

1aC01

安定同位体標識法を併用した多次元NMR分光法によるラン藻 *Anabaena variabilis* M3のRNA結合タンパク質RbpA1の溶液構造解析

村上智英、佐藤直樹¹、森田勇人、林秀則（愛媛大院・理工・物質理、¹埼玉大・理・分子生物）

低温環境下ではmRNA上に部分的に存在する相補的領域が二本鎖を形成し、遺伝情報の翻訳効率が低下する。ラン藻 *Anabaena variabilis* M3は低温環境下でRbpA1を発現する。RbpA1はmRNA上に生じた二本鎖を解きほぐすことで、タンパク質への翻訳効率の低下を防ぐ働きを持つと考えられている。また、RbpA1には真核生物で見られるRNA recognition motif (RRM) やグリシンリッチドメインが存在することから、これらのRNA結合タンパク質の中でも進化的に最も基本的なタンパク質であると考えられる。本研究では、¹⁵Nのみ、あるいは¹⁵Nおよび¹³Cで安定同位体標識したRbpA1を大腸菌による大量発現系を用いて作製し、多次元NMR分光法により溶液構造解析を行うことで各機能領域の構造機能相関を明らかにすることを目的とした。¹H-¹⁵NHSQC NMRスペクトルによって各アミノ酸に由来するシグナルが広範囲にかつ、よく分離して観測されたので、RbpA1は溶液中で比較的安定した全体構造を持ち、各機能領域が特定の高次構造をとることを明らかにした。現在、シグナルの帰属を行いRbpA1の各機能領域の二次構造の解析を進めている。

1aC02

低温誘導性遺伝子 *rbpA1* の転写調節の解析

圓山恭之進、佐藤直樹（埼玉大・理・分子生物）

シアノバクテリア *Anabaena variabilis* M3株にはRNA recognition motifタイプのRNA結合タンパク質遺伝子 (*rbp* 遺伝子) が8個存在する。その内7個の *rbp* 遺伝子は低温誘導性を示し、特徴的な保存配列が5'非翻訳領域に4ヶ所存在する。リボソーム結合部位RBS(5'-TTYGGAGA-3')、BOX1(TCTCCGAA)、BOX2(TTGTNNAGT)及びBOX3(TTCGGYGA)である。また *rbpA1* 遺伝子の5'非翻訳領域には高温条件(38°C)で培養した細胞の抽出タンパク質が結合する。そこでそれぞれの保存配列を置換したプローブDNAを用いゲルシフト解析を行った。その結果、保存配列はDNA結合タンパク質の結合に関係していることが推定された。また5'非翻訳領域に結合するタンパク質を硫酸分画と磁気ビーズを用い精製した結果2種類の一本鎖DNA結合タンパク質と相同性の高いタンパク質を得た。しかし5'非翻訳領域にはこの他にも幾つかのDNA結合タンパク質が結合することが予想され更に精製を進めている。

1aC03

Synechocystis sp. PCC 6803 における *rbp1* 及び *crh* 遺伝子の低温誘導的な発現制御に関わる低温シグナル伝達系の解析

兼崎友¹、三上浩司、鈴木石根、村田紀夫（基生研、¹総研大・生命科学）

生物には低温に曝されると特異的に発現する遺伝子が存在するが、そのような遺伝子発現を促す低温検知及びその情報伝達経路の詳細は不明である。その解明を目的として、本研究では *Synechocystis* sp. PCC 6803 の RNA-binding protein (*rbp1*) 及び RNA-helicase (*crh*) 遺伝子の低温誘導的な発現制御機構の解析を行った。

rbp1 及び *crh* 遺伝子の転写産物は、34°Cから22°Cへの温度シフト後一過的に発現し、発現のピークはそれぞれ50分、30分後であった。*Synechocystis* におけるヒスチジンキナーゼの変異体の解析から *crh* 遺伝子の低温誘導的な発現には、膜結合型HiK33と細胞質型HK19が関与していることが明らかとなった。しかし、HiK33とHiK19は *rbp1* 遺伝子の低温誘導的な発現には関与していなかった。以上のことから、*Synechocystis* には低温シグナル伝達経路が2種類存在し、そのうちの1つにはHiK33とHiK19が含まれている可能性が示唆された。

1aC04

Synechocystis PCC6803の低温シグナル検知に関わるヒスチジンキナーゼHiK33の変異株の解析

鈴木石根、兼崎友¹、三上浩司、村田紀夫（基生研、¹総研大）

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803は、環境温度の低下にともないさまざまな遺伝子の発現を制御している。これまでに我々は、低温下における脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現誘導に関わる因子として、ヒスチジンキナーゼHiK33を同定した。HiK33は膜タンパク質で、低温による膜の流動性の変化を検知するセンサーであろうと推定されている。HiK33の機能を明らかにする目的で、野生株とHiK33遺伝子の破壊株についてDNAマイクロアレイを用いて低温環境下で変動する遺伝子の探索をおこなった。その結果、野生株では転写や翻訳に関わる一群のタンパク質の遺伝子の発現が誘導され、光合成の光化学系のサブユニットの遺伝子発現が抑制されていた。HiK33変異株ではそれら遺伝子の発現量の増減が小さくなっていった。これらの結果は、HiK33が低温条件下における遺伝子発現の促進および抑制に必要な因子であることを示唆するものである。

1aC05

常温性ラン色細菌 *Synechocystis* sp. PCC6803の生育の温度依存性

井上名津子、菓子野康浩、小池裕幸、佐藤和彦
(姫路工業大・理・生命)

これまでに我々は、常温性ラン色細菌 *Synechocystis* sp. PCC6803がどのように高温適応するのかを知るためにそれらの生育温度をかえて培養した細胞を高温処理し、その影響を調べてきた。その結果35°Cで培養した細胞が25°C培養したものよりも酸素発生活性や蛍光指標Fv、細胞膜の透過性の耐熱性が增大すること、一方で高温での炭酸固定反応には耐熱性の増大がほとんど見られないことを明らかにし、先の植物生理学会において報告した。

今回はこのラン色細菌の生育の温度依存性を調べ、どの反応が光合成独立栄養的生育の温度限界になっているのかを調べた。細胞を種々の温度で培養すると生育速度が最大になるのは30°C付近でその成長速度は40°C付近まであまり低下せず、急激な成長速度の低下は42~3°C付近であり、きわめて特徴的であることがわかった。そして面白いことに培養温度での光合成速度がほとんど同じであり、また、低温で培養した細胞ほど、光合成活性の温度依存性が大きくなった。

以上のことから推定される結果および細胞を光従属栄養的に培養した場合の温度依存性についての比較も併せて報告する。

1aC06

円石藻の生育温度マーカー分子の細胞内分布

山崎武央¹、沢田 健²、白岩善博³ (新潟大・理・生、²筑波大・化学、³筑波大・生物)

ハプト植物門ゲフィロカプサ科の円石藻に特有なパイオマーカー分子として長鎖アルケノン (nC₃₇-C₃₉)・アルケノエイト (nC₃₇-C₃₈) が知られている。それらの分子は藻の生育温度に依存して不飽和結合の数を変化させかつ海底堆積物中においても変化を受けずに保存されることから、地球科学分野で古海洋温度復元の指標として利用されてきている。しかし、それら分子の生理学的機能や役割については不明のままである。本研究では、円石藻 *Emiliania huxleyi* のオルガネラを単離し、各画分に含まれる長鎖アルケノン・アルケノエイト分子の細胞内分布を調べ、それらの量および不飽和結合数を分析した。結果として、これらのバイオマーカー分子は、各膜の量に比例して存在し、各画分における不飽和結合数にも違いは認められなかったことから、細胞内の膜画分に均等に分布しているものと推定した。

1aC07

クラミドモナスの光合成の高温適応：核と葉緑体ゲノムの相互作用

田中祐二、西山佳孝、村田紀夫
(基生研、総研大・生命科学)

高温に適応したクラミドモナスでは光化学系II複合体の高温耐性が增大する。この分子機構を明らかにすることを目的に、タンパク質合成阻害剤の効果および熱ショックタンパク質との関連を調べた。細胞を高温に適応させる際にシクロヘキシミドまたはリンコマイシンを共存させると、いずれの場合も光化学系IIの高温耐性は増大しなかった。したがって、光合成の高温適応には核ゲノムと葉緑体ゲノムから新規に合成されるタンパク質が必要であると考えられる。また、熱ショックタンパク質のウェスタン分析の結果、光化学系IIの高温耐性の増大が見られる温度範囲 (20°C-35°C) では、Hsp60の量的変動はなくHsp22の発現は見られなかった。このことから、熱ショックタンパク質の誘導は光合成の高温適応に関与しないことが示唆される。

1aC08

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

木村愛子、森田勇人、林 秀則 (愛媛大院・理工・環境科学)

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

SHT1株と野生株において、通常生育温度 (30°C) での生育には特別な違いは見られなかったが、やや高め温度 (38°C) で生育させるとSHT1株は野生株と比較して増殖が著しく遅くなった。SHT1株の変異を起こしたDNA領域をプラスミドレスキューにより回収し、塩基配列の決定により変異部位を同定したところ、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002のプラスミドpAQ1に変異が起きていることが明らかとなった。野生株のpAQ1上には4つのORFが存在すると推測されているが(1)、SHT1株にはそのうちの1つ、ORF93をコードする領域が新たに挿入されていた。ORF93領域の挿入と高温感受性の関係を明らかにする目的で、ORF93を大量発現する形質転換体を作製し、その高温耐性および、タンパク質組成について解析を進めている。

(1) Akiyama, H. et al., *DNA Res.* 5, 127-129 (1998)

1aC09

好冷性藻類および好冷性細菌からの熱ショックタンパク質遺伝子のクローニング

山内清司、小亀一弘¹、奥山英登志²、森田勇人、林秀則(愛媛大院・理工・物質理、¹北大院・理・生物科、²北大・地球環境)

好冷性藻類ハプト藻 *Prymnesiophyte* strain B や好冷性細菌 *Vibrio* sp. strain ABE-1 などは、一般の藻類や細菌類と比べて低温環境を好む生物である(最適生育温度 5°C~15°C)。このような生物では、一般的な生物にとっては低温環境である 20°C 程度で熱ショックタンパク質の発現が誘導される。このような低温で発現される熱ショックタンパク質の機能や、発現様式を明らかにする目的で、好冷性生物から熱ショックタンパク質遺伝子をクローニングした。

すでに単離されている GroEL のアミノ酸配列を比較し、保存されている領域のアミノ酸配列をコードする混合プライマーを合成した。この混合プライマーとゲノム DNA を鋳型とした PCR によって、増幅された DNA 断片について塩基配列を決定した。この PCR 産物の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、他の生物の GroEL の相当する部分と同一性があったため、これをプローブとしたサザンブロット分析により、GroEL の遺伝子を含む DNA 断片を単離し、塩基配列を決定した。*Vibrio* sp. strain ABE-1 の GroEL は 547 アミノ酸から構成され、その 81% が大腸菌の GroEL のアミノ酸と一致し、GroES とオペロンを構成していた。また、groES 上流のオペレーター領域の塩基配列は大腸菌との同一性は低かった。現在、ハプト藻の HSP60 に関しても同様の解析を行っている。

1aC10

ランソウ低分子量熱ショックタンパク質の構成的発現
仲本 準, 鈴木伸章, ロイ・サンジュット(埼玉大・理・分子生物)

好熱性ランソウ *Synechococcus vulcanus* を高温に曝すと三種類のタンパク質 (GroEL, small Hsp, GroES) が顕著に蓄積する。我々は、GroEL や DnaK とは異なり高温や重金属ストレス下でのみ顕著に蓄積する small Hsp が、24 個のサブユニットから構成されるホモ・オリゴマーであること、リンゴ酸脱水素酵素などのモデル基質に対して分子シャペロン様活性を示すこと等を既に明らかにした。本研究ではランソウにおける small Hsp の機能を明らかにするために、この Hsp を構成的に発現するランソウ株 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) を構築した。形質転換体の致死温度 (50°C) 処理後の生存率や光化学系 II、フィコシアニンの熱耐性が増加した。興味深いことに、*in vitro* において 50°C では不可逆的凝集を起こさない small HSP が、細胞内では同温度の処理により不溶性画分に移行した。small Hsp とフィコピリンタンパク質やチラコイド膜が相互作用するのではないかと考えて研究を進めている。

1aC11

新規な熱ショック遺伝子によるランソウ熱ショック応答の調節

石川南都子, 仲本 準(埼玉大・理・分子生物)

我々は、*Synechococcus* sp. PCC 7942 から、熱ショックで発現が(少なくとも転写レベルで)誘導される新規な遺伝子をクローニングし、本学会で既に報告した(田中直樹ら、1997 年度年会)。この熱ショック遺伝子の塩基配列や推定翻訳産物と相同な配列はデータベースに存在しなかった。この Hsp 遺伝子の機能を明らかにするために、遺伝子翻訳領域、翻訳領域直下流、遺伝子上流及び下流の各部位に抗生物質耐性遺伝子を挿入した変異株を構築した。この遺伝子の翻訳領域と翻訳領域直下流に変異を生じた形質転換体は、45°C (比較的穏やかな高温で、野性株においては致死温度ではない) において生育が著しく阻害された。翻訳領域直下流に変異を起こした形質転換体の転写産物蓄積量は減少していた。これらの結果は、形質転換体の高温感受性が、この新規な熱ショック遺伝子自身の不活化あるいは発現阻害によって引き起こされたことを示すものである。これらの高温感受性形質転換体における groEL 遺伝子の発現が顕著に阻害されていたことから、この熱ショック遺伝子は他の Hsp 遺伝子の発現調節に関与するのではないかと考えて研究を進めている。

1aC12

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のラン藻における相同的機能発現
天野剛志, 森田勇人, 林秀則(愛媛大院・理工・物質理)

高等植物を高温ストレスにさらすと、細胞内局在性が異なる 5 種類以上の低分子量熱ショックタンパク質 (sHsp) の発現が誘導される。これらのうち葉緑体局在型 sHsp は、光合成機能の安定化に寄与すると推定される。葉緑体におけるこの sHsp の機能を解析するため、この sHsp をラン藻において発現させ、高温に対する応答を解析した。

シロイヌナズナの葉緑体局在型 sHsp である Hsp21 をラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 で発現させると、致死温度である 48°C の高温ストレスに対する生存率が 30% 以上上昇した。また、Hsp21 の局在部位を調べると、30°C では、ほとんどの Hsp21 が細胞質を含む可溶性画分に存在していたが、45°C の高温処理を行うと、可溶性画分の Hsp21 は減少し、チラコイド膜を含む不溶性画分の Hsp21 は増加した。これは高等植物の葉緑体局在型 sHsp の高温によるチラコイド膜への移行と同様のことが起こったものと考えられる。これらの結果は、ラン藻において発現した葉緑体局在型 sHsp が、チラコイド膜と相互作用し、葉緑体における機能と同様の機能を果たしたと推定できる。

1pC01

トマトミトコンドリア型 sHSP 遺伝子の生殖器官における発現様式

三宮 一幸、鈴木 克己、Liu Jian¹、庄野 真理子

(国際農林水産業研究センター沖縄、¹名古屋大・生物分子応答研究センター)

高温ストレスにより発現誘導されるヒートショックタンパク質は、真核生物において5つのサブグループ、HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 および small heat shock proteins (sHSPs) に分類される。なかでも、分子量 15-30 kD の sHSPs は、植物において顕著に発現している。植物の sHSPs は、その細胞内局在性により、細胞質型 class I、class II、小胞体 (ER) 型、ミトコンドリア (MT) 型、葉緑体型に分類される。

我々は、トマトからミトコンドリア型 sHSP (MT-sHSP) 遺伝子をクローニングし、ノーザンブロット解析により、熱ストレス下における生殖器官での発現様式を調べた。MT-sHSP 遺伝子は、40℃の熱処理開始後 30 分で、最も強く発現していた。また、*in situ* ハイブリダイゼーション解析により、生殖器官での発現の組織特異性を調べた。開花時、MT-sHSP 遺伝子は、花粉では顕著に発現していなかったが、胚珠および柱頭において、特異的に発現していた。

1pC02

形質転換タバコを用いたミトコンドリア型 sHSP の機能解析

Liu Jian^{1,2}、三宮 一幸^{1,3}、鈴木克己³、庄野真理子³

(¹生研機構、²名大院・生命農、³農水省・国際農研・沖縄)

高等植物には細胞局在性の異なる5種類の低分子量熱ショックタンパク質 (sHSP) の存在が報告されている。我々はトマトからミトコンドリア型 sHSP (MT-sHSP) 遺伝子をクローニングし、MT-sHSP が *in vitro* で分子シャペロンとして機能することを確認している。

この MT-sHSP 遺伝子をタバコに導入し、MT-sHSP の機能と高温耐性に対する効果を解析した。発現したタンパク質はミトコンドリアに局在する事が明らかとなった。また、単離したミトコンドリアを用いてチトクローム C オキシダーゼの熱耐性を検討したところ MT-sHSP 形質転換体のミトコンドリアの方がコントロールと比較して高い熱耐性を示し、*in vivo* においても MT-sHSP が分子シャペロンとして機能していることを示唆した。

本研究の一部は、生研機構基礎推進事業の支援で行われた。

1pC03

膜脂質を占めるトリエン脂肪酸含量の温度依存的な制御に関わる分子メカニズムの解析

松田 修、射場 厚 (九大・院・理・生物科学)

トリエン脂肪酸は、高等植物の生体膜脂質を構成する主要な多不飽和脂肪酸であるが、その含量は生育温度に依存して動的に変化することが知られている。トリエン脂肪酸はジエン脂肪酸の不飽和化により合成されるが、この反応は小胞体および葉緑体に局在する ω -3 脂肪酸不飽和化酵素により触媒される。シロイヌナズナにおいては、*FAD3* が小胞体局在型、*FAD7* および *FAD8* が葉緑体局在型の ω -3 酵素のアイソザイムをコードする。*fad7* 突然変異体では、25℃ 近傍の生育温度域において、膜脂質を占めるトリエン脂肪酸含量が著しく変化する。また、*FAD8* の mRNA の蓄積は、顕著な温度誘導性を示す。これらのことは、*FAD8* がトリエン脂肪酸含量の温度依存的な制御に特に重要な役割を果たし、植物の温度環境に対する適応機構とも密接に関わっている可能性を示唆する。私たちは遺伝子導入系を用いたアプローチにより、*FAD7* および *FAD8* の発現が、トリエン脂肪酸含量の温度依存性にそれぞれどのように影響するかについて検証した。また、2つの遺伝子の部分領域を様々な組み合わせた改変遺伝子を作製し、それらを導入した植物におけるトリエン脂肪酸含量の温度依存性の変化を解析した。本発表においては、これらの実験の結果を踏まえた上で、トリエン脂肪酸含量の温度依存的な制御に関わる分子的要因について考察する。

1pC04

イネ cDNA マイクロアレイを用いたコムギ低温応答遺伝子の発現モニタリング

下坂悦生、半田裕一 (農水省・北海道農試)

コムギは、低温感受性植物に比して高度な低温適応機構を有する低温耐性植物であり、低温環境に反応して -20~-30℃ の凍結耐性を獲得することも可能である。演者等は、コムギの持つ低温環境適応機構の解明を目的に低温応答性遺伝子群の解析を行ってきた。しかしながら、このプロセスは、複数のシグナル伝達系を介した複雑な遺伝子制御を受けており、個々の遺伝子の独立した解析のみでは、その遺伝子システムの全体像を把握することは困難であった。近年、数千個の cDNA をガラス板上に規則的に固定し、その発現パターンを同時検出する cDNA マイクロアレイ技術が注目されており、環境ストレス関連遺伝子の特定やそれらの機能解析の有力なツールとして期待されている。そこで、コムギを対象としたマイクロアレイ解析の第一歩として、コムギの近縁作物であるイネで開発された cDNA マイクロアレイを利用し、低温ストレスに対する発現パターンのモニタリングを試みた。ガラス版上には、農水省イネ・ゲノム研究により作成された cDNA カタログから独立クローンが固定された。無処理及び低温処理されたコムギ及びイネ植物体より、RNA を精製し、アレイに対するターゲットとし、Cy5 によるラベルの後、ハイブリッド検出を行った。なお、アレイ解析手法は、農水省生物研及び STAFF 研において開発された。結果、コムギをターゲットとした場合でも、その発現パターンの検出は可能であり、低温に反応した挙動を示す一部の遺伝子が確認された。

1pC05

低温馴化過程でコムギ冠部に蓄積する mRNA の解析

中山昌^{1, 2}, 増田ゆかり¹, 島本義也², 今井亮三¹
(¹農水省・北海道農試, ²北大・農)

低温馴化過程で発現量が変化する遺伝子を広く探索し、その機能から低温馴化の分子機構を明らかにすることを目的として、低温馴化した秋播きコムギの冠部組織から cDNA ライブラリーを構築した。cDNA ライブラリーに対し、ディフェレンシャルスクリーニング法およびマクロアレイ法 (cDNA クローン スロットプロットしたメンブランによる解析) によるスクリーニングをおこない、5 種の cDNA クローンを得た。ホモロジー検索の結果、それぞれのクローンは、オオムギの *blt801*、HMG (High Mobility Group protein)、dehydrin、K⁺チャンネルタンパク質、および様々なバクテリア間に保存される機能未知のタンパク質遺伝子と高い相同性を有することが明らかになった。これらのクローンにおける短時間の低温応答性、ABA および乾燥に対する応答等について報告する。

1pC06

イネ幼苗期耐冷性と水チャンネル遺伝子の発現との関係

北川良親、李 楽攻、李 世訪、陶 艶 (秋田県立大・生工研)

低温感受性イネ苗に脱水ストレスを前もって与えると、低温処理 (4°C/24 h, 25°C/24 h) しても枯死しなくなる。この耐冷性発現には脱水で細胞内にカルシウムシグナルが発生することが必要である。カフェイン処理するとカルシウムの発生は抑制され、イネ苗は枯れる。同じような現象は耐冷性イネでも観察された。イネから 3 種類の水チャンネル遺伝子を分離し、カフェインによる発現の変化を調べた。いずれの水チャンネル遺伝子とも常温で発現しており、脱水誘導遺伝子ではない。一つの水チャンネル遺伝子については、脱水前処理や低温処理およびカフェイン処理による遺伝子の発現促進または抑制とイネ苗の耐冷性発現との間に密接な関係が認められた。水チャンネル遺伝子とイネの耐冷性との関係について考察する。

1pC07

イネ及びコムギ PEP C 遺伝子の低温下における発現及び酵素活性への低温の影響

佐藤希実、加藤明 (農水省・北農試)

イネのフォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEP C) 活性は 20°C 以下の温度では大きく低下するが、コムギの酵素では温度による活性低下が比較的少ない。ダイズ、カボチャなどの夏作物と、オオムギ、エンドウ、ナタネなどの PEP C 活性についても、同様の傾向が見られ、夏作物の PEP C は冬作物に比べて低温域での活性低下が著しいことが示唆された。イネの PEP C の cDNA を単離してその塩基配列を決定し、夏作物と冬作物に属する植物の間で、既知の PEP C タンパク質のアミノ酸配列を比較した結果、夏作物と冬作物の間では C 末側の特徴的なアミノ酸配列に違いが見られた。夏作物と冬作物の低温域における PEP C 活性の差は夏作物と冬作物の低温域での成長活性の違いと関係があるかも知れない。

1pC08

A novel component of MAP kinase cascade is responsive to cool stress in rice.

Jiang-Qi WEN, Kiyoharu OONO¹, Ryozi IMAI; Dept. Low Temp. Sci., Hokkaido NAES, ¹NIAR.

A cDNA clone, *OsMEK1*, encoding MAP kinase kinase (MEK) has been cloned from *Oryza sativa*. The putative protein is 92% identical to the maize MEK homolog, *ZmMEK1*. Northern analysis revealed that the accumulation of *OsMEK1* transcripts was steadily induced by 12°C but not by 4°C treatment in shoots, roots and callus cultures. MAP kinase in-gel activity assay showed that the MAP kinase activity was also induced by 12°C treatment. In contrast, expression of *lip19* (a bZIP protein possibly involved in low temperature-induced gene expression) was induced by 4°C but not by 12°C treatment, suggesting that the two different temperatures trigger different signaling systems. Relative water content measurement showed that there was no significant difference between the water status changes in 12°C-treated and 4°C-treated seedlings, suggesting that the induction of *OsMEK1* expression by 12°C treatment may not be due to dehydration. Results suggest that *OsMEK1* is possibly a novel component of MAP kinase cascade involved in the signal transduction of low temperature in rice.

1pC09

植物の Uncoupling Protein (UCP) について—アラビドプシスおよびイネ UCP の遺伝子構造、発現の比較から
渡辺明夫、平井篤志 (東大院・農学生命科学)

ほ乳類などの恒温動物は低温におかれた際、積極的に熱を発生させ体温の低下を防ぐことが知られている。こうした低温にตอบสนองした熱産生で発熱をつかさどっているのはミトコンドリア内膜にある Uncoupling Protein (UCP) であり、最近、植物にも UCP が存在することが報告された。また、私たちのこれまでの研究から、アラビドプシスには少なくとも 2 つの UCP アイソフォームが存在し、低温に対しそれぞれの遺伝子が異なった発現制御を受けていることが示された(1)。一方、我々は将来的な遺伝子操作も視野に入れ、低温に弱いとされるイネの UCP についての研究も行なっている。イネにもアラビドプシス同様、2 つの UCP 遺伝子 *OsUCP1*, *OsUCP2* が存在することが示されたが、低温によるこれらの遺伝子の発現誘導は認められなかった。さらに RT-PCR による解析から、*OsUCP1*, *OsUCP2* の転写産物の中には活性調節部位をコードする領域を欠くなどした短い転写産物がかなりの割合で含まれていることが示された。その後、*OsUCP1*, *OsUCP2* のゲノミッククローンを単離し、塩基配列を決定したところ、不完全な転写産物はスプライシング部位およびポリ A の付加サイトの異常により生じることが示された。今回は、こうしたデータをもとに、アラビドプシス、イネを中心に高等植物の UCP 遺伝子について考察する。

(1) Watanabe et al. (1999) *Plant Cell Physiol.* 40:1160-1166

1pC10

低温環境におけるコムギ *cox2* 遺伝子の転写解析
栗原志保、半田裕一 (農水省・北海道農試)

高等植物の低温環境応答には、核ゲノムのみでなく細胞質ゲノムも核と相互作用しながら、影響を与えていると考えられる。低温がコムギのミトコンドリア遺伝子群の転写に及ぼす影響を調査する過程で、*cox2* が特徴ある転写パターンを示した。*cox2* は、チトクローム c 酸化酵素のサブユニット II をコードするミトコンドリア遺伝子で、コムギでは 1 個のイントロンを含んでいる。常温区では、成熟転写産物と、イントロンを含む微量の前駆体が確認された。一方、2°C 一週間処理では、成熟転写産物の量は常温区と差がなかったが、前駆体の量は明らかに増加していた。これは、低温により一次転写量が増加したか、スプライシング活性が低下したことによると推測される。

コムギ *cox2* のイントロンは Group II に属し、イントロン内とエクソン部分との間の相補的塩基配列のペアリングがスプライシングに必要な因子のひとつである。これに関与するエクソン側の相補的塩基配列 intron binding site 1 (IBS1) に RNA エディティングが起こることが明らかになっている。そこで、それぞれの区で成熟転写産物と前駆体の IBS1 のエディティングの有無を比較することによって、低温がエディティングを介してスプライシング活性に影響を与えるかどうかを検討した。

1pC11

季節的低温馴化でクワの ER に蓄積する WAP20 および WAP27 の cDNA を用いたノーザン解析
宇梶徳史、竹澤大輔、荒川圭太、藤川清三 (北海道大・低温研)

冬季に -80°C 以下の凍結耐性を獲得するクワ皮層組織には、季節的低温馴化過程で ER に低分子量熱ショックタンパク質ホモログ (WAP20) および group III LEA タンパク質ホモログ (WAP27) が蓄積することを、前回までに報告した。本報告では WAP20 および WAP27 の cDNA を用いたノーザン解析の結果を報告する。季節的低温馴化過程における WAP20 および WAP27 mRNA の誘導が皮層組織において確認された。WAP20 および WAP27 mRNA は低温処理によっても誘導された。季節的低温馴化過程における WAP20 mRNA の発現は皮層で最も顕著であり、木部および冬芽組織では少なかった。一方、季節的低温馴化過程における WAP27 mRNA の発現は皮層、木部および冬芽組織ともに同程度であった。また、熱ショック、ABA および乾燥に対する WAP20 および WAP27 mRNA の発現も検討した。

1pC12

秋播コムギ・キチナーゼ遺伝子のハードニングによる発現誘導と酵素機能の解析

川上 題、吉田みどり (農水省・北農試)

越冬作物は、ハードニングにより耐凍性及び雪腐病抵抗性を獲得する。これらの形質に抗菌活性及び不凍活性を合わせ持つ Pathogenesis-Related (PR) タンパクの関与が示唆された。そこで秋播コムギでハードニング中に発現が誘導される PR タンパク、特にキチナーゼ遺伝子の単離及び発現解析を行った。各種キチナーゼ遺伝子の保存領域を利用した RT-PCR によりキチナーゼ相同断片を単離し、それをプローブに野外でハードニング処理を行った高度雪腐病抵抗性コムギ PI173438 由来の cDNA ライブラリーから 3 種類のキチナーゼホモログ (*Chi1, 7, 10*) を単離した。それらのアミノ酸配列から *Chi 1* はキチン結合ドメインを持たないクラス II キチナーゼに、*Chi 7* 及び *10* は、キチン結合ドメインをもつクラス I キチナーゼに分類されることが予想された。またそれぞれのホモログは、ハードニングにより発現が誘導されることが明らかとなった。次にそれぞれのホモログのキチナーゼとしての機能を明らかにする目的で、*Chi1, 7, 10* の OR をそれぞれ組み込んだメタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) を利用してタンパクを生産し、それぞれの酵素活性を調べた。その結果、3 種類のホモログともエンド型のキチナーゼ活性を持つことが明らかとなった。

1pC13

コムギ *wpi6*、イネ *osr8*、及びオオムギ *blt101* のプロモーター領域の構造とストレス応答性の関係

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

コムギ *wpi6* およびイネ *osr8* はオオムギの低温誘導性遺伝子 *blt101* と同源性を持つ遺伝子である。*wpi6* と *osr8* のプロモーター領域を単離して配列を比較したところ、*wpi6* のプロモーター領域(Pro-*wpi6*)には Drought Responsive Element (DRE)のタンデムリピートと ABA responsive element (ABRE)が存在するが、*osr8* のプロモーター領域(Pro-*osr8*)には DRE、ABRE のいずれも存在しないことが明らかになった。両遺伝子の低温並びに他のストレスに対する応答性の違い(1999年植物生理学会年会)はプロモーター領域の構造の違いに起因するものと思われる。今回我々は *blt101* のプロモーター領域(Pro-*blt101*)を単離し、Pro-*wpi6* と比較した。Dot Matrix 解析の結果、両プロモーター配列はよく保存されていたが、Pro-*blt101* には 641bp の挿入配列(Insertion-like sequence in Pro-*blt101*; IPB101)がプロモーター中の DRE と ABRE との間に存在することが明らかになった。サザン解析の結果から、オオムギのゲノムにはこの IPB101 と相同な塩基配列が多数存在するものと思われる。IPB101 の存在が *blt101* の発現誘導に及ぼす影響の可能性について、オオムギ幼苗の ABA および乾燥に対する応答性をノーザンハイブリダイゼーションにより解析中である。加えて我々は Pro-*wpi6* 中の DRE、ABRE に結合するトランス因子の単離も試みている。

1pC14

コムギのフルクタン代謝関連遺伝子の酵素機能及び

ハードニング中の発現解析

川上顕、吉田みどり(農水省、北海道農試)

フルクタンは主にユリ科、キク科、イネ科においてデンプンに代わる液胞の貯蔵多糖で、種々のストレスに浸透圧調節剤として関わっていることが報告されている。コムギ品種においてはハードニング中のフルクタンの蓄積量とその耐凍性に相関するのみならず、雪腐病抵抗性にも強く関わっている。我々は、コムギからフルクタン代謝に関わる遺伝子の単離を試み、オオムギの6-SFT (sucrose: fructan 6-fructosyltransferase) 相同遺伝子とサトウキビInvertase相同遺伝子を単離した(植物生理学会、1999)。フルクタン合成植物において、フルクタン合成酵素類とInvertaseは構造および触媒反応が似通うことが報告されているため、これらの遺伝子を組み込んだ酵母によって両酵素を生産し酵素反応を調べた結果、単離された2つの遺伝子はそれぞれSFTとSST (sucrose: sucrose fructosyltransferase)であると推定された。この2つのcDNAの特異的な配列をプローブとして、自然条件下でハードニングしたコムギ6品種についてノーザン解析を行ったところ、両遺伝子ともハードニング中に強く誘導され、その発現量はフルクタン蓄積量の多い雪腐病抵抗性品種においてより高かった。

1pC15

コムギ低温誘導性遺伝子 *wcor14* の単離

大野良子¹、Sergei Tsvetanov¹、津田加奈子¹、宅見薫雄¹、森直樹¹、Atanas Atanassov²、中村千春¹(¹神戸大・自然科学、²IGE、ブルガリア)

低温処理を行った極耐冷凍性パンコムギ品種'Mironovska 808'から作製したcDNAライブラリーを用いて、オオムギの低温及び光誘導性遺伝子 *cor14b* をプローブにスクリーニングを行い、パンコムギの低温誘導性遺伝子(*wcor14a*, *wcor14b*)を単離した。*wcor14a* は、140 アミノ酸残基からなる酸性(pI=4.71)タンパク質(WCOR14a, 13.5kDa)をコードしており、N末端に51アミノ酸からなる葉緑体トランジットペプチドを持つと推定された。WCOR14a はオオムギの COR14b と 70%の同源性を示した。*wcor14b* にはコーディング領域中に塩基置換と欠出があった。RACE PCR により *wcor14* に由来する異なるタイプの転写物が同定された。*wcor14a* cDNA をプローブにしたゲノミックサザン及びゲノミック PCR 分析の結果から、*wcor14a* と高い同源性を示す遺伝子は、パンコムギゲノム中に少なくとも3コピーあることが示唆された。そのうち2つは長さの異なるイントロンを含んでいた。ノーザン分析の結果、*wcor14* は NaCl、脱水及び ABA によっては誘導されず、低温によってのみ発現が誘導されることが明らかになった。

1pC16

コムギ低温誘導性遺伝子 *Wrab* ファミリーの単離

津田加奈子、セルゲイ ツベタノフ、大野良子、宅見薫雄、森直樹、中村千春(神戸大・自然科学)

ABA 及びストレス誘導性オオムギcDNAクローン *HVA1* をプローブとして、低温順化後の冬コムギ品種 'Mironovska 808' から作成したcDNAライブラリーよりコムギcDNAクローン *Wrab1* を単離した。さらに、*Wrab1* をプローブに用いて同じライブラリーから独立なcDNAクローン *Wrab2* を単離した。*Wrab1* は塩基性 (pI=10.3) で親水性の117アミノ酸残基(WRAB1, 18.5 kDa)をコードするORFを含むと推定された。*Wrab2* は酸性 (pI=4.6-4.7) であり疎水性の167アミノ酸残基(WRAB2, 17 kDa)をコードするORFを含むと推定された。WRAB1 と WRAB2 は LEA グループ3に属した。*Wrab1* と *Wrab2* のmRNA レベルは低温、ABA、GA₃ 処理によって増加した。*Wrab* ファミリーはコムギゲノム中で多コピー存在し、*Wrab1* のうち1コピーは第1同祖群染色体に座落することがわかった。

1pC17

アブシジン酸誘導性タウマチン様タンパク質の機能解析

桑原 慎子、荒川 圭太、竹澤 大輔、
藤川 清三（北大・低温研）

冬の間、越冬性イネ科植物などは凍結ストレスのほか病原菌の感染にもさらされる。演者らは、これまでに冬小麦培養細胞 (*Triticum aestivum* L. cv. Chihokukomugi) から、ABA 誘導性タウマチン様タンパク質 (WAS-3a) の cDNA を単離し、mRNA 発現量が、冬小麦実生において ABA 処理や低温順化によって増加することを確認した。タウマチン様タンパク質には抗菌活性を持つものがあることから、WAS-3a は冬季における病原菌抵抗性に関与することが期待された。そこで、WAS-3a が実際にどのような働きをしているのかを検討するため、春小麦培養細胞 HY-1 に WAS-3a cDNA を導入し、大量生産を試みた。春小麦培養細胞によって生産された分泌性 WAS-3a を陽イオン交換カラムを用いて精製し、単離された WAS-3a について、糸状菌 (*Fusarium oxysporum*、*Alternaria brassicicola*、*Pythium irregulare*、*Typhula ishikariensis*、*Typhula incarnata*) に対する抗菌活性を検定した。

1pC18

小麦由来のパラクマル酸による氷核活性細菌の不活性化

大平万里、星野保、吉田みどり¹、神繁樹¹、津田栄、扇谷悟、石崎紘三（通産省北海道工業技術研究所、¹農水省北海道農業試験場）

植物のアポプラストは、外部環境と細胞との接点として、近年その重要性が注目されている。我々は、小麦由来のアポプラスト画分から不凍タンパク質も含む不凍物質を検索している。

その過程で、小麦の低温処理によってアポプラスト画分のフェノール化合物濃度、特にパラクマル酸が増大することを見いだした。そこで、パラクマル酸の不凍活性を調べたところ、パラクマル酸溶液の凝固点は、過冷却を含めた測定方法によれば、コントロールの緩衝液に比べて-3.5℃ほど低下した。しかし、オスモメーターによって測定した、過冷却を含まない凝固点はコントロールと変わらなかった。またパラクマル酸は、氷核細菌による凍結促進作用（氷核活性）を明らかに不活性化させた。しかしヨウ化銀による氷核活性を不活性化することはなかった。さらに氷結晶の形態も、不凍タンパク質のようにくさび形にはならなかった。すなわち、パラクマル酸は、不凍タンパク質とは違ったメカニズムで凍結を制御し、氷核細菌の氷核活性を特異的に不活性化している可能性がある。

パラクマル酸は植物の二次代謝において重要な中間産物である。そこで、代謝経路上で近縁の類似化合物が氷核活性を不活性化するか調べた。フェルラ酸、コーヒー酸は氷核活性を不活性化したが、チロシンは不活性化することはなかった。また、興味深いことにパラクマル酸の異性体であるオルトクマル酸では、不活性の効果が半減した。

以上の結果から、アポプラストに蓄積するフェノール化合物は、氷核細菌などによるアポプラストの凍結を制御している可能性があり、植物の低温適応機構に新たな視点を与えるものも期待している。

2aC01

不凍 (Antifreeze) 活性測定法の比較

石川雅也、村本 彩、西尾直美（農水省・生物研）

不凍活性は北極や南極の魚類の血液、越冬昆虫の体液等にあることが知られている。最近になって、低温馴化した数種の植物の apoplast にも不凍活性の存在が報告されている。これまで、活性の測定方法としては微量融点測定装置を用いた、氷の結晶の生長動向を基に活性を測定していることが多いが、この方法はどちらかというと定性的な方法である。

私たちは氷結晶の再結晶の阻止能力に基づいた新しい不凍活性測定法を開発したので、魚の不凍タンパク質を用いて、従前の方法との比較してみた。不凍タンパク質存在下では氷の結晶の微細構造が -10℃ ~ -25℃ に長期間においても保存されていたが、非存在下では、氷の結晶の微細構造は失われ、大きな氷柱状の結晶に生長していた。本方法を用いた植物の不凍活性の測定についても報告する予定である。

2aC02

温度低下にともなう植物体のしおれの発生機構
村井麻理、石川淳子、塩谷康生、小沢聖（東北農試）

本研究では、低温感受性の異なる数種の植物（ソラマメ、インゲン、コマツナなど）を用いて、温度低下にともなう植物体のしおれの発生機構を、吸水能力と気孔開閉機能の両面から解析した。

地上部のみを冷却した場合は、いずれの植物種においてもしおれはみられないが、地下部を冷却すると低温処理開始 10 分後から葉のしおれが観察されるとともに、吸水速度が著しく低下した（インゲンでは根圏温度を 25℃ から 1℃ に低下させると吸水速度は 1/3 に低下）。一方、気孔開閉機能には植物種により特徴的な温度反応がみられた。低温感受性植物であるインゲンにおいては、葉からの脱水がすすんでも低温 (5℃) では気孔コンダクタンスの低下が抑制されるが、コマツナでは気孔反応の温度条件による違いは認められなかった。

これらの結果から、低温による植物体のしおれの主因は根圏温度の低下による吸水速度低下にあり、植物種によっては低温での気孔閉鎖の遅れがしおれを加速させるということが示唆された。現在、根の皮層組織から単離したプロトプラストを用いて、細胞の水透過性と低温との関係について検討を進めている。

2aC03

作物幼苗の低温感受性の日周変化

石川 淳子、村井 麻里、山口 知哉、北川 良親¹、小池 説夫（農水省・東北農試、¹秋田県立大学附属生物工学研究所）

12時間明期/暗期の条件で生育させたイネ・绿豆・アズキの幼苗では、低温処理（4℃・暗黒・湿度100%）開始時刻によって処理終了後の常温でのしおれの程度が大きく変動した。明期終了時から低温処理を開始した幼苗はしおれの程度が小さかったが、暗期終了時から低温処理を開始した幼苗は最もしおれの程度が大きかった。根部を25℃に暖めて地上部のみを低温処理すると、暗期終了時の幼苗でのしおれは軽減された。

低温処理終了後のイネ幼苗根からの分泌液量は明期終了時の幼苗では増加したが、暗期終了時の幼苗では増加しなかった。また低温処理直前に100μM塩化水銀で根を20分間処理した結果、明期終了時と暗期終了時どちらのイネ幼苗も低温処理後のしおれは助長され、暗期終了時の幼苗で特に顕著であった。

明暗日周による低温感受性の変化は、低温によって幼苗根の吸水機能がどの程度障害を受けるのかによると考えられた。現在、根の水チャンネルとの関係について検討をすすめている。

2aC04

ジャガイモ塊茎の低温貯蔵における増糖機構の解析
遠藤千絵、川口健太郎、森元幸（農水省・北海道農試）

ジャガイモ塊茎は低温貯蔵すると一般に還元糖が増加するが、増加程度には品種間差がある。本研究では、強い難糖化性を有する系統や、還元糖ではなくスクロースを特異的に集積する品種等、6品種を用いて、貯蔵中（20℃/4℃、湿度90%、暗所）の糖変動メカニズムを解析した。

20℃貯蔵はいずれの品種もグルコース、フラクトース、スクロースとも低く推移したが、4℃貯蔵では、糖変動は①還元糖増加型、②糖量低推移型、③スクロース増加型の3タイプに分かれた。①では貯蔵開始後、スクロースが急激に増加、2週間後にピークとなり、その後徐々に減少した。グルコースとフラクトースはスクロースより遅れて増加し始め、8週間後までは顕著に増加、その後も緩やかに増加し続けた。②では、グルコース、フラクトース量の増加は①より約1/6低く推移した。③では、スクロース量は2週間後以降も増加し続け、250日後には①②の6倍に達した。グルコース、フラクトース量は②と同様に低く推移した。①では、酸性イソマルターゼ活性が貯蔵1週間後以降増加したが、②③では、活性はきわめて低かったことから、低温貯蔵中の還元糖の増加には本酵素の活性の有無が関与することが示唆された。また、スクロース酸シターゼ活性は①③で高く推移し、アミラーゼ活性は①②③とも貯蔵1週間後までの急激な増加の後減少、その後低く推移した。これら酵素活性の調節機構と糖変動との関連について考察する。

2aC05

Analysis of the role of RcaE during complementary chromatic adaptation in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*.

Kazuki TERAUCHI, David M. KEHOE, Dept. Biol., Indiana Univ., Bloomington, IN 47405, USA

The cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* shows complementary chromatic adaptation (CCA). The gene *rcaE* complemented the black mutant **FdBk**. The amino-terminal half of RcaE contains a region similar to the tetrapyrrole chromophore binding domains of the phytochromes, including a cysteine (C) at position 198 that is in a similar location to the C used in phytochromes for the covalent attachment of the bilin chromophore. RcaE is proposed to act as a photoreceptor controlling CCA.

We used zinc blots to examine RcaE isolated from *F. diplosiphon* for the presence of a covalently attached chromophore. RcaE covalently associates with a tetrapyrrole chromophore *in vivo*. Mutagenesis of C198 to alanine (A) results in loss of chromophore attachment.

We examined the ability of RcaE/C198A to functionally complement **FdBk**. RcaE/C198A restored CCA in red light, but not in green light. These data suggest that another, red light absorbing chromophore may be involved in regulating CCA.

RcaE was overexpressed in both *F. diplosiphon* and *E. coli*. We are currently determining the structure of the tetrapyrrole of RcaE.

