W1-1

クロロフィル *a* 合成系の起原と進化

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

クロロフィル (Chl) *a* は植物の光合成に必須の光合成色素である。しかし、植物におけるその合成過程には未だ不明の点が多い。一方、バクテリオクロロフィル (BChl) *a* を合成する紅色細菌 *Rhodobacter capsulatus* の分子遺伝学的研究やシアノバクテリア *Synechocystis* PCC 6803 のゲノム解析などから、Chl *a* 合成系と BChl *a* 合成系はかなり共通した酵素系を持つことが明かとなってきた。我々は、Chl *a* と化学構造の良く似た BChl *g* を主要な光合成色素とする光合成細菌ヘリオバクテリアから BChl *g* の合成に関与する数多くの遺伝子を単離した。さらに、16s rRNA に基づく真正細菌の分子系統樹で、かなり初期に分岐したとされる緑色非硫黄細菌や鉄硫黄型の反応中心を持つ緑色硫黄細菌からも BChl *a* の合成に関与する多数の遺伝子を単離した。

植物・シアノバクテリア・光合成細菌の主要な系統間での Chl *a*・BChl *a* 合成に関与する多くの酵素の系統解析を通じて垣間見えてくる光合成の初期進化に関する話題を提供する。

W1-2

cytochrome *b6f* 複合体による光エネルギー受容量調節

鹿内 利治（奈良先端大・バイオサイエンス）

光合成の明反応の最終産物は、NADPH などの還元力と ATP である。これらは、CO_2 の固定のみならず、種々の生体反応に利用されるため、細胞の要求に応じて NADPH/ATP 合成比は調節を受けなければならない。この調節は、電子伝達におけるプロトン勾配の形成効率（H^+/e^-比）の調節に他ならない。またΔpH は、光化学系 II で光受容を調節し、過剰な光エネルギー受容による光障害を回避する反応においても中心的な機能を果たす。したがって植物にとって、プロトン勾配の形成効率調節は、変動する環境の中で光障害を回避し、最大の光合成活性を引き出すため極めて重要なプロセスである。

我々はクロロフィル蛍光画像化システムを用いて、強光下で光化学系 II での光受容制御が誘導できないシロイヌナズナ変異株を多数単離した。その中で、cytochrome *b6f* 複合体に直接､間接的に関連する変異株が少なくとも４つ(*pgr1-3*, *nrd6*) 得られた。これらの変異株から推測される、この良く知られた光合成電子伝達複合体のプロトン勾配制御における調節的機能について考察したい。

W1-3

より良い光条件を探す動く葉緑体

加川貴俊（科技団・さきがけ研究２１、基礎生物学研究所）

外界の光環境に依存して葉緑体はその位置をかえる。弱光下では葉緑体は光に向かって集まり（弱光反応）、強光下では光から逃げる方向に移動する（強光反応）。シロイヌナズナの葉でもこの現象は観察される（Kagawa and Wada, 2000, Plant Cell Physiol. 41:84-93)。私たちは、シロイヌナズナから強光反応のみ起こらない突然変異体の単離し、その原因遺伝子としてＮＰＬ１を同定した。このＮＰＬ１はシロイヌナズナの光屈性の光受容体 NPH1 のホモログである。通常、野生型では強光・弱光反応はそれぞれ 0.1-4Wm^{-2}, 8-30Wm^{-2}の青色光で誘導される。しかし、*npl1* 変異体は調べた 0.1-30Wm-2 の光環境で葉緑体光定位運動はほとんど観察されなかっが、弱光反応は正常であった。一方、*nph1* 変異体はほぼ正常の葉緑体光定位運動が観察された。さらにＮＰＬ１・ＮＰＨ１の２重変異体では葉緑体光定位運動自体が観察されなかった（京大・岡田研との共同研究）ことから、葉緑体光定位運動の光受容体はＮＰＬ１およびＮＰＨ１であることが解った。

W1-4

オルガネラ、顆粒等の細胞内輸送におけるミオシンの役割

横田悦雄（姫路工大・理・生命）

植物細胞内では、原形質流動と呼ばれるオルガネラ、顆粒等の細胞内輸送が起こっており、細胞の生長や分化に重要な役割を担っている。多くの場合、その流動力はミオシンによって発生していると考えられている。テッポウユリ花粉管（170-kDa ミオシン）とタバコ培養細胞 BY-2（175-kDa ミオシン）からカルモジュリンを軽鎖とする２種のミオシンを単離した。170-kDa ミオシン重鎖の一次構造を解析した結果、シロイヌナズナで同定されていた MYA1 と高い相同性を示すことから、このミオシンは XI クラスのミオシンであると思われる。滑り速度あるいは細胞内における存在様式の解析から、両ミオシンともに原形質流動に関与しているモーター分子でことが示唆された。しかし、両ミオシンが発現しいる BY-2 細胞内では、それぞれのミオシンが結合しているオルガネラが異なっており、原形質流動において役割分担をしている可能性が考えられる。

ワークショップ

W1-5

葉緑体の酸化還元カスケード：チオール酵素と調節機構

久堀 徹[1], 近藤愛子[1], M. T. Stumpp[1], 本橋健[1,2], D. Bald[1,3]
([1]東京工業大・資源研、[2]北大・院・薬、[3]CREST Team13)

高等植物の葉緑体には、*f*型と*m*型という2種類のチオレドキシン(Trx)が存在し、光化学系から電子を受け取り、標的となる酵素のジスルフィド結合を還元し、その活性を調節している。炭酸同化系の酵素群、ATP 合成酵素(CF_oCF_1)、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)が Trx の標的であることが以前から知られていた。この数年間に、Acetyl CoA carboxylase, 3'-Phosphoadenylylsulfate Reductase, Rubisco Activase が新たな標的酵素として報告された。私たちは、Trx に支配される酵素群を網羅的に捕捉するため、Trx の活性中心の変異体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを考案した。この方法により、葉緑体ストロマ画分から、標的としては未同定の酵素を捕捉することに成功した。現在、これらの酵素が実際に Trx による酸化還元で活性調節を受けるか否かを調べている。今回の講演では、私たちが捕捉した酵素群を含めて、Trx に支配される葉緑体酵素の調節を概観したい。

活性調節の分子機構は、MDH でよく研究が行われている。私たちは、細菌由来のF_1にCF_1の制御領域を導入して、1 分子のレベルで活性の調節を直接観察することに成功した(D. Bald et al., ポスター発表参照)。この成果も合わせて報告し、Trx による酵素調節の分子機構を考察する。

W1-6

植物オキシリピン生合成系に関与する脂質加水分解酵素

松井 健二（山口大・農・応生化）

植物オキシリピンは脂肪酸から酸化的に誘導される一連の化合物群の総称であり、ジャスモン酸や短鎖アルデヒド類などの生理活性物質が含まれる。植物オキシリピン生合成系の初発段階は脂質加水分解酵素(Lipolytic acyl hydrolase, LAH)による脂質からの脂肪酸の遊離であり、この段階がオキシリピン生合成系を制御している律速段階と考えられている。しかし、これまで LAH に関する知見は極めて乏しく、その詳細は明らかでない。演者はオキシリピンの中でも特に短鎖アルデヒド類生成系に関与する LAH に着目し解析を進めている。シロイヌナズナ無傷葉には短鎖アルデヒド含量はわずかであるが、磨砕に伴い数分以内に急激に生成される。このとき脂質、中でもガラクト糖脂質のリノレン酸含量が顕著に低下した。このことからシロイヌナズナ葉にはガラクト脂質特異的 LAH が存在し、磨砕に伴い活性化され、短鎖アルデヒド類の基質となるリノレン酸を遊離していることが明らかとなった。一方、シロイヌナズナゲノム中には 10 種類程度の真核生物型リパーゼホモログが見い出され、その中のひとつ、*EDS1* は R 遺伝子を介した病原菌抵抗性に必須な因子のひとつとして同定されている。その中から RT-PCR で発現の確認された４つの遺伝子(*DLL1-4*)について cDNA をクローニングした。RNA ブロット分析の結果、*DLL4* は傷害で誘導されたが、ジャスモン酸では誘導されなかった。現在、これら４種の遺伝子について異種発現系の確立と、T-DNA ノックアウト株のスクリーニングを行っており、これらの解析結果についても伴わせて報告する。

W1-7

分子シャペロンによる核膜融合の制御

西川周一[1]，寺澤ゆみこ[1]，中山剛[1]，平田愛子[2]，遠藤斗志也[1]（[1]名大・院・理，[2]東大・分生研）

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において，異なる接合型の 1 倍体細胞同士が接合して 2 倍体が形成する接合の過程では，1 倍体核同士の融合によって 2 倍体核が形成する．これまでの遺伝学的な解析によって，酵母接合時の核融合には，小胞体内腔の hsp70 である BiP が必要であることが明らかにされている．われわれは小胞体の DnaJ ホモログである Jem1p を同定し，これが BiP の制御因子として，酵母接合時の核膜融合の過程，特に核内膜の融合の過程を制御していることを明らかにしてきた．また，BiP-Jem1p による核膜融合の制御のメカニズムを明らかにするため，Jem1p と相互作用するタンパク質の検索を行ない，98kDa の新規核膜タンパク質を同定した．現在この新規核膜タンパク質の機能の解析を行なっている．

W1-8

光化学系 II 反応中心の構造・機能・動態についての研究

佐藤公行（岡山大・理・生物）

過去四半世紀の間に光合成の光化学系 II に関する研究は大きな進展を見せた。本講演では，その過程と今後の展望について個人的な見解を述べる。

W1-9

色素体分裂からみた色素体の起原と進化

箸本春樹（東京大・総合文化・生命環境）

元々独立した生物であったシアノバクテリアが真核細胞に共生し，それがオルガネラ化して色素体になったと考えられている．その過程で分裂遺伝子をはじめ大部分の遺伝子が宿主真核細胞に移行した．実際，色素体の分裂装置と考えられている色素体分裂リングや色素体 DNA の複製機構はいずれも核支配であることが明らかにされている．共生体の分裂機構を核が支配することは細胞内共生体をオルガネラ化するために必須であったと思われる．色素体の起原につながる細胞内共生は一次共生については一度だけだったという説が支配的であるが，二次，三次共生については複数回起こったと考えられている．その度に真核生物は色素体分裂機構を獲得したに違いない。また、一度獲得した色素体分裂機構を進化させてきたと考えられるが、これらの過程についてはほとんど明らかではない。本講演では、一次共生起原で最も原始的と考えられている *Cyanophora paradoxa* の葉緑体の分裂と二次共生起原の葉緑体の分裂機構についての最近の筆者らの知見を紹介する。

W1-10

１細胞が拓く細胞質遺伝の分子機構

西村芳樹・黒岩常祥（東大・院・理・生物科学）

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

雄葉緑体核様体消失における、葉緑体 DNA の変化を明らかにするため、まず雌雄の葉緑体 DNA をそれぞれ大腸菌由来の *aadA* 配列により識別し、葉緑体核様体の有無に基づいて接合子を１個ずつ光ピンセットで試験管に回収し、その葉緑体 DNA の変化を追跡した。その結果、核様体の消失とともに、葉緑体 DNA 分子は完全に分解されることが明らかになった。

さらに、雄葉緑体 DNA の分解に関わるヌクレアーゼを探索するため、接合子に含まれるヌクレアーゼの活性の変化を Native-PAGE / ゲル内アッセイ法によって継時的に解析した。その結果、配偶子誘導と共に雌のみで活性化される Ca^{2+}依存性ヌクレアーゼが検出された。接合子から単離した葉緑体におけるその活性の変化を解析すると、その活性は核様体消失時に高まることが明らかとなり、葉緑体母性遺伝との関わりが強く示唆された。

W1-11

植物オルガネラの転写／複製酵素の多様性
― その役割分担と進化的背景に関する研究の現状と展望 ―

酒井敦（奈良女子大・理・生物）

植物細胞は、好気性細菌、シアノバクテリア、ホスト細胞の三者の共生によって誕生した。この三者がより統合された生命体へと進化していく過程では、代謝経路の再編成に並行して共生体ゲノムから宿主ゲノムへの遺伝子の大量移行、不要遺伝子の喪失、遺伝子産物の細胞内局在部位の変更などが行われたと考えられる。オルガネラの半自律性の根幹をなすオルガネラの転写／複製装置についても、こうした大規模な再編成が行われたであろうことは想像に難くない。実際、高等植物の色素体RNAポリメラーゼ(RNAP)にはバクテリア型とファージ型の少なくとも２種類があるが、前者（核ゲノムと色素体ゲノムに分割してコード）はシアノバクテリア由来、後者（核コード）はミトコンドリア用RNAPの転用と考えられている。こうした進化過程におけるゲノム間相互作用の結果として成立した現存の植物細胞において、それぞれの色素体RNAPがどのような役割を分担しているのかについて、演者らの研究結果を中心に概説する。また、色素体とミトコンドリアには生化学的な性質が互いに酷似したDNAポリメラーゼ(DNAP)が存在しているが、色素体にはさらに別のDNAPが存在する可能性が強い。これらの知見に基づいて、オルガネラのDNAPについても進化過程における酵素の転用が行われ、複数の酵素による役割分担がなされるようになった可能性を検討する。最後に、こうしたオルガネラの転写／複製酵素の多重性を利用した応用研究の可能性についても紹介したい。

W1-12

葉の発生段階に依存した葉緑体分化制御メカニズム

楠見健介（九大・理・生物）

葉緑体の分化は、プロプラスチドが持つ多くの分化方向性の一つにすぎず、最初から運命づけられているわけではない。葉緑体分化は葉原基形成と同時に決定され、葉細胞の分化と密接に連動しながら、細胞核・葉緑体間のシグナル伝達を通じて制御されると考えられる。そのメカニズムを分子レベルで調べるためには葉と葉細胞の分化を段階的に追えるシステムが必要だが、現在植物オルガネラの研究に広く使われている双子葉植物では限界がある。単子葉植物であるイネは葉の発生と抽出、伸張において時間的、構造的な秩序を持ち、葉緑体分化を段階的に調べるのに適した研究材料である。 *virescent* (v_1, v_2, v_3) および *zebra* (TCM248, CM189) はイネの温度感受性突然変異株で、制限温度下で葉緑体分化が不可逆的に阻害される。P1～P6に分けられる葉の発生段階のうち、 *virescent*はP4の段階で葉緑体分化初期にNEP活性化を通じて引き起こされるプラスチド遺伝子発現の活性化に関与していると考えられる。また *zebra* はP5の段階で葉緑体分化の後期に確立される光ストレスに対する防御能の構築に関与していることが示唆された。これらの両変異株を中心に葉緑体分化制御に関する最近の研究成果を報告する。

W1-13

葉緑体遺伝子の転写制御

椎名　隆，（京都府大・人間環境）

葉緑体ゲノムにコードされる光合成遺伝子の大部分は，葉緑体コードの原核生物型 RNA ポリメラーゼ(PEP)によって転写される。PEP の活性は，葉緑体分化や光などの様々な内的・外的シグナルによって遺伝子特異的に制御されている。例えば，葉緑体が分化する過程で，PEP による psbA プロモータの認識性が変化し，-35 因子を必要とするタイプから必要としないタイプへ変化する。また同時に，光応答性も，光非依存型から，光応答型の PEP へと転換する。葉緑体には，複数の核コードのシグマ因子が存在する。原核生物の RNA ポリメラーゼと同様，コア酵素と会合するシグマ因子の多様性によってホロ酵素のプロモータ認識性がコントロールされていると考えられている。さらに，我々は特定の葉緑体シグマ因子と相互作用する新しい核コードの因子を，最近見いだした。シグマ因子結合タンパク質による葉緑体遺伝子の新しい転写制御機構についても議論する。

W1-14

葉緑体発達過程でのσ因子依存的な遺伝子発現調節と翻訳爆発

金丸研吾，田中寛，高橋秀夫　（東京大学・分生研）

高等植物葉緑体の発達過程では、真正細菌型 RNA ポリメラーゼ（PEP）が重要な働きをしている。PEP 複合体のうちコア酵素遺伝子(*rpo*)は色素体 DNA にコードされているが、制御サブユニットのσ因子遺伝子群(*sig*)は核に移行している。これまで我々はシロイヌナズナで 6 種類の *sig* 遺伝子(*sigA*～*F*)を同定したが、最近、それらのうち発芽初期から発現する *sigB* の T-DNA 挿入変異株を取得した。pale-green を示すこの株では葉緑体のみならずエチオプラストも数分の一の大きさで、主要光合成タンパク質は顕著に減少していた。このことから SigB が葉緑体発達の鍵を握っていることが強く示唆されたが、意外にも光合成系遺伝子の転写はどれもほぼ正常であった。そこで発想を転換して翻訳系の転写制御に着目したところ、SigB 依存的な tRNA の発現上昇と NEP 依存性遺伝子の抑制機構の存在を示すデータを得た。これらの結果を踏まえ我々は「PEP は光合成系遺伝子、T7 ファージ型 RNA ポリメラーゼ（NEP）はハウスキーピングな遺伝子の転写をする」という認識に疑問を投げかけ、新たに「翻訳爆発」という概念を提唱する。

W1-15

寄生植物における色素体-核ゲノム間の相互作用

若杉達也（富山大・理・生物）

色素体は独自のゲノムを持ち、色素体ゲノム上の約 110 種類の遺伝子は色素体の機能に重要な役割を果たしている。色素体機能の多くは核遺伝子の働きに依存しており、色素体遺伝子の発現も核ゲノムにコードされているタンパク質によって調節されている。一方、一部の核遺伝子では色素体からのシグナルによって発現調節を受けていることが知られている。このように、色素体と核のゲノムが協調的に働くことによって色素体の機能が維持されていると考えられる。我々は、色素体と核のゲノム間の相互作用を調べるために、寄生植物を材料に用いて研究を行っている。寄生植物では、色素体の機能に変化が生じたり色素体ゲノム上から多くの遺伝子が欠失しており、色素体-核ゲノム間の相互作用や核遺伝子の発現調節において一般の植物には見られない現象が見いだされている。それらのユニークな特徴について紹介する。

W2-1

宇宙での植物生理実験の紹介

嶋津　徹(財団法人　日本宇宙フォーラム)

宇宙の微小重力環境を利用した植物生理実験は 1970 年代初頭から、旧ソ連のソユーズおよびアメリカのスペースラブを用いて始められた。その後、旧ソ連のミールおよびアメリカのスペースシャトルでの実験へと引き継がれている。重力屈性に関する実験や、シロイズナズナを用いて宇宙で種子を得る実験などが行われた。

日本が参加した最初の宇宙での植物実験は 1992 年に毛利宇宙飛行士が搭乗した Space Lab Japan ミッションが最初であった。スペースシャトルに、日本などの実験装置を搭載して、タバコ細胞を実験試料として、宇宙の微小重力が植物に与える影響が研究された。1994 年の International Microgravity Laboratory 2 ミッションでは、粘菌を実験試料として微小重力と宇宙放射線の影響が研究された。1998 年に行われた STS-95 生物実験では、日本から植物を用いた 4 テーマが実施され、イネ・アラビドプシス・キュウリ・トウモロコシ・エンドウを実験試料として、重力屈性・細胞壁・重力形態形成・電気屈性などが研究された。

W2-2

宇宙実験の経験(1) 「宇宙環境下における植物の形態形成とオーキシンの極性移動に関する研究」
上田　純一（大阪府大・総合科学部）

1998 年にスペースシャトルを用いて実施された，宇宙実験「宇宙環境下における植物の形態形成とオーキシンの極性移動に関する研究」の実現に至るまでの経験と、そこから得られた教訓などを紹介する。

さらに、宇宙実験の準備として、地上の三次元クリノスタットを用いた模擬微小重力環境での予備実験などや、宇宙実験の実験条件を設定するために多くの予備的な実験が必要となったことを紹介する。

W2-3

宇宙実験の経験(2) 「ウリ科植物の重力形態形成：キュウリ芽生えのペグ細胞の発達と重力感受機構」
高橋　秀幸（東北大・遺伝生態研究センター）

1998 年にスペースシャトルを用いて実施された，宇宙実験「ウリ科植物の重力形態形成：キュウリ芽生えのペグ細胞の発達と重力感受機構」の実現に至るまでの経験と、そこから得られた教訓などを紹介する。

さらに、宇宙実験の準備として、地上の三次元クリノスタットを用いた模擬微小重力環境での予備実験、航空機のパラボリック飛行を利用した短時間微小重力などや、宇宙実験の実験条件を設定するために多くの予備的な実験が必要となったことを紹介する。

W2-4

宇宙実験の経験(3) 「微小重力環境における高等植物の成長調節機構」
保尊　隆享（大阪市立大学・理・生物）

1998 年にスペースシャトルを用いて実施された，宇宙実験「微小重力環境における高等植物の成長調節機構」の実現に至るまでの経験と、そこから得られた教訓などを紹介する。

さらに、宇宙実験の準備として、地上の三次元クリノスタットを用いた模擬微小重力環境での予備実験などや、宇宙実験の実験条件を設定するために多くの予備的な実験が必要となったことを紹介する。

W2-5

国際宇宙ステーション計画・植物実験装置
矢野(相澤)幸子、上垣内　茂樹（宇宙開発事業団・宇宙環境利用研究センター）

国際宇宙ステーション日本実験モジュール(Japanese Experiment Module, JEM, 愛称"きぼう")に搭載されるライフサイエンス系実験装置として、細胞培養装置(Cell Biology Experiment Facility, CBEF)およびクリーンベンチ(Clean Bench, CB)の開発が進められている。これら装置内で植物実験を可能にするための植物実験ユニット(Plant Experiment Unit, PEU)について紹介する。

PEU は、宇宙においてアラビドプシス等の小型植物の生活環を完結させる実験を想定し、CBEF から与えられる電力・通信、温度環境を利用して、給水、換気、観察などの実験操作をセットされたプログラムまたは地上からのテレコマンドにより実行する機器として開発された。PEU は、CBEF 微小重力実験区・人工重力発生区に固定される。PEU を用いることにより、播種しておいた種子に給水して発芽させ、成長の各段階を小型 CCD カメラによって観察する実験が可能になる。また、生育用照明には赤と青の LED を用い、水分センサーと給水ポンプにより、播種支持体水分含量を自動制御する。また、湿度センサーと換気ポンプにより自動換気を行うことにより容器内湿度を一定の範囲に保つ。

植物体の顕微鏡観察のためには、CB 内に装備されている位相差／蛍光顕微鏡を使用する。

W2-6

宇宙ライフサイエンス実験国際公募の経験と課題

松宮 弘幸、上垣内 茂樹、石岡 憲昭、泉 龍太郎、福井 啓二[1]、嶋津 徹[1]（宇宙開発事業団、宇宙環境利用研究センター、1（財）日本宇宙フォーラム）

宇宙実験の効率的実施をめざし、国際宇宙ライフサイエンス戦略会合は軌道実験の公募を、過去3回国際公募、選定を進めてきた。日本は第2回から参加し46テーマが応募し、5件が詳細化フェーズに入った。第3回は25テーマの提案があったが、詳細化に入ったものは1件のみであった。日本からの提案は合格率が世界的な平均と比較すると低かった。そこで、この経験から得たいくつかの教訓を生かし、これから日本からの提案の水準を向上させるためのポイントを指摘する。とくにプロポーザルの構成、作成上の留意事項などについて述べるとともに、科学的評価について国際評価パネルからの指摘事項についても解説し、今後の提案の参考に供したい。

W2-7

宇宙実験の立案から実施に至るまでの作業

福井啓二　（財）日本宇宙フォーラム

国際公募への提案テーマは国際科学評価パネルで審査され、一定基準に達したテーマが国際技術評価パネルでの審査にかけられる。技術面からも評価されるのは、宇宙実験には搭載試料量や使用可能装置などに関して特有の制約がともなうためである。したがって宇宙実験計画立案時には、科学面、技術面双方について十分に考慮すべきである。

両審査を通過した提案テーマは各機関の方針のもとに再評価され、最終的に国際ライフサイエンス会合(ISLSWG)においてフライト実験候補テーマに選定される。候補選定後およそ1年間に、審査過程で指摘された課題への回答の作成、およびフライト実験実施のための実験装置、器具類、実験操作手順などの詳細をまとめた実験計画書の作成が要求されている(definition phase作業)。この作業の終了がISLSWGで確認されたテーマはフライト実験に向けた具体的準備段階(development phase作業)に進む。

これらの準備作業にあたっては宇宙開発事業団ならびに(財)日本宇宙フォーラムが支援させていただいている。

W2-8

宇宙環境利用に関する地上公募研究

伏島康男(日本宇宙フォーラム)

本制度は、国際宇宙ステーション/「きぼう」を中心とした宇宙環境を利用する準備段階として、幅広い分野の研究者に機会を提供し、宇宙環境利用に関する地上研究を推進することを目的としています。具体的研究分野、研究領域としては、微小重力科学、微小重力物理学、生物科学、バイオメディカル、宇宙医学、宇宙科学、地球科学、宇宙利用技術開発などが対象となります。ただし、募集の対象はこれに限定されるものではありません。既成概念にない斬新な発想、思い切ったアイディアを歓迎しております。

W3-1

乾燥と低温ストレスによる遺伝子発現を制御する転写因子DREBの機能解析

[1]篠崎和子、[2]篠崎一雄（[1]農水省・国際農研・生物資源、[2]理化学研究所・植物分子）

乾燥・塩・低温ストレスに応答する遺伝子発現を制御するシス因子 DRE(TACCGACAT)は乾燥・塩・低温ストレス耐性の獲得に機能する多くの植物遺伝子の発現を制御している。この DRE に結合して転写を活性化する転写因子をコードする cDNA である DREB1 と DREB2 とをシロイヌナズナより単離した。DREB1 は低温による遺伝子発現で転写因子として働き、DREB2 は乾燥・塩ストレスによる遺伝子発現で機能している。

これらの転写因子の機能を解析するために DREB1A を植物中で過剰発現するように、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターと結合して植物に導入した。得られた遺伝子導入植物を解析すると、導入遺伝子の発現レベルに応じて、ストレス耐性の獲得に働くターゲット遺伝子が発現していることが明らかになった。また、cDNA マイクロアレイによる解析により、少なくとも12種以上のターゲット遺伝子が存在することも示された。さらに、得られた遺伝子導入植物は、乾燥や凍結や塩ストレスに対して強い耐性を示すことも明らかになった。一方、その成長を観察すると導入遺伝子の発現レベルに対応した成長阻害が見られた。そこで、ストレス時に特異的に遺伝子発現を誘導する rd29A プロモーターに DREB1A 遺伝子を結合して植物に導入した。得られた遺伝子導入植物はこれまでにない高いレベルの乾燥・塩・凍結耐性を示した。また、ほとんど成長阻害は見られず、種子の収量も正常だった。

W3-2

ストレス応答に関わるMYB遺伝子の解析

杉本和彦、武田真、廣近洋彦（農業生物資源研究所 分子遺伝部）

タバコのレトロトランスポゾン *Tto1* の転移は転写のレベルで調節されている。無処理のタバコでは *Tto1* RNA の転写は見られないが、ストレスを与えると発現が誘導される。ストレスへの応答は *Tto1* の末端にある長反復配列(LTR)に存在するシス配列、13-bp motif/L box によって引き起こされている。*NtMyb2* は傷、エリシターにより誘導され、13-bp motif を持つ遺伝子 *Tto1* と L box をもつ防御遺伝子の *PAL* のポジティブな制御因子である。NtMyb2 の活性が主に転写のレベルで調節されており、特に AGATCC からなる AG-motif と名付けた配列が傷ストレスに対する必要十分なシス配列として働く。この AG-motif に結合する因子である LBP1 は傷処理に伴いリン酸化される等、リン酸化により調節されている可能性が高い。エピトープタグを付加した MAPK を用いた実験から、傷により活性化された MAPK が LBP1 をリン酸化することが示された。現在、LBP1 が *in vivo* でも機能するか、リン酸化によって LBP1 が活性化されるのか調べている。

最近、シロイヌナズナのみならず、イネでもミュータントパネルと呼ばれる遺伝子破壊系や、マイクロアレイといったポストゲノム的な解析手法が発達してきている。このような解析手法を適用するために NtMyb2 のイネ同祖体を酵母の one-hybrid system を使って単離した。イネ Myb 様因子 OsMybS1 と S3 は、その結合配列、発現パターンやマルチプルアライメントの結果から NtMyb2 のイネ同祖体であることが示唆されている。PCR によりこれら因子の挿入変異体をミュータントパネルからスクリーニングした結果、OsMybS1 の 3'UTR への挿入変異体が得られた。現在、傷応答性の Myb と傷応答性に関連する遺伝子の変異体の解析を行っている。

W3-3

ARABIDOPSIS MAPK PATHWAYS AND TRANSCRIPTION FACTORS RELATED TO PATHOGEN RESISTANCE

Tsuneaki ASAI, Guillaume TENA, Frederick M. AUSUBEL, Jen SHEEN; Dept. Genet., Harvard Med. Sch., and Dept. Mol. Biol., MGH, Boston, MA 02114, USA.

Plants can detect invasion by microbial pathogens and protect themselves by mounting a variety of defense responses. One of the early responses is the induction of various transcription factors, which, in turn, regulate the expression of many defense-related genes. It has been suggested that WRKY transcription factors, a family of plant-specific zinc-finger-type proteins, play an important role in pathogen resistance. However, signaling pathways leading from pathogen attack to the induction of WRKY proteins remain unclear. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are involved in the transduction of extracellular signals to intracellular targets in all eukaryotes. Recent evidence suggests that defense signaling in plants also employs MAPKs. To study a potential role of MAPK pathways in WRKY induction, we have developed an Arabidopsis protoplast model system. We have found that a peptide elicitor, called flg22, derived from the most conserved region of bacterial flagellin activates MAPKs and WRKY factors in Arabidopsis protoplasts. We will present the signaling components that mediate flg22-induced WRKY expression and discuss possible roles of WRKY proteins in pathogen resistance.

W3-4

ZINC FINGER TRANSCRIPTION FACTORS PLAY ESSENTIAL ROLES IN POLLEN DEVELOPMENT IN PETUNIA

Sanjay KAPOOR, Hiroshi TAKATSUJI; Dept. Plant Physiol. Natl Inst. Agrobiol. Resources (NIAR) Tsukuba 305-8602

Here we describe functional characterization of four zinc finger-containing genes, *ZPT2-5, 3-1, 4-1* and *3-2*, which are essential for male fertility in petunia. Expression of *ZPT 2-5, 3-1* and *4-1* is localized in microspores. Cosuppression of these genes in transgenic plants causes severe defects in meiosis which in turn results in ~90% reduction in the number of mature pollen grains. Pollen that reach maturity show aberrant morphology and considerably reduced germination rate. *ZPT3-2*, on the other hand, expresses mainly in the tapetal layer. Cosuppression of this gene results in poor development of tapetal layer, which starts to degenerate much earlier than in wild type anthers, i.e. before the dissolution of callose wall. In these plants, pollen development stages up to tetrad formation are similar to that of the wild type plants. However, after their release from tetrads, microspores start to degenerate presumably due to lack of flavanols and other nutrient material which are otherwise provided by the tapetum for the development of microspores. Efforts are under way to search for the orthologues of these genes in arabidopsis and exploit the vast resources generated by the genome sequencing program to search for the target genes of these transcription factors.

W3-5

シロイヌナズナの HD-Zip 型転写因子による転写制御ネットワーク

青山卓史，村本拓也，大岸麻紀，Giorgio Morelli[1]，Ida Ruberti[2]，岡　穆宏（京都大学・化学研究所，[1]Istituto Nazionale della Nutrizione, Italy, [2]Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Universita di Roma La Sapienza, Italy）

HD-Zip 蛋白質は植物特有の転写因子群であり、シロイヌナズナゲノム上には 50 以上の HD-Zip 蛋白質遺伝子がコードされている。我々は、それらの中で、環境刺激に応答する植物形態形成過程に関与する ATHB-1 および ATHB-2 に注目し、これら転写因子が支配する転写制御ネットワークを明らかにしようとしている。グルココルチコイド受容体とのキメラ転写因子遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて標的遺伝子解析が行われた。その結果、ATHB-1 に対してはアミノ酸トランスポーター遺伝子群が、ATHB-2 に対しては自分自身を含む HD-ZipII サブファミリー遺伝子群が直接の標的遺伝子の候補として同定された。これらの結果を踏まえて、転写制御ネットワーク解析の方法論および問題点について議論する。

W3-6

ラン藻のcAMP応答型転写因子の発見とDNA microarrayを用いたターゲット遺伝子の同定

吉村英尚[1]、柳澤修一[1]、久堀　徹[2]、大森正之[1]
（[1]東京大学・総合文化、[2]東京工業大学・資源化学研）

ラン藻は様々な環境変化に応答して細胞内のcAMP濃度を変動させることが知られている。最近、我々は*Synechocystis* sp. PCC6803のcAMP受容タンパク質であるSYCRP1を同定し、生化学的な解析を行った。その結果、SYCRP1は転写因子であることが強く示唆された。

そこでDNA microarrayを用いてSYCRP1のターゲット遺伝子のスクリーニングを試みた。野生株と*sycrp1*破壊株からそれぞれtotal RNAを抽出し、DNA microarrayを用いて網羅的な遺伝子発現の比較を行った結果、*sycrp1*破壊株において明らかに発現量が減少している２つのオペロンと考えられる遺伝子群が見出された。

次にこれらSYCRP1のターゲット遺伝子と考えられた２つの遺伝子群の先頭の遺伝子(slr1667、slr2015)について転写開始点の決定を行い、予測されたプロモーター領域とSYCRP1を用いてゲルシフトアッセイ及びDNase I フットプリントを行った。その結果、SYCRP1はslr1667の上流領域に特異的に結合することが明らかとなり、さらに、その結合部位は転写開始点からみて−170 から −155の領域であることを明らかにした。以上のことから、SYCRP1はslr1667の転写を制御していると結論した。

F001

クラミドモナス葉緑体DNAのメチル化機構の解析

西山りあ[1]、小泉望、草野友延、佐野浩（奈良先端大・遺伝子センター・植物、[1]CREST）

クラミドモナス葉緑体 DNA の母性遺伝の機構には DNA のメチル化が関わっていると考えられているが、その機構は未だ解明されていない。私達は葉緑体 DNA のメチル化の分子機構を解明し、メチル化と母性遺伝との関係を明らかにするため、DNA メチル化酵素遺伝子(CrMET)を単離し、その解析を行った。

CrMET 遺伝子は全長 1357 アミノ酸をコードし、C 末端側に保存されたメチル化酵素活性部位を持っている。しかし、N 末端側は現在見つかっているメチル化酵素と相同性がないことから、CrMET は新しいタイプのメチル化酵素と考えられる。N 末端にアルギニンに富んだ領域を持つことから、葉緑体移行型と推測された。CrMET は雌株の配偶子形成の初期段階でのみ発現していることから、CrMET は雌株の配偶子形成時に発現し、葉緑体へ移行して葉緑体 DNA のシトシンをメチル化することが示唆された。そこで、メチレーションマッピングを行い、葉緑体 DNA 上のメチルシトシンの位置を特定した。雌株の遊走子ではほとんどのシトシンがメチル化されていなかったのに対し、配偶子ではメチルシトシン量が増加していた。しかしメチル化された位置はランダムであったので、雌の配偶子で全体のメチルシトシン量が増加することが重要と考えられた。これらの結果は、葉緑体 DNA のメチル化が葉緑体 DNA の母性遺伝の要因ではないかという推測を支持した。

F002

トランスポゾン *Tag1* 類似配列の解析

[1] 加藤政臣、[1] P. Chandramati Shanker、[1] 田口悟朗、[2] 小平律子、[1] 林田信明、[12] 岡崎光雄（1 信州大・遺伝子実験施設、2 信州大・繊維・応用生物）

ハクサイ(*Brassica Juncea*)から、アラビドプシスで見つかったトランスポゾン *Tag1* の類似配列 *ccsTag1* をクローニングした。*Tag1* は、全長約 3.3kb、両端にはトランスポゾンの特徴である逆位反復配列(IR; Inverted Repeat)が存在する。又、内部には 4 つのエキソンで構成されるトランスポゼースのコード領域が存在し、自律的転移能を持つ。シークエンスの結果、この *ccsTag1* は、*Tag1* の IR を含む両端部分とトランスポゼースの第 1 及び第 3 エキソンの一部を高く保存していた。これはかつてハクサイでも *Tag1* が転移を繰り返していたことの痕跡と考えられる。

Tag1 を含む *Ac* ファミリーのトランスポゾンは転移の際に IR の両外側に 8 bp の同方向反復配列 TSD (Target Site Duplication)を残す特徴を持つ。*ccsTag1* もこの TSD を持っているか、つまり本当に *ccsTag1* が自律的に転移を繰り返していたトランスポゾンの痕跡なのかを調べる為、ハクサイゲノムでの *ccsTag1* 隣接配列の解析を行っている。

更に他の植物種からも *Tag1* 類似配列のクローニングを進めており、*Tag1* の分子進化や進化の足跡といった観点から、種の系統関係について議論したい。

F003

*Brassica campestris*における*S*多重遺伝子族の塩基配列比較

鈴木剛, 甲斐直子[1], 渡辺正夫[2], 磯貝彰[3], 日向康吉[4]（大阪教育大, [1]三井化学, [2]岩手大・農, [3]奈良先端大・バイオ, [4]採種実用技術研）

自家不和合性とは自家受精を妨げる機構の一つであり、アブラナ科植物では*SLG*と*SRK*が柱頭側の自己・非自己認識を担っている。SRKはレセプター型カイネースであり、レセプター部分（Sドメイン）はSLGと相同性が高い。また、ゲノム中には*SLG*や*SRK*と似た遺伝子が多数存在しており、*S*多重遺伝子族を形成している。本研究では、*Brassica campestris S*[9]系統の1個体から単離した*S*多重遺伝子族について塩基配列の決定を行い、比較解析を行った。*SLG*と*SRK*の他に、12の*SLG*様,*SRK*様遺伝子が10のゲノム領域に存在し、そのなかには新規のSRK様レセプター型カイネースをコードしているものや、既知の*SFR2*, *SLR2*、偽遺伝子などが存在していた。系統樹を作製すると、*SLG*と*SRK*は他の*S*多重遺伝子族とは違うクラスターに位置した。また、レセプター部分のみの分泌型タンパク質をコードする*SLG*, *SLR1*, *SLR2*は、それぞれ違うクラスターに存在していた。

F004

優性ストレプトマイシン感受性遺伝子を用いたラン藻の遺伝子置換

高濱 一貴, 松岡 正佳, 小川 隆平(崇城大・工・応微工)

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7942のリボソームタンパク質S12をコードする*rps12*遺伝子は優性のストレプトマイシン感受性(Sm^S)を付与する。この性質を利用して，染色体上の目的の遺伝子を置換後に薬剤耐性遺伝子が残存しない応用範囲の広い方法を確立した[1]。

ストレプトマイシン耐性(Sm^R)の*rps12-R43*変異株の*psbAI*座に*rps12*遺伝子＋カナマイシン耐性(Km^R)遺伝子のカセットを組込み，Sm^SKm^R部分2倍体を作成した。これらの部分2倍体を*psbAI*遺伝子の隣接領域中に*gfp*遺伝子を組込んだプラスミドにより形質転換すると，Sm^R株の中よりカナマイシン感受性(Km^S)となった組換え体は最大3%の頻度で得られた。自律複製プラスミドを利用することで最大16%まで頻度を上げることができた。しかし，大部分のSm^R株はまだKm^Rであり，遺伝子変換によるものであった。そこで，ラン藻の*rps12*と相同性の低い大腸菌*rpsL*を利用して自然的遺伝子変換率を低下させた系について検討を加えている。

