスによる活性化

武田真、杉本和彦、広近洋彦（農水省・農業生物資源研）

レトロトランスポゾンは、真核生物のゲノムに内在する転移因子であり、その幾つかは、ゲノムの進化に寄与してきたと推定されている。我々は、タバコの活性型レトロトランスポゾンである*Tto1*について、その動態や活性化機構を研究している。

*Tto1*は培養により転移が活性化されるほか、傷やウィルス感染などのストレスによっても転写が活性化される。また、根や花弁においても低レベルの*Tto1*の発現がみられる。最近、病傷害応答のシグナル分子の1つであるジャスモン酸の投与が、*Tto1* RNAの発現のみならず、逆転写反応による転移中間体の複製も誘導することが明らかにされた。

*Tto1*の転写調節領域を解析した結果、LTRに存在する13bpの繰り返し配列が、培養や傷、ジャスモン酸、病傷害応答エリシターによる活性化に関わるシスエレメントとして機能することが判明した。この配列は植物の防御応答遺伝子のプロモーターに保存された配列を含んでいた。さらにまた、アスパラガスの*PR1*遺伝子 (*AoPR1*)プロモーター内に、*Tto1*のプロモーター配列に類似した配列が見い出された。*AoPR1*プロモーターが*Tto1*プロモーターと共通したストレス応答性を示すことから、*Tto1*の祖先因子の転写調節領域への挿入が、*AoPR1*のこの様な発現制御の獲得に寄与した可能性が示唆された。

傷や病傷害ストレスによる活性化に関わる転写活性化因子として、13bp配列に結合するMyb様因子(LBM1)が既に単離されている（杉本和彦ら、投稿準備中）。さらにジャスモン酸応答性に関わる転写活性化因子の探索を現在行っている。

3aG09

チャにおける傷害誘導性蛋白質の解析

本間知夫，吉田克志（農水省・野菜茶試）

チャ(Camellia sinensis)の栽培では新芽の摘採や整せん枝などの作業により，繰り返し葉や枝が切断される。これは茶樹への傷害ストレスであり，その生理機能に様々な影響を与えていると思われるが，チャの傷害応答を調査した研究は見当たらない。今回，茶葉における傷害誘導蛋白質を調査した結果を報告する。

‘やぶきた’の若葉に切断傷害を与え，経時的にプロテイナーゼインヒビター(PI)活性および傷害応答関連酵素活性を測定したところ，PI，フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)，キチナーゼ(CHI)，ポリフェノールオキシダーゼ，リポキシゲナーゼおよびペルオキシダーゼの傷害による活性化が観察された。この傷害応答は若葉で顕著であり，成葉では弱かった。また，PI，PALおよびCHIの活性化は傷害葉の上位の無傷の葉でも誘導されること，ジャスモン酸メチルにより活性化されることが観察された。以上の結果，チャは多様な傷害応答機構を備えていることが示された。

3aG10

チャの傷害誘導性遺伝子の解析

吉田克志，本間知夫（農水省・野菜茶試）

我々はチャ(Camellia sinensis)の傷害応答に関する蛋白質・遺伝子の解析を進めている。茶葉では傷害によりプロテイナーゼインヒビター(PI)およびフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)が誘導されることから，傷害葉におけるこれらの遺伝子発現をトマトPIcDNAおよびチャPALcDNAをプローブとしてノーザン解析により調査した。トマトPIプローブではチャPIは検出できず，チャPIとトマトPIの差異が示唆された。PALmRNAについては，傷害葉とその上位葉における経時的な発現量の増加が観察された。次に，無傷葉と傷害葉から全RNAを分離し，differential display法を用いて傷害特異的遺伝子の単離を試みた。その結果，DNA結合蛋白質，ACC酸化酵素，hsp70と塩基配列の相同性が認められるcDNA断片が単離でき，これらの発現は傷害48時間後に増加することを確認した。以上の結果から，茶葉において多種の傷害誘導性遺伝子の発現が確認され，現在さらに詳細な解析を進めている。

3aG11

葉肉プロトプラスト単離時におけるストレス応答

渡辺正巳、鈴木久美子、田邊恵美子、呉崎[1]、渡邉幸雄　（千葉大・園・植栄、[1]マイクロテック・ニチオン（株））

ナタネとペチュニアの葉から葉肉プロトプラストを単離し、葉と葉肉プロトプラストについて、ポリアミン、アンモニア、アミノ酸含量、GS, GDH活性を比較した。

その結果、ナタネ葉肉プロトプラストでは、Putが増加しSpdが減少したのに対し、ペチュニアではSpdが増加した。アンモニア含量と遊離のアミノ酸含量は、ナタネ葉肉プロトプラストでは顕著に増加していた。したがって、ナタネ葉肉プロトプラストではタンパク質分解が起こっていると推定された。アンモニアの同化に関与しているGSとGDHの酵素活性について比較した結果、アンモニアを蓄積するナタネのプロトプラストで特に活性が増大した。

ナタネでは、傷害ストレスによってアンモニアの蓄積とGDHの活性化が起こることが報告されているので、過酸化水素の生成をナタネとペチュニアで比較した。その結果、両者ともにプロトプラスト単離時に過酸化水素の生成が認められた。経時的に過酸化水素の生成を比較したところ、酵素処理1時間後に最大となった。次に、ルミノールによって活性酸素の生成を測定した結果、ナタネとペチュニアでは、活性酸素の消長に差異が認められた。

3aG12

プラスチドω－３脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*FAD7*）の傷害誘導性におけるタンパク質リン酸化の関与

児玉浩明、西内巧、瀬尾茂美[1]、大橋祐子[1]、射場厚（九州大・理・生物、[1]農水省・生物研/JST・CREST）

シロイヌナズナ*FAD7*遺伝子は、葉緑組織で発現しているが、局所的な傷処理によって、葉組織のみならず、茎や根でも発現するようになる。この傷による発現応答は*FAD7*遺伝子のプロモーター領域により制御されている。*FAD7*遺伝子の傷害応答における情報伝経路について、とくにタンパク質リン酸化の関与について検討した。*FAD7*プロモーター領域をGUS遺伝子の5'上流に結合させた融合遺伝子を導入したタバコを用いて、タンパク質リン酸化、もしくは脱リン酸化反応阻害剤存在下での傷害応答性について調べた。その結果、特に茎組織において、リン酸化および脱リン酸化反応阻害剤のどちらにおいても*FAD7*プロモーターの傷害応答性が顕著に阻害された。また、傷害誘導性のMAPキナーゼ（WIPK)の発現が恒常的に見られる形質転換タバコおよび抑制されている形質転換タバコの茎組織では、*FAD7*遺伝子の傷害応答性がそれぞれ促進および抑制されることから、*FAD7*遺伝子の傷害誘導における情報伝達経路にタンパク質のリン酸化反応が関与することが示唆された。

3aG13

3種の異なる傷害誘導性ACC合成酵素遺伝子の発現調節機構の解析

渡邊敬浩、　酒井慎吾　　(筑波大・生物)

我々はすでに報告しているWSACS2に加え、新たに、傷害を与えたカボチャ中果皮組織を材料に、ACC合成酵素の保存領域をもとにデザインしたプライマーを使ったRT-PCRを行うことで2つの異なるcDNA断片(WSACS1とWSACS3)を単離した。これらWSACS1とWSACS3のコードする予想アミノ酸配列はそれぞれCS-ACS2に82.6％、CM-ACS2に82.6％の相同性を示した。

我々は現在までに、WSACS2の発現調節に対し、活性酸素群の一つに数えられるスーパーオキサイドと,ジャスモン酸がその発現を誘導することを報告している。

WSACS1とWSACS3の発現は、スーパーオキサイドの産生系であるNAD(P)H-oxidaseの阻害剤であるDPI (diphenyleneiodonium)によって阻害されたのに加え、ジャスモン酸によっても阻害された。

3pG01

傷によるタバコERF遺伝子の発現誘導機構の解析

○西内　巧[1,2]、鈴木　撃[1]、北島佐紀人[3]、佐藤文彦[4]、進士秀明[1]
([1]工技院・生命研・植物分子生物、[2]科学技術振興事業団、[3]京大・RIセ、[4]京大・農・農化)

タバコERF(エチレン応答性転写因子)2,3,4遺伝子の傷に対する発現応答の制御機構について解析を行っている。植物体の葉を切り離さずに傷をつけることによって解析したところ、いずれのERF遺伝子についても傷周辺の組織において、局所的に非常に早い発現誘導が見られた。また、傷をつけた個体の無傷の葉においても発現誘導が見られ、ERF遺伝子が傷による非常に迅速な全身的応答を示すことを見い出した。局所的及び全身的傷応答のどちらにおいてもERF3遺伝子が最も顕著な発現応答性を示した。接触刺激によっても、局所的にERF2,3,4遺伝子の一過的な誘導が見られたが、全身的な誘導は見られないことから、ERF遺伝子の傷応答は接触応答とは異なる機構で誘導されていることが示唆された。また、ERF遺伝子はエチレンのみならずジャスモン酸によっても弱い発現誘導を受けるが、ジャスモン酸およびエチレン合成阻害剤の前処理では、ERF2,3,4遺伝子の傷による局所的な発現誘導は阻害されなかった。

さらに、各ERF遺伝子のpromoter領域をGUS遺伝子に結合させた融合遺伝子を導入した形質転換タバコを用いて解析した。ERF2,3,4promoter::GUS導入タバコのいずれにおいても、GUS活性およびGUSmRNAについて、ERFmRNAと同様に傷による発現誘導が見られた。さらに、ERF3promoter::GUS導入タバコの幼苗期において、全身的な傷害応答性を示すことが明らかになった。以上の結果から、ERF遺伝子は傷により、ジャスモン酸やエチレンの合成に非依存的に、迅速な局所的および全身的な発現誘導を示し、その発現誘導は転写の活性化により制御されていることが示唆された。

3pG02

TMV感染による壊死斑形成過程や傷害により誘導される２種の新規タバコペルオキシダーゼ遺伝子の発現特性

平賀勧[1,2], 伊藤浩之[1], 山川博幹[2,3], 光原一朗[2,4],
大坪憲弘[2,4], 松井博和[1], 本間守[1], 大橋祐子[2,4]
([1]北大・農・生機化、[2]JST・CREST、[3]筑波大・生物、
[4]農水省・生物研)

TMV感染による壊死斑形成過程初期のタバコ葉cDNAライブラリーから2種の新規ペルオキシダーゼアイソザイムをコードするcDNA（tpoxC1, tpoxN1）を単離した．*tpoxC1*は壊死斑形成過程で誘導されるが物理的傷害では誘導されず，逆に*tpoxN1*は物理的傷害により誘導されるが壊死斑形成過程では誘導されなかった.タバコ葉ディスクをサリチル酸やジャスモン酸で処理したところ，酸性*PR-1*のmRNAはサリチル酸で，塩基性*PR-1* mRNAは傷害およびジャスモン酸で誘導されたが，*tpoxC1*はサリチル酸，ジャスモン酸いずれに対しても応答せず，*tpoxN1*は傷害による誘導がジャスモン酸により抑制された．これらの結果から，TMV感染による壊死斑形成過程あるいは傷害によるこれらのPOX遺伝子の発現誘導は，タバコPR1～5タンパク質遺伝子群で明らかとなっているものとは異なったシグナル伝達経路を介していることが示唆される．

3pG03

トマトモザイクウイルス（ToMV）の移行蛋白質に結合する植物側蛋白質遺伝子の単離

松下保彦、出口雅一、養田勝、渡辺雄一郎[1]、西口正通[2]、丹生谷 博（東京農工大・遺伝子、[1]東京大・生命環境科学、[2]農業生物資源研究所）

トマトモザイクウイルス（ToMV）の移行蛋白質は、ウイルスの宿主細胞間移行にとって必須であり、宿主特異性に関与していることが報告されている。我々は、植物ウイルスの宿主細胞間移行の分子機構を明らかにすることを目指し、移行蛋白質と相互作用する植物側因子の研究を開始した。これまでに、ToMV 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、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が移行蛋白質をリン酸化することを明らかにした。今回、移行蛋白質に結合する植物側蛋白質遺伝子を単離する目的で、大腸菌で発現・精製したToMV 由来の GST 融合型移行蛋白質をプローブとして、lambda-GEX5 ベクターを用いて作成した発現 cDNA ライブラリーを検索した。その結果、数種類の陽性クローンを得た。現在、塩基配列の決定などクローンの解析を行っているので、これらの結果をあわせて報告する。

3pG04

植物病原細菌*Pseudomonas avenae*によってイネ培養細胞に誘導される細胞死の特徴解析

蔡晃植、若崎由香、田中則子、岩野恵、高山誠司、門田育生[1]、磯貝彰（奈良先端大・バイオ、[1]農水省・農環研）

*Pseudomonas avenae*は単子葉植物を宿主とし、褐変、屈曲等を引き起こす植物病原細菌である。本菌の菌株間における宿主特異性は非常に厳密であり、それぞれの菌株が感染できる植物種は１種または数種に限定される。我々は、本菌の宿主特異性機構を明らかにすることを目的として研究を行い、本菌の宿主特異性には抵抗性誘導の有無が関与することを明らかにした。今回、イネに対して親和性の菌株と非親和性の菌株を用いて、イネ培養細胞に誘導される細胞死について解析したので報告する。

親和性・非親和性菌株をイネ培養細胞にそれぞれ接種したところ、非親和性菌株を接種した培養細胞では急速な細胞死が認められた。一方、親和性菌株を接種した培養細胞では急速な細胞死は認められず、接種10時間後から徐々に細胞死が誘導されることが明らかとなった。さらに、非親和性菌株によって誘導される細胞死は核DNAの断片化を伴うが、親和性菌株によって誘導される細胞死はこの様な断片化を伴わないことも明らかになった。また、それぞれの菌株を接種した培養細胞を電子顕微鏡で観察したところ、非親和性菌株を接種した培養細胞でのみ細胞質凝集等のアポトーシスに特徴的な形態変化が認められることが明らかになった。

3pG05

低分子量GTP結合タンパク質を過剰発現させたタバコの病原体抵抗性が増大する原因の解明

依田　寛、草野　友延、佐野　浩（奈良先端大・遺伝子教育研究センター）

DNAメチル化の阻害剤アザシチジン処理で誘導された矮化イネでは低分子量GTP結合タンパク質遺伝子(rgp1) mRNAが減少していた。rgp1をタバコに導入し、過剰発現させた組換え体タバコA2は、タバコモザイクウイルス(TMV)に対する抵抗性が増大した。これまでに、A2は傷害によって内生サリチル酸含量が増加し、酸性PRタンパク遺伝子が誘導せれることが分かっている。私たちはTMVータバコの温度シフトの系でA2を用い、病原体抵抗性の機構の解明を目的とした。

温度シフトの系でも壊死斑の広がりが少ないことより、TMVに対する抵抗性増大が再確認された。TMV感染によりA2では、内生サリチル酸含量が野生型の数倍増加することが示された。また、ノーザン法により病傷害によって誘導される既知遺伝子の発現様式を調べた。また一方で、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法を用いて原因遺伝子の単離を試みており、TMV感染により誘導される新規なタンパク質をコードする遺伝子の単離についても併せて報告する。

3pG06

傷害刺激によってオオムギ細胞に誘導される侵入抵抗性へのアクチン繊維の関与

古橋千穂，小林一成（三重大・生物資源・植病）

植物の細胞骨格は種々のストレスに応答して適応的に再配列する。我々は、植物細胞のアクチン繊維が糸状菌からの攻撃に応答して大規模に再配列し、抵抗性発現に重要な役割を果たすことを見出した。今回は、糸状菌侵入に伴う物理的刺激がアクチン繊維の関与した抵抗性誘導の引き金になりうるか否かを検討した。糸状菌侵入に伴う物理的刺激を模倣するため、マイクロインジェクション針およびパーティクルガンによりオオムギ子葉鞘細胞に微細な傷をつけた。この細胞にオオムギうどんこ病菌（*Erysiphe graminis hordei*）を接種すると、感染率は対照区に比べ有意に低下し抵抗性が誘導された。いずれの刺激を与えた場合にも、子葉鞘をアクチン重合阻害剤、cytochalasin A で処理すると抵抗性の誘導は完全に阻害され、*Egh* の感染率は対照区のレベルにまで回復した。以上の結果は、微細な傷害刺激によって誘導される抵抗性にアクチンが関与することを示唆している。オオムギ細胞におけるアクチンの一過的大量発現がこの抵抗性に及ぼす影響を現在検討している。

3pG07

タバコ Rac 遺伝子発現の病傷害ストレス応答性

加藤丈幸、小林一成（三重大・生物資源・植病）

糸状菌の侵入行動に対してアクチン繊維は特徴的な配向変化を示し、その制御機構は抵抗性発現と密接に関係していると考えられる。動物や酵母では、アクチン細胞骨格の制御に Rac や Cdc42 を含む Rho ファミリー低分子量G蛋白質が中心的な役割を果たしていることが分かっている。今回は、タバコ BY-2 細胞由来の cDNA ライブラリーより 4 つの Rac ホモローグをクローニングし、病傷害ストレスを与えた植物体における発現解析を試みた。病原菌（*Erysiphe cichoracearum*）、非病原菌（*E.pisi*）接種、または、傷害処理を施したタバコ葉における各遺伝子の発現を調べた結果、発現パターンに特徴的な変化が認められ、Rac 遺伝子が病傷害ストレスに応答して転写制御される可能性が示唆された。動物では Rho や Rac の活性は GEP や GAP 等の制御蛋白質によって調節されており、Rac の転写調節は重要でないと考えられている。これに対して、植物の病傷害ストレス応答では、 Rac の活性調節のために遺伝子の転写制御が重要である可能性が示唆された。

1aH01

緑色非硫黄細菌 *Chloroflexus aurantiacus* の染色体 DNA ライブラリーの導入による紅色細菌 *Rhodobacter capsulatus* のプロトクロロフィリド還元能の相補

中原昌明、服部明彦、Jin Xiong[1]、Carl E. Bauer[1]、井上和仁 （神奈川大・理・応用生物、[1]Dept. Biol., Indiana Univ.）

クロロフィル類の生合成過程におけるプロトクロロフィリドの還元には光依存型と光非依存型の二つの酵素反応系が知られている。紅色細菌 *R. capsulatus* には、光非依存型の酵素反応系だけが存在し、この反応系には少なくとも 3 つの遺伝子 *bchB,bchN,bchL* が関与している。今回、接合伝達性コスミド pJRD215 をベクターとして *C. aurantiacus* の染色体 DNA ライブラリーを作成し、これを 3 種類の *R. capsulatus* 株、JDB (*bchB*::Km)、JDA(*bchN*::Km)、ZY5(*bchL*::Km)に、それぞれ接合により導入後、光独立栄養的に置いたところ、いずれの株もプロトクロロフィリド還元能が相補され、Bchl*a* の合成が見られた。ZY5 相補株よりライブラリー由来のコスミドを単離後、塩基配列を解析した結果、*bchB*、*bchN*、*bchL* とメタン細菌のヒドロゲナーゼ補酵素 F420 β サブユニットと相同性の高い ORF がクラスターを形成していた。

1aH02

ラン藻*Synechocystis* sp. strain PCC6803の*ndhB*遺伝子変異によるCO_2輸送活性の選択的阻害

大河浩、園田雅俊、小川晃男（名大・生物分子応答研究センター）

ラン藻は光によって駆動される無機炭酸輸送系を持っている。作用スペクトルによる解析から光化学反応系I（PSI）は主にCO_2輸送にエネルギーを供給するということが示されている。また、NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ（NDH1）は、PSI循環的電子伝達を構成している一つであることが明かにされている。これらのことから、CO_2輸送はPSI循環的電子伝達により駆動されていると考えられる。HCO_3^-輸送も同様の系で駆動されていると考えられていたが、最近、光合成電子伝達の人工的電子受容体と阻害剤を用いた研究により、HCO_3^-輸送はPSIIからPSIへの直線的電子伝達によって駆動されていることが報告された。

そこで我々はCO_2とHCO_3^-のそれぞれの輸送にNDH1依存のPSI環状的電子伝達がどの程度関与しているかを明らかにすることを試みた。PCRによって*ndhB*遺伝子にランダムな変異を与えることにより、幾つかの性質の異なる変異株を得ることができた。それらの変異株のCO_2とHCO_3^-輸送や種々の条件下での生育を調べた。その結果、CO_2輸送には、NDH1依存のPSI環状的電子伝達が大きく関与しているが、HCO_3^-輸送には、大きく関与していないことが明らかになった。

1aH03

ラン藻 (*Synechocystis* sp.PCC6803) ゲノム全領域をカバーする高密度遺伝子フィルターの開発と利用

金子貴一、中村保一、笹本茂美、出澤久美、田畑哲之（かずさDNA研）

単細胞性のラン藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 はゲノム全領域の配列解析がすでに完了している。昨年度の本大会では、挿入断片の平均長が1.5kbのM13クローンDNAを高密度にドットすることによりPCC6803 ゲノムの大部分をカバーする遺伝子フィルターを試作し、これを用いて転写産物量の変化を検出することが可能であることを報告した。今回は、試作フィルターでカバーされていなかったゲノム上の領域をPCR産物で補うことで全ゲノムをカバーする遺伝子フィルターを作成し、これを用いて環境により転写産物量が変化する遺伝子の検出をおこなった。今回比較した条件は、光独立栄養条件下で増殖中の PCC6803、および増殖後に暗所処理、増殖後にグルコース添加処理したものである。それぞれから抽出したRNAを標識した後に、遺伝子フィルターに対してハイブリダイゼーション実験をおこない、結果を比較した。検出したスポットはその位置をゲノム全塩基配列と対応させることで転写量が増減した遺伝子を同定した。

1aH04

光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*の硝酸還元系遺伝子

劉惠萍、滝尾進、佐藤敏生、山本勇（広島大・理・生物）

光合成細菌*R. sphaeroides* f. sp. *denitrificans*は脱窒を行う。ペリプラズム局在性硝酸還元酵素の遺伝子をクローン化し昨年の本大会で*napFDA*の各遺伝子構造と各コード蛋白質の特徴を報告した。今回、すべての硝酸還元酵素の遺伝子の塩基配列を決定し、見い出された遺伝子の硝酸還元との関連を各遺伝子変異株を作成して検討した。

全長7.5 kbpのDNA断片に七つの遺伝子を見い出し*napKEFDABC*と命名した。それぞれの遺伝子にΩを挿入して作成した変異株は硝酸呼吸による増殖ができず、硝酸還元酵素活性の硝酸による誘導も、ひき続いて起こる亜硝酸還元酵素の誘導も見られなかった。*napD*変異株に*napKEFDABC*を持つプラスミドをそ接合導入すると、増殖、酵素活性ともに回復した。さらに、*napD*変異株は失っていた脱窒能も回復した。以上より、*napKEFDABC*は一つの遺伝子オペロンを構成していること、そして本菌には細胞膜結合性の硝酸還元酵素も報告されているが、ペリプラズム局在性硝酸還元酵素系が脱窒を担っていることが明らかになった。

1aH05

光合成細菌の新規ABCトランスポーター

原　郷美、松崎雅広、佐藤敏生
（広島大、理、生物科学）

脱窒光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides* f .sp. *denitrificans*のペリプラズム局在分子シャペロン様タンパク質を分離する過程において、グルコース、ピルビン酸では誘導されずにリンゴ酸で多量に誘導される分子量約38kDaの新規タンパク質を見出し、分離した。本研究では、この新規タンパク質の生理的役割を検討した。

ゲノムDNAから遺伝子を分離した。塩基配列より推定されるアミノ酸配列からは25%以上の相同性を示すタンパク質は認められなかった。この遺伝子の下流には、ABCトランスポーターのチャンネルを構成する膜タンパク質に特徴的なループをもつタンパク質が存在していた。以上の結果から、このタンパク質は新規のABCトランスポーターの基質結合タンパク質であることが示唆された。

1aH06

光合成細菌のペリプラズムにおけるDppAタンパク質の分子シャペロンとしての機能

木曾雄三、松崎雅広、山本勇、佐藤敏生　（広島大・理・生物科学）

DMSOレダクターゼ（DMSOR）は、脱窒光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* のdimethyl sulfoxide（DMSO）呼吸の末端還元酵素である。私達はこれまでDMSORのin vitroでのリフォールディング系を用い、ペリプラズムに局在する分子シャペロン様タンパク質として、DppAを分離した。このタンパク質は変性ウシ肝臓ロダネーゼの凝集も抑制し、ペリプラズムにおける分子シャペロンとして機能していると推定した。本研究では、in vivoでのDMSORのフォールディングに対するDppAの役割を検討した。

光合成細菌のゲノムDNAから遺伝子を分離し、相同組換えによりオメガカセットを構造遺伝子内に同方向と逆方向に挿入した遺伝子破壊株を構築した。得られた遺伝子破壊株はDppAが欠如していることと、ジペプチドを唯一のC源とした時増殖速度が低下していることを確認した。逆方向へ挿入した株は、ペリプラズムのDMSORタンパク質は減少し、DMSO呼吸のみによる生育が認められなかった。この株は相補実験によっても、DMSO呼吸による生育は認められなかったが、ペリプラズムのDMSORタンパク質は野性株と同じレベルまで回復した。以上の結果からDppA様タンパク質がin vivoでも、ペリプラズムにおいて分子シャペロン的機能を担っていることが示唆された。

1aH07

Rhodobacter sphaeroides f. sp. *denitrificans*から精製したDMSO呼吸系遺伝子の転写活性化因子DmsRのリン酸化とDNA結合

大島義紀、宇治家武史、山本勇、佐藤敏生（広島大・理・生物科学）

R. sphaeroides f. sp. *denitrificans*のDMSO(dimethyl sulfoxide)呼吸系遺伝子*dmsCBA*の嫌気条件におけるDMSOによる誘導発現には二成分制御系のsensor kinase DmsSとresponse regulator DmsRが関与している。*dmsCBA*の上流に4個のDmsR boxモチーフが存在し、DmsRの結合部位と予想している。本研究では*dmsCBA*の転写制御機構を解明するためにDmsRのリン酸化とDNA結合能の関係を検討した。

DmsR のN末端に6×His-tagをもつように*dmsR*遺伝子を改変し、本菌の*dmsR*変異株で発現させたところ、生成された蛋白質はDmsR boxをもつDNAに結合し、DMSO還元酵素のDMSOによる誘導生成も起こった。Ni-NTA affinity chromatographyによって28kDaの6×His-DmsR蛋白質を得た。6×His-DmsRをアセチルリン酸やカルバモイルリン酸とインキュベートしたところ二段階のゲルシフトが見られた。box1またはbox2に変異を持つDNAへの結合は起こらず、box3変異の場合は一段のゲルシフトで、box4変異では二段のシフトであった。以上の結果からDmsRはリン酸化されると4つのDmsR boxすべてに結合して転写活性化を起こすことが示唆された。

1aH08

ラン藻*Synechococcus* PCC6301株ゲノムの整列クローンバンクの作製（２）

杉田千恵子[1]、原由里子[1]、横田はるみ[1]、間瀬明日香[1]、鈴木　徹[1]、Nikolay TZVETKOV[1]，杉田　護[1,2]、杉浦昌弘[1]（[1] 名大・遺伝子、[2] 名大・人間情報）

単細胞性ラン藻*Synechococcus* PCC6301（*Anacystis nidulans* 6301）株のゲノムは2.7 Mbの大きさをもつ。PCC6301株のゲノム構造を詳細に調べるために、ゲノムの全領域をカバーするクローンバンクの作製と部分塩基配列の決定を行った。ゲノムDNAを*Pme* Iまたは*Swa* Iで切断、または*Pme* Iと*Swa* Iで２重切断して得られたDNA断片に特異的なλDashIIサブライブラリーを作製した。各サブライブラリーについて遺伝子プローブやリンキングクローンを起点としたウオーキング法によりクローンの整列化を進め、現在までに、ゲノム全体の約９０％をカバーするλDNAクローンを整列化した。また，全てのλDNAクローンの挿入DNA断片の両末端部の塩基配列を決定したのでその結果も合わせて報告する。

1aH09

テントキシンのラン色細菌に対する作用

斉藤勇仁, 持丸真里, 桜井英博
（早稲田大・教育・生物）

環状テトラペプチドのカビ毒テントキシンは、種特異的に感受性高等植物の白化を引き起こすが、われわれはラン色細菌 *Anacystis nidulans* も感受性であることをすでに報告している。テントキシンの主な作用部位は葉緑体 F_1-ATPase で、βサブユニットの機能未知なβバレルドメインにその結合部位があると言われている。テントキシンは単離 F_1 の ATPase 活性を濃度依存的に阻害／促進するという特異な性質を持つ。

ラン色細菌 13 種について、培地にテントキシンを加え、成長に対する影響を調べたところ、*Anabaena variabilis* などがテントキシン感受性であった。テントキシン感受性の *Synechococcus* sp. PCC 7002 を突然変異誘発剤(MNNG)で処理し、テントキシン耐性を獲得した変異株を得た。野生株及び変異株より F_1-ATPase を単離精製し、テントキシン濃度の活性に対する作用を比較した。

1aH10

クラミドモナスのフェオホルビドａピロ化酵素

土井道生、田川智加江[1]、岡山繁樹（九州大・理・生物、[1]福岡女子大・人間環境）

クラミドモナスクロロフィルｂ欠損株は生育途中にクロロフィルａの分解に伴い藻体が黄化し、細胞外に水溶性の赤い色素を排出する。この赤色色素（P535）はメタノール中で535ｎｍに吸収極大を示し、分光学的特徴、クロム酸分解産物の分析結果などからクロロフィルａに由来する開環テトラピロール構造を持つことが示唆された(化学的構造については現在検討中)。in vivo におけるP535の生成は酸素供給を制限することにより抑えられ、かわりにクロロフィリドａ、フェオホルビドａ、ピロフェオホルビドａが蓄積される。これらの結果はクロロフィル分子がクロロフィラーゼ、Ｍｇ－脱離酵素、ピロ化酵素の作用を受けた後、酸素に依存して開環反応を受けP535が生成されることを示唆する。本講演ではクラミドモナスで新たに見いだされたフェオホルビドピロ化酵素の性質とP535生成との関連性について報告する。

1pH01

ダイコンのシンク能の発達　1.ダイコン／シュート比の大きな栽培種の場合。

臼田秀明、出村拓[1]、下河原浩介、福田裕穂[1]
帝京大学、医学部、化学。[1]東京大学・理学系研究科。

シンク能の実体はその重要性に拘わらず未解明の点が多い。下胚軸が生長の初期から著しく肥大するハツカダイコンを用いて、シンク能の実体を明らかにするために、播種後3-21日の間、乾物重、シンク活性（ある時の単位重、単位時間当たりの重量の増加）、炭水化物含量、しょ糖分解関連の酵素活性、蛋白のプローフィール、構造等の変化を解析した。シンク活性は3.5日で、0.044g/g/day、15日で0.65g/g/dayと著しく増加した。また、シンク活性とsucrose synthase(Susy)の活性（存在量）間には高い相関があった。しかし、シンク活性とinvertaseの活性間には相関は無かった。また、しょ糖含量とSusyの活性（存在量）間にも相関があった。師管の発達も顕著であり、シンク能の発達の際のSusyの時間、空間的発現（調節）をしょ糖濃度の変化と関連させて解明することが今後の課題である。

1pH02

ダイズの source-sink モデル植物を用いた高 CO_2 濃度の成長及び光合成への影響に関する研究

1．高 CO_2 濃度の成長及び光合成能へ及ぼす影響

国仲真琴, 川村ひとみ, 渡辺晃樹, 佐藤篤, 葛西身延, 澤田信一（弘前大・農学生命科学部・生物機能）

我々は、これまでダイズの初生葉から作った source-sink モデル植物を用いて、光合成の source-sink 制御機構について研究を進めてきた。その結果、このモデル植物が環境要因による光合成代謝の制御機構の解析に極めて有効であることが明らかとなった。そこで、このモデル植物を高 CO_2 濃度による光合成代謝の制御機構の解析に用いた。

モデル植物を 350ppmCO_2(Control条件)及び700ppmCO_2（HighCO_2 条件）で水耕し、成長と光合成能について比較した。HighCO_2 条件では Control 条件に比べて、1)葉面積当たりの根と葉の乾重増加速度が大きく、2)葉の sucrose と starch 含量も大きく増加した。3)HighCO_2 条件に置かれた植物の 700 及び 350ppmCO_2 での光合成速度は生育に伴って低下したが、Control 条件に置かれた植物の 350ppmCO_2 での光合成速度は実験期間を通じて一定であった。HighCO_2 条件で生育した植物では、光合成速度と葉の sucrose 含量の間に高い負の相関関係が認められた。また、HighCO_2 条件で生育し光合成速度の低下した植物を 48hr 暗処理すると、低下していた光合成速度は完全に回復し、葉に蓄積していた sucrose は減少した。

1pH03

ダイズの source-sink モデル植物を用いた高 CO_2 濃度の成長及び光合成への影響に関する研究
2．高 CO_2 濃度による光合成の source-sink 制御機構

渡辺晃樹, 国仲真琴, 川村ひとみ, 佐藤篤, 葛西身延, 澤田信一
（弘前大・農学生命科学部・生物機能）

ダイズの初生葉から作った source-sink モデル植物を 350ppmCO_2（Control 条件）及び 700ppmCO_2（HighCO_2 条件）で水耕し、その光合成代謝について比較した。HighCO_2 条件で生育した植物の 350 及び 700ppmCO_2 での光合成速度は生育とともに低下した。しかし、Control 条件で生育した植物の 350ppmCO_2 での光合成速度は実験期間を通じて一定であった。HighCO_2 条件に置かれていた植物では、光合成速度の低下に伴って、RuBPcase の Initial activity は低下したが、Total activity は低下せず Control 植物とほぼ同じ高い値であった。

HighCO_2 条件に置かれ、光合成速度の低下した葉の光合成の A-Ci 曲線の初期勾配は Control 条件に置かれていた葉の初期勾配に比べて小さかった。また、前に報告した様に HighCO_2 条件に置かれた植物では光合成速度と葉の sucrose 含量の間には高い負の相関関係が認められた。

以上の結果は、モデル植物で見られた高 CO_2 濃度下での光合成速度の低下は、sink-limit 状態でのモデル植物の source-sink 制御機構によって説明することが可能である事を示している。

1pH04

ラン藻fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase 導入形質転換植物によるソース／シンク器官における光合成能と炭素代謝の解析

宮川 佳子、田茂井 政宏、重岡 成（近畿大・農・食栄）

高等植物葉緑体のfructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) およびsedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) は、光還元力による活性調節を受ける光合成炭素還元系の律速酵素の1つである。本研究では、FBPaseとSBPase活性の両方を有し、光調節を受けず、H_2O_2耐性を示すラン藻*Synechococcus* PCC 7942のFBP/SBPaseを葉緑体へ導入した形質転換タバコ(TFI)を作成し、高等植物のソース／シンク器官における光合成能と炭素代謝に及ぼす影響について検討した。

pBI101にトマトrbcSプロモーターとトランジットペプチドのコード領域および S. 7942 FBP/SBPase遺伝子（*fbp-I*）を連結したプラスミドを構築し、アグロバクテリウムを介して*Nicotiana tabacum* cv Xanthiに導入した。ゲノムDNAを単離後、PCRにより*fbp-I*の導入を確認し、7種の形質転換株(TFI-1～7)を得た。形質転換株（T_2世代）から葉緑体を単離し、ウエスタンブロッティングによりFBPase/SBPaseの発現を確認した。その中でTFI-3のFBPase活性、SBPase活性は野生株の1.65 ± 0.32倍、1.76 ± 0.24倍であった。水耕栽培10週目（400 μE/m^2/s、相対湿度 60%、25℃）では、TFI-3 の平均背丈は野生株と比較して1.4倍大きくなっていた。第4葉の培養条件下における光合成速度は野生株の1.25±0.03倍であった。現在、ソース／シンク器官における炭素代謝への影響について検討中である。

1pH05

電子の流速測定による葉内CO_2濃度と光合成速度の解析

津山孝人、小林善親（九大・農学部・林学）

光照射によって葉のチラコイド膜を流れる電子は、カルビン回路でのCO_2還元反応で消費されるとともに光呼吸やメーラー反応、亜硝酸還元反応によっても消費される。このような電子消費の流束を光合成に依存した同化的電子消費反応の流束（Jco_2）と光合成以外の反応に依存した非同化的電子消費反応の流束（J_N）とすると、チラコイド膜を流れる電子の流束（Je）は、$Je = Jco_2 + J_N$ で表される。いろいろな植物の葉におけるJco_2とJ_Nについて、一定の光強度のもとで気相中のCO_2濃度とO_2濃度（O_2/CO_2分圧比）を変えながらJe、Jco_2、J_Nを測定した結果、CO_2濃度の増加とともにJ_Nは減少し、Jco_2は増加することが明らかになった。また、J_N/Jco_2比は、気相中のO_2/CO_2分圧比と比例関係にあることを見出した。このような方法を用いて、植物葉の光合成速度を律速している原因について解析し、光合成能力の低い植物は、RubisCO部位におけるCO_2濃度が低いことが示唆された。

1pH06

糖センサーの解析：ヘキソースキナーゼの機能解析

森田章義[1], Lorenzo GUGLIELMINETTI[1,2], Pierdomenico PERATA[2], Elena LORETI[2], Amedio ALPI[2] 山口淳二[1]
[1]名大生物応答セ;[2]ピサ大学（イタリア）

高等植物の細胞内糖濃度認識に関与する糖センサーとしてヘキソースキナーゼが注目されている。イネ胚を用いて、ヘキソースキナーゼ・アイソフォームとcDNAの解析を行った。等電点電気泳動と新規の活性染色法の組み合わせにより、6種類のアイソフォームが検出された（グルコキナーゼGK1/2/3, ヘキソキナーゼHK1/2, フルクトキナーゼFK1）。酵素化学的な解析の結果、あるいはグルコサミン等の糖センサーのモジュレータに対する反応性より、HK1/2が糖センサーとしての緒性質に合致しているものと判断された。2種類のヘキソキナーゼ（*OsHxk1, 2*）と1種類のフルクトキナーゼ（*OsFrk1*）cDNAを用いた解析の結果、*OsHxk1*がHK1/2をコードしていることを明らかにした。この*OsHxk1*の機能について検討中である。