2aC06

Trihelix構造を有する新規遺伝子の性状解析

村田 純、高瀬尚文、平塚和之（奈良先端大・バイオ）

GTボックス結合タンパク質は植物固有のDNA結合モチーフであるtrihelixを有し、光、病原など様々なシグナル応答性遺伝子のプロモーター領域へ結合する。なかでもGT-1は代表的な光応答性シス因子、boxII配列へ結合するため、光応答性の転写制御機構において重要な因子であると考えられている。我々は現在までにGT-1と高い相同性を有する二つの新規なGTボックス結合タンパク質をクローニングし、各々GTR1、GTR2と命名した。GTR1及びGTR2の組換えタンパク質はboxIIをはじめとするGTボックスへ結合し、GT-1と類似するものの異なる配列特異性を示した。またGTR1、GTR2とGFPとの融合タンパク質はタマネギの表皮細胞において核へ局在を示した。さらに35S-GTR1及び35S-GT-1をエフェクター、4×boxII-35S(-46)-luciferaseをレポーターに用いたtransient assayの結果からGT-1及びGTR1はboxIIを介した転写調節に関与することが示唆された。

2aC07

トウモロコシの転写因子 Dof1 のターゲット遺伝子と機能ドメインの解析

柳澤修二 (東大院・総合文化・生命)

Dof タンパク質は AAAG 配列を認識する Dof DNA 結合ドメインを共有するタンパク質であり、植物に特異的な転写因子群である(1,2)。238 個のアミノ酸からなるトウモロコシの Dof1 は最初に同定された Dof タンパク質であり、緑葉と黄化葉から調製したプロトプラスト中で違ったように転写を促進する。Dof1 はプロトプラスト内で C4 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(C4PEPC)遺伝子プロモーターの活性を促進することから、Dof1 のターゲット遺伝子の一つは C4PEPC ではないかと推察していた(3)。今回、Dof1 のアンチセンス RNA を発現するプラスミドを用いた cotransfection 実験により、C4PEPC を含む幾つかの炭素代謝に関わる酵素の遺伝子が Dof1 のターゲット遺伝子であることが示唆された。さらに、Dof ドメイン(46-98 a.a.) だけで二つのプロトプラスト内で異なる活性を示す DNA 結合ドメインとして機能できることが示唆され、C-末端領域(175-238 a.a.)は分割不可能な一つの転写促進ドメインであり、塩基性領域(120-129 a.a.)は核移行シグナルとして十分であることが明らかとなった。(1) Yanagisawa (1996) Trends Plant Sci., 1, 213-214. (2) Yanagisawa & Schmidt (1999) Plant J., 17, 209-214. (3) Yanagisawa & Sheen (1999) Plant Cell, 10, 75-89.

2aC08

フタバネゼニゴケ配偶体におけるプロトクロロフィリド還元酵素遺伝子の発現様式

江口幸栄子, 上田玲子, 小野莞爾, 滝尾進 (熊本大・理・生物学)

プロトクロロフィリドからクロロフィリドへの還元反応は、反応に光のエネルギーを必要とする核ゲノム由来のPORか、または、必要としない葉緑体ゲノム由来のChlL,N,B複合体によって触媒される。フタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea* var. *diptera*)の再分化能をもつ培養細胞では、*por*と*chlL/N/B*がどちらも光依存的に発現した。この性質は暗所で長期間継代培養した有機栄養細胞で見いだされていたが、親植物については未検討であった。本研究は、この問題を明らかにするため、連続明所で育成した配偶体を暗所に移し、さらに明所に戻した時の*por*と*chlL*の発現レベルを調べ、次の結果を得た。1) *por*の転写レベルは暗所で著しく低下し、明所に移すと回復した。2) *chlL*の転写レベルは暗所で上昇した。3) 光独立栄養細胞でも同様の発現パターンが観察された。4) 明所で継代維持されていた有機栄養細胞では、*por*の転写レベルは暗所で若干低下するが*chlL*のレベルは変化しなかった。以上の結果から、配偶体では*por*と*chlL*は異なる発現調節を受け、その発現パターンは光独立栄養細胞でもみられることが明らかになった。

2aC09

苔類フタバネゼニゴケのプロトクロロフィリド還元酵素遺伝子の光による発現制御

鈴木崇紀, 松崎雅広, 山本勇, 滝尾進¹, 佐藤敏生
(¹広島大・理・生物科学,²熊本大・理・生物科学)

プロトクロロフィリド還元酵素は、その触媒反応がクロロフィル合成のキーステップであるため、植物の緑化過程において重要な役割を担う。この酵素には、光依存型(LPOR)と光非依存型(DPOR)があり、LPOR遺伝子の発現は、光やホルモンによって複雑に制御されることが知られているが、DPOR遺伝子の発現制御機構の解析はほとんど進んでいない。

私達は、苔類フタバネゼニゴケの培養細胞から、クロロフィル量が暗所で1/10に低下する黄色株と明暗で一定の緑色株を分離している。緑色株は、一部の光合成遺伝子群の光応答性が無く、再分化能がないことから、光情報伝達経路の一部を欠いた変異株であると考えている。私達は、黄色株におけるDPOR遺伝子の発現が暗所で抑制され、両株のクロロフィル量の差が生じることを見出した。そこで、光によるDPOR遺伝子の発現制御機構を解明するために、その光情報伝達がどのような経路によって行われるかを解析した。黄色株における単色光照射実験の結果、DPOR遺伝子の発現制御にフィトクロムが関与することが示唆された。

2aC10

アカバンカビにおけるNDPキナーゼを介した光信号伝達系の遺伝的解析

小倉康裕, 吉田雄介, 矢部尚登, 蓮沼仰嗣
(横浜市大・木原生研・総合理学)

アカバンカビの菌糸の粗膜分画を用いて*in vitro*で青色光照射することにより15kDaタンパク質のリン酸化の上昇が見られた。15kDaタンパク質は精製され、NDPキナーゼであることが判明し、NDK-1と名付けられた。NDK-1は i)NTPのγ位のリン酸転移活性, ii)自己リン酸化活性, iii)タンパク質キナーゼ活性が存在した。iii)のKm値は360μMであった。NDK-1は部分アミノ酸配列が決定され、そのcDNANDK-1がクローニングされた。さらにNDK-1が全くリン酸化されない*psp*変異株が単離され、子嚢殻の極性(ピークの形成される位置)の光誘導に欠損が見られた。*psp*はNDK-1のmRNAは正常に発現するが、そのタンパク質は減少していた。RT-PCRによりNDK-1cDNAを単離し、塩基配列を決定すると*psp*はNDK-1 Pro72His変異を含んでいた。HisタグNDK-1, HisタグNDK-1Pro72Hisを大腸菌内で発現し、精製し、上記i), ii), iii)を比較検討した。HisタグNDK-1Pro72Hisはii), iii)の活性が著しく低下していた。*psp*にNDK-1cDNAおよびゲノムDNAを導入した。これらの導入株は子嚢殻の極性の光誘導が野生型に戻っていた。

2aC11

光依存的に胚軸伸長を抑制する優性突然変異体の解析

中澤美紀、三浦聖子、藤岡生子、矢部尚登¹、蓮沼仰嗣¹、松井南（理研・植物ゲノム・変異探索、¹横浜市大・木原生研）

我々は、カリフラワーモザイクウイルス35Sエンハンサーを組み込んだベクターpPCVICEn4HPTを用いて作成したアクティベーションタグライン（Lerバックグラウンド）1200ラインを赤色光、近赤外光、青色光の下で選抜し、いずれの光の下でも胚軸の伸長が抑制される変異体を得た。この変異体は光条件下では極端な矮性を示すが暗黒下では野生型と変わらない表現型を示したことから*dwarf in light 1(dfl1)*と名付けた。光条件下での*dfl1*の矮化は細胞が小さくなっていることに起因していた。また、ロゼット葉の上偏生長、側根形成の減少、根の重力屈性の異常が見られた。*dfl1*は優性変異であり、35SエンハンサーによってT-DNA挿入部位近傍の遺伝子発現が上昇していることが変異の原因と考えられたためプラスミドレスキューによってT-DNAの挿入部位近傍の遺伝子をクローニングし解析を行った。

2aC12

イネ葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの光に対する発現応答

森田重人^{1,2}、小谷忠明¹、上中弘典¹、増村威宏^{1,2}、田中国介^{1,2}（¹京都府大・農・生資化、²京都府農資センター）

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）は過酸化水素を消去する酵素であり、葉緑体での酸素ストレスの防御に不可欠である。今回イネ芽生えにおける葉緑体型APXの発現をNorthern blotにより調べた。葉緑体型APXアイソザイムのうちチラコイド膜結合型は主に緑色組織で発現しているのに対し、ストロマ型APXは根において強く発現していた。またイネ黄化葉に光照射を行い、光に対する発現応答を調べたところ、チラコイド型APXは緑化初期から緑化24時間まで継続して著しく誘導された。一方、ストロマ型APXおよび葉緑体型CuZn-SOD、*rbcS*遺伝子は緑化4時間までの初期段階で誘導されその後は顕著な誘導はみられなかった。これらの結果から、葉緑体内の過酸化水素消去は主にチラコイド型APXによって行われていることが示唆された。また電子伝達阻害剤であるDCMUおよびDBMIBで処理したところ、チラコイド型APXの発現はDCMUにより抑制されたが、DBMIBには影響されなかった。このことから、チラコイド型APXの発現はプラストキノンの酸化還元状態により調節されていることが示唆された。

2aC13

光と糖により発現が促進される新奇の受容体型キナーゼ遺伝子

中村賢志、田中慎一郎、望月伸悦、長谷あきら（京大・理・植物）

シロイヌナズナのプロモータートラップラインから光により迅速にレポーター遺伝子の発現が上昇する系統を探索し、INRAが作出した系統からN27系統を再単離した。N27系統では、光あるいは糖により胚軸においてレポーター遺伝子の発現が上昇したそこでこの系統に関してさらに詳しく解析した。

タグされた遺伝子のクローニングを行ったところ新奇の受容体型キナーゼの上流域にT-DNAの挿入が見いだされた。RT-PCRを用いてこの遺伝子の発現解析を行ったところ、野生株ではN27系統におけるレポーター遺伝子の発現様式と一致し、またフィトクロムA欠損変異体では発現が減少していた。さらにN27系統では発現量が低下していた。現在、N27系統を用いてトラップされた遺伝子の機能を解析中である。

2pC01

オオセキシヨウモ表皮細胞における細胞質顆粒のアジテイションのII型フィトクロムによる制御と細胞自律性

高木慎吾、峰雪芳宣¹、古谷雅樹²（大阪大院・理・生物、¹広島大・理・生物、²日立基礎研）

赤外線顕微鏡とデジタル動画画像解析とを用いて、淡水産単子葉植物オオセキシヨウモ (*Vallisneria spiralis*) の葉の表皮細胞における細胞質顆粒のアジテイション（短距離の無方向性の運動）について定量的解析を行なった。細胞の暗順応にともなってアジテイションのレベルは一定の値にまで減衰するが、サイトカラシンB処理によってさらに減少した。暗順応後の細胞に 10^{-10} mole m⁻² の赤色光を照射すると、アジテイションは数秒間以内に促進され、赤色光の作用は近赤外光によって可逆的に打ち消された。必要光量および光可逆性から、この反応は、II型フィトクロムによって制御される非常に速い反応であると考えられる¹⁾。また、サイトカラシンB処理後の細胞では、赤色光によるアジテイションの促進はまったく起こらなかった。顕微照射装置²⁾を使って単一細胞を照射すると、アジテイションの促進は照射された細胞内だけで起こった。促進されたアジテイションのレベルは数分後には暗順応レベルに戻り、赤色光の作用は隣り合う細胞には伝わらなかった。

1) M. Furuya (1993) Ann. Rev. Pl. Phys. Pl. Mol. Biol. 44: 617-645.

2) F. Bischoff et al. (1997) The Plant J. 12: 839-849.

2pC02

Photomorphogenic signal alters organ specific expression of *IAA3/SHY2* gene of *Arabidopsis*

Byung Chul Kim^{*,}, Moon Soo Soh^{**,}, Sung Hyun Hong^{*,}, Masaki Furuya^{*,}, Hong Gil Nam^{**}

^{*}Hitachi Advanced Research Laboratory, Hitachi Ltd., Hatoyama, Saitama, 350-0395, Japan; ^{**}Department of Life Science and School of Environmental Engineering, Pohang University of Science and Technology, Hyoja-Dong, Pohang, Kyungbuk, 790-784, Korea; ^{*}These authors have contributed equally to this work and listed alphabetically.

Plants have evolved with a unique ability to interpret light information for adaptive developmental decisions. In the process, light signals should be integrated with intrinsic developmental signals such as plant hormones to specify a proper developmental program. *Shy2-1D*, a dominant gain of function mutation in *Arabidopsis*, confers various light-responsive developmental features in the absence of light and was suggested to have a critical function in controlling light-dependent development¹. In addition, the mutation alters various responses to a plant hormone, auxin. The mutation is due to an amino acid change in the conserved domain II of the *IAA3* genes that were suggested to function as transcriptional regulators in auxin response^{2,3}. Here, we show that the gene is distinctively regulated by light as well as by auxin. *IAA3/SHY2* expression was induced in the cotyledon but was reduced in the hypocotyl by light, providing a possible explanation on how light exerts the opposing effect on the growth of these organs. The results suggest that the *IAA3/SHY2* gene is involved in integrating light signals into auxin-mediated developmental responses.

1. Kim, B.C. et al. (1998) *Plant J* 15, 61-8.
2. Tian, Q and Reed, JW (1999) *Development* 126, 711-21
3. Soh, M.S. et al. (1999) *J Plant Biol.* 42, 239-46

2pC03

フィトクロムAを介するHIRの素過程にみられる光可逆的制御

篠村知子、内田憲孝、古谷雅樹（日立基礎研究所）

フィトクロムA(PhyA)は、近赤外光(FR)の連続照射によって引き起こされるHIRを誘導する¹。そのような光条件下ではほとんどのPhyA分子はP_r型として存在しており、PhyAがどのような仕組みでFRを捕獲して反応を誘導するのか、明らかではなかった。

シロイヌナズナの胚軸伸長の光抑制におけるPhyAによる光捕獲のHIR素過程を解析し、この反応が「FRパルスの繰返し照射」により誘導されることをすでに報告した²。この光照射方法を用いて測定した作用スペクトルは、PhyAのP_r型の吸収スペクトルとよく一致する結果を見出した。赤色光(R, 550~667nm)パルス光の繰返し照射は、この反応の誘導には有効ではなかった。一方、FRの繰返し照射の直後に毎回R照射を行なうと、FR照射の効果は完全に打ち消されることがわかった。これらの結果から、暗所で生合成されたP_r型も光変換されたP_{fr}型もこの反応を誘導する生理活性は持たないこと、FRを吸収してP_{fr}型がP_r型へ光変換する際に短寿命のPhyAシグナルが生じることが示唆された。すなわち、PhyAを介するHIRを誘導するための光捕獲機構は、PhyAを介するVLFRやPhyBを介するLFRを誘導するための光捕獲機構とは全く異なることが明らかになった。

1. Quail et al., 1988, *Science* 268: 675-680
2. Shinomura et al., 1988, *Plant Cell Physiol.* 39 suppl.: 149

2pC04

PHOTOINDUCED INTRACELLULAR REDISTRIBUTION OF PHYTOCHROME A *IN VIVO*

Akiko HISADA, Hiroko HANZAWA, James L. WELLER¹, Akira NAGATAN², James B. REID¹, Masaki FURUYA, Hitachi Adv. Res. Lab., Saitama 350-0395, ¹School of Plant Science, Univ. of Tasmania, Tasmania 7001, Australia, ²Dept. Botany, Kyoto Univ., Kyoto 606-8502

We have established a method for detecting phytochrome A apoprotein (PHYA)-specific immunosignal in cryosections of etiolated pea seedlings, using PHYA-deficient *fun1* mutants as negative controls. In etiolated apical hook cells, immuno-signal of PHYA showed cytosolic distribution. However, when etiolated seedlings were exposed to continuous red light (cR) or far-red light (cFR), the immuno-signal appeared in the nucleus, time being. The nuclear accumulation becomes maximal within 0.5 hr of cR. In contrast, under cFR it is essentially complete after 4.5 hr and continued gradually for 12 hr. During this time, levels of spectrophotometrically- and immunoblot-detectable phytochrome A did not change significantly under cFR whereas they became undetectable after 4.5 hr of cR. This is the first immunological evidence indicating that native PHYA is redistributed to the nucleus in response to irradiation with cR or cFR and decay under cR.

2pC05

発色団テトラピロールのA~D環各側鎖がフィトクロムBアポ蛋白質との結合および光可逆的吸収変化に及ぼす役割

半澤宏子、猪股勝彦¹、木下英樹¹、垣内貴司¹、澤本大介¹、太田敦子¹、中村洋¹、内田憲孝、和田敬四郎¹、古谷雅樹（日立・基礎研、金沢大院・自然科学¹）

フィトクロムは発色団として開環状テトラピロールを1分子持つ色素蛋白である。本研究では、有機合成した発色団を、酵母を宿主として発現したシロイヌナズナのフィトクロムBアポ蛋白質(PHYB)と試験管内で再構成を行い、発色団の結合およびフィトクロムBホロ蛋白質(PhyB)の光可逆的吸収変化に対するテトラピロールA-D各環の役割を解析した。天然型フィコシアノビルン(PCB)およびPCB誘導体全24種類について再構成を行った結果、テトラピロールのA-D環はそれぞれ異なる役割をPHYBとの相互作用において果たしていることが初めて分かった。A環3位の側鎖中の二重結合に水素残基を付加した発色団ではPHYBとの結合が完全に阻害された。B環8位およびC環12位のカルボキシル基を位置選択的にモノメチルエステル化するとPHYBとの結合効率が低下した。これらのことから発色団とPHYBの結合は、従来言われていたようにA環3位で共有結合するばかりでなく、B環8位およびC環12位のカルボキシル基が積極的にアポ蛋白質と相互作用して起こることが示唆された。また、D環側鎖の長さを段階的に長くするのに従って光変換が阻害された。このことから、D環側鎖の構造が、PhyB分子の光変換に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2pC06

イネ芽ばえの光屈性：その性質と突然変異体の分離
飯野盛利, Ralf Neumann (大阪市大院・理・付属植物園)

連続赤色光下で育てたイネ(品種: ニホンマサリ)の芽ばえを用いて光屈性の性質を調べた。青色光を一側面から照射すると幼葉鞘は正の光屈性を示し、パルス照射で誘導される一次光屈性と二次光屈性、及び照射時間に依存して誘導される時間依存光屈性がトウモロコシ幼葉鞘の場合と同様に観測された。ただし、最終的な屈曲反応はトウモロコシなどと比較すると小さかった。一方向から照射し続けると、重力屈性との拮抗によって、幼葉鞘は一定の屈曲角度を保った。この平衡角度から光強度-反応曲線を求めると、反応は光強度の上昇とともに増大し、強い光強度で減少するのが観測された。根は負の光屈性を示し、連続照射下では幼葉鞘と同様の光強度依存性を示した。

連続照射で達成される平衡角度を指標にして、 γ 線で突然変異を誘発したイネの M2 芽ばえから、光屈性の突然変異体を選抜した。その結果、幼葉鞘が全く光屈性を示さない突然変異体 (*cpt1: coleoptile phototropism 1*) を分離することができた。この突然変異体では根の光屈性も異常であった。ただし、幼葉鞘とは異なり、僅かながら光屈性を示した。突然変異体は幼葉鞘、根ともに正常に成長し、それらの重力屈性も正常であった。また、根の先端部で観測される回旋運動も正常であった。ライフサイクルを通してみても、正常系統との差異は認められなかった。現在、原因遺伝子を同定する研究を進めている。

2pC07

フィトクロム依存の光-成長反応が欠損したイネ突然変異体の分離と解析

Kamal K. Biswas, Ralf Neumann, 飯野盛利 (大阪市大院・理・付属植物園)

Mutants of rice (*Oryza sativa* L., cv. Nihonmasari) that have long coleoptiles under white light irradiation have been isolated from γ ray-treated M2 seedlings. One of them (*cpm1: coleoptile photomorphogenesis 1*) has been found defective in phytochrome-mediated growth inhibition. The mutant shows normal coleoptile growth in total darkness and humid air. In the normal strain, the coleoptile growth is strongly inhibited by a pulse of red light. This inhibition is comprised of a very-low-fluence response (that can also be induced by FR) and a low-fluence response (that can be reversed by FR). A large part of either response is lost in the mutant. FR-HIR is also impaired in the mutant. Under natural growth conditions, the mutant has long internodes and filaments, but leaf greening and photoperiodism are normal. The mutant coleoptile has the normal level of spectrophotometrically detectable phytochrome. The mutated gene appears to encode a protein that occurs downstream of phytochromes and functions specifically in growth inhibition.

2pC08

イネ幼葉鞘の回旋運動と光屈性に対するフィトクロムの作用

吉原 毅, 飯野盛利 (大阪市大院・理・付属植物園)

イネ(ニホンマサリ)の芽ばえを暗黒下、気中で育てると、その幼葉鞘は顕著な回旋運動(反時計回り、周期約3時間)を示した。その回旋運動は短時間(3分)の赤色光照射により抑制され、赤色光照射から3時間の時点で幼葉鞘はほぼ直立した。この赤色光効果には、近赤外光でも誘導できる very-low-fluence response (VLFR) と近赤外光で打ち消される low-fluence response (LFR) の二つが同程度関与することが分かった。また、その効果は、*cpm1* 変異により大きく損なわれた。なお、水中で育てた幼葉鞘は暗黒条件であっても回旋運動をほとんど示さなかった。

我々はトウモロコシ幼葉鞘が光屈性(照射時間依存光屈性)を示す能力はフィトクロムの制御を受けていることを既に報告した(Liu & Iino 1996)。今回、イネ幼葉鞘の光屈性も同様にフィトクロムによって制御されていることを明らかにした。暗黒下で育てた幼葉鞘は青色光を15分照射しても光屈性をほとんど示さない。しかし赤色光を短時間照射すると、青色光を受容して光屈性を生じる能力が約30分で発現し始め、約90分で最大に達することが分かった。この現象は気中で育てた幼葉鞘でも観測されたが、回旋運動を示さない水中培養の幼葉鞘を用いて、より明確にすることができた。また、LFRが主要な反応成分であることも分かった。

2pC09

二量体化領域に変異を導入したフィトクロム A の生理活性

小鍛治敏生, 望月伸悦, *Seong Hee Booh, *Pill-Soon Song, 長谷あきら (京大・理・植物, *Dept. Chemistry, Univ. Nebraska, Lincoln, Nebraska 68588, USA)

フィトクロムは二量体として存在することが知られているが、生理活性に二量体化が必要かどうかは分かっていない。そこで、本研究では、フィトクロム A (phyA) の二量体化領域に変異を導入したコンストラクトを作成し、35S プロモーターの下流につないで、シロイヌナズナの phyA 欠損株に形質転換し生理学的・生化学的解析を行った。

導入した変異 phyA タンパク質の発現を調べたところ、白色光下では野生型より多くのタンパク質の蓄積がみられた。一方、暗黒下では、全長 phyA を導入した植物では野生型と同程度のタンパク質の蓄積がみられたが、変異 phyA を導入した植物では野生型より少なかった。また、近赤外光下における胚軸伸長阻害を観察した結果、全長 phyA を導入した植物では表現型の部分的な回復がみられたが、変異 phyA を導入した植物では表現型の回復はみられなかった。以上の結果からは、表現型が戻らないのは導入タンパク質の発現量が原因なのか、phyA 分子が生理活性を失ったためなのかははっきりとは分からないので、現在、より白色光に近い条件で表現型とタンパク質の発現量を調べている。

2pC10

ホウライシダにおける改変フィトクロム遺伝子の導入とその表現型の解析

河合博子¹、鐘ヶ江健¹、和田正三^{1, 2} (¹ 都立大・院理生物科学、² 基生研・情報制御)

ホウライシダ配偶体においてはこれまで、様々なフィトクロム反応の生理学的解析が行われてきた。また、少なくとも3種のホウライシダフィトクロム遺伝子が単離されており、なかでもPHY3遺伝子は、5'側がフィトクロム発色団結合領域と相同、3'側が高等植物の光屈性の受容体であるNPH1遺伝子と相同、と非常に特異な構造をとっている。

今回我々は、PHY3遺伝子の機能を説明することを目的として、相同組み換えによる遺伝子破壊を試みた。PHY3遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子を挿入した改変遺伝子をパーティクルガン法によりシダ原系体に導入し、その後薬剤耐性によって選抜を行った。

その結果得られた薬剤耐性個体16個体において表現型の解析を行ったところ、それらすべてにおいて赤色光に対する光屈性が欠損していることがわかった。また、赤色光による葉緑体光定位運動にも異常がみられたため、PHY3遺伝子は、これら2つの反応における光受容体遺伝子として機能していることが推察された。

現在これらの薬剤耐性個体について、実際にPHY3遺伝子が破壊されているか否かをPCR法等によって検討している。その結果について報告する予定である。

本研究は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた。

2pC11

イネ・フィトクロムA突然変異体の単離と解析

高野誠、鐘ヶ江弘美、篠村知子¹、廣近洋彦、古谷雅樹¹
(農水省・生物研・分子遺伝、¹ 日立製作所・基礎研)

私たちは、イネの活性型レトロトランスポゾン、*Tos17*の転移を利用して作製した突然変異体集団(ミュータントパネル)から、単子葉類では初めてのフィトクロムA (*phyA*)突然変異体を3系統単離した。いずれも*Tos17*が*PHYA*遺伝子のエクソンに挿入されており、ノザンやウエスタン解析の結果からも、これらが*phyA*の完全突然変異であることが示された。これらの突然変異体の芽生えは近赤外光下と暗黒下で同様の形態を示し、*phyA*を介する近赤外光によるシグナルは伝達されていないことが明らかになった。一方、白色光あるいは赤色光下で育てると正常に生育し、開花時期も含めて対照と異なる表現型は認められなかった。この様な特徴はシロイヌナズナの*phyA*突然変異体と共通しており、*phyA*の普遍的な機能を反映していると考えられる。これに対して、シロイヌナズナでは認められない現象も見つかったので、それらも含めてイネ*phyA*突然変異体の生理学的、分子生物学的解析の結果を報告する。

3aC01

無毛かつアントシアニン高蓄積アラビドプシス突然変異体*pig2*の単離と遺伝学および生理学的解析

市川裕章¹、呉麗華^{1, 2}、田中淳³、田野茂光³、Jeremy Harbinson⁴、中村保典¹、Cathie Martin⁵、宇垣正志^{1, 6} (¹ 農水省・生物研、² 生研機構、³ 原研・環境資源利用研究部、⁴ オランダATO-DLO、⁵ 英国John Innes Centre、⁶ 東大・新領域)

高等植物の光応答反応の分子機構を解明する目的で、光制御を受けるアントシアニン色素合成や胚軸伸長に着目した。アントシアニン色素の蓄積が起こりにくい黄色光連続照射下で色素を高蓄積するアラビドプシス突然変異体をイオンビーム処理したM2世代(約12万個体)より選抜した結果、1系統の変異体が得られた。黄色光照射下で生育した本系統(自殖後代)芽生えは野生型(Col-0)の数倍の色素を蓄積した他、胚軸伸長も抑制されていた。これらの表現型から、本系統は光に対して過敏応答を示す可能性が示唆された。さらにこの変異体ではトライコム(毛)の形成が認められない一方、根毛数は増加していた。そこで本系統を他の無毛突然変異体(*gl1*, *gl2*, *ttg*)と交配して得られたF1個体のトライコムの表現型を観察したところ、本系統の無毛形質は*GL2*遺伝子の変異に由来することが判明した。以上の結果から本系統を*pig2* (*pigment-intensified and glabrous2*)と名付けた。*pig2*系統を白色光照射下かつショ糖を含む培地で生育させると、葉の成熟に伴って退色(黄化)が見られ、葉緑体蛍光強度の画像解析の結果、黄化葉では光合成能(光化学系IIの活性)が低下していた。またこの黄化の過程で、野生型と比較して*pig2*幼植物体はデンプンをより多く蓄積する傾向があることが観察された。これらの多面的な表現型に関する因果関係を解明すべく、特に生理学および(分子)遺伝学的側面からさらに研究を進行中である。

3aC02

無毛かつアントシアニン高蓄積アラビドプシス突然変異体*pig2*における*glabra2*遺伝子座の分子遺伝学的解析

呉麗華^{1, 2}、宇垣正志^{1, 3}、田中淳⁴、田野茂光⁴、Cathie Martin⁵、市川裕章¹ (¹ 農水省・生物研、² 生研機構、³ 東大・新領域、⁴ 原研・環境資源利用研究部、⁵ John Innes Centre)

イオンビーム照射由来アラビドプシス*pig2*突然変異体では、アントシアニン色素の高蓄積、トライコムの消失、根毛数の増加、デンプンの蓄積等の表現型が観察される。本研究の目的はこの*pig2*変異体の表現型と変異遺伝子座のDNA構造との相関関係を明らかにすることである。*pig2*系統の遺伝学的解析により第1染色体上の*GLABRA2* (*GL2*) 遺伝子座の変異が示唆されていることから、まず*GL2* cDNA断片をプローブとしたザザン解析を行った。その結果、*pig2*系統では*GL2*遺伝子領域の分子構造が異常であることが判明した。さらに詳細な分子構造を明らかにするため、PCR法をベースにしたgenome walking法により*pig2*系統*GL2*遺伝子の5'上流ゲノミック配列をクローン化し、塩基配列を決定した結果、*GL2*遺伝子のエクソン1から約50 bp上流域に第3染色体由来の約20 kbの断片の挿入が認められた。また*GL2*遺伝子のRT-PCR解析の結果から、*pig2*変異体の*GL2*遺伝子の転写産物のサイズが野生型のそれとは明確に異なり、その発現量も激減していた。従って*pig2*系統の*GL2*遺伝子座では、DNA断片の転座の結果、*GL2* コーディング配列のごく近傍(5'上流域)にstem-loop構造を取り得る配列の出現や同コーディング領域と本来の*GL2*プロモーターとの物理的隔離が生じ、*GL2*遺伝子の発現に異常をきたしたのと考えられる。さらに*pig2*系統のゲノミックPCR解析により、*GL2*遺伝子の5'上流域に挿入されたDNA断片が本来存在する第3染色体領域においても、DNA欠失と考えられる構造異常が検出された。

3aC03

シスエレメント DE1 を介した光応答性遺伝子発現の制御

稲葉 丈人、永野 幸生、James B. Reid¹、
佐々木 幸子 (名大院・生命農学・生物情報制御、
¹タスマニア大・植物科学)

光応答性 12bp シスエレメントはエンドウ GTPase、*pra2* 遺伝子の 5' 上流域より同定された。今回、我々はこの 12bp シスエレメントがどの光受容体からシグナルを受け取っているか調べた。

まず 12bp をタンデムにつないだコンストラクトを作成してエンドウ上胚軸に導入し、レポーターが暗所で強く発現し様々な光により抑制されること、12bp 上に 3bp の塩基置換を挿入するとこの反応が消失することを明らかにした。レポーターの発現パターンが dark-inducible であることから、このシスエレメントを DE1 と名づけた。エンドウフィトクロム変異株を用い *pra2* の発現を調べたところ、*pra2* タンパク質の発現も様々な光受容体により制御されていることが分かった。さらにフィトクロム A 及び B 変異株を用いたレポーター遺伝子の解析では、その分子種特異的に起こる反応が減少した。このことから DE1 は様々な光受容体からシグナルを受け取っており、また DE1 単独で光応答性を付与するのに十分であることが分かった。

3aC04

高等植物に特有の新規DNA結合タンパク質の解析

古橋寛史、永野幸生、稲葉丈人、佐々木幸子
(名大院、生命農、生物情報制御)

エンドウ *pra2* 遺伝子はフィトクロムを介してその発現が抑制されることがこれまでの解析により既に明らかにされている。今回、この光応答性発現に関与する領域に結合するDNA結合タンパク質の解析を目的とした。

既に同定された *pra2* 光応答性シスエレメントを用いて one-hybrid 法によるスクリーニングを行い、得られた cDNA の塩基配列を決定した。推定されたアミノ酸配列を用いてデータベースを検索したところ、他の植物の未同定配列との相同性が見出された。しかし、植物以外においては相同性を持つものが見出されず、植物に特有の新規DNA結合タンパク質であることが示唆された。そこで、組換え型タンパク質を作成し、これを用いて詳細な解析を進めている。

3aC05

GT-Factor は植物にのみ存在する DNA 結合タンパク質か？

永野幸生 (名大院・生命農学・生物情報制御)

GT 配列は多くの植物遺伝子の発現を調節する重要な配列である。光に応答した遺伝子発現や組織特異的発現への関与がよく研究されている。この GT 配列に結合する DNA 結合タンパク質が GT-Factor である。いくつかの研究から、GT-Factor は「trihelix structure」という構造を持ち、この構造が GT 配列と結合することがわかっている。この GT-Factor は植物にのみ存在すると信じられている。

しかし、GT-Factor は次に述べる点で Myb の DNA 結合領域と非常によく似ている。1) GT-Factor の「trihelix structure」モデルは Myb の DNA 結合領域の NMR 構造とよく一致する。2) Myb の代表的特徴として規則的に並ぶ Trp 残基がよく知られているが、これは GT-Factor にも存在する。3) 繰り返して検索を行う PSI-BLAST を用いると、有意なレベルで GT-Factor と Myb の DNA 結合領域の間に相同性が検出される。

合わせて GT-Factor の進化についても議論する。

3aC06

クロレラのヘキソース取り込みの光阻害

神谷明男 (帝京大・薬・化学)

Chlorella kessleri の野生株、微量のクロロフィルを持つ白色変異体にヘキソースを与えて照射すると、ヘキソースの取り込みが顕著に阻害された。特にグルコース、フルクトースの取り込み阻害が顕著であった。また同じ照射で白色変異体細胞中のクロロフィル類の光破壊が認められた。光によるヘキソース取り込み阻害の作用スペクトルと光破壊されるクロロフィル類の吸収スペクトルはよく似ている。また、窒素相中で照射すると、ヘキソース取り込みの光阻害とクロロフィル類の光破壊は認められない。このことからこの現象に活性酸素の関与が考えられた。

SOD 添加はヘキソース取り込みに影響を与えないが、メチルビオローゲン (パラコート) 添加によりヘキソース取り込みは顕著に阻害された。このとき呼吸の阻害は認められない。このことから照射によりクロロフィル類の光破壊を経て活性酸素によるヘキソース輸送体の機能が傷害を受ける可能性を考えている。

3aC07

キュウリ子葉におけるDNA損傷光修復酵素の性質と光誘導

秦 恵, 芸林 圭¹, 栗原 邦子¹, 竹内 裕一¹
(京都大・エネルギー理工研, ¹北海道東海大・工・生物工)

オゾン層の破壊に伴って増加するB領域紫外線(UV-B)の生物への影響が懸念されている。DNAはUV-B傷害のターゲットであり、主要な損傷産物はピリミジンダイマーである。多くの生物で、ピリミジンダイマーの光修復機構が報告されているが、高等植物においてはこの機構に関与する酵素、DNA損傷光修復酵素(DNA photolyase)の酵素的性質やその誘導機構について不明の点が多い。

われわれは、キュウリの黄化芽生え子葉の光修復酵素の *in vitro* 活性測定法を確立するとともに、酵素の精製を試みた。また、光修復酵素の光による誘導について、基礎生物学研究所大型スペクトログラフを用いて実験を行った。その結果、キュウリの子葉では、ホウキモロコシと同様に、UV-B~UV-A領域の紫外線が酵素活性の誘導に有効であることが明らかになった。

3aC08

キュウリからの光回復酵素 cDNA クローンの単離と発現解析
高橋真哉, 中嶋信美¹, 玉置雅紀¹, 近藤矩朗(東京大・院・理・生物科学, ¹国立環境研)

太陽光中の紫外線により生物体内にシクロブタン型ピリミジン二量体などのDNA損傷物質が生成する。これらの生成・蓄積により生物個体は死に至ることがあるが、生物にはこれを回避するメカニズムとして除去修復や光回復酵素による修復などの修復機構が備わっている。植物では光回復が大きな役割を果たしているが、その遺伝子レベルの解析はシロイヌナズナでしかなされていない。また、光回復酵素活性と紫外線照射による生理的影響との関係についてはほとんど解明されていない。本研究ではキュウリ実生から高等生物型光回復酵素の cDNA クローンを単離し、その発現解析を行った。

12時間日長の人工気象室で栽培したキュウリ第一葉から抽出した total RNA を用いた RT-PCR により cDNA 断片を単離し、その塩基配列を決定した。この情報を元にして新たな primer を作製し、RACE 法によりキュウリ光回復酵素遺伝子の cDNA (*CsPFR*) を得た。このクローンは 480 個のアミノ酸残基より構成されるタンパク質をコードしていると推測された。このアミノ酸配列はシロイヌナズナの光回復酵素のアミノ酸配列と 75% の相同性を持っていた。キュウリ第一葉から抽出した total RNA を用いて定量的 RT-PCR による発現解析を行った。第一葉における *CsPFR* の日周サイクル(明期 6:00~18:00)での発現量を、6:00 から 21:00 まで 3 時間ごとに調べたところ、明期中央(12:00)より前の 9:00 に発現量が最大になり暗期では発現が大きく低下した。*CsPFR* は若い葉ほど発現量が多く、加齢とともに急速に低下していた。

3aC09

イネ(*Oryza sativa* L.)の紫外線UVB誘導-DNA損傷の光修復能誘導の光調節
熊谷忠, 山口弘子, 成日慶, 日出間純(東北大・遺生研)

植物における紫外線 UVB によって生成される DNA 損傷の主な光産物はシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)とピリミジン-(6-4)-ピリミドン[(6-4)-型光産物]である。暗黒で生育したイネ(ササニシキ)の幼少植物では UVB 照射によって生ずる CPD の光修復能は認められない。ところが、暗黒で生育した植物の第3葉に短時間(5 min)の青色光あるいは赤色光を照射した後暗黒に置くと約1時間後には CPD 光修復能が誘導される。この場合、UVB は無効であった。この光誘導効果は青・赤色光照射直後に近赤外光(5 min)を照射すると打ち消されることから、フィトクロームによる光反応によって調節されることを前年度の大会で報告した。本講演では、CPD 光修復能の誘導に及ぼすタンパク合成阻害剤の影響ならびに暗黒で育てたイネ葉の(6-4)-型光産物の光修復能とその光修復能誘導に及ぼす光照射の影響を報告する。

3aC10

紫外線 UVB がイネの葉緑体タンパク質(Rubisco, LHCII)の合成と分解に及ぼす影響について
日出間純, 竹内敦子, 山口琢也, 熊谷忠(東北大・遺生研)

我々は、紫外線 UVB がイネの生育や葉内のタンパク質含量に及ぼす影響、さらには紫外線によって生成する DNA 損傷およびその修復能力とイネの紫外線抵抗性との関連について、解析を行っている。これら一連の研究の中で、UVB 量の増加は、紫外線感受性品種において、①特に Rubisco の含量が著しく低下する、②Rubisco と同様葉緑体に局在する集光性クロロフィルタンパク質 LHCII の含量は、Rubisco のような顕著な減少は認められないことを、以前報告した。これらの結果は、Rubisco と LHCII では、各々のタンパク質の合成または分解に及ぼす UVB の効果が異なっていることを示唆している。そこで、紫外線抵抗性の異なるイネ 2 品種の第 8 葉を材料に、①¹⁵N トレーサーを用い、Rubisco, LHCII タンパク質の合成と分解に及ぼす影響、②Rubisco (*rbcS*, *rbcL*)、および LHCII (*cab*) の mRNA の転写量に及ぼす影響を経時的に解析した。本講演では、これら葉緑体タンパク質の合成、分解に及ぼす UVB の効果の違いについて考察する。

3aC11

シロイヌナズナにおける葉緑体光定位運動の突然変異体の単離と解析

加川貴俊^{1,2}、末次憲之³、及川和聡³、和田正三^{2,3}
(¹科学事業振興事業団・さきがけ研究2 1、²基礎生物学研究所、³都立大・理・生物)

外界の光環境に依存して葉緑体はその位置をかえる。弱光下では葉緑体は光に向かって集まり(弱光反応)、強光下では光から逃げる方向に移動する(強光反応)。シロイヌナズナの葉でもこの現象は観察される(Kagawa and Wada, 2000, Plant Cell Physiol. in press)。今回、シロイヌナズナから強光反応が起こらない突然変異体の単離を試み、2種類を得たのでその報告をする。1つは強光反応も弱光反応も共に全く起きない突然変異体、もう一方は強光反応のみ起こさない突然変異体である。野生型では強光・弱光反応はそれぞれ 0.1-4Wm⁻²、8-30Wm⁻²の青色光で誘導される。しかし、前者の変異体では調べた0.1-30Wm⁻²の光環境で葉緑体光定位運動はほとんど観察されなかった。一方、後者の変異体は、弱光反応はほぼ正常ではあるが、通常強光反応を示す光強度でも弱光反応を示す。本発表では、後者の強光反応が起きない変異体の原因遺伝子解析過程についてものべる。

3aC12

シロイヌナズナの葉緑体光定位運動における弱光反応欠損突然変異体の解析

末次憲之¹、加川貴俊^{2,3}、和田正三^{1,3} (1東京都立大学大学院・理・生物科学、2科技団・さきがけ2 1研究、3基生研・情報制御研究部門)

葉緑体は弱光下では光の方向へ集まり(弱光反応)強光下では光から逃避する(強光反応)という二つの異なる反応を行う。弱光反応は葉緑体が光を効率よく捕集できるようにするための反応であり、強光反応は光傷害を避けるための反応であると考えられている。この光定位運動は青色光の照射によって誘導されることが多くの植物で知られている。しかし光受容体の実体や、葉緑体の運動に至るまでの情報伝達系については全く分かっていない。

本研究では弱光反応の機構を解明するために、突然変異体を単離し解析した。現在までに、T-DNAタグラインとEMSラインから各々1ラインの変異体が単離された。これらの変異体に顕微鏡下で光を照射し、連続録画することにより葉緑体の動きを観察した。その結通常野生型で弱光反応を誘導する光強度の青色光(1, 3 W/m²)で弱光反応は誘導されなかったが、強光下(10, 30 W/m²)では逃避反応を示した。この結果は単離した変異体が弱光反応のみ欠損していることを示している。

本研究の一部は生研機構基礎研究推進事業の一環として行われた。

3aC13

シロイヌナズナ芽生えにおけるオーキシンを介した遺伝子発現の光制御の解析

田中慎一郎、中村賢志、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システムを用い、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システムより我々が再単離したN35システムでは、暗所で胚軸下部においてレポーター遺伝子の発現が上昇する。その発現様式を解析した結果、この光応答における主な光受容部位は子葉であり、子葉から何らかのシグナルが胚軸下部に伝えられていることが示唆された。

このシステムにおいては何らかの遺伝子がT-DNAによってタグされていると考えられたため、T-DNAの挿入位置をTail-PCRによって同定した。その結果N35システムにおいてはダイズですすでに同定されているオーキシニン応答性遺伝子GH3のホモログの近傍に挿入が起きていることが分かった。近傍にあったGH3遺伝子はRNA-gel blot解析の結果、フィトクロムによって発現が制御されていることが示唆された。

1aD01

タバコERF3はユビキチン結合酵素と相互作用する

○小山知嗣¹、岡田崇¹、北島佐紀人²、高木優³、
進士秀明³、佐藤文彦^{1,4} (1京大院・農、2 RITE、
3工技院・生命工学、4京大院・生命科学)

植物は病原体の感染に対して、PR (Pathogenesis-related) タンパク質の発現を誘導する。エチレン応答性転写因子ERF (EREBP)は塩基性PR遺伝子のプロモーター領域に保存されたGCC boxに特異的に結合することから、ERFの活性制御の解析はPR遺伝子の発現制御を理解する上で重要である。

タンパク質間相互作用を介したERF3の翻訳後修飾を解明するために、ERF3をベイトとした酵母 two-hybrid systemによるERF3結合タンパク質の単離を試みた。スクリーニングの結果、Ubiquitin conjugating enzyme (UBC, E2 enzyme)をコードする遺伝子を単離し、NtUBC1および2と名付けた。NtUBC1/2はarabidopsisのAtUBC1-3に高い相同性を示した。UBCは基質タンパク質にポリユビキチン鎖を付加するので、ERF3とUBCの相互作用からユビキチン/プロテアソーム系によりERF3が分解されると推測される。

1aD02

シロイヌナズナ DNA 傷害応答遺伝子の制御領域の解析

前田智秀、渡壁百合子、高瀬尚文、堀田康雄¹、
平塚和之 (奈良先端大・バイオ,¹岐阜国際バイオ研究所)

シロイヌナズナ *AtRAD51* 遺伝子は RecA 様タンパク質をコードし、DNA 損傷や細胞周期の S 期に誘導されることが知られている。高等植物の DNA 傷害に応答する遺伝子発現制御機構を明らかにする目的で *AtRAD51* 遺伝子のプロモーター領域の解析を試みた。5'上流側から段階的に欠失させた *AtRAD51* プロモーターの下流にレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを作製した。それらを遺伝子銃を用いてタバコ培養細胞 BY-2 へ導入し、DNA 傷害剤として知られているブレオマイシン処理による発現誘導を指標として、DNA 傷害応答領域を調べた。その結果、コアプロモーター近傍に位置する 44 塩基対の領域が DNA 傷害による転写活性化に必須であることが見いだされた。

1aD03

シロイヌナズナのヒスチジinkinナーゼ ATHK1 の変異遺伝子の解析

浦尾剛、刑部祐里子、篠崎和子、篠崎一雄¹
(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

我々は植物の情報伝達における Two-Component System の役割を解析することを目的として、シロイヌナズナから N 末側に 2 個所の膜貫通ドメインを持つハイブリッド型ヒスチジinkinナーゼ ATHK1 をコードする cDNA をクローニングした。さらに、酵母の浸透圧応答変異株を用いて ATHK1 が酵母の中で浸透圧センサーとして働くことを示してきた。