[1] 高濱 一貴, 他 (2000) 日本植物生理学会2000年度年会講演要旨集, p.198

F005

ダイズ形質転換系確立に向けた高不定胚誘導品種の探索と誘導条件の検討

皆川博[1]、原田久也[1]、大坪憲弘（農水省・農研センター、[1]千葉大・園芸）

ダイズ(*Glycine max* L. Merr.)は未だ形質転換の非常に困難な植物種の一つである。近年の不定胚誘導／再分化技術の改良によって、研究室レベルでの形質転換体作出は可能になりつつあるが、材料となる品種が１種（cv. Jack）に限られているため、将来の育種的な利用を考えた場合、より実用的な栽培品種で系を構築することが必要である。本研究では、日本の栽培品種を中心とした 16 品種を用いて未熟子葉からの高濃度 2,4-D 処理（40mg/l）による不定胚誘導効率を比較し、いくつかの有用品種を同定した。不定胚形成効率には最大 10 倍以上の品種間差異が見られ、材料となる子葉片の至適サイズや 2,4-D に対する応答性の違い、子葉片の低温処理による不定胚誘導効率の上昇などが観察された。GUS 及び GFP をマーカーとした超音波処理によるアグロバクテリウム感染法（SAAT 法）の有用品種への適用と感染の条件検討についても併せて報告する。

F006

シロイヌナズナにおける
不定胚の大量誘導系の確立

岩井美穂、梅原三貴久、鎌田博（筑波大・生物）

分化全能性の代表的事例として知られている、不定胚形成においては、種子胚と類似の形態変化を経て植物体が再生することから、不定胚形成は種子胚発生のモデル系として解析されてきた。特に、ニンジンは同調的に発達する大量の不定胚を容易に誘導出来ることから、初期胚発生に関する研究に盛んに用いられてきた。しかし、分子遺伝学的解析のモデル植物として利用されているシロイヌナズナにおいては、解析に耐えうる不定胚の大量誘導系は確立されていない。

本研究では、既に報告されているシロイヌナズナ種子胚からの不定胚誘導系を大幅に改変し、大量の不定胚を容易に得られる培養系を開発した。さらに継代培養につれて不定胚不定胚形成能力が低下する問題を解決するため、不定胚形成能力が低下した細胞塊から、２次不定胚を得、これを利用することで不定胚形成能力を再度高める培養系も確立した。

また、本研究で開発された実験系を用いて、胚特異的遺伝子の発現をノーザン法で確認した結果、不定胚形成能力を持つ細胞（EC）やそのECから誘導した不定胚において、*ABI3*、*LEC1*、*FUS3*等の胚特異的遺伝子が発現していることが確認された。

F007

カラマツの初期胚発生では胚柄組織が胚の発達を制御している

梅原三貴久、荻田信二郎[1]、笹本浜子[2]、鎌田博（筑波大・生物、[1]奈良先端大、[2]森林総研）

胚柄は胚発生初期に胚の幼根端に観察される組織であり、その役割は胚本体の物理的支持および胚本体への栄養分の供給と考えられている。一方、胚発生を制御する因子も胚柄を通じて胚へ供給されると考えられている。しかしながら、胚発生制御因子と呼べるものは未だ同定されていない。未熟種子からの胚柄の単離は困難である。そこで胚柄が胚本体の発達におよぼす影響を調べるため、胚柄を形成する不定胚の誘導が可能なカラマツの培養系を用いた。

この系で得られた不定胚を実体顕微鏡下で胚本体と胚柄に切り分け、それぞれを別々に培養した。その結果、胚柄のみを培養した場合には、胚本体に類似したものが形成する個体が観察された。一方、胚本体のみを培養した場合には、培養初期には分裂が認められたが、途中で分裂増殖が停止した。さらに、不定胚の培養期間を長くした場合、切り出した胚柄から胚本体に類似した細胞塊は観察されなかった。これらの結果から、胚発生を制御する何らかの因子が胚発生初期に胚柄から胚本体へ供給されていることが示唆された。

F008

毛状根の塊根誘導に及ぼす培養条件の影響

関　功介，鈴木　伸秀，千脇　真澄，長谷川　孝，
坂田　洋一，田中　重雄，武長　宏 (東農大・応用生物)

熱帯産マメ科植物であるシカクマメ (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.)はダイズに匹敵する栄養価をもつ種子を形成するのに加えて，地下部にも食用となる塊根を形成するという，他のマメ科植物には無い優れた特性を有する。我々はシカクマメの塊根形成機構の解明を目的に，毛状根による *in vitro* 塊根誘導系の確立を目指している。

シカクマメ UPS89 の種子を無菌的に播種し，発芽後１週間の子葉片に *Agrobacterium rhizogenes* 15834 株を接種して，明条件下，30℃で毛状根の誘導を行った。その結果，２週間後に子葉片すべてからという高頻度で毛状根が誘導されることが示された。この系では *Agrobacterium rhizogenes* にバイナリーベクターを保持させることにより，外来遺伝子の導入も可能である。そこで根では発現せず、塊根において高発現するシカクマメキモトリプシンインヒビター (WCI) 遺伝子の 5'上流域に GFP を融合したレポーター遺伝子を導入した毛状根を現在作出している。得られた形質転換毛状根を用いて，塊根形成を誘導する培養条件を根の形態変化や細胞内の生化学的変化あるいは GFP の発現を指標に検索していく予定である。

F009

変異体を用いたサツマイモ塊根形成過程の解析

田中勝，吉永優，中澤芳則，中谷誠[1]（農水省・九州農試，農水省・農研センター）

サツマイモ（*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Kokei 14）の培養変異体 KM95-A68 では正常な植物体に比べ塊根形成の抑制が認められる。この変異体と正常な植物体との間で塊根形成に伴う根の内生ホルモン含量の変化を調べた結果、変異体では正常な植物体に比べてサイトカイニンおよびABA含量の増加時期に遅れが認められ、また含量も低かった。さらに正常な植物体と変異体の間で相互に接木植物を作成して実験を行ったところ、塊根形成数は台木部分に依存していた。根における内生サイトカイニン含量も同様の傾向を示したことから、変異体における塊根形成抑制が地下部特性に起因し、サイトカイニンの合成や集積と関連することが示唆された。また、この変異体は光合成速度およびクロロフィル含量に関して正常な植物体と有意な差は認められなかった。

現在、正常な植物体と変異体について塊根形成過程の各段階の根より抽出したRNAを用いて簡易法によるディファレンシャルディスプレイを行い、塊根形成に関与する遺伝子のクローニングを進めている。

F010

イネ発芽種子・Ｄｏｆタンパク質はＧＡＭＹＢの機能と共役してジベレリン酸応答性遺伝子の発現に関与する

鷲尾建司　（北海道大・地球環境科学・環境分子生物学）

穀物種子・糊粉層特異的なジベレリン酸（ＧＡ）による加水分解酵素遺伝子群の発現は、その初期反応遺伝子の産物であるＧＡＭＹＢを中心とした転写装置の形成により活性化されることが知られている。先の研究によりＧＡ誘導性プロモーター配列に結合するタンパク質としてＺｎフィンガー型のＤＮＡ結合タンパク質であるＤｏｆタンパク質（ＯｓＤｏｆ３）を同定しているが、ノーザン法を用いた発現解析はこのＤｏｆ遺伝子がＧＡ初期反応遺伝子の１つであることを示している。このタンパク質の機能を推定するため糊粉層組織を用いた一過性遺伝子発現解析を行ったところ、ＧＡＭＹＢと共役して標的プロモーターの転写活性を上昇させる傾向が見られた。現在、このＯｓＤｏｆ３とＧＡＭＹＢとの機能的・物理的相関作用を調べており、これらの結果を踏まえて糊粉層細胞でのＧＡの作用系における、このタンパク質の意義を考察する。

F011

高温耐性発芽変異体の解析

田村典子、Lepiniec, Loïc[1]、川上直人（明大・農・生命、[1]INRA, Versailles）

私達は、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挿入系統から高温でも発芽する変異体、TRW13-1 と TRW71-1 を単離している。これらの種子は、野生型種子がほとんど発芽できない32℃での高い発芽率とともに、休眠性の低下を示した。F_2 各個体から得られた F_3 種子の発芽から、高温耐性発芽はいずれの系統においても 1 遺伝子の劣性変異によることを明らかにした。TRW71-1 の種子は黄土色であり、野生型との正逆交雑により得られた F_1 種子において、種皮色および高温耐性発芽に母性効果が認められた。TRW71-1 の種皮色は *transparent testa 7* 変異種子によく似ており、相補性検定の結果、この変異は *tt7* の対立遺伝子であることが判明した。また、*tt7-1* の種子は高温耐性発芽を示した。これらの結果は、胚と種皮の両者が種子発芽の温度反応に関わることを示唆している。

F012

ニンジン種子発芽時におけるシステインプロテアーゼの遺伝子発現とシスタチン

作田千代子、小田篤 1、小西実 1、佐藤忍 1（筑波大・応生、1筑波大・生物）

Extracellular Insoluble Cystatin of Carrot (EICC)は、ニンジン種子の登熟後期にABAに応答して胚で合成・分泌され、胚自身と胚乳の内側の縁に局在する不溶性のシステインプロテアーゼ阻害タンパク質（シスタチン）である。シスタチンは、虫害に対する防御機能だけでなく、自らが合成するシステインプロテアーゼを制御する機能も持つと考えられている。EICC が発芽時のプロテアーゼの活性を阻害すること [Ojima et al.(1997) *Plant Mol. Biol.* 34: 99]から、EICC が胚の周りを覆うことで、発芽時に合成・分泌される、胚乳の分解を行うシステインプロテアーゼから胚を保護していると考えられた。そこで、発芽時に発現するシステインプロテアーゼ遺伝子(Carrot Seed Systein Proteinase 2; *CSCP2*）を単離し、そのmRNAの局在を調べた結果、EICC の蓄積が認められる領域より外側の胚乳で発現していることが明らかになった。

F013

ゼンマイ胞子の発芽におけるCDPKの関与について

蒲池浩之、大友かおり、井上　弘（富山大・理・環境）

シダ胞子の発芽にはCa^{2+}を必要とする。しかしながらその役割についてはよく分かっていない。本研究では、ゼンマイの胞子を用いて、その発芽過程におけるCa^{2+}依存性プロテインキナーゼ（CDPK）の関与について検討した。

イネのCDPKから得られた抗体（Anti-OsCDPK7; 京大の西條博士より贈与）を用いてウェスタンブロッティングを行った。分子量47、49、53、および56kDaの4つのCDPKが休眠胞子中に存在することが示された。これらの発現量は、吸水直後から発芽に至るまで一定していた。一方、多数のタンパク質が吸水直後から3時間以内に急速にリン酸化されることが分かった。これらのリン酸化は、Ca^{2+}のキレート剤であるEGTAの存在下で抑制された。Sr^{2+}、Mn^{2+}、Ba^{2+}は、Ca^{2+}同様、リン酸化反応を促進させた。これらの二価カチオンは、また、ゼンマイ胞子のCDPKを活性化できることがゲル内リン酸化法により確認された。以上の結果は、ゼンマイ胞子の発芽にはCDPKが関与していることを示唆している。

F014

コムギの転写因子HBP-1a(17)の塩基配列認識機構の構造科学的解析

合田名都子、森田勇人、飯哲夫[1]、岩淵雅樹[2]、林秀則
（愛媛大学院・理工・物質理、[1]京都大学院・理・植物、[2]岡山県生物科学総合研究所）

コムギの核タンパク質HBP-1は、bZIPドメインを持つ転写因子であり、ヒストンH3遺伝子のS期特異的発現を誘導する。このタンパク質は、ホモダイマーまたは、他のbZIPドメインを持つ転写因子とのヘテロダイマーを形成し、コムギヒストンH3遺伝子のプロモータ領域に存在するヘキサマーモチーフ(ACGTCA)に特異的に結合し、この遺伝子の転写を活性化させる。現在同定されている5種類のHBP-1タンパク質のうち、最初に同定され、その生化学的特徴の解析が最も進んでいるHBP-1a(17)は、そのアミノ酸配列上のカルボキシル末端側にbZIPドメインを持ち、G-box(CACGTG)、ヘキサマーモチーフを含む配列へ特異的に結合するタンパク質である。本研究では、HBP-1a(17)の塩基配列認識機構を明らかにすることを目的とした。

本研究では、bZIPドメインのアミド末端側及びカルボキシル末端側を欠損した組換えHBP-1a(17)を作製し、そのヘキサマーモチーフを含む配列に対する結合能のHBP-1a(17)との比較を、ゲルシフト法により行った。これにより、認識塩基配列との結合に必要十分な領域を決定した。現在、この領域を大腸菌による大量発現系を用いて発現させ、部位特異的変異の導入により、塩基配列認識に関係するアミノ酸の同定を進めている。

F015

シロイヌナズナの花粉減数分裂突然変異体 *solo dancers* の原因遺伝子とその産物に関する研究

安積良隆[1,2]、Yi Hu[2]、鈴木秀穂[1]、Hong Ma[2]
（[1]神奈川大・理・応用生物、[2]Dept. Biology, 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*) は正常な花粉を形成することが出来ない。花粉の減数分裂時の染色体の様子を細胞壁を消化後染色体をスライドガラス上に展開し DAPI で染色する方法を用いて調べてみた。この変異体でも第一減数分裂のザイゴテン期から相同染色体の対合が見られ、パキテン期までは正常であるように観察されるが、ディプロテン期からダイアキネシス期にかけて相同染色体が第一減数分裂中期前に解離してしまうことがわかった。このことが原因で第一減数分裂後期に相同染色体が娘細胞に均等に分配されず、２つ以上の染色体グループが形成され、その後それらの染色体グループを核にして４つ以上の異常な数の四分子が形成されることが判明した。この異常の原因となった遺伝子をクローニングし、解析した。さらにこの遺伝子に対する抗体を調製したので、これを用いた実験結果を報告する。

F016

イネ懸濁培養細胞(Oc)の培養液中に存在するタンパク質成分によるタバコ培養細胞(BY2)の分裂

古川聡子，庄野邦彦[1]
(都立短大・化学，[1]日本女子大・理・物質生物)

我々はすでにイネ懸濁培養細胞(Oc)の培養液に存在するタンパク性因子が糸状菌 *Rhizoctonia solani* の IAA 産生量を増大させることを報告している。 一方江口らが 2000 年度本学会で，タバコ馴化細胞(2b13)の培養濾液がホルモン非存在下で増殖を停止しているタバコ細胞の増殖を開始させることを報告した。そこで今回我々は，Oc のタンパク性因子が植物細胞の増殖に与える影響について検討した。Oc の培養濾液のタンパク質画分を硫安沈殿等によって粗精製し，ホルモンフリーの培地に懸濁した BY2 細胞に与えたところ，オーキシンを与えた場合と同様に活発に分裂，増殖を行った。 それに対し与えなかった細胞は，増殖せず伸長するのみであった。 今後，Oc培養液中のタンパク性因子が *R. solani* に対する IAA 産生増進作用と同様の作用を BY2 にも行っているかどうかついて検討したい。

F017

細胞質分裂に関与するシロイヌナズナ・エンド-β-1,4-グルカナーゼ欠損変異体の解析

西澤直子, Jianru ZUO[1], Niu QI-WEN[1], Kost BENEDIKT[1], Wu YAN[1], Nam-Hai CHUA[1]（東大院農学生命科学, [1]The Rockefeller University）

細胞板形成は植物細胞の細胞質分裂における重要な過程である．シロイヌナズナ・エンド-β-1,4-グルカナーゼ欠損変異体は，発芽後本葉が展開せずに全体がカルス化してしまい，正常な形態形成が行われない．電子顕微鏡により観察すると，細胞板形成に異常が見られ，不完全な細胞壁を持った多核細胞の存在が見られる．このエンド-β-1,4-グルカナーゼは膜貫通領域を持ち，細胞質側端に２つの推定極性移行シグナルが存在する．タバコＢＹ２細胞で発現させたＧＦＰとの融合タンパク質は細胞板に局在し，エンド-β-1,4-グルカナーゼが細胞質分裂に重要な機能を果たすことが示された．

F018

CONSTRUCTION OF CHROMOSOME-SPECIFIC LIBRARY IN MAIZE

J-H LEE, K-Y KIM , S-W PARK, C-H Chung;
Dept. Biores & Biotech, Dong-A Univ., Busan 604-714, Korea

The goal of this research was (1) to describe the conditions and parameters required for the cell cycle synchronization and the accumulation of large number of metaphase cells in maize root tips, (2) to isolate intact metaphase chromosomes from root tips suitable for characterization by flow cytometry, and (3) to construct chromosome-specific libraries from maize. Plant metaphase chromosomes have been successfully synchronized and isolated from maize root-tips. Individual chromosome peaks have been sorted from the maize B73. Libraries were generated from the DOP-PCR amplification product from each peak. To date, we have analyzed clones from a library constructed from the maize chromosome 1 peak. Hybridization of labeled genomic DNA to clone inserts indicated that 24%, 18%, and 58% of the clones were highly repetitive, medium repetitive, and low copy, respectively. Fifty percent of putative low copy clones showed single bands on inbred screening blots, and the remaining 50% were low copy repeats. Single copy clones showing polymorphism will be mapped using recombinant inbred mapping populations. Repetitive clones are being characterized by Southern blot analysis, and will be screened by *in situ* hybridization for their potential utility as chromosome specific markers.

F019

エンドウ葉緑体核様体の転写活性に対するヘパリンの効果

関根康介, 佐藤直樹 （埼玉大・理・分子生物）

核様体はプラスチドが葉緑体へと発達する過程で著しい形態的・分子的変化を遂げる。私達は、播種後７日目のエンドウ未展開葉から単離した葉緑体核様体を用いた *in vitro* 転写系を使い、様々な条件下での転写活性の変化を調べた。転写阻害剤を添加する実験では、アクチノマイシンＤとタゲチトキシンによって90%以上阻害され、この系で主にプラスチドコードのバクテリア型 RNA ポリメラーゼ(PEP)が働いていると推定される。α-アマニチンとリファンピシンによる阻害はなかった。一方ヘパリンによって活性が 3-5 倍促進された。タバコ葉緑体核様体での転写活性はヘパリンによる影響を受けないことが報告されているが、エンドウでは全く異なる結果となった。また、核様体をヘパリンで処理したところ、主要な核様体タンパク質である 70 kDa タンパク質などが遊離した。現在、ヘパリンによって遊離される転写抑制因子の同定を進めている。

F020

ヒメツリガネゴケの核コード T7 ファージタイプ RNA ポリメラーゼ遺伝子の単離

壁谷 如洋・橋本 和宣・佐藤 直樹（埼玉大・理・分子生物）

植物のオルガネラには、細胞核にコードされたT7ファージタイプRNAポリメラーゼ（RpoT）がある。プラスチドにはさらに、プラスチドゲノムにコードされた原核タイプの RNA ポリメラーゼが存在している。RpoT の機能を解析するため、相同組換えにより遺伝子破壊を行うことができるヒメツリガネゴケから、cDNA の単離を行った。その結果、２種類の *RpoT* 遺伝子を取得し、*PpRpoT1*、*PpRpoT2* と名付けた。cDNA より推定されるアミノ酸数は、PpRpoT1では 1087 残基、PpRpoT2 では 1065 残基であり、それぞれトランジット配列と思われる配列があった。GFP との融合タンパク質を利用し、オルガネラへの局在を調べた。また、ハイグロマイシン耐性カセットをcDNA 内に挿入したものを用いて遺伝子破壊も行っており、それらの結果も報告する予定である。

F021

Arabidopsis における体色変異株の収集と解析

中西弘充[1]、情家高史[1]、田口悟朗[1]、小平律子[2]、林田信明[1]、岡崎光雄[1,2]
([1]信州大・遺伝子実験施設 [2]信州大・繊維・応生)

全ゲノム配列が決定した *Arabidopsis thaliana* において、今後の課題は各遺伝子の機能の解析となる。そこで、大量の遺伝子破壊変異株を用いて、系統的に表現型変異株を収集し、ゲノム情報と組み合わせて遺伝子の機能を解析することを試みつつある。変異源として化学物質 EMS（エチルメタンスルホン酸）を用いて、飽和変異を目差して、現在までに約 100,000 個の種子を処理し、処理をした M2 変異群から、十分な変異株を得ることができた。成長の早い株、遅い株、葉の形成に異常を持つ株、花の形成に異常を持つ株、背丈の小さい株など多くの表現型が見つかった。その中でも体色に異常を持つ変異株に注目し、多数の系統を得ることができた。体色の薄い株、濃い株、黄色の株、白色の株、斑入りの株などである。これら体色異常の変異株を対象にクロロフィルの定量、葉緑体の構造の観察などいくつかの解析を進めている。

F022

Cyanophora paradoxa の葉緑体（シアネル）分裂

飯野雅人，<u>箸本春樹</u>（東京大院・総合文化・生命環境）

Cyanophora paradoxa (Glaucophyta) の葉緑体はペプチドグリカン層に覆われていると考えられており、形態もシアノバクテリアと似ていることからシアネル (cyanelle) と呼ばれている。シアネルの分裂は一般の色素体分裂とは異なり，細菌の細胞分裂に見られるような隔壁形成を伴い，分裂リングは二重ではなく、狭窄部の内包膜のストロマ側にのみ認められる（箸本，日本植物学会第 64 回大会)。本研究では，シアネルの分裂狭窄部に形成される隔壁が多糖からなる細胞壁様構造であることを銀-メテナミン法を用いた電顕組織化学的方法によって示した．また，内外両包膜が隔壁の内側と外側にそれぞれ存在し，内包膜のくびれ込みが外包膜のそれよりも先行することが電顕観察によって明らかになった。これらの知見は，シアネルの分裂がシアノバクテリアのように隔壁形成を伴うものであり，通常の葉緑体分裂において内外の二重の分裂リングをともなって内包膜と外包膜が同時にくびれ込むのとは大いに異なることを意味している．

F023

アクティベーションタギング法によって得られたシロイヌナズナ非光合成組織（カルス）において光合成遺伝子が発現している突然変異体の解析

<u>後藤新悟</u>，丹羽康夫，小林裕和 (静岡県大院・生活健康科学)

光合成遺伝子組織特異的発現制御機構を解明するために，シロイヌナズナを用い，非光合成組織（カルス）において光合成遺伝子が発現する突然変異体の選抜を試みた．アクティベーションタギング法を適用し，*RBCS-3B* プロモーターの制御下において薬剤耐性遺伝子を発現するようにした形質転換系統のカルスにおいて，*RBCS* 遺伝子が発現するようになった 2 系統の突然変異体 *ces101* および *ces102* (*c*allus *e*xpression of *RBCS*) を選抜した．これらのうち，*ces101* について検討を加えた．*ces101* のカルスは，緑色を呈し，ノーザン解析において，*RBCS* 遺伝子の発現量は，野生系統カルスの約 3.5 倍であった．サザン解析により T-DNA が 1 コピー挿入されていることが示された．TAIL-PCR 法によりゲノムに挿入された T-DNA の隣接領域を増幅し，DNA 塩基配列を決定した．T-DNA は第 3 染色体上部 P1 clone MSL1 に挿入されていた．近傍の ORF を検索したところ，挿入部位から約 2 kb 下腕側にモータータンパク質である kinesin と相同性の高い配列が見つかった．この近傍には，他の ORF が存在しないため，*ces101* 突然変異体においては，ゲノム挿入 T-DNA 内のエンハンサーによってこの遺伝子が活性化されていると推測する．現在，この ORF が表現型の原因遺伝子であることの確認を行っている．

F024

virescent 変異が葉緑体の転写・翻訳機構に及ぼす影響

<u>杉本広樹</u>、楠見健介、河野智樹、吉村淳[1]、射場厚（九州大・院・理・生物科学、[1]九州大・院・生資環）

virescent (v_2, v_3) はイネ低温感受性葉緑体形成不全突然変異株である。これまで行われた表現型解析により、*virescent* 遺伝子は、葉の発生分化の初期に特異的に機能し、葉緑体の分化に重要な機能を持つと考えられる。葉緑体形成に関与する遺伝子の発現パターンの解析から、これらの *virescent* 遺伝子が、葉緑体ゲノムにコードされた遺伝子の発現における RNA の安定性や翻訳の開始などの様々な段階、および核にコードされた T7 ファージ型葉緑体 RNA ポリメラーゼ (NEP) 遺伝子の発現制御に関与することを示唆された。*virescent* 遺伝子の構造と機能を明らかにするために、v_2, v_3 について、それぞれ 1643, 1148 個体よりなるマッピング系統を用いて、マップベースクローニングを目的とした精密マッピングを行った。その結果、V_2 遺伝子は第 3 染色体の短腕上の 4.9 cM の間の領域に、V_3 遺伝子は第 6 染色体の短腕上の 5.0 cM の間の領域にマップされた。

F025

葉緑体の保存的分裂機構に関する研究

伊藤竜一，藤原誠，永田典子，吉田茂男（理研・植物機能）

葉緑体の祖先たる真正細菌の細胞分裂は「Fts蛋白質群による分裂装置形成」と「Min蛋白質群による非分裂面での分裂阻害」との協調により達成される．一方，高等植物においても分裂因子FtsZ，分裂阻害因子MinDが葉緑体分裂を制御することが近年報告され，細菌由来の分裂機構(conservative mechanism)の存在が明らかにされた．Min蛋白質の一つMinEは，細菌の細胞分裂においてMinCDと拮抗して分裂面を決定する．*minE*相同遺伝子は一部藻類の葉緑体ゲノムに存在するが，高等植物では葉緑体ゲノムに見つからないことから核ゲノムに転移していると推測された．今回私達はシロイヌナズナの核コード *minE* 相同遺伝子，*AtMinE1* を同定した．AtMinE1は細菌及び藻類葉緑体コードのMinEに対してN,C両末端に数十残基の延長部を持ち，N末端は配列の特徴から葉緑体移行シグナルとして働くと予測された．CaMV35Sプロモーター下で*AtMinE1*を過剰発現する形質転換植物を作出し，その細胞内構造を観察したところ，ミトコンドリア形態は野生型と同様であるのに対し，葉緑体数・形態に顕著な異常が観察された．この結果はMinEが葉緑体分裂制御に関与する第三の保存的因子であることを示す．現在，*AtMinE1*発現部位の解析，GFP及び抗体を用いたAtMinE1の細胞内局在の確認を進めている．

F026

植物 TATA 欠損プロモーターの体系的解析

中邨真之、吉次友昭、角田達彦[1]、Gerit Weinzierl[2]、Irena Sherameti[2]、日比野浩之、井村あゆみ、杉浦昌弘[3]、Ralf Oelmüller[2]、小保方潤一（名大・遺伝子、[1]理研・遺伝子多型研究センター、[2]Inst. Allgemeine Botanik・Friedrich-Schiller-Univ.、[3]名市大・システム自然科学）

TATA ボックスは転写開始点上流30塩基付近にあり、RNA ポリメラーゼⅡの転写開始機構に重要な役割を果たしている。しかし、我々はタバコ光化学系Ⅰ核遺伝子 *psaDb* のプロモーターがTATA 非依存的な転写を行うTATA 欠損プロモーターであることを明らかにした。また、約 230 の植物遺伝子について、コアプロモーター構造をコンピュータ解析した結果、TATA 欠損プロモーターが光合成遺伝子群に非常に高頻度（60%以上）で出現することを見出した。本研究では、なぜ光合成遺伝子群にTATA 欠損プロモーターが多いのかを解明する端緒として、シロイヌナズナのチラコイド膜タンパク質遺伝子について、コアプロモータの微細構造と発現調節機構との比較解析を行った。

F027

シロイヌナズナからの液胞膜の単離とそのタンパク質の解析

気多澄江[1]，白武勝裕[1]，佐塚隆志[2]，柴田大輔[2]，前島正義[1]，山木昭平[1]（[1]名古屋大・院・生命農学，[2]かずさ DNA 研究所）

プロテオーム研究の一環として、オルガネラごとにタンパク質のカタログ作りが行われている。植物でもシロイヌナズナを材料に、細胞膜や葉緑体膜のタンパク質のカタログ化が進められている。一方、液胞は植物細胞に特徴的な興味深いオルガネラでありながら、その単離の困難さから液胞膜タンパク質のカタログ化は進んでいない。我々は、液胞膜タンパク質のカタログ化を行うことを目標に、ショ糖密度勾配遠心法を組み合わせて、シロイヌナズナ植物体から比較的高純度な液胞膜を単離することに成功した。

一般にプロテオーム解析に用いられている 2D-PAGE は、高濃度の疎水性タンパク質の分離に適していない。そのため、液胞膜タンパク質のカタログ化には 2D-PAGE を用いず、界面活性剤処理やカオトロピックイオン処理により膜タンパク質をクラス分けした後に SDS-PAGE を行うことで、二次元的な分離を行った。このクラス分けにより、プロトンポンプや水チャネルなどの膜に強固に結合した疎水性タンパク質と、それ以外のタンパク質を効果的に分離できた。現在、分離したタンパク質の機能を TOF-MS により特定する準備も進めており、できればその結果も併せて報告したい。

F028

GFP 標識されたシロイヌナズナ根白色体の形態解析

藤原誠，丹羽康夫[1]，吉田茂男（理研・植物機能，[1]静岡県大院・生活健康科学）

近年，色素体移行配列を融合した緑色蛍光タンパク（GFP）を発現する形質転換植物を用いて，GFP 標識された色素体から伸長する管状構造（stromule, stroma filled tubule）の存在が確認され，更に stromule を介して細胞内色素体間で物質輸送が行われることが示された。演者らは，シロイヌナズナの色素体 RNA ポリメラーゼシグマ因子（SigA, SigB）の N 末領域と GFP との融合タンパクを発現する形質転換シロイヌナズナを作製し生組織色素体を観察した結果， stromule が根白色体から顕著に形成されることを見出している（本学会昨年度年会）。今回，より効率良く色素体が GFP 標識される形質転換シロイヌナズナ（[1], RBCS1A 色素体移行配列と GFP との融合タンパクを発現する）を用いて stromule 形成の植物組織依存性と色素体型依存性に関して観察を行った。その結果，根白色体の stromule は根端部では elongation zone から differentiation zone で活性化し，古い根の成熟領域で最も発達していた。一方，葉緑体や葉の表皮，毛状突起，花弁の色素体では stromule 出現頻度は根と比較して稀であった。現在，stromule を持つ根色素体における色素体核様体の分布および細胞骨格に作用する薬剤の stromule 構造への影響について解析を行っている。

[1] Niwa et al. (1999) Plant J. 18, 455-463

F029

シロイヌナズナを用いたプラスチド包膜透過に関与する因子の解析

丹羽康夫[1]，森安裕二[1]，梶原英之[2]，加藤友彦[3]，田畑哲之[3]，白野由美子[4,5]，林　浩昭[6]，柴田大輔[4,3]，関　原明[7]，小林正智[7]，篠崎一雄[7]（[1]静県大院・生活健康，[2]かずさDNA研，[3]農水省・生物研，[4]三井業際植物バイオ・[5]Cornell大，[6]東大院・農学生命，[7]理研・植物分子生物）

プラスチドで機能している大部分のタンパク質は核ゲノム中にコードされているため，細胞質で翻訳後，プラスチド包膜を通過する必要がある．プラスチド包膜に存在しタンパク質の透過に関与している因子は，その局在部位からToc（外包膜），Tic（内包膜）と命名され，そのうちのいくつかは生化学的手法によりアミノ酸配列が明らかにされている．シロイヌナズナは遺伝学的解析が容易でかつ，現時点でほぼ全ゲノム配列が明らかにされている．アブラナToc36（エンドウではTic40）と相同性が高い領域は，他の多くのToc/Tic因子とは異なり，シロイヌナズナゲノムあたり１コピーで存在する．GFPを用いた解析結果から，その配列がシロイヌナズナのプラスチド包膜部分に局在することが確かめられた．一方その遺伝子の破壊株を独立に３系統選抜した．破壊株では子葉，本葉ともにその緑化が抑制された．しかしながら形態学的解析ならびに生化学的解析結果から，シロイヌナズナTIC40タンパク質は，子葉と本葉とでは異なる機能を担っている可能性が示唆された．

F030

葉緑体シグマ因子結合蛋白質（SibI）による転写制御

森川一也、村上真也、角山雄一[1]、椎名　隆[2]、豊島喜則（京大・院・人・環，[1]京大・RIセンター　[2]京都府立大・人環）

葉緑体での光合成関連遺伝子の転写は大腸菌型RNAポリメラーゼ（PEP）によって行われ、組織特異性・光応答性を示す。プロモータ配列の認識には核コードのσ因子群が必要である。我々は葉緑体遺伝子の転写制御の一機構として、σ因子に結合するタンパク質による活性制御が存在すると予想し、シロイヌナズナSigAの-35配列認識領域（region4）に結合するタンパク質（SibI）を同定した。SibIの機能を、新たに確立した「形質転換プロトプラストを用いたrun-onアッセイ系」により調べた結果、従来成熟葉緑体において光応答を示すことが知られていた幾つかの遺伝子の転写活性がSibIの一過性発現によって特異的に上昇することが見出された。この遺伝子特異的な転写活性化の分子機構を、細菌のアンチシグマ因子の機能をモデルとして議論する。

F031

シロイヌナズナ PEP シグマ因子のプロモーター選択性の解析

角山雄一、森川一也 [2]、椎名隆 [1]、豊島喜則 [2]（京大・ RI センター、[1] 京都府大・人間環境、[2] 京大院・人間・環境）

葉緑体中に存在する原核生物型転写酵素 PEP は、核ゲノムコードのコア酵素と色素体ゲノムコードの転写開始因子σ因子からなる。既に高等植物ではσ因子遺伝子が複数（シロイヌナズナでは 6 種）同定されており、原核生物と同様に環境や成育段階に応じて因子の使い分けがなされていると考えられる。しかし、各因子のプロモーター認識配列の特異性や機能分担については殆ど分かっていない。そこで我々はσ因子を一過的に過剰発現させたプロトプラストを用い、色素体ゲノム上の 12 種の遺伝子を対象に各因子が認識するプロモーター構造を調べた。その結果、幾つかの遺伝子において転写活性の増大が見られ、またその活性化パターンは因子により全く異なっていた。この結果をもとに、葉緑体遺伝子のσ因子を介した転写制御について論ずる。

F032

維管束分化に関わるヒャクニチソウ HD-Zip 型クラスⅢホメオボックス遺伝子の単離と解析

大橋恭子 [1]、出村拓[2]、福田裕穂[1]（[1]東京大・院・理・生物科学、[2]理研・植物科学センター）

私たちは、維管束分化の分子機構に迫ることを目的に、維管束形成に重要なはたらきを持つことが示唆されている HD-ZIP 型クラスⅢのホメオボックス遺伝子に着目し解析を行った。まず、*in vitro* 管状要素分化系をもつヒャクニチソウにおいて 3 種の HD-ZIP 型クラスⅢホメオボックス遺伝子を単離し、それぞれ *ZeHB10,11,12*（*Zinnia elegans* homeo box）と命名した。*in vitro* 管状要素分化系における RNA ゲルブロット解析により *ZeHB10,11,12* は管状要素分化特異的に発現し、その発現はブラシノステロイドの合成阻害剤であるウニコナゾールにより抑制され、外から添加したブラシノライドにより回復することを明らかにした。また、*in situ* hybridization により *ZeHB10,12* は植物体において維管束特異的に発現することがわかった。これらの結果は、*ZeHB10,11,12* が *in vivo, in vitro* ともに維管束分化に特異的なはたらきを持つことを示唆している。現在、yeast two-hybrid の系を用い ZeHB10,11,12 タンパク質間の相互作用を解析しており、合わせて発表する予定である。

F033

センヨウヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* の頂端細胞で発現するキネシン様タンパク遺伝子 *APII* の機能解析

日渡祐二[1,2]、長谷部光泰[1,2,3]（[1]基生研・種分化2, [2]総研大・生命科学, [3]PRESTO）

センヨウヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens* subsp. *patens*）の原糸体・茎葉体の頂端細胞の分化は、オーキシン・サイトカイニンによって制御される。我々は、頂端細胞の分化を分子レベルで解析するために、ヒメツリガネゴケにおいてジーン・エンハンサートラップ系を確立し、頂端細胞で発現する遺伝子を検索してきた。これまでに、カウロネマと仮根の頂端細胞、および茎葉体頂端細胞にレポーター遺伝子が発現するジーントラップ系統 *Apicar1* から、これらの頂端細胞で発現する遺伝子として、キネシン様タンパクをコードする *APII* 遺伝子を同定した。今回は、*APII* 遺伝子の構造と機能を類推するために、*APII* タンパクの細胞内局在を調べた。*APII*cDNA全長と GFP 遺伝子との融合遺伝子を作成し、構成的プロモーター制御下で原糸体に一過的に発現させた。この結果、*APII::GFP* 融合タンパクは核に局在し、*APII* タンパクが核内で機能することが示された。さらにキネシンモータードメインの C 末端側を削除した部分的 *APII* を *GFP* 融合タンパクとして発現させた結果から、キネシンモータードメインのC末端側の隣接領域に核局在に関わるシグナル配列が存在することがわかった。

また、遺伝子ターゲティングによる遺伝子破壊系統を用いた *APII* 遺伝子の機能推定も行っている。はじめに *APII* 遺伝子のコピー数をゲノムサザン解析で調べ、*APII* 遺伝子はシングルコピーであることを確認した。現在、遺伝子破壊系統を作出中であり、この結果もあわせて報告したい。

F034

ファージディスプレイ差し引き法を用いた木部細胞壁成分を認識するモノクローナル抗体の単離

篠原 直貴、出村 拓[1]、福田裕 穂（東大院・理・生物、[1]理研・植物科学研究センター）

分化特異的な細胞壁成分を認識する抗体は、特定の細胞の識別や分化段階の細分化に有効である。そこで、本研究では次の三つの手順からなる方法で、そのような抗体を単離する事にした。まず、ヒャクニチソウ培養細胞系を用いて同調的に分化を誘導した細胞から細胞壁を調製した。次に、この細胞壁に対するファージディスプレイ組換え抗体ライブラリーを作った。そして、細胞壁を用いた「パニング」による差し引き的なスクリーニングを行った。その結果、私達はこれまでに2つの抗体の単離に成功し、これら二つを CN 8, XD 3 と名付けた。

植物体において、CN 8 エピトープは、未成熟な管状要素、木部柔細胞に局在していた。一方、XD 3 エピトープは、管状要素の前駆細胞、未成熟な繊維細胞に局在していた。また培養細胞において、これら二つの抗体は、異なった分化段階の細胞を認識した。以上の結果から、これら二つの抗体は、木部細胞分化の有用な分子マーカーであることが判った。さらに、我々はこれらの抗体を分化特異的な細胞壁成分の精製や特定の木部細胞を単離にも利用できると考えている。

F035

継代培養されているヒマワリ根端の鉄欠乏による形態変化

友常優子, 野村港二（筑波大・バイシス）

鉄欠乏時に植物は根端にtransfer cellを分化させ、この細胞の働きによりFe(III)をFe(II)にすることで鉄を吸収しようとする。その時根端では、膨潤と根毛の発達という形態の変化が見られる。これまで、根端におけるtransfer cellの分化と形態の変化は、地上部が鉄を要求することで引き起こされる植物体全体の反応であると説明されてきたが、直接的な証明はされていない。

我々は、水耕栽培したヒマワリを用い、鉄欠乏下の根端におけるtransfer cellの分化が、根だけでの自律的な細胞分化である可能性を示してきた。そこで、これを検証するためにヒマワリ根の器官培養を試み、鉄欠乏下での形態の変化を追った。その結果、継代培養されている根においても鉄欠乏下で根端の膨潤と根毛の発達が見られた。従って、この変化には植物体全体の反応系とは別の、根という器官レベルの部分的な反応系の存在が示唆された。

F036

イネの葉において観察された光周期相特異的な遺伝子発現

椎名由起,神田伸一郎[1],田中 尚,久留主泰朗,丹羽 勝（茨城大・農,[1]青森県農試藤坂支場）

イネの光周性に関与する遺伝子を探索するため,葉において光周期相特異的に発現する mRNA を簡易 DD 法 (Yoshida *et al.*, 1994)により探索し,5 本の光周期相特異的に出現するバンドを検出した(育雑 48(別2),625,1998).

