

S203

シロイヌナズナにおけるフロリゲン様物質の動態解析
平岡和久、篠崎真輝¹
(京大院・生命科学・統合生命、¹京大院・農・応用生物)

シロイヌナズナでは現在のところ花成誘導に関する遺伝子の同定・単離が進みつつあるが、代謝面の研究はまだなされていない。我々は昨年の本年会において、アサガオ(ムラサキ)のフロリゲンを満たす物質を新たに開発した分離システムを用いてUV検出器で検出することに成功したことを報告した。本年会ではシロイヌナズナについて同様の分離システムを用いてフロリゲン様物質の動態解析を行った結果を報告する。

実験材料としては、シロイヌナズナのColumbiaを用いた。播種後2カ月間短日条件下(10時間明期・14時間暗期)で育てたものに対し、長日処理(16時間明期・8時間暗期)を7日間繰り返したものと短日条件(8時間明期・16時間暗期)で7日間育てたもののロゼット葉をそれぞれ採取して抽出し、HPLCで分離した後、UV検出器(250および280nm)で検出したものを比較した。その結果、短日条件で増加するいくつかの物質と長日条件で増加する多数の物質を検出した。

また本年会では、*gagantea*, *ft*, *fca*の各花成遅延変異体についての結果も報告する予定である。

S204

ACC合成酵素遺伝子 *CS-ACS2* はキュウリ花芽の雌ずい原基で発現する。
瀧池伸一郎、安藤杉尋、水澤秀雅¹、松浦誠司¹、酒井慎吾(筑波大・生物、¹㈱トーホク)

発生初期のキュウリの花芽は、雄ずいと雌ずいの両原基を持ち、その後、一方の原基の発達が停止することにより、雄花または雌花に分化する。キュウリの雌花分化はエチレンにより誘導され、ACC合成酵素遺伝子 *CS-ACS2* は雌花分化を誘導するエチレンの合成に関与することが示唆されている。そこで、私達はキュウリの雌花形成におけるエチレンの役割を明らかにする目的で、キュウリの花芽における *CS-ACS2* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。その結果、発生初期の雌花に分化する花芽において、*CS-ACS2* は雌ずい原基でのみ発現していた。さらに発生の進んだ花芽では、*CS-ACS2* の発現は子房で検出された。以上の結果より、雌花分化において、エチレンは雌ずいの発達、特に子房の発達に作用していることが示唆された。また、花芽のエチレン処理は、雌ずいの発達を促すと共に、雄ずい原基の発達停止に作用するが、*CS-ACS2* の発現は雄ずい原基では検出されなかった。以上の結果より、エチレンは雄ずい原基の発達停止に直接的に作用するのではなく、雌ずい原基と雄ずい原基間のコミュニケーションの結果、雄ずい原基の発達が停止する可能性が考えられた。

S205

エチレンによるキュウリの雌花誘導時に発現が誘導される遺伝子 *ERAF17* の発現の局在解析
安藤杉尋、佐藤由夏、酒井慎吾(筑波大・生物)

キュウリは雌雄異花同株植物であり、その性発現パターンはエチレンによって雌花形成を促進する方向に制御されていることが知られている。我々はこれまでに、エチレンの発生剤である Ethephon をキュウリの茎頂部に処理することにより雌花形成を誘導し、その茎頂部より遺伝子発現の変化する遺伝子のスクリーニングを Differential Display 法によって行った。その結果、雌花形成と非常に相関性の高い発現パターンを示す遺伝子として *ERAF17* を単離した。また、*ERAF17* は MADS-box 遺伝子をコードしていた。

今回の研究では *ERAF17* の機能を推測するために、その発現部位を詳細に解析した。まず、Northern 法により、開花時の花における発現部位を調べた結果、雌花の小花柄で非常に強く発現していることが分かった。また、雄花においても雌花よりも弱いながらも小花柄に特異的に発現していることが明らかとなった。さらに若い発生段階での発現を *in situ* hybridization 法を用いて調べたところ、やはり雌花の小花柄部分で強く発現していることが分かった。キュウリの小花柄は雌花と雄花とで形態的に異なることから、*ERAF17* が小花柄の発達の制御を通じて雌花分化に関与している可能性が示唆された。

S206

TRAB1を介したABA応答性遺伝子発現制御機構
加賀谷安章、保浦徳昇¹、村田道春、服部東穂
(三重大・遺伝子、¹現理研・植物分子生物)

TRAB1は、種子特異的な転写活性化因子OsVP1と相互作用するタンパク質としてクローン化されたbZIP型転写因子であり、ABA応答性配列(ABRE)に特異的に結合する。さらにGBD (GAL4 DNA-binding domain)::TRAB1融合タンパク質が、GAL4結合部位をもつレポーター遺伝子にABA応答性を付加することができることは、TRAB1がABA応答反応を直接媒介する制御因子であることを示している。

今回、ABAシグナル伝達におけるTRAB1の作用機構を解析した結果を報告する。TRAB1のdeletionやpoint mutationを調べた結果、N末端領域に存在するある特定のSer残基をAlaに置換するとGBD::GAL4のABA応答性付加が失われた。さらにイネ培養細胞Oc株を用いて *in vivo*でのリン酸化実験を行ったところ、TRAB1がABA処理後15分以内にリン酸化されることが見出された。また細胞分画の実験からはTRAB1はABAのあるなしに関わらず常に粗核区分に回収されることが見出された。これらのことから、ABAの一次シグナル伝達の最終事象はすでに核に存在するTRAB1の特定のSer残基のABA依存的なリン酸化であると考えられた。

S207

ヒメツリガネゴケ完全長cDNAの過剰発現変異体スクリーニングによるオーキシン、サイトカイニン作用機構解明への網羅的研究

藤田知道¹、関原明²、Piero Carninci³、林崎良英³、篠崎一雄²、長谷部光泰^{1,4} (1基生研・種分化2、2理研・植物分子、3理研・生体分子機能、4総研大・生命科学)

オーキシンやサイトカイニンは、植物の分化、成長に必須のホルモンであり、その作用機構が、モデル被子植物を用いて精力的に研究されている。しかし多岐にわたる生理作用のため全貌の解明にはまだ多くの困難が予想される。コケ植物のヒメツリガネゴケにおいても、オーキシン、サイトカイニンは、細胞分化に必須であると考えられている。オーキシンは、仮根や特定の原始体細胞の分化に、またサイトカイニンは、原系体から茎葉体に至るパッド(芽)の形成に重要である。これらの細胞分化様式に注目することで、それぞれのホルモン応答に関わる突然変異体のスクリーニングが容易に行える。さらに、ヒメツリガネゴケは、遺伝子ターゲットングが容易な唯一の植物である。

我々は、このようなヒメツリガネゴケの特性をいかして、これらホルモンの作用機構を解明するため、ヒメツリガネゴケ突然変異体の作成、スクリーニングを試みている。これまでに、遺伝子相同組換えを利用した遺伝子破壊株、ジーン、エンハンサートラップ株の作成を報告してきた。次に我々は、これら変異体のスクリーニングを相補するものとして、遺伝子過剰発現突然変異体の作成を開始した。ヒメツリガネゴケの完全長cDNAライブラリーを作成し、個々のcDNAの塩基配列を決定後、順次、相同組換えを利用してコケの特定遺伝子座にターゲットさせ、過剰発現させるというものである。本大会では、これら方法の詳細、ならびにEST解析の経過を報告する。

S208

ジャスモン酸メチルエステルによる *Bryophyllum calycinum* における二次離層形成誘導

Marian Saniewski¹、宇都宮 真木²、宮本 健助²、上田 純一² (1ポーランド国立果樹学・花卉学研究所、2大阪府立大、総合科学)

最近、演者らは、*Bryophyllum calycinum* の節間切片中央部にジャスモン酸メチルエステル(JA-Me, 0.5%, w/w)を50%含水ラノリンペーストとして環状に塗布すると、処理後4から6日目に処理部の上下において、茎細胞が二次的に離層細胞に分化する現象(二次離層形成)を見出した。この二次離層形成はJA-Meの他、エチレン発生剤であるエテホン(Ethrel, 2-chloroethyl phosphonic acid, 1%, w/w)によっても誘導された。JA-Meあるいはエテホンによる二次離層形成は、切片の茎頂端側へのオーキシン(IAA)投与によって阻害された。エテホンを処理した場合の茎切片中の内生ジャスモン酸類(JAs)含量、およびJA-Meを処理した場合のエチレン発生量は、ラノリンのみを処理した対照区とほぼ同程度であった。以上の結果から、JAsとエチレンは、IAAと相互作用を示しつつ、茎細胞を二次的に離層細胞へ分化させることが示唆された。また、JAsとエチレンの二次離層形成誘導は互いに独立であると推察された。

S209

単子葉植物の形態形成とオーキシンの極性輸送

伊藤百代、松岡信(名大、生物分子応答研究センター)

近年、形態形成の種々の局面においてオーキシンの極性輸送が重要な役割を担っていることが示唆されている。このオーキシンの極性輸送を担うトランスポーターとして、シロイヌナズナではいくつかのPIN遺伝子が同定されており、その分子遺伝学的解析により双子葉植物の形態形成におけるオーキシン極性輸送の役割が徐々に解明されつつある。一方、オーキシンの極性輸送が深く関与すると考えられている維管束の走向や胚におけるパターン形成において、双子葉植物と単子葉植物では、大きく異なっているにもかかわらず、単子葉植物におけるオーキシンの極性輸送と形態形成の関連についてはほとんど解析されていない。

我々はこれまでに、イネにおいて受粉後3および7日目の胚のcDNAライブラリーから4つのPIN-familyに属する遺伝子の完全長cDNAを単離した。これらの遺伝子を用いて現在、ノザンハイブリダイゼーションやin situハイブリダイゼーションによる詳細な発現解析、抗体染色によるPINタンパク質の細胞内局在の解析、RNAi法による機能破壊などを行っている。これらの結果をもとに、単子葉植物における胚発生過程やその後の形態形成におけるオーキシンの極性輸送の役割について考察する。

S210

GUS融合遺伝子を用いたオーキシン誘導性遺伝子MSG2/IAA19の発現様式の解析

立松圭・山本興太郎(北海道大・地球環境)

オーキシン依存性偏差成長欠損優性突然変異体msg2の原因遺伝子であるオーキシン誘導性遺伝子IAA19のプロモーター領域とGUSの融合遺伝子を用いて、IAA19の発現様式を組織化学的に調べた。黄化芽生えではGUSの発現が胚軸の伸長領域の直下の維管束系において見られ、根の維管束系でもわずかな発現が観察された。また、側根原基でもGUSの発現が見られる。スクロースを添加した培地で培養すると、GUS染色は維管束系に加えて皮層でも見られるようになった。黄化芽生えに重力刺激や一方からの青色光照射を2時間与えた場合、スクロースの添加に関係なく、未処理胚軸で染色された領域でGUS染色が増加した。水耕培養した黄化芽生えに50 μM 2,4-Dを24時間処理すると、胚軸と根の両方で維管束系のGUS染色の増加が見られた。GUS染色は花茎でも伸長領域の直下で観察されたが、ロゼット葉や茎性葉では見られない。花卉や萼の維管束系、雌しべの花柱や珠柄においても染色が観察された。

S211

気孔形成に対するオーキシンの作用

藤田美樹・風間晴子

国際基督教大学・生物

オーキシンの生理作用については数多くの研究がなされてきたが、気孔形成に対する影響に関する報告はこれまでほとんどない。我々は、キュウリの胚軸表皮系において、気孔形成過程が外生オーキシンによって著しく影響を受けることを見出したので報告する。

IAA処理により、気孔形成頻度には顕著な変化は認められなかった。しかし、孔辺細胞に特徴的な形態形成は観察されず、葉緑体の発達は見られるものの、孔の形成もなく、ほとんどの孔辺細胞は角張った形態の段階でその形成が停止していた。また、孔辺母細胞の分裂面の形成が途中で停止しているものが観察された。分裂面形成が途中で停止している細胞板の形成の様子から、細胞板の形成において、新たな細胞板が母細胞に融合する際には、まず茎頂側に伸展して固定され、さらに伸展して、母細胞の基底側の細胞壁と融合するという優先順位があることが明らかになった。これらの気孔の形成過程に対するオーキシンの作用を微小管との関わりという観点から論ずる。

S212

シロイヌナズナの温度感受性突然変異体を用いた不定根形成過程の遺伝学的解剖
小西美穂子, 杉山宗隆 (東大院・理・植物園)

シロイヌナズナの胚軸をオーキシンを含む発根誘導培地で培養すると、不定根が生じる。私達はこの過程に異常の見られる温度感受性突然変異体を新たに多数単離した。一次スクリーニングでは 8003 個体の M2 植物から 985 の候補を選抜し、二次スクリーニングで 473 の M3 系統から 60 の変異系統を得た。これらの変異体は、制限温度下での表現型から、(A)全く不定根を生じないもの、(B)基部端に細胞集塊を生じるもの、(C)太く短い異常な根を生じるもの、(D)基部端だけでなく、胚軸全体から原基を生じるもの、の 4 つのグループに大きく分類された。

現在、オーキシンの受容から不定根原基の形成開始に至る過程を遺伝学的に解剖するために、(A)群の突然変異系統の解析を行っている。胚軸からの不定根形成には脱分化とそれに続く増殖という 2 つの段階があり、両方の段階においてオーキシンが必要であると考えられるが、各突然変異の作用点をこれらの段階と関係づけることを当面の目標としている。

S213

葉の形態異常と植物体の右巻きのねじれを示すシロイヌナズナ突然変異体の解析

宮田麻衣子, 山本(豊田)章子, 前田英子, 船口珠紀, 塚谷裕一¹, 服部東穂(三重大・遺伝子,¹ 岡崎国立共同研究機構・基生研)

ABA による生育の阻害とクロロフィルの分解に対する耐性によって選抜された変異系統 20-15 は、第一染色体の *ANGUSTIFOLIA* (*AN*) 遺伝子の近傍にマップされた。20-15 系統は、*an* 変異体と同様に幅の狭い葉を持ち、トライコームの分枝が 2 本になっていることから、*an* のアレルである可能性が高い。20-15 系統は暗所で生育させた胚軸と根の表皮細胞が右巻きにねじれており、垂直に立てた寒天培地上で生育させると根が重力方向より右側にずれて伸長する。培地に ABA を加えると、この右方向への伸長は阻害され、根は垂直方向に伸長する。20-15 変異系統、ABA 合成または感受性に関わる変異体、および、ねじれ変異体 *spr* を用いて細胞の伸長方向と ABA との関係について検討した。

S214

アラビドプシスの根端優勢を喪失した突然変異体の単離と解析
黒羽剛, 岡田清孝¹, 佐藤忍(筑波大・生物,¹ 京大・生物)

高等植物の不定根及び側根の形成には、茎あるいは根を切断することにより切り口付近での根の形成が誘導される現象が見られ、頂芽優勢に対処させて「根端優勢」と呼ぶことにする。この現象には地上部から輸送されたオーキシンや傷害等が関与していることが知られているが、根(根端)がより基部側における根の形成を阻害する物質を生産することにより、根の形成を制御している可能性も示唆されている。その制御物質の候補として我々は、カボチャ根導管液に不定根形成阻害活性が存在することを示してきたが、根端で合成されるサイトカイニンをはじめ他の要因の関与を含めその詳細な検証は未だなされていないのが現状である。

そこで本研究では、アラビドプシスにおいて根端優勢が喪失した突然変異体の単離及びその解析を試みた。EMS処理により突然変異を誘起した種子から選抜を行ったところ、根や胚軸を切断しないにもかかわらず、不定根や側根の形成が多く見られる突然変異体 *rot302*, *ar-L14*, *ar-C12*, *ar-C22* が得られた。*rot302* は根の伸長が遅く、根の分枝が顕著に見られ、一部で不定根の形成も見られた。*ar-L14* は側根が多く、不定根の形成もよく見られた。*ar-C12* は側根形成は野生型と差が見られないが、不定根の形成が著しかった。これらの変異体では根端分裂組織の異常は見られなかった。*ar-C22* は主根の成長が途中で停止し、側根を全く形成しない代わりに正常に伸長する不定根の形成がよく見られた。これらの突然変異体は、何らかの根の機能の異常より根端優勢を喪失した結果このような表現型を示す可能性が考えられる。現在、これらの突然変異体の詳細な生理学的、遺伝学的解析を行っているところである。

S215

ジベレリンによって発現が誘導されるAtGAUR2遺伝子の解析

金田剛史, 白井美和, ¹柿本辰男 (愛媛大・理・生物, ¹大阪大院・理・生物)

アズキの上胚軸よりジベレリンによってmRNAの蓄積量の増加する遺伝子としてディファレンシャルスクリーニングにより単離したGAUR2 (GA up-regulated gene) は新規の遺伝子である。この遺伝子の機能は未知であるので、遺伝子の機能を調べジベレリンの作用との関連性を検討する目的で、形質転換植物作製の容易なシロイヌナズナよりGAUR2とアミノ酸配列レベルでよく似た遺伝子 (AtGAUR2) をRT-PCR法により単離した。シロイヌナズナにおいてAtGAUR2 mRNAの蓄積量は植物体にジベレリン合成阻害剤処理を施すことにより減少し、ジベレリン処理により増加した。そこで、AtGAUR2のアンチセンスRNAを強制発現させた形質転換植物の作製を試み、RNAプローブを用いたノザンプロット解析によりAtGAUR2遺伝子の発現量が減少していることが確認された植物体が得られた。現在、これらの植物体の形態やジベレリン処理による効果の解析を行っている。

S216

葉の極性伸長を司るチトクロムP450について

金 夔 泰¹, 藤岡昭三², 高津戸秀三, 吉田茂男², 塚谷裕一¹ (1岡崎国立共同研究機構・統合バイオ, 2理研・植物機能, 3上越教育大・化学)

葉の発生の制御機構を解明することは、植物の形、多様化の仕組みの理解に必須である。これまでに私たちは、発生遺伝学的手法を導入し、アラビドプシスの葉の全形が、細胞レベルでの極性伸長を通じ、縦方向と横方向との二方向独立に、制御を受けていることを明らかにしてきた (Tsukaya et al. 1994; Tsuge et al. 1996)。このうち縦方向の伸長を司るROT3遺伝子単離の結果は、既に報告 (Kim et al. 1998, 1999)したように、P450遺伝子族の一種であることが明らかになった。ROT3はブラシノステロイド合成系の遺伝子と酷似しているが、変異体の表現型から見てそれらとは異なる、新規の生長調整系に関わるものと推定される。そこでその制御機構を詳しく知るため、ブラシノステロイド生合成中間体を用いた回復実験や定量分析を行なった。またROT3類似遺伝子を単離し、トランスジェニック植物を用いた解析よりROT3類似遺伝子の機能解析を進めている。さらに、ブラシノステロイドによるROT3遺伝子発現の制御を知るため、ROT3pro::GUSを用いた解析も行なった。また、ROT3遺伝子によって制御される因子をマイクロアレイ法で探索を行なった。本研究の結果、ROT3は新規のステロイド生合成系に働く可能性もしくはブラシノステロイド生合成中間体を基質として共有する可能性が示唆された。

以上の結果を含め今回は、世界的に注目されているが、まだ全体像は明らかになっていない葉の長さ方向への伸長のメカニズムのうち、新規のステロイドホルモンの作用による制御について考察したい。

S217

サイトカイニン応答性遺伝子 (cig) の機能解析

木村琢磨^{1,2}, 金子委利子^{1,3}, 中野雄司¹, 吉田茂男¹

(¹理研・植物機能, ²埼玉大・理工学研究科, ³明治大・農)