次に ATHK1 の植物における機能を解析するために、ATHK1 の活性を改変した変異遺伝子を導入した形質転換植物の作出を試みた。まず初めに、two-hybrid 法により ATHK1 が細胞内領域間を介してホモダイマーを形成することがわかったので、PCR 法で作成した ATHK1 のランダム変異ライブラリーを *sln1* 欠損株に導入し、*sln1* 欠損株を相補する野生型 ATHK1 の活性を阻害するようなドミナントネガティブ型 ATHK1 変異体のスクリーニングを試みた。その結果、現在までに 6 種の変異株 (ATHK1-1~6) を単離した。さらに、変異部位を同定するために塩基配列を調べた結果、ATHK1-2 は N 末側の 641 アミノ酸が欠失した変異体、ATHK1-6 は ATP 結合部位と推定される 726 番目の Gly のアミノ酸置換の変異体であることがわかった。現在、これらの変異遺伝子を導入した形質転換植物の解析を行っている。

1aD04

老化および乾燥ストレスにより誘導されるシロイヌナズナ *erd1* 遺伝子の発現解析

嶋坂義弘、中島一雄、Sean D Simpson、篠崎和子、篠崎一雄¹
(国際農研・生物資源、¹理研・植物分子)

シロイヌナズナの *erd1* 遺伝子は Clp protease regulatory subunit (ATPase) homolog をコードしており、ERD1 タンパク質は糸状体ターゲットされる。またこの遺伝子は乾燥、塩ストレスに対し 2 時間以内に発現し、自然老化あるいは人工的な老化を起こす暗処理にも高い発現を示すことを明らかにした (Nakashima et al., Plant J. 12:851-861)。そこで *erd1* 遺伝子プロモーター中の老化認識・乾燥応答シグナルを解析するため、*erd1* 遺伝子の 5'上流領域 (-723~+165)/*LUC*(luciferase)キメラ遺伝子を導入した形質転換タバコおよびシロイヌナズナを作製した。形質転換タバコを 12 日間暗処理し、*erd1* 遺伝子のプロモーター解析を行った結果、-202~-134 までの 69 塩基が老化認識に関与していることが明らかになった。またこの領域には ABRE (ABA Responsive Element) 様配列が含まれていた。現在この領域に欠失変異を加えて、老化認識シグナルの特定を試みている。さらに乾燥ストレスに対する解析を行った結果を報告する。

1aD05

シロイヌナズナのHPT因子AHPと相互作用する因子の検索

鈴木友美、櫻井健介、上口智治、水野猛
(名大院・生命農)

二成分制御系は植物ホルモンの応答に関与するなど重要な機能を果たすシグナル伝達系であると考えられる。我々はこれまでこの系を構成する因子をシロイヌナズナから多数取得・解析してきたが、因子間の相互関連に関してはよくわかっていない。そこでシグナル伝達の仲介因子として機能するHPT因子(AHP1~3)と相互作用する因子の検索を試みた。

酵母Two-Hybrid法によるスクリーニングの結果、2種類の転写関連因子をコードする遺伝子を得ることができた。AHP1~3全てと相互作用可能な因子として、二成分制御系のレスポンスレギュレーターのうち、Myb様ドメインを保持する遺伝子(ARR1,10)が分離できた。この結果はAHP1~3とこれらARRがシグナル伝達経路を構成することを強く示唆する。一方AHP2,3のみと強く相互作用する因子としてTCPドメインを持つ新規遺伝子(TCP10)が分離できた。TCPドメインは他の植物種では側部分裂組織の成長に関与する遺伝子に共通して見出される構造ドメインとして注目されている。この結果はAHP2,3によるシグナル伝達経路と植物の成長制御機構の間の関連を示唆するものと考えられる。

1aD06

シロイヌナズナにおけるHis-Aspリン酸転移情報伝達機構因子群ARRsの比較総合解析

今村 綾、鈴木 友美、上口 智治、水野 猛 (名古屋大院・生命農)

His-Aspリン酸リレー系は原核生物、真核生物に普遍的なシグナル伝達機構である。一般にこの情報伝達機構はセンサーHisキナーゼ、HPT因子、レスポンスレギュレーター3因子から構成され、各因子間のリン酸転移によりシグナルが伝達される。高等植物シロイヌナズナにおいてもこの情報伝達機構が植物ホルモンシグナルや環境ストレスシグナルの受容と伝達に関与していることが示唆されている。今回は、シロイヌナズナに見出された16種類のレスポンスレギュレーター(ARR)群に関して、その構造的特徴、リン酸転移活性、発現様式、局在性などの解析を行い、その特徴付けを行った。その結果、シロイヌナズナのARRは大きく2種類(Type-AとType-B)に大別できることが示された。各諸性質に関する結果を提示しながら、シロイヌナズナにおけるARR因子群の全体像をまとめる。

1aD07

シロイヌナズナにおけるHis-Aspリン酸リレー情報伝達：擬似レギュレーター因子群の機能解析

牧野聖也、今村綾、木羽隆敏、谷口光隆、上口智治、杉山達夫、水野猛(名古屋大院・生命農学・生物機構)

His-Aspリン酸リレー系はバクテリアにおける最も普遍的な情報伝達機構である。しかも、この機構は高等植物のホルモン応答機構にも組み込まれていることが明らかになりつつある。我々は、シロイヌナズナを対象にしてHis-Aspリン酸リレー情報伝達系に関わる諸因子(センサー、HPTドメイン、レギュレーターなど)の総合的解析を進めている。これらの解析過程で、シロイヌナズナにARRのリン酸基受容ドメイン(レシーバー)と極めて類似したドメインをもつ因子をコードする複数の遺伝子が存在することに気付いた。しかし、ARRと異なりリン酸基受容に必須と思われるAsp残基を欠いているので擬似レギュレーター(APRR)と名付けた。これらがHis-Aspリン酸リレー情報伝達に関わる新規な因子かもしれないと想定し、その遺伝子の取得・解析を行った。代表としてAPRR1とAPRR2の遺伝子を取得して、その構造と発現様式を解析した。APRR1の発現については特徴的な日周期性を示したため、APRR1を用いてTwo-hybrid法により相互作用因子の検索をおこなった。その結果、Myc様bHLHをもつ因子が同定された。これらの結果を含め、APRR1やAPRR2のもつ興味深い構造的特徴などをまとめながら、His-Aspリン酸リレー情報伝達機構との関連で考察する。

1aD08

窒素栄養に応答したサイトカイニンの蓄積・輸送機構の解析

武井兼太郎、榊原 均、谷口光隆、杉山達夫 (名古屋大院・生命農学)

トウモロコシ葉から単離した二成分情報伝達系のレスポンスレギュレーター ZmRR1、ZmRR2 は窒素飢餓植物への無機窒素補填により発現が誘導される。一方、切り取り葉ではこれらの遺伝子発現は無機窒素ではなく、サイトカイニンにより誘導される。我々は、すでに窒素飢餓からの回復過程において根のサイトカイニンが増加することを明らかにしている。これらのことから、根で増加したサイトカイニンが導管を經由し葉へ輸送され、これらの遺伝子発現誘導をもたらすと考えた。本研究では、根から葉へのサイトカイニン輸送の窒素栄養による制御様式について検討した。

根から葉へ輸送されるサイトカイニン量を把握するため、切断茎からのxylem sapの浸出量とsap中のサイトカイニン量を解析・定量した。ODSカラムを使用したHPLCによるxylem sap中のサイトカイニン分子種の分離とELISA法による定量の結果、硝酸塩の補填に伴い主にZeatinriboside-5'-monophosphate、Zeatinriboside、Zeatinの3分子種が増加することがわかった。葉のサイトカイニン量の変動やZmRR1、ZmRR2の発現様式等の結果とあわせて、根から葉へのサイトカイニン輸送機構について考察する。

1aD09

トウモロコシの二成分情報伝達系因子ZmRR1遺伝子のシス領域と発現部位の解析

出路篤、榊原均、奥村真也、石田祐二¹、山田茂裕¹、小鞠敏彦¹、久保友明¹、杉山達夫(名古屋大院・生命農学、¹ORYNOVA K.K.)

サイトカイニンを介した窒素栄養の情報伝達に二成分情報伝達系が関与していることが明らかになりつつある。我々は既にトウモロコシから、サイトカイニン誘導性のレスポンスレギュレーター遺伝子(ZmRR1)を単離している。今回、この遺伝子の発現部位、およびサイトカイニンにตอบสนองした発現制御機構を明らかにするために、ZmRR1の上流領域(3.4 kb)の下流にGUS遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入した形質転換トウモロコシを作製した。5系統のT1世代の形質転換体の葉片をサイトカイニン処理したところ、いずれの系統においてもGUS活性が有意に増加した。この結果から、ZmRR1のサイトカイニンにตอบสนองした発現の少なくとも一部は、転写活性の増加によるものであり、今回導入した上流領域内にその発現制御に関わるシス領域が含まれていることが示唆された。現在、GUS組織染色やZmRR1抗体を用いた解析により、細胞レベルでのZmRR1の発現部位の特定を試みるとともに、植物個体の生長に伴う発現部位と発現様式の変化についても解析を行っている。これらの結果についても報告する予定である。

1aD10

トウモロコシにおけるHis-Aspリジン酸リレー系情報伝達因子の単離と機能解析

榊原均、太田行則、杉山達夫(名古屋大院・生命農学)

二成分(His-Aspリジン酸リレー)情報伝達系が、植物の環境応答やホルモン応答におけるシグナル伝達に関与していることが近年明らかにされつつある。我々はサイトカイニンを介した窒素栄養情報の伝達機構にこの系が関与することを見出すとともに、伝達因子の同定と機能解析を進めている。現在までにトウモロコシから、無機窒素源補填あるいはサイトカイニン処理により発現誘導されるレスポンスレギュレーター(RR)遺伝子ZmRR1、ZmRR2と、構成的に発現するHPT遺伝子ZmHP1、ZmHP2を単離している。今回、two-hybrid assay, *in vitro* binding assayを用いて因子間の相互作用について検討したところ、ZmHP1はZmRR1、ZmRR2と相互作用するものの、ZmHP2はいずれとも相互作用せず、少なくとも因子間で認識特異性を持つことが示された。現在、緑葉のcDNAライブラリーよりさらに4種のRR(ZmRR4-ZmRR7)cDNAを単離しており、それらの構造と発現様式、さらにZmHPsとの相互作用の特異性についても解析中である。

1aD11

アラビドプシスにおけるRNAポリメラーゼI遺伝子の窒素及びサイトカイニンにตอบสนองした発現の解析

木羽隆敏、高橋徹、武井兼太郎、谷口光隆、榊原均、杉山達夫(名古屋大院・生命農学)

我々はアラビドプシスにおいて、2成分情報伝達系のResponse Regulator 遺伝子(*ARR3~9*)の発現が窒素補填及びサイトカイニン添加にตอบสนองして増大することを明らかにしている。このことは、2成分情報伝達系が関与するサイトカイニンを介した窒素情報伝達系がアラビドプシスにも存在することを示唆するものであるが、この情報伝達系により制御される標的遺伝子については不明である。

そこで本研究では、この情報伝達系の標的遺伝子の候補として、サイトカイニンにตอบสนองして転写が促進されることが知られるrRNA遺伝子(*rDNA*)に着目した。その結果、*rDNA*の転写を司るRNA polymerase I大サブユニット遺伝子(*AtRPA190*)のmRNA蓄積量が窒素補填及びサイトカイニン添加にตอบสนองして増大することを明らかにした。また、この*AtRPA190*mRNA蓄積量の増大は*rDNA*の転写活性化に先駆けて起きることから、*rDNA*の転写活性化の少なくとも一部はRNAポリメラーゼI遺伝子の発現増大に起因している可能性があると考えられた。さらに、*ARR*は、これら*rDNA*や*AtRPA190*の発現誘導に先駆けて誘導されることから、*ARR*を介するサイトカイニン情報伝達系の標的遺伝子に*AtRPA190*が含まれる可能性が示唆された。

1aD12

サイトカイニン情報伝達系の負の制御因子と考えられるCYTOKININ-HYPERSENSITIVE 1(*CKH1*)遺伝子の単離

久保 稔、劉 耀光¹、柴田大輔¹、柿本辰男(阪大・院理・生物科学、¹三井植物バイオ研)

サイトカイニンは植物の形態形成や分化に重要な役割を果たしているが、その分子レベルでの作用機構において、未だ分からないことが多い。私たちは、サイトカイニンの情報伝達系を解析するために、遺伝学的手法や分子生物学的手法が有用なシロイヌナズナから、サイトカイニン高感受性変異体である*ckh1*、*ckh2*変異体を単離した。サイトカイニンには、植物の組織からカルスを誘導し緑化させる作用があり、*ckh*変異体の外植片は、低濃度のサイトカイニンを含む培地で、緑色で増殖の速いカルスを誘導するが、野生型の外植片ではこのような反応は見られなかった。また、内在性のサイトカイニン量を調べたところ、野生型と*ckh*変異体の間で顕著な違いは見られなかった。これらのことより、*ckh*変異体はサイトカイニンの情報伝達系における負の制御因子に欠陥があることが示唆された。*CKH1*、*CKH2*遺伝子はそれぞれ第1染色体、第2染色体にマッピングされ、*CKH1*遺伝子はCAPSマーカーであるm59に近接していたので、これを用いて、ポジショナルクローニングを試みた。TAC、BACのゲノムライブラリーを用いて約200kbに及ぶ連鎖地図を作成し、ここに含まれるTACクローンを*ckh1*変異体に導入したところ、あるTACクローンが、*ckh1*変異体の表現型を相補した。このTACクローンに含まれる遺伝子を2つの*ckh1*変異体の遺伝子と比較したところ、ある遺伝子にナンセンス変異が生じていることが分かった。現在、この遺伝子のcDNAを単離し、機能解析を行っている。

1pD01

電氣的刺激によるイネ単一細胞内カルシウムイオン
流入量の制御

小齋裕里、斉藤美佳子、松岡英明
(東京農工大・工・生命工学)

イネ単一細胞内へのカルシウムイオン流入量を電氣的刺激により制御した。細胞膜にかかる電圧 (V_{CMP}) は電極間の電位分布を測定し、その傾きから見積もった。その結果、 V_{CMP} が 1.0mV 以下では細胞内へのカルシウムイオンの流入は起こらなかったが、 V_{CMP} が 1.9mV 以上では顕著な細胞内への流入が認められた。この流入はカルシウムチャンネルブロッカーであるベラパミルにより阻害されたことから、細胞内へのカルシウムイオンの流入は電氣的刺激により電位依存性カルシウムチャンネルを通して制御することが可能であると考えられた。

1pD02

タバコ光化学系 I 核遺伝子 *psaDb* の光応答性転写
制御機構に与えるカルシウムの影響
中邨真之、小保方潤一 (名大・遺伝子)

光化学系 I 核遺伝子の光応答には少なくとも cGMP とカルシウムの両方が必要であることが示唆されている。しかし、cGMP やカルシウムがどのような機構で光化学系 I 核遺伝子の発現を調節しているのかは明らかではない。そこで本研究では、cGMP やカルシウムが光化学系 I 核遺伝子の転写活性に与える影響について、タバコ光化学系 I 核遺伝子 *psaDb* をモデルにパーティクルガンを用いたトランジェント発現系で調べた。

カルシウムキレーター BAPTA-AM で処理したタバコ黄化芽生えに *psaDb::LUC* キメラ遺伝子を導入し、24 時間後のレポーター活性を測定した。その結果、10 μ M の BAPTA-AM を処理した芽生えでは、明所下でのレポーター活性が著しく減少した。この結果は、カルシウムが *psaDb* の光応答に転写レベルに関わっていることを示している。また、cGMP アンタゴニストを用いた実験結果についても報告する予定である。

1pD03

Transmembrane mechanism of apoplast calmodulin effects
on the pollen germination and tube growth

Sun DY and Ma LG (Institute of Molecular Cell Biology, Hebei Normal University, Hebei Shijiazhuang, 050016, sundaye@163.net)

We find that calmodulin was not only presence at apoplast universally but also have important biological function at outside of the cell, including initiating and promoting pollen germination and tube growth (Planta, 1996, 198:510-516). Hetrotrimeric G protein was detected in the lily pollen tube and involvement in the transmembrane mechanism of apoplast calmodulin to promote pollen germination and growth (Plant Cell, 1999,11:1351-1363). Our preliminary experiments indicated presence of CaMBPs in the out surface of pollen cell. (unpublished data) Recently, Using pharmacological probes, microinjecting IP3 and antibodies against the PLC β 、IP3 receptor, we got evidences for involvement of phosphoinositide signaling pathway in the intracellular signal transduction mechanism of calmodulin effects. By fluoresces probe combine with confocal technique, our results also show enhances of free cytoplasm Ca⁺² concentration of lily pollen tubes after adding pure exogenous calmodulin into culture medium of pollen. Above evidences suggested that the extracellular calmodulin may play an important role in the regulation of pollen germination and tube growth. Taken together with other research results in our Lab., we think that apoplast CaM maybe a new primary peptide messenger in the plant kingdom.

1pD04

イネ細胞におけるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体様
糖タンパクについて

岩淵 諭、渡辺 仁子¹、伊藤 紀美子¹、堀 秀隆、
三ツ井 敏明

(新潟大学大学院・自然科学、¹新潟大学・農)

イノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体 (IP₃-R) は IP₃-Ca²⁺情報伝達系における重要な因子として研究が行なわれており、動物細胞では既に三種類のサブタイプが精製、クローニングが行なわれている。しかし、植物細胞ではほとんど知見がない。そこで、動物の IP₃-R に対するポリクローナル抗体を用いてイネ IP₃-R の検出を試みた。抗 IP₃-R Type I、II 抗体では特異的に認識されるイネ膜タンパクの存在は認めることはできなかった。しかし抗 IP₃-R Type III 抗体では 50-55kDa 付近に特異的なタンパクバンドが検出された。そこで、既に確立されている IP₃-R Type III の精製法をもとにコンカナバリン A セファロース樹脂を用いてこのイネ膜タンパクを精製したところ、結合フラクション中に、この抗 IP₃-R Type III 抗体が認識するタンパクを得ることができた。この結果イネ細胞中にも動物細胞における IP₃-R と構造的に相同性の高い糖タンパクの存在が示唆された。

1pD05

シュートの重力屈性と胚発生に関するシロイヌナズナ
SGR2 は phospholipase A1 との相同性を示す

加藤壮英¹、田坂昌生²

(¹京大院・理・植物、²奈良先端大・バイオ)

高等植物のシュートは負の、根は正の重力屈性を示す。この反応は重力感受・伝達・屈曲応答の順に進行する。我々がシロイヌナズナより単離した *sgr2* 変異株の地上部(花茎、胚軸)は異常な重力屈性を示すが、根は正常だった。さらに *sgr2* は胚発生も異常を示した。今回 *sgr2* 全アレルの変異がマップされる遺伝子をポジショナルクローニングにより単離した。この遺伝子を 35S プロモーターで強制発現すると、変異体のシュートの重力屈性反応が回復した。これらの事からこの遺伝子を *SGR2* と断定した。*SGR2* は牛より単離されたホスファチジル酸特異的なホスホリパーゼ A1 と全長にわたり相同性を示した。その中にはリパーゼコンセンサス配列、予想膜貫通領域などが存在した。サザン解析、データベース検索からシロイヌナズナに他の相同遺伝子は存在しなかった。また RT-PCR 解析により *SGR2*mRNA は全ての器官で発現しているのが明らかとなった。我々は *SGR2* を新規なシグナル伝達系に関連する因子と考えている。

1pD06

シロイヌナズナ培養細胞における浸透圧ストレスに応答したホスホリパーゼC活性の一過的上昇

高橋征司^{1,2}、片桐健¹、平山隆志¹、篠崎一雄^{1,2}

(¹理研・植物分子、²筑波大・生物化学)

これまでに高等植物において種々の細胞外刺激によりイノシトールリン脂質代謝(PI代謝)が活性化されることが報告されている。特に、PI代謝においてキーエンザイムであるホスホリパーゼC(PLC)を介した反応は細胞内情報伝達に重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、浸透圧ストレス応答の情報伝達機構とPI代謝との関係を明らかにする目的で、シロイヌナズナ培養細胞における各種浸透圧ストレスに対するPLCの活性調節について解析を行った。

T87培養細胞にNaCl、マンニトール、ABA、乾燥の各処理を加えイノシトール3リン酸(IP₃)を抽出、定量する事によりPLC活性を測定した。その結果、NaCl、マンニトール、乾燥の処理によって1分以内にIP₃の一過的産生が確認された。ABAでは応答は見られなかった。また、それらはネオマイシン等のPLC阻害剤を前処理することで阻害された。PLC活性の抑制が浸透圧ストレス応答機構に与える影響を確認するため、PLC阻害剤を処理した細胞における乾燥応答性遺伝子の発現誘導について解析を行った。その結果、ネオマイシンによりRD29A等の遺伝子発現誘導が有意に抑制されていることが明らかとなった。この様な現象とPLCとの関係をさらに直接的に解析するため、T87培養細胞の形質転換系を確立し、センス、アンチセンスのPLC形質転換体を作成した。現在これらのラインを用いて解析を行っている。

1pD07

イネ篩管液中のRNAについての解析

-イネ篩管液からのcDNA libraryの構築-

真野弘範¹、林浩昭¹、藤原徹^{1,2} (¹東大院・農、

²PRESTO, JST)

篩管は、その分化の過程で核を含む一部のオルガネラを失った通道組織であるが、篩管液の中にはRNAが存在することが知られている。近年、篩管の中のRNAはgene silencingのシグナル物質の有力な候補としてあげられており、どのようなRNAが篩管の中にあるかを知ることが重要な課題となっている。

このため、篩管液中のRNAを単離、同定することを目的として、インセクトレーザー法で集めたイネ篩管液を鋳型としてcDNA libraryを構築し、ランダムに単離したクローンの塩基配列を決定したところ、rRNAやイネmRNAの断片がクローニングできた。100-200のクローンについて報告する予定である。

また、篩管液中の80塩基以下の低分子RNAについてはキャピラリー電気泳動でその存在量を測定し報告する予定である。

1pD08

未熟種子特異的プロテインキナーゼ SPK が抑制された形質転換イネの篩管液の成分分析

小石原弘明、林浩昭*、島田浩章(東京理科大・生物工、*東大・農)

未熟種子特異的プロテインキナーゼ SPK はシンクにおけるデンプン生合成の鍵酵素であるショ糖合成酵素の活性化因子であることが示唆されている。アンチセンス SPK 遺伝子を導入した形質転換イネでは、おそらく SPK によるショ糖合成酵素の活性化が抑制されることで、ショ糖の利用が滞り、未熟種子におけるデンプン生合成が阻害されると考えられている。一方、SPK はイネの茎においても遺伝子発現が確認されているため、アンチセンス SPK を導入した形質転換植物における篩管内のショ糖などの物質移送にどのような変化が生じているか興味を持たれた。そこで、アンチセンス植物よりトビイロウンカを利用した方法により篩管液を採取し、内容成分の分析をおこなった。

1pD09

SPKによる sucrose synthase のリン酸化の解析

小村雄飛、国枝典子、島田浩章（東京理科大・生物工）

イネ未熟種子特異的プロテインキナーゼ SPK は、in vitro 反応系において sucrose synthase のリン酸化を触媒する。sucrose synthase は貯蔵デンプン生合成経路での初期反応を触媒する重要な酵素である。アンチセンス SPK を導入した組換え体イネでは未熟種子のデンプン生合成が阻害され、ショ糖が蓄積するため、SPK は未熟種子における sucrose synthase の活性化制御を行っているものと予想された。未熟種子の粗抽出液を基質として SPK によるリン酸化反応をおこない、電気泳動により分析したところ、sucrose synthase に対応する分子量を有するタンパク質がリン酸化された。また、抗 sucrose synthase 抗体を用いて、未熟種子タンパク質から回収された画分についてリン酸化反応をおこなったところ、sucrose synthase のリン酸化が認められた。そこで SPK による sucrose synthase のリン酸化部位の検定を試みた。

1pD10

イネにおける OsCDPK7 を介した低温および塩・乾燥ストレスのシグナル伝達

西條雄介、木下奈都子¹、畑信吾¹、経塚淳子²、島本功²、泉井桂¹（京大院・農・応用生物科学、¹京大院・生命科学、²奈良先端大・バイオ）

植物のストレス応答におけるシグナル系は、低温と塩・乾燥とでは基本的に異なる経路を介すると考えられている。イネのカルシウム依存性プロテインキナーゼ（CDPK）、OsCDPK7 は、形質転換植物（イネ）を用いた解析により、低温ストレスに反応して耐性を増強させるように機能することが示されている。OsCDPK7 過剰発現系統では耐塩性や乾燥ストレス耐性も著しく上昇していた。逆に発現抑制系統では耐性が低下していた。次に、OsCDPK7 の過剰発現によるストレス誘導性遺伝子の発現量への影響を解析した。過剰発現植物では、*rab16A*、*salT* などの塩・乾燥ストレスや ABA による誘導が増強されており、その結果、塩・乾燥ストレス耐性の強化に至ったことが示唆された。一方、低温条件下では、これらの遺伝子の発現は過剰発現植物においても誘導されておらず、耐冷性の獲得は異なる分子機構に由来すると推定された。以上の結果から、低温、塩/乾燥という異なるシグナル系が共通の構成因子として OsCDPK7 を共有することが示された。また OsCDPK7 の過剰発現によるシグナルの増幅にもかかわらず、未知の分子機構によって経路の独立性が保たれていることが示唆された。現在、OsCDPK7 シグナル系の構成因子の探索をさらに進めている。

1pD11

イネにおける *Ac/Ds* 系を利用した OsCDPK7 ノックアウト植物の解析

木下奈都子、西條雄介¹、経塚淳子²、島本功²、泉井桂（京大院・生命科学、¹京大院・農・応用生物科学、²奈良先端大学・バイオ）

低温・塩ストレス誘導性カルシウム依存性プロテインキナーゼ(CDPK)である OsCDPK7 を過剰発現させた形質転換イネは低温・塩・乾燥ストレスに対する耐性が著しく上昇していた。本研究ではさらにイネのストレス応答における OsCDPK7 の機能解析を進めるために、トウモロコシ由来のトランスポゾン *Ac/Ds* を用いたイネ 20,000 個体からなる遺伝子破壊系統プールを利用して OsCDPK7 ノックアウト植物の探索を行った。この挿入変異個体のスクリーニングは、3次元プールにおさめられた 20,000 個体からさらに上位のスーパープールを作成し、このバルクゲノムより *OsCDPK7* と *Ac/Ds* に特異的なプライマーペアを用いた PCR 法によって行った。シグナルの得られたスーパープールのみ、さらに 3次元プールから個体を特定した。その結果、2系統の OsCDPK7 ノックアウト植物が得られた。OsCDPK7 過剰発現植物では、*rab16A* や *salT* などの塩・乾燥ストレスや ABA による誘導が増強されたことによって塩・乾燥ストレスの耐性の獲得に至ったと示唆されている。そこで、得られた挿入破壊系統の後代について通常生育条件下における表現型に加えて、切り取り葉を用いてこれらストレス誘導性遺伝子の発現に対する OsCDPK7 ノックアウトの影響について解析を進めている。

1pD12

ゼンマイ胞子の発芽初期過程におけるカルシウム依存的なタンパク質のリン酸化

蒲池浩之、渡辺一成、井上 弘（富山大・理・環境）

赤色光照射によりフィトクロム系を介して引き起こされるシダ胞子の発芽は、 Ca^{2+} の制御下にあることが知られている。本研究では、ゼンマイ胞子を用いて、その発芽初期における Ca^{2+} の役割を調べた。

ゼンマイ胞子の発芽過程において、培地中の Ca^{2+} 存在時期を様々に制限したときの発芽率を調べた。結果は、ゼンマイ胞子の発芽初期過程には、少なくとも 2 回の Ca^{2+} 要求時期が存在することを示していた。最初の Ca^{2+} 要求時期は、胞子の培養開始直後から始まり、少なくとも 1 時間以上続いた。一方、2 回目の Ca^{2+} 要求時期は、培養開始後 1 時間目から始まり、約 3 時間継続した。モノクローナル抗ホスホセリン抗体を用いたウェスタンブロットティング法により、多数のタンパク質が培養開始直後からリン酸化されることが分かった。これらのリン酸化は、10mM EGTA により大きく阻害された。以上の結果は、ゼンマイ胞子の発芽初期に要求される Ca^{2+} は、タンパク質のリン酸化を引き起こすために必要であることを示唆している。

1pD13

ポプラ細胞質型プロテインキナーゼのクローニング

西口満、角園敏郎（農水省・森林総研）

我々は、樹木におけるプロテインキナーゼの機能解明を目指している。昨年度年会においては、ポプラのレクチン様ドメインを持つ受容体型プロテインキナーゼに関して報告した。今回、新たにポプラ頂芽由来のライブラリーから、405 アミノ酸残基の ORF (PnPK1: *Populus nigra* var. *italica* Protein Kinase 1) を含む 1658bp の cDNA、406 アミノ酸残基からなる ORF (PnPK2) を含む 1685bp の cDNA をクローニングした。PnPK1 と PnPK2 は相同性が非常に高く、約 87% のアミノ酸残基が一致する。PnPK1 と PnPK2 の触媒ドメインには、プロテインキナーゼに特有な I から XI までのサブドメインが存在した。しかし、細胞内局在シグナル等の特徴的な配列が見いだされなかったことから、2つのプロテインキナーゼはポプラの細胞質で機能していると考えられる。相同性検索の結果、PnPK1 と PnPK2 はシロイヌナズナの APK1a や NAK と約 40% のアミノ酸残基が一致した。

1pD14

高等植物シロイヌナズナにおける新規な SNF1 関連プロテインキナーゼ遺伝子の同定と解析

河野友子、松岡大介、東哲司、南森隆司、安田武司（神大院・自然科学研究科）

高等植物の SNF1 関連プロテインキナーゼ (SnRK) 遺伝子は、他の生物種と比較して多様化していることが特徴である。もともと、このキナーゼは、出芽酵母のスクロース資化能欠損株の復帰遺伝子として同定され、それが哺乳類の AMPK (AMP-activated protein kinase) のホモログであることが判明したものである。

植物の SnRK はその N 末端側の触媒領域が酵母や哺乳類のものと同様な相同性を示すものの、C 末端側の調節領域と考えられる部位においてはほとんど相同性が認められず、多様化した SnRK の個々の機能は、正確に同定されているわけではない。

最近、SnRK ファミリーの酵素が、硝酸還元酵素や炭水化物代謝系のいくつかの酵素をリン酸化し、調節していることが示唆されている。

今回、演者らはシロイヌナズナの全長約 1.5kb の新規なタイプの SNF1 関連プロテインキナーゼ遺伝子 (ATSRPK1) を同定した。キナーゼドメインの配列の比較から、これは SnRK3 のグループに属するものであることが判明した。

その後さらに、本酵素の全長領域とキナーゼドメインのみをコードする領域とをそれぞれ GST-融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。現在、活性の発現と制御領域の機能の解析並びに、生体内での遺伝子発現部位の解析を行っている。

1pD15

クラミドモナス MAP キナーゼ相同遺伝子の分離と解析

堀沢恒一、河本伸、山田隆、宇佐美昭二（広大院・先端研・分子生命）

MAP (mitogen-activated protein) キナーゼは、酵母から動植物に至る種々の生物で高度に保存されている細胞内情報伝達関連物質である。高等植物においても既に多数の相同遺伝子が分離され、その機能が明らかにされたものも存在するが、藻類などの下等植物における分離報告の例はほとんどない。

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は分子生物学的手法が利用可能な唯一の単細胞性微細藻類であり、モデル生物として注目を集め、ゲノムプロジェクトも進行中であるが、細胞増殖制御等の細胞内情報伝達系の研究はあまり進んでいない。我々はクラミドモナスにおける細胞内情報伝達系の機能を明らかにする目的から MAP キナーゼ相同遺伝子を分離し、その機能解析を進めている。

クラミドモナスの対数増殖期 cDNA ライブラリーを鋳型に RT-PCR 法により、TEY 型 MAP キナーゼ相同遺伝子をコードしていると思われる 2 種類の DNA 断片を取得した。これらの断片をプローブとして cDNA ライブラリーより全長クローンの分離を行ったところ、全長をコードしていると思われるクローン (CrMPK2 と命名) を分離できた。CrMPK2 遺伝子は全長 2,069 bp、推定 389 aa から成る TEY 型 MAP キナーゼ遺伝子であり、高等植物で知られる TEY 型の 2 つのサブタイプのいずれにも属さない、新規のタイプの MAP キナーゼ遺伝子である可能性が示された。

現在、リン酸化活性の測定を行うと共に機能解析を進めている。

1pD16

シロイヌナズナ ABA 依存性プロテインキナーゼの精製と生化学的解析

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

アブジジン酸 (ABA) は、高等植物の水分ストレス応答や種子休眠に関わる重要な植物ホルモンである。ABA のシグナル伝達に関する研究はシロイヌナズナの ABA 応答性突然変異体 (*abi1*, *era*) を中心に精力的に行われてきた。特に *abi1*, 2 においてはその原因遺伝子がプロテインホスファターゼ 2C であることが解明され、このことは ABA シグナル伝達にタンパク質のリン酸化が関与することを強く示唆した。しかしながら、その可能性を実証するためのシグナル因子の同定および生化学的解析はほとんど行われていない。

我々は、シロイヌナズナ T87 培養細胞から ABA により特異的に、そして、非常に短時間に活性化される分子量 44 kDa のプロテインキナーゼ (p44) をゲル内リン酸化法により確認した。このプロテインキナーゼ遺伝子の同定は今後のタンパク質リン酸化を介した ABA シグナル伝達系を理解する上で非常に大きな役割を持つことが期待されることから、我々は実際にその p44 タンパク質の精製を行っている。

1pD17

プロテインキナーゼWPK4と14-3-3タンパク質との結合様式の解析

池田佳久、草野友延、佐野浩（奈良先端大・遺伝子センター植物細胞工学）

植物SNF1関連遺伝子は3つのグループに分類され、WPK4はグループ3に属する。グループ1キナーゼは酵母*snf1*変異体を相補し、SNF1複合体と同じ構成因子と複合体を形成する。糖応答遺伝子の発現に関与していることから、SNF1の orthologと考えられる。

WPK4は異なる2つの14-3-3タンパク質と相互作用することを私たちはYeast two-hybrid法により明らかにした。本研究では、WPK4と得られた2つの14-3-3タンパク質との詳しい結合様式をtwo-hybridアッセイ法で解析した。その結果、1) 14-3-3タンパク質は自己リン酸化されたWPK4に結合する、2) キナーゼドメインのアクティベーションループ中のスレオニン残基のリン酸化がWPK4キナーゼ活性に影響を与えていることが示唆された、3) 14-3-3タンパク質はWPK4のC末端側に存在する二ヶ所の部位を介して結合する、ことが明らかになった。さらに*in vitro*の系において、14-3-3タンパク質はWPK4に結合するがキナーゼ不活性型(K75D)には結合しないこと、2つの14-3-3タンパク質はヘテロダイマーを形成することが明らかとなった。

1pD18

シロイヌナズナの分裂組織で発現する受容体型キナーゼ遺伝子 *IMK3* の機能解析

竹村美保、谷英美、武田有史、長谷川雅一、根本恭子、横田明穂、河内孝之（奈良先端大・バイオ）

植物の生長は、茎頂ならびに根端に存在する分裂組織の増殖・分化によって行われている。我々は、特に花成における分裂組織内での遺伝的制御を明らかにすることを目的とし、花序茎頂で特異的に発現する遺伝子をシロイヌナズナの花序茎頂由来均一化cDNAライブラリーより単離してきた。本研究では、その中の受容体型キナーゼ遺伝子と相同性を示した *IMK3* (*Inflorescence Meristem receptor-like Kinase 3*) の解析を行っている。これまでに、この遺伝子の配列を決定し、構造を明らかにしている。現在は、様々な手法を用いて、*IMK3* 遺伝子の機能を解析している。具体的には、*IMK3* Pro:: *GUS* 導入植物体を用いた発現解析などの結果、*IMK3* 遺伝子は花序茎頂のみならず栄養生長期の茎頂、さらには根端でも発現していることがわかった。また、*IMK3* キナーゼドメインと相互作用する遺伝子を Two-hybrid 法により探索し、得られた候補因子の結合活性などを調べて、いずれが *IMK3* の下流因子であるかを検討している。さらに、GFPを用いた実験により、*IMK3* タンパク質が細胞膜に局在することが示唆された。本大会では、これら機能解析の結果について報告する。

2aD01

塩生植物アイスプラント及びシロイヌナズナにおけるタンパク質脱リン酸化酵素タイプ2C (PP2C) 遺伝子の多様性
和泉俊介、宮崎さおり、大里広頭、福原敏行（東京農工大・農・細胞分子生物）

タンパク質脱リン酸化酵素タイプ2C (PP2C) は酵母やシロイヌナズナの研究から生物のストレス応答に関与することが示唆されている。特にシロイヌナズナではアブシジン酸シグナル伝達経路に関与する PP2C をコードする ABI1、ABI2 遺伝子が詳しく研究されている。我々は塩性植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から11個のPP2C遺伝子 (MPC1-11) を単離し、その解析から ABI ファミリー以外のPP2Cの存在を予測した。そこでシロイヌナズナ、イネの遺伝子データベースからMPCに類似した遺伝子を検索し、これらABIファミリー以外のPP2C遺伝子についてDNAシークエンス、ノーザンハイブリダイゼーション、脱リン酸化活性測定等により解析を行った。

2aD02

シロイヌナズナの γ 線照射応答における Nucleoside Diphosphate Kinase シグナル伝達機構の解析

○永田俊文¹、等々力節子²、林徹³、小松節子³、岡部健³、杜澤吉²、矢崎潤史⁴、中村桂子⁴、岸本直己³、森昌樹³、菊池尚志¹ (¹ J S T長崎、²食総研、³生物研、⁴STAFF研)

我々はシロイヌナズナに対する γ 線照射実験から、アントシアニン及び活性酸素消去能の蓄積、毛状突起(トライコム)の増加、エチレンの発生、根の形態変化等の現象を見だし、これらの反応が活性酸素を介して誘導されることを明らかにしてきた。細胞内シグナル伝達系の解明のため、MBPを基質にした *in-gel-assay* の結果、17.5kDaのタンパク質が Protein kinase 活性を有し、その活性が γ 線照射に伴って細胞質から膜面分に移行することを見いだし、これらが青色光受容体(クリプトクローム)の変異体 *hy4* (CRY1) *gha1* (CRY2) では、野生株と異なる挙動を示すことを見い出した。17.5kDaタンパク質は分子量、pI、イネ抗NDK抗体を用いた実験から、シロイヌナズナ Nucleoside Diphosphate Kinase である結果が示唆された。更に、NDK1aを bait に Yeast Two Hybrid System を用いて相互作用する遺伝子産物をスクリーニングした結果、膜タンパク質、光合成関連タンパク質が相互作用していることが明らかになった。マイクロアレイシステムを用い、 γ 線の照射によるこれらの遺伝子の発現の変化を解析したところ、照射依存的に発現量の変化が認められ、Nucleoside Diphosphate Kinase シグナル伝達系の遺伝子が、 γ 線照射応答に関与している可能性が示唆された。

2aD03

イネ、プロトプラストによる *N*-アセチルキトオリゴ糖エリシターの認識
南 栄一、西村宜之、渋谷直人（農水省・農業生物資源研究所）

イネイモチ病菌細胞壁の主要骨格であるキチンのオリゴマー (*N*-アセチルキトオリゴ糖) はイネ懸濁培養細胞に対して強いエリシター活性を示し、活性酸素生成、遺伝子発現等の防御反応を誘導する。イネ細胞によるエリシターの認識、シグナル伝達を明らかにすることを目的として、プロトプラストによるエリシター応答反応を、エリシター応答性遺伝子の一つ、EL3の発現、並びに活性酸素の生成を指標として調べた。EL3は6~8量体の *N*-アセチルキトオリゴ糖に反応して、一過的な発現を示した。また活性酸素生成もエリシターのサイズに対して同様の依存性を示した。この両者はタンパク質リン酸化阻害剤、k-252a で阻害され、またタンパク質脱リン酸化阻害剤、calyculin A はそれぞれ単独でこの両者を誘導した。*N*-アセチルキトオリゴ糖を認識するタンパク質が細胞膜状にある (FEBS Lett., 1993, 329, 75; Plant J., 1997, 12, 347) という結果を考えあわせると、イネ培養細胞におけるエリシターシグナル伝達の初期段階には細胞壁の関与は少ないことが推察された。

2aD04

エリシター応答性遺伝子のイネ植物体における発現様式
田部 茂、南 栄一、岡田 光央、渋谷 直人
(農水省・農業生物資源研究所)

イネ培養細胞系では、特定サイズのキチンのオリゴマー (*N*-アセチルキトオリゴ糖) がエリシターとして種々の生体防御反応を起こすことが知られている。これまでにこの系を用いて、エリシター処理後数分で発現が誘導され、1~2時間で発現レベルが低下するという一過性の発現パターンを示す初期応答性遺伝子、EL2, EL3が単離されている。また、その他にも、PAL, β -glucanase といった生体防御反応に関与していると考えられる遺伝子もエリシターによって誘導されることが示されている。本研究では、これらのエリシター応答性遺伝子が、イネ植物体でどのように発現しているのかを、ノザン分析、*in situ* ハイブリダイゼーション実験によって解析した。その結果、EL2, EL3はエリシター処理15分後にはすでに発現が誘導されていること、一過性の発現パターンを示すことなどがわかり、イネ植物体におけるこれらの初期応答遺伝子が培養細胞系と同じように挙動していることが示唆された。さらに、PAL, β -glucanaseなどの遺伝子についても解析を行う予定である。

2aD05

イネ培養細胞のキチンエリシターによる活性酸素生成の制御機構の解析

山口武志 前原有美子 渋谷直人
(農水省 農業生物資源研究所)

本研究室ではキチン系オリゴ糖とグルカン系オリゴ糖がイネ培養細胞に対して強いエリシター活性を示すこと、初期細胞応答としての活性酸素生成に関して、キチン系が二相性 (即時性と遅発性) の応答を示すこと、さらにこの即時性の制御には蛋白質チロシナーゼが関与していると考えられることを報告した¹⁾。

その後の検討の結果、この活性酸素の生成は蛋白質合成阻害剤 Cycloheximide や PI3 Kinase、Phospholipase の阻害剤である Wortmannin により、遅発性の生成は完全に阻害されたが即時性の生成は全く影響を受けなかった。一方、この阻害はリノール酸、リノレン酸等の添加により大幅に回復した。さらに、各種ホスホリパーゼの阻害剤を用いた解析より、エリシターによる活性酸素生成の制御にはリン脂質の代謝系が複雑に関与していることが示唆された。

¹⁾ 1999年度植物生理学会講演要旨集 p153

2aD06

アラビドプシス新規転写因子群AtERFは、GCCボックスに特異的な転写活性可能あるいは転写抑制能を持つ
高木 優、太田 賢、Susan Y. Fujimoto、進士秀明 (工技院・生命研・植物分子生物)

ERFタンパク質は、植物固有な転写因子であり、ERFドメインと呼ばれるDNA結合ドメインを共有している。これらの因子の遺伝子は、マルチジーンファミリーを形成しており、植物の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていると考えられている。アラビドプシスcDNAライブラリーからERFタンパク質をコードするAtERF1-5を単離し、それらの発現様式および転写因子としての機能解析をおこなった。AtERF1, AtERF2, およびAtERF5は、GCCボックスに特異的な転写活性因子として機能する。一方、AtERF3, AtERF4は、リプレッサーとして機能し、リポーター遺伝子の活性のみならず他の転写因子の転写活性を抑制する因子であることが明らかになった。mRNAレベルでのAtERFの発現は、エチレン、メチルジャスモン酸、低温、塩、傷害、乾燥により、異なる様式で誘導される。これらの発現様式とエチレンおよびジャスモン酸シグナル伝達経路との関連についても述べる。

2aD07

植物間で保存された ERF3 転写抑制ドメインの機能解析
太田賢、高木優、進士秀明
(工技院・生命研・植物分子生物学研究室)

植物の防御遺伝子のプロモーター領域に存在する GCC box 配列はエチレン応答やエリシター応答に関与していることが知られている。GCC box 配列からの転写制御に関わる ERF (Ethylene responsive transcription factor) は活性化因子と抑制因子に分けられ、タバコでは ERF3 が転写抑制因子としてはたらく。本研究ではアラビドプシスとイネの ERF3 ホモログの機能解析を行った。アラビドプシス AtERF3 と AtERF4 と、イネの ERF3 ホモログを酵母の GAL4 の DNA 結合ドメインに融合させて GAL4 応答性のレポーター遺伝子と共にタバコ・プロトプラストに一過的に発現させると、GAL4 応答性のレポーター遺伝子の活性を減少させた。したがって、アラビドプシスとイネの ERF3 ホモログはアクティブプレサーとして働き、転写抑制ドメインを持っていると考えられる。さらに、これら ERF3 ホモログの転写抑制ドメインについての解析したので、その結果について報告する。

2aD08

分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素の糖による発現調節

藤木友紀、伊藤正樹、渡邊昭
(東京大・院・理系・生物科学)

