

## 1pG01

*Synechocystis* sp. PCC6803 の時計遺伝子に依存した従属栄養条件下での増殖

藤井賢二、Kis Mihaly、正元和盛<sup>1</sup>、岡本和久<sup>2</sup>、石浦正寛<sup>2</sup>、近藤孝男<sup>2</sup>、和田 元（九大院・理・生物、熊大・教育・生物<sup>1</sup>、名大院・理・生命理<sup>2</sup>）

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 は、毎日 10 分程度のパルス光照射により、青色光に依存して従属栄養的に増殖する。本研究では、従属栄養増殖における青色光の役割を解明することを目的として細胞周期に対する青色光の効果や circadian clock と従属栄養増殖との関連について解析した。

光パルス条件下で、細胞周期に対する青色光の効果調べたところ、青色光によって細胞の分裂が同調することが明らかとなった。しかし、暗所に移しても細胞の分裂の同調がしばらく続くことから、青色光が細胞周期に直接関わっているのではないことが示唆された。

一方、時計遺伝子 *kaiABC* の破壊株を作製し、circadian clock と従属栄養増殖の関連について解析したところ、破壊株は光パルス条件下において増殖できないことが明らかとなった。このことは、青色光に依存した従属栄養増殖には時計遺伝子が必要であることを示している。

## 1pG02

シアノバクテリアの概日リズム周期への光入力系に関わる突然変異体の解析

片山光徳、Susan S. Golden<sup>1</sup>（東大、総合文化、生命環境、<sup>1</sup>Dept. Biol., Texas A&M University

連続光のもとで概日リズムの周期は照射光の強度に依存して変化することが知られており、シアノバクテリア *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 においては光強度の減少にともなって周期の伸長が起こる。私たちはシアノバクテリアから光依存的な概日リズムの周期変化に影響を与える突然変異体を 2 株単離した。これらの突然変異体では弱光下で観察される周期の伸長が著しく抑えられていた。トランスポゾンの挿入部位を調べたところ、*tnpK* と名付けた遺伝子の異なる部位に挿入が起こっていた。*tnpK* 遺伝子は 352 アミノ酸残基からなる水溶性のタンパク質をコードしており、これは Fe-S クラスター結合領域と高い相同性を示す配列を含んでいた。TnpK タンパク質は酸化還元反応あるいは電子伝達反応を通じて概日リズムの周期の光感受性を調節していることが推測される。

## 1pG03

種々の藍色細菌における *kai* 遺伝子クラスターの相同遺伝子

宇津巻童也、中平洋一<sup>1</sup>、井上千晶<sup>1</sup>、C. P. Wolk<sup>2</sup>、井上頼直<sup>3</sup>、近藤孝男<sup>1</sup>、石浦正寛（名大・遺伝子、<sup>1</sup>名大院・理・生命理学、<sup>2</sup>ミシガン州立大、<sup>3</sup>理研）

藍色細菌 *Synechococcus* sp. strain PCC7942（以下 *Synechococcus*）の時計遺伝子クラスター *kaiABC* の相同遺伝子は、種々の藍色細菌（*Synechocystis* sp. strain PCC6803, *Synechococcus vulcanus* [好熱性], *Anabaena* sp. strain PCC7120 [糸状性]）にも存在する。

*Anabaena* の KaiB 及び KaiC は *Synechococcus* の KaiB、KaiC と高い同一性を示したが、KaiA は N 末側の 2/3 が欠失しており、C 末側 1/3 の領域のみを有し、同一性も低かった。

*Anabaena* の各 *kai* 遺伝子を *Synechococcus* の *kai* とそれぞれ交換しても、時計遺伝子として機能した。また、*Anabaena* の *kaiA* は *Synechococcus* の *kaiA* と同様に機能した。このことより *Synechococcus* の KaiA の時計としての機能が C 末側 1/3 にあることを推定した。

## 1pG04

藍色細菌の時計遺伝子群に対するランダム突然変異の誘発とその解析

中平洋一、竹内しのぶ、石浦正寛<sup>1</sup>、近藤孝男（名大院・理・生命理学、<sup>1</sup>名大・遺伝子・植物ゲノム）

藍色細菌 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) の *ka* 時計遺伝子群 (*kaiA, B, C*) はクラスターを形成しており、その発現リズムの自己フィードバック制御が、概日振動発生に重要であると考えられている。しかしながら、これらの時計遺伝子の具体的な分子機能は殆ど明らかにされていない。

本研究では、*in vitro* での PCR 反応における基質認識性の誤りを原理として、*kai* 遺伝子群の特定領域に対してランダムに変異を導入し、*kaiBC* 遺伝子の発現リズムに異常を与える変異株を発光レポータ系を用いてスクリーニングした。その結果、EMS による *in vivo* での変異誘発では少数しか見られなかった、*kaiA, B* 遺伝子及び *kaiBC* プロモータ上に変異をもつリズム変異株をあわせて 100 以上得た。現在、変異部位の特定と、個々の変異株での Kai 蛋白質の動態等を解析しており、その結果から推測される個々の時計蛋白質の機能部位について論ずる予定である。

## 1pG05

管状要素分化に伴うプログラム細胞死の観察

小原圭介、福田裕穂（東京大院・理・生物科学）

道管を形成する管状要素は中空の死細胞であり、分化の過程で厳密に制御されたプログラム細胞死を伴う。これまで、ヒヤクニチソウ管状要素分化系を用いて、細胞死の過程が盛んに研究されてきたが、電子顕微鏡での観察を基にした断片的な知見しか得られていない。そこで私たちはFDA, SYTO16, SYBR-Goldなどの蛍光試薬で、細胞質と核を染色し、細胞死過程の連続観察を試みた。そして共焦点レーザー顕微鏡を用いて1つの生細胞を連続的に観察することにより、細胞死の引き金である液胞崩壊の瞬間とその後の核分解の過程を捉えることに成功した。その結果、液胞崩壊の前に液胞が膨張すること、崩壊そのものは短時間で起こること、核は液胞崩壊後に速やかに分解されること、その際核の中央部のDNAから分解が始まり、核膜構造はしばらく保たれることなどが判明した。

## 1pG06

プログラム細胞死特異的遺伝子 *Zinnia Cysteine Protease 4* の発現解析

表賢珍、出村拓、福田裕穂（東大院・理・生物科学）

プログラム細胞死は多細胞生物の発生の過程で重要な役割を果たしている。ヒヤクニチソウの単離葉肉細胞から管状要素への分化系は高等植物のプログラム細胞死の研究の優れた実験系である。私たちはヒヤクニチソウの管状要素分化の細胞死に先立って一過的かつ特異的にcysteine protease活性が上昇すること、そしてそのcysteine proteaseをコードすると考えられるcDNA (*ZCP4*) を単離したことをすでに報告している。

本研究で私たちは*ZCP4* 遺伝子の詳細な発現様式を調べた。ヒヤクニチソウの莖頂に対する *in situ* hybridizationにより*ZCP4* 遺伝子は管状要素に分化しつつあるごく限られた細胞にのみ発現することが示された。この結果から、*ZCP4* 遺伝子が植物体においても管状要素分化過程における細胞死に深く関わっていることが強く示唆された。*ZCP4* の発現様式をさらに詳しく調べるために、*ZCP4* のプロモーター領域を単離し、*ZCP4* プロモーターと $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) との融合遺伝子をアグロバクテリアを介してシロイヌナズナに導入した。形質転換植物のロゼット葉をGUS染色したところ、ごく一部の未成熟な道管にのみGUS活性が検出された。現在、形質転換植物の他の器官に対してGUS染色を行っており、この結果についても報告する。

## 1pG07

ヒヤクニチソウ管状要素分化における液胞崩壊の機構  
栗山英夫、福田裕穂（東大・院・生物科学）

道管・仮道管を構成する管状要素は特徴的な耐水性の二次細胞壁を持つ死細胞であり、その分化過程で液胞崩壊によるプログラムされた細胞死を起こすことが知られている。そこで管状要素分化を高頻度かつ同調的に誘導できるヒヤクニチソウ培養細胞系を用いて液胞崩壊の際の特徴的な性質変化を探索した。その結果、二次壁肥厚を開始した多くの細胞は生体染色用蛍光色素のFDA (fluorescein diacetate) で染色したとき、細胞質内で代謝されたfluoresceinの液胞への輸送が起こらないことがわかった。またfluoresceinのような有機物陰イオンの輸送阻害剤であるprobenecidで処理すると管状要素が急速に細胞死を起こした。probenecidは相当の時間の遅れを経て管状要素以外の細胞の液胞も崩壊させた。この有機物陰イオン輸送阻害を伴う管状要素液胞の性質変化は二次壁肥厚形成、液胞崩壊とともにcycloheximideで阻害されたこと、二次壁肥厚開始直前の関連遺伝子の発現と開始時期が符合することから、有機物陰イオン輸送能の変化が管状要素形成の際のプログラム細胞死に重要な役割を果たしていると考えられた。

## 1pG08

細胞死抑制タンパク質を過剰発現させたタバコで観察される耐塩性等のストレス耐性

香景波<sup>1</sup>、後藤洋子<sup>1</sup>、光原一朗<sup>1,2</sup>、三浦正幸<sup>3</sup>、大橋祐子<sup>1,2</sup> (1 農水省・農業生物資源研、<sup>2</sup>CREST/JST、<sup>3</sup>大阪大学・医学部)

動物の細胞死抑制タンパク質Bcl-xLやCed-9を過剰生産しているタバコが、UV、パラコート処理に耐性を示すことはすでに報告した<sup>1</sup>。今回、これらの植物がさらに耐塩性や耐冷性を示す結果を得た。これらのタンパク質が多く含まれる植物の葉をカルス化させ、懸濁培養細胞株の樹立を試みたところ、非形質転換体に比べてより増殖しやすい株を容易に得ることができた。これらの細胞株では生長がより活発であるとともに、NaClに対する耐性も示した。種子発芽時に塩や低温処理した場合にも、これらのタンパク質の発現量の多い系統ほど明瞭な耐塩性や、耐冷性を示すことが分かった。これらの結果は、これらのタンパク質を高発現させることにより、植物細胞に、環境ストレスに対する耐性を与え得ることを示唆する。<sup>1</sup> Mitsuahara, I. et al. Curr. Biol. 9:775-778(1999)

## 1pG09

葉の老化が遅くなるシロイヌナズナ変異体の単離と解析

吉田 聡子, 伊藤 正樹, 渡邊 昭 (東京大・院・理・生物科学)

緑葉の老化の過程は遺伝的にプログラムされていると考えられているが、その進行をコントロールする機構についてはほとんど明らかになっていない。我々はシロイヌナズナを材料に老化プログラムに異常をきたした変異体を単離し、その遺伝学および分子生物学的な解析を行っている。今回、暗所に置かれた際の子葉の老化を指標に、葉の老化が遅くなる変異体 T47 株を T-DNA タグラインから単離した。遺伝学的な解析から、T47 株は劣性一遺伝子座における変異であり、挿入 T-DNA と表現型が連鎖していることが明らかになった。その表現型の解析を行ったところ、T47 株は、暗所下で人為的に老化を誘導した老化の進行も、通常光条件下で生育させた時の自然老化の進行も遅くなっていることが分かった。また、T47 株のエチレン感受性は野生株と大きな違いは認められなかったため、T47 株の変異の原因遺伝子は、老化の進行に重要であり、かつエチレンを介さない経路に関与するものであると考えられる。

## 1pG10

シロイヌナズナ子葉の老化過程における細胞死と *AtDAD-1/-2* の発現変動

天笠英行、内藤継吾、シャミーマ・モンジュール、鈴木 寛 (福井県立大・生物資源)

細胞死抑制遺伝子ホモログ *AtDAD-1/-2* の高等植物での機能を解明するため、両遺伝子の抗アポトーシス能及び野生型 (wt) とエチレン非感受性変異体 (*etr1-1*) の子葉の老化過程での細胞死と両遺伝子の発現変動を解析した。

*AtDAD-1* は *AtDAD-2* と比較して、アポトーシスを起こしている *tsBN7* (ハムスター *DAD-1* 変異細胞株) の DNA 断片化を、強く抑制した。子葉の老化過程での死細胞数は、老化後期に増大した。その数は、*etr1-1* より wt で多かった。wt での *AtDAD-1/-2* の mRNA レベルは老化とともに増大し、その後期に減少した。これに対し、*etr1-1* では減少しなかった。また、antisense *AtDAD-1* を過剰発現する T1 の子葉が黄色であった。以上のことは *AtDAD-1* は、老化過程での細胞死に抑制的に関わることを示唆する。

## 1pG11

酵母のBax誘導性細胞死を抑制する植物

Bax inhibitor-1(BI-1) 遺伝子の解析

川合真紀<sup>1,2</sup>, 潘玲<sup>2</sup>, 内宮博文<sup>2,1</sup> (1原研・先端研, 2東大・分生研)

Bax Inhibitor-1(BI-1) 遺伝子はYeast におけるBax誘導性の細胞死を抑制する新規因子として動物から単離された (Xu and Reed 1998)。植物の細胞死メカニズムを解析する足がかりとして、我々は植物のBI-1遺伝子をアラビドプシス (*AtBI-1*) 及びイネ (*OsBI-1*) より単離した。植物BI-1遺伝子は動物と同様、6又は7つの膜貫通領域を有する膜タンパク質であり、アミノ酸レベルで動物遺伝子とは約42%、イネ、アラビドプシス間では約70%の相同性を示した。植物BI-1遺伝子の機能を調べるため、ガラクトース誘導性のBax遺伝子を有する酵母(QX95001)にアラビドプシスBI-1遺伝子を導入し、Bax誘導性細胞死の抑制効果を調べた。その結果、ガラクトース培地上で、発現ベクターのみ(コントロール)を持つ株は増殖できなかったが、BI-1遺伝子を有する株は増殖が可能であった。即ち、植物BI-1遺伝子は動物と同様、酵母におけるBax誘導性細胞死を抑制する活性を有することが確認された。

## 1pG12

酵母の機能的スクリーニングによるシロイヌナズナ由来Bax遺伝子サブプレッサーの同定

潘玲<sup>1</sup>, 余荔華<sup>1</sup>, 川合真紀<sup>2,1</sup>, 内宮博文<sup>1,2</sup> (1東大・分生研, 2原研・先端研)

動物Bax遺伝子が植物細胞の死を誘導することが最近報告され、生物種を越えた細胞死メカニズムが存在することが予想されている。さらに、Bax遺伝子を酵母内で発現させると、細胞死を誘導することも知られている。我々は、酵母におけるBax誘導性細胞死の阻害因子を、シロイヌナズナのcDNAライブラリーより同定した。それらは酵母のコロニー形成能の観察から、阻害作用の加減が異なるものである。ウエスタン解析の結果、一部の阻害因子は酵母内のBaxタンパク質の発現量に影響を与えていないことが分かった。同定された遺伝子の中には、動物の細胞死阻害因子であるBax Inhibitor-1ホモログ (*AtBI-1*, 前演者参照) が存在することから、同実験系はBax誘導性細胞死の阻害効果を正確にモニターしているものと思われる。最も高頻度で現われたサブプレッサーは*AtEBP*遺伝子であった。この遺伝子は転写因子であるEREBP(Ethylene-Reponsive Element-Binding Protein)のホモログであり、生体内の機能は不明である。今後、これらの遺伝子の機能と植物の細胞死の関係について明らかにしたい。

## 1pG13

タバコ *tbzF* 遺伝子は老化のプロセスと花芽で強く発現する bZIP 型転写活性化因子をコードする

梁 勝煥, Thomas Berberich<sup>1</sup>, 佐野 浩, 草野友延 (奈良先端大・遺伝子教育研究センター, <sup>1</sup>Botanisches Institut, J.W. Goethe-Universität)

演者らは、稲の低温誘導性遺伝子 *lip19* のタバコ相同性遺伝子として *tbz17* を報告してきた。今回、タバコより *lip19* の 2 番目のホモログ *tbzF* を単離し、特徴づけを行ったので報告する。

【方法】タバコ花芽 cDNA ライブラリーを作製し、*tbz17* cDNA をプローブとしてスクリーニングを行った。

【結果】得られたクローンはいずれも *tbz17* とは異なるクローンであり、*tbzF* と称した。*tbzF* 遺伝子産物 (TBZF) は 144 アミノ酸よりなる bZIP タンパク質であり、TBZ17 と 73% の相同性を示した。TBZF は TBZ17 と同様に核因子であり転写活性化能をもつことが明らかとなった。

成熟したタバコ植物体で、*tbz17* mRNA の蓄積はクロロフィル含量の低い老化葉でみられたが、*tbzF* mRNA の蓄積は老化葉に加え、花芽周辺組織で観察された。*tbzF* mRNA は開花まで増加するが、開花直後には直ちに減少することが分かった。

*tbzF* のストレスに対する発現応答を調べたところ、低温により mRNA の蓄積がみられた。植物ホルモンの影響を調べたところ、エチレンおよびオーキシンにより *tbzF* と *tbz17* mRNA の蓄積がみられた。オーキシンの効果はエチレンを介したものと考えている。

今後、2 つの *tbz* 遺伝子 (*tbz17* と *tbzF*) が植物の老化プロセスと低温応答にどのように関わっているか、*tbzF* の花における役割についても解析を進める予定である。

## 1pG14

タバコ培養細胞における過敏感反応死の過程

天野豊己, 平沢賢一, 塩井祐三 (静岡大・理・生物地球)

植物におけるプログラム細胞死のモデル系として過敏感反応がある。本研究では BY-2 培養細胞に確定的な細胞死を引き起こすペプチド系エリシターの Cryptogein を用いた。これは *Pichia* 酵母での大量発現系が構築されており、X 線構造解析もなされている。このため、細胞死誘導因子としてタンパク質工学的加工が容易という利点をもつ。

細胞死の過程を定量的に追跡するため、フルオレセインジアセテート (FDA) の取込み速度を定量する実験系を構築した。細胞死が完了するまでの蛍光強度変化を測定し、死の過程を観察した。その結果以下の事が明らかとなった。

1. Cryptogein 添加と同時に細胞死が始まり、指数関数的に生存率が減少した。
2. 細胞膜の損傷を伴わないエバンスブルー非感受性の細胞死であった。
3. 細胞含有タンパク質が減少した。
4. 酸素消費量が一過的に上昇した。

## 1pG15

ダイズの個体老化を誘導する内生因子

松野純子・喜久田嘉明・幸田泰則 (北大院・農・植物)

一回結実生植物は開花結実後老化し枯死する。この老化は一連のプログラムされた現象と考えられるがそれを制御している原因物質は現在のところ明らかではない。エチレン、ABA 及びジャスモン酸メチルエステル (JA-Me) などは老化を促進する活性をもつことが知られておりこれらのホルモン(様物質)がこの個体老化に関与している可能性がある。

開花結実後の老化が明瞭である作物であるダイズを用いて個体の老化を誘導する内生因子の特定を試みた。老化の指標としては葉のクロロフィル含量を用いた。結実後の早い時期に莢を除去すると老化が大幅に遅れることから莢が何らかの老化開始のシグナルを出すものと考えられた。未熟な莢には強い老化促進活性が認められこの活性は葉の老化開始と同時に最大となった。莢に含まれる ABA と JA-Me の生長に伴う変動を調べた結果、ABA の挙動と老化促進活性の挙動はほぼ一致した。従ってダイズの老化の開始シグナルの本体は ABA である可能性が考えられた。しかし ABA 量は水ストレス等で容易に変化することが知られており、このように量的に不安定な物質が数週間に渡って生ずる老化の原因であるとは考えにくい。現在 GC-MS-SIM 法によってより正確に ABA の定量を行っている。

## 1pG16

コムギの穎及び穂軸に含まれる老化促進物質

幸田泰則、喜久田嘉郎 (北海道大・院・農・植物)

一年生植物は開花結実後、個体全体が老化しやがて枯死する。この老化のメカニズムは未だ不明である。生長中の子実が栄養を独占し、それにより老化が始まるとする説もある。しかしこの老化は、個体に残存する栄養物質を効率的に子実に取り込ませるために役立っており、積極的なプログラムされた老化である可能性が高い。コムギの老化は特に顕著であり、他の植物が旺盛に生長している盛夏に一斉に老化枯死が起こる。秋まきコムギと春まきコムギをそれぞれ 2 品種ずつ用い、個体老化の原因の解明を試みた。いずれの品種においても、生育中の穂の中に強い老化促進活性が存在し、その活性は葉の老化開始 1 週間前に最大となった。また老化の始まった葉にも老化促進活性が検出された。穂を穎、穂軸及び種子に分けそれぞれの活性を比較したところ、穂軸と穎に強い活性が検出された。この結果は、老化開始のシグナルは子である種子から出されるのではなく、親個体が自ら出しており、老化枯死が一種の自殺であることを示唆している。現在活性物質の純化を試みているが、各種のクロマトグラム上での挙動は、既知の老化促進物質とは全く異なっていた。また老化促進の比活性もジャスモン酸メチルより大幅に高いこと判明した。

## 1pG17

オートムギ第一葉の老化に伴う細胞壁多糖類の変化  
宮本 健助、宇都宮 真木、勇田 友和、上田 純一  
(大阪府立大・総合科学・自然環境)

明所で育成させたオートムギ (*Avena sativa* L.) の第一葉切片の老化過程における細胞壁構成多糖類の質的量的変化について調べた。8日齢のオートムギ芽生えの第一葉先端部から3 cmの切片を調製し、暗所、25°Cで3日間培養を行った。第一葉切片中のクロロフィル含量は、培養開始後、急激に減少し、培養開始3日目には、切片はほぼ完全に黄変した。常法に従い、第一葉切片の細胞壁多糖類をペクチン性、ヘミセルロース性、そしてセルロース性多糖類に分画し、各画分中の糖を定量した結果、ペクチン性多糖類はほとんど含まれておらず、ヘミセルロース性多糖類およびセルロース性多糖類が、ほぼ7:3の割合で含まれていた。この割合は、老化の進行にかかわらずほとんど変化しなかったものの、ヘミセルロース性多糖類およびセルロース性多糖類の量は緩やかに減少し、培養3日目には開始時の80%程度になった。加水分解後、ガスクロマトグラフを用いて、ヘミセルロース性多糖類の中性糖組成を調べた結果、主としてアラビノース、キシロース、そしてグルコースから構成されていた。また、老化過程において、これらの中性糖組成比にほとんど変化は認められなかった。以上の結果から、オートムギ第一葉の細胞壁多糖類は、老化の進行に伴ってその分子種には無関係に分解されることが示唆された。

## 2aG01

### アサガオのフロリゲン様物質の分離、精製とその精製物の花芽誘導活性

篠崎真輝、平岡和久(京大院・農・応用生物)

一昨年度の本年会で多電極電気化学検出器を用いてアサガオのフロリゲン足りうる五つの必要条件- (1) 限界暗期後に増加する、(2) 光中断でその合成が阻害される、(3) 暗期中の低温により合成が阻害される、(4) 日長反応を阻害する阻害剤により合成が阻害される、(5) 暗処理12時間後には子葉から消失する-を満たす物質を多数検出出来ることを報告した。しかし、これらの物質は極性が非常に高く、夾雑物のためにUV検出器では検出出来なかった。これらの物質を精製、UV検出器で検出するには新たな分離システムを開発する必要があった。種々のカラム、溶離液等を検討した結果、TSK-Carbon 500 (4.6×10cm+25cm、特注品)を用い、アセトニトリルの緩やかなステップグラジエント法で上記条件を満たす物質を約40UV検出器(280nm)で検出することに成功した。本年会では分離、精製法及び分離、精製した物質の単独及び混合物の花芽誘導促進能について報告する。

## 2aG02

アラビドプシス *TFL1* に相同な配列を有するリンゴ *MdTFL* の単離と発現解析

古藤田信博、和田雅人、加藤秀憲、増田哲男、副島淳一 (農水省・果樹試・リンゴ支場)

*TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* および *CENTRORADIALIS (CEN)* は栄養成長から生殖成長相への切替に関与しており、それらの *loss-of-function mutant* は無限花序から有限花序に変化し、*lfl1* 変異体については早期開花することが観察されている。また *TFL1* は *LEAFY* を抑制的に制御していることが示されている。

1999年度年会において私たちは、リンゴから *LEAFY (LFY)* /*FLORICAULA (FLO)* に相同な遺伝子 *AFL1*, *AFL2* 及び *APETALAI (API) /SQUAMOSA (SQUA)* に相同と考えられる遺伝子 *MdAPI (MdMADS5)* の単離・解析について発表した。今回はアラビドプシス *TFL1* のリンゴ相同遺伝子(全長 cDNA) と考えられる *MdTFL* を単離しその発現解析を行った。*TFL1*、*CEN* に対する相同性は核酸レベルでそれぞれ75%、71%、アミノ酸レベルでそれぞれ74%、72%であった。時期別 mRNA の発現量は、花芽分化期が最も高くその後やや減少した。この発現パターンは、*AFL* が花芽分化後次第に上昇したのと対照的であった。Southern blot においてメジャーなバンドの他にマイナーなバンドが1本検出されたことから *MdTFL* に相同性の高い別の遺伝子が存在することが示唆された。*LFY* 相同遺伝子である *AFL* においては塩基配列上極めて相同性の高い複数の遺伝子が単離されており (*AFL1*, *AFL2*)、*TFL1* ホモログに関しても同様である可能性がある。

我々はリンゴ *MdTFL* の機能を明らかにするために、*35S::MdTFL* をアラビドプシスに導入し形質転換体の作出を試みた。

## 2aG03

リンゴ *LFY* ホモログ *AFL1*, *AFL2* の発現及び機能解析

和田雅人、古藤田信博、副島淳一、増田哲男  
(農水省・果樹試・リンゴ支場)

我々はリンゴの花芽形成メカニズムを明らかにする目的で、リンゴ(紅玉: Jonathan) から *Arabidopsis* の *floral identity gene* の一つである、*LFY* のホモログを単離し、*AFL1*, *AFL2* とした。これら2つの遺伝子はお互いに90%の相同性を持っているが、発現部位は *AFL1* が花芽茎頂部に限定されるのに対し、*AFL2* は、花芽茎頂部以外にも、花器官や栄養生長の茎頂部、根などにも見られた。葉、茎にはどちらも発現していなかった。このような発現部位の違いは、それぞれの遺伝子の機能の違いを反映していると考え、*35S* プロモーター下につなぎ、アグロバクテリウムによって *Arabidopsis* に導入し、形質転換体を得た。それぞれ複数個の転換体を得たが、特に *AFL2* を導入したものでは、ロゼット軸からの単生花の発生が多く、開花に要する日数の短縮が見られた。一方 *AFL1* の転換体でも同様の形態変化は観察されたが、*AFL2* より変化の程度が小さく、開花日数もより長く必要とした。しかしながら、どちらの遺伝子によっても無限花序の伸長を妨げることはなく、これまでの報告のように中心の花茎も *terminal flower* によって伸長が止まることはなかった。以上の結果をもとに、2つの遺伝子がリンゴの花芽形成にどのように関与しているのかを考察した。

## 2aG04

シロイヌナズナの *embryonic flower2* 変異を相補するイネ遺伝子  
柳井 幸弘, 吉田 存方 (三井化学ライフサイエンス研究所)

シロイヌナズナの *embryonic flower* 変異体 (*emf1* と *emf2*) は、子葉展開直後に開花に至る。*emf2* 変異を引き起こした原因遺伝子は、本来、zinc-finger モチーフを持つ蛋白質をコードしており、遺伝子発現の制御因子としての役割が推測された (吉田ら、本学会 1999 年度年会)。

植物の花芽形成における「EMF2」の役割を検証する一助として、イネ相同遺伝子 cDNA を単離した。この遺伝子 *Os-EMF2* は、シロイヌナズナ EMF2 蛋白質と 61% の相同性を示す蛋白質をコードし、zinc-finger モチーフも保存されていた。また *Os-EMF2* は、シロイヌナズナ *emf2* 変異を相補する機能を有することも判明した。「EMF2」は、全く異なる開花習性を示す分類上分岐したイネ・シロイヌナズナ植物種間であっても、高度に構造が保存され、機能保持されていた。このことは、EMF2 が植物一般の花芽形成を制御する因子の一種である可能性を示唆し興味深い。

## 2aG05

シロイヌナズナ *EMBRYONIC FLOWER 2* 遺伝子の発現及びトランスジェニック植物を用いた機能解析

吉田存方, 柳井幸弘, Lingjing Chen<sup>1</sup>, Z. Renee Sung<sup>1</sup>, 高橋滋 (三井化学・ライフサイエンス研究所、<sup>1</sup> UC Berkeley)

シロイヌナズナの *EMF* 遺伝子 (*EMF1*, *EMF2*) は、機能欠損変異体における超早期花成形成質から、栄養成長の維持または花成プログラムの抑制に関わっていると考えられている。我々は、ポジショナルクローニングにより *EMF2* 遺伝子を単離し、新規なジンクフィンガータンパク質をコードしていることを明らかにした (昨年度本学会年会)。 *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行なったところ、*EMF2* 転写産物は、発達中の胚に認められ、発芽後の植物体では主に茎頂分裂組織に局在し、花成後においても花序分裂組織及び花芽分裂組織でその蓄積が認められた。すなわち、変異体の形質から予想される花成抑制遺伝子としての機能を支持する結果 (花成に伴う発現; 転写の減少) とはならなかった。

現在、*EMF2* のアンチセンス/過剰発現コンストラクトを用いてトランスジェニック植物を作成し、その機能について解析を行っており、これらの結果も合わせて報告する。

## 2aG06

シロイヌナズナの花芽特異的ジンクフィンガータンパク質をコードする遺伝子 *ZIM* の機能解析  
四方雅仁、西井晶子、藤田秀知、竹村美保、横田明穂、河内孝之 (奈良先端大・バイオ)

花成は環境刺激を受けた植物体が遺伝的な制御を行うことによりおこる。我々は花芽特異的かつ低発現性の遺伝子を系統的に得ており、そのうち転写因子と相同性を示すタンパク質 *ZIM* は、若い花芽・花序茎頂・雄ずい・雌ずいで発現し、生殖生長期の茎頂分裂組織で働いていることが予測された。

*ZIM* はそのアミノ酸配列から、ジンクフィンガーモチーフを含む、転写因子と考えられる構造が予測された。塩基性領域には核移行シグナル様配列が見られ、*ZIM* が核に局在することが確認された。また、酸性領域やグルタミンに富む領域は転写活性化領域と考えられ、*GAL4* の DNA 結合領域と *ZIM* の融合タンパク質とルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた解析より、転写活性化に関わる因子であることが示唆された。以上のことから、*ZIM* は花成時期に特異的に働く転写因子であると期待された。

さらに、*ZIM* と現象との関わりを推測するため、形質転換体を用いた解析を行っている。

## 2aG07

*CONSTANS* 遺伝子の過剰発現による早咲きを抑制するシロイヌナズナ変異体の単離と解析  
尾之内均, Alon Samach, Isabel Igeno, Clair Perilleux, Scott E. Gold\*, Martin F. Yanofsky\* and George Coupland, John Innes Centre, \*Dept. Biol. and Center of Mol. Gen., University of California at San Diego

シロイヌナズナの *CONSTANS(CO)* 遺伝子は、転写因子様タンパク質をコードする遺伝子で、その機能欠損変異体では長日条件下における花芽形成が遅れ、その過剰発現体 (35S::CO) は日長非感受性の早咲きの表現型を示す。*CO* 遺伝子の下流で機能する遺伝子を同定するために、35S::CO の早咲きの表現型を抑制する変異をスクリーニングした。その結果、三つの遺伝子座が同定され、それぞれ *soc1*, *soc2*, *soc3* (suppressors of over-expression of CO) と名付けた。このうち *soc3* は新しい花芽形成遅延遺伝子座であることが分かった。*soc1* 変異と *soc2* 変異は、それぞれ既知の花芽形成遅延遺伝子である *FT* 遺伝子、*FWA* 遺伝子の変異であることが分かった。*soc3 ft*, *soc3 fwa* 二重変異は 35S::CO 植物の花芽形成時期を単一変異よりも著しく遅らせた。したがって、*SOC3* は *FT*, *FWA* とは異なる経路で機能すると考えられる。

## 2aG08

シロイヌナズナの糖シグナリング変異株 *uns2* の解析

林真吾<sup>1,2</sup>、古川靖子<sup>1</sup>、大藤雅章<sup>1</sup>、中村研三<sup>1,2</sup>、<sup>1</sup>基生研・発生物、<sup>2</sup>名大、生命農)

*in vitro* で生育させたシロイヌナズナ野性株では、培地の糖濃度増加に伴い葉のクロロフィル含量が増加し花成が遅延する。我々は葉の光合成機能発達過程や花成における糖シグナリングの役割を明らかにするために、独自に確立した T-DNA タグラインの中から、*in vitro* 培地上で葉の光合成機能低下や early flowering の表現型を示し、葉での糖応答性遺伝子発現制御も異常になった多数の突然変異体 *uns* (unusual sugar response) を単離してきた。その一つ、劣性の変異株 *uns2* は、土栽培条件下及び糖濃度の異なる *in vitro* 培養条件下いずれの場合にも、葉のクロロフィル含量低下と early flowering 表現型を示す。また  $\beta$ -アミラーゼやアントシアニンの葉での糖誘導蓄積が野性株に比べ高くなっている。この変異株ではエチレン応答性変異株 *hookless1(hls1)* の原因遺伝子内に T-DNA が挿入されていた。*uns2* は *hookless* 表現型を示し、*hls1* の複数のアレルすべてにおいて *uns2* と類似の表現型が見られたことから、*uns2* の原因遺伝子は *HLS1* であると断定した。*HLS1* は N アセチル基転位酵素に相同性が高いが、細胞内局在や基質など機能に関しては不明である。本発表では、情報伝達を異にする複数の糖応答性遺伝子の発現制御や *HLS1* 自身の糖応答性、*HLS1* タンパク質の細胞内局在等について報告し、*HLS1/UNS2* の役割について考察する。

## 2aG09

オオムギを用いた生殖生長過程における遺伝子発現の全体像の解析の試み

東谷篤志、阪田 忠、高橋秀幸 (東北大・遺生研)

植物の生殖生長過程は、栄養生長と異なり、雄蕊・雌蕊・減数分裂を行う生殖細胞・それを取り巻く栄養細胞などさまざまな分化した器官組織形成を必要とし、そこには数多くの生殖生長特異的な遺伝子群ならびに栄養生長においても不可欠な遺伝子群が発現し機能することで進行すると考えられる。本研究では、オオムギを材料に用い、その生殖生長過程で発現する遺伝子の全体像を解明することを最終的な目標とする。オオムギを用いた利点は、幼穂における各穎花の同調性が比較的良好なこと、減数分裂期の染色体観察が容易なことがあげられる。まずはじめに、人工環境下 (昼 25°C/夜 15°C、16 時間日長) におけるオオムギの生殖生長過程の調査を行い、播種後 35 日目に開花し、約 80% 以上の稔性を確認した。また花粉母細胞の前減数分裂期に、5 日間昼夜 10°C 高温処理することで、花粉が形成されず稔性が完全になくなることが認められた。この高温処理では穎花の数や雌蕊の形態異常はほとんど観察されなかったため、高温処理区とコントロール区を比較することで、雄性配偶子形成に関わる遺伝子群を同定することができるかと期待している。これらの系を材料に用いて、現在、Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法によるオオムギの生殖生長各発生分化過程における遺伝子発現の網羅的な解析を開始した。

## 2aG10

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の第 III 番染色体 DNA 長多型による接合能の低下

壺井基夫、山下泰然、有津俊史、小西一功、太才由紀子、久富泰資 (福山大・工・生物学)

*S. cerevisiae* の第 III 番染色体 DNA 長は 350 kbp であるが、我々の研究室保存株の中に同 DNA 長が 450 kbp である株がある。この株の第 III 番染色体では、*THR4* 遺伝子座から *HMR* 遺伝子座までを含む約 100 kbp の領域が重複している。また、減数分裂時にこの重複領域で不等交叉を起こすことにより、同 DNA 長が 100 kbp 単位で多型を起こす。

多型の誘発により第 III 番染色体 DNA 長が長くなった細胞では、接合能が顕著に低下する現象を見いだした。また、この接合能の低下は、a 型細胞の  $\alpha$  フェロモンに対する感受性の低下に起因していることを明らかにした。そこで、DNA 長多型を起こす 100 kbp の DNA 領域について塩基配列のデータベースを検索したところ、フェロモン感受性に関与する遺伝子 *FIG2* が含まれていることが判った。

本研究では、この *FIG2* 遺伝子の量と接合能の関係を明らかにする目的で、*FIG2* 遺伝子を多コピーベクターに組み込み、通常の細胞に導入した。その結果、*FIG2* 遺伝子量が増加した細胞は接合能が低下することが明らかとなった。

以上の結果から、第 III 番染色体 DNA 長多型で見られる接合能の低下は、*FIG2* の遺伝子量に基づくことが示された。

## 2aG11

テッポウユリの葯の減数分裂に同調した温度低下と気孔形成  
北島佐紀人、高瀬尚文<sup>1</sup>、平塚和之<sup>1</sup>、堀田康雄<sup>1</sup>、富澤健一、横田明穂 (RITE、<sup>1</sup>奈良先端大・バイオサイエンス)

テッポウユリ (*Lilium longiflorum*) は、生殖器官が大型で花粉母細胞の減数分裂の同調性が高いことから、生殖生長の研究材料に適している。我々は、熱電対をもちいて減数分裂の進行と同調して葯の内部の温度が 2-3°C 低下し、減数分裂終了後に再び上昇する事を見いだした。葯の成長初期には、最先端部をのぞいて表皮に気孔が存在しなかったが、減数分裂と同調して急激にその数が増加し、特に外側においては約 0.12 個/表皮細胞、60-120 個/mm<sup>2</sup> に達した。その後、細胞当たりの気孔数は一定であったが細胞の伸張に伴い面積当たりの気孔数は減少した。これらの結果は減数分裂の正常な進行と温度低下に何らかの関連があるとともに、気孔を介した蒸散が温度低下を担う因子の一つであることを示唆するものである。さらに、我々はこの系が気孔分化研究の良い材料になるものと考え、気孔形成期に葯表皮で発現誘導をうける遺伝子を cDNA サブトラクション法により探索しているので、その結果も併せて報告する。

## 2aG12

高湿度条件下で稔性を回復するシロイヌナズナの雄性不稔突然変異体 VW294 の分子遺伝学的解析  
山田美穂、石黒澄衛、影山奈津子、近藤真紀<sup>1</sup>、西村いくこ、岡田清孝（京大・院・理・植物、<sup>1</sup>基生研・細胞生物）

花粉は成熟とともに乾燥に対する耐性を獲得するため、主に自家受粉で種子を形成するシロイヌナズナでも、花粉は乾燥条件下で数日間以上に渡って生存し稔性を保持することができる。このような花粉の乾燥耐性に関わる遺伝子の同定を試みた。

T-DNA タギング系統から単離した突然変異体 VW294 は通常の栽培条件下では種子を形成できないが、開花時の花にポリ袋を被せて湿度を高く保った場合には種子が形成される。透過型電子顕微鏡で花粉の表面を観察したところ、VW294 突然変異体では花粉表面を覆うトリフィンがほぼ完全に失われていた。また、走査型電子顕微鏡による観察では花粉表面が大きく陥没した像が観察され、花粉表面の強度が著しく低下しているものと推定された。この突然変異体の原因遺伝子と推定される遺伝子を単離したところ、脂質合成に関与すると考えられる酵素をコードしていることが分かった。現在、この遺伝子と花粉表面の脂質の合成との関連について解析を進めている。

## 2aG13

カワヤナギにおけるペクテトリアーゼ遺伝子の発現特性  
二村典宏、篠原健司（農水省・森林総研）

我々は、雌雄異株植物カワヤナギ (*Salix gilgiana*) の生殖器官における *DnaJ* homolog、*Hsp70*、ポリガラクトシロナーゼ遺伝子、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子の発現特性について報告してきた。今回は、ペクテトリアーゼ (PL) 遺伝子の発現特性について報告する。

PL に対応する cDNA クロームは、カワヤナギの雄花由来の cDNA ライブラリーから単離された。この cDNA クロームは 409 アミノ酸をコードし、ヒヤクニチソウ細胞の PL と 73% の高い相同性を示した。PL 遺伝子の mRNA レベルは雄花、雌花や若い茎で高かった。一方、根、茎頂、成熟葉、木化した茎での発現のレベルは低かった。この結果は、根での発現レベルが高いヒヤクニチソウ PL 遺伝子のものと異なる。雄花や雌花で *in situ* hybridization を行った結果、PL 遺伝子は雄ずいの花糸と雌ずいの柱頭で発現していた。また、花序の横断面の切片では、形成層の木部側で発現していた。さらに、PL 遺伝子の葉での発現は、熱処理、塩ストレスや傷害により一過性の誘導を受けた。従って、PL 遺伝子は特定の発達段階において重要な役割を果たすだけでなく、ストレス応答でも何らかの機能を担っていると考えられる。なお、様々な植物ホルモン処理による PL 遺伝子の応答についても報告する。

## 2pG01

ニンジン LEC1 ホモログの単離と不定胚・種子胚における発現解析

矢澤克美、高畑紀、鎌田博（筑波大・生物）

高等植物の胚形成については、シロイヌナズナ mutant を用いた研究が進められており、*ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3* (*ABI3*)、*FUSCA3* (*FUS3*)、*LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) の 3 つの遺伝子が胚における転写制御因子として同定・単離されている。特に、*lec1* mutant では、胚の形態形成、成熟の両者に異常が見られ、また、*LEC1* 遺伝子を異所的に発現させると、栄養組織から胚様の構造物を誘導できる。これらのことから、*LEC1* 遺伝子は胚形成時に特異的な転写制御因子であり、高等植物の胚発生において重要な役割を担っていると考えられる。

我々の研究室では、ニンジンから *ABI3* のホモログである *C-ABI3* を単離し、発現解析、機能解析を行ってきた。また、胚形成の後期において特異的に発現する Embryonic cell protein (ECP) の解析を行っている。

今回、ニンジンから *LEC1* 遺伝子のホモログを単離するため、不定胚 cDNA ライブラリーをシロイヌナズナ *LEC1* 遺伝子を用いてスクリーニングした。10 個のポジティブクローンを解析した結果、それらは全て同一の遺伝子 (*C-LEC1*) を含んでいた。Genomic Southern 解析の結果、*LEC1* 遺伝子はニンジンゲノム中に 2 コピー存在すると考えられる。*C-LEC1* 遺伝子は *LEC1* 遺伝子と塩基レベルで 55.5%、アミノ酸レベルで 52.9% の相同性を示し、中央部の B domain での相同性が特に高かった。B domain は、哺乳類や酵母の CCAAT box 結合型転写制御因子 (CBF) の HAP3 サブユニットと相同性が高く、DNA binding site や subunit interaction site などが高度に保存されていた。不定胚発達に伴う *C-LEC1* 遺伝子の発現を解析したところ、不定胚誘導直後の細胞では発現は見られないが、その後徐々に発現レベルが上昇し、魚雷型胚以降は減少することが確認された。また、発達中のニンジン種子においても同様の結果が得られた。

## 2pG02

胚発生関連遺伝子の *in situ* hybridization 法による発現解析  
高畑紀、齋藤力、矢澤克美、塩田肇<sup>1</sup>、鎌田博（筑波大・生物、<sup>1</sup>横浜市大・理）

不定胚形成は、一度特定の機能を持つように分化した体細胞が種子胚と同様の形態変化を経て植物体にまで成長する現象であり、種子胚発生解析のためのモデル系として利用されている。

我々はこれまでニンジン不定胚誘導系を用い、不定胚を形成する能力を持った細胞 (EC: embryogenic cells) に特異的に発現している embryonic cell protein (ECP) を複数同定した。そのうち、ECP31,40,45,63 遺伝子の単離、解析を行ったところ、不定胚のような胚的器官においてアブシジン酸 (ABA) による発現誘導が見られるのに対し、実生などではその誘導が見られないことを明らかにしてきた。

また、胚形成における ABA の情報伝達系に関与し、種子の脱水、乾燥において重要な働きをしている *C-ABI3* の単離、解析を行い、*C-ABI3* は ECP 遺伝子の発現制御に関与していることを明らかにしてきた。一方、*C-ABI3* と共に胚形成を制御している転写制御遺伝子 *C-LEC1* の単離、解析を進めている。

今回我々は、ニンジンの ECP31,40,45,63, *C-ABI3*, *C-LEC1* の mRNA 局在を、EC および不定胚の各発達段階において *in situ* hybridization 法を用いて解析した。さらに、不定胚においては ABA の処理によってこれらの遺伝子の発現パターンがどのように変化するかを調べた。

その結果、これらの遺伝子は EC ではカルス全体で発現しており、不定胚では球状胚から魚雷型胚に至る過程で胚全体で発現していた。また、ECP31 は不定胚の各発達段階で ABA によって顕著に発現が促進される事が明らかとなった。

## 2pG03

### 最外細胞特異的イネホメオボックス遺伝子群の解析

伊藤百代、千徳直樹、西村明日香、松岡信  
(名大・生物分子応答)

表皮組織に特異的な発現を示すGL2タイプに分類されるホメオボックス遺伝子をイネより5種類 (*Roc1-5; Rice outermost cell specific gene*) 単離した。これらの遺伝子は、in situ ハイブリダイゼーションを用いた発現解析によりすべてが表皮組織に特異的な発現を示すことが確認されたが、その中でさらにshoot 器官の表皮組織にのみ発現の見られるグループと、shoot 器官およびroot の両方の表皮組織に発現の見られるグループの2種類に分類できることが明らかとなり、表皮組織の決定及び機能発現において、これらの遺伝子が機能的に分化していることが示唆された。

さらに、*Roc1* 遺伝子の発現パターンを詳しく解析した。この遺伝子は、ランダムな分裂を繰り返す(層構造を構成していない)イネの初期胚発生において、胚の最外細胞に特異的に発現しており、その最外細胞における発現の局在化は、物理的に内側と外側の細胞が区別できる時点で確立されることが明らかになった。また、*Roc1* は組織形成を行っていないカルスにおいてもカルス全体において最外細胞に特異的な発現を示した。これらの観察から、この遺伝子の発現は、細胞の表皮としての運命決定以前に、細胞が細胞集団の最外に位置するという物理的情報に基づき行われていると考えられた。さらに、このような物理的情報に基づく *Roc1* の発現が、胚発生における表皮細胞 (L1細胞) の分化の引き金に関与している可能性も考えられる。さらに詳しい発現解析を行い、この遺伝子の胚発生における役割について考察する。

## 2pG04

### 胚形成異常を示すシロイヌナズナ *globular arrest 1* 変異体の解析

石川貴章<sup>1</sup>、吉岡泰<sup>1</sup>、町田千代子<sup>1</sup>、町田泰則<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・理・生命理学)

我々は、高等植物の胚形成の分子メカニズムを解明するため、シロイヌナズナの T-DNA 挿入系統から、胚形成異常を示すいくつかの変異体を単離した。そのうちの一つである *globular arrest 1* (*glal*) 変異体は、球状胚までは正常に胚形成が進行するが、それ以後子葉原基が形成し始めるハート型胚には進まないという表現型を示した。この *glal* 変異は T-DNA と強く連鎖していたため、T-DNA 挿入部位周辺のゲノム DNA を解析した。その結果、T-DNA は、folylpolyglutamate synthetase (FPGS) をコードしていると推定される遺伝子のコード領域に挿入していた。FPGS はテトラヒドロ葉酸ポリグルタミン酸誘導体の合成に関与する酵素である。また、テトラヒドロ葉酸ポリグルタミン酸誘導体は、プリン、チミジン、グリシンおよびメチオニンの合成経路において重要な役割を果たすテトラヒドロ葉酸一炭素誘導体の前駆体であることから、*glal* 変異体ではこれらの代謝産物の欠乏が表現型の原因であると考えられた。

## 2pG05

ゴマ種子チアミン結合タンパク質のcDNA  
渡辺克美、高橋英之、光永俊郎 (近畿大院・農・応生化)

ゴマ種子に存在する三つのチアミン結合タンパク質 (TBP) は、他の植物種子の TBP と比べ分子量が小さいなど、植物種子 TBP の中でも特徴がある。今回、ゴマ種子 TBP のアミノ酸配列を解析し、その cDNA クローニングを行ったので報告する。

既報に従い、ゴマ種子 TBP を構成する 2 本のポリペプチド鎖 (S鎖、L鎖) を分離、L鎖の内部アミノ酸配列の分析を行い、既知の S鎖の配列とともにプライマーを作成し、RT-PCR 法と 5'-、3'-RACE 法により、全長を含む cDNA を単離した。

S鎖、L鎖ともに三つのチアミン結合タンパク質に共通のアミノ酸配列をもっていた。これらをもとにホモロジー検索を行ったところ、ヒマ種子 2S アルブミンとの同一性が認められた。そこで、ヒマ種子 2S アルブミンと同様に、S鎖、L鎖は一つの mRNA に前駆体としてコードされているのではないかと考え、S鎖の配列で Forward、L鎖の配列で Reverse のプライマーを構築し、クローニングを行った。その結果、143 残基のアミノ酸をコードするゴマ種子 TBP の cDNA が得られた。

## 2pG06

### 高温で発芽する突然変異体の選抜と解析

川上直人、Loïc Lepiniec<sup>1</sup> (明大・農、<sup>1</sup>INRA, Versailles)

冬型一年草であるシロイヌナズナ種子の発芽は高温で阻害される。また、休眠の年次変化にともない、発芽できる温度の上限が変化することが知られている。種子発芽の温度による調節機構を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナの T-DNA タグライン、10,000 系統の T3 種子を選抜し、34°C でも発芽する突然変異体を 2 系統 (TRW13-1, TRW71-1) 単離した。T4 種子の 34°C における発芽率は、野生型 (Ws) が 3% であるのに対し、TRW13-1 が 74%、TRW71-1 が 48% であった。野生型および TRW13-1 の種皮が茶色であるのに対し、TRW71-1 の種皮は黄土色を呈し、いわゆる *transparent testa* 形質を示した。22°C における発芽速度は、TRW13-1 が野生型より速く、TRW71-1 は野生型より遅い傾向を示した。発芽におけるアブシジン酸感受性は、両者とも野生型よりやや高い傾向を示した。

## 2pG07

オオムギのプロテインキナーゼ遺伝子 *HvPKABA1* の構造とその発現について

山内大輔<sup>1,2</sup>, Rodlfo ZENTELLA<sup>2</sup>, Tuan-Hua D. HO<sup>2</sup> (1東京都立大院・理・生物科学、2ワシントン大・生物)

コムギ種子にアブシジン酸 (ABA) を与えるとプロテインキナーゼ PKABA1 の遺伝子発現が誘導されることが知られている。PKABA1 をオオムギのアリユーロン層で強制的に発現させると、ジベレリン (GA) により誘導される  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現が強く抑制された。このことから、PKABA1 が ABA による GA 誘導遺伝子の発現抑制に介在していることが示唆された。そこでこの遺伝子の役割を調べるためにオオムギよりその相同遺伝子 *HvPKABA1* を単離した。その塩基配列より、この遺伝子は、8 イントロンに分断された 9 エキソンよりなり、コードされるタンパク質はコムギ PKABA1 と 97% の相同性がみられた。また、オオムギ種子での *HvPKABA1* の発現における ABA や GA による影響を RNA プロット法により調べた。

## 2pG08

イネ・発芽種子で発現する Dof タンパク質の類別とジベレリン酸応答性遺伝子発現への関与

鷲尾健司 (北海道大・地球環境科学・環境分子生物学)

イネ発芽種子においてジベレリン酸 (GA) による発現誘導を受けるカルボキシペプチダーゼ (CPD3) 遺伝子のプロモーター領域に相互作用するタンパク質として、Dof タンパク質が選別された。Dof タンパク質は新規の Zn finger motif を有する DNA 結合タンパク質であり、植物の成長や分化、環境変化に呼応した遺伝情報の発現において転写制御因子として機能することが知られている。CPD3 遺伝子のプロモーター配列には穀物植物の GA 応答性遺伝子の共通プロモーター配列の 1 つである pyrimidine box (YCTTTY) が見だされており、この配列は Dof タンパク質が認識する DNA のコア配列 (CTTT) と一致することから、GA による遺伝子発現の活性化に Dof タンパク質が関与することが推察された。イネ発芽種子内には 5 つの異なる Dof 遺伝子に由来する転写産物が確認され、ノーザン法による解析により各々の mRNA は、発芽過程において時期・組織特異的な発現をすることが確認された。その中には GA の標的組織である胚盤・糊粉層組織に強く発現しているものも見だされている。現在、同定された Dof タンパク質の糊粉層細胞内における転写活性化能を想定して解析を進めている。

## 2pG09

イネの FUS3 ホモログ遺伝子の構造と機能について  
加賀谷 安章、小川 勇一郎、藤井 律江、服部 束穂  
(三重大・遺伝子)

アラビドプシス *ABI3*, *FUS3* および *LEC1* 遺伝子は胚発生中期から後期において、多面的な現象に相互に関係して機能していることが報告されている。FUS3 は VP1/ABI3 の B3 DNA 結合ドメインと高い相同性を示す領域を持つ。VP1/ABI3 の分子機能の解析はかなり進んできているのに対して、FUS3 の分子構造と機能に関する解析はほとんど行われていない。演者らはイネより FUS3 ホモログを単離し、その構造ならびにイネにおける機能解析を進めている。

アラビドプシス FUS3 に、高い相同性を示す cDNA を PCR 法によりイネから単離し、さらにその全長 cDNA (*OsFUS3*) を得た。*OsFUS3* は、アラビドプシス FUS3 と同様に B2 ドメイン様の構造と B3 ドメイン構造を有していた。遺伝子発現の組織特異性を調べたところ、発達中の種子においてのみ発現が検出された。現在、*in vitro* での *OsFUS3* の DNA 結合特性の詳細な解析とセンスおよびアンチセンス RNA を発現させたトランスジェニックイネの作製も進めており、その進展についても報告したい。

## 2pG10

ヒヤクニチソウ種子発芽における活性酸素の役割

小川健一、田中良和、岩淵雅樹 (岡山県生物科学総合研究所)

$H_2O_2$  はオオムギやコムギ、イネ等の種子発芽を促進するが、その効果は  $H_2O_2$  の不均化で生じる  $O_2$  による呼吸促進であると説明されている。我々はヒヤクニチソウ種子を用いて発芽における  $H_2O_2$  の作用および役割を調べた。 $H_2O_2$  はヒヤクニチソウ種子の発芽を促進させたが、呼吸阻害剤も同様であったことから、 $O_2$  よりもむしろ  $H_2O_2$  自身が発芽を促進する可能性が考えられた。種子からの果皮の除去や果皮付き種子のエタノール可溶成分抽出による発芽促進、およびそのエタノール可溶抽出成分による果皮なし種子の発芽抑制とその  $H_2O_2$  による回復が見られたことから、 $H_2O_2$  による果皮含有の発芽阻害物質の酸化分解がヒヤクニチソウ種子の発芽を促進すると考えられた。一方、実際の種子発芽時に  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  が生じたことに加え、それらの消去剤は果皮をとり除いた種子でも発芽を抑制したことから、種子の発芽時に生成する活性酸素は、発芽阻害物質分解以外にも発芽自体に不可欠な関わりがあることが示された。

### 3aG01

シロイヌナズナ雄性不稔突然変異体 *solo dancers* における染色体の挙動と紡錘体について

安積良隆<sup>1,2</sup>、Yi Hu<sup>2</sup>、鈴木秀穂<sup>1</sup>、Hong Ma<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>神奈川大・理・応用生物、<sup>2</sup>Dept. of Biol., Life Sci. Consortium, Penn State Univ.)