サイトカイニンは細胞分裂促進、葉緑体分化促進等の植物体の成育に必要な生理作用を制御することが知られているが、これらの情報伝達系の上流に位置するサイトカイニン応答性遺伝子についての知見は非常に少ない。そこで我々は、タバコ緑色培養細胞においてサイトカイニン生理作用の前段階もしくは初期段階と想定される刺激後12時間で発現が誘導される遺伝子群を、Differential Display法を用いて単離し、cig (cytokinin inducible gene) 1~3と命名した。これらcig遺伝子群についての完全長cDNAの単離し、引き続きhomology searchを行った結果、cig2遺伝子は翻訳開始時にribosome/tRNAと複合体を形成するeIF2に対するGDP/GTP exchange factor (GEF) であるeIF-2Bファミリーと高い相同性を示した。続いてより詳細な解析を行い、cig2はサイトカイニン刺激後2時間以内に発現誘導を受けること、植物体内において、つぼみにおいて最も高い発現が見られることが明かとなった。現在、より詳細にcig2の機能解析を行うため、cig2センス、アンチセンスタバコ形質転換植物体の作出、およびGFPを用いたcig2遺伝子の細胞内局在の解析などを行っている。またcig1遺伝子はproline dehydrogenaseと高い相同性を示した。現在酵母遺伝子欠損株を用いた相補実験を試みている。

S218

マメ科植物・メスキートの葉のアレロパシー

中野洋, 藤井義晴¹, 山田小須弥², 小瀬村誠治³, 長谷川宏司² (筑波大院・農・応生化, ¹農水省・農環研, ²筑波大・応生化, ³慶應義塾大・理工・化学)

植物は自らの意志によって生活の場を変えることができないうえ、与えられた環境に適応し、周りの生物に対しては防衛的、攻撃的あるいは共益的機構を備えて身を守り、種の繁栄を図っている。植物から分泌・放出される化学物質が、他の植物に対して何らかの影響を与える場合、これをアレロパシーという。マメ科植物・メスキートは、サウジアラビア、アメリカ合衆国、インド等に分布し、周りには他の植物が生えにくいというアレロパシーが確認されている。これまでに、我々は、この野外で見られるアレロパシーを実験室レベルで再現し、レタス、イヌビエの幼根の生長抑制物質としてL-Tryptophanを単離、同定した。さらに、このアレロパシーにL-Tryptophanが深く関与していることを明らかにしたが、L-Tryptophan以外の生長抑制物質の存在が明らかになった。そこで、本研究ではL-Tryptophan以外のレタス、イヌビエの幼根の成長抑制物質の単離、同定を行ったので、その結果について報告する。

S219

窒素栄養に応答したサイトカイニン代謝機構の解析
高橋徹、榊原均¹、武井兼太郎、谷口光隆、杉山達夫(名古屋大院・生命農学、¹理研・植物科学研究センター)

我々はトウモロコシの窒素飢餓からの回復過程初期において根でサイトカイニン(CK)レベルが増加することを明らかにしている。しかし、どのような要因によりこの増加が起こるかは明らかにされていない。本研究では、窒素栄養に応答したCKレベル変動の制御機構についてCK代謝系酵素に着目して検討した。

CKの代謝に関わる酵素(adenosine kinase, adenine phosphoribosyltransferase, CK oxidase, β -glucosidase)の窒素補填による遺伝子発現レベルの変化を調べたところ、 β -glucosidase mRNAの蓄積量のみが有意に増加した。 β -Glucosidaseはzeatin-O-glucoside(不活性型)をt-zeatin(活性型)へと変換する酵素である。このことはCK量増加の一部は不活性型からの代謝的変換によることを示唆している。現在 β -glucosidase抗体を作製し、タンパク質レベルでの窒素補填による発現様式、および窒素飢餓からの回復過程における不活性型と活性型のCKレベルの変動を解析中である。更に、活性型から不活性型へと変換するzeatin-O-xylosyltransferaseと相対性を持つ遺伝子をトウモロコシから単離しているのでこの詳細についても合わせて報告する。

S220

Alaska エンドウ芽生えの頂芽優勢に関与する成長調節物質

中島江理、山田小須弥¹、小瀬村誠治²、山村庄亮²、長谷川宏司¹(筑波大院・農、¹筑波大・応生化、²慶應義塾大・理工・化)

頂芽の存在が側芽の成長・分化を抑制する現象を頂芽優勢という。側芽の成長は頂芽から供給されるオーキシンにより制御されていると考えられているが、その関与は単純ではないと思われる。第39回大会において、エンドウの頂芽優勢には、オーキシンやサイトカイニン等の植物ホルモンとは異なる、側芽の成長を制御する物質が関与していることを示した。そこで本研究では頂芽を切除することにより内生量が変動する物質を探索し、その物質本体の構造と作用機作の解明を目指した。

エンドウの頂芽優勢に関与する側芽成長調節物質の解明を目的として、頂芽を有する explant、頂芽を切除した explant 及び頂芽切除面に IAA を投与した explant から寒天中に拡散してきた物質を HPLC を用いて解析したところ、頂芽を有する explant 及び頂芽切除面に IAA を投与した explant からの浸出物と比較して、頂芽を切除することにより含量が変動する物質が確認され、現在これらの物質の単離・同定及び側芽の成長制御機構についての検討を進めている。これらの物質本体の構造が明らかにされることによって、頂芽優勢のメカニズムの解明に向けた新たな展開が期待される。

S221

ACC合成酵素のリン酸化部位の決定
立木 美保、森 仁志(名大院・生命農)

ACC合成酵素はエチレン生合成経路の律速段階を触媒する酵素で、様々な刺激に応答し転写段階で発現が制御されている。しかし、ACC合成酵素の活性制御は転写段階ばかりではなく、翻訳後にも制御されている可能性が示唆されていた。我々はACC合成酵素が組織内でリン酸化されていること、*in vitro* でACC合成酵素を脱リン酸すると活性が減少することを明らかにし、前大会で報告した。更に解析を進め、トマト果実から抽出した粗kinase画分を用い、大腸菌に発現させたACC合成酵素を、*in vitro* でCa²⁺依存的にリン酸化させることに成功した。このassay系を用いて、リン酸化部位の決定を試みた。C末端欠損変異体、セリン残基置換変異体、各種合成ペプチドを基質として*in vitro* リン酸化実験を行った結果、LE-ACS2の460番目のセリン残基がリン酸化部位であることが明らかとなった。

S222

ブラシノステロイド欠損非感受性変異体の単離

中野雄司、永田典子、嶋田幸久、吉田茂男、浅見忠男(理研)

ブラシノステロイド欠損状況下において暗所発芽させた植物に認められる「光形態形成」もしくは「葉緑体初期発達度の促進」は、ブラシノステロイドが植物生長の正の制御要因であるのみならず、葉緑体機能調節においては負の要因である可能性を示唆すると考えられる。本研究は、このブラシノステロイドの初期生長制御作用を手がかりにした分子遺伝学的手法によって、ブラシノステロイド情報伝達系に関わる遺伝子の機能解析と同定を試みることを目的とする。ブラシノステロイド生合成阻害剤(brassinazole)存在下における暗形態形成を示す変異体のスクリーニングを行い、bil (*brassinazole insensitive long hypocotyl*)、bih (*brassinazole insensitive hooked hypocotyl*)を単離した。特にこの中で最も形質の強いbil1は、双葉の展開、胚軸の徒長、初期緑化の全てにおいてbrassinazole非感受性を示し、しかし形質の強弱はbrassinazole濃度勾配に依存しないことから、ブラシノステロイド生合成過程ではなくブラシノステロイド情報伝達経路上の位置の活性化変異であると予測している。

ジベレリン(GA)は、SLR タンパク質を核から消失させることでシュート伸長を引き起こす
伊藤博紀, 上口(田中)美弥子, 芦荻基行, 松岡信(名大・生物分子応答センター)

近年、イネの恒常的に GA に反応する変異体 (*slender rice*) *slr* の原因遺伝子が単離され、そのコードするタンパク質がアラビドプシスにおける GA 情報伝達経路の抑制因子として単離された GAI/RGA と類似していることが明らかとなり、アラビドプシスにおいては GAI/RGA がリガンドに機能し GA シグナルを伝達しているのに対し、イネでは SLR のみで支配されていることが示唆された。さらに、アラビドプシスの *gai* は N 末端側の 17 アミノ酸が欠失することでドミナントネガティブ型タンパク質を産生することにより優性の GA 非感受型矮性を示すのに対し、*slr* は機能欠乏によって正対な恒常的 GA 反応性徒長型を示すことから、GAI/RGA/SLR の抑制機構は GA による伸長制御に重要であると考えられているが、その GA シグナル伝達に果たす機構は明らかになっていない。今回我々は、イネ SLR の GA シグナルにおける抑制機構を解明するために、SLR:GFP 及びドミナントネガティブ型変異 SLR (Δ DELLA SLR):GFP を発現する形質転換イネを作製した。これらの遺伝子を導入した形質転換イネは矮性を示し、細胞内における SLR:GFP タンパク質は核に局在していた。これらの形質転換イネに対して GA 処理を行ったところ、SLR:GFP では、核における GFP の蛍光は消失し形質転換イネは徒長した。一方、 Δ DELLA SLR:GFP では核からの蛍光の消失は起こらず植物体は矮性のままであった。このことは、SLR は核に局在することで GA 情報伝達経路を抑制していることを示しており、GA 応答により SLR を核から消失させることで脱抑制が起こると考えられた。また、DELLA 領域は GA シグナルを受容して SLR の核内の消失を引き起こすために重要であることが示唆された。

S224

イネのジベレリン非感受性変異体、*GA insensitive dwarf1* の解析 (2)

上口(田中)美弥子, 芦荻基行, 小林正智¹, 北野英巳, 松岡信(名大・生物分子応答センター, 生命農学, ¹理研)

イネの極矮性変異体、*GA insensitive dwarf1 (gid1)* は、GA 生合成欠損変異体 *d18* の強いアリルと類似した形態を示す。一方、内生 GA は逆に野生型の 100 倍以上に蓄積しており、GA 添加によっても表現型の回復がみられないことから、*gid1* 変異体は、GA シグナル伝達系に異常を来しているものと考えられた。また、このことは、*GID1* 遺伝子産物の機能が、GA シグナルの伝達における正の因子である可能性を示唆する。今回は、*gid1* 変異体の更に詳細な解析を目的として、GA シグナル伝達に関与する遺伝子や、その下流の遺伝子の *gid1* における発現を調べるとともに、GA シグナル伝達系の負の調節因子を欠損した徒長型突然変異体、*slr-1* とのエピスタティック分析を行った。

その結果、野生型においては、GA 添加により *SLR-1, GAMYB*, α -アミラーゼ遺伝子が発現誘導されたのに対し、*gid1* 変異体においては誘導が全くみられなかった。一方、GA により発現抑制される *GA20ox* 遺伝子は、*gid1* 内で発現が増大していた。また、*gid1* ヘテロ株と *slr-1* ヘテロ株を掛け合わせた分離世代において劣性ホモ表現型が *slr-1* 型に分離がゆがんでいたことから、*gid1/sl-1* 二重劣性変異体の表現型は *slr-1* 型であり、GA シグナル伝達系において *SLR-1* の上流で *GID1* が機能していることが示唆された。以上の結果から、イネ GA シグナル伝達系における *GID1* の機能を考察するとともに、*GID1* 遺伝子のポジショナルクローニングの結果も報告したい。

ダイコン下胚軸の光屈性反応に関与するミロシナーゼ

山田小須弥, 長谷川剛, 富田-横谷香織, 南栄一¹, 渋谷直人¹, 長谷川宏司(筑波大・応生化, ¹農水省・生物研)

ミロシナーゼ (β -thioglucoside glucohydrolase) はアブラナ科植物に多く含まれているカラシ油配糖体等のチオグルコシド結合を加水分解する酵素である。これまでにダイコン (*Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *gigantissimus* Makino) 下胚軸の光屈性に伴い、光側組織に存在する 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate (MTBG, 不活性型) が減少し、4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBI, 活性型) が増加し、更にラファヌニン (活性型) が生成されることを明らかにして光屈性刺激が MTBG から MTBI への変換を誘導している可能性が示唆されている。この MTBG から MTBI への変換を触媒すると考えられるミロシナーゼの光照射に伴う活性の変化を調べたところ、片側からの光照射後すみやかに光側組織で増大することを確認した。一方、影側と暗黒対照では大きな変動は見られなかった。これらの結果から不活性型の MTBG がミロシナーゼにより MTBI に変化し、更にその一部が活性型のラファヌニンへと変化した結果、光照射側組織での成長抑制が生じ、光屈性が誘導されることが示唆された。本大会ではダイコン下胚軸に存在するミロシナーゼ遺伝子の種々の光条件下での光屈性刺激に応答した発現パターンについて報告する。

S226

ABA 生合成に関与するシロイヌナズナ *NCED* 遺伝子の乾燥ストレス応答における機能解析

井内聖, 小林正智, 篠崎一雄(理研・植物分子)

ネオザンチン開裂酵素 (*NCED*) は ABA の生合成において律速となる反応を触媒する。我々はカウピーより *NCED* 遺伝子 (*VuNCED1*) をクローニングし、乾燥ストレスに応答して *VuNCED1* の発現が誘導されることを明らかにした。(Iuchi *et al.* (2000) *Plant Physiol.* 123: 553-562)

一方、シロイヌナズナゲノムデータベース上には *NCED* と同性的のある塩基配列が少なくとも 9 個存在する。そこでシロイヌナズナにも乾燥ストレスに応答して発現が誘導される *NCED* 遺伝子が存在するか否か明らかにするため解析を行い、*AtNCED3* の発現レベルが乾燥ストレスにより顕著に上昇することを明らかにした。続いて *AtNCED3* がコードするタンパクの機能解析を行い、*NCED* 活性を確認した。さらに形質転換植物を用いた解析により、*AtNCED3* の発現量に相関して内生 ABA レベルと乾燥耐性が変化することを明らかにした。以上の結果、ABA の蓄積を介して乾燥耐性を獲得する過程において *AtNCED3* の発現制御が重要な役割を担っていることが示唆された。

S227

アントシアニン芳香族アシル基転移酵素の活性中心に関わるアミノ酸残基の同定

奥原宏明、榊原(米倉)圭子¹、田中良和¹、久住高章¹、長谷俊治(阪大蛋白研、¹サントリー・基礎研)

アシル基転移酵素(AT)は植物の中で多様な機能を担っており、アラビドプシスのゲノム中には数十コピーあると考えられている。ATファミリーに属するアントシアニン芳香族アシル基転移酵素(AAT)は、アントシアニンの糖部分に芳香族アシル基を転移する反応を触媒し、アントシアニン構造の多様化による花色の変化に関わっている。我々はリンドウのAATを材料として、化学修飾実験や部位特異的改変によって基質認識領域や反応中心に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。

リンドウAATの組換え体は化学修飾剤のNEMやDEPCによって活性が阻害されたことから、CysとHis残基がAATの活性に重要であることが示唆された。AATにはHis-X-X-X-AspというATファミリーに共通して保存されているモチーフがあり活性中心であると考えられているが、生化学的裏付けはない。また、Asp-Phe-Gly-Trp-Gly-Lysの非常に保存されたアミノ酸配列領域がAATには存在するが、その機能についてはまったく未知である。以上のAAT活性に重要と予測されるアミノ酸残基を各々Alaに置換した改変酵素を作出し、AAT活性に重要であるアミノ酸残基をいくつか同定した。

S228

ブラシノステロイド生合成の初期過程に関する研究

中嶋直子¹、藤岡昭三¹、田中孝志²、高津戸秀²、吉田茂男¹(¹理研・植物科学研究センター、²上越教育大学・化学)

ブラシノステロイド生合成経路における初期過程を明らかにするため、シロイヌナズナ、タバコの実生、ニチニチソウの培養細胞を用いて、重水素で標識したcholesterolまたはcampestanolの代謝実験を行い、代謝産物をGC-MSで分析した。その結果、cholesterolからの代謝産物としてcholest-4-en-3-oneとcholestanolが確認された。また、campestanolから28位の脱メチル化が起こり、cholestanolへ変換することも明らかになった。シロイヌナズナ、タバコではcampestanolからcholestanolへの変換量が、cholesterolからの変換量よりも多く、campestanolからcholestanolへの経路のほうが主要である可能性も示唆された。さらに、本研究では、ニチニチソウ培養細胞と同様、シロイヌナズナにおいて、campestanolから6-oxocampestanolへの変換が起こることを明らかにした。

S229

シロイヌナズナのイソペンテニルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

武井兼太郎、榊原 均¹、杉山達夫(名古屋大院・生命農学、¹理研・植物科学研究センター)

新規のサイトカイニン合成の律速段階はdimethylallylpyrophosphate (DMAPP)と5'-AMPからisopentenyladenosine-5'-monophosphateを生成する反応であり、これを触媒する酵素はイソペンテニルトランスフェラーゼ (IPT) であると考えられている。現在まで、植物病原菌由来のIPT遺伝子は同定されているが、植物からの報告はなされていなかった。

我々はシロイヌナズナからのIPT遺伝子の単離を目的として、バクテリアのIPTアミノ酸配列をもとにゲノムデータベースを検索したところ複数種の相同遺伝子の存在が示唆された。これらの遺伝子の中で、tRNAのアンチコドンの3'側に隣接したアデノシン残基にDMAPPのイソペンテニル基を転位する酵素であるtRNAイソペンテニルトランスフェラーゼ (tRNAIPT) と分類されていた遺伝子のタンパク質を大腸菌で発現させたところ、現在までに4種類の遺伝子産物についてIPT活性が確認された。現在、IPTとしての酵素の基本的な性質と共にtRNAIPT活性の有無についての解析、またシロイヌナズナにおけるこれらの遺伝子の発現解析を進めている。

S230

CHARACTERIZATION OF THE SPERMIDINE SYNTHASE GENE FAMILY IN *ARABIDOPSIS THALIANA*.

Yoshie HANZAWA^{1,2}, Akihiro IMAI¹, Taku TAKAHASHI¹, Marina FRANCESCHETTI², Anthony MICHAEL² and Yoshiyumi KOMEDA¹; ¹Division of Biological Sciences, Hokkaido University, 060-0810, Japan, ²Institute of Food Research, NR4 7UA, UK

We recently showed that the *Arabidopsis* *ACAULIS5* (*ACL5*) gene, whose inactivation causes a severe defect in the elongation of stem internodes encodes a polyamine biosynthetic enzyme, spermine synthase (EMBO journal (2000) vol. 19, pp4248). In order to clarify further the function of polyamines in plant development, we have isolated three *Arabidopsis* cDNA clones with a high sequence similarity to known spermidine synthases. Their enzyme activity was examined in yeast cell line defective in spermidine synthase and *E. coli* cells. In addition, a series of site-directed mutations in *ACL5* were produced. Here we report these results and expression patterns of these genes in plants and discuss the function of the spermidine and spermine in plants.

rd29A 遺伝子の低温、塩および ABA 応答性発現に異常が生じた変異体の単離と解析

中島一雄、三浦節子、大河原依久子、篠崎一雄¹、篠崎和子
(国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

我々は、乾燥、塩ストレス、および低温に対するシグナル伝達機構を解明することを目的に、ストレス応答性遺伝子の発現に異常が見られる変異体の単離と解析を行っている。すなわち、乾燥、塩、低温、および ABA 応答性遺伝子である *rd29A* 遺伝子のプロモーターとルシフェラーゼ (*LUC*) 遺伝子を融合してシロイヌナズナに導入した。これにアクティベーションタギング用ベクター pPCVICEn4HPT あるいは pSKI015 をもつアグロバクテリウムを感染させることにより、アクティベーション T-DNA タグラインを作成した。得られた変異体から非ストレス条件下でも発現する変異体、あるいは低温、塩、ABA 処理時に *LUC* の発現が異常になる変異体をスクリーニングした。その結果、いくつかのラインにおいて *rd29A::LUC* 遺伝子の異常な発現が見られた。得られた変異体のうち #1986 系統は非ストレス時においても高い *LUC* 活性を示した。現在、得られた変異体の生理学的、分子生物学的、および遺伝学的解析を行っている。

イネ植物体におけるエリシター応答性遺伝子の組織特異的及びシステミックな発現

田部 茂、岡田 光央、南 栄一、渋谷 直人
農水省・農業生物資源研究所

イネ培養細胞系では、特定サイズ以上のキチンオリゴ糖 (*N*-アセチルキトオリゴ糖) が、エリシターとして種々の生体防御反応を引き起こす。これまでにこの系において、エリシター処理後数分で発現が誘導され、数時間で発現レベルが低下するという一過性の発現パターンを示す初期応答性遺伝子、EL2、EL3が単離されている。さらにPAL等の生体防御反応に関与していると考えられる遺伝子もエリシターによって誘導される。これらのエリシター応答性遺伝子のイネ植物体における発現をノザン分析、*in situ* ハイブリダイゼーション実験によって解析した結果から、基部で切断し(GlcNAc)₇水溶液を切断部位に処理したイネ緑葉では、EL2、EL3の発現は培養細胞系と同様の発現パターンであり、これらの初期応答遺伝子が、イネ植物体においても培養細胞系と同様なメカニズムによって制御されていることが示唆されている。そこで本研究では、インタクトなイネの根に(GlcNAc)₇処理を行い、EL2とPALの発現を調べた。その結果、EL2は、根では外皮と根冠始原細胞群周辺に特異的かつ一過性の発現を示したが、葉ではエリシターによる誘導は確認されなかった。一方、PALは、根では発現しておらず、葉で発現していた。¹²⁵Iラベルした(GlcNAc)₇を根部に処理しても、葉への移行は認められなかった。これらの結果から、イネ植物体において、EL2の発現は、エリシターと接触するような非常に近接した部位でのみ誘導され、PALの発現は、エリシターによって生じるシステミックなシグナルによって誘導されているものと推測された。さらにプロピオン酸などの処理を行った時のこれらの遺伝子の挙動についても併せて報告する。

A POSSIBLE INVOLVEMENT OF SUPEROXIDE GENERATION IN SALICYLIC ACID-INDUCED STOMATAL CLOSURE IN *VICIA FABEA*

Izumi C. MORI¹, Reinhard PINONTOAN¹, Tomonori KAWANO², Shoshi MUTO^{1,2}, ¹Nagoya University Bioscience Center, ²Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601

The known mediator of systemic acquired resistance salicylic acid (SA) induced stomatal closure of *Vicia faba* L. Application of SA to the epidermal peels evoked an elevation of CLA-chemiluminescence, suggesting the generation of superoxide (O₂⁻). Pharmacological studies by using inhibitors showed that SA-induced O₂⁻-generation was inhibited by both O₂⁻-specific scavengers superoxide dismutase (SOD) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid (tiron), and a peroxidase inhibitor salicylhydroxamic (SHAM). Moreover, either SOD, tiron or SHAM could suppress the SA-induced stomatal closure. On the other hand, application of superoxide-generating system also induced stomatal closure. These results support the involvement of reactive oxygen species on signal transduction in SA-induced stomatal closure.