我々は、暗所に置かれたシロイヌナズナ緑葉から、分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体 (BCKDH) を構成する 2 つのサブユニットの遺伝子 *din3*, *din4* の cDNA クローンを植物では初めて単離した。これまでに、糖の枯渇に反応して *din3*, *din4* の転写産物やタンパクが蓄積すること、およびそれぞれの 5' 上流域がタバコ培養細胞 BY-2 中でレポーター遺伝子に糖飢餓特異的な発現を付与することを明らかにしてきた。近年植物でも、ヘキソキナーゼや SNF1 プロテインキナーゼが糖センサーとして注目を集めているが、糖シグナリングについては不明な点が多い。我々は *din3*, *din4* のプロモーター解析を通して、糖による遺伝子発現の制御機構にアプローチしたいと考えた。

まず *din3* 遺伝子の 5' 上流域を欠失させ、ルシフェラーゼとのキメラ遺伝子を BY-2 に導入した。その結果、糖飢餓特異的な発現に関わる可能性のある配列が複数存在することが予想された。さらに糖飢餓特異的な発現に必要な最小限のプロモーター領域に結合するタンパク質の存在をゲルシフトにより示した。*din4* の糖飢餓応答性の発現を導く最小限のプロモーター領域にも、類似した配列が存在していた。この配列は、BCKDH の各遺伝子の発現を、糖飢餓に反応して協調的に誘導する過程に関わっていることが予想される。

2aD09

糖センサーとしてのヘキソースキナーゼの解析
砂子智美、森田章義、山口淳二 (名大・生物分子応答研究センター)

高等植物の細胞内糖濃度認識に関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。私たちはヘキソースキナーゼの糖センサーとしての機能解明のために、現在までイネよりヘキソキナーゼ 2 種類 (*OsHXK1*, 2)、フルクトキナーゼ 2 種類 (*OsFRK1*, 2) をクローニングし、その解析を行ってきた。今回は、糖で抑制される α -アミラーゼ遺伝子、RAmy3D のプロモーターを指標としてヘキソースキナーゼの機能を検討した。ヘキソースキナーゼ cDNA のアンチセンスコンストラクトと RAmy3D プロモーター-GUS 融合遺伝子をイネ胚に導入した結果、*OsHXK1* では RAmy3D の糖抑制が解除されたが、他のヘキソースキナーゼではこの解除は起こらなかった。この結果から、*OsHXK1* のみが糖シグナルに関与していると結論した。

2aD10

植物体における糖シグナル応答性 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇とその機構-エクオリン導入シロイヌナズナによる解析
古市卓也¹、加藤潔²、森泉³、高橋宏二²、武藤尚志^{1,3}
(名古屋大・大学院生命農学研究科・生化学制御、²情報文化学部、³生物分子応答研究センター)

Ca 依存性発光蛋白質エクオリンを導入したシロイヌナズナ植物体における糖応答性 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇を、CCD カメラを用いて解析した。培地に炭素源としてショ糖を与えずに生育したシロイヌナズナの根元に糖を与えると、下位の葉から上位の葉へと経時的に移動する $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇を反映したエクオリン発光が観察された。この発光は非代謝糖によっては誘導されなかった。また、ショ糖を与えて生育した植物体では発光が観察されなかった。この結果は、シンク状態の細胞の糖応答性 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇が個体レベルで起こり、糖分子を認識して起こることを示唆している。そこで植物体内を移動するシグナル物質とその作用機構を解析した。¹⁴C-Sucrose の植物体内での移動と発光の移動はほぼ一致した。また、植物体内での糖分子の移動を経時的に調べる為に行った細胞内への糖の取り込みと共役したプロトンの移動を反映する表面電位変化の測定結果も、発光部位とほぼ一致した。

2pD02

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803における運動と形質転換に関する遺伝子の機能解析
吉原静恵、耿曉星、岡本忍、由良敬¹、郷通子¹、大森正之、池内昌彦（東大・教養・生物、¹名大・院理）

多くのシアノバクテリアは滑走運動能をもち、変動する光環境に適応している。形質転換型シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803も寒天プレート上で光に応答する運動性を示すことが知られている。一方、病原性細菌などでは、IV型線毛が twitching 運動と形質転換の両方にかかわっていることが知られており、これらに関連して *Synechocystis* sp. PCC 6803の運動にも線毛が関与しているという報告がある。本研究では、すでに決定されている *Synechocystis* sp. PCC 6803の全ゲノム情報にもとづいて、運動性や形質転換にかかわる遺伝子を探索し、その破壊株の表現型を解析した。

全ての候補遺伝子を破壊したところ、*pilA1*、*pilB1*、*pilD*、*pilM*などの破壊株で運動性や形質転換能が欠失したが、*pilA2*破壊株では大きな影響は認められなかった。さらに、これらの遺伝子の近傍のORFが運動性に必要な *pil* 遺伝子群であることが判明した。一方、タンパクの構造予測から見出された形質転換関連遺伝子 (*comE1*) の破壊株では形質転換能が著しく低下したが、運動能には影響がないことが実証された。

以上の結果にもとづいて、*Synechocystis* sp. PCC 6803の運動性と形質転換のしくみ、さらにシアノバクテリアの環境応答へのこれらの機能の関連性について議論する。

2pD03

運動性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803における新規Ser/Thr型プロテインキナーゼ様遺伝子 (*spkA*) の解析
亀井綾子、耿曉星、折川紅美、池内昌彦（東大・教養・生物）

我々はこれまでに *Synechocystis* sp. PCC 6803の運動性を示すPCC株を用いてSer/Thr型プロテインフォスファターゼモチーフをコードする *str2031* 遺伝子の破壊株の表現型を解析し、リン酸化を介したストレス応答性シグナル伝達経路の存在を示唆してきた。今回は、この *str2031* に対応するプロテインキナーゼ遺伝子を探索する目的でゲノムに存在する候補ORFの全てをそれぞれPCC株で破壊した。その結果、 Δ *sll1575* は運動性が失われ、 Δ *str2031* と同じ表現型を示した。ゲノムの塩基配列が決定した非運動性のGT (glucose-tolerant) 株の配列解析によれば、*sll1575* とすぐ上流のORF (*sll1574*) の、2つを繋げると一群のプロテインキナーゼ遺伝子に対応していた。そこで *sll1574* と *sll1575* の境界の塩基配列をPCC株、GT株、ATCC 27184株で決定した。その結果、運動性を示すPCC株では単一のORFのものが、非運動性のATCC 27184株とGT株では1塩基の挿入によって2つのORFに分かれていた。PCC株の機能性遺伝子はよく保存されたSer/Thr型プロテインキナーゼドメインを持つ522残基の産物をコードしており、*spkA* と命名した。このSpkAの質質の探索とStr2031プロテインフォスファターゼとの関連についても現在検討しているので報告する予定である。

2pD04

DNAチップを用いた *Synechocystis* sp. PCC 6803の強光誘導遺伝子群の解析
日原由香子、亀井綾子、池内昌彦（東大・教養・生物）

Synechocystis sp. PCC 6803の強光順化に関する新規遺伝子を同定する目的で、DNAチップを用いた解析を行った。20 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の弱光下で培養した野生株を、200 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の強光下に移すと、フィコシアニン関連 (*pcp*) 遺伝子群や光化学系1反応中心サブユニット遺伝子 *psaAB* 等の発現抑制、リボソーム関連 (*rpl*、*rps*)、ATP合成酵素 (*atp*)、CO₂濃縮関連 (*ccm*)、RuBisCO (*rbc*) 等の遺伝子群の発現誘導が観察された。また強光シフト後の様々な時期で強く発現する新規遺伝子が多数同定されたので、それらについて報告する。

強光下での光化学系2/系1比の上昇は、シアノバクテリアの順化応答として良く知られているが、その調節メカニズムは未だ解明されていない。強光シフト後に *psaAB* 発現の抑制が顕著に見られた上記の結果は、この発現抑制により系2/系1比が調節されていることを示唆している。そこでDNAチップを用いて、強光下での系2/系1比の上昇を行わない *pmgA* 破壊株の遺伝子発現を野生株と比較したところ、*pmgA* 破壊株では強光下での *psaA* の発現量が多いが、他の光化学系サブユニット遺伝子の発現には野生株との間で有意な差がないことが見出された。この結果は、異なる光強度下での光化学系量比が *psaA* の転写レベルによって調節されていることを強く裏付けるものである。

2pD05

ラン色細菌のヒドロゲナーゼの遺伝子分布とその遺伝子破壊の水素生産に及ぼす影響
増川一、中村賢介、持丸真里、桜井英博（早稲田大・教育・生物）

ラン色細菌の水素代謝には、ニトロゲナーゼと2種類のヒドロゲナーゼ（双方向性 Hox と取込み型 Hup）が直接関与する。ラン色細菌は一般に両方のヒドロゲナーゼを持つと考えられていたが、近年いくつかの種が Hox を欠くことが報告されている。ヘテロシストを持つラン色細菌8株について、ヒドロゲナーゼの分布を *hoxH* と *hupL* 遺伝子のサザン解析により調べた。*hupL* についてはすべての株が陽性であったが、3株は用いた *hoxH* プロンプトに対し陰性であった。現在、酵素活性測定的面からの確認をおこなっている。次に、ニトロゲナーゼによる水素発生に対するヒドロゲナーゼの影響を調べるため、*Anabaena* PCC7120 の *hupL* 遺伝子破壊株を作製し、野生株と比較したところ、*hupL* 遺伝子破壊株は野生株よりも高い水素発生活性を示した。

2pD06

ラン藻 *Synechocystis* PCC 6803 における NADPH デヒドロゲナーゼに依存する電子伝達の光誘導
米華玲, 田中義人¹, 日比野隆¹, 小川晃男², 高倍昭洋³, (中国科学院上海植物生理研、¹名城大・理工、²名大・分子応答、³名城大総合研、)

ラン藻 *Synechocystis* PCC 6803 光照射終了後クロロフィル蛍光上昇の kinetics を調べた。野生株の slow phase は光によって誘導された。人工電子受容体及び阻害剤の結果から、このような poly-phasic kinetics は NDH を経由し、異なる光還元当量からの電子によるプラストキノンの還元を反映している。光に誘導された slow phase と同様に NADPH デヒドロゲナーゼの活性及び NDH-H サブユニットの発現量は 3 時間まで光照射につれて増加した。一方、NDH-B 遺伝子欠損した変異株は野生株のような現象は示されなかった。これらの結果は NDH を経由し、プラストキノンへの電子伝達は光に誘導されたことを示した。

2pD07

ラン藻 *Synechocystis* sp. strain PCC6803 における機能の異なる複数の NAD(P)H デヒドロゲナーゼ
大河浩, 小川晃男 (名大・生物分子応答研究センター)

Synechocystis sp. PCC6803 のゲノム上には *ndhD*、*ndhF* がそれぞれ 6 および 3 コピー存在する。このことから NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (NDH-1) には異なったタイプのものがあり、機能的役割の分担がなされていると推測される。また、1 コピーしか存在しない *ndhB* 遺伝子の変異株は、CO₂ 取り込み活性を示さず、また光従属栄養条件下では生育しない (昨年度本大会で報告)。

我々は、相同性の高い *ndhD* 遺伝子同士の二重変異株を作製し、それぞれの変異株について CO₂ 取り込み活性及び様々な条件下での生育を調べた。その結果、*ndhD3/ndhD4* 二重変異株は全く CO₂ 取り込み活性を示さず、空気 CO₂ 濃度条件下で大きく生育阻害をうけたが、光従属栄養条件下では生育した。一方、*ndhD1/ndhD2* 二重変異株は、光従属栄養条件下での生育が阻害されたが、CO₂ 取り込みは野生株と同程度の活性を示した。これらのことから、*ndhD3/ndhD4* をサブユニットとする NDH-1 は、CO₂ 取り込みに必須であり、*ndhD1/ndhD2* をサブユニットとする NDH-1 は、光従属栄養での生育に必須であるということが明らかになった。このように少なくとも 2 種類の機能が異なる NDH-1 複合体が存在することが判った。

2pD08

Synechocystis sp. PCC6803 の未知遺伝子群の
欠失突然変異体の作成と機能解析
大塚雅子・菓子野康浩・小池裕幸・佐藤和彦
(姫工大・理・生命)

葉緑体の全塩基配列が、紅藻から高等植物まで全部で 14 種類の生物について決定されている。これを、全塩基配列が決定されたラン藻 *Synechocystis* 6803 のものと比較すると、約 100 種類の遺伝子が全てに共通して存在し、どれも光合成または葉緑体の維持に重要な役割を果たしている。これらの中で、複数種の葉緑体に保存されているにもかかわらず、機能が全く分からない遺伝子群がみつかり、これらは *ycf* と命名され、現在までに 80 個同定されている。*Synechocystis* sp. PCC6803 にはそのうち 50 個がコードされている。

本研究では、これらの機能を推定するために、*Synechocystis* sp. PCC6803 にある *ycf* のうち 20 個についてクローニングを行い、19 個について突然変異体を作成した。現在 10 個の segregation が完了した。作製した突然変異体は、成長の速度や細胞の色に違いがあるものが見られた。現在、phenotype のスクリーニング法を検討するとともに表現型に変化が現れたものについて解析を進めている。

2pD09

ラン藻 (*Anabaena* sp. PCC7120) ゲノムの構造解析
金子貴一、中村保一、笹本茂美、C. Peter Wolk¹、
田畑哲之 (かずさ DNA 研、¹ ミシガン州立大)

ラン藻は植物と類似の酸素発生型光合成をおこなう原核生物であり、形態的には単細胞性や糸状体を形成するものなど多様である。糸状性ラン藻の一種である *Anabaena* sp. PCC7120 は、窒素固定の場となるヘテロシストを分化させることから、その遺伝学的、生化学的研究が進められてきた。この株ではゲノム物理地図がすでに構築されており、ゲノムサイズが 6.4 Mb、3 種の巨大プラスミドを含むことがわかっている。我々は *Anabaena* sp. PCC7120 のもつ全遺伝情報を明らかにするため、全ゲノムの塩基配列解析を開始した。配列決定は全ゲノムショットガン法でおこなっている。1999 年 12 月現在、ゲノムサイズの 5.25 倍重複分のクローン末端配列の蓄積を完了し、Phrap を用いたアセンブルにより 42 のコンティグを構築することができた。本発表では配列解析の進行状況とコンティグのコンセンサス配列を用いた情報解析の結果を報告する。

Anabaena sp. PCC7120 の配列に対して、*Synechocystis* sp. PCC6803 の 3,167 のタンパク質遺伝子のアミノ酸配列を TFASTA でサーチし、類似性の高いものを検出した。その結果、翻訳アミノ酸配列の相同性が 90% 以上の遺伝子数は 15、80~90% は 120、70~80% は 312 であった。このことから、2 種のラン藻間で遺伝子配列の保存性はそれほど高くはないことが示唆された。

2pD10

シアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 の細胞外 hemolysin

桑原朋彦, 永井孝志, 汝少国¹, 加藤彰 (筑波大・生物科学, ¹青島海洋大学・海洋生命)

ある種のシアノバクテリアが銅ストレスに反応して細胞外に分泌する物質は、生態系に大きな影響を与えていることが示唆されている。そこで本研究ではゲノム構造が既に明らかにされているシアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 をモデル生物として用い、銅ストレスのもとで培養液中に分泌される物質について調べた。

培養液をカラムクロマトグラフィーにかけて銅を指標に (原子吸光分析) 精製を行い、銅結合画分を部分精製した。この画分を SDS-PAGE にかけたところ、>120 kDa および 26 kDa の 2 本のポリペプチドが検出された。高分子量のポリペプチドを N 末端アミノ酸配列分析にかけ、ゲノムデータベースと照合したところ hemolysin であることが示唆された。これは植物細胞における hemolysin の発現を示した最初の報告である。少なくともシアノバクテリアの場合には、hemolysin の生理的機能は赤血球の破壊ではないと推察される。

3aD02

多次元 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 の溶液構造解析

瀧尾昌也, 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 は細胞内の重金属イオン濃度の上昇に伴い、その発現が誘導されるメタロチオネン様タンパク質である。しかし、SmtA は真核生物のメタロチオネンとのアミノ酸の相同性が低く、1 分子あたりの重金属結合数は 3 個であるのに対し、真核生物のメタロチオネンは 5~7 個である、などの差異が見られることから、SmtA における重金属結合様式は真核生物のメタロチオネンとは異なると推測される。本研究では、SmtA と真核生物におけるメタロチオネンの重金属結合様式の差異を解明するため、安定同位体標識法を併用した多次元 NMR 分光法による SmtA の溶液構造解析を行った。

大腸菌による大量発現系を用いて、¹⁵N のみあるいは ¹³C と ¹⁵N で安定同位体標識された SmtA 標品を作製した。亜鉛イオンと結合した SmtA の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した結果、63 個のよく分離したアミド基由来のシグナルが観測された。さらに、多次元 NMR スペクトルから得られた各プロトン間の距離情報をもとに、SmtA の溶液構造決定を行い、主鎖の折たたみ構造を明らかにした。さらに、SmtA 中には重金属と結合する領域が 2 ヶ所存在し、一方には重金属イオンが 2 個結合し、他方には 1 個結合することを明らかにした。なお、重金属イオンが 2 個結合する領域においては、11 番目のシステイン残基が 2 つの金属をブリッジするように結合することを明らかにした。

3aD03

点突然変異の導入によるラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の転写因子 SmtB の塩基配列認識機構の構造化学的解析
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 の転写因子 SmtB は、二量体として機能し、金属結合タンパク質をコードする *smtA* 遺伝子の転写を抑制するリプレッサーである。SmtB が亜鉛イオンと結合し、オペレーター/プロモーター領域との親和性を失うことで、*smtA* 遺伝子の転写が誘導される。我々はこれまで、安定同位体標識法を併用した多次元 NMR スペクトルを解析し、亜鉛イオンを同定するとともに、2 つのロイシン残基が亜鉛イオンの結合により誘起される構造変化の分子内伝達に大きく関すると推定した。

本研究では、これら亜鉛イオンの配位子として機能する残基を含む、全てのヒスチジン残基とシステイン残基、および 2 つのロイシン残基を、セリン残基、またはアラニン残基に置換した SmtB を作製し、亜鉛イオンの検知能や認識塩基配列への親和性の変化をゲルシフトアッセイで解析し、各アミノ酸残基の機能を明らかにすることを目的とした。その結果、認識ヘリックス中の 78 番目のヒスチジン残基が認識塩基配列を含む DNA と相互作用すること、117 番目のヒスチジン残基が SmtB 二量体の構造の安定化に寄与することなどを明らかにした。

3aD04

藓類ネジグチゴケの銅による二つの葉緑体 SOD、Fe-SOD と CuZn-SOD の発現制御

塩野忠彦, 中田克, 鈴木崇紀, 山原俊昭, 滝尾進¹, 佐藤敏生 (広島大・理・生物科学, ¹熊本大・理・生物科学)

初期の陸上植物であるコケ植物は、陸上化に伴う酸素ストレスへの適応を考える上で重要な位置にある。コケ植物における活性酸素除去機構に関わる酵素 superoxide dismutase (SOD) に注目し、その種類と性質について調べてきた。

より体制的に高等植物に近い藓類ネジグチゴケの SOD イソ酵素の分布パターンを調べたところ、高等植物と類似していた。しかしながら、葉緑体には Fe-SOD と CuZn-SOD の二つの SOD が局在していた。この二つの葉緑体 SOD イソ酵素は培地中の銅濃度に依存して発現が制御され、培地中の銅濃度が 0.1 M までは Fe-SOD が発現し、それ以上の銅濃度では、CuZn-SOD が発現するという切り替えが起こることを認めた。ノザンハイブリダイゼーションによりこれらのイソ酵素は転写レベルで制御されることを認めた。これらの現象は、体制がより古い苔類フタバネゼニゴケには見られなかった。

3aD05

アルミニウム耐性タバコ培養細胞を用いた脂質過酸化防御機構-蛋白質の2次元電気泳動法による解析-
朝倉由香里、山本洋子、山田秀徳¹、岡本庄司、松本英明（岡山大・資生研、¹岡山大・工・生物機能）

タバコ培養細胞からアルミニウム耐性株として分離されたALT213は、脂質過酸化誘発剤に耐性を示す。本研究では、その耐性機構を解明するため、2次元電気泳動法を用い、親株より多く発現する蛋白質を2個見だし、アミノ酸の部分配列をN末端から各々15個と10個決定した。ホモロジー検索の結果、1つはミトコンドリア型の Malate dehydrogenase (MDH)、他方は Nucleotide diphosphate kinase (NDPK) IaもしくはIIと相同性が高かった。ALT213株から調製した粗抽出液におけるMDHの比活性は親株に比べて4割高く、特に親株のAl感受性期である対数増殖期において顕著であった。以上の結果より、MDHやNDPKの過剰発現がALT213株の脂質過酸化防御機構に関与している可能性が示唆された。

3aD06

Al ストレス誘導性遺伝子による耐性植物の構築
江崎文二、R.C.Gardner¹、江崎由香¹、松本英明（岡山大 資生研、¹オークランド大 ニュージランド）

我々は植物でのAl耐性機構や毒性機構を解明することを目的として、これまでに植物や酵母から単離されたAlストレス誘導性遺伝子群から耐性遺伝子のスクリーニングを試みた。

今回、8個の誘導性遺伝子をそれぞれ植物体 (*A. thaliana* Ler-0) に導入した形質転換体を構築し、Al ストレスに対する感受性試験を根の伸長率を指標にして行った。その結果、*AtBCB* 遺伝子、*parB* 遺伝子、*NtPox* 遺伝子、*NtGDI1* 遺伝子を挿入した形質転換体の根では、非形質転換体 (Ler-0) に比べて200 μ M のAl処理による伸長阻害が抑制されていた。根端部でのAl含有量を morin 染色で比較してみると非形質転換体では顕著に根端でAlの集積が観察されたのに対し、伸長阻害が抑制されている形質転換体では集積を抑えられていた。耐性株の根端ではAlの集積を抑えることで、細胞分裂部位や細胞伸長部位の機能を維持し、Alによる根の伸長阻害作用を抑えている可能性が示唆された。

3aD07

タバコ培養細胞を用いたカルシウム溶液におけるアルミニウム毒性機構の解析ならびにアルミニウム耐性細胞株の分離

山本洋子、S. Rama DEVI¹、山口雪子²、松本英明（岡山大・資生研、¹生研機構、²岡山女子短大）

植物根のAl処理液としてCa溶液が多用されている。そこで、根でのAl障害の詳細を培養細胞を用いて検討するために、タバコ細胞のAl処理をCa溶液中で行った。Al処理に伴う原形質膜損傷をEvans blueの取り込みで定量したところ、Al処理期間中(24時間)での損傷は少ないが、Al処理後の細胞を増殖培地で培養すると損傷が直ちに誘発された。一方、Al処理後の細胞を高張液に懸濁した場合も、膜損傷が誘発され、顕微鏡観察により、原形質分離が阻害された細胞の他に原形質膜と細胞壁との接着を示唆する細胞が観察された。従って、Alは原形質膜と細胞壁を接着することにより、細胞の伸長や原形質分離に伴って原形質膜損傷を引き起こす可能性が考えられた。上記のAl処理条件下で耐性を示す細胞株を分離したので、その表現型についても報告する。

3aD08

ソバにおけるアルミニウム吸収と輸送形態の同定
馬 建鋒、平館俊太郎¹（香川大農、¹農環研）

本研究はアルミニウム集積植物であるソバを用いて、根によるAlの吸収形態と根から地上部への輸送形態について検討を行った。まず、根によるAlの吸収形態を明らかにするために、50 μ MのAlCl₃と異なる比率(1:1, 1:2, 1:3)のAl-シュウ酸錯体を根に4時間吸収させ、導管液中のAl濃度を測定した。その結果、AlCl₃の形態で与えた場合の導管液中のAl濃度はいずれのAl-シュウ酸錯体で与えた場合の5倍以上であった。このことは根によるAlの吸収形態はAl-シュウ酸錯体ではなく、イオン形態のAlであることを示している。また、根によるAlCl₃の吸収速度を検討したところ、Al処理開始1時間後の導管液中のAl濃度が外液の4倍、2時間以降は外液の1.0倍近くであった。導管液中のAl濃度は処理液中のAl濃度が増加するにつれ、増加した。さらに根によるAlCl₃の吸収は代謝阻害剤のヒドロキシアミンによって阻害されず、ランタンによって著しく阻害された。根細胞中のAlの形態は1:3のAl-シュウ酸錯体と同定されている(Ma et al., 1998)。このことはアルミニウムイオンが外液と根の間の濃度勾配によって、受動的に膜通過されると推察される。また²⁷Al-NMRを用いて、導管液中のAlの形態を同定したところ、Al-クエン酸であることを明らかにした。導管液中の主な有機酸はクエン酸であった。これらのことはAlが導管へリリースされる際、Al-シュウ酸(1:3)からAl-クエン酸への変換が起こったことを示唆している。

3aD09

高等植物耐塩性機構において、液胞が果たす役割の再検討。

堀田万利子, 根本節子, 三村徹郎 (一橋大・生物)

我々は、マングロープ植物 (*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を検討している。昨年の本学会で、無塩培地で育てた細胞を 150mM NaCl 培地に移すと、1 日以内に、一過的に細胞内 Na^+ 濃度が急上昇し、その大半が液胞に蓄積すること、またこの変化に伴って、細胞体積中の液胞/細胞質体積比が 2 倍以上に増加することを報告した。我々は、高塩処理下での、短時間での液胞体積の増加は、細胞質における適溶質合成量を減少させるとともに、液胞内イオン濃度を低下させることで液胞へのイオン輸送を容易にする、植物細胞の新しい耐塩性機構として理解すべきであると考えている。

本研究では、この塩処理に伴う短時間での液胞体積の変化を一個の生細胞レベルで連続観察できたので報告する。また、この変化は液胞内タンパク質である酸性ホスファターゼ活性や液胞膜タンパク質である H^+ -ATPase 活性の増大を伴うことから、液胞が能動的に増大して、耐塩機構に積極的に関与していることを示唆している。同様の現象が、その他の高等植物でも生じるかを検証したので、それについても合わせて報告する。

3aD10

アラビドプシス K^+ トランスポーターの塩ストレス下でのイオン吸収制御

長岡修一, 高野哲夫 (東大・アジアセンター)

カリウムは植物の生育に不可欠な栄養素であり根においてトランスポーターを介して吸収されている。一方、植物が塩ストレスを受けた際にはこの K^+ トランスポーターを通して細胞内への Na^+ 流入が起こっている。

そこで本来の K^+ トランスポーターを欠失した酵母 (*trk1* Δ *trk2* Δ) と、トランスポーターに加えカルシニューリン (CaN) を欠失した酵母 (*trk1* Δ *trk2* Δ *can* Δ) を作製した。これらの酵母にアラビドプシス由来の K^+ トランスポーターを導入し塩ストレスを与え細胞内のイオン含量を原子吸光度計で測定した。その結果 *trk1* Δ *trk2* Δ *can* Δ では *trk1* Δ *trk2* Δ に比べ約二倍の Na^+ 吸収量を示した。また K^+ 吸収量についても *trk1* Δ *trk2* Δ に比べ *trk1* Δ *trk2* Δ *can* Δ ではストレス直後からの急激な吸収量の低下が見られた。

3aD11

マングロープの新規耐塩性強化因子「マングリン」の機能領域
山田晃世, 齋藤丈夫, 三村徹郎¹, 小関良宏 (農工大・工・生命, 1-一橋大・商・生物)

マングロープとは、熱帯、亜熱帯の沿岸域に生息する樹木類の総称である。マングロープは進化の過程で他の高等植物とは異なる特殊な耐塩性機構を獲得したのと考えられる。本研究では、三村博士らが確立したマングロープ植物の一種である *Bruguiera sexangula* の培養細胞系から、マングロープ cDNA ライブラリーを構築し、この中からマングロープの耐塩性に関与する遺伝子を獲得することを目指した。大腸菌にマングロープ cDNA ライブラリーを導入し、その形質転換体の耐塩性を指標とした機能スクリーニングを行った結果、大腸菌の耐塩性を強化する機能を有する cDNA の単離に成功した。この cDNA の全塩基配列を解析した結果、長さが 1018 bp であり、この中に 141 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが明らかになった。相同性検索を行ったところ、現在相同性を有するタンパク質がデータベース (PIR, SwissProt) 上に登録されていないことが明らかになった。そこで、我々はこの cDNA がコードする新規タンパク質を「マングリン (Mangrin)」と命名した。さらに、本研究ではマングリン cDNA の欠失変異体を作製し、変異 cDNA の大腸菌における耐塩性の有無を調べることで、マングリンの耐塩性に関与するアミノ酸配列領域を決定した。

3aD12

マングリン組み換え酵母、及び植物における耐塩性の発現
齋藤丈夫, 山田晃世, 三村徹郎¹, 小関良宏
(農工大・工・生命, 1-一橋大・商・生物)

マングロープ (*B. sexangula*) cDNA ライブラリーから得られたマングリン cDNA は、大腸菌の耐塩性を強化する機能を有する事が既に前演者により示されている。しかしながら、マングロープ培養細胞の耐塩性とマングリンの発現の関連は明らかになっていない。また、真核生物におけるマングリンの耐塩性強化機能は確認されていない。そこで、本研究ではマングロープ培養細胞におけるマングリンの発現に対する NaCl の影響を明らかにし、さらにマングリン cDNA を酵母、タバコ培養細胞、及びタバコ植物体で発現させ、それぞれの形質転換体の耐塩性を評価した。ノーザン解析により、マングリンの発現に対する NaCl の影響を評価した結果、マングリンは NaCl の添加の有無にかかわらず恒常的に発現し、特に NaCl 添加により増大する事が明らかになった。次に、マングリン cDNA をタバコ培養細胞に導入しその耐塩性を評価した結果、マングリン cDNA を導入した形質転換培養細胞を 150 mM の NaCl を含む培地で培養した場合、コントロールと比べ、顕著な生育促進効果が見出された。同様な結果は、マングリン cDNA を導入した酵母、及びタバコ植物体においても観察された。これらの結果から、マングリンは、原核生物から酵母、高等植物に至る、幅広い生物群の耐塩性を強化する機能を有するものと考えられた。

3aD13

マングローブの伸長因子 eEF-1A の NaCl に対する特異的性質
佐野えみ子、山田晃世、齋藤丈夫、三村徹郎¹、小関良宏
(農工大・工・生命、¹一橋大・商・生物)

当研究室では大腸菌を利用した耐塩性因子の機能スクリーニング法を確立し、それを用いてマングローブ (*B. sexangula*) cDNA ライブラリーから耐塩性因子をコードする cDNA の探索を進めている。その結果、新たに前演者が示したマングリン cDNA (1.0 kb) と異なる、長さ 1.7 Kb の cDNA に大腸菌の耐塩性を強化する機能を有することが確認された。この cDNA の全塩基配列を決定し、相同性検索を行ったところ、高等植物の eEF-1A cDNA と高い相同性 (90% 以上) を有した。マングローブ eEF-1A cDNA の GTP 結合領域に変異を導入し、その耐塩性強化機能を評価した結果、GTP 結合領域に変異を導入した cDNA の耐塩性強化機能は明らかに低下し、その機能が働くためには GTP との結合が必要であると考えられた。次に、PCR 法によりマングローブ eEF-1A cDNA とアミノ酸レベルで 94% の相同性を有するアラビドプシス eEF-1A cDNA を単離し、その耐塩性強化機能を解析した結果、アラビドプシスの eEF-1A cDNA には大腸菌の耐塩性を強化する機能は全くみられなかった。このことから、eEF-1A の耐塩性強化機能はマングローブ eEF-1A に特異的に存在し、マングローブの耐塩性に深く関与するものであると考えられた。

1aE01

ジャガイモ植物における Sesquiterpene Cyclase 遺伝子の単離

口村和男, 山田直史, 道家紀志, 吉岡博文 (名大・院・生農)

Sesquiterpene cyclase (SC) はセスキテルペン合成経路の上流に位置し、ジャガイモのファイトアレキシンであるリシチン生成の鍵酵素であると考えられている。SC の発現動向を解析する目的で、タバコ SC cDNA をプローブに使い、ジャガイモ cDNA ライブラリーより cDNA の単離を試みた。得られた SC cDNA の推定アミノ酸配列は、ソラベチボンの前駆体を合成する *Hyoscyamus muticus* の vetispiradiene synthase (VS) と高い相同性を示した。菌体壁成分エリター (HWC)、アラキドン酸およびサリチル酸処理を施したジャガイモ塊茎より 12 時間後まで全 RNA を抽出してノーザン解析した結果、HWC 処理区で著しい発現誘導が観察された。VS 遺伝子は多重遺伝子族 (VS1~VS4) を形成している。本遺伝子の詳細な制御機構を探る目的で VS1 および VS4 のゲノムクローンを単離し、解析を進めている。

1aE02

NASBA を用いた RNA サブトラクション：特異的に存在する RNA の解析法

中原健二, 吉田幸二¹, 北川良親 (秋田県立大・生工研, ¹果樹試リンゴ)

組織特異的に存在する RNA を調べる新しい方法を考案した。本法は RNA 増幅法 NASBA とサブトラクティブハイブリダイゼーションを組み合わせたことを特徴とする。NASBA は、1 本鎖 RNA を鋳型にして主に 1 本鎖の短鎖 RNA (<300 塩基) を増幅する。この特徴を利用して 2 つの組織 (tester と driver) の RNA 群を鋳型に、tester の相補 RNA 群と driver の相同 RNA 群を増幅する。それらの 1 本鎖の短鎖 RNA 間でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッドを形成しなかった tester 由来の RNA 群のみを NASBA により増幅してクローニングする。本法は従来の cDNA サブトラクション法に比べ (1) 鋳型 RNA 試料がより少なくすむ、(2) より高率に特異 RNA の単離ができる、(3) 低発現量の遺伝子の単離が期待できる等の利点がある。

本法のモデル実験としてキュウリモザイクウイルス (CMV) 感染トマトから、特異に存在する CMV ゲノムの部分配列をクローニングした。

1aE03

植物における二本鎖 RNA 結合タンパク質の同定
相澤大輔, 福原敏行 (東京農工大・農・細胞分子)

二本鎖の RNA に特異的に結合するタンパク質はヒトからショウジョウバエ、さらには大腸菌に至る様々な生物内で見つかっているが、植物においてそのような報告はまだない。これらのタンパク質には約 70 アミノ酸からなる二本鎖 RNA 結合モチーフが保存されているので、シロイヌナズナとイネのデータベースからこのモチーフを持つタンパク質を検索したところ、シロイヌナズナで 3 つ、イネで 2 つの遺伝子が類似性を持っており、我々はそれぞれに *Adb1*, *Adb2*, *Adb3*, *Odb1*, *Odb2* と名前をつけた。我々は分子生物学的手法を用いて、少なくとも ADB1 と ODB1 は二本鎖 RNA に特異的に結合し、さらに RNA レベルで発現していることを確認した。これらのタンパク質の働きはまだわからないが、二本鎖 RNA と結合するという性質から、RNA ウイルスに対する生体防御反応、あるいは転写後抑制型のジーンサイレンシングに関係していることが期待される。

1aE04

汎用型 X-band ESR 装置を用いた植物の *in vivo* ESR 計測
白石卓夫¹, 青山正明^{1,2}, 大矢博昭^{1,2}, 鎌田仁² (1 科技団、²生物ラジカル研究所)

植物が外部からの刺激に応じて生成する活性酸素・ラジカルを生理的条件下で観察することは、植物の環境ストレス応答のメカニズムを解明する上で必須の技術である。ラジカルの検出には電子スピン共鳴 (ESR) 計測が有効な手段であるが、標準的な X-band ESR 装置では、測定対象は葉の切片・切り離れた葉に限られ給水が出来ないため、生理的条件下での ESR 信号の観察は不可能であった。今回、我々は測定用セルを工夫し、汎用型 X-band ESR 装置で生葉の ESR 信号を計測した。

測定試料として、トネアサギ (枝先端から 1~2 枚目の葉を枝に繋がった状態)・イネ (3~4 週目の全個体) を用いた。新しく考案した測定セルを用いて、給水・通気しながら ESR 信号を観察した。光障害条件として 10 mM Paraquat を吸わせた後に光照射 (500 W m⁻², >440 nm) をしながら ESR 測定を行った。

給水部から植物に取り込まれやすい水溶性スピンプローブ (Glucose-TEMPO) を吸わせることにより、葉でのプローブの増加に伴う ESR 信号の増大が観察された。また、ストレスのモデルとしての Paraquat 存在下での強光照射実験によって、Ascorbate radical の ESR 信号を検出した。植物へのスピンプローブの導入・ストレス処理による葉での ESR 信号の変化を、汎用型 X-band ESR 装置でリアルタイム観察する事が可能となった。

1aE05

タバコ葉に存在する複数のCa²⁺依存性プロテインキナーゼ
岩田由紀子¹, 小内清², 小島久恵¹, 大藤雅章², 中村研三^{1,2}

(¹名古屋大・生命農・生化、²基生研・発生生物)

我々は先に、タバコ葉でのショ糖による遺伝子発現の誘導には細胞内Ca²⁺濃度の上昇とCa²⁺依存性プロテインキナーゼ(CDPK)が関与している可能性を示した。また、CDPKで保存性の高い領域のRT-PCRによって、タバコ葉では少なくとも8種類のCDPKが転写されていることを明らかにしている。

糖による遺伝子発現制御へのCDPKの関与を検証するために、ショ糖処理したタバコ葉のcDNAライブラリーから多数のCDPK cDNAのクローニングを行い、7種類のCDPKをコードするほぼ全長のcDNAを単離・同定した。これらはN末端に類似性の低い様々な長さのアミノ酸配列を持つが、触媒領域の相同性から4つのグループに分類できる。そのうちの1つのグループに属する3種類のアイソザイムは、触媒領域だけでなくN末端の多様性に富む領域のアミノ酸配列も類似しており、3種類ともN末端ミリスチル化モチーフ(M-G-X-X-S)を持っていた。これらのCDPKのうち糖シグナル伝達に関わるものを検索するため、多様性に富む5'領域をプローブに用いてアイソザイム特異的なノーザン解析及び定量的RT-PCRを行い、糖誘導性や器官別発現パターンの解析を行った。また、クローニングしたCDPK cDNAをアンチセンス方向に発現する形質転換植物の作出と解析を進めている。

これらの結果から、植物のシンク器官の成長・発達におけるCDPKを介した糖シグナリングについて考察する。

1aE06

ニチニチソウ培養細胞のAOXとPALのサリチル酸での発現誘導の比較

清田誠一郎、矢崎芳明、坂野勝啓(農水省・生物研)

Alternative oxidase(AOX)は、シアン耐性呼吸の末端酸化酵素である。その役割について、近年、耐病性、ストレス耐性との関わりが注目されている。我々は、AOXが、細胞内pH調節機構や2次代謝産物の合成調節を通して、ストレス耐性に関わっているのではないかと考え研究をすすめている。サリチル酸(SA)によるAOXの発現誘導については多くの報告があるが、詳細についてはよくわかっていない。我々は、NMRを用いてSAによって、ニチニチソウ培養細胞の細胞質pHが、低下することを見出している。今回は、phenylalanine ammonia lyase(PAL)と比較検討をしたので報告する。PALも、細胞質pHの酸性化によって発現誘導される。(南栄一ら、1998)。

植え継ぎ後3日目のニチニチソウ培養細胞にSAを与えてmRNAの継時変化を調べた。AOXのmRNA量は、終濃度0.1mMのSA添加によって顕著に誘導され、12時間くらいでピークに達した。それに対して、0.01mMでは、測定をした24時間目くらいまでゆっくり増加したが、量は少なかった。一方、PALは、0.1mM、0.01mM両方の場合とも、6-12時間目にピークを迎える同様な傾向を示した。ただし、発現量は、添加前に比べて2倍程度であった。現在、細胞内pHとの関連を調べるために、プロピオン酸添加の影響についても検討中である。また、SA添加によって細胞内のデンブリン顆粒の消失が観察された。これとの関連についても検討中である。

南栄一、Da-Yao He、矢崎芳明、高井亮太、長谷川宏司、西沢洋子、坂野勝弘、渋谷直人 第20回糖質シンポジウム講演要旨集 1998

1aE07

シロイヌナズナの低シアノアラニン合成酵素変異体

山口夕、中村達夫、佐野浩 (奈良先端大・遺伝子教育研究センター)

青酸イオンは生物に対して毒性を示すが、ある種の植物は草食動物などから身を守るためにそれを積極的に利用する。植物体内では青酸イオンは、青酸配糖体の分解産物、あるいはエチレン合成の副産物として生産される。青酸イオンを代謝し、解毒する酵素としてシアノアラニン合成酵素が知られている。シアノアラニン合成酵素は、青酸イオンとシステインをシアノアラニンと硫化水素に変換する。

私達は、シロイヌナズナよりシアノアラニン合成酵素遺伝子(AtcysC1)を単離し、特徴付けを行った。また、ミトコンドリアに局在することを確認した。さらに、大腸菌での発現タンパク質を用いて酵素化学的解析を行った。AtcysC1の塩基配列を利用してT-DNA挿入変異株の選抜を行ったところ、開始メチオンンより151塩基上流にt-DNAが挿入された変異株(cysc1)が得られた。発芽後2週間の変異株では、野生株に比べて内在性のシアノアラニン合成酵素活性が約20%にまで低下していたが、通常環境では正常に生育した。現在、KCNに対する応答やエチレン合成に及ぼす影響を検討中である。

1aE08

低線量放射線照射によるイネ初期生育の促進

宮原研三 (農水省・生物研)

低線量の放射線照射に植物の生育促進効果があるという報告は、これまでにいくつかあるものの統計的解析が不十分であったり、生育後期の形質を指標としたため再現性が低かったりするものが多い。そこで、本報告では、様々な管電圧の軟X線、および60Co γ 線照射をイネ種子に照射し、生育度を示す指標のうち最も直接的な初期の草丈について測定し低線量放射線照射の生育促進効果を解析した。その結果、0.1Gから100Gyまでの処理区のうちいくつかで、統計的に有意な草丈の伸びが観察された。また、この草丈の増加について放射線の線質による差異も見いだされた。一方、初期生育の促進が見られた線量区でも成熟期における最終的なかん長、穂数、種子稔性は無照射区と比較して有意な差はみられなかった。現在、温度、光等の生育条件がこの様な初期生育促進効果におよぼす影響、ならびに放射線照射によって誘発される活性酸素の関与について検討を行っている。

1aE09

アスコルビン酸合成に関与する遺伝子

AtGLD1の構造と発現解析

玉置雅紀、朴素弘¹、中嶋信美、久保明弘、青野光子、佐治光
(国立環境研究所、¹ ソウル市立大学)

植物のアスコルビン酸はこれを合成することができないヒトや一部の動物の主要な供給源となっており、また、光化学オキシダントの取り込みにより生成する各種活性酸素分子種の消去に重要な役割を果たしている。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L-Galactono- γ -Lactone Dehydrogenaseをコードする遺伝子AtGLD1を単離し、その発現解析を行った。AtGLD1のcDNA及び染色体遺伝子の一次構造を調べたところこの遺伝子は、5つのエキソンより構成され、610残基のアミノ酸をコードしていることが明らかになった。この遺伝子の発現の日周変化を調べたところこの遺伝子の発現は明期に上昇し、暗期に減少した。この時の植物におけるアスコルビン酸含量の増減はAtGLD1の発現に対して遅れることから、AtGLD1の転写がアスコルビン酸合成の律速になっている可能性が示唆された。前大会(1999年度年会)で、報告した異なるエコタイプ間(ColとWs)におけるこの遺伝子の発現と活性酸素ストレス耐性との関係についての詳細な解析結果、及びこの遺伝子の発現量を改変した遺伝子組換え体についての解析結果も合わせて報告する。

1aE10

アラビドプシスRad51ファミリータンパク質をコードする遺伝子群の解析

刑部敬史^{1, 2}、清水武史^{1, 2}、市川裕章²、土岐精一²

(1. 生物系特定産業技術研究推進機構、2. 農林水産省、農業生物資源研究所)

真核生物における遺伝子相同組み換えはRad52経路に属するタンパク質群(Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11, Xrs2)を介して行われ、減数分裂期の相同染色体分配や放射線等によるDNA損傷の修復に重要な役割を果たし、ひいては染色体の安定性に深く関与している。Rad52経路の中で大腸菌RecAホモログであるRad51はDNA鎖相同検索-交換反応という中心的な役割を担っている。しかしRad51自身のDNA鎖交換反応はRecAのそれに比べて弱いものであり、酵母や哺乳動物ではRad51と弱い相同性を示すRad51ファミリータンパク質群(Rad55, Rad57, Xrcc2, Xrcc3等)がRad51と協調して働くことによってその機能を補完していると考えられている。

今回、我々はデータベース検索によりアラビドプシスのゲノム中にRad51ファミリーに属すると考えられる3つの候補遺伝子(それぞれAtRad51H1, AtRad51H2, AtRad51H3と命名)を見い出した。これらをPCR法によりクローン化し塩基配列を決定した。それぞれのcDNAから予想されるアミノ酸配列はアラビドプシスRad51と25-30%の相同性を示し、特にヌクレオチド結合コンセンサス配列近傍は非常に高い保存性が認められた。また半定量的なRT-PCR分析により、AtRad51H1及びAtRad51H2の発現はガンマ線照射によって誘導されることを確認した。このことはAtRad51H1及びAtRad51H2がDNA損傷の修復に関与していることを示唆するものである。現在、詳細な発現機式の解析や生化学的な解析を進めている。

本研究は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた。

1aE11

HPLC DETECTION OF ANTIBIOTICS IN NECTAR AND HONEY - IN AND AROUND THE SOUTHERN PART OF TAMIL NADU, INDIA

Jebakumar Solomon, R. D and Sathiesh Kumar, T.
Department Of Molecular Microbiology, School Of Biotechnology, Madurai Kamaraj University, MADURAI-625021, India

We have developed a sensitive method of detection of antibiotics in natural honey available in the southern part of Tamilnadu, India. Majority of the farm land is crowded with plantations such as coconut, banana and rubber. A variety of antibiotics have been used up in these plantation crops to control bacterial diseases to generate high production. High level contamination chain: pollen, nectar, honey bee and finally 'carry-over' of antibiotics into the honey is possible here. We have collected nectar samples from banana and rubber flowers and also honey from bee hives set up in plantations for collecting natural honey in the same area where banana and rubber are cultivated. The extracted nectar and honey samples are subjected to HPLC analysis using reversed-phase column (C₁₈) with authentic antibiotics standards. Samples collected from rubber nectar and honey showed 10-15, 35-50 ng/gm of streptomycin and 12-20, 40-65 ng/gm of ampicillin. Nectar and honey from banana showed 18-20, 45-70 ng/gm of streptomycin and 22-25, 55-80 ng/gm of ampicillin. Further related work is going on in our laboratory.