トランスポゾンタギング法によって作製されたシロイヌナズナの突然変異体 *solo dancers* (*sds*) は健全な花粉を生産することができない雄性不稔の変異体である。先の研究で減数分裂中の花粉母細胞の染色体の挙動を調べたところ、第一減数分裂後期において、正常な個体では染色体が5本ずつ分配されるところ、この変異体では6:4、7:3といった具合に不均等に分配されることが明らかにされた。さらに通常、減数分裂によって大きさの等しい4つの花粉細胞が形成されるが、この変異体では大小の5つから8つの花粉細胞が作られた。我々はこの変異体における紡錘体の機能に関心を持ち、マウスの $\beta$ -tubulin に対する抗体を用いて microtubule を染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果を紹介し、この変異体の表現型への紡錘体の関与に関して検討する。

### 3aG02

ゲノムサイズとアクチン遺伝子の多重化・分子系統からみた原始緑藻ナノクロリス属の分裂様式の起源  
山本真紀<sup>1</sup>、野崎久義<sup>1</sup>、河野重行<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東京大・院・理系・生物科学、<sup>2</sup>東京大・院・新領域・先端生命)

生物は分裂して増殖するが、その分裂様式は単一ではない。原始緑藻ナノクロリス属に注目し、6種7系統の分裂様式を観察し、二分裂、出芽、二細胞性・四細胞性内生胞子の3つがあることを明らかにした。分裂様式の系統関係を推定するために、ゲノムサイズ、アクチン遺伝子の多重化と分子系統を解析した。ゲノムサイズは、核DNA含量の顕微測光とパルスフィールドゲル電気泳動法によって定量した。そのゲノムサイズは極めて小さく、約12Mbp (*N. maculata*) ~ 20Mbp (*N. atomus*)であった。アクチン遺伝子の多重化を調べた結果、二分裂型の *N. bacillaris*、出芽型の *N. coccoides*、内生胞子型のうち二細胞性の *N. sp.*、四細胞性の *N. eucaryotum* は一遺伝子であり、内生胞子型の他の種は二遺伝子であった。また、アクチン遺伝子の分子系統解析は、ナノクロリス属がクロレラと単系統で、その分裂様式は内生胞子型が基本形であり、二分裂型や出芽型は派生的であることを示唆していた。

### 3aG03

有糸分裂期におけるペプチド鎖伸長因子 (EF1 $\alpha$ ) のタバコ培養細胞 (BY-2) 細胞内局在性  
神田勝弘、小岩弘之<sup>1</sup>、江尻慎一郎  
(岩手大・農・寒冷バイオ、<sup>1</sup>岩手生工研)

タンパク質合成に必須であるイネ由来ペプチド鎖伸長因子 (EF1 $\alpha$ ) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質をタバコ培養細胞 (BY-2) 内で発現させることにより、有糸分裂期におけるEF1 $\alpha$ の局在性とアクチンフィラメントとの関連性を細胞組織化学的に解析した。

EF1 $\alpha$ -GFP融合タンパク質発現用のパインリーベクターを構築し、アグロバクテリウム法でBY-2を形質転換した<sup>1,2</sup>。形質転換体はアフィティコリン処理で同調し、さらに有糸分裂期におけるアクチンフィラメントを観察するためにサイトカラシン処理した後<sup>3</sup>、固定した。固定細胞はローダミンファロイジンおよびDAPIで染色した後、共焦点レーザー走査顕微鏡で各標識の観察を行った。

EF1 $\alpha$ は分裂装置およびフラグモプラスト上への局在性が認められた。細胞分裂間期のEF1 $\alpha$ はアクチンフィラメントと挙動をともにすること<sup>1,2</sup>、有糸分裂期のアクチンフィラメントは分裂装置およびフラグモプラスト上に分布することが報告されている<sup>3</sup>。このことから有糸分裂期においてもEF1 $\alpha$ はアクチンフィラメントと挙動をともにすることが示唆された。興味深いことに、EF1 $\alpha$ は染色体凝集にともなって大部分が核内とその周辺に局在し、核膜上の両分裂極から配向を形成する分裂装置上のアクチンフィラメントとは異なる現象が観察された。以上のことは、EF1 $\alpha$ の核内移行および有糸分裂への関与を示唆するものと考えられた。

1: 1999年度日本農芸化学会東北・北海道合同支部会 (神田ら)

2: 1999年度日本生化学会大会 (神田ら)

3: 1999年度日本植物学会大会 (神田ら)

### 3aG04

タバコ馴化細胞 2b13 の増殖の特性

江口健太郎、西田生郎、H. Van Onckelen<sup>1</sup>、長田敏行  
(東京大、院理系生物科学、<sup>1</sup>アントワープ大)

タバコ培養細胞 BY2 細胞株は、増殖にオーキシンの添加が必須であるが、BY2 に由来する馴化細胞株 2b13 は、オーキシン無しの基本培地で盛んに増殖することを特徴とする。そこで、2b13 の増殖の特性を探ることにより、未だ分子機構の明らかでない馴化の本質に迫ることを目的として研究を行なった。

BY2 細胞をオーキシンを除去した培地で培養すると細胞増殖は停止するが、この時 2b13 の培養濾液を加えると増殖を開始することが観察された。この濾液中の増殖を誘導する因子は、高分子であることが推定されたので、ゲル濾過を行なったところ、活性因子は特定の分画に狭められることが分かった。そこでこの物質の同定を試みるとともに、2b13 の増殖特性を明らかにする試みを行なっているのでその結果を報告する。

### 3aG05

植物に CDK のリン酸化による活性化カスケードは存在するか？

梅田正明、松林聡子、内宮博文（東大・分生研）

植物は分裂組織における細胞分裂を柔軟に制御することにより、外的・内的環境要因に適応した器官形成を行っている。しかし、いかなるシグナルが細胞分裂の制御因子をどのようにコントロールしているのか、その分子機構については殆ど明らかにされていない。そこで、我々は細胞周期の活性化因子である CDK 活性化キナーゼ (CAK) に注目し、リン酸化による CDK の活性化機構と細胞分裂の関連について解析を進めている。

CAK は CDK をリン酸化することにより活性化するキナーゼである。我々は昨年度までに、アラビドプシスには少なくとも 2 種類の CAK 相同遺伝子 (*cak1At*, *cak2At*) が存在することを明らかにした。*cak2At* は酵母の two-hybrid システムで *cak1At* と相互作用する因子として単離された。そこで、両者の結合性を検討したところ、*Cak1At* と *Cak2At* は *in vitro* で特異的に結合することが明らかになった。また、分裂酵母の Csk1 変異株を用いて相補性試験を行なったところ、*cak1At* は Csk1 変異株の温度感受性を強く抑圧することが明らかになった。キナーゼ活性の解析結果も合わせて報告し、*Cak1At* が *Cak2At* の活性化キナーゼである可能性を議論する。

### 3aG06

イネのサイクリン H は CDK-活性化キナーゼの活性化因子である

山口雅利、梅田正明、内宮博文（東大・分生研）

細胞周期において中心的な役割を果たしているのが、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) である。CDK の活性化にはサイクリンとの結合だけでなく、CDK 自身のリン酸化・脱リン酸化も重要であることが知られている。CDK 活性化キナーゼ (CAK) は、T-loop 領域にあるスレオニン残基をリン酸化することにより、CDK を活性化するキナーゼである。イネの CDK の一つである R2 は動物や分裂酵母の CAK の機能的なホモログであること、そして 3 種類 (190, 105, 70kDa) の複合体を形成することを昨年度の本学会で発表した。CAK の活性化因子として知られるサイクリン H が R2 と相互作用するのか、酵母の two-hybrid 法及び精製した組換えタンパク質を用いた pull-down アッセイを行ったところ、サイクリン H は他の CDK とは結合せず、R2 と特異的に結合することが明らかになった。また、ヒトの CDK2、イネの Cdc20s1 そしてアラビドプシスの CTD に対するリン酸化活性を検討したところ、サイクリン H を加えることによって、各基質に対する R2 のリン酸化活性が上昇することが明らかになった。以上の結果から、サイクリン H は 105kDa の R2 活性型複合体の構成因子として存在すると示唆された。

### 3aG07

タバコ培養細胞における糸状菌エリシターによって誘導されるサイクリン遺伝子の発現抑制

鈴木 肇<sup>1</sup>、西内 巧<sup>1,2</sup>、進士 秀明<sup>1</sup> (<sup>1</sup>工技院・生命研・植物分子生物、<sup>2</sup>科学技術振興事業団)

防御応答の初期過程を理解するために、エリシターとして *Trichoderma viride* が生産するキシラナーゼ (TvX) 及び *Phytophthora infestans* の細胞壁抽出物 (PiE) を用いてタバコ培養細胞 (XD6S 株) における多様な遺伝子群の発現様式を解析している。その中で、エリシターがサイクリン遺伝子 (*Ntmyc25*, *Nt-CYM*, *CycD3.2*) の mRNA レベルの急激な低下を引き起こすことを見いだした。PiE によるこれら mRNA の減少は、TvX の場合よりも早い。転写阻害剤 (アクチノマイシン D, ActD) によって *Ntmyc25* と *Nt-CYM* の mRNA レベルは急激に低下する。一方、ActD は TvX による *CycD3.2* mRNA 量の減少を抑制する。これらは、エリシターによるこれらサイクリン遺伝子の発現が転写の抑制あるいは mRNA の不安定化によってそれぞれ特異的に制御されていることを示唆している。さらに、TvX による *Ntmyc25*, *Nt-CYM*, *CycD3.2* の発現レベルの低下は、プロテインキナーゼ阻害剤 (スタウロスポリン) によって抑制される。したがって、エリシターシグナル伝達系が防御遺伝子の活性化及びサイクリン遺伝子の抑制という相反する応答を調節していると考えられる。

### 3aG08

B-type サイクリン遺伝子の M 期特異的発現を制御する myb 様転写因子

伊藤正樹<sup>1,3</sup>、荒木智史<sup>2</sup>、町田泰則<sup>2</sup>、John Doonan<sup>3</sup>、渡邊 昭<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大・院・理系・生物科学、<sup>2</sup>名大院・理・生命、<sup>3</sup>Dept. Cell Biol., John Innes Centre)

植物の B-type サイクリン遺伝子は G2/M 期に特異的な発現を示す。この発現はプロモーター領域によって制御されており、9 bp からなるシスエレメント (MSA element) が M 期特異的なプロモーターの活性化に必要かつ十分であると明らかにしてきた。この MSA element に結合する転写因子の cDNA クローニングを、酵母を用いた one hybrid 法により試みた。その結果、3 種類の myb 様転写因子 (*NtmybA1*, *NtmybA2*, 及び *NtmybB*) をタバコ cDNA ライブラリーよりクローニングした。これらの myb 様転写因子はいずれも、これまでに植物からは同定されていない新規な myb であり、そのアミノ酸配列は植物の myb よりも動物の myb に類似している。タバコ培養細胞 BY2 の同調培養系を用い、細胞周期中での発現を解析したところ、*NtmybA1*, *NtmybA2* は B-type サイクリンと同様に M 期特異的な発現を示したが、*NtmybB* は細胞周期を通じて発現していた。これらの myb はいずれも、MSA element を含む DNA に、*in vitro* で塩基配列特異的に結合する。現在、これらの myb が *in vivo* において、MSA element を含むプロモーターを活性化するかどうかについて解析中である。

### 3aG09

NPK1 MAPKKK はタバコ細胞の細胞質分裂に必須である  
西浜竜一、石川雅樹、荒木智史<sup>1</sup>、町田泰則（名大院・理・  
生命理、<sup>1</sup>石原産業・中央研）

我々は、分裂細胞で発現し、mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKKK) をコードする NPK1 遺伝子のタバコ細胞における機能解析を行っている。NPK1 タンパク質はタバコ培養細胞 BY-2 の細胞周期において S 期から M 期にかけて蓄積した。NPK1 の活性を測定したところ、M 期後半に活性のピークが見られた。また、NPK1 は細胞板形成を行う装置であるフラグモプラストに局在した。そこで、このような特徴を有する NPK1 が M 期後半のどのような生理過程において機能するのかを逆遺伝学的に解析した。キナーゼ不活性型変異を持つ NPK1 の過剰発現は、ドミナント・ネガティブ様式に NPK1 の機能を阻害することが期待される。デキサメタゾン (DEX) 依存的に変異タンパク質を過剰発現できる形質転換 BY-2 細胞を、DEX 存在下で培養したところ、多核化が観察され、その核数は時間とともに増加した。カルコフローやアニリンブルーで染色すると、間期の多核細胞において、途中で発達が止まった細胞板と思われる構造が観察された。さらにキナーゼ不活性型 NPK1 を発現している細胞のフラグモプラストは、横方向への拡大成長の速度が低下していた。以上のことから、NPK1 MAPKKK は細胞板形成に必須な因子であることが明らかになった。

### 3aG10

タバコ細胞周期の NPK1 プロテインキナーゼ (MAPKKK) の細胞内局在とその機能  
石川雅樹<sup>1</sup>、西浜竜一<sup>1</sup>、荒木智史<sup>2</sup>、町田泰則<sup>1</sup>（<sup>1</sup>名大院・理・生命理、<sup>2</sup>石原産業・中央研）

タバコの NPK1 プロテインキナーゼは、細胞増殖にかかわっていると考えられる。NPK1 の N 末端側のキナーゼ領域は、アミノ酸配列に関して MAPKKK と類似しており、実際にタバコの MAPKK をリン酸化することができる。さらに細胞周期における NPK1 の活性化パターンから、NPK1 は M 期において何らかの機能をしていると考えられる。本研究の目的は、NPK1 の細胞周期における細胞内局在と機能を解明することである。そこで、NPK1 cDNA を Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子と結合して (GFP::NPK1)、タバコ培養細胞 BY-2 に導入しその細胞内局在を調べた。細胞周期の各ステージについてみてみると、NPK1 は間期では核内に存在し、M 期に入ると細胞質全体に広がり、分裂中期までこの局在が続いた。分裂後期になると、両極に移動しつつある染色体のほぼ中央に帯状に局在するようになった。さらにフラグモプラスト微小管が形成されるようになると、その中央領域に細くドーナツリングのように局在するようになった。またこの時期には細胞核の中にも見られるようになった。さらに我々は、キナーゼ不活性型の NPK1 と GFP を融合した GFP::NPK1KN を用いて細胞周期に与える影響について解析したところ、フラグモプラストの広がりや細胞板形成が抑制され、多核になった細胞が現れた。以上のことから、NPK1 は細胞質分裂において何らかの機能をしていることが考えられる。

### 3aG11

ドミナントネガティブ型 NPK1 プロテインキナーゼ (MAPKKK) を発現する形質転換タバコでの NPK1 の機能解析  
荒木智史<sup>1</sup>、西浜竜一、石川雅樹、町田泰則、(<sup>1</sup>石原産業・中央研、名大院・理・生命理)

タバコの NPK1 プロテインキナーゼは N 末端側にキナーゼ領域を有し、MAPKKK として機能する。また C 末端側にはキナーゼ活性の調節領域や核移行シグナルが存在する。細胞周期の依存的な遺伝子産物の蓄積や、NPK1 の蓄積パターンや、タバコ植物個体内での発現部位から、NPK1 は分裂細胞において機能していることが推測される。

NPK1 の欠損が細胞分裂及びそれに伴う器官形成にどのような影響を及ぼすかを調べるために様々な変異を導入した NPK1 遺伝子を過剰発現する形質転換タバコを作製した。形質転換には DEX 誘導的発現が可能な pTA7001 ベクターを用いた。キナーゼ不活性型 NPK1 をコードする遺伝子を導入した形質転換体において DEX を添加した培地で発芽した幼苗の子葉表面が凹凸になる表現形が認められた。細胞レベルで観察したところ、表皮細胞、葉肉細胞において細胞の多核化及び巨大化が認められた。また気孔に着目すると形成過程の様々な段階で細胞質分裂異常を示した孔辺細胞が観察された。これらの結果より NPK1 はタバコ植物体において細胞質分裂を制御している可能性が示唆された。現在、更にこれらの形質転換体の解析を行なっている。

### 3aG12

NPK1 (MAPKKK)-NQK1 (MAPKK)-NRK1 (MAPK) から成る MAP キナーゼカスケードは細胞周期 M 期に活性化される  
征矢野敦<sup>1</sup>、西浜竜一<sup>2</sup>、荒木智史<sup>3</sup>、町田泰則<sup>2</sup>（<sup>1</sup>京大院・理・植物、<sup>2</sup>名大院・理・生命理、<sup>3</sup>石原産業・中央研）

MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードは、MAPKKK (MAPK kinase kinase) → MAPKK (MAPK kinase) → MAPK から成り、一連のリン酸化による活性化機構によって情報を伝達する。タバコの MAPKKK ホモログ NPK1 とその活性化因子 NACK1 は、細胞周期 M 期にのみ同時に存在し、且つ隔膜形成体に共局在することから、植物細胞の細胞周期 M 期に活性化される MAPK カスケードが存在することが期待された。我々は、既に NPK1 の下流因子の候補として、MAPKK ホモログ NQK1 及び MAPK ホモログ NRK1 を同定している。NQK1 は、NPK1 及び NRK1 と蛋白質-蛋白質相互作用を示し、NACK1 依存的に NPK1 によってリン酸化された。更に、*in vitro* において、NQK1 は、NRK1 をリン酸化して活性化したことから、NRK1 は NQK1 の下流に位置する MAPK であることが証明された。これらの結果は、NPK1、NQK1、NRK1 が MAPK カスケードを構成できることを示している。更に、タバコ懸濁培養細胞 BY-2 の同調培養系において、NPK1 は細胞周期 M 期に活性化され (本大会、西浜)、NQK1、NRK1 も同様な時期に活性化されていた。これらの活性化の時期は、NACK1 蛋白質の蓄積する時期と一致しており、NACK1 によって活性化される NPK1-NQK1-NRK1 MAPK カスケードの存在を支持している。

### 3aG13

発芽過程におけるダイズフェリチンの蓄積と分解

増田太郎、後藤文之、吉原利一、斉木博（電中研・生物科学）

フェリチンは高等植物、動物、微生物にわたって広範に見いだされる鉄貯蔵タンパク質である。植物フェリチンは主に種子のプラスチド内で24量体構造をとっており、ダイズ乾燥種子では分子量約28kDaという単一サブユニットから構成されている。この28kDaサブユニットは、種子の吸水、発芽過程に特定の位置で切断を受け、その結果、徐々に分子量約26.5kDaのサブユニットが出現する。ここで生じる26.5kDaサブユニットは、フェリチンが完全に分解される過程の第一段階と考えられているものの、その機能については不明である。本発表では、ダイズ種子の発芽過程における両サブユニットの構成比の解析を行い、大腸菌発現系より調製した両サブユニットからなるホモ24量体の鉄貯蔵能についても検討した。鉄貯蔵能については28kDaサブユニットの方が優れており、このことから、28から26.5kDaサブユニットへの分解に伴ってフェリチン内部の鉄が放出されている可能性が示唆された。

### 3pG01

左巻きのねじれを示すアラビドプシス突然変異体の解析。

THITAMADEE siripong, 土原 和子、橋本 隆；（奈良先端大、バイオ）。

シロイヌナズナの劣性突然変異体 *spiral1* (*spr1*) は根や黄化胚軸や暗照生育の茎の表皮細胞が右巻きのねじれを示す。*spiral1* を EMS で突然変異処理した M2 集団から元の右巻きのねじれが左巻きに逆転した突然変異体 *lefty* (*lft*) を選抜した。*spr1* background では *lft1* と *lft2* は半優性的に左巻きのねじれ形質示すが *Spr1* background では、*lft1* は劣性である。*lft1* と *lft2* の幼植物は taxol と propyzamide に対し感受性が高く、それぞれの遺伝子座は染色体のIV番とI番に map された。我々は *LFT1* の遺伝子候補に mis-sense を発見した。この *lft1* 変異は我々が提唱している微少管に依存したねじれモデルを支持するものである。

### 3pG02

GFP 標識微小管を過剰発現させたシロイヌナズナに見られるねじれ形質の解析

直井国子、松山崇、植田勝巳、橋本隆（奈良先端大・バイオ）

$\alpha$ -tubulin 6 の N 末に GFP をつなげた遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ形質転換体 (35S::GFP-TUA6) では、葉や胚軸等の表皮細胞の表層微小管が明瞭に蛍光標識される。35S::GFP-TUA6 は正常に生育するが、子葉（一部の系統では花弁も）が反時計回りにねじれるという表現型を示す。これに対し、微小管に作用する薬剤 (propyzamide や taxol) を野生株に投与すると、子葉は時計回りにねじれる。一方、*spiral* 変異株の子葉は 35S::GFP-TUA6 と同じ反時計回りのねじれを示す。35S::GFP-TUA6 のねじれを薬剤やエチレン、温度に対する感受性の観点から調べた。*spiral* 変異株と掛け合わせた場合のねじれ形質についても報告する。

### 3pG03

GFP を利用して生細胞内で分裂期の微小管の動態を観る熊谷 史、植田 勝巳<sup>1</sup>、馳澤 盛一郎（東京大院・新領域・先端生命、<sup>1</sup>奈良女子大・生物科学）

高等植物細胞において、微小管は細胞周期を通じて重要な役割を果たしており、各期でそれぞれの機能に合った特徴的な配向を示す。しかし、それらの構造間の移行過程についてはまだ不明な点が多い。我々は、一つの生細胞内での微小管の挙動を GFP (green fluorescent protein) の蛍光を利用して追跡したいと考えた。しかし、GFP とチューブリン (シロイヌナズナ TUA6) の融合タンパク質を強制発現させたシロイヌナズナ植物体では表層微小管は蛍光によって観察されるものの、分裂期の微小管に関する知見は得られなかった。そこでこの形質転換シロイヌナズナの幼植物体より培養細胞を作成し、増殖の盛んな培養株を確立したところ、表層微小管だけでなく、前期前微小管束、紡錘体および隔膜形成体が GFP の蛍光像として観察できた。この培養細胞を冷却 CCD カメラとタイムラプスソフトウェアを組み合わせたシステムによって連続観察することにより、細胞周期の境界期における微小管の動態を追跡することが可能となった。今回は、我々がかねてより興味を持っている M 期と G<sub>1</sub> 期の境界における表層微小管の再構築過程を中心として観察結果を報告する<sup>2)</sup>。

1) Ueda et al. (1999) Protoplasma 206: 201-206.

2) Hasezawa et al. submitted.

### 3pG04

コケ減数分裂の分裂面挿入予定位置に出現する新奇微小管帯

嶋村正樹, 出口博則, 峰雪芳宣 (広大・理・生物)

高等植物の体細胞分裂では、分裂前の分裂面挿入予定位置に、微小管が帯状に配向した分裂準備帯 (preprophase band) が出現し、分裂面の挿入位置決定に関与している。しかし、減数分裂では、分裂準備帯の様な構造は存在しないと考えられてきた。正四面体型の胞子四分子を形成するコケ減数分裂には、分裂前に、色素体が四つの領域に分かれ、その間に途中まで細胞質のくびれが生じるグループがある。この時期、四つの領域に分かれた色素体どうしを結ぶ四極微小管系と呼ばれる微小管構造がみられることから、この構造が分裂面の位置決定に関与していると考えられてきた。しかし、この構造が見られる細胞では、すでに細胞質のくびれがはっきりしていた。そこで、くびれが開始する前後に別の構造が存在するのではないかと考え、より早い時期のアクチンと微小管の観察を行った。春先に減数分裂を行うコケでは、冬の間すでに細胞質のくびれが進行していることに注目して、晩秋から冬の時期に観察を行ったところ、マキノゴケ (*Makinoa crispata*) でくびれの位置に微小管が帯状に配向することを見つけた。これは、陸上植物の減数分裂細胞で細胞骨格が細胞表層に並ぶ初めての例である。

### 3pG05

ヒメツリガネゴケにおける葉緑体光定位運動の解析 - 強光反応の運動機構

佐藤 良勝<sup>1</sup>、門田 明雄<sup>1</sup>、和田 正三<sup>1,2</sup> (1都立大・院理・生物科学, 基生研・2情報制御研究部門)

ヒメツリガネゴケ原系体では葉緑体光定位運動が、弱光下で誘引される弱光反応、強光下で逃避する強光反応、ともに青色光だけでなく赤色光でも誘導される。このうち、前者は青色光吸収色素、後者はフィトクロムを介した反応であることが分かっている。弱光反応の運動機構については細胞骨格阻害剤を用いて解析を行った結果、赤色光による運動は微小管系に依存するのに対し、青色光による運動は、微小管系、アクチン繊維系のどちらも利用できる運動機構を備えていることが推察されている。今回、強光反応について解析を行ったところ、弱光反応と同様の結果が得られた。つまり、ヒメツリガネゴケの赤色光・青色光による葉緑体光定位運動は、光の照射部位に対して集合したり逃避したりするという点で一見同じに見えるが、異なる光受容体を介し情報伝達過程の最終段階の運動系まで独立な経路が存在する可能性を示唆している。

### 3pG06

2,3-butanedione monoxime による原形質流動の阻害機構

富永基樹、横田悦雄、園部誠司、新免輝男 (姫工大・理・生命)

2,3-butanedione monoxime (BDM) はミオシンの活性を阻害する薬剤として知られており、植物細胞にも用いられているが、植物ミオシンに対する作用は調べられていない。

ユリ花粉管より単離したミオシンに対する BDM の作用を *in vitro motility assay* を用いて調べたところ、60mM で 25% の阻害がみられた。

次に、ミオシンの関与が知られているユリ花粉管とトチカガミ根毛の原形質流動に対する BDM の影響を調べた。ユリ花粉管では 30mM、短いトチカガミ根毛では 70mM、長い根毛では 100mM で、それぞれ原形質流動は完全に阻害された。しかし、高濃度の BDM 処理によって、アクチン繊維の配向が乱れた。また、トチカガミ根毛では、表層微小管の断片化もみられた。

### 3pG07

トウモロコシにおける二種類のキシランの分布の違い

鈴木潔、北村進一<sup>1</sup>、加藤陽治<sup>2</sup>、伊東隆夫 (京大・木質研、<sup>1</sup>京都府大・農、<sup>2</sup>弘前大・教育)

イネ科植物におけるキシランの分布を調べるために分岐度の異なったキシラン鎖を認識する二種類のポリクローナル抗体を作製し、これらの抗体が交差反応しないことを間接 ELISA 法で確認した。トウモロコシの節間におけるキシランの分布を調べた結果、分岐度の高いキシランは組織の種類に関係なく一次壁全体に局在した。このキシランは未木化の二次壁からなる師部で、特に多くの局在が認められた。しかし、木化した細胞壁における分布は、原生木部、柔細胞および一部の繊維細胞に限定され、わずかな局在しか認められなかった。対照的に、分岐度の低いキシランは組織の種類に関係なく木化した細胞壁中に局在した。従って、分岐度の低いキシランの分布は木化部位に一致していた。以上の結果、分岐度の高いキシランは主として未木化の細胞壁に認められ、分岐度の低いキシランはすべて木化した細胞壁に認められることから、分岐度の異なった二つのキシランは組織レベルで相補的な分布を示すことが明らかになった。

## 1aH01

低温・光ストレスによって阻害された光化学系 I 反応中心複合体の修復と分解

工藤英樹、園池公毅（東大・新領域・先端生命）

機能を失った光化学系のタンパク質は、正常な電子伝達ができないため、過剰なエネルギーによって活性酸素を生じる危険性がある。では、植物はどのようにしてこの危険を回避しているだろうか？可能性として以下の3つが考えられる。機能障害タンパク質の選択的な分解、傷害タンパク質の修復もしくは機能障害を持った葉全体の枯死である。低温・光処理により系 I の機能が失われるキュウリを用いて機能障害をうけた系 I 反応中心複合体の運命を調べるために、系 I の活性、光化学系のタンパク質の量およびクロロフィル量を低温・光処理後に経時測定した。その結果、1) 処理により系 I 反応中心の酸化による吸光変化が減少した。この減少（阻害）は6日後でも持続したが、光阻害の程度が小さい場合には徐々に回復した。2) 処理直後には変化しなかったクロロフィル量が、処理後3-4日の間に減少した。3) 残ったクロロフィル量と系 I の活性の間に強い相関があった。4) PsaA/B タンパク質の量が処理後に減少した。以上の結果から、系 I 反応中心複合体は、強い阻害をうけた時には主に分解され、阻害が弱い時には主に修復されていると考えられる。

## 1aH02

コムギにおける温度順化：光化学系 I、II 間の電子伝達反応

山崎武信<sup>1</sup>、山根由裕、小池弘幸、佐藤和彦（姫工大・理・生命科学、<sup>1</sup>東邦大・理・生物）

コムギを15、25及び35℃で栽培すると栽培温度にあわせて光合成の至適温度が変化すること、その変化は光化学系 II の水側で起きることを以前に本学会で報告した。今回は光化学系 I、II 間の電子伝達反応が栽培温度でどのように変化するかを調べたので報告する。光化学系 II の最初の安定なキノン受容体である QA の再酸化速度を PAM を用いた蛍光強度変化で測定したところ、3成分から成ることがわかった。速度の高い順にそれぞれ QA から QB への電子伝達反応、QB の回転速度、プラストキノンのチラコイド膜内の移動速度に対応すると考えられる。これらの成分の内、第2、第3の成分の速度の温度依存性が一定ではなく、栽培温度によって変化したのが特徴的であった。

## 1aH03

低温・高照度環境下で育成したイネ葉の光合成特性  
太極敬子、牧野 周、前 忠彦（東北大院・農・応生科）

私達はイネを材料に、育成時の生理的な低温・低照度の複合環境に対する光合成の応答、馴化能力を調査してきた。低温・低照度植物 [20/18℃(昼温/夜温)、350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] は、対照植物 [25/20℃(昼温/夜温)、1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] に比べ、大気 CO<sub>2</sub> 分圧、低温・低照度環境下で、葉身 N あたりの光合成速度がやや高く、光飽和にするとその光合成速度の差はさらに大きくなった。また、低温・低照度植物は光飽和、高 CO<sub>2</sub> 分圧の葉身 N あたりの光合成速度が高いことから、RuBP 再生産能力が向上していることが示唆された。低温領域の光合成は、RuBP 再生産能力に律速されるので、この能力が向上したことで低温領域の光合成速度の維持につながったものと理解された<sup>1)</sup>。しかし、RuBP 再生産能力の向上は、低温または低照度のどちらの影響を受けた結果なのか、あるいはそれらの複合的な結果なのかが明確でなかった。そこで今回は、低温・高照度環境で育成したイネの光合成特性を調べることを目的とした。照度 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  のもと、20/18℃ (昼温/夜温；低温区)、25/20℃ (昼温/夜温；対照区) を設け、光合成特性を解析した。光飽和、大気 CO<sub>2</sub> 分圧、低温領域の葉身 N あたりの光合成速度は低温植物で高い傾向にあった。これは、気孔の応答によるものではなかった。光飽和、高 CO<sub>2</sub> 分圧の光合成も低温植物で増加し、RuBP 再生産能力が向上していることが示唆された。よって、低温・高照度で育成したイネにおいても、RuBP 再生産能力の向上により、低温領域の光合成が比較的維持されるものと考えられた。  
1) PCP 39; 1384-1387, 1998

## 1aH04

葉の老化速度の決定要因

西 由香里、寺島一郎（大阪大・理・生物）

植物個体の中の新しい葉を人為的に被陰すると、古い葉の窒素含量が高く維持される。したがって、葉の老化による窒素量、光合成活性の減少が起こるのは、葉齢そのものためではなく、個体内の他の葉に比べてその葉の相対的受光量が減少するためでもある。古い葉は、自身の生産する光合成産物の需要を感知することで、相対的受光量を認識している可能性がある。そこで、本研究ではインゲンマメ個体の処せ異様の光合成系の老化過程に対する初生葉以降に展開する葉の被陰効果を調べた。光合成速度の減少は被陰処理により著しく抑制された。蛍光分析などによる光合成系の諸パラメーターの測定、炭水化物の定量も併せて行い、光合成産物の需要感知機構を検討している。

## 1aH05

常緑広葉樹の葉の光合成機能の成熟遅延  
宮澤真一, 寺島一郎 (大阪大・理・生物)

常緑広葉樹の葉の発生過程においては、面積あたりの純光合成速度と葉の乾燥重量は、葉面積の展開が終了しても依然として低く、葉面積展開が終了してから 10 日~40 日をかけて最大値に達する (光合成機能の成熟遅延)。光合成機能の成熟遅延については、生態学的な解釈に留まり、メカニズムについては明らかにされていない。本研究はインゲンと常緑広葉樹スダジイの葉の発生過程を追って、A-Ci 曲線を作成し、最大総光合成速度が気孔コンダクタンス (gs) や呼吸速度 (rday) によって、どの程度減少しているのか計算した。また、スダジイにおいては、葉の発生過程を追って Rubisco 量を測定し葉緑体内 CO<sub>2</sub> (Cc) を計算した。スダジイの展開途中の葉において、最大総光合成速度は gs よりも rday によって減少していた。一方、インゲンの展開途中の葉においては、最大光合成速度は gs によって大部分が減少していた。また、スダジイにおいて Cc は葉齢と共に減少し、これは葉肉細胞の細胞壁の肥厚が原因である事が示唆された。光合成機能の成熟遅延は、①若い葉の呼吸速度が高い事、②葉緑体の発達が遅い事、③Cc が低い事によって生じることが解った。

## 1aH06

組み換え体イネ細胞質型デヒドロアスコルビン酸還元酵素の性質とそのタバコ葉緑体への導入  
尼子克己<sup>1</sup> 石川綾美<sup>1</sup> 丑丸敬史<sup>2</sup> 森田重人<sup>3</sup> 増村威宏<sup>3</sup>  
田中國介<sup>3</sup> 大岸泰香<sup>1</sup> 岸本律子<sup>1</sup> 合田清<sup>1</sup> (<sup>1</sup>神戸学院大・栄養、<sup>2</sup>静岡大・理、<sup>3</sup>京都府大・農)

アスコルビン酸(AsA)は植物では特に葉緑体で高濃度に見いだされ、光合成電子伝達反応に伴って不可避免的に生じる活性酸素の消去に機能している。我々は個体内のAsA量が酸化ストレスに対する許容量を反映するという予想の下、高AsA含量植物創成の具体的方法を模索している。本研究では以前本大会で報告した、葉緑体DHARの葉緑体へのAsA集積への寄与を、形質転換植物を用いて示すことを目的とし、イネ細胞質型DHARをその材料として用いられるか検討した。

イネ細胞質型DHAR cDNAをpQEベクターに導入し、N末端側に6xHisを持つ融合タンパク質を発現させた。宿主としてBL21(DE3)RILを用いることで目的とするタンパク(rDHAR)を高度に発現させることが出来、これをNi<sup>2+</sup>-NTAカラムによって1ステップでSDS-PAGE上で均一になるまで精製した。rDHARの至適pH、DHAおよび還元型グルタチオンに対する親和性はどれも光照射時の葉緑体ストロマの環境で酵素機能を発揮できるものであった。そこでDHARとイネ葉緑体型CuZn-SODのトランジットペプチドの融合タンパクが発現するようにpBI121ベクター上にcDNAを挿入し、アグロバクテリウム法によってタバコに形質転換した。形質転換体が示す形質を併せて報告する。

## 1aH07

ホウレンソウ葉緑体dehydroascorbate reductaseの精製とその構造活性相関  
嶋岡 泰世, 三宅 親弘, 横田 明穂  
(奈良先端大学院、バイオ)

植物葉緑体において、アスコルビン酸はascorbate peroxidase反応の電子供与体として機能しており、活性酸素消去には必須の物質である。アスコルビン酸再生酵素の一つであるdehydroascorbate reductase(DHAR)はその活性が葉緑体に存在することが明らかにされているが、葉緑体でのアスコルビン酸の再生に十分機能できるDHARは精製されていない。そこで、我々はホウレンソウから葉緑体DHARを精製し、その酵素学的性質を調べたところ、DHA、GSHに対するKm値はそれぞれ0.07mM、1.1mM、比活性は370 μmol/min/mg proteinであり、葉緑体で十分機能できるものであると結論した。また、葉緑体DHARの比活性はこれまで葉緑体DHARであると考えられていたtrypsin inhibitorの比活性と比べると約300倍高く、葉緑体DHARとtrypsin inhibitorとは分子的にも全く異なるものであった。また、葉緑体DHARのcDNAを単離し、葉緑体DHARの大腸菌での発現にも成功しており、現在、点変異を施したDHARを用いた葉緑体DHARの構造活性相関について解析中である。

## 1aH08

光化学系II 集光装置制御因子CP26の遺伝子発現  
皆川純、中森審、小野高明 (理研・光生物)

光化学系に過剰な光エネルギーがもたらされると、活性酸素種等、細胞に有害な分子種が生成され、光合成系は破壊される。こうしたストレスのかかる状態を避けるため、植物は光環境の変化に応じて集光装置の質を変える。その質の変化によって持たせられるものの一つに、集光装置から反応中心へのエネルギー伝達の遮断がある。この時、過剰な励起エネルギーは集光装置内で無輻射過程により緩和され、光化学系は“non-photochemical quenching (NPQ)”と呼ばれる低蛍光状態になる。このNPQが実際に起きている場とされるのが補助集光装置タンパク質CP26である。

本研究では、まず緑藻クラミドモナスよりCP26のcDNAを単離し、遺伝子構造を調べた。現在、このcDNAより染色体DNAを単離している。その遺伝子発現制御領域の構造と、さまざまな光条件下における遺伝子発現の変化についても報告し、CP26遺伝子の発現調節を植物の対光ストレス戦略の一つとして考察する。

## 1aH09

アスコルビン酸合成酵素L-ガラクトノγ-ラクトン脱水素酵素は呼吸の電子伝達系と共役している

吉村和也<sup>1</sup>, 藪田行哲<sup>2</sup>, 重岡 成<sup>1,2</sup>  
(近大院・応生命化<sup>1</sup>, 近大・農・食栄<sup>2</sup>)

アスコルビン酸(AsA)は植物に普遍的かつ多量に含まれており、種々の外部環境ストレスによる光・酸素毒に対する防御など種々の生理機能を有している。L-ガラクトノγ-ラクトン脱水素酵素(GALDH)はAsA合成経路の最終段階を触媒する酵素であり、数種の植物から精製およびcDNAの解析が行われている。しかし、本酵素の発現調節や細胞内AsA量に対する役割については不明な点が多く残っている。そこで本研究では、タバコ葉におけるGALDHの性質および生理的役割について検討した。

GALDH活性はタバコ葉のミトコンドリアの膜面分においてのみ認められた。cDNA解析の結果、GALDHは587アミノ酸残基からなり、推定分子量は66755Daであった。また、N末端領域にはミトコンドリアへのトランジットペプチドが存在した。リコンビナントGALDHはnative酵素と同様にチトクロームcを電子受容体として、L-ガラクトノγ-ラクトン(L-Gal)に高い特異性を示した。以上の結果およびチトクロームcの局在性を考えると、GALDHはミトコンドリアの内膜に結合し、膜間スペース側にその活性中心を向け、反応に伴って電子伝達系と共役し、ATPの生成を伴うことが示唆された。そこで、同じ分子特性を持つGALDHが局在するホウレン草ミトコンドリアを用いて酸素電極により本酵素活性が呼吸の電子伝達系に及ぼす影響を検討した。その結果、単離ミトコンドリアにL-Galを添加することにより明らかに酸素消費速度が上昇した。現在、呼吸系阻害剤を用いてGALDHと電子伝達系との相互作用を詳細に検討中である。

## 1aH10

ザゼンソウのuncoupling proteinの出芽酵母における発現系の構築と機能解析

伊藤菊二, 上村松生(岩手大・農・寒冷バイオ)

脱共役タンパク質(uncoupling protein: UCP)はミトコンドリアの呼吸により生じたプロトン勾配をATP合成と共役せずに解消し、生じた自由エネルギーを熱として放出することが知られている。我々は、発熱植物であるザゼンソウの肉穂花序で特異的に発現している2種類の新規UCP関連遺伝子(*SfUCPa* & *SfUCPb*)の単離に成功し、これらの発現が低温で誘導されることを明らかにしてきた。

本研究では*SfUCPa*および*SfUCPb*の出芽酵母での発現系を構築し、誘導される形質の変化について解析した。その結果、遺伝子導入酵母における増殖は野性株に比べて抑制されることが判明し、その効果は*SfUCPb*発現株でより顕著であることが明らかになった(野性型の55%阻害)。また、*SfUCPa*および*SfUCPb*発現株におけるミトコンドリア内膜の膜電位は野性株と比較して有意に低下していることが判明し、ザゼンソウ由来のUCP関連遺伝子がミトコンドリアにおける脱共役反応に関与していることが示唆された。

## 1aH11

*Thiobacillus novellus* チトクロームc オキシダーゼ:

構造, 機能, 進化

林田伸吾, 高山勝行, 谷川 実, 庄子和夫, 石塚盛雄<sup>1</sup>, 山中健生  
(日大・理工・物質応化,<sup>1</sup>中央大・理工・応化)

*T. novellus* チトクロームc オキシダーゼは、2種類のサブユニット各1分子からなる最小構造単位中に1分子のヘムAと1原子のCuしかもたない点で他の生物種のオキシダーゼと非常に異なっているが、還元型チトクロームcを酸化してO<sub>2</sub>をH<sub>2</sub>Oに還元する。このオキシダーゼはTween 20存在下では最小構造単位のダイマーとして存在するがATPを加えると可逆的にモノマーになる。今回、このオキシダーゼをコードするDNAの塩基配列を決定することができた。その配列から推定されたアミノ酸配列からすると、サブユニットIと考えられる部分にはチトクロームa<sub>3</sub>のヘムAおよびCu<sub>B</sub>の結合場所の他に、チトクロームaのヘムA結合場所も存在するが、サブユニットIIにはCu<sub>A</sub>の結合場所がないことが分かった。ただ、サブユニットIらしい部分のチトクロームaのヘムA結合場所が実際に使われているかどうかは、目下のところ分からない。サブユニットIらしい部分をコードするDNAの塩基配列は、*Paracoccus denitrificans* チトクロームaa<sub>3</sub>のサブユニットIをコードするDNAのものに似ているし、サブユニットIIをコードするDNAの塩基配列は*Bradyrhizobium japonicum* チトクロームaa<sub>3</sub>のサブユニットIIをコードするDNAのものに似ている。*T. novellus*にはチトクロームc オキシダーゼをコードすると思われるもう1セットのDNAがあり、この方の塩基配列は*B. japonicum*のチトクロームbb<sub>3</sub>をコードするDNAの塩基配列と似ている。

## 1aH12

NO(一酸化窒素)によるミトコンドリア酸化リン酸化の阻害

下地寿, 大城優子, 崎浜靖子, 山崎秀雄  
(琉球大・理・海洋自然)