シロイヌナズナ DNA 傷害応答遺伝子の制御領域の解析

前田智秀、渡壁百合子、高瀬尚文、平塚和之
(奈良先端大・バイオ)

シロイヌナズナの *AtRAD51* 遺伝子は組換え因子 RecA 様タンパク質をコードし、染色体 DNA の相同組換えや修復に関与すると考えられている。*AtRAD51* 遺伝子は DNA 傷害や細胞周期により制御されることが示されているが、その制御機構と関連する情報伝達系に関しては必ずしも明らかでない。そこで、高等植物における DNA 傷害応答性遺伝子発現の機構を調べる目的で、*AtRAD51* 遺伝子のプロモーター解析を試み、これまでに、TATA ボックス上流近傍に位置する領域が DNA 傷害を認識し転写活性を上昇させるのに必要であることを明らかにした。今回は、機能欠失実験および機能獲得実験によって、44塩基対のシス制御領域を同定することが出来たのでその結果について報告する。

F305

シロイヌナズナATSRPK1遺伝子の浸透圧および乾燥ストレス、ABAによる転写量の変化

河野友子、松岡大介、南森隆司、東哲司、安田武司（神大院・自然科学研究科）

高等植物のSNF1関連プロテインキナーゼ（SnRK）は、様々な環境および栄養ストレスに対する細胞の応答に関与していると推測されており、SnRK1、2、3の3つのサブファミリーから構成される。

我々はSnRK3に分類される全長約1.5kbの新規なシロイヌナズナのSNF1関連プロテインキナーゼ遺伝子（ATSRPK1）を同定した（2000年度年会発表）。

今回はATSRPK1遺伝子発現と環境ストレスとの関連について報告する。

光、低温、高温、乾燥、浸透圧などの様々な環境ストレスおよびABA、BAなどの植物ホルモンがATSRPK1転写量に与える影響について検証した結果、高浸透圧ストレスにより転写量は増加し、乾燥ストレスおよびABA添加によっても転写量の変動が認められた。

ATSRPK1はアミノ酸配列においては同じSnRK3に属する小麦のWPK4と比較的近縁なものであるが、外的環境による転写量の変化はWPK4とは異なっていた。従って、ATSRPK1のこれらの特徴はSnRK3サブファミリーにおいて新規なものであると考えられる。

F306

イネキチンオリゴ糖 エリシター結合蛋白質の単離及びその遺伝子の探索
賀来華江、南栄一、渋谷直人（農水省・生物研）

我々は、これまで、いもち菌細胞壁の構成多糖であるキチンのオリゴ糖（GlcNAc)₆がエリシターとして、イネの生体防御反応を誘導すること、さらに、イネ培養細胞の原形質膜画分に高親和性のエリシター結合蛋白質が存在すること、フォトアフィニティーラベル法によりこのタンパク質を同定したことについて報告した。このキチンオリゴ糖結合蛋白質（EBP）の精製に関しては、これまでのところ、収率の低さ等からクローニングに必要な情報を得るのが困難であった。本大会では、精製過程等を見直すことにより、糖エリシター結合蛋白質の精製を大幅に収率を向上させることができたので、その結果を報告する。

EBPの精製は、Triton X-100で可溶化した原形質膜画分を（GlcNAc)₆-APEA-CH-Sepharoseカラムに供し、buffer及び非エリシター糖で洗浄後、目的タンパク質は、酸性buffer（pH 2.3）により溶出した。EBPの活性の検出は、¹²⁵I-APEA-(GlcNAc)₆と架橋させた後、SDS-電気泳動により調べた。

銀染色及びアフィニティーラベルの結果から、7万5千及び5万5千付近に2本の主バンドを検出した。これらのバンドへのラベル体の導入は、いずれもエリシター活性を有するキチンオリゴ糖により特異的に阻害された。

今回使用したアフィニティーカラムにおけるEBPの結合効率は、これまで、使用していたカラム担体のものに比べて18倍良いものであった。このEBPの回収率の増加により、EBPのN末端アミノ酸配列解析が可能になり、その情報に基づいて、EBPの遺伝子の探索を行なっている。

F307

ジャガイモ植物のエリシター応答性MAPキナーゼ
加藤新平、仙田香織¹、吉岡博文、道家紀志、川北一人（名大院・生命農学・資源生物機能、¹岡山生科総研）

ジャガイモ植物の誘導抵抗反応にはプロテインキナーゼが関与すると考えられている。本研究では、疫病菌菌体壁成分エリシター処理したジャガイモ塊茎において、分子質量約51 kDaのプロテインキナーゼ（p51-PK）が活性化されることをミエリン塩基性タンパク質を基質としたゲル内リン酸化法を用いて見いだした。p51-PKの諸性質について検討したところ、p51-PKはMAPキナーゼファミリーに属すると考えられた。p51-PKの精製を各種カラムクロマトグラフィーにより試みたところ、p51-PKに加えて分子質量約46 kDaのPK（p46-PK）が共精製された。両者はゲル濾過において予想されるサイズの位置に独立に溶出し、それぞれ単量体として機能すると考えられた。両者のペプチドマッピングおよび内部アミノ酸配列は一致し、p46-PKはp51-PKの部分分解物であると考えられた。

F308

イネ酸素ストレス防御遺伝子に存在する酸素ストレス応答性新規シス-エレメント

森田重人^{1,2}、塚本成文¹、平野悦子¹、増村威宏^{1,2}、田中國介^{1,2}（¹京都府大・農・生資化、²京都府農資センター）

我々はこれまでにイネにおいて、酸素ストレスの防御に関与する細胞質型スーパーオキシドディスムターゼ、細胞質型チオレドキシシン、グルタレドキシシンのそれぞれの遺伝子の5'-上流域に、28bpから成る相同性の高い配列が共通に存在することを明らかにしている。我々はこの共通配列がレドックス制御に関与するシス-エレメントである可能性を検討した。

この28bp配列をCaMV 35Sプロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子上流に連結したレポーターコンストラクトを用いてトランジェントアッセイを行った。その結果、パラコート処理によりルシフェラーゼ活性の上昇が見られ、この配列が酸素ストレスにตอบสนองするシス-エレメントとして機能していることが明らかとなった。またこの配列に結合する核タンパク質の存在がゲルシフトアッセイにより確認された。これらの結果から、酸素ストレス防御に関わる複数の遺伝子が共通なレドックス制御を受けていることが明らかとなった。

F309

乾燥・塩・低温応答性シスエレメント DRE に結合する DREB1 をコードしている遺伝子群のプロモーター解析

鳴坂義弘¹, 中島一雄¹, Zabta K. Shinwari¹, 篠崎和子¹, 篠崎一雄²
(¹国際農研・生物資源, ²理研・植物分子生物)

乾燥・塩・低温誘導遺伝子であるシロイヌナズナの *rd29A* 遺伝子のプロモーター領域には乾燥・塩・低温ストレス応答に関与するシスエレメント DRE(TACCGACAT)が存在し、さらにこの領域に結合する転写因子 DREB の存在を明らかにした。今回は低温応答に関与する転写因子 *DREB1* 遺伝子ファミリー(*DREB1A*)のプロモーター解析を行った。

3種の低温ストレス誘導性 *DREB1* 遺伝子の5'側上流プロモーター領域を比較すると3種のプロモーター間で保存された領域、BOX I から IX が存在していた。そこで、これら3種の *DREB1* 遺伝子の保存された領域を含む5'側上流領域と β -グルクロニダーゼ(*GUS*) レポーター遺伝子を融合させたキメラ遺伝子を作製し、シロイヌナズナに導入した。得られた形質転換シロイヌナズナを低温(4°C)処理し、ノーザン法により導入遺伝子の発現解析を行った。その結果、3種すべての *DREB1* 遺伝子のプロモーターを用いた場合で *GUS* レポーター遺伝子の低温誘導が示された。一方、*DREB1A* 遺伝子のプロモーター領域を用いたデリション解析の結果、-313~-71の領域にシスエレメントの存在が示唆された。さらに3種のプロモーター間で保存された領域に欠失変異を加えて *DREB1A* および *IC* プロモーター領域を用いて同様に解析すると、いくつかの領域において *GUS* 遺伝子の発現が著しく低下し、低温応答性シスエレメントの存在が示唆された。

F310

COMPARATIVE ANALYSIS IN BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF OSRAB7 WITH ITS MUTANS
JD BAHK, MY NAHM; Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch.
Gyeongsang Natl. Univ., Jinju 660-701 Korea

Low temperature is a major environmental stress affecting plant growth and crop productivity. OsRab7 was screened from a cDNA library of cold-acclimated etiolated seedlings of rice. Deduced amino acid sequences from OsRab7 and other homologues are very same as much as 60-70%. It also conserved all the known functional domains of other small G-proteins. Its specific binding in a saturable manner and intrinsic GTPase activity although low, revealed directly that OsRab7 is indeed a GTP-binding protein. A phosphate binding domain mutant(Q67L) showed very lower GTPase activity and a gamma phosphate interaction region mutant(T22N) showed no GTP binding activity. Western blot analysis proved its wide distribution on various tissues. Tryptic proteolysis experiment for the confirmation of the binding state of T22N and Q67L mutants with guanine nucleotides exhibited different cleavage patterns.

[This work was supported by the Brain Korea 21 Project, the Ministry of Education, Korea]

F311

シロイヌナズナにおけるサーカディアンリズム関連遺伝子群APRR1/TOC1ファミリーの解析(I): 擬似レスポンスレギュレーターの新規発見とサーカディアンウェイブ
牧野聖也, 松鹿昭則, 小島正也, 水野 猛
(名大院・生命農)

シロイヌナズナには、His \rightarrow Aspリン酸リレー情報伝達に関与するレギュレーター群(ARRs)と類似した擬似レギュレーター群(APRRs)が存在する。これらAPRRsに共通する構造は興味深く、N末端の擬似レギュレータードメインに加えてC末端にCONSTANSモチーフもつ。今回、これら5種類のAPRR遺伝子群(APRR1, APRR3, APRR5, APRR7, APRR9)の同定と単離を行い、それらの構造と発現様式を解析した。最も興味深い知見は、全て遺伝子の転写発現が典型的なサーカディアンリズムを示すことであった。さらに、数時間毎の間隔でAPRR9 \rightarrow APRR7 \rightarrow APRR5 \rightarrow APRR3 \rightarrow APRR1の順に規則正しく発現が上昇し、そのリズムは生育条件としての明暗条件(日長)に左右されることなく刻まれることを見いだした。この興味深い現象を「サーカディアンウェイブ」と名付けた。この研究の過程で、他の研究者により時計遺伝子の有力候補として注目されているTOC1遺伝子が同定され、APRR1と同一であることが分かった。これらの結果をあわせ、APRR1/TOC1ファミリー遺伝子群が、シロイヌナズナにおいて未だ知られていない概日時計本体と関わった働きをし、「サーカディアンウェイブ」という現象が時を刻む分子メカニズムと深く関連しているという新しいモデル(バーコードクロックモデル)を提案する。

F312

シロイヌナズナにおけるサーカディアンリズム関連遺伝子群APRR1/TOC1ファミリーの解析(II): 何時どのようにしてサーカディアンウェイブは開始するか?
松鹿昭則, 牧野聖也, 小島正也, 水野 猛
(名大院・生命農)

シロイヌナズナにみられる特徴的なサーカディアンリズムである「APRRsサーカディアンウェイブ」は、概日性時計と深く関連していると予想された。そこで、これが本当に時計メカニズムと関連した現象か否かを「光条件」との関係で検討した。「明暗条件」で生育させた植物個体では、日長に関わりなくAPRR9の転写は夜明けとともに急激に上昇した。連続暗所で生育させた黄化めばえでは「ウェイブ」は観察されなかった。しかし、白色光に晒すと急激にAPRR9の転写が誘導され、それに先導されるようにして「APRR7 \rightarrow APRR5 \rightarrow APRR3 \rightarrow APRR1サーカディアンウェイブ」が誘起された。この誘導性リズムは明暗条件に依存しない自由継続(Free-Running)性を示し、連続光条件下で3日間持続した。また、「サーカディアンウェイブ」を誘導するには、赤色光(660nm)を2分間照射するだけで十分であった。このことは、APRR9の転写とそのリズムの誘導(及び結果としての「サーカディアンウェイブの誘起」)は、少なくともその一部が、フィトクローム関連の光シグナル入力経路に支配されていることを示唆している。この結果を「入力系 \rightarrow 時計振動体」という時計の一般的基本概念から解釈することで、先に提案した「バーコードクロックモデル」を補強する。

F313

ラン藻概日時計に関与するHis-キナーゼと相互作用するレスポンスレギュレーターの同定と機能解析
 藤澤洋二郎¹、岩崎秀雄²、三輪久美子¹、饗場浩文¹、近藤孝男²、水野 猛¹ (名大院・¹生命農、²生命理)

ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7942の概日時計に関しては、*kaiABC*遺伝子群がリズムを刻む本体(オシレーター)であると考えられる。最近、岩崎と近藤らにより、*kaiABC*時計の振動制御に係わる因子として*SasA*・His-キナーゼが同定され、その機能に関するモデルが提案された。His→Aspリン酸リレー系の基本概念に従えば、*SasA*His-キナーゼは未知のレギュレーターとペアで機能していると推定される(モデルで推定されたRR-X)。今回は、大腸菌のHis→Aspリン酸リレー系を利用したトリックを用いて、*SasA*と相互作用して働くRR-Xに相当すると思われるレギュレーター(*SasR*と命名)を同定した。*SasR*はその構造から、下等植物のプラスチドにも保存されるDNA結合転写因子タイプのレギュレーターと推定された。そこで*SasR*の構造と機能に関して、His→Aspリン酸リレーに関する観点、及び、ラン藻における概日リズムの制御に関する観点の両面から解析した。これらの結果を、ラン藻の時計メカニズムや制御モデルとの関連を含めて考察する。

F314

DNAチップを用いた運動性シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803における*lexA*様*sll1626*遺伝子破壊株の解析
 亀井綾子、日原由香子¹、耿暁星、池内昌彦(東大・教養・生物、¹埼玉大・理・分子生物)

紫外線や活性酸素によるDNAの損傷は普遍的な現象で、生物はこれに対応するための様々なDNA修復機構を持っている。シアノバクテリアや植物は、酸素発生型光合成生物の性質上DNAの損傷と修復は非常に重要と考えられるがその機構や調節系はほとんど解明されていない。本研究では大腸菌でよく知られているSOS遺伝子群の転写リプレッサーである*LexA*と有意な相同性を示す*Synechocystis* sp. PCC 6803の*sll1626*遺伝子に注目し、この遺伝子破壊株のDNA chip解析を行なった。

大腸菌において*LexA*によって発現が抑制されるSOS遺伝子群(*recA*, *umuC*, *suIA*他)のホモログの発現レベルは野生株と比べて有意な差は確認されなかった。一方、*sll1626*遺伝子自身を含む数個の機能未知遺伝子(*sll1009*, *slr0179*, *sll1765*他)の発現量が7-10倍増加していた。また線毛のサブユニットをコードする*sll1694*(*pilA1*)や*slr1667*, *slr1668*, *slr2015*, *slr2016*, *slr2017*, *slr2018*などの遺伝子の発現量は減少していた。*sll1694*の発現レベルの減少はノーザンハイブリダイゼーションでも確認された。これと対応して*sll1626*遺伝子破壊株は運動性を欠失する表現型を示した。これらの結果は、*sll1626*遺伝子は*LexA*とは異なり、運動性に関係した線毛様構造体の遺伝子などの発現を調節する正と負の両方の転写因子の機能を持つ調節因子であることを示唆している。

F315

運動性シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803におけるSer/Thr型プロテインキナーゼ(SpkA)の機能解析及び基質タンパク質の同定
 亀井綾子、湯浅高志、耿暁星、折川紅美、吉原静恵、池内昌彦(東大・教養・生物)

我々は2000年の本大会において*Synechocystis* sp. PCC 6803においてSer/Thrプロテインキナーゼ様遺伝子の中から*spkA*が運動性に関与していることを報告した。

*spkA*と運動性との関連性を詳細に知るため、線毛のサブユニットをコードする*pilA1*の発現レベル及び線毛の形成を確認したが親株との違いは見られなかった。これらの結果は、*SpkA*は運動や線毛の生合成の必須因子ではないことを示唆している。N末端にHis-tagをつけた融合タンパク質として*SpkA*を大腸菌で大量発現させ、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーで精製した。精製した*SpkA*を用いてin vitroリン酸化実験を行った結果、自己リン酸化活性とSer/Thrプロテインキナーゼの一般的な基質として知られているカゼイン、ミエリン塩基性タンパク質、ヒストンへのリン酸化が確認された。この*SpkA*タンパク質による*Synechocystis* sp. PCC 6803の細胞抽出液のin vitroリン酸化実験より、複数の膜タンパク質が*SpkA*によってリン酸化されたことが明らかになった。これらの結果は*SpkA*は真核生物型のSer/Thr型プロテインキナーゼであり、*Synechocystis* sp. PCC 6803の細胞膜に存在する運動装置もしくはシグナル伝達経路の成分をリン酸化することによって細胞の運動性を調節していることを示唆している。

F316

膜脂質の流動性による遺伝子発現の制御

Silvia FRANCESCHELLI¹、稲葉昌美、鈴木石根²、Balazs SZALONTAI³、兼崎 友²、Dimitry A. LOS⁴、Bruno MARESCA⁵、村田紀夫² (基生研、¹Univ. Salerno, Italy、²総研大 生命科学、³Inst. Biophys., Biol. Res. Center, Szeged, Hungary、⁴Inst. Plant Physiol., Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia、⁵Inst. Genet. Biophys., Naples, Italy)