1aE12

瀬戸内海で採取された有毒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、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、赤潮の予知、防除法の開発が求められている。しかし、その基礎となる分類は、これらプランクトンの形態的特徴に基づいており、あいまいな点が多く残されている。

そこで本研究は、リボソームRNA(rRNA)遺伝子領域を用い、瀬戸内海沿岸域で採取された主要な赤潮を引き起す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。

瀬戸内海沿岸域で採取された赤潮プランクトンを用い、18S rDNA及び28S rDNA D1/D2領域をターゲットにしたPCR産物の塩基配列を決定した。これらの塩基配列を基にした分子系統樹を作成したところ、形態学的特徴により分類された近縁種は、ほぼ同じ位置に分配されることが示された。

そこで、これらの塩基配列を基に種特異的なPCRプライマーとして有効な領域を検索した。その領域からPCRプライマーを作成し、これを用いて高感度の種識別ができるか検討を行った。

1pE01

植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* 各病原型の harpin の構造及び機能解析

田中 暎, 田口富美子, 木下さゆり, 中田秀毅, 一瀬勇規, 豊田和弘, 白石友紀, 山田哲治 (岡山大・農)

Pseudomonas syringae の非宿主植物に過敏反応 (HR) を誘導する因子として harpin が知られている。harpin は、glycine に富み、cysteine を持たない熱に安定な分子量 35kDa 程度の細胞外分泌性のタンパク質である。harpin の(非)病原性における機能解析に向け、*P. syringae* の 4 病原型 (pv. *pisi*, *tomato*, *glycinea*, *tabaci*) の *hrpZ* 遺伝子を単離した。DNA 及び推定アミノ酸配列は互いに高い相同性を示したが、pv. *tabaci* の *hrpZ* 遺伝子は他の菌と異なり、中央部に 320bp の欠失が認められた。大腸菌で発現させた各々の harpin でタバコに処理すると、非病原菌 (pv. *pisi*, *glycinea*, *tomato*) 由来の harpin は 24~48 時間以内に HR を誘導したが、病原菌 (pv. *tabaci*) 由来の harpin_{Psta} は HR を誘導しなかった。これらの結果は、harpin_{Psta} の構造上の欠失が HR 誘導能力の欠失に関与していることを示唆する。

1pE02

イネ培養細胞は *Pseudomonas avenae* のフラジェリン分子を特異的に認識することによって抵抗性反応を誘導する

蔡 見植, 中島芳浩, 吉田朋美, 田中則子, 高山誠司, 磯貝 彰 (奈良先端大・バイオ)

単子葉植物を宿主とする植物病原細菌 *Pseudomonas avenae* の菌株間には厳密な宿主特異性が存在する。我々はこれまで、非親和性菌をイネ培養細胞に接種すると過敏細胞死を始めとする抵抗性反応が引き起こされるが、親和性菌ではこのような抵抗性反応が誘導されないことを明らかにした。今回このような抵抗性反応誘導に関与する認識物質を明らかにしたので報告する。非親和性菌に対する抗血清を親和性菌で吸収して作成した特異的抗体を用いて検出した 50 kDa のバンドの N 末端配列解析を行ったところ、このタンパク質は鞭毛構成タンパク質フラジェリンであることが明らかになった。そこで、精製した親和性、非親和性菌のフラジェリンをイネ培養細胞に加えたところ、非親和性菌のフラジェリンのみで過敏細胞死が誘導された。次に、フラジェリンが認識と抵抗性誘導に関わる因子であることを直接証明するために、非親和性菌である N1141 株および親和性菌である K1 株のフラジェリン欠損株を作成し、イネ培養細胞に接種した。その結果、イネ培養細胞に N1141 フラジェリン欠損株を接種しても野生株で見られるような過敏細胞死の誘導、核 DNA の断片化および抵抗性関連遺伝子 *EL2* の発現は認められず、K1 フラジェリン欠損株も野生株と同様に抵抗性反応を誘導しなかった。以上の結果より、植物はフラジェリンを特異的に認識し、一連の抵抗性反応を誘導することが明らかとなった。

1pE03

植物病原細菌 *Pseudomonas avenae* によって誘導されるイネ過敏細胞死の機構解析

田中則子, 金田隆志, 海老瀬速雄, 高山誠司, 蔡見植, 磯貝彰 (奈良先端大・バイオ)

我々はこれまでに、植物病原細菌 *Pseudomonas avenae* のイネ非親和性菌がイネ培養細胞に核 DNA の断片化や動物のアポトーシスに特徴的な形態変化を伴う過敏細胞死を誘導することを明らかにし、昨年までの本学会で報告した。今回、この過敏細胞死のシグナル伝達機構について解析したので報告する。*P. avenae* イネ非親和性菌により誘導される細胞死に対する各種阻害剤の影響を調べた。その結果、NO Synthase 阻害剤、NADPH Oxidase 阻害剤、DNase 阻害剤によって、細胞死が抑制されることが明らかになった。そこで、NO と H₂O₂ の経時的発生を DAF-2 とジアミノベンジジンを用いてそれぞれ測定したところ、非親和性菌を接種した細胞で 6 時間前後から NO 及び H₂O₂ の発生が増加することが明らかになった。これは *P. avenae* の非親和性菌によって誘導される過敏細胞死に NO と H₂O₂ が関与することを示唆する。また DNase の活性染色を行ったところ、非親和性菌接種後 6 時間から活性化される約 35 kDa のタンパク質が存在することがわかった。この結果は過敏細胞死誘導に DNase の活性化も関与することを示唆する。

1pE04

Pseudomonas avenae の非親和性菌株によって活性化される caspase-like protease の解析

金田隆志, 田中則子, 高山誠司, 蔡見植, 磯貝彰 (奈良先端大・バイオ)

Pseudomonas avenae は単子葉植物を宿主とする植物病原菌である。我々はこれまで、イネに対して非親和性の N1141 菌株がイネ培養細胞に過敏細胞死を誘導し、この誘導に様々なプロテアーゼの関与を明らかにしている。今回、動物のアポトーシス誘導に必要な caspase がこの細胞死誘導に関与しているかどうかを調べた。

イネ培養細胞に *P. avenae* N1141 菌株 (非親和性) を接種し、細胞内の caspase 活性を合成基質を用いて測定した。その結果、非親和性の N1141 菌株を接種した細胞では 2 時間後に合成基質の分解活性の上昇が認められ、細胞死誘導時に caspase-like protease が特異的に活性化されることが示唆された。そこで、非親和性菌株の接種によって特異的に活性化される caspase-like protease を zEK(bio)D-aomk でラベルし、SDS-PAGE でそれぞれのバンドを分離した後、ラベルされたタンパク質を解析した。その結果、32kDa のバンドが特異的に活性化されることが明らかになった。以上の結果は、N1141 菌株によって誘導される過敏細胞死に 32kDa の caspase-like protease が関与する可能性を示している。

現在、この Caspase-like protease の精製を試みている。

1pE05

ハクサイにおけるネコブ病(*Plasmodiophora brassicae*)に対する抵抗性反応

今西俊介、平井正志、釘貫靖久¹ (野菜・茶試・野菜育種・育種法、¹野菜育種・アブラナ科)

ネコブ病(*Plasmodiophora brassicae*)はアブラナ科野菜の重要土壌病害で、一度発病すると休眠胞子の状態で長く土壌中で存在し続けるため耕種的防御が非常に困難である。また、薬剤防除にも限界があり、抵抗性品種の育成が強く望まれる。これまでヨーロッパの飼料用カブを抵抗性素材としたハクサイのネコブ病抵抗性品種 (CR) が育成されてきたが、これらの栽培が普及するとともに、CR 品種が罹病化する事例が知られるようになり、罹病化領域は次第に広がる傾向にある。

我々は病原菌の病原性とハクサイの抵抗性の分化機構を解明することを目的として、各地で採取された菌に対する市販の CR F₁ ハクサイ品種の抵抗性反応の品種間差異を検討した。その結果ハクサイ 3 品種により明確に反応性を区別できる 4 菌の組み合わせを見いだした。さらにそれらの菌から単体休眠胞子由来の菌株 (SS) の単離を試み、反応性の異なる 3 菌株を得、各ハクサイにおける反応を解析している。

1pE06

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 Bc2 の解析

松下保彦、出口雅一、宮川織恵、西口正通¹、丹生谷 博 (東京農工大・遺伝子、¹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、宿主特異性に参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的し、移行蛋白質と相互作用する植物側因子の検索を行っている。この目的で、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、アブラナ科植物の発現 cDNA ライブラリーを検索し、これまでに、3 種類の候補クローンを得ている。このうち、移行蛋白質と最も強い結合を示したクローン Bc2 の産物は、シロイヌナズナで報告されている転写コアクティベーター K_{ELP} とアミノ酸レベルで 75% 一致していた。Bc2 産物は、ToMV だけでなくキュウリモザイクウイルスのような他の植物ウイルスの移行蛋白質とも結合し、さらに、Bc2 産物自身とも結合した。現在、宿主のタバコ由来の発現 cDNA ライブラリーの検索も行っているため、その結果もあわせて報告する。

1pE07

葉緑体 FtsH タンパク質の減少はタバコモザイクウイルス感染で誘導される過敏反応を加速させる

瀬尾茂美、大橋祐子 (農水省・農業生資研, JST・CREST)

病原体感染細胞の積極的な自滅死は過敏反応 (HR) と呼ばれ、病原体を病斑内に封じ込めるための植物版プログラム細胞死と考えられる。我々は、タバコモザイクウイルス (TMV) に感染した抵抗性遺伝子 *N* を持つタバコを用いて、HR 機構の分子レベルでの解明を目指し、病斑が出現する前にその転写産物量が減少する、タバコ遺伝子、*DS9* を単離した。*DS9* 遺伝子産物は、AAA スーパーファミリーに属する FtsH メタロプロテアーゼのホモログであり、葉緑体のチラコイド膜に局在することがわかっている。組み換え *DS9* タンパク質は、大腸菌 FtsH と同様、Mg²⁺依存性の ATPase 活性と Zn²⁺依存性のカゼイン分解活性を示した。ウエスタン分析により、*DS9* タンパク質は健全葉で多量に蓄積しているが、病斑出現前に減少することがわかった。*DS9* タンパク質量が野生型タバコに比較して減少している形質転換タバコでは、TMV 感染で誘導された病斑の直径が小さく、増加しているタバコでは、TMV が拡がり易く、結果大サイズの病斑が形成された。また、単離したチラコイド膜を用い、病斑出現前に電子伝達が阻害されることが判明した。これらの結果は、*DS9* タンパク質がある閾値以下に減少することにより葉緑体の機能が損失し、このことが HR を加速させることを示唆する。

1pE08

タバコ培養細胞においてエリシチンにより誘導される防御応答経路の解析

笹部美知子、竹内香純、Sophien Kamoun¹、一瀬勇規、豊田和弘、白石友紀、山田哲治 (岡山大学・農、¹Ohio State Univ.)

多くの *Phytophthora* 属菌により分泌されるエリシチンは、非宿主に対して著しい HR を誘導するタンパク質エリシチンとして知られている。大腸菌で発現させた *P. infestans* のエリシチンをタバコ懸濁培養細胞に処理すると、oxidative burst、防御遺伝子の発現と共に、アポトーシス様のゲノム DNA のラダー化を伴う細胞死が誘導された。シグナル伝達系の各種阻害剤を用いてエリシチンによる細胞死と他の防御応答の発現に対する影響を調べた結果、細胞死、oxidative burst はいずれも Ca²⁺ を必要とすること、また protein kinase の活性化が防御遺伝子の発現を含む全ての応答に必須であることが示された。しかし、O₂、H₂O₂ 等いずれの活性酸素種の生成を抑制しても、細胞死及び防御遺伝子発現には影響を与えなかったこと、細胞死が抑制される系においても防御遺伝子発現は誘導されたことなどから、それぞれのシグナル伝達経路は一部同様のシグナル分子の活性化を必要とするものの、かなり上流で分岐した独立した経路であることが示唆された。

1pE09

タバコ植物の病害ストレス誘導性遺伝子群の発現解析

竹本大吾、林 誠¹、道家紀志、西村幹夫²、川北一人

(名大院・生命農学・資源生物機能、¹東北大院・農・応用生命科学、²基生研・細胞生物)

植物は病原菌の攻撃に対して様々な動的抵抗反応を發動し、抵抗性を獲得している。これら抵抗反応の多くは新規の遺伝子発現を伴った現象であると考えられている。

タバコ葉を *Phytophthora infestans* 菌体壁成分エリシター (HWC) で処理すると、各種 PR-タンパク質の蓄積や細胞死などの防御応答が観察される。そこで、このモデル系を用いてタバコ植物の病害ストレス誘導性遺伝子の単離を試みた。水処理および HWC 処理タバコ葉より、Subtraction 法を用いてエリシター誘導性 cDNA ライブラリーを作製した。タバコ葉に非病原性細菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) を接種し、遺伝子の発現を調べたところ、転写制御因子、細胞壁タンパク質、PR-タンパク質遺伝子など病原菌接種誘導性の既知遺伝子と同一性を示す遺伝子、あるいは機能不明の遺伝子など多数の遺伝子の発現誘導が認められた。さらに傷害、ジャスモン酸、サリチル酸処理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、発現パターンを比較を行った。先に単離したエリシター誘導遺伝子群¹⁾の解析の結果も併せて報告する。

¹⁾ 日本植物生理学会 1999 年度年会講演予稿集 p.203

1pE10

TMV に応答する WRKY 転写制御因子の機能解析

小川幹弘、依田寛、草野友延、佐野 浩 (奈良先端科学技術大学院大学、遺伝子教育研究センター)

生物は様々な環境ストレスにさらされている。動物のように移動できず、免疫系も持たない植物は、病原体に対して動物と異なる防御システムを発達させてきた。タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) はタバコモザイクウイルス (TMV) の感染に対し、過敏反応 (HR) を起こすことで TMV に対して抵抗性を示す。本研究ではこの防御システムを調べるために、蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ法により TMV に応答する遺伝子の単離を行った。いくつか得られた cDNA の一つである A3 遺伝子は、TMV 認識後 3 時間以内に mRNA 蓄積量が増大した。A3 は 258 アミノ酸をコードし、病原体や様々なストレスのシグナル伝達に関わると考えられている WRKY 転写制御因子タンパク質と高い相同性を示した。サリチル酸処理によっても一過的に A3 mRNA 蓄積量が増大した。GFP を用いた解析から、A3 タンパク質は核に局在することが分かった。

1pE11

GENES CONTROLLING CYTOTOXICITY OF PN-AMPS, PLANT ANTIFUNGAL PROTEINS FROM SEEDS OF MORNING GLORY

Dae-Jin YUN, Ja Choon KOO, Bo Young LEE, Ji Young LEE, Dong Jin SHIN, and Moo Je CHO *Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, and Department of Molecular Biology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*

Nonenzymatic chitin-binding lectins are carbohydrate-binding proteins that contain chitin-binding domain, so-called "hevein domain", consisting of 40 to 43 amino acid residues. Recently, we purified two novel hevein-like peptides, Pn-AMP1 and Pn-AMP2, from seeds of morning glory (*Pharbitis nil* L.). The proteins exhibited a potent antifungal/antimicrobial activity *in vitro* against a broad range of fungi, including several plant pathogens. The transgenic tobacco plants expressing a Pn-AMP exhibited resistance to *Phytophthora parasitica*, demonstrating that Pn-AMPs can be used as a source of resistant to fungal infection.

To study the mechanism of toxicity of Pn-AMPs, we began a search for a biological system that would allow the genetic identification of determinants governing sensitivity to Pn-AMPs. We found the existence of genetic variants of *Saccharomyces cerevisiae* with increased sensitivity to Pn-AMPs. To isolate genes that control sensitivity to Pn-AMPs, we created the yeast:mTn3 fusion library to perform transposon-tagging mutagenesis in the yeast strain. Cloning and characterizing of the genes controlling the cytotoxicity of Pn-AMPs will be discussed in the meeting.

1pE12

クラミドモナスのレトロトランスポゾン様逆転写酵素遺伝子の単離と解析

嘉本泰裕、上甲孝志、桐沢恒一、山田隆、宇佐美昭二

(広大院・先端研・生命機能)

逆転写酵素はレトロトランスポゾンおよびレトロウイルスの転位に必須の酵素である。レトロトランスポゾンは真核生物のゲノム上に多数存在し、環境変化に伴う変異率の増加などゲノムの進化に寄与すると共に遺伝子タギングなどの分子生物学的手法によく用いられている。単細胞緑藻類クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は分子生物学的手法が利用できる藻類のモデル生物として注目され、ゲノムプロジェクトも進行中であるが、ゲノムの安定性に関わるレトロトランスポゾンの研究は進んでいない。また、遺伝子タギングのツールが十分に整備されていないのが現状である。現在までにこの生物のレトロトランスポゾンの一部をコードしている DNA 断片がいくつか単離され、転位、挿入が報告されているものの、自律的に転移できる全長をコードするレトロトランスポゾンの報告はない。

我々は PCR 法によりレトロトランスポゾン様逆転写酵素をコードしていると思われる DNA 断片をクラミドモナスより分離した。この DNA 断片は逆転写酵素活性領域の 80% 以上の部位で同一性を示すこと、サザン解析によりゲノムあたり数コピーとかなり数が少ないことなどから明らかとなった。現在このレトロトランスポゾン様逆転写酵素遺伝子の全長を分離すると共に様々なストレスや変異株を用いて、可動性の確認を行い、遺伝子タギングのツールとしての可能性を検討している。

1pE13

イネの主要ファイトアレキシン、サクラネチンの合成酵素
(naringenin 7-O-methyltransferase)遺伝子の単離とその性質
山野 剛^{1,2}, Randeep Rakwal^{2,1}, 児玉 治², 川崎信二¹
(¹農水省・生物研,²茨城大・農・資源生物)

サクラネチンはイネの主要なファイトアレキシンの一つであり、強い抗菌活性を示すが主要植物ではイネとサクラに見出されるに過ぎない。しかし、普遍的なフラボノイドであるナリンゲニンへの1メチル基の転移だけで生成されるので、この合成酵素遺伝子の導入は植物の抗菌活性の向上に広く寄与する可能性が期待される。我々は、精製した酵素のアミノ酸1次構造からcDNAの構造を決めると共にBACクローンから遺伝子のゲノミック構造を決定した。遺伝子は368アミノ酸をコードする2つのエクソンを持つ約3.2kBからなり1748bpの1つの長いイントロンが存在する。細胞壁合成の他、抗菌性にも関連すると考えられるトウモロコシのリグニン合成に関与するメチルトランスフェラーゼ群と極めて高いホモロジー(一致83%, 相同90%)を示し、防御反応としてのファイトアレキシン合成と細胞壁の強化と同族の遺伝子で行われることが示された。アルファルファのイソフラボンメチルトランスフェラーゼは機能の相同性にもかかわらずホモロジーは低い(34%, 55%)。現在、本遺伝子のストレスによる発現誘導のパターンの解析と、酵素の基質特異性の検討とを行っている。

1pE14

わさび由来の抗菌性タンパク質の精製と遺伝子のクローニング
木場章範、西原昌宏、大宮香織、山村三郎(財団法人・岩手生物工学研究センター)

遺伝子工学的手法による耐病性植物の作出を目的に研究を進めている。今回、灰色かび病の発芽・生育阻害を指標に、わさび葉より抗菌性タンパク質を単離し、解析した結果を報告する。わさび葉より硫酸塩析、Q-sepharoseカラム、SP-sepharoseカラム、逆相カラムを用いて2種の抗菌性タンパク質(Wj AFP-1、2)を精製した。Wj AFP-1、2はリング斑点落葉病菌、灰色かび病菌、トルコギキョウ立ち枯れ病菌、イネいもち病菌の生育を阻害した。ペプチドシークエンスによって得られたアミノ酸配列をもとに作成した縮合プライマーによるRT-PCRによってWj AFP-1、2のcDNAを単離した。相同性検索の結果、Wj AFP-1はアミノ酸レベルでゴムのヘヴェインと60%、アラビドプシスのヘヴェイン様タンパク質と70%の相同性を示した。一方、Wj AFP-2は複数の植物のPR-1と相同性を示した(アラビドプシス; 79%、アブラナ; 71%)。サザンブロット解析の結果、Wj AFP-1は1~2コピー、Wj AFP-2は少なくとも8コピーゲノム中に存在することが示された。現在、Wj AFP-1、2に関して詳細な生理活性を調べるとともに形質転換タバコの作出を行っている。

2aE01

フェリチンの発現を誘導する因子について
後藤文之・吉原利一・増田太郎・斉木博
(電中研・生物科学)

鉄貯蔵タンパク質フェリチンは、1分子あたり最大4000原子もの鉄を貯蔵することができる。その際にリン酸を取り込むことや他の重金属を蓄積するという報告があるが、鉄以外の金属による発現誘導は知られていない。また、フェリチンの発現は、一般に鉄欠乏状態から急激な鉄供給をおこなうと誘導されるが、酸性土壌においても誘導されることが報告されている。しかし、この誘導の直接の原因(低pH、または、低pHで可溶化するAl、Feの効果など)については明らかにされていない。

そこで、我々は、フェリチンの発現を誘導する因子を解明する目的で研究をおこなってきた。本報告では、まず、水耕栽培した大豆を用い、幾つかの元素供給やpH条件を刺激として、フェリチンの発現をウエスタンブロット法により検討した。その結果、低pH及び、わずかではあるがAlやCdによるフェリチンの蓄積が認められた。現在、詳細な解析をmRNAレベルでおこなっている。

2aE02

外来フェリチン遺伝子導入タバコにおけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子の転写活性について
吉原利一、後藤文之、増田太郎(電中研・生物科学)

鉄は生命活動に不可欠の元素であると同時に、有害な活性酸素種の発生を触媒する。そのため植物は主に根からの鉄還元酵素などを介した鉄の吸収と、フェリチンを介した葉などにおける余剰な鉄の貯蔵・隔離によって適応している。一方、活性酸素種を消去するために、SOD、カタラーゼ等のいくつかの酵素が知られている。その一つに過酸化水素の分解を触媒するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)がある。この酵素は、植物にのみ見いだされ、過酸化水素の濃度に依存せず鉄過剰に対して転写活性が上昇することや、細胞質型(APX-Cyt)、葉緑体型(APX-Chl)等働く場所によっていくつかの分化型が存在することが知られている。本報告では、通常型(葉緑体移行型)のダイズフェリチン遺伝子導入タバコ、および葉緑体移行シグナルのない変異型(細胞質型)のダイズフェリチン遺伝子導入タバコを作出し、それぞれにおける各APXの転写活性を調べるとともに、外来フェリチン遺伝子導入がAPX等の関連酵素の活性に及ぼす影響について考察する。

2aE03

クラミドモナスにおいて低CO₂条件への順化に必要な調節遺伝子CCM1の単離

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・生命科学）

クラミドモナスは、低CO₂ストレス条件に順化するため無機炭素濃縮機構(CCM)を誘導する。しかし、そのシグナル伝達については分かっていない。高CO₂要求性変異株C16は単一の変異でありながら低CO₂誘導性遺伝子(CAH1, LIP-36, β-CA)の発現がみられなかったことから、このシグナル伝達経路に変異が存在することが示唆された。この変異株に野生株(C9)由来の少なくとも5.1kbのDNA断片(pKI4XA)を導入すれば3つの低CO₂誘導性遺伝子の発現が回復することから、この領域が変異を相補するのに必要な領域であることが明らかになった。そこで、この領域に存在する遺伝子(CCM1)を単離した。この遺伝子は6つのエキソンからなり、推定70kDaの親水性タンパク質をコードしていた。

2aE04

緑藻クラミドモナス炭酸脱水酵素遺伝子CAH1の5'上流域に存在するCO₂応答性シス配列とDNA結合因子

九町健一、谷口郁也、大山莞爾、福澤秀哉
（京大院・生命科学）

クラミドモナスは、低CO₂ストレス環境下で数種の遺伝子の発現を誘導する。中でも細胞表層に局在する炭酸脱水酵素の遺伝子CAH1の転写は、低CO₂(0.04%)明所で活性化されるが、高CO₂(5%)では抑制されることが知られている。我々はCAH1の5'上流域をレポーター遺伝子arsに連結した一連の融合遺伝子の解析から、転写開始点上流-293から-261の領域が低CO₂でエンハンサーとして、-351から-294の領域が高CO₂でサイレンサーとして機能することを明らかにした(99年度本大会)。その後、両領域のリネアスキヤニング解析により5つの低CO₂依存性エンハンサー配列を同定した。また、ゲルシフト解析により、低CO₂と高CO₂両条件で培養した細胞の単離核中に、エンハンサー及びサイレンサー領域に特異的に結合するタンパク質が複数存在したので報告する。

2aE05

ラン藻の炭酸水素イオン結合タンパク質

前田真一¹、G. Dean Price¹、Murray R. Badger¹、榎本千賀、小俣達男（名古屋大院・生命農学、¹オーストラリア国立大・生物科学研）

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942のcmpABCDオペロンは、ABC型のHCO₃⁻能動輸送体をコードしている。cmpBCDの3遺伝子が輸送体の膜複合体サブユニットをコードしているのに対し、cmpAは細胞膜結合性の42kDタンパク質をコードしており、その推定アミノ酸配列は硝酸イオン/亜硝酸イオン輸送体の基質結合タンパク質であるNrtAと47%同一である。本研究ではHis₆タグを付加したCmpAを大腸菌に発現させ、これを用いてCmpAの生化学的性質を調べた。H¹⁴CO₃⁻を用いた平衡透析実験からCmpAが無機炭素(Ci; CO₂またはHCO₃⁻)を特異的に結合することがわかった。低濃度のCiを含む緩衝液にCmpAを加えると、CiのCmpAへの結合によって溶液中のCO₂濃度が低下したが、その低下速度はカーボニックアンヒドラーゼによって速められた。このことからCO₂ではなくHCO₃⁻がCmpAに結合すると結論した。マスペクトルを用いて溶液中のfreeのHCO₃⁻とタンパク質に結合したHCO₃⁻の量を定量した結果、CmpAがHCO₃⁻に対して高い親和性をもつことがわかった(K_d = 5μM)。以上のことから、CmpAがHCO₃⁻輸送体の基質結合タンパク質であることが明らかとなった。

2aE06

炭素欠乏条件下におけるカルボキシゾーム関連遺伝子の転写制御機構

原野よしみ、小俣達男（名古屋大院・生命農学研究科）

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942の炭酸固定の場であるカルボキシゾームの形成と機能発現に関連する遺伝子群の転写は炭素欠乏状態において活性化される。炭素欠乏に応答した遺伝子の発現機構を解明するために、これらの遺伝子群の一つであるccmKLMNOオペロンのプロモーター領域と *Vibrio harveyi* の luxAB を連結してルシフェラーゼ活性をモニターすることにより、シス制御配列の機能を解析した。その結果、転写活性化に必要なシス制御領域はccmKの翻訳開始点より-239~-155 bpに存在することが分かった。この領域には、化学合成細菌の炭酸同化系遺伝子の転写調節因子であるRbcR(CbbR)の認識配列と相同な配列が2ヶ所存在した。そこでこの2ヶ所に部位特異的変異を導入したところ、いずれも炭素欠乏に対する応答が見られなくなった。このことから、ccmKの転写はRbcR様の転写調節因子によって支配されている可能性が示唆された。我々はすでに、*Synechococcus* sp. PCC7942よりRbcRのホモログをコードする遺伝子を1つ取得しているが、この遺伝子を破壊してもccmKLMNOの炭素欠乏による活性化はみられた。このことから *Synechococcus* sp. PCC7942には少なくとも2つ以上のRbcR様の転写調節因子が存在すると推定した。

2aE07

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942 における Fe(III)-EDTA 還元活性の明暗での変化について

辰己朋子, 岩城俊雄, 和田野晃 (大阪府大・農・応生化)

我々はラン藻 *Synechococcus* PCC7942 が細胞外の Fe(III)-EDTA を還元することについて検討してきた。この Fe(III)-EDTA 還元活性は光強度が強くなるに従って増加し、 $110 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光で飽和した。飽和光条件下での活性は $19.5 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$ Chl であり、これを 100% とすると暗中ででの活性は約 66% であった。この条件下で光合成電子伝達阻害剤 DCMU を用いると、 $5 \mu\text{M}$ で光照射による Fe(III)-EDTA 還元活性の増加が約 62% 抑制された。呼吸鎖電子伝達阻害剤である KCN を暗中で用いると、 $30 \mu\text{M}$ で呼吸による O_2 吸収をほぼ完全に阻害したが、Fe(III)-EDTA 還元活性に対しては 1 mM で約 37%、 3 mM でも約 83% 阻害するにとどまり、それ以上の濃度になっても阻害効果は変わらなかった。

次に Fe(III)-EDTA 還元活性の基質濃度依存性を調べた。光照射下での活性は、Fe(III)-EDTA が $0 \sim 10 \text{ mM}$ の範囲では直線的に増加した。一方暗中ででは基質濃度の増加に従って飽和し、その K_m 値は約 7.4 mM であった。

2aE08

Synechocystis sp. PCC 6803 における硫黄源欠乏に伴う転写産物量の変化

高橋由香里¹、坂本文徳²、鈴木英治³ (¹茨城大・理・自然、²日本原子力研究所、³茨城大・理・環境)

種々の硫黄化合物について、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の生育における単一の硫黄源となりうるかどうかを検討した。*Synechocystis* は硫酸、チオ硫酸、亜硫酸、硫化物イオン、分子状硫黄の存在下、良好に生育したが、L-システイン存在下における生育は僅かであり、チオシアン酸、および L-メチオニンでは、生育しなかった。

硫黄源欠乏時に顕著な転写活性化が認められる。硫酸トランスポーターサブユニットの遺伝子、*sbpA* をプローブとしてノーザン解析を行った結果、硫酸、チオ硫酸、亜硫酸、硫化物イオンの存在下では転写物は認められず、一方、チオシアン酸、分子状硫黄、L-システイン、L-メチオニンを加えた場合、および硫黄欠乏条件では、30 分以内に転写物の蓄積が認められた。

硫黄同化の主要経路である、システイン生合成に関与する遺伝子について、硫黄源欠乏時における転写産物量の変動を解析した。その結果、ほとんどの遺伝子が硫黄源除去後、30 分以内に転写活性化をうけることがわかった。亜硫酸還元酵素については、例外的に転写産物量の変化が認められなかった。現在、*Synechocystis* 染色体上の他の遺伝子について、硫黄源欠乏に伴う転写パターンの解析を行っている。

2aE09

$^{75}\text{Se}/^{35}\text{S}$ -ダブルラベル法による円石藻のセレン蛋白質の解析

小幡年弘, 岩本浩二, 白岩善博 (筑波大・生物)

セレン (Se) は毒性の強い金属であると同時にある酵素では必須な補助元素として知られている。我々は円石藻の生育に Se が必須であることを既に見い出したが、Se 取り込み機構や Se 要求性の原因等は依然として不明である。本研究では、円石藻を ^{75}Se および ^{35}S を含む培地で培養し、Se の取り込み能力を調べると共に Se 含有タンパク質を検索した。まず、 $^{75}\text{Se}/^{35}\text{S}$ -ダブルラベル法に関する技術的問題を解決しそれを実験に用いた。その結果、1) ^{75}Se の取り込みは生育速度に依存する、2) Se は生育に不可欠な量以上に吸収され蓄積される、3) 分子量 25kD の蛋白質が特異的に ^{75}Se ラベルされる、4) それは膜画分に局在すること等を見いだした。

2aE10

C 3 型 PEPC 遺伝子のリン酸欠乏による発現誘導

豊田健太郎¹、佐藤文彦^{1, 2}

(¹京大院、農、応用生命、²京大院、生命、統合)

リン酸欠乏時における有機酸の合成において Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) が果たす役割を明らかとするため、本遺伝子のリン酸欠乏による発現誘導を解析した。まず、*Nicotiana sylvestris* より単離した C 3 型 PEPC 遺伝子 (*ppc1*~*3*) のうち、根、茎、葉のいずれの組織においても最も強く発現している *ppc1* のプロモーター領域 (約 2kb) を GUS 遺伝子に連結した発現プラスミドを構築し、タバコに導入した。この形質転換タバコを用いてリン酸欠乏の効果をみたところ、酵素活性、タンパク質レベルの変動と対応してリン酸欠乏による GUS 活性の上昇を認めた。従って、リン酸欠乏による PEPC の活性上昇は転写レベルで調節されていることが明らかになった。一方、リン酸欠乏による PEPC の発現誘導はショ糖の添加により顕著に促進された。現在、リン酸欠乏シグナルに対するシス配列の解析を行っている。

2aE11

葉緑体の亜硝酸取り込みに関するトランスポーターの性質と cDNA の単離

杉浦美羽、橋高隆一、畑山裕亮、高橋正昭
(大阪府大・農・応用生物化学)

硝酸のアミノ酸への還元同化は植物のみが持つ重要な機構である。土壌から取り込んだ硝酸をまず細胞質で硝酸還元酵素によって亜硝酸に、続いて葉緑体内で亜硝酸還元酵素によってアンモニアに還元し、アミノ酸の合成に用いる。この一連の窒素同化過程において中間体として生じる亜硝酸は、細胞質から葉緑体内に素早く取り込まれる。この輸送の機構は殆ど不明のままに残されているが、植物の生育に影響する重要な過程であり、トランスポーターの関与が考えられる。

我々は光照射によって緑葉でのみ転写が誘導され、アンモニア添加によって発現が抑制される遺伝子の cDNA (*CsNitr1*) を好硝酸性植物であるキュウリから単離した。*CsNitr1* がコードするタンパク質は葉緑体包膜に局在しており、亜硝酸イオンの単離葉緑体による *in vitro* の取り込みは抗 *Nitr1* 抗体の Fab フラグメントによって阻害されたので、*Nitr1* が亜硝酸トランスポーターをコードしていると推察した。*CsNitr1* タンパク質は、12 の膜貫通ドメインと 1 つの親水性ループを持つ典型的なトランスポーター構造を持っていた。シロイヌナズナの EST ライブラリーより *CsNitr1* アミノ酸配列に 56% の相同性を持つ全長 cDNA (*AtNitr1*) を得た。この遺伝子の発現も光照射下の葉に特異的で、*CsNitr1* の発現様式と一致した。また、*CsNitr1* と *AtNitr1* の保存領域から合成したプライマーを用いてタバコゲノムより *CsNitr1* に 57%、*AtNitr1* に 90% の相同性を持つクローン *NtNitr1* を得た。

2aE12

葉脈間クロロシスを示す NAAT 過剰発現タバコ
高橋美智子^{1,2}、中河卓也²、根岸孝至²、寺田靖子²、中井泉³、西澤直子²、吉村悦郎²、森敏^{1,2}
(1.CREST, 2.東大院・農, 3.東京理科大・理)

ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (NAAT) はムギネ酸生合成経路上の酵素であり、鉄欠乏ストレスによって発現が誘導される。NAAT は双子葉には存在せずイネ科のみに存在する。NAAT の機能を解明するため、この遺伝子の一つ (*naat-A*) が 35 S のプロモーターで過剰発現する形質転換タバコを作成した。

形質転換タバコのうちの約半数の株の新葉はニコチアナミン合成能を欠くトマトの突然変異クロロネバ (*Chloronerva*) と良く似た葉脈間クロロシスを呈した。シンクروتロン蛍光 X 線解析法による解析や金属含量の測定は、*naat* タバコが特に鉄輸送に異常を来していることを示唆した。また、電子顕微鏡観察により、*naat* タバコが電子密度の高い物質を液胞に貯めていることがわかった。

2aE13

Al によるタバコ培養細胞の細胞内 Ca^{2+} と微小管の変動

Mayandi SIVAGURU, 山本洋子, 松本英明 (岡山大・資生研)

タバコ培養細胞を用い Al の細胞内遊離 Ca^{2+} と微小管の構造変化に与える影響について検討した。Al の影響は細胞の生育時期により大きく変動した。対数期の細胞では Al (50 μ M) によりフラグモプラストと紡錘体の構造が消滅した。また Al により分裂細胞の紡錘体の脱重合が観察された。一方、表層微小管は短時間の Al 処理では変化しなかったが、処理時間を長くすると脱重合が認められた。

他方、定常期の細胞では Al によって表層微小管の安定化が認められ、脱重合には 100 μ M の Al 処理を必要とした。対数期の細胞では Al による細胞内 Ca^{2+} の増加が認められたが、定常期の細胞では認められなかった。また Ca^{2+} の増加は処理に用いた Al の濃度に依存した。さらにこれら Ca^{2+} の変動は、A23187 や CPA (Cyclopiazonic Acid) 処理による Ca^{2+} の変動と類似していた。

2pE01

CaMV35S-ニコチアナミン合成酵素遺伝子 (*hvnas1*) を導入した形質転換イネおよびタバコ樋口恭子^{1,2}、高橋美智子^{1,2}、川崎信三³、中西啓仁¹、西澤直子¹、森敏^{1,2}
(¹東大院・農学生命科学、²CREST、³資生研)

ニコチアナミンはムギネ酸生合成の中間体としてイネ科植物の鉄吸収において重要な役割をはたす一方、ニコチアナミン自体が鉄やそのほかの重金属のキレーターであり、双子葉植物では植物体内の重金属代謝に関与している。しかし双子葉植物のニコチアナミン合成酵素 (NAS) 活性は鉄欠乏や鉄過剰によって変動せずニコチアナミンの生理機能の詳細は明らかでない。演者らはこれまでオオムギ、イネ、アラビドプシスからの NAS 遺伝子群のクローニングについて報告してきた。今回、オオムギ由来の *hvnas1* の ORF を CaMV35S プロモーターにつなぎイネとタバコに導入した。得られた形質転換植物について、ノーザン解析により導入した *hvnas1* が地上部でも地下部でも発現していることを確認した。これらの植物が鉄欠乏や鉄過剰に対して耐性を示すかどうか、また金属含量の変化について検討中である。

2pE02

シロイヌナズナのニコチアミン合成酵素 (AtNAS) 遺伝子の
上流域解析

鈴木一矢^{1,2}, 樋口恭子^{1,2}, 中西啓仁², 西澤直子³, 森敏^{1,2}
(¹CREST, ²東京大学大学院農学生命科学)

演者らは植物生理学会 1999 年年会において双子葉植物である *Arabidopsis thaliana* からのニコチアミン合成酵素 (NAS) の3つの遺伝子 (AtNAS1-3) のクローニングについて発表をおこなった。今回これらの3つの遺伝子の発現様式についての解析をおこなったのでこれについて報告する。先にクローニングした AtNAS1~3 のそれぞれの ORF より上流 1000 ベース程度を PCR によりクローニングし、それぞれについて β -グルクロニダーゼ (GUS) をレポーター遺伝子としてつないだデリーションシリーズを作成した。これらをパーティクルガンを用いてタバコ培養細胞、BY-2 に導入し、GUS 活性を測定した。その結果、3つの遺伝子がそれぞれ異なるプロモーター活性を持っていることがわかった。また、NAS の反応産物であるニコチアミンは、植物体内の二価金属のホメオスタシスに関係していると考えられるので、Fe, Cu, Mn, Zn について、過剰症、欠乏症におけるプロモーター領域のレスポンスを調べたところ、AtNAS2, 3 の上流域については過剰症、欠乏症ともに変化がみられなかった。AtNAS1 の上流域においては、Fe, Cu, Zn の欠乏症で GUS 活性の上昇がみられたものの、Mn の欠乏症では GUS 活性の上昇はみられなかった。また、各金属の過剰症では GUS 活性に変化はなかった。これらの結果の意義について論議する。

2pE03

クエン酸合成酵素過剰発現によるシロイヌナズナ
有機酸放出能力の強化

小山博之, 河村彩子, 滝田英司, 木原智仁, ¹柴田大輔, 原徹夫 (岐阜大・農, 1 かずさ DNA 研)

ニンジン由来のミトコンドリア局在クエン酸合成酵素をアグロバクテリウム方によりシロイヌナズナ (WS) に組み換えた。10 系統の組み換え体の内、2 系統では本酵素活性が 2 倍程度に増加していた。この活性増加は、定量 PCR 解析から主に遺伝子導入効果によると推定された。本酵素はシロイヌナズナ中でも、ミトコンドリアに移行し活性を保持していることがウェスタンブロット解析等の結果から推定された。リン酸アルミニウム給源の無菌的水耕栽培条件下で、根端から放出されるクエン酸量が野生型及び組み換えの対照植物に比較して最大で 2 倍増加し、その程度は遺伝子発現・タンパクの蓄積量と相関を示した。尚、放出量の高い系統はアルミニウムストレスに対して耐性を示した。

2pE04

トランスジェニックシロイヌナズナの種子における硫酸イ
オントランスポーター AST68 の機能解析

粟津原 元子^{1,2}, 高橋 秀樹¹, 高橋 (渡部) 晶子¹, 林
浩昭², 藤原 徹², 斉藤 和季¹ (1 千葉大・薬・薬用資
源センター, 2 東京大・農・応生化)

シロイヌナズナには、組織特異的に発現する硫酸イオントランスポーターをコードすると考えられる遺伝子が、少なくとも 7 種存在する。本研究では、それらのうちの AST68 [1] について種子における機能を解析した。AST68 プロモーターと β -グルクロニダーゼ (*gus*) との融合遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナにおいては、GUS 遺伝子は種子とさやの連結部分 (funiculus)、さやの付け根で強く発現していた。ダイズ β -コングリシニンの β サブユニット遺伝子の硫黄欠乏に応答するシス領域を CaMV 35S プロモーターに挿入した融合プロモーターと *gus* との融合遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナ (p35S- β -GUS 植物) では、地上部全体で GUS 活性が硫黄欠乏により増加する [2]。本研究では、アンチセンス mRNA により AST68 の発現を抑制した形質転換シロイヌナズナ (AST68 アンチセンス植物) と、p35S- β -GUS 植物との交配体を作製し解析した。交配体 (F1 植物) では、硫黄欠乏条件下において p35S- β -GUS 植物と比較して完全種子中の GUS 活性の著しい増加 (約 2 倍)、硫酸イオン濃度の低下 (約 50%) がみられた。

以上の結果から、AST68 は種子への硫黄の輸送に重要な役割を果たしていると考えられる。

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

[2] Awazuhara *et al.* (1998) Plant Cell Physiol. 39 Suppl. s133

2pE05

シロイヌナズナ高ホウ素要求性変異株の単離と解析
青木法明、林浩昭、藤原徹 (東大院・農・応生化)

高等植物の必須栄養素の機能を知る上で、分子遺伝学的手法を用いることは有効である。ホウ素栄養に関わる変異株として、シロイヌナズナでは現在までに *bor1-1*、*bor1-2* が知られている。より多くの変異株を得ることを目的として、ホウ素栄養に関与する変異株のスクリーニングを行なった。

50000 個の EMS 処理した M2 種子から 4 回のスクリーニングを経てホウ素欠乏条件下 (0.3 μ M) で地上部の成長が押さえられる候補株を単離した。この候補株は、低ホウ素条件下 (3 μ M) で地上部の生育が野生型株と比較して著しい障害が起きた。しかし、通常条件下 (30 μ M) では野生型株とほぼ同様の生育を示した。根の伸長は低ホウ素条件下でやや阻害され、これも通常条件で回復した。

候補株についての他の実験結果も合わせて報告する。

2pE06

シロイヌナズナ *bor1-1* 変異株におけるホウ素の根から地上部への移行について

野口享太郎、高野順平、林浩昭、藤原徹（東大院、農、応生化）

bor1-1 変異株は、ホウ素欠乏に感受性の変異株である。現在までの演者らの解析により、*bor1-1* 変異株では根から地上部へのホウ素の移行が抑制されていることが示唆された。そこで本研究では、このホウ素移行機構についてさらに詳しく知るためにトレーサー実験を行った。

30 μM のホウ素 ($^{10}\text{B}:$ $^{11}\text{B} = 20:80$) を含む水耕液で3週間生育させた野生型株と *bor1-1* 変異株を 1, 3, 10, 30, 100 μM のトレーサーホウ素 ($^{10}\text{B}:$ $^{11}\text{B} = 96:4$) を含む水耕液に移し、これを1日吸収させた。これらの植物体から導管液を採取し、そのホウ素濃度を測定した結果、1, 3, 10 μM 区において、野生型株ではトレーサーホウ素濃度が水耕液中のホウ素濃度と比較して高かった。一方、*bor1-1* 変異株の導管液のトレーサーホウ素濃度は、水耕液のホウ素濃度と同様であった。30, 100 μM 区では、野生型株、*bor1-1* 変異株の両方で、導管液へのトレーサーホウ素の濃縮は見られなかった。これらの結果から、シロイヌナズナは、低ホウ素条件下で地上部へホウ素を移行させる際に、水耕液中のホウ素を濃縮する機構を持ち、*bor1-1* 変異株ではこの機構が欠損していると推察される。この濃縮機構の性質について報告する。