リョクトウ(*Vigna radiata*)胚軸ミトコンドリアを用いて、ミトコンドリア酸化リン酸化に対するNO(一酸化窒素)の影響を調べた。*in vitro* NO発生系として亜硝酸/NADH/硝酸還元酵素系を用い、ミトコンドリア電子伝達活性は酸素吸収速度をモニターした。植物の呼吸系には、2つの電子伝達系路(cytochrome pathway, alternative pathway)が存在することが知られている。NOはcytochrome pathwayに対して阻害効果を示したが、alternative pathwayに対する阻害は示さなかった。また、NOはミトコンドリアのATP合成活性を阻害した。以上の結果は、NOがcytochrome pathwayを阻害することによって酸化リン酸化を抑制することを示している。このことは、窒素同化系がミトコンドリアのエネルギー生産に影響を与える可能性を示唆している。

## 1pH01

水ストレスによるレタス葉緑体 CuZn スーパーオキシドジスムターゼ失活機構の解析

堂前喜章、縄田栄治、金松澄雄<sup>1</sup>、真野純一<sup>2</sup>

(京都大院・農、<sup>1</sup>南九州大・園芸、<sup>2</sup>京都大・食糧科学研)

レタス個体の根に強い水ストレス処理を与えると、葉の水ポテンシャル低下に先立ち、葉緑体 CuZn スーパーオキシドジスムターゼ(CuZnSOD)、カタラーゼ (CAT)が失活する。本研究では、この水ストレス初期の CuZnSOD 失活機構の解明を目的としている。

播種後 3~4 週間水耕栽培したレタスを用い、根をソルビトール溶液(Sorb)に浸し、水ストレスを与えた。250 mM Sorb 処理では、葉の膨圧は 24 時間でも低下しないが、葉の全 SOD 活性は処理 1 時間で約 40%低下した。CAT 活性は、500 mM Sorb 以下では失活しなかった。また、アブシジン酸を葉柄から 0.1 mM 吸収させると、水ストレス処理同様に SOD 活性が 1 時間で約 50%低下した。

このような微弱な水ストレスによる葉緑体 CuZnSOD の特異的な失活は、水ストレス初期応答の生理的反応と考える。

## 1pH02

クラミドモナスのグルタチオンペルオキシダーゼ様タンパク質の誘導へのセレンの関与

武田 徹、重岡 成 (近畿大・農・食栄)

過酸化物質消去系の鍵酵素の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)は、触媒反応に必須であるセレンシステインを含む。我々は *Chlamydomonas reinhardtii* C9 (*C. reinhardtii*)において、光合成生物で初めてセレン依存のGPX 活性を見出したが、本酵素のcDNAを単離解析したところ、活性中心と予想される部位はセレンシステインではなくシステインをコードしていた。そこで今回、*C. reinhardtii* GPXの活性発現にセレンがどのように関与しているかを明らかにするために、ネイティブおよびリコンビナント酵素を用いて、セレンの必要性、存在形態などを検討した。

大腸菌でのGPXタンパク質の発現量は全タンパク質の約 20%であった。しかし、リコンビナント酵素のGPX活性は認められなかった。大腸菌粗抽出液をセレン化合物でプレインキュベーションしたが酵素活性は検出されなかった。そこで大腸菌培養時に種々の金属イオンを添加したところ、セレン化合物でのみGPX活性(122.5 nmol/min/mg protein)が検出された。リコンビナントおよびネイティブ酵素を精製しKCNにより処理したところ、セレン依存のウシ赤血球GPXと同様に、酵素活性の失活とそれに伴いタンパク質からのセレンの遊離が認められた。また、GPXの特異的阻害剤であるヨード酢酸によりネイティブおよびリコンビナント酵素はそれぞれ失活した。以上の結果は、本酵素の活性発現にセレンが関与していることを示唆している。現在、セレンの結合部位の同定および存在形態について検討している。

## 1pH03

クラミドモナスの violaxanthin 変換に関与する遺伝子の解明  
加藤 彰, Alia<sup>1</sup>, Tony H. H. CHEN<sup>2</sup>, 西山佳孝<sup>1</sup>, 高市真一<sup>3</sup>, 石崎公庸<sup>4</sup>, 福澤秀哉<sup>4</sup>, 村田紀夫<sup>1</sup> (筑波大・生物科学,<sup>1</sup> 基生研・計時機構,<sup>2</sup> Dept. Horticult., Oregon State Univ.,<sup>3</sup> 日本医科大・生物,<sup>4</sup> 京都大・生命科学)

植物ホルモン的一种、アブサイシン酸(ABA)の生合成系に関与する遺伝子を明らかにするために、高等植物と同じ ABA 生合成系を持つと考えられる緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)に挿入変異を導入し、細胞内の ABA レベルが低い変異株を単離した。それらの株のカロチノイド類組成を逆相 HPLC を用いて分析し、*trans*-と *9'-cis*-violaxanthin に対する *trans*-と *9'-cis*-neoxanthin の量比が野生株に比べて低い変異株 (M526)を一株得た。この株では、ABA 生合成系に含まれる violaxanthin が neoxanthin に異性化されるステップが異常を起こしていると考えている。M526 において破壊された遺伝子を明らかにするために、タギングされている DNA 部分をクローニングし、この領域の DNA 構造を解析した。また、M526 の光合成特性を解析したので報告する。

## 1pH04

クロレラ CO<sub>2</sub> 不感受性変異体の細胞膜流動性のスピンドラベル EPR による研究

山田修嗣、藤原美佳、松田祐介、河盛阿佐子  
(関西学院大・理)

CO<sub>2</sub> 濃度を感知するセンサーは *Chlorella ellipsoidea* の細胞膜の表面に存在すると考えられている。我々は、化学的変異誘発物質である N-nitroso-N-ethylurea (ENU)を用いて、CO<sub>2</sub> への感受性の欠落した CO<sub>2</sub> 不感受性変異体を作成し、低および高 CO<sub>2</sub> 環境下で育てた。5-doxyl stearic acid label (5SAL)は細胞膜に結合し、 $\sigma = (A_{i1} - A_{i2}) / [A_{i1} - (A_{i1} + A_{i2})/2]$  で定義される膜の剛性を決定するために、室温でその EPR 信号を観測した。ここで、 $A_i$  ( $i = x, y, z$ )は <sup>14</sup>N の超微細相互作用のそれぞれの成分である。その結果、野生型の膜の剛性は低 CO<sub>2</sub> と高 CO<sub>2</sub> 生育どちらの場合でも同じであった。また高 CO<sub>2</sub> で育てられた変異体の膜の剛性は、低 CO<sub>2</sub> で育てられた変異体や野生型よりも小さかった。

これらの結果は細胞膜の流動性が CO<sub>2</sub> 感受性に寄与していることを示している。

## 1pH05

PEPカルボキシラーゼの特異的リン酸化酵素の均一精製とチオレドキシニンによる活性調節

佐瀬英俊<sup>1</sup>、上野宜久<sup>2</sup>、林浩昭<sup>3</sup>、久堀徹<sup>4</sup>、泉井桂<sup>1,5</sup> (1京都大・院・農、2名大・院・理、3東京大・院・農、4東工大・資源研、5京都大・院・生命)

C4光合成において本酵素 (PEPC)は葉肉細胞の細胞質に局在し、初期炭酸固定を行う。PEPCは光シグナル依存的に可逆的リン酸化による活性調節を受け、昼間にN末端近傍のセリン残基がリン酸化されて高活性型となる。これに関与するリン酸化酵素(PEPC-PK)を今回初めてトウモロコシ緑葉より約140万倍精製し、均一標品を得た。PEPC-PKは空気酸化や酸化型グルタチオンにより容易に不活化されたがDTT等のSH試薬で活性が回復し、大腸菌のチオレドキシニン(Trx)はこの回復を加速した。還元型Trxは単独でも濃度依存的に活性回復効果を示した。さらに葉緑体に局在するTrx mおよびf、細胞質に局在するTrx hも同様な活性回復効果を示した。その他の知見ともあわせて、PEPC-PKがレドックス制御による活性調節を受けていることが強く示唆された。植物においても細胞質にTrx hの存在することは知られていたが、その生理的役割はあまり知られていない。Trx hのシグナル伝達への関与の可能性について考察する。

## 1pH06

トリエン脂肪酸は植物の高温適応におけるキーファクターである

村上雄樹、津山孝人<sup>1</sup>、小林善親<sup>1</sup>、児玉浩明、荒田博行、射場厚

九大院・理・生物、<sup>1</sup>九大院・農・林学

人間活動によってもたらされた温室効果ガスは地球温暖化を引き起こし、人類の社会経済活動にも悪影響を及ぼすことが危惧されている。よってこのような事態を回避するための対策が各研究分野においても急務とされている。

葉緑体膜脂質の主要脂肪酸分子種であるトリエン脂肪酸の含量は低温で生育させると増加し、逆に高温下では減少する。このことから、トリエン脂肪酸含量の減少は高温適応に関係していると考えられる。私たちはジエン脂肪酸からトリエン脂肪酸を生成する葉緑体局在型 $\omega$ -3 デサチュラーゼ遺伝子 (FAD7) を強発現させたトランスジェニックタバコのうち、トリエン脂肪酸含量が顕著に減少した2つのジーンサイレンシング系統株 (T15, T23) における高温耐性能を評価した。生葉を熱処理した後の光合成による酸素発生速度、36°Cでの長期生育、47°Cでの枯死率について評価した。T15, T23は野生株に比べ、顕著に熱耐性が増加していた。このことは高温下でのトリエン脂肪酸の減少が植物の高温適応能力と密接に関係していることを示している。

## 1aI01

シロイヌナズナの rd29A 遺伝子プロモーターを導入したトランスジェニックイネの解析

吉羽洋周<sup>1</sup>、田中博美<sup>1,2</sup>、津村まゆみ<sup>1</sup>、関口文彦<sup>2</sup>、篠崎和子<sup>3</sup>、篠崎一雄<sup>4</sup> ( <sup>1</sup> 日立・中研・ライフサイエンス、<sup>2</sup> 日本女子大・理・生物、<sup>3</sup> 国際農研、<sup>4</sup> 理研・植物分子 )

シロイヌナズナの rd29A 遺伝子は乾燥応答性遺伝子として単離され、その後低温や高塩ストレスによってもその発現が誘導される事がわかっている。また、この遺伝子のプロモーター領域には乾燥応答性遺伝子プロモーターに特徴的なシスエレメント DRE (dehydration-responsive element) が存在し、しかもこの領域に結合する転写因子 DREB の存在が明らかになっている。さらに、本プロモーターに GUS 遺伝子を連結して導入したシロイヌナズナとタバコでは、乾燥ストレスによって強い GUS 活性が植物体全体に見られることがわかっている。

そこで本研究では、この強力なプロモーターが双子葉だけでなく単子葉においても働くか否か調べるため、イネに導入した。その結果、本プロモーターはイネにおいては根特異的に作用することがわかった。

## 1aI02

シロイヌナズナにおけるエクステンシン遺伝子(atExt2)の単離とそのファミリーの解析

吉羽洋周<sup>1</sup>、青木知佐子<sup>1,2</sup>、井内 聖<sup>3</sup>、楠城時彦<sup>3</sup>、関 原明<sup>3</sup>、関口文彦<sup>2</sup>、篠崎和子<sup>4</sup>、篠崎一雄<sup>3</sup> ( <sup>1</sup> 日立・中研・ライフサイエンス、<sup>2</sup> 日本女子大・理・生物、<sup>3</sup> 理研・植物分子、<sup>4</sup> 国際農研 )

我々は植物が水ストレスにตอบสนองする遺伝子の一つとしてエクステンシンの遺伝子をシロイヌナズナからクローニングし、atExt2 と名付けた。エクステンシンは植物細胞の伸長に参与する糖タンパク質であり、その配列中に、SPPPP の特徴的な反復配列を豊富に含むことが知られている。これまでに単離されているエクステンシン遺伝子の多くはストレス誘導型として知られている。すでにシロイヌナズナからは 1 つ atExt1 が単離されている。本研究により単離した atExt2 は水ストレスに対して遺伝子発現が抑制されるタイプであり、シロイヌナズナから単離されたのははじめてである。また、本遺伝子には幾つかのファミリーが存在し、それらのアミノ酸反復配列モチーフには、3 種類のバリエーションのあることが明らかとなった。さらに、ノーザン解析の結果から、根や茎そしてつぼみに強く発現するといった組織特異性のあることもわかった。本研究では、この他、単離した遺伝子群のストレスや植物ホルモン処理下での発現の特徴についても報告する。

## 1aI03

プロリン処理したイネの耐塩性と Na<sup>+</sup>吸収量の関係

五十嵐由美子<sup>1</sup>、吉羽洋周<sup>2</sup>、真田幸香<sup>3</sup>、和田敬四郎<sup>3</sup>、篠崎和子<sup>4</sup>、篠崎一雄<sup>5</sup> ( <sup>1</sup> 日立・ライフサイエンス推進事業部、<sup>2</sup> 日立・中央研、<sup>3</sup> 金沢大・理・生物、<sup>4</sup> 農水・国際農研、<sup>5</sup> 理研・植物分子 )

イネは高塩ストレスをうけると体内にプロリン(Pro)を蓄積し、浸透圧調節を行う。我々はこれまでに Pro 合成系の  $\Delta$  1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素(P5CS)が律速となり高塩ストレスにตอบสนองして Pro を蓄積すること、Pro は特に葉に蓄積され、茎や根には殆ど蓄積されないことを明らかにしてきた。また、高塩ストレス下において耐塩性イネ(DGWG)は感受性イネ(IR28)より多くの P5CS 遺伝子を発現し、多くの Pro を蓄積することが分かった。そこで耐塩性における Pro の効果を検証するために、IR28 に予め Pro を吸収させることで塩に対する耐性が向上するの否かを検討した。その結果、3日間塩(250mM NaCl)処理した IR28 が全て枯死してしまうのに対して、予め Pro を吸収させたものは 70% の高い生存率を維持することが分かった。また Pro 前処理した IR28 は無処理の IR28 と比較して Na<sup>+</sup>の吸収が抑制されていた。以上より、Pro が高塩ストレス下において浸透圧調節とともに Na<sup>+</sup>の取込みを抑える効果があり、これによって塩に対する耐性が向上したものと考えられることができる。

## 1aI04

シロイヌナズナにおける各種ポリアミンの水ストレス処理による変動と組織特異的分布

浦野 薫<sup>1,3</sup>、吉羽洋周<sup>1</sup>、五十嵐由美子<sup>2</sup>、内田憲孝<sup>1</sup>、関口文彦<sup>3</sup>、篠崎和子<sup>4</sup>、篠崎一雄<sup>5</sup> ( <sup>1</sup> 日立・中研・ライフサイエンス、<sup>2</sup> 日立・ライフサイエンス推進事業部、<sup>3</sup> 日本女子大・理・生物、<sup>4</sup> 国際農研、<sup>5</sup> 理研・植物分子 )

我々は、植物が水ストレスにตอบสนองして誘導される遺伝子の 1 つとしてポリアミン合成系の arginine decarboxylase(ADC)遺伝子をシロイヌナズナからクローニングし、解析を進めている。この遺伝子はシロイヌナズナでは 2 つのタイプ (1 型と 2 型) が存在し、1 型はハウスキーピング遺伝子、2 型は高塩ストレスや乾燥ストレスといった水ストレスによって誘導されるストレス誘導性遺伝子であることがわかった。また、2 型は花、つぼみ、若いさやなどの生殖組織に特異的に発現することも分かった。そこで実際に内生ポリアミンレベルがどのように変化しているか HPLC で種々のストレスを与えたシロイヌナズナを用いて分析したところ、水ストレスによってアグマチン、プトレスシン、スベルミンの量が增加することがわかった。しかも花、つぼみ、若いさや、熟したさやなどの生殖組織で各種ポリアミンが多量に存在していることがわかった。

## 1aI05

ストレス応答におけるシロイヌナズナ galactinol synthase 遺伝子の機能解析

太治輝昭<sup>1, 2</sup>, 大住千栄子<sup>3</sup>, 関 原明<sup>1</sup>, 井内 聖<sup>1</sup>, 篠崎和子<sup>4</sup>, 篠崎一雄<sup>1</sup> (理研・植物分子, <sup>2</sup>筑波大・生物科学, <sup>3</sup>味の素(株)・中研, <sup>4</sup>農水省・国際農研・生物資源)

galactinol synthase は、raffinose family oligosaccharides (RFO) 合成の key enzyme で、RFO は植物において proline, glycinebetaine 等と同様に適合溶質として機能しているという報告があるが、その証明はされていない。そこでシロイヌナズナより galactinol synthase 遺伝子をクローニングし、その遺伝子 (*AtGalS1-6*) のストレス応答性 (Dry, Cold, NaCl, sorbitol) についてノーザン解析を行った。*AtGalS1, 2* については、これらのストレス処理により短時間で誘導されることが明らかとなった。また *AtGalS3* については恒常的な発現が見られることも明らかとなった。さらに *AtGalS1, 2* について、組織別にノーザン解析を行った結果、成熟過程の種子で非常に強く発現していた。また野生型の *Arabidopsis* において無処理・乾燥ストレス・塩ストレス条件下における糖分析を行った結果、無処理では検出できない程度の raffinose がストレス下において非常に蓄積することが示唆された。さらに乾燥種子における糖分析の結果では、他の植物種での報告と同様に raffinose も蓄積されるがより多量な stachyose の蓄積が見られた。

## 1aI06

The DREB family of genes in Rice, *Oryza sativa*  
Joseph G. DUBOUZET<sup>1</sup>, Yoh SAKUMA<sup>1</sup>, Setsuko MIURA<sup>1</sup>, Emilyn G. DUBOUZET<sup>1</sup>, Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI<sup>1</sup> and Kazuo SHINOZAKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Japan Intl Res Cent Agric Sci (JIRCAS), Tsukuba 305-8686, <sup>2</sup>Inst Physic Chem Res (RIKEN), Tsukuba 305-0074

The DREB family of transcription factors bind specifically to a cis-acting element (DRE/CRT) in *A. thaliana*. They have been shown to play key roles in orchestrating the plant's response to stress factors such as cold, drought and salinity. Cloning of similar genes in rice may be a prerequisite for the development of superior transgenic cultivars that can withstand or thrive in adverse environments. Here we report the characteristics of the corresponding DREB homologues in rice, Os (*Oryza sativa*) DREB1A, 1B and OsDREB2 cDNA from rice.

OsDREB1A was isolated from cDNA libraries constructed from cold- and salt-stressed 3-week-old rice plants whereas OsDREB1B was obtained as an EST clone from the Rice Genome Project. Both genes show extensive similarity to *Arabidopsis* DREB1A (AtDREB1A), especially in a portion of their N-terminal regions and in their ERF/AP2 domains. OsDREB1A, like AtDREB1A, is upregulated in plants exposed to cold. OsDREB2 was obtained from a cDNA library constructed from drought-stressed, 3-week-old rice seedlings. The putative amino acid sequences of *Arabidopsis* DREB2A (AtDREB2A) and OsDREB2 also show extensive similarity especially in a portion of their N-terminal regions and in their ERF/AP2 domains. Similar to AtDREB2A, OsDREB2 is induced by drought and salinity but not by cold exposure. The extensive conservation of protein sequence and stress-response characteristics of these DREB proteins indicate their fundamental function in plant stress physiology. The OsDREB genes in this report may play an important role in the production of superior transgenic rice plants that are resistant to multiple stress environments.

## 1aI07

シロイヌナズナの完全長 cDNA マイクロアレイを用いた乾燥、低温ストレス応答性遺伝子および転写因子 DREB1A の Target 遺伝子の解析

関 原明<sup>1, 2</sup>, 鳴坂真理<sup>1</sup>, 安部洋<sup>3</sup>, 篠崎和子<sup>3</sup>, Piero Carninci<sup>4</sup>, 林崎良英<sup>4</sup>, 篠崎一雄<sup>1, 2</sup> (理研・植物分子生物, <sup>2</sup>理研・ゲノム科学総研セ・植物ゲノム, <sup>3</sup>農水省・国際農研・生物資源, <sup>4</sup>理研・ゲノム科学総研セ・遺伝子構造)

我々はこれまでに、乾燥や低温ストレス処理した植物体などより調製した mRNA 等を用いて計 9 種類のシロイヌナズナの完全長 cDNA ライブラリーを作製した。今回、単離した約 1300 種類の cDNA および RD, ERD 遺伝子を用いてシロイヌナズナの完全長 cDNA マイクロアレイを作製したので報告する。乾燥ストレス 2 時間および、低温ストレス 2 時間処理した植物体や CaMV35S プロモーターを用いて DREB1A cDNA を過剰発現させたトランスジェニックシロイヌナズナ植物体より調製したプローブを用いて解析を行った。その結果、これまでに報告されている、乾燥、低温ストレス誘導性遺伝子でかつ、DREB1A の Target 遺伝子である、RD29A, RD17, ERD10, kin1, kin2, cor15a 遺伝子などが乾燥、低温ストレス誘導性および DREB1A の Target 遺伝子として同定され、我々の cDNA マイクロアレイシステムが正しく動いていることが示された。また、コムギの putative cold acclimation protein のホモログ遺伝子などが新規な乾燥、低温ストレス誘導性および DREB1A の Target 遺伝子として同定された。

## 1aI08

アイスプラント PIP-アクアポリン遺伝子 *McMipA* プロモーターの組織特異性解析

山田茂裕, Hans J. Bohnert<sup>1</sup> (オリノバ, <sup>1</sup>Dept. of Biochem., Univ. Arizona)

多くの高等植物において、細胞膜局在型水チャンネル (PIP-アクアポリン) 遺伝子は複数存在し、それぞれ組織特性や環境応答性が異なっていることが報告されている。以前我々は、アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) 由来 PIP-アクアポリン遺伝子 *McMipB* のプロモーターの組織特異性について、GUS 融合遺伝子をタバコに導入して解析した。今回我々は、同じ植物由来の異なる PIP-アクアポリン遺伝子 *McMipA* のプロモーターについて同じ手法を用いて解析したので、その結果を報告する。

*McMipA* 遺伝子の翻訳開始点上流域約 2.2kb を GUS 遺伝子上流に配置してタバコに形質転換し、*McMipA* プロモーターの組織特異性を調査した。*McMipA* プロモーターは根の内鞘と柔細胞、茎では師部周辺と内鞘を取り巻く細胞で発現していた。緑葉では、葉肉細胞と小脈 (minor vein) で発現が見られたが、大脈 (major vein) 近傍では発現が見られなかった。未熟な花芽器官では組織全体に発現が見られたが、成熟するにつれて弱くなっていった。成熟した花芽器官では、柱頭先端と花粉で強い発現が見られた。根端および頂端分裂組織近傍では、発現は見られなかった。*McMipA* プロモーターの組織特異性は *McMipB* プロモーターとは異なる部分が多く、それぞれの遺伝子にコードされる PIP-アクアポリンの体内における役割は、異なるものであることが示唆された。

## 1aI09

通性 CAM 植物・アスパラントの葉で塩ストレスにより誘導される転写産物の EST 解析

是枝 晋<sup>1</sup>, Mary Ann CUSHMAN, 東江 栄<sup>2</sup>, Davina BUFFORD, Monica FREDRICKSON, Anamika RAY, Inna AKSELROD, Darcey LANDRITH, Lana STOUT, João MAROCO, and John C. CUSHMAN. (オクラホマ州立大・分子生物,<sup>1</sup> 埼玉大・理・分子生物,<sup>2</sup> 佐賀大・農・生物生産)

高濃度の塩による水ストレスで C<sub>3</sub> 型光合成から CAM (Crassulacean acid metabolism) 型光合成へと転換するアスパラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、分子生物学的な解析を行う上でいくつかの優れた特性を備えている。しかし、外コヤアビト・アビスなど他のワイルド植物に比べ、クローン化され分子生物学的に解析された遺伝子の数は限られている。そこで我々は、アスパラントの葉の cDNA ライブラリーからランダムに選択したクローンの部分塩基配列 (expressed sequence tag; EST) のテラヌース構築を開始した。

水を十分与えたアスパラントと、0.4 M NaCl を 30 時間または 48 時間与えたアスパラントから cDNA ライブラリーを作成後、約 7,000 個のクローンの部分塩基配列を 5' 側から決定した。これらのクローンは約 3,500 種類の mRNA に由来しており、そのうち約 2/3 は機能の解っているタンパク質と相同性を持っていた。水ストレス下では、CAM 関連のタンパク質やストレス応答、信号伝達に関与すると思われるタンパク質だけでなく、機能不明のタンパク質や新規タンパク質をコードする転写産物の割合も増加しており、ストレス応答に関与する新規遺伝子の発見につながる事が期待される。

## 1aI10

野生種と栽培種スイカでの光化学系 II 量子収率と活性酸素消去酵素活性の乾燥ストレス応答

○三宅親弘、横田明穂 (奈良先端大・バイオ)

光化学系 II の量子収率と活性酸素消去酵素活性の乾燥ストレス応答を野生種と栽培種スイカを用いて調べた。乾燥ストレスによる気孔閉鎖後、栽培種スイカ生葉の萎凋によるカーリングを野生種生葉は示さず、水ポテンシャルを維持し、その生葉を完全展開させていた。これは、栽培種スイカ以上に、野生種では光障害を被らないために、気孔閉鎖後の過剰な光エネルギー処理が必要であることを示唆する。乾燥ストレス後、両種スイカ生葉の葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) 活性は気孔が閉鎖すると共に増大し、野生種生葉では 1.3 倍、栽培種では 1.6 倍になった。また、乾燥ストレス後、両種スイカ生葉の定常状態光化学系 II 量子収率が低下した。乾燥ストレス後、葉緑体光化学系 I でのスーパーオキシド・ラジカル (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 生成速度を測定 (*Plant Cell Physiol.* (1999) s431) すると、両種スイカ生葉で、その速度は低下し、野生種スイカでは 1/3 へ、栽培種では 4/5 になった。この O<sub>2</sub><sup>-</sup> 生成速度低下は光化学系 II 量子収率の低下によるものであった。したがって、両種スイカ生葉では、乾燥ストレス後、O<sub>2</sub><sup>-</sup> の生成速度を低下させると共に、APX の活性を増大させる二重の酸化ストレス防御系が機能している。そして、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 生成抑制能は、生葉がカーリングしない野生種で大きかった。

## 1pI01

ホウレンソウと大腸菌のベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの基質特異性と安定性からみた構造比較  
松田信行、孟玉玲<sup>1</sup>、日比野隆<sup>2</sup>、原彰、船隈透、高倍昭洋<sup>1</sup> (名城大・農・農化、<sup>1</sup>名城大・総合研、<sup>2</sup>名城大・理工・化学)

植物や微生物には、塩ストレスや乾燥ストレスを受けると、適合溶質としてベタイン (グリシンベタイン) を蓄積するものがある。植物のベタイン合成は、コリンから、ベタインアルデヒドを経る 2 種類の反応により行われる。最近になって、ベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ (BADH) がベタインアルデヒド以外にポリアミンの代謝などいくつかの反応を触媒することが報告された。そこで我々は、ホウレンソウおよび大腸菌の本酵素を大腸菌で大量発現し、その基質特異性、安定性について検討した。また、ホウレンソウの BADH の一部を大腸菌の BADH と交換したハイブリッド BADH も作成した。ベタインアルデヒド、3-アミノプロピオンアルデヒド、4-アミノブチルアルデヒドを用いて基質特異性および酵素の安定性について検討した。これらの結果を、両酵素の構造に基づいて検討した結果について報告する。

## 1pI02

マンダローブのベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子

孟玉玲、松田信行<sup>1</sup>、日比野隆<sup>2</sup>、田中義人<sup>2</sup>、上原直子<sup>3</sup>、馬場繁幸<sup>3</sup>、川満芳信<sup>3</sup>、高倍鉄子<sup>4</sup>、和田敬四郎<sup>5</sup>、石井忠<sup>6</sup>、原彰<sup>1</sup>、高倍昭洋 (名城大・総合研、<sup>1</sup>名城大・農・農化、<sup>2</sup>名城大・理工・化学、<sup>3</sup>琉球大・農・熱帯、<sup>4</sup>名古屋大院・生命農・生物資源、<sup>5</sup>金沢大・理・生物、<sup>6</sup>森林総研・生物機能)

マンダローブは熱帯・亜熱帯の海岸や河口の一部、または、海水あるいは海水と淡水の混ざり合う汽水域に生える常緑の低木または高木の群落やそれを構成する植物の総称である。我々はマンダローブの環境ストレス応答機構の分子レベルの解明を目的とし、マンダローブの適合溶質の検索とその合成遺伝子の単離を行った。沖縄地方に生息する 4 種類のマンダローブの適合溶質を調べた結果、1 種類についてベタインの蓄積が認められた。そこで、このマンダローブの葉から cDNA ライブラリーを作成した。そして、ライブラリーからベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を単離した。この遺伝子の構造と発現について報告する。

### 1pI03

ベタイン合成の遺伝子工学 (I) : コリンオキシダーゼ遺伝子を発現する形質転換植物

林 秀則, Alia<sup>1</sup>, 坂本 敦<sup>1</sup>, 村田紀夫<sup>1</sup> (愛媛大・理・物質理, 1基生研)

塩ストレスを受けたとき、多くの植物は細胞内に適合溶質を蓄積し、塩による傷害を回避する。適合溶質の一つであるグリシンベタインは、塩ストレスに対する保護作用が特に強く、塩耐性植物の作出に適している。土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* のコリンオキシダーゼは一段階の反応でコリンからグリシンベタインを合成する。そこでこの酵素をシロイヌナズナで発現させて塩耐性植物の作出を試みた。

導入遺伝子に葉緑体へのシグナル配列を接続した結果、形質転換シロイヌナズナにおいて発現したコリンオキシダーゼは主に葉緑体に局在していた。生葉には約1  $\mu\text{mol/g}$  新鮮重量のグリシンベタインが蓄積し、野生株より高い塩ストレス耐性を示した。基質であるコリンの含量は野生株と変わらなかった。コリンオキシダーゼによる反応ではグリシンベタイン1 moleに対して2 moleの過酸化水素が発生する。しかし形質転換体における過酸化水素の含量は野生株とほぼ同じレベルであった。活性酸素消去系の酵素については、カタラーゼ、グルタチオン還元酵素、SODなどの活性は野生株とほぼ同じであったが、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は形質転換体において2~4倍高く、コリンオキシダーゼによって発生した過酸化水素によってこの酵素の発現が誘導されたものと思われる。

### 1pI04

ベタイン合成の遺伝子工学 (II) : 形質転換アラビドプシス種子の吸水及び発芽期におけるストレス耐性  
坂本 敦, ALIA, Cai-Xia HOU, 村田紀夫, 林 秀則<sup>1</sup> (基生研, 1愛媛大・理・物質理学)

コリンオキシダーゼ遺伝子を導入したアラビドプシスはその種子中にベタインを高度に蓄積する。形質転換アラビドプシスの種子発芽期における塩、低温、高温および浸透圧に対する耐性を評価した。形質転換植物由来の種子では、これらのストレス条件下で、野生型植物の種子と比較して発芽速度が上昇していた。種子吸水期における温度ストレスは、植物の初期発生を著しく阻害するので、この時期における低温および高温耐性を調べた。形質転換植物の種子は0°Cや55°Cといった極端な温度ストレス条件下で吸水させても、野生型植物の種子に対してはるかに優れた発芽率を有していた。このような様々なストレスに対する耐性の増強の程度は、種子に蓄積したベタイン量に正の相関を示した。以上の結果は、種子に蓄積したベタインがその吸水時ならびに発芽期において、複数の異なるストレスに対して耐性を増強したことを示している。

### 1pI05

GENETIC ENGINEERING OF BETAINE SYNTHESIS IN PLANTS (III): STRESS TOLERANCE OF YOUNG AND MATURE PLANTS  
Cai-Xia HOU, ALIA, Atsushi SAKAMOTO, Norio MURATA, Hidenori HAYASHI<sup>1</sup>  
Nat. Inst. Basic Biol., Okazaki 444-8585, <sup>1</sup>Dept. Chem., Fac. Sci. Ehime Univ., Matsuyama 790-8577

Transformation with the *codA* gene for choline oxidase significantly enhanced salt tolerance of young seedlings and mature plants. Under cold stress, young seedlings of transformed plants grew better with respect to length, fresh weight and dry weight. No significant chlorosis occurred in the transformed plants after cold treatment whereas wild-type plants displayed the visible injury. Transformed plants, but not wild-type plants, also survived freezing treatment. Seedlings of transformed plants showed better growth than wild-type seedlings during heat stress as well as during the recovery from heat shock. Finally, the transformation enhanced tolerance to drought stress at the reproductive stage.

Those results clearly showed that transformation with the *codA* gene for choline oxidase enabled *Arabidopsis* to tolerate various stresses during growth of young seedlings, and development of mature plants.

### 1pI06

ベタイン合成の遺伝子工学 (IV) : ストレス耐性の分子機構  
村田紀夫, ALIA, Cai-Xia HOU, 坂本 敦, 林 秀則<sup>1</sup> (基生研, 1愛媛大・理・物質理学)

私たちはコリンオキシダーゼ遺伝子によるアラビドプシスの形質転換が、ベタインを葉緑体で蓄積させるとともに、様々な生育段階において広範な環境ストレスへの耐性を増強することを示した。細胞レベルでは形質転換アラビドプシスの光合成機能が、塩や低温、凍結、強光条件下での光阻害に対して耐性を獲得していることを明らかにした。さらに強光ストレスに対する光合成機能の耐性増強におけるベタインの作用として、強光による光合成機能の損傷を緩和するのではなく、光損傷を受けた光化学系II複合体の回復を促進することを示した。これらの結果は、ストレスによる細胞機能の損傷の回復過程で必須な生化学的プロセスであるタンパク質の新規合成を、ベタインが促進することを示唆している。形質転換植物においてベタインの蓄積によってもたらされたストレス耐性増強の機構を分子レベルで議論する。

## 1pI07

### FLUORESCENT DIFFERENTIAL DISPLAY -A TECHNICAL DEVELOPMENT-

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

Differential display<sup>1</sup> (DD) is a potentially powerful tool for large scale screening of differentially expressed genes and has the advantages of comparing multiple samples and detecting low abundant mRNAs. However, DD has suffered from the low reproducibility of fingerprints or the high frequency of false positive clones. These problems were solved by fluorescent differential display<sup>2</sup> (FDD), using fluorescent labeled anchor primers and automated DNA sequencer, and high throughput and operational safety were accomplished.

We modified the original FDD protocol<sup>2</sup> to identify candidate genes more effectively. Forty-five samples can be analyzed at once and more than hundred bands up to 800 bp in length can be displayed within 3.5 hr. In case of *Arabidopsis*, about 60 combinations of primers should be sufficient for detection of the majority of expressed mRNA species with 95% probability. Therefore, genome-wide screening in *Arabidopsis* was achieved within a month using our FDD system. We also have improved the procedure to distinguish a true positive fragment among cDNAs extracted from single displayed-band using SSCP or RFLP. Consequently, we have established a large-scale screening and efficient procedure for isolation of target genes<sup>3,4</sup>. However, the running cost of FDD is very high, and we need a long time for the characterization and function analysis of target genes.

1. Liang P, Pardee AB (1992) *Science* 257: 967 2. Ito et al. (1994) *FEBS Lett* 351:231  
3. Uchida et al. (1998) *Plant J.* 15:813 4. Kuno et al. (2000) *Plant Physiol.* in press.

## 1pI08

### ROLES OF EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE GENE ENCODING A NOVEL MYB-RELATED PROTEIN IN ARABIDOPSIS

Norihito KUNO<sup>1</sup>, Tomoko SHINOMURA<sup>1</sup>, Simon Geir MØLLER<sup>2</sup>, Nam-Hai CHUA<sup>2</sup> and Masaki FURUYA<sup>1</sup>; <sup>1</sup>Hitachi Advanced Research Laboratory, Saitama 350-0395, JAPAN, <sup>2</sup>The Rockefeller Univ., New York, NY 10021, USA

We have isolated and characterized early-phytochrome-responsive genes from *Arabidopsis thaliana* using a fluorescent differential display technique<sup>1</sup>. Wild-type six-day-old etiolated seedlings were irradiated with red light (1 mmol m<sup>-2</sup>). mRNA fingerprints were compared from samples prepared 0, 30 and 60 min after light treatment. Five differentially expressed cDNA bands were identified from approximately 20,000 displayed bands. Sequence analysis revealed that two of the isolated cDNAs, which represent one mRNA species, showed high similarity (70%) to a Myb DNA-binding domain of *Arabidopsis* Circadian-Clock Associated 1 (*CCA1*) gene<sup>2</sup>. Subsequent RT-PCR analysis demonstrated that both PhyA and PhyB induced the expression of this *myb*-related gene. To probe the functionality of the isolated gene product, we transformed *Arabidopsis* with an antisense construct harboring the isolated cDNA fragment. Physiological and molecular phenotypes of the antisense transgenic plants indicate a function for this *myb*-related gene in the phytochrome-signal transduction pathway.

<sup>1</sup>Kuno et al. (2000) *Plant Physiol.* 122(1), in press.

<sup>2</sup>Wang et al. (1997) *Plant Cell* 9: 491-507

## 1pI09

### FLUORESCENT DIFFERENTIAL DISPLAY AS A TOOL FOR THE ISOLATION OF EARLY UV- B LIGHT INDUCED GENES

Linda LOYALL, Alexander BAUMANN, Kenko UCHIDA<sup>1</sup>, Masaki FURUYA<sup>1</sup> and Hanns FROHNMEYER

Biologisches Institut II, Albert-Ludwigs-Universitaet, D-79104 Freiburg, Germany; <sup>1</sup>Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395

In parsley cell cultures UV-B irradiation leads to the generation of protective flavonoids. Chalcone synthase (CHS) is the key enzyme of this pathway and is transcriptionally stimulated 4 to 6 h after UV-light irradiation. As this stimulation is inhibited by cycloheximide the involvement of UV-light induced early gene products in the signal transduction to the CHS-promoter is evident. To isolate such candidates fluorescent differential display technique was used for a large scale screening. We detected several candidates, which are expressed within the first two hours after light stimulation. Of these, a novel glutathione S-transferase (PcGST1) shows all features of an early gene and precedes the expression of CHS. Our data indicate that PcGST1 and its substrate glutathione are involved in the UV signal transduction pathway in plants.

## 1pI10

### AUXIN-DEPENDENT REGULATION OF AN AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) FROM RICE

Frank WALLER, Masaki FURUYA<sup>1</sup>, Peter NICK, Institut für Biologie II, Freiburg University, D-79104 Freiburg, Germany, <sup>1</sup>Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395

During plant development, auxin is playing a central role in regulating growth and differentiation. In *Arabidopsis thaliana*, auxin response factors (ARFs) bind specifically to promoter elements of primary auxin response (*Aux/IAA*) genes<sup>a</sup>. Mutations in ARFs, e.g. *MONOPTEROS*, show severe developmental phenotypes. Little is known about a possible regulation of these transcriptional regulators of auxin action. In a fluorescence differential display experiment<sup>b</sup> with rice coleoptiles several auxin-induced cDNAs were isolated. Having high homology to an ARF that represses transcription, one candidate, *OsARF1*, was characterized. *OsARF1* mRNA is upregulated fast by auxin. Internal shifts of auxin-triggered elongation correlate with differential expression of *OsARF1* mRNA. Thus, *OsARF1* mRNA expression might reflect a possible adaptation mechanism of auxin controlled responses.

<sup>a</sup>T. Ulmasov et al (1997) *Science* 276:1865-1868.

<sup>b</sup>K. Uchida et al (1998) *The Plant J.* 15:813-819.

## 1pI11

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TWO PUTATIVE HELIX-LOOP-HELIX PROTEINS THAT ARE INDUCED BY BRASSINOSTEROIDS

Danielle FRIEDRICHSEN, Takamichi MURAMATSU<sup>1</sup>, Masaki FURUYA<sup>1</sup>, Joanne CHORY, The Salk Institute, San Diego, CA 92186-5800, U.S.A.,<sup>1</sup>Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395

Brassinosteroids (BRs) are important growth regulators throughout *Arabidopsis* development, and exhibit multiple effects when applied exogenously. Promotion of growth by BRs requires *de novo* RNA and protein synthesis. Although BRI1, a leucine-rich-repeat receptor kinase, is the putative brassinolide receptor, no other components of the BR signaling are known. Using fluorescence differential display (FDD) by comparing mRNA fingerprints between *det2* and *brl* mutants, we have identified a few differentially expressed transcripts in response to brassinolide treatment. One transcript, B1, was found in the FDD screen and another, B2, was identified by its DNA sequence similarity to B1. Both encode putative helix-loop-helix proteins and are up-regulated by brassinolide. This induction requires functional BRI1 and does not require new protein synthesis. Luciferase reporter fusions with the promoters of these genes confirm transcriptional regulation of these promoters by brassinolide and deletion analysis is underway to identify the BR response element. Recently, knockout mutants for both genes have been isolated which may have an altered response to brassinolide.

## 1pI12

### FLUORESCENT DIFFERENTIAL DISPLAY AS A TOOL TO DISSECT FLOWER DEVELOPMENT

Charles P. SCUTT, Masaki FURUYA<sup>1</sup> and Philip M. GILMARTIN

Centre for Plant Sciences, Leeds Institute for Plant Biotech. & Agriculture, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK, <sup>1</sup>Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395

We are studying sex chromosomes mediate flower development in dioecious white campion (*Silene latifolia*). Male plants possess X and Y sex chromosomes; females contain two X-chromosomes. The Y-chromosome moulds floral developmental fate. Female flower fails to develop stamens indicating that the Y-chromosome is essential for stamen organogenesis. The Y-chromosome also directs the arrest of carpel development in male flowers. FDD represents an ideal tool for identification of genes involved in the control of reproductive organ arrest and development. We have used this technique to identify a number of male specific cDNA clones, the majority of which represent autosomal genes that are unregulated in response to the Y-chromosome. However, two of these male specific cDNAs hybridize to Y-chromosome DNA. The characterization of these sequences will be discussed.

## 1pI13

### Fluorescent Differential Display (FDD) Identifies Circadian Clock Regulated Genes in *Arabidopsis*.

Steve A. Kay, Joel A. Kreps, Takamichi Muramatsu and Masaki Furuya, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA and Hitachi Adv. Res. Lab, Saitama 350-0395.

Most organisms express rhythms in biological activities with a 24-hour periodicity, and they are called circadian rhythms if they persist in constant environmental conditions. Circadian rhythms in gene expression were first observed in plants over 13 years ago but the underlying mechanism controlling rhythmic gene-expression is still not understood. The isolation of novel circadian clock-controlled genes (ccgs) is likely to provide new tools for studying circadian rhythms. Fluorescent differential display (FDD) was used to screen *Arabidopsis thaliana* mRNAs for cycling transcripts. 70 PCR primer pairs were screened and 17 different cycling bands were observed out of an estimated 10 500 bands screened. The identities of 10 bands were determined and the rhythmic gene expression was confirmed using northern blot analysis. The 10 cycling bands represent 7 different genes, 6 of which are present in the databases, and 1 that does not match anything in current databases. The rhythmic expression of the 7 genes comprises 4 distinct phases of clock-regulation. The results demonstrate that FDD can be used to isolate ccgs. The genes identified in this screen range from known *A. thaliana* ccgs, as well as genes shown to be clock-controlled in other plant species, to a novel gene that may encode a pioneer protein. Further study of these ccgs is likely to increase our understanding of circadian regulated gene expression.