感光性遺伝子座 *Se-1* に関する 2 つのイネ同質遺伝子系統を 12L12D で処理し,2 サイクルにわたって 2 時間毎に葉身からトータル RNA を抽出し,上記 5 本のバンドに含まれる cDNA 断片をプローブとするノーザン解析を行った.

5 本のバンドのうち,暗期 12 時間目に特異的に出現した D70 をプローブに用いた時,暗期 12 時間目に強いシグナルが得られた.クローニングとシークエンシングを行った結果, D70 は長さ 447bp の断片であり,サザン解析によりイネゲノム中にシングルコピーで存在することがわかった.

DDBJ のデータベース検索により,D70 の塩基配列は短日で花成誘導したソルガムの花芽分裂組織で発現する cDNA の配列と部分的に 95%一致していた.

F037

LHY-CCA1 double loss-of-function in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression and early flowering phenotype

Tsuyoshi MIZOGUCHI, Kay WHEATLEY and George COUPLAND; Dept. Mol. Genetics, John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, UK

Circadian rhythms are driven by endoginous biological clocks that regulate many biochemical, physiological, and behavioral processes in a wide variety of organisms. Two Myb-related genes, LHY and CCA1, have been shown to be closely associated with clock function in *Arabidopsis*. Expression of LHY and CCA1 oscillates with a circadian rhythm. Overexpression of LHY or CCA1 causes arrhythmic expression of clock-controled genes, reduction of their own expression, and delay of flowering time. Lack of CCA1 in a T-DNA insertion mutant line (*cca1-1*) shorterned the periods of LHY and other clock-controled genes, suugesting that the functions of LHY and CCA1 may be partially redundant.

To examine the effects of a LHY-CCA1 double loss-of-function mutation on circadian rhythms, we recently identified three loss-of-function alleles (*lhy 11*, *12* and *13*) of LHY and made double null mutants (*lhy12/cca1-1*). Here we show that 1) loss of the LHY in *Arabidopsis* shorterns the periods of CCA1, GI and CCR2 gene expression in a similar way to the cca1 single null mutant , 2) both *lhy 12* and *cca1-1* single null mutants flower earlier than wild type, 3) the *lhy12/cca1-1* double null mutation shorterns or alters the periods of the circadian clock-controled genes dramatically and also causes a much earlier flowering phenotype than either parental mutant. These data show that two closely related genes, LHY and CCA1, play a central role in both circadian regulation of gene expression and flowering time regulation. To identify mutations which affect circadian rhythms in *Arabidopsis*, we have screened EMS-mutagenised *lhy12* seeds for plants which flowered earlier than the *lhy12* progenitor in SD and isolated more than 600 candidates. Characterization of these mutants is underway and results on the analysis will be discussed.

F038

甘果オウトウにおける冬芽中の小葉からの不定芽誘導

加藤良一[1]、漆山登喜[1]、市村暁子[1]、高品善[2]、仲野英秋[2]、鈴木隆[1]（[1]山形大・教育、[2]山形県立園芸試験場）

甘果オウトウの主力栽培品種を組織培養して植物体を再分化させることは難しかったが、我々のグループは未熟受精胚（2000年春、園芸学会）及び茎頂培養由来の培養シュートの上位展開葉（2000年秋、日本育種学会）を材料にして初めて成功した。今回は、果樹体の冬芽中の小葉を培養して不定芽が誘導されたので報告する。なお、本研究は山形県地域結集型共同研究事業の一環として行われた。

1月末から4月初めにかけて果樹体から枝を採取し、その冬芽をほころばせた後、その中から小葉を取り出した。①「佐藤錦」の小葉を5又は10mg／ﾘｯﾄﾙ 2,4-Dを含む液体WP培地中に1日浸した後に、10mg／ﾘｯﾄﾙ TDZ及び0.1mg／ﾘｯﾄﾙ NAAを含むWP培地上で16時間明下／8時間暗下で40日以上培養すると、小葉の基部にできたカルスから3%又は12%の誘導率で不定芽がそれぞれ誘導された。②「Naporeon」の小葉を10mg／ﾘｯﾄﾙ 2,4-D、NAA又はIAAを含む液体WP培地中に1日浸した後に上記と同様に培養すると、33%、9%又は0%の誘導率で同様に不定芽がそれぞれ誘導された。③「セネカ」、「マザード」、「高砂」、「紅秀峰」、「紅てまり」、「紅さやか」及び「VAN」の小葉を10mg／ﾘｯﾄﾙ 2,4-Dを含む液体WP培地中に1日浸した後に上記と同様に培養した。「マザード」及び「紅てまり」では、②の結果と比較してその不定芽誘導率は高かった。

F039

シロイヌナズナ *AHK4* 遺伝子産物はサイトカイニンレセプターとして機能する

上口智治，佐藤修正[1]，加藤友彦[1] and 田畑哲之[1]（名古屋大・生物分子応答研究センター、[1]かずさDNA研究所）

二成分制御系に属するシロイヌナズナの新規センサーヒスチジンキナーゼファミリー遺伝子（*AHK2,3,4*）の生物学的機能を探る目的でT-DNA挿入変異株のスクリーニングを行った。その結果、*AHK4*遺伝子の劣性機能欠損変異を同定した。*AHK4*の発現が根組織特異的であるという事実に着目して*ahk4*ホモ接合体の表現型を調べたところ、根の伸長阻害とカルスの緑化においてサイトカイニンに対する感受性が著しく低下していることが判明した。出芽酵母のヒスチジンキナーゼ変異を*AHK4*が抑制できるかどうかを調べたところ、サイトカイニンに依存した抑制活性を示した。この結果はAHK4がサイトカイニンの直接の受容体であることと共に、リガンドとの結合がリン酸転移を誘導することを示唆する。

S001

スギナ配偶体と胞子体の中間的な構造体の作出

栗山昭，本山健太郎，山名昌男，前田桝夫[1]（東京電機大・理工・生命，[1]福井大・教育地域・生物）

ホルモン無添加でショ糖を3%含むMS培地で継代培養しているスギナ配偶体を、サイトカイニンを含んだ培地に移すと、無配生殖的に胞子体が形成される。形成された胞子体はホルモン無添加の培地に移しても配偶体に戻ることはない。このことは、サイトカイニンにより配偶体細胞で胞子体遺伝子が発現したら、ホルモン無添加の条件に戻されても再び配偶体遺伝子が発現することはないことを示唆している。胞子体誘導の際、ショ糖とサイトカイニンの濃度を低くすると、配偶体と胞子体の中間的な構造体が形成されることがわかった。中間的な構造体をホルモン無添加で3%ショ糖を含む培地に移すと、胞子体として生長するものと配偶体に再分化するものがあった。サイトカイニンが低濃度でもショ糖濃度が高い(3%)ときは中間体の形成がみられないので、中間体の形成には糖の濃度が重要な役割を果しているといえる。

コケ植物には維管束がないが、シダ植物では維管束が発達している。中間体の内部構造を観察することは、コケ植物からシダ植物への移行を考える上で興味深い。

S002

CHARACTERIZATION OF A NOVEL NUCLEAR PROTEIN EXPRESSED DURING MICROSPOROGENESIS

Gun-Aajav BAYARMAA, Kengo MOROHASHI, Hisabumi TAKASE, Kazuyuki HIRATSUKA,
Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, Ikoma 630-0101

Microsporogenesis is a highly organized indispensable event for the sexual reproduction of higher plants. The process includes a series of organ development, cell differentiation and meiosis. In order to investigate functional genes involved in microsporogenesis, we carried out random sequencing project using a cDNA library from lily zygotene stage microsporocytes and isolated several cDNAs encoding novel gene product. Among them, the deduced amino acid sequence of a gene, designated *M532*, has shown to contain a nuclear loclization signal. RNA and protein gel blot analyses indicate that the temporal and spatial expression of the M532 is associated with early stages of microsporogenesis. Nuclear localization of the M532 protein was confirmed by cell fractionation experiments and GFP tag. We have also identified the *M532* homolog from Arabidopsis.

S003

雌雄異株植物・アサは自家・他家受粉ともに可能な場合に他家受粉を優先する

阪本浩一, 長沼亜紀[1], 佐藤忍[1], 松山知樹, 阿部知子, 吉田茂男（理研・植物機能, [1]筑波大・生物）

雌雄異株植物のアサは、自然界では通常、短日条件で開花し、他家受粉を行うが、雌株のみで短日処理を行うと、雌株上に雄花が着き、単性花の雌花と雄花が混在した間性株となり、自家受粉によって種子を形成する。一方、雄株のみで短日処理を行っても間性株は出現しない。雌株と雄株を混在させ、他家受粉可能な状況で短日処理を行った場合には、間性雌株上に着いた雄花は発達途中で落下し、他家受粉を行う。この原因を調べるため、雌株と袋がけした雄株を混在させ、短日処理した結果、間性雌株上に着いた雄花は、落下せず、自家受粉を行った。さらに、間性雌株上の雌花に雄株の花粉を人工受粉したところ、間性雌株に着いた雄花は、発達途中で落下した。以上の結果から、受粉刺激によるシグナルが雄花の落下に関わっており、自家受粉よりも他家受粉を優先することが推定された。

S004

雌雄異株植物ヒロハノマンテマのゲノムに局在するテロメア様反復配列の解析

内田和歌奈、松永幸大、河野重行（東大・院・新領域・先端生命）

ナデシコ科の雌雄異株植物ヒロハノマンテマ（*Silene latifolia*）はXY 型の巨大な性染色体を持つ。性染色体の起源を探るために、染色体に内在するテロメア様反復配列を解析した。シロイヌナズナ型のテロメア反復配列CCCTAAAを5回繰り返したオリゴプローブを用いて、ヒロハノマンテマのゲノミックライブラリーをスクリーニングし、染色体に内在する 80～200bp のテロメア様反復配列を含む 12 クローンを単離した。このうち 8 クローンについてテロメア様反復配列の周辺領域の塩基配列を解析した結果、各クローンが高度に保存された共通のモチーフ（ A～J ）を含むことを見出した。共通のモチーフの分布をもとにクローンを4つのファミリーに分類することができた。それぞれのモチーフをプローブにしたゲノミックサザンハイブリダイゼーション解析では雌雄での差は見出されず、雌雄のゲノム上にそれぞれ数十コピー存在していることが推定された。現在、各モチーフをプローブとした FISH により、それらの染色体上における局在を解析している。

S005

雌雄の生殖器官の相互作用に関わるシロイヌナズナ突然変異体の解析

金岡雅浩、清水健太郎、岡田清孝（京都大・院理・植物）

高等植物の有性生殖過程において、雌雄の生殖器官の相互作用に関する分子レベルでの知見はほとんど得られていない。我々は、EMS または高速中性子線で処理したシロイヌナズナの M1, M2 植物を用いて、花粉管を観察することにより、雌雄間の相互作用に異常の見られる突然変異体の探索を行った。その結果、以下の段階に異常の見られる突然変異体を新たに単離することができた。1) *kompeito* は花粉の形態の異常により、柱頭への接着に異常が見られる。2) *nobinai* の花粉管は雌しべの途中で伸長が止まる。3) *karakusa* の花粉管は胚珠内で開裂せず伸び続ける。4) *int3* の露出した雌性配偶体では、花粉管が進入に失敗することがある。5) *ml2* では「多精拒否」に異常が見られ、一つの胚珠に複数の花粉管が向かう。現在、これらの突然変異体の表現型を詳細に解析し、また、原因遺伝子を同定中である。

S006

ニンジン体細胞胚形成の初期過程のVTRでの観察

伊藤崇博、保田浩[1]、大和田琢二、増田宏志（帯広畜大・生物資源科学、[1]岩手大・農・寒冷地システムセンター）

私達はこれまでニンジンでその胚軸切片を 2,4-Dで短時間処理して遊離してくる体細胞が 2,4-D非依存下で分裂し、胚を経て幼植物体が形成する体細胞胚形成系を開発し研究を行ってきた。この系の長所は体細胞からカルスや懸濁培養細胞を経ることなく一段階で胚が形成されることである。今回は体細胞が分裂して胚が形成される過程を VTR で連続観察することが出来たので報告する。

ニンジンの再生植物体を 2,4-D で短時間処理し、次いで 2,4-D のない培地で培養した。この培養中に遊離する体細胞を材料とし、顕微鏡下でこの体細胞が胚へと発達する形態学的変化の様子を VTR に録画し、さらに高速度画像化した。体細胞がどのように分裂し細胞塊が形成するか、また細胞塊がどのように発達して球状胚が形成されるか、および球状胚からどのように心臓型胚に発達するかが観察された。

S007

ニンジンにおける不定胚形成能力獲得と細胞分裂の関係

菊池彰、高畑公紀、朝比奈雅志、鎌田博
(筑波大・生物)

ニンジンの不定胚は、通常、外生オーキシン処理によって増殖するカルスを得た後、このカルスをオーキシン無添加培地に移植することで誘導される。この系は活発な細胞分裂と不定胚形成能力の獲得が連続した事象として起こる系であることから、細胞分裂と不定胚形成能力獲得の関係を明らかにすることは困難である。しかし、実生茎頂を用いるストレス不定胚誘導系では、外部からの植物ホルモン処理をおこなうことなしに不定胚形成を引き起こすことができる。ストレス（高浸透圧・重金属・熱など）処理によってニンジン実生茎頂はその生長が抑制された状態に置かれるが、その状態で不定胚形成能力を獲得すると考えられる。

そこで、不定胚形成能力の獲得と細胞分裂の関係を明らかにするためストレス不定胚誘導系を用い、ストレス処理時間を変化させた際の不定胚形成率の変化と胚発生関連遺伝子の発現を解析するとともに、ストレス処理中の細胞分裂レベルについて検討した。

その結果、ストレス処理時間を長くすることによって不定胚形成頻度が上昇し、それとともに胚発生関連遺伝子の発現も上昇することが確認された。一方、細胞分裂レベルはストレス処理に伴って著しく低下していることが判明した。以上の結果から、不定胚形成能力獲得には細胞分裂は必須では無いことが示唆された。

S008

ニンジン種皮から不定胚!?

飯塚京、澤進一郎、小柴共一（都立大院・理・生物）

ニンジンの不定胚誘導系は、古くから胚発生のモデル系として利用されてきた。しかし、根や胚軸切片から胚形成能力をもつカルス（embryogenic callus）を誘導し、このカルス経由で不定胚を誘導するという従来の方法では、十分量の不定胚を得るまでに数ヶ月という長い期間を必要とする。最近、カルスを誘導することなく、胚軸切片表皮細胞から直接的に不定胚を誘導する方法も報告されているが、この場合でも、少なくとも数週間を要する。

我々は、発芽後のニンジン種子の殻（種皮）の一部から、ごく短期間のうちに、非常に高頻度で不定胚が誘導されることを見出した。25℃、14 日間育てた黄化芽生えに付着している種皮を集め、2 日間の 2,4-D 処理後、2,4-D を除去し、植物ホルモンを含まない MS 固形培地上で培養すると、わずか数日間で、芽生えの出口側の付近に、高頻度で多数の不定胚が観察された。また、この培養を液体振盪で行い、ステンレスメッシュで初期段階の胚（球状胚）を選抜し、培養を継続することによる不定胚の同調的培養系について報告する。

S009

シロイヌナズナ *CUC1, CUC 2* 遺伝子の機能解析

田岡健一郎、相田光宏、田坂昌生　（奈良先端大、バイオ）

シロイヌナズナ *CUC1*、*CUC2* 両遺伝子は、胚発生過程で茎頂分裂組織の形成や子葉の分離に関わる遺伝子である。両遺伝子は、ともに NAC box と呼ばれる高度に保存された領域を持つ。NAC box を持つ遺伝子は、高等植物において大きな遺伝子ファミリーを形成しているが、それらの遺伝子がコードしている蛋白質の分子機能は不明である。我々は、双子葉植物の茎頂分裂組織形成、器官分離の分子機構を明らかにするために、CUC2 蛋白質の機能解析をおこなった。

CUC2 と GFP との融合蛋白質をシロイヌナズナにおいて発現させたところ、子葉原基間の細胞核に蛍光が観察された。この結果から、CUC1, CUC2 は転写因子である可能性が示唆されたので、GAL4 DNA 結合領域との融合蛋白質を酵母で発現させ、その転写活性化能を調べた。その結果、NAC domain を含まないC末側の領域に転写活性化能があることが明らかになった。また、酵母 2-hybrid assay から、CUC1, CUC2 は、homodimer や heterodimer を形成しうることが示された。以上から、CUC1, CUC2 が転写因子として機能している可能性が高い。現在、植物細胞を用いて転写活性化能について解析中である。

S010

花粉特異的に発現するATP合成酵素のβサブユニット遺伝子(*atpb*)の解析

坂本正弘[1]、島田浩章[2]、杉田　護[3]
([1]京大院・農・地域環境、[2]東京理科大・基礎工、[3]名大・遺伝子)

われわれは、トマト(*Lycopersicon esculentum* L.)のゲノミックライブラリーから、花粉特異的に発現するミトコンドリアATP合成酵素のβサブユニット遺伝子(*atpb*)ときわめて相同性の高いクローンを得た。得られたトマトの*atpb*遺伝子は9個のexonで構成されており、exon1を除いては組織非特異的な発現をする他の*atpb*とも相同性が高かった。このexon1は花粉特異的に発現するタバコの*atpb*ときわめて高い相同性があり、この遺伝子が花粉特異的に発現することが示唆された。exon3～8をプローブとしてゲノミックサザンをおこなった場合、複数のシグナルが検出されるのに対し、exon1をプローブとした場合には単一のシグナルが得られたため、本クローンはゲノム内では単一で存在している可能性が高いと考えられた。この遺伝子の構造および各組織における発現の解析結果について報告する。

S011

シロイヌナズナの暗黒条件下での花成誘導機構の解析

中川　薫、根本圭介[1]、米田好文（北海道大院・理・生物科学、[1]東京大・アジア生物資源環境研究セ）

花成は発芽と並び、植物の生存に関わる最重要事項である。そのため、外的環境は花成誘導の重要因子であり、その誘導経路の研究は光情報に応答する経路を中心に解析が進んでいる。一方、これまでの研究から、植物には環境情報とは関係なく進行する内在的な遺伝的花成誘導プログラムが存在することがわかっている。

シロイヌナズナの*COP1*は光形態形成に関与する遺伝子で、その突然変異体は光非依存性の表現型を示す。弱いアリルである*cop1-6*突然変異体は暗黒条件下で花成が誘導される。そこで、内在性の花芽誘導機構の解明を目指し、環境条件の中でも特に花成に強い影響を与える光条件を排除した、暗黒下での花成誘導経路の解析を*cop1-6*を用いて行った。

野生型(Col)、*cop1-6*をそれぞれ光照射下と暗黒条件下で育成し、ノーザン解析、RT-PCR、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、既知の花成関与遺伝子の発現解析を行った。その結果、複数の異なる花芽誘導経路に存在すると考えられている遺伝子の発現が、暗黒条件下の*cop1-6*のみならずColでも確認された。

S012

シロイヌナズナ短日花成遅延表現型抑圧変異株*sls1, sls2*の単離と解析

矢部尚登、蓮沼仰嗣（横浜市大院・木原生研）

アクティベーションタギングによりシロイヌナズナの短日花成遅延表現型を抑圧する変異株の単離を試みた。約11,000の独立な形質転換ラインを構築、T1世代では恒明条件、T2世代で短日条件で検索を行い、花成が早化する変異株を検索、最終的に2株の半優性変異株*sls1, sls2*を得た。これらは共に短日で野生型の半数以下の普通葉数で花成に至り、長日でも花成早化表現型を示した。*sls1*は花成早化以外に幼若葉が内向きに巻き上がるcurly-leaf様表現型を示すほか、第二メタマー特異的な花茎の伸長抑制に起因する半矮性表現型を示す。この花茎の特異的な伸長抑制表現型は28℃で育成することで抑圧されるが花成早化表現型は温度シフトの影響を受けなかった。ともに戻し交雑により得た単一挿入個体よりT-DNA隣接ゲノム領域を回収、解析したところ*sls1*は3番染色体、*sls2*は5番染色体のスペーサー領域と推定される領域にエンハンサー配列が挿入されていた。挿入位置周辺について検索を行ったところ*sls1*ではRNA結合モチーフを持つ新規遺伝子および機能未知のORFが、*sls2*では花成促進因子*FPF1*およびphotolyase相同遺伝子が近傍に位置していた。これら近傍遺伝子の挙動と花成を含めた表現型の関係について報告する。

S013

液胞輸送レセプターPV72の細胞内局在性と役割

嶋田知生，三橋尚登，石丸八寿子[1]，西村幹夫[1]，西村いくこ（京大院・理・植物，[1]基生研・細胞生物）

カボチャPV72は液胞タンパク質の選別輸送に関わる輸送レセプターである(1)．本研究では，PV72の細胞内局在性とその役割について検討した．

免疫電顕観察からPV72は登熟子葉のPAC小胞(2)に存在することが判明した．ショ糖密度勾配遠心法ではPV72はPAC小胞とともに，マイクロソーム画分にも検出された．PV72のルーメンドメインを緑色蛍光タンパク質 (GFP) に置換したSP-GFP-PV72Cをタバコ培養細胞BY-2で発現させると，ゴルジ体と考えられる小さな顆粒状の蛍光パターンが観察された．この蛍光は継代とともに速やかに消失する傾向があった．同じコンストラクトをシロイヌナズナで発現させると，細胞内の様々な大きさの顆粒にGFP蛍光が観察された．GFP蛍光が観察された個体では著しい生育阻害が見られた．GFPを発現するラインの乾燥種子では貯蔵タンパク質の前駆体が検出された．SP-GFP-PV72Cがドミナントネガティブに作用し，内在性の輸送レセプターの機能を阻害することにより，生育不良を引き起こしている可能性が考えられた．

(1)Shimada et al. (1997) Plant Cell Physiol. 38, 1414-1420
(2)Hara-Nishimura et al. (1998) Plant Cell 10, 825-836

S014

シロイヌナズナの後期胚発生と実生分化に関与するWD40蛋白質の解析

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

*line24*変異体は胚におけるアントシアニンの蓄積、乾燥耐性の欠損、子葉上のトライコーム形成、実生特異的遺伝子の異時的発現など後期胚発生変異体*leafy cotyledon*と同様の特徴を有した。未熟種子は培地上で発芽したが、実生致死性や徒長異常など*fusca*変異体とも類似性を示した。二重変異体の解析から、*LINE24*遺伝子は*LEAFY COTYLEDON*及び*FUSCA*遺伝子と協調して働き、後期胚発生と実生分化の誘導或いは維持に関与すると推測された。野性株から単離した*LINE24*遺伝子転写産物のcDNAは35S及び自身のプロモーター制御下で変異を相補し、予想される蛋白質は8反復のWD40モチーフから成っていた。前者の相補は不完全な場合があり、花がカルス状の形態を呈する個体が出現した。異常花における*LINE24* mRNAの蓄積は正常なものと比較し減少していた。結果の意義について検討中である。

S015

種子貯蔵タンパク質のプロセシングに異常を示すシロイヌナズナ変異体の単離とその解析

片岡未裕希,嶋田知生,山田健志,西村幹夫[1],西村いくこ
(京大・理・植物、[1]基生研・細胞生物)

液胞タンパク質の多くは小胞体上で前駆体として合成され，液胞へと輸送された後にVPE（液胞プロセシング酵素）によるプロセシングを受けて成熟型に変換される（1）．本研究では液胞タンパク質のプロセシング機構の解明を目的として，種子貯蔵タンパク質のプロセシングに異常を示すシロイヌナズナ変異体のスクリーニングを行った．

シロイヌナズナの種子貯蔵タンパク質である12Sグロブリンと2Sアルブミンをイムノブロット解析し，プロセシングの不完全な前駆体の蓄積を指標として，約28,000ラインから6ラインの変異体候補を得た．前駆体が蓄積していたラインでも，相当量のタンパクは成熟型として蓄積していた．変異体候補株のいくつかを，種子型のVPEであるβVPEの抗体でイムノブロット解析したところ，バンドが検出されなかった．βVPE遺伝子をシークエンスした結果，ナンセンス変異やアミノ酸置換を伴う変異が見られた．変異体候補株でのVPE活性などの解析結果についても併せて報告する予定である．

(1) Yamada *et al.*, (1999) J. Biol. Chem., 274, 2563-2570.

S016

インゲンマメのVP1類似転写因子pvAlfによるシステインプロテアーゼEP-C1遺伝子発現制御機構

山内大輔、小林重典、南川隆雄（都立大院・理・生物）

トウモロコシの種子登熟と発芽を制御する転写因子VP1がα-アミラーゼ遺伝子の発現を抑制することが知られている。これに類似した転写因子pvAlfをコードするcDNAがインゲンマメより単離されているが、発芽への関与は分かっていない。そこで、この遺伝子の発現パターンを解析した。pvAlf mRNAは乾燥種子中に存在し、吸水後3日目になると消失した。これはシステインプロテアーゼEP-C1遺伝子の発現パターンと相反した。次にCaMV35S RNA遺伝子プロモーターにpvAlf cDNAを結合した融合遺伝子を、EP-C1遺伝子プロモーターを結合したβ-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子とともに粒子銃で発芽子葉に導入した。その結果、強制発現させたpvAlfによってGUS活性の発現が阻害された。これらの結果から、pvAlfはEP-C1遺伝子の発現を抑制していることが示唆された。

S017

イネPCF familyのDNA結合及び2量体形成の特異性

小杉俊一[1,2]、大橋祐子[1,2]（[1]農水省・生物研、[2]ＪＳＴ／ＣＲＥＳＴ）

イネPCNAプロモーターの、分裂組織特異的発現に関わるシスエレメントに結合する因子として単離されたPCF1およびPCF2は、植物に特有のDNA結合ドメイン（TCPドメイン）を共有するタンパク質ファミリーのメンバーである。TCPタンパク質群は、その構造上PCFを含むグループIとCYCおよびTB1が属するグループIIに大きく分けられる。CYCタンパク質はキンギョソウの花弁（不整斉花）の非対称性成長を制御し、TB1はトウモロコシの腋芽の分裂、成長の制御に関わっている。これらのことから、TCPタンパク質群の主な機能は、細胞、組織の分裂、成長の制御であると推察される。

我々は、イネから両グループに属する計7つのTCPドメインタンパク質（PCF1 - PCF7）を単離し、DNA結合特異性の解析を行った。PCFのDNA結合には、比較的厳密な配列特異性が要求され、グループIとIIの間で認識配列に違いが見い出された。また、グループIのコンセンサス結合配列は、イネPCNA遺伝子のシスエレメントと完全に一致し、PCFがイネPCNA遺伝子を制御していることを強く示唆した。PCFは2量体としてDNAに結合するが、yeast two-hybrid assayの結果から、グループ間よりもグループ内でホモおよびヘテロ2量体を形成する傾向にあった。さらに、これらコンセンサス結合配列をもとにして検索されたPCFタンパク質の標的遺伝子の候補の内、いくつかの遺伝子のプロモター領域について、PCF結合部位に変異を導入したところ、プロモーター活性の減少が見られた。

S018

タバコサイクリンDの *in vivo* 機能解析

中神弘史[1]、関根政実[2]、河村和恵[2]、杉坂恵子[2]、Heribert Hirt[1]、新名惇彦[2]（[1]Vienna Biocenter, Austria、[2]奈良先端大・バイオサイエンス）

近年、植物の G1 期制御は酵母に比べ動物により近いことが明らかになりつつある。動物ではサイクリン D はサイクリン依存性キナーゼ（CDK4 または CDK6）と複合体を形成し、Rb をリン酸化することにより細胞を S 期に導く。我々はバキュロウイルス発現系を用いた *in vitro* 再構成系により、タバコサイクリン D（Nicta;CycD3;4）がタバコ CDK-a（Nicta;CDKA;3）と活性のある複合体を形成し、タバコ Rb(NtRb1）および Histone H1 をリン酸化すること、更に Nicta;CycD3;4 のリン酸化が複合体の活性制御に関与していることを本学会において報告してきた。

そこで次に、1）Nicta;CycD3;4 を特異的に認識するペプチド抗体、2）GFP（Green fluorescent protein）融合 Nicta;CycD3;4 を CaMV（cauliflower mosaic virus）35S プロモーター下で構成的に発現させた形質転換タバコ培養細胞 BY-2、の二つの実験材料を作製し、Nicta;CycD3;4 の *in vivo* における機能解析を試みた。その結果、Nicta;CycD3;4 および NtRb1 が G1 期制御に関与していることを示唆する興味深い結果が得られた。また、Nicta;CycD3;4 のリン酸化が *in vivo* においても CDK 複合体の活性に関与していることが分かり、更に Nicta;CycD3;4 の細胞内局在性にも関与していることを見出した。

S019

CDK 活性化キナーゼ(CAK)の活性化とサイトカイニン

山口雅利、山村三郎[1]、梅田正明、内宮博文　（東大・分生研、[1]財団法人岩手生物工学研究センター）

細胞周期の制御において中心的な役割を果たしているサイクリン依存性キナーゼ(CDK)は、様々な相互作用因子によって活性が制御されている。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 を活性化させる。我々は本学会において、イネの R2 が CAK として機能すること、また R2 の相互作用因子としてサイクリン H(Os;CycH;1)を単離し、R2 を活性化することを報告した。そこで次に CAK はどのような上流のシグナルにより制御されているか解析するために、*R2* 及び *Os;cycH;1* 遺伝子をグルココルチコイド誘導性プロモーターに連結してタバコに導入した。その結果、グルココルチコイド誘導体であるデキサメタゾン(DEX)により R2 及び Os;cycH;1 を発現させたところ、その葉切片は、オーキシンのみを含む培地上でカルスを形成することが明らかになった。この結果は CAK 活性がサイトカイニンのシグナルにより制御されている可能性を示唆している。

S020

CDK のリン酸化カスケードによる細胞分裂の制御機構の解析

下遠野明恵、梅田正明、内宮博文（東大・分生研）

細胞周期の進行に中心的な役割を果たしている CDK (Cyclin-dependent kinase) が完全に活性化されるには CDK の T-loop 領域のスレオニン残基のリン酸化が必須であり、このリン酸化反応を触媒しているのが CAK (CDK-activating kinase)である。現在までに、様々な植物種において複数の CDK が単離され機能解析が進められているが、それらが上流からのどのようなシグナルによって制御されているか、という点はほとんど明らかにされていない。そこで、我々はリン酸化による CDK の制御機構に注目して、細胞分裂を制御するシグナル伝達機構について解析を行なっている。

我々は、現在までにアラビドプシスの 3 種類の CAK 遺伝子(*cak1At*、*cak2At*、*cak3At*)の存在を明らかにした。Cak1At は、ヒトや分裂酵母の CAK とアミノ酸レベルでも酵素活性の上でも、動物の CAK と近縁な Cak2At、Cak3At とは異なる機能を有することが予想された。そこで、酵母を用いた遺伝学的解析、および *in vitro* におけるキナーゼアッセイを行なったところ、これら 3 種類の CAK はリン酸化カスケードを構成し、Cak1At が Cak2At, Cak3At をリン酸化し活性化する CAK 活性化キナーゼ(CAKAK) として機能している可能性が示唆された。この結果は、CAK を介した CDK のリン酸化経路が外的あるいは内的シグナルに応答して細胞分裂を制御し得ることを示している。

S021

タバコ細胞周期 M 期に活性化される NQK1 MAPKK は NRK1 MAPK を特異的に活性化する

征矢野敬、西浜竜一、町田泰則（名大院・理・生命理）

MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードは、MAPKKK、MAPKK、MAPKから成る一連のタンパク質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 NPK1 MAPKKK は、高等植物の細胞質分裂に必須なタンパク質であり、細胞周期の細胞質分裂が起こっている時期に活性化される。すでに我々は、NPK1 の下流因子と考えられる NQK1 MAPKK 及び NRK1 MAPK を同定している。NQK1 及び NRK1 の細胞周期を通した活性化様式はNPK1の場合と酷似していたこと。また、NQK1 が NPK1 とその活性化因子であるキネシン様タンパク質 NACK1 との両者に依存して酵母細胞内で活性化されること及び*in vitro* に おいて NQK1 が NRK1をリン酸化して活性化することから、NPK1-NQK1-NRK1 MAPK　カスケードがタバコ細胞に存在すると考えられる。今回、我々は、新たに NQK1 及び NRK1 に保存されているプロテインキナーゼによるリン酸化部位が各の活性化に重要であることを明らかにし、NQK1、NRK1 が MAPKK、MAPK としての性質を有していることを生化学的に示した。また、これまでにタバコで同定された複数のMAPKを用いて NQK1 の基質特異性を *in vitro* リン酸化反応によって解析したところ、NQK1 は NRK1 のみを効率よくリン酸化することが明らかとなった。この結果より、NQK1 は NRK1 に特異的な MAPKK であると考えられる。

S022

シロイヌナズナの *Ds* 挿入変異体を用いた、葉緑体形態形成に関与する 37kDa chloroplast inner envelope membrane polypeptide の機能解析

本橋令子 1、伊藤卓也 2、小林正智 2、永田典子 3、吉田茂男 3、篠崎一雄 1,2（1; 理研・ゲノム科学総合研究センター・植物ゲノム機能、2; 理研・植物分子生物、3; 理研・植物機能）

我々は葉緑体の形成や色素合成に関与する遺伝子の機能解析を行うことを目的として、トランスポゾン *Ac/Ds* を用いて作製したシロイヌナズナ遺伝子破壊系統の F3 世代について幼苗期の表現形質を調べ、アルビノ又は葉の色素が薄くなる pale green 変異体を多数得ることができた。遺伝学的解析から表現型が *Ds* の挿入が原因と考えられる、植物体の色素が薄く pale green になる変異系統 *apg1*（albino and pale green mutant 1）は、ホウレンソウとタバコの 37 kDa chloroplast inner envelope membrane polypeptide precursor と高い相同性を持っ遺伝子内部に *Ds* が挿入していた。また、37 kDa chloroplast inner envelope membrane polypeptide precursor は S-adenosylmethionine dependent methyltransferase と配列が部分的に類似していた。この変異体は土植えすると枯死し、葉緑体はグラナラメラの減少など異常な形態を示していた。このことから、メチル化が葉緑体の形成に必要なプロセスであることが示唆された。現在、 *apg1* 変異体を用いてメチル化について解析をすすめている。

S023

Gyrase 阻害剤による葉緑体 DNA コピー数減少に伴う葉緑体形成阻害の解析

島田裕士、太田啓之、高宮建一郎 （東京工業大学、大学院生命理工）

植物の葉緑体は細胞核とは異なる独自の DNA を通常数十コピー持っており、その複製には DNA gyrase が関与していることが知られている。そこで、DNA gyrase 阻害剤であるニューキノロン剤（オフロキサシン）を処理する事によって、植物の葉緑体 DNA コピー数を減少させた。オフロキサシンを 0.3μg/ml 含む培地でシロイヌナズナを生育させたところ、黄緑色の植物体であったが、生育速度等は未処理の植物体との違いはなかった。サザンブロッティングの結果から、オフロキサシン処理した植物体のプラスチド DNA コピー数は、未処理の約 1/10 に減少していた。オフロキサシン処理した植物の葉緑体はチラコイド膜の発達が悪く、代わりに電子密度の高い膜画分が観察された。調べた全ての光合成遺伝子の発現量は未処理植物とオフロキサシン処理した植物体で変化が観察されなかった。ウエスタンブロッティングによる解析から、ルビスコの小サブユニットと大サブユニットは処理した植物体では減少していたが、その他のタンパク質の量の変化は観察されなかった。以上の結果と、オフロキサシン処理による葉緑体 DNA コピー数減少と葉緑体の形成阻害についての関連性についての考察もあわせて報告する。

S024

ヒメツリガネゴケの葉緑体形質転換系の開発

杉浦千佳[1]、青木摂之[1]、杉田千恵子[2]、杉田 護[1, 2]
（[1]名大・院人間情報、[2]名大・遺伝子）

ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）は相同組み換えを介した遺伝子ターゲッティングが可能な唯一の陸上植物である。我々は、ヒメツリガネゴケの高い相同組み換え能に着目して、ヒメツリガネゴケの葉緑体形質転換系の開発を試みた。これに先立つ解析として、まずヒメツリガネゴケの葉緑体ゲノムの構造決定を行った。ヒメツリガネゴケのゲノムライブラリーから、*rbcL*遺伝子を含むファージクローンを取得しその挿入DNA断片の塩基配列を決定した。ヒメツリガネゴケでは*rbcL*-*trnR*-CCG-*accD*の順に遺伝子が並んでいることが判明した。高等植物では*rbcL*のすぐ下流に*accD*が位置し、*trnR*-ACGと*trnR*-UCUは存在するが、*trnR*-CCGは存在しないことが知られている。次に、スペクチノマイシン耐性を付与する遺伝子*aadA*を*trnR*-CCG領域内に、および*rbcL*と*trnR*-CCGの間に挿入したコンストラクトを作製し、それぞれをポリエチレングリコール（PEG）存在下でヒメツリガネゴケのプロトプラストに導入した。その結果、多数のスペクチノマイシン耐性の葉緑体形質転換株を得ることに成功したので合わせて報告する。

S025

シロイヌナズナの葉緑体転写制御における*sigB*の役割

華岡光正、金丸研吾、田中 寛、高橋秀夫
（東京大学・分生研）

葉緑体の真正細菌型RNAポリメラーゼ(PEP)は、色素体ゲノムコードのコア酵素と転写開始に必要な核コードシグマ因子から構成される。シグマ因子は複数存在し、各シグマ因子が葉緑体の発達や環境変化に応じて異なるプロモーター構造を認識しているものと考えられる。

我々はこれまでにシロイヌナズナから6種類のシグマ因子遺伝子(*sigA*-*sigF*)を同定し、それらの発現と機能についての解析を進めている。最近、それらのうち*sigB*遺伝子へのT-DNAの挿入による変異株を取得した。pale-greenの表現型を示すこの株では何らかの光合成関連遺伝子の転写が影響を受けていると考えられたが、ノザン解析では意外にも野生株と顕著な差はみられなかった。そこで、プライマー伸長法とS1マッピング法を用いて各プロモーターレベルでの転写量を比較したところ、*psbD*遺伝子のプロモーターの中に*sigB*依存性を示すものがあることが分かった。このプロモーター構造及び*sigB*を相補した実験結果を報告し、葉緑体転写制御における*sigB*の役割について考察する。

S026

斑入り突然変異体を用いたオルガネラ機能制御遺伝子の解析

坂本　亘，武智克彰，蘇都莫日根[1]，田村隆行，村田 稔
（岡山大・資生研，[1]北京大学・生物学系）

植物の茎葉に斑入りを生じる遺伝的変異は劣性突然変異が多く，これらの個体では葉緑体の発達・分化が異常となりセクター状の斑入りを示す。斑入りを起こす原因遺伝子を調べることにより，斑入りが生じる機構，さらに葉緑体の分化に関わる新たな遺伝子の解析を可能にすると考えられる。我々はシロイヌナズナにおける斑入り突然変異体を用いて分子遺伝学的研究を進めており，T-DNA タギングにより得られた斑入り突然変異体 F204 からその原因遺伝子を単離して解析した。遺伝解析の結果からは，タグされた遺伝子はこれまでに報告されている *YELLOW VARIEGATED2* (*VAR2*)であり，*VAR2* は大腸菌の *ftsH* と相同性の高いタンパク質をコードしていることが明らかとなった。FtsH は ATPase モチーフを持った AAA protein family に属するメタロプロテアーゼであり，細胞の様々な機能に関与している。VAR2 は葉緑体に輸送されてチラコイド膜に局在することから，光合成に関与するタンパク質複合体の形成あるいはまた分解に関わっていると推察された。また，シロイヌナズナゲノムには葉緑体型の FtsH をコードすると考えられる遺伝子が *VAR2* 以外に少なくとも６つ存在しており，このような遺伝子の重複性と redundant な発現が斑入りと関係していることが示唆された。