生物は外界温度の変化に応じて遺伝子発現のパターンを変化させ、新しい環境に適応する。我々は、生体膜の物理的性質の変化が温度検知の機構に関与していると考えている。*Synechocystis* sp. PCC 6803は4つの不飽和化酵素の遺伝子を持つが、低温下ではそのうち*desA*, *desB*, *desD*の発現が誘導され、多価不飽和脂肪酸が増加する。一方、遺伝子破壊株*desA::desD*は一価不飽和脂肪酸しか持たず、低温感受性である。細胞質膜の脂質の「硬さ」を表す指標としてアルキル基の分子振動の振動数をFTIR分光法を用いて解析したところ、*desA::desD*株の膜脂質は野生株より硬く、その差は特に低温で顕著であった。DNAマイクロアレイ解析により、*desA::desD*株では、熱ショックタンパクの遺伝子(*hspA*, *hspG*, *dnaK2*, *htrA*, *dnaI4*)の発現が低温ストレス条件下で顕著に誘導されることが見出された。野生株では、これらの遺伝子の低温誘導性は非常に低い。以上の結果は、生物が細胞質膜の流動性の低下を低温シグナルとして検知し、遺伝子発現を制御していることを示唆する。

F317

イネ篩管液の中に検出される RNA に関する研究
真野弘範¹, 野口真己¹, 米山忠克¹, 林浩昭¹, 藤原徹^{1,2} (¹東大院・農, ²PRESTO, JST)

篩管はその分化の過程で核が消失するが、篩管液中には RNA が存在する。他の組織からのコンタミネーションの最も少ない篩管液の採取法であるインセクトレーザ法によって篩管液を集め実験に用いた。篩管液中の核酸の量を測定すると、18-44ng/μl 程度であり、DNA と RNA はおよそ半分づつ含まれていた。連続して出てくる篩管液においても核酸の量は減少しないことから、篩管への核酸の供給は継続的に行われていると考えられる。篩管液から抽出した核酸の電気泳動を行うと 100-200 ベース付近にシグナルが検出され、このシグナルは RNase 処理によって消失し、DNase 処理では変化がなかった。篩管液から cDNA library を作製し、ランダムに約 200 のクローンについて塩基配列を決定したところ、20 ベース弱のクローンが多く得られ、tRNA や rRNA、あるいは機能未知のイネの EST の断片と一致するものが得られた。

F318

イネの RING-H2 finger をコードする cDNA の単離、同定とその発現

高井 亮太、田部 茂¹、南 栄一¹、長谷川 宏司²、渋谷 直人¹ (筑波大・農学、¹農水省・生物研、²筑波大・応生化)

イネ培養細胞は N-アセチルキトオリゴ糖をエリシターとして認識し、活性酸素生成、遺伝子発現等の防御反応を展開する。この実験系において単離された新規遺伝子 EL5 は、これまでの研究から、エリシター処理後 45 分をピークとして一過的発現をすること、発現には de novo タンパク質合成を必要としないこと等を明らかにしてきた。本研究においては EL5 をプローブとして単離した、RING-H2 finger モチーフを有するイネ cDNA、RRF1 及びゲノム構造から推定されたアミノ酸配列 BAA78746.1 について、その一次構造上の特徴を比較した。その結果、これらのいずれにも N 末端領域に transmembrane domain、塩基性アミノ酸領域、ほぼ中央付近に RING-H2 finger モチーフが見いだされ、アラビドプシスで報告されている ATL family に属する遺伝子群であると推定された。ATL family のいくつかはエリシター等の環境ストレスに応答することが知られており、現在、RRF、EL5 のストレスに応答した発現についてもイネ植物体、培養細胞を用いて詳細に解析している。

F319

アラビドプシスにおける ERF 転写因子の機能解析
高木 優、太田 賢、Dongyun HAO、進士秀明
(工技院・生命研・植物分子)

ERF タンパク質は、ERF ドメインと名づけた新規な DNA 結合ドメインをもつ転写因子である。アラビドプシスでは、約 100 個の遺伝子が、ERF ドメインを持つタンパク質をコードしていることが、データベースの解析から明らかになっている。我々は、これまでにタバコ ERF3、アラビドプシス AtERF3、AtERF4 が、抑制能を持つリプレッサーとして機能することを報告した。ERF 因子によって調節される遺伝子発現にリプレッサーがどのように関与しているのかを明らかにするため、リプレッションドメインの同定をおこない、30 アミノ酸残基の領域がリプレッションドメインとして機能することを明らかにした。これらの領域には、モチーフである D/FDLNF(x)P が、共通して存在し、さらに、ERF ばかりでなく、TFIIIA タイプのジンクフィンガーを持つタンパク質因子にも保存されていることが明らかになった。このモチーフのアミノ酸を置換するとリプレッサーとしての機能を失うことから、リプレッション機能に必要な領域であることがわかった。このドメインと相互作用するタンパク質因子との関係から、リプレッサー機能について議論する。

F320

細胞増殖に伴うシロイヌナズナ RNA ポリメラーゼ I 遺伝子の発現解析

木羽隆敏¹、松本知人¹、谷口光隆¹、榎原均²、竹田恵美³、水野猛¹、杉山達夫¹ (¹名古屋大院・生命農学、²理研・植物科学研究センター、³大阪女子大・理学部)

我々は 2 成分情報伝達系が関与する、サイトカニンを経た窒素情報伝達系がシロイヌナズナにも存在することを示してきた。そして、この情報伝達系の標的遺伝子の候補として rRNA 遺伝子 (rDNA) に着目し、窒素及びサイトカニンに反応して rDNA の転写が活性化されること、その転写活性化の少なくとも一部は RNA polymerase I の発現増大によることを示唆する結果を昨年の本大会で報告した。

サイトカニンは細胞分裂を促進する作用をもつことから、本研究では細胞増殖とサイトカニンを介した窒素情報伝達系による rDNA 転写活性化の相関性について解析した。シロイヌナズナの培養細胞を用いて、栄養変動やホルモン添加に反応した細胞周期移行時の RNA polymerase I 大サブユニット遺伝子 (AtRPA190) 及び細胞周期関連遺伝子 (cycD3、histoneH3) の発現変動を調べた。その結果、AtRPA190 の発現が細胞分裂の活性上昇に伴って増大することを示唆する結果を得た。また、サイトカニンを介した窒素情報伝達に関わると考えられるレスポンスレギュレーター遺伝子 (ARR) の発現変動と細胞分裂活性との間にも正の相関がみられた。以上の結果をふまえ、サイトカニンを介した窒素情報伝達系と細胞増殖の制御について考察する予定である。

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の走光性の光受容体と調節系に関する新規遺伝子群
吉原静恵、鈴木布美子、藤田浩徳¹、耿暎星、池内昌彦
(東大・院総合文化・生命環境、¹名大・院理・生物)

多くのシアノバクテリアは滑走運動能をもち、変動する光環境に適応している。この運動性について100年以上ものあいだ研究がされてきたが、光受容や運動のメカニズム、光刺激を運動機構に伝えるシグナル伝達系の分子機構はほとんど明らかにされていない。形質転換型シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 も寒天プレート上で走光性を示すことが知られている。われわれはすでに、*pilM* 遺伝子群や *pilB1* などがコードする IV 型線毛構造がべん毛をもたないシアノバクテリアにおける運動装置であるとともに、形質転換にも重要な働きをしていることを示してきた。本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム情報にもとづいて作成した破壊株の解析によって同定した走光性に関する遺伝子について報告する。正の走光性を示す野生株から *sl10038* 遺伝子群の破壊株を作出すると、負の走光性を示した。これらの遺伝子群は走化性調節因子の *cheY*, *cheA* に相同性を示し、さらに *sl10041* 遺伝子産物はフィトクロム様の色素結合部位をもつ MCP (methyl-accepting chemotaxis protein) に相同性を示すことから、シアノバクテリアの正の走光性の調節が、フィトクロム様の光受容体と、CheA/CheY に似たシグナル伝達系によって調節されていると示唆される。

シロイヌナズナの SNF1 関連タンパク質キナーゼ AtSR1 はカルシウム結合タンパク質 CBL2 と相互作用する

野澤彰、小泉望、草野友延、佐野浩 (奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター)

光合成産物である糖は植物にとってエネルギー源であると同時に、重要なシグナル因子である。植物体内の様々な代謝系が糖シグナルにより制御されている。糖のシグナル伝達にカルシウムが関与することも示唆されているが、そこに関与する分子種の詳細は不明である。

当研究室でシロイヌナズナより単離した AtSR1 は SNF1 関連タンパク質キナーゼのサブファミリー 3 (SnRK3) に属するタンパク質をコードする遺伝子である。最近、AtSR1 と同様に SnRK3 に属する CIPK1 と SOS2 が、カルシウム結合タンパク質である CBL1 および CBL4 (SOS3) とそれぞれ相互作用することが報告された。そこで、AtSR1 と CBL ファミリーとの相互作用を、酵母の two-hybrid system を用いて検定した。その結果、AtSR1 は酵母内において CBL2 と特異的に相互作用することが明らかとなった。また、ブルダウンアッセイにより *in vitro* でも AtSR1 と CBL2 が相互作用すること、カルシウムによりその相互作用が促進されることが示された。ノーザン解析の結果、CBL2 は本葉において糖の添加により転写産物の蓄積量が増加していた。以上の結果から、AtSR1/CBL2 がカルシウムを介した糖のシグナル伝達系に関与する可能性が示された。

光合成細菌の DMSO 呼吸系遺伝子の二成分制御系による発現制御

半田悟史、佐藤敏生、山本勇 (広島大・院・理・生物科学)

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106 のジメチルスルフォキシド (DMSO) 呼吸系は嫌気条件下で DMSO によって誘導され、その遺伝子 *dmsCBA* オペロンの転写活性化に二成分制御系の DNA 結合型レスポンスレギュレーターである DmsR が働く。本研究では、その対となるセンサーキナーゼ DmsS をコードする遺伝子 *dmsS* をクローン化し、その遺伝子破壊株を作製して *dmsCBA* オペロンの発現制御への関与を検討した。

クローン化した *dmsS* の塩基配列を決定した結果、その予想されるアミノ酸配列から PAS、トランスミッター1、レシーバー1、トランスミッター2、の4つのドメインが見出され、DmsS がマルチドメインを持つセンサーキナーゼであることが判明した。IL106 のゲノム DNA に Ω カセットを挿入し、*dmsS* 遺伝子破壊株 HAS214 を作製したところ、*dmsA* にコードされる DMSO 還元酵素の合成が検出されなくなった。また、この HAS214 に *dmsS* 遺伝子を持つプラスミド pDMS175 を接合導入することにより DMSO 還元酵素の合成は回復した。さらに、HAS214 に *dmsR* 遺伝子を持つプラスミド pDMS149 を接合導入し、DmsR の過剰発現させることにより他のリン酸基ドナーの有無を検討したが、この株においても DMSO 還元酵素の発現の回復は見られなかった。このことから、DmsS/DmsR から成る二成分制御系が *dmsCBA* オペロンの転写活性化に関与していることが解明された。

シロイヌナズナの His \rightarrow Asp リン酸リレー系因子 AHKs と AHPs の機能解析

鈴木友美、石川邦子、三輪久美子、水野猛
(名大院・生命農)

His \rightarrow Asp リン酸リレー系は植物ホルモンなどへの応答に関与する重要な情報伝達系であると考えられる。我々はこれまでに、シロイヌナズナにおいてこの情報伝達系を構成する諸因子 (AHKs \rightarrow AHPs \rightarrow ARRs) を多数解析することで、その全体的フレームワークを構築してきた。しかし、具体的生理機能に関しては、一部を除いて不明である。今回は、我々が取得したセンサー His-キナーゼである AHK 遺伝子群と HPT 因子である AHP 遺伝子群に焦点を絞り、これら因子の生理機能と互いの関連性に関して検討した。その結果、AHKs に関しては大腸菌及び分裂酵母の His \rightarrow Asp リン酸リレー情報伝達系を利用した分子遺伝学的及び生化学的解析により、AHP に関しては過剰発現形質転換体植物を作成・解析する遺伝学的解析により、両因子のあるものが、ともに植物ホルモンの受容と応答に関わっていることを強く示唆する結果が得られた。これらの結果をまとめ、特に AHK と AHP の生理機能の観点から、我々が解析を進めている AHKs \rightarrow AHPs \rightarrow ARRs 情報伝達ネットワークの全体像の中に位置付けて考察する。

F325

シロイヌナズナのHis→Aspリン酸リレー系因子
ARRsの機能解析

今村 綾, 吉野由里子, 山崎正俊*, 水野 猛
(名大院・生命農, *農水・生物研)

His→Aspリン酸リレー系は植物ホルモンなどへの応答・制御に関与する重要な情報伝達系であると考えられる。我々はこれまでに、シロイヌナズナにおいてこの情報伝達系を構成する諸因子(AHKs→AHPs→ARRs)を多数取得・解析することで、そのフレームワークを構築してきた。今回は、レギュレーター因子群であり、A/B二つのタイプに大別されるARR因子群に焦点を絞り、これら因子の構造と機能に関して比較検討した。各GFP融合遺伝子を構築してタマネギの表皮細胞を用いて細胞内局在性を検討した結果、タイプ-A (ARR6とARR7)及びタイプ-B (ARR10とARR11)ともに核に存在し、AHPが細胞質に存在するのと対照的であった。また、核移行シグナル(NLS)部位をそれぞれ特定した。タイプ-BはBモチーフ(Myb-様)を共通して持つことが特徴であるが、以上のように決定されたNLS及びDNA結合活性をもつBモチーフ(ARR10由来)の三次元構造をNMRを用いて決定した。これらの結果を、AHKs→AHPs→ARRs情報伝達ネットワークの全体像の中に位置付けて考察する。

F326

塩生植物アイスプラントおよびシロイヌナズナのタンパク質脱リン酸化酵素タイプ2C (PP2C) 遺伝子の機能解析

大里広顕¹, 和泉俊介¹, 宮崎さおり², 福原敏行¹ (¹東京農工大・農・細胞分子生物, ²アリゾナ大)

タンパク質脱リン酸化酵素タイプ2C (PP2C) は酵母やシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の研究から生物のストレス応答のシグナル伝達に関与していることが示されている。特にシロイヌナズナではアブジジン酸シグナル伝達経路に関与するPP2CをコードするABI1, ABI2遺伝子が詳しく研究されている。我々は塩生植物アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から11個のPP2C遺伝子 (*Mpc1-11*) を単離し、また、これら遺伝子と相同性を持つ5つのシロイヌナズナのPP2C遺伝子 (*Apc1-5*) を解析している。

今回の発表では、*in vitro* の系で、これらの遺伝子のリコンビナントタンパク質を用いた、カゼインおよび植物体内での基質となりうるタンパク質の脱リン酸化活性測定の結果と、アイスプラントが光合成をC3からCAMへと変換するときのKey Enzymeであるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) をコードする遺伝子 (*Ppc1*) のストレス応答した発現誘導に対する *Mpc2,5,6,8* の影響を co-bombardment 法を用いて解析した結果を報告する。

F327

シロイヌナズナの分裂組織で発現する受容体型キナーゼ遺伝子 *IMK3* とそれと相互作用する *AGL24* 遺伝子の解析
竹村美保, 藤田秀知, 横田明穂, 河内孝之 (奈良先端大・バイオ)

植物の生長・形態形成は、茎頂ならびに根端に存在する分裂組織の働きによって行われている。多細胞体制である植物においては、分裂組織内の細胞は互いに協調して、それぞれの機能を果たしていると考えられる。受容体型キナーゼ遺伝子は、そのような細胞間コミュニケーションに重要な働きをしているものの一つである。我々は、シロイヌナズナの花序分裂組織由来 cDNA ライブラリーから、受容体型キナーゼ遺伝子 *IMK3* を単離し、その解析を行っている。これまでに、*IMK3* が胚発生時から、植物の一生を通じて茎頂ならびに根端分裂組織で発現していることが明らかとなった。このことから、*IMK3* 遺伝子は植物の発生にとって非常に基本的な役割をしていることが示唆された。*IMK3* の機能や *IMK3* が動くシグナル伝達経路を解明するために、*IMK3* キナーゼドメインと相互作用する因子を探索した。その結果、最も可能性が高い遺伝子として、MADS-box 転写因子 *AGL24* を単離した。発現解析から、*AGL24* 遺伝子は花成前の茎頂に発現し、花成後は主に茎頂と花茎に発現していることがわかった。このことは、*IMK3* と *AGL24* が花成前後の茎頂分裂組織において相互作用している可能性を示唆している。現在、*AGL24* と *IMK3* との相互作用部位の同定やタグラインを用いた *AGL24* の機能解析などを行っており、それについてもあわせて報告する。

F328

Synechocystis sp. PCC 6803株のグループ2シグマ因子遺伝子 *sigD* (*sl12012*)の機能解析
中野貴之、鈴木石根¹、村田紀夫¹、田中寛、高橋秀夫
(東大・分生研、¹基生研)

シアノバクテリアは一般に複数種のグループ2シグマ因子(主要型シグマ因子)を持ち、それらの構造はシアノバクテリアの種を越えて広く保存されている。従って、これらの転写因子はそれぞれ、何らかの重要な生理機能に対応すると予想されるが、その実体は全く知られていない。今回我々は *Synechocystis* sp. PCC 6803の *sigD* 遺伝子(*sl12012*)の生理機能解明を目指して解析を行ったので、ここに報告する。

これまでのDNAマイクロアレイを用いた解析により、*sigD*転写産物量は低温シフトにより増加することが示されている。*sigD*の発現をより詳細に調べるために、*sigD*のプロモーター領域にluciferase遺伝子を融合させ、染色体上に組み込んだ株を作成した。この株を用いた luciferase assayにより、低温、高浸透圧、DCMU添加等のストレスにより、*sigD*転写が活性化されていることが明らかになった。従って、*sigD*は多様なストレス(General Stress)に対応した遺伝子発現に関わる転写因子である可能性がある。次に、*sigD*制御下にある遺伝子群の同定を目的として、*sigD*欠損株を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、光化学系関連の遺伝子、翻訳関連の遺伝子等の発現が、*sigD*欠損により低下していることを見いだした。現在、細胞へのストレスとこれらの遺伝子の発現の関連について解析を進めている。

F329

塩生植物 *Atriplex lentiformis* における GSK3/shaggy プロテインキナーゼ遺伝子の同定

鯉田拓也、南森隆司、東哲司、安田武司（神大院・自然科学研究科）

塩生植物 *Atriplex lentiformis* における情報伝達の解明を目的として、新規なプロテインキナーゼの同定を試みた。そして、2つの CDPK と考えられる遺伝子断片と、1つの GSK3/SGG(GSK3/shaggy プロテインキナーゼ) と考えられる遺伝子断片が得られた。

高等植物の GSK3/SGG は、そのキナーゼドメインが *Drosophila* SGG や哺乳類の glycogen synthase kinase-3 のものと高い相同性を示し、マルチジーンファミリーを形成する。しかし、そのうちの一部の遺伝子で発現部位などが特定されているものの、個々の GSK3/SGG の性質などについてはほとんど不明である。

今回、演者らは *Atriplex lentiformis* の全長約 1.9kb の GSK3/SGG ホモログを同定した。本酵素、そして、現在同定されている植物、動物の GSK3/SGG ホモログのキナーゼドメインをもとに系統解析を行った。その結果、植物の GSK3/SGG ホモログは 3 つのグループに分けられるが、本酵素は *Arabidopsis thaliana* の ASK kappa と近縁で、上記 3 グループに属さないものであることが判明した。

ノーザンハイブリダイゼーションにより、本酵素の遺伝子は、葉で多く発現していることが判明した。現在、本酵素の全長領域をコードする領域を大腸菌内で発現させ、活性の発現、諸性質の解析を行っている。

F330

イネ 3 量体 G タンパク質 α サブユニット遺伝子の発現様式

藤澤由紀子、南 美穂、大城 閑、旭 正、岩崎行玄
(福井県立大・生物資源)