## 2aI01

トウモロコシ葉緑体局在性リンゴ酸輸送体の分化  
谷口光隆, 杉山達夫 (名古屋大院・生命農学)

トウモロコシに代表されるNADP-マリックエンザイム型C<sub>4</sub>植物では、葉肉細胞で一次固定されたCO<sub>2</sub>はリンゴ酸のかたちで葉肉細胞葉緑体から維管束鞘細胞葉緑体へと運ばれ、脱炭酸反応を受ける。今までの生化学的研究から、両葉緑体でのリンゴ酸輸送は特性の異なる輸送体を介して行われていると考えられている。我々はこれらのリンゴ酸輸送体のcDNAクローニングを試みた結果、候補となる2種のcDNAクローンを単離することができた。両遺伝子のmRNAは、葉肉細胞あるいは維管束鞘細胞で特異的に蓄積しており、光誘導的な発現制御を受けていた。また、両cDNAがコードするポリペプチド間での相同性は76%であり、葉緑体局在性2-オキソグルタル酸/リンゴ酸輸送体とは45%程の相同性しかみられないことから、2-オキソグルタル酸/リンゴ酸輸送体とは異なる膜タンパク質であることが予想された。現在、これらの膜タンパク質を大腸菌及び酵母で大量発現させ、再構成系を用いた輸送機能特性の解析を行っており、両膜タンパク質の機能に分化があるかどうかを検討している。

## 2aI02

光に制御される新規原核型低分子量 GTP 結合蛋白質 *OsERA* 遺伝子の構造と機能  
今井亮三, 増田ゆかり, 米山 昌 (農水省・北農試・越冬ストレス)

大腸菌 ERA (*E. coli ras-like*)蛋白質は原核生物における低分子量 GTP 結合蛋白質であり, 機能不明であるが, 生育に必須である。今回我々はイネより ERA-family 蛋白質と高い相同性を有する *OsERA* 遺伝子を単離し, その特異な構造と発現特性を解析した。*OsERA* 遺伝子はイネゲノム中の 3kb の領域に9個のエクソンとして存在し, 1.8kb 全長 cDNA は 507 アミノ酸からなる分子量 57kD の蛋白質をコードしていた。*OsERA* タンパク質の N 末端側約 200 残基はデータベース中の既知の蛋白質配列と全く相同性を示さなかったが, C 末端側約 300 残基は原核生物の ERA 蛋白質群 (約 300 残基) と全体にわたって相同性を示した。また, アラビドプシスより *OsERA* 相当遺伝子 (*AtERA*) を単離し構造決定した。C 末端側 300 残基における *OsERA* と *AtERA* の同一性は 73% であったが, N 末端側の配列の同一性は低かった (25%)。以上の構造比較から, *OsERA* において機能上重要な領域は C 末端側約 300 残基と推定された。*OsERA* の発現は幼苗の根組織で極めて低く, 茎葉部で高く, 脱黄化の過程でも強く誘導された。また, 出芽酵母ゲノム中には相同な配列がないことなどから, *OsERA* はオルガネラ特に葉緑体で機能する GTP 結合タンパク質の可能性も考えられる。

## 2aI03

植物特有の Dof ドメイン型 DNA 結合タンパク質の結合様式  
山本理恵, 石塚朋子, 江坂宗春 (広島大・生物生産)

カボチャのアスコルビン酸化酵素遺伝子の 5' 上流域に結合するタンパク質 (AOBP) の cDNA がクローニングされ, その一次構造が明らかにされた。AOBP の N 末端側 52 アミノ酸領域は植物の種々の DNA 結合タンパク質でも見つかっており, Dof ドメインと呼ばれている。Dof ドメインは, 動物の転写因子である GATA-1 やステロイドホルモンレセプターの zinc finger 型 DNA 結合ドメインと類似しており, 4 つの Cys 残基が Zn と配位している。しかし, Dof ドメインはこれらの zinc finger と異なり, より長いループ構造を持ち, その内部に第 5 の Cys 残基を保持している。また, 一般にこれまでの zinc finger は, タンパク質あたり複数個認められているが, Dof ドメインはタンパク質あたり 1 つしか存在しない。このように Dof ドメインは植物にのみ認められるユニークな zinc finger である。そこで, これらの Dof ドメインの特徴が DNA との結合性にどのように関係しているかを検討するため, 長いループ構造を欠失させた変異 AOBP や, Cys 残基の数を増減させた変異 AOBP を大腸菌により発現させ, サウスウエスタンやゲルシフトアッセイで DNA 結合活性を調べた。また AOBP-GFP キメラタンパク質をタバコ BY-2 に導入し, GFP の蛍光を観察することで AOBP の細胞内局在性, 特に核に局在するかどうかについて検討した。

## 2aI04

マメプロテアーゼインヒビター遺伝子のプロモーターに結合する新規ホメオドメインタンパク質 cDNA の単離と機能解析  
枝 礼子, 森永裕香子, 嶋村幸一郎, 坂田洋一, 田中重雄, 武長 宏 (東京農大・応用生物)

熱帯産マメ科植物であるシカクマメは, 多量の Kunitz 型キモトリプシンインヒビター (WCI) を種子および塊根に, また少量の WCI を茎に蓄積する。演者らは, WCI 遺伝子の器官特異的な転写制御機構の解明を目的として, WCI 遺伝子の転写開始点上流約 1.0 kbp のプロモーター領域に結合するタンパク質の探索を行った。その結果, 酵母 One-Hybrid システムにより, 4 種類のタンパク質 cDNA を得た。これらの cDNA がコードするタンパク質はその N 末端側にシステインおよびヒスチジンに富む領域, C 末端側にホメオドメインを有しており, 新規タンパク質と考えられたため, これらを WBHD2 (winged bean homeodomain protein 2) a,b,c,d と命名した。WBHD2 は既知の植物ホメオドメインタンパク質との相同性は低かったが, アラビドプシスおよびイネのゲノム中に相同性の高い配列が存在することから, 種を越えて保存されている重要な因子であると考えられる。ノザンプロット解析により, WBHD2 遺伝子群はいずれもシカクマメの種子および花芽で強く発現しているが, その発現パターンは種子の成熟段階で異なっていることが分かった。大腸菌を用いて発現させた WBHD2a タンパク質を用いてゲルシフト解析を行ったところ, WCI 遺伝子プロモーターの複数位置に結合することが示された。

## 2aI05

赤タマネギからの Alliinase 遺伝子プロモーター領域の単離と機能解析  
上西愛子, 山口由貴子, 野村研, 大矢武志, 北宜裕 (神奈川農総研, 神奈川大学・理)

アリイナーゼはタマネギ鱗茎に含まれるアリインを加水分解して特有の揮発性辛味成分であるアリシンを生成させる。演者らは, これまでに本県育成の赤タマネギ品種 '早生湘南レッド' から RT-PCR によりその cDNA を単離するとともに, ゲノム DNA から対応する構造遺伝子断片を検出する系を確立した。アリイナーゼはタマネギ鱗茎に含まれる可溶性タンパク質の 6% 以上を占めることから, その発現調節領域を解析するため, Inverse PCR によりゲノム DNA からアリイナーゼ構造遺伝子の 5' 上流領域の単離を試みた。その結果, 開始コドン上流に TATA Box 様配列を有する 1.4 kbp の DNA 断片が得られた。さらに, パーティクルガンによる赤タマネギ鱗茎裏面組織を用いた GUS assay により, GUS の一過性発現が認められた。講演では, 本領域の機能解析結果についても併せて報告する。

## 2aI06

ABAを介した乾燥応答性遺伝子発現に関与するシロイヌナズナのbZIP型転写因子AREBの解析

降旗 敬<sup>1</sup>, 宇野 雄一<sup>1,2</sup>, 安部 洋<sup>1</sup>, モハマド M. パルベーズ<sup>1</sup>, 吉田 理一郎<sup>3</sup>, 篠崎 和子<sup>1</sup>, 篠崎 一雄<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>農水省・国際農研・生物資源, <sup>2</sup>神戸大・農・植物資源, <sup>3</sup>理研・植物分子)

シロイヌナズナの*rd29B*遺伝子は、乾燥およびアブシジン酸(ABA)により発現が誘導される。また、ABA変異体である*aba1*や*abi1*では、乾燥による発現誘導が抑えられるため、*rd29B*遺伝子の乾燥応答による発現は、主としてABAを介して制御されていると考えられる。我々は*rd29B*遺伝子のプロモーター解析から2個のABRE(ABA Responsive Element)が乾燥誘導に関与するシス因子であることを明らかにし、酵母のone-hybrid系を用いてこのABREに特異的に結合する新規のbZIP型転写因子・AREB (ABA Responsive Element Binding Protein) 1~3をコードするcDNAを単離した。ノーザン解析の結果、AREB1およびAREB2のmRNAは、乾燥、NaClまたはABAに反応して増加した。葉肉細胞プロトプラストを用いてAREB1と2はABREを介した転写活性化因子であることが明らかになった。さらにこの転写の活性化はABAの添加によって付加的に増加した。また、ABA欠損変異体である*aba2*のプロトプラストにおいてはABA非存在下では転写の活性化が認められなかったことから、AREBの活性化にはABAに反応したリン酸化など翻訳後の修飾が関与していると考えられた。そこで、AREBタンパク質の保存領域を基質として活性ゲル内リン酸化実験を行ったところ、T87培養細胞から抽出したタンパク質中にABA処理に依存してAREBタンパク質をリン酸化するkinase活性が存在した。

## 2aI07

タバコcysteine protease遺伝子 (NTCP-23)の発現解析

上田 忠正、瀬尾 茂美、大橋 祐子、橋本 純治  
(農水省・生物研/JST・CREST)

植物のcysteine protease (CP)はプログラム細胞死の過程において、また様々な環境ストレスに反応して発現が誘導されることが知られている。我々はCPの細胞内での機能を明らかにする目的でタバコから単離したNTCP-23遺伝子の発現解析を行った。NTCP-23遺伝子は調べた全ての組織で発現しており、特に老化葉で高い発現量を示した。しかし老化誘導植物ホルモン処理や長時間の暗黒では発現の増加は見られなかった。これらのことからNTCP-23は細胞内のタンパク質・アミノ酸の代謝回転また転流などにおいて主な機能があると考えられ、その発現の上昇は老化に関与する発生・分化の制御を受けていると考えられる。また遺伝子発現の日変化をみたところ概日性リズムを示した。さらにNTCP-23 mRNA量は傷などにより一時的に減少した。おそらく植物の細胞内でのアミノ酸の再利用に関わるタンパク分解は概日性リズムに従い、このリズムは傷などの厳しいストレス下では一過的に抑えられるのではないかと考えられる。

## 2aI08

ケツルアズキ芽ばえ子葉でのプロテイナーゼ活性発現とジベレリン

種山正登志, 南川隆雄, 山根久和<sup>1</sup> (東京都立大院・理・生物科学, <sup>1</sup>東京大・生物工学センター)

ケツルアズキを暗所で発芽させると、子葉の種子貯蔵タンパク質の分解にかかわるプロテイナーゼが活性を現し、3-4日目にピークに達して、その後低下する。胚軸を切除した子葉のみをインキュベートすると、その活性発現は著しく抑えられる。しかし、切除した子葉に10-100  $\mu$ M GA<sub>3</sub> を与えるとプロテイナーゼ活性発現に明らかに効果がみられ、またウニコナゾール-Pを与えると発芽子葉・切除子葉ともに発現は強く阻害される。これらの結果およびその他の観察から、胚軸で合成されるジベレリンが子葉でのプロテイナーゼ活性発現に関与している可能性が示唆された。そこで、発芽3日目の胚軸から酢酸エチル可溶性画分を調製し、これをさらにODS-HPLCおよびN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-HPLCによって分画した。半矮性イネ(短銀坊主)を用いた点滴法により、得られた画分のジベレリン検定を行った結果、5-6の活性画分を得た。現在、GC/MS法により、これらの画分に含まれるジベレリンの同定を試みている。

## 2aI09

イネプロテイナーゼ遺伝子 *Rep1* の発現には新規のジベレリン応答配列が関与する

須藤慶太、加藤英樹、南川隆雄 (東京都立大院・理・生物)

イネ REP-1 は、発芽種子において貯蔵タンパク質分解に主要な働きを担うシステインエンドペプチダーゼであり、その発現はジベレリンによって転写レベルで制御されている。また、REP-1 遺伝子 (*Rep1*) 上流域にはイネ科植物の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子によく保存されているジベレリン応答配列 (TAACAAA) に比較的よく似た GAACAAA 配列が -200 bp 付近に存在する。そこでこの配列が *Rep1* のジベレリン応答にかかわっているかどうかを、Deletion assay 法により明らかにしようとした。

さまざまな長さに欠失させた *Rep1* プロモーター領域と GUS 遺伝子を結合した融合遺伝子を作製し、これらをパーティクルガン法を用いてイネ種子胚盤上皮由来のカルスに導入した。その結果、GAACAAA 配列を含まない -500 から -432 bp の領域に少なくとも1つのジベレリン応答配列が含まれることが示唆された。さらに GAACAAA 配列に突然変異を導入しても、*Rep1* 発現のジベレリン応答性には影響を及ぼさなかった。以上の結果は、*Rep1* の -500 から -432 bp の領域には新規のジベレリン応答配列が存在することを示している。現在、linker-scan mutation 法によって、この領域に存在するシスエレメントの同定を行っている。

## 2aI10

イネアスパラギニルエンドペプチダーゼ REP-2 遺伝子のクローニング

加藤英樹, 須藤慶太, 南川隆雄 (東京都立大院・理・生物科学)

発芽期のイネ種子中には主要な2種のシステインエンドペプチダーゼ REP-1 及び REP-2 が存在する。REP-1 は種子貯蔵タンパク質(グルテリン)分解に主要な役割を果たし、また REP-2 は基質となるペプチド中の Asn 残基のカルボキシル基側を特異的に切断するアスパラギニルエンドペプチダーゼである。REP-2 mRNA 量は種子登熟後期及び発芽初期に増加することから、貯蔵タンパク質及び REP-1 のプロセッシングに関与することが示唆されている。今回 REP-2 の発現機構を明らかにするために、REP-2 遺伝子のクローニングを行った。サザンハイブリダイゼーションにより、REP-2 遺伝子はイネゲノム中に数コピー存在すると推定された。これまでにイネゲノムライブラリーから7個の陽性クローンを得ており、現在これらの構造を解析中である。

## 2aI11

アラビドプシス、フルクトース-6-リン酸、2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ cDNA の単離と解析

古本強, 河津維, 寺本真紀, 伊藤正樹, 渡邊昭 (東大院・理・生物科学)

フルクトース-2,6-ビスリン酸(F2,6BP)は、真核生物中に広く一般的に存在する糖リン酸であり、生体内では糖代謝の中間産物としてではなく糖代謝酵素の活性を調節することで代謝の流れを制御する働きを担っている。F2,6BP の合成と分解はフルクトース-6-リン酸、2-キナーゼとフルクトース-2,6-ビスリン酸ホスファターゼにより触媒され、この反応はこれらの酵素がひとつのポリペプチド内に含まれる二反応触媒性の酵素が司っている。植物では、葉肉細胞内において糖の合成と分解が日周的に変動していることから、F2,6BP による糖代謝の制御もより複雑化していることが考えられる。

我々は、暗所下におかれたシロイヌナズナの葉において特異的に発現している遺伝子の解析を行う過程で、ヒトより単離された同遺伝子と高い相同性を示す cDNA 断片を単離した。今回、これをプローブに完全長 cDNA を単離し、さらにこの組換え体酵素が両酵素活性を示すことを確認した。現在、遺伝子発現の挙動とウエスタンブロットによるタンパク量の挙動を調査中であり、これらの結果もあわせて報告する。

## 2aI12

シロイヌナズナのマンノース-6-リン酸イソメラーゼ cDNA の単離と解析

中川由香, 藤木友紀, 伊藤正樹, 古本強, 渡邊昭 (東大院・理・生物科学)

マンノース-6-リン酸イソメラーゼ(PMI)はマンノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸の異性化反応を可逆的に触媒する酵素である。しかし、植物からはほとんど PMI 活性の報告が無く、シロイヌナズナではマンノースを呼吸基質として利用できないので、マンノースを投与すると発芽が阻害される。

われわれは、暗処理によって発現が誘導されるシロイヌナズナの *din* 遺伝子群の中にヒトや酵母の PMI と相同性を示す *din9* 遺伝子断片を見出した。今回、*din9* の完全長 cDNA を単離し、これを組換え体タンパク質として大腸菌で発現させ、大腸菌可溶性画分に PMI 活性を検出することに成功した。この結果は *din9* が PMI をコードすることを示している。また、*din9* が暗処理によって発現誘導されることから、シロイヌナズナでは通常は不活化しているマンノース代謝が、光合成を行えない暗黒などの環境下では活性化することを示唆している。

## 2aI13

カラシナからのカドミウム耐性遺伝子のクローニング

宮元大輔, 水野幸一, 藤村達人 (筑波大・農工系)

近年、重金属汚染土壌の修復に植物を利用した phytoremediation が注目されている。今回、様々な重金属を高濃度に蓄積することが知られているカラシナを材料として、カドミウム(Cd)無毒化機構に関与する遺伝子の単離を試みた。

Cd 処理した植物体の地上部より mRNA を調製し、酵母発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製した。これらの cDNA を含む酵母の中から Cd 制限濃度でも生育できる形質転換体をスクリーニングし、最終的に 19 個の Cd 耐性をもつ形質転換体を得た。これらのクローンに含まれる cDNA は、それぞれアラビドプシスの Phytochelatin synthase (PCS1) とアミノ酸配列で約 95% の、Metallothionein type 3 (MT3) と約 90% の、動原体タンパク質である SKP1 と 86~91% の相同性を示した。つぎに、出芽酵母の Cd 耐性を高めるのに単離した遺伝子がどの程度影響を与えているか検討した。カラシナ MT3 をもつ酵母は Cd 耐性能が 2 倍程度高かった。しかしノーザン解析からカラシナ MT3 は Cd ストレスの有無にかかわらず地上部でよく発現していることから、重金属の無毒化だけでなく重金属のホメオスタシスにも関与していることが考えられた。一方、カラシナ PCS1 を発現させた場合は Cd 耐性能が 6 倍以上増すことがわかった。カラシナ SKP1 を発現させた場合、1.5 から 2 倍とアイソフォーム間で酵母の Cd 耐性を高める能力にわずかながら違いがあることが明らかとなった。

## 2pI01

メチオニン添加に応答したCystathionine  $\gamma$ -synthase mRNAの安定性の自己制御

千葉由佳子、木嶋文子、石川真理、内藤 哲 (北大・院農・応用生命科学)

植物におけるメチオニン生合成制御機構の分子メカニズムを解明するために、遊離メチオニンを過剰に蓄積する*mtol*突然変異株の解析を行った。*mtol*変異株ではcystathionine  $\gamma$ -synthase (CGS)のmRNA量が野生型株より多くなっている。また、野生型株ではメチオニン添加によってCGS mRNAの量が低下する。このCGS mRNAの蓄積の低下はCGS mRNAの分解が促進されることによるものであることがわかった。これらの結果は、CGS遺伝子がメチオニン添加に応答した転写後調節機構を持つことを示している。一過的発現系を用いた解析から、この転写後調節にはCGS第1エキソンのポリペプチドが重要であること、および第1エキソンは自身のmRNAに対してのみ働くことが示された。そこで、CGS遺伝子のメチオニン添加に応答した発現制御機構のモデルを提唱する。CGS第1エキソンのポリペプチドがメチオニンあるいはその代謝産物からのシグナルを直接あるいは間接的に受けて、自身のmRNAを分解すると考えている。

## 2pI02

アラビドプシスtRNA<sup>Met</sup>(CUA)アンバー・サブプレッサー活性のイントロンに依存した増大  
赤間 一仁, Volker Junker<sup>1</sup>, Hildburg Beier<sup>1</sup> (島根大・生物科学, <sup>1</sup>Inst. fuer Biochemie, Wuerzburg Univ., Wuerzburg, Germany)

真核生物の核tRNA<sup>Tyr</sup>遺伝子は普遍的にイントロンを含んでいる。イントロンを欠如したtRNA<sup>Tyr</sup>遺伝子の発現解析から、イントロンはそのアンチコドンGU<sub>35</sub>Aの修飾(U $\rightarrow$  $\Psi$ )に必須であることが明らかにされている。

植物では、核tRNA<sup>Met</sup>遺伝子もまたイントロンにより分断されている。植物tRNA<sup>Met</sup>イントロンの機能を探るために、野生型遺伝子とイントロンを除いた、欠失遺伝子をサブプレッサー型にそれぞれ改変し、植物細胞内でのアンバー・コドンの抑制効率から、これらの機能発現を比較した。その結果、野生型遺伝子由来のものでは、イントロンを除いたものに比べて、有意に高いアンバー・サブプレッサー活性が観察された。両者の*in vitro*転写産物を小麦胚芽の核抽出液中で反応させて、修飾ヌクレオチドを調べたところ、アンチコドン(C<sub>34</sub>U<sub>35</sub>A<sub>36</sub>)の修飾(U $\rightarrow$  $\Psi$ )がイントロンを含むもので検出された。この結果から、植物の $\Psi$ <sub>35</sub>合成酵素はtRNA<sup>Tyr</sup>前駆体だけでなく、イントロンを含むtRNA<sup>Met</sup>分子も同様に認識できることが判明した。

## 2pI03

葉緑体リボヌクレオプロテインのリン酸化とRNA結合能

中村崇裕<sup>1</sup>、杉田護<sup>1,2</sup>、杉浦昌弘<sup>1</sup> (1名大・遺伝子実験施設、<sup>2</sup>名大・人間情報)

タバコの核コード葉緑体リボヌクレオプロテイン(cpRNP)は2個のRNA結合ドメインとN末端に酸性ドメインを持つタンパク質で5種類の分子種(cp28~cp33)が存在する。これまでcpRNPがストロマ中の非リボソーム画分にRNAと複合体を形成し、その複合体中に非翻訳状態の*psbA* mRNAの大部分が含まれることを報告してきた。本研究で、いくつかのcpRNP、特にcp31が非常によくリン酸化されること、リン酸化によってcp31のRNA結合能を調節されることが*in organello*および*in vitro*の実験で明らかになった。さらに、cp31のリン酸化は光照射によって誘導された。また、翻訳過程においてcp31が阻害的に働くことが明らかになった。以上の結果からcpRNPのリン酸化によるRNA結合能の制御とともに、葉緑体での光依存的な翻訳の活性化におけるcp31の寄与が示唆された。

## 2pI04

ラン藻*Synechococcus* sp.における*rbcS* mRNAの翻訳メカニズムの解析  
陸田径典<sup>1</sup>、杉田護<sup>1,2</sup>、杉浦昌弘<sup>1</sup> (1名大・遺伝子、<sup>2</sup>名大・人間情報)

*rbcS*遺伝子はRuBisCOの小サブユニットをコードし、真核の光合成生物では核ゲノムに局在する。また大サブユニットをコードする*rbcL*遺伝子は葉緑体ゲノムにあるが、それぞれの遺伝子発現はこれらの相互制御によりRuBisCO生成の調和を保っていると考えられている。一方ラン藻の*rbcS*、*rbcL*の発現はモノシストロニックな転写産物に由来し、転写後の複雑な制御機構は存在しないと考えられていた。

本研究では我々が独自に開発したラン藻の*in vitro*翻訳系を用い*rbcS* mRNAの翻訳メカニズムの解析を行った。その結果、*rbcS* mRNAの5'非翻訳領域には翻訳エンハンサーエレメントが存在し、ここにリボソームタンパク質S1が関与することを強く示唆する結果を得た。

## 2pI05

*In vitro* 分子進化を用いた植物翻訳制御因子の解析  
長尾一生<sup>1</sup>、小保方潤一<sup>2</sup> (北大・地球環境<sup>1</sup>、名古屋大・遺伝子<sup>2</sup>)

mRNAの非翻訳領域(UTR)の配列は様々な分子機構で翻訳開始頻度に影響をあたえていると考えられている。しかし、これまでUTRと翻訳開始頻度との関係が実際に解析された例はほんの少数であり、多くの遺伝子については未解明である。従って、これらの領域にはまだ明らかになっていない多くの翻訳制御配列とそれらを介した制御機構が存在している筈である。本研究では、個々の遺伝子のUTRを一つずつ解析してゆくかわりに、モデル遺伝子の*in vitro* 分子進化系を使って、所与の翻訳系の中で機能するUTR制御配列群を組織的に単離し、解析する手法を考案した。まず、5'UTRや3'UTR中にランダム配列を挿入したmRNAを調製し、小麦胚芽無細胞系で翻訳反応を行い、翻訳開始頻度の違いをもとに分離、濃縮した。その結果、ランダム配列を含んだmRNAの初期集団から高頻度翻訳群と低頻度翻訳群を分離することに成功した。

## 2pI06

タバコ光化学系I遺伝子*psaDb*の翻訳効率に影響を及ぼすシス領域の解析  
宮本徹也、長尾一生<sup>1</sup>、小保方潤一 (名大・遺伝子、<sup>1</sup>北大・地球環境)

真核生物のmRNAの翻訳効率は、5'非翻訳領域と翻訳開始コドン周辺の配列に大きく影響される。タバコの核コード遺伝子*psaDb*の5'非翻訳領域は23塩基と非常に短い。翻訳効率を上昇させる配列を含むことがわかっている。また翻訳開始に使われていると思われるAUGコドンが2つ存在している。本研究では様々な*psaDb*-GUS融合遺伝子をparticle bombardment法によりタバコに導入し、そのGUS活性を測定することによりこれらの配列が翻訳に与える影響を調べた。その結果、*psaDb*では主に2番目のAUGコドンが翻訳開始に使われていること、5'非翻訳領域の効果はその周辺の配列により著しく異なることが示された。

## 2pI07

トランジェントアッセイシステムを用いたタバコ*accD* 遺伝子の5'隣接領域の解析  
平田徳宏、射場厚 (九大・院理・生物科学)

プラスチド *accD* 遺伝子は、脂肪酸合成の律即段階を触媒するアセチル CoA カルボキシラーゼのサブユニットをコードしている。高等植物において、プラスチド遺伝子は少なくとも2つのタイプのRNAポリメラーゼによって転写されることが示唆されている。そのうちの一つは、プラスチドゲノムにコードされている大腸菌型のRNAポリメラーゼ (PEP) で、もう一つは、核ゲノムにコードされるバクテリオファージ T7 RNAポリメラーゼ型である (NEP)。 *in vitro* における研究からプラスチド *accD* 遺伝子は、NEPによって転写されることが見いだされた。我々は、*accD* 遺伝子の発現制御機構を解明するために、トランジェントアッセイシステムを開発した。このシステムは、プラスチドの *in vivo* における転写の迅速でかつ定量的な解析を可能にした。このシステムを用いてタバコBY-2培養細胞にける *accD* 遺伝子の5'隣接領域の解析を行った。

(この研究における初期段階を手伝っていただいた福田仁博士に感謝します)

## 2pI08

藻類ミトコンドリアCOXI 遺伝子中に見出された転移性 groupII intron  
江原 恵<sup>\*1, 2</sup>・渡辺一生<sup>\*1</sup>・平岩呂子<sup>\*</sup>・大濱 武<sup>\*1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・理・生物科学、<sup>2</sup>神戸大・内海域セ、<sup>\*</sup>JT生命誌研究館)

オルガネラゲノムに特異的に見出されるgroupII intronは、特定のDNA部位に自己の遺伝子を挿入する転移活性を持つ利己的な遺伝子であると考えられる。藻類ミトコンドリアCOXI 遺伝子中の高い保存領域に挿入されているgroupII intronについて調べた。

珪藻 *Thalassiosira nordenskioldii* から検出されたintronは、褐藻 *Phylaiella littoralis* の第2 intronと同じ位置に挿入されていた。両intronは、リボザイム中に転移に必要な活性をコードするORFを持つが、ORF領域を利用した系統解析の結果、両者が近縁であることを示した。一方、ハプト藻 *Pavlova luteri* とその近縁種の中では、*Pavlova luteri* のみgroupII intronを持つことが判り、このintron中にもORFが見出された。藻類groupII intronの転移機構について考察する。

## 2pI09

変異導入した組み換えシロザ・クロロフィラーゼの解析  
土屋徹, 太田啓之, 島田裕士, 増田建, 高宮建一郎 (東工大・  
生命理工)

クロロフィラーゼ [EC3.1.1.14] はクロロフィルのフィチル基を加水分解しクロロフィリドとフィトールを生成する反応を触媒し、クロロフィル分解の第一段階にはたらく酵素であると考えられている。本酵素は1910年代には発見されていたが、長らく遺伝子の単離がなされなかった。しかし最近、我々はシロザ (*Chenopodium album*) を用いて、クロロフィル分解に関与する酵素としてはじめてクロロフィラーゼ遺伝子 (*CaCLH*, *C. album chlorophyll-chlorophyllido hydrolase*) の単離に成功し、さらにシロイヌナズナの二つのイソ酵素の遺伝子 (*AtCLH1*, *AtCLH2*) も単離・同定したことを報告した<sup>1)</sup>。

アライメントを行った結果、それら三つのクロロフィラーゼは全体では40%以下の相同性しかなかったが、リパーゼ・モチーフ (セリン残基が活性部位) を含んだいくつかの領域およびアミノ酸ではよく保存されていた。さらに最近、これらクロロフィラーゼ間でよく保存されているアミノ酸でのみ保存性の高い、いくつかの植物のEST配列が見つかった。そこで、クロロフィラーゼ間で完全に保存しているアミノ酸のうち、どのアミノ酸が活性に必須・重要なかを解明するため、変異を導入した組み換えクロロフィラーゼを大腸菌で発現させ解析を行った。

本発表では、活性部位であると考えられるリパーゼ・モチーフのセリン残基をはじめ、完全に保存されているアスパラギン酸、ヒスチジン、システイン残基などへ網羅的に変異導入を行った結果およびその他最近得られた知見について報告する。

<sup>1)</sup> Tsuchiya et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: in press

## 2pI10

劣性ストレプトマイシン耐性変異を利用したラン藻の遺伝子置換  
高濱一貴, 古閑 恵, 松岡正佳, 小川隆平 (熊工大・応理工)

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の多くの遺伝子を正確に置換できる応用性の広い形質転換法を確立することを目的とした。この方法ではリボソームのS12タンパク質のLys43がArgに変化したストレプトマイシン耐性 (*Sm<sup>r</sup>*) 変異 (*rps12-R43*) を利用する [1]。

*rps12-R43* 対立遺伝子は劣性であるため、この変異をもつ *Sy. sp.* PCC 7942 株の *psbAI* 遺伝子 (光化学系 II の D1 タンパク質をコードする) に野生型 *rps12* 遺伝子 + カナマイシン耐性遺伝子を組込んだ部分2倍体はストレプトマイシン感受性 (*Sm<sup>s</sup>*) 表現型を示した。これらの部分2倍体では、組込んだ *rps12* 遺伝子の変異型 *rps12-R43* 遺伝子に変換された *Sm<sup>r</sup>* 細胞が自然的に生じた。一方、*psbAI* 遺伝子の ORF を *gfp* 遺伝子 (GFP をコードする) で置き換えた組換え遺伝子 (*psbAI::gfp*) をもつ 鑄型プラスミドを電圧ポレーションで導入すると、*psbAI* 遺伝子が *gfp* 遺伝子に置換されたカナマイシン感受性組換え体が全 *Sm<sup>r</sup>* コロニーの中より約3%の頻度で得られた。さらに pUC3031 (クロラムフェニコル耐性) を同時に用いて形質転換体を選択する方法について述べる。

[1] Takahama, K. et al. (1999) *Plant Cell Physiol.*, 40, suppl., s24

## 3aI01

インゲン根粒菌によって形成されたミヤコグサ根粒の性状解析

馬場真里<sup>1</sup>, A. -B. M. Sidique<sup>2</sup>, 河内宏<sup>2</sup>, 泉井桂<sup>1</sup>, 畑信吾<sup>1</sup> (1京大院・生命科学, 2農業生物資源研究所)

インゲン根粒菌 *Rhizobium etli* CE3 は、*Lotus* 属植物に感染するミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* とほぼ同一の Nod factor を作り、ミヤコグサ *L. japonicus* B-129 'Gifu' に根粒を形成することができる。我々はこの根粒の性状を詳しく解析し、窒素固定活性が非常に低く、共生が正常に成立していないことを見出したので報告する。

感染実験の結果、*R. etli* CE3 はミヤコグサに、接種後少なくとも4週目までは *M. loti* 'Tono' による根粒と外見上差がない根粒を形成した。*R. etli* CE3 による根粒の内部構造を光学顕微鏡及び電子顕微鏡によって観察したところ、菌の植物細胞内への侵入や根粒組織の発達は正常になされていたが、根粒内部にアミロプラストや poly- $\beta$ -hydroxybutyrate が蓄積していること、ペリバクテロイド膜の崩壊が見られること、Y字型のバクテロイドが見られることなどが観察された。レグヘモグロビンの発現状況は *R. etli* CE3 による根粒と *M. loti* 'Tono' による根粒とでは差は見られなかった。*R. etli* CE3 による根粒のアセチレン還元活性は非常に低く、その値は週を追うごとに低下していった。

以上の結果からミヤコグサと *R. etli* CE3 の共生は、Nod factor が関与する共生成立初期の過程をクリアした後の、窒素固定活性を発現させる後期の過程において停止していると考えられた。

## 3aI02

マメ科モデル植物ミヤコグサの形質転換

神沢あゆみ、川口正代司<sup>1</sup>、綾部真一、青木俊夫  
(日本大・生物資源・応用生物、<sup>1</sup>東京大院・総合文化)

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は分子遺伝学的研究に最適な性質を持ち、マメ科のモデル植物として注目されている。我々は、様々な濃度と期間によるハイグロマイシン (Hyg) 選抜で形質転換体を作成し、エスケープを極力おさえ、効率よく形質転換体を得られる方法を確立した。

*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 を用いてバイナリーベクター pIG121Hm を標準系統 B-129 'Gifu' に導入した。Hyg 100 mg/L で3週間選抜し、その後 40 mg/L でシュート伸長まで選抜をした条件では、感染切片に対して 27% の頻度で耐性シュートが得られ、その全てに GUS 活性が確認された。今後、逆遺伝学的手法を用いた遺伝子機能の解析、および、タギングによる変異遺伝子の単離に応用していく予定である。

### 3aI03

エンドウレグヘモグロビンアイソフォームの異質性  
川島和也、菅沼教生、玉置雅紀、河内宏<sup>1</sup> (愛知教育大・生命科学、<sup>1</sup>農水省・生物研)

レグヘモグロビンは、根粒内の酸素分圧を低く保つと同時にバクテロイドに酸素を供給する役割を果たす共生窒素固定に欠くことのできない重要なタンパク質である。多くの場合、マメ科植物の根粒には、複数のレグヘモグロビンアイソフォームが存在するが、複数存在することの生理的な意味は十分に理解されていない。エンドウ根粒から、5種類のレグヘモグロビンのcDNAクローンを単離し、それらの一次構造、組み換えタンパク質の酸素に対する親和性、根粒における空間的な発現様式を調べたところ、酸素に対する親和性が低く、ニトロゲナーゼの構造遺伝子(*nifH*)と同様に根粒のearly symbiotic zoneで発現がみられるもの(*PsLb120*)とそれよりも酸素に対する親和性が高く、根粒のlate symbiotic zoneにも発現がみられるもの(*PsLb5*)の2つのタイプに大別された。このうち、*PsLb120*の発現は、窒素固定活性を示さないエンドウFix-突然変異体E135の根粒においても正常な根粒と同様であったが、*PsLb5*の発現はE135の根粒では抑制され、late symbiotic zoneにおける発現がみられなかった。

### 3aI04

ミヤコグサのグロビン遺伝子の構造と発現機構

鶴田智子、内海俊樹<sup>1</sup>、阿部美紀子<sup>1</sup>、鈴木章弘<sup>1</sup>、東四郎<sup>1</sup>  
(鹿児島大院・理工・生命化学、<sup>1</sup>鹿児島大・理・生命化学)

根粒菌とマメ科植物の共生系で重要な働きをしているタンパク質のひとつとして、レグヘモグロビンを挙げることができる。レグヘモグロビンは根粒に多量に存在するヘムタンパク質であり、根粒内の酸素分圧を調節している。そのグロビン部分の遺伝子(Lb遺伝子)は、宿主植物の染色体上に存在するが、その発現調節機構は未だ不明の部分が多い。

本研究では、マメ科のモデル植物として注目されているミヤコグサ(*Lotus japonicus*, 2n=12)を材料として、Lb遺伝子の解析を行った。まず、長さの異なる3種のLb遺伝子をPCRにてクローニングし、その塩基配列と構造を決定した。さらにLb遺伝子の発現機構を調べることを目的として、レポーター遺伝子の構築を試みた。Lb遺伝子の塩基配列を基に作製したプライマーを用いてIPCRを行い、Lb遺伝子の上流域を含む6653bpの塩基配列を決定した。そのうちプロモーター領域を含むと予想される約3.3kbの断片とgreen fluorescent protein(GFP)遺伝子を連結したレポーター遺伝子を構築し、*Agrobacterium*を介したミヤコグサへの形質転換を試みている。

### 3aI05

レンゲソウ根粒で発現する asparagine synthetase 遺伝子の取得と解析  
笠井光治、藤江誠、宇佐見昭二、山田隆 (広島大・工・発酵)

我々はレンゲソウ(*Astragalus sinicus*)と根粒菌(*Mesorhizobium huakuii*)との共生系に着目し、根粒形成過程で発現するレンゲソウ遺伝子群の取得と解析を行っている。

Differential Hybridizationにより根粒特異的に発現する遺伝子をスクリーニングしたところ、c9とc9-4の2つの asparagine synthetase が取得された。asparagineは根粒内で固定された窒素を転流する際に輸送分子として使用される。c9は584aa、c9-4は586aaからなるORFをコードし、両者ともにグルタミン結合部位を保存しており、グルタミン依存型の asparagine synthetaseであった。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、c9-4は根粒と根において発現していたが、c9は根粒と根に加えて、葉においても若干の発現が認められ、両者の機能的な使い分けが示唆された。レンゲソウをN源制限培地で培養後、培地にN源(0.5mM、NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>)を加えると、両者ともに根粒内における発現量は著しく減少し、根粒内において、N源に対応した転写調節機構があることが示唆された。

### 3aI06

ダイズ根粒特異的ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子のプロモーター解析

中川知己<sup>1</sup>、杉本琢真<sup>1</sup>、畑信吾<sup>1,2</sup>、泉井桂<sup>1,2</sup>、河内宏<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農・応用生物、<sup>2</sup>京大院・生命・分子代謝、<sup>3</sup>農水省・生物研)

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)は、マメ科植物の根粒において炭素代謝の中心的役割を担っている。我々はダイズ根粒から2種類のPEPC遺伝子、*GmPEPC7*と*GmPEPC15*をクローニングした。このうち*GmPEPC7*は根粒で高く発現していた。一方、*GmPEPC15*は植物全体で低く発現し、基本的な炭素代謝に関わっていることが示唆された(Plant J. 13: 267, 1998)。

今回我々は、それぞれのプロモーター(1.7 kbと1.4 kb)の下流にGUS遺伝子をつないでダイズを形質転換し、根粒におけるGUS活性を測定した。その結果、*GmPEPC7*のプロモーターは根粒で非常に高い活性を示したが*GmPEPC15*の活性は低かった。さらに*GmPEPC7*プロモーターの、*GmPEPC15*との極めて相溶性の高い約400bpの領域のみでも有意なGUS活性を示したことから、ほんのわずかなプロモーター配列の差が*GmPEPC7*根粒特異的な高発現を付与していることが考えられた。これらの結果を基に、*GmPEPC7*遺伝子が根粒特異的な発現に至った分子進化過程についても考察する。

### 3aI07

ウリカーゼ II (nodulin-35) 遺伝子の根粒非感染細胞特異的発現に関与する *cis*-element の解析

高根健一、田島茂行<sup>1</sup>、河内宏 (農業生物資源研究所・窒素固定、<sup>1</sup>香川大学・農学・生命機能科学)

ウレイドを主な固定窒素の転流形態とするダイズにおいて、ウリカーゼ II (nodulin-35) はウレイド生成の鍵酵素で、根粒非感染細胞内のパーオキシソームに局在していることが判明している。しかしながら、その発現調節機構については解明されていない。

我々は既にウリカーゼ II をコードしている 2 つの遺伝子 (*GmUR2*, *GmUR9*) を単離している。ダイズ毛状根を用いたプロモーター解析の結果、2 つの遺伝子共に非感染細胞特異的発現を有することが分かり、塩基配列比較においても高度に保存された配列を確認した。*GmUR9* についてプロモーター領域の削り込み実験を行ったところ、翻訳開始点から上流-254~-148bp の間に非感染細胞特異的発現に関与する *cis*-領域が存在することが示唆された。この領域内の 2 つのモチーフ (box I, box II) に注目し、さらにこれらのモチーフを別々に欠失させた実験の結果、box I (GTAATG) は根粒内での非感染細胞特異的な発現に関与している *cis*-領域の 1 つであることが示唆された。

### 3aI08

*Rhodobacter capsulatus* の窒素固定に必須な Rnf 蛋白質複合体の性質

熊谷浩高、水戸千恵、佐伯和彦  
(阪大院・理・生物)

*R. capsulatus* のフェレドキシン I (FdxN) はニトロゲナーゼへの主要な電子供与体である。fdxN 遺伝子の近傍には、窒素固定に必須で既知の *nif* 遺伝子とは類似性のない遺伝子クラスター *rnf* が存在する。*rnf* 遺伝子クラスターの産物は FdxN や鉄欠乏時に FdxN の代替えを行うフラボドキシン (NifF) の還元を司る酸化還元酵素複合体を構成する。Rnf 複合体は、NADH 結合部位と鉄硫黄クラスターを保持する膜表在サブ複合体と 3 つ以上のサブユニットからなる膜貫通サブ複合体から構成される。

膜貫通サブユニットのうち RnfA の膜配向性は決定済みである。今回は、残る 2 種のうち RnfD の親水領域 13 箇所到大腸菌アルカリ性フォスファターゼ (PhoA) を融合させるキメラ遺伝子を作成し *R. capsulatus* 野生株に導入し、キメラ産物の存在量と PhoA 活性の解析などを行った。その結果、RnfD は N 末端と C 末端を細胞質側に、分子中央領域をペリプラズムに露出する 6 回膜貫通蛋白質であることが示された。残る RnfE の膜配向性および RnfA, D, と E の三者の相互作用についても解析中である。

また、膜表在性サブ複合体を構成する RnfB が C 末端に (His)<sub>6</sub> を付加しても生理活性を保持することを利用して、RnfB-(His)<sub>6</sub> を含む複合体の精製を進めている。現在までに、RnfC サブユニットと共精製されることを確認した。

### 3aI09

オオムギ硝酸還元酵素遺伝子の発現制御：

1. 導管液の硝酸イオンの役割

末吉邦、川地太兵、大竹憲邦、大山卓爾  
(新潟大・農・応生)

オオムギ葉における硝酸還元酵素 (NR) 遺伝子の発現制御に対する導管液中の硝酸イオンの役割を明らかにするために実験を行った。

無窒素で生育させたオオムギ幼植物の根に 0.1mM, 1mM および 5mM の硝酸イオンを与えると、いずれの濃度の場合でも、根と葉の両方で NRmRNA の蓄積が同程度に誘導された。葉における NRmRNA の蓄積は、葉への硝酸イオンの蓄積以前におこり、一方、導管液中の硝酸イオン濃度は、硝酸イオンを供与して数時間後に 10mM 近くにも達しており、NRmRNA 蓄積のキネティクスと強い相関があった。切断葉の切り口から種々の濃度で硝酸イオンを与えた場合、十分な NRmRNA の誘導蓄積を引き起こすのに必要な濃度は 5mM 以上であった。植物を 1mM の硝酸イオンで 24 時間処理した後に無窒素培地に移した場合、葉における NRmRNA 蓄積量と導管液中の硝酸イオンはともに急減した。以上のことより、オオムギ葉における NR 遺伝子の発現は、導管液中の硝酸イオンによって制御されている可能性が示唆された。

### 3aI10

オオムギ硝酸還元酵素遺伝子の発現制御：

2. アニオンチャネルの役割

川地太兵、大竹憲邦、末吉邦、大山卓爾  
(新潟大・農・応生)

高等植物において、硝酸還元酵素 (NR) 遺伝子の発現は培地中の硝酸イオンによって誘導される。今回我々は、オオムギの NR 遺伝子発現制御におけるアニオンチャネルの役割について阻害剤を用いて調べた。S 型のアニオンチャネル阻害剤である A-9-C をあらかじめ与えておくと、硝酸イオンによる NRmRNA の誘導は阻害された。また組織硝酸の蓄積も阻害された。一方 R 型のチャネル阻害剤である DIDS は A-9-C と同様の効果を示さなかった。これらのことからオオムギ NRmRNA の蓄積誘導や硝酸イオンの吸収において S 型のアニオンチャネルがなんらかの関与をしていることが示唆された。現在、これらアニオンチャネルブロッカーの硝酸トランスポーター遺伝子の発現誘導に対する影響を調べている。

### 3aI11

ハウレンソウ硝酸還元酵素タンパク質大量発現系の構築

白石齊聖、大野貴博、Wilbur H. Campbell<sup>1</sup>、杉本敏男、王子善清（神戸大学・農・植栄、<sup>1</sup>Dept. Biology, Michigan Tech. Univ. MI, USA）

ハウレンソウ硝酸還元酵素（NR）cDNA を用いて NR タンパク質発現系の構築を行った。大腸菌を宿主とした系では、pET3 ベクターを用いて活性型 NR フラグメント（NR の C 末端側 42kDa, 30kDa）を約 2mg/L 発現することに成功した。次に酵母（*Pichia pastoris*）を宿主とした系では、pHIL-D2 ベクターを用いて 41kDa NR フラグメントを約 100mg/L 発現した。

ホロ NR（110kDa のホモダイマー）の発現は酵母の系で pPICZ ベクターを用いて行ったが、タンパク質発現量は 41kDa NR フラグメントと比較して少なく、期待した発現量が得られなかった。現在ホロ NR 発現量を増加させるため、培養系の改良を行っている。

### 3aI12

ハウレンソウの硝酸還元酵素不活性化タンパク質をコードする遺伝子の単離と発現解析

園田雅俊、井出博章、中山真也、佐藤隆英、中川弘毅（千葉大・園芸・生物生産）

硝酸還元酵素（NR）は硝酸同化系の第一段階で硝酸を亜硝酸に還元する反応を触媒する酵素である。この酵素の活性は様々なシグナルに応じたタンパク質レベルで多面的な調節を受けている。インピトロで可逆的あるいは不可逆的に NR を不活性化する因子が幾つか報告されてるが遺伝子レベルでの解析はほとんどされていない。我々は NR 活性を不可逆的に不活性化するタンパク質（Nitrate Reductase Inactivator Protein : NRI）をハウレンソウ緑葉より精製し解析を進めてきた。本研究では NRI 遺伝子を単離し、ハウレンソウ培養細胞におけるこの遺伝子の発現解析を行った。

精製された NRI の N 末端領域のアミノ酸配列をもとに作製したディジェネレートプライマーを用いてゲノム DNA を鋳型として PCR を行い NRI 遺伝子の 1 部分（102bp）をクローニングした。更にこの配列をもとにして 3'-RACE 法を行い NRI 遺伝子の単離に成功した。得られたクローンは 390 アミノ酸をコードし、その推定アミノ酸配列はイネやシロイヌナズナのヌクレオチドピロホスファターゼとそれぞれ 73% と 59-75% の相同性を示した。現在解析を進めている NRI 遺伝子の発現様式についても報告する。

### 3aI13

硝酸還元酵素による活性窒素種の生成

山崎秀雄、崎浜靖子（琉球大・理・海洋自然）

NO（Nitric Oxide、一酸化窒素）は、生体内で生成されるフリーラジカルの一つである。本研究では、植物の窒素同化酵素である硝酸還元酵素（NR, Nitrate Reductase）が、植物細胞における NO 発生系になることを報告する。NADH とトウモロコシ NR の存在下で亜硝酸を添加すると、急速な NO の発生が電極法により検出された。このシグナルは、NR 及び NADH 不在下では見られず、ヘモグロビン添加によって速やかに消失した。電極法以外に、DAF の蛍光によっても NO 生成が観察され、亜硝酸が NR によって NO に変換されていることが確認された。これら *in vitro* の実験結果は、NR が植物の NO 発生源の一つであり、光合成電子伝達系による活性酸素種生成と同様に、窒素同化系が植物細胞の酸化障害の原因となっている可能性を指摘している。

### 3pI01

亜硝酸還元酵素活性が大幅に抑制された形質転換植物における硝酸/亜硝酸還元（4）

高橋美佐、森川弘道（広島大・理・数理分子生命理学）

亜硝酸還元酵素（NiR）は亜硝酸イオンをアンモニアに還元し、二酸化窒素還元、硝酸還元に必要な酵素であるが、我々はこれまでに NiR 活性がほぼゼロに抑制されているトランスジェニック植物が二酸化窒素還元能に関しては野性株の約 60% の能力を、硝酸還元については野性株とほぼ同レベルの能力を持っていることを明らかにしている（高橋ら、植物生理学会 1998、1999 年度年会発表）。本研究では、NiR 活性を抑制したトランスジェニック植物において亜硝酸イオン還元に関与しているタンパク質を明らかにすることを目的として研究を行った。

植物材料として、タバコの NiR cDNA のアンチセンス鎖を導入したトランスジェニック・タバコ植物（Vaucheret et al. 1992）と野性株を 10 週間生育させたものを実験に用いた。植物体から抽出した粗抽出液を native PAGE により分離し、還元力としてメチルピオローゲンを用いて亜硝酸還元酵素活性について活性染色、およびハウレンソウ NiR 抗体を用いてイムノプロット解析を行った。活性染色の結果、2 本のバンドが検出された。イムノプロット解析の結果、NiR 活性染色で検出されたバンドの内 1 本は NiR 抗体を用いたイムノプロット解析で検出されたバンドの位置と一致した。現在 NiR 活性染色で検出されたもう 1 本のバンドについて解析している。

### 3pI02

植物葉内に取り込まれた二酸化窒素から生成される新規化合物の解析

河村義史, 張藝潔, 平田敏文, 高橋美佐,  
森川弘道 (広島大・理・数理分子生命理学)

植物は、大気中の二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) ガスを葉から吸収・代謝する。我々はこれまで、植物葉内に取り込まれた二酸化窒素由来の窒素は、根から吸収された硝酸由来の窒素とは異なる運命をたどり、その20-30%はケールダール法で回収されにくい新規窒素化合物に変わることを見いだした。本研究は、その化合物の構造解析を目的としている。

播種後約5週齢のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype C24) の実生を、 $^{15}\text{NO}_2$  (51.6 atom%  $^{15}\text{N}$ ) 濃度  $4.0 \pm 0.4$  ppm,  $\text{CO}_2$  濃度  $340 \pm 80$  ppm, 温度  $22.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , 相対湿度  $70 \pm 4\%$ , 照度  $70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  の条件下で4時間暴露し、葉を回収後、凍結乾燥、粉碎したものを試料として用いた。試料のホモジネート中の新規窒素化合物を含む画分を液体クロマト (Superdex 75 HR, Dowex 50W, Zorbax BP-CN カラム) を用いて分取した。さらにその分取液を薄層クロマト (フナセル SF) を用いて分離した。現在、薄層クロマトで得られた新規窒素化合物を含む画分について解析中である。

### 3pI03

高等植物の二酸化窒素ガスの吸収に関与する遺伝子の探索  
木須康智, 河村義史, 近藤功明, 白野由美子<sup>1</sup>, 柴田大輔<sup>2</sup>,  
林浩昭<sup>3</sup>, 其木茂則<sup>4</sup>, 高橋美佐, 森川弘道 (広島大院・理・  
数理分子生命理学, <sup>1</sup>Waksman Institute・Rutgers Univ.,  
<sup>2</sup>かずさDNA研究所, <sup>3</sup>東京大院・農生科・応生化,  
<sup>4</sup>麻布大・環境保健・健康環境科学)

窒素酸化物ガスは生物に対して有毒であるが、一方で植物は二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) ガスを体内へと吸収している。吸収された  $\text{NO}_2$  の一部は、代謝され窒素源として利用されるが、それ以外のことについてはよく解っていない。演者らは、植物の  $\text{NO}_2$  ガス吸収の機構を明らかにすることを目的として、 $\text{NO}_2$  ガス吸収に関わる遺伝子、及び  $\text{NO}_2$  ガス曝露に際して発現が誘導される遺伝子の探索を二つのタギング法、アクティベーションタギング法とエンハンサートラップ法を用いて行っている。

$\text{NO}_2$  ガス吸収に関わる遺伝子の同定のため、CaMV35Sプロモーターを導入したシロイヌナズナアクティベーションタギングラインについて、 $\text{NO}_2$  ガス吸収能の上昇した植物体の選抜を行った。0.1ppmの  $^{15}\text{NO}_2$  で1時間暴露処理を行い、葉内の  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  量を同位体質量分析計で測定することにより解析した。

また、 $\text{NO}_2$  ガス曝露に際して発現が誘導される遺伝子の同定のために  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を導入したシロイヌナズナ (オハイオ州立大 ARABIDOPSIS BIOLOGICAL RESOURCE CENTERより) についても同様の  $\text{NO}_2$  ガス曝露処理を行った後、GUS活性の上昇した植物体の選抜を行った。

### 3pI04

形質転換イネを用いたサイトゾル型グルタミン合成酵素の機能解析

小笠原ひろみ, 早川俊彦, 林浩昭<sup>1</sup>, 山谷知行 (東京大院・農・生化<sup>1</sup>, 東北大院・農・応用生命科学)

イネにおいて、維管束師部伴細胞や柔細胞に存在するサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1) が、窒素の主な転流形態であるグルタミンの合成に関わっている可能性をより直接的に証明することを目的とし、GS1含量を減少させた形質転換イネを作出した。イネ維管束師部特異的に発現するチオレドキシシンhプロモーターを用いて、GS1アンチセンス遺伝子を発現させ、可溶性タンパク質当たりのGS1含量を野生型の30%~80%に減少させた14系統の形質転換イネを獲得した。葉緑体型GS含量には大きな変動は認められなかった。これらの形質転換イネ ( $T_0$  世代) では、生育や老化の遅延などが認められた。老化葉身におけるGS1相対含量が低い系統ほど、全窒素量、可溶性タンパク質量、Rubisco量が高く保持されていた。これは、GS1量が減少したことによって、窒素の転流が滞った結果であると考えられた。

### 3pI05

ラン藻 *Plectonema boryanum* の2種類のグルタミン合成酵素の酵素学的特性と生理機能の解析  
奥原宏明<sup>1</sup>, 木田隆夫<sup>2</sup>, 長谷俊治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大蛋白研, <sup>2</sup>味の素中央研)