S027

シロイヌナズナの斑入り突然変異体 *var1* は *FtsH* ホモログ遺伝子の欠損によって生じる

田村隆行，武智克彰，村田　稔，坂本　亘（岡山大・資生研）

シロイヌナズナの斑入り突然変異体 *yellow variegated 2*(*var2*)は *FtsH* ホモログ遺伝子の変異によって生じる。データベース検索から、シロイヌナズナのゲノム内には *VAR2* 以外に５つの *FtsH* 様遺伝子が存在していることが明らかになった。その中の１つ(*AtFtsH5*)は *VAR1* の近傍にあることから、*var2* 変異体と似た表現型を示す *var1-1*(N271)の *AtFtsH5* の塩基配列を解析したところ、第２エキソンで塩基の挿入によりフレームシフトが生じることが確認された。*var1-1* では *AtFtsH5* の発現が抑制されること及び、GFP を用いたトランジェントアッセイによって AtFtsH5 タンパク質も VAR2 同様に葉緑体へ輸送されることから、*var 1* 変異も *FtsH* ホモログ遺伝子の欠損によることが示唆された。これらの結果は、FtsH タンパク質の量的変化が斑入りに関わっていることを強く示唆しており、高等植物において一般に知られている多くの遺伝的斑入り変異が葉緑体型 *FtsH* 遺伝子の欠損による可能性を示すと考えられた。

S028

シロイヌナズナVAR2タンパク質の局在性と機能解析

武智克彰，蘇都莫日根[1]，村田　稔，坂本　亘（岡山大・資生研，[1]北京大学生物学系）

シロイヌナズナを用いたT-DNAタギングにより *YELLOW VARIEGATED2* (*VAR2*)遺伝子をクローニングした。大腸菌 *ftsH*遺伝子のホモログと考えられる *VAR2*遺伝子は、AAA protein family に属するメタロプロテアーゼをコードした遺伝子である。GFPを用いたtransient assayの結果、VAR2タンパク質は葉緑体へ移行することが示された。さらに免疫電子顕微鏡による観察，並びに分画化した葉緑体におけるWestern解析の結果から、VAR2がチラコイド膜へ局在していることが明らかとなった。*var2*変異体の成葉の斑入り組織では、光化学系を構成するタンパク質の蓄積はほとんど検出されず、さらに電子顕微鏡による観察では、機能的な葉緑体は見られなかった。また変異体では強光照射後の光障害の回復が遅れることから、VAR2は光化学系タンパク質の光障害を克服するメカニズムに関与していることが推測された。一方、*var2*変異体を用いた詳細な電子顕微鏡観察から、斑入り組織に分化する細胞の運命は、非常に早い段階で決定することが予測された。従ってVAR2が光障害とは別に直接的にチラコイド膜の発達を促進させる因子として機能していることが示唆された。

S029

子葉の老化で消失するシロイヌナズナの表皮細胞に見られるER由来の新規構造体の解析

石丸八寿子，山田健志[1]，松島良[1]，嶋田知生[1]，西澤直子[2]，西村いくこ[1]，西村幹夫
（基生研・細胞生物，[1]京大院・理・植物，[2]東大院・農）

我々は，シロイヌナズナの子葉や胚軸などの表皮細胞に特異的に存在する新規の構造体を見出した．この構造体は，大きな環状（0.5 μm x 5 μm)をしており，内部に繊維状パタン構造が見られる．ER局在化シグナルを持つGFP-HDELを発現する形質転換シロイヌナズナでは，GFPがこの構造体に蓄積することが分かった．高圧凍結および凍結弛緩法による電子顕微鏡像から，この構造体の膜にリボゾームが付着しており，ER由来であることが示唆された．この構造体は，子葉の老化に伴い，子葉の表皮細胞から消失する．また，塩ストレスにより，液胞内に運ばれる可能性が示された．さらに，光照射下から暗所に移すと，細胞内で集合体を形成することも明らかとなった．現在，細胞分画法や免疫電子顕微鏡法を駆使して，この構造体の機能を明らかにしようとしている．その結果，この構造体には液胞内で機能する酵素の前駆体が蓄積していること，それらの酵素はゴルジ体を経由せずに液胞に運搬されることが明らかとなった．そこで，この構造体の機能について考察する．

S030

新規膜タンパク質 PMP38 は植物のグリオキシソーム膜に局在している

深尾 陽一朗[1,2]、 真野 昌二[1]、 林 誠[1]、 西村 幹夫[1]
([1]基礎生物学研究所、[2]総合研究大学院大学)

脂肪性種子植物のペルオキシソームはその成長過程においてダイナミックにその機能を転換させるオルガネラである。その過程において、ペルオキシソームはマトリックス酵素を順次入れ替えていくことで、グリオキシソームから緑葉ペルオキシソームへ、また可逆的にグリオキシソームへと機能転換している。しかしながら、ペルオキシソームの膜タンパク質に関する研究は進んでおらず、機能変換時の挙動はもとより、機能の明らかな膜タンパク質もあまり知られていない。本研究はペルオキシソームの主要膜タンパク質の同定およびその機能解析を行うことを目的として以下の解析を行った。5日間暗所で生育させたカボチャ子葉より調整したペルオキシソーム膜画分のうち、分子量が約 38K のタンパク質（PMP38）に着目し、内部アミノ酸配列を決定した。ホモロジー検索の結果、酵母およびヒト、マウスで同定されているペルオキシソーム膜タンパク質 PMP47、PMP34 と最も高い相同性を示し、このタンパク質がペルオキシソームに普遍的に存在していることが予想された。これら PMP47、PMP34 はミトコンドリアに局在する ATP/ADP carrier protein のホモログとして同定されている。PMP38 に対する特異抗体を作成し、その局在性や発現パターンを解析したところ、PMP38 はペルオキシソーム膜に強く結合する膜タンパク質であることが明らかとなった。また、その発現はグリオキシソーム特異的で、緑葉ペルオキシソームにはほとんど検出されず、β酸化系酵素の挙動と酷似していた。この結果から、PMP38 は全てのペルオキシソームにおいて機能するのではなく、グリオキシソームに特異的な機能、特にβ酸化系の機能と関与していることが予想された。

S031

シロイヌナズナにおけるGFPによるペルオキシソームの可視化とペルオキシソーム形成変異体の解析

真野昌二[1]、中森ちひろ[1]、林誠[1]、加藤朗[2]、近藤真紀[1]、西村幹夫[1、3]（[1]基生研・細胞生物、[2]新潟大・理・生物、[3]総合研究大学院大・生命科学）

【目的】ペルオキシソーム酵素の多くは、C末端にPTS1あるいはN末端にPTS2輸送シグナルを持つ。今回、我々は、緑色蛍光タンパク質(GFP)とPTS1あるいはPTS2をつなげた融合タンパク質を発現している形質転換シロイヌナズナ (GFP-PTS1、GFP-PTS2) を作製し、種々の組織及び成長段階のペルオキシソームの挙動を観察した。また、高等植物のペルオキシソーム形成機構については、現在ほとんど明らかにされてはいない。そこで、GFP-PTS1をEMSで変異処理し、GFPの蛍光を指標にペルオキシソーム形成変異体の単離を試みた。

【結果】GFP-PTS1及びGFP-PTS2における蛍光パターンの違いはないものの、共に暗所下における下胚軸やフックでは、通常より大きいペルオキシソームが密集した形態をとっていること、発芽初期では、原形質流動によるペルオキシソームの移動が顕著ではないことが明らかとなった。EMS処理した約37000個体のM2植物体をスクリーニングしたところ、GFPがペルオキシソームへ輸送されずサイトソルに留まる、ペルオキシソームの形や大きさ、数、細胞内分布が変わるといった表現型を、器官・組織特異的に示す変異体が単離された。以上の結果をもとに、植物細胞内おけるペルオキシソームの存在様式について考察する。

S032

*At*Pex14pはすべてのペルオキシソームに共通したペルオキシソームタンパク質輸送因子として機能する

林 誠[1]、二藤和昌[1,2]、西村幹夫[1,2]
([1]基生研・細胞生物、[2]総研大・生命科学)

［目的］ 高等植物のペルオキシソームは、生理機能の違いによりグリオキシソームや緑葉ペルオキシソームなどに細分することができる。これらのオルガネラに含まれるタンパク質の大部分は、細胞礎質で生合成された後、PTS1またはPTS2輸送シグナルによる識別機構によりオルガネラ内へ輸送される。我々は、ペルオキシソームタンパク質の輸送機構に異常が生じたアラビドプシス*ped2*突然変異体について分子遺伝学的解析を行うことにより、ペルオキシソームへのタンパク質輸送機構の分子機作を明らかにしたいと考えている。今回は、*PED2*遺伝子の同定と遺伝子産物の作用機作について報告する。

［結果］ ファインマッピングおよび相補実験を行い、*PED2*遺伝子が５番染色体に位置するＰ１クローンの7.7 kb *Xho* ＩＤＮＡ断片に含まれていることが明らかになった。この配列をもとにcDNAを単離した結果、本遺伝子は５０７アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると推定された。本タンパク質は、（１）ペルオキシソーム膜のサイトゾル側に存在する、（２）PTS1タンパク質、PTS2タンパク質の両方の輸送を制御する、（３）アミノ酸配列の一部分にヒトPex14pと類似性が認められる、などの性質を持つ[1)]。そこで、本タンパク質を*At*Pex14pと呼ぶことにした。*At*Pex14pは高等植物ペルオキシソームに共通したペルオキシソームタンパク質輸送因子として機能しており、グリオキシソームの脂肪酸分解活性や緑葉ペルオキシソームのグリコール酸代謝などすべてのペルオキシソーム機能の維持に必須であると考えられる。

1) Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T. and Nishimura, M. (2000) *EMBO J.* 19, 5701-5710.

S033

ペルオキシソーム膜タンパク質 *At*Pex14p は PTS1-PTS2 レセプターコンプレックスとタンパク質輸送複合体を形成する

二藤和昌[1,2]、林 誠[1]、西村幹夫[1,2]
([1]基生研・細胞生物、[2]総研大・生命科学)

［目的］我々は、*ped2* 変異体の解析から、ペルオキシソーム膜タンパク質 *At*Pex14p がペルオキシソームのタンパク質輸送に関与することを明らかにした。ペルオキシソームタンパク質の大部分は PTS1 または PTS2 のどちらかの輸送シグナルを有している。これらの輸送シグナルはサイトゾル型の PTS1 レセプターまたは PTS2 レセプターに認識されることが知られている。そこで今回、ペルオキシソームタンパク質の細胞内輸送過程における *At*Pex14p と PTS1 レセプター及び PTS2 レセプターの機能分担について検討した。

［結果］*At*Pex14p と PTS1 レセプター、PTS2 レセプター間における相互作用を酵母 two-hybrid system により解析し、以下の結論を得た。(1) *At*Pex14p は N 末端側に位置する 58-65 及び 78-97 アミノ酸の二つの領域を介して PTS1 レセプターと結合する。(2) *At*Pex14p と PTS1 型タンパク質の間に結合活性は認められない。(3) PTS1 レセプターの N 末端 1-230 アミノ酸と PTS2 レセプター C 末端 266-317 アミノ酸の間で結合活性が認められる。(4) *At*Pex14p と PTS2 レセプター間に結合は認められない。以上の結果から、ペルオキシソームへのタンパク質輸送機構は次のように推測される。新規に合成されたペルオキシソームタンパク質はサイトゾルに存在する PTS1-PTS2 レセプターコンプレックスに捕捉される。その後、PTS1 レセプターがペルオキシソーム膜上の *At*Pex14p と結合することにより、ペルオキシソームタンパク質の膜透過における初期複合体を形成する。

S034

植物における可動性因子の形質転換に与える効果

福田崇、小柳美喜子、香田隆俊[1]、米谷民雄[2]、小関良宏（農工大・工・生命工、[1]三栄源FFI、[2]国立衛研・食添）

形質転換植物の作出において導入した遺伝子が核ゲノム中の「位置効果」の影響を受け、発現しないジーンサイレンシングという問題がある。

ニンジン培養細胞の phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 遺伝子のプロモーター部位から、２種類の MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements) 、IS1 及び IS2 が単離され、これら MITEs が PAL 遺伝子発現の活性化に関与していることが見い出された。そこで本実験においては、pAB35S のカナマイシン耐性遺伝子と GUS 遺伝子との間に IS1、IS2 及びこれら二つの因子のタンデム構造である IS12 を組み、タバコ植物体及び培養細胞、ニンジン植物体に導入してその効果を調べた。その結果、MITEs の挿入により選抜培地での再生率の向上がみられ、染色体上での位置効果を打ち消す事が示唆された。さらにIS12 を挿入したタバコ培養細胞について1コピーあたりの GUS 活性量がコントロールに比べ活性が高いことがわかり、IS12 は外来遺伝子の発現量を上昇させる転写因子としての機能を持ちうることも示唆された。

S035

ニンジン培養細胞におけるスプライシング因子のクローニング

木村惣一，伊藤佳央，小関良宏（農工大・工・生命工）

MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements) はゲノム中に多コピー存在する可動性の遺伝因子である。ニンジン培養細胞において phenylalanine-ammonia-lyase(PAL) 遺伝子のプロモーター領域には 2 種類の MITEs 様因子 IS1、IS2 が挿入しており、これらが PAL 遺伝子の発現に重要な役割をはたしていることを見い出した。我々は不定胚形成の途中まで分化が誘導される細胞株、およびアントシアニン合成を行なうニンジン培養細胞を用いて、多コピー存在する IS1、IS2 が他にどのような領域に挿入されているかを調べた。IS1、IS2 の配列をプライマーとした PCR から、IS1、IS2が挿入された近傍の遺伝子を単離し、これをプローブとしたニンジン cDNA ライブラリーからのスクリーニングにより *S.cerevisiae* の CUS1 と相同性をもつ遺伝子が得られた。その構造と機能について解析したので報告する。

S036

アラビノガラクタンタンパク質は管状要素分化に必要な局所的な細胞間相互作用を仲介する.

本瀬宏康[1]，杉山宗隆[2]，福田裕穂[1]（[1]東大院・理・生物科学，[2]東大院・理・植物園）

ヒャクニチソウ単離葉肉細胞はオーキシンとサイトカイニン存在下で管状要素へと分化転換する。この系において細胞間相互作用とそれを担う因子について解析したところ、25 kDa 以上のタンパク質性因子が、管状要素分化に必要な局所的な細胞間相互作用を担っていることがわかった。この因子を、その xylogenic な活性に因んで、xylogen と名付けた。

Xylogen の単離のために、その活性をモニターできるバイオアッセイ系を開発した。この系では、葉肉細胞を高い細胞密度密度と低い細胞密度で 10 μl のアガロースビーズに包埋し、この高密度ビーズと低密度ビーズを液体培地中で共培養する。高密度ビーズでは高頻度の管状要素分化が起き、低密度ビーズでは分化率が低く抑えられるが、この低密度ビーズにおける分化率の低下は xylogen の不足によると推定された。そこで、xylogen を含むと考えられる、分化を誘導した細胞懸濁培養の培地上清を、バイオアッセイ系に添加したところ、低密度ビーズでの分化率が増大し、培地上清の xylogen 活性を検出できた。この xylogen 活性はガラクトースに特異的なレクチンである RCA と PNA に結合し、β-glucosyl Yariv 試薬により沈殿した。これらの結果は xylogen がアラビノガラクタンタンパク質の一種であることを示している。

S037

ヒメツリガネゴケ HD-Zip 遺伝子 *Pphb7* の仮根形成における役割

榊原恵子[12]、長谷部光泰[12]
（総研大・生命科学[1]、基生研・種分化第二[2]）

HD-Zip 遺伝子はホメオドメインとロイシンジッパーモチーフをあわせ持つ植物特有の転写調節因子であり、維管束植物から多くの遺伝子が単離されているが、機能の不明な遺伝子も多い。ヒメツリガネゴケは相同組換えを利用した遺伝子改変が容易であり、逆遺伝学に適したモデル植物である。私たちはヒメツリガネゴケから 10 個の HD-Zip 遺伝子(*Pphb1-10*)を単離した(Sakakibara et al. 2001)。現在、遺伝子破壊株・遺伝子過剰発現株の作出、及び発現解析による各 *Pphb* 遺伝子の機能解析が進行中である。なかでも *Pphb7* の結果について詳しく報告する。ヒメツリガネゴケの仮根は、茎の表皮細胞のうち、葉の中肋の直線上にある細胞の一部から形成される。*Pphb7* は仮根形成に先立って、仮根が形成される細胞で発現を開始する。また、*Pphb7* の発現及び、仮根形成はオーキシンによって、誘導される。

S038

光周性花成誘導に関連する時計制御遺伝子*AtC401*の構造と機能

小野公代、小野道之[1]、小口太一、福井晴隆、藤原すみれ、鎌田博（筑波大・生物, [1]秋田県立大・生工研）

アサガオ(*Pharbitis nil* cv. Violet)より単離した*PnC401*とシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のホモログである*AtC401*は暗期後半に発現が増加するサーカディアン発現変動を示す時計制御遺伝子であり、光周性花成誘導への関与が予想されている。推定されるPnC401タンパク質は665アミノ酸から成る新規タンパク質であり、その機能を類推することは困難であった。一方、AtC401は296残基のkinase domainに続いてPnC401と高い相同性を示すC401 domainと名付けた領域からなる832残基のタンパク質をコードしていた。AtC401のkinase domainは、regulatory domainを持ち、種々の外環境の変化への応答に関与することが知られているSNF1/AMPK familyのタンパク質キナーゼと相同性があった。そのため、C401 domainは何らかのregulatory domainとして機能している可能性がある。大腸菌で発現したAtC401タンパク質の活性を測定した結果、MBPを人工基質として用いた場合に高いリン酸化活性を示し、kinaseとして機能することが示された。これらの結果より、光周性花成誘導において、AtC401がリン酸化により情報伝達に関与する可能性が示唆された。

S039

光周性花成誘導に関連する時計制御遺伝子(*C401*、*GLP*)のmRNA及びタンパク質の局在解析

福井晴隆、小野公代、小口太一、小野道之[1]、鎌田博（筑波大・生物、[1]秋田県立大・生工研）

短日植物であるアサガオから単離された *PnGLP* と *PnC401* は暗期に特異的に増加するサーカディアン発現変動を示すことから、光周性花成誘導に関連することが予想されているが、その機能については明らかにされていない。今回、これらの遺伝子とそのシロイヌナズナにおけるホモログ（*AtGLP*、*AtC401*）について、シロイヌナズナの形質転換体を用いた発現解析を行った。*C401* 遺伝子のプロモーター領域と *GUS* 遺伝子を連結したコンストラクトを導入した形質転換体を用いた実験から、*AtC401* が緑色器官で発現し、特に葉の葉肉細胞において強く発現していることが確認された。また、PnGLP および AtC401 と GFP の融合タンパクを産生する形質転換体において、PnGLP タンパクが細胞外局在、AtC401 タンパクが核局在を示すことが示唆された。

F101

樹木のリグニン生合成遺伝子プロモーターの機能解析

小柳美喜子、小関良宏（農工大・工・生命）

フェニルプロパノイド合成系は、環境ストレスに対抗するための物質を合成する代謝系であるとともに、木部分化にともなうリグニン合成などに関与する代謝系である。ポプラに存在する木部分化時特異的に発現する PAL 遺伝子の一つ、*g2bPAL* プロモーターには M-box、G-box、P-box、および L-box が存在することが見い出された。そこでこれらを１つずつ欠失させた変異プロモーターを作成しニンジンプロトプラストにおける transient な発現を調べたところ、G-box を欠失させた場合にプロモーターの転写活性が低下することがわかった。次に、各変異プロモーターをタバコ植物体に導入し、形質転換植物体の stable な発現を調べた結果、L-box を欠失させた場合に活性が上昇することがわかった。更に、この box を欠失させた変異プロモーターを導入したタバコ植物体においては発現の部位特異性が失われることが見い出された。

F102

スギ のB遺伝子の組織特異的発現

福井充枝、横山敏孝、Edward C. Yeung[1]、笹本浜子（農水省・森林総研、[1]Dept.Biol.Sci., Univ.Calgary）

我々は、裸子植物の生殖器官の形態形成機構を解明するために、スギから2種類のMADS遺伝子（*CjMADS1*、*CjMADS2*）を単離し、解析を進めている。これまでに、両遺伝子は、他の裸子植物由来のB遺伝子群とともに*AP3/PI*グループを構成すること、被子植物のB遺伝子に特徴的なモチーフ構造を持つこと、雄花で特異的に発現すること、特に、花粉母細胞の分裂期の雄花ではタペータムで発現することなどを明らかにしてきた。今回は、さらに詳細な*in situ* Hybridization解析を試み、雄花の各発達段階において、これらB遺伝子がどの組織で発現するかを調べた。その結果、*CjMADS2*は、雄花の分化初期に、胞子形成細胞で発現することがわかった。さらに、発達中の小胞子葉では、タペータムおよび花粉母細胞で発現した。雄花の軸では、休眠に至るまで、恒常的に発現が認められた。休眠後、花粉飛散以前の時期には、軸部分で発現が検出されたが、成熟花粉では発現は見られなかった。*CjMADS1*については、現在、解析を行っているところである。

F103

向軸側の花弁発生に異常を示す *rabbit ears* 突然変異体の解析

武田征士、松本任孝、岡田清孝 (京都大院・理・植物)

シロイヌナズナの花では、決まった数の花器官が花芽の中で決まった位置に発生する。しかし位置依存的な器官発生の制御機構については、これまであまり明らかにされていない。

rabbit ears (rbe) 突然変異体は花弁発生に異常を示す突然変異体である。表現型の解析の結果、向軸側の花弁の多くが形態異常を示し、背軸側の花弁は正常なものが多いことがわかった。このことから、花弁発生の制御は向軸側と背軸側で異なることが示唆される。また、他の花器官の数及び発生位置は正常であったことから、*RBE* 遺伝子は花茎軸に依存した花弁発生に関与することが示唆される。

花芽形成・花器官形成に異常のある *apetala1 (ap1)* 突然変異体との二重突然変異体を作製したところ、向軸側・背軸側両方の花弁に形態的な異常が見られた。*AP1* 遺伝子はステージ1 で一時的に向軸側に発現することから、*RBE* 遺伝子は *AP1* 遺伝子の制御を受けていることが示唆される。

今回は *in situ* ハイブリダイゼーションによる *AP1* 遺伝子と *RBE* 遺伝子の発現解析、またその他の花器官形成に異常のある突然変異体との二重突然変異体の解析及び *RBE* 遺伝子のクローニングの結果を合わせて報告する。

F104

シロイヌナズナ花序形態形成に関与する*CRM2*遺伝子の単離と解析

鈴木　光宏、高橋　卓、米田　好文(北海道大・理・生物科学)

シロイヌナズナは栄養成長期から生殖成長期に移行すると、花芽の分化と並行して花茎を伸長させる。*corymbosa2*(*crm2*)変異体は花芽の発達の遅れと花茎伸長開始の遅れが原因で、一時的に花序先端の花芽が増加、密集し散房花序様の形態を示す。

この原因遺伝子の単離をポジショナルクローニングによって試みた。その結果、*CRM2*遺伝子は942残基のアミノ酸をコードし、既知遺伝子とは相同性をもたない新規の遺伝子であった。RT-PCRの解析により、*CRM2*遺伝子は花序先端と根で発現していることがわかった。また、*CRM2*遺伝子を含む約6kbpのゲノム断片を植物に導入し相補性検定を行ったところ、*crm2*の変異形質が相補された。さらに、*CRM2*遺伝子のアンチセンス植物を作成したところ、*crm2*変異の表現型を示した。本発表ではこれらの解析結果を中心に報告する。

F105

シロイヌナズナの花弁とガクの発達に異常を示す *frl1* 変異体の解析

長谷純宏，田中　淳（原研高碕・植物資源）

frill1(*frl1*)は，花弁とガクに特異的に，それらの周縁がフリル状になる表現型を示す突然変異体である．これまでの調査から，*frl1* 変異体の花弁先端部では，野生型に比べて細胞の数が少ないこと，細胞の大きさがランダムであること，また，細胞が平均的に大きく肥大することがわかっている．さらに，肥大した細胞では巨大な核が観察され，野生型では起こらない核内倍加が起きていることが示唆された．発達初期の花弁を観察したところ，花の発達ステージ１０以降において，これらの異常が現れることがわかった．以上のことから，*FRL1* 遺伝子は花弁の発達後期において，正常な細胞の分裂と肥大に必要であり，また，核内倍加サイクルへの移行を抑えているのではと考えられる．

ファインマッピングの結果から，*FRL1* 遺伝子は，第１染色体上の BAC F14O10 と F5M15 にまたがる約１００kb の領域に存在することがわかった．この領域には２９の推定遺伝子が存在し，現在 *FRL1* 遺伝子の特定を進めている．

F106

シロイヌナズナ雌ずい形成に関与する *SHORT VALVE* 遺伝子はリボソーム蛋白質 L24 ホモログをコードする

西村泰介、岡田清孝　（京大院・理・植物）

雌ずいの形成機構を解明することを目的に、シロイヌナズナの突然変異体を用いた研究を行っている。シロイヌナズナの雌ずいは、頂端部より基部にかけて柱頭、花柱、子房、子房柄の４つの構造から構成される。我々が単離した *short valve* 突然変異体 (*stv*) は、このうち子房を構成する部分が短くなり、その欠損部分が子房柄に置き換わっている。類似の表現型を示す *pid*、*ett*、*fil* 突然変異体との二重突然変異体を作製したところ、花茎は伸びるものの花芽の形成がおこなえず、*pin1* 突然変異体様の茎頂が形成された。この結果より、*STV* 遺伝子は雌ずい形成だけでなく、花芽の形成にも重要な役割を果たすことが考えられた。T-DNA タギングと遺伝子の導入による相補性の検定により *STV* 遺伝子を同定したところ、リボソーム蛋白質 L24 のホモログをコードすることがわかった。

現在、*STV* 遺伝子の発現解析や強制発現体の作製等を進めている。

F107

シロイヌナズナの花原基および花器官の横側領域で発現している *PRS* 遺伝子の機能解析

松本任孝，岡田清孝（京都大院・理・植物）

FIL 遺伝子は花原基の背軸側で発現している。一方、*API* 遺伝子は一時的ではあるが花原基の向軸側で発現している。花器官の配置は花原基における向背軸側、横側といった方向に依存して決定されていると考えられる。しかし、どのように向背軸側、横側という方向が決定されるのか、その機構はこれまで明らかになっていない。

pressed flower(*prs*) 突然変異体では横側のがく片の発生、および向背軸側のがく片の周縁部の発生が正常におこらない。原因遺伝子である *PRS* 遺伝子はホメオドメインを持つタンパク質をコードしており転写因子と考えられる。また、*PRS* 遺伝子は花原基および花器官の横側領域で発現していることがわかった。これらのことから *PRS* 遺伝子は花原基および花器官の横側領域の細胞の分化、もしくは分裂に関わっていると考えられる。

今回は *prs* 突然変異体と *ap1*、*fil* 各突然変異体の二重突然変異体の解析、およびそれぞれの遺伝子の発現解析の結果を報告する。また、*PRS* 遺伝子の過剰発現体を作製しその解析結果もあわせて報告する。

F108

ねじれ変異遺伝子 *SPIRAL2* のクローニング

林和典、成田典之、Rafael PRIETO、増川正敏、土原和子、鹿内利治、橋本隆(奈良先端大・バイオ)

ねじれ変異株 *spiral2*(*spr2*)は 、アラビドプシスの根、はい軸、葉柄、花弁が時計回りにねじれることに着目して単離された劣性の変異株である。低濃度の微小管安定剤タキソールや微小管重合阻害剤プロピザマイドを加えた培地で生育させた場合、これらの表皮細胞層のねじれの向きは反転した。植物細胞の表層微小管と細胞の伸長方向には密接な関係があることが知られていることから、*SPR2* 遺伝子は表層微小管の配向の決定に関与し、細胞伸長の方向制御に機能していると推測される。我々はマッピングによって *SPR2* 遺伝子をクローニングし、これが新規のタンパク質をコードすることを明らかにした。

F109

The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *A. thaliana* regulates the establishment of midvein as the longitudinal axis of leaf symmetry

OEndang Semiarti1, 2, Hidekazu Iwakawa1, Yoshihisa Ueno1, Hirokazu Tsukaya3, Chiyoko Machida1, and Yasunori Machida1 (1 Div. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., 2 Gadjah Mada Univ., Indonesia, 3 NIBB,PRESTO, JST.)

The *asymmetric leaves2 (as2)* mutant exhibited bilateral asymmetrical lobed-leaf, and leaflet-like structures at the petioles of leaves. A distinct midvein as the thickest vein and is located in the longitudinal center of the leaf blade in the wild-type plants was often rudimentary even in mature *as2* leaves. The complexities of venation patterns in leaf-like organs of *as2* plants were reduced. The malformed veins were maintained in the mature *as2* leaves. The mutation in *ASYMMETRIC LEAVES1* also results in the such malformed veins. We isolated the *AS2* gene and showed that *AS2* encodes a novel protein that contains a cystein rich region and a leucine zipper structure. The *AS1* gene has been reported to be isolated by Byrne et al. (2000), it encodes a MYB-like PHANTASTICA homolog. The double mutant of *as1as2* showed *as2* phenotype, indicating that *as2* was epistatic to *as1*. These results suggest that in the same pathway *AS2* and *AS1* might be involved in the establishment of midvein as a longitudinal axis of leaf that crucial for the formation of symmetric leaves.

F110

ペチュニアにおける *CURLY LEAF* 相同遺伝子の単離と解析

間山　智子、土本　卓、大坪　栄一　（東京大・分生研）

花の形態形成機構として、A, B, C 三種類の遺伝子の組み合わせによるモデルが提唱されている。これら三種類の遺伝子のうちAタイプの機能を持つ遺伝子として、シロイヌナズナでは *APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*), *CURLY LEAF* (*CLF*)などが報告されている。しかし、他の植物ではそのような機能を持つ遺伝子は単離されていない。ペチュニアでは萼片から雌蕊へ、花弁から雄蕊へホメオティックな花の表現型を示すAタイプの突然変異体、*blind* (*bl*)が存在する。しかし、ペチュニアの *API*, *AP2* 相同遺伝子は双方ともAタイプ遺伝子の機能は示さないことが報告されているため、*BLIND* (*BL*) 遺伝子はそれら以外であると考えられる。そこでペチュニアのAタイプ遺伝子である *BL* の単離を目的として、*bl* と似た花の表現型を示すシロイヌナズナの *CLF* のペチュニアにおける相同遺伝子を degenerate primer を用いたRT-PCR により単離し、三つの遺伝子のクローンを得た。そのうち二つ (*PhCLF1* と *2*) は *CLF* と相同性が高く、もう一つ (*PhCLF3*) はシロイヌナズナの *CLF* 相同遺伝子 *CLK* (*CLF-like*) と相同性が高かった。*CLF* と *PhCLF1* と *2* の間で特に保存されている領域の配列を用いて相同性検索を行ったところ、双子葉植物ではダイズ、トマト、ジャガイモ、及びワタ、単子葉植物ではイネ、オオムギ、コムギと植物界に広く相同遺伝子が存在することが明らかとなった。また *PhCLF1, 2* の花の各器官における発現を RT-PCR を用いて調べたところ、両遺伝子とも全ての器官で発現していたが、雌蕊での発現は非常に弱かった。従って、*PhCLF1, 2* は雌蕊以外の花の各器官で作用していることが示唆される。更に、*PhCLF1* には alternative splicing が起こるが、*PhCLF2* では起こらないことが明らかとなった。このことから、*PhCLF1* は *PhCLF2* とは異なり、転写後調節を受けている可能性が考えられる。

F111

シロイヌナズナの葉の形成における *WUS* (*JAM*) 遺伝子の機能

○浜田　進[1]、工藤　光子[1]、尾之内　均[1]、劉　耀光、柴田　大輔[2]、町田　千代子[1]、町田　泰則[1]
（[1]名大院・理・生命理学、[2]かずさ DNA 研究所）

シロイヌナズナの葉の性質は成長段階によってさまざまに変化する。ロゼット葉の形態を調べてみると、最初に形成される 3-4 枚の幼若葉は葉身が丸く、葉の裏側にトリコームを形成しない。その後に形成される成熟葉は葉身が細長く、葉の表裏両側にトリコームを形成する。我々が単離した *jam* 変異体は野生型に比べて本葉形成の開始が遅れ、幼若葉の性質を持つ葉が形成されないという表現型を示す。解析の結果、この変異体の原因遺伝子 *WUS* (*JAM*) は、幼若葉の性質の制御か、または、将来幼若葉となる葉原器の形成に関わっていることが示唆された。今回、*jam* 変異体と、幼若葉、成熟葉の分化に関わる他の変異体との遺伝学的な相互作用について考察する。

F112

リンゴ AFL1, AFL2 キメラ遺伝子の機能解析

和田雅人、曹秋芬[1]、増田哲男（農水省・果樹試・リンゴ支場、[1]岩手大・農）

前回の生理学会（名古屋）で発表したリンゴの LEAFY ホモログである AFL1 と AFL2 は互いに９０％の相同性を示すが、これらをそれぞれアラビドプシスに導入し 35S プロモーター下で強制的に発現させると、早期開花性と単生花のロゼット軸からの発生が引き起こされた。しかし、高い相同性に関わらず、AFL1 より AFL2 の方がより早期開花性を示しかつ発生する単生花の数も増加していた。これらの特徴はそれぞれの独立した形質転換体の複数の系統で確認され、２つの遺伝子の働きの違いを反映しているものと考えられた。これまでに報告されている植物の LEAFY ホモログの比較により、N 端側のプロリンが多い領域、中央部のアスパラギン酸、グルタミン酸など負のアミノ酸の多い領域、C 端後半部の植物間で高い相同性を示す領域が分かっている。そこで、AFL1 と AFL2 による形質転換体の違いを解明するためにこの C 端後半部を入れ替えた AFL1 と AFL2 のキメラ遺伝子を作成した。分子の前半が AFL1、後半が AFL2 のキメラを AFL12, その逆のキメラを AFL21 と名付け、それぞれをアラビドプシスに形質転換し、得られた転換体の早期開花性および単生花の発生を解析したので報告する。

F113

Ng*rolC* 遺伝子の生理学的および系統学的手法による解析

青木誠志郎、[1]庄野邦彦、伊藤元己（東大院・総合文化、[1]日本女子・理）

Ng*rol* 遺伝子群（Ng*rolB*, Ng*rolC*, NgORF13, NgORF14）は土壌細菌*Agrobacterium rhizogenes* のRiプラスミドのRi*rol* 遺伝子群に相同な遺伝子群として人工的に未感染のタバコ属植物*Nicotiana glauca*のゲノムに発見された。今まで、１回だけの菌からの感染がタバコ属がナス科から分かれ初期の段階でおこりNg*rol* 遺伝子群の水平移行を引き起こしたと考えられてきた。我々はこれまでにNg*rolB*、NgORF13そしてNgORF14の機能について報告してきた。更なる機能的・進化的な解析をこれら遺伝子群について行っている。今回の報告ではNg*rolC* について報告する。

Ng*rolC* はカリフラワーモザイクウィルス35Sプロモーター支配下で*N. tabacum* にて強制発現された。10個体以上のT0再生植物でわい化したがこれは節間が短縮したためと考えられる。葉は形が細くなり色が薄くなった。導入遺伝子の転写は形態変化を顕した植物にのみ検出された。我々はNg*rolC* の機能しうるDNA配列が祖先での菌からの移行時から保存され続けたであろうことを提案する。

またこの遺伝子への系統学的解析からは菌からの水平移行がタバコ属のいくつかの種に複数回、独立に起こったことであろうことが示された。

F114

シロイヌナズナの根の表皮細胞分化を制御する*CPC* 遺伝子のプロモーター解析

越野泰裕、橘達彦、和田拓治[1]、槻木竜二、岡田清孝（京都大院・理：植物，[1]理研・植科セ）

シロイヌナズナの根の表皮細胞は、根毛を形成する細胞（根毛細胞）と形成しない細胞（非根毛細胞）に分化する。これまでの分子遺伝学的な解析から、*CAPRICE*（*CPC* ）遺伝子は表皮細胞を根毛細胞に分化させる正の制御因子であることがわかっている。しかしながら*CPC* 遺伝子は非根毛細胞で特異的に強く転写されている。またCPCタンパク質は表皮細胞の全ての細胞列に存在することが、CPCとGFPの融合タンパク質を用いた解析から示唆されている。現在までのところ、*CPC* 遺伝子が非根毛細胞で強く転写されタンパク質として全ての細胞列に局在する機構とその理由は明らかになっていない。

今回、*CPC* 遺伝子が非根毛細胞特異的に転写される機構を解析するため、*CPC* プロモーターのシス解析を行った。欠損型*CPC* プロモーターに*GUS* 遺伝子を繋いで植物に導入し、プロモーター活性を調べた。その結果、非根毛細胞特異的な転写には転写開始点から約300bp上流の約50bpの領域が必要であることが明らかとなった。その領域には転写因子であるMybタンパク質が認識、結合すると予想される配列が含まれていた。CPCタンパク質は1つのMybドメインを持つが、根毛形成を負に制御するWEREWOLFタンパク質も2つのMybドメインを持つことが知られている。これらのタンパク質の*CPC* 遺伝子の発現への関わりについて論じたい。

F115

細胞種特異的マーカーラインを利用した糖濃度依存的側根形成不全突然変異株 *rfc3* の形態観察

堀口吾朗、射場　厚　（九州大・院・理・生物科学）

シロイヌナズナ *rfc3* 突然変異株は 3% ショ糖を含む培地ではドーム状の異常な側根原基を形成するが、0.5% ショ糖存在下では正常な側根を形成する。この側根形成異常について細胞分化および形態形成の観点から詳細な観察を行うため、細胞種特異的に GFP あるいは GUS 遺伝子を発現するマーカー系統との掛け合わせを行った。現在までに側根形成過程で野生株と *rfc3* 変異株で異なるマーカー遺伝子の発現パターンを示す系統（J1841)が１つ得られた。この系統では側根原基の形成過程を通じその基部側に GFP の蓄積が認められる。一方、*rfc3* mutant の異常な側根原基では時間の経過と共に GFP の蓄積が側根原基の基部から最表層全体に広がるパターンを示した。今後、多数の系統について観察を行う予定でありその結果について考察する。また、*rfc3-1* および *rfc3-2* 突然変異株において共通して突然変異が生じた遺伝子を同定し野生株よりその cDNA を単離した。この遺伝子が *RFC3* 遺伝子であるのか相補性検定を行っており、その結果についても併せて報告する。

F116

根端分裂組織の維持に異常を示す *halted root* 突然変異体の解析

植田美那子[1]，松井啓祐[1]，和田拓治[2]，石黒澄衛[1]，岡田清孝[1,2]
([1]京都大院・理・植物，[2]理研・植物科学研究センター)

根の構造は根端分裂組織(RAM)における細胞分裂および細胞伸長の繰り返しによって維持されている。しかしその重要性にも関わらず、この維持機構について詳細は知られていない。

私達はシロイヌナズナを用いて、発芽後の根端に異常を示す *halted root* (*hlr*) 突然変異体を単離した。表現型を解析したところ、*hlr* 突然変異体では発芽後２日目から RAM で異常な分裂がおこり、根端が肥大化することが分かった。このため *hlr* 突然変異体は RAM の維持機構に欠陥を持つと考えられた。

HLR 遺伝子を同定したところ、HLR 蛋白質は酵母で同定されたプロテアソームのサブユニット 4 のホモログであった。プロテアソームとはポリユビキチン化を受けた蛋白質を分解する巨大な複合体であることが知られている。