2pE07

硫黄欠乏下で蛍光強度が増す形質転換体とその利用

大鎌直子、林浩昭、藤原徹（東大院・農・応用生命化学）

ダイズ種子貯蔵蛋白質 β コングリシニン β サブユニットをコードする遺伝子は転写レベルで硫黄栄養により制御されることが知られている。硫黄応答に必要なこの遺伝子のプロモーターの最小領域をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターに挿入した後、Green Fluorescent Protein の遺伝子をつないでシロイヌナズナに導入した。この形質転換体を培地の硫酸硫黄濃度を変化させて育てたところ、15 μM 以下の濃度で強い蛍光が地上部全体で観察された。葉は周辺部が良く光った。蛍光は播種後 15 日目に顕著に観察された。Ethyl methanesulfonate 処理したこの形質転換体の種子から、硫黄濃度に応じた蛍光強度の変化に異常がある株を数株得ているので現状を報告する。

2pE08

オオムギ根からの鉄欠乏誘導性 lipoxigenase 遺伝子の単離

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

鉄欠乏オオムギ根由来の cDNA library から、鉄欠乏で発現が誘導される cDNA *IDI6* を単離した。*IDI6* cDNA は全長 1793bp で、448 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。*IDI6* タンパク質は、アミノ酸配列の相同性から lipoxigenase であると考えられた。これまで、オオムギからは 4 つの isoform が単離されているが、*IDI6* は新規の lipoxigenase isoform であった。lipoxigenase は不飽和脂肪酸の過酸化を触媒する。生成した過酸化脂肪酸は、jasmonic acid や traumatic acid などの、高等植物の病原菌感染に対する防御に関わる、二次代謝産物の前駆体である。イネ科植物は鉄欠乏条件に応答して三価鉄キレーターであるムギネ酸を分泌し、鉄を可溶化して吸収している。実際の土壌中では、分泌されたムギネ酸の大部分は微生物に分解されるため、一部分しか鉄吸収のためには有効ではない。鉄欠乏条件で lipoxigenase 遺伝子の発現が誘導されることの意義を、鉄欠乏条件での根圏における植物と微生物の相互作用の見地から論じる。

2pE09

トマト根に局在する germin 様タンパク質 (LeGlp1) の性質

高橋正昭、竹上貴史、藤本直

(大阪府大・農・応用生化)

germin は種々のストレスにより発現が誘導されるタンパク質の一つである。我々はトマトの根から金属結合部位を持つタンパク質 cDNA をクローニングし、コードしているタンパク質が germin のファミリーに属することから *LeGlp1* と名付けた。*LeGlp1* の機能を知るために、*LeGlp1* 形質転換植物を作出し、また、大腸菌で発現させた不活性型の *LeGlp1* を抗原として作出した抗体を用いて定量することにより、組織分布や金属結合性などを調べた。

非形質転換タバコと異なり、*LeGlp1* 形質転換タバコには抗 *LeGlp1* 抗体と反応するタンパク質が根、地上部ともに見出され、その分子量は germin が持つシュウ酸酸化酵素の活性染色部位と一致した。ホモポリマー構造を持つ *LeGlp1* は Ni^{2+} に対する親和性を示さないが、SDS と尿素存在下で熱処理してモノマーに解離させると結合性を示した。モノマーはシュウ酸酸化酵素活性を持たないので金属の結合と酸化酵素活性の獲得との間の関連性が示唆される。

3aE01

エチレン合成系酵素の大气汚染物質による発現誘導
¹中嶋信美・²玉置雅紀・³裴 公英・⁴朴素弘・⁵佐治 光
¹青野光子・¹久保明弘・³近藤短則
(¹国立環境研・²ソウル市立大学・³東京大・院・理)

オゾン(O₃)と二酸化イオウ(SO₂)は主要な大气汚染物質であり植物に可視障害をもたらす。植物がこれらのガスに曝露されると、可視障害が発生する前にエチレンの生成が起こり、エチレンの生成や作用を薬剤によって抑制すると障害も抑制される。2種のガスがエチレン生合成経路の酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を調べる目的で、O₃あるいはSO₂で誘導される ACC synthase(ACS)及び ACC oxidase(ACO)をコードする cDNAを RT-PCR法によってクローニングした。O₃を曝露したトマト緑葉由来の RNA、および SO₂を曝露したトマト緑葉由来の RNAからは共に同じ3種類の ACS (LE-ACS1A, LE-ACS2, LE-ACS6)と1種類の ACO (LE-ACO1)をコードする cDNAが単離された。それらの発現を RNase Protection assay法および Northern blot分析で調べた結果、0.2ppmの O₃を暴露した場合3つの ACSの発現は一過的に上昇し、曝露開始から2時間以内にピークになり、その後急速に減少した。LE-ACO1の発現は4時間まで上昇しつづき、その後やや低下した。一方 1ppmの SO₂を曝露した場合、2時間までに LE-ACS1Aと LE-ACS6の発現がわずかに上昇したが、そのレベルは O₃曝露の場合の5分の1程度であった。LE-ACS2の発現は4時間以降急速に上昇し、LE-ACO1の発現は O₃曝露に比べ5分の1程度上昇した。以上の結果から O₃と SO₂はエチレン生合成経路の同じアイソザイム遺伝子の発現を誘導するが、その効果が異なるものと考えられる。

3aE02

傷、エリシターにより誘導される Myb 様転写調節因子 LBM1 の発現調節機構および LBM1 を過剰発現する植物体の解析
[○]杉本 和彦、武田 真、廣近 洋彦(農林水産省・農業生物資源研)
Kazuhiko SUGIMOTO, Shin TAKEDA and Hirohiko HIROCHIKA (Dept. of Molecular Genetics, National Institute of Agrobiological Resources)

タバコの Myb 様転写因子である LBM1 はレトロトランスポゾン(T₁)末端反復配列(LTR)に存在するシスエレメント(13-bp motif)に結合し、傷、エリシター処理への応答に関与していると考えられる。傷処理後の LBM1 の発現は、そのターゲットとなっていると考えられる 13-bp motif を持つレポーター遺伝子(GUS)の発現に先立って引き起こされる。LBM1 による 13-bp motif への DNA 結合活性も同様に傷処理によって一過的に引き起こされ、この一過的な発現及び DNA 結合活性はタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドで阻害されたが、LBM1 の傷誘導は阻害されなかった。これらの結果から LBM1 の活性化は転写のレベルで制御されることが考えられる。そこで今回 LBM1 が *in vivo* で機能するか、そして LBM1 の活性が転写のレベルで調節されているか調べるために、LBM1 を過剰発現する形質転換タバコを作製した。LBM1 の標的である 13-bp motif/L-box を持つレポーター遺伝子及び内在性の遺伝子 PAL, T₁ の発現レベルを解析した結果、導入した LBM1 の発現に相関してその発現レベルが高くなっており、LBM1 が *in vivo* でも機能することが示された。

LBM1 の傷誘導に必要なシス配列(AG-motif)とそこに結合する zinc finger protein である LBP1 が 同定されている。ゲル内リン酸化実験から LBP1 は 46kDa の kinase により傷処理後一過的にリン酸化される。この LBP1 kinase の候補として *in vitro* の実験の結果からタバコ MAPK の一つである NTF3 である可能性が示唆されている。今回これらについても報告する。

3aE03

Ri プラスミド由来アグロピン合成酵素遺伝子プロモーターの傷害誘導性：プロモーター解析 II
森上順子、猪口雅彦、近藤弘清(岡山理大・理・生物化学)

これまで我々は、*Agrobacterium rhizogenes* の Ri プラスミド由来のアグロピン合成酵素遺伝子 (Ri-ags) のプロモーター (Ri-Pags) が、植物中で根及びカルス組織特異性を示し、一方葉及び茎では傷害誘導性を示すことを明らかにしてきた。さらに Ri-Pags の 5' 端から段階的に欠失させ、前述の発現特異性が翻訳開始コドンの上流-243bp~-208bp の領域で制御されることを示した。今回はゲルシフトアッセイを用いて Ri-Pags に結合する因子の検出とその結合部位の特定を行なった。

ゲルシフトアッセイは、-243bp~-208bp の領域を含みかつ TATA box を含まない Ri-Pags の上流断片 (KE1, 216bp) をプローブとし、タバコ懸濁培養細胞から調製した核抽出液を用いて行なった。その結果、KE1 に結合する主要な因子が1種だけ存在することが示された。この系に KE1 を6分割した断片 (KE1-1~6) を競合させた結果、-243bp~-208bp の領域 (KE1-3) のみで競合がみられた。一方この領域を内部欠失させたプローブ (KE1Δ3) に対しては結合活性が観察されなかった。これらの結果は、先述の段階的欠失実験の結果と一致した。また、KE1-3 を細分割した断片を競合させた結果、因子の結合部位は-243bp~-232bp の12塩基対の領域に含まれることが明らかとなった。さらにこの領域を2塩基ずつトランスバージョン変異させた断片を競合させた結果、結合因子は G、C に富む10塩基対を認識することが示された。

3aE04

タバコ ERF3 遺伝子の傷応答発現の転写制御機構の解析
西内 巧^{1,2}、進士秀明¹、鈴木 馨¹
(¹工技院・生命研・植物分子生物、²科学技術振興事業団)

エチレン応答性転写因子であるタバコ ERF は、植物の防御遺伝子のプロモーターに存在するエチレン応答性シスエレメント(GCC box)と相互作用して転写を制御する。これらの ERF をコードする ERF2, 3, 4 遺伝子は葉に傷をつけると、ジャスモン酸やエチレン非依存的に、傷周辺の組織での局所的な早い発現応答と共に迅速な全身的応答を示す。ERF2, 3 および 4 遺伝子のプロモーター領域と GUS の融合遺伝子をタバコに導入して解析を行った結果、傷によって、局所的及び全身的な ERF 遺伝子の迅速な転写の活性化が起こることを明らかにした。そこで、最も顕著な傷応答性を示す ERF3 遺伝子の傷応答発現制御機構について解析を行った。ERF3 遺伝子のプロモーター領域を 5' 上流から段階的に欠失させて GUS につないだ融合遺伝子を導入したタバコを解析した結果、翻訳開始点から -224~-164bp の領域に傷害応答性エレメントが含まれていることを明らかにし、さらに、この領域中の 22bp の DNA 断片と特異的に結合し、傷処理後 10 分以内にその結合活性が顕著に増加する核蛋白質の存在を明らかにした。

3aE05

傷害により誘導されるタバコペルオキシダーゼ遺伝子の発現特性

佐々木克友^{1, 4}、平賀勲^{1, 4}、伊藤浩之¹、山川博幹^{2, 4}、
光原一朗^{3, 4}、松井博和¹、本間守¹、大橋祐子^{3, 4} (1北大院・
農・応生科、²筑波大・生物、³農業生物資源研、⁴JST・
CREST)

我々は、タバコ植物から、傷害により迅速に誘導されるペルオキシダーゼアイソザイムをコードするcDNA (*tpoxN1*) を単離した。*tpoxN1*は根で恒常的に発現し、傷害により全身的に発現誘導を受ける。また、*tpoxN1*は、タバコモザイクウイルス感染による病斑形成に伴って誘導される。しかし、傷害により誘導される塩基性PRタンパク質遺伝子群のシグナル物質であるメチルジャスモン酸およびエチレン処理では、*tpoxN1*のmRNAの増加は見られなかった。これらの結果は、*tpoxN1*の傷害による誘導が、現在までに明らかにされているタバコ塩基性PRタンパク質遺伝子の発現とは異なったシグナル伝達経路を介することを示唆する。今回は、この遺伝子の傷害応答の器官特異性や、この応答に対するプロテインキナーゼ阻害剤の影響等を調べたので報告する。

3aE06

傷害後のカボチャ中果皮組織におけるジャスモン酸の蓄積と、
活性酸素群とは独立したエチレン産生への影響
渡邊敏浩、藤田広樹、酒井慎吾 (筑波大・生物)

傷害後のカボチャ中果皮組織におけるジャスモン酸量の変動を gas chromatography-mass spectrometry を用いて測定した結果、ジャスモン酸量は傷害後 1 時間以内に増加を始め、その後 3 時間、劇的に増加を続けた。この増加様式は、傷害後のエチレン産生に見られたものに相関を示した。また、リボキシゲナーゼの阻害剤であるアスピリンを処理することで、この増加は抑制された。さらにアスピリン処理はエチレン産生も阻害した。この結果は、ジャスモン酸が傷害後のエチレン産生に促進的効果を示すという結果と対を成すものであった。

我々は現在までに、カボチャ中果皮組織より単離した 3 種の傷害誘導性 ACC 合成酵素遺伝子のうち *CM-ACS1* (以前は *WSACS2* と呼称) の発現調節機構の一部として、活性酸素群とジャスモン酸がともにその発現を誘導するように機能することを報告している。そこで O_2^- の産生系である NAD(P)H オキシダーゼの阻害剤 DPI (diphenyleneiodonium) を処理した際のジャスモン酸産生への影響を調べたところ、影響がないことが分かった。また更に、DPI とアスピリンを同時投与した際の *CM-ACS1* の発現を調査することにより、その発現が上記 2 つの阻害剤により相対的に抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、活性酸素群とジャスモン酸が独立した機構によって *CM-ACS1* の発現を制御していることを示唆しているものと考えられる。

3aE07

タバコの傷害ストレス初期応答遺伝子 *C7* は浸透圧ストレスにも応答する

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

植物は環境ストレスから逃れることが出来ないために、ストレスの認識、情報伝達、対応といった複雑な防御機構を発達させてきた。これらの素過程の中で、認識にかかわる遺伝子の単離を目指した。モデル系として、タバコ葉で傷害ストレス初期に応答する遺伝子を単離するために、蛍光ディフュージョンディスプレイ法(FDD)を用いた。いくつか得られたcDNA断片のうち、*C7*遺伝子のmRNAは傷害後10分以内に蓄積を始め、3時間後には減少した。更に詳しく検討した結果、傷害ばかりでなく塩ストレスや浸透圧ストレスに対しても早期一過的にmRNAが蓄積された。予想されるアミノ酸配列により、膜貫通型の新規のタンパク質であった。GFPとの融合タンパク質により、細胞膜上に局在することが分かった。現在詳しい特徴づけをおこなっている。

3aE08

Isolation of a gene, *NtWAF1*, encoding a protein that interacts with wound induced protein kinase (WIPK) from tobacco plants by yeast two hybrid system.

Yunkiam YAE, Tomonobu KUSANO, Hiroshi SANO, Res. And Edu. Ctr. For Genetic Information, Nara Institute of Science and Technology, Nara 630-0101.

A tobacco gene, *WIPK*, encoding a protein kinase that belongs to the mitogen activated protein kinase family (MAPK), is transcriptionally activated in response to wounding. The protein kinase activity was detected in wounded leaves as early as 1 minute after wounding. In order to isolate proteins that interact with *WIPK*, we screened a cDNA library by yeast two hybrid system. Using the full length *wipk* cDNA as bait, we isolated a particular clone containing a 0.8kb cDNA fragment, products of which interact specifically with *WIPK*. Using the isolated 0.8kb cDNA fragment as a probe, we then isolated a 2.2kb cDNA clone by screening a Uni-ZAP XR cDNA library. This clone was temporarily designated as *NtWAF1* (*WIPK* associated factor). The predicted ORF of *NtWAF1* encodes a polypeptide of 648 amino acids. The first 300 amino acid sequence from the N-terminal of *NtWAF1* shows a high homology to the DNA binding domain of auxin response factors (ARFs) from *Arabidopsis*. However the C-terminal region which interacts specifically with *WIPK*, does not show any similarity to any known proteins. Further analyses are under progress to examine the in vivo interaction between *WIPK* and *NtWAF1*, and expression of *NtWAF1* in response to wounding.

(This work was partly supported by a grant from JST/CREST).

3aE09

傷害誘導遺伝性レセプター型キナーゼをコードする *WRK1* 遺伝子の特性

伊藤直子、瀬尾茂美、大橋祐子（農水省・農業生資研/JST・CREST）

われわれはタバコを材料に、傷害の情報伝達経路に関する研究を行ってきた。そして、傷害誘導性 MAP キナーゼ (WIPK) がリン酸化による活性化を受けることにより、その情報が下流の塩基性 PR 遺伝子の発現へと伝達されることを示した。今回、TMV 感染による病斑形成の初期にその発現が誘導される新規の遺伝子を単離した。この遺伝子は N 末端にロイシンリッチリピート (LRR) を持つと共に膜貫通ドメインとセリンスレオニンキナーゼを持つレセプター型キナーゼをコードし、傷により 15-30 分でその発現が誘導された。そこで我々はこの遺伝子を *Wound-induced Receptor Kinase 1 (WRK1)* と名付けた。*WRK1* の転写産物は同調的病斑形成誘導系を用いると、病斑出現のかなり前から蓄積した。さらに老化葉で転写産物が蓄積していることが確認された。この遺伝子が傷害情報伝達系において果たす役割について討論する。

3aE10

サクラの茎成長における重力とジベレリンの作用
根岸容子、佐藤麻美¹、船田良²、山田晃弘³、中村輝子

(日女大院・理、日女大・理¹、北大・農²、放送大³)

樹木の枝及び幹の成長方向は、一次伸長成長と二次肥大成長により制御されている。サクラを実験材料として用いて、樹木の成長方向制御に関わる、重力と植物ホルモンの働きについて、重力形態形成や重力屈性における重力応答系の研究を通して解明している。既に、シダレ性の実験により、ジベレリンが重力刺激伝達物質として機能すること、又、サクラ幼植物の二次木部の形態形成に重力が深く関わっていること、及び伸長停止帯である二次肥大成長部位の茎基部節間レベルにおいて、その重力形態形成及び重力屈性の重力感受に沈降性アミロプラストが関与している可能性が示唆された。

本研究においては、3D-クリノスタットを用いて、疑似微小重力環境下におけるサクラの茎の成長方向、二次木部発達、及び沈降性アミロプラストの挙動に及ぼすジベレリンの影響について検討したので、この結果を報告する。

3aE11

疑似微小重力環境下における黄化アラスカエンドウの成長方向と植物ホルモン

丹羽美乃理¹、長尾明子²、中村輝子¹

(¹日本女子大院・理、²筑波大 環境科学)

直交する2軸をランダムに回転させることにより、疑似微小重力環境を作出する3D-クリノスタット上で、3日齢の黄化アラスカエンドウを24時間生育させると、その上胚軸は地上対照植物と異なり、成長方向がランダムになり、屈曲が認められる。しかし、ジベレリン処理を行なうことによりこの屈曲が抑制された。また、地上においてブラシノライド処理することにより、屈曲が認められ、3D-クリノスタット処理植物と類似した形態を示した。このことより、地上対照植物、3D-クリノスタット処理植物、ブラシノライド処理—地上植物、およびジベレリン処理—3D-クリノスタット処理植物においてエチレン放出量の検討を行なった。その結果、地上対照植物に比べ、3D-クリノスタット処理、ブラシノライド処理—地上植物は、エチレン放出が促進され、また、ジベレリン処理—3D-クリノスタット処理植物は、エチレン放出が抑制された。よって、微小重力によりエチレン放出が促進され、ジベレリンがその促進を抑え、地上対照植物のエチレン放出量まで回復させる可能性が示唆された。

1aF01

クロロフィル *b* 合成はクロロフィル *a* オキシゲナーゼの発現によって調節されているか？

田中亮一、田中歩（北大・低温研）

さまざまな光環境（強光、弱光など）へ高等植物が適応する際には、光化学系のアンテナの大きさの変化が重要な役割を果たしている。光化学系のアンテナの大きさは、主に、クロロフィル *b* の合成量によって決まると考えられているが、現在までのところ、そのメカニズムはわかっていない。

我々は、近年、クロロフィル *b* を合成する酵素（クロロフィル *a* オキシゲナーゼ；CAO）をクラミドモナスで同定し、その遺伝子をシロイヌナズナなどいくつかの植物から単離した。

我々は、クロロフィル *b* 合成および光化学系のアンテナの大きさは、CAO の発現によって調節されているのではないかと考え、解析を進めている。

今回、様々な光環境下における、CAO の発現とクロロフィル *b* の合成について報告する。

1aF02

シアノバクテリアにおけるクロロフィル *a* オキシゲナーゼ(CAO)の発現とクロロフィル *b* の蓄積
佐藤壮一郎、田中亮一、三室守¹、池内昌彦²、田中歩（北大・低温研、¹山口大・理、²東大・教養・生物）

クロロフィル *b* はクロロフィル *a* の 7 位のメチル基がホルミル基に酸化されることによって合成される。最近、我々のグループはこの反応を行う酵素の遺伝子を単離し、この遺伝子をクロロフィル *a* オキシゲナーゼ (CAO) と命名した。

今回、我々はクロロフィル *a* からクロロフィル *b* への反応が CAO タンパク質単独で行われているかどうかを明らかにするために、シロイヌナズナの CAO の cDNA をシアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6803 のゲノムに導入した。この形質転換株 (cb1-3) のクロロフィルを分析したところ、クロロフィル *b* の蓄積が見られた。この結果は CAO タンパク質単独でクロロフィル *b* が合成されたことを示している。

また、これらの結果を光合成色素系の進化に関連させて考察する。

1aF03

光合成細菌を利用した光非依存性プロトクロロフィリド還元酵素の精製とその性質

藤田祐一、Carl E. Bauer¹（大阪大・蛋白研、¹Dept. Biol., Indiana Univ.）

クロロフィル (Chl) 合成系の中間体であるプロトクロロフィリド (Pchl_{id}) は、Pchl_{id} 還元酵素によってクロロフィリドに変換される。光非依存型のプロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR) は、光合成生物の暗所における Chl 合成能を決定づけている。DPOR の 3 つの推定サブユニット (ChlL/BchL, ChlN/BchN, ChlB/BchB) のホモロジー解析から、DPOR はニトロゲナーゼに類似した酵素であることが推定されているが、その生化学的性質についてはまったく不明であった。

本研究では、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* を材料として、この細菌自身の BchL と BchN 蛋白質を S-タグとの融合蛋白質として、*puc* プロモータの制御下で発現させ、両蛋白質を別々に S-タグを利用して精製した。その結果、BchL は、単独蛋白質 (L-蛋白質) として精製された。一方、BchN は、もう一つの推定サブユニット BchB と共精製され、これら二つの蛋白質が一つのコンポーネント (NB-蛋白質) を構成していることが示された。これら二つの精製蛋白質画分を用いて、DPOR の再構成を試みた結果、Pchl_{id} 還元活性は、二つの蛋白質画分を加えたアッセイ系において、ATP とジチオオナイトに依存して検出された。これらの DPOR の生化学的性質は、ニトロゲナーゼと酷似しており、多くの光合成生物はこのようなユニークな酵素系を用いて Pchl_{id} 還元を行っていると考えられる。

1aF04

シロイヌナズナにおける新規な NADPH-プロトクロロフィリド還元酵素アイソザイム (PORC) のクローニングおよび発現解析
大沢直樹、増田建、粟井光一郎、房田直紀、島田裕士、太田啓之、高宮建一郎（東工大・生命理工・生命科学）

被子植物のクロロフィル合成系において、NADPH-プロトクロロフィリド還元酵素 (POR) は、光に依存したプロトクロロフィリドの還元反応を触媒する。シロイヌナズナやオオムギでは、光照射によって異なる発現制御を受ける 2 種類の POR のアイソザイム (PORA, PORB) が存在することが報告されている。最近、PORB がクロロフィル合成に、また PORA が光酸化防御及び PORB の光還元反応のエネルギーを得るための光捕集アンテナとして機能していることが報告され、2 つのアイソザイムが異なる機能を果たしていることが示された。しかし、これを否定する報告もなされており、それぞれのアイソザイムの機能については未だ明らかではない。

我々は、最近公開されたシロイヌナズナのゲノムデータベースにおいて、PORA, B いずれとも異なる POR 相同遺伝子が存在することを見いだした。シロイヌナズナ cDNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、この POR 相同遺伝子断片が特異的に増幅されたことから、この遺伝子は偽遺伝子ではなく、機能的な POR 蛋白質をコードしていると考えられ、PORC と命名した。ゲノムサザン解析の結果、PORC はシロイヌナズナゲノム中に 1 コピー存在していた。シロイヌナズナ cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、PORC の全長を含む cDNA を単離し、その塩基配列を決定した。その結果、PORA, B の推定されるアミノ酸配列が高い相同性 (約 90%) を示すのに対し、PORC は PORA 及び B と比較的低い相同性 (約 75%) しか有しないことが明らかとなった。また遺伝子のイントロンの挿入部位から、進化上、PORC はシロイヌナズナにおいて最初に分岐したことが考えられた。現在、PORC の機能を解明するため、PORC の発現に対する光照射の影響や組織特異性について RNase Protection Assay 法による解析を行っている。

1aF05

ダイコン子葉の2種類のクロロフィル分解酵素, フェオホルビダーゼの精製と性質

鈴木康予, 鈴木千穂, 塩井祐三 (静岡大・理・生物地球)

クロロフィルの分解過程では, ピロフェオホルビドが生成されることが知られている. そのピロフェオホルビドの生成はフェオホルビドを基質とし, そのカルボメトキシ基をメタノールと二酸化炭素へと加水分解する酵素, フェオホルビダーゼが関与していることがわかってきた. しかしながら, その詳細については明らかとなっていない.

本研究では, ダイコンの子葉より2種類のフェオホルビダーゼを精製し, 性質を決定したので報告する. フェオホルビダーゼ活性は老化に伴って急激に上昇した. DEAE-クロマトグラフィーで分離される2種類の成分が存在し, その1つは老化時に出現した. このことから, フェオホルビダーゼには構成型と老化型が存在することが明らかとなった. それぞれについて精製し解析を行ったところ, 両者とも分子量113,000, K_m は15 μ Mであったが, 至適pHに違いがみられた. さらに, 14種のクロロフィル類について基質特異性を調べたところ, フェオホルビダーゼの基質認識にはマグネシウムやフィトールの脱離, C¹⁷-C¹⁸位の1重結合構造が重要であることが明らかとなった.

1aF06

高等植物におけるクロロフィル代謝の主要なステップ

足立 勝^{1,2}, 山口 登喜夫³, 東 理恵², 倉田 裕文⁴, 高橋 芳弘¹, 下川 敬之¹(¹宮崎大・農, ²宮崎医科大・生化学, ³東京医科歯科大・遺伝生化学, ⁴九州農業試験場)

老化葉・成熟果実の脱緑は劇的な現象であるものの, クロロフィル分解の研究はその代謝産物の抽出・同定が困難なために, 明確ではない.

我々は, *Arabidopsis thaliana* の老化葉より pheophorbide *a* オキシゲナーゼ酵素を部分精製した. この酵素による pheophorbide *a* の *in vitro* での酸化開裂機構を検討したので, その結果を報告する. 酸化開裂機反応での ¹⁸O₂ 添加アッセイ系では, pheophorbide *a* 代謝産物中に2分子の酸素原子が挿入された. 分子状酸素の一つの酸素原子がホルミル基に添加された.

以上の結果より, pheophorbide *a* の *in vitro* における酸化開裂反応の主要なステップは, モノオキシゲナーゼ酵素により触媒されていることが示唆された.

1aF07

ウンシュウミカン果実におけるクロロフィル代謝

倉田 裕文, 東 理恵¹, 高橋 芳弘², 山元 洋幸², 下川 敬之², 足立 勝¹(九州農業試験場, ¹宮崎医科大・生化学, ²宮崎大・農)

これまでの研究より, 我々はエチレンが必しも三つの酵素 (クロロフィラーゼ, Mg-デキレターゼ, フェオフォルビド *a* オキシゲナーゼ) の順序だった作用 (Matileら, 1996) を通して植物の脱緑を促進するのではなく, 主にクロロフィラーゼによって開始されるものと, クロロフィル酸化酵素によって開始されるもの (Adachiら, 1996) の二つのタイプが存在することを報告した. さらに, *in vivo* でのクロロフィル *a* 分解経路に, フェオフォルビド *a* からピロフェオフォルビド *a* へ変換する経路が関与すること (Kurataら, 1998) を推察した. このことより, クロロフィル分解は非常に複雑な代謝経路である. 本研究では, *in vivo* におけるエチレン処理したウンシュウミカン果実でのクロロフィル代謝と, それに関する酵素についてさらに研究を行なった.

1aF08

ブロッコリー花蕾 (*Brassica oleracea* L.) におけるクロロフィル代謝

高橋 芳弘, 古田 宗宜, 山元 洋幸, 倉田 裕文¹, 東 理恵², 下川 敬之, 足立 勝² (宮崎大・農, ¹九州農業試験場, ²宮崎医科大・生化学)

クロロフィル分解の促進は, エチレン生理作用の一つである. 本研究では, 暗所下においてエチレン処理したブロッコリー花蕾 (*Brassica oleracea* L.) の脱緑機構を明らかにするために, 高速液体クロマトグラフィーを使用し, ブロッコリー花蕾のクロロフィル代謝産物の分離を行った. エチレン処理, 無処理48時間目の花蕾から, クロロフィル *a* 代謝産物であるクロロフィリド *a*, フェオフォルビド *a*, ピロフェオフォルビド *a*, C¹³-ヒドロキシクロロフィル *a*, フェオフィチン *a* がそれぞれ検出された. そこで, ブロッコリー花蕾から調製した粗酵素を使用して, クロロフィル *a* からピロフェオフォルビド *a* への変換過程を調査した.

1aF09

植物におけるMg-デキレターゼの部分精製と酵素化学的性質

東 理恵, 倉田裕文¹, 高橋芳弘², 下川敬之², 足立 勝(宮崎医科大・生化学, ¹九州農業試験場, ²宮崎大・農)

前回、ウンシュウミカン(*Citrus unshiu* Marc.)の脱緑機構を明らかにするため、エチレン処理をしたウンシュウミカン果実果皮より可溶性クロロフィラーゼ(EC 3.1.1.14.)を精製した。また酵素化学的性質と可溶性酵素の*in vitro*でのクロロフィル分解系路を調査し、さらにエチレン処理したウンシュウミカン果実における可溶性Mg-デキレターゼの存在を確認した。

今回、エチレン処理をしたウンシュウミカン果実果皮よりMg-デキレターゼの部分精製と酵素化学的性質の検討を行い、アラビドプシス(*Arabidopsis thaliana* Columbia)にも同様の活性をもつ酵素が*in vivo*中に存在するかどうかを確認した。

1aF10

組織局在性の異なる2種類のキュウリ・フェロキターゼの発現解析

鈴木琢雄, 増田建, 井口八郎¹, 島田裕士, 太田啓之, 高宮建一郎(東工大・生命理工・生命科学, ¹京大・院理・生物物理)

フェロキターゼはプロトポルフィリン IX に Fe²⁺を配位し、プロトヘムを合成する反応を触媒する。我々は大腸菌変異株との機能的相補により単離されたキュウリのフェロキターゼ(FeC1)が、胚軸や根などの非光合成組織において発現していることを明らかにした。しかしキュウリ子葉では、葉緑体チラコイド膜に高いフェロキターゼ活性が認められたため、光合成組織においてヘム合成を担うアイソザイムの存在が推定された。そこで、キュウリ子葉のcDNAライブラリのスクリーニングを行い、新たに子葉で発現しているフェロキターゼ(FeC2) cDNAの単離に成功した。FeC2の推定されるアミノ酸配列のC末端には、シアノバクテリアのフェロキターゼなどで認められている集光性クロロフィル蛋白質(LHC)モチーフが保存されていた。これら2種類のアイソザイムの mRNA の発現について解析を行ったところ、FeC1 が非光合成組織のみで発現が認められるのに対し、FeC2 は子葉はもとより、胚軸、根においてもその発現が認められた。また、FeC1 の mRNA 量の光照射による変化は認められなかったが、子葉における FeC2 の発現は光照射により顕著に上昇した。次に、各アイソザイムに対する抗体を用いて、蛋白質の発現を解析したところ、mRNA の蓄積とほぼ同様の結果が得られた。また FeC2 の子葉における細胞内局在性を調べたところ、FeC2 は葉緑体のチラコイド膜に局在することが明らかとなった。以上の結果から、キュウリでは組織局在性および発現制御機構の異なる少なくとも2種類のフェロキターゼのアイソザイムによりヘム合成が行われていることが明らかとなった。特に光合成組織における FeC2 の発現は、他の組織とは異なり、光により特異的に制御を受けることが考えられる。現在、さらに詳細な発現解析を行っており、これらの結果についても報告する予定である。

1aF11

新規植物白化誘導化合物RWH-21はタバコ培養細胞中に13²-Hydroxychlorophyll *a*の蓄積を誘導する

王 敬銘, 浅見忠男*, 吉田茂男*, 室伏 旭
(秋田県立大・生物資源, 理研*)

13²-Hydroxychlorophyll *a*はクロロフィルの酸化生成物であることが知られている。しかし、その生成機構については明らかにされていない。演者らは、植物白化現象を解析する過程で、新規植物白化誘導化合物RWH-21を見出した。RWH-21は光照射条件下において、タバコ培養細胞の白化を誘導するが、暗条件では白化誘導活性が示さない。そこで、RWH-21の作用機構解明を行うために、RWH-21処理によるタバコ培養細胞中のポルフィリン系化合物の挙動を解析することにした。その結果、明暗両条件下において、RWH-21で処理したタバコ培養細胞中に幾つかの蛍光物質が蓄積されることが明らかになった。これらの蛍光物質の化学構造解析を行った結果、蛍光物質の一つは13²-hydroxychlorophyll *a*であることを判明した。13²-hydroxychlorophyll *a*の蓄積と植物の白化作用の関連を検討するために、タバコ培養細胞中に含まれる不飽和脂肪酸の過酸化に注目し、その副生成物であるmalondialdehyde (MDA)の生成を検討した。その結果、13²-hydroxychlorophyll *a*が光増感作用を有することが示唆された。

1pF01

トレニア *in vitro* 重複受精系によって明らかにされた助細胞の機能

東山哲也, 矢部志津, 黒岩晴子, 黒岩常祥(東大・院・理・生物科学)

我々は、胚嚢が胚珠組織から裸出するトレニア (*Torenia fournieri*)を材料に用いて、*in vitro* で花粉管が胚嚢に誘導されることを発見し(Higashiyama et al., 1998)、*in vitro* 重複受精系の開発に成功した。

in vitro において花粉管誘導と胚嚢の状態には高い相関があり、胚嚢が花粉管を誘導することが示唆された。しかし、胚嚢を構成する卵細胞、2つの助細胞、中心細胞のうち、どの細胞が花粉管誘導を司るのかという点については不明であった。そこでUVレーザーによる細胞破壊実験を行った。その結果、卵細胞や中心細胞を特異的に破壊した場合には誘導率に変化は見られないが、助細胞を破壊した場合のみ誘導率の低下が見られた。助細胞を1つ破壊した場合には誘導率はおよそ半減し、2つ破壊した場合には全く誘導が見られなくなった。これにより、助細胞が花粉管を誘導する細胞であることが示された。

さらに、誘導された花粉管が胚嚢に内容物を放出する瞬間の映像を撮影することに成功した(Higashiyama et al., 2000)。胚嚢に到達した花粉管は2つの助細胞の間を通過して胚嚢内部に進入した。そして、先端部で破裂し、初速 12,000 μm³/s(花粉管直径は 10 μm)で内容物を噴出し始めた(n = 6)。すると、わずか平均 0.6 秒後に2つの助細胞のうち1つが選択的に崩壊する様子が捉えられた。2つの助細胞は花粉管が到達するまでは花粉管を誘導し続け、一旦花粉管が内容物の放出を開始すると、一方の助細胞が選択的に崩壊することで花粉管内容物を胚嚢内に受け取ると考えられた。

1. Higashiyama T., Kuroiwa H., Kawano S., Kuroiwa T. (1998). *Plant Cell* 10, 2019-2031.
2. Higashiyama T., Kuroiwa H., Kawano S., Kuroiwa T. (2000). *Plant Physiol*, *in press*.

1pF02

CHARACTERIZATION OF THREE POLLEN-SPECIFIC ZINC-FINGER TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN THE PROCESS OF MALE MEIOSIS IN PETUNIA

Sanjay KAPOOR, Hiroshi TAKATSUJI Lab. of Dev. Biol., National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba 305-8602

We have previously isolated cDNAs for seven zinc-finger transcription factors that are sequentially expressed during anther development in petunia (Kobayashi et al., 1998). By following the reverse genetical approach we have been able to link three of these genes, viz., *ZPT 2-5*, *ZPT 3-1* and *ZPT 4-1* to the process of male meiosis. The promoter regions of all three genes, made available after cloning of their respective genomic counterparts, directed GUS expression predominantly in microspores. Ectopic expression of their respective coding sequences under the control of CaMV 35S promoter resulted in radical changes in the morphology of pollens as well as severe reduction in the number of mature pollens rendering these plants male sterile. While analyzing the cause of these phenotypic changes we found that in these plants, the process of meiosis culminated into pentads to octads instead of normal tetrads. Although, expression of these genes peaks at different periods of pollen development they all seem to be part of a common biochemical pathway that could be essential for the proper progression of male meiosis in petunia.

1pF03

アサガオの *En/Spm* 系トランスポゾンの転移酵素遺伝子 *tnpD* の解析

各務孝、飯田滋 (総研大・生命科学、基生研)

アサガオの花弁に絞り模様を賦与する易変性 (mutable) 変異 *a-3^f*, *speckled*, *r-1*, *purple* はいずれも *En/Spm* に属する *Tpn1* 類縁の非自律性トランスポゾンであり、ゲノム中に存在する自律性因子の供給する2種類の転移酵素によって転移すると考えられている。*Tpn1* 類縁因子の転移機構を解明するためにアサガオの自律性トランスポゾンの転移酵素遺伝子の同定を試みた。*En/Spm* は2種の転移酵素 TNPd と TNPA を持ち、特に *tnpD* 遺伝子は特徴的な ORF を持つことから、これを指標にアサガオゲノム中の *tnpD* 様配列の検索を行った。その結果、得られたゲノム断片の配列は *tnpD* と高い相同性を示した。今回はこの *tnpD* 様配列のゲノム中の存在様式と活性化トランスポゾンを有すると思われるアサガオから得られた *tnpD* 様配列を持つ cDNA の構造解析の結果を報告する。

1pF04

Imprinting of the *MEDEA* Polycomb Gene in the Arabidopsis Endosperm

Tetsu Kinoshita, R. Yadegari, JJ. Harada¹ RB. Goldberg², and RL. Fischer (U.C. Berkeley, ¹U.C. Davis, ²U.C.L.A.)

medea(*mea*)突然変異体は、受精に依存せず胚乳形成を開始し、鞘の伸長、種子様の構造体の形成が起きる。一方、受精がおこると *mea* 変異型遺伝子が、母親由来か父親由来かによって異なった表現型を示す。すなわち、母親から変異型遺伝子を受け継ぐと、父親の遺伝子型に関わらず、種子形成過程で胚乳が肥大し胚発生を停止する致死性を示す。

我々は、このいわゆる parent-of-origin 効果を分子レベルで解明するため、*MEA* 遺伝子内の多型を利用して、シロイヌナズナの二種のエコタイプの F1 ハイブリッドにおける母親および父親由来の *MEA* 遺伝子の発現量を比較した。その結果、*torpedo* 以降の胚および、幼植物、根、莖、葉では両性に由来する mRNA が検出されたのに対し、胚乳においては母親由来の mRNA のみ検出され、父親由来の mRNA は検出されなかった。また、*ddm1* 変異体との交配の結果、*ddm1* 変異体を父親とした場合、母親由来の *mea* 変異体の致死性を回復した。以上の結果は、*MEA* 遺伝子は胚乳においてゲノミックインプリンティングを受けていることを示唆している。また、哺乳動物と被子植物において観察されるインプリンティングの進化的意義もあわせて考察したい。T. Kinoshita et. al. Plant Cell (1999) 11: 1945-1952

1pF05

花粉母細胞で発現する *SCARECROW* 様遺伝子の性状解析

諸橋賢吾、高瀬尚文、堀田康雄¹、平塚和之 (奈良先端大・バイオ、¹岐阜国際バイオ研究所)

我々はテッポウユリ減数分裂前期花粉母細胞由来の cDNA ライブラリーからシロイヌナズナの *SCARECROW* (*SCR*) 遺伝子と相同性を示す cDNA クローン、#1125 を得た。#1125 cDNA クローンの全長を単離し、相同性を調査したところ、C 末端領域において *SCR* をはじめとする GRAS 遺伝子ファミリーがコードするアミノ酸配列と高い相同性を示した。しかしながら、N 末端領域では既知の遺伝子と相同性が見いだせなかったことから #1125 cDNA クローンを *LISCL* (*Lilium longiflorum SCARECROW-like gene*) と名付け詳細な解析を行った。*LISCL* 遺伝子の転写産物はユリの各組織において恒常的に蓄積しており、花粉形成過程においても成熟花粉をのぞく各時期で蓄積が見られた。GFP 融合 *LISCL* 蛋白質をタマネギ表皮細胞中で一過的に発現させたところ、*LISCL* は核移行活性をもつことが示された。また、欠失変異導入により、*LISCL* の核移行活性には塩基性アミノ酸に富む中間領域と C 末端領域の両者が必須なことがわかった。

1pF06

テッポウユリの雄性配偶体形成過程において発現する *LIM18* 遺伝子の解析

皆見政好、高瀬尚文、堀田康雄¹、平塚和之
(奈良先端大・バイオ、¹岐阜国際バイオ研究所)

LIM18 は、花粉母細胞特異的に発現する遺伝子であり HSP70 をコードする。減数分裂進行過程における HSP70 の機能を調べるために、抗 *LIM18* 抗体を用いて免疫学的解析を行った。その結果、テッポウユリの減数分裂細胞には、*LIM18* の他に抗 *LIM18* 抗体に反応性を示す複数の HSP70 が存在すること、これらの HSP70 は細胞質のみならず核にも分布することが明らかになった。更に、*LIM18::GFP* 遺伝子を導入したタバコ BY-2 細胞では、GFP のみを発現させた場合と比較し、*LIM18::GFP* タンパク質は核により多く局在した。以上のことから、*LIM18* は核移行能を持つ HSP70 であり、減数分裂細胞において観察される細胞骨格・染色体構造の変化の過程等で分子シャペロンして働く可能性が考えられる。

1pF07

ユリ *RecA* 様組換えタンパク *LIM15* の特徴付け
高瀬尚文、平塚和之、堀田康雄¹ (奈良先端大・バイオ、¹岐阜国際バイオ研究所)

LIM15/DMC1 遺伝子は、大腸菌の相同的 DNA 組換え酵素である *RecA* タンパクと高い相同性を示すタンパクをコードし、減数分裂特異的に働くことが知られている。組み換えタンパクを用いてユリ *LIM15* タンパクの性状解析を行った結果、*LIM15* タンパクは自己集合体形成活性、DNA 依存的な ATPase 活性、単鎖 DNA 結合活性、二重鎖 DNA 結合活性を有していることが明らかとなった。*LIM15/DMC1*、*RecA* および *Rad51* タンパク間の一次構造比較の結果、*LIM15* 分子は *LIM15/DMC1* 特異的な約 70 アミノ酸残基からなる配列を含む N 末 1/3 の領域 (*LIM15N* 断片) と *LIM15/DMC1*、*Rad51* および *RecA* タンパクに共通に見いだされる約 220 アミノ酸残基からなる配列を含む C 末側 2/3 の領域 (*LIM15C* 断片) に分けられる。*LIM15N* 断片と *LIM15C* 断片の両断片を用いた分子解剖の実験結果は、*LIM15* 分子が機能的にも *LIM15N* 断片と *LIM15C* 断片に分割できる分子であることを示唆するものであった。

1pF08

光ピンセットにより 1 つの接合子から解明された片親葉緑体 DNA の能動的分解

西村芳樹¹・三角修己¹・東山哲也¹・横田明穂²・黒岩常祥¹ (1. 東大・院・理・生物科学、2. 奈良先端研・バイオサイエンス)

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* において、葉緑体 DNA は母性遺伝する。DNA 特異的蛍光色素 SYBR Green 1 により、生きた接合子で葉緑体核様態の挙動を観察したところ、接合後わずか 40 分後に雄由来の葉緑体核様体のみが選択的に小さくなり始め、10 分以内に観察できなくなった。

こうした葉緑体核様体の蛍光の消失が、葉緑体 DNA 分子のどのような変化を反映したものであるかを解明するため、まず雌雄の葉緑体 DNA をそれぞれ大腸菌由来の *aadA* 配列により識別し、光ピンセットによって核様体消失前の接合子と、消失した接合子を 1 個ずつ試験管に回収し、nested-PCR によって葉緑体 DNA の変化を追跡した。その結果、核様体の消失とともに、葉緑体 DNA 分子は完全に分解されていることが明らかになった。

接合子に含まれるヌクレアーゼについて、プラスミド分解法による解析を行ったところ、強い Ca^{2+} 要求性ヌクレアーゼの活性が検出された。さらに接合子から単離した葉緑体のヌクレアーゼについての解析結果も含め、クラミドモナスにおける葉緑体 DNA の母性遺伝の分子機構について議論したい。

1pF09

rDNA 非転写領域 (NTS) の導入によるシロイヌナズナ 相同組み換え能の活性化
浦和博子¹、日高真純¹、石黒澄衛²、岡田清孝²、堀内 嵩¹
(¹基生研、²京大・理・植物)