Ref: Plant Cell 9: 2197 (1997); Planta 204: 420 (1998)

1pH07

クラミドモナスにおける多重ルビスコ導入の影響

[1]富澤健一，[1]内田英伸，[1]磯野協一，[1,2]横田明穂
（[1]RITE・植物分子生理，[2]奈良先端大・バイオ）

植物ルビスコの大サブユニット遺伝子(*rbcL*)は葉緑体に，小サブユニット遺伝子(*rbcS*)は核に存在し協調的発現制御が行われていることが示唆されているがどのような機構でこうした制御が行われているのかは現時点では明らかになっていない。この協調的発現制御機構の解析の一環として，葉緑体ゲノムの逆位反復配列(ＩＲ)部位に新たに*rbcL*を挿入したクラミドモナス葉緑体形質転換体を作成した。サザンブロットにより*rbcL*のコピー数が３倍存在することが確認された形質転換体において，他の光合成関連遺伝子の発現におよぼす影響を見たところ，特に*rbcS*の転写および翻訳量の増加が観察された。現在，この形質転換体の電顕による形態学的観察，光合成能の評価等を行っており，これらの結果もあわせて報告する予定である。本研究の一部はＰＥＣ／ＭＩＴＩに支援された。

1pH08

クラミドモナスの低光呼吸突然変異株とその性質（２）

鈴木健策（農水省・東北農試・生理生態研）

光呼吸速度が野性株の半分しかない突然変異株をクラミドモナスで得ることに成功したことは前回報告した。この株7FR2Nは「二重突然変異株」であり、高CO_2要求性であるホスホグリコール酸ホスファターゼ（PGPase）活性欠損突然変異株*pgp1*-18-7Fに更に突然変異を起こさせ、大気中でもよく生育する株として得た。この株では、RubiscoのCO_2/O_2相対特異性には野性株との違いは認められていない。

今回7FR2Nを野性株等と有性生殖を行わせそのテトラドを調べたところ、光呼吸活性が野性株とほぼ同じ株と半分程度の株が2:2の分離比を示した。また調べた全ての低光呼吸活性株で、光合成のCO_2に対する親和性が野性株より高く、CO_2飽和時の光合成活性は野性株より小さかった。この形質はPGPase遺伝子とはリンクしておらず*pgp1*突然変異を容易に除くことができた。その結果得た株A82では、二重突然変異株7FR2N同様、カーボニックアンヒドラーゼ阻害剤EZA添加により、光合成のCO_2に対する親和性が低下し野性株との差が認められなくなった。また脱共役剤に対して、光合成が野性株とは異なる応答を示すとの予備実験結果を得ており、低光呼吸の原因となっている突然変異とCO_2濃縮機構の発現機構との関連性が示唆される。

1pH09

クラミドモナス葉緑体内での翻訳に伴う mRNA の分解

石倉清秀、加藤晃、新名惇彦（奈良先端大・バイオ）

葉緑体内の mRNA の蓄積量の変化は転写後制御、特に mRNA の安定性の差異に起因する。近年、原核細胞において翻訳過程が mRNA の安定性に影響を与えることが明らかになってきた。本研究では、翻訳効率の異なる GUS 遺伝子をクラミドモナスの葉緑体ゲノムへ導入し、その発現動態を解析した。その結果、葉緑体においても翻訳過程が mRNA の分解速度に影響を及ぼすことが明らかになった。続いて、GUS 遺伝子の開始コドン、および５番、126番のアミノ酸残基に相当する塩基配列に終止コドン UAA を点変異導入した。これらの変異 GUS 遺伝子をクラミドモナスの葉緑体ゲノムに導入し、early termination が GUSmRNA の安定性に及ぼす影響について解析した。さらに、翻訳開始、および伸長を阻害する薬剤を用い、内在の葉緑体遺伝子について、翻訳過程と mRNA の安定性の関係を調べた。

1pH10

『ホウレンソウ RuBisCO fallover への食塩の影響』

宅間　弘樹、三宅　親弘、横田　明穂
（奈良先端大　バイオ）

高等植物 RuBisCO はカルボキシラーゼ反応開始後、急激に反応した後非常にゆっくりと失活していく、いわゆる fallover 現象を示す。最初の急激な反応を initial burst、その後のゆっくりとした失活の段階を steady state と呼んでいる。fallover は RuBisCO の構造変化が主な原因であるとする履歴現象説と反応進行に伴う阻害剤の蓄積が主な原因であると考える阻害剤説が提唱され、いまだ議論されている。ホウレンソウ RuBisCO を用いて高濃度の NaCl が fallover に及ぼす影響を解析した。その結果、高濃度の NaCl は initial burst 時の RuBisCO 活性を抑制したが、steady state での反応を促進した。initial burst での反応抑制は RuBisCO タンパク質の構造変化の抑制であった。一方、steady state における反応促進は RuBisCO と阻害剤との会合への NaCl の影響の結果と思われ、現在その解析を行っている。

1pH11

RuBisCO Oxygenase 反応機構の解析

岡田幸子、三宅親弘、横田明穂
(奈良先端大学院・バイオ)

光合成の炭素固定を制御する RuBisCO は互いに拮抗するカルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応を触媒する。カルボキシラーゼ反応の反応中間体はすでに単離され、CO_2 の ribulose-1,5-bisphosphate(RuBP) への付加機構は明らかにされているが、オキシゲナーゼの反応機構はいまだ明らかでない。とくに RuBP に付加する酸素分子の活性化の機構は全く不明である。

我々は、オキシゲナーゼ反応で生成する酸素の活性種検出を試みる過程で、基質 RuBP 非存在下でも市販 nitroblue tetrazolium(NBT)が活性型 RuBisCO により還元されることを見いだした。この反応は基質 RuBP や特異的阻害剤 CABP によって阻害され、また Superoxide dismutase 存在下あるいは低濃度の O_2 存在下で抑制された。この RuBisCO による NBT 還元反応は精製 NBT では認められなかった。このことから、活性型 RuBisCO が市販 NBT に含まれる還元物質から O_2 への電子伝達を触媒し、生成した O_2^- が NBT を還元すると考察する。現在この還元物質を同定中である。

1pH12

rbcL-欠損タバコを用いた植物 RuBisCO タンパク質工学実験系の確立

大槻茂男[1,2]、富澤健一[2]、横田明穂[1,2]
([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE　植物分子生理)

RuBisCO の酵素反応機構を知る上で、遺伝子改変によるアミノ酸置換は有用な手法であるが、高等植物 RuBisCO の場合、活性のあるホロ酵素を得られないことから、この手法は用いられていなかった。本研究では、葉緑体にコードされる RuBisCO 大サブユニット遺伝子（*rbcL*）を欠損させ、CO_2 固定能を失ったタバコを宿主とした植物 RuBisCO 改変遺伝子発現系の確立を試みた。35S promotor の下流に葉緑体移行シグナルと連結した *rbcL* を、アグロバクテリウムにより宿主に導入したところ、CO_2 固定能を回復したものが得られた。このことは、核に導入された *rbcL* で、ホロ酵素を形成できたことを示している。さらに、この系を用いて、アミノ酸変異を導入した *rbcL* においても、同様の形質転換体がいくつか得られており、その解析結果もあわせて報告する。（本研究の一部は PEC/MITI の支援を受けた。）

1pH13

トウモロコシC4型ピルビン酸Piジキナーゼのイネでの高発現と光による活性化の解析

深山浩[1,2]，東江栄[3]，野村美加[4]，土田博子[2]，Maurice S.B. Ku[5]，小野寺治子[2]，小野和子[2]，松岡信[6]，徳富 (宮尾) 光恵[2]
([1]生研機構，[2]農水省・生物研，[3]佐賀大・農，[4]香川大・農，[5]Washington State Univ.，[6]名大・生物分子応答)

トウモロコシC4型ピルビン酸Piジキナーゼ (PPDK) 遺伝子導入用コンストラクトを3種類作成し，それぞれイネに導入し，PPDKの発現量を比較した。トウモロコシPPDKゲノム遺伝子を導入したイネでは，最高で非形質転換体の40倍のPPDK活性を示した。一方，*Cab* promoter::PPDK cDNA，トウモロコシPPDK promoter::PPDK cDNA導入したイネでは，活性上昇は1-5倍と高発現には至らなかった。以上の結果は，PPDKの高発現にはゲノム遺伝子の導入が有効であること，また，PPDK遺伝子のpromoter以外の遺伝子構造が高発現に必要であることを示している。

形質転換イネで発現したトウモロコシPPDKは，光による活性化を受け，光照射下で活性が徐々に増大した。トウモロコシでは光照射開始後1時間以内に活性が約20倍に上昇し，活性化が飽和したのに対して，形質転換イネでは，少なくとも14時間活性上昇が続いた。14時間の光照射でPPDK活性は暗所の約10倍に増大したが，活性型PPDKは全PPDKタンパク質の20%程度であった。このことは，トウモロコシPPDKがイネのPPDK活性調節タンパク質により活性調節を受けること，しかし，イネでは活性調節タンパク質のレベルが低いため全てのPPDKを活性化できないことを示している。本研究の一部は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた。

1pH14

ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PCK）発現イネのC4光合成回路類似の炭素代謝

鈴木庄一、村井宣彦、新井雅雄（JT・遺伝育種研）

我々は、PCKを葉緑体で高発現させたイネの炭素代謝を解析している。[1)] イネで発現させたPCKの各反応のkineticsを測定すると、生理的条件では、炭酸固定反応と交換反応の活性は、脱炭酸反応に比べて著しく低かった。このことは、形質転換体内でPCKは主に脱炭酸反応を触媒することを示唆する。ホスホエノールピルビン酸（PEP）をあらかじめ与えると、C4化合物への初期炭酸固定の割合が増加した。同様に、PEPカルボキシラーゼ（PEPC）の特異的阻害剤（DCDP）を与えておくと、同割合は減少した。よって、形質転換体では、内生のPEPCがC4化合物への炭酸固定反応を行い、PCKは、PEPCへPEPを供給していると推定される。また、4位のCのみを^{14}Cで標識したリンゴ酸を与えると、形質転換体の方が高い割合で^{14}Cを光合成代謝産物へ固定することが示された。このことから、形質転換体にはリンゴ酸を脱炭酸して光合成代謝産物へ固定する代謝系が付与されたと推定される。これまでの一連の実験結果から、形質転換体には、C4光合成回路に類似した新たな炭素代謝経路が付与されたことが示唆された。

1）鈴木ら　1998年度日本植物生理学会年会A2p-10

1pH15

C4植物に特異的な新規タンパク質の探索

泉田 敦、古本 強、畑 信吾、泉井 桂（京都大院・農・植物生理）

キク科の*Flaveria* 属の21種にはC3型からC4型（NADP-ME型）まで連続的な光合成型の変異の存在することが知られている。これらは、真正C4型、C4-like、C3-C4中間型、C3型に分類されているが、それぞれの遺伝的背景は非常に近いとされている。C4光合成の成立に関与している新規タンパク質の探索のために、C3型（*F. pringlei*)及びC4型（*F. trinervia*)の２種を材料に用いて二次元電気泳動によるタンパク質の分析を行い、それぞれの種間での泳動パターンの比較を行った。それぞれに特異的に高発現しているタンパク質を見出し、それらの部分アミノ酸配列を決定した。そのシークエンス結果をもとにオリゴDNAを合成し、これをプローブとしてcDNAライブラリーに対してスクリーニングを行った。得られたクローンの遺伝子発現状態を調べ、C4種に特異的に発現しているクローンを複数単離することに成功した。これらのクローンにはホモロジー検索上未知ものがあり、C4光合成を支える新規タンパク質のcDNAであろうと推定された。

また、上記の実験以外にも、遺伝子側からのアプローチした実験も行った。NADP-ME型のC4植物である*Flaveria*において、その存在が知られていなかったPEPカルボキシキナーゼ遺伝子がC4種により多く発現しているという知見を得たので、あわせて報告する。

1pH16

トウモロコシC4光合成における葉肉細胞と維管束鞘細胞の機能分担に関わる新規遺伝子の探索

古本 強、畑 信吾、泉井 桂（京都大院・農・植物生理）

C4光合成は、葉肉細胞(MC)と維管束鞘細胞(BSC)の機能分担の上に成立している。C4光合成の成立に必要な新規タンパク質を探索するために、両細胞間の機能分担に着目し、それぞれの細胞に特異的に発現している遺伝子をdifferential screening法を用いて探索した。その結果、MC特異的遺伝子として多数の光合成電子伝達系遺伝子を、維管束鞘細胞群(BSS)特異的遺伝子としてPEPカルボキシキナーゼ(PCK)遺伝子、塩ストレス誘導性タンパク質ホモログ(*SalT*)遺伝子などを単離している（98年年会発表）。今回、前回未解析であったクローンの解析と共に、BSS特異的遺伝子として単離した遺伝子について*in situ* hybridizationを行い、より詳細な組織特異性を調べた。この結果、PCKがBSCに特異的に発現していること、*SalT*ホモログが維管束系細胞に多く発現していることを明らかにした。これらのことから、従来から考えられている以上に、MCとBSCは光受容組織として機能分化していること、PCKの関与する炭素代謝がトウモロコシのBSC中に存在することが示めされた。トウモロコシはNADP-ME型C4光合成植物に分類され、PCKの果たしている生理的役割は不明である。その生理的役割を考察するとともに、その他のクローンの組織特異性を調べているのでその結果も合わせて報告する。

1pH17

ﾋﾟﾘﾄﾞｷｻｰﾙ 5'-ﾘﾝ酸による CAM 型ｱｲｽﾌﾟﾗﾝﾄ葉緑体のG6P 輸送活性の阻害

是枝 晋, 金井龍二 (埼玉大･理･分子生物)

CAM (crassulacean acid metabolism)ではﾃﾞﾝﾌﾟﾝの合成･分解が重要な役割を果たす。我々は水ｽﾄﾚｽによるｱｲｽﾌﾟﾗﾝﾄ (*Mesembryanthemum crystallinum*) の CAM 化の過程で, ﾃﾞﾝﾌﾟﾝ分解産物の一つ G6P を輸送するﾘﾝ酸輸送体が葉緑体に新たに誘導されることを見いだした。

C_3植物, C_4植物の葉緑体ﾘﾝ酸輸送体は, 様々なﾀﾝﾊﾟｸ質修飾試薬により輸送活性が阻害されることが既に知られている。そこで, ｼﾘｺﾝｵｲﾙ層濾過遠心法により, ｱｲｽﾌﾟﾗﾝﾄの C_3型及び CAM 型葉緑体への ^{32}Pi と ^{14}C-G6P (ｸﾞﾙｺｰｽ-6ﾘﾝ酸) 輸送活性に対する PLP (ﾋﾟﾘﾄﾞｷｻｰﾙ 5'-ﾘﾝ酸)の阻害効果を比較したところ, Pi 輸送活性は C_3型, CAM 型ともに, 85 μM PLP で 50%阻害されるのに対し, CAM 型葉緑体の G6P 輸送活性は 32 μM PLP で 50%阻害され, Pi 輸送の場合よりもやや感受性が高いことがわかった。このことは CAM 型葉緑体において G6P は Pi の場合とは異なる輸送体によって輸送されていることを示唆している。現在, PLP によって修飾される C_3型及び CAM 型葉緑体包膜のﾀﾝﾊﾟｸ質を ^{3}H-水素化ﾎｳ素ﾅﾄﾘｳﾑでﾗﾍﾞﾙ化し, SDS-PAGE により解析することで, この G6P 輸送体ﾀﾝﾊﾟｸ質の同定を試みている。

1pH18

低CO_2ストレスに適応しない緑藻クラミドモナス高CO_2要求性変異株C16の解析

三浦謙治、石崎公庸、松枝昭治、九町健一、大山莞爾、福澤秀哉（京大院・農・応用生命）

クラミドモナスは、低CO_2ストレス条件に適応するために無機炭素濃縮機構(CCM)を誘導する。このCCMに関わる遺伝子を単離同定するために、高CO_2要求性変異株を7株単離している(1997年度年会, 文献1)。このうちタグとして用いた*nit1*遺伝子が１コピー挿入されたC16株について四分子解析を行なったところ、その挿入と表現型がリンクしていた。この株では、CCMに関わる遺伝子(*CAH1*, β-CA, LIP-36)の発現が誘導されなかったことから、CCM誘導に関わるシグナル伝達経路に変異が存在することが示唆された。大腸菌人工染色体pCYPAC2をベクターとしてクラミドモナス野性株(C9株)のゲノムライブラリーを構築し、遺伝子破壊の起こっている部位を含むクローンpKI4を単離した。さらにこのpKI4をC16株に形質転換すると、変異が相補したので報告する。

文献1) **Can. J. Bot.** 76: 1-6 (1998)

2aH01

タバコにおける葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼアイソザイムの発現機構の解析

吉村和也，藪田行哲，重岡　成（近畿大･農･食栄）

高等植物の葉緑体にはアスコルビン酸ペルオキシダーゼがアイソザイムとしてチラコイド膜(tAPX)およびストロマ(sAPX)に局在している。我々は、ホウレンソウのtAPXおよびsAPXは同一の遺伝子(*ApxII*)にコードされており、*ApxII*から3'領域の選択的スプライシングによって4種類のmRNAが生成し、tAPX及びsAPXタンパク質が合成されていることを明らかにした(*Biochem. J.*, 328, 795, 1997; *Biochem. J.*, 1999, in press)。また、同様の機構はカボチャ及びアイスプラントにおいても認められた。一方、アラビドプシス及びイネにおいてはsAPX及びtAPXは別々の遺伝子にコードされていた。そこで今回は、タバコにおける葉緑体型APXについての解析を行った。

葉緑体型APXに特異的に交差反応を示す、抗ホウレンソウsAPXモノクローナル抗体を用いたイムノブロティングの結果、タバコにおいてもtAPX及びsAPX共に存在し、分子量はそれぞれ約38 kDaおよび33 kDaであった。RT-PCR法およびRACE法により、タバコのtAPX cDNAのクローニングを行った。その結果、タバコtAPXの推定アミノ酸配列は、他の植物種由来のtAPXと高い相同性(80%以上)を示し、N末端側及びC末端側には、それぞれ葉緑体移送のトランジットペプチドおよびチラコイド膜結合のための疎水性ドメインが存在していた。以上より、タバコにおいても葉緑体型APXが選択的スプライシングにより発現している可能性が示唆された。現在、葉緑体型APX遺伝子の解析及びmRNAレベルでの詳細な検討を行っている。

2aH02

高濃度リン酸施用によるキャベツ葉の障害発生機構

渡邊和洋、真野純一[1]（東北農試、[1]京都大・食糧科学研）

キャベツ栽培においてリン酸肥料の利用率を高め、施用量を削減するためには、定植前の苗への重点施用が有効である[1]。しかし苗へのリン酸の重点施用によりクロロシスを伴う障害が発生する。この障害は他の塩類やソルビトールによる浸透圧ストレスでは認められない。本研究では、キャベツ苗の高濃度リン酸障害のメカニズムと初期ターゲット部位を解明するために、光合成活性とラジカル生成、消去能のリン酸に対する応答を明らかにした。

第２葉が完全展開したキャベツ苗に、200 mM のリン酸カリウム水溶液(pH 6.2)を与え、経時的に Chl 蛍光クエンチング解析、およびメチルビオローゲン存在下でのモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル(MDA)光生成を測定した。

リン酸処理後４日では可視障害は認められなかったが、400 μmol m^{-2} s^{-1} ６分間照射したときの non-photochemical quenching は無処理区に対し 35 %増加した。処理後５～６日で可視障害が発生し、同時に Fv/Fm および photochemical quenching が低下した。これに対し MDA シグナルは処理４時間後から低下し、４日後には無処理区の 40 %になった。MDA シグナルの低下は、リン酸処理によりアスコルビン酸プールが消費されたか、アスコルビン酸ペルオキシダーゼが失活した可能性を示唆する。

1)渡邊ら、土肥誌 68:622-628、1997

2aH03

水ストレスによるレタス葉のスーパーオキシドジスムターゼの活性低下

堂前喜章、縄田栄治、金松澄雄[1]、真野純一[2]（京都大院・農、[1]南九州大・園芸、[2]京都大・食糧科学研）

水ストレスによる障害のメカニズムの解明は、乾燥耐性作物の育種戦略を決める際の最重要課題である。我々はこれまでに、ポリエチレングリコール（PEG)、ソルビトール溶液により水ストレスを与えたレタス葉の、パラコート存在下でのモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル（MDA）の光生成の増大から、水ストレスにより葉での酸化的ストレスが誘導されることを明らかにした。

本研究ではこの酸化的ストレス増大機構を明らかにするために MDA 光生成・消去に関する活性酸素消去系酵素および光合成電子伝達活性の水ストレス後の変化を解析した。3～4 週間水耕栽培したレタス（*Lactuca sativa* L.）の根を、10 mM PEG もしくは１ M ソルビトール溶液に浸し、水ストレスを与えた。葉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ、MDA レダクターゼ、及び光合成電子伝達活性（$H_2O \rightarrow NADP^+$）は、4 時間の水ストレス処理では変化しなかった。一方、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性は、2 時間の PEG 処理、4 時間のソルビトール処理により約 90％減少した。Native-PAGE/ 活性染色で確認されたレタス葉の 3 種類の SOD アイソザイムのうち、2 種の CuZnSOD 活性が水ストレスにより減少した。抗スギナ葉緑体 CuZnSOD 抗体を用いたウエスタンブロッティングから、この SOD 活性の低下に対応した SOD タンパク量の減少が確認された。このように、葉緑体の CuZnSOD は水ストレスにより分解が促進される初期ターゲット分子であることが示唆された。

2aH04

クロロフィル分解産物の老化植物葉における検出：HPLC による分析法とその応用

鈴木康予，塩井祐三（静岡大・理・生物地球）

クロロフィルは植物の老化に伴って分解代謝される．その分解過程は酵素による数段階の反応を経て酸化開裂しビリルビン様物質となることが報告されているが，その後の分解経路についてはまだわかっていない．本研究では，ピロフェオホオルビド *a* をクロム酸によって化学的に酸化分解し，その分解産物を標準物質として高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて，分離・分析する手法を確立した．さらに，この手法を用いて，植物の老化に伴い，酸化分解産物と同様の物質が出現してくるかどうかについて解析し，クロロフィルの分解経路を検討した．

ヘマチン酸，メチルエチルマレイミド，メチルビニルマレイミド，C-E-リング誘導体の分解産物と推定されるメチルビニルジアルデヒドなどがダイコンとオオムギの老化子葉で検出された．これらのことから，植物のクロロフィル分解にはビリルビン様物質から低分子の物質へと分解する経路が存在し代謝されること．また，その経路は植物の種によって異なることが明らかとなった．

2aH05

異なる光・栄養条件で生育した一年生草本シロザにおける強光耐性の解析

加藤真晴、彦坂幸毅、広瀬忠樹（東北大・院・理・生物）

光阻害は消費・放散しきれなかった過剰な吸収光エネルギーが原因で起こると考えられているが、葉の強光耐性は同一種内であっても生育光環境によって異なる。光合成は吸収光エネルギーの主要な消費系であり、光合成能力は生育光環境によって異なる。このことから、光合成能力の違いが強光耐性の違いをもたらすと考えられてきた。一方、近年は様々な光阻害回避系が着目されている。しかし、各光阻害回避系が強光耐性の可塑性にどれだけ貢献しているのかはよくわかっていない。我々はこれまでに一年生草本シロザを材料に、強光耐性の可塑性について調べてきた。特に光合成能力の違いが持つ意味を明らかにするため、強光・富栄養で生育させた光合成能力が高い葉(A)、弱光生育のために光合成能力が低い葉(B)、強光生育だが貧栄養のために低い光合成能力を持つ葉(C)の比較を行っている。これまでに、強光耐性もD1タンパクの修復能力も生育条件で決まることを明らかにし（A=C>B)、光合成能力以外の光阻害回避系の重要性を示唆した。今回はクロロフィル蛍光の解析により熱放散能力を調べた結果を報告する。

2aH06

野生種スイカ生葉を用いた強光・低CO_2分圧下での光呼吸およびWater-Water Cycle生理機能解析と*in vivo*葉緑体酸化ストレス診断

三宅親弘、横田明穂　（奈良先端大学院・バイオ）

本研究で用いる野生種スイカは、強光・乾燥ストレス下、委凋せず、光障害を被らない。これは、光合成に使われない過剰な光エネルギーが安全に処理されていることを示唆する。我々は、過剰な光エネルギー散逸系として光呼吸とWater-Water Cycleをその候補として考え、この2つの系の光エネルギー散逸への貢献度を、生葉でのガス交換測定とクロロフィル蛍光収率測定を同時に行うことにより定量、比較評価した。1,000μmol Photon m^{-2} s^{-1}下、大気CO_2分圧を36Paから10Paへ低下させると、PSII全電子伝達活性のうち光呼吸依存活性の割合は25から50％へ増大し、またWater-Water Cycle依存活性は7％から20％へ増大した。さらに、10Pa CO_2下、大気O_2分圧を21kPaから1.7kPaへ低下させると、Q_Aの還元率が50％から90％へ増大した。これは、強光・低CO_2分圧下、光呼吸が光化学系過還元解消に大きく寄与していることを示唆する。一方、光呼吸抑制条件下、クロロフィル蛍光Qnpの大きな促進が見られ、Water-Water Cycleがチラコイド膜ΔpH生成によりPSII down-regulationを維持すると考えられる。以上の結果より、スイカ生葉での光呼吸とWater-Water Cycleの生理機能を議論する。さらに、Water-Water Cycleでのスーパーオキシド・ラジカルとH_2O_2生成速度および葉緑体内でのそれらの定常濃度を評価し、強光・低CO_2分圧下での葉緑体酸化ストレスを*in vivo*診断する。

2aH07

熱耐性デヒドロアスコルビン酸還元酵素の生化学的特性

高橋俊一, 山崎秀雄（琉球大学・理・海洋自然）

アスコルビン酸-グルタチオンサイクル(AGC)は、光ストレスで発生する活性酸素の消去に重要だと考えられている。AGC を構成する酵素の一つである DHA 還元酵素(DHAR)は、デヒドロアスコルビン酸(DHA)からアスコルビン酸への還元を触媒する。植物中には DHAR 活性を示すタンパクが複数存在しているが、特異的酵素の存在を含め未解決の問題が多い。今回、光合成器官で見い出された熱耐性 DHAR 活性の生化学的特性を報告する。諸条件の検討後、ガジュマル生葉で 800 $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg\ protein^{-1}$ の熱耐性活性が検出された。熱耐性活性は全活性の 40%を占め、80℃, 15 分間の熱処理でも失活しなかった。ホウレンソウでは、全活性の約 20%が熱耐性であり、DHA に対する K_m 値は 80 μM であった。この値は DHA に非特異的な DHAR の K_m 値よりも顕著に低かった。熱耐性活性は、非光合成器官や光ストレス過敏性を示すオウゴンガジュマルでは検出されなかった。

2aH08

光照射下の単離葉緑体における活性酸素を介したグルタミン合成酵素の分解

石田 宏幸、安澤 大輔、牧野 周、前 忠彦
（東北大院・農・応生科）

これまでに私たちは、光照射下の単離葉緑体及びその破砕液において、Rubisco-LSU が活性酸素により部位特異的に断片化されることを報告した。本研究では、同様の系において他の葉緑体タンパク質ついても活性酸素による断片化が見られるのかについて検討した。

コムギ葉から単離した葉緑体を光照射下及び暗所下でインキュベートし、数種類の葉緑体タンパク質の分解について SDS-PAGE/イムノブロット法で分析した。その結果、光照射下においてプラスチド型グルタミン合成酵素（GS2）のタンパク質量が減少するとともに、分子量 39 kDa、及び 35 kDa の分解断片が出現することがわかった。一方暗所下では、この GS2 の分解は見られなかった。光照射下における GS2 の分解は、DCMU により完全に抑制された。そして各種のプロテアーゼ阻害剤と活性酸素スカベンジャーの効果について調べた結果、GS2 の分解は金属キレート剤、catalase、ならびに *n*-propyl gallate によって抑制されることがわかった。以上の結果から、光照射下における GS2 の分解にも Fenton 反応を介して生じる活性酸素が関与していることが示唆された。

2aH09

ガス交換とクロロフィル蛍光の同時測定から観察されるRubiscoアンチセンスイネの光ストレス回避機構

牧野 周、前 忠彦、島田 多喜子[1]、山本 直樹[2]（東北大院・農、[1]石川農短大、[2]農水省・生物研）

私たちは、イネに*rbs*Sのアンチセンス遺伝子を導入し、窒素含量あたりのRubisco量を約40%まで減少させた形質転換体イネを得た。Rubiscoは大気条件下の光合成と光呼吸の律速因子であるにもかかわらず、これらのRubiscoアンチセンスイネは、真夏の炎天下でも一切の光傷害を受けることなく正常に成育した。そこで、このアンチセンスイネのガス交換と Chl 蛍光の測定を行い、その光阻害回避機構について考察した。

Rubisco量の60%減は、光飽和（1500 μmol m^{-2} s^{-1}）の光合成の50%減、光呼吸の60%減をもたらしていた。光合成あたりの気孔開度は、アンチセンスイネの方が高かったので、Ciを26 Paに揃え定量的な解析をしたところ、光合成の減少割合とPS IIの量子収率低下の割合にはまったく差がなく、それらの減少分と同じ割合のNPQの増加が観測された。CO2飽和領域の解析でも同様の結果が得られた。このように、NPQのポテンシャルが高まることがアンチセンスイネの光阻害回避機構の重要な因子であることが示唆された。

2aH10

C4型*Pdk*遺伝子はどのように進化したか？

野村美加、[1]千徳直樹、[1]谷口光隆、[2]石田祐二、[2]太田象三、[2]小鞠敏彦、田島茂行、[1]松岡信（香川大・農、[1]名古屋大、[2]日本たばこ・植物育種研）

C4型*Pdk*（ピルビン酸Piジキナーゼ）遺伝子は１つの遺伝子から２つの転写産物を産生する。すなわち、長い転写産物は葉緑体型*Pdk*遺伝子を、短い転写産物は細胞質型*Pdk*遺伝子をコードしている。この特徴的な性質はC4植物の*Pdk*遺伝子のみならずイネ（C3植物）の*Pdk*遺伝子においても同様な発現制御系が存在することが明らかとなっている。我々はC3植物からC4植物へ進化する際、*Pdk*遺伝子に何が起こったかに興味を持って研究を行っている。既に報告したように、イネ、トウモロコシの葉緑体型*Pdk*プロモーターの制御下におけるGUSの発現は、形質転換イネにおいて、光合成器官である葉において高いGUS活性を誘導するが、その活性はイネ由来のものに比べ、トウモロコシ由来のものが約10倍高い活性を示した。また、GUS活性の染色の結果、イネ、トウモロコシともに葉肉細胞特異的な発現をすることが確認された。一方、同様のコンストラクトをトウモロコシに導入したところ、トウモロコシ由来のものは葉肉細胞に特異的に高いGUS活性を示したのに対し、イネ由来のものは葉肉細胞のみならず維管束鞘細胞においてもGUS活性が発現した。これらの結果からトウモロコシ*Pdk*遺伝子には、葉肉細胞特異的に発現を引き起こすための転写因子が存在し、それはイネの*Pdk*プロモーター領域には存在しないことが示唆された。

本研究の一部は、生研機構「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の支援を受けて行われた。

2pH01

ラン色細菌*Synechocystis* sp. PCC 6803に対する高温処理の影響

井上名津子、*江見崇、山根由裕、菓子野康浩、小池裕幸、佐藤和彦（姫路工業大・理・生命、*九州大・理）

先の植物生理学会において我々は、好熱性ラン色細菌*Synechococcus vulcanus*を用いて高温処理に対する光合成系や細胞膜への影響を調べ、細胞膜の透過性の増大と細胞の死が関連することを報告した。今回は常温性ラン色細菌*Synechocystis* sp. PCC6803 について、蛍光指標に対する影響を含めて高温処理の効果について報告する。

S. PCC6803 を生育至適温度25℃で培養し、25℃から60℃の各温度で5分間処理したものと、温度処理後、25℃に5分間戻したときの回復を調べた。光化学系II活性の指標と考えられる蛍光指標Fvは約42℃から低下しはじめ、約52℃でゼロになった。25℃に戻したとき一部回復がみられたが、あまり顕著ではなかった。フィコビリゾームの系II反応中心複合体からの解離および系II反応中心の熱不活性化が原因と考えられるFoレベルの上昇は35℃から始まり、55℃以上で減少に転じたが、25℃に戻したときは約45℃処理まではほぼ完全に元のレベルに下った。フィコビリンタンパク質は55℃から変性が始まり、65℃でほぼ完全に退色した。細胞膜は約55℃で透過性の増大が見られるようになり、この温度が細胞の生死に関係することがわかった。 常温性ラン色細菌と好熱性ラン色細菌の高温処理の影響の比較および*S*. PCC6803 を35℃で培養した時に高温処理の影響がどのように変化するのかも併せて報告する。

2pH02

*Chlamydomonas reinhardtii*における高温処理の影響

梶間久子、山根由裕、菓子野康浩、小池裕幸、佐藤和彦（姫路工業大・理・生命科学）

真核光合成生物*C. reinhardtii* の耐熱性獲得機構を探る目的で、高温処理による光合成系の変化について調べ、また、細胞の生死と高温処理の関係についても調べたので併せて報告する。

PAM (pulse amplitude modulation)蛍光装置で測定した葉緑素からの蛍光指標の内、Fvは約38℃から低下し始め、約50℃でゼロになった。Foは48℃付近より上昇したが、Fvと同時に室温に戻しても回復はほとんど見られなかった。

酸素発生活性は、約38℃で活性が低下し始め、45℃で完全に失活した。各温度で5分間処理後25℃に5分間おくと、一部活性回復がみられた。このように*C. reinhardtii* ではFvの減少は他の光合成生物とは異なり、酸素発生活性の減少には対応せず、むしろ系II反応中心の不活性化と対応した。

チラコイド膜の透過性変化の指標としてカロチノイドの electrochromic shift による515 nmでの吸光度変化を測定した。その結果、チラコイド膜は40℃以上の温度で透過性増加が始まったが、25℃に戻すと一部回復した。

細胞膜は、47.5℃で透過性が増大した。高温処理をした後に細胞培養すると、この温度を境に、細胞の増殖が抑えられる事が分かった。従って*C. reinhardtii* でもラン色細菌同様、細胞膜の変性が細胞の死に関与している事が分かった。

2pH03

INCREASE IN TOLERANCE OF THE PHOTOSYNTHETIC MACHINERY TO SALT STRESS BY GENETIC ENHANCEMENT OF UNSATURATION OF FATTY ACIDS IN MEMBRANE LIPIDS IN *Synechococcus*

Suleyman ALLAKHVERDIEV, Iwane SUZUKI, Yoshitaka NISHIYAMA, Masami INABA and Norio MURATA; Dept. Regulation Biol., National Institute for Basic Biology, Okazaki 444-8585

The effect of unsaturation of fatty acids in membrane lipids on the tolerance to salt of the photosynthetic machinery was investigated in wild-type and *desA*$^+$ cells of *Synechococcus* sp. PCC 7942; Wild-type cells synthesized saturated and monounsaturated fatty acids, whereas *desA*$^+$ cells, which had been transformed with the *desA* gene for the Δ12 acyl-lipid desaturase of *Synechocystis* sp. PCC 6803, additionally synthesized diunsaturated fatty acids. Incubation these cells with 0.5 M NaCl induced a rapid loss of photosystem I and II activities either in light or darkness. However, *desA*$^+$ cells were more tolerant to salt and osmotic stress than wild-type cells. Recovery of the photosynthetic activities in light from the salt-induced inactivation in darkness was much faster in *desA*$^+$ cells than in wild-type cells. Lincomycin blocked the light-induced recovery, indicating that the recovery process is supported by protein synthesis *de novo*. These results demonstrate that the genetic increase in unsaturation of fatty acids in membrane lipids significantly enhanced the tolerate to salt stress.