イネ 3 量体 G タンパク質 α サブユニット遺伝子(RGA1)を欠損した変異体、大黒 d1 は、矮性、短粒、濃緑葉など特徴のある表現型を示す。このことから、3 量体 G タンパク質遺伝子は、節間伸長や種子形成の時期に重要な役割をしていることが予想される。そこで、3 量体 G タンパク質が、予想される組織において、発現しているか否かを、GUS 活性を指標に検討した。はじめに約 900 塩基のプロモーター領域を含む全鎖長 RGA1 遺伝子を単離した。次に、この遺伝子を大黒 d1 に導入したところ、野生型に復帰することを確認した。この結果は、約 900 塩基のプロモーター領域は、組織特異的な制御領域を含んでいることを示した。GUS 遺伝子を、全鎖長 RGA1 遺伝子の第 3 エクソンに連結し、キメラ遺伝子を作成した。アグロバクテリウム法を用いて、野生型イネに遺伝子導入し、形質転換体 (T3 世代種子) の GUS 活性を解析した。吸収初期においてはアリユロン層、胚盤上皮細胞、葉鞘に GUS の発現が観察された。伸長が盛んな時期では伸長節間、出穂前では外穎と内穎、出穂後では成熟した花粉に顕著な GUS 活性が検出された。イネ 3 量体 G タンパク質は、ジベレリン情報伝達に関与しているので、アリユロン層での発現は目的であろう。大黒 d1 は、矮性、短粒の表現型を示すので、葉鞘、節間伸長、外穎、内穎に発現がみられるのも合理的である。胚盤上皮細胞と花粉での 3 量体 G タンパク質の機能解明に興味もたれる。

F331

エクオリン導入植物体を用いた

カルシウムシグナリング機構の解析

古市卓也¹、武藤尚志^{1,3}

(名古屋大¹院生命農学研究所,²生物分子応答研究センター)

我々は既に Ca²⁺依存性発光蛋白質エクオリンを導入したシロイヌナズナ植物体において、代謝糖に反応して [Ca²⁺]_{cyt} 上昇が起こること、この [Ca²⁺]_{cyt} 上昇が細胞外からの Ca²⁺ 流入によるものであることを証明した。また、糖/H⁺共輸送により細胞内に糖が取り込まれる際には形質膜が大きく脱分極すること、形質膜に電位依存型 Ca²⁺ チャネルが存在することが報告されている。

今回、我々は形質膜電位の変化と細胞外からの Ca²⁺ 流入の相関について詳細な知見を得る目的で、糖トランスポーターの発現解析を行った。また、糖同様に細胞内に取り込まれる際に形質膜の電位変化が生じる NO₃ を処理したシロイヌナズナ植物体についても同様に解析を行い、形質膜電位の変化と細胞外からの Ca²⁺ 流入が密接な関係にあることを明らかにした。

S301

イネ PR1 遺伝子群の発現特性の解析

岩井孝尚^{1,2}、足立陽子³、佐々木卓治¹、大橋祐子^{1,2}

1 農業生物資源研究所・2 JST/CREST・3 宮城県園芸試験場

PR1 タンパク質は、過敏反応 (HR) や全身獲得抵抗性 (SAR) のマーカーとして種々の植物でよく研究されている。我々は、イネいもち病抵抗性のメカニズムを解明するために、イネ EST よりタバコ PR1a タンパク質遺伝子と相同な 3 種類の遺伝子 (OsPR1.1, OsPR1.2, OsPR1.3) を選抜し発現特性を調べた。これらは、アミノ酸配列でタバコ PR1a とそれぞれ 59、54、42% の相同性を示し、OsPR1.2、1.3 はタバコ塩基性 PR1 と同様に C 末端に余分の 8 アミノ酸残基を有していた。これら遺伝子はすべて根で発現していたが、1.1 は鞘葉、穂でも、1.2 は鞘葉でも恒常的に発現していた。また、イモチ病菌を罹病性イネ品種に接種すると 3 日目から進展型病斑が観察され、5 日目には分生子の形成が認められ、イネ PR1 遺伝子の発現は 3 日目から緩やかに誘導された。抵抗性の組合せでは 2~3 日目に過敏型病斑が形成され、イネ PR1 遺伝子の発現は 3~4 日目までに急速に誘導されたのち減少することが分かった。以上の結果は多重遺伝子族を形成するイネ PR1 遺伝子は、それぞれ異なった器官特異的発現やイモチ病害感染応答することが分かった。今後、これらイネ PR1 遺伝子は、いもち病抵抗性メカニズム解明のためのマーカーとして使用可能と考えられる。

S302

イネ 3 量体 G タンパク質 α サブユニットの生化学的解析
榎谷岳洋、和田 大、旭 正、岩崎行玄 (福井県大・生物資源)

3 量体 G タンパク質は、GTP を結合した α サブユニットと β γ サブユニットに解離した後、下流の因子に情報を伝達する。 α サブユニットは、1 アミノ酸置換で、恒常的に活性型を示す事例が報告されている。これは、アミノ酸置換により構造変化した α サブユニットが、GTP を結合できるが、GTP を加水分解できないことによるものと考えられている。イネ 3 量体 G タンパク質 α サブユニット (RGA1) は、動物由来のものと同様性がある。特に、GTP 結合領域は、高度に保存されている。今回は、動物で解析された変異部位を参考に、イネ 3 量体 G タンパク質 α サブユニット (RGA1) を恒常的に活性型に改変できるかを検討した。改変部位は、223 番目のグルタミンをロイシンに置換した (Q223L) のものを用いた。*In vitro* mutagenesis 法を用いて、RGA1 に変異を導入した後、His-tag を有する発現ベクター (pQE30) に挿入し、大腸菌にて融合タンパク質を合成した。融合タンパク質は、Ni²⁺ アフィニティカラム、Mono Q クロマトグラフィーを用いて精製した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を用いて GTP 結合能を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を用いて GTPase 活性を測定した。Q223L は、GTP 結合能を示すものの、GTPase 活性は有していなかった。この結果は、高等植物の α サブユニットも、動物と同様の変異で、恒常的に活性型を取りうることを示した。

S303

イネの PKABA ホモログ遺伝子 SAPK1 の構造と機能の解析
小林裕子、岩崎行玄¹、廣江孝彦²、服部穂穂 (三重大・遺伝子実験施設、¹福井県大・生物資源、²農水省・生物研・分子遺伝)

PKABA1 は、コムギにおいてアブジジン酸 (ABA) により発現誘導されるプロテインキナーゼ遺伝子として単離され、オオムギのアリュウロン層でこれを強制的に発現させるとジベレリン (GA) により誘導される α -アミラーゼ遺伝子の発現が強く抑制されることから、ABA による GA 誘導遺伝子の発現抑制に介在していると考えられている。しかし、この遺伝子の ABA シグナル伝達機構におけるその役割については不明である。我々は、イネの活性型レトロトランスポゾン、Tos17 の転移を利用して作製された突然変異集団から PKABA ホモログ遺伝子 SAPK1 (Stress and/or ABA regulated Protein Kinase) の欠損変異体を単離した。SAPK1 は 8 イントロンに分断された 9 エキソンで構成されており、コードされているタンパク質はコムギ PKABA1 と 90% の相同性を示した。sapk1-1 変異体では第二エキソンの 12 番目の塩基の後に Tos17 が挿入した結果、異常スプライシングによって第二エキソンが欠落し、正常な転写産物よりも 78 塩基短い mRNA が合成されていた。この変異体の通常の栽培条件下での生育は、野生型と同様であり、幼苗の生長に及ぼす GA あるいは ABA の影響についても両者間で顕著な違いは認められなかった。ノーザン解析の結果、SAPK1 は地上部では高濃度処理時に、根では乾燥及び ABA 処理によって誘導されることが明らかとなった。また野生型と変異体での rab16a、salT、lip19、wsi18 等のストレス/ABA 誘導遺伝子の発現解析についてもあわせて報告する。

S304

アオウキクサ 151 系統における安息香酸による花成誘導への NF- κ B 様転写因子の関与の可能性

新町文絵、佐加羅純一、羽石将弘、松元健¹、田中修¹、別府敏夫 (帝京科学大・理工、¹甲南大・理)

花芽形成は花成ホルモンにより制御されていると考えられているが、その実体は明らかにされていない。我々は、花成誘導のシグナル伝達経路の解析からその機構解明を試みている。サリチル酸はアオウキクサの花成誘導に有効な物質の一つであるが、その作用機作は未だ不明である。一方、動物では、サリチル酸が転写因子 NF- κ B の活性化を抑制するとの報告があることから、サリチル酸による花成誘導への NF- κ B 関与の可能性を検討した。実験材料には、鈍感な短日性のアオウキクサ 151 系統を用いた。サリチル酸の類縁化合物である安息香酸による花成誘導処理時に NF- κ B の活性化に影響を及ぼす種々の薬剤を投与して花成への影響を調べた。その結果、NF- κ B の活性化調節因子である I κ B 分解の阻害剤や、NF- κ B の活性化阻害剤などの添加により花成は抑制され、活性酸素の発生による NF- κ B 活性化条件下では安息香酸の非存在下でも花成が誘導された。これらの結果は、安息香酸による花成誘導における NF- κ B 様転写因子の関与を示唆するものと思われる。

S305

AtNDK1 と相互作用する 因子の Two-hybrid system による探索

深松陽介、矢部尚登、蓮沼仰嗣 (横浜市大院、総合理学、木原生研)

当研究室ではアラスカエンドウにおいて、赤色光照射特異的にリン酸化が促進される 18 kDa のタンパク質を見出した。タンパク質の精製と解析の結果、NDK (Nucl-eoside Diphosphate Kinase) であることが判明し NDK-P1 と命名された。NDK は NDK 活性だけでなくタンパク質キナーゼ活性、DNA 結合活性を有し、他の因子との相互作用により情報伝達系の因子として働くと考えられている。シロイヌナズナにおいて NDK 遺伝子は複数単離されているが、もっとも NDK-P1 に相同性が高くかつ存在量も多い AtNDK1 がシロイヌナズナにおける NDK-P1 の相同遺伝子であると推定された。そこで AtNDK1 の光をはじめとした情報伝達系での役割を明らかにするため酵母 Two-hybrid system を用い AtNDK1 と相互作用する因子を検索することにした。約 1.0×10^6 クローンをスクリーニングし、候補を 5 クローンに絞ったが有意なもの含まれなかった。真核生物において NDK は 6 量体を形成し情報伝達体として働くことが知られている。そこで AtNDK1 自体の相互作用に必要な領域を Two-hybrid system により調べたところ N 末端側の領域 (1~89 残基) 同士が相互作用することが確認され、この領域で 6 量体を形成することが推測された。そこで AtNDK1 の N 末端側の領域 (1~89 残基) と C 末端側の領域 (90~150 残基) で独立にスクリーニングを行い、複数の候補が得られたので詳細を報告する。

シロイヌナズナNDK遺伝子ファミリー構成遺伝子群の単離と解析

橋本薫、矢部尚登、加藤友彦¹、田畑哲之¹、蓮沼仰嗣（横浜市大院・総合理学・木原生研、¹かずさDNA研究所）

当研究室においてアラスカエンドウPNDK1が光信号伝達に関与することが示された。シロイヌナズナでは既に4種のNDK(*AtNDK1*, 1a, 2, 3)が単離されているが、緩やかな条件でのザザン解析により、更に遺伝子の存在が示唆されたため検索を行ったところ新規のNDK遺伝子*AtNDK4*を含むゲノミッククローン*AtNDK6*が単離された。推定アミノ酸配列から*AtNDK1*は細胞質、*AtNDK1a*, 2, 3, 4はN末端側にリーダー配列を持ちともにオルガネラに局在すると推測される。

生化学的機能分担を明らかにするために5種の組換え*AtNDK*タンパク質を分裂酵母発現系で発現させ、精製、NDK, protein kinase, DNA binding等の活性についての相互比較を行っている。また生物学的機能を解明するためにかずさDNA研究所のT-DNAタグライク共同利用システムから各NDK遺伝子挿入破壊変異体のスクリーニングを行い、5'側領域約1kbを含む領域にT-DNAの挿入された最終候補を得ている。現在、戻し交雑を行った後代を用い様々な環境刺激に対する応答などの表現型解析を行っている。細胞内局在に関しては、*AtNDK::sGFP*融合遺伝子をシロイヌナズナ植物体へ導入し一過性発現により解析を行っており、これらの詳細について報告する。

アカパンカビNDK-1変異株*ndk-1^{P72H}*を用いたNDK-1機能の解析

吉田雄介、矢部尚登、蓮沼仰嗣（横浜市大院・総合理学・木原生研）

NDK-1の生物学的機能を解明するためアカパンカビ突然変異体ストックよりNDK-1のリン酸化が低下している株*psp* (*phosphorylation of small protein*) を単離した。その表現型について解析したところ子嚢殻極性の光依存的秩序性の欠失、高温下での菌糸伸長の低下を示した。*psp*株はNDK-1の72番目のプロリンがヒスチジンに置換した点突然変異体であることが解り、前述の表現型が共に野生型*ndk-1*遺伝子の導入により相補されたことから*ndk-1*が原因遺伝子であることが示された。以後*psp*株を*ndk-1^{P72H}*とする。表現型の解析から共通因子として活性酸素分子種の関与が示唆され、活性酸素源であるParaquat (methyl viologen) やBleomycinを外的に投与した場合の影響を観察した。その結果、両剤ともに高感受性を示した。これらの高感受性が二次的なDNAやタンパク質傷害ストレスによるものか活性酸素分子種の直接的な影響によるものかを判別するため現在、過酸化水素やUV、亜硫酸等の影響をみている。活性酸素除去酵素であるsuperoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) の欠損株である*sod-1*と*ndk-1^{P72H}*の熱感受性や活性酸素源感受性の表現型が類似していることから*sod-1*の光応答反応を観察した。その結果、*ndk-1^{P72H}*と同様子嚢殻極性の光依存的秩序性に欠失が認められた。このことから子嚢殻極性の光依存的秩序性に生体内の活性酸素分子種が関与する可能性が考えられる。現在、SOD活性やcatalase活性の測定及び二重変異体によるNDK-1との上下位性を検討している。

タバコ転写抑制因子 ERF3 と相互作用するユビキチン結合酵素 NtUBC2 の解析

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

エチレン応答性転写因子 ERF (EREBP) は GCC box を介して一群の PR (Pathogenesis-related) 遺伝子の発現を制御する。転写抑制因子タバコ ERF3 の遺伝子発現は種々のストレスにより誘導されるので、PR 遺伝子の発現誘導には ERF3 の転写抑制活性を転写後レベルで負に制御する機構が必要である。

転写因子の多くがタンパク質間相互作用を介した制御を受ける。そこで、ERF3 と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を酵母 two-hybrid system により探索し、ユビキチン結合酵素 (UBC, E2 enzyme) をコードする遺伝子タバコ NtUBC1 と NtUBC2 を単離した。NtUBC2 は ERF3 に特異的な領域と相互作用したが、転写活性化因子 ERF2 とは相互作用しなかった。ERF3 との特異的な相互作用から、NtUBC2 は ERF3 の転写抑制活性の制御を介して PR 遺伝子の発現誘導に関与する可能性がある。

シロイヌナズナ培養細胞における高浸透圧応答のシグナル伝達に働くホスホリパーゼCの機能解析

高橋征司^{1,2}、片桐健¹、平山隆志¹、篠崎和子³、篠崎一雄^{1,2}（¹理研・植物分子、²筑波大・生物科学、³国際農研・生物資源）

高等植物においてイノシトールリン脂質代謝 (PI代謝) は種々の細胞外刺激により活性化することが報告されている。本研究では特に、シロイヌナズナ培養細胞における各種浸透圧ストレスに対するホスホリパーゼC (PLC) の活性調節について解析を行うことにより、浸透圧ストレス応答の情報伝達機構におけるPI代謝の役割を明らかにすることを目的としている。

T87培養細胞におけるイノシトール3リン酸 (IP₃) 量はNaCl、マンニトールの濃度に依存して処理後30秒以内に一過的に上昇する。この一過的上昇は、PLC阻害剤により阻害されることなどからPLCの活性上昇によるものであることが分かった。浸透圧ストレス応答機構におけるPLCの役割を明らかにするため、PLC阻害剤を処理した細胞における乾燥応答性遺伝子の発現誘導について解析を行った。その結果、ネオマイシン、U73122により*rd29A*等の遺伝子発現誘導が有意に抑制されていることが明らかとなった。浸透圧ストレス応答におけるPLCの関与をさらに直接的に解析するため、T87培養細胞の形質転換系を確立し、T87培養細胞において特に発現の強いPLCのホモログであるAtPLC1s、AtPLC2のセンス、アンチセンス形質転換細胞を作成し解析を行った。その結果、PLC過剰発現の形質転換細胞において浸透圧ストレスに対するIP₃の産生量、*rd29A*の遺伝子発現誘導が有意に上昇していることが分かった。

S310

タバコ カルモジュリン遺伝子群の病傷害ストレス応答

山川 博幹^{1,2,3}, 光原 一朗^{2,3}, 伊藤 直子^{2,3}, 鎌田 博¹, 大橋 祐子^{2,3} (筑波大・生物科学, ²農水省・生物研・分子遺伝, ³JST・CREST)

植物は害虫による食害などの傷害や、病原体による感染に対して巧妙な機構で自身を守っていることが知られているが、これらストレス応答のシグナル因子としてCa²⁺の関与が示されている。一方、動物とは異なり、植物は標的酵素の特異性が異なる複数のカルモジュリン (CaM) 分子種をもっており、それぞれ異なる機能を有していることが予想されている。そこで我々は、代表的なCa²⁺シグナル受容タンパク質であるCaMに着目し、傷害およびタバコモザイクウイルス (TMV) 感染葉より作成したcDNAライブラリーから13種類のCaM遺伝子 (*NtCaM1~13*) を単離した。これらはアミノ酸配列の異なる4種類のCaMをコードしており、既知の3タイプすべての植物CaMを単離することができた。すなわち、*NtCaM1/2*はポテトのPCM1と、*NtCaM3/4/5/6/7/8/11/12*と*NtCaM9/10*はさまざまな植物より単離されているCaMと、*NtCaM13*は*DiScCaM4*とそれぞれ高い相同性を示した。このうち、*NtCaM1, 2, 13*はTMV感染による過敏反応によって、*NtCaM1, 2, 3, 4, 13*は傷害によってそれぞれ転写産物の蓄積がみられた。これらの結果は、タバコ病傷害応答において複数のカルモジュリンが協調的に機能していることを示唆する。現在、特異的抗体を作成し、タンパク質レベルの解析を行っている。

S311

新規糖誘導型カルシウム結合タンパク質遺伝子*OsSUR1*の発現制御

大槻 茂男、松倉千昭¹、武藤尚志、山口淳二 (名大・生物応答センター、¹(株)オリノバ)

植物内において、糖は代謝産物として重要であるばかりではなく、遺伝子発現制御のシグナル因子としても注目されている。糖によって発現制御を受ける遺伝子群を網羅的に掌握するために、糖処理したイネ単離胚カルスより単離したmRNAをプローブとして、マイクロアレイ解析を行った。この結果、高糖濃度の胚カルスにおいて発現が誘導されるクローンが2つ (*OsSUR1, 2 sugar up-regulation*)、低糖濃度胚カルスで発現するクローンが5つ (*OsSDR1~5 sugar down-regulation*) 同定された。機能未知なこれらの遺伝子産物をモチーフ検索した結果、*OsSUR1*タンパク質が、カルシウム結合モチーフであるEF-handを2カ所持つことが明らかとなった。大腸菌に発現させた*OsSUR1*タンパク質はカルシウム結合能を示した。*OsSUR1*の発現制御を、糖添加、糖飢餓処理を施したカルスを用いたノーザン解析より、いずれも数時間以内に発現の上昇、抑制が観察された。*OsSUR1*の発現器官を解析したところ、出穂後の稈において発現していることが明らかとなった。これらのことから、*OsSUR1*は稈などの糖転流器官において、糖とカルシウムのシグナル伝達に関与していることが示唆された。この研究は、農林水産省イネ・ゲノムプロジェクト (GS-2218) の援助を受けた。