ラン藻の一種 *Plectonema boryanum* は2種類のグルタミン酸合成酵素 (GOGAT) を持ち、細胞粗抽出液中には、反応に必要な還元力をフェレドキシン (Fd) 由来と、NADH由来とするものの活性が認められる。ゲノムDNAより *glsF* と *gltBD* をクローン化し、前者はFd依存型の、後者はNADH依存型の活性に対応する酵素をコードすることを遺伝学的に示し、それぞれが窒素同化経路で機能することを報告した。今回は、これら2種の酵素を大腸菌発現系で組換え体として精製し、Fd-GOGATは単一ポリペプチド鎖から、NADH-GOGATは2種のサブユニットからなる酵素で、共にフラビンと鉄硫黄クラスターの存在を示す吸収スペクトルを持つことを明らかにした。速度論的解析から、両者には電子供与体の差異に加えて、Glnに対する  $K_m$  値も相違することが判明した。目下、各々のGOGATを欠損したラン藻株を用いて、光合成の代謝状況の変化に対応して、細胞内のGln、Glu等の遊離アミノ酸プールがどのように変動するのかを検討している。そして、窒素同化の動的代謝過程に対する2種のGOGATの寄与の仕組みを、酵素学的特性も考慮しながら明確にすることを目指している。

### 3pI06

日本型、インド型、ジャワ型イネの穎果における NADH 依存性グルタミン酸合成酵素含量及び活性の挙動とそのタンパク質含量に関する QTL 解析  
小原実広、梶浦真、佐藤雅志<sup>1</sup>、山谷知行 (東北大院・農・応生科、<sup>1</sup>東北大・遺生研)

日本型イネの NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) は、登熟初期の穂や抽出中の葉身などにおいて、転流されてくるグルタミンの再利用において機能していることが示唆されている。他のインド型やジャワ型イネにおける NADH-GOGAT の機能を詳細に検討する目的で、Nipponbare (日本型)、Kasalath (インド型)、及び Gemdiah Beton (ジャワ型)イネを供試して、穎果における NADH-GOGAT 含量と活性の挙動を比較した。

ガラス室内にて登熟期まで土耕栽培を行い、開花日を 0 日として強勢穎果を 0 日から 35 日まで経時的に収穫した。Kasalath では、穎果当たりの NADH-GOGAT 含量の増加は、Nipponbare や Gemdiah Beton よりも早く、開花後 8 日目に最大値となり、その後減少した。NADH-GOGAT 含量の最大値は、Nipponbare、Kasalath での品種間に大きな違いは無かった。また、すべての品種において、穎果当たりの NADH-GOGAT 活性は含量の変化と類似していた。Kasalath においては、穎果当たりの全窒素量、乾燥重及び貯蔵タンパク質プロラミンの集積量の速度が早かった。以上の結果より、Kasalath で認められた穎果への窒素集積時期が早いことの一因に、NADH-GOGAT 集積速度が早いことが示唆された。一方、未抽出葉身では、Kasalath は Nipponbare に比較して約半分の NADH-GOGAT 含量しかないことが判明している。現在、Nipponbare 及び Kasalath 由来する BILs を用いて、第 10 葉完全展開時の第 11 未抽出葉身における NADH-GOGAT タンパク質含量の差に関する QTL 解析を行っている。

### 3pI07

イネ根の中心柱における NADH-、Fd-依存性グルタミン酸合成酵素タンパク質の分布する細胞群の特定  
石山 敬貴、早川 俊彦、山谷 知行 (東北大院・農・応生科)

イネ根において、 $\text{NH}_4^+$ の供給に伴い、NADH-GOGAT が特異的に根端の表層の細胞である表皮と外皮に蓄積されることが判明している。この結果は、NADH-GOGAT が、吸収された  $\text{NH}_4^+$ の同化過程に機能することを示唆している。しかしながら、 $\text{NH}_4^+$ の供給の有無に関わらず恒常的に根の中心柱に存在する NADH-GOGAT 及び Fd-GOGAT の機能は不明のままである。

本報告では、中心柱に存在する NADH-GOGAT 及び Fd-GOGAT の機能解析の一手段として、免疫電子顕微鏡法を用い、中心柱の GOGAT タンパク質の分布する細胞の特定を行った。

根端より 1cm の部位の横断切片を作製し、抗 NADH-GOGAT 抗体または抗 Fd-GOGAT 抗体を使用してイムノゴールド法による解析を行った。その結果、中心柱では NADH-GOGAT タンパク質の分布を示す金粒子は、主に維管束柔細胞のプラスチドに検出された。一方、Fd-GOGAT タンパク質の分布を示す金粒子は、主に篩部の伴細胞と考えられる細胞内のプラスチドに検出された。

現在、上記の結果をより明確にするために、二重染色法を用いて、同一切片上で NADH-GOGAT 及び Fd-GOGAT タンパク質の検出を試みている。

### 3pI08

イネにおけるアスパラギン合成酵素の組織内分布  
中野健太郎、早川俊彦、山谷知行 (東北大院・農・応用生命科学)

高等植物におけるアスパラギン合成酵素 (AS) の研究は、mRNA の発現に関する解析は行われてきたものの、AS タンパク質の解析はほとんど行われていなかった。これまで我々はイネ AS cDNA を大腸菌内で発現させ、AS 特異抗体を獲得した。この抗体を用いて、AS タンパク質が完全展開前後の葉鞘と登熟過程の穎果に多く存在することを示した。今回我々は、これらの器官における AS タンパク質の組織内分布を解析した。

約 12.5 歳のイネの第 11 葉鞘と、開花後二週間後の穎果を用い、パラフィン包埋法により組織切片を作成した。アフニティー精製したイネ AS 特異抗体を用いて、アビジンビオチン法により解析した。この結果、葉鞘では維管束師部の伴細胞に、また、穎果では背部大維管束の柔細胞に検出された。また、ゲノミックサザン解析の結果、イネ AS はゲノム中に単一コピーで存在していることが強く示唆された。

現在、葉鞘の伴細胞における AS タンパク質の細胞内局在について、免疫電顕を用いて、検証を行っている

### 3pI09

葉脈維管束において強く発現するシロイヌナズナのリジン感受性アスパラギン酸キナーゼ遺伝子  
吉岡泰、樽井俊介、町田泰則 (名大院・理・生命理)

我々はシロイヌナズナの遺伝子トランプライブラリーを作製、スクリーニングし、本葉の維管束においてレポーター遺伝子として用いた  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) が強く発現している系統 (E10) を分離した。塩基配列を解析した結果、E10 系統においてトランプされている遺伝子は、シロイヌナズナのリジン感受性のアスパラギン酸キナーゼの一つ (cArb-AK-Lys) と 87% のアミノ酸の類似性を示すタンパク質をコードしていた。これからトランプされた遺伝子は新奇なリジン感受性アスパラギン酸キナーゼをコードすると考えられた。E10 系統における GUS 活性は、最初の本葉が展開し始める頃から胚軸、子葉葉柄、根の維管束で検出され始め、その後、子葉、本葉葉脈の維管束で特に強い GUS 活性が検出された。抽苔後では茎生葉の葉脈、花弁とがく全体、柱頭、トリコームにおいて GUS 活性が検出された。アスパラギン酸キナーゼはアスパラギン酸からアスパラギン酸族アミノ酸が生合成される経路の最初の段階を触媒する鍵酵素である。E10 系統の葉脈維管束において強い GUS 活性が検出されたことはアスパラギン酸族アミノ酸が葉の維管束において盛んに生合成されている事を示唆すると考えられる。

## 1aJ01

スボラミン前駆体のPro36への糖鎖付加に必要な領域  
伊ヶ崎知弘, 長谷川順子, 中村研三, 松岡 健  
(名大院・生命農・生化)

スボラミン(SPO)前駆体をタバコ培養細胞BY-2株で発現させると、N-末端より36番目のPro残基が水酸化され生じたヒドロキシプロリン(Hyp)残基にアラビノガラクトン(AG)に分類される糖鎖が付加される。AGを糖鎖として持つ多くの蛋白質では多くのHyp残基が糖鎖付加を受けており、これらの蛋白質をモデルとして糖鎖付加モチーフを検索することは困難である。そこで我々は、AGの付加部位が1箇所であるSPO前駆体の特性を生かして、AGの蛋白質への付加に関わるモチーフの検索を行っている。

糖鎖付加部位よりN-末端を段階的に欠失させた変異SPOや、さらに糖鎖付加部位よりC-末端側のアミノ酸残基をAla等のアミノ酸残基に置換したSPOをBY-2で発現させ、細胞外へ分泌されたSPOへの糖鎖付加を糖染色、抗AG抗体による染色およびエドマン分解により検討した。糖鎖付加部位よりN-末端側の長さが短くなるにつれHyp残基への糖鎖付加が減少した。糖鎖付加部位よりC-末端側のアラニン残基への置換は糖鎖付加へ顕著な影響を及ぼさなかったが、Ala残基への置換と共に39番目のSer残基をPhe残基に置換した変異では糖鎖付加が阻害された。以上の結果は、Hyp残基近傍の大きな側鎖を持つ残基がAGの付加を阻害する可能性を示唆している。

## 1aJ02

イネ種子由来の $\alpha$ -マンノシダーゼの精製と特性について

岸本 正, 中野 恵康, 渡部 真由美, 堀 秀隆, 三ツ井 敏明  
(新潟大学院・自然科学)

$\alpha$ -マンノシダーゼはハイマンノース型糖鎖から $\alpha$ -マンノースを遊離する酵素である。マメ科植物をはじめとする双子葉植物では多くの知見があるものの、単子葉植物では全く知見が無いのが現状である。そこで、イネ種子から $\alpha$ -マンノシダーゼを精製し、特性を調べた。本酵素の精製ステップは40-55%硫酸塩析、ブチル-トヨパール、フェニル-セファロース、CM- & DEAE-トヨパール、最後にトヨパール HW55Sの手順で行った。精製した酵素はトヨパール HW55S のゲルろ過カラムにより、190 kDa であることが推定された。SDS-PAGE では 54 と 42 kDa の 2 つのバンドを示したことから、それぞれのサブユニットが 2 つずつ会合した四量体として存在していることが分かった。至適 pH 4.5 を示し、亜鉛要求性であった。1-デオキシマンノジリマイシンにおいて十分な活性を示すものの、スワインゾンでは完全に阻害された。 $\alpha$ -2, 3, 6, 位結合のマンビオースをそれぞれ消化し、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  と  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  の糖鎖から $\alpha$ -マンノースを遊離した。また、本酵素はイネカルス由来のハイマンノース型糖鎖を含む糖ペプチドにも活性を示したことから、発芽時に糖蛋白質糖鎖の分解または修飾に関与するものと示唆された。

## 1aJ03

サツマイモ培養細胞のポリフェノールオキシダーゼ  
プロセッシング酵素の諸性質と機能  
吉田行孝, 金沢孝治, 橋本英之, 田中一平, 塩入秀成, 小島峯雄, 野末雅之 (信州大・繊維・応生)

高等植物のポリフェノールオキシダーゼ (PPO) は、色素体輸送シグナルをN末端に持つ前駆体タンパク質として細胞質で合成され、葉緑体に輸送され約60kDaの不活性型成熟タンパク質としてチラコイド内腔に存在する。先に、サツマイモ培養細胞をショ糖飢餓状態で培養すると、色素体に存在する不活性型の60-kDa型PPOが速やかに40-kDa型PPOにプロテオリシスされ、活性化されることを示した。PPOの細胞内での活性化機構を明らかにするために、今回、60-kDa型PPOプロセッシング酵素を精製し、その諸性質を調べた。その結果PPOプロセッシング酵素は液胞に局在し、至適pHは4.0~5.0のシステインプロテアーゼであることがわかった。ショ糖飢餓細胞にE-64を処理すると60-kDa型PPOの*in vivo*プロテオリシスが阻害されることから、色素体60-kDa型PPOのプロテオリシスによる活性化に今回精製したPPOプロセッシング酵素の関与が強く示唆された。

## 1aJ04

アントシアニン生産性サツマイモ培養細胞の24-kDa液胞タンパク質(VP24)の一次構造と機能解析  
徐 文新, 守屋 慶, 塩入秀成, 小島峯雄, 野末雅之  
(信州大・繊維・応生)

VP24はアントシアニンを高濃度に蓄積しているサツマイモ培養細胞の液胞で特異的に発現するタンパク質として見いだされたが、その機能は明らかでない。VP24は、N末端にシグナルペプチドを持つ前駆体タンパク質(96 kDa)として合成され、液胞へ輸送され24-kDa成熟タンパク質となると考えられる。VP24前駆体タンパク質のC末端側には膜貫通ドメインと予測される疎水性領域が存在する。この疎水性領域が液胞膜タンパク質として機能しているのかどうかを明らかにするために、C末端プロペプチドの一部を含む融合タンパク質を調製し、特異抗体を作製した。液胞分画に本抗体と反応する36kDaのタンパク質(VP36)が存在することがウェスタンブロット解析により明らかになった。VP36はVP24と同様に光照射により誘導され、2,4-Dにより発現が抑制された。これらの結果から、VP36はVP24前駆体タンパク質から生じ、液胞タンパク質として存在していることが示唆された。

## 1aJ05

ヒマ種子液胞プロセシング酵素の成熟化機構の解析  
平岩呂子<sup>1,2</sup>, 水谷 健<sup>3</sup>, 牧野由美子<sup>3</sup>, 村上明男<sup>3,4</sup>, 西村幹夫<sup>1</sup>, 西村いくこ<sup>1,5</sup> ( <sup>1</sup>基生研・細胞生物, <sup>2</sup>JT生命誌研, <sup>3</sup>基生研・分析室, <sup>4</sup>神戸大・内海域セ, <sup>5</sup>京大院・理・植物)

液胞プロセシング酵素(VPE, Vacuolar processing enzyme)は、高等植物の液胞タンパク質の成熟化に関与する酵素である(1)。我々は、VPE自身も液胞内で前駆体からのプロセシングにより成熟型へ変換することを明らかにしている(2)。今回は、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)で発現させたヒマ種子VPEの部位特異的変異体を用いたVPEの成熟化機構の解析結果を報告する。

現在までに構造が明らかにされた10種のVPEホモログ間で保存性の高いアミノ酸残基のうちCys-83, Cys-222, His-180をそれぞれGlyに変えた改変VPE前駆体はプロセシング活性を全く示さず、成熟型VPEへの変換も示さなかった。また、C末端側のプロセシング部位と予想されるAspをGlyへ変えた改変VPE前駆体の場合、成熟型への変換が見られなかった。VPEはAsn残基のC末端側を切断する酵素であるが、合成ペプチドを使った解析等からAsp残基も認識することが分かった。以上の結果は、VPEが自己触媒的にC末端側のプロペプチドを切断することによって成熟化することを示している(3)。

(1) Kinoshita et al. (1999) Plant J., 19, 43-53

(2) Hiraiwa et al. (1997) Plant J. 12, 819-829

(3) Hiraiwa et al. (1999) FEBS Lett., 447, 213-216

## 1aJ06

インゲンマメのセネッセンス葉における液胞プロテイナーゼによるルビスコ分解

南川隆雄, 豊岡公德, 岡本龍史, 西村いくこ<sup>1</sup>, 近藤真紀<sup>2</sup>, 西村幹夫<sup>2</sup> (東京都立大院・理・生物科学, <sup>1</sup>京都大院・理・植物, <sup>2</sup>基生研・細胞生物)

インゲンマメ第1葉を単離して暗所25°Cで4-8日置き、この間のルビスコ分解を主にSDS-PAGE/免疫プロット法と免疫電顕法によって観察した。ルビスコLSU及びSSU量はともにセネッセンス中に速やかに減少し、その間にLSUの分解物とみられるポリペプチドが検出された。セネッセンスの進行に伴いインゲンマメ葉の主要システインプロテイナーゼEP-C1 (ケツルアズキSH-EPと免疫学的に相同)の量は増加し、VmPE-1 (EP-C1のプロセシング酵素と推定される)量は減少した。また、セネッセンスとともに葉細胞中の葉緑体数は減少し(4日目)、その形は丸くなり、内部構造は無秩序になった(8日目)。抗SH-EP抗体の金粒子は新鮮葉では液胞のみに局在していたが、セネッセンス葉では液胞に接触または取り囲まれた葉緑体にも分布していた。以上の結果は、セネッセンス葉でのルビスコ分解には液胞プロテイナーゼが関与していることを示している。

## 1aJ07

キュウリ緑葉プロテアーゼの活性調節機構  
一内在性特異的インヒビターによる活性調節—  
山内靖雄、江尻千徳、田中淨 (鳥取大・農・植物機能学)

キュウリ緑葉にはArg、Lys残基のC末端側を切断するpI5.0のプロテアーゼ(CEP5.0)と、Glu残基のC末端側を切断するpI4.5のもの(CEP4.5)が主要なプロテアーゼとして存在する。我々はCEP5.0が葉緑体内に局在し、その活性がArg、ATP、Mg<sup>2+</sup>により制御されていることを明らかにしたが、CEP4.5も内在性の特異的インヒビターにより活性が制御されていることが明らかとなったので報告する。CEP4.5阻害活性を指標としてインヒビターを検索した結果、キュウリ緑葉内には少なくとも生化学的性質の異なる3種類が存在することが分かった。それらのうち、熱安定性の阻害剤が単一に精製され、それは分子量25kDの単量体で、非拮抗的にCEP4.5を阻害するものであった。この阻害物質はCEP4.5と同じくGluのC末端側を認識して切断するV8プロテアーゼや、他の動物、微生物由来のプロテアーゼを阻害しなかったことから、CEP4.5に特異的な内在性インヒビターであることが分かった。

## 1aJ08

葉緑体に局在する Clp プロテアーゼ調節サブユニットの解析

中林 一美、伊藤 正樹、渡邊 昭

(東京大・院・理系・生物科学)

葉緑体に局在する Clp プロテアーゼは、ATPase 活性をもつ調節サブユニットのClpC、およびプロテアーゼ活性を担う触媒サブユニットClpPにより構成されている。シロイヌナズナ Clp 調節サブユニットには、乾燥ストレスで発現する遺伝子として単離された ERD1 のほかに、他の植物種からもホモログの報告のある ClpC が存在する。シロイヌナズナ *clpC* (*AtclpC*) の cDNA を単離し発現解析を行った結果、転写産物の蓄積量は、乾燥ストレス応答、あるいは暗処理や自然老化において転写産物の蓄積量が増加する *Erd1* とは全く異なるパターンを示すことが明らかとなった。この結果は、二つの調節サブユニットが機能的に異なっていて使い分けられていることを示唆する。これら両方の調節サブユニットの性質を調べるために、大腸菌で成熟タンパク質部分を大量発現し、*in vitro* における ATPase 活性を測定しているのでその結果について報告する。

## 1aJ09

ゼンマイ胞子葉緑体に存在する22-kDa蛋白の性質  
井上 弘, 田村英生, 蒲池浩之, 中山耕造<sup>1</sup>  
(富山大・理・生物圏環境, <sup>1</sup>信州大・医・解剖)

ゼンマイの胞子には、乾燥した休眠胞子の葉緑体には存在するが、吸水後の胞子発芽に伴って消失する、独特の蛋白がいくつか存在している。特に、サブユニットの分子量が42kDa近辺の可溶性蛋白群、膜に強く結合している24-kDa蛋白、ゆるく結合している22-kDa蛋白などが、多量に存在している。このうち、22-kDa蛋白は完全に精製されている。また、この蛋白を特異的に分解するプロテアーゼも部分精製されている。このプロテアーゼによる分解産物のN末端アミノ酸配列を参考にしてPCRを行うことにより、22-kDa蛋白の全アミノ酸配列を知ることが計画された。現在までに明らかになった130残基のアミノ酸配列をコンピュータ検索にかけた結果、クロレラのストレス応答蛋白で、グループ3 Lea蛋白のホモログと似ている部分が認められた。このことから、ゼンマイ胞子の葉緑体に存在する22-kDa蛋白は、胞子が形成され成熟する過程において、乾燥に反応して合成されるもので、吸水後の発芽の過程においては、役目が終わった蛋白として、特異的に分解・消失するものと思われる。

## 1aJ10

ホウレンソウ Protoporphyrinogen oxidase-I の葉緑体への移行と局在部位の解析  
渡辺尚英, 蔡晃植, 岩野恵, 高山誠司, 吉田茂男<sup>1</sup>, 磯貝彰  
(奈良先端大・バイオ, <sup>1</sup>理化学研究所・植物機能)

高等植物にはクロロフィル・ヘム生合成共通経路の最終段階を触媒する2種類の protoporphyrinogen oxidase (Protox) が存在し、それぞれ葉緑体とミトコンドリアに局在する。本研究では、葉緑体型と考えられている Protox-I のオルガネラへの移行と局在部位に関する解析を行った。既知の植物 Protox-I の保存配列を基にプライマーを設計し、PCRにより全長のホウレンソウ Protox-I cDNA を単離した。配列解析から、ホウレンソウの Protox-I 遺伝子は、N末端に葉緑体への推定トランジットペプチドを含む563アミノ酸(分子量約60kDa)のタンパク質をコードしており、他の Protox-I と70%程度の相同性を示した。ウエスタンブロット解析により、Protox-I は葉緑体の膜画分に存在することが示唆された。Protox-I のプロセッシング部位およびトランジットペプチド領域を決定するため、ホウレンソウの葉緑体膜画分を Triton X-100 で可溶化した粗酵素抽出液を調製し、免疫沈降法により Protox-I を精製した。そのタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した結果、ホウレンソウ Protox-I は Cys-48 のC末端側でプロセッシングされていることが明らかとなった。そこで Met-1 から Cys-48 の領域と GFP との融合タンパク質をホウレンソウ葉で一過的に発現させたところ、GFP の特異的蛍光が葉緑体で検出された。このことから、Met-1 から Cys-48 の領域が葉緑体へのトランジットペプチドとして機能していることが示された。さらに免疫電子顕微鏡観察から、葉緑体型 Protox の大部分はチラコイド膜に存在しており、一部は包膜に存在していることが明らかとなった。

## 1aJ11

シロイヌナズナに存在する2種類の NADPH-シトクロム P450 還元酵素タンパクの細胞内局在性の解明

村井淳<sup>1</sup>, 山下直輝<sup>1</sup>, Rafael Prieto<sup>2</sup>, 水谷正治<sup>3</sup>, 橋本隆<sup>2</sup>, 太田大策<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪府立大学・農学部, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオサイエンス, <sup>3</sup>京都大学・化学研究所)

ミクロソーム電子伝達系は、NADPH-シトクロム (Cyt) P450 還元酵素 (Fp2), Cyt b5, Cyt b5 還元酵素および、最終電子受容体である Cyt P450 から成る。しかし、これらの電子伝達成分の植物細胞内における相互作用が、P450 モノオキシゲナーゼ活性にどのような影響を与えるかという情報は無い。植物のミクロソーム電子伝達系の特徴は、Fp2 遺伝子が複数個存在することである。例えば、シロイヌナズナには、恒常的に発現する AR1 と、ストレス条件下で発現が誘導される AR2 の2種類の Fp2 遺伝子が存在する。AR1 と AR2 の両タンパクを比較すると、第1エクソンにコードされるN-末端シグナル配列の長さが大きく異なり、この部分のアミノ酸配列にも全く相同性が無いことがわかる。一方、第2エクソン以降にコードされる部分には90%程度の相同性がある。両酵素 cDNA を昆虫細胞で発現させて得られた組換えタンパクには、酵素的な性質の差は無かった。以上より、N-末端のシグナルペプチドが、Fp2 タンパクの生理機能を規定する可能性があると判断した。今回は、AR1 と AR2 の細胞内局在性を明らかにするため、それぞれのシグナル配列をコードする第一エクソン部分を GFP (Green Fluorescence Protein) cDNA に連結し、35S プロモータを用いて、シロイヌナズナ細胞における一過性の発現を観た。いずれの場合も GFP 蛍光シグナルは核膜周辺の顆粒状構造に局在した。また、AR1 と AR2 両遺伝子のプロモータ領域を用いて GUS 遺伝子をレポーターとして発現させたので、両酵素の発現誘導条件についても報告する。

## 1pJ01

モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼによるフェノキシラジカルの還元

崎浜靖子, 真野純一<sup>1</sup>, 佐野智<sup>2</sup>, 浅田浩二<sup>3</sup>, 山崎秀雄  
(琉球大・海洋自然, <sup>1</sup>京都大・食糧科学研, <sup>2</sup>京都府大・農, <sup>3</sup>福山大・生物工学)

モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (MDAR) は、NAD(P)H を電子供与体として、モノデヒドロアスコルビン酸 (MDA) ラジカルをアスコルビン酸に還元する。本研究では、フラボノイドやリグニン前駆体から生じるフェノキシラジカルと MDAR との反応性について報告する。フラボノイドのケルセチンは西洋ワサビペルオキシダーゼ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系で酸化され A380 が減少する。これに MDAR と NADH を添加すると、ケルセチンの酸化は抑制され、NADH の酸化が観察された。この抑制時間は NADH 濃度に依存していた。ESR を用いて測定したケルセチンラジカルの定常濃度は、MDAR と NADH の添加によって著しく減少した。ケルセチン以外の植物性フェノールも、同様の結果を示した。これらの結果は、MDAR は MDA 以外にフェノキシラジカルも基質として還元することを示している。

## 1pJ02

トウモロコシ亜硫酸還元酵素の亜硫酸と亜硝酸に対する基質特異性の改変

中山雅登、長谷俊治 (阪大・蛋白質)

植物型亜硫酸還元酵素(SiR)は、亜硫酸( $\text{SO}_3^{2-}$ )を硫化物( $\text{S}^{2-}$ )に還元し、システイン合成に必要な硫化水素( $\text{H}_2\text{S}$ )を供給する、植物の硫黄同化系の鍵となる酵素の一つである。これは葉緑体ストロマに局在し、光化学系Iからの、またフェレドキシンNADP<sup>+</sup>還元酵素(FNR)によるNADPHの酸化反応から生じる電子を、電子伝達体フェレドキシン(Fd)を経てその反応に利用している。SiRは窒素同化に関与する亜硝酸還元酵素(NiR)と相同性があり、亜硝酸に対する親和性は低いながらもNiR活性も保持している。このようなSiRとNiRとの基質特異性の違いがどのような構造的差異によるものかは明白には分かっていない。

大腸菌SiRでの立体構造解析によって、SiRの補欠分子族シロヘム周辺の塩基性アミノ酸が、その特異的な基質認識に不可欠であると示唆され、一次構造の比較からトウモロコシSiRでもこれらの残基が保存されていることが判明した。我々は大腸菌でのトウモロコシSiR大量発現系と部位特異的変異導入法を利用し、上記塩基性残基を他のアミノ酸に置換したSiR mutantの作製に成功した。これらのmutantのうちR193EおよびR193Aは、野生型と比較して亜硫酸還元活性を著しく低下したが、逆に亜硝酸に対する親和性が野生型よりも増大した。またR193Eは野生型よりも高い亜硝酸還元の分子活性を示した。以上のことから、Arg193はSiRにおいて亜硫酸と亜硝酸を特異的に区別するのに不可欠な残基と考えられ、今回の研究は、SiRとNiRとの機能分化において重要な情報を提供するものと思われる。

## 1pJ03

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803の運動と形質転換に関係するPilTタンパク質の生化学的解析

岡本 忍、大森正之 (東京大院・総合文化・生命)

我々は1999年の植物生理学会で*Synechocystis* sp. PCC6803の運動と形質転換に、slr0161(<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>)が必要なことを報告した。この遺伝子のコードするタンパク質は広くバクテリアの線毛(pili)の生合成や、膜を介したタンパク質の輸送に関係している *pil* 遺伝子群の *pilT* に相同性を持ち、そのアミノ酸配列にATP/GTP結合モチーフである Walker Box とバクテリアのII型タンパク分泌システムに保存されているGSPドメイン (General secretion pathway) が存在した。 *pilT* 遺伝子は病原性のバクテリアの宿主への感染にも必要であり、他のバクテリアでもATPを加水分解し運動のエネルギーを発生するモーターや蛋白質の輸送体の可能性が示唆されているがその全容は解明されていない。

今回、我々はラン藻のPilTをHis-Tagを付けた大腸菌の組み替え型タンパク質として発現させ、精製してその生化学的特性を調べた。その結果、PilTはATPase活性を持つことが明らかになった。PilT-ATPaseはMg<sup>2+</sup>要求性であり、GTPも基質としてATPの60%程度分解することが明らかになった。また抗PilT抗体を用いたウエスタンブロッティングによる免疫染色からPilTは膜画分に存在することも明らかになった。さらに、PilT-ATPaseの表現形への関係の可能性についても併せて報告する。

## 1pJ04

ヒメウキクサのGPIアンカーホスファターゼの細胞壁における存在様式について

錦織美和、長谷昭<sup>1</sup>、奥山英登志 (北海道大院・地球環境科学・環境分子生物、<sup>1</sup>北海道教育大・函館・生物)

ヒメウキクサ (*Spirodela oligarrhiza*) のリン酸飢餓で誘導される purple acid phosphatase (PAP) は GPI アンカータンパク質として合成されるが、細胞膜にアンカリングしているものは極めて僅かで、そのほとんどは GPI 分子中の脂質部分を失った形で可溶性画分と細胞壁に存在する。本研究では PAP の細胞壁における存在様式について検討した。

リン酸飢餓で10日間25℃で培養した植物体を凍結乾燥して微細に粉末化したものを用い、*p*-nitrophenyl phosphate を基質として測定した pH 8.0 におけるホスファターゼの全活性は 301.6 nmol/10 min/mg dry mass (plant) であった。この植物体粉末を 1.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-maleic buffer で抽出、洗浄したあとの画分 (細胞壁) は 35.1 nmol/10 min/mg dry mass (cell wall) のホスファターゼ活性を持っていたことから、*S. oligarrhiza* の全ホスファターゼ活性の約 10% は高塩濃度処理に耐性であった。一方、この細胞壁をセルラーゼとマセロザイムで処理したところ、可溶性 PAP と同じ 57 kDa のサイズを持つ PAP の可溶化がウエスタン法により確認された。細胞壁中の PAP は可溶性タンパク質として細胞壁に機械的に封じ込められているか、細胞壁成分と共有結合しているものと考えられる。

## 1pJ05

タバコ細胞壁酸性ホスファターゼのGPIアンカー分子の検出の試み

金子堯子、松田奈緒、松田明子<sup>1</sup>、岩森正男<sup>2</sup>、(日本女子大・理・物生、<sup>1</sup>日本女子大院・理、<sup>2</sup>近畿大・理工・化)

本実験では、細胞壁APaseとして細胞壁のNaCl-extractを使用した。細胞壁APaseの細胞内前駆タンパク質(Pro-cwAPase)として、細胞内可溶性APaseを使用した。GPIアンカー分子を認識できる抗体を使用してAPaseのGPI分子を検出するために、抗細胞壁APaseウサギ抗体および抗サツマイモAPaseウサギ抗体が、GPI分子を認識できるかを調べた。7種類の糖脂質を用いてTLC-immunostainingを行なった結果、バンドは現れなかった。これらの抗体は、GPI部分を抗原決定基として作製された抗体分子を含まない。GPIタンパク質のPI部分を切断するPL-Cを細胞壁APaseおよびPro-cwAPaseに作用させた。GPIタンパク質であれば、分子量の変化およびゲル上の移動度をHPLCおよびnative PAGEで検出することが可能である。PL-C処理Pro-cwAPaseをHPLCにかけた結果、分子量の変化が認められた。同処理Pro-cwAPaseおよび細胞壁APaseをPAGEにかけてゲル上の移動度の変化を検出したところ、Pro-cwAPaseでは変化が認められた。膜由来のリン脂質を除去したPro-cwAPaseを得るため、ミクロソーム画分を1.0% TritonX-100処理後、DEAE-celluloseカラムにかけNaClで酵素を溶出し活性画分を得た。この画分をnative PAGEで泳動しPro-cwAPaseを含むかを調べたところ、活性画分I、IIが相当した。これらを試料としてGPI分子の検出を試みる。

## 1pJ06

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 培養細胞のグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質  
脇本 貴史、加藤 研治、奥山英登志 (北海道大院・地球環境科学、<sup>1</sup>塩野義製薬・油日ラボラトリーズ)

1995年にクロレラの硝酸還元酵素がGPIアンカータンパク質であることが報告されて以来、ウキクサ、タバコ、バラ、シロイヌナズナなどからもその報告が相次ぎ、植物にもGPIアンカータンパク質が広く存在することが予想されている。本研究では、コケ植物にもGPIアンカータンパク質が存在するかどうかを知ることを、GPIの詳細な構造を明らかにするために適した材料を得ることを目的に、ゼニゴケの培養細胞及び培養液上清中のGPIアンカータンパク質の検索を行った。

まず、ゼニゴケ培養細胞をGPIの前駆体である [<sup>3</sup>H] エタノールアミンと [<sup>3</sup>H] ミリスチン酸でそれぞれ18時間標識し、細胞と培養液中のタンパク質 (分泌タンパク質) を回収して電気泳動を行った。CBBで染色後、ゲルを1mmずつスライスし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に溶解して、放射活性を測定した。その結果、細胞由来するサンプルでは非常に多数のラジオピークが存在するのに対し、分泌タンパク質の場合は、 [<sup>3</sup>H] エタノールアミンによってのみ標識される顕著な1本のピークが50 kDa付近に認められた。そこで、この50 kDaの分泌タンパク質を精製して、アミノ酸組成分析を行ったところ、タンパク質1分子当たりエタノールアミンが1分子、GPIの成分でもあるガラクトサミンが4分子含まれることが分かった。これらの結果は、この50 kDa分泌タンパク質がGPIアンカータンパク質であることを示唆している。また、この50 kDaのタンパク質が、脂肪酸で標識されないのは、細胞膜から遊離する際に脂質成分を失ったためと考えられる。

## 1pJ07

ソラマメ孔辺細胞におけるプロテインホスファターゼ 2A 触媒サブユニット cDNA の単離  
上野裕之、木下俊則、浅沼三和子、島崎研一郎  
(九州大・院理・生物科学)

プロテインホスファターゼ 2A (PP2A) は真核生物において様々な細胞内プロセスを調節することが知られている。孔辺細胞においては阻害剤を用いた研究により、内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネルの活性化やアニオンチャネルの抑制に関与していることが示唆されている。しかし、これまで孔辺細胞から PP2A の cDNA は単離されていない。そこで、本研究ではソラマメ孔辺細胞プロトプラストから PP2A 触媒サブユニット cDNA (vfPP2A-I, vfPP2A-II, vfPP2A-III) を単離し、その性質を調べた。vfPP2A-I と vfPP2A-II は 306 アミノ酸残基、vfPP2A-III は 313 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、既知の PP2A 触媒サブユニットと 80~98% の同一性を示した。RT-PCR 解析の結果、これら PP2A 触媒サブユニットは葉、孔辺細胞、葉緑細胞、根において同程度発現していることがわかった。さらに、vfPP2A-I を大腸菌内で発現させ精製後、プロテインホスファターゼ活性を測定すると、活性は PP2A の特異的な阻害剤であるオカダ酸やカリキュリン A によって阻害された。以上の結果より今回単離した cDNA は PP2A 触媒サブユニットをコードする事が示された。

## 1pJ08

好熱性藍藻 *Synechococcus elongatus* FNR のクローニングとその特性  
中嶋正人、立入愛子、斉藤康雄、和田敬四郎 (金沢大・理・生物)

現在までに多くの高等植物やラン藻から ferredoxin-NADPH oxidoreductase (FNR) のタンパク質、遺伝子が単離され、酵素反応機構など様々な解析が行われている。特に活性中心やフェレドキシンと NADP の結合部位周辺の構造については、結晶構造解析や部位特異的突然変異などの手法を用いることにより、多くの情報が得られている。しかし、酵素活性と構造の相関関係について不明な点が多い。そこで我々は、高温環境に適応した生物の FNR は、構造と機能の相関関係について多くの情報を与えるものであると考え、最適生育温度が 57°C である好熱性ラン藻 *Synechococcus elongatus* の FNR の解析を行った。

*S. elongatus* より FNR を精製し、その酵素活性の特性を明らかにし、他の FNR のそれと比較した。また遺伝子クローニングを行い、遺伝子配列を明らかにした。その結果、mesophilic な FNR タンパク質と高い homology を持つことなどがわかった。今回、すでに明らかになっている FNR の立体構造を視野に入れた検討結果を報告する。

## 1pJ09

キュウリの基質特異性の異なる 2 種の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼは異なった制御下にある  
松井健二、宇治田知可、藤本昌平、梶原忠彦、  
Jack Wilkinson<sup>1</sup>, Bill Hiatt<sup>1</sup>, Vic Knauf<sup>1</sup>  
(山口大・農・応生化、<sup>1</sup>Calgene LLC)

脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ (HPL) はリノレン酸の 13-、または 9-ヒドロペルオキシド (HPO) を開裂し、それぞれから炭素数 6 または 9 のアルデヒドを生成する新規のシトクローム P450 酵素である。これら短鎖アルデヒドは抗菌性、抗虫性を有し、また種々の PR タンパク質の誘導を促す。キュウリには 13-HPO、9-HPO それぞれに特異的な 2 種の HPL が存在する。我々はキュウリ胚軸より HPL cDNA を得た。その配列は報告されている HPL のそれより、むしろ同じ HPO を基質とするジャスモン酸生成に関与するアレノキシドシンターゼ (AOS) により近かった。しかし、大腸菌により発現させた組換えタンパク質には HPL 活性のみが認められ、AOS 活性は認められなかった。キュウリ胚軸 HPL は 9-HPO を最もよい基質とし、13-HPO はその半分程度であった。この基質特異性はキュウリ胚軸粗抽出液に見い出される HPL 活性のそれと類似していたが、根、子葉には 13-HPL 活性が高く、今回得た HPL 以外の 13-HPO 特異的な HPL の存在が示唆された。また、キュウリ葉をジャスモン酸処理すると HPL 活性の上昇が見られたが、この処理では 13-HPL 活性のみが誘導され、9-HPL 活性には変化しなかった。このことからキュウリにおいては 9-HPL と 13-HPL は異なる遺伝子にコードされており、その発現は異なる制御下にあることが示された。

## 1pJ10

クラミドモナスのCDP-diacylglycerol synthase cDNAの単離

佐藤典裕、都筑幹夫 (東京薬大・生命科学)

植物では、CDP-diacylglycerol synthase (CDS)<sup>3</sup>がERと葉緑体に存在し、phosphatidylglycerol (PG)、phosphatidylinositolの合成を担っている。本研究では、植物CDSの構造を明らかにするため、緑藻クラミドモナスからCDSのcDNAを単離した。まず、酵母等のCDS間で保存されたアミノ酸配列を基にprimerを作製し、クラミドモナスでRT-PCRを行った。次いで、増幅されたDNA断片をプローブとして、クラミドモナスのcDNA libraryをスクリーニングした。得られたcDNAクローンには、既知のCDSとアミノ酸レベルで26~46%の相同性を示すタンパク質(456アミノ酸残基)がコードされ、そのN末端領域には葉緑体への移行シグナル様の配列は無かった。また、3'側の非翻訳領域にはポリ(A)付加シグナル(TGTAA)とポリ(A)配列が存在した。本cDNAをラン藻のCDS欠損株で発現させると、そのPG要求性を相補した。以上の結果は、本cDNAが非葉緑体型、恐らくはER型CDSをコードすることを示している。

## 1pJ11

シロイヌナズナにおける3つのMGDG合成酵素遺伝子の発現およびGFPを用いた局在部位の解析

粟井光一郎, Eric Maréchal\*, Maryse A. Block\*, 増田建, 島田裕士, Roland Douce\*, Jacques Joyard\*, 高宮建一郎, 太田啓之 (東工大, 生命理工, 生命科学; \*CNRS/CEA, Grenoble, France)

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) は、光合成生物に特徴的な糖脂質である。我々はこれまで、シロイヌナズナより2種類のMGDG合成酵素遺伝子(MGDA, MGDB)の単離を報告したが、最近シロイヌナズナのゲノムプロジェクトより、新たなMGDG合成酵素遺伝子の存在が明らかとなった。そこで、この遺伝子(MGDC)のcDNAを単離し、比較解析を行ったので報告する。これまで、生化学的解析からMGDG合成酵素は葉緑体包膜に局在していることがハウレンソウやエンドウを材料として報告されている。そこで我々は今回明らかとなったシロイヌナズナの3つのMGDG合成酵素それぞれのGFP融合タンパク質を作製し、細胞内での局在を調べた。その結果、ハウレンソウなどと同様、シロイヌナズナのMGDG合成酵素も葉緑体包膜に局在していることが確認できた。これは、葉緑体包膜のタンパク質の局在をGFPを用いて解析した初めての例である。現在、それぞれの遺伝子についてmRNAの発現解析を行っており、それについても報告する予定である。

## 1pJ12

キュウリMGDG合成酵素遺伝子の5'上流域を結合したルシフェラーゼ遺伝子の光およびサイトカイニンに対する応答  
金井大輔、山領和紀、粟井光一郎、増田建、島田裕士、高宮建一郎、太田啓之 (東工大・生命理工・生命科学)

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)は、高等植物のチラコイド膜脂質の約50%を占めており、膜の主要構成脂質としての機能のみならず、光合成機能の発現にも重要な役割を担っていると考えられている。MGDGはMGDG合成酵素と呼ばれる糖転移酵素により合成される。この酵素は、光照射やサイトカイニンを処理したキュウリ黄化子葉においてその活性が増加することが分かっているが、発現制御機構に関してはほとんど分かっていないのが現状である。そこで、MGDG合成酵素の発現制御の詳細を調べるために、ゲノム遺伝子の単離と5'上流域の解析を行った。まずキュウリMGDG合成酵素のcDNAの一部をプローブとしてキュウリゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、単離したクローンの塩基配列を決定した。プライマーエクステンション法により決定された転写開始点より上流域にはTATA boxの他に、光に対して応答すると考えられているGT-1様のboxなどが見出された。次に、この上流域をルシフェラーゼ遺伝子の5'上流につなげたconstructを作製し、パーティクルガンを用いてキュウリ黄化子葉に導入したところ、光とサイトカイニン処理に対してルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。よってこのMGDG合成酵素の上流域には光やサイトカイニンに応答するシス領域が存在すると考えられた。

## 1pJ13

エンドウアセチルCoAカルボキシラーゼの研究

レドックスに応答する組換え型酵素の発現

木崎 暁子、蒲田 浩一郎、永野 幸生、井口 ひろ、佐々木 幸子 (名大・生命農学研究科・生物情報)

葉緑体に存在するアセチルCoAカルボキシラーゼ(ACCase)は植物の脂肪酸合成の調節酵素である。植物の脂肪酸合成は明暗により制御されるが、これは葉緑体のACCase活性が明暗により制御されているためである。我々はエンドウ葉緑体のACCase活性が、レドックスカスケードにより制御されていることを示してきた(1)。また、ACCase活性は、ピオチンカルボキシラーゼ(BC)活性とカルボキシルトランスフェラーゼ(CT)活性からなるが、このうちCT活性がレドックス制御を受けることを報告した(2)。

カルボキシルトランスフェラーゼのレドックス制御を分子レベルで明らかにするために、組換え型酵素を大腸菌で発現させた。精製した組み換え型CTは、葉緑体から精製したCTと同様に、還元剤であるDTTの添加によってはじめて活性がみられるという、レドックス応答性を示した。今回は、この組換え型CTの諸性質について解析したので報告する。

(1)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 11096-11101 (1997)

(2)Biochem. J. 339, 541-546 (1999)

## 1pJ14

エンドウアセチル CoA カルボキシラーゼの研究  
レドックス制御に関わるシステイン残基の検討

真弓慶子、木崎咲子、佐々木幸子 (名大・生命農学研究所  
・ 生物情報)

これまでの実験で、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) のカルボキシルトランスフェラーゼ (CT) がレドックス制御を受けることが明らかになっている。CT は、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットからなり、 $\alpha$ サブユニットには2個、 $\beta$ サブユニットには11個のシステイン残基が存在する。

本研究では、レドックス制御を分子レベルで明らかにするために、葉緑体から精製したCTと同じ性質をもつ組換え型の酵素を用いて検討した。

まず、種々の生物のCTで保存されている領域のみの組換え型CTを発現したところ、活性はwild typeの酵素と同様にレドックス制御を受けた。これより、保存領域にあるシステイン残基がレドックス制御に関与していることが明らかになった。そこで、保存領域にあるシステイン残基をセリン残基に変えた酵素をつくり、どのシステイン残基が活性調節に関わっているか検討した。

## 1pJ15

カボチャの器官発達過程におけるプラスチド型グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼアイソザイムの役割について

杉浦雅子、榎亜希子、西田生郎 (東大・院理・生科)

プラスチド型グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT; EC 2.3.1.15) は、プラスチド膜脂質合成系への脂肪酸供給量を調節する酵素である。我々は、最近、カボチャ (*Cucurbita moschata*) には少なくとも2つのGPATイソ遺伝子 (SQAT1, SQAT2) が存在することを明らかにした。

今回、プラスチド膜脂質合成が盛んであると考えられるカボチャの器官発達過程に注目し、SQATイソ遺伝子に対する特異プローブを用いてRNAゲルプロット解析を行った。その結果、SQAT1転写産物は、調べたカボチャ器官ではほぼ一定であったのに対し、SQAT2転写産物は本葉の発達、花卉の発達、子葉の緑化に伴って増加した。これらの結果は、SQATアイソザイムがカボチャ器官の発達において生理学的に異なる役割を持つことを示唆している。イムノプロットによるタンパク質レベルのアイソザイムの挙動と合わせて報告する予定である。

## 1pJ16

シロイヌナズナのスフィンゴ脂質長鎖塩基合成酵素cDNAのクローニング

田村謙太郎、今井博之<sup>1</sup> (甲南大・院・自然科学、<sup>1</sup>甲南大・理・生物)

スフィンゴ脂質は細胞膜や液胞膜に存在し、低温ストレス条件下でのこれら膜系における物理的変化を引き起こす主要な脂質成分である。しかしこの脂質が植物においてどのような分子機構で生成されるのかについては不明である。そこで本研究では、植物のスフィンゴ脂質合成系の最初のステップを触媒する鍵酵素セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) について、そのcDNAをシロイヌナズナからクローニングした。

酵母 (*S. cerevisiae*) のSPTサブユニット (LCB2) と相同性のあるタンパク質をコードしたcDNAをシロイヌナズナEST DataBaseより検索し、PCR法によりクローニングした。クローニングしたcDNAは、既知のLCB2と相同性の有る490アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており、SPTの補酵素であるピリドキサル5'-リン酸の結合モチーフを有していた。このcDNAを大腸菌において発現させると*in vivo*及*in vitro*において新たにSPTの反応産物であるスフィンガニンの生成が認められた。以上の結果からこのcDNAがシロイヌナズナSPTをコードしていることが確認された。

## 1pJ17

シロイヌナズナのスフィンゴ脂質長鎖塩基キナーゼcDNAのクローニング

西浦英樹、今井博之<sup>1</sup> (甲南大・院・自然科学、<sup>1</sup>甲南大・理・生物)

スフィンゴ脂質長鎖塩基キナーゼは、スフィンゴ脂質の合成、分解経路でできるスフィンゴ脂質長鎖塩基 (LCB) をリン酸化し、LCB 1-リン酸 (LCBP) の合成を触媒する酵素である。植物において、マイコトキシンなどのセラミド合成阻害剤の作用によりLCBが細胞内に蓄積し、これがシグナルとなってプログラム細胞死の誘導が促進されることから、LCBキナーゼの発現制御が細胞の生死を決定する重要なステップであると考えられる。本研究では、シロイヌナズナを用いてマウスのLCBキナーゼと相同性のあるcDNAのクローニングを行い、大腸菌での発現を試みた。

得られたcDNAクローンは764アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており、一般的なキナーゼとは異なるLCBキナーゼ特有のボックスと高い相同性が見られた。このcDNAをHis-tagとの融合タンパク質として大腸菌において発現させ、SDS-PAGEで分析したところ、予想される分子量85,000付近に融合タンパク質の存在を確認した。

## 2aJ01

### シロイヌナズナゲノムプロジェクト

ゲノム塩基配列決定と全塩基配列再注釈の進行状況

中村保一、金子貴一、加藤友彦、佐藤修正、浅水恵理香、小谷博一、田畑哲之(かずさDNA研究所)

我々は高等植物における遺伝情報の全体像を理解することを目的とし、モデル植物であるシロイヌナズナゲノムの全塩基配列を決定するゲノムプロジェクトを進めている。日米欧の6グループによる国際協調プロジェクト AGI (Arabidopsis Genome Initiative) により2000年7月に全塩基配列の解析完了を予定しており、我々のグループでは3番染色体並びに5番染色体の特定の分担領域について塩基配列の決定を行ない、計算機による自動解析と注釈作業システムによる高速な解析をすすめてきている。決定した塩基配列情報は相同性検索ならびに遺伝子コード領域予測を行ない、WWW サイトおよび国際DNAデータベースを通じて順次公開している。現在、本研究グループ以外から公開された塩基配列についても同じシステムで再解析し、AGI 由来のすべての塩基配列解析情報を閲覧可能なサイトを公開している [http://www.kazusa.or.jp/kaos/]。1999年12月現在、1,117 クローン、約91メガベース分の塩基配列の再解析を終了し、閲覧、相同性ならびにキーワード検索などの情報を公開している。塩基配列解析を自動化したシステムと遺伝子構成予測のための専用インタフェースを組み合せ、高速な塩基配列再注釈作業を進めており、シロイヌナズナ全塩基配列の高精度な解析情報を WWW を通じて提供するための準備をすすめている。

## 2aJ02

シロイヌナズナ、ミヤコグサ、クラミドモナス、スサビノリの EST 解析

浅水恵理香<sup>1</sup>、中村保一<sup>1</sup>、佐藤修正<sup>1</sup>、福澤秀哉<sup>2</sup>、中嶋舞子<sup>3</sup>、田畑哲之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>かずさDNA研、<sup>2</sup>京大・院生科、<sup>3</sup>東海大・海洋研)

植物のゲノム解析はシロイヌナズナやイネを中心として進められている。これらの系では、ゲノム塩基配列の決定と構造情報を利用したゲノムレベルでの包括的な機能解析によって、植物が共通に持つ基本的性質に関する理解が深まることが期待される。しかしながら、これら2種類のモデル植物でさまざまな植物が顕す多様性を説明することは困難である。そこで、我々は、いくつかの代表的な植物種のもつ遺伝情報をシロイヌナズナと比較することによって、各植物独自の遺伝子レパートリーや発現制御システムを明らかにすることを目的として、大規模なEST情報の蓄積を進めている。材料としては、ゲノム解析や分子遺伝解析が可能なミヤコグサ(マメ科)、クラミドモナス(単細胞緑藻)、スサビノリ(多細胞紅藻)を選び、各材料より作製した均一化ライブラリーおよびサイズ分画ライブラリーを用いてEST解析を行った。

## 2aJ03

シロイヌナズナ DNA アレイの作製と遺伝子発現解析

柴田大輔、浅水恵理香、天谷 正行、津金 胤昭、桑田 主税、深見 正信、中村保一、金子貴一、田畑哲之(かずさDNA研)

シロイヌナズナの全ゲノム塩基配列解読は2000年夏ごろにはほぼ終了すると見込まれている。ゲノム解析プロジェクトから得られる膨大な遺伝子情報を活用する方法の一つとして、DNA アレイ技術が開発されてきた。DNA アレイとは、ゲノムに含まれる多くの遺伝子を網羅的に集め、それらを適当な支持体に固定し、それをテンプレートとして、mRNAを鋳型として調製したcDNA プローブでハイブリダイゼーションを行う技術である。各ステップに関して、様々な技術が開発されている。シロイヌナズナのDNA アレイに関しては、既に、かずさDNA研究所においてゲノム塩基配列解読に際して使用したゲノムクローンをを用いたアレイ(ゲノムDNAアレイ法)をすでに発表している(本年会第38回シンポジウム)。本研究では、かずさDNA研究所で単離したシロイヌナズナのESTクローンをを用いてDNAアレイを作製し、各種の条件下で生育させたシロイヌナズナの遺伝子発現を解析した。DNAアレイ技術の詳細を報告する。

## 2aJ04

DNA アレイを用いたジャスモン酸応答性遺伝子群のゲノム規模での解析

佐々木結子、浅水恵理香<sup>1</sup>、柴田大輔<sup>1</sup>、中村保一<sup>1</sup>、金子貴一<sup>1</sup>、栗井光一郎、増田建、島田裕士、高宮建一郎、太田啓之、田畑哲之<sup>1</sup> (東工大・生命理工・生命科学、<sup>1</sup>かずさDNA研究所)

ジャスモン酸はエリシター応答・ファイトアレキシン合成などの病傷害応答の他、光合成・発芽・根の成長に対して抑制的に、栄養貯蔵・花芽形成に対して促進的に作用することが知られており、第7番目の植物ホルモンとして注目されつつある。しかし受容体の単離も含め、ジャスモン酸応答に関与する制御因子の解析は他の植物ホルモンに比べ遅れている。

本研究ではシロイヌナズナにおいてジャスモン酸に応答する遺伝子をゲノム規模で解析することにより、ジャスモン酸による情報の伝達経路を明らかにすることを目的とし、ナイロンメンブレン上に約3,000のESTクローンをプロットしたcDNAマクロアレイフィルターを用いてジャスモン酸誘導性遺伝子の単離を行った。30μMのジャスモン酸メチルで12時間処理したシロイヌナズナおよび未処理のシロイヌナズナからmRNAを抽出し、α-<sup>32</sup>P dCTPの存在下で逆転写反応を行って標識一本鎖DNAを合成した。得られたDNAをcDNAマクロアレイフィルターとハイブリダイズさせた結果をジャスモン酸メチル処理と未処理もので比較したところ、ジャスモン酸メチルに反応するスポットが複数得られた。本発表では、これらの遺伝子について解析した結果を報告する。

## 2aJ05

シロイヌナズナのFunctional Genomics - ジーン・エンハンサートラップ法による遺伝子発現の網羅的解析  
加藤友彦、佐藤修正、田畑哲之（かずさDNA研）

シロイヌナズナ全ゲノムの塩基配列決定作業は2000年7月に終了する見通しであり、これによってさまざまな手法を用いた遺伝子の機能解析が加速されることが予想される。植物においては、多数のタグラインを作製することが、遺伝子の機能解析を進めるうえで重要な手法となる。我々は、包括的な遺伝子の機能解析にむけてT-DNAタグラインの大規模な作製を進めている。この際、個々の遺伝子の発現パターンを解析する目的で、GUS遺伝子をレポーター遺伝子としたジーン・エンハンサートラップのシステムを導入している。またT-DNAの中にはAc/Ds系トランスポゾンが含まれており、T-DNA挿入位置からさらにトランスポズンを転移させ近傍の遺伝子を破壊することが可能である。現在までに15000ラインのタグラインを作製し、そのうち6,000ラインについてGUS染色による発現パターンの解析を行った。

## 2aJ06

EFFICIENT AGROBACTERIUM-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION BY SUCROSE OR SALT PRE-TREATMENT OF COTYLEDONS IN *PANAX GINSENG* AND *DAUCUS CAROTA*

Y.E. CHOI, T. KUSANO, H. SANO, Research and Education Center for Genetic Information, Nara Institute of Science and Technology, Nara 630-0101, Japan

Plasmolysis pretreatment by 1.0 M sucrose or 0.3 M MgSO<sub>4</sub> strongly enhanced direct somatic embryo formation from cotyledons of *Panax ginseng* and *Daucus carota*. The number of somatic embryos per cotyledon highly increased and somatic embryos were formed directly from single epidermal cells of cotyledon surface. When cotyledon explants of *Panax ginseng* and *Daucus carota* were pretreated with 1.0 M sucrose or 0.3 M MgSO<sub>4</sub> before co-cultivation with *Agrobacterium* harboring GUS gene, transient expression of GUS gene was greatly enhanced. In cotyledon explants without sucrose or MgSO<sub>4</sub> pretreatment, few GUS positive spots constituted with a group of cells were observed to scatter on cotyledon surface. In cotyledons after sucrose or salt pretreatment, transient expression of GUS gene were detected in large areas of tissues of cotyledon explants. Similar results were observed in pretreated embryogenic calli. Using this method, we rapidly obtained transgenic plants at high frequency.