2pH04

Synechococcus PCC 7942 の *cpx-1* 遺伝子破壊株によるカタラーゼ-ペルオキシダーゼの生理機能の解明

田茂井 政宏、武田 徹、重岡 成（近畿大・農・食栄）

ラン藻では、過酸化水素（H_2O_2）消去酵素として主にカタラーゼ-ペルオキシダーゼ（CPX）が機能し、さらに光合成CO_2固定能およびPCRサイクルのチオール酵素はH_2O_2耐性を示す。最近、*Synechococcus* PCC 7942 および *Synechocystis* PCC 6803においてチオレドキシンペルオキシダーゼの存在が示唆されている。今回、*S.* 7942のCPX遺伝子（*cpx-1*）を破壊した欠損株を作製し、光・酸素毒ストレスに対する応答機構を明らかにし、ラン藻でのH_2O_2代謝におけるCPXの役割を考察した。

*cpx-1*遺伝子内部にカナマイシン耐性酵素遺伝子カートリッジ（*kan*^{r}）を挿入したプラスミドを構築し、*S.* 7942に導入した。カナマイシン添加培地によるスクリーニングを行い、カナマイシン耐性株を単離し、サザンブロット解析により*cpx-1*の破壊を確認した。*cpx-1*破壊株のカタラーゼ活性は検出できず、ウエスタンブロット解析によりタンパク質レベルでもCPXの欠損を確認した。40 μE/s/m^2 の光条件下でのCPX欠損株の生育速度およびクロロフィル含量は、野生株と比べて有意な差は見られなかった。240 μE/s/m^{2}の光条件下ではCPX欠損株にクロロフィルの退色および生育阻害が見られた。また、パラコート処理（50 μM MV, 100 μE/s/m^{2}光条件下）では、野生株よりも速いクロロフィルの退色が見られた。また、いずれの条件下においてもFBPase, NADP$^+$-GAPDH, PRKの活性に有意な差は見られなかった。現在、光合成能およびクロロフィル蛍光などを詳細に検討中である。

2pH05

アイスアルジーおよび珪藻の光強度順応のタンパク質レベルでの解析

南千絵、小池裕幸、佐藤和彦、*池谷透、*伊村智、*渡辺研太郎、*工藤栄、菓子野康浩　（姫路工大・理、*国立極地研）

アイスアルジーおよびその構成主体となっている珪藻類が、光強度の変化に対して光化学系I・系II・LHCの量比をタンパク質レベルでどのように調整することにより、低温・弱光下で効率よく光合成を行っているのかを明らかにすることをめざした。まず、タンパク質レベルで量的な変化を検証するために充分なタンパク質の分離をするためのチラコイド膜の調製法および電気泳動条件を常温性の培養珪藻を使い検討した。また、界面活性剤によりチラコイド膜を可溶化して系I、系II、LHCを分離し、それらを電気泳動することによって、それぞれの構成ポリペプチドバンドを特定した。このような方法により生育光強度を変えて培養した常温性の*Ch. gracilis.* およびアイスアルジー単離株の光合成系構成タンパク質の量的変化を分析したところ、系I・系II・LHC・RubisCOの量比が大きく変化することがわかった。

2pH06

超高濃度CO_2条件に曝されたときにみられる海産性単細胞緑藻の光合成活性の変化

Demidov Edward, 岩崎郁子, 佐藤朗, 藏野憲秀, 宮地重遠（海洋バイオテクノロジー研究所 釜石研究所）

海産性単細胞緑藻*Chlorococcum littorale*は40%のような極端に高いCO_2濃度でも数日間のラグの後に適応して増殖する。培養条件を空気から40%CO_2へ移した時の蛍光変化をPAMシステムで測定し、適応できない*Stichococcus bacillaris*と比較した。*C. littorale*は移行後数分で系II量子収率(Φ_{II})が大きく低下し(10%以下)、酸素発生活性もほとんど消失したが、*S. bacillaris*はΦ_{II}も酸素発生活性も空気条件の値の60%以上を示した。*C. littorale*のΦ_{II}が低下した時はqTタイプのqNが増加したことからPQプールの過剰還元が予想される。この時期の低温蛍光は系I由来の蛍光が増加することから、*C. littorale*にはState 2 変化も生じていると考えられる。*S. bacillaris* ではこのような変化は全く見られなかった。また、DCMU存在下でのP700の酸化還元測定により求めた系Iの量子収率から、*C. littorale*では*S. bacillaris*に較べて非常に大きいサイクリック電子伝達の寄与が示唆された。

（本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構の委託研究「細菌藻類等利用二酸化炭素固定化・有効利用技術研究開発」の一環として行われたものである。）

2pH07

海産単細胞緑藻 *Chlorococcum littorale*が 40% CO_2条件下で光合成を維持する為に必須な蛋白質発現調節に関する検討

佐藤朗、蔵野憲秀、宮地重遠（海洋バイオテクノロジー研　釜石）

Chlorococcum littorale 細胞を、空気（0.04% CO_2）を通気しながら生育させ（air-grown cells）、通気条件を空気から 40% CO_2 を含む空気に変えると、光化学系 II 量子収率（Φ II）の低下がひきおこされる。5% CO_2-grown cells を 40% CO_2 に曝した場合には、Φ II の低下は認められなかった。一方、5% CO_2-grown cells に空気を 3 時間通気した後 40% CO_2 に曝したところ、Φ II の低下が認められた。しかし、40% CO_2 によるΦ II の低下は、真核蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド添加により消失した。また、5% CO_2-grown cells を原核蛋白合成阻害剤クロラムフェニコール存在下で 40%CO_2 に曝した場合には、Φ II の低下が認められた。以上の結果から、いずれの細胞に対しても 40% CO_2 は光合成を低下させるストレス要因であり、air-grown cells ではさらにストレスの影響を増大させる真核蛋白因子が誘導されていること、また、40% CO_2 条件下においては、このストレス条件下で光合成を維持するための原核合成蛋白質が存在することが示唆された。本研究では、さらに、カルボニックアンヒドラーゼ（CA）阻害剤であるエトキシゾルアミドの添加が、40% CO_2 によるΦ II の低下を防いだことなどから、ストレスの影響を増大させる真核蛋白因子が CA か否かについての検討結果も報告する。（本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構の委託研究「細菌・藻類等利用二酸化炭素固定化・有効利用技術研究開発」の一環として行われたものである。）

2pH08

海洋性ケイ藻 *Phaeodactylum tricornutum* の 溶存無機炭素取り込みについて

原　匠、松田　祐介　（関西学院大学・理・化学）

海洋性藻類などの、環境生理学的に重要と考えられる藻類には、光合成の基質である溶存無機炭素を取り込む仕組みや、その調節機構について詳しく知られていないものが多い。海洋性のケイ藻 *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX 642) は、光合成の基質として HCO_3^- を取り込むことが報告されている。この細胞を 5%-CO_2 を含む大気で通気培養したときの成長速度は、通常の大気で通気培養したときの約 2 倍であった。

これらの細胞について、光合成の溶存無機炭素に対する親和性を、酸素電極を用いて測定した。その結果、5%-CO_2 培養細胞の親和性は、大気培養細胞の場合の約 90%であった。さらに、これらの細胞では、光合成の基質として HCO_3^- を能動的に取り込んでいるという証拠は得られなかった。一方、測定系に 100μg/mL のウシ赤血球カーボニックアンヒドラーゼを加えたところ、両細胞で大幅な親和性の上昇がみられた。これらの結果から、*P. tricornutum* は、海水中の自発的 CO_2 生成速度では飽和されない CO_2 取り込み系を有すること、及び環境 CO_2 分圧の上昇に対する無機炭素取り込み系の抑制が小さいことが示唆された。

2pH09

環境 CO_2 に対する感受性が変化した緑藻 *Chlorella ellipsoidea* の突然変異体

落合　輝彦、松田　祐介（関西学院大学・理・化学）

緑藻 *Chlorella ellipsoidea* において溶存無機炭素（DIC）輸送機構の発現が、細胞表面での高 CO_2 濃度によって直接抑制されていることが示唆されている。さらに、この仮説は、X 線で誘発された CO_2 不感受性変異体の単離によって支持されている。本研究では、強力な DNA アルキル化剤である N-ethyl N-nitrosourea（ENU,0.5mg ml^{-1}）で変異誘導を行った後、低 CO_2 条件で無機炭素を固定する能力の違いを直接比較し得るマススクリーニングを行い、高 CO_2 環境でも DIC に対して高い親和性を有する突然変異体の単離を行った。単離された変異体の一部について、光合成の DIC に対する親和性を測定した。その結果、ほとんどの変異体は高 CO_2 環境下に於いても低 CO_2 に順化した野生型と同レベルの親和性を有し、これは、低 CO_2 に順化した後も変化しなかった。また一部の細胞は、高 CO_2 で生育した時のみ、野生型の高 CO_2 生育細胞と低 CO_2 細胞の中間レベルの親和性を有した。ENU21 と名付けた細胞は初め高 CO_2 の DIC 輸送機構に対する発現抑制効果に不感受性であったが、感受性に復帰した。しかし、高 CO_2 濃度環境における親和性は、野生型の約 50%であった。これらの知見から、細胞外の CO_2 濃度に直接反応して DIC 輸送機構の発現を抑制的に制御するシステムの存在が考えられた。

2pH10

クラミドモナスの高 CO_2 誘導性 43kDa 蛋白の性質とその誘導パターン

白岩善博，小林　寛，佐々木孝行（筑波大・生物）

クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii* 2137)の高 CO_2 誘導性 43kDa 蛋白(H43)を見い出し特性を解析した。H43 は細胞壁欠損株 *cw-15* では培地中へ遊離したのに対し，野性株では細胞と共に保持されたことから，細胞膜と細胞壁の間隙に局在するものと考えられる。低 CO_2 条件下で培養すると H43 は消失し，carbonic anhydrase が速やかに誘導された。H43 は alanine-rich な糖蛋白であり，bisecting N-acethylglucosamine/mucin 型の asparagine 結合糖鎖を有していた。リシルエンドペプチダーゼによる分解産物を HPLC で分離し，得られた 7 種のペプチド断片のアミノ酸配列およびそれをプローブにして得られた cDNA フラグメントの配列に基づくアミノ酸配列には，データベース上に有意な相同蛋白は見い出されなかった。また，H43 の誘導は，高 CO_2 条件移行後 10 時間の誘導期をへて増加し，48 時間後に最大となった。以上より，H43 は過剰の CO_2 供給による藻細胞への障害の回避に機能する分子であることが期待される。

3aH01

顕微分光法による花弁細胞の液胞内アントシアニン濃度の測定

吉田久美、外山友紀[1]、亀田清、近藤忠雄[2]（椙山大・生活・食品栄養、[1]名大・人間情報、[2]名大・化測機セ）

花色素アントシアニンは、通常液胞内に均一に溶解し存在する。アントシアニンによる花色発現機構や色素の生理機能を明らかにするには、液胞中の存在形態を正確に知る必要があり、色素濃度の測定は、最も重要なものの一つである。しかし、色素は通常花弁の表層細胞の液胞にだけに存在するので、花弁全体を抽出する方法では測定できない。今回我々は、空色西洋アサガオ *(Ipomoea tricolor)* および空色アジサイ(*Hydorangea macrophylla*)の液胞内色素濃度を、色素細胞のプロトプラスト化と顕微分光法により明らかにした。アサガオについては花弁より単離したヘブンリーブルーアントシアニン (HBA) を、アジサイについては、萼片と同じスペクトルを示すデルフィニジン３-グルコシドーイソクロロゲン酸ーアルミニウム錯体を用いて、それらの溶液の吸収スペクトルと比較することにより定量した。アサガオ花弁の液胞内の色素濃度は$1.2x10^{-2}$ M、青色アジサイ萼片液胞中のデルフィニジン３-グルコシドの濃度は$5x10^{-3}$ Mであることがわかった。

3aH02

ミヤコグサにおけるアントシアニンの誘導と自然突然変異

青木俊夫、川口正代司[1]、赤尾勝一郎[2]、綾部真一（日本大・生物資源・応用生物、[1]東京大院・総合文化、[2]農水省・生物研）

分子遺伝学的研究に好適なマメ科植物ミヤコグサ（*Lotus corniculatus* var. *japonicus*）は茎などにシアニジン系アントシアニンを蓄積する。我々は変異の原因遺伝子の単離や形質転換による遺伝子の機能解析を視野に入れ、アントシアニン生合成に関する人為および自然突然変異体の収集と解析を行っている。標準系統B-129と比較して有意にアントシアニン含量の低い自然変異系統を選び、B-129との交配により得られたF2世代を調べたところ、劣性単因子（MG13、17、20）または多因子（MG15）の遺伝様式が推定された。無菌幼植物でのアントシアニン誘導条件を検討した結果、乾燥・強光・窒素飢餓条件でアントシアニンが顕著に蓄積されることが明かとなった。誘導条件下におかれた各自然変異系統の幼植物によるアントシアニン生合成の特徴について報告する。

3aH03

タマネギの交雑後代における色素発現解析

藤井竜明, [1]大矢武志, [1]柳下良美, [1]藤代岳雄, [1]北宜裕
（神奈川大学・理学部, [1]神奈川農総研）

タマネギの育種効率を高める目的で、タマネギの交雑後代F_2世代のアントシアニン系色素構成について検討した。

F_2世代の色調には濃赤紫色から淡赤色までの幅広い変異が認められた。そこで、各個体からアントシアニン系色素を酢酸・メタノール＝１：１溶液で抽出し、吸収スペクトルを測定したところ、吸収極大波長により２種類に分類されることが示された。そこで、各個体から抽出した色素をHPLCを用いて色素組成の分析し、色素組成と吸収極大との相関解析を行った。一方、赤および黄タマネギから抽出した全DNAを鋳型に、コモンズプライマー（ベックス社）を用いてRAPD解析を行った結果、A13を用いた場合、赤タマネギ品種にのみに認められる950bpのDNA増幅断片が得られた。以上の結果をもとに、タマネギF_2世代における色素構成の遺伝解析とRAPDマーカーの適用の可能性について報告する。

3aH04

アサガオ、マルバアサガオ「*Magenta*」変異の同定

森田裕将、星野敦、田中良和[1]、久住高章[1]、斉藤規夫[2]、飯田滋（基生研、[1]サントリー基礎研究所、[2]明治学院大・一般教育）

野生型のアサガオやマルバアサガオは、各々青色や紫色の花を咲かせる。花弁に含まれる色素の化学分析の結果から、どちらもシアニジン骨格を持つアントシアニン色素を蓄積しているが、赤色の花を咲かせるアサガオの「*Magenta*」変異体では、ペラルゴニジン骨格を持つアントシアニン色素を蓄積していることが知られている。また同様な赤色の花を咲かせるマルバアサガオ変異体でもペラルゴニジン骨格を持つアントシアニン色素の蓄積が観察されている。

我々は、ペラルゴニジン骨格を持つアントシアニン色素を蓄積して赤色の花を咲かせる変異体アサガオとマルバアサガオの花色に関する変異の同定を試み、アントシアニン骨格Ｂ環の水酸化を行う *F3'H*（Flavonoid 3'-hydroxylase）遺伝子上に変異が起こっていることを見出した。これらの変異と花色との関係について論ずる。

3aH05

マルバアサガオの *DFR-A, -B, -C* 遺伝子の発現

稲垣善茂[1]、Surin Peyachoknagul[1]、定塚（久富）恵世[1]、土生芳樹[1]、小関良宏[1,2]、飯田滋[1]
（[1]基生研、[2]農工大・工・生命）

アントシアニン生合成系路の酵素 Dihydroflavonol 4-reductase をコードするDFR遺伝子は、アサガオとマルバアサガオのゲノム上では、DFR－A、－B、－C、の３つの遺伝子がタンデムに並んでいる。またアサガオにおいては、その真ん中に位置するDFR－B遺伝子が、花で色素合成に関わる遺伝子である。今回、我々はマルバアサガオの花において、マルバアサガオDFR－Bに一致するmRNAを見いだした。また、アサガオおよびマルバアサガオ双方の１７ｋｂにわたるDFR遺伝子領域のいずれにも、DFR－A、およびDFR－C遺伝子には変異が存在していないことから、これら、DFR－A、およびDFR－C遺伝子の機能を探る第一歩として、我々は semi-quantitative ＲＴ－ＰＣＲによりそれら遺伝子の発現について解析した。その結果、ごく微量ではあるがDFR－AやDFR－Cが、花やその他の組織においてもDFRmRNAを発現しているとの知見を得たので、これを報告する。

3aH06

カンキツ類におけるβ-cryptoxanthin を生成するβ-carotene hydroxylase 遺伝子の機能解析

小松　晃、生駒吉識[1]、大村三男[1]、矢野昌充[1]
（生研機構、[1]果樹試験場）

我々はカンキツ果実に含まれているカロテノイドの中でマンダリン類に特に多く且つ、*in vitro* での発癌抑制効果が高いβ-cryptoxanthin に着目し、種々の解析を進めている。このβ-cryptoxanthin はβ-carotene に存在する２つのβ-ionone 環の片方に OH 基が１つ導入されたもので、さらに対象の位置に OH 基が導入されると zeaxanthin となる。多くの植物や微生物では、β-carotene から zeaxanthin へ代謝は進み、途中のβ-cryptoxanthin はほとんど検出されない。本研究では、β-carotene から zeaxanthin への反応を触媒するβ-carotene hydroxylase 遺伝子を詳細に解析することにより、β-cryptoxanthin を生合成する代謝機構を明らかにしようと試みている。

カンキツ果実から単離されたクローンは pBluescriptII SK⁺プラスミドに挿入され、*E. coli* 内で pACCAR16 プラスミド(farnesyl PP からβ-carotene までが生成できる４つの *Erwinia* 由来の遺伝子を持つ)と共存させて培養を行い、この形質転換体のカロテノイド組成は HPLC 解析により調査された。その結果、β-cryptoxanthin を主に生成する事ができる新規のβ-carotene hydroxylase をコードする遺伝子が、カンキツゲノムに存在することが明らかとなった。

3aH07

Coffea 属植物にみられるカフェイン代謝の多様性

芦原　坦、Alan Crozier[1]（お茶の水大・生物、[1]グラスゴー大・生化・分子生物）

Coffea arabica, と低カフェイン種である *C. salvatrix, C. eugenoides, C. bengalensis* の葉におけるカフェインの生合成と分解経路活性を比較した。*C. arabica* におけるカフェイン合成能は、他の３つの低カフェイン種のものより高かった。一方、カフェインの分解活性はほとんどの種で弱く数%程度しか分解されなかったが、*C. eugenoides* では投与したカフェインの 75%(若葉)から 80%(成熟葉)が 18 時間で分解された。パルス・チェイス実験から *C. eugenoides* では、カフェイン→テオフィリン→3-メチルキサンチン→キサンチン→尿酸→アラントイン→アラントイン酸→尿素→ CO_2 + NH_3 の経路が働くことが明らかになった。*C. salvatrix, C. eugenoides* でカフェイン含量が少ないのは、生合成活性が低いことによるものであり、*C. eugenoides* では、これに加えて、カフェインの分解活性が大きいことが原因であると考えられた。*C. liberica C. dewevri* などの種では、カフェインがさらにメチル尿酸に変換される場合もある。ここでは、カフェイン代謝のさまざまな型を *Camellia* 属で得られたデータも加えて考察する。

3aH08

チャ葉のカフェインシンターゼの精製とその性質

加藤　美砂子，水野　幸一[1]，藤村　達人[1]，芦原　坦（お茶の水大・理・生物，[1]筑波大・農林工学）

チャ葉(*Camellia sinensis*)からカフェイン生合成の最終2段階を触媒する *N*-メチルトランスフェラーゼを初めて単離し，カフェインシンターゼ(CS)と名づけた。精製は硫安分画，ハイドロキシアパタイト，陰イオン交換，アデノシンアガロース，ゲル濾過により行い，SDS-PAGE で単一なバンドになるまで 520 倍に精製した。CS の推定分子量は，ゲル濾過により 61,000，SDS-PAGE により 41,000 であり，CS はモノマーの可能性が高いことがわかった。最終精製標品は，広い基質特異性を示し，3-および1-メチルトランスフェラーゼ活性をもつ。しかし，キサントシンや XMP は基質とならず，7-メチルトランスフェラーゼ活性はもたないことがわかった。この CS は葉緑体に存在する。CS の最適 pH は 8.5 であり，葉緑体内でプリンアルカロイド生合成系を調節していると考えられる。

3aH09

チャ二次代謝酵素遺伝子の糖と光による発現誘導メカニズム

竹内敦子，松元哲（農水省・野菜茶試）

チャ *Camellia sinensis* の葉では，二次代謝酵素であるPAL, CHS, DFRの遺伝子発現は，糖と光によって同調的に誘導される。葉に含まれるショ糖量は，暗所下にあった葉よりも明所下にあった葉の方が高く，遺伝子発現も明所下にあった葉で著しく誘導された。しかし，明所下の葉に含まれる量と同程度のショ糖量があっても，暗所でショ糖を与えられた葉での遺伝子発現は明所下の葉ほど強く誘導はされなかった。よって，光による発現誘導には，直接光が当たっていることが必要であって，含まれるショ糖量の上昇が必要となるのではないことがわかった。一方，暗所下でショ糖を葉に与えた時，与えたショ糖溶液の濃度にほぼ依存して，葉に含まれるショ糖量は増加し，遺伝子発現も誘導された。今回は，このような糖と光によるPAL, CHS, DFR遺伝子の発現誘導メカニズムについて考察する。

3aH10

チャ樹のアルコール系香気生成に関与する二糖配糖体特異的加水分解酵素β-プリメベロシダーゼcDNAのクローニング

中西英光、水谷正治、坂田完三（京大化研）

チャ樹や花、果実など様々な植物では多くの香気前駆体が二糖配糖体であるβ-プリメベロシドとして存在することが明らかにされている。我々は緑茶用品種やぶきた種チャ葉からこれら香気前駆体をプリメベロースと香気成分に特異的に加水分解するβ-プリメベロシダーゼを抽出し、p-ニトロフェニルプリメベロシド加水分解活性を指標に3段階のカラムクロマトグラフィーによって、電気泳動的に単一な酵素標品を得、N末端及び内部部分アミノ酸配列を決定した。これを基にチャ葉の cDNA ライブラリーから本酵素の cDNA をクローニングした。N末端アミノ酸配列は cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列の 29 残基目以降と一致し、28 残基目まではシグナルペプチドと予想された。cDNA から予想される成熟タンパク質の分子量は 54,324 であるのに対し、精製酵素の分子量は約 61,000 であることから、本酵素の N-グリコシド糖鎖による修飾が示唆された。このアミノ酸配列は、青酸配糖体を加水分解するβ-グルコシダーゼと約 60%の相同性を示した。さらに、29 残基目以降の成熟タンパク質のアミノ酸配列に相当する cDNA を発現ベクターに組込み、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌で発現させたところ、β-プリメベロシダーゼ活性を示した。今後はβ-プリメベロシダーゼの細胞内局在性、基質特異性、発現様式の研究を通じて、植物における本酵素の生理機能を解明していく予定である。

3aH11

緑藻 *Botryococcus braunii* の炭化水素合成系遺伝子のクローニング

矢野伸一、河田悦和、小嶋洋之（工技院・大阪工技研）

コロニー性緑藻 *B. braunii* は炭化水素を多量に合成・蓄積することで知られている。この藻は生産する炭化水素の構造により３つの race に分類されるが、Ｂrace が生産するボツリオコッセンと呼ばれる分枝不飽和炭化水素は燃料油生産の原料として特に期待されている。ボツリオコッセンの生合成経路はまだ明らかになっていないが、その構造からテルペノイドであるスクアレンの合成系と関連がある可能性が考えられたので、他の生物のスクアレン合成酵素でアミノ酸配列が保存されている領域から設計したプライマーでＰＣＲを行い、得られたＤＮＡ断片をもとにスクリーニングを行った。その結果、スクアレン合成酵素の保存領域を完全に保持する遺伝子がクローニングされた。またテルペノイド生合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の遺伝子も同様な手法によりクローニングを行った。現在これらの遺伝子がコードする酵素の性質を解析中である。

3aH12

木本植物 ***Melianthus comosus*** 培養毛状根からの **cinnamate-4-hydroxylase** の **cDNA** クローニングおよびその機能解析

橋本 裕、雪岡 日出男、田中 玲爾、稲垣 秀一郎、船附 賢三、加藤 研治（塩野義製薬 ・ 油日ラボラトリーズ）

チトクロムP450は植物の二次代謝産物生合成経路における様々な反応に関与している事が知られている。我々は、多様な二次代謝産物を含みながら材料供給等実験上の制約が多く、草本植物に比べて研究が遅れている木本植物のチトクロムP450の解析を行なっている。南アフリカ原産木本植物 *Melianthus comosus* の毛状根培養系を確立し、毛状根から全mRNAを分離後、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型とし、チトクロムP450のアミノ酸配列で、種間で高度に保存されているヘム鉄結合領域配列をもとにデザインした縮重プライマーとオリゴdTプライマーを用いてPCRを行なった。増幅されたDNAをサブクローニングし、その塩基配列を解析した結果、それらのうちの１つがcinnamate-4-hydroxylase(C4H)と高い相同性を示したので、5'−RACE法により全長をクローニングした。このcDNAを酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）で発現させ、ミクロソーム画分のCO差スペクトル解析を行なった結果、450nm付近にピークが認められた。さらにこのミクロソーム画分中で *t*-cinnamic acidを反応させたところ *p*-coumaric acidへの変換が認められた。このことから、このクローンは *M.comosus* のC4Hをコードすることが明らかとなった。*M.comosus* ゲノムDNAのサザン解析を行なった結果、C4Hが草本植物の場合と同様に *M.comosus* においてもsmall gene familyを形成していることが示唆された。

1aI01

黒斑病菌に感染したサツマイモ塊根組織における
エチレン生成とその機構

奥村京子，加藤雅也，兵藤　宏，生駒吉識[1]，
矢野昌充[1]（静岡大・農・生物生産，[1]果樹試・
カンキツ部・品質化学）

サツマイモ（*Ipomoea batatas* Lam.）塊根組織は黒斑病菌（*Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst）に感染すると多量のエチレンを生成する。エチレン生成の場は菌の侵入に対応して内部に移行する。黒斑病菌胞子接種後、塊根組織表層0.5 mmでは感染1日後，多量のエチレンを生成し，2日後には低いレベルに低下した。このエチレン生成系は高等植物に普遍的に存在する，メチオニン-ACC経路を通るとは考え難い。その理由は，1. ^{14}C(U)-メチオニンのエチレンへの取り込みは少ない，2. この取り込みに対してACCの希釈効果がみられない，3. ACC酸化酵素の活性が非常に小さいこと，などによる。　ACC酸化酵素の活性は非常に低かったが，ACC酸化酵素タンパク質の存在がWestern blottingで検出された。

1aI02

ヤエナリのオーキシン誘導型ACC合成酵素遺伝子、*VR-ACS6*プロモーターの植物ホルモン応答反応

In Sun Yoon[1,2], Don Ha Park[2], 森　仁志[1], Bin G. Kang[2], 今関英雅[1]([1]名大院・農・生化学制御、[2]Dept. Biol., Yonsei Univ.)

オーキシン誘導エチレン生成はサイトカイニンで促進され、ABA、エチレンによって抑制される。この相互作用は特定のACC合成酵素イソ遺伝子の発現制御に基づくもので、ヤエナリ（*Vigna radiata*）では*VR-ACS6*がこれに当たる。植物ホルモン相互作用の分子機構を明らかにする目的で本イソ遺伝子を単離し、その非転写領域内に相互作用に必要なすべての要素が含まれるかどうかを、GUSを指標遺伝子とした形質転換タバコを作製して調べた。*VR-ACS6*はヤエナリのGenomic Libraryから、cDNAをプローブとして選別単離し、翻訳領域がcDNAの配列と同一であることを確認した。本遺伝子は3つのエクソンからなり、1.6 kbの非転写領域を含んでいた。この非転写領域をGUS遺伝子に連結し、*Agrobacterium*を介してタバコSR1に導入した。薬剤選別したT_0個体の緑葉切片、それらの種子(T_1、T_2)から得た黄化及び緑化芽生えをIAAと他の植物ホルモンとを組み合わせて処理して発現したGUS活性でプロモーター機能を評価した。GUS活性は、緑葉切片、黄化、緑化芽生え何れを用いてもオーキシン処理でのみ、特異的かつ濃度依存的に発現し、他の植物ホルモンでは発現しなかった。IAAでは0.1 μMから100 μMまで有意の発現が見られた。IAAによる発現の程度はカイネチン或いはベンジルアデニンが共存すると顕著に増大したが、ABAが共存すると抑制された。IAA処理を10 ppmのエチレン共存下に行っても発現は抑制された。活性染色によると、IAA処理した黄化芽生えでは下胚軸に、緑化芽生えでは成長先端から子葉の葉柄、葉身へかけてGUSが発現し、サイトカイニンの共存は染色の範囲を増大すると共に、染色強度を増強した。ABA又はエチレン共存下では、逆に染色範囲が縮小し、染色強度も低下した。染色した部分では表皮を除くすべての細胞がGUSを発現していた。以上の結果は、ヤエナリにおけるエチレン生成やVR-ACS6のmRNAレベルの変化と同一で、1.6 kb内に相互作用に必要なすべての制御要素があること、形質転換タバコを今後の解析に使用できることを示している。

1aI03

ニンジン培養細胞における細胞周期関連遺伝子の発現に対するPSK-αの効果

荒川史博、東克己、EUN Chang-Ho、Dennis Yeo、鎌田博
（筑波大・生物）

アスパラガスの葉肉細胞培養系から単離されたペプチド性植物細胞増殖因子 Phytosulfokine(PSK)-αは植物に普遍的な細胞増殖因子であると考えられている。しかしながら、PSK-αが細胞増殖を促進する作用機作についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、細胞周期の制御因子であるA-type cyclinとB-type cyclin, cdc2のcDNA断片をニンジンから単離してプローブとして用い、これらの転写産物量の変化に対するPSK-αの効果を解析した。実験系として、ニンジン不定胚誘導系とニンジン non-embryo-genic cells(NC)の同調培養系を用いた。不定胚誘導においては、PSK-α処理後24時間で既に両遺伝子の発現促進効果が見られた。また、NCの同調培養においては、PSK-αの投与は両遺伝子の転写産物量を増加させたが、蓄積量のパターン及び蓄積量が最大になるまでの時間はPSK-α無処理区と同じであった。これらの結果から、植物細胞のPSK-αに対する反応は非常に迅速であり、また、PSK-αの効果は細胞周期を短くするのではなく、細胞分裂を行っている細胞の割合を増加させていることが示唆された。

1aI04

ニンジン細胞分裂に対するPSK-αとオーキシンの相互作用

東克己、荒川史博、鎌田博（筑波大・生物）

アフィディコリンによって同調化させたニンジンnon-embryogenic cells（NC）に対するオーキシンの一種、2,4-dichlorophenoxyacetic acid（2,4-D）とphytosulfokine（PSK）-αの作用を調べた。2週間2,4-Dを含まないMurashige & Skoog's（MS）培地中で培養したNCは、2,4-Dを含むMS培地で前培養したNCに比べて細胞分裂活性が低下していた。このNCに対して、アフィディコリン投与24時間前からPSK-αあるいは2,4-Dを処理することにより、細胞分裂活性の上昇が観察された。PSK-αの投与により、非投与時に比べて分裂指数（mitotic index、MI）は上昇したが、アフィディコリンの除去からMIが最大になるまでの時間は変化しなかった。このことから、PSK-αの投与は、NCの細胞分裂のS期からM期までのいづれかの過程にのみ影響を与えたというより、細胞分裂を行っているNCの割合を増加させたと考えられる。一方、オーキシンの投与では、MIが上昇したのみでなく、MIが最大になるまでの時間も早くなっていた。このことから、オーキシンの投与は、分裂している細胞の割合を増やすばかりでなく、細胞分裂の過程そのものにも影響を与えることが示唆された。ニンジンの*cyclin A*、*B*の転写産物量の変化も同調培養系において得られた結果を支持するものであった。

1aI05

オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子プロモーター：GUS融合遺伝子のジャスモン酸誘導に及ぼすサリチル酸の影響

山下耕司、中北真紀子、今西俊介、古田文美、中村研三（名大院・生命農・生化）

プトレシン合成に関わるオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)の遺伝子発現は、タバコBY-2細胞でタンパク質合成阻害下でもジャスモン酸(MeJA)によるmRNAレベルの誘導を受ける。タバコのODC遺伝子はイントロンを持たない遺伝子であり、そのプロモーター領域とGUSとの融合遺伝子(ODC:GUS)もBY-2細胞でMeJAやコロナチンによる発現誘導を受けた。サリチル酸(SA)は単独ではODC:GUSの発現を誘導しないが、0.2～2 μMのSAはMeJAやコロナチンによるGUS活性の誘導レベルを増加させた。同様の効果はアスピリンによっても得られたが、4-hydroxybenzoic acidでは見られなかった。SAはODC:GUSに加えて内在性ODC mRNAのMeJA誘導も促進するが、他の幾つかの遺伝子のMeJA誘導には影響を与えなかった。

1aI06

RICE SEEDLING TISSUES RESPOND DIFFERENTIALLY TO EXOGENOUS JASMONIC ACID (JA) UNDER LIGHT AND DARK

Randeep RAKWAL, Setsuko KOMATSU; Dept. Mol. Gen., Natl. Ins. Agrobio. Res., Tsukuba 305-0862

Jasmonic acid applied exogenously effects changes in polypeptide patterns of rice (*Oryza sativa* L.) seedling tissues in a dose- and time-dependent manner. Furthermore, we report that under light and/or dark conditions the polypeptide patterns are different. Using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis induction of three clearly defined polypeptide bands was found in stem tissues. In leaf tissues no clear induction was seen, except for significant reductions in RuBisCO levels. This induction/reduction was reversed by addition of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. Polypeptides were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes and N-terminal amino-acid sequences were determined. Effect of lipoxygenase inhibitors and role of kinetin in effecting changes in JA plus inhibitor-treated tissues is discussed. Present results suggest to role of JA in changing gene expression in rice seedlings as evidenced by *de novo* synthesis of specific proteins and to an interaction with light to effect these changes.

1aI07

シロイヌナズナの乾燥誘導性遺伝子 *rd22* の転写制御機構に関する研究

安部　洋、浦尾　剛、篠崎和子、篠崎一雄[1]
（農水省・国際農研・生資部、[1]理研・植物分子）

乾燥ストレスによる遺伝子発現調節機構を明らかにするため、シロイヌナズナの乾燥誘導性遺伝子 *rd22* 遺伝子の転写調節機構について研究を行っている。*rd22* 遺伝子は乾燥ストレスによって増加した植物ホルモンのアブシジン酸（ABA）を介して誘導されるが、その発現には他のタンパク質の合成を必要とする。*rd22* のプロモーター解析により、2カ所のMYC認識配列と1カ所のMYB認識配列が存在する67bpのシス領域が乾燥誘導に必要であることが明らかになった。これまでに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* 遺伝子を単離するとともに、シロイヌナズナのMYB相同性タンパク質Atmyb2もMYB認識配列に結合すること、またrd22BP1及びAtmyb2は共に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ことを葉肉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してきた。

今回我々は、*rd22BP1* 及び *Atmyb2* を過剰発現させた形質転換植物を作成し解析を行ったので報告する。

1aI08

シロイヌナズナ*rd29B*遺伝子の乾燥およびABA応答性発現に関与する*AREB*遺伝子の解析

宇野　雄一[12]，降旗　敬[13]，安部　洋[1]，モハマド M. パルベーズ[1]，篠崎　和子[1]，篠崎　一雄[3]（[1]農水省・国際農研・生物資源，[2]神戸大・農・植物資源，[3]理研・植物分子）

シロイヌナズナの*rd29B*遺伝子は，乾燥およびアブシジン酸(ABA)により発現が誘導される。また，ABA変異体である*aba1*や*abi1*では，乾燥による発現誘導が抑えられる。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*リポーター遺伝子を用いたトランスジェニック・タバコの系で*rd29B*遺伝子のプロモーター解析を行った結果，2個のABRE (ABA Responsive Element) 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新規のbZIP型タンパク質・AREB (ABA Responsive Element Binding Protein) 1～3をコードするcDNAを単離した。ゲルシフト解析の結果，AREB1およびAREB2のGST融合タンパク質は，ABRE配列に特異的に結合することが示された。またノーザン解析の結果，*AREB1*および*AREB2*のmRNAは，乾燥，NaClおよびABAに応答して増加した。さらに，*rd29B*のシス配列を含んだ77塩基の断片をレポーター遺伝子につないだキメラ遺伝子は，葉肉プロトプラストの系で*AREB1*および*AREB2*を共発現させた場合，転写活性化が認められ，その活性はABA存在下で付加的に増加した。以上の結果により，AREB1およびAREB2が乾燥時のABAによる発現誘導に働く*rd29B*遺伝子の転写活性化因子であると考えられた。

1aI09

ダイコン下胚軸の光屈性におけるミロシナーゼの役割

山田小須弥、長谷川剛[1]、長谷川宏司（筑波大・応生化、[1]筑波大院・バイオシステム）

ミロシナーゼはアブラナ科植物に多く含まれているカラシ油配糖体等のチオグルコシド結合を加水分解する酵素である。これまでにダイコン（*Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *gigantissimus* Makino）下胚軸の光屈性に伴い、光側組織に存在する4-methylthio-3-butenyl glucosinolate (MTBG、不活性型)が減少し、4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBI、活性型)が増加し、更にラファヌサニン（活性型）が生成されることを明らかにして光屈性刺激がMTBGからMTBIへの変換を誘導している可能性が示唆された。今回、MTBGからMTBIへの変換を触媒すると考えられるミロシナーゼに注目し、片側からの光照射に伴うダイコン下胚軸のミロシナーゼ活性の変化を調べた。照射後１０分以内に光側組織でミロシナーゼ活性が増大することを確認した。一方、影側と暗黒対照では大きな変動は見られなかった。これらの結果から不活性型のMTBGがミロシナーゼによりMTBIに変化し、更にその一部が活性型のラファヌサニンへと変化することにより光屈性が誘導されることが示唆された。

1aI10

インゲン（*Phaseolus vulgaris*）のジベレリン3β水酸化酵素の解析

小林正智，川出洋，篠崎一雄，神谷勇治（理研）

インゲンの未熟種子は高いジベレリン生合成能力を持ち，in vivo，in vitroでの代謝実験により生合成経路が推定されている。その特徴は，3β位の水酸化の段階で，二重結合の導入，さらにはエポキシ化に至る分岐が存在することである。未熟種子から精製された3β水酸化酵素は，このような特徴を保持していた。一方茎葉ではエポキシ化に至る活性は存在していない。これらの結果は活性が異なる複数の3β水酸化酵素の存在を示唆している。

演者らはインゲン未熟種子よりRT－PCRとRACEを用いて３種類の3β水酸化酵素遺伝子をクローニングした。それらのうち，これまでに他の植物よりクローニングされた3β水酸化酵素遺伝子と最もホモロジーの低いクローンがコードする蛋白の機能を解析したところ，3β位の水酸化とともに二重結合の導入，およびエポキシ化の活性も持つことが明らかになった。またこの酵素はδ-ラクトン型およびアルデヒド型のC_{20}ジベレリンも基質としうることから，これまでに報告された3β水酸化酵素よりも基質特異性が低い酵素であることが示唆された。他のクローンの活性と生活環上での発現について解析した結果についても報告する予定である。

1pI01

イネの胚発生過程に関与する遺伝子の解析

西村明日香[1]、北野英巳[2]、松岡信[1]（[1]名大・生物分子応答、[2]名大・農）

胚発生過程は植物の基本的体制が構築される出発点として重要な過程である。これまでの組織・形態学的な研究から、高等植物においては初期の分裂様式やそれに伴う形態的な変化、器官の分化など、その過程はほぼ一定のパターンで行われていることが明らかにされている。近年、イネ、トウモロコシ、シロイヌナズナなどでこのような胚発生過程が異常になる突然変異体が多数報告され、それらを利用した遺伝子機構の解明に期待が寄せられている。我々はイネの胚発生過程に関わる遺伝子の探索、解析をもとにその機構の解明を目指している。今回はシロイヌナズナにおいて、その変異により胚発生過程に異常をきたすことが知られている幾つかの遺伝子に関して、その相同遺伝子をイネから単離、解析したので報告する。