以上の結果から HLR 蛋白質を含むプロテアソームが蛋白質分解経路を介し RAM の維持に働くという可能性が示唆された。

F117

フィトクロム B を部位特異的に発現するシロイヌナズナの作出と解析

中村賢志、望月伸悦、長谷あきら（京大・理・植物）

我々は赤/近赤外光の主要な光受容体であるフィトクロム B（phyB）を部位特異的に発現するシロイヌナズナの形質転換植物の作出を試みた。phyB を部位特異的に発現させるためにはエンハンサートラップの原理を用いた。すなわち、最小プロモーターに PHYB-GFP 融合遺伝子をつなげたベクターを *phyB* 欠損変異体に導入することで、挿入部位近傍の部位特異的なエンハンサーの効果で phyB-GFP が部位特異的に発現することを期待した方法である。

このようにして作出したラインを解析したところ、互いに異なる部位で phyB-GFP を発現するラインが複数見いだされた。特に胚軸伸長の制御について注目して解析した結果、維管束周辺および子葉表皮に局在する phyB が胚軸伸長の制御に重要であり、それぞれが異なる機構により胚軸伸長を制御していることが示唆された。現在、他の phyB 応答反応についても同様の解析を進めている。

F118

フィトクロム発色団の生合成：シロイヌナズナ HY2 遺伝子はフェレドキシン依存ビリベルジン還元酵素（フィトクロモビリンシンターゼ）をコードする

河内孝之,[a] 向川佳子,[a] Nicole FRANKENBERG,[b] 鶴居義之,[a] 増田宗久,[a] 横田明穂,[a] J. Clark LAGARIAS[b]（[a] 奈良先端大・バイオ、[b] University of California, Davis）

植物光受容体フィトクロムは多重位遺伝子族にコードされるアポタンパク質と共有結合しているテトラピロール発色団、フィトクロモビリン(PΦB)から構成される。シロイヌナズナ変異体 *hy1* and *hy2* は PΦB 生合成に欠損をもち、正常なフィトクロムが合成できず、様々な光形態形成異常を示す。 我々は染色体上の遺伝子座の位置と相補性テストに基づいて *HY2* 遺伝子を単離した。 *HY2* 遺伝子は 38kD の N 末端にプラスチドへの推定移行配列をもつ可溶性タンパク質をコードしていた。HY2 と GFP レポーターとの融合タンパク質はプラスチドに局在しプラスチドへ移行配列が機能的であることがわかった。精製した組換え HY2 タンパク質はフェレドキシン依存性 PΦB 合成酵素活性を示し、ビリベルジンから機能的な発色団を生成する還元反応を触媒した。配列のデータベース検索により藻類などに関連遺伝子を見いだし、これらがビリン化合物の生合成に関与することを明らかにした。

F119

キュウリ根導管液タンパク質XSP30の地上部器官依存的産生とレクチン活性

小田 篤[1]、作田 千代子[1]、増田 進[2]、佐藤 忍[1]（[1]筑波大・生物、[2]野田産業科学研究所）

高等植物の植物体全体の発生と機能は、導管と師管からなる維管束組織によってつながった地下部と地上部の諸器官が相互作用することによって維持されている。これまで導管中を流れる導管液中には水と無機栄養素、ホルモン類などが存在していると考えられてきたが、近年の我々の研究により、導管液中には多糖類やタンパク質などの高分子物質が存在することが明らかになった。そこで我々はキュウリ根導管液中に存在するレクチン様タンパク質(XSP30)に着目し、キュウリ根における遺伝子発現の解析とレクチン活性の検討を行った。

*XSP30*の発現は播種後４日目の根では見られないものの、６日目以降次第に上昇した。また、地上部を切除すると発現が一過的に上昇した後急激に低下し、切除後１日後には発現が見られなくなった。さらに、植物体の地上部に光周期（16時間明期/8時間暗期）を処理すると、*XSP30*の発現は暗期に増加し、明期に減少するリズム振動を示した。この発現のリズム振動は連続明期、連続暗期に移した後も少なくとも２周期にわたって維持された。また、導管液中のXSP30タンパク質の量も暗期に増加した。一方、XSP30タンパク質はキュウリ植物体地上部に存在する糖タンパク質とオブアルブミンの糖鎖に結合することが明らかになった。現在、認識糖鎖の特定を行っている。これらのことから、キュウリの根は地上部器官依存的にレクチン様タンパク質XSP30を産生し、導管を介して地上部器官に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

F120

アオミドロの仮根分化における微小管の役割

吉田勝久、井上尚子、新免輝男（姫路工大・理・生命）

アオミドロは糸状の藻体を持ち、その末端において、仮根と呼ばれる放射状や棒状の付着器を形成する。末端に位置する細胞ではまず分散生長から先端生長への転換が起こり、やがて複雑な仮根が形成される。また、仮根では蛍光レクチンで標識される粘着物質が分泌される。植物細胞の形態は細胞壁のセルロースミクロフィブリルの配向によって決まり、また、セルロースミクロフィブリルの配向は表層微小管によって決まることが明らかとなってきた。本研究においては、アオミドロの仮根分化における微小管の役割について検討した。

仮根部位の微小管の配列は藻体の部位の配列と大きく異なり、非常に複雑であることが解った。まず、オリザリン処理によってアオミドロの微小管が破壊されることを確認した。オリザリン存在下で形成された仮根は正常のものと異なり、丸い形をしていた。タキソール処理では仮根の形状、微小管の配列に異常は見られなかった。この様に仮根の形成そのものには微小管は不要であるが、正常な形態形成には必要であることが分かった。また、オリザリン存在下、タキソール存在下においても粘着物質は分泌されることが分かった。

F121

車軸藻ミオシンのカルシウム感受性

栗田 淳也、樫山 拓、山本 啓一（千葉大 理 生物）

車軸藻の原形質流動は、カルシウムイオンによって阻害される。山本らによって精製された車軸藻ミオシンのactin activated MgATPase活性、*in vitro* でのモーター活性はカルシウムイオンによって直接阻害されなかった。樫山らによって明らかにされた車軸藻ミオシンの一次構造にはIQmotifが含まれていた。また、当研究室で部分精製された車軸藻ミオシン画分には、カルモジュリンが含まれていた。車軸藻ミオシンは軽鎖にカルモジュリンを含み、本来カルシウムイオン濃度上昇時にミオシンのモーター活性を阻害するものが、精製過程でカルモジュリンが外れてしまい、カルシウム感受性が失われた可能性がある。軽鎖のカルモジュリンがミオシンから外れるのを防ぐために、車軸藻粗抽出液で *in vitro* motility assay を行った。流動速度に近い速度の actin 滑り運動を観察することができたが、カルシウムイオンによって大きく阻害されなかった。さらに、assay 操作中にカルモジュリンが解離する可能性を極力抑えるために、大腸菌内で発現させた車軸藻カルモジュリンをカルシウムイオンと共に過剰に加えたが、流動停止に結びつくような運動の阻害は観察できなかった。現在、*in vitro* motility assay 系を改良し、解析を進めている。

F122

サイトカラシンがフシナシミドロの青色光依存細胞形態形成に必須である核の集合を阻害する.

片岡博尚, 高橋文雄[1], 菱沼祐[2]（東北大・遺生研, [1]理研・フォトダイナミクス研, [2]山形大・理・生物）

多核細胞フシナシミドロ（*Vaucheria*）の細胞の一部に青色光（BL）を照射すると照射域に枝が誘導される. この反応には, 照射直後に始まり約 60 分で完了する照射域への葉緑体の集合では十分ではなく, 30 - 40 分後から始まる核の集合が必要である. 集合した核はそこで必要な蛋白を作り, 照射域中央に枝原基を誘導する. 核分裂でなく, 核を寄せ集めることで核の空間密度を増やしているのである. 核集合が必須であることは Amiprophos methyl (APM)や Cytochalasin A (CA)で核集合を阻害すると枝発生が完全に阻害されることから明らかとなった. 核の移動は centrosome から前方に伸びた長い（50-60μm の）微小管（MT）束に引っ張られて起こる. 両薬剤の効果はMT束を破壊することによる. CA が MT 束を壊すことは, MT 束の維持にアクチンが関与することを示唆する. しかし, CA がなぜアクチン細網化によるとされる葉緑体集合を阻害しないのかは不明である.

F123

植物ビリン様アクチン繊維束化タンパク質の細胞内アクチン構築における役割

横田悦雄、富永基樹、森實陽介、新免輝男（姫路工大・理・生命）

テッポウユリ花粉管から、生化学的に単離したビリン様アクチン繊維束化タンパク質の抗体を用いて、細胞内での機能を解析した。このタンパク質は様々な植物種に存在しており、ユリ花粉管、トチカガミ根毛、シャジクモ節間細胞内では、アクチン繊維束と共存していた。そして根毛に抗体をマイクロインジェクションした結果、アクチン繊維束がこまかな束にほどけるとともにトランスバキュオーラーストランドが消失した。in vitro でビリン様タンパク質によって形成されたアクチン繊維束と同様に、根毛アクチン束内の繊維の方向性はそろっていた。以上の結果から、ビリン様タンパク質は植物一般に存在する、アクチン束化因子の一つであることが示された。

F124

ワタ繊維の成長に伴う細胞壁マトリックス多糖類の構造と分解活性の変化

徳本勇人、若林和幸、保尊隆享、神阪盛一郎[1]（大阪市大院・理・生物、[1]富山大・理・生物）

ワタ繊維の成長は、伸長成長期と肥厚期の２つの時期から成る。繊維細胞壁のマトリックス（ペクチン、ヘミセルロース）多糖類は、伸長成長期では全細胞壁量の３０～５０％を占めるが、肥厚期では３％以下となっていた。マトリックス多糖類はβ－（１，３）－グルカン、キシログルカン、アラビノガラクタン、ガラクツロナンから構成されており、これらの多糖類量は伸長成長期に増加し、その後の肥厚期には減少した。β－グルカン、アラビノガラクタン、キシログルカンの分子量は伸長成長期に減少したが、ガラクツロナンの分子量は逆に増加した。繊維の細胞壁から抽出した細胞壁分解酵素の活性を、ラミナリン、アラビノガラクタン、キシログルカン、カルボキシメチルセルロース、ポリガラクツロン酸を基質に用いて測定したところ、ラミナリン、キシログルカン、アラビノガラクタンの高い分解活性が繊維の伸長成長期において見られたが、これらの活性は伸長停止後、急速に低下した。以上の結果から、繊維の伸長成長期には、マトリックス多糖類の活発な代謝回転が起こっており、高い細胞壁分解酵素活性が、この代謝回転に関与していると考えられる。

F125

ｱﾗﾋﾞﾄﾌﾟｼｽ膜結合 endo-1,4-β-glucanase はセルロース合成に関与する

佐藤茂、加藤友彦[1]、掛川弘一[2]、石井忠[2]、劉耀光[3]、粟野達也[4]、高部圭司[4]、西山義春[5]、空閑重則[5]、佐藤修正[1]、中村保一[1]、田畑哲之[1]、柴田大輔[1]（王子製紙・森林資源研、1かずさDNA研、2森林総研、3華南農業大学、4京大大学院・森林科学、5東大大学院・農学生命科学）

非許容温度(31℃)下で細胞伸長が阻害される温度感受性変異体 *acw1* は、膜結合 endo-1,4-β-glucanase の変異であり、セルロース量が減っていることを既に報告した(1999 年度年会)。今回、*acw1* 変異の細胞伸長とセルロース合成への影響を詳細に解析したので報告する。

変異の細胞壁構造へ及ぼす影響を調べるため、変異体のセルロース繊維をFE-SEMで解析した。野生株と許容温度(21℃)下で生育させた変異体では、繊維は通直であったが、31℃で生育させた変異体では、繊維が歪む異常が観察された。変異の細胞壁合成初期段階への影響を調べるため、ﾌﾟﾛﾄﾌﾟﾗｽﾄからのセルロース合成実験を行った。その結果、変異体では合成が遅れることが観察された。これらの結果から、ｱﾗﾋﾞﾄﾌﾟｼｽ膜結合 endo-1,4-β-glucanase が、セルロース合成に関与することが強く示唆された。

F126

ユーカリ EST データベースを用いた木部形成機構の解明

佐藤茂、堀切敬子、石毛奈緒子、冨田啓治、越山淳子、土肥敬悟、山口善紀、近藤啓子、浅田隆之、河津哲、日尾野隆

（王子製紙・森林資源研）

ユーカリ属は500以上の種から構成され、属内の遺伝的多様性に富む。このことを反映して産業的にも、木材加工、薪炭材、パルプ原料材等と多岐に渡る利用が認められる。我々は、遺伝子工学的手法によるユーカリの改良を行っており、既にユーカリ形質転換体作出技術を確立している。加えて、有効な遺伝子を獲得すべく、ユーカリ組織毎のESTデータベース構築を開始した。今後は、実用化はもとより、有用バイオマスとしての実績の高いユーカリを木本性植物のモデル系として活用し、樹木に特異的である肥大成長や2次代謝産物生合成機構の解明を行う予定である。本報告では得られたユーカリ木部由来ESTsデータの相同性検索結果を中心に紹介する。

F127

細胞壁の臨界降伏張力（*y*）を調節するタンパク質 yieldin の器官・組織内局在性

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

Yieldin はミトリササゲ細胞壁から新規に単離精製された細胞壁の臨界降伏張力（*y*）を調節するタンパク質である[1,2]。その遺伝子を大腸菌に組み込んで作製した recombinant yieldin に対して作製したウサギ抗血清より精製した抗 yieldin 抗体を用い、免疫組織化学的に yieldin の器官・組織内局在性を検討した。その結果、yieldin はササゲ幼茎の子葉節から 1-15mm の伸長成長域を含む部域に分布し、皮層細胞の細胞壁に局在することが明らかになったので報告する。

[1]Okamoto-Nakazato, A., Nakamura, T. & Okamoto, H. (2000) *Plant Cell & Environ.*,**23**：145-154.

[2]Okamoto-Nakazato, A., Takahashi, K., Kido, N., Owaribe, K. & Katou, K. (2000) *ibid.*, **23**：155-164.

F128

イネの穂や根で発現する1,3-β-グルカナーゼ遺伝子：cDNAクローニングおよび大腸菌発現酵素の性質

秋山 亶[1]、渋谷直人[2]（[1]農水省・北海道農試、[2]農水省・生物研）

1,3-β-グルカナーゼ遺伝子ファミリーに属する新規遺伝子を探索する目的で、オオムギの1,3-β-グルカナーゼGII遺伝子をプローブに用いて、イネ幼植物cDNAライブラリーをスクリーニングした。部分シーケンス解析の結果から、単離された３２クローンのうち２クローン、OsGLN1およびOsGLN3が、遺伝子の全長を含むことがわかった。OsGLN1およびOsGLN3は、GenBankのデータベースとの比較において、すでに登録されているgsn4 (GenBank accession no.U72250) およびglu3 (GenBank accession no.AF030167)と９０％以上の相同性を示した。ノーザンブロット法によりOsGLN1は出穂前の穂で、OsGLN3は成熟した根で強く発現することがわかった。OsGLN1およびOsGLN3がコードするタンパク質の酵素活性の有無を調べるため、GST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）融合タンパクとして大腸菌で発現させた。GST-OsGLN1およびGST-OsGLN3融合タンパク質は、1,3-β-グルカンを速やかに分解し、オリゴ糖を生成したが、1,3;1,4-β-グルカンは全く分解しなかった。この他のGST-OsGLN1およびGST-OsGLN3融合タンパク質の諸性質についても合わせて報告する。

F129

間期における発現を特徴とする植物特有のキネシン様タンパク質TBK５の解析

後藤悠平[1]，松井啓祐[2]，浅田哲弘[1]
（1.阪大・院理，2.京大・院理）

タバコ培養細胞BY-2から単離されたcDNA クローンTBK5は、間期に高いレベルのmRNA蓄積が認められる、植物特有のキネシン様蛋白質をコードする。私達は今回、大腸菌に発現させたTBK5Ｎ末端領域に対する抗体（Ab5N）、Ｎ末端領域内の16アミノ酸残基から成る親水性領域に対する抗体(Ab5p）、及び大腸菌に発現させたC末端領域に対する抗体（Ab5C)を用いたTBK5蛋白質の同定ならびに細胞内局在解析の結果について報告する。全細胞抽出液に対してウエスタンブロット解析を行ったところ、Ab5Nは74kDaと62KDaのポリペプチドを、Ab5pは74kDaのポリペプチドを、Ab5Cは74kDaと65kDaのポリペプチドを認識した。この結果は、74kDaポリペプチドがcDNAクローンTBK5にコードされた蛋白質に相当することを示している。間期の細胞から調整した細胞質抽出液を用いて微小管共沈実験を行ったところ、74kDaポリペプチドは微小管と共沈したが、Ab5Nが交差反応する62kDaポリペプチド、及びAb5Cが交差反応する65kDaポリペプチドは微小管と共沈しなかった。また、Ab5NあるいはAb5Cを用いて間接蛍光抗体法観察をおこなったところ、細胞質表層微小管に沿った染色が認められた。これら結果は、TBK5は細胞質表層微小管に附随する蛋白質の一つであることを強く示唆している。

F130

イネのアラビノガラクタンプロテイン（AGP）とその分解酵素の特性解明

川口健太郎、山内宏昭、渋谷直人[1]（農水省・北海道農試、[1]農水省・生物研）

小胞子形成の初期段階のイネ葯はストレス感受性を持ち、12℃４日間の低温処理は小胞子発生に障害を誘導する。一方、葯の糖分析により、高濃度の AGP が小胞子及びタペート細胞表層に一過的に蓄積し、その分解過程でアラビノガラクト（ＡＧ）オリゴ糖の一過的蓄積がみられることが明らかになった。現在、ＡＧＰの生理的機能の詳細は未だ不明で、いくつかの研究室で解明が進められているが、発生過程の葯における特徴的な蓄積は、これら糖質が花粉形成に重要な役割を果たしていることを示唆する。

我々はこれまで、通常のクロマトグラフィー手法を用いてイネ幼穂及び葯を材料として AGP の精製を試みてきたが、完全な精製には至っていない。本年度は Yariv phenylglycoside の特異的結合能を利用した分離法を新しく導入したところ、顕著な効果が得られたので報告する。また、低温感受のキー反応を制御すると思われる AGP 分解酵素活性の温度特性、及び、酵素単離の試みについても報告する予定である。

F131

イネ花粉形成に関わるカロース膜合成・分解酵素遺伝子の同定と解析

山口知哉，中山克大，林高見，小池説夫（農水省・東北農試）

イネの冷温感受性が最も高いのは、葯内の四分子が4つの小胞子に分離する四分子解離期であり、この時期の冷温処理によって高度の雄性不稔が誘発される。花粉母細胞はβ-1,3-グルカンからなるカロース膜に覆われており、減数分裂後にカラーゼ(β-1,3-グルカナーゼ)がカロースを速やかに加水分解し小胞子が葯腔へと放出されるが、このカロース膜合成および分解の活性制御が花粉形成に重要であると考えられる。

我々はこれまでに、イネ葯β-1,3-グルカナーゼ遺伝子Osag1の構造を明らかにし、その発現様式を明らかにしてきた。そこで、カロース膜を合成するカロース合成酵素(CalS)触媒サブユニットについても、酵母やシロイヌナズナでの保存配列を元にして花粉母細胞期のイネ葯からRT-PCRで部分配列を増幅したところ、予想されるアミノ酸配列は他のCalS遺伝子と高い相同性を示した。シロイヌナズナのゲノム中には12種のCalS-like配列があることがすでに分かっているが、今回イネ葯から単離したCalS遺伝子は、花粉形成に関わるサブタイプであると考えられ、現在その発現様式の解析を行っている。

F132

シロイヌナズナのキシログルカン関連蛋白質の遺伝子構造と発現解析

横山隆亮、西谷和彦（東北大・院・理・生物）

キシログルカンは、双子葉植物の細胞壁に最も豊富に存在するマトリックス多糖であり、セルロース微繊維を架橋している。このようなキシログルカン分子の繋ぎ換え反応を触媒するエンド型キシログルカン転移酵素は、植物において大きな遺伝子ファミリーを形成していることが明らかになり、これら遺伝子がコードする蛋白質はキシログルカン関連蛋白質(XRP)と名付けられた。現在、ゲノムプロジェクトによって、シロイヌナズナのゲノム中には 31 種類の XRP 遺伝子が確認されている。そこで我々は個々の XRP 遺伝子を特異的に認識するプライマーを作成し、リアルタイム RT-PCR によってシロイヌナズナに存在する全ての XRP 遺伝子の発現解析を行った。31 種類の XRP 遺伝子のうち、28 種類の発現が確認され、いずれの遺伝子も独自の発現パターンと発現レベルを示すことが明らかになった。また発現のレベルは異なるが、共通の発現パターンを示す遺伝子のグループがあり、この中には類似のプロモーター構造を共有するグループも存在した。遺伝子発現、ゲノム構造そして染色体上の位置に関する以上の解析を基にして、XRP 遺伝子の派生様式と冗長性について考察する。

F133

エンド型キシログルカン転移酵素を欠損したシロイヌナズナ変異体を用いた機能解析

松井章浩[1] 横山隆亮[1] 関原明[2] 篠崎一雄[2] 石黒澄衛[3] 岡田清孝[3] 加藤友彦[4] 田畑哲之[4] 西谷和彦[1]（1東北大・院・理 2理研・植物分子 3京大・院・理 4かずさDNA研）

エンド型キシログルカン転移酵素EXGTはキシログルカンの転移活性を持つ酵素で、細胞壁の構築に関わると考えられている。

この酵素は比較的大きな遺伝子ファミリーにコードされており、シロイヌナズナでは現在までに31の遺伝子が知られている。私たちは、これらの遺伝子の欠損株を用いてEXGT遺伝子群の役割を明らかにしたいと考えている。今回の実験では、*EXGT-A2* と *A3* の遺伝子について、欠損株の表現形とmRNAの発現様式をin situ ハイブリダイゼーション等を用いて調べた。

exgt-a2 a3 両遺伝子欠損株は共にロゼット葉がWTと比べて背軸方向に強く巻き込む。更に、*exgt-a3* では胚軸伸長やロゼット葉の伸長に異常が見られ、花茎の抽台時期が遅れる形質を持つが花茎の伸長速度に異常がなかった。*EXGT-A3* mRNAはロゼット葉の中肋と維管束で確認されたが、抽台直後の花茎では確認されなかった。以上の結果をもとにして、EXGT-A2,A3の役割を考察する。

F134

シロイヌナズナのエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子 *EXGT-A1* の発現様式と機能の解析

多田功生、横山隆亮、西谷和彦（東北大 院 理 生物）

エンド型キシログルカン転移酵素（EXGT）は、細胞壁中のセルロース微繊維間を架橋しているキシログルカン分子の接ぎ換え反応を触媒することが *in vitro* の実験系で確認されている酵素である。EXGT遺伝子は大きな遺伝子ファミリーを形成し、シロイヌナズナでは現在までに31個の遺伝子が確認されている。それぞれのメンバーは植物の生長の諸過程における細胞壁の構築と再編においてそれぞれ独自の役割を担っていると考えられるが、*in vivo* での機能についての知見はどのメンバーに関しても得られていない。このファミリーの一つである *EXGT-A1* の機能を特定するために、我々はRT-PCR法と *in situ* ハイブリダイゼーション法により *EXGT-A1* mRNAの発現組織を調べた。また、*EXGT-A1* promoter::GFP及び *EXGT-A1* promoter::GUSを導入した形質転換植物を用いて、レポーター遺伝子の発現組織の解析を進めた。その結果、*EXGT-A1* は地下部では側根原基、地上部では特定の維管束で特異的な発現することが明らかとなった。これらの結果は、*EXGT-A1* が維管束及び側根の形成過程での細胞壁構築に関与していることを示唆している。この点を更に確認するために、現在、CaMV35S プロモーターに *EXGT-A1* のセンスおよびアンチセンスcDNAを結合させた融合遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナの解析を行っているので、それも合わせて報告する。

F135

アズキのエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子 *EXGT-V1, EXGT-V2* の発現様式の解析

中村拓磨、横山隆亮、西谷和彦（東北大・院・理・生物）

エンド型キシログルカン転移酵素(EXGT)は細胞壁中のセルロース微繊維を架橋するキシログルカン分子の切断や繋ぎ換え反応を触媒する酵素である。*EXGT-V1* はアズキ上胚軸より単離されたEXGTタンパク質をコードする遺伝子である。また *EXGT-V2* はそのホモログである。RNAゲルブロット法により、両遺伝子が上胚軸で特異的に発現していることはすでに明らかにされているが、植物体内での具体的な役割を示唆する知見は少ない。そこで、私たちは *EXGT-V1, EXGT-V2* にそれぞれ特異的なプローブを用いた *in situ* hybridization 法により両遺伝子の上胚軸内での発現組織を解析した。その結果、両遺伝子が形成層および厚壁組織において特異的な発現を示すことが明らかになった。カルコフロアーおよびフロログルシノールを用いた組織染色により、それらの発現組織ではリグニン沈着を伴わないβ-グルカン（セルロース）の著しい沈着が観察された。以上の結果は、両遺伝子が木化を伴わない細胞壁構築において重要な役割を担っていることを示している。厚壁組織は上胚軸を機械的に支持する組織であることから、本酵素は上胚軸の機械的支持に関わる機能を担っていると考えられる。現在、この組織特異的な発現調節機構を解明するため、両遺伝子のプロモーター領域の塩基配列の比較を試みている。

F136

分化能をもたないニンジン懸濁培養細胞由来のα-L-アラビノフラノシダーゼの精製と基質特異性

有本光江、金子哲[1]、岩谷麻有子、小林秀行[1]、日下部功（筑波大・応用生物化学系、[1]農水省・食総研）

植物の糖加水分解酵素は細胞壁の構築に重要な役割をになっている。しかしながら、それらの酵素についてはまだ不明のものも多く、性質が明らかになっているものは少ない。

我々は分化能のないニンジン懸濁培養細胞の対数分裂期に多く生産されているα-L-アラビノフラノシダーゼを精製し、その性質と基質特異性を調べた。

本酵素は分子量94，000 、pI 6.6、至適 pH 4.5 。アラビナンとアラビノガラクタンに比較的作用しやすくアラビノキシロオリゴ糖ではA1X2よりもA1X3に作用しやすいことがわかった。α-(1→3)、α-(1→5)アラビノビオースについても作用し、主鎖、側鎖ともに作用することがわかった。

F137

レクチンによる根の可逆的伸長阻害

林　弥智、谷本英一
（名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科）
Email: m.hayash@gs.nsc.nagoya-cu.ac.jp

レクチンは糖を特異的に認識して結合するタンパク質である。レクチンが植物にとってどのような役割を果たすのか、まだ詳しくは明らかにされていないが、窒素固定や病原菌に対する防御を助けるものと考えられている。一方、α-D-mannnose またはL-fucose を認識するレクチンがアズキ上胚軸切片の伸長を抑制することが保尊ら（1987 年）によって報告された。しかしそのメカニズムについては分かっていない。

そこで我々は根の伸長成長系を用いてレクチンの作用を調査した。根の表皮にはクチクラがなくレクチンの浸透性は高いと考えられる。調査した 10 種のレクチンのうち RCA と abrinA がイネとエンドウの根の伸長を阻害することが分かった。興味深いことに，この伸長阻害は可逆的で、RCA を取り除いた溶液に移すと処理前の成長速度に回復した。このレクチンはリボソームを不活性化することが知られているが、根の可逆的伸長阻害のメカニズムは不明である。細胞壁の伸展性と糖組成についても分析したところ、レクチン処理により伸展性は減少した。また，糖組成はジベレリン誘導伸長制御における変化と一致した。

F138

チューリップの STMADS11-like 遺伝子の単離と発現解析

菅野　明, Heinz SAEDLER[1], Guenter THEISSEN[1]
（東北大・遺生研、[1]マックスプランク植物育種研究所）

Using the RACE method we have isolated cDNA clones for TGMADS11, a MADS-box gene from tulip, which belongs to the subfamily of STMADS11-like genes. TGMADS11 is closely related to SVP (SHORT VEGETATIVE PHASE) from *Arabidopsis* (1) and JOINTLESS from tomato (2). Genomic Southern hybridization showed that TGMADS11 exists in single copy in the tulip genome. Sequencing of more than ten independent cDNA clones and comparison with genomic sequences revealed a 4-bp deletion in some cDNA clones due to alternative splicing. This deletion results in a frameshift and thereby a putatively truncated protein product. Northern hybridization demonstrated that TGMADS11 is weakly expressed in leaves, but not in flower buds, roots, stems, and bulbs.

(1) Hartmann *et al.* (2000) Plant J. 21:351-360
(2) Mao *et al.* (2000) Nature 406:910-913

F139

黄緑色でいびつな葉の形態を示すシロイヌナズナの *crumpled leaf* 変異体の解析

浅野智哉、樽井俊介、吉岡泰、町田泰則
（名大院・理・生命理学）

我々は維管束の機能や形成に関与する遺伝子を明らかにするためにシロイヌナズナの遺伝子トラップライブラリーを作製し、維管束で特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行っている。その過程で異常な葉の形態を示す ***crumpled leaf* (*crl*)** 変異体を分離した。この変異体は多面発現的な表現型を示し、矮性で、葉、花茎が黄緑色となり、花茎が直立できず、葉の表面に皺がより葉身の形がいびつになる。葉と花茎との横断切片を作製観察した結果、表皮細胞の大きさが不均一で葉の表面が凸凹している事、柵状組織、海綿状組織、花茎の皮層細胞の形態が異常である事、および、**interfascicular *fiber*細胞**において２次細胞壁の肥厚が起こっていない事が明らかとなった。この結果から、***crl*** 変異体においては少なくとも葉と花茎における表皮細胞、柵状組織、海綿状組織、皮層細胞、**interfascicular *fiber*細胞**の分化に異常が起こっていると考えられる。また、サザンブロット解析の結果、***crl*** 変異原遺伝子と連鎖する T-DNA が３コピー存在している事がわかった。現在、***crl*** 遺伝子のクローニングを進めている。

F140

タバコ遺伝的腫瘍の形成における NgORF13 の発現解析

宇田川真樹子、青木誠志郎[1]、庄野邦彦
（日本女子大・理、[1]東京大・院・総合文化）

Nicotiana glauca と *N.langsdorffii* を交配させたF1植物体は、傷処理をはじめとする様々なストレスにより遺伝的腫瘍を形成する。*N.glauca* には *Agrobacterium rhizogenes* の Ri プラスミド上にある *rol* 遺伝子群と高いホモロジーを示す N*grol* 遺伝子群が存在する。我々は今までにその中の一つである NgORF13 が F1 植物体および腫瘍において転写され、また過剰発現させた NgORF13 が *N.tabacum* の葉の形態に影響を与えることを示した。

本研究では NgORF13 の発現を詳細に解析し、腫瘍形成との関係を調べることを目的とした。材料として NgORF13－GUS キメラ遺伝子を導入した F1 植物体を用いて解析した結果、培養した腫瘍組織および老化に伴い自然発生した腫瘍全体で強い GUS 活性がみられた。さらに GUS 活性は傷処理により増加し、傷を受けた部位で腫瘍形成とともに強く誘導された。以上の結果は、NgORF13 が腫瘍形成と何らかの関係がある可能性を示唆する。一方、F1 植物体でも腫瘍組織に比べると弱いが、活性が認められた。維管束組織の他、葉の原基や若い葉において強い GUS 活性が観察された。この結果は、植物体において NgORF13 が葉の形態に影響を与えるという上記の結果と矛盾しない。

F141

遺伝子導入によるりんご斑点落葉病抵抗性りんごの作出

加藤喜明[1]、西原昌宏[1]、峰正樹[1]、松木吏弓[2]、中野優[3]、大宮知[4]、星伸枝[5]、仲谷房治[5]、高木正道、山村三郎[1]（[1]（財） 岩手生物工学研究センター、[2]（財）電力中央研究所、[3] 新潟大学農学部、[4] 北海道立花・野菜技術センター、[5] 岩手農業研究センター）

我々は、耐病性付与のためにりんごの主要品種である‘ふじ’にクモノスカビ（*Rhizopus oligosporus*）由来のキチナーゼ遺伝子（chi1）を導入し、サザン解析、ノザン解析、病原性糸状菌胞子接種試験により、りんご斑点落葉病 に抵抗性を示す形質転換体 No.35 を選抜した。今回、その耐病性機構を解析したので報告する。

Native-PAGE によるキチナーゼアイソザイムを検出した結果、No.35では導入遺伝子由来のキチナーゼのバンドが検出された。しかし、葉における毒素抵抗性試験によりNo.35の毒素感受性は、野生型と同様であった。そこで、りんご斑点落葉病菌(*Alternaria alternata* apple pathotype) 接種後の感染過程を観察した結果、接種18時間後には野生型およびNo.35で付着器が形成されていたが、接種48時間後には No.35 における侵入菌糸の形成が抑制されていた。そのため、No.35は導入遺伝子の発現により、侵入菌糸形成過程が阻害され、病害抵抗性を示すものと考えられる。

F142

AtEBP (*Arabidopsis* Ethylene-responsive element-Binding Protein) suppresses Bax-induced cell death in yeast

Ling PAN[1], Maki KAWAI[1], Lihua Yu[1], Kyung-Min KIM[1], Hirofumi UCHIMIYA[1,2]
([1]Univ. Tokyo, Inst. Mol. Cellu. Biosci., [2]JAERI, Adv. Sci. Res. Center)

Mammalian Bax expression in plant caused tissue collapse resembling the hypersensitivity response, that suggested some conserved pathway of PCD between plant and animal system. Moreover, Bax triggered cell death when expressed in yeast, and commonalties in the mechanisms by which Bax induces death in yeast and mammalian cells were proposed. By taking advantage of this lethal phenotype we identified dozens of *Arabidopsis* inhibitors which could suppress Bax-induced cell death by functional screening in yeast system. Among these inhibitors, two were the plant homologue of mammalian Bax Inhibitor-1 (AtBI-1); some were genes involved in the detoxification of reactive oxygen species. Interestingly, AtEBP (Ethylene-responsive element- Binding Protein) turned out to be most abundant. By fused with GFP, we found that it was localized in the nucleus of yeast. The EM observation revealed that abnormal nucleus induced by Bax was restored to be normal by AtEBP in yeast.

F143

タバコ属種間雑種での細胞死発現

三野真布、前川賢司、小川健一[1]、井上雅好 （京都府立大学農学部、1:岡山県生物科学総合研究所）

植物の雑種致死は生殖的隔離現象の一つで、雑種成立の阻害をとおして種の独立性を維持するように作用する。致死現象は受精後の胚発生から発芽後の幼植物までの様々な段階で発現する。最近、タバコ種間雑種の幼植物に発現する雑種致死にはアポトーシス様反応を伴う事実が明らかにされた（Marubashi *et al.*1999, Planta、210:168）。このことは雑種においては未同定のシグナル因子の作用が広範な細胞死を誘起して致死現象を引き起こすことを示唆している。

我々は雑種致死の生理・生化学的および分子生物学的解析から致死に関連する因子の探索とその作用を明らかにする目的で研究を開始した。しかし、これまでは雑種致死がどの様に進行するかの時間的、組織学的な研究はなく、その解析の基盤となる情報は不足していた。本報告ではタバコ属種間雑種の幼殖物致死現象がどの様に進行するかを植物体の成長、細胞分裂指数などから解析した結果を示す。更に、器官・組織毎にみた細活性酸素の発生と細胞死の進行パターンについての観察結果とを合わせて示し、細胞・組織学的的観点から雑種致死について考察する

F144

植物老化過程における過酸化水素消去系の変動

目沼真美、崎浜靖子、山崎秀雄（琉大・理・海洋自然）

花の老化過程は、プログラム細胞死（PCD）の一つと考えられている。PCDには活性酸素の急激な生産を伴うオキシデイティブバーストが関与していることが明らかとなっているが、その負制御に関わる抗酸化系の応答は不明な点が多い。本研究では、熱帯植物モミジバヒルガオ（*Ipomoea cairica*）を用いて、花弁老化過程における過酸化水素除去酵素系の変動を調べた。モミジバヒルガオの花弁細胞中の蛋白質、DNA等の高分子成分は老化過程とともに減少したが、呼吸活性の顕著な低下は見られず、典型的な植物細胞老化を示していた。活性酸素の除去に不可欠なアスコルビン酸含量の急激な低下が老化初期段階から見られ、それに引き続きグルタチオンの含量の低下も観察された。アスコルビン酸を電子供与体として過酸化水素除去を行うアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）活性も低下が見られた。一方、グアヤコール型ペルオキシダーゼ（GuPX）活性は老化最終段階まで保持され、同酵素の蛋白質レベルでの分解も見られなかった。これらの結果より、老化過程の代謝にはミトコンドリアによるエネルギー供給と同様にGuPXの反応が関与していることが示唆された。GuPXの老化過程における生理的意義について考察する。

F145

細胞死抑制遺伝子Bax inhibitor-1 (*AtBI-1*)の機能解析

川合真紀, 潘玲, 内宮博文（東大・分生研）

Bax Inhibitor-1 (*BI-1*) 遺伝子は酵母におけるBax誘導性の細胞死を抑制する因子として動物及び植物より単離された。BI-1は６又は７ケ所の膜貫通領域を有する膜タンパク質であると予想されている。植物BI-1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)にシロイヌナズナの*BI-1*遺伝子(*AtBI-1*)を導入したところ、細胞死の抑制が確認された。Baxに対する抗体を用いたウェスタン解析により、AtBI-1はBaxの発現量に影響を与えないことが確認された。また、AtBI-1の細胞死抑制活性にはC末端部位が不可欠なことが明らかとなった。

さらにAtBI-1の細胞内局在を調べるためGFPとの融合タンパク質をシロイヌナズナ、及びタバコ培養細胞(BY2)で発現させた。共焦点レーザー顕微鏡による観察の結果、AtBI-GFPは核膜及び小胞体に局在すると考えられた。また、AtBI-GFPが酵母内で細胞死抑制活性を保持していることも確認された。本大会ではさらに、AtBI-1を導入した形質転換シロイヌナズナの解析結果についても併せて報告する。

F146

キクイモカルス由来レクチン(HTA)の細胞死過程における発現と変動

中川良二, 奥村幸広, 川上誠, 長島浩二（北海道立食品加工研究センター）

キクイモ塊茎をNAAとBAを含むMS培地で３週間培養すると、カルスが誘導されるが、このカルスに於いては、塊茎レクチン[1]に変わってカルスレクチン(HTA)[2,3]が発現すると共に一部の細胞は管状要素に分化していた。また、継代したカルスを 20mg/l の MeJA を含む MS 培地で培養すると、これらの反応が非常に速やかに現れ、培養 2,3 日後には、カルスは褐変し細胞壁は肥厚になった。さらに、細胞 DNA の断片化、RNA およびタンパク質の分解消失が観察され、細胞は暗青波長(400～440nm)の照射により強い自家蛍光を発した。一方、HTA活性には変化がなく、その比活性は非常に高くなっていた。これらのことから、HTA は管状要素分化過程および細胞損傷におけるアポトーシス様細胞死（過敏感反応死）と関連したタンパク質ではないかと推察した。

1)Van Damme et al., *Eur. J. Biochem.*, **259**, 135 (1999).
2) Nakagawa et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 259 (1996).
3)Nakagawa et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1247 (2000).

F147

クリプトゲインの細胞死誘導部位の解析

平沢賢一, 天野豊己, 塩井祐三（静岡大・理・生物地球）

タバコ細胞に過敏感反応を誘導するエリシターとしてエリシチンが知られている. エリシチンファミリーは, 細胞死活性の弱いα-エリシチンと細胞死活性の強いβ-エリシチンに分けられる.

本研究は, α-, β-エリシチンにおける細胞死活性の強弱が特定部位のアミノ酸に由来するものであるか否かの検証を目的としている. そこで大量発現系が構築されているβ-エリシチンの 1 種であるクリプトゲインを材料にして, 部位特異的突然変異により細胞死活性の変化した変異体を作製し, クリプトゲインの機能部位の同定を行った.