## 2aJ07

リポソームに再構成された光化学系I複合体のサーモライシンによる消化  
佐々木毅、小谷俊之、唐澤智司、和田敬四郎、星名哲（金沢大・理・生物）

光化学系I(系I)複合体は少なくとも13個のサブユニットで構成されており、そのうち大型のPsaA, PsaBは、ヘテロダイマーとして初期電子供与体P700とそれに続く3つの電子受容体(A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, Fx)を配位し、電子伝達の主な場を形成している。それらの構造と機能についてX線結晶構造解析や形質転換株の解析から、P700やFxの結合部位などを含めたC末端側の情報が得られている。しかしながら、N末端側の構造は不明な点が多い。本研究では系I反応中心複合体の構造や機能を明らかにするため以下の実験を行った。

ホウレンソウの葉緑体チラコイド膜よりPsaA, PsaB, PsaKを含む系I反応中心複合体を調製し、凍結融解法によりホスファチジルコリンのリポソームへ再構成した。この再構成膜をサーモライシンで処理後、得られた断片をアミノ酸シーケンサーとMADI-TOF質量分析計で解析した。さらに、ショ糖密度勾配遠心法によりクロロフィルを含む断片を得た。この断片は、約30KDaであった。得られた系I反応中心複合体の消化産物の性質について報告する。

## 2aJ08

P700濃縮粒子のアルカリ処理：P700およびA<sub>0</sub>(A)のみを特異的に変性させる方法  
池上勇（帝京大・薬）

今回、P700当たり10個のChl aしか含まない光化学系I標品を用いて、P700とA<sub>0</sub>(A?)のみが特異的に変性する条件を確立したので報告する。

1. pH11.5、10°C処理したとき、P700の還元条件下(1 mM Ascorbate)では、695 nm吸収成分(P700の還元型)と共に686 nmに吸収を持つ成分(A<sub>0</sub> or A?)がbleachする。時間と共にP700の変性速度は鈍化するが、686 nm吸収成分の変性速度は変わらない。
2. P700の酸化条件下(酸化剤無し)では、686 nmに吸収を持つ成分(P700の酸化型とA<sub>0</sub>(A?))のみがbleachし、還元条件下のものに比べその形は著しくsharpになる。
3. 変性の速度はpHと温度がいずれも高くなるほど早くなる。また、変性は不可逆的で、アルカリ処理後、pH8に戻しても回復しない。
4. この変性に伴って、生残っているP700の定常光による光酸化は著しく阻害される。即ち、P700<sup>+</sup>-A<sub>0</sub>の電荷再結合の確率が上昇すると共に、P700光酸化の量子収率も著しく低下する。

## 2aJ09

植物と細菌のもつ光化学系 I 型反応中心の電子受容体クロロフィル $a$  ( $A_0$ )と鉄硫黄センターの比較

伊藤 繁、岩城雅代、大岡宏造<sup>1</sup>、深見佳枝<sup>1</sup> (基生研、阪大理生物<sup>1</sup>)

ホウレンソウの光化学系 I 反応中心の電子受容体 Chla-686 ( $A_0$ )、緑色硫黄細菌 *Chloobium tepidum* の  $A_0$  となるクロロフィル $a$  異性体、*Heliobacterium modesticaldum* の  $A_0$  8-OH-Chl  $a$  の 77K での反応とスペクトルを比較した。系 I の  $A_0$  はエーテル抽出でキノンを除くと P700\* との電荷再結合速度が 100ns になり 686nm にピークを示す。*Chl. tepidum* 反応中心をウレア処理してキノンと鉄硫黄センターを除くと 45ns の P 840\*  $A_0$  間の電荷再結合がみられ、 $A_0$  は 670nm にピーク、P 840\* に応じた 668nm を中心にアクセサリー Chl らしいシフトがみられた(1)。*H. modesticaldum* RC にウレア処理は効かず、スクロースモノラウレート処理でコア蛋白だけにすると P798\*  $A_0$  状態が 100ns で減衰し、668nm に  $A_0$  ピークがみられた。P798\* とともに赤色シフトする色素も同じ中心波長を示した。FeS センターの反応とあわせて、構造との関連を検討する。(1) *Iwaki et al. (1999) Plant Cell Physiol. 40, 1021*

## 2aJ10

パルス EPR による光化学系 II の電子伝達体配置：  
 $Q_A$  と Cyt  $b_{559}$

河盛阿佐子<sup>1</sup>、東中資喜<sup>1</sup>、黒岩繁樹<sup>2</sup>、赤堀構造<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>関学大理、<sup>2</sup>東大総合文化、<sup>3</sup>広大総合科学)

パルス EPR の ELDOR (電子 2 重共鳴) 法で 2 個の常磁性対の双極子相互作用を観測し、得られた  $D_0 = g\beta/r^3$  から距離  $r$  を決定し、また膜配向光化学系 II (PS II) のスペクトルの磁場依存性より、膜法線からの距離ベクトル  $r$  の方向を決めることができる。

トリス処理した PS II Core 膜の非ヘム鉄を亜鉛に置換し、摂氏 0 度で 8 分光照射し、3 分暗所においてから 77 K で凍結する。約 8 K で酸化した Cyt  $b_{559}$  のスピンエコーを 9.5GHz で間隔 1.5 $\mu$ s の第 1 と 3 パルスで観測し、9.6GHz の第 2 パルスで  $Q_A$ -スピンを倒す時間を 0 から 1.5 $\mu$ s の範囲で変えると振動スペクトルが得られる。これより距離が 40Å と決定できる。さらに膜配向したスペクトルの角度変化についてこの  $r=40\text{\AA}$  と膜法線からの角度  $\pm 70^\circ$  を使用して最適の fitting が得られた。

## 2aJ11

ギ酸処理による PSII 電子伝達阻害の EPR 研究  
勝田延宏<sup>1</sup>、河盛阿佐子<sup>1</sup> Yashar M. Feyziev<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>関学大・理・物理、<sup>2</sup>Academy of Sciences, Azerbaijan)

ギ酸処理により、受容体側の鉄に配位している重炭酸 ( $\text{HCO}_3^-$ ) とギ酸 ( $\text{HCOO}^-$ ) との置換が起こり、それに伴い電子伝達も阻害されることはよく知られているが、最近、ギ酸は供与体側の水分解系 Mn にも配位するという報告があり、今回の実験ではそれを EPR 信号の観測により確認することを目的とした。

ギ酸処理された PSII の EPR 信号は、ギ酸濃度と共に  $Q_A^- \text{Fe}^{2+}$  信号が出現し、変わりに、水分解系 Mn cluster の  $S_2$  multiline の減少が見られ、その増減は線形関係になる。また酸素活性も減少し、その状態での水分解系からの電子伝達の様子を、主にチロシン Z ラジカルの時間分解 EPR の測定により推測した。詳細は当日議論する。

(1) Klimov V.V. et al., *Biochemistry* 1997,36,16277

## 2aJ12

光合成の光阻害における活性酸素の作用機構  
西山佳孝<sup>1</sup>、山本宏<sup>2</sup>、横田明穂<sup>2,3</sup>、村田紀夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>基生研、<sup>2</sup>RITE、<sup>3</sup>奈良先端大・バイオ)

強光ストレスにより光化学系 II 複合体は不可逆的な損傷を受けるが、同時に D1 タンパク質をはじめ構成成員の新規合成により修復される。光阻害は活性酸素による複合体の損傷に起因すると考えられているが、これは *in vitro* の実験系から導き出された仮説であり、生体内の現象を直接反映しているかどうかは不明である。本研究では、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を用いて、光阻害における活性酸素の作用を *in vivo* で解析した。生細胞を methyl viologen や  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、Rose bengal の存在下で強光にさらすと、いずれの場合も光化学系 II の光阻害が促進した。しかし、その際にタンパク質合成阻害剤 chloramphenicol を共存させると、これらの化合物による光阻害の促進は見られなかった。これら結果は、活性酸素が光化学系 II の光損傷過程ではなく修復過程を阻害することを示唆している。

## 2aJ13

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の光化学系IIサブユニット *psbK* 破壊株の強光阻害  
岡田克彦、池内昌彦<sup>1</sup>、都筑幹夫（東京薬科大・生命科学、<sup>1</sup>東京大・教養・生物）

チラコイド膜上の電子伝達反応成分の一つ光化学系II反応中心複合体は 20以上のサブユニットからなる複雑な巨大タンパク質複合体である。そのサブユニットの一つ PSII-Kは *psbK* 遺伝子由来の分子量 3.9 KDa の膜貫通型のタンパク質である。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 では *psbK* とその上流の *sll1752* を含む領域の遺伝子破壊株での研究から、PSII-K を欠く光化学系II反応中心複合体では電子伝達速度が低下することが報告されている。本研究では、*psbK* 遺伝子のみを破壊した株を作製し、強光照射下で光合成が阻害を受ける強光阻害過程への PSII-K タンパク質の有無の影響を調べた。*psbK* 遺伝子破壊株の光化学系IIは強光による損傷を受けやすいことが分かった。強光下で *psbK* 遺伝子破壊株の光化学系IIが野生株よりも速く失活し、その後通常光下に戻したときの回復過程も遅くなっていることが分かった。これらの結果は PSII-Kの欠如が光化学系IIの不安定化をもたらすことを示唆している。

## 2aJ14

系II活性の強光阻害とその後の回復におけるPsbTの役割  
大西紀和、高橋裕一郎（岡山大・理・生物）

系II複合体のPsbTは、葉緑体にコードされた小型で疎水性のサブユニットである。*psbT*欠損株の生育は、強光照射下で著しく阻害される。すでに我々は、野生株と欠損株の系IIタンパクの光分解速度が同じであることを示し、PsbTが光損傷した系IIタンパクの修復過程に関与していることを示唆した。本報告では、系II活性の光阻害およびその後の回復過程におけるPsbTの役割を調べた。

野生株と *psbT*欠損株に4時間強光照射を行うと、酸素発生活性は野生株では約50%、欠損株では約10%に減少した。ところが、葉緑体タンパク合成阻害剤を添加した時の光失活の速度は、両株で同じであった。さらに、15分の強光照射後に弱光下で系II活性の回復を調べると、欠損株の活性の回復は野生株よりもおよそ4倍も遅かった。従って、PsbTサブユニットは光損傷を受けた系II活性の効率的な回復において重要な役割を果たしていると結論した。

## 2pJ01

光化学系2酸素発生系23kDaタンパク質のN末端部位の役割  
伊福 健太郎<sup>1</sup>、佐藤 文彦<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農・応生科、<sup>2</sup>同・生命・統合生命)

光化学系2酸素発生系23kDaタンパク質(OEC23)は、水分解反応に必須なCa<sup>2+</sup>とCl<sup>-</sup>の反応中心への結合に関わると考えられている。しかしながらそのイオン局在化機構は未だ明かではない。

我々は、異なる植物由来のOEC23を大腸菌を用いた発現系で調製し、その機能を塩処理によってOEC23を外したハウレンソウ光化学系2との再構成実験により比較した。その結果、各OEC23分子種間で酸素発生を回復する機能に差がある事を認めた。そこでOEC23分子種間で数種のキメラタンパク質を作製し、各々の機能を解析した結果、N末端側にイオン局在化能に影響をもつ重要な部位が存在する事が明らかとなった。さらに部位特異的アミノ酸置換による変異導入OEC23を用いて解析した結果、15番目のアスパラギンの位置の電荷が重要である事を認めた。現在、N末端部位を欠失させたタンパク質を用いた解析、並びにOEC23と直接結合していると考えられるOEC18存在下における解析を進めている。

## 2pJ02

系II複合体の生合成におけるPsbKタンパクの役割  
杉本育代、高橋裕一郎（岡山大・理学部・生物）

PsbKは小型で疎水的な系IIサブユニットで、緑藻クラミドモナスの*psbK*欠損株の解析から系II複合体の分子集合や安定性に必須であると報告されている。本研究では、PsbKに対する抗体を作製し、このサブユニットの存在部位や機能をより詳細に解析した。

ウェスタン分析によりPsbKは細胞内でチラコイド膜に局在し、ドデシルマルトシドを用いて単離した系IIコア標品にすべて結合していることが示された。現在、系II複合体の部分解体により複合体内でのPsbKの存在部位を解析している。

次に、暗所では黄化する *y-1*変異株を用いて、緑化過程でのクロロフィルや系IIタンパクの合成・蓄積を調べた。PsbKと系IIタンパクは黄化細胞には検出されなかったが、緑化初期にPsbKはクロロフィルや系IIの主要なタンパクよりも少し早く蓄積されることがわかった。したがって、PsbKは比較的早い段階で系II複合体に分子集合すると考えられる。

## 2pJ03

光化学系 II 酸化側光阻害における酸素の関与について

逸見隆博, 水澤直樹<sup>1</sup>, 宮尾光恵<sup>1</sup>, 山本 泰 (岡山大・理・生物, <sup>1</sup>農水省・生物研)

光化学系 II の光阻害は酸化側と還元側の異なる二つの機構で起こることが知られている。還元側光阻害には、過剰な光照射によって引き起こされる光化学系 II 反応中心での電荷の再結合と、それによって酸素から誘導される一重項酸素が関与している。一方、酸化側光阻害は、光照射によって生じる P680<sup>+</sup> や TyrZ<sup>+</sup> のような光化学系 II の内在性カチオンラジカルが原因で引き起こされ、還元側光阻害とは対照的に酸素は関与しないと考えられている。この研究では、Tris (0.8 M, pH 9.0) または NH<sub>2</sub>OH (5 mM, pH 6.5) で処理した光化学系 II 膜標品を用い、酸化側光阻害における酸素要求性について再検討した。その結果、①電子伝達活性の失活は酸素の存在に依存しない、②色素の光褪色は嫌気条件下では抑制される、③D1 タンパク質の架橋反応には酸素を必要とするものとしなないものがある、④D1 タンパク質の分解には酸素が必要であることがわかった。これらの結果から、還元側光阻害だけでなく酸化側光阻害においても活性酸素分子種が関与している可能性が考えられる。

## 2pJ04

光化学系 II 反応中心蛋白質 D1 とシトクロム b<sub>559</sub> αサブユニットとの架橋産物のストロマプロテアーゼによる分解

フェルジャンニ アリ, 安部紗央里, 山本泰 (岡山大・理・生物)

光化学系 II 反応中心蛋白質 D1 は光ストレスの主な標的であり、過剰な光によって損傷を受け分解される。また、この時 D1 蛋白質はシトクロム b<sub>559</sub> の αサブユニット、D2、CP43 との架橋産物およびアグリゲートが生じることが知られている。本研究では、光阻害の過程におけるこれら D1 タンパク質の架橋産物のうち、特に D1/Cyt b<sub>559</sub> αサブユニットの架橋産物の代謝回転を調べるため、ホウレンソウから単離した PS II 膜標品および葉緑体ストロマ画分を用いて実験を行った。その結果、光照射によって生じる D1/Cyt b<sub>559</sub> α架橋産物は、ストロマ画分を加えてインキュベートすることによって特異的に分解されることが分かった。また、ストロマのプロテアーゼ活性は pH 8.0 に至適 pH をもち、ATP を分解するアピラーゼの添加によってその活性が阻害された。また、架橋産物の分解過程は架橋産物のリン酸化 / 脱リン酸化による調節を受けることがわかった。関与するプロテアーゼ同定は出来ていないが、現在その部分精製を進めている。

## 2pJ05

チラコイドルーメン中のプロテアーゼによる光損傷 D1 タンパク質の分解

友川裕加, 山本 泰 (岡山大・理・生物)

葉緑体のチラコイドルーメン中には、酸素発生系 OEC タンパク質プールの他、多くのタンパク質が存在するが、それらの機能はよく分かっていない。強光照射による光阻害により、光化学系 II (PS II) 反応中心タンパク質 D1 は他のサブユニットと比べ速い turnover を示し、速やかに分解される。今回、ルーメン成分を保持する無傷のチラコイドを強光照射したところ、PS II 膜標品の強光照射では見られない分子量 14kDa 以下の多数の D1 分解産物が観察された。この D1 分解産物は、無傷チラコイドを TritonX-100 処理して得られた broken チラコイドの光照射では見られないが、Triton 処理で得られたルーメン成分を含む画分を broken チラコイドに加えて光照射すると再び検出された。このルーメン画分には、カゼイン分解活性があった。現在この画分の性質を更に解析中である。

## 2pJ06

*in vivo*での光化学系 II D1 蛋白質分解経路の解析

水澤直樹<sup>1,2</sup>, 徳富 (宮尾) 光恵<sup>2</sup> (<sup>1</sup>生研機構, <sup>2</sup>農水省・生物研)

*in vivo*での D1 蛋白質の分解機構を明らかにするため、強光照射下での D1 蛋白質分解の様相を、生葉葉片、無傷葉緑体およびチラコイド膜とで比較検討した。

チラコイド膜に強光を照射すると、D1 蛋白質の切断と D1 蛋白質と他の反応中心蛋白質との架橋反応が並行して進行する。無傷葉緑体と葉片に強光を照射すると、チラコイド膜と同様に D1 蛋白質は切断されたが、D1 蛋白質を含む架橋産物はほとんど蓄積しなかった。一方、強光照射で架橋産物を生成させたチラコイド膜に ATP またはストロマ画分を添加すると、暗所で架橋産物が速やかに分解されることがわかった。これらの結果は、架橋産物の分解には、ストロマ局在性プロテアーゼとチラコイド膜に結合している ATP 要求性プロテアーゼの 2 種類が関与していること、および、葉片と無傷葉緑体で生成した架橋産物が速やかに消化されることを示している。また、強光を照射して D1 蛋白質断片を生成させたチラコイド膜に Zn<sup>2+</sup> を添加し暗所に静置すると、D1 蛋白質断片がさらに分解されることがわかった。このことは、D1 蛋白質切断断片はチラコイド膜結合性メタロプロテアーゼで分解されることを示している。以上の結果から、*in vivo*では、D1 蛋白質は架橋産物と一次切断断片を中間体とする複数の分解経路で完全分解されることが示唆された。

本研究は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた。

## 2pJ07

系II反応中心タンパクD1のC末領域の酸素発生反応における機能

伊原大輔<sup>1</sup>、岩崎(葉田野)郁<sup>1</sup>、皆川純<sup>2</sup>、小野高明<sup>2</sup>、高橋裕一郎<sup>1</sup>(<sup>1</sup>岡山大・理・生物、<sup>2</sup>理研・フォトダイナミックス研究センター)

酸素発生系のMnクラスターの結合および機能に系II反応中心タンパクD1のC末領域は重要であると報告されている。そこで我々は、C末延長配列をもたないD1のN末から343と344番目のアミノ酸をそれぞれ大きな構造変化を導くと期待されるProに置換した形質転換体(L343P-OcとA344P-Oc)を作成し、酸素発生系への影響を調べた。A344P-Ocは光合成的に生育せず、酸素発生活性が失われていた。一方L343P-Ocは光合成的に生育し、酸素発生活性は野生型の20%程度に低下した。しかし、L343P-OcとA344P-Ocの系IIタンパク量の低下はわずかであった。熱発光の測定を行うと、L343P-OcとA344P-OcにはQ-bandが検出されず、高温側に異常なバンドが発光されていた。以上の結果から、343と344番目のアミノ酸置換によりD1のC末領域のタンパク構造が変化し、Mnクラスターの機能が大きく影響を受けたことがわかった。

## 2pJ08

D1タンパク質のランダムなアミノ酸置換により光独立栄養性を失った*Synechocystis* sp. PCC 6803 変異株の解析(I)-ランダムな変異の導入とニトロフラントイン処理による選別-

山里明弘<sup>1</sup>、鎌田知江<sup>1</sup>、佐藤公行<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>岡山大院・自然科学、<sup>2</sup>岡山大・理・生物)

シアノバクテリア・藻類・高等植物などの酸素発生型光合成生物を特徴づける光化学系II反応中心は、*psbA* 遺伝子にコードされるD1タンパク質を中心に構築されており、このタンパク質上には反応中心の構造・機能に直接関与するアミノ酸残基が数多く存在しているものと推測される。

本研究では、ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803 株の持つ3つの*psbA* 遺伝子のうち、*psbA*IとIIIを失活させたCm4Δ-1株を用い、*psbA*II遺伝子にPCR法を用いたランダムな突然変異誘発を行うことで、D1タンパク質上のSer148-Ala357間の広い領域にアミノ酸置換を導入した。ついで、それらの変異株から光合成能の低下した株を、“明条件下のニトロフラントイン処理”等の方法で選抜した。こうして、新たに約150の光合成能損傷株が単離され、そのうちの約85%が独立栄養性を喪失していることが確認された。これらの株について、置換を導入した*psbA*II遺伝子領域の塩基配列を決定したところ、1-9ヶ所(平均約3ヶ所)のアミノ酸置換が検出され、その中には、Tyr161やHis198などの予想された変異部位に加えて、多数の未報告の変異部位が含まれていた。今後、変異株の解析を通じて光化学系IIの構造と機能へのアミノ酸残基の関与を解明する予定である。

## 2pJ09

D1タンパク質のランダムなアミノ酸置換により光独立栄養性を失った*Synechocystis* sp. PCC 6803 変異株の解析(II)-光独立栄養性損失株の光化学系IIの特性-

鎌田知江<sup>1</sup>、山里明弘<sup>1</sup>、佐藤公行<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>岡山大院・自然科学、<sup>2</sup>岡山大・理・生物)

我々はラン藻*Synechocystis* sp. PCC6803株を用い、酸素発生型光合成を特徴づける光化学系II反応中心の構造及び機能を解明することを目的として、その中核を担うD1タンパク質上にランダムなアミノ酸置換を導入した。今回、これにより光合成能の低下した約150の変異株を得たが(前報告)、塩基配列決定の結果から、これらの株のうちいくつかについては、D1タンパク質上の変異部位は1または2箇所に限られており、それらは未報告のアミノ酸置換であることが示された。そこで本研究では、これらの株のうちから約20株を選び、その光化学系IIの特性を解析した。まず、これらの株は全て光独立栄養性を喪失しており、これには*psbA*II遺伝子上的変異のみが原因となっていることが、野生型との相補テストにより、確認された。これらの変異株のうちには、D1タンパク質の蓄積が極度に低下し(<5%)、光化学系II活性が見られない株(例: Q187P)や、蛍光の誘導期現象(Fv/Fm)は見られず水分解の機能は失っているが、DPCを電子供与体とする活性の高い光化学系IIを蓄積している株(例: N298I, N301Y)など、多様な場合が認められた。本研究では、これらの変異株について、問題となるアミノ酸置換と機能発現との相関関係を解析することにより、光化学系II反応中心の構造と機能の解明を進めている。

## 2pJ10

光化学系II複合体結晶の性質

沈建仁・神谷信夫(理研・播磨研)

好熱性らん藻、*Synechococcus vulcanus*より得られた酸素発生光化学系II複合体の結晶の性質について報告する。結晶は主に菱形で、最大1x0.5x0.15mmまで成長する。結晶は、系IIの主要サブユニットであるCP47, CP43, D1, D2, チトクロムb-559αとβサブユニット、表在性蛋白である33kDa, 12kDa蛋白、チトクロムc-550及び数種の低分子量サブユニットを含み、高い酸素発生活性を保持していた。ゲル濾過により決定した結晶中の系IIの分子量は580kDaであり、系IIが二量体として結晶化したことが示された。放射光を用いて100Kで測定した結果、最高分解能3.4Åの回折斑点が確認され、分解能4.0Åのネーティブデータセットを収集することができた。結晶の空間群はP212121で、格子定数はa=130Å, b=227Å, c=308Åであった。単位格子中に含まれる系II単量体の数は8個であった。結晶構造解析の進展状況を合わせて報告する予定である。

### 3aJ01

紅藻シアニジウムの酸素発生標品に存在する表在性20 kDa蛋白のクローニングと発現

太田尚孝<sup>1</sup>、上野匡司、沈建仁<sup>2</sup>、加茂政晴<sup>3</sup>、榎並 勲<sup>4</sup> (東理大・理・生物、<sup>1</sup>理研・播磨、<sup>2</sup>岩手医科大・歯・口腔生化)

我々は、紅藻シアニジウムから単離した精製酸素発生系II標品に、4種の表在性蛋白(33 kDa, チトクロームc550, 12 kDaおよび20 kDa)が結合している事をすでに報告した[Enami et al. (1995) *B.B.A.* 1232, 208-216]。本研究では、これら表在性蛋白の中の20 kDa蛋白をクローニングし、その全塩基配列を決定するとともに、その遺伝子の大腸菌による大量発現に成功したので報告する。20 kDa蛋白は純化した酸素発生系II標品をCaCl<sub>2</sub>処理し、4種の表在性蛋白を遊離したのち、イオン交換カラムにより精製した。精製した20 kDa蛋白のN末端アミノ酸配列を決定し、その配列からミックスプライマーを合成し、入ベクターに組み込んだcDNAをテンプレートにPCRを行い、コードするDNA断片を得た。得られた配列から再度プライマーを合成し、入ベクタープライマーとPCRを行うことにより、5'-側および3'-側までのフラグメントを得、全配列を決定した。得られたクローンは72個のアミノ酸残基よりなるリーダー配列と146個のアミノ酸残基からなるマチュアな蛋白(分子量=16386)をコードしていることが明らかになった。このアミノ酸配列をスイスプロットデータベースに対しホモロジーサーチしたところ、*Volvox*の17 kDa蛋白と36.3%、*Chlamydomonas*の17 kDa蛋白と30.3%の相同性を示した。またpCAL-n-EKを用いて、この蛋白を大腸菌に大量発現させることに成功した。発現した蛋白をカルモデュリンアフィニティーカラムを用いて精製したところ、この発現蛋白もCaCl<sub>2</sub>処理した系II標品に再結合し、酸素発生を活性化することが明らかとなった。

### 3aJ02

地衣酸によるタバコ培養細胞の光合成電子伝達阻害

高萩敏和、遠藤剛、伊福健太郎、山本好和<sup>1</sup>、木下靖浩<sup>2</sup>

竹下俊治<sup>3</sup>、佐藤文彦

(京大院・生命科学、<sup>1</sup>秋田県立大・生物資源、<sup>2</sup>日本ペイント

<sup>3</sup> 広大・学校教育)

地衣類の生産する地衣成分の内、有機酸類には地衣特有のものが多く、これらは特に地衣酸とよばれている。我々は地衣酸の生理を解析し、地衣酸が光化学系IIの還元側及び酸化側を阻害することを明らかにした(遠藤BBB, 62, 2023, 1998)。さらに、*クラミドモナス*、地衣類共生藻(*Trebouxia*)、タバコ培養細胞を用いた数種の地衣酸の解析から、*クラミドモナス*、共生藻では阻害部位が酸化側にあること、タバコ培養細胞では還元側にあることを明らかにし、細胞種により阻害部位に違いがあることを報告した。今回、タバコ培養細胞、特にアトラジン耐性株を用いて地衣酸によるPSII阻害作用を詳細に検討した結果を報告する。

アトラジン耐性株(B, D)は野生株(NI)より強く阻害され、特にD株は酸化側も強く阻害されることを認めた。一方B株では、酸化側の強い阻害は認められなかった。そこで、未だアトラジン耐性機構の明らかでないB株のD1タンパク質遺伝子の塩基配列を決定した。またチラコイド膜レベルでの地衣酸の作用について解析を進めている結果を報告する。

### 3aJ03

プロテアーゼ処理した33kDa蛋白のラン色細菌、紅藻、高等植物の系IIへの再構成

藤利 彰彦<sup>1,2</sup>、太田 尚孝<sup>1</sup>、元木 章裕<sup>3</sup>、平野 昌彦<sup>3</sup>、佐藤 公行<sup>3</sup>、榎並 勲<sup>4</sup> (東理大・理、<sup>2</sup>岡大・自然科学、<sup>3</sup>東レリサーチセンター)

酸素発生に必要なMnクラスターの機能保持に重要な役割をもつ33kDa蛋白は全ての酸素発生型生物に存在し、そのアミノ酸配列はラン色細菌から高等植物まで比較的よく保存されており、植物種をこえて50-60%のホモロジーを示す。また、ラン色細菌から高等植物にいたるまで、どの植物からの33kDa蛋白でも多種の植物の系IIに再結合でき、酸素発生を活性化することができる。しかし、ラン色細菌や紅藻の33kDa蛋白のプロテアーゼによる限定分解部位と高等植物の33kDa蛋白の分解部位は明らかに異なる(第63回植物学会発表)。この事は、33kDa蛋白の構造は植物種により異なることを示唆している。そこで、本大会では、33kDa蛋白の系IIへの結合ドメインが異なる可能性をはっきりさせるため、限定分解部位の異なる33kDa蛋白をラン色細菌、紅藻、高等植物の系IIに再構成させ、再結合の有無について調べた。その結果、キモトリプシン処理によりN末端の16残基が切断された高等植物の33kDa蛋白は、高等植物の系IIには再結合できないが、紅藻やラン色細菌の系IIには結合できることが明らかになった。同様に、ラン色細菌や紅藻の33kDa蛋白についてもプロテアーゼ処理後、3種の植物の系IIへの再結合能についても報告する予定である。

### 3aJ04

紅藻の酸素発生系II標品に存在する表在性12 kDa蛋白の系IIへの結合能と再活性化能に及ぼすプロテアーゼ処理の影響

奥村彰暉、太田尚孝、井上康則<sup>1</sup>、榎並 勲 (東理大・理・生物、<sup>1</sup>東理大・理工・応用生物)

すでに我々は紅藻(*Cyanidium caldarium*)から活性の高い酸素発生系II標品を純化し、その紅藻系II標品には33 kDa, 20 kDa, 12 kDa蛋白とチトクロームc550(Cyt c550)の4種の表在性蛋白が存在することを報告した(1)。また、この系II標品から12 kDa蛋白とCyt c550を遊離すると、酸素発生活性に高いCa<sup>2+</sup>やCl<sup>-</sup>要求性を示すようになるが、これらの表在性蛋白を再構成するとイオン要求性は消失することから、これらの表在性蛋白は高等植物の表在性23, 17 kDa蛋白に類似した機能をもつことを明らかにした(2)。本研究では、紅藻の表在性12 kDa蛋白の構造と機能を明らかにする試みの1つとして、12 kDa蛋白の系IIへの結合能と酸素発生の再活性化能に及ぼすプロテアーゼ処理の影響について調べた。その結果、キモトリプシン処理した12 kDa蛋白は、他の表在性蛋白とともに系IIに再構成すると、その限定分解産物は完全に再結合したが、酸素発生の再活性化は認められなかった。一方、V8プロテアーゼで処理した12 kDa蛋白は、再構成実験により、その分解産物が完全に再結合するとともに、かなりの酸素発生の再活性化がみられた。現在、上記プロテアーゼによる限定分解部位の決定を行いつつある。上記結果と限定分解部位を相互比較することにより、12 kDa蛋白の系IIへの結合部位や酸素発生活性を保持するのに必要な構造などについて検討したいと考えている。

(1) Enami et al. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1232, 208-216

(2) Enami et al. (1998) *Biochemistry* 37, 2787-2793

### 3aJ05

PSII酸化側電子移動へのPsbL関与の分子機構  
土田祐平、岩田達也、豊島喜則  
(京大院、人間・環境)

PsbLは、PSII複合体を構成するタンパク質の一つで、37アミノ酸残基からなり、C末端側に1本の膜貫通ヘリックスを持っている。我々は、これまでにPsbLのY34を含むC末端領域の幾つかのアミノ酸残基がYzからP680<sup>+</sup>への電子移動に関与していることを明らかにしている。ここでは、この分子機構に関する二つの実験結果を報告する。

1) Yz/Y<sub>D</sub>の光酸化のpH依存性に対するPsbLの寄与を、再構成法とEPR法を用いて調べた。PSIIでは、pH上昇に伴いYz/Y<sub>D</sub>のラジカル生成によるsignal II強度が2段階(pK4.5とpK6.5)で増加した。PsbLを除去したものはpK4.5の成分が消失し、pK6.5の成分のみが残った。

2) 上記のPsbLの効果はC末端6残基を1残基ごとにLで置換した場合、Y34置換体でのみ消失した。また、Y34をそれぞれL、S、Hに置換するとPsbLの効果は消失したが、Fに置換した場合には、野生型の約70%の活性を示し、Y34の芳香族環がYz/Y<sub>D</sub>の光酸化に重要であることが示唆された。

これらの結果を、*in vivo*でPsbLに変異を導入した結果と比較して考察する。

### 3aJ06

好熱性シアノバクテリア*Synechococcus elongatus*  
の光化学系2サブユニットタンパク質PsbXの機能解析  
加藤浩、池内昌彦(東大・教養・生物)

PsbXは光化学系2複合体に結合している4.1kDaの膜貫通タンパク質である。PsbXは高等植物、シアノバクテリアに存在するが、その役割については明らかになっていない。そこで我々は、好熱性シアノバクテリア*Synechococcus elongatus*の形質転換系を用い、*psbX*遺伝子破壊株( $\Delta psbX$ 株)を作成してPsbXの機能解析を試みた。 $\Delta psbX$ 株は光独立栄養条件下では野生株とほぼ同じ増殖を示したが、細胞の酸素発生活性のキノン濃度依存性に違いが認められた。つまり、2,6DCBQでは $\Delta psbX$ 株は野生株よりも低濃度で最大活性を示した。チラコイド膜でも同様の結果が得られたことから、 $\Delta psbX$ 株の光化学系2複合体の電子受容部位に何らかの変化が起きていると考えられる。これをより詳細に解析するため、現在 $\Delta psbX$ 株から光化学系2複合体を精製しており、その結果を含めて報告する予定である。

### 3aJ07

酸素発生マンガンクラスターにおけるヒスチジン配位子の構造  
野口 巧、井上頼直、Xiao-Song Tang<sup>1</sup>(理研・光合成科学、<sup>1</sup>DuPont de Nemours & Co.)

酸素発生Mnクラスターを形成するアミノ酸配位子としてヒスチジンが存在していることはESEEMの実験から示されていたが、その配位構造などの詳細は不明であった。そこで本研究では、フーリエ変換赤外(FTIR)分光を用い、ヒスチジン配位子のプロトン化構造や水素結合状態などを調べた。

ハウレンソウの全<sup>15</sup>Nラベル及びバラン藻のイミダゾール基の選択的<sup>15</sup>Nラベルを用い、酸素発生系のS<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>FTIR差スペクトルにおけるヒスチジンのバンドを同定した。その結果、1113cm<sup>-1</sup>のC-N伸縮振動バンド及び2500-2850 cm<sup>-1</sup>のN-H伸縮振動上のフェルミ共鳴ピーク群がヒスチジン由来であることが示された。1113 cm<sup>-1</sup>バンドの振動数及びN重水素化シフトから、Mnクラスターのヒスチジン配位子は、N $\pi$ 位がプロトン化されている構造をとっていることが明らかとなった。また、>2500 cm<sup>-1</sup>のピーク群は水素結合したイミダゾールN-Hに特有なものであり、ヒスチジン配位子のN-Hが水素結合を形成していることが示された。

### 3aJ08

光合成光化学系II (PSII) コア複合体の単量体および二量体の単離とそれらの性質  
山成敏広、野村勝司、赤堀興造(広島大、総合科)

HPLCゲル濾過法および蔗糖密度勾配超遠心法により、 $n$ -ドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを用いて、ハウレンソウPSII粒子から2種類のPSIIコア複合体を単離した。これら2種類の複合体は同じタンパク質組成を示し、かつそれらの分子量はそれぞれ約320および440kDaであり、単量体および二量体と同定された。また、これら複合体中のシトクロムb-559の酸化還元滴定の結果は、それぞれ高電位型( $E_m = -430$ mV)を示した。

### 3aJ09

C a<sup>2+</sup>結合部位への1価カチオン結合による光合成酸素発生系Mnクラスターの性質の変化

小野高明, 千葉憲之, Annette Rompel, (理研PDC・光生物)

光合成酸素発生機能には4核Mn錯体の極近傍に結合していると考えられている1個のC a<sup>2+</sup>イオンが必須である。しかし、C a<sup>2+</sup>イオンの結合部位、その機能に関しては不明の部分が多い。本研究では酸素発生能を失ったC a除去系II膜を材料とし、1価カチオン(Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>)をプローブとしてC a<sup>2+</sup>イオンの役割について検討し以下の結果を得た。1) C a<sup>2+</sup>イオンの替わりとして酸素発生機能を回復させる1価カチオンは存在しなかった。2) C a<sup>2+</sup>イオンよりイオン半径が小さいLi<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>はC a<sup>2+</sup>結合部位に低い親和性しか示さなかったが、C a<sup>2+</sup>イオンよりイオン半径が大きいK<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>は高い親和性を示した。3) K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>の結合によりMnクラスターの酸化電位は著しく変化し、光照射により異常な熱発光バンドを示す、また、この状態はマルチラインEPR信号を示さない。4) 1価カチオン置換試料を光照射した後C a<sup>2+</sup>イオンを暗所で添加することにより正常なS<sub>2</sub>状態が回復した。1価カチオン結合状態でも光照射によりMnクラスターの酸化反応が進行しS<sub>2</sub>に相当する酸化状態となることが示された。

### 3aJ10

クラミドモナスD1変異株を用いた光化学系II反応中心の解析

梶 達也, 小野 高明, 皆川 純  
(理研PDC・光生物)

光化学系II反応中心“P680”は水をも分解しうる高電位を持つが、その理由は未だ明らかになっていない。構造解析された紅色光合成細菌との同一性の比較より、D1・D2タンパク質の198番目のヒスチジンが反応中心“P680”の配位子として働いていると予測されているが、その他のクロモフォアの配位子は判明していない。そこで我々は“P680”近傍のD1タンパク質の189番目のグルタミン酸と190番目のヒスチジンを変異させた株を作成した。クラミドモナスのD2タンパク質のC末にヒスチジンタグ導入した株より、光化学系II反応中心複合体を単離・精製し、その性質を調べることにより、高電位形成のメカニズムの解析を行った。変異株の一つである190番目のヒスチジンをアルギニンに換えた変えた株では室温でのクロロフィルQ<sub>y</sub>吸収の極大が672-3nmにブルーシフトしており、吸収スペクトルから算出した活性な“P680”の割合はコントロールの約6割に減少していた。また、フェオフィチンに対するクロロフィルの比の若干の低下が見られた。189番目のアミノ酸を変異させた株の解析も報告する。

### 3aJ11

光合成の初期過程におけるホスファチジルグリセロールの機能に関する分子生物学的解析

萩尾美樹, 佐藤典裕<sup>1</sup>, 都筑幹夫<sup>1</sup>, 正元和盛<sup>2</sup>, Zoltan GOMBOS, 和田元(九大院・理・生物,  
<sup>1</sup>東京薬科大・生命科学, <sup>2</sup>熊本大・教育・生物)

光合成の初期過程の場であるチラコイド膜は、主にタンパク質と脂質によって構築されている。脂質としてはガラクト脂質、スルホ脂質、リン脂質が存在するが、それらの各脂質の光合成における機能については殆どわかっていない。

本研究では、光合成におけるホスファチジルグリセロール(PG)の機能を調べるために、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803のホスファチジルグリセロールリン酸(PGP)合成酵素欠損株(*pgsA*破壊株)を作製し、その性質を野生株と比較した。得られた破壊株は増殖にPGを要求し、他のリン脂質ではこのPGの機能を補うことはできなかった。このことは、PGが *Synechocystis* の増殖に必要な不可欠であることを示している。また、PGを含む培地で増殖させた *pgsA* 破壊株をPGを含まない培地に移すと、野生株に比べ光合成活性が著しく低下した。このことは、PGが光合成の初期過程において重要な機能を担っていることを示唆している。

### 3aJ12

クロロフィルdをもつ酸素発生型原核生物 *Acaryochloris marina* : 光化学系IIの反応中心

岩城雅代, 伊藤繁, 岩崎郁子<sup>1</sup>, 沈建仁<sup>2</sup>, 井上頼直<sup>2</sup>, 宮下英明<sup>3</sup>, 宮地重遠<sup>3</sup> (基生研, <sup>1</sup>秋田県立大.生工研, <sup>2</sup>理研.播磨研, <sup>3</sup>海洋バイオテクノロジー研.釜石研)

酸素発生光合成をする原核生物 *Acaryochloris marina* は主要色素としてクロロフィルd(Chl d)をもち、Chl aは3-5%しかない。Chl a型と比較するとアンテナChl dは赤色域で約40 nm長波長にあり(715 nm)、0.1 eV低い光エネルギー(1.73 eV)を吸収する。

細胞破碎後dodecylmaltosideでチラコイドを可溶化し、シヨ糖密度勾配遠心により、705 nmに吸収極大を示す光化学系II濃縮画分を採取した。標品にジブプロモチモキノン添加してnsレーザ閃光照射すると、720 nmの吸収帯が減少し、 $t_{1/e} = 0.3\text{ms}, 3\text{ms}$ の二相で回復した。これと同時に酸化型Chlに特徴的な830 nmの吸収増大を観測した。既に *A. marina* の光化学系IIは740 nm光を吸収するChl d(P740)が反応中心クロロフィルと推定されており、光化学系IIでも720 nmに吸収極大をもつChl dが反応中心クロロフィルである可能性が高い。

### 3aJ13

Chl *d* を主要な光合成色素として持つ原核藻類  
*Acaryochloris marina* の蛍光特性

三室 守, 宮下英明<sup>1</sup>, 平山 香, 宮地重遠<sup>1</sup>

(山口大・理・自然情報科学, <sup>1</sup>海洋バイオ研・釜石)

*Acaryochloris marina* においては Chl *d* が 95% 以上を占め残りが Chl *a* である。PS I RC の電子供与体は Chl *d* である事が報告されている。昨年、我々は PS II においては Chl *a* が電子供与体であることを明らかにした。今回、この藻類における励起エネルギー移動経路や RC 複合体での色素構成の特徴を知るために蛍光特性を精査した。

測定には定常期の細胞を使い、定常系での測定を行った。

(1) PS II では室温で Chl *d* から Chl *a* への up-hill のエネルギー移動が観測され、エネルギー準位の低いアンテナを持って酸素発生には問題が無いことが確認された。(2) 77K では PS II の蛍光は Chl *d* に由来する 1 成分 (735 nm) であり、他の酸素発生型光合成生物とは際違った違いが認められた。これは Chl *a* とのエネルギー差が大きいことと関連すると考えられる。(3) 77K では PS I 蛍光が明瞭なバンドとして観測されず、際違った違いであった。これらの結果を基に、*A. marina* の光合成系の特徴について議論をする。

### 3pJ01

Cytochrome *b<sub>6</sub>f* 複合体による Photosystem II での光エネルギー散逸機構制御の解明

宗景ゆり, 竹田恵美<sup>1</sup>, 遠藤剛<sup>2</sup>, 橋本隆, 鹿内利治 (奈良先端大・バイオ, <sup>1</sup>大坂女大・基理, <sup>2</sup>京大・院生命科学)