*PINHEAD(ZWILLE)*及び*ARGONAUTE1*遺伝子は、茎頂分裂組織(SAM)の形成に関与していると考えられている。これらのイネ相同遺伝子の胚発生過程における発現を調べたところ、*PINHEAD*ホモログは主にSAM周辺の特異的な領域や子葉鞘の表側、維管束などに発現が見られたが、*ARGONAUTE1*ホモログは胚全体に一様に発現していることがわかった。また、初期胚発生に関わる*MONOPTEROS*遺伝子の類似遺伝子、*ARF3(ETTIN)*遺伝子のイネホモログは、芽鱗を構成するの一部の細胞で局所的に発現していた。これらのイネ胚発生過程おける機能に加え、幾つかのイネ胚発生突然変異体との関わりについて考察する。

1pI02

胚発生過程において分化する器官の数の制御

千徳直樹、佐藤豊、北野英巳[1]、長戸康郎[2]、松岡信　（名古屋大・生物分子応答研究センター、[1]名古屋大・生命農学、[2]東大・農学生命科学）

胚発生において器官を幾つ分化させるかは植物種によって決まっており、厳密な遺伝的制御を受けていると考えられる。このような器官の数を制御する遺伝的プログラムを解析する目的で、シュートが複数形成されるイネの変異体odm54、odm69およびodm87を単離した。これらの変異体はどれも種子発芽させると複数の発芽が認められたが、胚発生過程における形態観察によってエキストラのシュートが分化する時期は変異体によって異なること、しかしその発生位置は全ての変異体で本来のシュートが分化する位置に対し、幼根原基をはさんだ反対側に分化する傾向が認められた。また、茎頂分裂組織の分化、維持に関与していると考えられているイネのホメオボックス遺伝子、*OSH1*をプローブに用い*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったところ、odm69の球状胚において２つ目のシュートの発生位置を予期するような発現パターンが見られた。これらの結果より、イネ胚発生過程におけるこれら３つの遺伝子の機能および器官分化数の制御機構について考察する。

1pI03

*leafy cotyledon*及び*fusca*と類似形質を有するシロイヌナズナ変異体の解析

山岸和敏[1,4], 吉田茂男[1], Robert L. FISCHER[2], Robert B. GOLDBERG[3], John J. HARADA[4]; ([1]理研・植物機能, [2]Dept. of Plant and Microbial Biol., Univ. of California, Berkeley, CA 94720, USA, [3]Dept. of Mol., Cell, and Dev. Biol., Univ. of California, Los Angeles, CA 90024-1606, USA, [4]Sec. of Plant Biol., Div. of Biol. Sci., Univ. of California, Davis, CA 95616, USA

我々はシロイヌナズナ変異体を用い、胚発生の分子機構解明を目的としている。line24変異体は後期胚発生欠損株としてT-DNA挿入系統より単離され、*leafy cotyledon* (*lec*)変異体と同様、胚におけるアントシアニンの蓄積、乾燥耐性欠損による胚致死性、子葉上のトライコーム形成などの形質を有した。また寒天培地上にレスキューした未熟種子は発芽したが、実生過程での枯死、暗所下での胚軸伸長欠損など*fusca*変異体とも一部類似性を示した。従ってline24遺伝子は後期胚発生と実生分化の誘導或いは維持に働くと考えられる。二重変異体の解析では*lec1*、*lec2*、*fus1* (*cop1*)と相乗作用を示すことから、line24遺伝子は*LEAFY COTYLEDON*及び*FUSCA*遺伝子と協同的に働くと推測された。単離されたline24遺伝子から予想したアミノ酸配列はWD-40反復配列を有した。現在、遺伝子の機能解析を行っている。

1pI04

ニンジンホメオボックス遺伝子*CHB2*の不定胚形成における発現様式と機能の解析

得字圭彦、福田裕穂　(東大院・理・生物科学)

ニンジン不定胚形成はオーキシンによって容易に誘導することができ、現在まで植物の胚発生のモデルとなってきた。私達の研究室では、ホメオボックス遺伝子をニンジンより単離し、不定胚形成におけるその役割を解析している。ニンジンホメオボックス遺伝子(*CHB1*-*CHB6*)の産物はホメオドメインというDNA結合領域を持ち、さらに隣接してロイシンジッパーモチーフを持っている。

今回、私達は*CHB2*についてin situ hybridizationを行い、不定胚形成における発現様式を解析した。さらに*CHB2*をセンスおよびアンチセンス方向に導入した形質転換不定胚を作成し、この遺伝子の機能について解析を行った。*CHB2*はノーザン解析より心臓型胚の時期に一過的に発現が上昇することがわかっている。in situ hybridizationの結果、*CHB2*は心臓型胚では子葉原基の付け根部分に発現し、魚雷型胚では管状要素とその周辺の細胞に局在していた。*CHB2*アンチセンスを導入した形質転換植物では、胚軸の伸長が抑えられ、さらにこの植物体からオーキシン処理によって二次不定胚を誘導したところ、心臓型胚以降への発達が著しく阻害された。

以上の結果にもとづき*CHB2*の胚発生における機能を考察する。

1pI05

ニンジンECP45 遺伝子の単離と解析

北澤則之、斎藤力[1]、塩田肇[1]、鎌田博[1]
(筑波大・バイオシステム、[1]筑波大・生物)

不定胚形成は、一度特定の機能を持つように分化した体細胞から植物体が再分化する現象であり、植物細胞の持つ分化全能性の最も直接的な証拠として知られている。また、種子胚と同様の形態変化を経て植物体にまで成長することから、種子胚発生解析のためのモデル系として利用されている。

我々はこれまで、ニンジン不定胚誘導系を用い、不定胚を形成する能力を持った細胞(EC: embryogenic cells)に特異的に発現している embryogenic cell protein (ECP)を同定してきた。そのうち、ECP31,40,63 遺伝子の単離、解析を行い、不定胚のような胚的器官においてABAによる発現誘導が見られるのに対し、実生などでは、その誘導が見られないことを明らかにしてきた。

今回我々は、ECで特異的に検出されたECP45蛋白質についてその遺伝子の単離と発現解析を行った。まず、ECP45 の部分アミノ酸配列をもとに RT-PCR、degenerate PCR を行い、cDNA 断片を得た。その断片をプローブにニンジン不定胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ECP45 cDNA を単離し、その塩基配列を決定した。その結果、この cDNA は約 1.4 kbp であり、389 アミノ酸よりなる蛋白質をコードする遺伝子であった。アミノ酸配列をもとに相同性の検索を行ったところ、種子胚発生後期に発現してくる LEA タンパク質と高い相同性があることが明らかとなった。また、サザンハイブリダイゼーションにより、遺伝子はゲノム中に1コピーのみ存在することが示された。

1pI06

胚形成異常を示すシロイヌナズナ *embryo yellow* 変異体の解析

石川　貴章[1]、吉岡　泰[1]、町田千代子[1, 2]、町田　泰則[3] ([1]名大院・理・生命理学、[2]キリンビール基盤研、[3]京大院・理・植物)

eye (*embryo yellow*) 変異は胚形成異常を示す劣性の変異であり、シロイヌナズナの T-DNA 挿入系統より同定された。胚の成熟期において野生型胚の色は緑のままであるのに対して、*eye* 変異胚は緑から黄に変色するという表現型を示した。また、*eye* 変異体は 寒天培地上で 0 ～ 13 % の割合で発芽し、発芽した植物体は、以下のような形態的特徴を示した。① 野生型と比較して胚軸と根の表皮細胞の長さが短く、葉の大きさが小さい。② 根端部の細胞増殖が抑えられた。③ 茎頂および葉柄の基部から多くの不定芽が形成された。④ 5 μM BA (Benzladenine) を含む寒天培地上で *eye* 変異体を発芽させたところ、2 ～ 3 週間後に幼植物の茎頂から緑色カルスが形成され、そこから多くのシュートが形成された。以上のような変異体の表現型から *EYE* 遺伝子は胚形成においては胚の成熟期において機能し、発芽後は細胞増殖や細胞伸長を制御していると推測される。*eye* 変異は T-DNA 挿入部位と強く連鎖しているため、現在、この T-DNA を指標として *EYE* 遺伝子のクローニングを行っている。

1pI07

ニンジン体細胞胚の形態形成におよぼすアフィディコリンの影響

保田浩、増田宏志（岩手連大・生資科）

ニンジン体細胞胚形成において体細胞から細胞塊形成の初期段階、次いで球状胚から心臓型胚形成の過程を連続観察した。その結果、細胞塊から球状胚、次いで心臓型胚に移行する過程で時々不規則な形態形成が観察された。一方、細胞塊をDNA合成阻害剤であるアフィディコリンで処理し、次いでアフィディコリンのない培地に移して培養すると、一時細胞塊は構成する細胞間の接着がルーズになり細胞が大きくなる。さらに培養を続けると大きくなった細胞が分裂して胚が形成されることを観察した。この過程における形態変化をSEMでも観察したので報告する。

1pI08

シロイヌナズナの *EMBRYONIC FLOWER(EMF)2* 遺伝子のクローニング

吉田存方，柳井幸弘，平塚純造，三輪龍士，加藤嘉博，加藤弥生，Z.R.Sung[1]，高橋滋（三井化学・ライフサイエンス研究所，[1]UC Berkeley, Plant and Microbial Biology）

シロイヌナズナの *emf* 変異体 *(emf1, 2)* は、栄養成長期間を経ず開花直後に花成することから、野生型遺伝子は栄養成長の維持または花成プログラムの抑制に関わっていると考えられている。我々は、早期花成変異体の単離を目的としたスクリーニングの過程で *emf* 様の変異体を見出し、アレリズムテストの結果、この変異体が *emf2* のアレルであることを確認した。さらに、マップベースクローニング法により *EMF2* 遺伝子の単離に成功した。*EMF2* 遺伝子は、ジンクフィンガーモチーフを持つ新規な蛋白質をコードしていた。また、相同な配列がシロイヌナズナにおいて少なくとも他に 1 種存在することが確認された。

（参考文献）

Z.R.Sung et al(1992)Science 258, 1645

L.Chen et al(1997)The Plant Cell 9, 2011

1pI09

メチル化部位検出型 AFLP 法を用いたカーネーションゲノム DNA の細胞層別特異的メチル化部位の検出

秋元宏文[1]、吉田洋之[2]、山口雅篤[3]、柴田道夫[4]、土生芳樹[5]、飯田滋[5]、小関良宏[1,5]（[1]農工大院・工・生命工, [2]JT・植開研, [3]南九州大・園芸, [4]野茶試・花卉部, [5]基生研）

カーネーションの花色は表皮由来の L1 層細胞におけるアントシアニンの蓄積により決定されている。栄養繁殖性花卉であるカーネーションの花色と色素の存在する細胞層のメチル化との関連性についてをターゲットに、すでに品種として確立されている「サティスファクション」とこの品種から「枝変わり」として得られた花色発現という表現型において変異の見られる品種「レッド」を用いて遺伝学的・細胞学的見地からメチル化部位検出型 AFLP 法を用いて調べた。

本研究で用いたメチル化部位検出型 AFLP 法は「サティスファクション」と「レッド」の成熟した葉の表皮（L1 層）および葉肉組織（L2 層）プロトプラストから抽出されたゲノム DNA を 6 塩基認識制限酵素とメチル化感受性制限酵素 HpaII あるいはメチル化非感受性制限酵素 MspI により切断し、2 つの選択的プライマーを組み合わせて 2 段階の PCR を行うことによりゲノム DNA 中のメチル化状態の差異を可視的に同定した。その結果、カーネーションゲノム DNA 中の約 30% がメチル化されていることが示され、両者の間でゲノム DNA 全体の 1.3% のメチル化の変異が見られた。その変異の見られる遺伝子断片の単離およびその解析について報告する。

1pI10

突然変異体を用いたイネ穂の形態形成の解析

経塚淳子、黒河江美、前川雅彦[1]、安部賢史、松村玲子、島本　功（奈良先端大・バイオ、[1]岡山大・資生研）

イネ科植物では穂（花序）の分枝パターンは穂のかたちを決定する重要な要因の一つである。そこで、われわれはイネ穂の形態形成の遺伝的メカニズムを解明するために、分枝に関する突然変異体（*blp*、*fzp2*、*lax*）の表現型の解析を行った。*blp* では穂が分枝しない。一方、*fzp2* では花芽が形成されず分枝が繰り返される。*lax* は分枝パターンは正常であるが、花芽の形成が著しく阻害される変異体である。

イネ *LFY/FLO* 相同遺伝子である *RFL* は、その発現パターンから穂の分枝への関与が示唆されている。そこで、突然変異体における *RFL* 遺伝子の発現を調べたところ、*blp*、*fzp2* では野生型と同様の発現パターンが観察された。このことから、*RFL* 遺伝子は *BLP*、*FZP2* 遺伝子の上流あるいは、独立の経路において機能していることが示唆された。

1pI11

シロイヌナズナの糖応答性変異株*uns3,uns4(unusual sugar response)*の単離と解析

大藤雅章[1]、古川靖子[1]、青木栄津子[1]、中村研三[1,2]
([1]基生研・発生生物、[2]名大・生命農・生化)

野生型シロイヌナズナを糖を含む*in vitro*培地上で生育させると、糖濃度の上昇に伴い多量のアントシアニンが蓄積するほか、ロゼット葉数の増加と共に花成時期が遅れるという表現型が見られる(1998年度日本植物生理学会年会)。我々は花成における糖シグナリングの役割を明らかにするため、独自に作成したシロイヌナズナのActivation Tagging Lineの中から「高濃度の糖を含む培地上で、野生型より花成時期が早い」などの表現型を指標に突然変異体の選抜を行い、花成と糖応答性に異常が見られる変異体*uns3, uns4*を単離した。

これらの変異体はともに土栽培/長日条件下で花成時期が促進されていた。いずれも野生型植物体とくらべて葉のクロロフィル含量の低下が見られ、葉の形態的特徴から野生型植物体と区別が可能である。形態的特徴に関しては、少なくとも優性の形質を示す。また、いずれも切り取り葉における糖誘導性のアミラーゼ活性の増加が野生型にくらべ低く抑制されていた。土栽培/短日条件下、及び*in vitro*培地上での花成、アントシアニン蓄積の糖応答性、葉の形態的特徴、などの表現型のほか、表現型の連鎖やサザン法によるタギングの可能性、などについて報告する。

1pI12

シロイヌナズナの糖応答性変異株*uns1* (*unusual sugar response*)の分離と解析

小内清[1]、大藤雅章[1]、中村研三[1,2]
([1]基生研・発生生物、[2]名大・生命農・生化)

野生型シロイヌナズナ植物体を糖濃度の異なる*in vitro*培地上で生育させると、葉のクロロフィル含量が培地の糖濃度と正の相関を示す。このことは、糖シグナリング(糖の輸送や代謝、糖応答性遺伝子発現制御)が葉の機能発達過程に積極的に関わることを示唆する。我々は、葉の機能発達における糖シグナリングの役割を明らかにするために、独自に作成したactivation tagging lineの中から、「葉のクロロフィル含量の野生型植物体との違いが、土栽培時に比べ*in vitro*培地上で顕著に現れる」という表現型を示す多数の突然変異株を分離し、さらにこの中から糖応答性変異株*uns1*を分離した。

*uns1*変異株は、土栽培では、発芽後しばらくlight green表現型を示すが、その後、野生型と区別できなくなる。一方、糖濃度の低い*in vitro*培地上では、ほぼアルビノに近い表現型を示した。培地糖濃度を上昇させると葉のクロロフィル含量は増加するが、そのレベルは野生型より顕著に低下していた。また、切り取りロゼット葉におけるアミラーゼやアントシアニンの糖誘導性が野生型に比べ顕著に低下していた。この他、土栽培及び*in vitro*培地上での花成、糖の輸送や糖応答性遺伝子発現、複数の表現型の連鎖、などについて報告し、*UNS1*遺伝子の役割について考察する。

2aI01

Agrobacterium A281のTiプラスミド(pTiBo542)のRB近傍の解析

梅基直行(キリンビール・基盤研)

*Agrobacterium*A281は感染能力の高い強病原性の菌系として知られている。このT-DNA上のおおよそのマップと幾つかの配列は決定されているが、TL-DNAを解析したDengら[(1995) Mol.Plant-MicrobeInteract. 8, 538-548]はRB配列として保存されている配列と相同なものは見つからなかったと報告した。そこで今回、既報部分の配列を基にクローニング・配列を決定したところ、RB保存配列、その配列と6b遺伝子の間に新規のORFが存在することを発見した。

新規遺伝子はRiプラスミドの*rolD*遺伝子との相同性が認められた。当該遺伝子を破壊した株を作成したが、タバコに対するcrown gall生成能には変化がなく、病原性には関与していないことがわかった。当該遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子であるGUS遺伝子を連結したものを作成して、タバコの形質転換体を得た。その解析から、このプロモーターは組織特異的な発現制御がされていることが明らかとなった。

2aI02

タバコ植物体におけるエリシター応答遺伝子の発現様式

鈴木　馨[1]、矢野　明[2]、西内　巧[1,3]、進士　秀明[1]([1]工技院・生命研・植物分子生物、[2]国立感染研・口腔科学部、[3]科学技術振興事業団)

植物は、細胞壁などの物理的障壁とともに、過敏感反応に代表される誘導性の感染防御応答によって感染部位の周辺に抗菌性の化学的環境と物理的障壁を再構築して感染の拡大を抑制して抵抗する。このような誘導性の防御応答では、様々な遺伝子の転写制御をともなう応答が重要な役割を担っており、感染応答の初期過程で発現誘導される遺伝子を解析することが植物の感染防御機構を理解する上で重要である。そこでタバコ懸濁培養細胞を用いて、エリシター応答の初期過程で発現量が上昇する遺伝子群のcDNAをsubtractive hybridization法を用いて単離した。多数のcDNAが得られ、ホモロジー検索の結果、一次および二次代謝系の酵素遺伝子、エチレン合成に関わる酵素遺伝子など含む既知のエリシター応答性遺伝子の他に、転写制御因子やプロテインキナーゼなどシグナル伝達や遺伝子発現制御に関わる遺伝子と相同性を示すものが得られた。また、まったく相同性の見られないものも得られた。さらに、これらのcDNAを用いてタバコ植物体でのmRNA量を解析し、器官特異的発現、葉齢による発現量の変化、また、エリシター処理による処理葉および非処理葉における発現応答について調べた結果を報告する。

2aI03

タバコ植物における菌体壁エリシター誘導性遺伝子のクローニングとその発現解析

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) で処理すると、PR-protein の蓄積や細胞死などの防御応答が観察される。そこで、HWC 処理タバコ葉より cDNA ライブラリーを作成し、Differential Hybridization によりエリシター誘導性遺伝子の単離を試みた。その結果、二次代謝系酵素遺伝子、Glycine-rich protein や hsr 201 といった既知の病原菌接種誘導性遺伝子と相同性を示す遺伝子、未知の遺伝子などが単離された。 傷害、サリチル酸処理、非病原性細菌接種といった種々のストレスに対するこれら遺伝子の応答性をノーザン解析により調べたところ、発現誘導の量や時間に様々なパターンが見られ、病傷害ストレス誘導性遺伝子の発現にいたる情報伝達の多様性が示唆された。先に単離した[1] エリシターにより誘導されるレセプター様タンパク質遺伝子とシトクロム P450 遺伝子の発現解析の結果も併せて報告する。

1) 日本植物生理学会 1998 年度年会講演予稿集 p. 167

2aI04

ジャガイモ植物における 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) 遺伝子のクローニング

伊藤夢子、吉岡博文、道家紀志 (名大院・生命農学・資源生物機能)

HMGR は、セスキテルペノイドファイトアレキシン生合成の鍵酵素であると考えられている。ジャガイモにおける HMGR 遺伝子は、3 クラスから成る多重遺伝子族を形成しており、*hmg*2 および *hmg*3 はエリシター処理や病原菌接種により誘導されることが知られている。今回、HMGR 遺伝子の発現制御を解析する目的でジャガイモゲノミックライブラリーより *hmg*3 ゲノムのクローニングを試みた。その結果、5 クローンが得られたので塩基配列を比較したところ、イントロンおよびエクソンにおいて若干違いが認められた。推定プロモーター領域には myb および P-box 様配列が存在し、H-box 様配列を 2 つ含む約 300bp の繰り返し配列が認められた。さらに翻訳開始コドンの 5' 側近傍には、ピリミジンに富む配列が見出された。

2aI05

タバコ培養細胞BY-2におけるキチナーゼの分離・精製

新屋友規、斉藤美佳子、呉　基鳳、松岡英明 (東京農工大・工・生命工学)

タバコ培養細胞BY-2は、比較的大きい細胞 (直径約20～30 μ m) が数個、直鎖状に結合している。このユニークな形状は、ストレス応答遺伝子発現の単一細胞での解析に有用であると期待される。そこで、既に他のタバコ種で確認されているキチナーゼに注目し、BY-2でのキチナーゼ発現の確認と、その単離を試みた。

BY-2に対してストレスとして、15種類の化学的あるいは物理的処理をし、キチナーゼ酵素活性をグリコールキチンを基質とする活性染色法により調べた。その結果、植物病原菌の一種である *Alternaria alternata* 培養液をオートクレーブ処理後、その上清を作用させたところ、最も顕著にキチナーゼ活性の誘導が確認された。本酵素の活性は処理後30分で確認され、約3時間後に最大に、その後12時間後までゆるやかな減少が確認された。また、ゲルろ過クロマトグラフィーにより活性成分の分子量は15～20kDaと推定された。

2aI06

Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼによるG/HBF-1のリン酸化

作田正明、 Pedro M. Cánovas[1]、Richard A. Dixon[2]、Chris Lamb[1]、(お茶の水大・理・生物, [1]Salk Institute、 [2]Samuel Roberts Noble Foundation)

G/HBF-1は、カルコンシンターゼ (*chs15*) のプロモーター領域内のG-boxおよびH-boxに結合するbZIPタンパク質である[1]。ダイズ培養細胞に*Pseudomonas syringae*を感染させると、プロテインキナーゼの活性が急激に上昇し、G/HBF-1のセリン残基がリン酸化される。このプロテインキナーゼは細胞質に局在し、これによりリン酸化されたG/HBF-1は、*chs15*のプロモーター領域に結合する。我々は、このプロテインキナーゼに注目し、その特性の解析を試みた。G/HBF-1には、Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ (CDPK) によりリン酸化される可能性のあるセリン残基がいくつかある。そこでG/HBF-1のリン酸化に対するCa^{2+}の影響を調べたところ、EGTA (100 uM) によりリン酸化が阻害された。ダイズより精製したCDPKは、*in vitro*でG/HBF-1をリン酸化した。また感染細胞からの抽出液を抗CDPK抗体で処理すると、G/HBF-1のリン酸化が阻害された。さらに、感染細胞からの抽出液とCDPKで、それぞれリン酸化したG/HBF-1についてtryptic phosphopeptide mappingを行ったところ、両者に共通にみられるphosphopeptideがいくつか存在した。

1) Dröge-Laser et al. (1997) EMBO J. 16: 726-738

2aI07

新規なプロモータープローブ・ミニ*Tn*5を用いて作製したＧＦＰ恒常発現根粒菌株の性質

佐伯和彦　　阪大・院理・生物科学

*Aequorea victoria*由来のGreen Fluorescent Protein(GFP)は *in vivo* 非破壊レポーターとして著しい注目を集めている。今回、プロモーターを持たないGFP遺伝子とゲンタマイシン耐性（Gm^R）遺伝子（*accC1*）を連結したタンデムレポーターを持つミニトランスポゾンを作製して、ミヤコグサ根粒菌（*Mesorhizobium loti*）へ導入した。得られた変異株のうち、GFPを恒常的に発現するものについて報告する。

GFP遺伝子としてS65TとP64L変異により励起蛍光ピークが赤方にシフトするEGFP産物（Clontech社）をコードするものを用いたミニ*Tn*5 -*egfp-accC1*を、*M. loti*に導入し、Gm含有TY培地で選択した。約10^9の母集団から10 μg/ml以上のGm存在下で生育する約40の変異株を得たが、蛍光強度には50倍以上の格差が認められた。４株が特に強い蛍光を示し、YEM培地での生育速度は母株と同程度であった。これらの株中で、抗GFP抗体と反応するポリペプチドは総蛋白質の１～３%以上に達していた。興味深いことに、いずれのポリペプチドは本来のEGFPよりも数万程度高分子側に検出された。如何なる蛋白質と融合しているのか、現在解析中である。４株の強蛍光株をミヤコグサ（Gifu）へ感染させたところ、１）２～４日以内に根毛表層でのマイクロコロニーを形成し、２）３～７日間以内で根毛の変形を引き起こし、蛍光を発する感染糸の伸張が認められ、３）１０～１４日で肉眼で確認可能な根粒を形成した。野性株と比べ、根粒形成までの時間は２から５日程度遅いが、頻度は同程度であった。

2aI08

レンゲ根粒形成における最初期発現遺伝子群の解析

林　誠，室岡義勝（阪大院・工・応生）

マメ科植物の根粒形成に関与する遺伝子は nodulin あるいは early nodulin (ENOD)として多く単離されている．いくつかの ENOD 遺伝子は根粒の形態形成の始まる以前から発現していることがわかっているが，基本的にこれら nodulin は根粒の形態形成開始以降に発現する．われわれは根粒菌感染直後から根粒形成開始以前に発現し，ENOD として同定されていない一群の遺伝子をスクリーニングするために蛍光ディファレンシャルディスプレーをおこなった．レンゲに根粒菌を感染させて９６時間経過した根から RNA を抽出し，逆転写反応で cDNA を合成し，任意の 10mer プライマーと蛍光標識したアンカープライマーで PCR をおこなった．その結果８種のポジティブフラグメントの塩基配列が明らかになった．そのうちの１つはフラボノイド生合成の初期段階に関わる酵素である cinnamate 4-hydroxylase(C4H)と高い相同性を示した．

2aI09

ダイズ根粒菌の DNA 再編成と共生遺伝子水平伝達

伊沢　剛，鮫島玲子，板倉　学，三井久幸，南沢　究（東北大学・遺伝生態研究センター）

日本各地から単離されたダイズ根粒菌 213 株中に、ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) の挿入配列 (IS) 様構造をもつ反復配列 RSα と RSβ が、極めて多く保持される超反復配列保有株 (HRS 株) が 21 株単離された。HRS 株から RSα、RSβ 以外に 5 種類の IS が単離され、それらは RSα、RSβ と同様に HRS 株でコピー数が増加していた。共生遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、バンドの重複や移動が観察されることから HRS 株では IS の介在する DNA 再編成が起こったことが示唆された。そこでその共生遺伝子周辺の物理地図を作製し検討したところ、IS の挿入、欠失等 DNA 再編成の痕跡が見られた。*nif* 遺伝子領域についてはシーケンスを行いさらに詳細に検討を行った。

また、HRS 株の生態的意義の一つとして遺伝子水平伝達の供与菌となることが以前から示唆されているが、その水平伝達した根粒掲載遺伝子領域の特徴についても合わせて報告する予定である。

2aI10

リゾビトキシンのACC合成阻害と生合成系の解明

安田　剛[1]、佐藤　茂[2]、遊橋健一[1,3]、江面　浩[3]、市川徳一[1]、貫井憲之[1]、南沢　究[1]　([1]東北大・遺生研、[2]東北大・農、[3]茨城生工研)

ダイズ根粒菌*Bradyrhizobium elkanii*の生産するリゾビトキシン(RT)はメチオニン生合成系のβ-cystathionaseを阻害し、ダイズ栽培種にクロロシスを引き起こす植物毒とされてきた。しかし最近の状況証拠から、RTが宿主のエチレン生合成を抑制し、根粒形成を促進させる働きを持つことが考えられた。そこで、エチレン生合成におけるRTの影響を検討するために、鍵酵素であるACC合成酵素に着目し、酵素活性に及ぼす影響を検討した。その結果、RTのKiは0.025 μMと非常に低く、RTがACC合成酵素を強く阻害する作用を持つことが本研究より初めて明らかとなった。さらに我々は本酵素阻害に基づいた高感度新規RT定量法を作成した。現在は、他の根粒菌へRT生産能を付与し、根粒形成能に優れた有用菌の構築を行うことを目指しており、*B. elkanii*のRT生合成遺伝子の解析結果についても合わせて報告を行う予定である。

2aI11

Bradyrhizobium elkanii の生産するリゾビトキシンの根粒形成における役割

市川徳一 [1]、遊橋健一 [1,2]、江面浩 [2]、安田剛 [1]、貫井憲之 [1]、南澤究 [1]（[1] 東北大・遺生研、[2] 茨城生工研）

ダイズ根粒菌*Bradyrhizobium elkanii* は、低分子アミノ酸誘導体であるリゾビトキシンを生産する。このリゾビトキシンは植物にクロロシスを誘導する一種の植物毒として知られている。本報告では、リゾビトキシンの根粒形成における効果について、宿主植物のエチレン発生に着目し、検討を行った。

B. elkanii USDA94 株と、これを親株とするリゾビトキシン非生産変異株をサイラトロにそれぞれ接種すると、親株では宿主根からのエチレン発生が抑えられ、変異株では抑えられなかった。また、根粒形成数については親株の方が優位に増加した。以上の結果から、リゾビトキシンはエチレン生合成を抑制し、根粒形成を有利にする因子であることが示唆された。さらに宿主植物に対して、エチレン生合成や受容に変化を与える物質の投与を行ったところ、この示唆を支持する結果が得られた。

2pI01

海産性赤潮プランクトンの分子系統学的解析

平下 貴司、門谷 茂、野村 美加、一見 和彦[1]、田島 茂行（香川大・農、[1]東北水研）

有害プランクトンによる赤潮が、西日本とくに瀬戸内海沿岸域で毎年頻発して深刻な漁業被害を及ぼしており、有効な赤潮鞭毛藻種の同定法確立および、発生の予知・防除方法の開発が求められている。

そこで本研究は、種確認法確立に最も良い分子マーカーとして保存性の高いリボソームRNA(rRNA)遺伝子領域を用い、過去瀬戸内海沿岸域で赤潮を引き起こした主要な藻類の分子系統解析を行い、その結果に基づいた種特異的なPCRプライマーの開発を目指した。

本研究には、形態学的特徴より同定後研究室でクローン化された株を用い、そのゲノムDNAよりPCR法で18S rDNA及び28S rDNA D1/D2領域を増幅するために、それぞれのプライマーを設計した。

その結果、18S rDNA領域からは約1.8kb、28S rDNA D1/D2領域からは約720bpの増幅産物を得た。この増幅産物を直接クローニング後、塩基配列を決定した。決定された塩基配列とデータベースから得た他の藻類の塩基配列を比較した結果、同一属内で18S rDNA領域では、約80%、28S rDNA D1/D2領域でも、約85%と比較的高いホモロジーを示した。各クローン株の分子系統学的位置を推定するために、近隣結合法により分子系統樹を作製したところ、形態学的特徴によって分類された近縁種は、ほぼ同じ位置に分配された。

2pI02

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

関 原明、鳴坂真理、Piero Carninci[1]、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）

シロイヌナズナでは、ゲノムプロジェクトが進行しており2000年末にはゲノムの塩基配列がすべて決定される見通しになっている。しかし、発現遺伝子の正しい予測は現在のところいまだに難しく、全長cDNAの単離は発現遺伝子の同定に必要である。また、全長cDNAは植物遺伝子の機能同定にも必要である。そこで、我々はビオチン化cap trapper法を用いてシロイヌナズナの完全長cDNAライブラリーを作製した[1)]。

これまでに、乾燥や低温ストレス処理した植物体、種々の発生段階の植物体より調製したmRNA等を用いて計9種類のシロイヌナズナの完全長cDNAライブラリーを作製した。単離した1003個のcDNAクローンについて5'末端側から端読みを行ったところ、それらは725のcDNAグループに分類された。今後は、単離した全長cDNAをDNAチップに結合させて種々のプローブとのハイブリにより、乾燥や低温ストレスにより誘導される発現遺伝子の同定や、トランスジェニック植物や挿入変異体での遺伝子の発現パターンの変化を解析しTarget遺伝子の同定を行う予定である。

1) Seki et al. (1998) Plant J. 15: 707-720.

2pI03

ラン藻*Synechocystis* sp. PCC6803 の運動の解析

岡本 忍、大森正之（東京大・総合文化・生命環境）

ラン藻は古くから運動性を持つことが知られ、そのメカニズムの解析が約一世紀に渡り行われてきた。しかし、いまだそのメカニズムは不明である。

単細胞性ラン藻*Synechocystis* sp. PCC6803 野生株は運動性を有し、寒天培地上で拡がったコロニーを形成する。一方、光合成研究で広く用いられているPCC6803のグルコース耐性株は運動性がなく、寒天培地上で拡がることが出来ず、ドーム状のコロニーを形成する。このPCC6803野生株を用いて、運動性を持たない変異体を得ることを試みた。

トランスポゾン(Tn5)または、薬剤カセットを用いたランダムカートリッジ法によるランダムな突然変異誘導では、運動変異に関与する遺伝子を単離することが出来なかった。

そこで、他の運動性細菌で運動との関与が示唆されている遺伝子群のうちPCC6803に相同遺伝子があるものに関して、直接その遺伝子を破壊を試みた。その結果、typeIV pili (線毛)の生合成に関与する*pil*遺伝子ファミリーの*pilT* (slr0161)を破壊した株で運動性の欠損が観察された。*pilT* のラン藻運動への関与を検討した。

2pI04

窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* のFe-スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子のクローニングと大腸菌での発現制御

金松澄雄、佐藤節子、浅田浩二[1] (南九州大・食品工学、[1]福山大・生物工学)

スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、多くの細菌ではMn-SOD(*sodA*)、Fe-SOD(*sodB*)の2種のアイソザイムがあり、酸素によってMn-SODが誘導される。一方、Fe-SODは酸素によって誘導されず逆に減少するが、Fe-SODの発現調節機構はよく解っていない。好気性窒素固定菌の *Azotobacter*はFe-SODしか持たず、また可溶性タンパクの数%を占め、活性は変動しない。そこでこの高発現は構成的な発現であるのか、または細胞内の環境を反映した発現であるのかを明らかにするために、*Azotobacter*のFe-SOD遺伝子を単離し、通性嫌気性菌である大腸菌に導入し、培養条件を変えることによりその発現調節を調べた。FeSODの相同部分の塩基配列を基に合成したプローブを用い、ゲノムライブラリーをスクリーニングして10kのクローンを得、塩基配列を決定した。このクローンは193個のアミノ酸からなる推定分子量21,377Da のFe-SODをコードしていた。また近傍にいくつかのORFも明らかになったが、ゲノム上の遺伝子配置に他の細菌のものとの類似性は認められなかった。*sodB*を含む4kの断片をベクターに組み込み、大腸菌に導入して、好気的または嫌気的に培養し、Fe-SODの発現を活性染色と免疫染色で検討した結果、自身のプロモーターによって、嫌気的条件下でより多く発現した。このことから *Azotobacter*の*sodB*は酸素による被制御能を有しており、その高発現は細胞内の嫌気的な環境を反映してることが示された。

2pI05

シロイヌナズナにおけるアスコルビン酸合成に関与する*GLDH*遺伝子の単離と発現解析

玉置雅紀、向井文子[1]、鎌田博[1]、中嶋信美、久保明宏、青野光子、佐治光（国立環境研、[1]筑波大・バイオシステム）

植物のアスコルビン酸は環境ストレスにより発生する過酸化水素のスカベンジャーとして重要な働きを持つと考えられている。実際、アスコルビン酸合成能が低下したシロイヌナズナはオゾンに対する抵抗性が低下していることが示されている。植物のアスコルビン酸合成経路は明らかになりつつあるが、この経路に関与する遺伝子の単離及びその発現制御についての解析はほとんど行われていない。我々はシロイヌナズナよりアスコルビン酸合成経路の最終ステップを触媒する酵素をコードする遺伝子、L-Galactono-Lactone Dehydrogenase (EC 1.3.2.3; *GLDH*)を単離し、環境ストレス下におけるこの遺伝子の発現解析を行った。既に単離されているカリフラワーの*GLDH*遺伝子のcDNAをカリフラワーの小花のtotal RNAを用いてRT-PCR により単離し、これをプローブとしてコロンビアの播種後２週間の実生cDNAライブラリーをスクリーニングしたところシロイヌナズナ*GLDH*遺伝子のクローン、*AtGLD1*を単離することができた。*AtGLD1*はGLDHの全長をコードしているクローンではなかったが、カリフラワーのGLDHのアミノ酸配列と90%の相同性が見られたことからGLDHをコードするcDNAであると考えられた。この遺伝子の発現をいくつかの異なる大気汚染ストレス下、また、ストレスに対して異なる耐性を示すシロイヌナズナ生態型（Columbia、Wassilewskija）で解析した結果をアスコルビン酸含量の測定結果とあわせて報告する。

2pI06

AP2/EREBPおよびB3ドメインを含む新規のDNA結合性タンパク質、RAV1、およびRAV2は、機械的刺激により誘導される

加賀谷安章、服部束穂（三重大・遺伝子）

トウモロコシVP1、およびアラビドプシスABI3等に保存されるDNA結合ドメイン、B3ドメインとの構造的類似性をもとに単離したアラビドプシスのRAV1、および、RAV2は、B3ドメイン様の領域に加え、AP2/EREBPドメイン様の領域を併せ持つ構造的特徴がある。

RAV1の最適結合配列を解析したところ、各々のドメインは、5'-CACCTG-3'、および5'-CAACA-3'の２つの塩基配列に対して特異的に結合し、RAV1全体としては、２つの塩基配列を持つ配列に強く結合し、その間隔が、異なる長さの場合、あるいは、２つの塩基配列の向きが相対的に異なった場合にも同等の結合を示した。さらに、RAV1、および、RAV2の生理的機能を検討するために、RAV1およびRAV2の発現パターンを、ノーザン法で解析した。また、RAV2に関しては、プロモーターGUSキメラ遺伝子を導入したトランスジェニックアラビドプシスを作成して時・空間的発現パターンを調べた。その結果、RAV1およびRAV2の発現は、寒天培地から引き抜き水に移す操作、あるいは、傷害処理等の外因的な刺激に対して応答する性質を示すことが見出された。現在、種々の刺激に対する応答性、および、その組織特異性の解析等を試みており、併せて紹介したい。