DNA 複製フォーク阻害点 (RFB) は、細菌からヒトまでの染色体上に存在する特異的な部位である。特に真核生物においては、報告されている RFB は、全てリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) リピート構造内の非転写領域 (NTS) にある。我々は、これまで大腸菌や出芽酵母を用いて、RFB でのフォークの進行阻害が、近傍の相同的組み換えを著しく活性化することを見出ししてきた。そこで、この現象が高等生物においても起こるかどうかを調べるため、シロイヌナズナを用いて以下の実験を行った。

NTS の下流に β -gluc. 遺伝子 (相同組み換え時のみ発現) を配置したユニットを染色体の任意の場所に導入した形質転換体 (F) を作製した。組み換え頻度を任意の 20 ラインについて、複数個のロゼット葉を GUS 染色して調べた結果、F では、対照となる形質転換体 (G; NTS を持たない) に比べ、GUS スポット数が 7 倍高いことが解った。更に、F で最も高い組み換え頻度を示した形質転換ラインでは、ゲノムサザン法により、DNA レベルで高頻度な組み換え後分子を確認できた。また、形質転換体には、興味ある GUS 染色パターンを示すものもあり、細胞系譜を知るための技法として役立つ可能性もある。

1pF10

ゼニゴケ性染色体間における反復配列の存在状態の差異

中山繁樹¹, 藤下まり子^{1,2}, 大山莞爾³ (1 農業生物研,
2 生研機構, 3 京都大院・生命科学)

生活環の大半が半数体である雌雄異株種ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) は雌株 ($n=9=8+X$) と雄株 ($n=9=8+Y$) がそれぞれ X 染色体と Y 染色体を一本ずつ持ち、この性染色体がゼニゴケにおける性決定に関与していると考えられている。このゼニゴケ性染色体の構造解析を、マイクロ・ダイセクション法と蛍光 *in situ* ハイブリッド (FISH) 法等を用いている。レーザーを用いたマイクロ・ダイセクション法により単離したゼニゴケ性染色体から得た DNA を増幅し、現在、雌雄間で存在量が異なる DNA クローンを選抜しつつある。これらの DNA クロンの存在状態を解明するため、FISH 法を改良し、高感度な DNA の可視化をゼニゴケ性染色体において可能にした。この FISH 法を用い、ゼニゴケ染色体上における反復配列の存在状態を可視化した結果、性染色体において、反復配列の存在状態が異なることが明らかになった。

1pF11

緑藻クラミドモナスにおけるガミートライシン遺伝子の構造解析：C 末端共通配列を持つ 2 つのメタロプロテアーゼ遺伝子の並列的存在
久保雄昭¹, 齊藤達昭¹, 福澤秀哉², 松田吉弘¹ (神戸大院・自然科学, 岡山理大・理・基礎理¹, 京都大院・生命科学²)

ガミートライシンは、緑藻クラミドモナスの配偶子接合の際に細胞外に分泌され、細胞壁を離脱させる活性をもつ亜鉛結合性のマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) である。この酵素は植物細胞においてその生理的機能が詳細に解析されている数少ない MMP の一つであり、またクラミドモナスに外来遺伝子を導入する形質転換実験においては、ホスト細胞をプロトプラストにするための有用な酵素でもある。

本研究では、ガミートライシン遺伝子の構造及び、その発現調節機構を明らかにする目的で、以前に単離されていた cDNA をプローブとして、クラミドモナス C-9 株 (*mt*) のインデックス・ゲノムライブラリーからガミートライシン遺伝子の単離を試みた。その結果、ガミートライシン遺伝子を含むクロソンの単離に成功した。塩基配列の解析結果から、ガミートライシン遺伝子は 7 つのエキソン (638 アミノ酸残基をコード) と 6 つのイントロンを内在するおよそ 3.5-kb のゲノム構造を持つことが明らかになった。さらに興味深いことに、この遺伝子のすぐ上流にさらにもう一つ新規のガミートライシン類似遺伝子がタンデムに存在していた。この新規遺伝子のコード領域から推定される蛋白質はおよそ 487 アミノ酸残基をもち、その C 末端側からおよそ 300 残基にわたる領域は、ガミートライシンの成熟蛋白質の C 末端側領域に非常に高い相同性を示した。またその内部にはガミートライシンと同様にプレプロポリペプチドの配列とマチュア領域に亜鉛結合ドメインのモチーフが存在していた。これらの解析結果から、この新規遺伝子はガミートライシン様の亜鉛結合性メタロプロテアーゼである可能性が考えられ、クラミドモナスにおけるメタロプロテアーゼ・ファミリーの存在を示唆するものである。

1pF12

緑藻、*Chlamydomonas reinhardtii* の新規な AGC 系 (PKA 様) プロテインキナーゼの同定

川端愛、南森隆司、松田吉弘、東哲司、安田武司 (神大院・自然科学研究科)

クラミドモナスは、最近、緑の酵母たるモデル生物としてその研究価値が上昇しつつある。また、雄雌の配偶子が凝集し接合する過程で cAMP 濃度の上昇が示されており、そのセカンドメッセンジャーとしての機能が予想されているが下流のシグナル伝達機構に関しては未知の領域であるといえる。

今回、我々は、通常の培養細胞から得たクラミドモナスの mRNA を鋳型に、既知の AGC 系のプロテインキナーゼのキナーゼドメインの保存アミノ酸配列に基づく合成塩基をミックスプライマーとして RT-PCR で新規なプロテインキナーゼの検索を行った。その結果、PKA や PKG などの AGC 系のプロテインキナーゼをコードする cDNA 断片を得た。さらにこの断片をプローブにクラミドモナスの cDNA ライブラリーからスクリーニングを行い、AGC 系のプロテインキナーゼの cDNA を得た。そのアミノ酸配列は、N 末端側は cAMP 結合タンパク質と高い相同性を示し、その下流には PKA と相同の配列が存在していた。さらに C 末端側には、PKA に特徴的と指摘されている FXXF 配列の存在が確認された。よって本キナーゼは、調節領域と触媒領域を 1 つのポリペプチド上を持つ新規なタイプの PKA であることが示唆された。ただし、PKG 様のキナーゼである可能性もまだ残されており正確な同定は今後の生化学的解析が必要である。

1pF13

植物由来の廃棄物からの有用生理活性物質の探索-収穫後のトマト地上部に含まれる生長阻害物質

大野修二、富田横谷香織¹, 鈴木利貞², 津布楽洋和³, 小瀬村誠治⁴, 山村庄亮⁴, 長谷川宏司² (筑波大・生物資源, 筑波大・応生¹, 筑波大・院・農², カゴメ・総研³, 慶應・理工・化⁴)

これまでに当研究室では、トマトやニンジンジュースの絞り粕等の植物由来の廃棄物から、植物の生長制御に関与する有用物質の探索を行い、幾つかの生物活性を有する物質の単離を行ってきている。その研究の一環として、収穫後のトマトの地上部に含まれる、生理活性を有する有用物質の探索とその機能を、数種の作物及び雑草の幼植物の生長を指標として試みた。冷凍保存された収穫後のトマト地上部を、冷蒸留水と共に破砕機で破砕し 5°C 1 晩蒸留水に浸した。ろ過後、抽出溶液を溶媒分画し、TLC 及びシリカゲル等各種精製手法を用い、各精製段階において各種幼植物の生長を指標として精製を行った。その結果植物選択性を有する生長阻害物質の存在が明らかになった。現在、この原因物質の単離・同定を行っている。

1pF14

シロイヌナズナの根における細胞増殖と伸長成長との制約関係を表す数理モデル

古谷将彦, 杉山宗隆 (東京大院・理・植物園)

植物器官の軸性成長における細胞増殖と伸長の空間パターンについては、近年速度論的な解析による詳しいデータが報告されている。これらのデータからは細胞増殖と伸長成長との間に何らかの制約関係が窺えるが、このような関係は未だ定式化されていない。本講演では、細胞増殖と伸長成長との連関を表す数理モデルを提示し、そのシロイヌナズナ主根の成長に対する適用を報告する。このモデルは、植物器官が細胞数に比例する生物学的活動能力(資本)を有しており、細胞増殖、成長(体積増大)、器官の維持のいずれかに投資していると仮定するが、これは簡単な微分方程式で表現できる。シロイヌナズナ主根の皮層細胞長の空間プロフィールから、この微分方程式を用いて伸長速度の空間プロフィールを導くと、広い範囲にわたって実測データとよく適合した。これは細胞増殖と成長との関係が本モデルで仮定した諸条件の制約のもとに成り立っていることを示している。

1pF15

微弱磁場環境下における植物の成長

富田一横谷香織, 山下雅道¹, 柳澤政生², 箸本春樹³, 中村輝子⁴, 長谷川宏司¹ (筑波大・応生化, 宇宙研¹, 早稲田・理工², 東大・院・総合文化³, 日女大・理・物生⁴)

植物は動物と異なりその生育場所を自由に移動することができないことから、周りの環境に対して敏感に応答する機能を有していると考えられる。地球環境中には、磁場があり、地上の生物は常に磁力線の影響下で生活している。しかし、植物における磁場の影響についての詳細な情報は少ない。これまでの、強磁場環境及び微弱磁場環境下における植物の成長についての結果は、強磁場環境下では促進あるいは抑制と一定の結果に至っていないが、何らかの影響を示すことが報告されている。一方微弱磁場環境下における植物の成長に及ぼす結果は、促進傾向を示すことで一致していることから、今回、特に磁場を取り除いた場合にける植物の成長運動に注目し、磁気シールドボックスを用いた微弱磁場環境下における植物の成長運動を、数種の幼植物の成長を指標として個体レベルと細胞レベルおよび物質レベルから探ることを試みた。その結果、これまでの結果と同様に、促進の傾向が認められたが、植物種によってその反応は異なっていた。

1pF16

ルシフェラーゼ遺伝子を高発現させた植物におけるジーンサイレンシングの解析

光原一朗^{1,2}, 白澤直美³, 中村茂雄³, 岩井孝尚^{1,2}, 本蔵良三³, 大橋祐子^{1,2} (農水省・農業生物資源研究所, ²JST・CREST, ³宮城県農業センター)

一旦は発現していた外来遺伝子及び、相同性のある内在性の遺伝子の発現が抑制されるジーンサイレンシングと呼ばれる現象が、しばしば報告されている。これは形質転換植物を作成する際に問題となると同時に、逆に内在性の遺伝子を抑制する方法として積極的に利用される場合も少なくない。

我々は、この機構を調べる目的で、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を高発現させたタバコを作製し、これをモデルとして解析を行っている。この系では、植物体でのサイレンシングの様子を、高感度CCDカメラを用いてルシフェラーゼ活性を検出することにより、非破壊的かつ継続的に調べることが出来る。この系を用いて、形質転換植物の中から、比較的高頻度にサイレンシングを引き起こす系統を複数見いだした。これらの形質転換植物では、実生の芽生えでは高いレベルのルシフェラーゼの発現が認められるが、生長にともなってその発現が著しく抑制されるなど、いくつかの特徴から転写後型のサイレンシング(PTGS)が起きていると考えられる。このサイレンシングの起こる経過を、組織・器官レベルで解析した結果について報告する。

2aF01

クロロゾームを欠く新規好熱性繊維状光合成細菌
花田智, 高市真一¹, 松浦克美², 中村和憲 (工技院・生命研, ¹日医大, ²都立大・理)

長野県中房温泉の温泉流水中には特徴的な赤色マットが存在する。この赤色マットは太さ1 μ m程度の繊維状細菌により構成されており、また分光学的測定からこの赤色マットが光合成色素としてバクテリオクロロフィル(Bchl)aのみを含んでいることが推測されていた。この細菌の分離を有機酸を基本とした寒天培地を用い50 $^{\circ}$ Cで試みたところ、太さ0.8-1.0 μ mの多細胞糸状細菌が単離された。この単離株はクロロフィルとしてBchl aのみを含んでおり、in vivoスペクトルの近赤外部の吸収ピークは878および801nmであった。16S rRNA配列に基づく系統解析からこの菌株は*Chloroflexus/Deinococcus* group (緑色糸状細菌)には属するが、*Chloroflexus*属に対する配列の相同性は82-84%と低かった。また、Bchl cは全く含まれておらず、*Chloroflexus*属に特徴的な光捕集系であるクロロソームを欠いていた。また、この菌株のキノン組成・脂肪酸組成・GC含量・含有カロチノイド等にも*Chloroflexus*属との共通性と共に差異も認められた。これらのことはこの新単離菌株が属レベルで*Chloroflexus*属と隔たっており、新属新種として提案されるべきものであることを示している。

2aF02

クロロソームを持たない新規緑色系状細菌 HLO8 株
におけるチトクロム光酸化

¹山田光則、²花田智、¹永島賢治、¹嶋田敬三、¹松浦克美
(¹都立大・生物、²工技院・生命研)

Chloroflexus に代表される緑色系状細菌は紅色細菌とともに最も古い光合成細菌の性質を残していると考えられている。しかしクロロソームが大きな吸収を持つため、紅色細菌に比べ、光合成電子伝達系の解析が不十分であった。

中房温泉の赤色バイオマットから花田らによって単離された HLO8 株は緑色系状細菌に属すると考えられているが、*Chloroflexus* 属に特異的なクロロソームは存在しない。本菌の膜画分を調製し、酸化還元差スペクトルを測定したところ、*Chloroflexus* と同様な反応中心バクテリオクロロフィル、および *c* 型チトクロムの存在が示された。また、膜画分を用いて閃光照射実験を行ったところ、膜結合型チトクロム *c* の光酸化が認められた。これらのことは光駆動の電子伝達系の存在と反応中心への電子供与体として膜結合型チトクロム *c* が関与することを示唆した。

クロロソームを持たない本菌は、光合成電子伝達系反応の測定が容易であり、今後、緑色系状細菌の電子伝達系の詳細な解析に有用であると考えられる。

2aF03

Thermochromatium tepidum 由来 光合成反応中心と HiPIP の結晶構造

¹ 禾 晃和、² Insan Fathir、² 小林正幸、² 野澤庸則、^{1,3} 三木邦夫 (¹京大・院理・化、²東北大・院工・生物工、³理研・播磨研)

紅色細菌の光合成電子伝達反応において、キノンの還元により酸化された光合成反応中心は、可溶性の電子伝達体から電子を受け取ることで、初期状態に戻る。可溶性電子伝達体には大きく分けて 2 つのグループがあり、*c* 型の Cytochrome と鉄-イオウタンパク質の HiPIP である。今回我々は紅色イオウ細菌 *Thermochromatium (Tch) tepidum* から単離した光合成反応中心 (2.2Å 分解能) と HiPIP (1.4Å 分解能) の結晶構造を報告する。また、それらの構造をもとにした電子伝達の際の分子認識についての考察を行う。

Tch. tepidum は紅色細菌の中で最も高い温度で生育出来る菌体であり、そのタンパク質は何らかの耐熱化を受けていることが予想される。従って、この *Tch. tepidum* 由来の反応中心の構造を他の中温菌由来の反応中心と比較することにより、膜タンパク質の耐熱化機構についての考察も行う。

2aF04

ヘリオバクテリアの光化学反応中心の電子供与体
大岡宏造、岩城雅代¹、伊藤 繁¹ (阪大院・理・生物科学、¹基生研)

ヘリオバクテリアはグラム陽性の光合成細菌であり、その光化学反応中心は系 I 型に分類される。コアタンパクはホモダイマー構造をとるが、還元側の F_A/F_B タンパクや、反応中心 P798 の直接の電子供与体と考えられているチトクロム *c* (cyt *c*) の実体については不明である。今回、*H. gestii* の細胞と膜標品を用い、反応中心の電子供与体側の反応解析を行った。膜標品では、フラッシュ照射により酸化された P798⁺ の再還元は、2 相性 ($t_{1/2}=3\text{ms}$ と 7ms) を示した。早い成分は cyt *c* の酸化速度と一致し、cyt *c* から P798 への電子伝達と判断した。遅い成分は、還元側からの電子の戻りと思われる。しかし cyt *c* → P798 の反応は、細胞中 (*in vivo*) での反応速度 ($t_{1/2}$ = 約 100μs) と比較すると極端に遅かった。この違いの原因について、二価カチオン Mg^{2+} や温度の影響を調べた。また、*bc* 複合体の阻害剤である stigmatellin の添加により、cyt *c* の再還元速度は遅くなることも分かった。

2aF05

好酸性好気性光合成細菌 *Acidiphilium rubrum* における光合成電子伝達系の解析

○成田幸洋 永島賢治 松浦克美 嶋田敬三
(都立大、理、生物)

Acidiphilium rubrum は Mg ではなく Zn をバクテリオクロロフィルの中心金属として含む細菌であり、その生育環境は pH 3 程度という生体にとって強い酸性条件である。本菌の光合成電子伝達系の機能を調べるため、光酸化されるチトクロムの性質を調べた。

生細胞での閃光照射により電子伝達に関わる C 型チトクロムの光酸化が観察され、少なくとも、555nm と 553nm に吸収極大を持つ 2 つの C 型高電位ヘムが反応中心バクテリオクロロフィルへの電子伝達に関わっていると考えられた。これらに加えて 551nm に吸収極大を持つ可溶性チトクロム *c* の光合成電子伝達反応への関与も示唆され、反応中心への電子伝達のモデルとして次のものが考えられた。

可溶性チトクロム → 膜結合型チトクロム → 反応中心バクテリオクロロフィル二量体
様々な pH 条件下でチトクロムの光酸化を測定したところ本菌の光合成電子伝達系は pH 2.5 から pH 6.5 の間で正常に機能することが示された。また、より高い pH 条件下でも光酸化は観察されたが、その速度は大きく低下し、再還元は殆ど見られなかった。これは本菌のペリプラズムにおける電子伝達系が酸性環境に適応していることを示すと考えられた。しかしこれらの変化は可逆的であり、酸性適応にとって興味深い。

2aF06

紅色細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の光合成電子伝達における2つの可溶性チトクロム c_8 と HiPIP の役割
永島賢治、André Verméglio¹ (都立大・理・生物、¹CEA Cadarache)

紅色細菌の光合成電子伝達系において光酸化された反応中心複合体に対する電子供与体は一般的に可溶性チトクロム c_2 とされている。しかし *Rubrivivax gelatinosus* を含むいわゆる β グループの紅色細菌においては可溶性の鉄-イオウタンパクである HiPIP がその機能を担っていることが分光学的に示されてきた。さらに *R. gelatinosus* では HiPIP 以外にも酸化還元電位の異なる2つの可溶性チトクロム c_8 が存在し、反応中心への電子供与体として働いていることが示されている。そこで、*R. gelatinosus* におけるこれら3つの可溶性電子伝達タンパクの生理的な役割を明らかにするために、これらをコードする遺伝子を薬剤耐性遺伝子に置き換えた3種類の欠損株を作成した。これら欠損株は全て好気条件下で野生型と同じ生育速度を示したが、光合成培養では HiPIP 欠損株の生育速度が野生型の約半分となった。一方、光合成培養下で2つのチトクロム欠損株はともに野生型とほぼ同じ生育速度を示した。生細胞に対する閃光照射実験では、光酸化された反応中心の約50%を1ミリ秒以内で再還元する最も速い成分が HiPIP 欠損株では見られなかった。以上のことから、*R. gelatinosus* の光合成電子伝達において HiPIP が生理的に主要な電子伝達タンパクであることが明らかとなった。また、2種のチトクロム c_8 は不完全ではあるが HiPIP の欠落を補い得ることが示唆された。

2aF07

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* のシトクロム c 酸化酵素の精製と性質
松田優治、渡邊あずさ、荒田博行 (九大院・理・生物科学)

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* のシトクロム c 酸化酵素を精製した。明条件で好氣的に培養した細菌の膜成分を sucrose monodecanoate で可溶化し、DEAE Sepharose CL-6B による陰イオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S-300 によるゲルろ過、そして Mono Q による陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

精製標品の吸収スペクトルは、酸化型で410nmと530nmに吸収極大が見られ、還元型では419nm、522nm、550nmに吸収極大、そして560nm付近に肩が見られた。吸収スペクトルはこの酵素がヘムbとヘムcを持つ事を示唆している。SDS-PAGEでは、18kDaと37kDaの位置に明確な2本のバンドが確認でき、18kDaのバンドはヘム染色により染まる。この酵素は、*Paracoccus denitrificans* ATCC 35512の、シトクロム c 酸化酵素の活性を持つNO還元酵素 (Fujiwara and Fukumori, 1996, J. Bacteriol. 178, 1866-1871) と類似している。

2aF08

Rhodobacter sphaeroides f. sp. *denitrificans* の硝酸還元酵素遺伝子 *napKEFDABC* オペロンの転写制御
田畑敦也、山本勇、佐藤敏生 (広島大・理・生物科学)

脱窒光合成細菌 *R. sphaeroides* f. sp. *denitrificans* の硝酸還元酵素遺伝子 *napKEFDABC* は脱窒を担っている。硝酸還元酵素活性は硝酸存在下、嫌気的条件下で誘導されることが知られているが、本研究では *nap* オペロンの転写制御について検討した。

napKEFD とその上流290bpを含むDNAと *lacZ* との融合遺伝子を持つプラスミドを、*napD* 変異株に接合導入し、転写活性を測定した。硝酸還元酵素は、嫌気呼吸の酵素であるにも係わらず、*nap* オペロンは酸素の有無に関係なく構成的に発現した。更に、硝酸を加えると嫌気条件下で活性は約4倍、好気条件下では約2倍に増加し、*nap* オペロン転写は硝酸イオンによって活性化されることが示された。次に、ゲルシフトアッセイにより、*nap* オペロンのプロモーター領域に結合するDNA結合蛋白質の有無を検討した。その結果、*napK* の上流の239bpのDNAに結合する蛋白質が検出された。

2aF09

光合成細菌のペリプラズムに存在する新奇分子シャペロン様タンパク質
松崎雅広、山本勇、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 dimethyl sulfoxide (DMSO) 呼吸の末端還元酵素である DMSO レダクターゼ (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をも抑制し、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。しかし、*dppA* 遺伝子破壊株でも野生株と同様に、正しくフォールドした DMSOR がペリプラズムに生成されていた。そこで、分子シャペロンとしての DppA の機能を相補するタンパク質が遺伝子破壊株のペリプラズムに存在すると考えそのペリプラズムを調べたところ、さらにアンフォールド DMSOR の凝集を抑制する分子シャペロン様タンパク質が存在することを認めた。

2aF10

紅色光合成細菌 *Allochrochromatium vinosum* における光捕集色素タンパク質(LH1)の遺伝子重複と発現
永島咲子、嶋田敬三、松浦克美、永島賢治(都立大・理・生物)

紅色細菌の光捕集複合体LH1は、反応中心複合体と一定量比でこれを囲むように存在するタンパク質であり、 α 、 β の2種類のペプチドから成る。これらの遺伝子(*pufB*, *pufA*)は反応中心タンパクの遺伝子(*pufLMC*)と共に *puf* と呼ばれるオペロンを構成している。今回紅色イオウ光合成細菌 *Allochrochromatium vinosum* について、*puf* オペロンの下流領域をクローニングして塩基配列を決定したところ、上流の *pufBA* の他に新たに2組(*pufBA2*, *pufBA3*)の相同遺伝子が確認された。ノーザンハイブリダイゼーションによる mRNA の解析では、*pufBALMC*に加え、下流の2組の *pufBA* を含む約5.3kbの mRNA、上流の *pufBA1* のみの約0.9kbの mRNA、及び下流の2組の *pufBA* のみを含む約1kbの mRNA が検出された。さらに塩基配列から推定されるアミノ酸配列のうち、*pufB1*, *pufA2*, *pufB3* については、精製したLH1タンパク質のアミノ酸配列と一致した。*pufBA* の遺伝子重複については *A. vinosum* 以外に報告がなく、環境の変化に応じてこれらの遺伝子の発現量を変えている可能性があるため、現在転写レベルでの解析を進めている。

2aF11

紅色細菌 *Roseateles depolymerans* と *Rubrivivax gelatinosus* の光合成器官発現調節に対する酸素濃度・栄養条件の影響
陶山哲志¹ 重松 亨^{1,2} 鈴木利彦¹ 常盤 豊¹ 金川貴博¹
永島賢治³ 花田 智¹ (¹工技院・生命研、²熊本大・工・物質生命化、³都立大・理・生物)

Roseateles depolymerans は光合成器官を有するにも拘わらず光栄養では生育しない絶対好気性細菌である。一方16S-rRNAの分子系統で最も近縁な *Rubrivivax gelatinosus* は嫌気光栄養で生育できる光合成細菌であり、両者の生理的特徴は全く異なる。*Rat. depolymerans* と *Rvi. gelatinosus* のRC・LH1複合体サブユニットをコードする *puf* オペロンの構造と各遺伝子の塩基配列が両者の間で非常に類似していることを昨年(1997)の年会で報告した。両者に生理的な違いをもたらす一要因として、光合成器官の発現調節の違いが考えられることから、今回は、炭素栄養基質濃度と酸素濃度を変えた培養条件で両者の暗所での光合成色素の蓄積量を比較すると共に、Northern hybridization を用いて *puf* 遺伝子の発現量の違いを検討した。今回検討した培養条件の範囲では *Rvi. gelatinosus* は好気から嫌気、富栄養から貧栄養まで全ての培養条件で光合成色素の蓄積を示したが、嫌気・貧栄養条件でより高い蓄積を示した。一方、*Rat. depolymerans* は好気・貧栄養条件で *Rvi. gelatinosus* に比べて少ないながら光合成色素の蓄積を示したが、嫌気に近い条件もしくは富栄養条件では光合成色素を持たず *puf* オペロンの mRNA も見られなかった。*Rat. depolymerans* では嫌気好気による光合成発現調節系の働きが *Rvi. gelatinosus* とは異なっていること、また、栄養条件によってより厳密な調節が働いていることが示唆され、両者の生理的な違いを説明する要因と考えられた。

2aF12

紅色細菌 *Rhodovulum* における好気条件下での光合成遺伝子の発現
増田真二¹、永島賢治¹、嶋田敬三¹、井上和仁²、Carl E. Bauer³、松浦克美¹ (¹都立大・生物、²神奈川大・応用生物、³インディアナ大・生物)

多くの紅色細菌は酸化的条件に適応し、好気条件下では酸素呼吸を行い、嫌気条件下では光合成で生育することが知られている。紅色細菌の光合成遺伝子の発現様式がどの様に酸素環境へ適応してきたかを明らかにすることを目的に、光合成器官の合成パターンの異なる二種の紅色細菌 (*Rhodovulum*, *Rhodobacter*) を用いて、光合成 *puf* オペロンの発現様式を解析した。mRNA の存在量比は概ね光合成器官の合成量を反映しており、その分解速度も二種において違いが見られた。プロモーターの詳細な解析結果を踏まえ以下のことが結論された。1) 光合成器官の合成を制御する酸素感受性二成分制御系 (RegA/B) は、紅色細菌の嫌気条件下での光合成遺伝子の発現において主要な役割を担い、その機能は好気条件下でも光合成器官の合成を行う *Rhodovulum* においても同じであった。2) *Rhodovulum* の好気条件下での *puf* オペロンの発現には RegA/B は関与せず、恒常的なプロモーターと上流からの転写が関与している。

紅色細菌 *Rhodovulum* は好気条件下でも光合成器官を合成し光合成を行えるように、嫌気条件とは異なる発現制御機構を発達させてきたと考えられる。

2pF01

NMR 分光による R[P,E] BChl c の B745 会合体の構造の決定
原 一公、溝口 正、小山 泰(関西学院大学・理)

緑色硫黄細菌は、アンテナ複合体・クロロゾームとその主要構成色素であるバクテリオクロロフィル c (BChl c) の同族体で特徴づけられる。蛋白質の関与が非常に少ないクロロゾーム内部での BChl c は Q_y 吸収帯が 745 nm 付近まで長波長シフトした会合体(B745 会合体)を形成している。我々は同族体 R[P,E] について ¹H-, ¹³C-NMR 分光法を用いた会合体解離実験を行い、R[P,E] の B745 高次会合体構造に関する知見を得ようと試みた。

Chlorobium limicola より単離精製した R[P,E] BChl c を用いて、ジクロロメタン/シクロヘキサン混合溶媒中で B745 会合体を形成させ、エタノールを滴下し、会合体を解体した。一連の解体過程を紫外可視吸収分光法及び ¹H-, ¹³C-NMR 分光法によって追跡した。吸収スペクトルには 755 nm (B745 会合体)、720 nm (B720 会合体)、705 nm (B705 会合体)、675 nm (二量体)、662 nm (単量体) の 5 成分を仮定して、ガウス関数を用いた波形分解を行った。また NMR スペクトルには、chemical shift を読み出し、単量体との差をとり、環電流効果のシミュレーションを行い、会合体構造を決定した。

その結果、既に報告された monomer ベースの階段状構造を作る B745d S[L,E] の B745 会合体とは異なり^{1), 2)}、R[P,E] の B745 会合体は piggy-back dimer ベースの階段状構造 (dimer-dimer 間 8.75 Å) の 'shifted-inclined column (B745d 会合体)' を形成する事がわかった。

1) T. Mizoguchi et al., *Chem. Phys. Lett.*, **260** (1996) 153-158

2) T. Mizoguchi et al., *Photochem. Photobiol.*, **67** (1998) 239-248

2pF02

バクテリオクロロフィル c (BChl c) 会合体の構造転換：
Q_y 吸収帯シフトの計算・エネルギー計算からのアプ
ローチ

溝口 正、原 一公、長江裕芳¹、小山 泰
(関西学院大・理、¹神戸市外大)

ジクロロメタン・*n*-ヘキサン混合溶媒中に存在する BChl c 会合体の種類は、その Q_y 吸収帯の波長により特徴づけられる：Q_y = 675 nm の B675 (二量体)、705 nm の B705、720 nm の B720、745 nm の B745。これらの BChl c 会合体間での構造転換を、BChl c 同族体、及び異性体 (R[E,E], R[P,E], R[L,E], S[P,E], S[L,E]) を用いて紫外可視吸収分光により追跡した。

(1) 溶液 NMR 分光により決定した会合体構造を基に、Q_y 吸収帯の長波長シフトを計算した結果、表 1 に示すような会合体の構造を提案することができた。

(2) 表 1 に示した各会合体の分子間の van der Waals エネルギーの計算の結果、① (3¹R)-異性体では、二量体→B705d (B705d') → B720d → B745d、② (3¹S)-異性体では、単量体→B720m → B745m への異なる構造転換経路を確認することができた。また、S[L,E]BChl c の (3¹R)-異性体への添加は、B745d → B745m への構造転換のトリガーとして作用しているものと考えられる。

Table 1.

Aggregates	Base	Stacking structure	Assembly
B705d	dimer	straight column	linear array
B705d'	dimer	inclined column	linear array
B720d	dimer	shifted inclined column	one column
B745d	dimer	shifted inclined column	two columns
B720m	monomer	monomer stepwise	one column
B745m	monomer	monomer stepwise	two columns

2pF03

Rhodobacter sphaeroides R26.1 LH2 へのカロテノイドの再構成
古井 陽介、張 建平、稲葉 徹、小山 泰 (関西学院大・理・化学)

光合成細菌のアンテナ複合体中でのカロテノイドの重要な役割の一つは集光作用を行い、バクテリオクロロフィルへエネルギーを伝達することである。本研究は、カロテノイド欠損株である紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* R26.1 のアンテナ複合体へ種々の共役二重結合を有するカロテノイドを再構成することで、Car-BChl エネルギー伝達について分光学的な面より考察した。

Rhodobacter sphaeroides R26.1 から界面活性剤 SMC を用いて単離した LH2 の懸濁液に、精製したスフェロイデンの石油エーテル溶液を加え、超音波処理し、Sucrose gradient により過剰のスフェロイデンを除いて、再構成 LH2 を調製した。この再構成 LH2 の電子吸収スペクトル、サブピコ秒時間分解吸収スペクトルを測定した。

電子吸収スペクトルを測定した結果、カロテノイド欠損株の LH2 の吸収スペクトルに、野生株のそれに近いカロテノイドの吸収ピークが現れた。更にサブピコ秒時間分解吸収スペクトルを測定した結果、Car-BChl エネルギー伝達が観測できた。これにより、カロテノイドの S₁ 励起状態の寿命を計算したところ、2.8ps となった。野生株は 2.0ps と報告されているので、同様の研究が Harry Franck らによりなされているが、彼らが求めた 8.0ps という結果に比べて、スフェロイデンがアンテナ複合体により自然に近い状態で再構成されたということがいえる。発表当日はヌロスボレンの結果についても報告する予定である。

2pF04

紅色光合成細菌 *R. sphaeroides* G1C の
LH2 アンテナ複合体における同位元素効果

稲葉 徹、張 建平、小山 泰 (関西学院大学・理・化学)

序論) 紅色光合成細菌の LH2 アンテナ複合体内で光エネルギーを吸収し、励起したカロテノイドは 1B_g⁺ 状態から 2A_g⁻ 状態、1A_g⁻ 状態へと内部転換すると同時に近接するバクテリオクロロフィル (BChl) へ一重項エネルギーを伝達する。有機溶媒中でのカロテノイドの内部転換速度に同位元素効果があることは既に報告されている。本研究ではこのことが LH2 内でのカロテノイドから BChl へのエネルギー伝達にどのように影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とする。

実験) 炭素源に CH₃COONa と ¹³CH₃¹³COONa を用いた培地でそれぞれ培養した *R. sphaeroides* G1C から LH2 アンテナ複合体を調製し、それらのカロテノイドを励起した場合の 400 - 700 nm、800 nm - 1 μm の領域の時間分解吸収スペクトルを測定した。

結果) 天然に存在する LH2 内と同位元素置換された LH2 内でのカロテノイド (ヌロスボレン) の 1B_g⁺ 状態の寿命は 0.152 ps と 0.145 ps、2A_g⁻ 状態の寿命は 1.1 ps と 1.3 ps であった。これらの結果と有機溶媒中でのカロテノイドの各状態の寿命からそれぞれの LH2 内でのカロテノイドから BChl へのエネルギー伝達速度と伝達効率を決定することができる。

2pF05

MECHANISM OF CAROTENOID-TO-BACTERIOCHLOROPHYLL
ENERGY TRANSFER VIA THE 2A_g⁻ STATE IN THE LH2
COMPLEXES FROM PURPLE BACTERIA

Jian Ping ZHANG, Yasutaka. WATANABE and Yasushi KOYAMA,
Fac. Sci., Kwansai Gakuin Univ., Nishinomiya 662-8501

We have been interested in the involvement of the optically forbidden singlet-state, 2A_g⁻, of carotenoid in the carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer in antenna complexes of purple bacteria. In this study, we attempted to seek the mechanism of the energy transfer proceeding via the 2A_g⁻ state.

We carried out the following experiments. (1) Time-resolved absorption spectroscopy was employed to measure the 2A_g⁻ state lifetimes of lycopene, spheroidene and neurosporene both free in *n*-hexane and bound to the LH2 complexes from *Rs. molischianum*, *R. sphaeroides* 2.4.1 and *R. sphaeroides* G1C, respectively. The energy transfer efficiencies via the 2A_g⁻ state were then estimated for the above carotenoids. (2) High sensitivity steady-state fluorescence spectroscopy was used to measure the emission from both 1B_g⁺ and 2A_g⁻ states for the above carotenoids in *n*-hexane. It was found that the 2A_g⁻ emissions of the above carotenoids carry noticeably large oscillator strengths. In the case of the LH2 complex from *Rs. molischianum* whose structural information is available, the time constant of energy transfer (18.6 ps) predicted on the basis of dipole-dipole coupling was in good agreement with the one experimentally determined (12.3 ps).

2pF06

THE CAROTENOID CONFIGURATIONS IN PIGMENT-PROTEIN COMPLEXES OF *Rhodobium marinum* AS REVEALED BY RAMAN SPECTROSCOPY

Pu QIAN, and Yasushi KOYAMA; Fac. Sci., Kwansai Gakuin Univ., Uegahara, Nishinomiya 662, Japan

Three different kinds of pigment protein complexes, i.e., the core complex, LH1 complex and reaction center were isolated from a purple photosynthetic bacteria *Rhodobium marinum* that was first isolated by J. F. Imhoff in 1983. Here, we present the experimental results of Raman spectroscopy of these protein complexes together with the major carotenoids. Five carotenoids, lycopene, rhodopin, rhodovibrin, anhydrorhodovibrin and spirilloxanthin were extracted from the cells and purified by means of open column chromatography, recrystallization and HPLC. 4-day culturing cells whose major carotenoid is spirilloxanthin, were used for preparation of protein complexes. Samples were irradiated with the 514.5 nm beam of Ar⁺ laser. Back scattering geometry was used. The experimental results show that

1. Five carotenoids extracted from cell are all in all-*trans* configuration. This conclusion is consistent with the results of NMR;
2. Raman spectrum of core and LH1 complex are similar with that of all-*trans* spirilloxanthin. Thus, spirilloxanthin in core and LH1 are in all-*trans* configuration;
3. Raman spectra of reaction center are different from the all-*trans* spirilloxanthin and, core and LH1 complex. C=C stretch peak shift to higher position and a new peak appear at 1246 cm⁻¹ indicating that spirilloxanthin in reaction center is in 15-*cis* configuration.

2pF07

カロテノイドの共鳴ラマン励起プロファイル; カロテノイドの光学禁制な 1B_u⁻状態の役割について
佐島徳武、小山 泰 (関西学院大学・理)

光合成細菌のアンテナ蛋白複合体中のカロテノイド(Car)は2つのエネルギー伝達経路をもつことが知られている: Carの光学活性な 1B_u⁻状態→バクテリオクロロフィル(BChl)のQ_y状態と, Carの光学禁制な 2A_g⁻状態→BChl Q_y状態である。Carのエネルギー準位を決定することはCar→BChlのエネルギー伝達のメカニズムを考える上で、重要である。最近スフェロイデン(二重結合数n=10)で 1B_u⁻状態と 2A_g⁻状態の間に光学禁制な 1B_u⁻状態が存在する事を共鳴ラマン励起プロファイルによって確認した¹⁾。そこで3つのCarの励起プロファイル測定を行い、それぞれのCarについて 1B_u⁻, 1B_u⁻, 2A_g⁻状態のエネルギーを決定し、1B_u⁻状態の役割について調べた。

共鳴ラマン励起プロファイルを用いて決定したカロテノイドの一重項エネルギーを表1にまとめた。β-イオン環を持つもの、持たないもの共に、二重結合数nの増加に伴い全ての一重項エネルギーの減少が見られた。特に、1B_u⁻状態は3つの一重項状態の中で最もエネルギー減少率が大きくなった。これはTavanとSchultenのPPP-MRD-CI計算によるポリエンの一重項エネルギーの予測²⁾と一致する結果であった。1B_u⁻状態は1B_u⁻→2A_g⁻の内部転換の中間体としての役割があるものと思われる。

表1. カロテノイドの一重項状態エネルギー (cm⁻¹)

カロテノイド	n	1B _u ⁻	1B _u ⁻	2A _g ⁻
スフェロイデン	10	19690	17680	14250
リコペン	11	18600	15770	13200
β-カロテン	11	19150	16550	14670
ミニ9-β-カロテン	9	20900	19700	15750

- 1) T. Sashima et al., *Chem. Phys. Lett.*, **299** (1999) 187.
- 2) P. Tavan and K. Schulten, *J. Chem. Phys.*, **85** (1986) 6602.

2pF08

紫外可視吸収分光, NMR 分光による光合成カロテノイドの基底状態の研究
定影祐樹, 溝口 正, 稲葉 徹, 藤井律子, 小山 泰(関西学院大・理)

自然界には、共役二重結合数nの異なるカロテノイドが存在し、その殆どは分子の中央部では共通の構造だが、末端部の構造は大きく異なる。我々は、カロテノイドの基底状態の電子構造を¹H-, ¹³C-NMR, 紫外可視吸収分光を用いて考察した。

R. *sphaeroides* G1C, 2.4.1からそれぞれヌロスポレン(n=9), スフェロイデン(n=10)を、トマトジュースからリコペン(n=11), C. *vinosum* からアンヒドロロドピリン(n=12), スピリロキサントレン(n=13)を抽出し、all *trans*体を採取した。

n-ヘキサン溶液中でのλ(0-0)の波長, 及びモル吸光係数(ε)の値は共役鎖長に対する依存性が観測された。一方、¹H-NMRでは、共通のオレフィン領域(10H~10'H)の化学シフト値がよく保存されていることが分かった。

	ヌロスポレン	スフェロイデン	リコペン
λ(0-0)/nm	469	484	502
ε/M ⁻¹ cm ⁻¹	159400	173600	181500

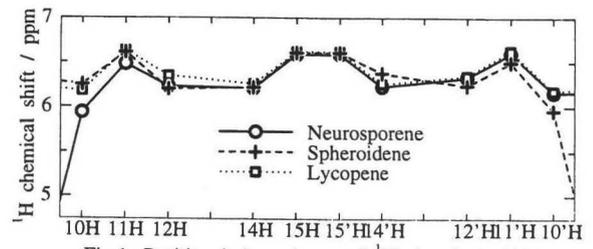


Fig.1. Positional dependence of ¹H-chemical shift

2pF09

新規紅色光合成細菌 *Rhodobaca* のカロテノイドとその生合成経路

高市真一¹, A.D. Milford², M.T. Madigan²

(¹日本医大・生物, ²Southern Illinois Univ.)