植物の光合成器官は光エネルギーを化学エネルギーに変換する最も優れた装置であるが、光エネルギーが過剰な環境下では酸素ラジカルの生成により光障害を受けてしまう。植物は強光下ではクロロフィルが吸収した過剰な光エネルギーを光化学系 II の反応中心に伝達する前にアンテナから熱として安全に散逸させている (NRD, nonradiative dissipation)。NRD は電子伝達に伴って形成される ΔpH により誘導されるため、光環境に瞬時に対応して光化学系 II の量子収率を調節することができる。我々はこの散逸機構や制御機構の詳細な分子メカニズムを解明するために、クロロフィル蛍光イメージ化システムを用いて *Arabidopsis* 変異株のスクリーニングを行い複数の変異株を得た。その中の *nr1* は Light harvesting complex II の構造変化に依存するはやい phase の NRD が誘導されていないことがクロロフィル蛍光の測定によりわかった。またカロテノイド分析の結果、Xanthophyll Cycle の活性が低いことがわかった。ポジショナルクローニングにより、*nr1* は cytochrome *b<sub>6</sub>f* 複合体の Rieske iron-sulfur subunit をコードする *petC* に変異があることが明らかになった。*nr1* は ΔpH の形成が十分でないために光エネルギー散逸機構の誘導を行えないと考えられる。*nr1* は光独立条件下で野生株と変わらない成長速度を示すが、強光、低 CO<sub>2</sub> 濃度ストレスに弱い。これらの結果は *nr1* で形成される ΔpH が光合成活性を維持するには充分であるが、NRD を誘導できない量であることを示す。このことから *b<sub>6</sub>f* 複合体で形成される ΔpH の少なくとも一部は光化学系 II の量子収率の調節のために機能しており、光障害を防ぐ生理的重要性を持つことが明らかになった。

### 3pJ02

トウモロコシの C<sub>4</sub> 光合成細胞特異的に発現している Fd イソ蛋白質を導入した形質転換ラン藻の光化学系 I 循環的電子伝達活性の差異の検証

有賀洋子, 藤本寛樹, 長谷俊治,<sup>1</sup>遠藤剛,<sup>2</sup>真野純一,<sup>1</sup>佐藤文彦 (阪大・蛋白研,<sup>1</sup>京大院・生命科学,<sup>2</sup>京大・食研)

昨年度の年会で我々は、C<sub>4</sub> 植物であるトウモロコシの葉の葉肉細胞と維管束鞘細胞のそれぞれに局在する異なる 2 種のフェレドキシン (Fd) イソたんぱく質 Fd I と Fd II の遺伝子をラン藻 *Plectonema boryanum* へ別々に導入し、得られた形質転換ラン藻の解析から、Fd I と Fd II は光合成電子伝達系における光化学系 I 循環的経路へ電子を送る活性が異なるという仮説を提唱した。この仮説を証明することを目的とし、形質転換ラン藻の更なる解析を行った。光化学系 I 反応中心 P700 の紫外光 (>710nm) 照射による酸化還元測定において、明所で生育させた Fd I または Fd II 形質転換ラン藻はいずれも殆ど P700 の酸化が認められなかったが、暗所に移して 3 日後には Fd I 導入形質転換体でその酸化レベルが顕著に上昇する一方 Fd II 導入形質転換体ではそのレベルは低いまだだった。いずれの形質転換体でも暗所に移すことにより呼吸活性は同程度に低下しており、暗所処理後も Fd II 導入体でみられた P700 酸化レベルが低いのは、呼吸基質から光化学系 I への電子流入は Fd I 導入体と同様に減少するが、光化学系 I 周辺の循環的電子伝達活性が高いためと考えられた。更に Fd II 導入体では野生型らん藻や Fd I 導入体に比べて細胞内 ATP レベルが高い一方 NADPH レベルは低く上記の仮説を支持する結果が得られるとともに、トウモロコシにおいて Fd I と Fd II がその存在場所である葉肉細胞と維管束鞘細胞で要求されるエネルギーレベルに見合うような電子伝達特性を持つ可能性を示す。

### 3pJ03

スギナ (*E. arvense*) フェレドキシンの大腸菌発現ベクターの作製

藤田しのぶ, 松永茂晃, 広瀬修一, 有賀洋子<sup>1</sup>, 長谷俊治<sup>1</sup>, 手島圭三 (広島大・総合科学,<sup>1</sup>阪大・蛋白研)

これまでスギナフェレドキシンの溶液構造を NMR 法を用いて調べ酸化還元による <sup>1</sup>H の化学シフト変化等を明らかにしてきたが、さらなる静的、動的構造変化を調べるためには同位体標識した標品が必要となるので、今回、スギナフェレドキシン I と II (Fd I と Fd II) の大腸菌による発現系の構築を試みた。

既知のアミノ酸配列から、両端に Nco I と Xba I の制限酵素部位を持つ約 300bp からなる Fd I および II 遺伝子を選択した。今後のアミノ酸改変を考えて幾つかの制限酵素部位を導入した。各遺伝子をまず 2 つのブロックに分け、ブロックの合成は 8 組のオリゴヌクレオチドをリン酸化、アニーリングおよびライゲーションすることによって行った。次に、ベクター pTrc99A に 2 つのブロックを挿入して、Fd I と II の発現ベクターを得た。挿入遺伝子の塩基配列は DNA シークエンサーにより確認した。さらに、PCR 法により両端に Nde I と Bcl I の制限酵素部位を持つ Fd I 遺伝子を調製し、ベクター pET9a に挿入して新たな Fd I の発現ベクターを得た。いずれの場合も大腸菌を形質転換したところ発現を確認した。今後は高発現の条件の確立を目指す予定である。

### 3pJ04

トウモロコシの葉と根に器官特異的に分布する2種のFd:NADP<sup>+</sup>還元酵素の立体構造と機能特性の解析  
栗栖源嗣<sup>1</sup>、楠木正己<sup>1</sup>、恩田弥生<sup>2</sup>、有賀洋子<sup>2</sup>、  
長谷俊治<sup>2</sup> (阪大・蛋白研・<sup>1</sup>生体分子解析研究センター、<sup>2</sup>酵素反応学部門)

Fd:NADP<sup>+</sup>還元酵素(FNR)は様々なプラスチドに広く存在する約35kDaのフラビン酵素であり、葉緑体ではFdを介してピリジンヌクレオチドの光還元反応を司り、根プラスチドではNADPHの還元力をFd依存性の代謝反応に供給する役割をもつ。トウモロコシの葉と根に器官特異的に分布するFNRアイソザイムを材料にX線結晶構造解析を行ない、今回、従来の葉型FNRに加え、根型FNRの立体構造を初めて明らかにしたので報告する。FNRと電子授受を行なうFdにも、光合成型と非光合成型のイソ蛋白質が存在するので、器官特異的なFNRとFdの組合せを考慮した複合体形成や電子伝達能を解析したところ、根FNRと非光合成型Fdとの間に、NADPH→FNR→Fdの還元力伝達に有利と思われる強い蛋白質間相互作用を見出した。この構造要因を立体構造上で特定すべく、FNRとFdの部位特異的な変異体を用いて解析を進めており、目下、根プラスチドに存在するFNRとFdの相互作用様式は、葉緑体の分子種間のものとは異なる可能性を示唆する結果を得ている。

### 3pJ05

緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* 反応中心と NAD(P)光還元系に関する研究

瀬尾倂介<sup>1</sup>、楠元範明<sup>1</sup>、富岡厚<sup>1,2</sup>、加茂政晴<sup>3</sup>、榎並勲<sup>3</sup>、桜井英博<sup>3</sup>

(早大・教育<sup>1</sup>、キリンビール製造<sup>2</sup>、岩手医科大・歯学部<sup>3</sup>、東京理科大・理)

緑色硫黄細菌の光化学反応中心は、PSI やヘリオバクテリア光化学反応中心と同様に鉄硫黄型反応中心に属し、PSIと同様にFd、FNRを介した系よりNAD(P)を還元していると考えられているが、その詳細は未だ明らかになっていない。我々は先づ、緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* では疎水クロマトグラフィーにより4つのFd画分A~Dが得られること、N末端15-25アミノ酸残基の分析からAはFdIII、BはFdII、C、Dは共にFdIに対応することを報告した。その後のアミノ酸組成分析より、C、Dは同一アミノ酸組成であることが分かった。また、これらのFd及びホウレンソウFdは、精製反応中心、ホウレンソウFNRを用いた系において高い光還元活性を示した(540~760 μmole·mg Bchl a<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)。同細菌の可溶性画分よりジアホラーゼ活性を持つタンパク質の精製を行っており、ゲルパーミエーションクロマトにより得られる2つのジアホラーゼ活性画分について精製を進めている。

### 3pJ06

ポリアクリルアミドゲルに固定化した光合成反応中心の電子伝達  
原正之<sup>1,2</sup>、J. Goc<sup>3</sup>、A. Planner<sup>3</sup>、D. Frackowiak<sup>3</sup>、三宅淳<sup>2</sup> (<sup>1</sup>工大院・生命研、<sup>2</sup>工大院・融合研、<sup>3</sup>ポーランド・ボズナニ工科大)

我々は、ポリアクリルアミドゲルに *Rhodospseudomonas viridis* などの光合成細菌の反応中心(RC)を封入し、フェリシアン化カリウムやアスコルビン酸などを用いて酸化還元状態を調節した状態で乾燥させるとRCの酸化還元状態を維持した状態で固定化された乾燥フィルムが作製できることを1997年度年会にて報告した。今回は同様の方法で *Rhodobacter shaeroides* のRCの乾燥フィルムを作製し、吸収スペクトルの測定を行った。バクテリオクロフィル2量体(Bch2)に由来する860nm付近の吸収帯は酸化された状態では低く、還元状態では高く酸化還元状態(Eh=142~508mV)に応じて増減していた。ハロゲンランプによる定常光ならびにキセノンフラッシュによる照射時における吸収スペクトル変化より、乾燥フィルム中で電子伝達反応が行われていることを確かめた。さらに、このフィルムを用いて光音響波スペクトル測定(photoacoustic spectroscopy、以下PASと略)を行った。PASは、変調した光を試料に照射して発生する音波を検出する方法であり、色素に吸収されたエネルギーの内熱として放出される部分を測定することになる。

PASスペクトルは吸収スペクトルと似た形を有していたが、Soret帯など短波長側のピークに較べてバクテリオクロフィル単量体(Bch)やBch2のQyバンドなど長波長側のピークが高くなる傾向がみられた。また、吸収の場合と異なり、PASスペクトルにおいてはBch2のピークが顕著なEh依存性を示さなかった。

参考文献:

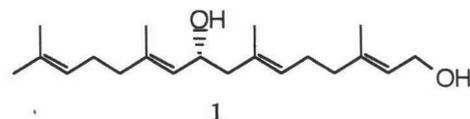
- [1] M. Hara et al., Mat. Sci. & Eng. C4 (1997) 321-325
- [2] J. Goc et al., J. Photochem. Photobiol. A:Chemistry 122 (1999) 33-37.

### 3pJ07

ジテルペンアルコールによる光合成電子伝達阻害  
丸山明男、原口博行、浅田浩二 (福山大・工)

褐藻 *Sargassum tortile* より単離されたジテルペンアルコールである crinitol (1)の生理活性を検討し、1が葉緑体電子伝達を阻害することを見出したので報告する。

1は単離葉緑体のクロロフィル蛍光の誘導からみてDCMUと同様の様式を示し、系II還元側を阻害していると推察された。チラコイド膜でのH<sub>2</sub>O→MV、H<sub>2</sub>O→DCIPの電子伝達活性を1が阻害した(I<sub>50</sub>≈15 μM)。DCMU存在下でのアスコルビン酸(DCIP)→MVの系I活性には1は影響しなかった。1のC-8 epimer及びC-8に水酸基のない geranylgeraniolも1と同様の阻害を示した。従って、ジテルペンアルコールは系II還元側を阻害することが明らかになった。



### 3pJ08

葉緑体 ATP 合成酵素の活性調節領域を挿入した好熱菌 ATP 合成酵素

Dirk Bald<sup>1</sup>, 野地博行<sup>1</sup>, 吉田賢右<sup>1,2</sup>, 久堀徹<sup>2</sup>(<sup>1</sup>Crest Team13, <sup>2</sup>東工大・資源研)

葉緑体 ATP 合成酵素は、好熱菌やミトコンドリアの ATP 合成酵素と異なり、 $\gamma$ サブユニット上の二個の Cys が形成するジスルフィド結合によって活性が調節されるチオール酵素である。昨年、私たちは葉緑体 ATP 合成酵素の  $\gamma$ サブユニットも回転するサブユニットであることを明らかにした (*FEBS Lett. in press*)。この酵素の活性調節は、回転する  $\gamma$ サブユニット自身の構造変化に起因するものであろう。

この活性調節の分子機構を詳細に調べる目的で、今回私たちは、葉緑体 ATP 合成酵素・ $\gamma$ サブユニットの制御領域を含む 150 残基を、遺伝子操作が可能な好熱菌 ATP 合成酵素の部分複合体の遺伝子相当部分に移植した。そして、葉緑体 ATP 合成酵素と同様の制御機能を持つ新たな複合体を得た。得られた複合体は、酸化還元による活性調節、チオレドキシンや内在性の阻害サブユニット  $\epsilon$  との相互作用などの点で葉緑体 ATP 合成酵素の性質を、高度な熱安定性や有機溶媒に対する感受性の点では好熱菌 ATP 合成酵素の性質を併せ持っていた。このように、この新しい変異複合体は、活性調節領域を研究するための有用なモデル実験系となった。現在、調節領域の変異導入による制御機構の解析や回転の制御の一分子解析を進めている。

## 1aK01

ウキクサ(*Lemna* spp.)のホウ素結合多糖の性質と精製

桑木信輔、神山貴信、間藤徹、小林優、關谷次郎  
(京都大院・農・応用生命科学)

高等植物のホウ素含有率は一般に 10~100mg/kg 乾燥重であるが、水田に見られるウキクサ (*Lemna* spp.) は 600~800mg/kg のホウ素を含有していた。そこで水田より採取した *Lemna* をホウ素濃度を変えて培養したが高濃度ホウ素には耐性がなかった。

このホウ素のほとんどは細胞壁に存在したので、ホウ素結合多糖の精製を試みた。CDTA 処理によって細胞壁ウロン酸の約半分が抽出されるがホウ素はほとんど溶出しなかった。細胞壁、CDTA 処理した細胞壁ともにセルラーゼ、ペクチナーゼではほとんど分解されなかった。しかしホウ素、カルシウムを除去した細胞壁はペクチナーゼによって分解され、残りのウロン酸が可溶化された。これらの結果よりホウ酸が細胞壁多糖を架橋することで細胞壁構造を物理的に保護していると考えた。

可溶化された多糖のうち、ホウ酸とカルシウムを再添加したとき沈殿する多糖をホウ素結合多糖とし、これらをイオン交換クロマトグラフィーによって分画したところ、アピオース、ウロン酸にとも多糖、アピオース、キシロースにとも多糖、アピオース、キシロース、ウロン酸にとも多糖に分かれた。現在、それぞれの構成糖と結合様式について検討中である。

## 1aK02

ラムノガラクトロン II - ホウ素複合体に結合している金属イオンの結合サイト

石井忠、松永俊朗<sup>1</sup>、小野裕嗣<sup>2</sup> (森林総研、<sup>1</sup>九農試、<sup>2</sup>食総研)

ラムノガラクトロン II (RG-II) は高等植物細胞壁をエンドポリガラクトナーゼ処理すると溶出する分子量約 5 千の複雑な化学構造をもつペクチン多糖である。RG-II はホウ酸ジエステル結合により架橋された 2 量体 (dRG-II-B) として細胞壁中で存在することが、最近証明された。

RG-II とホウ酸を  $Pb^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Eu^{3+}$ 、 $Pr^{3+}$  などの金属イオンの存在下に *in vitro* で反応させると、dRG-II-B の生成が促進される。また、植物体から調製した dRG-II-B は、 $Pb^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  などの金属イオンを含んでいる。そこで、dRG-II-B に結合した金属イオンの機能を検討するため、モデル化合物としてマンニトールを用いて  $Eu^{3+}$ 、あるいは  $Pr^{3+}$  の存在下にホウ酸エステルを生成させた。また、RG-II をマンニトールの場合と同様に反応させた。反応物を多核 NMR および HPLC/ICP-MS により分析した。

マンニトールは安定なマンニトール-ホウ酸-Eu、あるいはマンニトール-ホウ酸-Pr 複合体を形成していた。

<sup>11</sup>B および <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR スペクトルの解析より、 $Eu^{3+}$ 、あるいは  $Pr^{3+}$  はマンニトールにエステル結合したホウ酸に配位していた。 $Eu^{3+}$ 、あるいは  $Pr^{3+}$  の存在下によって生成した dRG-II-B では、 $Eu^{3+}$  や  $Pr^{3+}$  は dRG-II-B に結合していた。

## 1aK03

半数体ブランバギニフォーリアの細胞接着ミュータント (*nolac*) ではペクチン側鎖のアラビナンが欠損していた岩井宏暁、石井忠<sup>1</sup>、佐藤忍 (筑波大・生物、<sup>1</sup>森林総研)

多くの種の培養細胞では、継代を続けることにより、形態形成能力の消失と同時に細胞間の接着性が弱くなることが観察される。なかでもニンジン培養細胞の自然変異体 Non-embryogenic callus では、ペクチンの中性糖側鎖のアラビノガラクトタン構造に変異が生じていることが判明している。最近我々は、*Nicotiana* 属中で最小のゲノムを持つ *Nicotiana plumbaginifolia* の半数体植物に T-DNA を挿入することで、不定芽形成能力を失うと同時に、細胞間接着性の弱くなった loose な細胞塊を形成するミュータントである *nolac-H14* を得、ペクチンに注目した形態学的解析を行った。その結果、細胞間が分離し、また、細胞壁のコーナー部分のルテニウムレッドによる染色性が顕著に減少しており、カルス表面では逆に染色性が増加している様子が観察された。本研究では、*nolac-H14* の細胞壁糖組成およびメチル化分析による構造様式の解析を行った。その結果、*nolac-H14* では、4M KOH で抽出されてくるヘミセルロースと挙動を同じくするペクチンの含量が、顕著に減少しており、逆に培地に放出されるペクチンが増加していた。また、そのペクチンの Ara/Gal 比は、Normal が 4.16 であったのに対し、*nolac-H14* では 0.16 であった。メチル化分析の結果、*nolac-H14* のペクチンの中性糖側鎖において、アラビナンが存在していないことが判明した。

## 1aK04

キュウリ胚軸の切断面における組織癒合過程の形態学的解析

朝比奈雅志、岩井宏暁、佐藤忍 (筑波大・生物)

植物では、細胞内に新たな細胞壁である細胞板が形成されることによって 2 つの娘細胞が仕切れ、その結果生じた娘細胞は初めから接着している (初生的細胞接着)。一方、動物では、くびれ分裂の結果生じた娘細胞は一旦分離し、後に細胞間の接着が起こる。しかし植物細胞でも例外的に、雌蕊形成時にみられる心皮の結合や傷害・接ぎ木等による組織癒合の際には、動物細胞における細胞接着のように一旦分離した細胞が再び結合する「後生的細胞接着」が起こることが知られている。本研究ではキュウリ胚軸の一部を切断し、組織癒合時の後生的細胞接着過程について形態学的な解析を行った。光学顕微鏡を用いた観察から、切断 3 日目に切断面付近の細胞が細胞分裂を開始し、その後盛んに細胞分裂・伸長をしていることが示された。そして切断 7 日目には、切断された胚軸はほぼ完全に癒合していた。またペクチンに注目し、透過型電子顕微鏡を用いたルテニウムレッド染色 (脱メチル化ペクチン染色) による組織化学的解析を行ったところ、組織癒合面がルテニウムレッドにより染色されていた。またルテニウムレッド染色前にアルカリ処理を行うことで、さらに組織癒合部の細胞壁自体も強く染色されたことから、メチル化ペクチンも存在していることが示された。しかし組織癒合部以外の細胞壁では、アルカリ処理を行っても中葉しか染色されなかった。また組織癒合過程に対する器官除去の影響を調べた結果、子葉を除去したときに強く阻害されることが示された。

## 1aK05

ポプラ培養細胞におけるセルロースの生分解機構  
林 隆久、大宮泰徳 (京大・木研)

ポプラ培養細胞は、成長とともにエンド-1,4-β-グルカナーゼを分泌し、培養液中にフリーで存在するタイプ (PopCel1) と細胞壁に結合しているタイプ (PopCel2) の2つの酵素タンパクを産生する。クローニングされたcDNAによるノーザン解析によって2つのβ-グルカナーゼは、ともにシュクロースによって誘導され、オーキシシンによってそのレベルが高められることが明らかとなった。ここでは、細胞壁糖鎖の生分解機構について報告する。

細胞壁標品をポプラ培養細胞由来の粗酵素標品とともにインキュベートすると、セロオリゴサッカライドとキシログルカンの可溶化が認められた。これら分解物の生成は、抗体との反応によって抑えられた。ポプラ培養細胞における mRNA と酵素活性の発現は、セロオリゴサッカライドの生成と一致し、それに引き続いてキシログルカンの可溶化が生じた。以上の結果より、エンド-1,4-β-グルカナーゼはオーキシシンにより間接的に誘導され、主としてセルロースを分解し、間接的にキシログルカンを可溶化することが示唆された。

## 1aK06

エンド-1,4-β-グルカナーゼを過剰発現させた  
アラビドプシスの解析  
富永るみ、酒井富久美、林隆久 (京都大・木研)

ポプラのエンド-1,4-β-グルカナーゼは、細胞壁セルロース性糖鎖の切断を触媒し、植物の成長・分化・形態形成に重要な役割を担っている。ポプラのエンド-1,4-β-グルカナーゼを過剰発現させたアラビドプシス形質転換体を作成し、この酵素の機能を解析した。

ポプラのエンド-1,4-β-グルカナーゼの大半は、アポプラスト中で発現していることが認められた。形質転換体は、葉部で高いセルラーゼ活性を示すと同時に、可溶性のセロオリゴサッカライド量が増加していた。形質転換体のフェノタイプは、葉身の長さ、幅ともにワイルドタイプに比べて大きくなった。さらに、細胞壁の伸展性の増加もみられた。以上の結果から、過剰発現されたエンド-1,4-β-グルカナーゼが細胞壁のゆるみを誘導し、葉の拡大成長を促進していることが示唆された。

## 1aK07

ポプラエンド-1,4-β-グルカナーゼの分子細胞生物学的解析  
大宮泰徳、酒井富久美、林 隆久 (京大・木研)

ポプラ (*Populus alba* L.) のエンド-1,4-β-グルカナーゼ cDNA, *PopCel1* および *PopCel2* に対応するゲノムDNAをクローニングした。*PopCel1* および *PopCel2* の転写調節領域は、ポプラ形質転換植物体ではそれぞれ異なった器官特異的発現を示した。若い葉では、*PopCel1* は葉脈、*PopCel2* は葉肉細胞で発現し、互いに相補的な発現パターンを示した。この葉脈・葉肉相補的な発現パターンは、野生型ポプラ幼葉の mRNA レベルからも確認した。根端においては、*PopCel1* は根冠、*PopCel2* は伸長領域で発現し、互いに相補的な役割分担をもって発現していた。

胚軸の伸長および孔辺細胞の成長との関係については、アラビドプシスの形質転換体を用いて解析した。下胚軸が著しく伸長する発芽後3~4日目に、伸長部位で発現した。孔辺細胞では、その形成初期に発現し、孔辺細胞の成熟とともに発現は消失した。以上の結果より、エンド-1,4-β-グルカナーゼは伸長肥大する細胞中で発現することが示唆された。

ポプラの葉を個体培地に挿し木することによって発現を検討した。*PopCel1* および *PopCel2* は、シュクロースだけでなく、グルコースやフラクトースによっても発現された。また、セルロース合成阻害剤である DCB によってセルロースの生合成が抑制されるとともに、*PopCel1* および *PopCel2* の発現も抑制された。以上の結果より、セルロースの分解がセルロースの生合成にも関与していることが示唆された。

## 1aK08

キシログルカン合成酵素の可溶化と精製  
小西 照子、三石 安<sup>1</sup>、酒井 富久美、  
林 隆久 (京大・木研、<sup>1</sup>工技院・生命研)

伸長しているエンド上胚軸で、キシログルカンはゴルジ体で合成された後、細胞外へ分泌されてセルロースとネットワークを形成する。このゴルジ体中での生合成について、従来では膜画分を用いて *in vitro* で実験が行われてきた。この場合、糖ヌクレオチドの膜輸送や他の合成酵素の混在等の問題点があった。そこで私たちは、キシログルカン 4-β-グルコシルトランスフェラーゼ及び 6-α-キシロシルトランスフェラーゼを膜画分から可溶化し、この酵素の化学的性質を明らかにすることを試みた。

エンド上胚軸より精製された合成酵素は SDS-PAGE により単一バンドを示した。この酵素はキシログルカンオリゴサッカライドをアクセプターとして、UDP-グルコース及び UDP-キシロースからそれぞれ、グルコース及びキシロースを転移する反応を触媒した。

## 1aK09

セルロース生合成におけるキシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ

竹田 匠、酒井 富久美、林 隆久 (京大、木研)

植物培養細胞をセルロース生合成阻害剤 DCB 存在下で培養すると、大量のキシログルカンが培地中にフリーの状態で分泌されることが知られている。この現象は、キシログルカンと水素結合するセルロースマイクロフィブリルが合成されず、細胞壁に固定できなくなるためと推察されている。

我々は、伸長しながら活発にセルロースを合成している、エンドウ上胚軸切片をセルロース生合成阻害剤 DCB とともにインキュベートすることにより、キシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ (XET) 活性が減少する現象を見出した。特に細胞壁に結合している XET 活性の減少レベルが、セルロース合成の阻害のレベルと一致した。また、このエンドウ上胚軸切片中で誘導される XET の mRNA も、DCB、イソキサベン、クマリンによって、その蓄積が抑えられた。この XET の抑制は、セルロース合成阻害と同じく、速やかに生じることが認められた。一方、セルロース生合成の阻害のみならず、XET の抑制はエンドウ上胚軸切片の伸長を阻害しなかった。

## 1aK10

アボカド果実ポリガラクトツロナーゼの精製とその性質

若林和幸, Donald J. Huber<sup>1</sup> (大阪市大院・理・生物、<sup>1</sup>フロリダ大・園芸)

成熟したアボカド果実の細胞壁から 1.8 M NaCl により細胞壁蛋白質を抽出し、その中に含まれるポリガラクトツロナーゼ (PG) の精製を行った。イオン交換、ゲルろ過の各クロマトグラフィーにより、PG 活性は 2 つの画分に分離され、SDS-PAGE 上でそれぞれ 48 と 46 kDa のバンドとして検出された。ポリガラクトツロン酸 (PGA) を基質とし、両アイソザイムの pH 依存性を調べた結果、両者とも至適 pH は 6.0 であった。活性を比較すると、46 kDa のアイソザイムは、48 kDa のものよりも活性が若干低くなっていた。しかし、平均分子量約 180 kDa の PGA に、両アイソザイムをくり返し与え、反応生成物の分子量を調べたところ、両者とも PGA を、最終的に約 2-3 kDa の大きさのポリマーに加水分解することが示された。次に、成熟前のアボカド果実から調製した細胞壁標品を、それぞれの PG アイソザイムで処理すると、ポリウロナイドの遊離が促進され、その分子量も低下していた。遊離したポリウロナイドの分子量は、成熟の中間段階の果実から水で抽出される水可溶性ポリウロナイドの分子量と同程度であった。以上の結果から、今回精製された両 PG アイソザイムは、成熟に伴うアボカド果実細胞壁のポリウロナイドの分解に関与しているものと考えられる。

## 1aK11

イネ葯アラビノガラクトタンパク質 (AGP) とその分解活性の解析

川口健太郎、渋谷直人<sup>1</sup> (農水省・北海道農試、<sup>1</sup>農水省・生物研)

小孢子形成期のイネ葯においては、高濃度の AGP とそれに続く AGP 糖鎖コア構造に類似のアラビノガラクトオリゴ糖の一過的蓄積がみられる。花粉形成に重要な役割を果たすと考えられるこれら糖質の代謝過程を解明するため、イネ葯より AGP を分離・精製すると共に、AGP 分解活性測定系を確立し、葯の生長 (花粉生育ステージ進行) に伴う活性の変動などを解析した。

ゲルろ過カラム (Superdex200) により葯特異的に分離される 30kd の AGP を基質に、葯の粗タンパク画分を酵素標品に用い反応後、生成されるオリゴ糖量を Dionex HPLC にて測定し、AGP 分解活性を評価した。その結果、小孢子中期をピークとするステージ特異的な活性変動を示すことがわかった。これにより、葯の生長段階において、AGP の酵素的分解によるオリゴ糖生成機構が発生的に制御され発現していることが確認された。

## 1aK12

凍結切断レプリカ上のロゼット TC の免疫標識

木村聡, 伊東隆夫, Walairat Laosinchai<sup>1</sup>, Xiaojiang Cui<sup>1</sup>, C. Randal Linder<sup>1</sup>, R. Malcolm Brown Jr.<sup>1</sup> (京都大・木質科学研究所、<sup>1</sup>テキサス大・生命科学)

ロゼット TC は高等植物のセルロース合成酵素であると推測されているが、未だ直接的な証拠はない。今回、高等植物のセルロース合成酵素をコードすると考えられている CelA 遺伝子のリコンビナントタンパク質に対する抗体を作製した。そしてアズキ上胚軸のフリーズフラクチャーレプリカをセルラーゼと SDS 液を用いて細胞壁を分解・洗浄した後に CelA 抗体を作用させたところ、CelA 抗体はロゼット TC を特異的に認識した。SDS による洗浄後、原形質膜のレプリカでは膜貫通型タンパク質のみが保持される。この結果、ロゼット TC を構成する膜顆粒がセルロース合成酵素であることが直接証明された。一方、フリーズフラクチャーレプリカの免疫標識法が植物細胞の膜タンパク質の解析においても有効な手段になりうることも示された。

## 1pK01

乾燥ストレスやABAに応答するイネ1,3-β-グルカナゼcDNAのクローニング

秋山 高、今井亮三、長谷川 信<sup>1</sup>、山口亮太<sup>1</sup>、榊剛<sup>1</sup>、渋谷直人<sup>2</sup> (農水省北海道農試、<sup>1</sup>北海道東海大学、<sup>2</sup>生物研)

オオムギの1,3-β-グルカナゼ遺伝子(*GII*)をプローブに用いて、イネ幼植物由来のcDNAライブラリーをスクリーニングし、数種類の全長を含むエンド-1,3-β-グルカナゼ遺伝子を単離した。その中の一つのエンド-1,3-β-グルカナゼ遺伝子(*OsGln4*)の発現が、乾燥処理やABA処理によって増大することがわかった。この乾燥ストレスに応答する*OsGln4*のORFは、318個のアミノ酸をコードする954bpを含んでいた。*OsGln4*がコードするペプチドの分子量は約34,000であり、その等電点は約8.4の塩基性を示した。*OsGln4*の推定アミノ酸配列と最も近い配列を示したのは、オオムギのエンド-1,3-β-グルカナゼ(*GV*)であり、約63%の相同性が認められた。黄化イネ幼植物(発芽後10日目)の根の部分では、乾燥処理及びABA処理いずれの場合でも、1日以内に*OsGln4*の顕著な発現が誘導された。一方若い葉の部分では、乾燥処理による発現量の差はほとんど認められなかったが、ABA処理では1日目に降明らかな発現量の増加が観察された。

## 1pK02

高能率 AFLP を利用したイネのカマイラス遺伝子(*bc-3*)のポジショナルクローニングの試み

神原久美子<sup>1,2</sup>、中村信吾<sup>1</sup>、児玉治<sup>2</sup>、川崎信二<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>農水省・生物研、<sup>2</sup>茨城大・農・資源生物)

ポジショナルクローニング法は調節機能を司る遺伝子等従来の手法では単離困難であった遺伝子の単離に強力な力を発揮する。我々はイネの耐病性遺伝子の単離の過程から、本法による遺伝子単離を効率的に行うためのノウハウを蓄積してきたが、今回は我々が開発した高能率 AFLP により延べ1ヶ月足らずで、細胞壁の2次壁のセルロースの合成を制御していると考えられるイネのカマイラス(鎌要らず:*brittle culm*)遺伝子(*bc-3*)を1cM以下のflanking marker内の領域に精密マッピングする事ができたので報告する。この手法では、*indica* x *japonica*の様に1割程度の多型を持った、イネ(ゲノムサイズ:450 MB)のparent間でのF<sub>2</sub>分析の場合、延べ2ヶ月程度で従来の遺伝子マップを1桁上回る2万の多型マーカーを系統的に走査することができるので、生理学的に重要な遺伝子の単離を極めて短期間でしかも低いコストで行うことを可能にする。現在、得られたマーカーを用いて遺伝子近傍のBACクローンによるcontigの作製を試みている。

## 1pK03

ペクチンの生合成に関わるガラクトuron酸転移酵素武内義弥、円谷陽一(埼玉大・理・分子生物)

ペクチンは高等植物細胞壁の主要な構成多糖の一つである。その構造は、ガラクトuron酸(GalA)がα-1,4-結合で連なったポリガラクトuron酸(polyGalA)を主とする。polyGalAの糖鎖の伸長を触媒するガラクトuron酸転移酵素(GTase)の諸性質を検討した。

アズキ(*Vigna angularis*)を室温、暗所で生育し、上胚軸から粗膜画分を調製して酵素源とした。GTaseの活性は0.3 mM UDP-[<sup>14</sup>C]-GalAを供与体とし、受容体である2 mg/ml polyGalAへの放射活性の取り込み量を測定して求めた。酵素の最適作用pHは6.8~7.5、最適作用温度は25~35°Cである。酵素活性にはMn<sup>2+</sup>が必須であり、界面活性剤として0.5% Triton X-100を加えると活性が2~3倍に増加した。重合度の高いpolyGalAよりも低いpolyGalA(酸可溶性画分、分子量約10,000)が良好な受容体であった。GTaseの活性は約1800 pmol/min/mg proteinである。糖転移産物のポリガラクトuron酸分解物をHPLCで分析することで[<sup>14</sup>C]GalAのα-1,4-結合でのpolyGalAへの取り込みを確認した。

## 1pK04

アラビノキシランの合成に関わるキシロース転移酵素

黒山 浩之、円谷陽一(埼玉大・理・分子生物)

アラビノキシランは単子葉植物細胞壁の主構成多糖の一つであり、β-(1→4)-結合したキシロース(Xyl)が主鎖をなし、アラビノースやグルクロン酸を側鎖に持つ。キシランの合成に関わるキシロース転移酵素(XTase)の諸性質を解析した。

小麦(農林61号)を25°Cで生育させ、実生から粗膜画分を調製して酵素源とした。XTaseの活性測定は、2 mM UDP-Xylを供与体、ピリジルアミノ基(PA)で蛍光標識したキシロオリゴ糖を受容体として、50 mM HEPES緩衝液(pH 7.0)中で反応を行なった。糖転移生成物をHPLCで分離、定量して酵素活性を求めた。活性は0.5% Triton X-100の添加で4~5倍に増加した。酵素の最適作用pHは6.8、最適温度は20°Cである。酵素反応によってXyl<sub>3</sub>-PAからXylがβ-(1→4)-結合で転移したXyl<sub>4</sub>-PAが生じた。長時間反応ではXyl<sub>5</sub>-、Xyl<sub>6</sub>-PAも生じた。Xyl<sub>2~5</sub>-PAの場合、重合度の高い方が高い活性を示す。UDP-[<sup>14</sup>C]-Xylを基質として放射活性の取り込みを調べた結果では、高級キシロオリゴ糖、水可溶性キシランが受容体となる。

## 1pK05

オオムギの幼葉鞘におけるエキソグルカナーゼ、エンド-1,3:1,4-グルカナーゼ、エンド-1,4-グルカナーゼの発現

小竹敬久、中川直樹、桜井直樹（広島大・総合科学）

オオムギ幼葉鞘細胞壁の主要成分である1,3:1,4-β-グルカンの分解には、複数の酵素が関与していると考えられている。演者らは、幼葉鞘で発現している2種のエキソグルカナーゼ、ExoIV, ExoVと4種のエンド-1,4-グルカナーゼ、Cell, 2, 3, 4をRT-PCRとcDNAライブラリースクリーニングによりクローニングした。すでにクローニングされているエキソグルカナーゼ、ExoIIとエンド-1,3:1,4-グルカナーゼ、EIと併せて合計8種の酵素の発現を調べた。8種のうち、ExoII, Cell, 2は幼葉鞘において強い発現が認められた。幼葉鞘切片における各遺伝子の発現を調べたところ、EIの発現がオーキシン処理後4時間後に促進されることが明らかになった。従ってオオムギ幼葉鞘では、少なくとも8種の遺伝子が1,3:1,4-β-グルカン分解に関わっていると思われる。そのうちEIは幼葉鞘でオーキシンにより転写レベルの活性調節を受けていることが示唆された。

## 1pK06

寄生根形成過程におけるエクспанシン (EXP) およびキシログルカン・エンドトランスグリコシラーゼ (XET) の遺伝子発現

蓮沼明子、若杉達也、古橋勝久<sup>1</sup>、山田恭司  
(富山大・理・生物、<sup>1</sup>新潟大・理・生物)

寄生植物は宿主から養分や水分を収奪するために特殊な吸収器官（寄生根）を形成する。我々は、寄生根の分化が高頻度かつ同調的に誘導できるネナシカズラ芽生えの系を用いて、寄生根形成のメカニズムを解明するための研究をすすめている。これまでの組織学的観察によれば、ネナシカズラの寄生根は、はじめに皮層の一部の細胞群が分裂を開始し、その後、より内側の一群の細胞が急激に顕著な伸長を起こすことによって形成される。本研究では、寄生根形成過程において細胞壁の分解・再構築に関わるタンパク質の遺伝子の発現パターンを mRNA レベルで調べた。まず、EXP と XET の cDNA クロームをネナシカズラから単離したところ、4種類ずつのクロームが得られた。これらを用いて、寄生根誘導処理後、経時的にノーザン分析を行った。その結果、XET の遺伝子では、いずれも誘導処理後 12-24 時間目に転写産物の蓄積量が増加していることがわかった。また EXP 遺伝子の中で EXP-3 だけは 24 時間目に転写産物が一過的に蓄積するというパターンを示した。さらに、他の細胞壁分解・再構築に関わる酵素（エキソ-β-グルコシダーゼ、β-1,4-グルカナーゼ、ペクチン・メチルエステラーゼおよびポリガラクトツロナーゼ）についての結果も合わせて報告し、これらのタンパク質の寄生根形成への関わりを考察する。

## 1pK07

ギンドロ培養細胞におけるペクチンの分解に関する酵素活性の変動

掛川弘一<sup>1</sup>、下川知子<sup>1,2</sup>（<sup>1</sup>農水省・森林総研、<sup>2</sup>科学技術振興事業団）

高等植物の細胞壁は細胞の成長ともなって活発に代謝されている。細胞壁を構成する主要な多糖類のうち伸長生長に伴うキシログルカンの分解や再構築についてはこれまでに多くの知見が得られてきた。しかし、その他の細胞壁多糖類、特にペクチンと伸長生長との関連については不明な点が多い。演者らはこれまでにギンドロ培養細胞を用いて成長過程における細胞壁多糖類の変化について研究し、キシログルカンに加えてガラクトタン、およびアラビナンといったペクチンの側鎖を構成する中性多糖類の代謝が活発に起きていることを明らかにしてきた。本研究ではこれらの多糖類の分解活性を経時的に追いつき、伸長生長との関係を明らかにすることを目的として実験を行った。

培養細胞から培地分泌性、細胞内可溶性、および細胞壁結合性の各粗酵素液を調製し、ガラクトタン、およびアラビナンを基質として酵素活性を測定した。その結果、細胞壁結合性の酵素はどちらの基質に対してもendo-1,4-β-glucanaseの活性と同様に伸長生長初期に高い活性を示すことが明らかになり、伸長生長との関係が示唆された。また、アラビナンを基質とした場合には分裂成長期に、ガラクトタンを基質とした場合には定常期初期にもう一つのピークが観察された。これらの結果からそれぞれの多糖、およびその分解酵素の細胞生長の調節における働きの違いが推測された。

## 1pK08

エンドウ(Pisum sativum L.) UDP-グルクロン酸デカルボキシラーゼの精製とcDNAクローニング

中川広宣、宮川功、小林優、間藤徹、關谷次郎  
(京都大院・農・応用生命・植物栄養学)

UDP-グルクロン酸デカルボキシラーゼ(NAD<sup>+</sup>非依存型、UDP-キシロース合成酵素)を、エンドウ幼植物から約800倍に精製した。本酵素の反応生成物がUDP-キシロースであることをHPLC, GCにより確認した。SDS-PAGEによって41.5kDaと42.3kDaのペプチドが検出されたが双方のN末アミノ酸組成(20残基)は同一であった。この配列とV8プロテアーゼ消化断片のアミノ酸配列(15残基)はSaccharopolyspora erythraeaのdTDP-グルコース-4,6-デヒドラターゼと高い相同性を示し、そのホモログはシロイヌナズナ、ダイズ、根粒菌などのESTに見いだされた。これらのアミノ酸配列を基に設計したプライマーとエンドウcDNAライブラリーでPCRを行い400bpのDNA断片を得た。この断片の推定アミノ酸配列はシロイヌナズナESTと95%の相同性があった。現在全長のシークエンスを行っている。さらに本酵素のポリクローナル抗体を作成し本酵素の局在部位を同定する予定である。

## 1pK09

*Oryza sativa* 培養細胞酵素によるアラビノキシロオリゴ糖へのフェルラ酸転移

下川知子<sup>1,2</sup>, 掛川弘一<sup>1</sup>, 吉田滋樹<sup>3</sup>, 石井忠<sup>1</sup> (1農水省・森林総研, 2化学技術振興事業団, 3筑波大・応用生物)

イネ科植物の細胞壁中には、ヘミセルロース成分であるアラビノキシランに結合したフェルラ酸が多く存在している。フェルラ酸含量は成長とともに増加し、植物体の強度と密接な関係のあることが知られている。このフェルラ酸はアラビノース残基の5位に特異的に結合していることから、フェルラ酸転移酵素の存在が示唆されているが、同酵素に関する知見は少ない。本研究では、イネ (*Oryza sativa*) 懸濁培養細胞より酵素液を調製し、酵素によるフェルラ酸転移反応を明らかにすることを目的として実験を行った。

イナワラから単離したアラビノキシロオリゴ糖 AXX (Ara-Xyl-Xyl) を受容体、フェルロイル-CoAをフェルラ酸供与体として酵素反応を行い、反応産物をHPLCにより分析した。反応産物中に、タケノコ細胞壁より単離されたフェルロイルアラビノキシロオリゴ糖 FAXX (feruloylated AXX) に相当するピークが認められたため、この反応産物を逆相カラムクロマトグラフィーにより単離・精製して構造決定を行った。その結果、AXXにフェルラ酸が転移したフェルロイルオリゴ糖であることが確認され、酵素による転移反応の起きていることが明らかになった。現在、このフェルラ酸転移酵素の諸性質について検討を行っている。

## 1pK10

エンドウ細胞壁におけるキシログルカン架橋構造の解析

藤野猛史、曾根義昭<sup>1</sup>、三石安<sup>2</sup>、伊東隆夫 (1京都市大・木質研, 2大阪市立大・生活科学・食物栄養、2工技院・生命研)

我々は急速凍結・ディープエッチング法によりエンドウ表皮細胞壁におけるセルロースマイクロフィブリル間の架橋構造を可視化した。さらにこの架橋構造はEDTA処理に引き続いて2% SDS及び4% KOH処理後も観察されるのに対して、glucanase処理を行うことにより消失することから、架橋構造がキシログルカンである可能性を既に報告した。本報告では、glucanaseがエンドウ細胞壁においてキシログルカンを分解していることを明らかにするためにキシログルカンの分布を免疫電子顕微鏡により調べ、glucanase分解産物の定性を行った。免疫電顕観察の結果、glucanase処理により細胞壁から標識が大きく減少した。さらにglucanaseによる細胞壁分解物を薄層クロマトグラフィーで分析した結果、glucanaseはキシログルカンを分解していることが示された。従ってglucanase処理によりキシログルカンが細胞壁から除去されていることが確かめられた。以上の結果からセルロースマイクロフィブリル間の架橋構造はキシログルカンであることがさらに強く示唆された。

## 1pK11

細胞壁グルカナーゼ活性に対するキチナーゼの影響

丸岡弘和, 井上雅裕, B. R. Thomas<sup>1</sup>, D. J. Nevins<sup>1</sup> (愛媛大・理・生地, <sup>1</sup>Univ. California Davis)

暗所で育てたトウモロコシ (*Zea mays* L.) 芽生えの細胞壁から $\beta$ -(1,3)(1,4)-グルカン分解にたずさわる2種類のグルカナーゼを分離精製しそれらの酵素活性に対するキチナーゼの影響を調べた。

トウモロコシ細胞壁から調製した酸性キチナーゼ画分は他生物由来のキチナーゼと同様に塩基性グルカナーゼのグルカン分解酵素活性を促進することがわかった。また、トウモロコシ細胞壁およびそれから分離した多糖類 (ヘミセルロース画分) を基質に反応を行った場合にもキチナーゼによるグルカナーゼ活性の促進効果が確認された。キチナーゼ自体によるグルカン分解活性は殆ど検出されなかったため、キチナーゼはグルカンもしくはグルカナーゼの微細構造を修飾するものと考えられる。

以上の結果から、細胞壁キチナーゼが細胞壁グルカンの代謝にも関与するという可能性が示された。植物ホルモンオーキシンはグルカン分解を誘導して細胞伸長を促進することが知られているのでキチナーゼの活性ならびに合成・輸送に対するオーキシン作用について調べる必要がある。

## 1pK12

アスパラガスの胚形成時に分泌されるペルオキシダーゼのクローニング

竹田浩之、甲村浩之<sup>1</sup>、小竹敏久、中川直樹、桜井直樹 (広島大・総合科学, <sup>1</sup>広島県立農業技術センター・生工研)

アスパラガスのカルスは2,4-D存在下では分化しないが、2,4-Dを含まない培地で液体振盪培養すると不定胚を形成する。分化・胚発生に伴い細胞の形態変化に関係して細胞壁に分泌されるタンパクの機能を明らかにするために、+/-2,4-Dの細胞壁からタンパク質を抽出し比較した。タンパク質を陽イオン交換カラムで分離し、SDS-PAGEにかけた。いくつかのタンパクが不定胚形成時に特異的に分泌されていた。そのうち一つのタンパクについてN末端15アミノ酸をシーケンスした。得られたアミノ酸情報からプライマーを設計し、RT-PCR法でほぼ全長のクローンを得た。このクローンの塩基配列をシーケンスしホモログ検索にかけたところ、ペルオキシダーゼと高い相同性があった。制限酵素処理して得られたDNA断片をプローブとしてノーザンを行ったところ、

2,4-Dで胚形成誘導時に強い発現がみられた。また、細胞壁結合型のペルオキシダーゼ活性を比較すると、-2,4-Dの方で強い活性がみられた。現在、このタンパクの精製・単離、及び基質となる物質の検討を行っている。

## 1pK13

セルロース合成阻害に伴うBY-2細胞の細胞壁多糖類、リグニン及び分泌多糖類の変化

高橋麻衣、佐台秀康、中川直樹、櫻井直樹（広島大・総合科学）

セルロース合成阻害剤であるDCBに馴化させたタバコ培養細胞(BY-2)では、細胞壁中のセルロース量が減少し、ペクチン量が増加する(Nakagawa & Sakurai 1998)。一方セルロース合成能が低下したシロイヌナズナ突然変異体の細胞壁成分でも同様のことが報告され、ペクチン量の増加は非晶性セルロースの蓄積によると考えられている(Arioli et al. 1998)。そこでDCB馴化細胞の細胞壁と分泌多糖類について構成単糖類分析、メチル化分析、ウロン酸定量、リグニン定量を行い、正常なBY-2細胞と比較した。メチル化分析の結果、ペクチン画分ではT-Ara、2-Ara、5-Ara、4-Gal、ヘミセルロース・分泌多糖ではT-Xyl、4-Xyl、4-Glc、4,6-Glcが主成分であった。馴化細胞の多量なペクチンの蓄積は主にウロン酸の蓄積によることが分かった。また馴化細胞のヘミセルロース量は約1/3~1/5と少なく、リグニン量は2~10倍、分泌多糖量は2~3倍と多かった。以上の結果、馴化細胞ではセルロースの合成阻害に伴い、セルロースと結合すべきキシログルカンが培養液中に分泌されたと考えられる。非晶性セルロースが蓄積された画分はなかった。また馴化細胞ではアラビノガラクトサンやホモガラクトソロンなどのペクチン多糖やリグニンの合成活性が高まり、セルロース・キシログルカンネットワークをつくれない細胞壁の強度を補っていることが示唆された。

## 1pK14

アズキ上胚軸の伸長成長およびキシログルカン分解活性の光による調節

加来友美、若林和幸、神阪盛一郎、森 仁志<sup>1</sup>、保尊隆享（大阪市大院・理・生物、<sup>1</sup>名古屋大院・生命農・生物情報制御）

双子葉植物の細胞壁マトリックスの主成分であるキシログルカンは、細胞壁伸展性と細胞の伸長成長の調節において重要な役割を担っている。本研究では、光がアズキ上胚軸の成長を制御するときのキシログルカン代謝の変化を調べた。暗所で生育させたアズキ芽生えに白色光を照射すると、上胚軸の伸長成長が抑制された。光照射下では細胞壁中のキシログルカン量の増加とその高分子化が起っていた。また、細胞壁中のキシログルカン分解酵素活性を測定したところ、光を照射して2時間以内に急速に減少することがわかった。一方、光照射下で生育させたアズキ芽生えを暗所に移すと、上胚軸の伸長成長が促進された。この時、細胞壁中のキシログルカン量の減少とその低分子化が起っており、また、キシログルカン分解活性は、暗所に移して2時間以内に急速に増加した。以上の結果から、光はキシログルカン分解活性を調節することにより、細胞壁中のキシログルカンの量および分子量を変化させ、アズキ上胚軸の成長を調節していることが示唆された。

## 1pK15

3-Dクリノスタットにおけるイネ幼葉鞘の自発的形態形成と細胞壁並びに微小管配列の変化

佐伯瑞枝、若林和幸、保尊隆享、神阪盛一郎（大阪市大院、理、生物）

3-Dクリノスタットによる疑似微小重力環境下でイネ穎果を発芽、育成させると、幼葉鞘は穎果に向かって自発的に屈曲した。このようなイネ幼葉鞘にみられる自発的形態形成は、STS-95における宇宙実験でも確認された(Hoson et al. 1999)。自発的屈曲の原因となる偏差成長の誘導機構を解明するため、3-Dクリノスタット上での屈曲部域の凸側及び凹側で、細胞壁の特性並びに細胞質表層微小管の配列を解析した。成長速度の大きい凸側の切片は凹側より高い細胞壁伸展性を示した。また、凸側では凹側よりもヘミセルロース構成多糖が低分子化しており、このヘミセルロース構成多糖の主成分である(1→3),(1→4)-β-グルカンの分解活性が増加していた。さらに、微小管配列を見ると、凸側では長軸と直交するものの割合が高く、逆に凹側では平行に配列するものが多い傾向が観察された。以上のことから、3-Dクリノスタット上で生育したイネ幼葉鞘にみられる自発的形態形成は、細胞壁の多糖代謝や微小管の配列の不均衡な変化を介してもたらされることが示唆された。

## 1pK16

重力刺激によるシロイヌナズナ胚軸の伸長成長およびキシログルカン代謝の調節

曾我康二、若林和幸、保尊隆享、神阪盛一郎（大阪市大院・理・生物）

過重力環境下(300 g)でシロイヌナズナを生育させたところ、胚軸の伸長成長は抑制されたが、微小重力環境下(スペースシャトルSTS-95)では成長が促進された。この時、過重力は細胞壁伸展性を低下させたが、微小重力は細胞壁伸展性を増加させた。また、過重力は細胞壁多糖の単位長さ当たりの量を増加させたが、微小重力は減少させた。さらに、過重力はキシログルカンの量および分子量を増加させたが、微小重力環境では減少した。過重力および微小重力環境で生育させた胚軸細胞壁画分から抽出した粗酵素標品を用いてキシログルカン分解活性を測定したところ、過重力によりキシログルカン分解活性が低下していた。しかし、微小重力によってその活性は増加していた。以上の結果より、シロイヌナズナ胚軸では重力刺激の大きさに応じてキシログルカン分解活性を調節することにより、キシログルカンの量および分子量が変化すると考えられる。このような変化と細胞壁の厚さの変化によって細胞壁伸展性が変わり、異なる重力環境におけるシロイヌナズナ胚軸の成長が調節される可能性が示された。

## 1pK17

細胞壁の臨界降伏張力 ( $\gamma$ ) を調節するタンパク質 yieldin の性質と組織内局在

中里(岡本)朱根<sup>1</sup>、高橋宏二<sup>2</sup>、仙波りつ子<sup>3</sup>、加藤潔<sup>2</sup>(昭和薬科大・生物<sup>1</sup>、名古屋大学・情報文化学部・人間情報学研究科<sup>2</sup>、愛知県心身障害者コロニー<sup>3</sup>)

グリセリン処理ミトリササゲ中空胚軸における細胞壁の臨界降伏張力 ( $\gamma$ ) を調節するタンパク質をミトリササゲ細胞壁から単離・精製して yieldin と名付け<sup>1</sup>、遺伝子のクローニングを行い、recombinant yieldin を調製した<sup>2</sup>。Recombinant yieldin を用い、yieldin による  $\gamma$  調節活性の pH 及び温度依存性なども検討した。また、recombinant yieldin に対して作製された抗血清を用いて yieldin の組織内局在性を検討したので合わせて報告する。

<sup>1</sup>Okamoto-Nakazato, A., Nakamura, T. & Okamoto, H. (1999) *Plant Cell & Environ.*, in press.