2pI07

イネ・鉄型スーパーオキシドディスムターゼのcDNAクローニングとストレスに対する発現応答

上中弘典[1]、森田重人[1,2]、徳本恵[1]、横山英史[1]、増村威宏[1,2]、田中國介[1,2]（[1]京府大・農・生資化、[2]京都農資センター）

スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は、含有金属の違いにより３種のアイソザイム(Cu/Zn-, Mn, Fe-SOD)が存在する。このうち、Fe-SODは双子葉植物の限られた種で報告されているものの、単子葉植物には存在しないと考えられてきた。今回、我々はイネより鉄型スーパーオキシドディスムターゼ(Fe-SOD)をコードするcDNAを単離した。推定アミノ酸配列は、N末端側に推定トランジットペプチドを含み、Fe-SODに必須のアミノ酸を完全に保存していた。しかし、既知の植物Fe-SODとの相同性はあまり高くなかった。得られたcDNAを大腸菌で発現させた組換えタンパク質は鉄を含み、SOD活性を示した。しかしながら、既知のFe-SOD活性が阻害を受ける過酸化水素処理により、このSOD活性は阻害されなかった。イネFe-SODのmRNAは、調べた全ての組織で発現が確認された。また、イネFe-SODは光、アブシジン酸、塩ストレスによって強く発現誘導されたが、乾燥ストレスにより発現量は低下した。

2pI08

レポーター遺伝子を用いたシロイヌナズナ ω-3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現制御機構の解析

松田 修, 渡辺 千鶴, 射場 厚 (九大・理・生物)

ω-3 脂肪酸不飽和化酵素は、植物脂質を構成する主要多不飽和脂肪酸であるトリエン脂肪酸の合成の最終段階を触媒する植物に固有の酵素である。シロイヌナズナにおいては、小胞体に局在する FAD3 および葉緑体に局在する FAD7、FAD8 の 3 種の ω-3 酵素が同定されているが、これらをコードする遺伝子の発現制御が膜脂質における脂肪酸組成の調節に深く関与し、植物の環境適応性に重大な影響を与えることが示唆されている。

私達は転写レベルでの発現解析を通じ、これら 3 種の ω-3 酵素遺伝子の発現が様々な内的要因 (加齢、組織など) あるいは外的刺激 (光条件、温度、傷害、植物ホルモンなど) により鋭敏に変化することを明らかにした。このような遺伝子発現の制御機構を明らかにするための手段として、これらの遺伝子の制御配列とレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子との融合遺伝子を作製し、葉組織を用いた一過的発現系および形質転換シロイヌナズナにおけるルシフェラーゼ遺伝子の発現を解析した。

本発表ではこの結果を踏まえ、これら 3 種の遺伝子が、同じアイソザイムをコードしながら、互いに独立した発現制御機構の支配を受けている可能性について議論する。

2pI09

シロイヌナズナ ω -3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*FAD7/8*) の発現に及ぼすオゾンの影響

八丈野 孝、 松田 修、 射場 厚 (九大・理・生物)

大気汚染物質の一種として知られるオゾンは、強力な酸化作用により生体の構成成分を破壊して細胞死を引き起こす。主に不飽和脂肪酸を過酸化することから、多不飽和脂肪酸を特に多く含む葉緑体膜中の脂質代謝に関わる酵素の発現に影響を与える可能性が考えられた。ω -3 脂肪酸不飽和化酵素は、ジエン脂肪酸をトリエン脂肪酸に不飽和化する反応を触媒する酵素である。シロイヌナズナにおいては、小胞体に局在する FAD3 および葉緑体に局在する FAD7、FAD8 の3種の ω -3 酵素が同定されているが、本研究においては、オゾンが FAD7 および FAD8 をコードする遺伝子の発現に及ぼす影響について調べた。本発表では、オゾンの曝露によるこれらの遺伝子の発現パターンの変化について、オゾンにより発現誘導を受けることが知られている PR (pathogenesis-related) 遺伝子と対比させながら議論する。

2pI10

ダイズβコングリシニンβサブユニットタンパク質の蓄積に対するグルタチオンの影響

粟津原元子、平竹潤[1]、金晧衍[2]、茅野充男、林浩昭、藤原徹 (東大院・農・応生化、[1]京大・化学研究所、[2]Department of Biology、Seoul National University)

ダイズの種子貯蔵タンパク質の一つであるβコングリシニンβサブユニットタンパク質は、硫黄欠乏条件下で蓄積量を増す。本研究では、βサブユニットタンパク質の蓄積に対するグルタチオンの影響について検討した。

グルタチオンは硫黄欠乏条件下で、植物体中の濃度が大きく低下する含硫化合物である。ダイズの未熟子葉を *in vitro* で培養する際に、グルタチオンを添加すると、βサブユニットの蓄積量が減少した。また、硫酸イオン存在下でグルタチオン合成系のγグルタミルシステイン合成酵素の阻害剤であるスルホキシミン誘導体 ((2*S*)-2-Amino-4-[(2*R*,*S*)-2-carboxybuthyl- (*R*,*S*)-sulfonimidoyl] butanoic acid) を培地に添加すると、その蓄積量が増加する傾向が見られた。

以上の結果より、グルタチオンがβサブユニットタンパク質の蓄積を負に制御していることが示唆される。現在、ダイズホモグルタチオンの定量を試みており最新の結果を報告する。

3aI01

従属栄養硝化細菌は硝化をしなくても生育できる

榎屋 温、杉井美里、増子大輔、大野泰史、庄子和夫、山中健生 (日大・理工・工化)

従属栄養硝化細菌は、コハク酸のような簡単な有機物の存在下にアンモニアをヒドロキシルアミン、亜硝酸、硝酸に酸化する硝化活性を示すが、この硝化は独立栄養硝化細菌のようにエネルギー獲得の為か、それとも解毒の為かがはっきりしていない。

本研究では*Alcaligenes faecalis* IFO 13111を用いて、種々の硝化阻害剤や脱共役剤が生育と硝化にどのように作用するかを調べた。1%カルボニルシアニド-*m*-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP)は、この細菌によるヒドロキシルアミン、亜硝酸の生成を強く阻害したが、その生育には影響を与えなかった。また、生菌細胞内のATP量はヒドロキシルアミンの存在下で急速に減少したが、亜硝酸の存在下ではほとんど影響されなかった。以上の結果からすると、*A.faecalis* は硝化をしなくても生育できるが、ヒドロキシルアミンが生じるとこれを除去するために硝化を行う必要があるといえる。

3aI02

δ^{15}N値でみた非マメ科植物の窒素固定の可能性

米山忠克[1,2]，寺門純子[2]，松丸泰郷[3]，安藤象太郎[4]，S. Meunchang[5]（[1]農林水産省農研センター、[2]筑波大・応生化系、[3]筑波大・環境、[4]国際農研、[5]タイ農業局）

サトウキビやサツマイモの植物体内に内生する細菌に窒素固定菌(*Acetobacter diazotrophicus*など)が報告されている。 圃場で栽培された非マメ科作物が窒素固定によって有意な窒素を獲得しているかを、植物体の窒素自然存在比（δ^{15}N値）を周辺植物の値と比較することによって推定した。

サトウキビについては、ブラジルで平均３０％（０~７０％の変異）の寄与率が、フィリピンで６カ所のうち１カ所、日本宮古では調べた３カ所全てで、高い寄与率が推定された。つくばで栽培したサツマイモでは炭水化物が蓄積する生育後期に固定—Nの獲得がみとめられた。タイのキャッサバではほとんど寄与がなっかたが、サトウキビでは低い寄与率、パイナップルでは高い寄与率が推定された。

3aI03

ダイズ根粒ウリカーゼ（nod-35）遺伝子の非感染細胞特異的発現に関与する調節領域の解析

高根健一、野村美加[1]、程憲国[1]、田島茂行[1]、河内宏（農水省・生物研、[1]香川大・農）

固定窒素をウレイドとして転流するダイズにおいて、根粒ウリカーゼ（nod-35）は尿酸からアラントインを生成する重要な反応を触媒し、非感染細胞パーオキシゾームに局在する。近年、ウリカーゼがコムギの葉に存在することが報告され、またシロイヌナズナからもcDNAが単離された。我々はダイズから根粒で強発現するUR9と全ての器官で弱く発現するUR2という２種類のnod-35遺伝子を単離し、さらに非ウレイドタイプのマメ科植物であるアルファルファからも複数のnod-35をcDNAクローニングした。そこで、ダイズnod-35遺伝子の非感染細胞特異的発現に関与する調節領域をダイズ以外の遺伝子と比較することにより考察することにした。

スクリーニングの結果、シロイヌナズナから１つ（gAtUR）、アルファルファから２つ（gMsUR1, gMsUR4）のnod-35遺伝子を単離した。これらの遺伝子の5'-上流域をGUS遺伝子と結合させたキメラ遺伝子の根粒での発現を、ダイズ毛状根の形質転換系を用いてUR9、UR2のそれと比較検討した。その結果、gAtURとgMsUR1は根粒中では維管束にのみGUS活性を認め、gMsUR4は維管束と非感染細胞の両方で発現していた。これらの発現パターンと5'-上流の塩基配列の比較解析、およびこれまでのUR9、UR2プロモータのデリーション実験の結果から、ダイズnod-35遺伝子の根粒非感染細胞特異的な発現に関与するエレメントとして、転写開始点上流130bp付近に存在する３カ所のモチーフが示唆された。

3aI04

非アラントイン型マメ科植物*Medicago sativa*のウリカーゼ発現とその解析

Cheng Xian Guo、野村美加、平光直文、高根健一[1]、河内宏[1]、松岡信[2]、田島茂行（香川大・農、[1]農水省・生物研、[2]名大・生物分子応答）

ダイズ、ナタマメ、インゲンといったアラントイン型のマメ科植物からウリカーゼの遺伝子がクローニングされている。この一群のウリカーゼ遺伝子をもとにディジェネレートプライマーを作製し、非アラントイン型のアルファルファ子葉を用いてRT-PCRを行ったところ、今までにクローニングされているウリカーゼ遺伝子と非常に類似している遺伝子をクローニングすることができた。そこで、これをプローブにしてアルファルファ根粒cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、２つのウリカーゼ遺伝子（M2,M9)をクローニングすることができた。根粒、葉、花、茎、根、子葉などの各器官におけるウリカーゼ遺伝子の発現を調べてみると、ダイズでみられるような根粒における高いウリカーゼ発現は認められず、M2、M9ともにmRNAの発現量はすべての器官で同程度の発現であった。しかし根粒の*in situ*ハイブリダイゼーションの結果、ウリカーゼ遺伝子はダイズと同様に非感染細胞、維管束特異的に発現していた。以上の結果から、非アラントイン型のマメ科植物においてもアラントイン型のマメ科植物と同様にウリカーゼ遺伝子は根粒の非感染細胞特異的に発現しているが、その発現量は低いことが明らかとなった。今後はさらに詳細に解析を行って行く予定である。

3aI05

クローバ根粒菌の*nod*遺伝子に応答して発現量が変動するクローバの遺伝子群

鈴木章弘，阿部美紀子，樺木野　繁，内海俊樹，東　四郎（鹿児島大·理·生命化学）

クローバ根粒菌*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 4Sの共生プラスミド(pRT4S, pSym)をcureして得たstrain H1は、クローバへの根粒形成能を持たない(Nod-)。しかし、insertとして共生プラスミド上の*nodN, M, L, E, F, D, A, B, C, I, J, T*を持ったプラスミド(pC4S8)をstrain H1に導入すると根粒形成能が回復する〈H1(pC4S8), Nod+〉。*nod*遺伝子に応答して発現量の変動する遺伝子の単離を試みた。

H1及びH1(pC4S8)を接種して48時間経過したクローバからcDNAライブラリーを構築し、それぞれのライブラリーについてディファレンシャルスクリーニングを行った。その結果、*nod*遺伝子によって発現が抑制される遺伝子として４種類（２種類は既知）促進される遺伝子として１９種類（１３種類は既知）の遺伝子がindependentに単離された。さらに、単離された遺伝子について、塩基配列の決定及び発現解析を行ったので報告する。

3aI06

ミヤコグサのレグヘモグロビン遺伝子の解析

内海俊樹，鶴田智子，宮本旬子[1]，阿部美紀子，鈴木章弘，東 四郎（鹿児島大・理・生命化学，[1]鹿児島大・理・地球環境科学）

レグヘモグロビン(Lb)は、マメ科植物の根粒細胞中に存在するヘムタンパク質で、根粒細胞内の酸素分圧を調節し、根粒菌が窒素固定活性を発現する環境を作り出している。マメ科植物には、通常、複数のLb遺伝子が存在しているが、それぞれの遺伝子の発現調節機構については不明である。また、微生物との共生窒素固定能とは関係ないグロビン遺伝子が、広く植物に存在することが明らかになりつつある。非マメ科植物のグロビン遺伝子とマメ科のLb遺伝子との関係も興味深い。

本研究では、ミヤコグサ(*Lotus japonicus*, 2n=12)のLb遺伝子をクローニングし塩基配列を解析した。PCRで増幅された長さの異なる3種のDNA断片について塩基配列を決定したところ、いずれもセスバニア及びアルファルファのLb遺伝子と高い相同性を示した。3種のDNA断片のエクソン部の塩基配列は互いによく似ていたが、特に第3イントロンは、長さ及び配列ともそれぞれのDNA断片で大きく異なっていた。*in situ* PCR / FISH法による染色体上でのLb遺伝子の直接検出も試みた。

3aI07

エンドウ突然変異体E135の根粒におけるバクテロイドの形態とタンパク質組成

菅沼教生、早川秀和、鬼頭誠1、内海俊樹2、阿部美紀子2、東四郎2（愛知教育大・生命科学、1神戸大・農、2鹿児島大・理・生命化学）

エンドウFix⁻突然変異体E135に形成された根粒では、ニトロゲナーゼタンパク質が存在するにもかかわらず、窒素固定活性がまったく検出されないことが明らかになった。そこで、E135根粒で窒素固定活性が発現しない原因をさらに特定するために、E135根粒のバクテロイドにおける鉄とモリブデンの含量、バクテロイドの形態とタンパク質組成を正常なものと比較検討した。

E135根粒のバクテロイドにおける鉄とモリブデンの含量は、正常なものとほぼ同様であった。バクテロイドの形態を走査型電子顕微鏡で観察したところ、E135根粒でも正常なものと同様にY字型に変形したバクテロイドが認められた。しかし、バクテロイドの表面が正常なものでは滑らかであるのに対し、E135ではでこぼこであった。また、二次元電気泳動法によりE135根粒のバクテロイドのタンパク質組成を分析した結果、正常なバクテロイドと純粋培養した根粒菌の中間的な特徴が示された。

3aI08

*Mesorhizobium loti*の生産するNod factorに対するミヤコグサの応答について

丹羽忍[1]・河内宏[2]・川口正代司[3]・生田安喜良[1]（1.東京理科大学、2. 農水省生物研、3. 東大大学院総合文化）

ミヤコグサ根粒菌(*M. loti* JRL501)からNod factorを精製し、それに対するミヤコグサの反応を調べた。Nod遺伝子を誘導した*M. loti*培養液のBuOH抽出液をシリカゲルカラムで処理後、HPLCによって分離すると2つの主要なピークを認めたので、これらについて質量分析によって構造を決定した。これらは10^{-7}~^{9}Mの濃度でミヤコグサ根毛の変形と、しばしば典型的なカーリングを引き起こした。また10~30ngのNod factorをミヤコグサ根に局所的に接種することにより、80%程度の高頻度で接種部位に根粒原基を誘導できた。Nod factorによって誘導された根粒原基は、根粒菌による場合と同様に初期nodulin遺伝子ENOD40とENOD2の発現を伴っており、それらの発現部位にも真性の根粒と違いはなかった。また、接種後10日目前後には根粒柔組織(cortex)の分化が認められ、さらに中心領域では感染細胞と非感染細胞に相当する細胞群の分化を認めることができた。これらの結果は、これまで報告されている野生ダイズの系などと比較して、ミヤコグサでは精製したNod factorのみによって、根粒形成のプログラムがより完全に近い形で進行することを示している。

3aI09

14-3-3タンパク質によるオオムギ硝酸還元酵素の不活性化

末吉邦，林優子，大竹憲邦，杉本敏男[1]，王子善清[1]，大山卓爾（新潟大・農・応生、[1]神戸大・農・生環）

ホウレンソウやコマツナ葉において、硝酸還元酵素（NR）は、明暗移行に伴ってリン酸され、さらにリン酸化NRへ14-3-3タンパク質がMg^{2+}依存的に結合することで不活性化される。今回我々は、単子葉植物のオオムギ葉にも同様のNR制御系が存在することを報告する。

オオムギを明暗周期の下で生育させ、明期および暗期開始後30分の植物より採取した葉をそれぞれ明処理葉および暗処理葉とした。暗処理葉から得た粗抽出液のNRはMg^{2+}存在下で不活性化された。粗抽出液を硫安分画で粗分画すると、NR画分（0~40％画分）とNRに阻害活性を示す画分（40~60％画分）に分けることができた。暗処理葉由来のNR画分に40~60％画分あるいはシロイヌナズナ14-3-3タンパク質を加えると、NR活性は同程度に不活性化された。一方、明処理葉から得たNR画分に対し同様な処理を行ってもNR活性は阻害されなかった。イムノブロット解析では、粗抽出液中には複数の14-3-3タンパク質が確認され、それらは硫安分画で40~60％画分に回収された。現在、NRに作用する14-3-3タンパク質分子種の特定を試みている。

3aI10

高等植物におけるN_2O発生の解析
(2) 光合成電子伝達系の役割

五島直樹、高橋美佐、森川弘道
（広島大・理・遺伝子科学）

我々はこれまでに、アンチセンスNiRc DNAを導入し、NiR活性 を大幅に抑制したタバコ形質転換体（clon e271）が、硝酸イオン、亜硝酸イオンまたは二酸化窒素を吸収し 、これらの窒素の一部をN_2Oに変換し、大気中に放出する能力を持つことを明らかに してきた。このN_2O発生は、タバコ葉断片に硝酸イオンを減圧浸潤法で吸収させ、リン酸緩衝溶液中でN_2O発生を測定するleaf strips assayによっても確認された。この leaf strips assayによってN_2O発生には、光エネルギーが必要であり、光合成電子伝 達系の阻害剤であるDCMUの添加によって約20倍、促進されることが明らかとなった。 現在、種々の電子伝達系阻害剤の添 加によって、N_2O発生に必要な還元力の供給経路の解析を行っている。

3aI11

二酸化窒素ガス暴露に応答して発現する植物葉タンパク質の解析

梅原明夫、木須康智、五島直樹、 高橋美佐、 森川弘道
（広島大・理・遺伝子科学）

窒素酸化物ガスは生物に対して有毒であるが、植物は窒素源の一つとしても利用している。しかしながら植物が窒素酸化物ガスにどのような影響を受け、どのように対応しているのかは明らかではない。演者らは植物体が窒素酸化物ガスに曝された際に特異的に発現する遺伝子の解析を行っている。

本研究では典型的な低木街路樹であるヒラドツツジ植物を4ppmの二酸化窒素ガスに暴露した後、葉のタンパク質を二次元電気泳動法で分離し、画像解析装置を用いて暴露処理葉/無処理葉間でタンパク質発現量の比較解析を行った。約1200個のタンパク質のスポットを解析し、pI 5.6, MW. 25-26 kDaの2つのタンパク質が暴露処理した葉で5倍以上増加することを見いだした。これらのタンパク質の各々22残基のN-末端アミノ酸配列はモモで報告されている auxin-binding protein、シロガラシ、シロイヌナズナで報告されている germin-like proteinのN末端領域と57-68%の相同性があることが明らかになった。現在本タンパク質の遺伝子のクローニングを行っている。

3aI12

植物葉に取り込まれた二酸化窒素から生成する未知窒素化合物の解析 (2)ニトロサミン化合物の同定

森川弘道,河村義史,高橋美佐,有村源一郎,井出博,藤田耕之輔[1](広大・理・遺伝子科学, [1]広大・生物生産)

大気中の窒素酸化物はそれ自体有毒ガスであるが大気中のVOC(volatile organic carbons)と光化学反応してオゾン生成する大気汚染の元凶の一つである。我々は植物に吸収された二酸化窒素由来の窒素の20-30%は硝酸態窒素とは異なる代謝をし、ケールダール難分解性の未知窒素(UN)化合物に変わることを報告した。このUN化合物中にはニトロサミン化合物が含まれていることを新たに見いだしたので報告する。

シロイヌナズナ(エコタイプC24)実生(播種後5週齢)をガス濃度自動制御型チャンバー(NC-1000-SC型)を用い、$^{15}NO_2$(51.6 atom%)濃度=4.0±0.4 ppm(v/v)、暴露時間=4時間、光強度=70uE m^{-2} s^{-1}、CO_2濃度=340±80ppm、温度=22.0±0.3 °C、相対湿度=70±4%の条件で暴露した。暴露後、葉を回収、ホモジナイズし、ホモジネートをゲルクロマト(Superdex 75HR)で分離した一つの画分をGC-MS分析するとニトロサミン化合物(N-ニトロソジフェニルアミン)に対応するピークが認められた。このピークをGC/C/MSで分析した結果、全未知窒素の5-10%がこの物質に含まれていることが分かった。

3aI13

植物葉に取り込まれた二酸化窒素から生成する未知窒素化合物の解析 (3) 主化合物の精製と解析

河村義史，高橋美佐，有村源一郎，井出博，藤田耕之輔[1]，森川弘道（広島大・理・遺伝子科学，[1]広島大・生物生産）

植物は，大気汚染物質の一つである二酸化窒素 (NO_2) ガスを葉から吸収・代謝する。我々はこれまで，植物葉から吸収された二酸化窒素由来の窒素は，根から吸収された硝酸由来の窒素とは異なる代謝をたどり，その20-30%はケールダール難分解性の未知窒素化合物に変わることを発見した。また全未知窒素の約10%は，有害物質として知られるニトロサミン化合物 (N-ニトロソジフェニルアミン)であることを見いだした(森川ら，日本植物生理学会1999年度年会発表予定)。しかし，残りの約90%はまだ同定されておらず，2種以上の物質が存在すると考えられる。本研究は，この未知窒素化合物の主要物質の構造解析を目的としている。

播種後約5週齢のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype C24) の実生を，NO_2 濃度 4.0±0.4 ppm，CO_2 濃度 340±80 ppm，温度 22±0.3°C，相対湿度 70±4%，照度 70$\mu Em^{-2}s^{-1}$の条件下で4時間暴露し，葉を回収後，乾燥，粉砕したものを試料として用いた。試料をホモジナイズした後，ホモジネート中の未知窒素化合物を陽イオン交換クロマト，ゲル濾過，逆相クロマト等で分離，精製し，その構造を解析する。その結果について報告する。

3pI01

亜硝酸還元酵素活性が大幅に抑制された形質転換植物における硝酸/亜硝酸還元の解析 (3) 還元に関与するタンパク質の解析

高橋美佐、Caboche, Miche[1]、森川弘道（広島大・理・遺伝子科学、[1]Lab Biologie Cellulaire, INRA）

亜硝酸還元酵素(NiR)は亜硝酸イオンを6電子還元してアンモニアを生成する反応を触媒する酵素で二酸化窒素や硝酸還元に必須の酵素である。タバコのNiRcDNAのアンチセンス鎖を導入したトランスジェニック・タバコclone 271(Vaucheret et al. 1992)では、NiR活性が大幅に抑制されているが、^{15}Nトレーサー法/質量分析法を用いて、このトランスジェニック植物の二酸化窒素還元および硝酸還元を解析したところ、二酸化窒素還元能は野性株の40-60%、硝酸還元能は野性株とほぼ同レベルであることが分かった(高橋ら、植物生理学会1998年度年会発表)。今回は、このトランスジェニック植物において二酸化窒素還元や硝酸還元に関与している酵素、タンパク質を明らかにすることを目的として研究を行った。

植物材料として、上に述べたトランスジェニック・タバコclone 271と野性株の10週間生育させたものを用いた。clone 271は個体毎に、NiR活性がほぼゼロに抑制されていることを確認して実験に用いた。植物体からに抽出した粗抽出液をnativePAGEにより分離し還元力としてメチルビオローゲンを用いて、亜硝酸還元酵素活性について活性染色を行った。これらの結果について報告し、討論する。

3pI02

トランスジェニック植物における二酸化窒素同化の解析 (3)NRcDNA,GScDNAを導入した植物の解析

高橋美佐、松村葉子、有村源一郎、藤井真紀子、森川弘道（広島大・理・遺伝子科学）

植物に取り込まれた二酸化窒素は植物内でアミノ酸に代謝されることが明らかにされており、その代謝には硝酸還元系酵素、GS/GOGAT系酵素が関与していると考えられている。本研究では硝酸還元酵素とグルタミン合成酵素活性を増加又は減少させたトランスジェニック植物を育成し、二酸化窒素同化を解析した。

CaMV 35S プロモーターとNOSターミネーターの制御下にあるタバコ由来のNRcDNA(センス)またはシロイヌナズナGS cDNA(センス、アンチセンス)発現ベクターをパーティクルガン法を用いてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* ecotype C24)に遺伝子導入し、トランスジェニック植物を育成した。選抜マーカー遺伝子として*hpt*を用いた。

NRcDNA形質転換植物ではNR活性が1.0-1.8倍(野性株比)であった。また、GScDNA形質転換植物ではGS活性が0.3-2.1倍(同)であった。これらの植物を4ppm $^{15}NO_2$に８時間暴露し、葉を採取し、乾燥、粉砕後、ケールダール分解及び同位体質量分析計を用いて二酸化窒素由来の還元体窒素量を解析した。酵素活性と二酸化窒素由来の還元体窒素量の相関を解析したところNR活性と還元態窒素量との間には相関は認められなかった。他方、GS活性と還元態窒素量には正の相関が観察された。我々はNiR形質転換植物を用いた研究から、NiR活性と還元態窒素量との間には正の相関関係があることを既に報告しており、その結果も含めて報告し、討論する。

3pI03

イネ未抽出葉身における細胞質型グルタミン合成酵素及びフェニルアラニンアンモニアリアーゼの組織内分布

櫻井望、片山義博[1]、山谷知行（東北大院・農・応生科、[1]農工大・院・BASE）

これまでの我々の研究では、イネの未抽出葉身において、細胞質型グルタミン合成酵素(GS1)タンパク質が主に二次細胞壁の未発達な厚壁組織細胞や木部柔細胞に存在することを見いだした。このことから、GS1 がリグニン化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)の反応により放出される NH_4^+の同化を行っている可能性が示唆された [1]。PAL により放出された NH_4^+は GS によりグルタミンへ取り込まれることが ^{15}N-NMR を用いた研究により示されているが、GS イソ酵素のうちどの分子種がその系に寄与しているかを直接的に示した報告はない。そこで本研究では、イネ未抽出葉身における GS1 と PAL タンパク質の組織内細胞分布を比較し、GS1 がこの NH_4^+の再同化系に機能しているかどうかを検証した。

約 12.5 齢のイネの第 12 葉身未抽出部分を用い、パラフィン包埋法により組織切片を作成した。アフィニティー精製した GS1 抗体及び、ポプラ PAL の抗体を用い、アビジン-ビオチン法により両酵素タンパク質の存在する細胞を検出した。 PAL タンパク質は主に、篩部と木部の境界付近の木部柔細胞、厚壁組織細胞、メストム鞘細胞に検出された。これらの細胞では、葉身の成熟に伴って二次細胞壁の肥厚が見られるため、PAL はこれらの細胞で、リグニン合成のための初期反応を行っていると考えられる。PAL の免疫染色に用いた切片と隣接した組織切片中で、GS1 タンパク質は PAL が検出された細胞と同様の細胞群に分布していることが観察された。この結果は、これらの細胞において GS1 が、PAL の触媒反応により放出されたアンモニアの再同化に機能している可能性を強く示唆するものである。

1) Sakurai *et al.* (1996) Planta **200**: 306-311

3pI04

形質転換イネによる NADH 依存性グルタミン酸合成酵素遺伝子プロモーター領域の解析

小島創一、木村美智子、早川俊彦、山谷知行（東北大院、農、応用生命科学）

我々は、イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素（NADH-GOGAT）遺伝子の-2,840 から翻訳開始コドン（+886）までのプロモーター領域と GUS 構造遺伝子との融合遺伝子を導入した形質転換イネを用いて、同プロモーターの発現特性解析を行なっている。これまでに-2,840 までのプロモーターは、主に（1）根の原表皮、中心柱、厚膜組織、（2）葉の維管束組織、（3）登熟中の穎果の背部大維管束組織といった成長中の若い組織と維管束組織に特異的であることを報告してきた。これらの NADH-GOGAT の組織特異的発現を制御している領域を同定するために、プロモーター領域を 5' 上流から段階的に欠失させたデリーション解析をおこなった。-1,325, -735, -267, -142, +7 から翻訳開始コドンまでの領域をそれぞれ GUS 遺伝子に連結した融合遺伝子をイネに導入した。R0 世代について GUS 活性の分布する組織を調べたところ、-1,325, -735 まで欠失させても-2,840 の発現パターンと変化はなかった。-267, -142, +7 については現在解析を進めている。また窒素に対する応答性についても-2,840 の R1 世代の形質転換幼植物を用いて現在解析中である。

3pI05

イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素（NADH-GOGAT）遺伝子のオカダ酸による発現制御

広瀬直也、早川俊彦、山谷知行（東北大院・農・応用生命科学）

イネ幼植物根および培養細胞において、NADH-GOGAT 遺伝子の発現は窒素源の供給により誘導される。また、イネの根の NADH-GOGAT 遺伝子の場合、シグナル物質がアンモニア自体ではなくグルタミン、あるいはその代謝産物であることを我々は示唆してきた[PCP 38(11):1295 (1997)]。今回我々は、NADH-GOGAT 遺伝子の窒素による発現誘導にリン酸化/脱リン酸化の過程が関与しているか否かを解析した。

プロテインキナーゼ及びプロテインホスファターゼの阻害剤を、窒素を含まない R-2 培地にて3日間前培養したイネ培養細胞に添加後、20mM NH_4^+ を6時間供給し NADH-GOGAT mRNA の変動をノーザン解析した。NH_4^+ と 1μM のオカダ酸の同時添加による NADH-GOGAT mRNA 蓄積量の増加は、NH_4^+ の単独添加による増加よりも著しかった。また、オカダ酸のみの添加によっても NADH-GOGAT mRNA の増加が検出され、その増加は少なくとも２４時間持続的であった。一方、プロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンや K252a は NADH-GOGAT mRNA 量に変化を及ぼさなかった。

現在、オカダ酸に依存した NADH-GOGAT mRNA の増加機構とアンモニウムイオンに依存した増加機構との相互関係を検討している。

3pI06

アンチセンス NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 cDNA を導入したイネの解析

石山敬貴、梶田史比古、石井有理、[1]鈴井信郎、早川俊彦、[1]林浩昭、山谷知行　（東北大院、農、応用生命科学　[1] 東京大院、農、生命化）

イネの NADH 依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGA)の生体内における、直接的な機能解明のために、NADH-GOGAT cDNA 断片(856 bp)のアンチセンス鎖を導入した形質転換体イネを作出した。

その結果、形質転換体の複数のラインにおいて、野生型イネと比較して、未抽出葉身で NADH-GOGAT タンパク質量が減少しており、これらの形質転換体イネの種子は、野生型イネの種子よりも重量が最大 30% 減少していた。また、予備的な結果ではあるが、根において NADH-GOGAT mRNA またはタンパク質量が減少していた形質転換体は、NH_4^+ を含む培地では生長に著しい障害をきたした。これらの結果は、NADH-GOGAT が、根で NH_4^+ の同化、また、生長中の若い組織において転流窒素の再同化に重要な役割を担うというこれまでの仮説を支持するとともに、生産性に直接関わる酵素であることを示唆している。現在、師管液中のアミノ酸組成の検証を進めている。

3pI07

日本型、インド型、ジャワ型イネ着生葉の一生におけるグルタミン合成酵素の挙動とクロロフィル減少速度に関する QTL 解析

小原実広、佐藤俊文、早川俊彦、佐藤雅志[1]、山谷知行
(東北大院・農・応生科、[1]東北大・遺生研)

ササニシキを用いたこれまでの研究から、老化葉における細胞質型グルタミン合成酵素(GS1)は、師管を介して転流されるグルタミンの生合成に関与していることが示唆されている。予備的な結果から、ササニシキに比較してインド型品種の多くは、老化葉身の新鮮重あたりの GS1 含量が高いことが示された。そこで、GS1 含量の比較を詳細にする検討する目的で、インド型、日本型、ジャワ型品種のイネ着生葉の一生を通して、GS1 含量の挙動を比較した。

ガラス室内にて 11 葉期まで土耕栽培を行い、第 6 葉葉身が完全展開した日を 0 日として第 6 葉葉身を-7 日から 28 日まで経時的に収穫した。着生葉の一生を通して日本型、ジャワ型において新鮮重あたりの GS1 タンパク質含量はほぼ一定に保たれていたが、インド型では 14 日まで増加が認められ、日本型、ジャワ型の約 1.8 倍の含量を示した。14 日以降は減少し、28 日目で日本型の含量の 1.3 倍となることわかった。従って、葉身の老化過程においてインド型は高い GS1 含量を持っていることが明らかとなった。また、すべての品種において新鮮重あたりの葉緑体型グルタミン合成酵素含量は可溶性タンパク質含量の変化と類似していた。

日本晴及び Kasalath に由来する RILs を用いて、登熟期における止め葉のクロロフィル減少量に関する QTL 解析を行った。その結果、第 3、6 及び 10 染色体に少なくとも 3 個の QTL が検出された。

3pI08

イネにおけるアスパラギン合成酵素の器官分布

鈴木達郎、増田享太、早川俊彦、山谷知行（東北大院・農・応用生命科学）

高等植物におけるアスパラギン合成酵素（AS）の研究は、mRNA の発現に関する解析は行なわれてきたものの、AS タンパク質の解析はほとんど行なわれていない。今回我々はイネ AS cDNA の 5’ 領域 1,085 bp を大腸菌内で発現させ、AS 特異抗体を獲得した。この AS 抗体を用いて AS タンパク質の器官分布を解析した。

イネ（ササニシキ）地上部の葉身、葉鞘を用いて AS の分布をイムノブロット法により解析したところ、完全展開直後の葉鞘で AS に相当する 66.2 kD の強いシグナルが得られた。葉身では AS タンパク質はほとんど検出されなかった。また、穂における AS タンパク質は開花後徐々に増加し、２１日目にピークを迎えた後急激に減少することが明らかになった。一方、AS mRNA は完全展開葉鞘、未抽出葉身で AS に相当する 2.2 kb の強いシグナルが得られた。

アスパラギンは、グルタミンと並んで窒素転流の主要形態の一つである。窒素転流に重要な働きをすると考えられている GS1 は主として老化葉身維管束組織に検出されることから、 AS は GS1 とは異なる生理機能を持っていることが示唆される。

1aJ01

ベタイン合成遺伝子とその塩ストレスによる発現

孟玉玲、王羽梅[1]、日比野隆[2]、石川浩[2]、新居直祐[1]、高倍昭洋（名城大・総合研、[1]名城大・農、[2]名城大・理工化学）

ベタインは細胞内の浸透圧調節とか生体膜や蛋白質の構造の安定化に寄与し、乾燥、塩、高温、低温、酸化ストレスなど様々なストレス応答に重要な役割を果たすと考えられている。ベタインは、高等植物の場合、コリンから、コリンモノオキシゲナーゼ（CMO）およびベタインアルデヒド脱水素酵素（BADH）の2段階の反応によって合成されると考えられている。バクテリアおよび動物では、第一段階はコリン脱水素酵素（CDH）が触媒する。本研究では、ホウレンソウ等の双子葉植物のベタイン合成遺伝子の単離と発現について検討を行った。また、植物のベタイン含量をTOF-MSで調べる方法についても検討を行った。ホウレンソウcDNAから単離したベタイン合成遺伝子を用いて抗体の作成を行った。つぎに、これらの遺伝子が大腸菌およびラン藻で活性を持つ状態で発現するかどうか検討した。さらに、他の生物種におけるこれら遺伝子の有無について調べた。これらの結果について報告する。

1aJ02

オオムギのマイクロボディー型ベタインアルデヒド脱水素酵素を過剰発現させた形質転換イネを用いたグリシンベタインとイオンの蓄積に関する研究

鈴木朗範、岸谷幸枝[1]、高倍昭洋[2]、日比野隆[2]、林泰行[3]、田中章[3]、Angelina Alvarez-Nakase、高倍鉄子（名古屋大・生物分子応答研究センター、[1]東北大・農、[2]名城大・総合研究所、[3]植物工学研究所）

グリシンベタインは、植物の適合溶質として広く知られている物質である。高等植物においてグリシンベタインはコリンより2段階で合成される。コリンからコリンモノオキシゲナーゼ（CMO）によりベタインアルデヒド（BA）ができ、ベタインアルデヒドからベタインアルデヒド脱水素酵素（BADH）によりグリシンベタイン（GB）が合成される。これまでにオオムギより、BADHのcDNAをクローニングし、その推定アミノ酸配列のC-末端にSKLというマイクロボディーへの輸送シグナルがあることを明らかにしている。また、GBを蓄積しないイネもBADHを持ち、クローニングによりマイクロボディー型であることが判明した。

オオムギのBADHを過剰発現させた形質転換イネにおいて、BADHの基質であるBAを3mMになるように培地に添加したとき、１５０mMのNaCl存在下で、BAを添加しない形質転換イネに比べ枯死に遅延がみられた。また、そのときGBは野生株に比べて形質転換イネの葉、根ともに有為に高い蓄積がみられた。また、形質転換イネにおいてBAを添加したとき、BA無添加の時と比較してナトリウムイオンと塩素イオンの植物体への流入は低く抑えられた。