S312

トウモロコシ幼葉鞘の先端特異的な生理機能と先端切除で誘導される機能再生に関わるタンパク質キナーゼ
樽井 裕, R. Kaldenhoff¹, 飯野盛利 (大阪市大・院理・生物地球, ¹Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Univ. Würzburg)

トウモロコシ (*Zea mays* L.) 幼葉鞘の先端はオーキシン生産、及び光屈性シグナル受容のセンターとして働いており、これらの生理的機能は先端を切除した幼葉鞘に回復することが知られている。これらの知見をもとに、先端 (5 mm) を切除した幼葉鞘の上部組織で特異的に発現する遺伝子を suppression subtractive hybridization 法で単離することを試みたところ、推定アミノ酸配列から、タンパク質キナーゼと相同性をもつ新規な cDNA が得られた。この遺伝子の mRNA は幼葉鞘先端で特異的に発現しており、先端から 5 mm 以下の幼葉鞘ではほとんど検出されなかった。しかし、先端を切除すると、発現量は 30分から90分の間に上部 5 mm の組織で上昇することが分かった。これらの結果から、同定した遺伝子のタンパク質は、オーキシン生産、あるいは光屈性シグナル受容など先端特異的な生理機能、及びその再生現象に関わるものであると推定される。

S313

親和性標識を利用したキチンオリゴ糖エリシター結合蛋白の挙動の解析

岡田光央^{1,2}、伊藤ユキ¹、松村正利²、渋谷直人¹
(¹農水省生物研、²筑波大 応用生物化学系)

イネの培養細胞系において、キチンオリゴ糖はエリシターとして様々な防御応答を誘導する。これまでに¹²⁵Iラベルしたキチンオリゴ糖誘導体とイネ原形質膜蛋白を非可逆的に架橋することによって、このキチンエリシター受容体と想定される約75kDaの高親和性キチンオリゴ糖結合蛋白の存在が示された。¹⁾

こうした実験において、用いるラベル体と架橋反応の条件によっては、従来の75kDaのおよそ2倍の分子量の位置にもラベルされた蛋白が検出された。この2量体相当のバンドは、キチンエリシター応答性を示し、また、類似のキチンオリゴ糖結合蛋白の存在が確認された他の植物の場合にも見いだされた。また、光親和性標識と還元性架橋剤を組み合わせた実験からも、エリシター結合蛋白質と膜上で隣接する蛋白分子が架橋されていることが支持された。これらの結果がエリシターによる受容体の2量体化を示すものかどうかさらに検討中である。

1) Y. Ito et al., *Plant J.*, 12:347-356 (1997)

S314

キチンオリゴマーがイネ培養細胞に誘導する
初期応答の解析

秋本千春, 塚田幸治, 矢崎芳明, 坂野勝啓, 渋谷直人, 南栄一 (農水省・農業生物資源研)

キチンオリゴマーをイネ培養細胞に作用させると、一連の初期応答を経て遺伝子発現やファイトアレキシン生成等の防御応答が観察される。本研究では、これらのうち初期応答であるイオンフラックスと、活性酸素生成、遺伝子発現との関係について解析した。培地からカルシウムイオンを除去すると初期応答であるカリウムイオンの放出、細胞質酸性化および遺伝子発現が抑制された。細胞質酸性化やエリシター応答性遺伝子の発現を阻害するタンパク質リン酸化酵素阻害剤K-252aは、カリウムイオン放出を阻害したが、これらをエリシターなしでも誘導するタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤CalyculinAは、カリウムイオンの放出を誘導しなかった。以上の結果より、カリウムイオンの放出に関わる因子はカルシウムによって制御され、かつCalyculinAの作用点の上流に位置するものと推察された。また、CalyculinAはカルシウムを含まない培地中でも細胞質酸性化を誘導した。現在、カルシウムが遺伝子発現や活性酸素生成に及ぼす影響をさらに解析中であり、その結果も併せて報告する。

S315

タンパク質性エリシターにより誘導されるタバコ培養細胞の過敏感細胞死におけるイオンチャネルの役割
門田康弘, 中村衣里, 玉内亮介, 平沢賢一¹, 武藤尚志², 朽津和幸 (東京理科大・理工・応用生物科学,¹静岡大・理工,²名古屋大・生物分子応答研究センター)

タバコ培養細胞はタンパク質性エリシター(クリプトゲイン)を認識し、過敏感細胞死を誘導する。イオン選択性電極やCa²⁺感受性発光タンパク質を用いて解析した結果、エリシター処理直後に一過性のCa²⁺流入や持続的なH⁺流入をはじめとする様々なイオンフラックスが誘導されることが明らかとなった。一方、過敏感細胞死は、陰イオンチャネル阻害剤(DIDS, A9C)により完全に、La³⁺(Ca²⁺チャネル阻害剤)により部分的に阻害された。また細胞膜を介したH⁺フラックスは、DIDS, La³⁺, BAPTA (Ca²⁺キレート剤), K-252a (プロテインキナーゼ阻害剤)により阻害された。以上からタバコ培養細胞における過敏感細胞死の情報伝達系に細胞膜上のCa²⁺チャネル、陰イオンチャネル、タンパク質リン酸化が関与している可能性が示唆される。

S316

イネ培養細胞においてオリゴ糖エリシターにより活性化されるプロテインキナーゼの性質

矢柄寿一, 小松節子¹, 渋谷直人¹, 朽津和幸

(東京理科大・理工・応用生物科学,¹農水省・生物研)

イネ培養細胞は *N*-アセチルキトオリゴ糖を認識し、一連の生体防御反応を誘導する。様々な条件でゲル内リン酸化法を試みたところ、オリゴ糖エリシター刺激により活性が上昇する複数のプロテインキナーゼ(PK)を検出した。ミエリン塩基性タンパク質(MBP)を基質とする分子量44kDaのMBPキナーゼの活性はエリシター処理後5分以内に上昇し、60分で対照と同程度まで減少した。ヒストンIII-Sを基質とするカルシウム依存性のPK活性もまたエリシター刺激の影響が認められた。また、PK阻害剤K-252aはエリシターにより誘導されたこれらのPKの活性化を抑制したことから、エリシター刺激に伴うこれらのPKの活性化には別のPKが関与していることが考えられた。以上の結果より、これら2種類のプロテインキナーゼがエリシター情報伝達系へ関与することが示唆される。

S317

キチンオリゴ糖エリシターにより誘導されるイネ培養細胞のイオンフラックスの分子機構の解析

門田康弘, 玉内亮介, 中村衣里, 渋谷直人¹, 朽津和幸 (東京理科大・理工・応用生物科学,¹農水省・生物研)

キチンオリゴ糖エリシターによりイネ培養細胞の一連の生体防御反応が誘導される過程では、シグナル伝達の初発反応として急激かつ一過性の膜電位の脱分極と細胞膜を介したイオンフラックスが誘導される[1-3]。この分子機構を解明するため、イオン選択性電極マルチチャンネル同時計測システムを構築し解析した結果、H⁺の流入や細胞質の酸性化に先立ってCl⁻の流出が誘導されることが明らかとなり、膜電位脱分極の主原因となっている可能性が考えられた。H⁺の一過性の流入は、Ca²⁺キレート剤(BAPTA)、プロテインキナーゼ阻害剤(K-252a)により完全に抑えられた。Cl⁻の流出と膜電位脱分極、H⁺の流入と再流出(回復)過程に関与するイオンチャネルやイオンポンプの実体とその調節機構について考察する。

- 【文献】1. Kuchitsu *et al.* *Protoplasma* 174: 79- (1993);
2. Kikuyama *et al.* *Plant Cell Physiol.* 38: 902- (1997);
3. Kuchitsu *et al.* *Plant Cell Physiol.* 38: 1012- (1997)

S318

イネ培養細胞のキチンエリシターによる活性酸素生成の制御機構の解析

山口武志 前原有美子 渋谷直人 (農水省 農業生物資源研究所)

キチン系エリシターはイネ培養細胞に対して強いエリシター活性を示し⁽¹⁾、その初期反応として活性酸素を生成する⁽²⁾。Dihexanoylglycerol (6:0-DG)、Dioctanoylglycerol(8:0-DG)、Dioctanoylphosphatidate (8:0-PA) が強い活性酸素生成活性を示し、さらにキチン系エリシターはイネ培養細胞に対して DG と PA の大幅な増加を誘導したことから、DG と PA は活性酸素の生成に対するセカンドメッセンジャーであることが示唆された。培養細胞の phospholipase 活性を解析した結果、膜面分にエリシター応答性の PLD 活性の大幅な上昇が認められ、この活性は protein tyrosine kinase の阻害剤処理した細胞から抽出した膜面分では大幅に減少していたことから、キチン系エリシター受容体から PLD の活性化の間に protein tyrosine phosphorylation が関与していることが示唆された。

¹⁾ A. Yamada et al., (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 405

²⁾ K. Kuchitsu et al. (1995) *Protoplasma*, 188, 138

S319

ビオチン化アブシジン酸を用いた気孔孔辺細胞の ABA 結合部位の可視化

山崎大樹, 小笠原よう子, 浅見忠男¹, 吉田茂男¹, 朽津和幸 (東京理科大・理工・応用生物科学, ¹ 理研・植物機能)

気孔閉鎖過程における孔辺細胞のアブシジン酸 (ABA) シグナル伝達には、タンパク質リン酸化/脱リン酸化を介したイオンチャネルの活性制御が重要な役割を果たしているが、ABA 受容体の分子実体は同定されておらず、局在部位も明らかではない。そこでビオチン化した ABA (bioABA) を合成し、気孔孔辺細胞における ABA 結合部位の可視化を試みた。ソラマメとシロイヌナズナにおいて、bioABA は気孔の閉鎖、孔辺細胞プロトプラストの収縮共に、やや弱いながらも ABA と同様の活性を示した。ソラマメの孔辺細胞プロトプラストを bioABA、蛍光標識化アビジンで処理した後、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞表面にパッチ状の蛍光が観察され、この蛍光は無標識の ABA の添加により減少した。またフローサイトメーター等を用いて蛍光量を定量的に解析した。こうした結果は気孔孔辺細胞の細胞表面に ABA 結合部位が存在する可能性を示唆すると考えられる。

S320

ソラマメ孔辺細胞からの SNF1 関連プロテインキナーゼ cDNA の単離とキナーゼの生化学的特質

富永美寿実, 重永綾子, 木下俊則, 島崎研一郎 (九州大・院理・生物科学)

気孔開孔は、青色光によって原形質膜 H⁺-ATPase が活性化され、その結果生じるプロトンの電気化学的勾配が駆動力となって誘導される。最近の我々の研究で、この H⁺-ATPase の活性化は C 末端自己阻害領域のリン酸化により引き起こされることが明らかになった。しかし青色光受容体から原形質膜 H⁺-ATPase までのシグナル伝達については不明な点が多い。本研究では青色光のシグナル伝達に関与するプロテインキナーゼの cDNA を単離する目的で実験を行い以下の結果を得た。ソラマメ孔辺細胞 cDNA を鋳型として既知のキナーゼドメインを基に設計した degenerate プライマーを用いて、RT-PCR を行ったところ 8 つの cDNA 断片が得られた。その中で最もクローン数の多い vfPK1 に関して 3' RACE、5' RACE 法により完全長 cDNA のシーケンスを決定した。vfPK1 遺伝子は全長 1,716 bp の新規のプロテインキナーゼ遺伝子で 455 アミノ酸残基のタンパクをコードしており、キナーゼドメインの配列から植物 SNF1 関連プロテインキナーゼの SnRK3 グループに属することが分かった。vfPK1 遺伝子発現の組織特異性をノーザンブロット法で調べた結果、孔辺細胞の他に根でも多く発現が見られた。次に vfPK1 を大腸菌内で発現させ精製後、プロテインキナーゼ活性を測定すると、このキナーゼは自己リン酸化活性を持ち、スタウロsporin で阻害された。さらにキナーゼドメイン II に変異を入れた場合、キナーゼ活性が無くなることが確認された。

S321

気孔孔辺細胞に発現するカルシウム依存性プロテインキナーゼの解析

重永綾子・木下俊則・島崎研一郎 (九大・院理・生物科学)

気孔は様々な環境要因にตอบสนองすることが知られている。中でも青色光が気孔開孔には有効である。青色光によって H⁺-ATPase が活性化され、その結果生じるプロトンの勾配が気孔開孔の駆動力となると考えられている。青色光に依存したプロトン放出は特定のキナーゼ阻害剤によって抑制されることから、気孔開孔にはカルシウム/カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK)、またはカルシウム依存性、カルモジュリン非依存性プロテインキナーゼ (CDPK) 様のキナーゼの関与が考えられた。そこで、気孔開孔に関与するキナーゼの単離を目的として、ソラマメ孔辺細胞に存在する複数のキナーゼに対してクローニングを行った。その結果、4 種類の CDPK が孔辺細胞に存在し、そのうち 3 つが孔辺細胞に多く発現していることが分かった。3 つの CDPK isoform (VFCDPK1, 3, 4) に関して、その cDNA sequence、細胞内局在、そして、キナーゼ活性について報告する。

ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子によるベチュニア・ジンクフィンガー遺伝子ZPT2-3のストレス応答プロファイルの解析

上中弘典, 菅野正治, 高辻博志 (農水省・生物研)

ベチュニアのジンクフィンガー(ZF)遺伝子 (EPFファミリー) のうち、複数の2フィンガー型ZF遺伝子が、様々なストレスによって発現誘導を受けることを明らかにしてきた。中でもZPT2-3は、傷、低温、乾燥、塩など複数のストレス処理に対して急速かつ強く応答し、またシグナル伝達物質として知られるエチレン、ジャスモン酸、活性酸素によっても発現誘導を受ける。今回、ZPT2-3遺伝子のストレス応答性発現誘導の空間的分布をリアルタイムにモニターすることによって本遺伝子のストレス応答における役割を推測するため、ZPT2-3プロモーター領域とルシフェラーゼ(LUC)遺伝子との融合遺伝子を導入したトランスジェニック植物を作出し、2D-ルミノメーターによる解析を行った。その結果、乾燥、低温ストレスにより、顕著なLUC活性の上昇が見られ、その反応は以前報告したZPT2-2よりも速い応答であることがわかった。また、ZPT2-3プロモーターは傷処理に対しても応答し、処理葉のみならず無処理の葉においてもLUC活性の上昇が観察され、システミックな応答が起こることが明らかになった。このような応答パターンは、植物ホルモンに対する発現応答とともに、病害抵抗性に関与する遺伝子の発現応答と似ており、ZPT2-3が病害抵抗性に関与している可能性を示唆している。阻害剤等がZPT2-3のストレス応答性に及ぼす効果についても報告する。

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 の低温検知機構の解析

鈴木石根, 兼崎友¹, 村田紀夫 (基生研, ¹総研大)

生物は環境温度の変化を検知し、遺伝子の発現を調節して適応し、生育している。我々はラン藻 *Synechocystis* PCC6803 の、環境温度の低下による脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現誘導機構の解析から、43個のヒスチジンキナーゼホモログのうち Hik33 と名づけたヒスチジンキナーゼが、複数の低温誘導性遺伝子の発現を制御する低温センサーであることを明らかにしている。

Synechocystis の野生株と Hik33 の変異株について、低温条件下における遺伝子の発現を網羅的に解析した。野生株では、遺伝子の転写や翻訳に関わるタンパク質の遺伝子が低温により顕著に誘導され、フィコビリゾームや光化学系 I の構成タンパク質遺伝子の発現が低温により抑制された。それらの低温誘導性遺伝子は、① Hik33 の変異により低温誘導性が完全に失う遺伝子群、② 低温誘導性が減少する遺伝子群、③ 低温誘導性が影響を受けない遺伝子群、の3つのグループに分類されることがわかった。これらの結果から、Hik33 のほかに少なくとももう1つのセンサーおよび遺伝子発現調節系が存在することが示唆された。現在、第2の低温検知機構の同定を試みている。

イネの低温・塩ストレス条件下における OsCDPK7 シグナル系の組織局在について

木下奈都子, 西條雄介, 石山敬貴¹, 早川俊彦¹, 古本強, 畑信吾, 山谷知行¹, 泉井桂 (京大院・生命科学, ¹東北大院・農・応生科)

イネにおける低温・塩ストレス誘導性カルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK)、OsCDPK7 は過剰発現植物の解析から、上記ストレスに対する耐性の増強に寄与していることが示された (Plant J. 23, 319-327(2000))。

本酵素が機能している部位を明らかにする目的で、これら過剰発現系統と野生型において、OsCDPK7 とその下流で機能していると推定される *rab16A* の発現部位の解析を *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的染色法を用いて解析した。その結果、OsCDPK7, *rab16A* ともに地上部では維管束系、根では中心柱・厚膜組織・根端分裂組織において特異的に発現していることが確認された。過剰発現系統においても、ほぼ同じ組織で OsCDPK7, *rab16A* のより高い発現が確認されたので、過剰発現系統では CaMV35S プロモーターがこれらの部位での OsCDPK7 の発現を増強して耐性獲得に至ったと考えられた。

また、シグナル伝達機構を明らかにするため、抗体を用いた生化学的解析も現在進行中である。

オゾンにより誘導される葉の可視障害はエチレン生成により促進される

玉置雅紀, 松山崇¹, 中嶋信美, 久保明弘, 青野光子, 佐治光 (国立環境研究所, ¹科技厅振興事業団)

オゾンは光化学オキシダントの主成分であり、植物に取り込まれることにより活性酸素を生じさせ、葉に可視障害を引き起こす。しかしながら、オゾンの植物への分子レベルでの作用機作はよくわかっていない。本発表では異なるオゾン耐性を示すシロイヌナズナ生態型 Col と Ws を用いた研究結果を報告する。

0.2ppm のオゾン暴露により Ws では Col に比べ生重量の低下、葉の可視障害が顕著に現れた。このことから Ws は Col に比べオゾン感受性であることが示唆された。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、オゾン暴露により Ws においてエチレン誘導性遺伝子 (PR-3b, PR-4, PDF1.2) の発現及び、サリチル酸誘導性遺伝子 (PR-1, PR-5) の発現が Col より顕著に高くなっていった。これらの遺伝子の発現を経時的に調べたところ Ws におけるエチレン誘導性遺伝子の発現上昇はサリチル酸誘導性遺伝子の発現上昇より早く起こっていた。また、オゾン暴露により Ws では暴露後 3 時間間に Col の約 2 倍のエチレンを発生した。

以上のことから、オゾン暴露によるエチレン生成量の増大は、サリチル酸による過敏反応を促進することが示唆された。

S326

ポプラの2つのプロテインキナーゼの発現と酵素活性
西口満、角園敏郎（農水省・森林総研）

樹木の成長や分化、環境適応には様々なプロテインキナーゼが関与していると考えられる。我々が昨年度年会で報告した、ポプラ (*Populus nigra* var. *italica*) の頂芽からクローニングした PnPK1 (405 アミノ酸残基)、PnPK2 (406 アミノ酸残基) は、プロテインキナーゼスーパーファミリーに特有な I から XI までのサブドメインを持つ、お互いに相溶性の高い (88%) プロテインキナーゼである。各々の mRNA は、ノーザンハイブリダイゼーションにより、ポプラの根、茎、葉、芽で検出された。大腸菌で作製した組換え PnPK1、PnPK2 タンパク質は自己リン酸化活性を示した。活性には、二価金属イオンを必要とし、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} でリン酸化が見られたが、 Ca^{2+} の添加ではリン酸化能を示さなかった。リン酸化アミノ酸分析により、自己リン酸化される残基はセリンとスレオニンであることが分かった。組換え PnPK2 タンパク質を用いてウサギを免疫し、得られた抗 PnPK2 抗血清は、PnPK2 だけでなく PnPK1 とも反応した。

S327

高等植物における新規な AGC 系プロテインキナーゼの同定
藤田尚也¹、松岡大介²、南森隆司^{1,2}、東哲司²、安田武司^{1,2}
(¹ 神大・農、² 神大院・自然科学研究科)