<sup>2</sup>Okamoto-Nakazato, A., Takahashi, K., Kido, N., Owaribe, K., Katou, K. (1999) *do.*, in press.

## 1pK18

湿度と pH による細胞壁粘弾性の変化

谷本英一、山本良一<sup>1</sup>、藤井修平<sup>1</sup>、稲永忍<sup>2</sup>; 名古屋大学・自然科学センター、<sup>1</sup>帝塚山短大・食品、<sup>2</sup>鳥取大・乾燥地研究センター、E-mail; tanimoto@nsc.nagoya-cu.ac.jp

根の細胞壁は外界に解放されているため、湿度や pH などの影響を直接受ける。そこで、根の細胞壁の粘弾性が、湿度と pH によってどのように変化するかを、クリーブメータ (山電・東京) と Kelvin-Voigt-Bergers の 6 要素モデルを用いて解析し、弾性率 (E0, E1, E2) と粘性係数 ( $\eta_0, \eta_1, \eta_2$ ) を得た。多数の均一な材料を得るため、アラスカエンドウの側根の伸長帯をメタノール固定し、それぞれの条件で *in vitro* 処理して粘弾性を計測した。

**湿度の効果:** 臨界点乾燥した細胞壁試料を異なる湿度条件で粘弾性変化を求めると、3つの弾性係数 (E0, E1, E2) は、相対湿度 (%) の増加とほぼ比例して減少した。粘性係数 ( $\eta_0, \eta_1$  and  $\eta_2$ ) も、湿度の増加とともに減少したが、減少は湿度に比例しなかった。

**pH の効果:** pH の低下によって粘性係数  $\eta_0$  が顕著に減少した。細胞壁の伸び易さの指標となる  $1/\eta_0$  の値は、pH 3 の値が pH 6 の 3 倍以上になった。 $\eta_0$  の変化を担う細胞壁成分は現在研究中である。

これらの結果から、土壌中の湿度や pH が根の細胞壁の粘弾性に直接作用して、細胞壁の伸展性を変化させ、成長を制御する可能性が示唆された。

## 2aK01

春化处理したトルコギキョウにおけるジベレリンに対する反応性

岡真理子、田坂恭嗣、岩渕雅樹、三野真布 (岡山県生物科学総合研究所)

演者らは春化处理したトルコギキョウの抽だいにおけるジベレリン (GA) の役割を研究し、これまでに春化处理が抽だいを促すと共に、GA に対する反応性を高めることを明らかにした。本研究では、GA に対する反応性の高まりに低温処理期間がどの程度必要かを調査した。ロゼット化した幼植物体を GA 生合成阻害剤であるアンシミドール  $10^{-5}$  M を含む培地に移植し、異なる春化处理期間を経た後に、アンシミドール共存化で  $10^{-7}$  ~  $10^{-4}$  M の GA<sub>3</sub> を処理して抽だいを調べた。その結果、いずれの濃度においても春化处理期間が長い程より良く反応して早く抽だいを促す傾向が認められた。

トルコギキョウの抽だいには、15°C 以下で 3~4 週間の春化处理が必要である。しかし、この低温処理を途中で中断すると、処理期間が合計で 4 週間でも、連続して処理した場合よりも抽だい率が低かった。この時の GA に対する反応性も合わせて報告する。

## 2aK02

春化处理したトルコギキョウのジベレリン合成酵素遺伝子の発現消長

三野真布、岡 真理子、田坂恭嗣、岩渕雅樹 (岡山県生物科学総合研究所)

トルコギキョウは芽生え期に 25°C 以上の温度に遭遇してロゼット相に入り、開花に至る茎伸長には春化处理 (15°C、3 週間以上) が必要である。また、茎伸長にはジベレリン (GA) の関与が明らかにされている。本研究は、春化处理が GA 合成系酵素である Copaly diphosphate synthase (CDP)、GA 20-oxidase (GA 20-ox) および GA 3  $\beta$  hydroxylase (GA 3  $\beta$ -hy) の遺伝子の発現にどのような影響を及ぼすかを調査し、ロゼット相打破との関連を明らかにする目的で行った。各遺伝子の発現量は TaqMan-PCR 法を用いて RT-PCR で推定した。春化处理開始から 2 週間目にかけて茎では 3 遺伝子全ての発現量が、葉では CDP と GA 3  $\beta$ -hy の発現量が、春化处理しなかった個体よりも多かったが、その後は減少した。春化处理後の 1 週間目までは、葉の GA 20-ox と GA 3  $\beta$ -hy の発現量は未処理個体よりも少なく、CDP は葉で多く、茎では差がなかった。GA で発現誘導される *expansin* 遺伝子と GA シグナル伝達の制御因子 SPY の発現消長とも合わせて報告する。

## 2aK03

コムギの深播き耐性における第一節間の伸長成長のためのジベレリン応答

陳磊, 東谷篤志, 小松節子<sup>1</sup>, 高橋秀幸 (東北大・遺生研,  
<sup>1</sup>農水省・生物研)

中国の黄土高原で発見された在来コムギ品種 (*Triticum aestivum* L.) の紅芒麦の芽ばえは、第一節間を伸ばすことによって、深播き耐性を示す。本研究では、第一節間の伸長に対するジベレリンの作用とその深播き耐性との関係について解析した。培地に外生のジベレリンを与えると、紅芒麦の第一節間の伸長は、著しく促進された。しかし、供試した他の日本の通常の品種では、GA<sub>3</sub>を与えても、第一節間の伸長はほとんど促進されなかった。他の品種に比較して、紅芒麦の内生ジベレリン量に、それほど大きな違いはなかった。紅芒麦では、ジベレリンを与えると、第一節間の細胞壁中の(1→3),(1→4)-β-D-グルカン加水分解酵素の活性が促進された。また、GA結合タンパクの発現レベルは、GA<sub>3</sub>を与えると、紅芒麦の第一葉では増大したが、他の品種では、GA<sub>3</sub>を与えると逆に減少した。これらの結果から、紅芒麦はジベレリンに対して超感受性であり、それが深播き条件における第一節間伸長の主要因と考えられる。

## 2aK04

コウキクサの根における伸長成長のジベレリン制御

稲田さやか、新免輝男 (姫路工大・理・生命)

我々は、コウキクサの根の成長が、内生ジベレリンによって制御されていることを報告している。

本研究では、伸長成長を分裂成長と区別するために、根の切片を用いて解析を行った。その結果、切片の伸長は、ジベレリン合成阻害剤であるユニコナゾール P (Un-P)によって阻害され、その阻害は GA<sub>3</sub>を同時に添加することで抑制された。Un-Pによって、表皮細胞の長さは短くなったが、幅は変化しなかった。また、表層微小管 (CMT)は Un-Pによって断片化していた。そこで、微小管安定化剤であるタキソールを同時に添加することで、Un-Pによる CMT 配列の阻害を抑制した。しかしながら、切片の伸長は Un-P 単独処理時と同様に阻害された。

以上の結果より、内生ジベレリンによる伸長成長の制御には、CMT の配向以外の要因も関与している可能性が考えられる。

## 2aK05

アズキ上胚軸切片の成長と糖代謝に対するジベレリンの作用

松田幸隆, 井上雅裕 (愛媛大・理・生地)

植物の茎の伸長成長はオーキシン(IAA)とジベレリン(GA)によって制御されている。IAA は表皮の細胞壁をゆるませて細胞の伸長成長を促進するが、GA の作用についてはまだ不明な点が多い。本研究では明所で育てたアズキの上胚軸切片の伸長成長に対する GA の促進機構を調べた。GA は単独では切片の伸長成長を誘導しないが IAA による伸長成長を相乗的に促進した。また、スプリット屈曲試験により IAA とは異なり GA が内部組織の成長能力を高めることが示唆された。次に、切片の長さをかえたスプリット屈曲試験と HPLC による糖分析の結果、伸長域へのスクロースの移動を GA が促進することがわかった。さらに、水の透過性および細胞壁分解活性に対する GA の影響が少ないこと、成長実験でスクロースが GA に似た作用を持ちかつそれらの伸長促進効果が細胞壁合成阻害剤により抑制されることもわかった。

以上の結果から、ジベレリンは内部組織の糖輸送、代謝促進を介してオーキシンによる伸長成長を促進すると考えられる。

## 2aK06

アズキ上胚軸成長に対する疑似微小重力と植物ホルモンの影響

井上雅裕, 都築敬一郎, 保尊隆享<sup>1</sup> (愛媛大・理・生地,  
<sup>1</sup>大阪市大・理・生物)

明所で生育したアズキ芽生えの上胚軸の成長に対する疑似微小重力と植物ホルモンの影響を調べた。発芽後 3 日目静置培養した芽生えを 1Dクリノスタット上で 24~72 時間生育させ、芽生えの形態と上胚軸の成長(長さとし生重量)パタンの変化を解析した。その結果、クリノスタット上で生育した芽生えでは、静置状態のものに比べ上胚軸の成長方向が不規則で、一部に肥大成長が観察され伸長量も低下していたが、葉の形態には大きな差がなかった。伸長抑制の原因を探るために、上胚軸成長域の切片(10 mm)を調製して伸長試験を行ったが、そのオーキシンによる伸長能力に差はなかった。ただ、各種糖による伸長促進率には一部違いがみられた。次に、根に植物ホルモンとミネラル (MS 培地)を与え、上胚軸のインタクトな成長に対する影響を調べた。ジベレリンと MS 培地は上胚軸の伸長を促進し、オーキシン、サイトカイニン、ABA はそれを阻害した。ここで、クリノスタット上での伸長抑制が低濃度のジベレリンによって特に回復することもわかった。以上の結果から、クリノスタット上で生じる芽生えの形態並びに成長の変化とジベレリンおよび糖代謝との関連が示唆された。

## 2aK07

イネ GA3 β 水酸化酵素遺伝子の単離と解析  
伊藤博紀<sup>1</sup>, 上口 (田中) 美弥子<sup>1</sup>, 北野英巳<sup>2</sup>, 小林正智<sup>3</sup>,  
松岡 信<sup>1</sup>, <sup>1</sup>名大・生物応答セ,<sup>2</sup>名大・農学部,<sup>3</sup>理研・  
ライフサイエンス

今回、我々は、イネより活性型ジベレリン(GA)合成の最終段階を触媒するGA3 β水酸化酵素遺伝子を2種類(*Oryza sativa* GA 3β-hydroxylase L<sub>2</sub>; OsGA3ox1, OsGA3ox2)単離し、その解析を行った。日本型イネ、アゾミノリとインド型イネ、IR24からのR1ラインを用いて両遺伝子をマッピングした結果、OsGA3ox1は第5染色体に、もう一方は第1染色体長腕のテロメア側にマップされた。この結果は、OsGA3ox2がGA欠損型矮性突然変異体として既に第1染色体長腕にマップされていたd18の原因遺伝子である可能性を示唆していた。そこで、d18変異株3系統についてOsGA3ox2コーディング領域のシーケンスを行ったところ、すべてのアレルに関して様々な塩基欠失が確認された。以上の結果は、OsGA3ox2がd18の原因遺伝子であることを示唆し、このことは、野生型OsGA3ox2領域を用いた相補性検定により矮性表現型が回復することで確認された。

また、D18 (OsGA3ox2)の発現は内活性型GA量によりフィードバック制御を受けるが、OsGA3ox1は活性型GA量によって発現制御されない。さらに、D18の発現は調査したすべての器官において観察されたが、OsGA3ox1の発現は、薬特異的に観察された。これらに結果は、イネにおいて少なくとも2タイプのGA3 β水酸化酵素遺伝子が存在し、D18はGA1が合成されるほとんどすべての器官において常に発現し、OsGA3ox1の発現はGA4が活発に合成され蓄積することが知られる薬特異的であるということを示している。

## 2aK08

イネ (*Oryza sativa* L.) のジベレリン 3 β 水酸化酵素遺伝子、  
OsGA3ox1の機能

小林正智, 伊藤博紀<sup>1</sup>, 上口 (田中) 美弥子<sup>1</sup>, 千徳直樹<sup>1</sup>,  
北野英巳<sup>2</sup>, 松岡信<sup>1</sup> (理研・植物分子,<sup>1</sup>名大・生物  
応答センター,<sup>2</sup>名大・生命農学)

成熟したイネの薬の内生ジベレリンレベルは栄養成長器官の約1000倍に達する。薬より調製したセルフリー系による代謝実験においては極めて高いジベレリン3 β水酸化活性が見いだされている。また茎葉の3 β水酸化活性が著しく低い矮性イネ、矮稲Cにおいても薬の3 β水酸化活性は正常であることから、薬においては茎葉と異なる3 β水酸化酵素遺伝子が発現していることが予想された。今回演者らはイネより2種類のジベレリン3 β水酸化酵素遺伝子、OsGA3ox1、

OsGA3ox2をクローニングしたが、このうちOsGA3ox1は薬特異的に発現していたので、その機能について解析した。大腸菌で発現させた融合蛋白を用いたin vitroアッセイの結果、OsGA3ox1はジベレリンの3 β位の水酸化を触媒するとともに、二重結合の導入、および2 β位の水酸化活性も持つことが明らかになった。発現パターンやミュータントの形態についての解析より、出穂時に薬において生合成されたジベレリンは上位節間、特に第一節間の伸長の促進に働いていることが示唆された。

## 2aK09

イネジベレリン2β水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析  
坂本知昭<sup>1,2</sup>, 田切明美<sup>2</sup>, 伊藤博紀<sup>3</sup>, 松岡信<sup>3</sup>, 岩堀修一<sup>1</sup>,  
萱野暁明<sup>2</sup>, 田中宥司<sup>2</sup>, 小林正智<sup>1</sup>(筑波大院・農,<sup>2</sup>生物研,<sup>3</sup>  
名古屋大・生物分子応答,<sup>4</sup>理研・ライフサイエンス)

ジベレリンは2位の炭素が水酸化されることにより不可逆的に不活性化することが知られている。我々はイネからこの過程を触媒するジベレリン2β水酸化酵素をコードする遺伝子OsGA2ox1を単離した。

大腸菌内で発現させたOsGA2ox1タンパク質はラクトン環を持つC<sub>19</sub>-ジベレリンを2β水酸化する活性を有したことから、OsGA2ox1はジベレリン2β水酸化酵素をコードしていることが確認された。

イネの発芽種子と栄養生長期の茎頂におけるジベレリン2β水酸化酵素遺伝子OsGA2ox1の発現領域を、活性型GAの生成を触媒するジベレリン3β水酸化酵素をコードする遺伝子OsGA3ox2の発現領域と比較したところ、茎頂分裂組織では葉原基や葉全体にOsGA3ox2が強く発現していたのに対し、OsGA2ox1の発現は葉原基や葉鞘の下端に局在していた。一方発芽種子では胚盤上皮細胞でOsGA3ox2が強く発現し、同時に胚盤上皮細胞と糊粉層でOsGA2ox1が発現していた。以上の結果から、OsGA3ox2とOsGA2ox1の発現領域の厳密な制御によって、イネ植物体内における活性型ジベレリンの分布が調節されている可能性が示唆された。

## 2aK10

bZIP 型転写因子 RSG の標的遺伝子の探索  
深澤壽太郎<sup>1</sup>, 山口五十鷹<sup>2</sup>, 神谷勇治<sup>3</sup>, 高橋陽介<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・理・生物科学,<sup>2</sup>東大・農,<sup>3</sup>理化学研究所)

RSG (repression of shoot growth) は bZIP 領域を持つ、タバコの転写活性化因子である。正常型 RSG の活性を選択的に阻害するドミナントネガティブ型 RSG を発現する形質転換タバコを作製し解析を行った結果、節間成長の阻害、主に細胞伸長が抑制されている事が明らかになった。形質転換植物に対するオーキシンとブラシノライドの投与は効果が認められなかったが、ジベレリンを投与すると個体の形態はコントロール植物とほぼ同程度まで回復した。そこで、ジベレリンの内生量を定量したところ、GA<sub>1</sub> が対照植物の 15% に低下している事が明らかとなった。以上の事から、RSG はジベレリンの生合成酵素の遺伝子の発現を直接、または間接的に制御する事によって GA の内生量を制御していると予想された。近年、ジベレリン欠損変異体などを用いて、ジベレリンの生合成酵素の遺伝子が徐々にクローニングされている。これらの遺伝子のプロモーター領域に RSG の結合配列が存在するか、またその遺伝子のプロモーターは RSG によって活性化されるかを検討する事により RSG の標的遺伝子を探索している。

## 2aK11

14-3-3 タンパク質による bZIP 型転写因子 RSG の活性制御機構の解析

五十嵐大亮、深澤壽太郎、石田さらみ、高橋陽介(東大院・理・生物科学)

RSG はシュートの成長を調節する bZIP 型転写因子である。RSG の機能を阻害した形質転換タバコでは、ジベレリンの内生量が低下しシュートの成長が著しく阻害される。遺伝子の発現調節には転写因子間の相互作用が重要である。そこでシュートの成長に関する転写制御系のネットワークを明らかにするため RSG と相互作用するタンパク質群を two-hybrid 法で単離・解析した。

それらのタンパク質のうち一つは 14-3-3 と呼ばれる真核生物の制御因子に広く存在する構造を持っていた。14-3-3 タンパク質は多くの場合、標的タンパク質のリン酸化されたセリンと結合して、その機能を調節する。キナーゼ Raf や M 期移行を調節する Cdc25p の制御への関与がよく知られている。点突然変異を導入した実験から RSG の 114 番目のセリン残基が 14-3-3 との結合に重要であることが明らかになった。このセリンのリン酸化により RSG と 14-3-3 との結合が制御されていると予想される。そこでトランジェントアッセイにより、14-3-3 と結合できない RSG(S114A) の転写因子としての活性を調べることで、14-3-3 による RSG の制御機構を解析した。また 14-3-3 による RSG の細胞内局在を解析した。

## 2aK12

3量体Gタンパク質 $\alpha$ subunitの欠損したイネ d1 矮性変異体はジベレリン情報伝達が異常になっている

上口(田中)美弥子、藤沢由紀子<sup>1</sup>、小林正智<sup>2</sup>、北野英巳、岩崎行玄<sup>1</sup>、松岡信(名大・生物分子応答センター、生命農学、<sup>1</sup>福井県大・生物資源、<sup>2</sup>理研)

イネ d1 矮性変異体は、3量体Gタンパク質 $\alpha$ subunit の欠損であることが、藤沢らにより明らかとなった。以前より、マストパランを用いた生化学的研究から GA 情報伝達の上流におけるGタンパク質の関与が示唆されていた。そこで、我々は、d1変異体において、GA 情報伝達系が異常を示しているのか否かを検討した。

まず、d1変異体における $\alpha$ -amylase の GA による誘導発現を調べたところ、野生型では、その活性誘導は低濃度 ( $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$ M) の GA で飽和に達するのに対し、d1変異体では活性誘導の程度が低く、高濃度 ( $10^{-5}$ M以上) でも飽和しなかった。このことは、d1変異体では、 $\alpha$ -amylase 誘導に対する GA の効果が低くなっていることを示している。 $\alpha$ -amylase 遺伝子及び GA シグナル伝達経路に関与していると予想される GAmyb および GA 依存性型  $Ca^{2+}$ -ATPase 遺伝子の発現は d1変異体において、非常に低下していた。さらに、地上部においては、節間伸長に対する GA の反応性も著しくおちていた。最近、我々が明らかにした GA シグナル伝達系の抑制因子である SLR 遺伝子の欠損変異体である徒長型変異体イネ、s1r との二重劣性変異体を作製したところ、地上部の形態ならびに $\alpha$ -amylase の発現についても s1r 型を示したことから、D1 は SLR の上流で機能しているものと推察された。

以上の結果より GA 情報伝達系における3量体Gタンパク質 $\alpha$ subunit の機能について考察する。

## 2pK01

イネの恒常的ジベレリン反応性突然変異体、*slender rice*の原因遺伝子SLRはGAI, RGA, Rht-1およびD8と相同性遺伝子である。

池田 亮, 上口(田中)美弥子, 園田 裕, 北野英巳, 蓬原雄三<sup>1</sup>, 松岡 信, 山口淳二

(名大・生物応答センター・生命農学, <sup>1</sup>名城大・農)

日本晴突然変異体 *slender rice* (*slr-1*) は、正常品種が過剰にジベレリン(GA)に反応した形態と極めて類似していた。しかしこれらの表現型は内GAに依存に依存していなかったことから、この変異体がGAによるシグナル伝達系を常に 'ON' にしている恒常的GA反応性突然変異体と結論づけられ、その原因遺伝子SLRの本来の機能は、GAシグナルを負に調節しているものと考えられた。

さらにSLR遺伝子を単離したところ、アラビドプシスのGAIおよびRGA、トウモロコシのD8、「緑の革命」で知られるコムギのRht-1と相同性遺伝子であった。これらの矮性変異体がin-frame型欠失変異であったのに対して、*slr-1*では1塩基の欠失によって引き起こされたloss of function型変異であった。また*slender rice*にSLRを形質転換したところ、正常な表現型に相補された。

## 2pK02

ジベレリン非感受性極矮性変異体の解析

山室千鶴子、上口(田中)美弥子、小林正智<sup>1</sup>、千徳直紀、北野英巳、松岡信(名大 生物分子応答センター、生命農学、<sup>1</sup>理研)

我々は、ジベレリンシグナル伝達経路の解明を目的として、N-メチルウレアによって作製した変異体集団の中から、ジベレリン(GA)非感受性変異体を単離した。この変異体は、不稔を伴う極矮性変異体であり、その形質は(GA)合成に欠損を持つd18の強いアレルと酷似していた。しかし、d18と異なり(GA)の添加によりその形質の回復が引き起こされることはない。また本変異体においては、アリューロン層における(GA)による $\alpha$ アミラーゼの誘導が観察されない。さらに、本変異体では内性ジベレリン量が増加しており、特に活性型GAであるGA1は野生型の120倍にも及ぶ高い内性量が確認された。これらの結果は、この変異体が、ジベレリン非感受性変異体であり、この変異体の原因遺伝子が、ジベレリンのシグナル伝達のポジティブレギュレーターとしての役割を担うタンパク質をコードしている可能性を示している。

## 2pK03

発根促進物質 N-(フェネチル)コハク酸アミドの生物学的活性と構造活性相関

副島 洋, 林 善晴<sup>1</sup>, 板垣 美保子, 江島 孝光<sup>1</sup>, 石井 耕, 藤田 稔夫<sup>2</sup>

(雪印種苗(株)技術研究所,<sup>1</sup>旭化成工業(株)延岡医薬工場,<sup>2</sup>EMILプロジェクト)

バチルス属菌の工業的培養液中から単離された発根促進物質 N-(フェネチル)コハク酸アミド(PESA)の生物学的活性をオーキシンと比較した。アズキ不定根発生試験ではアズキ切片作成後, IAA が 0~24 時間で最も効果が高かったのに対し, PESA は 48~72 時間の処理が最も効果的で, この効果は TIBA を茎上部に塗布することで阻害された。また, PESA はオーキシンと異なりアズキの茎伸長促進作用, ダイコンの葉の上偏生長促進作用を示さなかった。PESA をピーマンのセル成型苗に処理したところ, 総根長, 根部乾物重が増加した一方で, 上偏生長・茎割れは認められなかった。一連の類縁化合物を合成し, 構造活性相関解析を試みたところ, 発根促進活性は疎水性に依存することが示された。合成した化合物中では N-(4-フェニルブチル)コハク酸アミドメチルエステルが実用的には最も有望と考えられる。

## 2pK04

IBA による発根誘導過程の初期に出現するインドールブチロラクトン  
横山峰幸, 山口祥子, 吉田誠一, 阪本均<sup>1</sup>(資生堂・基盤セ,<sup>1</sup>サカタのタネ・長後試験場)

オーキシンが発根誘導に必須の作用を有することはよく知られている。われわれはインドール酪酸(IBA)によるミマサイコ不定根での発根誘導過程において, 細胞外における初期のオーキシン代謝を知る目的で, IBA を与えた直後のアポプラストまたは根組織近傍の生成物質を調べた。その結果, 3 種類の物質(Fa, Fb, Fb')が細胞外に出現することがわかった。Fa と Fb' は IBA の生理的な変換とは無関係なものであったが, Fb は IBA の 1' 位が水酸化され, 末端のカルボン酸と反応してラクトン環を形成した物質であった。Fb は培地中の IBA の減少に伴って一時的に増加し, その出現は IBA による発根誘導条件と相関していた。

そこで Fb を化学合成して, その発根誘導活性を調べた。サイコ不定根培養系において, Fb は発根誘導作用を示し, その強さは IBA と同等か, または劣った(発根誘導条件による)。さらに, 既存の発根剤(オキシベロン: IBA が主剤)と比較して, 多種類の植物で発根誘導作用を調べたところ, ①切り口に与えるよりも葉に噴霧するほうが効果的であること, ②単独ではオキシベロンより効果が劣るが, 葉に噴霧したとき, オキシベロンと相乗的に働き, 根や苗の成長を促進した。

## 2pK05

アラビドプシス重力屈性変異株 *aux1-7* におけるクロモサポニンによる重力屈性の回復

Abidur Rahman, 鶴見誠二<sup>1</sup>, Arifa Ahamed, 後藤伸治<sup>2</sup>, 尼川大作(神戸大・自然科学,<sup>1</sup>神戸大・RI センター,<sup>2</sup>宮教大・生物)

エンドウ芽生えから得られるクロモサポニン I (CSI) がアラビドプシスの根の成長を著しく促進することを既に報告した。今回は, 重力屈性を示さない変異株である *aux1-7* が, 60  $\mu$ M の CSI を与えると重力屈性を示すようになることを発見したので報告する。AUX1 は根における IAA の influx carrier であると考えられている (Bennett et al. 1996, Yamamoto and Yamamoto 1998)。この CSI の作用は他の重力屈性変異株 *axr2*, *eir1-1* では観察されず, 野生型・オーキシン耐性変異株 *axr1-3*・エチレン非感受性変異株 *ein2-1* では, CSI は反対に根の重力屈性反応を遅らせた。CSI は野生型の根における <sup>3</sup>H-IAA の取込みを阻害し, *aux1-7* の根における取込みを促進したが, <sup>3</sup>H-NAA の取込みには影響しなかった。また, CSI は野生型の根の外生 IAA に対する感受性を低下させ, *aux1-7* の根の IAA 感受性を高めた。これらの結果は CSI が AUX1 タンパク質を制御する能力があることを示唆している。

## 2pK06

偏差成長欠損優性突然変異体 *msg2* の屈地性とオーキシン感受性の欠損には AXR1 が必要である  
立松圭, 山本興太郎(北大・地球環境・生態環境)

偏差成長欠損劣性突然変異体 *nph4/msg1* 及び *axr1* と優性突然変異体 *msg2* の二重突然変異体を作成し, 胚軸の偏差成長反応とオーキシン耐性を調べた。オーキシン片側塗布による屈曲反応については, *msg2* = *nph4* = *msg2 nph4* = *msg2 axr1* > *axr1* > 野生型の順序で欠損が見られた。屈地性の欠損の強弱は, *msg2* = *msg2 nph4* > *nph4* = *msg2 axr1* > *axr1* > 野生型の順序になった。これに対し, 屈光性とフック形成の欠損の程度は, *axr1* = *msg2 axr1* = *msg2 nph4* > *msg2* > *nph4* > 野生型の順序となった。また, これら突然変異体は, *msg2* = *msg2 nph4* > *axr1* = *msg2 axr1* > *nph4* > 野生型の順にオーキシン耐性を示した。以上の結果から, 優性変異した MSG2 は AXR1 と同一の反応経路上で作用していること, *msg2* 胚軸で観察される屈地性の欠損とオーキシン耐性には AXR1 が必要であることが示唆された。

## 2pK07

シロイヌナズナアブシジンアルデヒド酸化酵素の突然変異体 (*aao3*) の解析

瀬尾光範, A.J.M. PEETERS<sup>1</sup>, 小岩井花恵, 折谷隆之<sup>2</sup>, J.A.D. ZEEVAART<sup>3</sup>, M. KOORNNEEF<sup>1</sup>, 神谷勇治<sup>4</sup>, 小柴共一 (都立大・理・生物科学, <sup>1</sup>Wageningen Agric Univ, <sup>2</sup>東北大・農・応用生命, <sup>3</sup>Michigan State Univ, <sup>4</sup>理研)

アルデヒド酸化酵素 (AO) は、アブシジン酸 (ABA) 合成の最終段階の反応に関与していると考えられている。我々は、これまでに4種のシロイヌナズナAO遺伝子 [AAO (*atAO*-) 1, 2, 3, 4] のうちのAAO3によってコードされているAO $\delta$ がアブシジンアルデヒド酸化酵素 (ABAO) である可能性が非常に高い事を示してきた。

ごく最近AAO3と非常に近い位置にマップされる、新規のABA欠損突然変異体が単離された。この変異体ではAO $\delta$ の活性が検出されず、さらにAAO3遺伝子内に1塩基置換の変異が見つかった。これよりこの変異体はAAO3遺伝子に関する変異体であり、そのコードするタンパク (AO $\delta$ ) がABAOである事が明かになった。この変異体は、他のABA欠損突然変異体と同様に葉が萎れやすいという形質を示すが、種子の休眠性は野生型植物と変わらない。さらに内生ABA量は葉で大きく減少しているのに対し、種子ではその減少の度合いが少ない。このことはAO $\delta$ は主に葉でのABA合成を調節しており、サヤや種子では別のAOがABA合成に関与している可能性を示唆している。

## 2pK08

シロイヌナズナアルデヒド酸化酵素遺伝子の T-DNA 挿入ラインの探索

青木裕晋, 瀬尾光範, 小柴共一(都立大・理・生物科学)

アルデヒド酸化酵素 (AO) は植物ホルモンであるインドール-3-酢酸 (IAA)、アブシジン酸 (ABA) の合成に関与しているという知見が蓄積してきている。我々はシロイヌナズナにおいて少なくとも4種のAOアイソザイム (AO $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) を検出し、4種のcDNA [AAO(*atAO*-)1,2,3,4] を単離してきている。これまでにAO $\alpha$  (AAO1産物) に関してはIAA、またAO $\delta$  (AAO3産物) およびAAO4産物に関してはABAの合成に関与している可能性を生化学的解析によって示唆してきた。

ごく最近AAO3遺伝子内に変異を持つ突然変異体が単離され、そのABA合成欠損という表現型からAAO3遺伝子のABA合成への関与が分子遺伝学的にも明らかにされた。AAO1、2、4遺伝子の役割に関しては決定的な結果は得られておらず、これらの遺伝子産物の働き特にIAA、ABA合成への関与を明らかにするため遺伝子機能を欠損した植物の単離を進めた。12,000のT-DNA挿入ラインからPCRスクリーニングを行い最終的にAAO1に関しては1ライン、AAO4に関しては2ラインの挿入ラインを単離した。現在これらの変異体について表現型の観察を中心に解析を進めIAA、ABA合成との関連検討している。

## 2pK09

アブシジン酸応答性遺伝子発現制御に関わる突然変異体の解析

山本(豊田)章子, 井内和美, 橋川美菜, 服部東穂 (三重大・遺伝子)

我々はこれまでにシロイヌナズナのアブシジン酸 (ABA) 応答性遺伝子 *COR15a* の発現に異常のみられる98系統の突然変異体を分離している。これらのうち21系統について、ABAによる誘導を受ける他の遺伝子の発現をノーザン解析により調べた。その結果、*COR15a* と *RAB18* はほとんどの系統において類似した発現パターンを示したが、*RD29A* は、いくつかの系統において明らかに異なる発現パターンを示した。このことは、*RD29A* 遺伝子のABA応答性発現が、他の2遺伝子とは異なる機構によって制御されている可能性を示唆している。現在、これらの変異系統の表現型について、さらに詳しい解析を行っており、これについても報告する。

## 3aK01

サイトカニン応答性を示すGDP/GTP交換因子相同性遺伝子の構造と機能

木村琢磨<sup>1,2</sup>, 瀧紀幸<sup>1,3</sup>, 金子委利子<sup>1,3</sup>, 中野雄司<sup>1</sup>, 吉田茂男<sup>1</sup> (1理研・植物機能, 2埼玉大・理工学研究科, 3明治大・農)

サイトカニンは細胞分裂促進、葉緑体分化促進等の植物体の成育に必要な生理作用を制御することが知られているが、これらの情報伝達系の上流に位置するサイトカニン応答性遺伝子についての知見は非常に少ない。そこで我々は、タバコ緑色培養細胞においてサイトカニン生理作用の前段階もしくは初期段階と想定される刺激後12時間で発現が誘導される遺伝子群を、Differential Display法を用いて単離し、*cig* (*cytokinin inducible gene*) 1~3と命名した。続いて完全長*cig2*遺伝子の塩基配列の決定を行った結果、*cig2*遺伝子は全長約1300 bpの遺伝子であることが明らかとなった。homology searchの結果、翻訳開始時にribosome/tRNAと複合体を形成するeIF2に対するGDP/GTP exchange factor (GEF)であるeIF-2Bファミリーと高い相同性を示した。また同時にras, rhoなどのG-protienに対するGEFとも相同性が認められた。続いてより詳細な解析を行い、*cig2*はサイトカニン刺激後2時間以内に発現誘導を受けること、植物体内において、つばみにおいて最も高い発現が見られることが明らかとなった。現在、より詳細に*cig2*の機能解析を行うため、形質転換体の作出および、タンパク質大量発現系の確立などを試みている。

### 3aK02

サイトカイニン生合成阻害剤の探索

瀧紀幸<sup>1,2</sup>、木村琢磨<sup>1,3</sup>、金子委利子<sup>1,2</sup>、宮外麻周<sup>1</sup>、  
中野雄司<sup>1</sup>、浅見忠男<sup>1</sup>、内藤忠雄<sup>2</sup>、吉田茂男<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>理研・植物機能、<sup>2</sup>明治大・農、<sup>3</sup>埼玉大・理工学研究科)

サイトカイニン生合成経路は未解明の部分が非常に多い。植物体由来の生合成関連遺伝子は、配糖化酵素以外は未だ単離例が無く、生合成欠損突然変異体も現存しない。そこで、我々はサイトカイニン作用の生理学的解析や関連遺伝子の分子遺伝学的解析等に有用と考えられるサイトカイニン生合成阻害剤の探索を試みている。

植物体のサイトカイニン欠損に由来する表現型は未知であるが、我々はクロロフィル含量の低下をその一つとして予測している。そこで、植物体白化剤群の中で、構造上サイトカイニン生合成の分岐酵素であるイソペンテニル基転移酵素 (*ipt*) の阻害剤としての作用が考察可能なシクロヘキサエン系化合物に着目した。当阻害剤はクレス、タバコの明所発芽子葉を白化させるが、サイトカイニン共存処理において、若干の緑化回復が認められた。タバコ緑色培養細胞系における当阻害剤処理は、細胞増殖の低下、クロロフィル含量の低下、サイトカイニン応答性遺伝子群 (*cig*) の発現レベルの低下を誘発することが認められたが、これらはいずれもサイトカイニン共存処理によって部分的回復が認められた。現在、より回復が顕著な、即ちより特異的な阻害剤の探索を目指し、当該類縁体の合成を試み、検定を進めている。

### 3aK03

内分泌攪乱物質 Bisphenol A のサイトカイニン様作用について  
中村百合子、榎本かおり、西成典子<sup>1</sup>、手呂内伸之<sup>1</sup> (大妻女子  
大学・社会情報・環境、<sup>1</sup>教養・生物)

内分泌攪乱物質の一種である Bisphenol A (4,4'-Isopropylidene diphenol) は、プラスチックのポリカーボネートとエポキシ樹脂の合成原料や歯科治療の充填材料などとして広く用いられている。

Bisphenol A は現在、動物の性ホルモンの一つであるエストロゲンと似た作用を持つことが知られているが、植物に対する影響についての研究は行われていない。

本研究では、Bisphenol A に植物ホルモン類の働きがあるかどうかを調べた。ダイズ (*Glycine max*) の Acme 品種由来するカルスを用いた生物検定実験により、Bisphenol A にサイトカイニンに似た作用があることをつきとめた。この実験系にサイトカイニンの代わりに Bisphenol A を濃度  $10^{-6}$  ~  $1 \mu\text{g/ml}$  で添加したところ、濃度  $10^{-1} \mu\text{g/ml}$  付近で著しい細胞増殖促進作用が確認された。現在、更に詳細な条件による追試と、Bisphenol A にサイトカイニンで知られている、他の生理活性作用があるかどうかについての実験を行っている。

### 3aK04

イネ幼植物における Brassinolide の細胞伸長促進機構

貴家康尋、田中重雄、武長宏 (東農大・応用生物)

Brassinolide (BR) は、ステロイド骨格を有する植物成長調節物質である。我々はその作用の 1 つである細胞伸長促進効果のメカニズム解明を目的として以下の実験を行っている。イネ第二葉身屈曲および子葉鞘伸長は、BR の処理により著しく促進され、これは細胞伸長に起因している。これらの応答はセルロース合成、微小管重合およびマイクロフィラメント重合阻害剤で抑制されることから、これらの諸因子が関与していることが示された。さらに Differential Display 法を行い、BR 処理により蓄積量の増加する遺伝子 (BRU2, Brassinolide up-regulated gene 2) のクローニングに成功した。BRU2 はアクチンの重合・脱重合を制御する因子である villin, gelsolin と相同性が見いだされている。

### 3aK05

管状要素形態形成に先立ち内生ブラシノステロイド量は劇的に増加する  
山本 亮、藤岡昭三<sup>1</sup>、出村 拓、高津戸 秀<sup>2</sup>、吉田茂男<sup>1</sup>、福田裕穂 (東大院・理・生物科学、<sup>1</sup>理研・植物機能、<sup>2</sup>上越教育大・化学)

私たちはヒヤクニチソウ *in vitro* 分化系を用いて、ブラシノステロイドが管状要素分化の中期から後期の移行に関与することを明らかにした。これまでに二次壁形成直前の細胞に含まれる内生のブラシノステロイドを GC/MS を用いて調べ、実際にティファステロールと 6-デオキシカステロンを同定したことを報告した。

今回はいくつかのブラシノステロイドについて、管状要素分化の各時期の細胞及び培地に含まれる量を詳細に調べた。ティーステロンとブラシノライドは今回の解析では全く検出されなかった。6-デオキシティーステロンは細胞と培地の両方に常に少量存在し、ほとんど変化しなかった。これに対し、ティファステロール、6-デオキシティファステロール、6-デオキシカステロンは形態形成に先立って細胞内と培地で急激に増加することが明らかになった。またカステロンは形態形成に先立って培地のみで急激に増加した。興味深いことに、培地にはこれら 4 つのブラシノステロイドが同程度含まれるのに対して、細胞には 6-デオキシティファステロールと 6-デオキシカステロンが圧倒的に多く蓄積していた。以上の結果をもとに、管状要素分化に伴うブラシノステロイド合成と放出のメカニズムについて考察する。

### 3aK06

#### LEVELS OF BRASSINOSTEROIDS ARE QUITE DIFFERENT BETWEEN SHOOTS AND ROOTS

Takao YOKOTA<sup>1</sup>, Takahito NOMURA<sup>2</sup>, Tatsuro SATO<sup>3</sup>, <sup>1</sup>Dept. Biosci., Teikyo Univ., Utsunomiya 320-8551, <sup>2</sup>Dept. sci. of Plant and Animal Prod., Tokyo Univ. of Agric. and Tech., Tokyo 183-8509, <sup>3</sup>Center for Res. on Wild Plants, Utsunomiya Univ., Utsunomiya 321-8505,

Endogenous brassinosteroids (BRs) in the shoots and roots of hydroponically grown pea seedlings were quantified by gas chromatography-selected ion monitoring. It was found that both shoots and roots contained 6-deoxoBRs as predominant BRs. In the shoots, 6-deoxocastasterone was accumulated. However, in the roots, there were accumulations of 6-deoxocastasterone and 6-deoxyphasterol. Furthermore, the level of castasterone in the roots was much lower than that in the shoots. These findings indicate that the BR biosynthesis is differently regulated between shoots and roots of pea and also that roots require BRs for the growth

### 3aK07

#### CATABOLISM OF BRASSINOSTEROIDS IS ENHANCED IN ARABIDOPSIS MUTANT *chibi2*.

Tatsuro SATO, Masanobu NAKAMURA<sup>1</sup>, Akira NAGTANI<sup>1</sup>, Takao YOKOTA<sup>2</sup>, Dept. Bioprod., Grad. Sch. Agr. Sci., Utsunomiya Univ., Utsunomiya 321-8505, <sup>1</sup>Dept. bot., Kyoto Univ., Kyoto 606-8502, <sup>2</sup>Dept. Biosci., Teikyo Univ., Utsunomiya 320-8551

The dwarf mutant *chibi2* of *Arabidopsis thaliana* was obtained by enhancer tagging. Its stunted phenotype was recovered by brassinolide. The levels of the endogenous BRs especially 6-deoxocastasterone, castasterone and brassinolide were reduced as compared with wild type plants, suggesting that catabolism of these BRs was enhanced in the *chibi2* mutant thereby retarding the growth. We examined the fate of the tritium-labeled castasterone in *chibi2* grown in Murashige-Skoog liquid culture medium, revealing that *chibi2* seedlings metabolise castasterone more rapidly than wild type plants do.

### 3aK08

#### ブラシノステロイド生合成に関する P450 酵素の解析

水谷正治、浅見忠夫<sup>1</sup>、藤岡昭三<sup>1</sup>、吉田茂男<sup>1</sup>、坂田完三(京大・化研、<sup>1</sup>理研・植物機能)

多数のチトクロム P 450 がブラシノステロイド生合成経路において複数の水酸化反応を触媒し、また不活性化過程と考えられる 2 5 位水酸化にも関与することが示唆されている。現在までにブラシノステロイド欠損変異株の解析から 3 種の P450 遺伝子 (CPD、DWF4、DWARF) が単離されているが、DWARF 遺伝子以外の 2 種については活性は確定されていない。また、これら P450 とアミノ酸配列相同性が高く進化系統的にも近い P450 遺伝子がシロイヌナズナには多数存在し、それらのブラシノステロイド生合成・代謝への関与の可能性も考えられる。これら未同定 P450 遺伝子を含めた P450 の活性同定及び生化学的解析を進めるためには、異種細胞系による組み替え P450 の発現が必須である。そこで大腸菌による発現系の構築を目的として、ステロイドの 2 2 位水酸化を触媒すると予想される DWF4 の発現を行った。DWF4 は C 末端側に His-tag を付けて発現させ Ni-NTA カラムにより精製した。DWF4 は典型的な P450 スペクトルを示し、ブラシノステロイド生合成阻害剤 (Brz) は DWF4 に強く結合した ( $K_s=1 \mu\text{M}$ )。他の P450 分子種についても大腸菌による発現を検討した。現在、P450 活性を測定するため P450 還元酵素との再構成系の構築を行っている。また、これら P450 遺伝子についてブラシノステロイド及び Brz 処理による発現応答性について解析を行った。

### 3aK09

#### BASI はブラシノステロイドのレベルを制御している

藤岡昭三、Michael M. Neff<sup>1</sup>、野口貴弘、瀬戸秀春、高津戸秀<sup>2</sup>、吉田茂男、Joanne Chory<sup>1</sup> (理研・植物機能、<sup>1</sup>The Salk Institute for Biological Studies and the Howard Hughes Medical Institute、<sup>2</sup>上越教育大・化学)

シロイヌナズナの *bas1* は、アクティベーションタギングにより見出された矮性変異体である。P450 の過剰発現により、ブラシノステロイド (BR) 生合成欠損変異体や BR 非感受性変異体とよく似た表現型を示す。BASI 遺伝子産物が BR の生合成あるいは代謝に関与しているか否か明らかにするために、内生 BRs の定量分析を行った。その結果、*bas1* では、brassinolide (BL)、castasterone、6-deoxocastasterone のレベルが著しく減少しており、BASI は BR レベルの制御に関与している可能性が示唆された。また、無菌培養したシロイヌナズナの実生を用いて BL の代謝実験を行ったところ、BL は 26-hydroxybrassinolide (26-OHBL) に代謝されることが明らかになるとともに、*bas1* では control に比べ、この変換が促進されていることを見出した。さらに、イネのラミナジョイントテストやシロイヌナズナの BR 生合成欠損変異体を用いた回復実験から、26-OHBL の生理活性は BL に比べ著しく弱いことが判明した。以上の結果から、BASI は BL の水酸化に関与していること、ならびに、*bas1* では、活性型の BL が水酸化されて不活性化されることにより矮性形質を示すことが示唆された。