1aJ03

塩性植物アッケシソウの葉と根におけるグリシンベタイン、糖、イオンの蓄積に関する研究

鈴木朗範、真田幸香[1]、和田敬四郎[1]、石井忠[2]、野村美加、桃木芳枝[3]、高倍鉄子（名古屋大・生物分子応答研究センター、[1]金沢大・理・生物、[2]森林総合研究所、[3]東京農大・生物産業）

アッケシソウ（*Salicornia europaea* L.）はアカザ科の塩性植物であり、アカザ科の植物は細胞内に外部との浸透圧のバランスを取るために、グリシンベタイン（GB）を適合溶質として蓄積すると考えられている。

汽水湖（能取湖）に自生するアッケシソウの適合溶質を定量したところ、プロリンはほとんど蓄積がみられず、GB及びフルクトースやグルコースを多量に蓄積していることを見い出した。GBの分布は甘生植物のオオムギでは葉に多く蓄積し、根には少量しか含まれない。しかも葉のなかでも古い葉より若い葉に蓄積が顕著である。一方、アッケシソウでは地上部よりも根に多くのGBが蓄積していた。さらに根のなかでも若い根端組織にGBの蓄積が顕著であった。また、オオムギはナトリウム、塩素イオンを葉よりも根に多く蓄積していた。アッケシソウにおいても地上部よりも根に多くイオンを蓄積していたが、若い組織である根端部には少なく、根の上部ほど多く蓄積していた。さらにGBの合成酵素の一つであるベタインアルデヒド脱水素酵素（BADH）の蛋白量を、アッケシソウの植物体各部位においてwestern解析により比較したところ、各部位間に大きな差はみられなかった。今後、アッケシソウの根におけるGBの蓄積のメカニズムの解明が待たれるところである。

1aJ04

耐塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* の分子シャペロン DnaK の ATP 分解、蛋白質フォールデイング活性に対する塩濃度依存性

日比野隆[1]，杉野真知子[2]，加来伸夫[3]，新居直祐[2]，高倍鉄子[4]，吉川博文[5]，高倍昭洋[1,3]（[1]名城大・理工，[2]名城大・農，[3]名城大・総合研究所，[4]名古屋大・生物分子応答センター，[5]東京農大・バイオ）

耐塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* は幅広い塩濃度(0.25～2.0 M NaCl)で生育可能なラン藻である。このような高塩耐性を支配する要因の1つとして、分子シャペロン DnaK が関与するかどうかを明らかにすることを計画した。

A. halophytica からクローニングした *dnaK* 遺伝子は、他の生物種の DnaK 蛋白質と比較すると、C末端領域のアミノ酸が約100個長く、そのアミノ酸配列の相同性は低いことはすでに報告した。

そこで、*A. halophytica* の *dnaK* 遺伝子を大腸菌で大量発現させ、DnaK蛋白質をゲル濾過等で精製した後、DnaK 蛋白質の ATP 分解、蛋白質フォールデイング活性の塩濃度依存性を検討した。尿素で変性させたラクトースデヒドロゲナーゼ(LDH)を DnaK 蛋白質の存在する溶液に希釈したときの LDH 活性の回復の塩濃度依存性を測定した。これらの結果について報告する。

一方、*A. halophytica* のC末端領域を欠損させた mutant (DnaK-C)および淡水性ラン藻の DnaK を大腸菌で発現して、三者の DnaK の活性に対する塩濃度依存性についても検討した。これらの結果について報告する。

1aJ05

耐塩性ラン藻分子シャペロン DnaK 形質転換タバコの塩耐性

杉野真知子[1]，日比野隆[2]，田中義人[2]，新居直祐[1]，高倍鉄子[3]，高倍昭洋[2,4]（[1]名城大・農，[2]名城大・理工，[3]名古屋大・生物分子応答センター，[4]名城大・総合研究所）

分子シャペロンは、細胞内の様々な蛋白質の生合成反応（折れたたみ・会合・輸送・凝集）に関与している蛋白質であるが、同時に、生物が様々な環境ストレス（高温・低温・強光・乾燥など）にさらされた時、細胞内の蛋白質が変性・失活するのを保護する作用があると考えられている。そこで、DnaK 蛋白質を過剰発現した高等植物が環境ストレスに対する耐性が付与されるかどうか検討することを計画した。

A. halophytica からクローニングした *dnaK* 遺伝子を、CaMV35Sプロモーターで発現するようにした形質転換タバコを作製した。ストレスを加えない通常の条件では、野生株と生育速度は同じであった。ストレス条件下におけるCO_2固定速度・光合成電子伝達活性・イオン含量・蛋白質含量の変動を測定した。これらの結果について報告する。

1aJ06

*Amaranthus tricolor*の異なる色の葉部位の塩ストレス応答

王羽梅、孟玉玲[1]、星田尚司[1]、田中義人[2]、日比野隆[2]、新居直祐、高倍昭洋[1]（名城大・農、[1]名城大・総合研、[2]名城大・理工化学）

Amaranthusは野菜と花卉として利用されている双子葉のC4植物である。A.tricolorは花が咲く前から葉が鮮やかな三色がでてくる。先端は緑、中央は黄色、基部は赤色となる。本講演では、異なる色の部位の塩ストレスに対する応答について報告する。黄色と赤い部位のクロロフィル含量は、緑の部分の数％であった。黄色と赤い部位のCO_2取込み速度は、緑の部位の約40％であった。緑と緑／赤の部位のクロロフィル含量は塩ストレスにより、約30％低下したが、赤と黄色の部位はほとんど変化がなかった。塩ストレスによる、タンパク質、Rubisco、P 700、CO_2取込み速度、電子伝達活性等の変化について測定した結果、およびベタイン含量、ベタイン合成遺伝子の発現について報告する。

1aJ07

オオムギからの水チャンネル遺伝子の単離と塩ストレス下における発現の解析

且原真木,秋山佳子,笠毛邦弘 (岡山大・資生研)

塩ストレスや乾燥ストレス環境下の植物において水輸送の制御は重要である。我々は、水輸送における水チャンネル（生体膜に存在し、水輸送を担うチャンネルタンパク質）の役割を解明するためにオオムギから水チャンネル遺伝子を単離し、その発現量を調べた。

オオムギの shoot、root 各々からトータル RNA を調製し、RT-PCR 法により３つの原形質膜型および１つの液胞膜型の水チャンネル相同遺伝子断片を得た。原形質膜型の３つについては 5'－RACE 法、3'－RACE 法により全長 cDNA（*bpw1*、*bpw2*、*bpw3*）をクローニングし、これらの全塩基配列を決定した。その結果これら 3 つの遺伝子とも６つの膜貫通領域と２つの NPA box を含んでいた。また *bpw1* はリン酸化部位と推定されるセリン残基を有していた。

次に *bpw1*、*bpw2* の発現量を調べた。両者とも shoot での発現量はほとんど同じであったが、*bpw1* の root での発現量は shoot での約 10 倍、*bpw2* では約 1.2 倍であった。200mMNaCl 処理後 24 時間で root の *bpw1* の発現量は約 1/2 に減少し、*bpw2* はわずかに減少した。shoot では *bpw1*、*bpw2* ともに 24 時間、48 時間経過とともに増加した。

現在３つの cDNA に対応するゲノミッククローンを単離し、解析中である。

1aJ08

適合溶質としての Sucrose；単離チラコイド膜及び組換え植物を用いた解析

荒田勇登、福島英一、遠藤剛、佐藤文彦（京大院・農・応用生命科学）

乾燥・塩類集積などの水分ストレスにより、細胞内に適合溶質と呼ばれる低分子水溶性化合物の蓄積が誘導される。本研究では、従来適合溶質としての検討がなされていなかった Sucrose の効果について、単離チラコイド膜、及び酵母インベルターゼを細胞外で発現させ Sucrose を蓄積するように改変された形質転換植物(Apo-Inv)を用いて解析した。単離チラコイド膜における光合成電子伝達活性は、塩処理により明白に低下する。この活性の低下は塩を除いた後も認められることから、不可逆的失活と考えられた。Sucrose は既知の適合溶質同様、この光合成活性の低下を抑制した。興味あることに、Sucrose 処理したチラコイド膜は glycinebetaine 処理したチラコイド膜同様、塩処理したチラコイド膜の安定性を高めていた。次いで、Apo-Inv を用い、その塩ストレス条件下における光合成活性を PAM により評価した結果、Apo-Inv では、野生型で光合成活性の低下がおこる塩処理条件下でも安定した活性を示すことを認めた。現在、この安定化機構を評価するため、PSII 構成タンパク質の解析を行っている。

1aJ09

イネ(*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki)における、塩ストレスによる光合成阻害と活性酸素の関係の解析

田中義人，星田尚司[1]，岸谷幸枝[2]，高倍鉄子[3]，林泰行[4]，田中章[4]，高倍昭洋[1]（名城大・理工，[1]名城大・総合研究所，[2]東北大・農，[3]名古屋大・生物分子応答研究センター，[4]植物工学研究所）

イネにおける塩ストレス障害の機構を明らかにすることを目的とし、塩ストレスによる光合成活性の阻害と活性酸素の関係について解析を行なった。イネ(*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki)芽生えを100 mM NaClを含む培地に移すと、光合成の電子伝達活性が著しく低下した。変調蛍光法によりクロロフィル蛍光を測定した結果、塩ストレスによる光合成活性の低下は、光化学系IIの失活を伴っていることがわかった。また、活性酸素消去系酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)、グルタチオンレダクターゼ(GR)、およびカタラーゼの活性を測定した結果、塩ストレスにより、葉緑体局在性Cu/ZnSODおよびカタラーゼの活性が低下し、GRの活性は上昇することがわかった。塩ストレスによる光化学系IIの障害と葉緑体局在性のSODの活性低下との関係を解析するため、酵母由来のマンガンスーパーオキシドジスムターゼ(Mn-SOD)に葉緑体への輸送のためのトランジットペプチド配列を接続した遺伝子をイネに導入した形質転換植物を作製した。この形質転換植物では、総SOD活性は野性株の約1.7倍になり、導入したMn-SODの活性は、塩ストレスにより低下しなかった。また、野性株と異なり、形質転換体では、塩ストレスによりAPXの活性の上昇がみられた。塩ストレスによる障害が著しく進行する時期において、形質転換体では、野性株よりも障害の進行が抑制される傾向を示した。

1pJ01

キュウリ芽ばえにおけるペグ発生様式とその重力によるネガティブコントロール

高橋秀幸，藤井伸治，鎌田源司，高野守，山崎裕，東谷篤志，金子康子[1]，上垣内茂樹[2]，相澤幸子[2]，吉崎泉[2]，嶋津徹[3]，福井啓二[3]（東北大・遺生研，[1]埼玉大・理，[2]宇宙開発事業団，[3]日本宇宙フォーラム）

ウリ科植物の芽ばえは，発芽直後にペグといわれる突起状組織と下胚軸フックを形成して種皮から脱皮する。演者らは，これまでペグ形成が種特異的な重力形態形成である可能性について報告してきたが，今回はその仮説を検証するために，スペースシャトル（STS-95，ディスカバリー）でキュウリを用いた宇宙実験を行った。その結果，地上で種子を水平において重力刺激を与えた対照区では，すべての芽ばえが下胚軸基部の下側に1個のペグを形成したが，宇宙の微小重力下で育成した芽ばえはほとんどが2個のペグを形成した。したがって，地上でのキュウリ芽ばえのペグ形成には，重力によるネガティブコントロールが働いていることが明らかになった。また，これまでペグが皮層細胞の成長極性の変化によって生じることを報告してきたが，今回はペグの発生過程を走査型電子顕微鏡で解析し，表皮細胞の特異構造とその役割を明らかにした。この表皮細胞特異構造の発達と重力の関係についても報告する。

1pJ02

ヤマザクラの茎における沈降性アミロプラストの存在

根岸容子、船田良[1]、山田晃弘[2]、中村輝子（日女大・理、[1]北大・農、[2]放送大）

既に、擬似微小重力環境下においては、サクラ幼植物二次木部の発達が地上対照に比べて、著しく低下しており、二次木部の形成に重力が深く関わっている事を報じた。今回は、二次木部の重力形態形成における、重力感受装置を検討するための第一歩として、アミロプラストの重力感受装置としての可能性を検討した。光顕、共焦点レーザー走査顕、及び透過型電顕により、3D-クリノスタット上、及び地上対照の約4週齢のサクラの茎基部を観察した。

地上における垂直位の肥大成長中の茎の師部をとりまく澱粉鞘中に、約10μmの数個の沈降性アミロプラストを含む細胞が存在することが明らかとなった。これを水平位にした時には、2分以内に重力方向に再沈降し始めた。更に、擬似微小重力環境下に茎を置くと、アミロプラストは沈降せず、分散した。これらの結果は、沈降性アミロプラストが平衡石として機能していることを示唆していると考えられる。

1pJ03

ヒマワリ下胚軸における重力屈性に関与する成長調節物質の分布変化

福田知子、山田小須弥[1]、長谷川宏司[1]（筑波大院・バイオシステム、[1]筑波大・応生化）

高等植物における茎の重力屈性は、オーキシンの偏差分布による上側・下側組織の成長量の違いが原因である、とこれまで説明されてきた。しかしヒマワリ下胚軸を水平にして重力刺激を加え、その上側・下側組織に含まれるIAAを機器分析により定量したところ、偏差成長を引き起こすほどの量的差異はみられなかった。そこで刺激閾値である5 - 10分間だけ重力刺激を加えたヒマワリ下胚軸の上側・下側組織から得られた抽出液をヒマワリ芽生えにそれぞれラノリンと混合して投与したところ、上側組織からの抽出液で伸長抑制活性が、一方下側組織からのものに伸長促進活性が認められた。刺激閾値に相当する時間内で上側・下側組織からの抽出液の活性に差異が生ずることから、重力刺激によって引き起こされる上側・下側組織の物質の変化が屈曲に関与することが予想される。現在これらの物質を探索中である。

1pJ04

胚軸と花茎で重力感知を欠損したシロイヌナズナの新規突然変異体 *endodermis amyloplast-less 1* の解析

藤平健一郎、倉田哲也、綿引雅昭、山本興太朗
（北海道大・地球環境・生態環境）

植物は重力刺激を感知して成長方向を調節する。その分子機構を明らかにするために、シロイヌナズナを用いて黄化芽生えでの重力屈性異常突然変異体を単離し、*endodermis amyloplast-less1* (*eal1*) と名付けた。*eal1* は黄化芽生え胚軸と花茎で重力屈性を示さなかったが、根では重力屈性を示した。胚軸や花茎での重力の感知には内皮のアミロプラストが必要であると考えられているが、*eal1* では胚軸の内皮のアミロプラストが見られなかった。しかし、皮層ではアミロプラストが見られるので澱粉をつくる能力はあると考えられる。*EAL1* 遺伝子座は４番染色体の AP2 と mi232 の間に位置していた。以上の結果から *EAL1* 遺伝子は内皮のアミロプラストの分化に関与する新規の遺伝子と考えられる。

1pJ05

擬似微小重力環境下で育てたヤマザクラの細胞形態の検討

米山恵未、佐野雄三[1]、船田良[1]、山田晃弘[2]、中村輝子（日女大･理、[1]北大･農、[2]放送大）

既に、擬似微小重力環境下においては、サクラ幼植物二次木部の発達が対照に比べて、著しく低下しており、二次木部の形成に重力が深く関わっている事を報じた。今回は電界放射型走査電子顕微鏡（FE-SEM）を用い、地上と３D-クリノスタット上で培養した約４週齢のヤマザクラ(*Prunus jamasakura*)の茎基部を実験材料として、細胞形態について観察した結果を報告する。３D-クリノスタット処理植物におけて、二次木部の軸方向柔細胞、道管要素、師部じん皮繊維等の細胞形態の変化が観察された。特にじん皮繊維に関しては、細胞壁肥厚の低下が認められた。今回の研究において、各組織を構成している細胞の著しい変形、その形態の不揃い、更に木部の細胞配列の乱れが認められた。これらの結果は各組織及び細胞の分化発達に、重力が大きく関わっていることを示唆している。

1pJ06

水分屈性を示しているエンドウ(*Pisum sativum* L.)の根の伸長細胞の水伝導度

宮本直子，大川泰一郎，高橋秀幸[1]，平沢正（東京農工大・農，[1]東北大・遺伝生態研究センター）

根の水分屈性における偏差生長は伸長域の組織の伸展性が根の両側で異なることによっておこる．本報告では偏差生長が伸長細胞の水吸収速度の相違によっておこることに着目し，水分屈性における偏差生長を根端に水ポテンシャルの異なる寒天片をつけたエンドウ(*Pisum sativum* L.)の幼植物を用いて解析した．

水分屈性によって偏差生長がおこっている根では水ポテンシャルの低い寒天片をつけた側の伸長細胞は水ポテンシャルの高い寒天片をつけた側の伸長細胞に比較して体積増加速度は約 2 倍であった．Cell pressure probe を用いて非定常状態で測定した伸長細胞の水伝導度も水ポテンシャルの低い寒天片をつけた側の伸長細胞が約６割大きくなることが分かった．以上の結果から，水分屈性における偏差生長には伸長細胞の水伝導度の相違が関与していることが分かった．

1pJ07

耐塩性 *Nicotiana* 属植物 *Nicotiana paniculata* からの低親和型カリウムチャンネル遺伝子の単離

小森俊之、山田茂裕、橋本晶子、今関英雅（日本たばこ産業・遺伝育種研究所）

水分ストレス耐性スクリーニングにより塩ストレス耐性種として選抜した *Nicotiana paniculata*（日本植物生理学会 1997 年度年会）の緑葉から、ディファレンシャルスクリーニングにより高等植物の低親和型カリウムチャンネル（KCH）遺伝子と相同性を持つ cDNA を単離した。この遺伝子(*Npkt1*)は 824 アミノ酸よりなる産物をコードしており、この産物と既知 KCH のアミノ酸配列との相同性は 45－80％であった。また、*Npkt1* 産物には KCH に特徴的である６ヶ所の膜貫通領域と、イオン選択性に関与すると思われる signature 配列（TTXTTXGYGD）が保存されていた。さらに、一部の既知 KCH に保存されている Ankyrin ドメインが存在していた。

Npkt1 転写産物は地上部の各器官（緑葉、花、茎）では認められたが、根では認められなかった。しかし、緑葉における転写産物量は塩ストレス条件下においても増加しなかった。ゲノムサザン解析の結果、*Npkt1* は単一コピーであるが、他に数個の相同性を持つ遺伝子が存在することが強く示唆された。

本研究は財団法人石油産業活性化センターからの委託研究として行われた。

1pJ08

耐塩性 *Nicotiana* 属植物 *Nicotiana paniculata* からの *myo*-inositol-1-phospate 合成酵素遺伝子の単離と塩ストレス下における発現解析

橋本晶子、山田茂裕、小森俊之、今関英雅（日本たばこ産業・遺伝育種研究所）

水分ストレス耐性スクリーニングにより塩ストレス耐性種として選抜した *Nicotiana paniculata*（日本植物生理学会1997年度年会）の塩ストレス耐性メカニズムを解明することを目的として、塩ストレス下において緑葉で発現誘導される遺伝子の単離をディファレンシャルスクリーニング法により試み、61クローンを塩ストレス誘導遺伝子候補として得た。それらの末端塩基配列を調査し、11クローンが高等植物由来の *myo*-inositol-1-phosphate 合成酵素（INPS）と相同性を持つことを明らかとした。塩ストレス条件下での当該遺伝子（*NpINPS1*）の発現挙動をノーザン解析により調査したところ、緑葉・根においてともに転写物蓄積量が上昇していたが、それぞれの組織における上昇プロファイルは異なっていた。緑葉ではストレス処理後1日目に蓄積量は上昇し、以後高いレベルを維持したが、根では1日目に最大値に達し、その後減少した。ウエスタン解析の結果、緑葉における *NpINPS1* 産物（NPINPS1）蓄積量は、塩ストレスにより上昇することが明らかとなった。ゲノムサザン解析の結果、*NpINPS1* はゲノム中に単一コピーで存在していることが強く示唆された。

本研究は財団法人石油産業活性化センターからの委託研究として行われた。

1pJ09

エンドウ根の偏差生長制御に関わるエンド型キシログルカン転移酵素の発現様式

高野　守・藤井伸治・東谷篤志・平沢　正[1]・西谷和彦[2]・高橋秀幸
(東北大・遺生研，[1]東京農工大学・[2]東北大・理学部)

重力屈性を欠損した突然変異体のエンドウ(*ageotropum*)の根は湿度勾配に遭遇すると正の水分屈性を示す．本研究では，この水分屈性の屈曲に伴い，機能すると考えられるエンド型キシログルカン転移酵素(EXGT)の遺伝子，タンパクレベルにおける発現様式に着目し，以下の結果を得た．

1） *ageotropum* の EXGT をコードする遺伝子のクローニングを行い，全長の塩基配列を決定した結果，ダイズ由来の EXGT と約 90%の相同性が得られたため，これを *Ps-EXGT1* と命名した．

2）*Ps-EXGT1* の機能解析を行った結果，主に伸長している組織で高く発現し，根においては伸長速度に応じて発現が増加することが明らかとなった．また，水分屈性における根の偏差生長に伴ってその発現量が変化することが確認され，根の伸長制御と相関があることが示唆された．

3）この EXGT タンパクの局在を間接蛍光抗体法により解析した結果，EXGT はタンパクレベルにおいても，根の水分屈性発現時にその発現が変動していることが確認され，根の偏差生長時における伸長にこの酵素が機能している可能性が示唆された．

1pJ10

光呼吸活性を増強したイネ（*Oryza sativa*)の耐塩性

星田尚司[1]、田中義人[2]、林泰行[3]、田中章[3]、高倍鉄子[4]、高倍昭洋[1]([1]名城大・総合研究所、[2]名城大理工・化学、[3]植工研、[4]名古屋大・生物分子応答センター)

植物は塩や乾燥などのストレスにさらされると蒸散を抑制するために気孔を閉じる。しかし、これは同時にCO_2の取り込みをも妨げ、過剰なエネルギーにより活性酸素種が生成し、植物に損傷を与える。この様な条件下でもCalvinサイクルが働き電子を効率よく流すことができれば、活性酸素による損傷を抑制できる可能性がある。そこで、光呼吸経路で生成するCO_2やホスホグリセリン酸がCalvinサイクルの基質である事に着目し、光呼吸活性を増強する目的で葉緑体型グルタミン合成酵素(GS2)遺伝子をイネに導入した。形質転換体にはGS2の発現量が増加している個体(G39-2)の他、GS2をほとんど失った個体(G241-12)もあった。形質転換体の光呼吸活性は、G39-2ではコントロールに比べ約1.5倍高く、G241-12では光呼吸活性はほとんど認められなかった。発芽後3週間生育させた植物体を 150 mM NaCl を含む培地に移し、光合成電子移動活性の変化を調べた結果、光呼吸活性が高くなったG39-2の耐塩性が強化されたことがわかった。

1pJ11

シロイヌナズナの形質転換体をもちいたプロリンの生合成系および分解系の制御

楠城時彦[1,2]，小林正智[1]，吉羽洋周[3]，角張嘉孝[4]，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]静岡大・農)

シロイヌナズナにおけるプロリンの生合成および分解の律速段階を触媒する酵素はそれぞれP5CS（Δ1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素）とプロリンデヒドロゲナーゼ（ProDH）である。プロリンの機能解析をおこなうために，我々はこれらの酵素（AtP5CS, AtProDH）をコードするcDNAをもちいてシロイヌナズナの形質転換体を作成した。これらのうちプロリン合成系のアンチセンス形質転換体では，プロリンの蓄積がほとんど見られず葉や茎の形態異常が観察された。ま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。我々が最近おこなった研究から，AtP5CSアンチセンス形質転換体において，プロリン欠乏の影響が細胞壁の構造タンパクの合成に特異的に及んでいることが明らかとなった。また一方，プロリン分解系のアンチセンス形質転換体はプロリンを恒常的に高レベルで蓄積していた。以上のように，我々は形質転換体をもちいてプロリンの蓄積レベルをコントロールすることに成功した。現在，遊離プロリンの蓄積とストレス耐性の関係を詳細に調査中である。これらのトランスジェニック植物の解析に基づき，ストレス耐性や成長におけるプロリンの役割について考察する。

1pJ12

花粉・胞子における蓄積プロリンの役割

池田陽介、市野琢也、村濱　稔、
林　史夫、真田幸香、和田敬四郎
（金沢大学理学部生物学科）

植物が乾燥や塩による水ストレスを受けると、細胞内に遊離のプロリンを多量に蓄積することが知られている。一方、乾燥ストレスは大きな植物体より小さな植物体により多大な影響を与えることが予測できる。相対表面積の大きな花粉や胞子は常に乾燥の脅威に曝されていると言える。花粉が多量のプロリンを蓄積しているという報告は古くからある。

我々はいくつかの花粉・胞子を材料にして、実際どの程度プロリンを蓄積しているのか、花粉や胞子の中の蓄積プロリンの役割を明らかにする研究を開始した。今回はいくつかの花粉と胞子のプロリン含量を確認し、花粉・胞子の発芽時に蓄積プロリンは急速に代謝され消失すること、さらにプロリンの代謝・消失時にプロリン脱水素酵素タンパク質が発現誘導されることを確認したので報告する。

1pJ13

Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase の精製

村濱　稔、市野　琢也、山田　裕之、
林　史夫、真田　幸香、和田　敬四郎
（金沢大学理学部生物）

塩ストレスを受けた植物はグリシンベタイン、ポリオール類、プロリンなどの適合溶質を蓄積し、ストレスに応答すると考えられている。プロリンの合成・分解についてはこれまでに多くの研究がなされている。プロリンは容易に分解される化合物であり、塩ストレスから解放された状態や、塩ストレスを受けている植物でも暗期では、蓄積したプロリンの減少が観察されている。プロリンの分解はプロリンデヒドロゲナーゼ(PDH)により、Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C)となり、P5CはP5Cデヒドロゲナーゼによりグルタミン酸となる。プロリンの分解系の酵素であるP5CDHは植物体からの精製はなされておらず、遺伝子も得られていない。本研究ではプロリン分解系を詳しく解析するために、P5CDHの精製と性質を明らかにすることを目的とした。

P5CDHの精製は、ホウレンソウ（*Spinacia oleracea* L.）の葉を用い、その粗抽出液を硫安分画（30-70%）し、その後 Blue Cellulofine, DEAE toyopearl, hydroxyapatite, superose 6 などのクロマトグラフィーを行った。その結果SDS-PAGEにおいて60kDaのバンドが検出された。一方、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果よりP5CDHの分子量は約240kDaと算出されたので、P5CDHは60kDa subunitの4量体であると思われる。

1pJ14

シロイヌナズナのプロリンデヒドロゲナーゼ遺伝子 *ProDH* の発現解析

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

プロリンは、水分ストレスを受けた植物が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。我々はプロリン分解酵素、プロリンデヒドロゲナーゼ（*ProDH*）のcDNA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 *ProDH* 遺伝子のプロモーター領域とβ-グルクロニダーゼ（*GUS*）遺伝子とを結合し導入した形質転換シロイヌナズナの解析から、*ProDH*遺伝子の発現は乾燥処理で抑制され、吸水及びプロリン処理で促進されることを明らかにしている。そこで、吸水及びプロリン応答性のシス因子を明らかにするため、*ProDH* 遺伝子のプロモーター領域に欠失及び変異を加えたものとルシフェラーゼ（*LUC*）との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、吸水及びプロリン処理時における *ProDH* 遺伝子の発現に関与すると思われる、ダイレクトリピート配列を見いだした。また、このダイレクトリピート配列を一つ含むプロモーター領域を導入した形質転換タバコでは、吸水及びプロリンによる *LUC* 遺伝子の誘導が見られた。

1pJ15

塩ストレス下のイネ（*Oryza sativa* L.）におけるプロリン蓄積の組織特異性と各種アミノ酸レベルの変動

五十嵐由美子[1]，吉羽洋周[1]，真田幸香[2]，和田敬四郎[2]，
篠崎和子[3]，篠崎一雄[4]（[1]日立・基礎研，[2]金沢大・理・生物，[3]農水・国際農研，[4]理研・植物分子）

イネは塩ストレスを受けるとプロリン合成系の律速酵素であるΔ^1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素（P5CS）遺伝子を速やかに発現し，プロリンを蓄積する。しかし植物体のどの組織にどの程度のプロリンが蓄積されるのかは明らかにされていなかった。そこで本研究では，250mM NaCl 溶液で処理したイネ（品種：朝の光）を 9 つの部位に分けてプロリン含量を測定した。その結果，プロリンは特に葉に蓄積され，茎，根にはほとんど蓄積されないことが分かった。さらに葉の中では先端部を含む上部に多く蓄積され，ストレスを強くうける部位ほど早く蓄積されることが分かった。しかし，P5CS 遺伝子の発現レベルは葉の上部，下部とも同程度で差は認められなかった。一方，この時の各種遊離アミノ酸を調べたところ，プロリン以外にも塩ストレスにより蓄積され，ストレス解除後代謝されるアミノ酸が 7 種類あることが認められた。

1pJ16

シロザ（*Chenopodium Album* L.）コリンモノオキシダーゼ遺伝子の単離及び発現解析

西村 哲、小池あゆみ （トヨタ自動車・バイオラボ）

植物の塩ストレス耐性には多くの防御機構が関与しており、そのひとつとして浸透圧調整物質が知られている。浸透圧調整物質の一つであるグリシンベタインは、植物内に蓄積させることで耐塩性を付与することが、数例報告されている。

植物では、コリン酸化酵素（CMO）、ベタインアルデヒド脱水素酵素（BADH）の2つの酵素によりグリシンベタインが合成されている。これら二つの酵素のうち、BADHに関する研究はこれまでにさかんに行われてきたが、CMOの解析及び耐塩性分子育種への応用に関しては、いまだ十分な研究は行なわれていない。そこで我々は、耐塩性植物として知られているシロザから、CMO及びBADH c DNAを単離し、シロザにおける発現誘導解析を行った。

1pJ17

ホウレンソウおよび大腸菌のベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの酵素化学的性質

松田信行、孟玉玲[1]、日比野隆[2]、原彰、船隈透、高倍昭洋[1]（名城大・農、[1]名城大・総合研、[2]名城大・理工化学）

植物や微生物には、塩ストレスや乾燥ストレスを受けると浸透圧の調節のために、適合溶質としてベタイン（グリシンベタイン）を蓄積するものがある。本研究で用いるベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼは、ベタインアルデヒドからベタインを合成する酵素である。最近になって、本酵素がベタインアルデヒド以外にポリアミンの代謝などいくつかの反応を触媒することが報告された。そこで我々は、ホウレンソウおよび大腸菌の本酵素を精製し、基質としてベタインアルデヒド、3-アミノプロピオンアルデヒド、4-アミノブチルアルデヒドを用いて酵素化学的性質について検討した。今回の測定の結果、本酵素が広い基質特異性を示すとともに、生物種によってかなり違いがあることが明らかになった。

2aJ01

キュウリ根導管液レクチン様タンパク質XSP30 cDNAのクローニング及び発現解析

増田進、作田千代子[1]、佐藤忍[1]（野田産研、[1]筑波大・生物）

キュウリ根導管液中に比較的多量に存在するタンパク質XSP30(Xylem Sap Protein）に着目し、その構造と機能を明らかにするため、以下の実験を行った。

キュウリ導管液を採取し、導管液中に含まれるタンパク質をアセトンで濃縮し、SDS-PAGEで解析した。その結果、30 kDa相当の位置に比較的多量にタンパク質が存在することが判明し、XSP30と名付けた。XSP30のN末端アミノ酸配列を決定し、その配列をもとにプライマーを作製し、根から抽出したmRNAを用いて、RT-PCR、3'-RACE及び5'-RACEを行い、XSP30 cDNAのクローニングを行った。データベースを調べたところ、ヒマ種子由来のガラクトース結合性レクチンであるRicin B鎖との相同性が観察された。また、ノーザンブロットによる発現解析を行ったところ、根でのみXSP30が発現していることが明らかとなった。

2aJ02

キュウリ根導管液glycine-rich proteinの遺伝子発現と蓄積

作田千代子、小田篤、佐藤忍（筑波大・生物）

近年我々はキュウリ根導管液タンパク質遺伝子の候補として幾つかのクローンを得ているが、本研究ではそのうち、XSP-4 (CRGRP-1)と XSP-10 (CRGRP-2)について、その産生細胞と移動に関して報告する。この二つのタンパク質は互いに相同性をもつglycine rich proteinで、根の根毛帯に特異的な発現を示す。まずXSP-4の生合成部位を調べるため、in situ hybridizationを行ったところ、芽生えの根の根毛帯部の導管を囲む維管束柔組織細胞のみでXSP-4遺伝子が発現していることが確認された。次に大腸菌の発現系を用いてXSP-4タンパク質を産生し、それを抗原として抗血清を得てwestern blottingを行ったところ、導管液で数本のバンドが検出された。また、植物体の各器官では、展開葉でのみバンドが検出され、そのサイズはXSP-4の推定アミノ酸サイズと一致した。

2aJ03

半数体プランバギニフォーリアにおける細胞間接着に関連するミュータントの形態学的解析および細胞壁多糖の生化学的解析

岩井宏暁，石井忠[1]，鎌田博，佐藤忍（筑波大・生物，[1]森林総研）

多くの種の培養細胞では、継代を続けることにより、形態形成能力の消失と同時に細胞間の接着性が弱くなることが観察される。なかでもニンジン培養細胞の自然変異体Non-embryogenic callusでは、ペクチンの中性糖側鎖の構造と量に変異が生じていることが判明している。近年我々は、*Nicotiana* 属中で最小のゲノムを持つ *Nicotiana plumbaginifolia* の半数体植物にT-DNAを挿入することで、不定芽形成能力を失うと同時に、細胞間接着性の弱くなったlooseな細胞塊を形成するミュータントを数株得ている。本研究では、それらに対し、ペクチンに注目した形態学的解析、およびその細胞壁糖組成について解析を行った。まず、光学顕微鏡、走査電子顕微鏡による形態観察および、透過電子顕微鏡を用いたルテニウムレッド染色（酸性糖染色）による組織化学的観察を行った。その結果、変異細胞株では、細胞間が分離しており、細胞表面に繊維状の物質が付着していることが観察された。一部の変異株では、細胞壁が三叉路になっている部分のルテニウムレッドによる染色性が顕著に減少しており、カルス表面では逆に染色性が増加している様子が観察された。また、変異カルス株の細胞壁多糖を分析したところ、アラビノース、ガラクトース、キシロースの含量に変化が生じていた。

2aJ04

低ホウ素要求性ギンドロ培養細胞の解析

掛川弘一，石井忠，松永俊朗[1]（農水省・森林総研，[1]農水省・九州農試）

ホウ素濃度100μMの培地中で継代を続けているギンドロ培養細胞（1/1-B）を5μMの培地に移植すると細胞は増殖することができない。しかし、10μMの培地で長期間継代を続けた後、5μMの培地に移植することで低ホウ素条件下でも増殖することができる培養細胞系（1/20-B）を確立することができた。本研究ではこの二つの培養細胞の細胞壁を分析し、細胞壁におけるホウ素の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

1/1-B、および1/20-B細胞から細胞壁を調製し、その特性を調べたところ1/20-Bの細胞壁に含まれるホウ素量は1/1-Bの約半分であった。また、ホウ素が結合するサイトであるRG-IIは1/1-Bではそのほとんどが二量体の形で存在しているのに対して1/20-Bでは単量体が存在することが明らかになった。さらに、それぞれの細胞壁から多糖類を逐次抽出し、50mM CDTA、50mM Na_2CO_3、1M KOH、4M KOH可溶性、および4M KOH 不溶性の各画分を得て比較したところ1/20-BではCDTA可溶性画分のガラクツロン酸、1M KOH可溶性画分のアラビノースが多くなっていた。一方で4M KOH可溶性画分に含まれるこれらの糖は減少しており、ホウ素が不足してRG-IIの架橋構造が減少したために抽出され易くなったと推測された。これらの結果は1/20-B細胞では1/1-Bとは異なる構造の細胞壁が形成されていることを示している。

2aJ05

ホウ素の細胞内局在部位 -細胞壁への局在-

間藤徹，松田晃，小林優，関谷次郎（京都大院・農）

我々はホウ素の生理機能を明らかにするため，ホウ素の細胞内局在部位を検討してきた。細胞は水溶性と不溶性ホウ素を含有し，不溶性ホウ素はペクチン質糖鎖をラムノガラクツロナン(RG)-II領域で架橋していることを示した。一方，水溶性ホウ素は培養細胞や緑葉から調製したプロトプラストには存在せず，さらに葉身の11B-NMR分析から，細胞壁中にほう酸イオンの形で存在していると判断した。さらに培地ホウ素濃度を下げた場合，緑葉では水溶性ホウ素から減少しはじめた。培養細胞ではホウ素欠乏による生育が低下しはじめるホウ素濃度がホウ酸-RG-II複合体形成に必要なホウ素濃度の下限と一致するので，ホウ素はRG-II領域に結合することで機能していると推察した。しかしホウ素欠除により低下したグルコース吸収はホウ素添加により直ちに回復した。現在，細胞膜へのホウ素の結合について検討中である。

2aJ06

高等植物のホウ素欠除に対する応答 -タバコ培養細胞の場合-

小林優，間藤徹，関谷次郎（京都大院・農）

ホウ素は細胞壁においてペクチン質多糖を架橋することでその生理機能を発揮していると考えられるが，ホウ素の欠乏から細胞の死に至る機作は明らかでない．そこでタバコ培養細胞を用いてホウ素欠除処理に対する応答を解析した．

タバコ培養細胞BY-2をホウ素欠除培地に移し，細胞の生死をFDA/PI染色によって観察した．9時間後から死細胞が増加し始め，36時間後にはほとんどの細胞が死んでいた．死細胞の原形質は収縮し細胞壁と分離していた．また処理開始3時間後では見かけ上死細胞は増加していないにもかかわらず，この時点でホウ素を再添加しても36時間後では死細胞の割合が対照より高くなっていた．このことはホウ素欠乏による細胞死は3時間以内に決定される不可逆的過程であることを示唆する．この細胞死の機構を明らかにするため，ホウ素欠除処理した細胞で特異的に発現する遺伝子を検索中である．