AGC 系プロテインキナーゼは、主として動物、酵母より種々のものが同定されており、細胞内情報伝達系において重要な役割を演じている。代表的なものとして、PKA、PKG、PKC などのプロテインキナーゼ (PK) がある。ところが、高等植物ではこれら三つのグループの PK は報告されておらず、S6K と PVPK 系の PK が植物においては、AGC 系の PK として報告されている。

今回シロイヌナズナより、AGC キナーゼに存する新規な PK 遺伝子を同定した。そこで本遺伝子の相溶性検索を行ったところ、他の動物種においても相同遺伝子が存在することが判明し、さらにこれらの遺伝子と既知の AGC 系 PK の触媒領域の系統解析を行ったところ、動植物共通に存在する新規なクラスターを形成していることが明らかとなった。そこで本遺伝子群を PKX と名付けた。

現在、本遺伝子の各組織や様々なストレスによる転写量の変化の解析を行うと同時に、GST 融合蛋白質として大腸菌内で発現させ、その酵素活性の測定を行っている。

S328

シロイヌナズナのヒスチジンキナーゼ ATHK1 の dominant negative 型変異遺伝子を導入した形質転換植物の解析
浦尾剛、刑部祐里子、篠崎一雄¹、篠崎和子
(農水省・国際農研・生物資源、¹ 理研・植物分子生物)

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

次に ATHK1 の植物における機能を解析するために、ATHK1 の活性を改変した変異遺伝子を導入した形質転換植物の作出を試みた。まず初めに、酵母の *sln1* 欠損株を用いて野生型 ATHK1 の活性を阻害するような 6 種類の dominant negative ATHK1 変異体 (ATHK1-1~6) を単離した。それらの塩基配列を調べた結果、ATHK1-2 は N 末側の 641 アミノ酸が欠失した変異体、ATHK1-6 は ATP 結合部位と推定される 726 番目の Gly のアミノ酸置換の変異体であることがわかった。さらに、これらの変異遺伝子を導入した形質転換植物を作成したところ、発芽遅延、根の伸長阻害、生育遅延、本葉の肉厚化、子葉の肥大、アントシアニン蓄積等の異常が認められる複数の系統があった。また、これらの系統における乾燥誘導性遺伝子の発現を調べたところ、いくつかの遺伝子の発現量が無処理の条件下でも亢進していた。

S329

アラビドプシス二成分制御系因子 ATRR1/ARR4/IBC7 および ATRR3/ARR8 の形質転換植物体による、サイトカイニンシグナリングにおける機能解析
刑部祐里子¹、浦尾剛¹、篠崎一雄²、篠崎和子¹
(¹ 農水省、² 国際農研、² 理研、植物分子)

アラビドプシス ATRR1/ARR4/IBC7 および ATRR3/ARR8 は、大腸菌等の代表的なシグナル伝達機構であり、真核生物では酵母における浸透圧制御、植物のエチレン受容機構に関わる二成分制御系に含まれる、レスポンスレギュレーター (RR) の相同遺伝子である。我々はこれまで ATRR1 から ATRR4 の 4 種類の RR について単離解析を行った。これらには低温や乾燥ストレスまたはサイトカイニンによって発現が誘導される遺伝子が含まれている。本報告ではこれら遺伝子の高発現形質転換アラビドプシスを作製した。T2 世代を用いた解析では、ATRR1 高発現体はコントロール及び ATRR3 高発現体と比較し抽だいが早い、両遺伝子ともに形態異常は見られなかった。シュート分化培地上での培養では、ATRR1 高発現体はサイトカイニン存在下でシュート分化が高頻度に行われ、ATRR3 高発現体についてはカルス緑化及びシュート分化が抑制された。この条件下で ATRR1 高発現体は *cycD3* および *cab* 遺伝子の発現量が增大しており、ATRR3 高発現体では抑制されていた。乾燥ストレスに関わる *rd29A* および *erd1* 遺伝子の発現は変化が見られなかった。本報告ではさらに、アラビドプシス RR の機能について考察を行う予定である。

S330

シロイヌナズナ MYC 相同性タンパク質 rd22BP1 と MYB 相同性タンパク質 ATMYB2 の ABA シグナリングにおける研究

安部洋、浦尾剛、篠崎一雄¹、篠崎和子

(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子)

乾燥ストレスによる遺伝子発現調節機構を明らかにするため、シロイヌナズナの乾燥誘導性遺伝子 *rd22* 遺伝子の転写調節機構について研究を行っている。*rd22* 遺伝子は乾燥ストレスによって増加した植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)を介して誘導される。*rd22* 遺伝子のプロモーターには ABA Responsive Element(ABRE)が存在せず MYC 認識配列及び MYB 認識配列が ABA を介した乾燥応答性のシスエレメントとして働いている事を明らかにした。また、これらのシス配列に結合する MYC う相同性因子 rd22BP1 と MYB 相同性因子 ATMYB2 を単離した。また rd22BP1 及び ATMYB2 は共に *rd22* 遺伝子の乾燥応答性のシス領域を介した転写活性化能を有している事を明らかにしてきた。今回我々は、*rd22BP1* 及び *Atmyb2* を過剰発現させた形質転換植物が ABA に対する感受性が増すこと、*rd22* 遺伝子が過剰に発現することを明らかにした。以上の結果をもとにこれら遺伝子産物の ABA シグナリングにおける役割について考察する。

S331

トウモロコシ由来新規ヒスチジンキナーゼcDNAのクローニング

榎原圭子¹、早川敦子²、杉山達夫^{1,2}、山谷知行^{1,3}、梶原均¹
(¹理研・植物科学、²名古屋大院・生命農学、³東北大院・農)

近年、高等植物においても、浸透圧応答やホルモン応答に際するシグナル伝達に His-Aspリン酸リレー系が関与していることが明らかにされつつある。真核生物の His-Aspリン酸リレー系は、基本的には sensory His-kinase (HK)、His-phosphotransfer protein (HPT)、response regulator (RR)の3因子から構成されていると考えられる。トウモロコシにおいては、すでに2種のHPT遺伝子(ZmHP1, 2)、8種のRR遺伝子(ZmRR1-8)が単離され、その発現様式や相互作用の特異性などについても解析が進みつつあるが、外界からのシグナルを直接受容するHKに関する報告はいまだなされていない。

今回我々は、トウモロコシからヒスチジンキナーゼcDNA4種(ZmHK1-4)をクローニングした。そのうちZmHK4はシロイヌナズナのETR2と全領域にわたり高い相同性を示した。ZmHK1-3については、3者間では高い相同性を示したものの、エチレンレセプターや浸透圧センサー、またCKI1など既知のものとは膜貫通領域も含めて相同性が低かった。現在全長クローンの取得と、機能解析、および発現パターンについて解析を進めつつある。本発表では、これら新規遺伝子の構造と発現様式を中心に報告する。

F401

光によるフィトクロムB細胞内局在変化のメカニズムについて

松下智直、望月伸悦、長谷あきら（京大・理・植物）

植物の主要な光受容体であるフィトクロムB (phyB)と GFP の融合蛋白質 phyB-GFP は暗所では細胞全体に分布するが、明所では核内へ蓄積し、そこで顆粒状の構造体を形成するということが、既に複数のグループから報告されている(Kircher et al.,1999; Yamaguchi et al.,1999)。しかしながら、phyB-GFP のこのような光依存的な細胞内局在変化を制御するメカニズムについては何も分かっていない。今回、フィトクロムが結合する転写因子である PIF3 (Ni et al.,1998,1999)との相互作用に重要であると考えられている phyB 分子内の特定のアミノ酸残基をアラニンに置換したところ、その改変 phyB-GFP 分子は明所においても細胞質と核内に均一に分布し、核内での顆粒状構造体形成は見られなかった。したがって、phyB-GFP が明所で示す核内への蓄積は、phyB が光依存的に PIF3 などの転写因子と結合することによって起こるのではないかと考えられる。また、phyB-GFP が核内で形成する顆粒状構造体は、光応答性遺伝子のプロモーター領域上に集合したトランス因子の複合体を反映しているのではないかとこの可能性が示唆される。

F402

核局在フィトクロムの生化学的研究

吹田晃彦、中村正展¹、望月伸悦、長谷あきら（京大・理・生物科学、¹東京大・院理系生物科学）

シロイヌナズナにおいて phyB-GFP 融合タンパク質は光依存的に核移行し、核内で GFP 蛍光が顆粒状に観察されることを本研究室が発表した (Yamaguchi et al.,1999)。本研究では顆粒状の核内構造体 (以後 PHYB-body) を精製し、生化学的な解析を行うことを目的とした。

生化学的な研究を行うための試料をシロイヌナズナでは充分得られないため、まずタバコで phyB-GFP を発現させた。phyB-GFP はタバコにおいても光依存的に核移行し、核内で顆粒状に観察された。phyB-GFP を発現させたタバコの葉 250 g から 3×10^8 個の核をパーコール密度勾配遠心分離法により単離したのち、PHYB-body の GFP 蛍光を失わせることなく核を破碎する条件を決定し、 6×10^8 個の PHYB-body を粗精製した。その画分に対し、抗 phyB 抗体と Cy-3 標識 2 次抗体を用いて免疫染色を行い、GFP 蛍光像と Cy-3 蛍光像が一致することを確認した。現在、抗 phyB 抗体を用いて PHYB-body を高度に精製し、銀染色によるタンパク質の確認を試みている。また、PHYB-body 画分についてタンパク質試験管内リン酸化反応を調べている。

F403

STRUCTURAL FEATURES OF BILIN CHROMOPHORES NECESSARY FOR PHYTOCHROME-B MEDIATED REGULATION OF HYPOCOTYL GROWTH IN ARABIDOPSIS.

Hiroko HANZAWA, Katsuhiko INOMATA^{*}, Tomoko SHINOMURA, Takashi KAKIUCHI[†], Krishanthi Padmarani JAYASUNDERA^{*}, Hideki KINOSHITA^{*}, Keishiro WADA^{*}, Masaki FURUYA

Hitachi Adv. Res. Lab, Saitama, 950-0395, Japan; ^{*}Fac. Sci., Kanazawa Univ., Ishikawa 920-1192, Japan

Phytochromes have an open-chain tetrapyrrole, phytychromobilin (PΦB) as a chromophore. We have synthesized phytycyanobilin (PCB), PΦB, and their analogs by preparing each pyrrole ring separately and then coupling them¹⁻⁴. To analyze the structural features of each pyrrole ring required for biological function, we examined *in vivo* assay system using chromophore-deficient *hyl* and *hy2* mutants in *Arabidopsis*. Seedlings were grown on media containing bilins under a 4-hour cycle of red light pulse irradiation⁵, and hypocotyl length was measured. Inhibition of elongation in seedlings grown with PCB or PΦB was similar to that of the wild-type. If the methyl group of PCB at the C17- or C18-position was replaced with longer side-chains, such as *n*-propyl, *n*-pentyl or *n*-octyl group, the extent of the hypocotyl elongation inhibition decreased with the length. These results suggested that the side-chains of the D-ring of the chromophore is structurally important for biological activity of phytyochrome-B under red light induced HIR.

1. Masukawa, T., Kato, H., Kakiuchi, T., Jayasundera, K. P., Kinoshita, H., and Inomata, K. (1998) *Chem Lett*, 455-456. 2. Jayasundera, K. P., Kinoshita, H., and Inomata, K. (1998) *Chem Lett*, 1227-1228. 3. Kakiuchi, T., Kato, H., Jayasundera, K. P., Higashi, T., Watabe, K., Sawamoto, D., Kinoshita, H., and Inomata, K. (1998) *Chem Lett*, 1001-1002. 4. Kakiuchi, T., Kinoshita, H., and Inomata, K. (1999) *Synlett*, 901-904. 5. Shinomura, T., Uchida, K., and Furuya, M. (2000) *Plant Physiol.* 122, 147-156.

F404

DIFFERENTIAL INTERACTIONS OF PHYTOCHROME A IN Pr AND Pfr FORMS WITH DIVERSE ANTI-PHYTOCHROME A MONOCLONALS

Chihoko Natori^{a,b}, Seong Hee Bhoo^c, Pill-Soon Song^c and Masaki Furuya^b

^aHitachi Instruments Service Co., Shinjuku, Tokyo 160-0004, Japan; ^bHitachi Advanced Research Lab, Saitama 350-0395, Japan; ^cUniversity of Nebraska, Lincoln, NE, USA and Kumho Life & Environmental Science Laboratory, Kwangju, Korea

Surface properties of proteins are crucial for the function of phytyochrome molecules¹. Using IA-sys surface plasmon resonance spectroscopy, we measured the dissociation constants for oat phytyochrome A (PhyA, 98% pure, Kumho Petrochem. Co., Korea) and anti-PHYA monoclonal antibodies. Prior to this study, the epitopes of diverse anti-PHYA monoclonals in our stock were determined by using variously engineered recombinant PhyA genes. First, PhyA was immobilized to the carboxymethyl dextran matrix in cuvette, and the interaction of a chosen monoclonal with PhyA in either Pr or Pfr form was monitored at different concentrations. The binding profiles were analyzed by using FAST fitting procedure. The resultant values of dissociation constants clearly indicated that the affinity between the PHYA and the monoclonals varied depending upon 1) Pr or Pfr form of PhyA, and 2) the epitopes of the monoclonals tested. This preliminary study on a model system indicated that the present approach to measure quantitatively the binding affinity between PhyA and differently interacting monoclonals would open a new way for the study of phytyochrome's surface properties and PhyA:protein interactions.

¹ Song, P. S (2000) Seminar Cell Dev. Biol.

F405

INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF ENDOGENOUS PHYTOCHROME A IN RICE SEEDLINGS

Sam-Geun Kong, Akiko Hisada, Makoto Takano¹, and Masaki Furuya; Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395, Japan; ¹Department of Plant Physiology, National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

Endogenous rice phytochrome A apoprotein (PHYA) in cryosections of etiolated rice seedlings was visualized by immuno-labeling techniques, using a *phyA* deficient mutant* as a negative control. Strong PHYA immuno-signal was observed in epidermal cells of the coleoptile, in young developing cells of the first, second, and third leaves, and in cortex cells of the root tip. Nuclear translocation of PHYA in the coleoptile and the first leaf of 3-day-old rice seedlings occurred within a few minutes under continuous red light illumination, but was clearly observed after 6 hours under continuous far-red light illumination. The immuno-labeling of PHYA in the tissues of the coleoptile and the first leaf of 3-day-old rice seedlings was no longer detectable after continuous red light illumination for 6 hours, but detectable in young developing tissues of the second and third leaves under the same condition. However the level of PHYA immuno-signal was not changed by continuous far-red light illumination. We conclude that the effects of light on rice phytochrome A distribution may differ depending on the cell type, tissue and/or organ.

* Takano *et al.*, (2000) Plant Cell, in press.

F406

LIGHT-INDUCED INTRACELLULAR REDISTRIBUTION OF ENDOGENOUS PEA PHYTOCHROME B

Akiko HISADA, James L. WELLER¹, James B. REID¹, Masaki FURUYA, Hitachi Adv. Res. Lab., Saitama 350-0395, ¹School of Plant Science, Univ. of Tasmania, Tasmania 7001, Australia

We have established a method for detecting phytochrome B apoprotein (PHYB)-specific immuno-labeling in cryosections of etiolated pea seedlings, using PHYB-null *lv5* mutant (Weller *et al.*, 1995) as a negative control. In etiolated apical hook cells, immuno-label of PHYB was diffusely distributed in the cytosol. However, when etiolated seedlings were exposed to continuous red light (cR), nuclear accumulation was first clearly detectable after 4.5 hr and continued gradually over the next 1.5 hr. Furthermore, to investigate the effects of various light conditions on both phytochrome A (PHYA) and PHYB distribution in single cells, we have established multiple labeling using each PHYA and PHYB specific antibodies conjugated to a differently colored fluorescent label. Results confirm cytosolic distribution under darkness, and the distinct kinetics for nuclear redistribution observed using single labeling.

Weller, J.L., Nagatani, A., Kendrick, R.E., Murfet, I.C., and Reid, J.B. (1995). Plant Physiol. 108, 525-532.

F407

AUTOMATED DEVICE FOR CRYOFIXATION OF ELECTRON MICROSCOPIC SPECIMEN AT LIQUID HELIUM TEMPERATURE

Akiko Hisada, Tomoko Yoshida¹, Shigeo Kubota², Naoko K. Nishizawa³, Masaki Furuya, Hitachi Adv. Res. Lab., Saitama 350-0395, ¹Hitachi Instruments Service Co., Tokyo 160-0004, ²Kubota Techno, Saitama 350-1255, ³The Univ. of Tokyo, Tokyo 113-8657

Metal-contact rapid freezing method using liquid helium is potentially best to preserve the fine structure of living cells for electron microscopy. This method, however, has not been used so often as expected, because of its technical difficulty and low reproducibility. We have designed and custom-constructed an automatic device for this method, so that any non-specialists can now prepare for very short time as many specimen of high quality as we want. We tested this new device as to how well the ultrastructure of specimens is conserved in terms of the distance from the contacted metal, finding that the region of 10 μ m on shorter distance from the metal-contact plane was fixed in the best quality. We applied this device to observe quickly changing phenomena by rapid freezing and freeze-substitution methods, like the active subcellular movement of the papillar cells in stigma. Considering the importance of understanding in the subcellular events of living cells in molecular and cell biological approaches, this device will open a new field in biotechnology in future.

F408

IMMUNOCYTOCHEMICAL ANALYSIS OF PHYTOCHROME A LOCALIZATION BY ELECTRON MICROSCOPY USING RAPID FREEZING TECHNIQUE

Tomoko YOSHIDA, Akiko HISADA¹, Sumiko YABE¹, Masaki FURUYA¹, Hitachi Instruments Service Co., Tokyo 160-0004, ¹Hitachi Adv. Res. Lab., Saitama 350-0395

We recently characterised reported the rapid light-induced subcellular translocation of phytochrome A apoprotein (PHYA) using light microscopy⁽¹⁾. To investigate rapid redistribution under electron microscope, we have applied the rapid freezing method at liquid helium temperature using a newly developed automatic device for cryofixation. After freeze substitution, endogenous pea PHYA was visualized by immunogold-labeling in ultrathin sections, using a PHYA-deficient mutant *fun1-1*⁽²⁾ as a negative control.

In etiolated hook cells of 5-day-old seedlings, immunolabelled PHYA was diffusely distributed in the cytosol. When etiolated seedlings were exposed to continuous red light (cR) for 30 min, immunolabel appeared in the nucleus, as small aggregations, whereas remaining cytosolic diffused immunolabel. We consider that these aggregates may corresponds to the previously reported speckled distribution of PHYA immunofluorescence in the nucleus under cR⁽¹⁾.

(1) Hisada *et al.*, 2000, Plant Cell, 12, 1063-1078

(2) Weller *et al.*, 1997, Plant Physiol., 114, 1225-1236

F409

VERY RAPID REGULATION OF CYTOPLASMIC AGITATION BY TYPE II PHYTOCHROME IN *Vallisneria* EPIDERMIS CELLS Shingo Takagi,^a Sam-Geun Kong,^b Yoshinobu Mineyuki,^c and Masaki Furuya^b

^a Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan, ^b Hitachi Advanced Research Laboratory, Hatoyama, Saitama 350-0395, Japan, ^c Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan

Using a custom-made, dynamic image-analyzer, we examined quantitatively effects of light on the actin-dependent cytoplasmic agitation in epidermal cells of green leaves of the aquatic monocot *Vallisneria gigantea*. We found that a type II phytochrome regulates photoreversibly the randomly oriented, short-distance movement of cytoplasmic particles. The phytochrome-dependent cytoplasmic agitation was induced not uniformly in the cytoplasm but as scattered patches where no specific cell organelles, such as the nuclei and chloroplasts, existed. The induction was first detectable around three seconds after the start of red light irradiation. The cytoplasmic agitation was accelerated only in the microbeam light-exposed area of cytoplasm, but no such acceleration was observed in non-irradiated areas. This photoinduced agitation disappeared within minutes and was never transmitted from an irradiated cell to its neighbors. Cryosections of the epidermal cells showed immunocytochemically positive signals when anti-phytochrome B antibodies, mBA01 and mBT01, were used. But no specific signal was detectable when anti-phytochrome A antibodies, mAR07 and mAR14, were used. This is consistent with the results that the effect of type I phytochrome on the cytoplasmic agitation was not detectable in the present material.