今回, クリプトゲインの構造や, 他のエリシチンのアミノ酸配列と比較して, 細胞死活性に影響を与えると考えられる 13 番目, 25 番目, 93 番目のアミノ酸 1 残基を置換した変異体 K13V, N25S, N93A と 13 番目と 25 番目の２残基を置換した変異体 K13V/N25S を作製した. クリプトゲインによるタバコ細胞の生存率の経時変化は, フルオレセインジアセテート（FDA）がフルオレセインに変換される速度を生存率の指標として定量的に解析した. クリプトゲイン濃度が 500 nM のとき, 変異体 K13V, N25S, N93A は野生型と比較して 15%程度のほぼ同じ細胞死活性の低下と, 変異体 K13V/N25S では 30%程度の細胞死活性の低下を示した. また, クリプトゲイン濃度が 100 nM のときは, 全ての変異体で野生型と比較して 75%程度の細胞死活性の低下が見られ, 変異体による細胞死が抑制されていた.

F148

クリプトゲインによるタバコ培養細胞の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）

過敏感反応をモデル系として、植物細胞におけるプログラム細胞死の経時的測定を行った。

植物細胞でのプログラム死は、細胞の分化の過程でみられる形態変化を伴うものと、過敏感反応で見られるように形態変化を伴わないものに大別できる。過敏感反応死はその生理的意義が高いにもかかわらず、大規模な形態変化を伴わないために死までのプロセスを報告した例は少ない。

本研究では過敏感反応時における死の全過程を、細胞の生存率の定量的解析、酸素消費速度の計測、顕微鏡による細胞の形態学的観測、の３点に関して検討した。生存率は死の進行を定量的に示す指標として、酸素消費速度は細胞の代謝レベルの指標として用いた。

タバコ細胞の生存率は、クリプトゲイン添加直後より指数関数的に減少した。その半減期は10μg/mlクリプトゲインをタバコ細胞に添加した場合、3.5時間であった。酸素消費速度は、クリプトゲイン添加後3.5時間までは上昇したが、その後は低下し、添加後10時間後までにはクリプトゲイン非添加の細胞の５割程度にまで低下した。光学顕微鏡による細胞の観察を行ったところ、生細胞にはトランスバキュオーラーストランドが発達し、原形質流動も盛んに行われていたが、過敏感反応を起こした細胞では、これら２つとも観察されなかった。

F149

ヒト由来の細胞死抑制遺伝子 *bcl-xL* を過剰発現させたイネ植物の塩および病害抵抗性

乗原　実[1]，光原一朗[2,3]，岩井孝尚[2,3]，後藤洋子[2,3]，加来久敏[2]，三浦正幸[4]，大橋祐子[2,3]（[1]福岡県農業総合試験場，[2]農林水産省・生物資源研究所，[3]CREST/JST，[4]大阪大学・医学部）

我々は、ヒト由来の細胞死抑制遺伝子 *bcl-xL* を過剰発現させたタバコが、紫外線照射や塩処理に対して抵抗性を示す一方で、TMV 感染に伴う特異的抵抗性反応である壊死病斑形成の遅延を示すことをすでに報告した[1,2]。今回、*bcl-xL* 遺伝子をイネ'日本晴'で過剰発現させ、形質転換体を得た。この自殖種子を0.3M NaCl を含む土壌中に播種したところ、非形質転換体より生育が良く、耐塩性を示した。また、イネ苗立枯細菌（*Pseudomonas plantarii*）およびイネもみ枯細菌（*P. glumae*）のけん濁液中に種子を浸漬し、発芽させたところ、形質転換体は前者に対してはより抵抗性を示し、イネ組織内での菌の増殖を抑制していた。一方、後者に対しては、非形質転換体より感受性を示した。これらの細菌病感染に対するイネの抵抗性機構は不明であるが、上記の結果は、*P. plantarii* は罹病性感染を、*P. glumae* に過敏感的反応を引き起こすような感染をする可能性を示している。

[1] Mitsuhara, I. et al. *Curr. Biol.* 9:775-778(1999),
[2] 2000年度本年会

S101

ドミナントネガティブ変異型のイネ *Ran* 遺伝子を導入したイネとシロイヌナズナの解析

川岸万紀子，矢部尚登[1]，若狭暁（農業研究センター，[1]横浜市大・木原生研）

Ran は small GTPase ファミリーに属し，酵母や培養細胞等を用いた解析から，タンパク質や RNA の核内外への選択的輸送に重要な役割を担うことが示されている。高等植物においても Ran の存在は報告されているが，その生理的機能は明らかではない。そこで，イネ *Ran* 遺伝子(*OsRan1, OsRan2*)を単離し，機能解析を試みた。ドミナントネガティブ分子となることが期待される変異型 *OsRan1* 遺伝子を 3 種類構築し，イネカルスへ導入した。野生型 *OsRan1* 遺伝子を高発現する形質転換体が正常に生育したのに対し，変異型遺伝子の場合には，いずれも野生型と同様の頻度で形質転換カルスは得られたが，カルスから得られる再分化個体数が著しく低下していた。一方，カルスからの再分化を要しない *in planta* 法により上記遺伝子をシロイヌナズナに導入し，その形質転換体を用いて，植物個体における *Ran* の機能解析を行なっているので，あわせて報告する。

F150

アクティベーション・タギングで得られた、著しい葉の上偏成長を示す優性突然変異体の解析

武藤秀樹、矢部尚登[1]、蓮沼仰嗣[1]、山本興太朗（北海道大・地球環境、[1]横浜市大・木原生研）

アクティベーション・タギング・ラインの中から半優性の突然変異体、4094を単離した。4094ヘテロ変異体はわい性で稔性が低く、葉は著しい上偏成長の結果、下側に丸まった形態を示す。ホモ個体ではこの形態異常はさらに強く、また、種子をほとんどつけなかった。4094変異体の暗黒下での芽生えは、胚軸の長さは野生型と差はないものの、螺旋状、またはねじれた伸長を示した。白色光下では、子葉と本葉の上偏成長がみられる他、胚軸が野生型より長くなった。この変異体に導入されたT-DNAは3番染色体に位置し、エンハンサー近傍にはSer/Thr　タンパク・キナーゼのNAKサブファミリーに属すると考えられる遺伝子が存在した。NAK遺伝子族は受容体様タンパク・キナーゼに近いグループであるが、受容体ドメインは持たず、キナーゼ・ドメイン以外のドメインはごく短い、全長400アミノ酸残基程度のタンパクをコードしている。ノーザン解析の結果、この遺伝子のmRNAは野生型では検出されず、4094変異体のみで蓄積していることが分かった。

S102

ペチュニアのジンクフィンガー遺伝子*PetSPL7*のプロモーターは若い表皮組織特異的な活性を示す

野末一成、Dennis Yeo、高辻博志（農水省・生物研）

ペチュニアにおいては、アラビドプシス *SUPERMAN*(*SUP*)と構造上の類似性を示すジンクフィンガー(ZF)型転写因子(ZFモチーフを１個含む)が遺伝子族を形成しており、それぞれ枝分かれや花の器官形成などに関与していることを示してきた。今回、さらに新規なZF遺伝子を見出して新たな転写因子機能を探索するため、再度PCRによるスクリーニングを行った。その結果、２種の新規ジンクフィンガー遺伝子（*PetSPL7*および*9*）を見出し、それらに対応するゲノムDNAを単離した。*PetSPL7*及び9は本遺伝子族の中では互いに比較的高い相同性（アミノ酸レベルで60%）を示す。*PetSPL7::GUS*遺伝子を導入したペチュニアを用いて*PetSPL7*のプロモーター活性を解析したところ、これまでの*SUP*様遺伝子と異なる特徴的な発現パターンを示し、若い本葉と茎及び若い花器官と花柄の表皮で特異的にGUS活性が認められた。しかしながら、茎頂分裂組織のL1層には活性は検出されなかった。また地上部の成熟した器官・組織および根でも発現が認められない。他の*SUP*様転写因子からの類推により、本転写因子が形態形成の制御に関与している可能性が考えられるため、形質転換植物を用いた機能解析を進めている。

S103

GA 生合成系を調節する転写活性化因子 RSG とその活性を制御する因子 14-3-3 の解析

石田さらみ、深澤壽太郎、高橋陽介（東京大学院・理学系）

RSG はシュートの生長を調節する 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。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。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) は野生型 RSG よりも強いアクティベーター活性を示した。従って、14-3-3 は RSG の負の制御因子と考えられる。また RSG-GFP 融合タンパク質を発現する形質転換植物を用いて RSG の細胞内局在制御における 14-3-3 の役割について解析した。

S104

FAS1, FAS2とAtMSI1蛋白質は複合体を形成し，クロマチンアセンブリー活性を持つ

○賀屋秀隆1，柴原慶一2,3，小林恭士1，飯　哲夫1，岩渕雅樹1,4，Bruce Stillman3，荒木　崇1
1京都大・理・植物，2科技団 TOREST，3CSHL，4岡山県生物科学総合研究所

シロイヌナズナ*FAS1*, *FAS2*遺伝子はSAMとRAMのオーガニゼーションの維持に関わることを，報告してきた（99, 00年度本大会）．しかし，これら遺伝子のどの様な機能によって分裂組織を維持しているのかは明らかでない．そこで，FAS1, FAS2蛋白質の*in vitro*での機能について生化学的解析を行った．

FAS1，FAS2蛋白質はヒトのChromatin Assembly Factor-1(hCAF-1)サブユニットのp150，p60と相同性がある．hCAF-1はp150, p60とp48の３つのサブユニットから成る複合体で，複製中のDNA選択的にヒストンをアセンブルさせる活性を持つ．まず，FAS1, FAS2とAtMSI1蛋白質の*in vitro*での結合能を調べた．AtMSI1蛋白質はhCAF-1の3番目のサブユニットであるp48と最もホモロジーが高い．これに基づいて，FAS1, FAS2, AtMSI蛋白質の*in vitro*における複合体形成能を検討し，確かにこれら３つの蛋白質が複合体を形成しうることを明らかにした．さらに，two-step supercoiling assay system (Shibahara K. and Stillman B, Cell 1999, 96, 575)を用いて，この複合体がDNA複製に伴うクロマチンアセンブリー活性を持つことを示した．

以上より，FAS1, FAS2蛋白質はhCAF-1のシロイヌナズナカウンターパートとして，細胞分裂に伴うヌクレオソーム形成に関わる機能を持つと結論した．

S105

シロイヌナズナ ATHB-1 の標的遺伝子の検索

村本拓也、佃真由美、岡穆宏、田畑哲之[1]、Ida Ruberti[2]、Giorgio Morelli[3]、青山卓史（京大・化研、[1]かずさDNA 研、[2]Centro di studio per gli Acidi Nucleici, Italy、[3]Unita di Nutrizione Sperimentale, Istituto Nazionale della Nutrizione, Italy）

シロイヌナズナの ATHB-1 は、ホメオボックスをもつ HD-Zip 型の転写因子である。その役割は形質転換植物の解析から葉の形態形成に関与すると考えられているが、詳細は明らかになっていない。植物の形態形成は発生のプログラムにそって行われるだけでなく、環境からの刺激によって大きな影響を受けるが、これら様々な要因が統御され植物を形づくる。我々は、植物の形態形成における ATHB-1 の役割を明らかにし、植物の全体的な形態形成プログラムを理解するため、ATHB-1 が転写制御を行う遺伝子の同定と解析を試みた。今回は、標的遺伝子の候補として同定された遺伝子の機能から ATHB-1 の役割について議論したい。

S106

シロイヌナズナのホメオボックス遺伝子 *ATHB-10/GL2* の機能解析

大橋洋平, 岡 穆宏, Ida Ruberti[1], Giorgio Morelli[2], 青山卓史（京都大学・化学研究所, [1]Centro di studio per gli Acidi Nucleici, c/o Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Universita di Roma La Sapienza, Italy. [2]Unita di Nutrizione Sperimentale, Istituto Nazionale della Nutrizione, Italy.）

*ATHB-10/GL2*遺伝子はシロイヌナズナのホメオボックス遺伝子で、HD-Zipファミリーに属する転写因子である。この遺伝子を欠失した*gl2*突然変異体ではトライコームの欠失、根毛の増加がみられることから、*ATHB-10/GL2*遺伝子はトライコーム形態形成を正に、根毛形態形成を負に制御しているものと思われる。これらの制御機構を理解する上で*ATHB-10/GL2*遺伝子の標的遺伝子を単離することが不可欠であると考えられる。そこで我々はGR誘導系をもちいて標的遺伝子の単離を試みている。

本年会ではこれまでの解析結果を中心に報告する予定である。

S107

リンドウの形態形成関連遺伝子(*GtMADS4*)の解析

西原昌宏、[1]横井崇秀、阿部善子、山村三郎（岩手生物工学研究センター,[1]（株）日立製作所ライフサイエンス）

我々は岩手県の花き生産の主力であるリンドウの遺伝子工学的育種を目標として研究を進めている。これまでリンドウ（品種マシリィ）から4種類のMADS box遺伝子（*GtMADS1-4*)を単離し、解析を進めている。今回は機能が十分解明されていないシロイヌナズナの*AGL2*と59%の相同性を示す*GtMADS4*の機能解析を試みた。*GtMADS4*をタバコに導入し、その形態変化、特に開花日、着花状態、草丈等に及ぼす影響について解析した結果、イネ*OsMADS1*を導入したタバコと類似の特徴が見られたので報告する。

*GtMADS4*遺伝子をCaMV35Sプロモーターの下流に繋いだベクター（pEbisGtMADS4)を構築し、アグロバクテリウム法によりタバコ（品種SR1）に導入し、24系統の形質転換体を得た(T_0)。後代の種子がカナマイシン抵抗性に対して3：1の分離比を示す8系統をその後の解析に用いた。カナマイシン耐性各4個体(T_1)ずつを馴化後、温室で栽培、育成し、形態観察を行った。その結果、形質転換体8系統中7系統で小花柄が短くなり、野生株に比較して花が密生して咲くという特徴が見られた。開花日および草丈、節間数に関しては野生型と比較して有意な差は認められなかったが、いくつかの系統について、花数が増加する傾向が認められた。現在、さらに次世代(T_2)の種子を採取しており、ホモ系統を選抜後、遺伝子の発現解析を含めた特性の詳細な解析を行う予定である。

S108

単細胞シャジクモ藻：ミカヅキモ(*Closterium p-s-l* complex)における、*CpMADS1*（Floral homeotic 遺伝子ホモログ）の発現について

田辺陽一、長谷部光泰１、関本弘之２、伊藤元己２　（千葉大院・自然科学、１基生研・種分化第二、２東大院・総合文化）

我々は、Floral homeotic 遺伝子群(ABC-function genes)の起源と進化を探る目的で、陸上植物と姉妹群的な関係にあると考えられる多細胞緑藻のシャジクモを材料にMADS遺伝子の解析を行った。その結果、シャジクモのMADS遺伝子(*CgMADS1*)は、陸上植物のMADS遺伝子に特徴的なMADS-boxとK-boxの２つの保存的な領域をもった遺伝子であり、造精糸、卵細胞の両方の生殖細胞に分化した細胞で特異的に強い発現が見られた。

本学会では、シャジクモに近縁でさらに原始的な体制をもつ、シャジクモ藻綱のミカヅキモ(*Closterium p-s-l* complex)を材料にMADS遺伝子の解析を行った結果を発表する。ミカヅキモは単細胞性の緑藻で、有性生殖は栄養細胞から分化した同型の配偶子細胞（Mt+,Mt-の２つのmating typeが存在する）の接合により行われる。ミカヅキモから単離できたMADS遺伝子*CpMADS1*は、シャジクモや陸上植物のMADS 遺伝子と同様にMADS-boxとK-boxの２つの保存的な領域をもった遺伝子であった。また、Northern hybridizationによる発現解析の結果、*CpMADS1*の発現は配偶子細胞の増加と一致が見られた。

これらの結果と分子系統学的解析の結果から、TypeIIと呼ばれるK-boxをもったタイプ(M.Yanofsky et al.2000)の遺伝子族は、植物の陸上への上陸の付近に共通の単一遺伝子から進化したこと、この遺伝子群の祖先的な働き(*CpMADS1*の遺伝子機能自体はまだ不明であるが)は、栄養細胞からの細胞分化に関わっていたのではないかということが示唆された。

S109

ゴマ (*Sesamum indicum* L.) の MADS 遺伝子群の単離と発現解析

市川優, 若杉達也, 増田恭次郎, 山田恭司 （富山大・理・生物）

ゴマでは葉腋に１個の花しかつけない系統が一般的である。ところが、花柄に２個存在する花外蜜腺が花へと変化し、葉腋当たり３個の花をつける変異体（３サク果性系統）がすでに単離されている。ゴマの花外蜜腺が花器官へと転換する機構の解明をめざして、本研究では、花の器官形成に関わるMADS 遺伝子に着目し、その発現機構を解析した。

まず、３サク果性系統（0311）の花芽の全 RNA を鋳型とし、3'RACE 法により７個の cDNA クローンを単離した。それぞれの予想アミノ酸配列は、キンギョソウの対応する MADS 遺伝子とどの場合も80％以上の相同性が認められた。得られた cDNA は、AG、AP3 グループに２個ずつ、そして AP1、PI、AGL2 グループに１個ずつ、それぞれ属していた。さらに、5'RACE 法によって、AGL2 グループのクローン以外のすべてのクローンの全長を単離することができたので、これらの cDNA 断片の特異的領域をプローブにして、組織特異的発現の解析を行った。

S110

Agrobacterium tumefaciens T-DNA の 6b タンパク質の機能領域の特定および 6b と相互作用するタンパク質 NtSIP1、NtSIP2 の機能解析

寺倉伸治、北倉左恵子、畦地洋子、上野宜久、藤田知道、我彦広悦[1]、町田泰則（名大院・理・生命理学、[1]秋田県大・生工研）

Agrobacterium tumefaciens の T-DNA 上に存在する 6b 遺伝子は単独でタバコ個体に腫瘍形成を誘導することが報告されている。この 6b 遺伝子を導入したタバコ葉片はホルモン非存在下でカルス形成をする。この形質転換タバコ個体はその成熟個体は異所的に葉様器官を形成する。また６b 遺伝子は植物細胞内において転写活性化能を有し、かつ核に局在することをすでに報告している。今回我々は６b タンパク質の機能領域の特定を目指し、plast gene family との相同領域を中心に変異を導入した６b を 7 種作成し、形質転換タバコ細胞の増殖のホルモン依存性を検定した。その結果、上記の相同領域および転写活性化に必要な６b 固有の酸性領域が必須であることが示唆された。また６b と相互作用するタバコのタンパク質としてすでにクローン化している NtSIP2 が核に局在することも確認した。さらに予備的ではあるが、NtSIP2 及び、既に報告している NtSIP1 と上記の変異型６b との酵母 2-hybrid system を用いた相互作用解析も行った。以上の結果から、タバコ細胞内での６b の機能及び、NtSIP1、２の関与について考察する。

S111

シロイヌナズナの *AS1*、*AS2* 遺伝子の機能解析

上野宜久、岩川秀和、町田千代子、Endang Semiarti、荒木智史、小笠原史明、町田泰則　（名大院・理・生命理学）

茎頂分裂組織細胞から器官が発生分化する過程には、複数の遺伝子が関わっていると考えられる。シロイヌナズナの葉の形態の変異体、*as1* 及び、*as2* では、維管束と葉の切れ込みのパターンに顕著な異常がみられる。原因遺伝子の*AS1*はMYBドメインを持つキンギョソウの*PHAN*およびトウモロコシの*RS2*のホモログであり、*AS2*は機能既知遺伝子とは相同性のない植物固有の遺伝子である。これらの変異体の葉では、class1 *knox* が異所的に発現していることがRT-PCRで確認されたことを前大会において報告した。今回は、これら変異体の葉切片の培養実験、二重変異体の葉におけるclass1 *knox* の発現解析、さらにAS1およびAS2タンパク質の*in vitro*結合実験の結果を報告する。以上の結果と二重変異体の表現型の予備的解析結果とから、AS1およびAS2の機能について考察する。

S112

タバコ茎頂分裂組織におけるジベレリン20酸化酵素遺伝子の発現はKNOXホメオドメインタンパク質により抑制されている

坂本知昭[1]，神谷紀子[2]，上口(田中)美弥子[2]，岩堀修一[1]，松岡信[2]（[1]筑波大・農林，[2]名古屋大・生物分子応答）

人為的機能誘導系を用いた実験により，タバコKNOXホメオドメインタンパク質NTH15は，ジベレリン20酸化酵素遺伝子*Ntc12*の発現を直接抑制している可能性が示された．ゲルシフトおよびフットプリントアッセイにより，*Ntc12*には2カ所のNTH15結合領域が存在し，NTH15はGTNACの5塩基を認識していることが示された．レポーター遺伝子を用いた実験により，*Ntc12*のイントロンにあるNTH15結合配列は，NTH15依存的な*Ntc12*の発現抑制には必須であり，この配列に対する変異の挿入は，タバコ茎頂分裂組織における*Ntc12*の発現領域を，本来は発現していない*NTH15*の発現領域にまで拡大させることが明らかとなった．以上の結果から，NTH15は*Ntc12*のイントロンにある配列GTGACを認識し，茎頂分裂組織内のcorpus細胞群における*Ntc12*の発現およびジベレリンの生合成を抑制することにより，corpus細胞群の未分化状態の維持に関わっているものと考えられた．

S113

FT 過剰発現体の成長相に影響を与える突然変異体の解析

小林恭士、大川智史、賀屋秀隆、荒木崇（京都大・理・植物）

植物は、茎頂分裂組織の発生プログラムを順次変更することで成長を進行させる。この成長相の転換は、茎頂分裂組織から派生する側生器官の変化によって捉えることが可能である。シロイヌナズナでは、後胚発生過程を4つの成長相（幼若栄養成長期、成熟栄養成長期、生殖成長期前期、生殖成長期後期）に分けることができる。

我々はこれまで、花成時期遺伝子*FT*について解析を進めてきているが、*FT*遺伝子の過剰発現により4つの成長相のすべてが短縮されることを見いだした。さらに*FT*過剰発現体の花成時期に影響を及ぼす突然変異体をスクリーニングしたところ、6系統の変異体が得られた。そのうち*s1901, s4701* 変異では*FT*過剰発現背景で幼若栄養成長期の延長効果が見られ、*s0101* 変異においては、両栄養成長期の欠落が見られた。

S114

茎頂分裂組織形成や器官分離を制御するシロイヌナズナの*CUC1*遺伝子はNACドメインをコードしている

高田忍[1]、檜原健一郎[2]、田坂昌生[2]（[1]京大院・理・植物，[2]奈良先端大・バイオ）

茎頂分裂組織の形成やその機能の解明は高等植物の発生を理解する上で重要である。我々の同定したシロイヌナズナの*CUC1*と*CUC2*の二遺伝子座は茎頂分裂組織の形成と器官の分離に重要と考えらる。今回、*CUC1*遺伝子をマップを基に単離したところ、1998年度の本年会で報告した*AtNAC1*遺伝子と同一のものであった。*CUC1*はCUC2と相同性の高いNACドメインをコードし、胚発生において将来茎頂分裂組織が形成される場所で発現する。また、花序においては花器官の境界部、胚珠、雌しべの隔壁形成部で発現する。さらに、*CUC1*を過剰発現した形質転換体では子葉の上から異所的なシュートが形成された。この形質転換体の子葉では不定芽形成前に*SHOOT MERISTEMLESS*（*STM*）遺伝子が異所的に発現していた。以上の結果から、*CUC1*は*STM*の転写を誘導することによって胚発生における茎頂分裂組織の形成を制御していることが示唆される。

S115

アンチセンス形質転換体を用いた*OsPNH1*遺伝子の機能解析とイネの葉の発生過程の分子機構

西村明日香、松岡信（名大・生物分子応答）

葉は植物の一生を通じて茎頂分裂組織（SAM）から一定のパターンをもって連続的に形成される。一般に、SAMからの葉原基発生の最初のステップは、葉になるように運命づけられたSAMのある領域の細胞群が未分化状態を維持し続ける細胞から区別されることではないかと考えられている。我々は、この過程への関与が予想される*OsPNH1*遺伝子の解析を通じてイネのSAMにおける葉の形成過程の分子機構の解明を目的に研究を進めている。

*OsPNH1*遺伝子は茎頂分裂組織の形成および葉の向軸面の細胞決定に関与していると考えられているシロイヌナズナ*PINHEAD*遺伝子のイネにおける相同遺伝子である。この*OsPNH1*遺伝子のアンチセンス形質転換イネを作成したところ、葉の形態や葉序が異常になったイネが得られた。組織切片によりそれらのSAM構造を観察すると、形質転換体の多くは野生型に比べて著しくSAMの高さが減少しており、ひどいものではSAMのドーム構造が観察されず、SAMを消失したような植物体の存在した。またアンチセンスにより異常を来したSAMでは、未分化状態の細胞をマークする*OSH1*遺伝子の発現領域の減少が確認された。さらに葉の発生様式の異常は、発達中の葉原基における維管束分化の異常と、向軸側の細胞発達の抑制によるものと考えられた。これらの結果をもとにOsPNH1が関与するイネSAMにおける葉の発生過程の分子機構について考察する。

S116

ペチュニアの SUPERMAN 様遺伝子 *PetSPL1* のノックアウト変異体の解析

中川仁[1]、Ferrario, Silvia[2], Angenent, G. C.[2], 高辻博志[1]
（[1]農水省・生物研, [2]Plant Res. Internatl., Wageningen）

シロイヌナズナの SUPERMAN と構造的に類似しているペチュニア PetSPL1 は、遺伝子発現がコサプレッションによって抑制されると、雌しべが退化し雄しべが増加するという *superman* 変異体と同様の表現型が表れる。しかしながらペチュニアには SUPERMAN に対して同程度の類似性を示すもう一つの遺伝子 PetSPL2 が存在し、両者と SUPERMAN との対応関係が不明であり、それぞれの遺伝子の機能について興味がもたれる。
今回、*PetSPL1* 遺伝子のジンクフィンガーのすぐ上流(*spl1-tm1*)および C-末端近傍(*spl1-tm2*)にそれぞれトランスポゾン *dTph1* の挿入を持つ二系統のノックアウト変異体が得られた。両系統はともに第４whorl に 1～3 個の余分な雄しべが形成され、胚珠の外珠皮の成長における非対称性が失われるという点で *superman* 変異体と類似していた。これらの表現型は *PetSPL1* と *PetSPL2* の両者がコサプレッションによって同時に発現抑制された時の表現型と基本的に同一であることから、ペチュニアでは主に PetSPL1 が SUPERMAN に対応する機能を果たしていると考えられる。両変異体系統はともに、葯の形状にも顕著な異常を示した。これは *superman* 変異体には認められない表現型であり、PetSPL1 と SUPERMAN が機能的に同一ではないことを示している。また、*spl1-tm2* 系統では、carpel の数が増加して雌しべが大きくなっていた。このような表現型は superman 変異体や *spl1-tm1* 系統とは異なっており、変異部位の違いによる表現型の相違として興味深い。

S117

半導体光源を用いた光質によるシロイヌナズナ花芽形成誘導条件の検討および解析

勝又政和、岡野陽平（浜松ホトニクス　中央研究所）

近年開発が進んでいる高い光出力と単色性に優れた半導体光源を用いて，シロイヌナズナ光受容変異体の光波長による花芽形成誘導について解析を行った。

シロイヌナズナにおける日長依存的な花芽形成の誘導では長日条件でCONSTANSの発現が上昇し、それが青色光受容体Cry2に依存する。また、青色単色光条件下で花芽形成が促進され、赤色単色光条件で花芽形成が遅延することが報告されている。

今回、半導体光源による単色光環境を用いてシロイヌナズナの光質依存的な花芽形成について検討した。その結果、赤色光に青色光，遠赤色光をそれぞれ添加した場合、それぞれの光の添加量に依存して花芽形成が促進された。また、赤色光源のピーク波長を変化させることにより花芽形成までの期間が変化した。さらに、青色／遠赤色のみを含む光条件では、日長に関わらず青色単色光よりも優性な花芽形成誘導が観察され、その効果は子葉展開時期以降の数日で効果を及ぼしていることがわかった。

これら現象は、フィトクロムとクリプトクロムの光受容による花芽形成誘導遺伝子の活性化によるものと推察される。現在、シロイヌナズナ光受容体変異体を用いて、これら光波長による花芽形成誘導の諸条件下における各光受容体の役割と遺伝子発現について検討を進めている。

S118

光誘導性遺伝子の発現調節における３量体Ｇタンパク質の役割

吉積毅[1]，稲垣言要[2]，趙麗1，山本直樹[3]，藤澤由紀子[4]，岩崎行玄[4]，松井南[1]（[1]理研・ゲノム科学総合研究セ，[2]農水省・生物研，[3]お茶の水大・理・生物，[4]福井県大・生物資源）

光誘導性遺伝子の発現は、光受容体とその下流に展開するシグナル伝達系によって制御されており、その分子機構についての解析が進みつつある。トマトの*aurea*変異株を用いたマイクロインジェクションによる解析では、フィトクロム下流のシグナル伝達には少なくとも１種類の３量体Ｇタンパク質が関与していることが推定されている。しかし、このことを直接的に証明する実験事実は得られていない。そこで我々は、イネの３量体Ｇタンパク質αサブユニット遺伝子に変異を持つ Daikoku *d1* 突然変異株を用いて、光シグナル伝達へのこのタンパク質の関与を検証した。１０日間暗所で栽培した野生株と Daikoku d1 イネ黄化葉に赤色光あるいは青色光を３時間照射し、光誘導性を示す*LHCB, RBCS, ELIP*遺伝子の発現をノーザンブロットで解析した。その結果、Daikoku *d1*では赤色光での遺伝子発現誘導が有意に低下していることが明らかになった。このことは、フィトクロム下流のシグナル伝達の一部に３量体Ｇタンパク質が関与することを示唆している。

S119

胚軸と根の細胞伸長に異常のある *vw331* 突然変異体の解析

伏木田地、槻木竜二、岡田清孝（京都大院・理・植物）

明所で育てたシロイヌナズナ芽生えの胚軸は長さ約1～3mm に過ぎないが、暗所のものは約 25mm まで伸長する。シロイヌナズナでは発芽後の胚軸伸長は細胞分裂を伴わないため、明暗条件による胚軸の長さの違いは細胞の伸長の度合いに由来する。胚軸の細胞伸長は光や植物ホルモンによって制御されることが知られているが、その制御機構、更には細胞の伸長機構それ自体が明らかではない。

vw331 突然変異体では、暗所での胚軸伸長が抑制されている。明所での胚軸の長さに野生型との差異はないので、暗所特異的な胚軸伸長に異常のある突然変異体である。また、明暗条件に依存せず、根の細胞伸長も抑制されている。細胞伸長が抑制されているこれら両器官では、その表面が異常に隆起しているのが観察され、根では内皮、皮層、表皮細胞の肥大が見られる。以上の結果は、*VW331* 遺伝子が光条件に依存的な胚軸の細胞伸長と、光条件に非依存的な根の細胞伸長の双方に関与していることを示唆している。*VW331* 遺伝子は 1 番染色体上端に位置し、現在更に詳細なマッピングを進めている。

S120

タバコ・β-チューブリン・アイソタイプ

岡村昭治, 北条知子, 朝野明香, 酒井孝恵, 原昌司, 山口晶生, 成田琴美, 守田雅志, 今中常雄 (富山医薬大・薬)

植物細胞において微小管は細胞周期や細胞分化に伴い，細胞のおかれた時間的・空間的情報に従ってコントロールされながらダイナミックに重合脱重合を行っている．一般に高等生物においては微小管の主サブユニット蛋白であるα-, β-チューブリンは複数のアイソタイプより構成されており，その特徴は主にC末端部の酸性アミノ酸クラスター付近の構造の違いにある．この部分は微小管の外壁に露出しており，MAPsやモーター蛋白質などと相互作用を行うと考えられていることから，特定のチューブリン分子種が特定分子と相互作用することにより，特殊な役割を行っている可能性が考えられる．我々は、タバコβ-チューブリン遺伝子の多様性に注目し，その細胞周期，細胞分化における意義について調べている．これまでにタバコ細胞及び原植物のRT-PCRにより，5種の異なったβ-チューブリン遺伝子のC末端部を増幅し，細胞周期および，葯の発達過程においてそのRNAレベルの違いを見ている．またそのうちの一つのアイソタイプ，NTB3のC末端ペプチドに特異的に反応する抗体Ant.3を作成し，NTB3翻訳産物の等電点電気泳動における挙動及びその細胞内分布の特徴を調べた．今回は，これらの結果を合わせて報告する．

S121

シロイヌナズナ *ftr (fat root)* 突然変異体の解析

松井啓祐、和田拓治[1]、石黒澄衛、岡田清孝（京都大院・理・植物、[1]理化学研究所）

細胞の伸長方向の決定と分裂面の決定は植物体の形態を制御する重要な要素であるが、これらの決定機構に関する知見は限られている。私たちは、植物の形態形成の制御機構を調べるため、細胞伸長が異常になった *ftr (fat root)* 突然変異体を単離し、解析を行った。

ftr 突然変異体では、細胞が横方向（伸長方向に対して垂直方向）に肥大することにより、根だけでなく茎、葉、花器官などほとんどの器官が太く、短くなる。植物細胞において、細胞質表層微小管の配向変化が細胞の伸長方向を制御すると考えられているが、*ftr* 突然変異体の表層微小管は、野生型よりも乱れた配向を示し、*FTR* 遺伝子が表層微小管の構築に機能していることが示唆された。マップベースの遺伝子クローニングにより *FTR* 遺伝子は523アミノ酸、推定分子量約57KDaのATPaseをコードしていることがわかった。*FTR* 遺伝子の表層微小管構築における役割を、抗体等を用いて解析したので報告する。

S122

ORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON DURING THE CYCLIC RE-ORIENTATION OF CORTICAL MICROTUBULES INDUCED BY AUXIN IN EPIDERMAL CELLS OF AZUKI BEAN EPICOTYLES

Keita FUKUI, Shingo TAKAGI; Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., Toyonaka 560-0043, JAPAN

In epidermal cells of azuki bean epicotyls, auxin induces cell elongation concomitantly with cyclic reorientation of cortical microtubules(cMTs) adjacent to the outer tangential wall from longitudinal to transverse and back to longitudinal array.[1] We have shown that while auxin can induce the reorientation of cMTs independent of stem elongation, the rate of stem elongation can affect the mode of reorientation of cMTs induced by auxin. Acceleration of the rate of stem elongation increases the number of cells with transverse array and deceleration of the rate of stem elongation increases that with longitudinal array.[2] It was reported that, in the presence of cytochalasin D, the reorientation of cMTs to longitudinal array is promoted and that to transverse array is inhibited. Moreover, the number of cells with multiple array of cMTs increased.[3] To clarify a possible role of the actin cytoskeleton in the reorientation of cMTs induced by auxin, we are visualizing actin filaments by phalloidin staining after preparation of monolayer epidermal cells.