2aJ07

ラムノガラクツロナンIIはホモガラクツロナン及びラムノガラクツロナンIと一次壁中で共有結合している

石井　忠、松永俊朗[1]（森林総研、[1]九農試）

ラムノガラクツロナンII（RG-II）は植物の一次壁をエンドポリガラクツロナーゼ（EPG）処理すると溶出する分子量約５千の構造の複雑なペクチン多糖である。RG-IIはホモガラクツロナン（HG）と共有結合していることと予想されているが、これを支持する実験証拠は私たちの知る限りない。

RG-IIはホウ酸ジエステル結合により架橋された2量体（dRG-II-B）として存在することが、最近証明された。このことからホウ素の機能は細胞壁ペクチンを架橋することと考えられる。それを検討するため、ホウ素を含むペクチン多糖をシュガービート細胞壁のドリセラーゼ分解物から単離した。得られたペクチンをケン化し、EPGあるいは再度ドリセラーゼ処理した。生成物をSEC/ICP-AESで分析した。dRG-II-B及び遊離したオリゴ糖をSEC、糖分析及びホウ素定量した。その結果、RG-IIはHGと共有結合していること、また、ラムノガラクツロナンIとも共有結合していることが明らかになった。RG-IIのホウ酸エステル架橋は、成長中の細胞壁で高分子のペクチンネットワークを形成していることが示された。

2aJ08

ペクチンの生合成に関わるメチル転移酵素

石川　誠、円谷陽一（埼玉大・理・分子生物）

ペクチンは高等植物の細胞壁多糖であり、α-1,4-結合したガラクツロン酸(GalA)が主構成糖で、中性糖のラムノース、ガラクトース、アラビノースを含む。GalAのカルボキシル基、水酸基の一部はメチルエステル化、アセチル化で修飾されている。ペクチンへのメチル基の転移を触媒するメチル転移酵素(MTase)の諸性質を検討した。

ダイズ(*Glycine max*)を室温、暗所で生育し、胚軸から粗膜画分を調製し酵素源とした。MTaseの活性はS-アデノシル-L-[メチル-^{14}C]メチオニンを供与体とし、市販の低メチル化度のペクチンへの放射活性の取り込み量を測定して求めた。

MTaseの活性は植物組織の糖鎖分解酵素と比べて弱いが(比活性、約500 pmol/min/mg protein)、最適作用pHは6.8で、活性にはTriton X-100を必要とした。転移生成物は、GalAのカルボキシル基に結合したメチルエステルであることをペクチン メチルエステラーゼとペクチナーゼ消化物のHPLC分析で確認した。ダイズ細胞壁から分画した多糖を用いて本酵素がペクチンの生合成に関わることを明らかにした。

2aJ09

アボカド果実細胞壁ポリウロナイドの分解

若林和幸, Donald J. Huber[1]（大阪市大・理・生物、[1]フロリダ大・園芸）

アボカド果実の成熟に伴い、細胞壁成分のうち、水可溶性のポリウロナイド量が急激に増加し、それらの分子量が大きく低下することが示された。成熟前の果実から調製した細胞壁標品を、成熟果実から部分精製したポリガラクツロナーゼ(PG)で処理すると、ポリウロナイドの遊離が促進され、その分子量も低下した。しかし、遊離したポリウロナイドに再度PGを処理しても、更なる分子量の低下は見られなかった。同様に、成熟の中間段階にある果実から抽出した水可溶性ポリウロナイドにPGを処理しても、ポリウロナイドの分子量の低下は見られなかった。一方、上記の水可溶性ポリウロナイドを弱アルカリあるいはペクチンメチルエステラーゼ(PME)で処理した後にPGで処理すると、果実の成熟の際に見られたような大幅な分子量の低下が誘導された。弱アルカリやPME処理は、細胞壁多糖中のメチルエステルを除く効果があることから、アボカド果実の成熟に伴うポリウロナイドの分解過程では、PGの活性と同時にポリウロナイドのメチルエステルのレベルが、分解活性の制御において重要な役割を持つことが示された。

2aJ10

アズキ上胚軸細胞壁の新規キシログルカン加水分解酵素

田渕彰、神阪盛一郎、[1]森仁志、保尊隆享
（大阪市大・理・生物、[1]名古屋大・農・生化学制御）

これまでにアズキ上胚軸細胞壁においてキシログルカンの分解に関与する酵素としてエンド型キシログルカン転移酵素（EXGT）(Nishitani and Tominaga 1992)とキシログルカン分解・転移酵素（XGH/T）(Tabuchi et al. 1997)が報告されている。今回、我々はこれらの酵素とは異なる性質を示すキシログルカン分解酵素を精製した。本酵素の大きさはキシログルカンに対して加水分解活性を示したが、オリゴ糖や単糖は生成しなかった。また、蛍光標識したオリゴ糖への転移活性は見られなかった。本酵素の大きさはSDS-PAGE上では33ｋＤａで、これら2種類の酵素に似ていた。しかし、本酵素の部分的なアミノ酸配列を調べたところ、EXGTよりも、加水分解活性を示すキンレンカのキシログルカン転移酵素に対して高い相同性を持つことがわかった。これらの結果から、本酵素は新しい種類のキシログルカン分解酵素であることが示唆された。

2aJ11

過重力によるアズキ上胚軸細胞壁中のキシログルカンの高分子化とキシログルカン分解活性の低下

曽我康一、若林和幸、保尊隆享、神阪盛一郎
(大阪市大院・理・生物)

アズキ芽生えに遠心分離器を用いて過重力を与えると、細胞壁の伸展性が低下して伸長成長が抑制される(98 年度本大会)。そこで、本研究では細胞壁伸展性の制御に重要な役割を担うキシログルカン(XG)の構造変化およびそれに関わる酵素活性に注目し、過重力によるアズキ上胚軸成長の阻害機構について調べた。その結果、過重力はヘミセルロース画分の XG の分子量を増加させた。また、細胞壁画分から抽出した粗酵素標品を用いて XG 分解酵素活性を測定したところ、過重力処理ではその活性が有意に低下していた。次に、上胚軸のアポプラスト液を集め、その pH を測定した結果、過重力処理により pH が上昇することがわかった (対照: pH 5.8、過重力: pH 6.6)。そこで、対照の細胞壁画分から抽出した粗酵素標品を用いて XG 分解活性を両 pH で測定したところ、pH 6.6 の時の活性は pH 5.8 の時の半分程度であった。以上の結果より、アズキ上胚軸では過重力により XG 分解酵素の活性が低下し、XG の高分子化が起こることで、細胞壁の伸展性が低下し、伸長成長が抑制されると考えられる。また、過重力によるアポプラストの pH 上昇が *in situ* での XG 分解活性の低下に関与している可能性が示された。

2aJ12

低温ストレスに応答するイネのエンド型キシログルカン転移酵素ホモログのｃＤＮＡのクローニング

秋山　高[1]、今井亮三[1]、吉田　均[1]、加藤　明[1]、内宮博文[2]（[1]農水省・北海道農試、[2]東大・分生研）

幼苗期のイネで、低温誘導性遺伝子の候補のひとつとして見つかった、エンド型キシログルカン転移酵素（ＸＥＴ）遺伝子の断片をプローブに用いて、イネ幼苗の根のｃＤＮＡライブラリーから、ＸＥＴのホモログ遺伝子（*ＯｓＸＥＴ２*）の単離を試みた。単離された最も長いｃＤＮＡは、ポリ（Ａ）を含む１１６５の塩基対からなり、そのＯＲＦの開始コドン（ＡＴＧ）は５２番目から、終止コドン（ＴＧＡ）は８９５番目から始まっていた。このＯＲＦの推定アミノ酸配列を、既知のＸＥＴ遺伝子やホモログ（１２種類）と比較した結果、全体で４３～５２％の一致が認められた。また、これらのＸＥＴ関連遺伝子の推定アミノ酸配列に基づき作成された系統樹において、*ＯｓＸＥＴ２*遺伝子は、いずれのグループにも分類されなかった。一方８日間暗発芽させたイネ苗を用いて、種々の非生物ストレスや植物ホルモン処理による、*ＯｓＸＥＴ２*のｍＲＮＡレベルの変化を、ノーザンブロット法を用いて調べた。その結果、今回行った処理の中では、５℃２日間の低温処理の場合に、最も顕著な*ＯｓＸＥＴ２*の発現量の増加が観察された。その他の*ＯｓＸＥＴ２*に関する知見についても報告する。

2aJ13

セルロースミクロフィブリル間の架橋構造がキシログルカンであることの実験的証明

藤野猛史、曽根義昭[1]、伊東隆夫（京都大学・木質研、[1]大阪市立大学・生活科学・食物栄養）

キシログルカンがセルロースミクロフィブリルを架橋結合する細胞壁の構造モデルが提唱されているが、未だ直接的な証明はなされていない。我々は急速凍結・ディープエッチング(RFDE)法により表皮細胞壁における架橋構造を可視化し、さらにEDTA処理（0.1 M EDTA, pH 7.0, 85°C, 6時間)に引き続いて様々な抽出処理を行い壁構造の変化をRFDEにより観察して架橋構造の成分を推定した。すなわち2% SDS (2% SDS, 10% ß-mercaptoethanol, 100°C,30分)及び4% KOH (4% KOH, 0.1% $NaBH_4$, 超音波洗浄機内で20°C,8時間)処理では、架橋構造は消失しなかった。しかしglucanase処理(50μunit/ml　endo-ß1,4-glucanase, 25mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 40°C, 22時間)により架橋構造が消失した。またキシログルカンとキシランの細胞壁内での分布を免疫電顕法により調べたところ、表皮細胞壁全体に多量のキシログルカンが分布するが、キシランは極僅かしか存在しないことが示された。以上の結果からセルロースミクロフィブリル間の架橋構造はキシログルカンであることが示唆された。

2pJ01

イネ葯ベータ-1,3-グルカナーゼ遺伝子Osag1の単離と解析

山口知哉，和田雅人[1]，田中喜之[2]，小池説夫（農水省·東北農試，[1]同·果樹試·リンゴ支場，[2]同·生資研）

イネにおいて最も冷温感受性が高いのは、葯内の四分子が４つの小胞子に分離する四分子解離期であり、実際冷温処理によって高度の雄性不稔が誘発される。四分子はβ-1,3-グルカンからなる厚いカロース膜に覆われており、減数分裂後にカラーゼ(β-1,3-グルカナーゼ)がカロースを加水分解して四分子を解離し小胞子が葯腔へと放出されるが、カラーゼの活性制御が花粉形成に重要であると考えられる。

われわれは、イネ葯poly(A)+RNAを鋳型としたRT-PCRによりイネ葯β-1,3-グルカナーゼ(Osag1)をコードする遺伝子断片を増幅し、これをプローブとしてイネ葯cDNAライブラリーからcDNAクローンを得た。ゲノムサザン解析によりOsag1はイネゲノムの中で単一コピー遺伝子として存在する事が示された。さらに、ゲノムライブラリーからOsag1配列を含むクローンを単離した。予想されるOsag1のアミノ酸配列は既知のグルカナーゼと高い相同性を示し、系統解析から既知の単子葉植物グルカナーゼの中でも比較的早い時期に分岐したことが示唆された。RT-PCRおよびノーザンブロットによるOsag1の発現様式の解析結果もあわせて報告する。

2pJ02

イネ葯に特異的に含まれるアラビノガラクタンプロテインの特性解析

川口健太郎、蔵之内利和、渋谷直人[1]（農水省・北海道農試、[1]農水省・生物研）

花粉形成においては、葯に特異的な遺伝子や機能物質が多数複雑に関与してその発生を制御していると考えられる。我々はこれまでに、イネ葯の生長過程においてアラビノガラクタンプロテイン（AGP）及びAGP糖鎖コア構造に類似のアラビノガラクトオリゴ糖が高濃度かつ時期特異的に蓄積すること、更に、穂ばらみ期の低温処理（12℃、４日間）によってこれら糖質の濃度が特異的に変動することを示してきたが、他種作物（シュガービート）でも同様の現象がみられたので併せて報告する。

また、葯におけるAGPの代謝過程を調べる端緒として、イネ葯AGPの分離・精製を行いその特性を解析した。ゲルろ過カラムを用いたHPLC分析によりAGPは分子量約200kDをピークとする単一でブロードな分離を示した。イオン交換クロマトグラフィー（Mono-Q, DEAE-cellulose）による分離では、抗オリゴ糖抗体により複数のピークが検出されたが、このうちYariv試薬と反応性を持つものは１つのみであった。これら分画相互の関係については現在解析中である。

2pJ03

ポプラセルラーゼの発現制御

大宮泰徳、酒井富久美、林　隆久（京大・木研）

我々はポプラ (*Populus alba* L.) 培養細胞から２種類のセルラーゼ遺伝子をクローニングした。一つはポプラ培養細胞の培地中にフリーの状態で存在するもの、もう一つは細胞壁に強固に結合しているものである。本研究では、5' 上流領域の発現を解析することにより、セルラーゼの機能を明らかにすることを目的として実験を行った。セルラーゼゲノムDNAの5' 上流領域２kbpをレポーター遺伝子GUSにつないだプラスミドを構築し、このプラスミドを用い、アグロバクテリウム法によってアラビドプシス及びポプラ形質転換植物体を作出した。GUS染色により、植物体の様々な組織や成長段階における5' 上流領域の発現パターンを解析した。その結果、葉の成長、胚軸の伸長、および孔辺細胞の成長とともに発現されることが観察された。

2pJ04

セルロース合成酵素様遺伝子の機能解明

小西照子、酒井富久美、林　隆久（京都大・木研）

セルロース合成酵素様遺伝子は、バクテリアのBcsA遺伝子やアラビドプシスの*RSW1*遺伝子とのホモログとして、アラビドプシス、ワタ、イネ、ポプラ等に存在することが認められている。これらの遺伝子は、基質であるUDP-グルコース結合モチーフ及びグリコシルトランスフェラーゼに特徴的な領域を持ち、セルロース様糖鎖合成酵素の遺伝子も含まれている可能性が高い。

我々は、キシログルカン 4-β-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子及び 6-α-キシロシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングを目指して、Pichia 及び COS での植物 cDNA の発現を行い、活性発現によってスクリーニングするストラテジーを開発した。それぞれの発現ベクターは、クローニングサイトにTを付加して簡単にTAクローニングが出来るとともに、構造遺伝子に分泌シグナル及び抗体認識部位が付加される。既知のシュクロースグルコシルトランスフェラーゼを Pichia で発現させ、ウェスタンブロットによる同定と酵素活性の発現を確認した。

2pJ05

DCB馴化細胞の細胞壁組成と分泌多糖類

高橋麻衣、中川直樹、櫻井直樹（広島大・総合科学）

セルロース合成阻害剤であるDCBに馴化させたタバコ培養細胞(BY-2)では、細胞壁中のセルロース量が減少し、ペクチン量が増加する(Nakagawa & Sakurai 1998)。セルロース合成の低下したシロイヌナズナ突然変異の細胞壁成分でも同様のことが報告されており(Arioli et al. 1998)、非晶性セルロースの蓄積によるものと考えられているが、その詳細は明らかにされていない。そこでDCB馴化BY-2細胞の細胞壁多糖類を構成単糖類分析とメチル化分析により調べ、正常なBY-2細胞と比較した。ペクチンの単糖組成比にDCBの影響は見られなかった。ヘミセルロース画分ではDCB処理によりGlcの割合が減少した。メチル化分析の結果、ペクチン画分ではDCB処理によって4-Glc量に変化は見られなかった。ヘミセルロース画分では4,6-Glcが減少した。また、どちらの画分でもDCB処理の有無に関わらず3-Glcは検出されなかった。以上の結果、DCB処理によるペクチン量の増加は非晶性セルロースの蓄積ではないことがわかった。4,6-Glcの減少は細胞壁中のキシログルカンの減少を示唆する。セルロース合成阻害に伴いセルロースと結合すべきキシログルカンが培養液中に分泌されている可能性がある。

2pJ06

オオムギの正常系統と折れやすい突然変異系統におけるセルロースの量とロゼットの関係

木村　聡, 桜井直樹[1], 伊東隆夫（京大・木質研, [1]広大・総合科学）

オオムギの在来種のうち於七、白瀬戸、コビンカタギ4号には茎の折れやすい自然突然変異系統が知られている。この突然変異系統は細胞壁成分のうちセルロースの量だけが正常系統の約 20%に低下している。今回、X線回折法を用いて正常系統および突然変異系統のセルロースの結晶幅の比較、次いでフリーズフラクチャー法によるセルロース合成酵素複合体（ロゼット）の観察によりセルロース量の低下の原因を検討した。X線回折より得られたセルロースの結晶幅はそれぞれの正常系統と突然変異系統の間で一致した。これは変異系統のセルロースは直径と重合度において正常系統と同じであるが、細胞壁中のセルロースの数が減少していることを意味する。コビンカタギ4号についてロゼットを観察したところ、正常および突然変異系統の間でロゼットの形状など構造的な差は見られなかったが、単位面積当たりのロゼットの数が突然変異系統で約 5 分の1に減少していた。すなわち、突然変異系統ではロゼットの合成量もしくは原形質膜への取り込みに異常があることが示唆される。

2pJ07

加齢に伴うタバコ葉アポプラストとシンプラストのクロロゲン酸レベル、それにペルオキシダーゼとスーパーオキシドディスムターゼ活性の変化

高浜有明夫、広津雅代、鬼木隆幸（九州歯科大学）

タバコ葉は加齢にともなってその色を緑→黄→褐色と変化させる。この褐変はタバコ葉に多量に含まれているクロロゲン酸(CGA)の酸化によるものと考えられる。しかし、CGAがいかにして酸化されるかについては不明であるので、今回はこれらを明らかにするために、加齢にともなうアスコルビン酸(AA)とCGAレベルの変化それにペルオキシダーゼ(POX)それにスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性の変化を調べた。アポプラストのAAは加齢にともなってゼロまで低下したが、シンプラストではゼロまでは低下しなかった。アポプラストのCGAレベルとPOX活性は加齢に伴って増加したが、シンプラストでは齢に無関係にほぼ一定であった。SOD活性は加齢にともなってアポプラストでは増加したが、シンプラストでは減少した。アポプラスト溶液は過酸化水素を加えなくてもCGAを酸化でき、その酸化はSODとカタラーゼ部分的に阻害された。カフェ酸残基を含む褐色物質が加齢にともなってアポプラストに蓄積され、その物質は自動酸化でO_2^-とH_2O_2を生成した。これらの結果から次ぎのことが考えられる。1）褐色物質は先ず最初にアポプラストのCGA/POXから作られる。2）1）の反応に必要な過酸化水素はCGA/POXに生成されると同時に褐色物質の自動酸化によっても生成される。3）アポプラストでCGA/POXと褐色物質により生成したO_2^-はそこの存在するSODで過酸化水素に変換される。

2pJ08

引張あて材形成中の木部分化帯で特異的に発現する遺伝子の cDNA 解析

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

伸長成長が止まって肥大成長している部分で傾斜刺激を受けると、樹木はあて材を形成して樹幹を鉛直に戻そうとする。広葉樹では傾斜上側に引張あて材と呼ばれるセルロースに富みリグニンの少ない木部が形成される。これまでに傾斜後2週間目のユーカリから、あて材形成中の木部分化帯で特異的に発現する遺伝子の cDNA を9つクローニングした。塩基配列の相同性検索を行ったところ、1つはメチオニン合成酵素、1つはペルオキシダーゼ(PO)に相同性の高いクローンであった。他のものは既知遺伝子との高い相同性は見られなかった。相同性の見られた PO は、ワタとダイズから見出されており、種子の成熟や発芽過程で発現するものであった。ジーンバンクには植物由来の PO が数多く登録されており、樹木の木部由来のものも5つ登録されていたが、いずれも相同性は見られなかった。このことから、あて材に特異的な cDNA と相同性の見られた PO はリグニンの重合を触媒するものではないことが推察される。

2pJ09

ラッカセイ根細胞壁に存在する鉄型リン酸溶解活性物質の抽出

沈仁芳, 阿江教治, 加藤陽治[1]（農環研, [1]弘前大・教・食物）

主要な存在形態を鉄型リン酸とする低リン酸肥沃土壌において，ラッカセイは旺盛な生育を示した。この能力は，ラッカセイ根細胞壁に存在するリン酸溶解活性と関連することをすでに報告した（Ae and Otani, 1997）。この細胞壁中に存在する鉄型リン酸溶解活性物質の性質と存在形態を知るため，ラッカセイ根からの抽出を試みた。抽出には熱水，酸加水分解およびアルカリ加水分解を行った。その結果，アルカリ加水分解で鉄型リン酸溶解活性を取り出すことができたが，酸加水分解では，抽出できなかった。抽出した活性画分と元の細胞壁成分に関して，Fe^{3+}，Al^{3+}，Ca^{2+}，Mg^{2+}，などのイオンとの反応を比較検討した。Ca^{2+}，Mg^{2+}の存在下では，抽出成分と細胞壁のリン酸溶解活性に影響を及ぼさなかった。しかし，Al^{3+}，Fe^{3+}を加えると抽出物溶解活性は著しく低下し，細胞壁と同じ反応を示した。

2pJ10

アラビドプシス温度感受性突然変異体*acw1*(altered cell wall)の細胞壁成分の解析

佐藤茂、加藤友彦、掛川弘一[1]、石井忠[1]、劉耀光、高部圭司[2]、空閑重則[3]、佐藤修正[4]、中村保一[4]、田畑哲之[4]、柴田大輔
（三井植物バイオ研、[1]森林総研、[2]京大大学院・農・森林科学、[3]東大大学院・農学生命科学、[4]かずさＤＮＡ研）

細胞壁は植物特有のものであるが、合成メカニズムに関する知見は乏しい。非許容温度で根端が膨らむ温度感受性変異体*acw1*は、細胞壁の染色性の異常が電顕で観察され、細胞壁成分の変化が予想された。そこで、*acw1*の細胞壁成分の分析を行った。常法で調整した*acw1*の細胞壁サンプルを2M TFAで処理し、可溶画分(hemicellulose, pectin)と残磋(cellulose)の構成糖を分析した。その結果、可溶画分の構成糖は野生株と比べ変化はなかったが、残磋ではglucoseのみが約1/3に減少していた。これらのことから、*acw1*はセルロース合成の変異体であり、*ACW1*遺伝子はセルロース合成に関与することが示唆された。

2pJ11

イネおよびアズキ芽生えの細胞壁物性と浸透圧に対する温度の影響

中村由紀子、若林和幸、保尊隆享、神阪盛一郎
（大阪市大院・理・生物）

30℃暗所で生育しているイネの芽生えを、様々な温度条件下に移し、さらに 15 時間育てた。幼葉鞘の成長速度は、40℃で最も高い値を示し、10、20、30、50℃ではそれぞれ最大値の 21、38、73、17%であった。植物細胞の成長速度は、細胞壁の伸展性と細胞液浸透濃度により最も直接的に規定される。細胞壁伸展性を測定したところ、成長速度と同様 40℃で最も高く、温度が低くなるか高くなるにつれて低下した。幼葉鞘の成長速度と細胞壁伸展性との間には高い相関が見られた。また、最小応力緩和時間と応力緩和速度は逆に、40℃で最も低く、温度が低くなるか高くなるにつれて増加する傾向が見られた。一方、幼葉鞘細胞液の浸透濃度は成長速度が高い温度でむしろ低く、成長速度との間の相関は認められなかった。アズキ上胚軸についてもほぼ同様の結果が得られた。以上の結果から、異なる温度で生育しているイネ幼葉鞘およびアズキ上胚軸の成長速度を制御するのは、細胞液の浸透濃度ではなく細胞壁伸展性であることが示唆された。

2pJ12

オクラ下胚軸切片の浸透的収縮と伸長のコンピューター・シミュレーション：水銀の影響

山本良一、藤井修平（生物・化学研、帝塚山短大）

ソルビトールを用いて温度を変えてオクラ下胚軸切片の収縮あるいは伸長の速さを計った。切片をカーボランダムでこするとその速さが著しく速く、表皮のクチクラが水の透過を制限していたことが分かった。このような水透過の制限を計算に取り込むと、浸透的な収縮や伸長が計算機によってシミュレートできた。温度を変えた結果から活性化エネルギーを求めると、それは水粘性の値に近かった。水の粘性すなわち水の透過が浸透圧や細胞壁の力学的性質に加えて細胞の伸長生長の主要な制御要因であることがわかる。水の透過を調べるため水チャンネルを阻害するといわれている水銀でオクラ下胚軸切片を処理した。塩化水銀の濃度が30μM以上であれば浸透的収縮やオーキシンによる伸長生長が著しく阻害された。オーキシンによる生長や浸透的収縮は主として水チャンネルを通る水の透過によっていると考えられる。

3aJ01

リンドウから単離した花器官形成に関与する遺伝子群

横井　崇秀、西原昌宏、小林仁[1]、及川弥生、山村三郎
(財団法人岩手生物工学研究センター、[1]新潟県農業総合研究所)

我々は岩手県の花き生産の主力であるリンドウの遺伝子工学的育種を目標として研究を進めている。今回リンドウより花器官形成に関与する遺伝子群の単離を行い4種類のMADS box関連遺伝子を得たので報告する。

既知MADS box遺伝子群の保存領域からディジェネレートプライマーを作成してRT-PCRを行い、得られた増幅断片の塩基配列を決定したところ4種の遺伝子が同定された。これらを*GtMADS1*～*4*と名付けその全長配列を決定し推定アミノ酸での相同性検索を行った。その結果*GtMADS1*（262aa）は*APETALA1*に58%、*GtMADS2*（252aa）、*GtMADS3*（249aa）は*AGAMOUS*にそれぞれ58%、62%、*GtMADS4*（244aa）は*AGL2*遺伝子に59%の相同性を示した。ノーザン解析を行ったところ*GtMADS1*は主にがく片、*GtMADS2*、*GtMADS3*は雄ずい及び雌ずい、*GtMADS4*は雌ずいで発現しており器官特異性が確認された。*GtMADS1*～*3*の結果は既報の発現様式にほぼ一致したが、*GtMADS4*の発現様式は*AGL2*遺伝子とは違い特徴的なものであった。現在これらの遺伝子の機能解析を行うためトルコギキョウ等の形質転換を行っている。

3aJ02

形態形成関連遺伝子を導入したトルコギキョウの解析

西原昌宏、横井崇秀、小林仁[1]、小岩弘之、大宮香織、山村三郎
（財団法人岩手生物工学研究センター、[1]新潟県農業総合研究所）

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、MADSboxを有する２種類の形態形成関連遺伝子をトルコギキョウへ導入し、解析を行った結果について報告する。

イネcDNAライブラリーからランダムシークエンスにより得られた*OsMADS1*遺伝子及びリンドウの花弁cDNAライブラリーからクローニングした*Apetala1*様遺伝子(*GtMADS1*)をCaMV35Sプロモーターの下流に繋ぎ、パーティクルガン法またはアグロバクテリウム法を用いて、トルコギキョウに導入した。いずれの遺伝子を導入した場合でも、再分化した系統の中に背丈が極端に短くなった（矮化）ものが得られた。*GtMADS1*遺伝子を導入したものには、逆に背丈が高くなる系統や花弁が葩化するものが観察された。さらに、*OsMADS1*遺伝子導入系統では、野生型に比較して、小花柄の部分が極端に短くなり、花が２つまたは３つ、くっついたように見える系統が多数、観察された。現在、次世代の種子を得ており、サザン、ノザンブロット法による解析を進めている。今後、これらの形質転換体の特性の安
上を確認し、安全性評価を進めていく予定である。

3aJ03

組換えタバコの芽生えにおけるレクチンプロモーターによる GUS 遺伝子の発現特性

吉田和正，田崎清（農林水産省　森林総合研究所）

ニセアカシア内樹皮レクチン遺伝子の 5'上流域(820bp)を GUS レポーター遺伝子につないでタバコに導入すると、成熟個体では GUS 遺伝子は内部師部と外部師部で主に発現する。このことから、内樹皮レクチン遺伝子の 5'上流域は、師部特異的な発現プロモーターとして機能することがうかがわれる。組換えタバコの生育初期段階におけるレクチンプロモーターによる発現パターンを知るために、自殖後代の芽生えでの GUS 遺伝子の発現を調べた。播種後８日目の芽生えを GUS 染色したところ、レクチンプロモーターを導入したタバコでは、子葉とシュート頂に薄い染色が見られた。子葉の横断切片を調製し観察すると、染色は子葉の中心とその両側にあるチューブ状の構造に限られていた。チューブ状の構造には環状の紋様が見られることから、この構造は管状要素であると考えられる。成熟した個体では師部特異的な遺伝子発現を示すプロモーターが、子葉においては管状要素と推定される組織に限定された発現を引き起こすことは興味深い。一方、シュート頂を含む胚軸の縦断面では、染色はシュート頂の内部（内体）に限られていた。

3aJ04

生長差の認められるアカシア兄弟家系間におけるゲノム比較

越山淳子、日尾野隆（王子製紙・森林資源研）

ゲノム解析が進んでいる植物種においては、実際の形質発現とこれらに関与する遺伝子（群）の解析、さらには個々の遺伝子産物であるタンパク質レベルにおける機構（ネットワーク）の解明を目的とした研究が今後急速に進むと予想される。これらの解析情報が、植物全般に共通する基盤的現象を理解する上で有用であることは疑う余地もない。しかしながら、特定の種にのみ認められる形質の解析においては、これらの情報にも適用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)を応用することを試みた。RDA 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。我々は昨年度の本大会において、原法のゲノムサブトラクション効果に加えて、同一材料から抽出した mRNA 由来の cDNA プローブによるハイブリダイゼーションを併用した特異的バンドの検出について実験条件並びに結果を紹介し、我々の解析方法が有効であることを報告した。現在、前回用いた材料（ベトナム事業植林地に由来するアカシア種の兄弟家系より生長性が明らかに異なることにより選抜した２系統）におけるゲノムサブトラクションによって得られたバンドについて、これらの構造解析を継続しておこなっている。ゲノムライブラリーを作成し、サブトラクトされた部分を含むゲノム領域を得た後、周辺領域の構造解析を行った。今回、構造解析により得られた ORF を基にしたデータベースでの相同性検索ならびに発現解析について得られた結果を報告する。

3aJ05

日周期および分単位で発現する樹幹の電位変動と直径変動

依田清胤[1,3]、鈴木三男[2,3]、鈴木均[1,3]（[1]石巻専修大・理工、[2]東北大・理・植物園、[3]理研・フロンティアサイエンス・フォトダイナミクス）

樹木の幹には物質の輸送機能と機械的支持機能とがあり、その機能発現とともに各種生理活性、形態・構造変化が生じている。植物体内の現象を非破壊的に把握する一手法として電位計測があげられるが、樹幹内部現象のように具体的情報が乏しい場合、電位計測の結果のみで幹内部の現象を把握することは困難である場合が多い。一方肥大生長をはじめとする樹幹の生長過程に関しては形態学的な情報が豊富に蓄積されている。そこで我々は樹幹表面の電位変動と幹の直径変動を計測することにより、樹幹内部の現象に関する情報の収集を試みた。その結果、幹の表面電位は明確な日周変動と秒から分の持続時間をもつ速い変動を示すこと、幹の直径もこれらと類似の日周変動と速い変動を示すことが明らかとなり、電位変動と直径変動の同時解析が幹内部の諸現象把握に有効な手段となりうることが示された。

3aJ06

水生植物ヒルムシロ殖芽の無酸素中での成長に伴うアラニンの蓄積

佐藤竜久、石澤公明(東北大・院・理・生物)

ヒルムシロ(*Potamogeton distinctus* A. Benn.)は、水田や湖沼、水路などに生育する単子葉類の浮葉植物で、地下茎にバナナの房状の殖芽を形成する。この殖芽は休眠覚醒後、酸素濃度の低下に応答して成長を開始する。殖芽は主に節間が伸長し、その伸長は無酸素条件で最大になる。また、暗黒の無酸素条件下でも1ヶ月を越えて生存する。この著しい嫌気耐性の機構の解明を目指している。

ヒルムシロ殖芽には、無酸素条件でも0.8を越えるエネルギー充足率を持続する活発なエネルギー合成系が存在し、これが嫌気条件での成長の持続を可能にしていると考えている。^{14}C-グルコースを用いたトレーサー実験から、無酸素中では多量のエタノールが生産されることが判り、無酸素中での ATP 合成は主にエタノール発酵によると推定した。また、殖芽中の多糖類、タンパク量の変動を空気中と無酸素中で比較したところ、無酸素中では、デンプンのみが減少することから、エネルギー源としてデンプンを利用していると推定した。一方、各種アミノ酸含量の変動を調べた結果、無酸素中でのみアラニンが顕著に増加することが明らかとなった。ヒルムシロ殖芽の無酸素中での成長を支える活発なエタノール発酵の維持に、アラニンの蓄積がどのように関わっているかを検討中である。

3aJ07

トランスポゾン*Ac/Ds*を用いたシロイヌナズナのトランスポゾンタギング: アルビノ変異体の解析

本橋令子1,2、伊藤卓也1、篠崎和子2、篠崎一雄1 (1; 理研・植物分子生物、2;農水省国際農研・生物資源)

シロイヌナズナの全塩基配列決定後、注目する遺伝子の機能を解析するためには遺伝子破壊系統の整備が重要である。我々はシロイヌナズナにおいて、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。

我々は、塩基配列の決定が進んでいる5番染色体に注目し解析を行った。5番染色体にマップされている*Ds*を転移させるため、*Ds*を持つ系統とトランスポゼース遺伝子を持つ*Ac*24系統を交配し、自家受精により、1000のトランスポゾン挿入系統(F2世代)を作製した(1)。*Ds*挿入部位に隣接するゲノム配列をTail-PCR法を用いて回収し、ゲノムのデータベースを利用して配列解析を行った。その結果、SNF1様プロテインキナーゼやMADS boxタンパク質、potassium transporterなどをコードする遺伝子の内部に*Ds*が挿入していることが明らかになった。現在、これら挿入変異体について、表現形質の解析を行っている。

また、各ラインのF3世代について幼苗期の表現形質を解析した結果、アルビノ変異体と葉の色素が薄くなる変異体が得られた。遺伝学的解析から、これらの表現型は*Ds*の挿入が原因と考えられる。現在、これら変異形質の原因遺伝子の解析を行っている。

(1)Smith et al. (1996) Plant J. 10(4): 721-732.

3aJ08

トランスポゾン*Ds*挿入シロイヌナズナを用いたリボソームタンパク質S13遺伝子の機能解析

伊藤 卓也、篠崎 一雄 (理研・植物分子生物)

トウモロコシ由来のトランスポゾン*Ac/Ds*は、シロイヌナズナ・ゲノム内においても効率良く転移することが知られている。我々は、非自律性因子*Ds*及び、*Ac*転移酵素遺伝子を導入した2種類の形質転換シロイヌナズナを交配し、*Ds*転移シロイヌナズナを作出した。約100系統について*Ds*に隣接するゲノムDNA断片をTAIL-PCR法により回収し、部分塩基配列を決定したところ、多数の遺伝子への*Ds*挿入変異体を同定することができた。今回、それら変異体のうちの一つである、リボソームタンパク質S13遺伝子(*AtRPS13A*)のノックアウト・シロイヌナズナの解析を報告する。

タンパク質合成の場であるリボソームは、多数のリボソームタンパク質とリボソームRNAより成る複合体で、細胞の活動に必要不可欠である。*AtRPS13A*遺伝子のノックアウト・シロイヌナズナは、栄養成長期において葉が小さく、また、細く尖った形態を示した。また、抽台が野生型と比較して約1週間遅れた。サザン解析より、S13遺伝子は、small gene familyを構成していることも明らかとなった。これら結果は、植物体の成長には、栄養成長期及び、栄養成長から生殖成長への移行期のシュート頂において、全てのS13遺伝子コピーからの発現が必要であることを示唆している。エンハンサー・トラップ法を利用した組織レベルの発現解析より、*AtRPS13A*遺伝子は地上部では、茎頂部、若い維管束組織、若い花芽、腋芽など、分裂活性の高い組織での構成的発現が見られるのに対し、根では、構成的発現パターンを示さず、オーキシンによる側根誘導時に発現が見られた。この結果は、*AtRPS13A*遺伝子が地上部と地下部で異なる発現制御を受けていることを示唆している。

3aJ09

イネにおけるアクチベーションタギングを利用した変異系統作成法の開発

森 昌樹、杉本和彦、岡部健、田切明美、西沢八恵子、廣瀬咲子、永田俊文、鐘ヶ江弘美、柴田百合子、土岐精一、宇垣正志、廣近洋彦、菊池尚志 (農水省・生物研)

アクチベーションタギング法はエンハンサー配列をゲノムＤＮＡ中にランダムに挿入し、挿入部位近傍の遺伝子の活性化を引き起こすことで突然変異体を取得する方法で、近年シロイヌナズナなどの双子葉植物で gain of function 型の突然変異体の取得に利用されている。しかしながら単子葉植物でこの方法の利用はほとんどないため、我々はイネで新規遺伝子の単離を目的に変異系統を作成した。

アクチベーションタギング法では通常エンハンサーのみを挿入するが、本研究では改変したプロモーターを挿入した。CaMV35S プロモーターの エンハンサー４コピーを３５Ｓプロモーター上流に連結し、トウモロコシのトランスポゾンＤｓ上にのせる形でＴ－ＤＮＡに挿入した。アグロバクテリウム法により１０００個体以上の 遺伝子導入イネ(T$_0$世代)を得た。この中には雄ずいが雌ずいに変換する花の形態変異体、病斑葉変異体などが存在していた。現在、次世代の解析、導入Ｔ－ＤＮＡの近傍配列の単離を進行中である。また、T$_0$世代のイネをＡｃトランスポゼースを持つイネと交配し種子を得たので、次世代での変異の拡大が起こるかどうかについても調べる予定である。

3aJ10

パーティクルガン法によるホウライシダ配偶体の形質転換

河合博子，鐘ケ江健，和田正三（都立大・理・生物）

ホウライシダ配偶体では，光屈性，葉緑体光定位運動，光による細胞分裂の調節等，フィトクロムあるいは青色光吸収色素を光受容体とする様々な細胞レベルの光反応が知られている。今回我々は，ホウライシダにおける形質転換系の確立のため，パーティクルガン法を用いてマーカー遺伝子を導入し，その発現を解析した。

マーカー遺伝子としては，CaMV 35S プロモーター制御下の GUS 遺伝子を，ホウライシダの内生の遺伝子である CRY2 遺伝子に挿入したものを用いた。材料は，赤色光下で４日間培養した原糸体で，これは単細胞の原糸体細胞と，仮根により構成される。遺伝子導入後約１ヶ月間白色光下で培養したところ，すべての細胞において GUS 活性が見られる前葉体を複数得た。これらは，安定な形質転換体である可能性が考えられる。

また，得られた形質転換体について，導入した遺伝子がゲノム上の CRY2 遺伝子の位置に組み込まれたかどうかを，PCR 法によって検出する試みについてもあわせて報告する。

3aJ11

NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE IS ESSENTIAL FOR THE NORMAL CELL ELONGATION PROCESSES

Ling PAN, Maki KAWAI, Akira YANO, Hirofumi UCHIMIYA; Inst. Mol. Cellu. Biosci., Univ. of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032

A chimeric gene encoding an anti-sense RNA of NDP kinase (nucleoside diphosphate kinase) under the control of the *Arabidopsis* HSP81-1 promoter was introduced into rice plants (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium* transformation system. At the stage of maturity transgenic anti-NDPK plants had shorter height when compared with non-transformants. The expression of the anti-sense RNA down-regulated the accumulation of mRNA so that the enzyme activity was reduced even under the standard growth temperature (25°C) in transgenic plants. Upon the heat shock treatment (37°C) NDP kinase activities in some transgenic rice plants were more reduced than those grown under 25°C.