最近発見された紅色細菌 *Rhodobaca bongoriensis* は *Rhodobacter* に近縁で、その色素を分析しカロテノイド生合成酵素の性質を検討した。

クロロフィルは BChl a_p であった。カロテノイドはスフェロイデン合成経路によることから、フィトエン不飽和化酵素 CrtI が *Rhodobacter* 型であるが、*Rhodobacter* とは組成が大きく異なっていた。demethylspheroidene, demethylspheroidenone が主成分であることから、メトキシ化酵素 CrtF の活性が低いと考えられる。またケト化した spheroidenone, demethylspheroidenone が多いのでケト化酵素 CrtA の活性が高いと考えられる。培養のときの酸素濃度に応じてケト化カロテノイドの量が変わるので、CrtA は光合成培養条件でも常に存在し、酸素の供給が律速になっていると考えられ、またこの細菌の CrtA 活性が *Rhodobacter* より非常に高いことが判明した。

2pF10

紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の phytoene 不飽和化酵素 CrtI の機能解析
原田二郎、永島賢治、高市真一¹、三沢典彦²、松浦克美、嶋田敬三（都立大・生物、¹日本医大・生物、²キリンビール・基盤研）

紅色光合成細菌の多くは主要なカロテノイドとして spirilloxanthin およびその前駆体、または spheroidene のどちらか一方を合成する。どちらを合成するかはカロテノイド合成の初期段階である phytoene の不飽和化過程において spirilloxanthin の前駆体の lycopene が合成されるか spheroidene の前駆体の neurosporene が合成されるかによって決まると考えられるが詳細は不明である。

Rubrivivax gelatinosus は主要カロテノイド spheroidene に加え spirilloxanthin も相当量合成する。我々はこの菌より phytoene 不飽和化酵素 (CrtI) 遺伝子に相同する遺伝子を 1 コピー見出してこれをクローニングし、大腸菌で発現させたところ、neurosporene に加え lycopene の合成が見られた。また、この *crtI* 欠損株の作成の結果、2 つのカロテノイドが *crtI* のコードする 1 つの酵素により合成される可能性が示された。現在この欠損株に、lycopene 合成能を持つ *Erwinia uredovora* 由来の *crtI* を相補させ、CrtI の機能の差のみによって 2 系統のカロテノイド合成系の差が生じるのかどうかの確認を試みている。

3aF01

樹木葉の光合成律速因子について

津山孝人、小林善親（九大・院・植物資源科学）

樹木葉の光合成活性（空气中・飽和光照射下での最大CO₂吸収速度）は草本葉よりも低い。一方、CO₂の拡散に対する気孔抵抗は樹木葉の方が大きい。しかし、気孔抵抗の違いだけでは樹木と草本における大きな活性の差を説明することはできない。この研究では、樹木葉の光合成律速因子について、クロロフィル蛍光とガス交換速度との同時測定により解析した。これまでクロロフィル蛍光と活性との同時測定は、厚い葉を持つ樹木葉では困難であった。このような測定上の問題点を解決することで次のことが明らかとなった。（1）樹木葉は草本葉よりも光呼吸経路での電子消費の割合が高い。（2）樹木葉のルビスコ近傍は光照射下で極端なCO₂不足の状態にある。（3）樹木葉の葉肉細胞はCO₂の透過性が低い。以上の結果から、樹木葉の光合成活性が低いのは、葉肉細胞においてCO₂の拡散に対する抵抗が大きいためであることが分かった。樹木葉の葉肉細胞におけるCO₂拡散の律速要因についても報告する。

3aF02

ダイズの source-sink モデル植物を用いた高 CO₂ 濃度の光合成能及び炭素代謝への影響

国仲真琴、渡辺晃樹、川村ひとみ、葛西身延、澤田信一（弘前大・農学生命・生物機能）

我々はダイズのモデル植物を用いて高 CO₂ 濃度による光合成 source-sink 制御機構を解析してきた。1) 700ppmCO₂ (highCO₂条件)で生育した植物の 700 及び 350ppmCO₂での光合成速度は生育に伴って低下したが、350ppmCO₂ (control条件)で生育した植物の光合成速度は実験期間を通じて高くほぼ一定であった。2) highCO₂条件植物は control 条件植物よりも葉内の sucrose と starch 含量は大きく増加した。3) highCO₂条件植物は光合成速度が低下しても RuBPCase の initial activity と total activity に大きな低下は見られず、control 条件植物とほぼ同じ値だった。4) highCO₂条件下で光合成速度が低下した植物の A-Ci 曲線の初期勾配は control 条件植物に比べて小さかったが、高 CO₂ 濃度(1200ppm)下では光合成速度は control 条件植物の値に近づいた。

HighCO₂条件下で、光合成速度が低下した植物を 48hr 暗処理すると、光合成速度は完全に回復し、葉に蓄積していた starch は減少した。更に、A-Ci 曲線の初期勾配は control 条件植物とほぼ同じ値になった。

3aF03

ダイコンのシンク能の発達 2.ダイコン/シュート比の小さな栽培種の場合

白田秀明、H. Rouhier、出村拓¹、福田裕穂¹（帝京大学・医学部・化学、¹東京大・院理・生物科学）

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。ダイコンが肥大する品種（ホワイト・チェリッシュ、WCと略）では、invertaseではなく、sucrose synthase (SuSy)がシンク能の発達に重要であることを示した (Plant Cell Physiol. 40:369-377, '99)。播種後21日でWCでは、乾物重の約50%がダイコンに分配された。野生のダイコンに近い、ダイコンの肥大しない品種（小瀬菜では、播種後21日で乾物重の約3%がダイコンに分配されたに過ぎない）で、ダイコンのシンク能について解析した。

小瀬菜ダイコンのシンク活性（ある時の単位重、単位時間当たりの重量の増加）は3.5日で、0.053g/g/day、15日で0.33g/g/dayと著しく増加した（WCの15日のそれは、0.65g/g/day）。両品種のシンク活性とSuSyの活性（存在量）間には、高い相関が認められた。興味深いことに、それらは共通の相関直線に回帰出来た。このことは、ダイコンの肥大の程度に拘わらず、ダイコンのシンク活性にはSuSyが重要であることが示された。両品種に於ける光合成産物の分配、ダイコンの構造の相違についても触れる。

3aF04

トウモロコシPEPCカルボキシラーゼ (PEPC) のリン酸化状態の特異的抗体による解析 - 種々のストレス条件下および日周変化 -

今成英司¹、上野直久²、榊原均³、杉山達夫³、泉井桂¹ (京大院・生命¹、名大院・理²、名大院・農³)

従来、PEPCのリン酸化はリンゴ酸阻害感受性などを指標とした間接的な方法で検出されてきたが、われわれはリン酸化されたPEPCに特異的な抗体を用いたより直接的な解析手法を確立した(Plant J. (2000) in press)。今回、この方法を用いてトウモロコシに低窒素、低CO₂、などのストレスを与えたときのPEPCのリン酸化状態変化を解析した。その結果、リン酸化の上昇が見られた。NやCといった必須要素の不足によりリンゴ酸などC₄回路の中間体の不足が生じ、それがフィードバック要因として補償的にPEPCに働いていることが予想される。

また、露地栽培のトウモロコシを用いた実験では、日の出前からPEPCのリン酸化が観察され、リン酸化には光シグナルの他に概日リズムの関与が示唆された。さらにこの現象を解析するため人工気象器内での制御された環境で育てたトウモロコシについてもリン酸化の日変化を解析した。その実験結果についても合わせて報告する。

3aF05

イネ葉内で高発現したトウモロコシ・ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性化状態

深山浩, 今成英司¹, 土田博子, 泉井桂¹, 松岡信², 徳富(宮尾)光恵(農水省・生物研,¹京大院・農,²名大・生物分子応答)

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) は、重炭酸イオン (HCO₃⁻) とホスホエノールピルビン酸 (PEP) からオキサロ酢酸 (OAA) を生成する反応を触媒する酵素で、C₄植物においてはC₄光合成の初発炭酸固定反応に関与している。PEPCは、N末端近傍のセリン残基がリン酸化されると高活性型となる。C₄植物では、PEPCのリン酸化は光照射で促進されることが知られている。形質転換イネ内で高発現したトウモロコシPEPCのリン酸化率をリン酸化PEPCに特異的な抗体を用いたドットプロット法で解析した。その結果、イネ緑葉内のトウモロコシPEPCは明所ではほとんどリン酸化されないこと、逆に暗所でリン酸化されることがわかった。形質転換イネの光合成CO₂初期固定産物を解析したところ、C₃植物同様、CO₂は最初にC₃化合物であるホスホグリセリン酸に取り込まれることがわかった。この結果は、トウモロコシPEPCは形質転換イネの光合成初発炭酸固定反応には関与していないことを示している。一方、形質転換イネでは、非形質転換イネに比べると、光条件に関わらず、PEPCの基質であるPEP含量が低下し、反応生成物であるOAA含量が増加することがわかった。以上の結果は、イネ葉内のトウモロコシPEPCは活性は低いものの機能しており、炭素代謝に何らかの変化をもたらす可能性を示唆している。

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。

3aF06

CLONING AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE (PEPC) GENE FROM THERMOPHILIC CYANOBACTERIUM *Synechococcus vulcanus*

Li-mei CHEN¹, Takuma OMIYA¹, Shingo HATA^{1,2}, Yorinao INOUE³, Katsura Izui^{1,2}; ¹Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., ²Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., Kyoto 606-8502; ³Photosynthesis Res.Lab.(Riken), Saitama 351-0198

The PEPC gene was cloned and sequenced from *S.vulcanus* by screening genomic DNA library. The coding region was inserted into a pET32a so as to be expressed under the control of T7 promoter. The optimum activity of purified recombinant SvPEPC had a V_{max} value of about 25.3 μmol min⁻¹(mg protein)⁻¹ at optimum pH 9.0, at 30°C. The Km values for PEP and Mg²⁺ were 0.58, 0.45 mM at pH 7.5 and 0.53, 0.3mM at pH 9.0, respectively. Enzyme activity was drastically activated by FruC-1,6-P₂, while acetyl-CoA had no effect to the enzyme at pH 7.5. SvPEPC was very sensitive to the inhibition by aspartate and the inhibition was relieved by Gluc-6-P, enhanced by L-glutamate and L-glutamine. The enzyme was more tolerant to heat treatment at 40, 50 and 60°C, compared with C4-form PEPC of *Zea mays*(MaizePEPC). SvPEPC was also more tolerant to guanidine hydrochloride than MaizePEPC.

3aF07

異なったCO₂分圧下におけるRubiscoアンチセンスイネの個体レベルでの育成¹

牧野 周、原田理代、兼子健太郎、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Rubiscoの小サブユニット遺伝子 *rbcs* をアンチセンス方向に導入し、Rubisco量を減少させた形質転換体イネを作出している。ここでは、Rubisco量を非形質転換体イネに対して65%に減じたものと40%に減じた植物を用い、異なるCO₂環境下における個体レベルでの育成について調べた。光強度は1000 μmol m⁻² s⁻¹、昼温/夜温、25/20°Cで、CO₂分圧は36/100 Paで栽培した。

36 Pa CO₂環境下ではアンチセンスイネの乾物生産量は著しく低く、その成長はRubisco量と相関があった。しかしながらその一方で、葉面積比の増加、葉への窒素投資量の増加、光合成産物の成長への利用効率の向上、および葉の老化の遅れなどの補償作用が認められた。

100 Pa CO₂環境下においては非形質転換体イネとアンチセンスイネの乾物生産にはほとんど差がなかった。Rubisco量65%のイネは理論的には高CO₂環境に最適化したものであったが、乾物生産量が非形質転換体を越えることはなかった。これは初期育成のRubiscoアンチセンス効果が大きいことによっているものと推定された。しかし、育成後半では純同化率は非形質転換体イネを若干上回り、純同化率を全葉身の窒素含量で割って算出した乾物生産の窒素利用効率は形質転換体イネの方が高かった。

¹Makino et al. (2000) *Aust. J. Plant Physiol.* 27(No. 1) in press.

3aF08

Rubisco アンチセンスイネにおける

光ストレス回避機構について

牛尾 亜由子、牧野 周、横田 聡、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 *rbcs* 遺伝子をアンチセンス方向に導入し Rubisco 量を約 40%まで減少させた形質転換体イネを得た。Rubisco は強光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の形質転換体イネは、真夏の炎天下で一切光阻害を受けることなく正常に生育した。

そこでその光阻害回避機構を明らかにするため、ガス交換とクロロフィル蛍光の同時測定を行うとともに、光エネルギーの熱放出に関与するキサントフィル色素と Water-Water Cycle の活性酸素消去系の酵素 APX, SOD, GR の酵素活性の測定を行った。

その結果、アンチセンスイネは Wild イネに比べ光合成が低下した分、PSII の量子収率が低下し、それに伴って NPQ の増加が見られた。また、熱放出に関わるキサントフィルサイクル色素の割合が変化し、ゼアキサントフェンの含量が Wild イネに比べ著しく増加していた。しかしながら活性酸素消去系酵素の活性には Wild イネとアンチセンスイネで大きな差が認められなかった。このようにキサントフィル色素による熱放出機構がアンチセンスイネの光阻害回避の重要なメカニズムであると思われた。

3aF09

単離葉緑体におけるストロマタンパク質の分解—活性酸素を介した Rubisco 及び GS の断片化機構の解析—

石田宏幸、安澤大輔、国分紀元、牧野 周、前 忠彦 (東北大院・農・応生科)

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 大サブユニット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てきた (1, 2, 3)。また Rubisco と同じくストロマに局在するグルタミン合成酵素(GS)が、同様の系において断片化されることを見出した (4)。本研究では、葉緑体におけるストロマタンパク質の分解機構の一端を明らかにすることを目的として、活性酸素を介した GS の断片化についてさらに解析した。

GS の断片化には光照射が必須であり、暗所下では全く断片化されなかった。種々のプロテアーゼ阻害剤や活性酸素消去剤の効果から、GS の断片化には Fenton 反応を介して生じるヒドロキシルラジカルが関与していることが示唆された。そして葉緑体破砕液にヒドロキシルラジカル発生系を加え暗所下でインキュベートしたところ、光照射下の場合と同じ断片化の出現が見られた。一方、破砕液に ATP を添加しても断片化の促進は見られなかった。これらの結果は、GS の断片化は Rubisco の場合と同様に活性酸素の直接作用により引き起こされており、ATP 依存性のプロテアーゼは関与していないことを示唆した。

(1) Ishida et al. (1997) Plant Cell Physiol., 38, 471; (2) Ishida et al. (1998) Planta 204, 305; (3) Ishida et al., (1999) J. Biol. Chem., 274, 5222; (4) Ishida et al. (1999) Plant Cell Physiol., 40, s120.

3aF10

水陸両生植物 *Eleocharis baldwinii* における C3, C4 光合成酵素の細胞蓄積パターン

上野 修 (農水省・生物研)

カヤツリグサ科の水陸両生植物 *Eleocharis baldwinii* は、陸上では Kranz 型の組織構造と C4 様の光合成代謝特性を示すが、沈水中では維管束鞘細胞の減少と葉肉細胞の発達を表し、C3-C4 中間的な代謝を行う。本研究では、陸生型と水生型の光合成組織における C3, C4 光合成関連酵素の蓄積様式を検討した。Western blot による解析から、水生型では陸生型に比べ、PEPC, PPK, NAD-ME の蓄積量が減少したが、NADP-ME の蓄積量は増加することが認められた。Rubisco については陸生型・水生型でほぼ同じか、後者が幾分か多かった。免疫電顕法による解析から、陸生型の葉肉細胞の葉緑体にも若干の Rubisco の蓄積が認められ、水生型ではこの蓄積量が陸生型に比べ増大した。両生育型ともに PEPC と PPK は維管束に近い葉肉細胞ほど多量に蓄積していたが、NAD-ME は維管束鞘細胞のミトコンドリアに特異的に蓄積していた。また NADP-ME は両生育型ともに、光合成細胞の主に葉緑体に認められた。以上の結果から、本植物は 2 つの生育型の間で、光合成代謝酵素の発現パターンを巧妙に調節することにより陸上および水中環境への適応を果たしているものと考えられ、どのような炭素代謝経路が動いているのか考察した。

3aF11

アミノ酸置換による、フォールオーバー現象をはじめとするクラミドモナス RuBisCO の構造活性相関の解析

溝端栄一^{1,2}、富澤健一²、三宅親弘¹、横田明穂^{1,2} (¹奈良先端大・バイオ, ²RITE・植物分子生理)

高等植物 RuBisCO のカルボキシラーゼ反応は、反応開始直後に観察される急激な活性の低下 (first phase, FP) と、続いて起こる緩やかな活性の低下 (second phase, SP) による二相性の経時変化を示す。この現象はフォールオーバーと呼ばれている。我々はこれまでに、高等植物 RuBisCO の大サブユニットで保存される 3 つのアミノ酸残基 (K21, R258, K305) が、FP に関与することを示唆している。今回、クラミドモナス RuBisCO の対応するアミノ酸残基を、高等植物型のアミノ酸に置換した。我々の解析法は、これまでの報告とは異なり、野生型クラミドモナス RuBisCO にも FP が存在することを明らかにした。また、変異 RuBisCO は野生型 RuBisCO に比べて、FP における活性の低下が著しく減少した。本大会ではさらに、アミノ酸置換が RuBisCO のキネティクスパラメーターや高次構造に与える影響について報告する。

3aF12

クラミドモナスの低光呼吸突然変異株とその性質 (3)

鈴木健策 (農水省・東北農試・生理生態研)

クラミドモナスのホスホグリコール酸ホスファターゼ (PGPase) 欠損突然変異株 *pgp1-18-7F* にさらに突然変異を誘発し、PGPase が欠損しているにも関わらず大気条件でも生育できるクラミドモナスの二重突然変異株として得た 7FR2N 株では、光合成の無機炭素に対する親和性が大きく、光呼吸速度は野生株の半分程度しかない (Suzuki 1995, Suzuki et al. 1999)。この株では低い光呼吸速度 (RPR) とルビスコの CO_2/O_2 相対特異性との関連性は認められない。この株を戻し交配して得た A82 株は RPR 変異のみを持ち PGPase 活性は正常であるが、この株の光合成の無機炭素に対する高い親和性が、EZA や Na₂S の存在下では失われることを前回報告した。このことはその RPR 変異が CO_2 濃縮機構と密接に関わっていることを示している。今回はこの RPR 変異遺伝子解明の手がかりを得る目的で、そのクロロフィル蛍光特性をはじめとした光合成の性質のいくつかについて、野生株および、*pmp1-16-5K* 等の CO_2 濃縮機構関連突然変異株と比較した結果を報告する。また CO_2 濃縮機構への光化学系の関与についても議論する予定である。

3aF13

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE FROM *CHLAMIDOMONAS REINHARDTII*

Tarlan G. MAMEDOV and Kensaku SUZUKI; Plant Eco-Physiol. Lab., Tohoku Natl. Agric. Exper. Station, Morioka 020-0198

Phosphoglycolate phosphatase (PGPase) (EC 3.1.3.18) is a key enzyme of photorespiration that is essential for plant growth under light. In spite of several reports on the partial purification of PGPase from higher plants, a green alga and a cyanobacterium, further information have not been available for any of eukaryotic PGPase. We have purified PGPase from *Chlamydomonas reinhardtii* using heat treatment, ammonium sulfate fractionation, anion-exchange (DEAE-Sephacel) and hydrophobic chromatography (Phenyl Sepharose), and native polyacrylamide gel electrophoresis, as the first homogeneous PGPase purified from eukaryotic organisms. The molecular mass of PGPase from *C. reinhardtii* was estimated to be approximately 65 kD by gel filtration on Superdex 200 and to be approximately 32 kD by SDS-electrophoresis, suggesting that the PGPase is composed of two identical or very similar subunits as in higher plants. The undissociated enzyme was an acidic protein with a pI of 5.1. Partial N-terminal amino acid sequence was also determined up to 21 residues. We also found that calcium is a strong inhibitor and the inhibition is competitively recovered by following addition of magnesium.

3pF01

海洋性ケイ藻 *Phaeodactylum tricornutum* における、高 CO_2 環境から低 CO_2 環境への順化について

原匠、松田 祐介 (関西学院大・理・化学)

海洋性のケイ藻 *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX640) について、光合成の高 CO_2 環境から低 CO_2 環境への順化過程を追跡した。酸素電極を用いた測定によれば、高 CO_2 (5%- CO_2 を含む大気) で通気培養した細胞の光合成の溶存無機炭素に対する親和性は、低 CO_2 (通常の大気) で通気培養した細胞の場合の約 10% であった。

この高 CO_2 培養細胞を低 CO_2 環境に移植したところ、徐々に溶存無機炭素に対する親和性が上昇し、24 時間後には、低 CO_2 培養細胞と同程度の高い親和性を獲得した。また、順化中の細胞において、細胞外カーボニックアンヒドラーゼの活性は検出されなかった。低 CO_2 環境に移植直後の細胞では、測定系に牛赤血球カーボニックアンヒドラーゼを加えることで大幅な親和性の上昇が見られたが、低 CO_2 環境に完全に順化した細胞では、その差はほとんど見られなかった。さらにこの順化の光依存性を検証するため、暗下での測定も行った。

3pF02

海洋性珪藻類 *Phaeodactylum tricornutum* におけるカーボニックアンヒドラーゼの解析および精製

平岡 康隆、佐藤 暖、松田 祐介 (関西学院大学・理・化学)

珪藻類は一般的に溶存無機炭素濃縮機構 (CCM) を持っており、水中での高い光合成能力の原動力と考えられている。海洋性珪藻類は水圏におけるきわめて重要な一次生産者の一つと見なされているが、その CCM については知られていない事が多い。本研究では、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX642) から、CCM の重要なコンポーネントと考えられる carbonic anhydrase (CA, EC 4.2.1.1) を単離精製し、その性質を調べた。大気レベルの CO_2 条件下で培養した細胞の CA 活性は細胞外にはほとんど見られず、細胞破砕後の上清に高い活性が見られた。これを硫酸塩析、陰イオン交換カラムゲラフィー及び *p*-アミノメチルペンシルフォニアミド アカロースゲルを用いたアフィニティカラムゲラフィーに供することで電気泳動的に単一のタンパク質を精製した。この CA は分子量約 29 kDa であり、また、生理学的な測定結果から低 CO_2 環境で特異的に細胞内可溶画分に現れるタンパク質であることが示唆されている。

3pF03

緑藻 *Chlorella ellipsoidea* CO₂不感受性変異体の高 CO₂濃度への順応

落合 輝彦、松田 祐介 (関西学院大学・理・化学)

緑藻 *Chlorella ellipsoidea* の野生型を高 CO₂濃度で生育した時、無機炭素濃縮機構 (CCM) の発現は抑制される。高 CO₂濃度から低 CO₂濃度へ移した後は、CCM が発現し、細胞外の溶存無機炭素 (DIC) に対して高い親和性を有するようになる。これまでに CCM の発現が細胞表面の CO₂濃度によって直接抑制されていることがクロレラで示唆されている。この仮説は、X線および N-ethyl N-nitrosourea (ENU, 0.5mg ml⁻¹) で誘発された CO₂不感受性変異体の単離によって支持されている。これらの突然変異体は高 CO₂環境でも DIC に対して高い親和性を有する。本研究では、CCM の作動している細胞に対する高 CO₂濃度の影響を調べるため、野生型と CO₂不感受性変異体の低 CO₂生育細胞を高 CO₂環境へ移し、順化過程に於ける最大光合成速度、DIC に対する親和性、及び成長速度を測定した。その結果、移植 6 時間後の最大光合成速度は、野生型で初めの約 50%、変異体で約 70% に低下した。その後、共に徐々に回復し、野生型で 2 日後、変異体で 1 日後に始めのレベルに到達した。細胞の成長は共に 2 日間停止した後、回復した。DIC に対する親和性は、野生型で 5 日後から 9 日後にかけて低下し続けたが、変異体で全く低下しなかった。これらのことから CO₂不感受性変異体は、CCM の抑制が見られないことに加えて、高 CO₂濃度ストレスに対して野生型よりも高い順応性を持つことが示唆された。

3pF04

緑藻クロレラの CO₂反応性に関連して発現する遺伝子について

佐藤 暖、廣住吾郎、松田祐介 (関西学院大学・理・化学)

緑藻は、無機炭素濃縮機構 (CCM) と呼ばれる、外界の溶存無機炭素 (DIC) を細胞内に蓄積するしくみをもっており、それによって蓄積された DIC を資源にして光合成を行う。この機構は、外界の CO₂によって制御されることが分かっているが、その分子機構については解明されていない。

CCM は、外界の CO₂濃度が自然界レベルであるときにはたらいで DIC を積極的に取り込むが、CO₂濃度が自然界よりも高くなると抑制されるという特徴をもっている。

現在、このような CO₂への反応性をもたない突然変異体が得られており、野生型とこの突然変異体の発現情報をサブトラクション法を用いて比較したところ、野生型あるいは突然変異体に特異的に発現する遺伝子を得ることができた。CCM の発現とこれらの遺伝子の発現から、CO₂応答に関係している分子について知見を得たので報告する。

3pF05

超高濃度 CO₂条件下での光合成に及ぼす carbonic anhydrase の影響に関する超高濃度 CO₂耐性及び非耐性微細藻における比較検討
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)

海産性微細藻 *Chlorococcum littorale* は、40%CO₂を含む空気に適応可能な超高濃度 CO₂耐性株である。しかし、空気を通気して生育させた細胞 (air 細胞) を 40%CO₂条件に移行させると、数日間は光合成・生育ともに殆ど完全に抑制され、その後回復する。一方、5%CO₂細胞を 40%CO₂条件に移行しても光合成・生育のラグは認められない。前年度年会では、air 細胞では細胞内 carbonic anhydrase (CA) 活性が高く [約 1,100 units/ml 細胞体積 (PCV)]、5%CO₂細胞ではその活性は殆ど検出されないことに注目し、さらに CA 阻害剤 EZA を用いた検討などから、air 細胞に認められる 40%CO₂による光合成・生育の極端な抑制の原因が細胞内 CA である可能性を報告した [CA は CO₂+H₂O ⇌ HCO₃⁻+H⁺の反応を触媒し、過剰な CO₂の存在下で H⁺の生成 (酸性化) が起こる]。本研究では、蛍光プローブ BCECF を用いて細胞内 pH (pH_i) を実測し、air 細胞を 40%CO₂に 1~2 時間曝すと pH_iが 7.0 から 6.4 に低下したが、EZA 存在下では低下しなかったことから、細胞内の酸性化、さらにその原因が CA であることが確認された。Air 細胞を 20-40%CO₂に移行した時、CA 活性が 5%CO₂細胞と同様に消失すること、液胞数・液胞 ATPase 活性・光化学系 I 活性 (extra ATP 供給) など、pH_i調節に関わると思われる要因の増大が既に確認されている。さらに、5%程度以上の CO₂濃度に移行された時の CA 活性の消失が、pH_i調節のために重要と考えられる。次に、air および 5%CO₂細胞のいずれも 40%CO₂条件で生育できない超高濃度 CO₂非耐性株、*Stichococcus bacillaris*、について検討した。この細胞では 5%CO₂細胞においても air 細胞と同等の細胞内 CA 活性 (約 200 units/ml PCV) を有していた。また、5%CO₂細胞を 40%CO₂に 1 時間曝すと、わずかではあるが光合成電子伝達が低下し、この低下は EZA によって軽減された。従って、CA は *S. bacillaris* においても 40%CO₂条件下での光合成を軽度だが抑制すると考えられた。(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。)

3pF06

シアノバクテリアにおけるカーボニックアンヒドラーゼの活性発現に必要な C 末端領域の同定

鈴木英治、海老原夏紀、安野祥史 (茨城大・理・環境)

シアノバクテリアの細胞内に局在し、CO₂濃縮機構に関わるカーボニックアンヒドラーゼ (CA) は、大腸菌 CA と比較して 51 アミノ酸残基、植物 CA より 65 残基、C 末端領域が長い。この特徴的な C 末端領域の生理機能を明らかにするため、欠失株を作成し、解析を行った。

Synechococcus sp. PCC 7942 株の CA 遺伝子 (272 アミノ酸残基) について、C 末端コード領域内に終止コドンを導入して長さの異なるものを作成し、CA 遺伝子欠失株に形質転換した。CA 遺伝子欠失株は、高 CO₂濃度要求性なので、大気 (低 CO₂) 条件下での生育能の回復を指標として、必要領域の特定を行った。その結果、アミノ酸残基数を 264 以下に切り詰めたものでは、低 CO₂条件下での生育は全く認められず、一方、269 および 272 残基の CA を導入した株は、野生株と同等の生育を示した。以上の結果、他の相同蛋白質には見られない独特の C 末端領域は、シアノバクテリア CA の活性発現に必須であることが示された。また、*Synechococcus* CA とのアミノ酸配列の相同性が 56% である、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株の CA 遺伝子を欠失株に形質転換した結果、低 CO₂条件下での生育能が回復した。従って、両種の CA において、C 末端領域も含めた全領域が、機能的に保存されていることが示唆された。

3pF07

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942 のカルボキシソーム形成に関わる遺伝子の完全除去とその形質転換体の性質

石田裕幸、井上則子、原納究、岩城俊雄、和田野晃
(大阪府大・農・応生化)

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942 の野生株およびカルボキシソーム欠損株(K.O 株)を CO₂ 律速条件下で生育させると、total RuBisCO 活性は、5% CO₂ 生育株に比べ、それぞれ約 2.5 倍、約 4 倍に上昇した。これは Ci pump では補償できない CO₂ 律速条件下では、total RuBisCO 量を増加させ、細胞内 RuBisCO の活性化率の低下を補償していると考えられる。また、CO₂ 律速条件下で生育させた K.O 株の低 CO₂ 濃度下での光合成速度は、5% CO₂ 生育株に比べ、約 2 倍に上昇したが、最大光合成速度はほぼ同じであった。この条件下では、Ci pump は誘導されていると考えられ、光合成速度の上昇は RuBisCO 量の増加と RuBP 再生能力の組み合わせによる、光合成の見かけの Km_{CO2} 値の低下によると考えられる。細胞内 RuBP 濃度を定量することによって、RuBisCO 活性と RuBP 再生速度が、CO₂ 律速条件下と高 CO₂ 濃度下で光合成速度に与える影響を考察した。

3pF08

ラン藻の光合成炭素還元系調節機構 -CP12の生理機能-
田茂井 政宏、山下 麻衣子、小林 大輔¹、和田野 晃¹、重岡 成
(近畿大・農、¹ 阪府大・応生化)

我々はラン藻(*Synechococcus* PCC 7942, *Synechocystis* PCC 6803) のSH酵素が光還元力により活性調節を受けないことを見いだした(BBB 62, 374, 1998, BBA 1383, 232, 1998)。さらにSH酵素を分子レベルで解析した結果、1) これらの酵素の調節部位に関与するシステイン残基(Cys)が欠損しているか周辺の構造が異なっている、2) 新規酵素fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/SBPase) はFBPとSBPの両方を加水分解することを明らかにした。そこで、本研究ではラン藻のPCRサイクルの明期/暗期における調節機構を考察した。

1) FBP/SBPaseはFBP/SBP濃度比の変化により活性が上昇した。2) FBP/SBPaseは低濃度のAMPにより著しく阻害された(Ki=0.26 mM)。3) FBP/SBPase活性はMg²⁺濃度依存性を示すが、明/暗期におけるMg²⁺濃度変化はFBP/SBPaseの活性に影響を及ぼさなかった。4) ラン藻のGAPDHは葉緑体型とは異なりAMPやNADPHによる活性化を受けなかった。5) 酸化的ペントースリン酸経路の6-ホスホグルコン酸(6PG)はPRK活性を阻害した。6) ラン藻にもPRKおよびGAPDHと複合体を形成するタンパク質CP12遺伝子が存在することから、NADPH濃度によりPRK活性が調節される可能性を示していた。そこでCP12の生理機能を明らかにすることを目的に、大腸菌でのラン藻CP12の発現系を構築し、His-Tag融合タンパク質として精製した。現在リコンビナントCP12とラン藻の各酵素との相互作用、活性への影響を検討中である。以上、ラン藻のPCRサイクルの調節には、AMP、6-PGおよびCP12(NADPH/NADP)によるFBP/SBPase、PRK活性の調節が重要であることが示唆された。

3pF09

ラン藻fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase 導入形質転換植物の光合成炭素還元系への影響
宮川 佳子¹⁾、市原 健志¹⁾、田茂井 政宏²⁾、重岡 成^{1,2)}
(近畿大・院・応生生命¹⁾、農・食栄²⁾)

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(PCRサイクル)の律速酵素の1つである。我々は、FBPaseとSBPase活性の両方を有し、光調節を受けないラン藻*Synechococcus* PCC7942のFBP/SBPaseを葉緑体に発現させた形質転換タバコ(TFI-3)を作成した。TFI-3の生育は野生株よりも速く、最終的な背丈は野生株の1.4倍、乾燥重量は1.5倍に上昇した。上葉ではヘキソースおよびシュクロース含量が、下葉および根ではデンプン含量が著しく増加した。そこで今回、PCRサイクルに及ぼす影響を詳細に検討するため、両株の光合成能、PCRサイクル酵素、代謝中間体(RuBP, PGA, F6P, G6P, DHAP)を測定した。

大気CO₂条件下(360 ppm, 1000 μE/m²/s)におけるTFI-3の光合成速度は野生株の1.25 ± 0.03倍に上昇した。さらに400 μE/m²/sの光条件下で細胞内CO₂濃度を変化させて光合成速度を測定したところ、CO₂飽和条件下(Ci>600 ppm)においてTFI-3の光合成速度は野生株よりも約1.5倍上昇していた。両株のPRK、NADP⁻-GAPDH、Aldolase、RuBisCO活性レベルに有意な差は認められなかった。興味深いことに、形質転換体のRuBisCOの活性化率が野生株の1.2倍に上昇していた。栽培条件下(400 μE/m²/s、相対湿度 60%、25℃)でTFI-3の面積当たりRuBPおよびF6P量は野生株の約2倍に、PGA、G6P、DHAP量は野生株の約1.4~1.5倍に上昇していた。以上より、FBPaseおよびSBPase活性の上昇は光合成速度の上昇をもたらす、カルビンサイクルの炭素代謝を大きく変化させたことが明らかになった。

1aG01

RPT2: シロイヌナズナの光屈性シグナル伝達因子
酒井達也、岡田清孝（京都大院・理・植物）

青色光受容体 NPH1 (*nonphototropic hypocotyl1*) はシロイヌナズナの胚軸及び根の光屈性を誘導する唯一の UV-A/Blue light 受容体と考えられてきた。しかしながら今回、根の光屈性異常突然変異体 *root phototropism (rpt)* の解析によって、光屈性に関与する第二の光受容体の存在、及びその下流の少なくとも二つのシグナル伝達経路の存在が明らかにできた。新たに単離した RPT2 遺伝子はその片方の経路に関与していた。RPT2 は光誘導遺伝子で、予想されるアミノ酸配列から、複数のリン酸化サイト、核移行シグナル、タンパク質間の相互作用に関与する BTB/POZ ドメイン及びコイルドコイルドメインをコードしていることが予想された。また相同遺伝子解析から RPT2 は光屈性に関与する NPH3 を含んだ大きな遺伝子ファミリーに属することが分かった。遺伝学、生理学、生化学的な解析から、我々はシロイヌナズナにおける光屈性シグナル伝達経路のモデルを提案する。

1aG02

転写因子ATHB-2の標的遺伝子の探索

大岸麻紀、岡 穆宏、青山卓史（京大・化研）

シロイヌナズナのHD-Zipタイプのホメオボックス遺伝子群、ATHBは環境刺激応答から形態形成にいたるまでのシグナル伝達に関与していると考えられている。そのうちの一つであるATHB-2は赤外光に富む光によって即座に強く発現誘導されることが知られており、光を介した伸張現象における制御的な役割を果たしていることが示唆される。我々はキメラ遺伝子、HDZip2-VGを作成した。これはATHB-2のDNA結合領域、VP16の転写活性化領域、そしてラットのGRのホルモン結合領域からなる、転写因子をコードする。我々はこのキメラ遺伝子HDZip2VGを導入したシロイヌナズナ形質転換体にDEXを処理することによって転写が誘導される遺伝子をgenomic micro arrayを用いて探索している。

1aG03

トランスポゾンタギングを用いた光形態形成突然変異cop1の抑制変異株の単離および解析
○吉積毅^{1,2}、山本義治¹、島田浩章²、松井南¹（¹理研・GSC・植物ゲノム・植物変異探索、²東京理大・基礎工・生物学）

植物の形態は外的環境要因によって精密に制御されており、それらの一つとして光が重要な役割を担っている。アラビドプシスのcop1変異株は、暗所において明所で見られる表現型を持つ。このことは、COP1タンパク質が光形態形成を抑制する制御因子であることを示している。

COP1タンパク質から下流の情報伝達系を解明するために、トランスポゾンタギング法を用いて、cop1変異株にさらに変異を加えることで、cop1から野生型へ復帰する抑制変異株とそれに関わる遺伝子の単離を試みた。現在までに、暗所においてcop1の表現型を抑制する変異株を5系統単離し、それらの変異株の一つについて詳細な解析を行っている。解析の結果から、この変異株は、暗所だけではなく様々な光環境下においても、cop1変異株と比較して、胚軸が伸長することが明らかになった。さらに、cop1変異株は、アントシアニンの蓄積が見られ、暗所から明所へ移したときの緑化が正常に行われぬ。ところが、この抑制変異株では、暗所での胚軸伸長抑制のみならず、これらのcop1変異株に特徴的な表現型についても抑制することがわかった。

1aG04

核タンパク質CIP4は光形態形成の正の制御因子である
山本義治¹、Xing-Wang Deng²、松井南¹
（¹理研・GSC、²Yale大・MCDB）

シロイヌナズナの CONSTITUTIVELYPHOTOMORPHOGENIC1 (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ター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た。そのうちの一つ、COP1-Interacting Protein4, CIP4は新奇の核タンパク質をコードしており、転写活性化能があることから共転写因子であることが示唆された。逆向き遺伝学的手法を用いて、CIP4の生体内における役割を調べたところ、実際に光形態形成に関与していること、そして、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。いくつかの解析結果からCIP4もCIP7同様にCOP1の下流に位置する光シグナル伝達因子であることが明らかにされた。CIP4とCIP7は異なる光応答を担うことから、PHYA、PHYB、CRY1より発せられた光シグナルは一旦COP1において合流した後、再びCIP4、CIP7へと分岐し、個々の光応答へと繋がるということが強く示唆された。

1aG05

ミズワラビ (*Ceratopteris richardii*) 前葉体における
仮根形成時の不等分裂の光制御

村田 隆, 菅井道三¹ (東京大・院総合文化・生命,
¹富山大・理・生物)

多くのシダ植物においては、胞子の発芽時に不等分裂が起こり、原糸体細胞と仮根が分化する。しかしながら、分裂過程の顕微鏡観察は着色した厚い胞子壁の存在のため難しい。一方、発芽後の原糸体、前葉体は顕微鏡観察が比較的容易であるが、不等分裂を同調的に誘導できる実験系は報告されていなかった。我々はミズワラビ (*Ceratopteris richardii*) 前葉体細胞において不等分裂が光により同調的に誘導できることを見だし、解析を行ったので報告する。

暗所で培養したへら状前葉体は、細胞3-5列で中間部に細胞伸長域を持つ。前葉体を暗黒下から白色光下に移すと、伸長域の細胞が不等分裂を起こし、形成された小さい細胞は仮根に分化した。不等分裂は短時間の赤色光 (100Jm⁻²) で誘導することができたが、青色光は効果が弱かった。分裂誘導におけるフィトクロムの関与については現在検討中である。

1aG06

西洋ワサビ毛状根に導入したフィトクロム遺伝子の過剰発現による光誘導不定芽形成に対する効果

齋藤 力, 鈴木 達哉, 徳富 哲¹, 鎌田 博 (筑波大・生物,
¹大阪府立大・先端研)

西洋ワサビ (*Armoracia rusticana*) に *A. rhizogenes* を感染させて得られる毛状根を、明所下、植物ホルモンを含まないMS培地上で培養すると不定芽が形成される。この光誘導不定芽形成には、光受容体としてフィトクロムが関与し、毛状根の基部側末端ではフィトクロムレベルが高く、また、*PHYA*, *PHYB* の転写産物量は毛状根の基部側に多く蓄積している。

そこで、西洋ワサビより単離した4種類のフィトクロム遺伝子 *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYE* をセンス方向に西洋ワサビ毛状根に導入し、フィトクロムレベルおよび光誘導不定芽形成に与える影響を検討した。その結果、それぞれの遺伝子をセンス方向に導入した場合、*GUS* 遺伝子を導入したコントロール毛状根に比べてフィトクロムレベルが増加している毛状根が得られた。このフィトクロム過剰発現毛状根において光誘導不定芽形成頻度を調べたところ、どのタイプの遺伝子を導入した場合においても不定芽形成頻度は上昇した。また、*PHYA* のアンチセンス遺伝子を導入した毛状根では、コントロール毛状根に比べてフィトクロムレベルが低下している毛状根が得られ、フィトクロムレベルの低下した毛状根における光誘導不定芽形成頻度はコントロールの毛状根に比べて減少していた。以上の結果より、西洋ワサビの *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYE* 遺伝子はフィトクロムをコードしており、どのタイプのフィトクロム遺伝子も西洋ワサビ毛状根における光誘導不定芽形成を促進し、毛状根内でのフィトクロムレベルの変動には *PHYA* が最も深く関与しており、*PHYA*, *PHYB* の光誘導不定芽形成への関与が強く示唆された。

1aG07

西洋ワサビからの *PIF3* 遺伝子の単離と解析
鈴木 達哉, 齋藤 力, 鎌田 博 (筑波大学・生物)

西洋ワサビ (*Armoracia rusticana*) に *A. rhizogenes* を感染させることで得られた毛状根を、明所下において植物ホルモンを含まないMS培地上で培養すると不定芽が形成される。これまでの研究で、この光誘導不定芽形成には光受容体としてフィトクロム、中でも *phyA*, *phyB* が関与することを明らかにしてきた。そこで、光誘導不定芽形成におけるフィトクロムの下流の情報伝達経路を明らかにする目的で、*phyA*, *phyB* と相互作用し、情報伝達に関与する因子、*PIF3* のホモログを西洋ワサビから単離することを試みた。

西洋ワサビの毛状根および緑葉より作成したcDNAライブラリーから、シロイヌナズナの *PIF3* genomic DNA 断片をプローブとしてスクリーニングを行った。その結果、毛状根のライブラリーから2種類、緑葉のライブラリーから3種類、合計4種類のクローンが単離できた。これら4種類のクローンはシロイヌナズナの *PIF3* に対して80%程度の高い相同性を示した。また、どのクローンもシロイヌナズナの *PIF3* がもつ PAS ドメイン、bHLH ドメインを持っていた。

1aG08

春化したオオムギの茎頂分裂組織で特異的に発現誘導される遺伝子の解析

木藤新一郎, 山岸紀子, 江尻慎一郎 (岩大・農・寒冷バイオ)

オオムギをはじめとする多くの植物は栄養生長から生殖生長への移行に春化を要求する。しかし、春化の分子機構は明らかにされておらず、関連する遺伝子の単離も行われていない。我々は、低温を感知すると考えられている茎頂分裂組織において春化にともない分子レベルでどのような質的変化がおきているのかを明らかにするため、低温要求性の高いオオムギ (ミノリムギ) の茎頂分裂組織を用いて春化の前後で発現変動する遺伝子の解析を行っている。

本研究では、PCRを利用したcDNAのサブトラクション法 (cDNA-RDA法) で春化が完了したミノリムギの茎頂分裂組織で特異的に発現誘導される遺伝子の単離を行った。単離したcDNA断片の塩基配列を調べ、ホモロジー解析を行った結果、受容体型プロテインキナーゼ、ヒストンH1、glycin-rich RNA結合タンパク質、HSP70、 α -チューブリン等の遺伝子と高い相同性を示すcDNA断片が多く含まれており、これら遺伝子の発現が春化した茎頂分裂組織で特異的に上昇している可能性が示唆された。現在、これら遺伝子と春化との関連性を探るため詳細な発現解析を行うとともに、オオムギで単離報告のない受容体型プロテインキナーゼの遺伝子単離を進めており、その結果についてもあわせて報告し機能について考察する。

1aG09

アカパンカビ時計遺伝子, *wc-1* の新たな対立遺伝子変異株の解析

中堀清・豊田勝也¹・角良則・小内清²・中島秀明(岡山大学・理・生物¹ 日水製薬² 基生研・発生生物学)

生物時計の分子機構の解明を目指し, 分生子形成に概日リズムの見られるアカパンカビを用いて解析を進めている。DNA挿入法を用いて新たな *wc-1* 遺伝子の対立遺伝子変異株 (*rhy-2* 株) を分離した。この株は恒暗条件下では分生子形成リズムを示さないが, 光パルス処理に対しては同調できることがわかった。シーケンスの結果, *wc-1* 遺伝子のグリシンリッチな領域よりも下流が挿入断片内のカルモジュリンプロモーターにより恒常的に発現している可能性が示された。これはこの領域がリズム発現に必須であることを示している。また, カルモジュリンプロモーター支配下に完全長 *wc-1* 遺伝子を置いた株を作出してリズムの発現と光への応答を調べたが野生型との違いは見られなかった。このことは, この2つの現象については *WC-1* のプロモーター領域は重要な働きをしていないが, 完全長の *WC-1* タンパク質が恒常的に存在する必要があることを示唆している。

FRQ タンパク質と *WC-1* タンパク質に対する抗体を用いて以上の推論を確認する実験も行っている。

1aG10

形質転換タバコにおける時計制御遺伝子 *GLP* の機能解析

小野公代, 相田徳子, 鎌田博, 小野道之¹ (筑波大学・生物, ¹秋田県立大・生工研)

光周性花成誘導の分子機構を明らかにする目的で, アサガオの花成誘導暗期中に特異的に発現する遺伝子として *PnGLP1* が単離された。アサガオは短日性花成誘導のモデル植物として多くの生理学的な知見があり, *PnGLP1* はその生理的な観察結果とよく一致した発現様式を示しているが, その機能は不明である。そこで, *PnGLP1* の cDNA を過剰発現 (Sense) あるいは発現抑制 (Antisense) させた形質転換植物を用いて, 光周性花成への影響を調査した。形質転換に用いたタバコ (*Nicotiana tabacum*) の品種メリーランドマンモスは, 長日条件下では1年以上も花を着けないが, *PnGLP1* の cDNA を CaMV の 35S プロモーターで発現せることによって, 長日条件でも約6カ月で花芽を着ける個体が現れた。一方, 短日条件下では, 対照区との差が見られなかった。タバコより *PnGLP1* のホモログを単離し, 内生の *GLP* (*NtGLP*) の発現を調査し, *PnGLP* の過剰発現及び発現抑制の効果と *NtGLP* の発現との関係について考察する。

1aG11

光周性花成誘導に関連する時計制御遺伝子

(*AtC401*, *PnC401*) のプロモーター解析

小口太二, 小野公代, 相田徳子, 福井晴隆, 小野道之¹, 鎌田博 (筑波大・生物, ¹秋田県立大・生工研)

PnC401 は短日植物アサガオ (*Pharbitis nil choisy* cv. Violet) において光周性花成誘導暗期中に特異的に発現量が増加する遺伝子として単離された。*PnC401* および長日植物シロイヌナズナのホモログである *AtC401* は, サーカディアンリズム発現変動を示し, 暗期中に mRNA 量がピークとなる時計制御遺伝子 (CCG) であった。我々は *C401* 遺伝子のサーカディアンリズム発現制御機構を明らかにするため, プロモーター配列の決定を行い, シスエレメント配列の調査, およびホタルのルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いたプロモーター解析を行った。プロモーターディレクションの結果, サーカディアンリズム発現制御には, *AtC401* プロモーターの転写開始点より 146 bp のプロモーター領域のみで十分であることが判明した。同様に, シロイヌナズナにおける *PnC401* のプロモーター解析についても報告する。

1aG12

イネカタラーゼ遺伝子の発現解析: *CatA* の概日リズムの制御には 5' 上流領域以外の領域も必要である
岩本政雄, 肥後ひろみ, 肥後健一 (農水省・生物研)

イネ (*Oryza sativa* L.) には3つのカタラーゼ遺伝子 (*CatA*, *CatB*, *CatC*) が存在している。本研究では, イネカタラーゼ遺伝子の発現の組織特異性と時期特異性について調べた。幼苗では, *CatA*, *CatB*, *CatC* の mRNA はそれぞれ葉鞘, 根, 葉身で多くみられた。一方, 開花期のイネでは, *CatA* と *CatC* の mRNA はそれぞれ穎花と葉身で多く, *CatB* の mRNA はそれぞれ穎花と葉身で多く, *CatB* の mRNA は調べたすべての組織でわずかに検出された。発現を経時的に調べた結果, *CatA* の mRNA 量は概日リズムを示した。また, *CatC* の mRNA 量は連続暗期下の葉身において *CatA* と異なる日周変動を示した。レポーター遺伝子 (GUS 遺伝子) の上流に *CatA* の 5' 上流領域 (約 1.6 kb) をつけたものを導入した形質転換イネを用いて, GUS 遺伝子の mRNA 及び pre-mRNA の発現について調べたところ, GUS 遺伝子の発現の日周変動は *CatA* と比べてわずかに異なることがわかった。これらの結果から, *CatA* の概日リズムは転写レベルまたは pre-mRNA の安定性の段階で制御されていて, 概日リズムの制御には他の領域の配列も必要とすることが示唆された。