1) Mayumi and Shibaoka (1996) Protoplasma 195: 112-122
2) Fukui and Takagi (1999) Proceedings of the 63rd Annual Meeting of the Botanical Society of Japan: P068
3) Takesue and Shibaoka (1998) Planta 205: 239-546

S123

タバコ培養細胞 BY-2 の微小管束化タンパク質 TMBP200 の cDNA クローニングと細胞内局在

安原裕紀、村岡正明、正垣宏樹、森仁志[1]（関西大・工・生物工、[1]名古屋大院・生命農・生物情報制御）

フラグモプラスト微小管の間に観察される架橋構造の細胞質分裂における役割を明らかにする目的で、演者らは、分裂終期のタバコ培養細胞より、およそ 200 kDa の微小管束化タンパク質（TMBP200, Tobacco Microtubule Bundling Polypeptide of 200 kDa）を単離した。精製した TMBP200 を部分分解して得られたペプチドの N 末端配列の情報を基に、RT-PCR により、TMBP200 の cDNA 断片約 1kb を得、その塩基配列を解読した。その結果、TMBP200 は、ヒトの微小管付随タンパク質の一つである TOGp タンパク質に相同性を持つことが判明した。また、TMBP200 は Igarashi ら（ Plant Cell Physiol. 41(8): 920-931, 2000)によって報告されている 190 kDa ポリペプチドとは異なるタンパク質であった。RACE-PCR 法を用いて、TMBP200 全長 cDNA（約 6 kb）を約 3 kb の二つの断片として増幅し、現在、全塩基配列の解読を進めている。

TMBP200 の C 末部分に対して作成したペプチド抗体は間接蛍光抗体法で、BY-2 細胞の紡錘体とフラグモプラストを染色した。

S124

孔辺細胞表層微小管の構築の光による制御

福田めぐみ、桃山ゆう、浅井尚子[1]、中嶋信美[1]、馳澤盛一郎、近藤矩朗（東京大院・理・生物科学、[1]国立環境研・地域）

孔辺細胞表層微小管は日周サイクルのなかで重合・脱重合を繰り返しながら配向変化を示し、気孔開閉運動を制御している（Fukuda *et al.*, *PCP*.39,1998）。

孔辺細胞微小管の構築制御におけるタンパク質リン酸化、脱リン酸化の関与を検討したところ、kinase 阻害剤である staurosporine、DMAP は明け方に構築される放射状の微小管束を減少させ気孔開口を阻害した。phosphatase 阻害剤である okadaic acid、calyculinA は構築過程における配向のランダム化を促し、気孔開口を阻害した。また光合成阻害剤である DCMU が明け方の気孔開口を阻害し、放射状の微小管構築を阻害したことから、微小管再構築過程において光の影響が存在することが考えられ、その光による影響を調べるために、微小管が断片化している夜中の孔辺細胞に青・赤色光などを照射したときの効果やタンパク質リン酸化、脱リン酸化の関与について検討した。

S125

アズキ懸濁培養細胞の成長とスクロース代謝に対するガラクトースの阻害作用

野崎悟史，井上雅裕（愛媛大・理・生地）

植物の細胞は成長過程で色々な糖を炭素源として利用する。一方、利用される糖の種類が植物の種類や生育状態で大きく異なる場合もある。グルコース（Glc）のエピマーであるガラクトース（Gal）は単子葉植物で各組織の成長を阻害するが、アズキなど双子葉植物には巧みに利用されそれらの成長を促進することが知られている。しかし、最近の研究からアズキ懸濁培養細胞の成長とスクロース（Suc）代謝をGalが阻害することが示されたのでその機構について研究を進めた。

MS培地中でのアズキ細胞はSucとGlc（30-90 mM）のいずれを与えてもよく成長した。Galはその時の成長を共に阻害し、かつ細胞内のSuc濃度を特異的に減少させた。添加するGalの濃度をかえて3～9日間培養し、細胞の成長速度、Viability（TTC還元力）、Suc濃度の関係を調べた結果、三者はほぼ平行して変化していた。さらに短時間の影響を調べた結果、Gal添加後少なくとも12時間までは、Viabilityと成長速度が低下しないことが判明した。その細胞のSucやGal濃度を測定し、Suc代謝と成長阻害の関係並びに、Sucが減少する機構の両方を今後解明する。

S126

複数の多糖類分解酵素活性に対するトウモロコシ幼葉鞘細胞壁グルカナーゼとキチナーゼの影響

丸岡弘和, 北西弘幸, 井上雅裕, B. R. Thomas[1], D. J. Nevins[1]（愛媛大・理・生地, [1]Univ. California Davis）

トウモロコシ（*Zea maize* L.）幼葉鞘細胞壁には β-(1,3)(1,4)-グルカン分解を触媒する２種類のグルカナーゼが含まれオーキシンによる細胞成長に重要な役割を担っている。それらの酵素活性は、幼葉鞘細胞壁から精製した酸性蛋白質及び他生物由来のキチナーゼによって促進される。その促進機構を詳しく調べた結果、キチナーゼ蛋白質がグルカナーゼの可逆的なアクチベーターであることが判明した。さらに、キチナーゼ自体が熱とpH変化に安定なため、グルカナーゼの保護蛋白質であることも同時に示唆された。

以前の研究で異種グルカナーゼが協同的にグルカン分解を高めることを報告している。そこで、他の複数の細胞壁多糖類分解酵素活性に対するグルカナーゼとキチナーゼの作用を調べた。その結果、少なくともセルラーゼ活性は上記グルカナーゼとキチナーゼによって顕著に促進されないことがわかった。現在、基質と温度・pH条件を変えてさらに詳しく調べている。

S127

タバコ BY-2 細胞のセルロース合成阻害に伴う分泌タンパク質の変化

佐合秀康　中川直樹　桜井直樹
（広島大総合）

植物細胞壁のセルロース合成を研究するために、我々はタバコ BY-2 細胞にセルロース合成阻害剤(DCB)を馴化させた DCB 細胞を用いてきた。これまでに DCB 細胞と BY-2 細胞の細胞壁の糖組成、CesA 蛋白質の量、細胞壁に関る遺伝子の発現を比較してきた。今回は細胞壁に分泌される蛋白質の違いに着目した。磨砕した細胞壁から LiCl で抽出した蛋白質を SP - トヨパールを用いて、6 段階の NaCl 濃度で分画して SDS-PAGE にかけた。そのうち 100mMNaCl 画分において DCB 細胞で強く発現している 17kD のバンドの N 末 21 アミノ酸を解析した。ホモロジー検索によりこのバンドは Nucleosido Diphosphate Kinase（NDPK）と高い相同性を示すことが分かった。N 末配列とホモログ遺伝子に共通する配列からプライマーを設計し RT－PCR により部分的なクローニングを行った。得られたシークエンスを用いて BY - 2 細胞と DCB 細胞の NDPK の発現をノーザンで調べた。また細胞壁タンパク画分および、生細胞の NDPK 活性、さらに基質特異性を調べた。その結果 NDPK 活性は DCB 細胞で高く、GDP に対する特異性はほかの NDP よりも高かった。

S128

UV-B照射により引き起こされる植物の防御機構

柿田美智子　中川直樹　桜井直樹
（広島大学・総合科学）

植物がUV-Bを防御する機構としてフラボノイド色素の生成・蓄積に関する研究が多く報告されている。しかし、液胞中に蓄積されるフラボノイド類よりも、細胞壁成分であり、UV-B域に吸収を持つリグニンのほうがUV-Bの遮蔽には有効ではないかと考えた。アラスカエンドウを用い、UV-Bを照射後、胚軸を表皮と内皮組織に分け磨砕し、沈殿画分を除タンパクのためアルカリ処理したのち、乾燥させ、リグニン量をアセチルブロマイド法で定量した。また、リグニンの分布を胚軸の横断切片を用い、２８０nmの蛍光で調べた。この結果、UV-B照射によりエンドウ表皮・内皮においてリグニン量が増加する傾向がみられた。

S129

シロイヌナズナ茎頂部で高発現するエンド型キシログルカン転移酵素 EXGT-A6 遺伝子の発現解析

○山川清栄、兵頭秀貴、横田明穂、西谷和彦*、河内孝之
（奈良先端大・バイオ、*東北大院・理）

花序茎頂分裂組織は、植物の地上部全器官の源となる組織であり、発生段階に応じた細胞の分裂・拡大により、植物の分化・形態形成を司る。我々はこれまで、シロイヌナズナの均一化ライブラリーを用いたディファレンシャルスクリーニングにより、花序茎頂において高レベルの発現が見られる新規エンド型キシログルカン転移酵素(EXGT)をコードする遺伝子 *EXGT-A6* を単離し、その cDNA およびゲノム遺伝子の一次構造を明らかにした。EXGT は、細胞のキシログルカン架橋の切断・繋ぎ換えを触媒する酵素であり、細胞壁の再編成を通して細胞生長や形態形成の中心的役割を担うと考えられている。本研究では、*EXGT-A6* 遺伝子の発現時期および組織特異性について解析を行った。

播種後2日-40日目のシロイヌナズナの各組織より RNA を抽出し、*EXGT-A6* cDNA をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。栄養生長期では、茎頂部分に発現が見られた。生殖生長期については、抽苔開始直後では、茎頂部分を含む花序の中心部(inner bud)と花柄伸長の始まった周辺の蕾(outer bud)の両者で強いシグナルが観察されたのに加えて、伸長の盛んな第一花茎上部にもシグナルが観察された。開花が盛んな時期では、inner bud、outer bud に加えて、花柄においても強いシグナルが観察された。茎の細胞伸長欠損ミュータントである *acl1*～*acl4* に関して同様の解析を行ったところ、花芽における発現量は野生型と変わらないのに対し、茎における発現は著しく減少していた。

S130

黄化カボチャ下胚軸のアポプラストに存在するアルデヒド酸化活性

鶴崎健一（福山大・人間文化・環境情報）

以前、本大会で黄化カボチャ下胚軸の成長帯のアポプラストに、インドールアセトアルデヒド（IAAld）を IAA に変換することができるアルデヒド酸化酵素が存在し、native-PAGE 後の活性染色より、アポプラストの IAAld 酸化活性は、既知のアルデヒド酸化酵素のアイソザイムであることを報告した。今回は、本酵素の性質の一部を報告する。基質特異性を調べるため、６種類のアルデヒド基質を用い、native-PAGE 後の活性染色を行うと、アセトアルデヒドで最も活性が強く、二番目が IAAld の代わりに用いたインドールアルデヒドであった。IAAld に対する Km 値を求めると、120 μM で、比較的親和性が低いことが分かった。さらに、下胚軸の成長帯と成長の停止した部分で活性を比較すると、ほぼ同じ程度の強さであった。以上の結果から、この酵素は IAA の合成に関与するというよりも、アポプラスト中での解毒などほかの作用に関与している可能性が高いと思われる。現在、本酵素の精製を進めている。

S131

ネナシカズラの寄生根形成には、細胞壁関連酵素群が総動員されている。

蓮沼明子、若杉達也、古橋勝久[1]、山田恭司
（富山大・理・生物、[1]名産大・環境情報）

寄生根（吸器）とは、寄生植物が宿主から養分や水分を奪取するために形成する特殊な吸収器官である。我々は、寄生根形成の分子機構を解明するために、ネナシカズラ芽生えの寄生根分化同調誘導系を用いて研究をすすめている。これまでの研究から、寄生根形成過程では、細胞壁の分解・再構築に関わる種々のタンパク質がダイナミックに動員されていることが明らかになってきた。本会の昨年度大会では、細胞伸長に関わる expansin と endoxyloglucan transferase について、それぞれ 4 つのアイソフォームが、寄生根形成の様々な段階に、おそらく役割分担をしながら関与している可能性を示した。今回は、β-1,4-glucanase(GL)、exo-β-glucosidase(EXG)、pectin methylesterase(PME)およびpolygalacturonase(PG)について、転写レベルでの詳細な発現解析をおこなった。ネナシカズラから上記の酵素の cDNA を単離し、その発現パターンを寄生根誘導処理後、経時的に調べた。GL と PG は、誘導処理後 36 時間目で最も強く発現していたが、この時期は、寄生根が自分自身の表皮から突出し始める時にあたっていた。EXG と PME は誘導処理後 48 時間目に最も強く発現していたが、この時期には、寄生根が宿主組織に完全に侵入してしまっている。これらの mRNA 蓄積量の増加は、寄生根を誘導できる条件を適切に与えた場合だけでしか観察されず、寄生根形成に伴って起きる現象であることが確かめられた。現在、in situ hybridization による解析をすすめているが、その結果についても報告する。

S132

脱メチルエステルによるアボカド果実細胞壁ポリウロナイドの分解の促進

若林和幸、保尊隆享、Donald J. Huber[1]（大阪市大・院理・生物、[1]フロリダ大・園芸）

アボカド果実の追熟過程では、細胞壁成分のうち、水可溶性ポリウロナイドが急激に増加し、その分子量は大きく低下した。この水可溶性ポリウロナイドのメチルエステル量も、追熟に伴い大きく減少し、分子量の低下と平行する傾向にあった。成熟の中間段階にある果実から抽出した水可溶性ポリウロナイドは、比較的高分子で高いメチルエステル化率(70-80%)を示した。このポリウロナイドをアボカド及びトマト果実から精製したポリガラクツロナーゼ(PG)で処理しても、分子量の大幅な低下は見られなかった。一方、上記の水可溶性ポリウロナイドをペクチンメチルエステラーゼ(PME)あるいは弱アルカリで処理すると、メチルエステル量が10%以下まで大きく低下した。この前処理したポリウロナイドをアボカドあるいはトマトのPGで処理すると、果実の追熟の際に見られた大幅な分子量の低下が誘導された。以上の結果から、ポリウロナイドに結合するメチルエステルは、PGに対するポリウロナイドの親和性を規定する要因となっており、分解の制御において重要な役割を持つと考えられる。

S133

細胞壁再生過程におけるタバコ酸性ホスファターゼ遺伝子の発現解析

海田るみ, 小野公代[1], 鎌田博[1], 金子堯子[2] (日本女子大院・理・物生機能, [1]筑波大・生物, [2]日本女子大・理・物生)

私たちは、タバコ細胞 XD-6 の細胞壁に局在する酸性ホスファターゼ(WP-II)が、プロトプラストの細胞壁再生に重要な役割を担っていると考え、研究を進めている。これまで、本酵素が細胞壁の再生を促進することを組織化学的研究法により示してきた[1]。また、タバコ細胞の cDNA ライブラリーより、4 種類の WP-II の cDNA クローンを単離し、推定されたアミノ酸配列より、これらは purple acid phosphatase (PAP)遺伝子ファミリーのメンバーであると報告した[2]。

今回は、プロトプラストの細胞壁再生過程におけるタバコ PAP 遺伝子(*TPAP4, TPAP12, TPAP19, TPAP21*)の発現を解析する目的でノーザンブロットを行った。プロトプラストを細胞壁再生培地で培養すると、3 時間以内でセルロース微繊維がプロトプラスト表面全体に蓄積される。細胞壁再生に伴い、4 種類のタバコ PAP 遺伝子のうち、*TPAP12* および *TPAP21* において速やかな mRNA の増加が認められた。一方、*TPAP4* は恒常的に発現しており、*TPAP19* mRNA は検出限界以下であった。この結果から、タバコ細胞プロトプラストの細胞壁再生には *TPAP12* および *TPAP21* が関与していると推測される。

1)日本植物学会第 64 回大会研究発表記録 p.203.
2)日本植物生理学会 1999 年度年会講演予稿集 p.129.

S134

ラムノガラクツロナンIIの構成糖，アピオースと3-デオキシ-D-*manno*-オクツロソン酸の合成酵素に関する研究　2

松浦啓一，須田泉，中川広宣，小林優，間藤徹（京都大院・農・応用生命・植物栄養学）

細胞壁ペクチン質多糖は，アポプラストにおける無機イオンの濃度調節，細胞壁ポアサイズの決定，保水などに機能している。そのネットワークはラムノガラクツロナン(RG)-II部位でのホウ酸とカルシウムによる架橋によって細胞壁に保持されている。ホウ酸はRG-IIのアピオース，カルシウムは3-デオキシ-D-*manno*-オクツロソン酸同士をエステル結合，配位結合で架橋している可能性がある。本研究はこれら無機元素によるペクチン鎖架橋の生理的意義を明らかにするため，これら架橋部位を量的に変化させた形質転換植物の作成を目的としている。そのためアピオース合成酵素(AS)と3-デオキシ-D-*manno*-オクツロソン酸8リン酸合成酵素(KDOS)のcDNAクローニングを試みた。精製酵素の部分アミノ酸配列あるいは微生物酵素遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計し，RT-PCRで増幅された断片をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングした。ASは活性が不安定で精製できなかったので反応中間体を共有するUDP-キシロース合成酵素cDNAを単離しそのホモログを探索する計画である。現在両酵素の候補cDNAについて大腸菌で組換蛋白質を発現させ活性の確認を行っている。

S135

アスパラガス胚形成時に分泌されるペルオキシダーゼの機能解析

竹田浩之、小竹敬久、中川直樹、桜井直樹
（広島大・総合科学）

我々はアスパラガスの不定胚を植物材料として用い、胚形成時にアポプラストに分泌されるタンパク質に注目して研究を行っている。これまで不定胚形成時に細胞壁に分泌される41 kDa の塩基性タンパク質に注目し、そのクローニングと発現解析を行ってきた。cDNAから予想されるアミノ酸配列が植物のペルオキシダーゼと高い相同性が見られたことから、このタンパク質をAspPOX1と名付けた。発現解析の結果、AspPOX1の転写産物は胚形成過程の比較的初期の段階で多く検出され、AspPOX1と胚形成との関係を示唆していた。AspPOX1タンパクのさらなる機能を明らかにするため、フェニルプロパノイドやチロシン、IAAなどを基質にして反応をみたところ、リグニン前駆体であるコニフェニルアルコールに強い基質特異性が認められた。しかし実際に胚形成過程の細胞壁のリグニン量を測定してみたところリグニンの増加は全く見られなかった。AspPOX1タンパクによるコニフェニルアルコールの代謝産物をHPLCで分離・分取し、GC-MSによる構造解析を試みたところこの産物はdehydrodiconiferyl alcohol であることが確かめられた。この結果をふまえ、AspPOX1タンパクの胚形成過程の細胞壁における役割について検討している。

S136

過重力刺激の除去にともなうアズキおよびトウモロコシ芽生えの成長回復

曽我康一[1,2]、若林和幸[2]、保尊隆享[2]、神阪盛一郎[3]
([1]岡山県生物科学総合研究所、[2]大阪市大院・理・生物、[3]富山大・理・生物)

過重力環境下でアズキおよびトウモロコシ芽生えを生育させると、細胞壁マトリックス多糖が高分子化することによって細胞壁伸展性が低下し、伸長成長が阻害される。また、マトリックス多糖の高分子化には、アポプラストの pH 上昇に起因するマトリックス多糖の分解抑制が関与している。これらの過重力環境で生育させた芽生えを 1 g の下に移すと、器官の成長速度は数時間以内に回復した。また、この成長速度の回復は、マトリックス多糖の分子量が対照レベルに戻り細胞壁伸展性が上昇するために起こることが示された。さらに、マトリックス多糖の分子量の戻りには、アポプラストの pH 低下に起因するマトリックス多糖の分解促進が関与していると考えられた。以上のように、成長や細胞壁代謝に対する過重力刺激の影響は刺激が存在する間のみに現れるものであり、刺激の除去に伴って速やかに消失することが明らかになった。植物は、重力の大きさに応じて柔軟に成長速度を調節し、適応する能力を有するものと思われる。

S137

湿度による根の細胞壁粘弾性の変化

谷本英一，山本良一1，藤井修平1，稲永忍2，杉本裕幸2
（名古屋市大院システム自然科学，1帝塚山短大・食品，2鳥取大・乾燥地研究センター）E-mail; tanimoto@nsc.nagoya-cu.ac.jp

根にはクチクラがないためアポプラスト空間は外界とつながっている。このため，細胞壁は湿度やｐＨなどの外界の影響を直接受ける。そこで我々は，根細胞壁の物性がｐＨや湿度等の外部環境への反応を解析し，根の外界への応答に細胞壁が関与する可能性を調べた。

細胞壁粘弾性は，クリープメータ（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(η0, η1, η2)を指標とした。

脱水の効果：メタノール固定した根の切片を，各種の濃度のエタノール(EtOH)溶液（蒸留水希釈）に浸した後，同じ溶液中で粘弾性を計測した。 EtOH濃度の上昇に伴ってすべての粘弾性パラメータが大きくなり（E0は約８倍，η0は約１１倍），伸展性が低下した。エタノール濃度と６つのパラメータの関係を詳しく見ると，粘性成分の方が弾性成分より脱水に対して敏感であることが示された。

加湿の効果：根の形態をできるだけ保持したまま乾燥し，一定湿度に平衡化した根の粘弾性を計測した。 湿度の上昇に伴って粘弾性係数は大きく低下し，伸展性が大きくなった。粘性係数は吸湿性の高い成分の物性と関係しており，弾性率(E0)は比較的吸湿性が遅い部分によって担われている可能性が示された。ペクチンなどの部分抽出によって，さらに，このような水分子と物性の関係を調査中である。

S138

ジベレリンによる細胞壁多糖の変化--アラスカエンドウ根軸に沿ったヘミセルロース分子量分布に対する効果--

梅田高呂，Capek P，Huber D，谷本英一
（名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科）
E-mail: t.umeda@gns.nsc.nagoya-cu.ac.jp

細胞壁マトリクス多糖は，ジベレリン（ＧＡ）による根の成長制御においても役割を果たしていると考えられる。我々は既にペクチンの分子量がジベレリンによって増加することを報告したが、ヘミセルロース多糖については知られていなかった。本研究ではアラスカエンドウ根のヘミセルロース多糖の分子量分布を分析し，ＧＡの効果を調査した。

GA処理した根には，アンシミドール処理によって成長が抑制された根よりも，大きなキシログルカンとヘミセルロース分子が存在した。このようなジベレリンの効果は根の伸長域と成熟域では観察されたが、根端分裂組織帯では観察されなかった。根端部のキシログルカンとヘミセルロースは，基部の細胞壁より分子量分布が大きかった。アンシミドール処理で伸長が抑制され肥大した根では，細胞壁の齢が進行し，マトリックス多糖の低分子化が進行するものと考えられる。ジベレリンはこの齢の進行を抑制し高分子多糖の供給を促していることが示唆された。このことは，細胞壁の伸展性との関係において，幼葉鞘切片でみられるオーキシン誘導伸長のメカニズムとは異なる機構が存在することも示唆している。

S139

脱分化と分裂組織形成に関する
シロイヌナズナ温度感受性変異体 *srd2* の解析

大谷美沙都、杉山宗隆（東大院・理・植物園）

植物の組織培養で見られる脱分化、再分化は、植物細胞のもつ分化全能性を端的に反映する現象である。分化全能性発現の分子機構の解明を目指して、私たちはこれまでに脱分化、再分化に関するシロイヌナズナ温度感受性変異体を多数単離し、解析を行ってきた。その一つ、*srd2* 変異体は、胚軸の脱分化に関しては強い温度感受性を示すが、根の脱分化に関しては温度感受性を示さず、また脱分化後の細胞増殖は正常であるが、シュート頂、根端分裂組織形成過程は温度感受性を示す、など大変興味深い特徴をもつ。これらの表現型から、*SRD2* 遺伝子は細胞増殖能の励起全般に関与し、脱分化過程では増殖能を持たない組織が増殖能を獲得する場合に、分裂組織形成の過程ではこれに先立って必要な増殖能レベルの上昇に働く、と推理している。精密マッピングを行った結果、*srd2* 変異は第Ⅰ染色体の 43 cM の位置、約 4 kb の範囲に存在すると推定された。これは F3M18.4 という CDS の前半部とその上流域に相当する。現在この範囲の塩基配列の決定とあわせて、変異形質の相補能検定を進めている。

S140

熱帯樹木クロトン *Codiaeum variegatum* における表現型の多様性

下地　寿，貝沼真美，山崎秀雄　（琉球大・理・海洋自然）

クロトンは、「枝変わり」と呼ばれる体細胞突然変異を高頻度に引き起こす熱帯性樹木である。挿木によって人為的に選抜、固定された園芸品種の数は現在百以上に及んでいる。これまでクロトンが生物学研究の対象となったことは殆ど無く、高頻度の体細胞変異を引き起こす原因は全く分かっていない。本研究では、特徴的な6系統の葉外部形態と遺伝子多型について比較解析を行った。クロトンの葉長と葉幅の測定を行ったところ、系統間で葉長に対する葉幅の比率の顕著な違いが見られた。クロトンゲノム多型を調べるためにRAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）法を適用した結果、系統に特有な数本のマーカーが検出された。また、クロトンゲノム中に転移因子様配列が存在することがPCR法によって示された。クロトンに見られる高頻度体細胞突然変異と転移因子の関係について考察する。

S141

発表取消

S142

シロイヌナズナの内皮細胞層では液胞膜関連遺伝子が重力屈性に必要である。

森田（寺尾）美代[1]、加藤壮英[2]、上田貴志[3]、齊藤知恵子[3]、中野明彦[3]、田坂昌生[1]（[1]奈良先端、[2]京大院、[3]理研）

高等植物のシュートは一般に負の重力屈性反応を示す。我々は重力感受から刺激伝達の分子メカニズムを理解するため、花茎の重力屈性変異体*sgr*をシロイヌナズナから単離、解析している。

*sgr2*変異体では重力屈性異常に加えて、受精卵の頂端側に形成される大きな液胞の為に、その後の胚発生にも異常が見られる。SGR2は、膜貫通領域を持つウシホスホリパーゼＡ１と相同性を示した。SGR2-GFP融合蛋白質は培養細胞中で、液胞膜及びエンドソームに局在した。一方*sgr4/zig*変異体は、花茎が節で折れ曲がりジグザグな形態を示す。*ZIG*は、酵母において液胞への小胞輸送に関わるv-SNARE、*Vti1*のホモログとして単離された*AtVTI1a*と同一であった。*SGR2*、*ZIG*ともに植物体全体で発現していた。花茎の重力感受には、重力方向に移動するアミロプラストを含む内皮細胞層が必須であるが、*sgr2*、*zig*変異体は共にアミロプラスト分布の異常を示した。内皮細胞特異的な*SCR*プロモーターで各遺伝子をそれぞれの変異体中で誘導すると、重力屈性反応を相補し、アミロプラスト分布も正常であった。一方で*pSCR::ZIG*は*zig*変異体の花茎の形態を相補しなかった。以上の結果から、内皮細胞にあるSGR2・ZIGが花茎の重力屈性反応に重要であり、他の組織ではそれ以外の役割を担うことを示している。またそれぞれの変異体の表現型および局在や機能から、ZIGがSGR２のエンドソーム／液胞への輸送を担い、内皮細胞内の液胞等の膜系が重力屈性に関与することが推測される。

S143

管状要素自己分解過程における加水分解酵素の空間的解析

井藤 純、中島 仁、福田裕穂(東京大・院・理・生物科学)

道管・仮道管を構成する管状要素の分化過程では、厳密に制御されたプログラム細胞死が起こり、最終的に管状要素は中空の死細胞へと分化する。私たちは、ヒャクニチソウ管状要素分化系を用いて、自己分解に伴って活性が上昇する加水分解酵素、S1 型ヌクレアーゼ *ZEN1*、リボヌクレアーゼ *ZRNaseI*、システインプロテアーゼ *ZCP4* に着目し、これらの自己分解、とくに核分解との関連を明らかにすべく研究を行っている。今回、各加水分解酵素のタンパク質レベルでの挙動を調べるため、各酵素に対する特異抗体を作製した。得られた抗体を用いて分化に伴う発現パターンを調べたところ、ZEN1、ZRNaseI 及び ZCP4 はいずれも mRNA の発現とほぼ一致して自己分解直前の時期に一過的に発現することがわかった。このことから、これらの加水分解酵素の発現は転写レベルで制御されていると考えられた。また、抗 ZEN1 抗体を用いた免疫局在解析から、少なくとも ZEN1 は管状要素へと分化しつつある細胞で ER、ゴルジ体を経て液胞へと輸送されることが明らかとなった。現在、ZRNaseI、ZCP4 の免疫局在解析と、核分解関連因子として新たなヌクレアーゼの探索を行っているので、これらの結果をあわせて報告する。

S144

未成熟な木部細胞から分泌された TED4 タンパク質は管状要素に隣接する細胞を守る

遠藤暁詩、出村拓[1]、福田裕穂(東大院・理・生物科学、[1]理研・植物科学研究センター)

管状要素(道管・仮道管構成細胞)は分化の最終局面で中空の構造物となるため、その細胞内容物は周囲へ流出する。TED4 はそのような管状要素の形態形成に先立って細胞外に分泌されるタンパク質である。私達はこれまでに、ヒャクニチソウ管状要素分化系を用いた解析から、管状要素の自己分解に伴って流出するプロテアソームに対し、TED4 タンパク質がインヒビターとして機能しうることを明らにしてきた。そこで、TED4 タンパク質のインヒビターとしての機能と管状要素分化過程での役割に着目して解析を進めた。まず、管状要素の自己分解の直前に TED4 タンパク質を除去して培養を続けたところ、管状要素以外の細胞の死亡率が増加した。この場合、プロテアソームの活性も細胞外において検出された。つぎに TED4 タンパク質を除去するとともに、プロテアソームインヒビターであるラクタシスチンを添加して培養を行ったところ、死亡率は通常の培養時と同等のレベルにまで抑えられた。これらの結果から、TED4 タンパク質が、管状要素から流出したプロテアソームの活性を阻害することで周囲の細胞を守っていることが示唆された。

S145

Rubisco のグリケーションとそれにともなう Rubisco のプロテアーゼに対する感受性の増加

江尻千徳、山内靖雄、田中淨(鳥取大・農・植物機能学)

生体内タンパク質は時間とともに共存する還元糖による修飾(グリケーション)を受け、その機能が低下することが知られている。今回我々は、Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) に注目し、その in vivo、in vitro でのグリケーション機構、およびグリケーションを受けた Rubisco のプロテアーゼ感受性について調べた。

Rubisco のグリケーションはタンパク質のグリケーションにより化学的に生成される AGE (advanced glycation end products)、carboxymethyllysine、pentosidine に対する 3 種類のモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。

精製 Rubisco を還元糖(グルコース)と in vitro で共存させたところ、インキュベート開始から 3 日目に 3 種類の抗体と反応するグリケーション生成物が見られた。また、Rubisco はグリケーションとともに高分子化し、グリケーションにともないサブユニット間に架橋が生じていることが分かった。In vivo では、Anti-AGE 抗体のみがシグナルを示し、in vivo でのグリケーションは in vitro とは異なるメカニズムで起こっていることが示唆された。植物由来のものを含むプロテアーゼを用いた実験により、グリケーションを受けた Rubisco は native なものよりプロテアーゼによる分解を受けやすくなっていることがわかった。これらの結果から、植物体内での Rubisco 分解についてのモデルを考察した。

S146

栄養器官型液胞プロセシング酵素の活性化機構とその生理機能

黒柳美和, 山田健志[1], 西村いくこ[1], 西村幹夫
(基生研・細胞生物, [1]京大院・理・植物)

液胞プロセシング酵素 (Vacuolar processing enzyme; VPE)は, 高等植物の種子タンパク質の成熟化に関する新規のシステインプロテイナーゼであるが[(1)], 葉や根などの器官では栄養器官型器官 VPE がストレスや老化によって誘導されることをこれまでに明らかにしてきた[(2)]. この栄養器官型 VPE の特性を明らかにする目的で, γVPE の活性発現の機構およびその生理的役割について解析を行った.

γVPE の遺伝子をバキュロウィルスシステムを介して昆虫細胞(Sf21)に導入したところ, 55 kDa と 57 kDa のγVPE が細胞内に発現した. 55-kDa γVPE はシグナルペプチドから始まるプレプロ型前駆体であること, 一方, 57-kDa γVPE は糖鎖が付加されたプロ型前駆体であることが分かった. 55-kDa の前駆体は, 酸性条件下で放置すると, 一定のラグタイムの後中間体を経て成熟型に変換され, 生成する成熟型の量に比例した活性が検出されることが明らかになった. これらのプロセシング様式の解析により, 栄養器官型 VPE の活性発現は自己触媒的に起こり, 不活性型のプロ型前駆体が, 中間体を経て活性を持つ成熟型に変換されることが示された. さらに, 蛍光基質を用いた γVPE の反応速度解析や VPE の活性に及ぼすプロテアーゼインヒビターの影響, その阻害様式についても報告する.

(1) Hara-Nishimura et al. (1993) *Plant Cell*, 5: 1651-1659
(2) Kinoshita, Yamada et al. (1999) *Plant J.*, 19, 43-53

S147

高等植物におけるオートファジーに関する解析

花岡秀樹[1,2]、野田健司[1,2]、白野由美子[3,4]、佐藤修正[5]、加藤友彦[5]、林浩昭[6]、柴田大輔[3,5]、田畑哲之[5]、大隅良典[1,2]
([1]基生研,[2]総研大,[3]三井業際植物,[4]New Jersey 大,[5]かずさDNA 研,[6]東大院・農・応生化)

オートファジー（自食作用）とは、栄養飢餓に伴い、細胞が細胞質成分を液胞等へ輸送、分解するという真核生物に普遍的に存在する現象である。我々はこれまでにオートファジーに関わると予想されるシロイヌナズナの cDNA（*AtAPG* genes）を7つ単離した。そして、高等植物におけるオートファジーの生理的機能を探るために各遺伝子の T-DNA 挿入破壊株をスクリーニングし、 *atapg9-1* という遺伝子破壊株を得た。*atapg9-1* は窒素源欠乏、炭素源欠乏の両条件下において、葉のクロロシスが野生型株よりも早く誘導されることが示された。また、切り葉に老化を誘導すると、野生型株よりも早く老化が誘導され、さらに最終的に枯死した葉の様相に野生型株との違いが観察された。これらのことから、老化や栄養欠乏時においてオートファジーが果たす役割について議論したい。

S148

シロイヌナズナ緑葉における暗所誘導遺伝子の発現制御

中川由香、吉田聡子、藤木友紀、伊藤正樹、西田生郎、渡邊昭（東大・院理・生物科学）

われわれはシロイヌナズナの緑葉から暗処理によって発現が誘導される *din* 遺伝子群(dark-inducible genes)を単離し、その解析を行ってきた。*din* 遺伝子群は数時間の暗処理で発現が誘導されるもの(*din3*)と、一日以上の暗処理が必要なもの(*din2*、*din9*)とに大別される。これら全ての *din* 遺伝子群の発現には糖レベルの低下が必要であり、培養細胞を糖飢餓状態に置いて3時間で一様に発現が誘導される。従って、植物体における発現時期の違いは糖以外の別の因子により調節されていることが推察される。暗所に置いた切り葉にカルモジュリン阻害剤である W-7 を投与すると、*din2*、*din9* 遺伝子の転写産物量の増加はコントロールに比べ、早い時期に認められたが、*din3* 遺伝子には影響がなかった。そして老化が早く起きる変異体 *hypersenescence1* に暗処理を行うと、*din3* 遺伝子は野生型と比べて変化がないのに対して、*din2*、*din9* 遺伝子の転写産物蓄積は変異体において早まっていることが明らかになった。以上の結果から、長時間の暗処理で発現が誘導される *din2*、*din9* 遺伝子の発現制御には糖以外の要因として葉の老化が必要であり、そこにカルモジュリンを介した系路が関与する可能性が考えられる。

S149

2種のタバコ*lip19*サブファミリー遺伝子の特徴付け

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

稲の*lip19*は、低温誘導性遺伝子として単離された。我々はタバコより2種の*lip19*相同性遺伝子、*tbz17*と*tbzF*、を単離し、その特徴づけを行ってきた。今回、タバコ植物体の生育に伴うmRNAの局在部位と、遺伝子産物であるTBZ17とTBZFの至適DNA結合配列を決定したので報告する。

*tbz17*と*tbzF*の遺伝子産物は、それぞれ145アミノ酸と144アミノ酸からなるbZIPタンパク質であり、両者は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も示してきた。

Random Binding Site Selection法を用いて、TBZ17やTBZFの至適結合配列を同定した所、両者はA-box/G-boxとC-box/G-boxのハイブリッドモチーフを含む配列に優先的に結合することが判明した。

*tbz17*と*tbzF*は、低温(4℃)処理によりmRNAの蓄積がみられたが、生育に伴う発現制御が起こることも明らかとなった。すなわち、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より多くみられたが、*tbzF* mRNAの蓄積は老化葉に加え、花芽周辺組織でも観察された。*in situ* hybridizationにより、*tbz17*は老化葉の孔辺細胞で、一方*tbzF*は花および老化葉の孔辺細胞で発現量が多いことがわかった。

以上の結果を踏まえ、*tbz17*と*tbzF*の役割について考察する。

S150

接触および光刺激による葉緑体運動の運動機構の解析

佐藤 良勝[1]、和田 正三[1,2]　門田 明雄[1]（[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糸体では葉緑体光定位運動が、弱光下での誘引反応、強光下での逃避反応は、青色光吸収色素、フィトクロムの両方にに調節される。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、フィトクロムに調節される運動は微小管系に依存するのに対し、青色光吸収色素による運動は、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。一方で、葉緑体運動は、光だけでなく、接触刺激によっても誘導される。ホウライシダでは、アクチン繊維に依存する接触部位逃避運動が誘導されることはすでに報告したが、コケ植物では、接触部位に集まる接触部位誘引反応が誘導された。そこで、ヒメツリガネゴケにおける接触部位誘引反応の運動機構を調べた結果を報告する。

F201

雄性両性同株型キュウリにおける*M*ローカスとエチレンによる性表現の制御

山崎聖司，藤井伸治，松浦誠司[1]，高橋秀幸（東北大院・遺生研，[1]（株）トーホク）

雌雄同株植物のキュウリでは，遺伝的に*F*および*M*ローカスによって性表現が制御されている．すなわち，これらのローカスの優劣の組み合わせによって，雌性型（*M-F-*），混性型（*M-ff*）および雄性両性同株型（*mmff*）の異なる性表現型品種が生み出される．一般に，雌性型キュウリは，混性型キュウリに比べて多くのエチレンを発生することが知られている．本研究において，雄性両性同株型キュウリの茎頂におけるエチレン発生量と*CS-ACS2*遺伝子の発現量は，ともに混性型キュウリと同程度であり，且つ，雌性型キュウリに比べて低いことが明らかになった．また，エチレンは，雌性型キュウリでは雄蕊の発育を抑制するものの，雄性両性同株型キュウリでは抑制しないことが明らかになった．さらに，*CS-ETR2, CS-ERS*および*CS-ACS2*遺伝子発現は，雌性型キュウリと混性型キュウリの茎頂ではエチレン誘導性を示すが，雄性両性同株型キュウリの茎頂ではエチレン誘導性を示さないことが明らかになった．また，低濃度のエチレン存在下での胚軸の伸長阻害は，混性型キュウリや雌性型キュウリに比べて雄性両性同株型キュウリで小さいことが明らかになった．これらの結果は，雄性両性同株型キュウリでのエチレン応答性は，混性型キュウリや雌性型キュウリに比べて低下していることを示唆している．このことは，キュウリにおいてエチレンシグナルが*M*ローカスの産物を介して雄蕊の発育を抑制することを示した初めての結果である．以上のことから，雄性両性同株型キュウリは，花の性決定時の*M*ローカスの機能を解析する上で，興味深い品種であることが示された．

F202

光によるブラシノステロイド生合成遺伝子の発現制御

嶋田幸久、郷田秀樹、宮内成真、永田典子、浅見忠男、藤岡昭三、吉田茂男（理研・植物センター生長制御、理研・植物機能）

植物の成長過程は光によって厳密にコントロールされている。これまでアラビドプシスミュータントの解析から、ブラシノステロイドは光形態形成過程に関与する可能性が示唆されてきた。また、光がブラシノステロイドの生合成にネガティブに働くことが示唆されてきた。しかし、光がブラシノステロイドの生合成をどのように調節しているのか解明されていない。そこで、アラビドプシスを用いてブラシノステロイド生合成遺伝子の発現が光でどの様に制御を受けているのかを、リアルタイム定量RT-PCRを用いて調べた。生合成遺伝子としては6位酸化酵素（*BR6ox*）、22位水酸化酵素の候補（*DWF4*）、23位水酸化酵素の候補（*CPD*）遺伝子などを調べた。明所または暗所で5日間～7日間生育させた植物体では、これらの遺伝子の発現は全体としては光にネガティブに応答する傾向があった。一方、明所また暗所で6日間生育させた植物を明所から暗所、暗所から明所へ移した際のタイムコースでは、光によってネガティブに制御される成分とポジティブに制御される成分が存在することがわかった。これら遺伝子発現と光環境によるブラシノステロイド内生量の変動を総合的に考慮すると、ブラシノステロイド生合成は光によってより複雑な制御を受けている可能性が浮かび上がった。光の強度を変化させたり、波長を変化させたときの結果も併せて報告する。

F203

光はイネのブラシノステロイド生合成を促進する

横田孝雄、野村崇人、佐藤達郎[1]、小林誠（帝京大・理工・バイオ、[1]宇都宮大・農・野生植物）

明・暗条件で育てたイネの茎葉及び根からcastasterone、typhasterol、teasterone、6-deoxocastasterone、6-deoxotyphasterol、3-dehydro-6-deoxoteasterone、6-deoxoteasterone、6-deoxocathasteroneをGC-SIMにより同定した。3-dehydroteasteroneは茎葉のみから検出された。一方、brassinolideおよびcathasteroneはいずれの試料からも検出されなかった。茎葉においては、明条件でのBR含量を暗条件と比べると、typhasterolの量が33倍に、castasteroneの量が6倍に増加した。他のBR含量は2-3倍に増えた。光はイネ茎葉において、C-6酸化酵素を活性化して、6-deoxocastasteroneからcastasteroneへの変換、および特に6-deoxotyphasterolからtyphasterolへの変換を増大しているように考えられる。なお、興味深いことに、根においては内生BRに対する明瞭な光の影響は見られなかった。このことから、根においては、光はBR生合成に関与していないと考えられる。

F204

コウキクサにおける根の可塑的伸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、コウキクサの根の切片における伸長生長の解析を行った。ジベレリン生合成阻害剤であるウニコナゾール P (Un-P)は、切片の伸長生長を阻害した。この阻害は、主に可塑的成分の阻害によって引き起こされることが分かった。また、Un-P存在下では、根の長軸に対して垂直方向に並ぶ表層微小管配列が断片化した。Un-P による阻害は可逆的であり、GA_3 は Un-P による切片の伸長阻害を回復させた。この回復は弾性的成分ではなく、可塑的成分の増加によることが分かった。さらに、表層微小管の配列も GA_3 によって回復した。以上の結果より、内生ジベレリンは、表層微小管配列の制御を介して、可塑的伸長を促進することで、伸長生長を促進していることが考えられた。この結論は、微小管阻害剤であるプロピザマイドを用いた解析によっても支持された。

F205

シロイヌナズナ花成へのグルタチオンの関与

小川健一，田坂恭嗣、三野真布、田中良和、岩渕雅樹
（岡山県生物科学総合研究所（RIBS））

最近我々は、管状要素分化のような植物の発達における調節にグルタチオン(GSH)が関与することを示してきた。我々はさらに植物の発達におけるGSHの新たな役割を明らかにすべく、GSHがシロイヌナズナの花成に関与するかどうかを野生型および晩成化変異体*fca-1*、グルタチオン欠乏変異体*cad2-1*を用いて調べた。長日条件で種子吸水から17と18、20、22日後にGSH合成の特異的阻害剤Buthionine sulfoximine (BSO)を投与すると、*fca-1*変異体の花成は促進された。一方、種子吸水から12と13、15、17日後に投与すると、*fca-1*変異体の花成は逆に阻害された。このBSOの阻害効果は10^{-4}MのGSHの同時投与で弱められ、10^{-3}M GSHの同時投与で強められた。吸水から12と13、15、17日後、野生型植物体にBSO処理を行うと花成は促進され、その促進効果はGSHの同時処理で濃度依存的に打ち消された。*fca-1*変異体はGSH含量が野生型よりも高かったが、BSO処理と同様に低温処理でその内生含量が減少し花成が促された。GSH合成に欠陥を有する変異体*cad2-1*は晩成化の表現型を示し、その表現型はBSO投与で強められ、GSH投与で弱められる傾向を示した。以上のことから栄養成長時のGSH合成速度および内生GSH含量がシロイヌナズナの花成と関係していることが示唆された。