We established the conditions for coleoptile growth, namely, coleoptile growth test under submerged conditions, where detailed observations of cell growth processes were carried out. The cell elongation process was inhibited in anti-NDPK transgenic plants, suggesting altered guanine nucleotide level may be responsible for the processes.

3aJ12

シロイヌナズナメタロチオネイン2a mRNA減少変異株の解析

赤星英一、藤原徹、林浩昭、茅野充男　（東大院・農・応生化）

前年度大会で、シロイヌナズナメタロチオネイン2a（MT2a）mRNA蓄積の減少が花柄基部の形態異常に関与する可能性について報告を行った。報告したEMS変異株では、MT2a mRNAの蓄積の減少が観察された。これより、変異株ではMT2a遺伝子の転写、或いは転写後制御に異常があると考えられた。変異株のMT2a構造遺伝子、及び上流約1kbのプロモーター領域のシークエンシングを行ったところ、この領域に変異は存在しなった。そこで、変異株に、MT2aプロモーター領域（約1kb）とGUS遺伝子を連結した融合遺伝子を、掛け合わせにより導入し、解析を行った。その結果、これらのラインでは、1）GUS活性がコントロール株に比べて約1/2に減少していること、2）組織特異性、過剰重金属に対する転写誘導のパターンはコントロール株と変わらないこと、が明らかとなった。以上の結果より、この変異株は、MT2a遺伝子の発現量を維持する機構に異常があると考えられる。

3pJ01

ヒゲカビ（*Phycomyces blakesleeanus*）の胞子嚢柄発生分化に及ぼす赤色光の影響

崔　寛三[1]、堀江　直司、宮嵜　厚，大瀧　保（忠南大・応用生物[1]東北大・遺生研）

ヒゲカビ（*Phycomyces blakesleeanus*）は、菌糸上に２種類の胞子嚢柄すなわち、直径 150μm、長さ 10cm 以上にもなる巨大な macrophore (macrosporangiophore)と直径 10μm、長さ 2-3mm の微小な microphore (microsporangiophore)を分化する。近年、ヒゲカビの種々の光反応が明らかにされ、特に巨大な macrophores に関しては、①その形成や胞子嚢の分化に及ぼす光誘導効果、②光の強さの増減による成長速度の増減変化(light-growth response)、③非対称的に照射された光刺激に対する光屈性反応(phototropism)などが知られ、多くの研究がなされている。これらの光反応は主として、青色光や紫外光などの短波長の光によって起こり、例えば光屈性に関しては赤色光は青色光に比べ約 10 億分の１程の効果しかなく，また、赤色光は青色光に対して拮抗的に働くことが僅かに知られているに過ぎない。一方、矮性胞子嚢柄である microphores に関しては、その発生が白色光、特に青色光によってほぼ完全に抑制され、これまでは暗所か赤色光下での発生しか知られていなかった。この場合、赤色光の積極的な影響はなく、そのため胞子嚢柄の発生分化にとっては暗所と全く同じ効果であると信じられてきた。本研究では、我々はこの microphores の発生分化に対しても、青色光と赤色光との拮抗作用を示唆する実験結果を得ることができた。すなわち、一定時間暗条件下で生育させたヒゲカビの菌糸に青色光を照射すると、microphores の形成は阻害されるが、その阻害効果はその後に照射した赤色光によって減少する。現在我々は、この現象を光に対する感受性の違う突然変異体を用いてより定量的に証明し，測定するために種々の光照射プログラミングを行っている。今回は，得られた結果の一部について報告する。

3pJ02

セン類*Physcomitrella patens*でのフィトクロム依存葉緑体光定位運動

門田 明雄、佐藤 良勝、和田 正三 （都立大院・理・生物科学）

シダ類の多くの種では、原糸体がフィトクロム依存の光屈性反応を示す。これら原糸体細胞は同時にフィトクロム依存の葉緑体光定位運動を示す。赤色光に光屈性を示さない種では、赤色光による葉緑体光定位運動も見られない。また、ホウライシダの赤色光誘導光屈性を欠く変異体では、どの変異株も赤色光による葉緑体光定位運動をも欠失している。これらの事実は赤色光による光屈性と葉緑体定位運動が同一のフィトクロム系に依存していることを示唆している。赤色光誘導光屈性はシダだけでなく、セン類の原糸体細胞でも見られる。しかし、これらの細胞では青色光誘導の葉緑体定位運動は知られているものの、赤色光による反応はまったく報告されていない。そこで、本研究では*Physcomitrella*を用い赤色光の細胞部分照射により葉緑体の光定位運動を調べた。その結果、照射部位に葉緑体が集まる弱光運動、照射部位を逃避する強光反応ともに見られ、フィトクロム依存であることがわかった。

3pJ03

白色光によるエンドウ上胚軸カスパリー線の発達遅延に対する光合成阻害剤の影響

高屋恵理子、唐原一郎、井上 弘[1]、菅井道三
（富山大・理・生物、[1]富山大・理・生物圏環境）

カスパリー線は内皮細胞のpericlinal wallに形成され、水やイオンのアポプラストバリアとしてはたらく、スベリンやリグニンからなる構造である。アラスカエンドウの上胚軸においては、暗所で育てた場合にはカスパリー線は形成されるが明所で育てた場合形成されない。このことは植物内部組織の発達が光により制御される例として興味深いが、その仕組みはよくわかっていない。今回、阻害剤を用いてこの反応における光合成の関与を調べた。

まず暗所で8日間育てたアラスカエンドウ上胚軸にDCMU (10 μM)を与え、白色光を20時間照射した。この時点で上胚軸より切片を切り出し、青色光で短時間励起したときのクロロフィル蛍光の誘導を調べることで、薬剤の有効性を確かめた。またカロチノイド合成を阻害することでクロロフィルを光酸化により破壊させる薬剤である、ノルフルラゾンの存在下(80 μM)で吸水させ、同薬剤存在下で7-8日間暗所で育てた芽生えに白色光を48時間照射し、クロロフィル含量を調べることで薬剤の有効性を確かめた。いずれの薬剤を与えた場合でも、薬剤処理開始から48時間後にカスパリー線の発達を調べたところ、白色光を照射した場合は薬剤の有無とは関係なくカスパリー線の発達は遅延していた。

これらのことから、白色光によるエンドウ上胚軸カスパリー線の発達停止に光合成は関与していない可能性が示唆された。

3pJ04

エンドウ上胚軸のカスパリー線の発達は入射光量に依存して遅れる

高屋恵里子、唐原一郎、菅井道三（富山大・理・生物）

維管束植物の根には水やイオンの保持、運搬に関わるカスパリー線と呼ばれる構造が発達している。カスパリー線は、内皮細胞の細胞壁に疎水性の物質がバンド状に蓄積して形成されたもので根だけでなく地上部の器官にも形成される場合がある。暗所で育てたエンドウ芽生え上胚軸にもカスパリー線が形成される。エンドウ黄化芽生え（8-9日齢）を白色光下に移すとカスパリー線の発達が停止することが報告されている。

本研究の目的はエンドウ上胚軸におけるカスパリー線の発達が白色光により阻害される仕組みを明らかにすることである。まず白色光がカスパリー線の発達に与える影響を光照射により生じたカスパリー線の発達の遅れを指標として定量する方法を確立し、次にこの方法を用いて照射時間・照射光強度及び照射総光量と反応との関係を調べた。8-9日齢のエンドウ黄化芽生えに照射時間を４段階（4、8，12，16時間）、照射光強度を３段階（5、10、20 w/m^2）に変えて白色光を照射した。10 w/m^2の白色光を16時間連続照射した場合、上胚軸のカスパリー線の発達は暗対照に比べ約40.5時間遅れた。発達の遅れは照射時間と、照射光強度に依存し、光の強さと照射時間の積、即ち総光量は発達が遅れた時間から照射時間を差し引いた値に比例し、調べられた光強度と照射時間の範囲内で相反則（ブンゼン=ロスコーの法則）が成立した。今回の結果と、白色光によるカスパリー線形成の阻害は光合成阻害剤によって阻害されないこと（高屋ら1999年度年会）から、この現象は光形態形成反応であることが強く示唆された。

3pJ05

UV-Bによるキュウリの成長阻害に対するUV-A/青色光の影響

稲継 理恵，[1]清水 英幸，近藤 矩朗 （東京大・院・理系，[1]国立環境研）

植物に対する紫外線の影響については， UV-B による成長阻害などのネガティブな影響に関する報告が主流だった．しかし最近では，様々な植物において UV-A が植物の成長，クロロフィル量の増加などに対して促進的な効果を持つという報告が多数なされている．我々の研究室では，紫外線の研究に汎用されているキュウリ幼植物体を用いた実験で UV-B と UV-A/可視光の相互作用について研究を行ってきた． その結果，UV-B 照射によって葉面積成長抑制，光合成活性の低下などの影響を受けている植物に UV-A から青色域にかけての光を照射すると光合成活性が促進されること，また UV-B を照射せずに UV-A から青色域にかけての光を照射した場合には，葉面積成長が促進されることは、既に 98 年の日本植物学会で報告した．今回はその結果に続き， UV-A から青色域にかけての光を全く含まない光で生育した植物，もしくはそれを含めた光で生育した植物に UV-B を照射した結果を比較することによって， UV-A から青色域の光が葉面積の成長や光合成活性に及ぼす影響についてさらに詳しく考察する．

3pJ06

シロイヌナズナにおけるNDKの発現と機能の解析

徳岡容子、矢部尚登、蓮沼仰嗣（横浜市大・木原生研・総合理学）

当研究室において、アラスカエンドウのヌクレオシドニリン酸キナーゼ(NDK)は、赤色光照射特異的にリン酸化レベルが上昇し、近赤外光によりリン酸化が抑制されることが見出されている。

本研究では、形質転換が容易で遺伝学的手法が可能なシロイヌナズナを用いて、NDKの光信号伝達への関与と機能の解析の一環として、その発現調節機構の解析を行った。シロイヌナズナでは、最近になってNDK遺伝子ファミリーの構成遺伝子が少なくとも３種単離されているが、その機能や発現様式についてはほとんど解っていない。本研究では、まずシロイヌナズナNDKの中でも最も発現量の多いものの一つであるAtNDK1の発現調節機構を解析するため、ゲノムライブラリーより 5'側上流約6.0Kbを含むクローンを単離した。5'側転写調節領域約1.8kbについてその塩基配列を決定したところ翻訳開始点より上流約100bpの位置に熱ショックエレメントのコンセンサス配列が4ユニット保存されていた。このクローンをもとに、AtNDK15'上流側約1.8kbを含み、AtNDK1のタンパク質コード領域をほとんど含まないもの(pYT4NB)と、イントロン及びタンパク質コード領域の大部分を含むもの(pYT4NN)にGUS遺伝子を翻訳レベルで融合し、シロイヌナズナに導入、その発現パターンを解析した。

現在、pYT4NBについて得られている形質転換体についてGUS組織化学染色を行ったところ、花粉および根で強いGUS活性が見られたほか、受粉後の柱頭毛および受粉後の子房内部においても GUS活性が見られた。

今後は、光や熱、酸化ストレスといった刺激に対する応答性や、細胞内局在、発現の器官特異性を解析する予定である。

3pJ07

シロイヌナズナの光形態形成に関わる共転写因子群

山本義治[1]、関根友紀子[1]、Xing-Wang Deng[1,2]、松井南[1]
（[1]理研・フロンティア、[2]Yale大・MCDB）

シロイヌナズナの *CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1* (*COP1*)は光応答を暗所下で抑制する働きを担う光形態形成のマススイッチの一つであり、その蛋白質産物は暗所下においては核に、明条件下においては細胞質に局在する。COP1の機能を明らかにすることを目標に、COP1と蛋白質レベルで結合しうる遺伝子を単離し、それらと相同性があるものを加えて計６つの遺伝子を *COP1-Interacting Protein, CIP* として同定した。逆向き遺伝学の手法を用いて、*CIP*の生体内における役割を調べたところ、6つのうち４つが実際に光形態形成に関与していること、そしてこの４つがすべて、*COP1*のような光形態形成を抑制する因子ではなく、逆に光形態形成を促進する因子であることが明らかになった。また、これら４つの*CIP*のタンパク質産物はすべて転写のコアクチベーターであることが示唆された。以上の知見並びに*CIP*の遺伝子発現解析から以下のような仮説が提唱された。すなわち、CIPは光依存性遺伝子群の発現を活性化するのに必要な転写共因子であり、光シグナルに応じてCOP1がCIPを抑制/脱抑制することで光誘導性遺伝子群の発現調節が行われる。

3pJ08

光依存、組織特異的発現パターンを示すプロモータートラップラインの解析

田中慎一郎、望月伸悦、長谷あきら（京都大・理・植物）

我々はシロイヌナズナのプロモータートラップ系統を用い、光による遺伝子発現制御の研究を行っている。INRAが作出したトラップ系統より我々が再単離したN35系統では、暗所で下胚軸下部においてレポーター遺伝子の発現が上昇する。そこでさらに詳しくその発現制御様式を解析した。

N35系統では、明所から暗所へ移す直前にFRの照射を行うと暗所でのレポーターの発現が促進された。この結果は本遺伝子の発現がフィトクロムにより制御されていることを示している。さらに、この反応の光受容部位を調べるため子葉を切除する実験、FRの部分照射実験を行ったところ、下胚軸ではなく子葉が光受容部位である事が示唆された。以上の結果は子葉から何らかのシグナルが下胚軸下部に伝えられることを示しており、その実体としては、植物ホルモンであるオーキシンを考え、解析中である。

3pJ09

光周期依存的な花成制御における*FT*遺伝子の役割

小林恭士、賀屋秀隆、岩渕雅樹[1]、荒木崇
（京都大・理・植物、[1]現・岡山県生物科学総研）

シロイヌナズナの花成時期遺伝子*FT*は、機能欠損により花成遅延を引き起こす遺伝子である。我々は、*FT*遺伝子の発現の極大が花成決定直前にあることを見出し、この遺伝子が花成制御を理解する上で重要な鍵になるという見方に立って研究を進めている。

*FT*遺伝子の過剰発現体では、日長によらず極端な花成早化が見られるが、これは機能欠損変異体の場合、日長への応答性が失われるという解析結果と併せて*FT*遺伝子が日長に依存した花成制御の中心的な調節因子である可能性を示唆する。

次にわれわれは、光周期による花成制御経路の重要な遺伝子である*CO*の機能欠損変異体で、*FT*遺伝子の発現が顕著に低下していることを明らかにした。さらにデキサメタゾンを用いて*CO*活性を誘導すると、*FT*遺伝子の発現が有意に上昇することを確認した。これらは、遺伝学的解析結果と併せて、*CO*の下流で*FT*が花成を促進的に制御していることを意味するものである。

1aK01

カワヤナギの生殖器官におけるペクチン分解酵素遺伝子の発現特性

二村典宏、河内宏[1]、篠原健司（農水省・森林総研、[1]生物研）

カワヤナギ（*Salix gilgiana*）の雄花由来のcDNAライブラリーから、ポリガラクツロナーゼ(PG)、ペクチンメチルエステラーゼ(PME)、ペクテートリアーゼ(PL)に対応するcDNAクローンを単離した。それぞれのcDNAクローンは409、596、393アミノ酸をコードし、既知の酵素のアミノ酸配列と40%から72%の相同性を示した。このうち、PGに関しては4種類のcDNAクローンを単離したが、推定されるアミノ酸配列は各クローン間で89%以上の高い相同性を示した。PG遺伝子とPME遺伝子は雄花でのみ特異的に発現しており、葉、茎及び根での発現は認められなかった。PGとPMEのmRNAは雄花の成熟過程で蓄積し、花芽が小さい時期やセネッセンスの始まった時期での蓄積量は少なかった。一方、PLのmRNAのレベルは雄花、雌花や茎で高く、葉や根でもわずかに検出された。これら遺伝子の組織特異的な発現を解析するため、*in situ* hybridizationを行った。その結果、PG遺伝子とPME遺伝子は成熟花粉で特異的に発現していた。また、PL遺伝子は雄ずいの花糸、雌ずいの柱頭及び維管束の木部で発現していた。以上の結果は、これらペクチン分解酵素が生殖器官の特定の組織でそれぞれ重要な役割を担っていることを示唆している。

1aK02

レンゲソウ根粒特異的に発現するプロテアーゼの取得と解析

内藤由紀、藤江誠、宇佐美昭二、室岡義勝[1]、山田隆　（広大院・先端・生命機能、[1]阪大院・工・応生）

マメ科植物と根粒菌との共生機構の解明に向けてレンゲソウ（*Astragalus sinicus*）と根粒菌（*Mesorhizobium huakuii* subsp.renge）を用いて根粒内で特異的に発現している遺伝子の取得と解析を行っている。

Differential display法により取得した根粒特異的クローンであるf-32は、1032bpのORFを含み、推定分子量38.0KDaのプロテアーゼをコードしていた。ORFのN末端近傍には液胞輸送シグナルと考えられる配列が存在していた。この遺伝子はゲノミックサザンハイブリダイゼーションで4～6コピー検出され、ジーンファミリーを形成していた。mRNAの発現は根粒特異的で、特に感染後30日目以降の成熟根粒で強く発現していた。また*In situ* hybridizationの結果、成熟根粒のsenescent zoneにおいて強いシグナルが検出された。以上より今回取得したプロテアーゼは、成熟根粒の液胞内で機能すると考えられる。

1aK03

コムギ種子の休眠を制御する内生因子

大塚広美・喜久田嘉郎・幸田泰則（北海道大・農・植物）

コムギ種子は休眠が浅く、しばしば穂発芽を起こし農業上の大きな被害を与えている。この穂発芽を防止する為には種子の休眠機構の解明が必要であるが。「ABAそのものではなく、種子胚のABAに対する感受性がコムギ種子の休眠を決定している」とするいくつかの報告があるが、未だこの感受性の本体は明らかにされていない。そこで穂の中に存在する休眠を制御する内生因子について調べることにした。実験材料として穂発芽性の異なる春コムギ2品種（易穂発芽性、ハルユタカ；難穂発芽性、春のあけぼの）を用いた。

まず穂の生育に伴うABA含量の変動を調べたところ、2品種共含量は低く、その濃度では発芽を抑制できないことが判明した。したがってABAは休眠の誘導には直接的には関与していないと思われた。次に発芽抑制活性を休眠誘導活性とみなし、穂に含まれる発芽抑制活性物質について調べた。穂のエタノール抽出物から得た酢酸エチル可溶性分画とn-ブタノール可溶性分画にには強い発芽抑制活性がみられたが、水溶性分画には活性は全く認められなかった。この両分画の発芽抑制活性は酸化により容易に失われてしまった。これらの発芽抑制分画を少量のABAと共存させると、発芽抑制活性は著しく上昇した。このことから、この発芽抑制物質はABAと共働し、その活性を高める共働物質(Sinergist)ではないかと思われた。この不安定な発芽抑制物質の量がABAの感受性を決定し、コムギ種子の休眠を制御していると考えられる。

1aK04

種子の休眠と発芽に関わる突然変異体の選抜

川上直人、矢部尚登[1]、Loic Lepiniec[2]（明大・農、[1]横浜市大・木原生研、[2]INRA）

種子の休眠と発芽に関わる遺伝因子の解析を目的とし、野生型種子の発芽は阻害しない程度の穏やかな条件で発芽抑制される変異体、および強い発芽阻害条件下でも発芽する変異体を選抜している。これまでに、シロイヌナズナのアクティベーションタギング・ライブラリーを3,000系統選抜し、28℃、5% PEG、0.3μM ABAの各条件で発芽阻害される系統、25% PEG、1μM ABAの各条件でも発芽する系統、および発芽に適した条件でも発芽しにくい系統を得た。二次選抜においてABA高感受性を示したC61は、半矮性の個体を生じた。22℃でも発芽しにくいC985の種子では、ジベレリンを与えても発芽率の上昇が見られなかった。発芽速度が遅いC1256は、器官分化は正常であるが長軸方向の細胞伸長がほとんど失われていた。現在、変異形質とT-DNA挿入の連鎖を解析している。

1aK05

発芽イネ種子のジベレリン誘導型α-アミラーゼ発現におけるホスフォイノシチド情報伝達系の関与

M.A. Kashem, 伊藤紀美子[1], 堀秀隆, 三ツ井敏明（新潟大院・自然科学・分子生命, [1]新潟大・農・応用生化）

私達は、イネ種子 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponkai) の発芽速度および伸長生長に及ぼすPLCの特異的阻害剤ネオマイシンの効果を調べた。ネオマイシン (≦1 mM) はイネ種子の発芽を効果的に阻害したが、10 mM $CaCl_2$ 存在下においてはその阻害効果が見られなくなった。さらに、ネオマイシンはイネ種子アリューロン層におけるジベレリン誘導型α-アミラーゼ発現を転写、蛋白合成、酵素活性レベルで抑制したが、10 mM $CaCl_2$ 存在下においてはその阻害効果は、転写レベルを除いて、完全に消えることが見いだされた。胚盤組織においても同様な結果が得られた。また、ネオマイシンは2つのα-アミラーゼ分泌組織において IP_3 レベルを減少させることも確認された。以上の結果から、PLCはイネ種子の発芽およびジベレリン誘導型α-アミラーゼ発現に関与していると考えられた。

1aK06

イネOSVP1の*in vivo*における機能の解析

星野　仙、服部束穂　（三重大・遺伝子）

トウモロコシの*Vp1*はABAによって制御される一連の遺伝子の調節に関わる種子特異的転写制御因子をコードする。イネにおいても、VP1のホモログとしてイネOSVP1が単離されており、プロトプラストを用いたトランジエントアッセイにおいて、イネ*Em*遺伝子(*Osem*)プロモーターからの転写を活性化し得ることなどから、OSVP1は機能的にもVP1と相同であると考えられている。しかし実際に植物体内において、OSVP1がVP1と同等な機能を果たしているか否かについてはこれまでのところ知見がない。そこでOSVP1の*in vivo*における機能を解析するために、*Osvp1* cDNAをアクチンプロモーターに対して、センスとアンチセンス方向につないで過剰発現させたトランスジェニックイネを作成した。センス過剰発現個体では、種子特異的ABA応答性遺伝子が植物体においてもABA誘導を受けるようになった。また、アンチセンス個体では、穂発芽性が増加していた。

これらのことから、OSVP1が植物体内において、実際にVP1と同等な機能を果たしていることが明らかになった。

1aK07

"分裂セット"に関する研究

黒岩常祥・宮城島進也・黒岩晴子１　（東大・院・理・生物科学、１共立女子短大・文科）

Cyanidioschyzon merolaeは直径２μm、ゲノムサイズ約１４ Mbpと極めて小さな単細胞の紅藻である。また、アクチンを使った分子系統学的解析から、真核生物として最も早く分岐した生物の一つであることが明らかとなっている。本研究の目的は、この藻をつかって真核細胞の最小のユニット構造と、それの分裂時における挙動を電子顕微鏡を使って明らかにすることであった。その結果、C.merolaeは高等な真核細胞に見られるほとんど総ての細胞小器官（細胞核、ミトコンドリア、色素体、マイクロボディ、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、小胞体など）を１個ずつもっていることが明らかとなった。またそれらの分裂時における挙動を調べたところ、先ず葉緑体とミトコンドリアの分裂に独自の分裂装置が出現した。この分裂装置にはマイクロボディが付着していた。分裂中のミトコンドリアにはリソソームが付着し、分裂中のマイクロボディの両極にはミトコンドリアと付着する装置(斑)があった。今回は新たに分裂中のミトコンドリアの両極と中心体を結びつけている構造が発見された。このことから、細胞分裂とは、細胞核分裂だけでなく細胞内のオルガネラの分裂と分配を有機的に結びつける構造からなる"分裂セット"の分裂であることが明らかとなった。

1aK08

アラビドプシスのCDK活性化キナーゼ(CAK)と相互作用する因子の単離と解析

松林聡子、梅田正明、内宮博文　（東大・分生研）

細胞周期の進行を制御するサイクリン依存性キナーゼ（CDK）は、制御因子であるサイクリンとの結合、特定のアミノ酸残基のリン酸化-脱リン酸化によりその活性が制御されている。CDKの活性化に必須なT-loop中のスレオニン残基のリン酸化を触媒するのが、CDK活性化キナーゼ（CAK）である。

梅田らにより単離されたアラビドプシスのCAK（Cak1At）は、全体のアミノ酸配列において他の生物由来のCAKとの相同性はそれ程高くなかった。系統樹上でも*cak1At*は新規のCAKをコードしていると考えられた。*cak1At*の発現をタンパク質レベルで解析したところ、植物ホルモンや糖などの栄養分による発現制御を受けないものの、分裂活性の高い細胞でのみ発現していることが明らかになった。また、アラビドプシスの粗タンパク質をゲル濾過により分画したところ、Cak1Atタンパク質およびCAK活性は、推定されるCak1Atの分子量よりもはるかに大きな分子量の画分において検出された。これらの結果から、Cak1Atは、他の因子と複合体を形成することにより活性を発現すると考えられる。そこで、現在、酵母のtwo-hybrid systemを用い、Cak1Atと相互作用する因子のスクリーニングを行い、得られたクローンの解析を進めている。

1aK09

イネCDK活性化キナーゼと相互作用する因子の単離及び解析

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

細胞周期の制御において中心的な役割を果たしているのが、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)である。CDKには高度に保存されたリン酸化部位が存在しており、これらのアミノ酸残基のリン酸化・脱リン酸化がCDKの活性の制御に重要であることが知られている。CDK活性化キナーゼ(CAK)は、T-loop領域にあるスレオニン残基をリン酸化することにより、CDKを活性化するキナーゼである。我々は昨年度の本学会において、イネのCDKの一つであるR2がCAKの機能的なホモログであることを示すと同時に、R2が少なくとも3種類の複合体を形成することを発表した。そこで、Sundbergらが単離したポプラのサイクリンHホモログを用いてR2との結合性をtwo-hybrid法により解析した結果、これらの蛋白質は物理的に結合することが明らかになった。さらに、出芽酵母のCAK変異株において*R2*とサイクリンHを共発現させたところ、*R2*のみ発現させた時に比べて抑圧活性が上昇することが明らかになった。このことから、このサイクリンHは、R2の活性型複合体の構成因子として存在すると考えられる。

1aK10

タバコの NPK1 プロテインキナーゼ (MAPKKK) の C 末端側領域の機能と細胞内局在

石川雅樹 [1]、西浜竜一 [1]、岩川秀和 [1]、町田泰則 [2]([1] 名大院・理・生命理、[2] 京大院・理・植物)

タバコの NPK1 プロテインキナーゼは、細胞増殖にかかわっていると考えられる。特に、NPK1 とその活性化因子である NACK1 キネシン様タンパク質の細胞周期における蓄積パターンから、NPK1 は M 期において何らかの機能をしていると考えられる。NPK1 は、その推定されるアミノ酸配列から、N 末端側のキナーゼ領域と C 末端側の非キナーゼ領域に分けることができる。キナーゼ領域は、アミノ酸配列に関して MAPKKK と類似しており、出芽酵母の MAPKKK の変異株を相補できる。NPK1 の C 末端側半分には、キナーゼの機能調節に関わっていると推定されるいくつかのモチーフが存在する。最も C 末端側に近い領域には、核移行シグナル (NLS) と思われる配列などが存在している。本研究の目的は、このような特徴をもつ NPK1 の C 末端側の機能を解明することである。そこで我々は、*NPK1* cDNA を、Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子と結合して、タバコ培養細胞 BY-2 に導入して細胞内局在性を調べた。また C 末端側の NLS 様配列を欠失させた NPK1 についても同様な解析を行った。その結果、全長の NPK1 は核に局在すること、NLS 様配列を欠失した NPK1 では細胞質全体に存在することが分かった。このことは、この配列がタバコ細胞のなかで NLS として機能していることを示唆している。さらにこの配列を含む C 末端側のおよそ 60 アミノ酸からなる領域が、NPK1 の活性化因子 NACK1 と相互作用することが分かった。これらの結果は、NPK1 の機能調節にとって、C 末端側の配列が重要な役割をすることを示している。

1aK11

タバコサイクリンDの機能解析

中神弘史、関根政実、河村和恵、新名惇彦(奈良先端大・バイオサイエンス)

近年、植物から数多くの細胞周期制御遺伝子のホモログが単離され、植物のG1期制御は酵母に比べ動物により近いことが明らかになりつつある。動物ではサイクリンDはサイクリン依存性キナーゼ(CDK4またはCDK6)と複合体を形成し、Rbをリン酸化することにより細胞をS期に導く。

我々はタバコから*Rb*遺伝子と*cdc2a*遺伝子の他にサイクリンD遺伝子を4種単離し、バキュロウイルス発現系を用い、タバコではサイクリンDがCdc2aと複合体を形成し、ヒトRbをリン酸化することを前回の大会で報告した。今回基質特異性を検討した結果、サイクリンD/Cdc2a複合体は*in vitro*でタバコRbおよびHistone H1に対してキナーゼ活性を示すことが分かった。現在、新たに単離したCdc2bを用いて同様の実験を行っている。

動物ではサイクリンDには2カ所のリン酸化部位が存在しており、その一方がサイクリンD/CDK複合体のキナーゼ活性に必須であることが知られている。タバコのサイクリンDにもリン酸化部位が保存されていることから、アミノ酸置換変異体の作製により機能解析を試みている。

また、4種のサイクリンD遺伝子の発現様式を解析するため、タバコ培養細胞を用いて細胞周期に伴う発現を解析した結果、G2/M期に発現レベルが上がる遺伝子があることがわかった。現在、植物ホルモンや炭素源に対する応答性を解析している。

1aK12

DNA合成はプロトン消費反応である 一培地のアルカリ化

坂野勝啓、矢崎芳明、清田誠一郎(農水省・生物研)

リン酸飢餓細胞に無機リン酸(Pi)を与えると容易に細胞分裂を誘導できる。網野ら(1983)はこれを利用してニチニチソウ細胞の同調分裂に成功している。我々はニチニチソウ細胞によるPi吸収機構を研究している際、比較的多量のPiを投与した後に偶然、プロトンシンポートとは無関係の培地pH上昇を観察した。約20時間でピークとなるこのpH上昇は細胞分裂へ向かう(G_1～S～M期)形態の細胞増加を伴い、aphidicolinで抑制される。動物細胞では培地pHを人為的にアルカリ側に調節してS期を誘導できる、あるいは、mitogenで誘導するとS期に細胞質がアルカリ化すると報告されており、細胞質のアルカリ化がタンパク・核酸合成を促進し、細胞周期を進行させるためと説明されている(Busa and Nuccitelli, 1984)。実際、多くのDNAポリメラーゼの至適pHは8～9であることが知られている(Gerson, 1982)。しかし、細胞質がアルカリ化する機構は知られていない。

観察された細胞形態変化を伴う培地pHの上昇は、細胞内部で何らかのプロトン消費反応が進行していることを示し、これはDNAポリメラーゼ反応そのものであると結論した。細胞内のPi^{2-}がDNAのphosphodiester結合に組み込まれると1価の陰イオン(RO-P^{-}-OR')になるので、1結合当たり1個のプロトンが消費される。従って、DNA合成が開始されると細胞内は自動的にアルカリ化し、もしDNAポリメラーゼがアルカリ化によって活性化すれば、DNA合成は加速度的に進行するであろう。同様の現象は少量のリン酸を与えた後、anoxia処理によっても誘導できた。

2aK01

単離したシャジク藻節間細胞細胞壁からの電解質水溶液中でのCa^{2+}イオンの遊離

清沢　桂太郎　（大阪大院・基礎工・生物工学）

シャジク藻節間細胞は、KCl, $MgCl_2$, $BaCl_2$ (Kiyosawa and Adachi, 1990), 及びNaCl (Katsuhara and Tazawa, 1986; Tufariello et al., 1988)水溶液中に入れると死ぬ。しかし、適当量のCa^{2+}を添加すると、それらの電解質水溶液中で長期間生存できる。Kiyosawa and Adachi (1990)は単離した節間細胞細胞壁を、上記の電解質水溶液に浸した後、残存するCaを稀薄HCl水溶液で抽出して、原子吸光法で測定し、上記電解質水溶液中でCa^{2+}が遊離してくることを見いだした。今回の実験では、単離した節間細胞細胞壁からのCa^{2+}イオンの純水、KCl, NaCl, $MgCl_2$,及び$BaCl_2$水溶液中での遊離をカルシウム電極で測定した。その結果、Ca^{2+}は純水中でも遊離してくること、しかし、その後で上記電解質水溶液に浸すとさらに多量に遊離してくることが分かった。

2aK02

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：顕著な外向き電流の性質について

大川和秋，筒井泉雄[1]，野坂修一[2]，大島朗伸（島根大・生物資源・生物科学，[1]岡崎生理研・生体膜、[2]滋賀医・麻酔科）

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、膜電位の-100mV より正側で顕著な外向き電流パターンが出現する。この電流パターンは人工池水の組成である KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, TESbuffer のいずれのイオンも、単独の組成でイオン濃度が 0.02 から 0.1 mM 以上であるやはり、膜電位の -100 mV より正側で記録された。通常人工池水に組成として含まれない塩化コリンでも同様のパターンが観測された。イオン濃度を 0.02 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。従って、イオン濃度（強度）に感じて開口するチャンネルと結論できる。

2aK03

オオシャジクモ節間細胞の高濃度カリウム存在下における起電機構

新免輝男　（姫路工大・理・生命）

植物細胞において、細胞外液のカリウム濃度を上げると膜電位は脱分極し、膜抵抗は低下する。これは膜電位発生にカリウムの濃度勾配による受動電位が関与していることによる。しかしながら、膜電位と膜抵抗のカリウム濃度変化に対する反応の程度は報告によってさまざまである。本実験で用いたオオシャジクモの節間細胞においては0.1mM KCl存在下での膜電位は-200mV程度であった。外液KCl濃度を100mMに上げても膜電位は-160mV程度の分極状態にあり、膜抵抗も高い値が維持された。細胞によっては、電気または機械刺激を与えない限り、100 mM KCl存在下においてもこのような分極状態が1時間以上も維持された。外液のカリウム濃度が100mMの状態ではイオンの濃度勾配による受動電位はほぼゼロであり、測定される膜電位のほとんどは起電生プロトンポンプによって発生する能動的な成分であると考えられる。プロトンポンプ阻害剤を用いた実験などによって、高濃度カリウム存在下における電位発生について解析した。

2aK04

走査型二重水膜電極法による　Chara の電気的細胞間連絡の測定

緒方惟昭（産業医大、産業保健、第一生体情報）

［材料と方法］「走査型水膜電極法、Ogata1983~」を改変した「走査型二重水膜電極法」により、*Chara* の二連節間細胞（節間細胞ａ／節細胞ｎ／節間細胞ｂ）を用い、材料の両端間に流す一定の電流（ΔＩ）と　二枚の水膜電極間に生じる電位変化（ΔＶ）との相関を求めた．また、生体膜に関する電気的等価回路（Philippson, 1921 ）を適用して（ａ／ｎ間、ａ／ｎ／ｂ間、およびｎ／ｂ間）の見かけの抵抗（Ｒｍ、Ｒｉ），および見かけの電気容量（Ｃｍ）の算出を試みた．　この方法では、A）電極が藻体に直接触れていないので、細胞に対する物理的刺激は無視出来る．B）材料が湿室中に有るので、細胞表面（主に細胞壁）と内部（主に液胞）を流れる電流の比は10^{-3}以下になる．　また、電圧応答から、　C）Impedance の周波数依存性（0~100 Hz）が求められ、D）電極の位置を固定することで、それらの時間的変化が観察可能となる．

［結果と考察］；節間細胞ａ＆ｂの見かけの抵抗、Rm_a Rm_b は$8*10^{-3}\Omega m^2$，節間細胞を介した抵抗、Rm_n は$4*10^{-2}\Omega m^2$ であった．温度変化（20～30℃）に対しRm_a Rm_b、Rm_n は共に＋の相関を示した．しかし、Rm_n の応答には時間的遅れがあったの対し　Rm_a Rm_b には有意な時間の遅れは無かった．また、節間細胞ａの膨圧低下によるＲｍの増大は、ａ／ｎ間にのみ観察された．これらのことは、電子顕微鏡などで観察されている Plasmodesmataによる細胞間連絡の制御が生理的過程によって進行していることを示すものである．