F206

春化処理したトルコギキョウの抽だいにおける
グルタチオンレドックス制御の関与

柳田元継、三野真布、岩渕雅樹、小川健一
（岡山県生物科学総合研究所（RIBS））

我々は最近、植物の発達にレドックス制御が関与することを明らかにしてきた。今回は春化処理したトルコギキョウの抽だい過程におけるレドックス制御の関わりについて調べた。種子吸水後 4 週間生育させた植物体を、15℃で 4 週間の春化処理を行い、続いて 25℃で 4 週間生育させた。この一連の処理によって抽だいが促されたが、還元型グルタチオン(GSH)の存在下ではさらに促進された。一方、GSH 合成阻害剤の Buthionine sulfoximine の存在下では抑制された。一連の処理に伴う GSH 含量とその代謝系酵素活性の変動を調べたところ、GSH は春化処理開始後 1 日で急速に減少し、3 日目までに春化無処理区と同じ値まで回復し、その後、再び減少傾向を示した。一方、春化処理区の酸化型グルタチオン(GSSG)は、無処理区に比べ、高い値を示し、特に低温処理開始直後、25℃に移してから 2 週目で顕著に増加した。また、GSH/GSSG 比は春化処理区でより低い値を示した。グルタチオンレダクターゼ活性は低温処理開始後、GSSG の蓄積を促す方向に顕著に減少していた。以上のことから春化処理によるトルコギキョウの抽だい過程にはグルタチオンを介する調節が関与することが示された。

F207

タバコ細胞核の MAR 結合タンパク質の分子構造と機能解析

藤原詩織、松田奈緒、深見裕之、前島正義（名大院:生命農）

マトリクス結合領域（MAR）は、AT に富む塩基配列を持つ DNA 上の領域で、核マトリクスタンパク質と結合することが知られている。核マトリクスタンパク質は、生化学的に単離核を塩や界面活性剤で処理した後に残る不溶性のタンパク質と定義されており、当研究室では核マトリクスの調製法が確立している。調製した核マトリクスを特異的に認識する抗体によって、分子量 43kDa のタンパク質が検出された。このタンパク質の N 末端側のアミノ酸配列とエンドウやイネ、動物などの MAR binding protein (MARBP) で高く保存されている配列をもとにプライマーを設計し、タバコ BY-2 細胞の cDNA library を鋳型として degenerate PCR を行った。得られた cDNA 断片をプローブとしてスクリーニングを行い、全鎖長 1688bp の cDNA (MAR43) を単離した。cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列はエンドウの MARBP と 75%の相同性があり、特に N 末端側でホモロジーが高かった。しかしエンドウの MARBP の C 末端側に存在する特徴的な繰り返し配列（KKE/D）は MAR43p では見られず、これまでに得られている MARBP とは異なる新しいタイプのタンパク質だと推定される。また BY-2 の MAR DNA として 13 種類を得ている。大腸菌等で発現させて得た MAR43p の MAR DNA 結合活性や MAR DNA の配列特異性等について報告したい。

F208

サイトカイニンはキュウリ切除子葉において暗所でも MGDG 合成酵素遺伝子の発現、活性化、プラスチド糖脂質の蓄積を引き起こす。

山領和紀、金井大輔、粟井光一郎、増田建、島田裕士、
高宮建一郎、太田啓之（東工大・大学院生命理工）

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)合成酵素は、葉緑体における主要脂質である MGDG の合成を触媒している。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、また *MGD* 遺伝子の 5' 上流域に光および植物ホルモンに応答するシス領域が存在することが分かっている。

そこで今回は、特に、サイトカイニンのアッセイ系として古くから用いられているキュウリ切除子葉における、切除による影響に着目し、光照射時における MGDG 合成酵素の発現と酵素活性、そしてガラクト脂質である MGDG と DGDG の蓄積量の変化に対して、光とサイトカイニンがどのように関与しているかを詳細に解析した結果を報告する。

暗所で育てたキュウリ子葉に光を照射すると MGDG 合成酵素遺伝子が一過的に発現し、それに伴い MGDG 合成酵素活性の増大と糖脂質の蓄積が見られる。しかし、キュウリ子葉を切除した後、光を照射すると、未切除子葉に比べ、充分な mRNA の蓄積や酵素活性、正常な糖脂質の蓄積が見られなかった。これは、根や胚軸からの糖脂質の正常な合成に必要な因子の供給が途絶えたためと考えられる。この切除子葉に暗所でサイトカイニンを処理すると MGDG 合成酵素遺伝子の発現や酵素の活性化、糖脂質の蓄積がほぼ完全に相補され、未切除子葉に光照射を行った場合と同様の効果が得られた。これらのことより、光による葉緑体糖脂質の蓄積、すなわちチラコイド膜の発達にサイトカイニンが重要な働きを持つことが示唆される。

F209

cDNAマクロアレイを用いたジャスモン酸応答性遺伝子群の大規模解析：ジャスモン酸生合成に対するポジティブフィードバックと他の植物ホルモンとのクロストーク

佐々木結子、浅水恵理香[1]、柴田大輔[1]、中村保一[1]、金子貴一[1]、粟井光一郎、増田建、島田裕士、高宮建一郎、田畑哲之[1]、太田啓之
（東工大・大学院生命理工・生体システム、[1]かずさDNA研究所）

ジャスモン酸およびその誘導体であるメチルジャスモン酸（MeJA）は、病傷害応答や葯の形成、老化などの生理現象に関与する生理活性物質として知られている。しかし、ジャスモン酸による情報の伝達経路についての知見はほとんど得られていない。本研究ではジャスモン酸類の情報伝達機構と、それらの下流で生じる生理現象を明らかにするために、ジャスモン酸応答性遺伝子群の網羅的解析を行っている。MeJA処理を行った播種後10日目のアラビドプシスから抽出したmRNAを用いてcDNAマクロアレイを行ったところ、MeJA処理後1時間から24時間までの間に、未処理に対して3倍以上の発現量変化を示す遺伝子が機能未知のものを含め42個同定された。これらの中には、ジャスモン酸生合成の酵素をコードする遺伝子である*LOX2, AOS, AOC, OPR1, OPR3*が含まれていた。この結果は現在同定されているジャスモン酸生合成遺伝子が全てMeJAによって誘導されることを示している。また、ジャスモン酸がエチレン・オーキシン・サリチル酸などの植物ホルモンと協調的あるいは拮抗的に作用することが知られているが、今回の結果からジャスモン酸とこれらの植物ホルモンとのより複雑な相互作用が明らかになったので報告する。

F210

微生物由来エチレン生成酵素遺伝子を導入した形質転換タバコの特性

荒木誠士，田中正美，吉田和哉[1]，新名惇彦[1]，松岡正佳[2]，小川隆平[2]
（熊本県農研センター，[1]奈良先端大・バイオ，[2]崇城大・応微工）

植物ホルモンであるエチレンを時期及び組織特異的に発現させる事により，耐病性，ストレス耐性，雌花形成等の制御が可能になると期待される。そこで，*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2由来の2-オキソグルタール酸依存性エチレン生成酵素（EFE）の遺伝子をタバコに導入し，遺伝子の発現とその影響を調査した。

EFE-GUS融合遺伝子を35Sプロモーターの下流で発現させた結果，節間が短くなり草丈が低くなり，葉が波打ち小さくなり，また根が太く脆くなる形態異常を示す系統が得られた。形態異常を示す系統は非形質転換体の20倍以上のエチレンガスを生成した[1]。また，タバコアルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター（NtADHp）を用いて，組織特異的発現とその影響についての実験も併せて行った。NtADHpでは根のみでGUS遺伝子の発現およびエチレン生成量の増加が認められた。

[1] Araki S. *et al.* (2000) Plant Cell Physiol. **41**: 327-334.

F211

トマト生長時のIAA分布とラベルIAAの輸送能力

児島清秀・大竹絵梨子[1]・馬　瑩瑩
（新潟大・自然研、[1]新潟大・農）

生長中の植物体でのIAAと生理現象の関係を解明するために、モデル系として草本性のトマトの栄養器官（茎・葉・根）と果実を使用し、IAAの輸送能力（極性輸送）・拡散量・内生量を同時に測定した。内生量はアポプラスト（AP）とシンプラスト（SP）に分けて分析した。輸送能力は^{14}C-IAAを使用して、各部の内生IAA量は$^{13}C_6$-IAAを内部標準としてHPLC-質量分析計-SIMで分析した。茎は長軸（3等分）・単軸方向（皮・肉・芯部）のそれぞれの部位に、果実は果皮・隔壁・果芯に分けた。茎ではIAAの輸送能力は下部で低下し、内生IAA濃度はAPのSPよりも2倍以上高く、下部では上部の2倍高かった。果実でもIAAの顕著な結果が得られた。以上の結果から、生長中の植物体でのIAAの生理作用に関して多面的に考察した。

F212

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とカリウムの作用

陳磊，東谷篤志，菅洋，武田和義[1]，高橋秀幸（東北大・遺生研，[1]岡山大・生物資源研）

培地に外生のジベレリン（GA）を与えると，紅芒麦とよばれる中国の黄土高原で発見されたコムギ品種（*Triticum aestivum* L.）の第一節間の伸長は，著しく促進された。紅芒麦の芽ばえは，第一節間が伸長することによって，深播き耐性を示す。本研究では，第一節間の伸長に対するGAとカリウムの作用とその深播き耐性との関係について解析した。GAによる紅芒麦第一節間の伸長の促進には，培地中のカリウムの存在が不可欠である。GAを与えると，紅芒麦では，第一節間の細胞のカリウムの取り込みが促進され、他の品種に比較して，紅芒麦の根と第一節間中のカリウムチンネル遺伝子発現のレベルが高いことがわかった。培地中にGAの生合成阻害剤ウニコナゾールを添加すると、根におけるカリウムチャンネル遺伝子の発見が低下し，GA_3を与えると，これらの遺伝子発現が回復された．また，第一節間中のカリウムチャンネル遺伝子の発現がGA_3によって誘導されたことから，紅芒麦の深播き条件における第一節間伸長の主要因の1つであるカリウムの取り込みにはGAが重要な役割を果たしていることが示唆された。

F213

ヒマワリ種子発芽過程における新規アレロパシー物質の消長

大野修二[1]、富田－横谷香織[2]、鈴木利貞[3]、小瀬村誠治[4]、安井一臣[5]、後藤敏男[5]、山村庄亮[4]、長谷川宏司[2]
([1]筑波大学大学院バイオシステム研究科、[2]筑波大学応用生物化学系、[3]筑波大学大学院農学研究科、[4]慶應義塾大学理工学部化学科、[5]日本バイエルアグロケム)

ヒマワリの植物体が強い阻害的アレロパシーを有することはよく知られており、これまでにその葉から数種のアレロパシー物質が単離・同定されている。しかし、その種子の発芽段階におけるアレロパシーについての詳細な研究はない。そこで、まずヒマワリ種子の発芽段階でのアレロパシーを観察した。ヒマワリ (*Helianthus annuus* L. *cv.* Taiyo, Sapporo Saishuen, Japan) 種子と数種の植物種子を同一シャーレ内で混植したところ、オオイヌノフグリの成長が対照に比べ大きく抑制された。　この結果より、ヒマワリ種子が種選択性阻害的アレロパシー機能を有する可能性が示唆された。そこで大量のヒマワリ種子を水で培養し、その培養液からこのアレロパシー現象を引き起こす原因物質の単離・同定を試みた。各種クロマトグラフィーを用いて阻害活性物質を精製・単離し、機器分析を行い、この物質を新規物質 4,15-dinor-3-hydroxy-1(5)-xanthene-12,8-olide と同定し、これを Sundiversifolide と命名した。この単離した物質について６種の植物を用いて生物検定を行ったところ、この物質が種選択性を有することが明らかになった。　また、ヒマワリ種子 500 粒を培養した培養液を精製し、HPLC を用いて分析したところ、Sundiversifolide と同様の保持時間にシングルピークが認められたが、このピークは時間と共に減少し、代わりに他のピークが増加していくという事実が明らかになった。これらの結果から、Sundiversifolide はヒマワリ生育環境中に放出されたあと他の物質に変化していくことが推察された。この物質について、現在詳細な検討を行っている。

F214

クレス緑化芽生えにおける成長抑制物質の探索

長谷川剛、山田小須弥[1]、鈴木利貞[2]、小瀬村誠治[3]、山村庄亮[3]、宮本健助[4]、上田純一[4]、長谷川宏司[1](大阪府大・院・理、[1]筑波大・応生化、[2]筑波大・農、[3]慶応大・理工・化、[4]大阪府大・総合科学部)

我々はこれまで高等植物・茎の光屈性のメカニズムについて分子レベルから研究を行い、光側・影側におけるオーキシンの分布は均等であり、光側で生成される光誘導性のオーキシン活性抑制物質が光屈性を制御していることを報告してきた (Bruinsma-Hasegawa 説)。光屈性制御物質としてダイコンから 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate や raphanusanins を、トウモロコシから benzoxazolinone 類を、ヒマワリから 8-epixanthatin を単離・同定してきた。今回は光屈性の研究に汎用されてきたクレスを用いて、光屈性制御物質の本体を明らかにすることを最終目的として、まず、クレス緑化芽生えから成長抑制物質の抽出を行い、いくつかの物質の単離に成功した。そのうちの１つは glycerol 1-(9,12,15-octadecatrienoate) であることが、^{1}H NMR 等から明らかになった。他の成長抑制物質の構造解析は現在進行中である。

F215

トマト搾汁残渣由来の植物成長促進物質

鈴木利貞[1]、富田-横谷香織[2]、津布楽洋和[3]、吉田滋樹[2]、日下部功[2]、山田小須弥[2]、三木洋一[4]、長谷川宏司[2]([1]筑波大院・農、[2]筑波大・応生化、[3]カゴメ・総研、[4]三木商店)

食品製造業において、廃棄物の処理は重要な課題の一つである。食品製造業から排出される廃棄物中には細胞壁多糖等多くの有機物が含まれている。これらを再資源とした何らかの活性物質の創製等、有効利用できる可能性が高い。そこで本発表ではトマトジュースの製造過程で大量に排出される搾汁残渣を材料として用い、植物成長促進剤としての有効利用性について検討を行った。

トマト搾汁残渣を水で煮沸し、その抽出物をケイトウ、トマトに与えて培養したところ顕著な成長促進効果は認められなかった。そこで、トマト搾汁残渣に塩酸を加え、煮沸した抽出物を中和の後、ケイトウに与えて培養したところ、熱水抽出にくらべ著しい成長促進活性の増加が認められた。特に、4 時間酸処理した抽出物では shoot の伸長を 500 ppm で 70 %、1000 ppm で 100 %促進した。しかし、4 時間以上煮沸した抽出物では、4 時間酸処理した抽出物に比べ、成長促進活性の減少が認められた。一方、トマト搾汁残渣に水酸化ナトリウムを加え煮沸した後中和したアルカリ抽出物では逆に、shoot、root ともに成長が阻害された。

4 時間酸処理した抽出物の、成長促進活性の原因物質について、精製を行ったところ、HPLC-PAD 分析により、重合度６～１０の酸性糖の存在が認められた。現在これらの詳細な構造と作用機構について検討を行っている。

F216

EFFECTS OF BRASSINOLIDE ON CELL DIVISION AND ELONGATION IN EPICOTYL GROWTH OF PEA SEEDLINGS.

Naoya MAEDA, Norihito KUNO[1], Takao YOKOTA[2], Motohiro FUKAMI and Masaki FURUYA[1]; Grad. Sch. Agr., Utsunomiya Univ., Utsunomiya, Tochigi 320-8505, [1]Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395, [2]Dept. Biosci., Teikyo Univ., Utsunomiya, Tochigi 320-8551

We studied effects of brassinolide(BL), a biologically active brassinosteroid(BR), on epicotyl growth in etiolated seedlings of wild-type(WT) and a BR biosynthesis mutant (*lkb*) of garden pea(*Pisum sativum*, cv Torsdag). The dwarf phenotype of the mutant first became detectable 53 hours after sowing in darkness at 25℃. We treated the mutant with BL in an attempt to rescue the dwarf phenotype. Time course study indicated that the dwarf phenotype of *lkb* was most effectively recovered when BL of 1×10^{-7}M was given exogenously at 29th hour after sowing. In response to this treatment the first internode of the *lkb* mutant grew 2-fold longer than untreated *lkb* control. However, BL treatment was unable to fully rescue the *lkb* mutant, as internode elongation and cell number of BL-treated *lkb* seedlings was only one half that of the WT. The maximal difference in cell number between WT and *lkb* was established by 29 hours after sowing, suggesting that cell division was significantly influenced by endogenous BR before 29 hours after sowing.

F217

シロイヌナズナの芽生えの成長に対するブラシノライドとブラシノステロイド生合成阻害剤ブラシナゾールの影響

田仲 究、中村考志[1]、浅見忠男[2]、吉田茂男[2]、松尾友明、岡本繁久（鹿大農・生物、[1]京府大・人環、[2]理研）

ブラシノステロイド(BR)は多面的な生理作用を示す第6番目の植物ホルモンである。近年、シロイヌナズナの分子遺伝学の発展により BR の生合成やシグナル伝達の詳細が明らかになりつつあるが、シロイヌナズナを用いた生理学の研究は、その重要性にも関わらず、前者に比べ進んでいない。そこで我々は、シロイヌナズナの芽生えの成長に対するブラシノライド(BL)及び BR 生合成阻害剤ブラシナゾール(Brz)の影響を調べた。その結果、外から与えた BL(10^{-10}~10^{-6}M)は子葉の肥大や連続光下で栽培した場合の下胚軸の伸長を濃度依存的に促進した。逆に、新鮮重の増加、根の伸長、暗黒下における下胚軸の伸長は、BL の濃度に依存した阻害を受けた。他方、Brz(10^{-9}~10^{-5}M)を処理すると、明暗に関わらず濃度に依存した成長の阻害が見られた。以上の結果から、シロイヌナズナの芽生えが正常に成長するためには、内生の BR が不可欠であること、また成長を促進する内生 BR の濃度が器官によって異なることが示唆された。続いて、一般的に茎の伸長に関わると考えられているオーキシン、ジベレリンと BR の下胚軸の伸長における関連性を調べた。3 種の植物ホルモン(BL、IAA、GA_3)と阻害剤(Brz、PCIB、TIBA、Uniconazole)を同時に投与して成長に対する影響を調べた結果、連続光下における下胚軸の伸長促進は、オーキシンやジベレリンの作用を介さない BR の直接の効果であることが示唆された。また、下胚軸の伸長には BR が主に働き、ジベレリンが補足的に働いている可能性が示された。

F218

Gene Chip を用いたブラシノステロイド応答性遺伝子の解析

郷田秀樹、嶋田幸久、宮内成真、関亦克彦[1]、浅見忠男[1]、藤岡昭三、吉田茂男（理研・植物科学研究センター、理研・植物機能[1]）

近年の欠損ミュータントの解析からブラシノステロイド(BR) は細胞の伸長、分裂、光形態形成など植物の生長調節に必須の役割を担っていることが明らかになってきた。しかし、ブラシノステロイドがどのようなメカニズムで生長を制御するのか、その機構はほとんど明らかにされていない。我々はブラシノステロイドの生理的な機能やシグナル伝達機構を解明するため、DNA アレイを用いてブラシノステロイドの制御下にある遺伝子を網羅的に解析することを試みた。DNA アレイの方式としては Affymetrix 方式を用いた。ブラシノライド投与により発現が変動する遺伝子をスクリーニングし、それらの遺伝子群を 4 つのカテゴリーに分類して、解析を行った。まず 1 つ目は細胞伸長に直接関与すると推定される遺伝子群である。この中には Xyloglucan endtransglycosylase (XET) とそのホモログがある。このカテゴリーに分類される遺伝子の多くは BR によりその発現が促進された。二つ目は BR の合成に関与する遺伝子群である。BR 生合成遺伝子としては CPD, DWF4, BR6ox などが報告されているが、それ以外にも既知生合成遺伝子と高い相同性を示し、かつ BR によって負に発現制御を受ける遺伝子が存在することがわかった。三つ目のカテゴリーは BR のシグナル伝達に関与する遺伝子群である。この中には他のホルモンとの相互作用を司る遺伝子が含まれており非常に興味深い。例えば、オーキシンによって誘導される IAA3 遺伝子などが BR に応答することが明らかになった。4 つ目は機能未知の遺伝子群である。

F219

ヒャクニチソウ管状要素分化過程でのブラシノステロイド合成関連遺伝子の発現調節

山本 亮、[1]出村 拓、福田裕穂（東大院・理・生物科学、[1]理研・植物科学センター）

私たちはヒャクニチソウ管状要素分化系を用いてブラシノステロイドが、分化の中期から後期への移行に関与することを明らかにした。次いで、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に存在する量を調べ、ブラシノステロイドが分化中期に急増することを明らかにした。

今回はブラシノステロイド合成に関連する遺伝子の単離を試み、その発現解析を行った。ＲＴ－ＰＣＲ法により、*ＳＴＥ１*、*ＤＩＭ*、*ＤＷＦ４*、*ＣＰＤ*、*ＤＷＡＲＦ*のホモログと予想されるクローンの部分配列を得た。これをもとにしてｃＤＮＡライブラリーから全長の単離を試み、*ＤＷＡＲＦ*以外のクローンの全長を単離できた。これらの遺伝子の管状要素分化過程におけるｍＲＮＡの蓄積を調べたところ、*ＤＷＦ４*と*ＣＰＤ*のホモログと予想されるクローンのｍＲＮＡは内生ブラシノステロイドの増加に先立って蓄積することがわかった。またこれらの遺伝子は、オーキシンとサイトカイニンの両方を含む分化誘導培地において強い発現が見られることから、これらの遺伝子の転写レベルでの制御が管状要素分化過程でのブラシノステロイド合成のキーステップになっていると考えられた。

F220

ヤマザクラ種子発芽過程における内生アブシシン酸の動態

丹羽美乃理[1]，諫山奈央子[2]，信太優子[2]，中村輝子[1, 2]（[1]日本女子大院・理，[2]日本女子大・理）

すでに、サクラの種子発芽には、約４ヶ月間の低温湿層処理が必須の過程であるが、同処理開始 2 ヶ月後に内果皮除去を行うことによりただちに発根過程に移行できることを明らかにした。種子発芽過程において生理学的過程を明らかにするための第 1 歩として、低温湿層処理直前、および同処理 2 ヶ月後の内果皮、種皮、種子における、アブシシン酸含量変化を GC/SIM により測定した。また、内果皮除去の種子を用いて発芽率に及ぼす外生アブシシン酸の効果をも調べた。その結果、内果皮、種皮および種子において内生アブシシン酸含量は，いずれの場合も生理的濃度範囲であり、処理後の内果皮における含量の低下が顕著に認められた。また、種子発芽に及ぼす外生アブシシン酸の阻害効果も、顕著に認められた。今回の結果により、低温湿層処理間に生ずる、内果皮等に含まれる発芽抑制物質の減少が、種子発芽に関与している可能性、及びアブシシン酸が発芽阻害物質のひとつとして含まれ、発芽過程の制御に関わることが示唆された。今後、さらに低温湿層処理による発芽過程に関わる、アブシシン酸その他の発芽抑制物質およびこれらと拮抗的に作用するであろうジベレリン等の発芽促進物質の動態、および胚の発達等について詳しく検討する必要がある。

F221

イネ発芽種子におけるジベレリン合成酵素遺伝子の発現解析

金子 美幸, 伊藤 博紀, 上口(田中) 美弥子, 北野 英巳[1], 松岡信 (名大・生物分子応答センター, [1]名大・生命農学)

穀物種子の発芽時における胚と糊粉層でのα-アミラーゼの発現は、ジベレリン(GA)により主に転写レベルで制御されることが知られているが、発現の引き金となる GA 合成に関する研究はほとんど行われていない。今回、我々は GA 合成とα-アミラーゼの発現の関係を解明するために、GA 合成の最終段階を触媒する 2 つの GA 3β水酸化酵素遺伝子 *OsGA3ox1*, *OsGA3ox2* (*D18*) と、その前段階を触媒する GA C-20 酸化酵素遺伝子 *OsGA20ox*、およびα-アミラーゼ遺伝子 *RAmy1A* の吸水種子における詳細な発現解析を行った。吸水後の経時的なノザン解析の結果、胚における *RAmy1A* は GA 合成酵素遺伝子の発現以前から発現し始め、ウニコナゾールによる GA 合成阻害もこの胚における *RAmy1A* の発現に影響を与えなかった。この結果から乾燥種子胚に微量に存在する GA により胚の *RAmy1A* の発現が誘導されると考えられた。一方、糊粉層の *RAmy1A* は GA 合成酵素遺伝子の発現後に誘導され、GA 合成阻害により転写誘導が抑制された。このことは、糊粉層に作用し *RAmy1A* の発現を誘導する GA は吸水後に *de novo* 合成されたことを示唆している。また、糊粉層のα-アミラーゼの発現に関与する GA 合成部位を同定するために行った、*OsGA3ox1, D18* をプローブとした *in situ* ハイブリダイゼーションの結果および胚器官欠損突然変異体の糊粉層での *RAmy1A* のノザン解析の結果も合わせて報告する。

F222

キュウリ・トマト切断胚軸における皮層の組織癒合に対する子葉およびジベレリンの関与

朝比奈 雅志[1]、岩井 宏暁[1]、川出 洋[2]、山口 信次郎[2]、神谷 勇治[2]、佐藤 忍[1] ([1]筑波大・生物、[2]理化学研究所・植物科学研究センター)

キュウリ胚軸を水平方向に半分程度切断すると切断後3日目に切断面付近の細胞が細胞分裂を開始し、切断後7日目には切断された皮層はほぼ完全に癒合するが、子葉を切除するとこの細胞分裂が強く阻害されることを我々は見いだした。本研究では、この組織癒合過程の細胞分裂に対する植物ホルモンの関与について解析を行った。キュウリ子葉を切除した個体で見られる細胞分裂の強い阻害は、子葉を切除した部分にジベレリン(10^{-4}M GA_3)を塗布することで回復したが、オーキシン(10^{-4}M IAA)を塗布した場合には、回復しなかった。また、ジベレリンの生合成阻害剤であるウニコナゾール(10^{-4}M Uniconazole P)を子葉に散布したところ、皮層の細胞分裂は強く阻害されたが、ジベレリンを同時投与することでこの阻害は消失した。一方、茎頂あるいは根を除去した場合には、皮層の組織癒合過程における細胞分裂に阻害は見られなかった。また、オーキシン極性移動阻害剤であるTIBA (10^{-4}M triiodobenzoic acid) を胚軸切断部の上部に塗布した場合でも、皮層の細胞分裂に影響は見られなかった。同様の現象がトマトの芽生えでも観察されたので、トマトのジベレリン生合成欠損変異体 (*gib-1*) の胚軸を用いて同様の実験を行ったところ、この変異体では皮層の組織癒合にともなう細胞分裂が起きないことが示された。これらの結果から、切断された皮層の組織癒合過程における細胞分裂に、ジベレリンが深く関与していること、また、活性型ジベレリンの生産に子葉が関与していることが示唆された。

F223

ジベレリン A_3 のセイヨウハコヤナギの成長に及ぼす影響

伊ヶ崎知弘, 長尾 精文, 篠原 健司 (農水省・森林総研)

セイヨウハコヤナギ(*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne)をジベレリン(GA_3)で処理し、形態、乾燥重量、葉の光合成速度や色素量などに及ぼす GA_3 の影響について調べた。セイヨウハコヤナギは人工光(約 500 $\mu mol \cdot m^{-2}s^{-1}$, 12 時間日長)、25℃の条件下で生育させ、未処理または 15, 45, 150 μM の GA_3 濃度で 4～5 週間処理した。GA_3 処理により、植物が異常な形態を示すことはなかった。シュートの伸長速度は 150 μM の GA_3 処理で未処理の約 2 倍に増加し、5 週間後にはその樹高は約 170cm に達した。また、節の数も GA_3 処理により増加した。地上部の乾燥重量は、GA_3 の濃度に依存して増加し、逆に根の乾燥重量は減少した。成葉での光合成速度及びクロロフィル、カロチノイドの含有量は、150 μM GA_3 で顕著に減少していた。一方、成葉でのアントシアニンの含有量には有意差が見られなかった。これらの結果は、GA_3 がセイヨウハコヤナギの成長に正の効果を及ぼすことを示している。現在、GA_3 処理後の内生の植物ホルモン（活性型ジベレリン、アブシジン酸、インドール酢酸）の変化や解剖学的な解析を進めている。

F224

エチレンによる根の成長制御におけるオーキシン要求性

Abidur Rahman, 尼川大作, 後藤伸治[1], 鶴見誠二[2] (神戸大・自然科学, [1]宮教大・生物, [2]神戸大・RI センター)

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の 2 種のエチレン抵抗性変異株、*aux1-7* と *eir1-1*、を用いて、エチレン作用に対する、オーキシンの要求性を調べた。*aux1-7* と *eir1-1* はそれぞれ、auxin influx carrier と efflux carrier の変異株である。*aux1-7* と *eir1-1* の根の成長はエチレンに対して、強い抵抗性を示したが、10 nM NAA の存在下では、これらの変異株は、野生型の根に近いエチレン感受性を示した。そして、10 nM IAA も *eir1-1* には有効であったが、aux*1-7* に対しては無効であった。これらの結果から、*aux1-7* と *eir1-1* のエチレン抵抗性の原因は、低い細胞内オーキシン濃度にあること、また、エチレンによる根の成長制御において、オーキシンは positive regulator として作用することが分かった。

F225

メロン ACC 合成酵素遺伝子（CMe-ACS2）のオーキシン誘導シス因子について

坂本木綿子[1]、龍野由美恵[1]、園田雅俊[1]、中川弘毅[1]、平林哲夫[3]、佐藤隆英[1,2]（[1]千葉大・園芸、[2]千葉大・院自然科学、[3]日本園芸研）

メロンのオーキシン誘導 ACC 合成酵素遺伝子（CMe-ACS2）のプロモータ領域にダイズの GH3 遺伝子（TGTCTC エレメント）やエンドウ PS−IAA4/5 遺伝子（AuxRD）のオーキシン誘導シス因子に似た配列が含まれている。本研究はそれらの配列がオーキシン誘導シス因子として働いているか検討した。

断片化した CMe-ACS2 プロモータを結合した pBI101 を導入したアラビドプシス及び一過的発現系によるオーキシン誘導性を測定した結果、TATAbox の約 100bp 上流に存在する TGTCTC 様エレメント（CGGACAttggcgaTGTCTC）が、それらの系においてオーキシン誘導シス因子として働いていることが明らかになった。

F226

Bisphenol A におけるサイトカイニン様活性の解析

手呂内伸之、高野邦子[1]、中村百合子[1]、榎本かおり[1]、細谷夏美[1]、西成典子（大妻女子大・教養・生物、[1]社会情報・環境）

内分泌撹乱物質として知られている Bisphenol A はポリカーボネートの原材料として用いられている。Bisphenol A はエストロゲン類似の作用を持ち、動物に対する影響が危惧されている。一方、植物に及ぼす影響は全く知られていなかったが我々は BisphenolA が植物ホルモンの一つであるサイトカイニンと類似の活性のあることを、ダイズカルスを用いた生物検定系の実験で明らかにしてきた。サイトカイニンと同様に細胞増殖促進作用が認められた。本研究では細胞において Bisphenol A とサイトカイニンの作用部位が同一なのか、それぞれ特異的なのか調べた。そのために Bisphenol A とサイトカイニン（ゼアチン）を半量ずつ加える半量実験を行った。その結果、ゼアチンとよく似た変化を示した。次いで、この２つを同時ではなくゼアチン→Bisphenol A、Bisphenol A→ゼアチンの移動実験をそれぞれ、この生物検定系を用いて行った。その結果、最初に加えたものの影響を受けることが示された。以上のことから同一の作用部位であることが推定された。また同時に加えた場合はゼアチン優先に進むことが考えられた。

さらに Bisphenol A にサイトカイニンの細胞増殖促進作用以外の生理活性があるか実験した。ニンジンカルスに Bisphenol A を与えたところ、芽の分化を誘導できた。現在、他の植物でも検討中である。

F227

ニンジン培養細胞の細胞分裂に対するphytosulfokine（PSK）とオーキシンの相互作用

東克己、松林嘉克[1]、坂神洋次[1]、鎌田博（筑波大・生物科学、[1]名古屋大院・生命農学）

ペプチド性植物細胞増殖因子であるPSKは、植物の細胞分裂を、オーキシン、サイトカイニンと協調して促進していると考えられている。ニンジンの non-embryogenic cells（NC）は、オーキシンとして2,4-Dを含むMS培地中で増殖するが、2,4-Dを含まないMS培地で前培養した場合、PSK-αの投与によって細胞分裂が促進された。また、PSK-αと2,4-Dを組み合わせて投与すると、細胞分裂が2,4-D濃度依存的に促進された。そこで、このPSKと2,4-Dの関係が、PSKとオーキシンの一般的な関係と考えられるか否かを明らかにするため、オーキシンとしてNAAを含むMS培地でNCを培養し、PSKとNAAの相互作用を調べた。その結果、4.5 x 10^{-6} M の NAA を1 x 10^{-7} MのPSK-αとともに投与することにより、2.3 x 10^{-7} M の2,4-Dと1 x 10^{-7} MのPSK-αを同時に投与したときと同等の結果が得られた。このことから、ニンジンNCにおいて、PSKはオーキシンと協調して細胞分裂を促進すること、また、NAAの作用は2,4-Dに比べて弱いことが明らかとなった。

F228

トマト成熟変異体 *Nr-2* のエチレン受容体様遺伝子

今西俊介，森仁志[1]，永田雅靖（野菜茶試・生理生態，[1]名古屋大学大学院・生命農学）

トマトにおいては成熟が抑えられた表現型を示す変異体がいくつか報告されており、これらの変異の原因遺伝子は、成熟を制御する遺伝子をコードしてる可能性が高い。また、トマト果実の成熟には内的因子としてエチレンが大きな役割を果たしていることが知られている。現在トマトでは、5種類のエチレン受容体遺伝子 (*LeETR1, 2, 4, 5, NR*) が報告されており、生長を通して複雑な発現変動を示すことが分かっている。

我々は、成熟が抑制されるトマト変異体である *Nr-2* からエチレン受容体ホモログ遺伝子を単離し、それらの構造などについての解析を試みた。*Nr-2* 変異体から RT-PCR によって増幅された断片の構造を決定したところ、既知のエチレン受容体遺伝子に加えて、予想されるアミノ酸配列が、*LeETR5* と 83.1 % の相同性を示す新規なエチレン受容体様遺伝子が得られた。

F229

エンドウ節間表皮組織のプロトプラストに誘導されるABP1を受容体としたIAA依存の膨潤反応

山上 睦, 芳賀 健[1], Richard M. Napier[2], 飯野盛利[1]（環境科学技術研究所, [1]大阪市立大・院理・生物地球, [2]Hort. Res. Inst., U.K.）

エンドウ芽ばえの成長中の節間（第3節間）の表皮組織からプロトプラストを分離し，その体積に及ぼすIAAの影響を調べた。プロトプラストは 0.5M sorbitol, 10mM KCl, 1mM $CaCl_2$, 20mM glucose, 10mM Mes-Tris (pH6.0) の培養液に懸濁し，赤色光下で観測した。IAAを含まない外液中でプロトプラストは一定の体積を維持したが，IAAを加えることによって膨潤した。膨潤反応はIAA投与後，少なくとも10分で開始し，10^{-8}Mから10^{-5}Mの濃度範囲で増加した。また，濃度依存の増加は2段階で起こることが示唆された。外液中のK^+，あるいはCl^-を膜不透過性のイオンで置き換えると反応は消失した。膨潤反応はK^+とCl^-の取り込みに基づく浸透調節によって生じると考えられる。オーキシン結合タンパク質1（ABP1）の抗体を外液に加えると，膨潤反応は6 μg ml^{-1}の低濃度でほぼ完全に消失した。Ca^{2+}を除き1mM EGTAを加えた外液中で膨潤反応は正常に起こった。これらの結果は，ABP1が膨潤反応のオーキシン受容体であること，外液のCa^{2+}はシグナル伝達成分として関与していないことを示している。

F230

シロイヌナズナのエチレン過剰合成変異体 *eto1* の分子遺伝学的解析

吉田 均, Kevin L.-C. Wang[1], Claire Lurin[2], Joseph R. Ecker[1] (北海道農業試験場, [1]Salk Institute, [2]INRA)

シロイヌナズナの *eto1* (*ethylene-overproducer1*)は黄化苗で野生型の約10倍のエチレンを合成する劣性突然変異体で、*ETO1* 遺伝子はエチレン合成の負の制御因子をコードすると考えられていた。*ETO1* 遺伝子は二つのタンパク質間相互作用ドメインを持つ新規のタンパク質をコードしていた。Two-hybrid systemおよび二重変異体の解析により、ETO1-ACS5の相互作用を明らかにした。また、大腸菌内でACS5とETO1-LIKE (EOL)タンパクを共発現させるとACS活性は著しく阻害された。これらの結果からETO1ファミリータンパクはACSと相互作用し、その活性を阻害することが明らかになった。

S201

イネにおけるアクチベーションタギングシステムの開発：トランスポゾンの利用による変異系統の拡大及び新規変異体の取得

森昌樹、佐藤浩二、杉本和彦、大岡久子、岡部健、大林憲吾、廣近洋彦、菊池尚志（農水省・生物研）

4コピーのCaMV35Sエンハンサー及び35Sプロモーターをdsの末端配列にはさんだ形（Ds-EN）で日本晴及びトウモロコシのAcトランスポゼースを発現している日本晴（9-17系統）に導入した。Acトランスポゼースの作用でDs-ENがsomatic及びgerminalに転移することが明らかになり、トランスポゾンを利用した変異系統の拡大が可能になった。

一方Ds-ENを日本晴に導入したT1世代で、エンハンサー近傍領域の転写を調べたところ、10系統中7系統で活性化が認められた。そのうち1系統は葉鞘が著しく短く、葉身が縮れていた。この変異体を水耕栽培し10ug/lのブラシノライドを添加すると数日で正常化したので、ブラシノライドの合成或いは分解系の変異体であることが示された。現在、タグした遺伝子がこの表現型の原因かどうかを調べている。

S202

アオウキクサ花成を強く誘導するFIFとノルエピネフリン反応物の構造解明

山口祥子、横山峰幸、飯田年以、岡井美佳[1]、福原忠雄、吉田誠一、田中修[1]、瀧本敦[2]（資生堂・基盤研究センター、[1]甲南大学・理・生物、[2]京都生物研）

アオウキクサが乾燥や高温などのストレスを受けた時に放出する成分（factor C）とノルエピネフリン（NE）の反応生成物はアオウキクサの花成を強く誘導する[1]。更に、factor Cの本体はリノレン酸の9, 10-位がα-ケトールになった不飽和脂肪酸の誘導体（FIF）であり、その構造特異性は極めて高いことを既に報告した[2]。本研究ではFIFとNEの反応物の構造解明を試みた。

FIFとNEとの反応により多種類の成分が生成しており、それらの多くのものは花成誘導効果を持っていた。また、300 nmに吸収極大がある、類似のUV吸収スペクトラムを持つ成分が多数存在していた。それらの成分のうち、主要な2成分を分離精製し、構造を決定した。それらは光学活性をもつFIFと、NE酸化物の付加体であり、3環構造を持つα-ケトール脂肪酸であった（FN1及びFN2と仮称）。FN1は(9*R*)-FIFに、また、FN2は(9*S*)-FIFに由来していた。FN1は単独でアオウキクサの花成を誘導し、また、アサガオの花成誘導もFIFの1/10,000の濃度（10^{-8}M）で同程度の促進効果を示した。一方、FN2は、どちらの測定系でもほとんど活性を示さなかった。FIFも*R*体がアサガオ花成系で促進活性を示し、*S*体は活性を検出できなかった。

[1)]Takimoto et al., Physiol. Plant., 92: 624-628 (1994)

[2)]Yokoyama et al., Plant Cell Physiol., 41: 110-113 (2000)