F410

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

Norihito KUNO¹, Simon Geir MØLLER², Tomoko SHINOMURA¹, Nam-Hai CHUA² and Masaki FURUYA¹; ¹Hitachi Advanced Research Laboratory, Saitama 350-0395, JAPAN, ²The Rockefeller Univ., New York, NY 10021, USA

We used a fluorescent differential display (FDD) technique (Kuno *et al.*, 2000, *Plant Physiol.* 122: 15-24) to screen early-phytochrome-responsive genes and isolated one inducible cDNA encodes a novel MYB-related protein of 346 amino acids harboring a single N-terminal MYB-domain in Arabidopsis. We transformed Arabidopsis with sense- and antisense-construct to probe the functionality of the isolated gene product. Under continuous red and far-red light, the antisense-transgenic plants showed reduced cotyledon opening than the wild-type plants. When plants were grown under long days (LD; 16h-white light/8h-dark) or short days (8h-white light/16-dark), one of the sense-transgenic lines (OX-19) showed elongated hypocotyls than the wild-type. Under LD, the OX-19 line flowered 5 days later (27.4±4.0 days) than the wild-type Arabidopsis (22.0±2.0 days). The OX-19 line flowered when they developed 15 leaves, whereas the wild-type plants did when they developed 12 leaves. The OX-19 line showed elongated leaves (average length of the 8th to 10th leaves was 56.4±4.1 mm) than the wild-type (45.6±3.7 mm) under LD for 4 weeks. These results suggest a function for this *myb*-related gene in the phytochrome-signal transduction pathway.

F411

シロイヌナズナ葉緑体光定位運動に関与する新規な遺伝子の単離と同定

及川和聡¹、清末知宏^{2, 3}、加川貴俊^{3, 4}、末次憲之¹、和田正三^{1, 3} (¹都立大・院理・生物科学、²香川大・遺伝施設、³基生研・情報制御、⁴科技団・さきがけ 2 1 研究)

葉緑体は光の質、量および方向に応じて細胞内でその位置を変える。この葉緑体光定位運動は一般的に青色光で制御されており、弱光下では光に集まる弱光反応を示し、強光下では光から逃げる強光反応を示す。我々はシロイヌナズナから葉緑体光定位運動を示さない突然変異体を選抜し、分子遺伝学的解析を行っている。今回我々は T-DNA 挿入突然変異体のラインから強光反応、弱光反応のいずれの反応も欠損している変異体を得た。この変異体の原因遺伝子を同定したところ、今までには報告されていない新規な遺伝子であり、いくつかの機能部位が存在していることがわかった。アクチンとの結合に関与すると思われる部位、プロリンに富む領域、2つのロイシンジッパー構造である。この遺伝子の機能を解明することにより葉緑体光定位運動の作用機作に新しい知見を与えるものと思われる。

F412

キュウリ CPD 光回復酵素 (*CsPHR*) の光による発現誘導

高橋真哉¹、中嶋信美²、近藤矩朗¹、渡辺正勝³
(¹東京大・院・理・生物、²国立環境研・地域、³基生研・培養育成)

UV-B 照射による生体内での DNA 損傷の生成は DNA 複製や RNA 転写の阻害などの悪影響を及ぼす。植物ではこれを回避するために光回復を主とした DNA 損傷修復機構が備わっていることが知られている。しかし、高等植物では光回復に関わる光回復酵素に関する研究はあまり進んでいない。我々は昨年の大会でキュウリ実生からの class II CPD 光回復酵素 (*CsPHR*) のクローニングについて報告した (2000 年度本大会)。*CsPHR* は日周サイクルに従って発現量が増加しており、また UV-B 照射により発現量が増加することが示された。今回、*CsPHR* の光による発現誘導の作用スペクトルについて調べたので報告する。

実験材料として、第一本葉が展開した直後のキュウリ (*Cucumis sativus* L.) を用いた。基礎生物学研究所の大型スペクトログラフにて 270~700nm の範囲の単色光を 4 時間照射したのち、直ちに第一本葉を凍結し、total RNA を抽出して定量的 RT-PCR に用いた。

CsPHR 発現誘導の作用スペクトルは、UV-B 領域の 300nm に顕著なピークを示した。また、青色光 (420, 450nm) 緑色光 (550nm) の可視領域でも効果があることが示された。逆に UV-C 領域 (270nm) では発現は阻害された。

これまでに、高等植物における光回復酵素の光誘導に関してはいくつかの結果が示されている。シロイヌナズナでは UV-B により誘導されるという報告がなされている。またいくつかの植物種では UV-A、青色光、赤色光などが有効であり phytochrome など各種光受容体の関与が示唆されている。本研究において 300nm で強い発現誘導が見られた。DNA 損傷の生成・蓄積による誘導と未知の UV-B 光受容体の関与と 2 つの可能性が考えられるが、300nm にピークがあり、UV-C で阻害されたことから UV-B 光受容体が関与している可能性が高い。また、青色光、緑色光でも発現誘導されたことから、*CsPHR* の発現誘導には複数の光受容体が関与している可能性も考えられる。

F413

DF1; 最小プロモーターに光応答性を付与できるシスエレメント DE1 に結合するタンパク質
永野幸生、稲葉丈人、古橋寛史、佐々木幸子
(名大院・生命農学)

エンドウ低分子量 GTPase 遺伝子 *pra2* は暗所生育エンドウの上胚軸で発現しており、光により発現が抑制される(Nagano *et al.*, PNAS 92, 6314 (1995))。我々はこの光抑制性発現制御機構を明らかにするため、レポーター遺伝子を用いた 5' 上流域のシスエレメントの解析を行ってきた。その結果、この遺伝子の暗所における発現誘導及び光抑制に関わるシスエレメント DE1 を見つけた(Inaba *et al.*, Plant Physiol. 120, 491 (1999))。また、DE1 は最小プロモーターに光応答性を付与するのに十分であることも明らかにした(Inaba *et al.*, JBC 275, 19723(2000))。最小プロモーターに光応答性を付与できるシスエレメントとしては最初の発見である。次に酵母 one-hybrid 法により DE1 に結合するタンパク質をコードしている cDNA をクローニングした。組換え型タンパク質を作り、その認識する DNA 配列を調べた。その結果、これまでのシスエレメント解析からわかった結果とよく一致した。

F414

ルシフェラーゼ遺伝子導入植物をモデルとした
ジーンサイレンシングの解析

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

ジーンサイレンシングとは、導入した外来遺伝子の発現が抑制される現象で、相同性のある内在遺伝子の発現抑制も伴い、菌類における quelling や線虫やショウジョウバエで報告されている RNAi (RNA interference) と類似の現象であると考えられている。ジーンサイレンシングは、形質転換植物を作成する際に障害となると同時に、逆に内在性の遺伝子を抑制する方法として積極的に利用される場合も少なくない。我々は、この機構を調べるために、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を高発現させたタバコを作成し、これらの植物で観察されるジーンサイレンシングを解析している。生化学的な解析から、我々の植物で認められるサイレンシングは、mRNA が特異的に分解される転写後型ジーンサイレンシング(PTGS)と考えられた。冷却 CCD カメラを用いて微弱なルシフェラーゼ活性を検出することにより、植物体におけるジーンサイレンシングを解析したところ、頂芽周辺やカルスなど成長が盛んな部分ではこれが認められなかった。花芽から種子形成過程におけるジーンサイレンシングについて、継続的に観察した結果についてもあわせて報告する。

F415

NPL1 が関わる光屈性応答の赤色光による増感について
高瀬智敬^{1,2}、中澤美紀²、酒井達也³、加川貴俊^{4,5}、真鍋勝司¹、松井南² (1横浜市大・院・総合理、2理研 GSC、3理研・植物科学研究センター、4科学事業振興事業団・さきがけ研究 21、5基生研・情報制御研究部門)

シロイヌナズナのはい軸は、青色光を一方向から照射すると正の光屈性応答を示し、その屈曲は弱い光フルエンスに応答する一次正屈曲と、強い光フルエンスに応答する二次正屈曲に分けられる。このどちらの光屈性応答も赤の前照射によってその屈曲の度合いが増すことが知られており、フトクロム変異株の研究によって、この増感には PHYA と PHYB が関わっていることが明らかになっている。これまでに光屈性応答を示さない変異株として *nph1* が単離されており、この変異株は弱い光フルエンスでの光屈性応答を示さない。しかし、最近になって強い青色光の連続照射によって *nph1* 変異株は正の屈曲を示すことが報告され、さらにこの応答には NPH1 のホモログである NPL1 が関わっていることが示唆されている。本研究では光屈性応答における、NPL1、NPH1 とフトクロム系との関係について *npl1* 変異株などを用いて解析した。

F416

アラビドプシスを用いた根の水分屈性実験系と各種突然変異体の水分屈性

高橋信行、後藤伸治¹、岡田清孝²、高橋秀幸(東北大・遺生研、¹宮教大・教育・生物、²京大・理・植物)

本研究では根の水分屈性の分子機構を解明するために、アラビドプシスの根における水分屈性実験系を確立し、各種突然変異体の水分屈性を解析した。

閉鎖系チャンバー内で 1% 寒天プレートと飽和塩溶液によって湿度勾配を形成させた場合、水分飽和条件下の根と比較してわずかに成長速度が低下するものの、根は 1 時間後には 20 度以上の水分屈性を示し、その屈曲は 24 時間後には 90 度以上に達した。このことからアラビドプシスの根が水分勾配に敏感に反応し、顕著な水分屈性を発現することが明らかになった。また、重力屈性突然変異体である *aux1*、*pgm* や光屈性突然変異体である *nph1* は水分屈性を正常に発現するのに対して、ABA 突然変異体である *aba1*、*abi2* では水分屈性が低下した。

これらの結果から、水分屈性が重力屈性や光屈性とは異なるシグナル伝達経路を有し、かつ水分屈性には ABA を介した経路が存在することが示唆された。

F417

疑似微小重力環境下における

ヤマザクラの茎の二次組織の発達について

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

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

F418

光によるキュウリのベグ形成の抑制

藤井伸治、鎌田源司、高橋秀幸
東北大・遺伝生態研究センター

キュウリの種子を水平に置き暗所で発芽させた場合、胚軸と幼根の境界領域（TR領域）が正の重力屈性により下側に彎曲し、その内側にベグと呼ばれる突起状の器官が発達する。いくつかの植物種において光が重力応答に影響を及ぼすことが知られている。そこで、本研究では、重力により制御をうけるベグ形成に対する光の影響を解析した。

水平にキュウリの種子を置き発芽させた場合、暗所、明所ともにTR領域の下方向への彎曲と、その内側に一つのベグ形成が認められた。ベグ形成が開始する芽ばえのTR領域は種皮で覆われている。ベグが形成される全ての期間を通じてTR領域に光を照射するため、種皮を剥いだ種子を用いて解析を行った。暗所で水平に発芽させた場合、ほぼ全ての芽ばえにおいてベグ形成が認められた。したがって、種皮の除去によりベグ形成は阻害されないことが示された。一方、明所で水平に発芽させた場合、約80%の芽ばえにおいてベグ形成は認められなかった。

上記の種皮を剥いだ種子を水平に発芽させた芽ばえにおけるベグ形成率の低下が、光条件によることを確認するため、種皮を剥いだ種子を水平に置き暗所で生育させた後、明所で72時間齢まで生育させた芽ばえのベグ形成率を測定した。吸水後12時間、暗所で生育させた後、明所でさらに生育させた場合、90%以上の芽ばえにおいてベグ形成は認められなかった。一方、吸水後21時間以上暗所で生育させた芽ばえでは、90%以上の個体でベグ形成が観察された。したがって、ベグ形成には吸水後21時間以上、暗所で生育させることが必要であることが示された。この結果から、光はベグ形成を抑制することが明かとなった。

F419

重力によって制御されるウリ科植物のベグ形成とオーキシン

輸送キャリア遺伝子の発現

鎌田源司、藤井伸治、東谷篤志、高橋秀幸

東北大・遺伝生態研究センター

ウリ科植物の芽ばえでは、維管束鞘細胞による重力の感受がオーキシンの不均等分布を誘導し、根と胚軸の境界部（TRゾーン）における特定の皮層細胞がその一定以上のオーキシン濃度に反応して成長極性を変化させ、ベグを発達させるものと考えられている。我々は、宇宙実験の結果から、微小重力下で育成されたキュウリ芽ばえは、TRゾーンに2個のベグを対称的に形成し、地上における1個のベグ形成が重力によるネガティブコントロールによって抑制されることを示した。さらに、オーキシン制御遺伝子 *CS-IAA1* の発現解析から、重力によるネガティブコントロールには、オーキシン濃度の局所的な減少が関与する可能性を示した。

そこで、本研究では、重力によって制御されると考えられるオーキシン分布およびオーキシン輸送がキュウリのベグ形成に果たす役割を解明するために、キュウリ芽ばえからオーキシン輸送キャリア遺伝子を単離し、その発現解析を行なった。

F420

オオムギのプロリントランスポーター (*HvProT*) の機能解析

上田晃弘、施衛明¹、高倍鉄子¹

(名大・生物分子応答研究センター、¹名大院・生命農学)

プロリンは塩ストレス下で適合溶質として重要な役割をはたすことが知られている。我々は先に、オオムギから塩ストレス下で特に根で強く発現するプロリントランスポーター遺伝子 (*HvProT*) をクローニングした。酵母のプロリントランスポーター変異株を用いてその基質親和性を調べたところ、これまで報告されているアラビドプシス (*AtProT2*) やトマト (*LeProT1*) のプロリントランスポーターとは違う性質が見られた。*HvProT* はL-プロリン以外にD-プロリンにいくぶんかの親和性を示したほか、プロリンのアナログであるハイドロキシプロリンや acetyl-D-glucosyl-L-proline、他の数種類のアミノ酸に対する親和性は低かった。一方で、L-プロリンの取り込みはGABA (γ -amino butyric acid) やグリシンベタインとはほとんど競合しないことが示された。これは *AtProT2* や *LeProT1* とは違い、*HvProT* はプロリン特異的なトランスポーターであるということを示唆している。またそのトランスポート活性はpH依存型であることから、*H⁺*アミノ酸トランスポーターの一種であることが示唆される。これらの特性より塩ストレス下でオオムギの根において *HvProT* の果たす役割について考察する。

F421

シロイヌナズナの完全長cDNAマイクロアレイより得られた新規の乾燥/低温ストレス応答性遺伝子の発現解析

植域時彦^{1,2}, 関原明^{2,3}, 鳴坂真理³, 藤田美紀³, 篠崎一雄^{2,3} (1株式会社コンボン研究所, 2理研・植物分子, 3理研・ゲノム科学総研セ)

高等植物を取り巻く環境ストレスの中でも乾燥, 高塩濃度, 低温は成長や生産性を規定する主要なストレス因子である。農業生産の向上や環境保全の見地から, 植物におけるこれらのストレスに対する応答や耐性の分子機構の解明が急務である。

このような背景のもとで, DNAマイクロアレイをもちいたストレス関連遺伝子の網羅的な探索と発現解析は, 基礎研究だけでなくストレス耐性植物の分子育種を目指した応用研究にとっても非常に有効な手段として注目されている。これまでに我々は, シロイヌナズナの完全長cDNAマイクロアレイをもちいて多数の乾燥/低温ストレス誘導性遺伝子を同定している。

今回我々は, それらの中で新規に得られた複数の乾燥/低温ストレス誘導性遺伝子の発現解析結果について報告する。また我々は, これらの遺伝子のプロモーター領域を単離し, それぞれのプロモーターにレポーターをつないで導入したシロイヌナズナおよびタバコの形質転換体を作成した。これらの形質転換体をもちいた組織化学的な発現解析の結果について報告し, 新規の環境ストレス応答性遺伝子群の発現特性について考察する。

F422

オオムギの水チャンネル遺伝子 *bpw1* の局在性と発現の日周変化

小塩和輝, 且原真木, 笠毛邦弘 (岡山大・資生研)

aquaporin(AQPs)は, MIP遺伝子ファミリーに属し, 水輸送をつかさどるタンパク質である。我々の一連の研究から, *bpw1* はAQPをコードしている遺伝子であり, その塩基配列から原形質膜局在型(PIP)に属する事が示唆されている。

本研究では, *bpw1* のN末端の予想アミノ酸配列に相当する人工ペプチドを基に作成した抗体を用いて, タンパク質レベルでの細胞内局在性と, Tissue print immunoblot法による, オオムギの根における*bpw1* タンパク質の組織内の分布をしらべた。また, AQPのmRNAレベルで日周変動が報告されているので(David, T. et al. J.Exp.Bot 51: 342, 2000), 我々は*bpw1* タンパク質の日周変動の解析を試みた。これらの結果, 1) *bpw1* は原形質膜局在型(PIP)である。2) 表皮組織と木部組織周辺に多く分布する。3) 深夜(0時)から明け方(4時)にかけて, *bpw1* タンパク質の発現が増加した。これらの結果をもとに, *bpw1* がオオムギの根における水の輸送とその調節にどのように関与するのかを議論する。

F423

COORDINATE GENE RESPONSE TO SALT-STRESS IN RICE (*Oryza sativa* L.)

M. Arumugam PILLAI¹, S. YANAGIHARA², H. FUNATSUKI¹, T. AKIYAMA¹

¹Department of Low Temperature Science, Hokkaido National Agricultural Experiment Station, 1 Hitsujigaoka, Sapporo, Hokkaido 062-8555, Japan, ²Japan International Research Centre for Agricultural Sciences Okinawa subtropical Station, Ishigaki, Okinawa 907-0002, Japan

Differential screening was performed by using the cDNA library constructed from the seedlings of rice variety TSA 1, grown in water culture either without or with osmotic shock (150 mM NaCl) for 3h. Sixteen clones were isolated and based on the sequencing analysis three clones encoding salt responsive protein were selected for further study. One of the clones OSINP represented a gene that is expressed at high levels during 24h NaCl treatment. The DNA sequence analysis of OSINP indicated a similarity between the deduced amino acid sequence of inositol phosphate kinase like protein of *Arabidopsis thaliana*. Another clone OSSRII showed identity to the photosystem II w protein. The clone OSSRIII was highly similar to cysteine proteinase inhibitor which is strongly associated with chilling inducible and drought tolerant protein of rice. Hybridization of the clone OSINP to genomic DNA digested with *EcoRI*, *EcoRV*, *Hind III*, and *Sal I* indicated that a single copy of gene encoded the salt inducible transcript. RNA blot hybridization showed the corresponding mRNA accumulation of 1.3, 1.0, 0.9 kb for the clones OSINP, OSSRII and OSSRIII respectively which increasingly accumulated over time.

F424

孔辺細胞のリンゴ酸代謝に関わる酵素の活性に対する浸透圧ストレスの影響

浅井尚子, 中嶋信美¹, 玉置雅紀¹, 後藤潔², 鎌田博, 近藤矩朗³ (筑波大・院・生命環境, ¹国立環境研, ²聖徳大, ³東京大・院・理・生物)

気孔は大気との接点にあるため, 特に大気の乾燥時には孔辺細胞は乾燥に曝される。したがって, 孔辺細胞は乾燥に対して何らかの防御機構を持っていると考えられるが, そのしくみについては研究されていなかった。そこで, 我々は孔辺細胞の乾燥に対する抵抗性のしくみについて調べてきた。ソラマメ(*Vicia faba* L.)の葉の裏側表皮を0.4 M マンニトール水溶液に浸潤することにより, 孔辺細胞に浸透圧ストレスを与え乾燥の代わりとした。我々は, これまでに浸透圧ストレスによって孔辺細胞でリンゴ酸の蓄積が起こることを明らかにしている。また, リンゴ酸の合成酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)のタンパク量が上昇することも見出している。しかし, PEPCのタンパク量の上昇はあまり顕著ではなかったため, 浸透圧ストレスによるリンゴ酸の蓄積がこのことだけに由来しているのか疑問である。そこで, 今回リンゴ酸の合成や分解に関わる酵素の活性変化について検討したので報告する。

F425

PROMOTER ANALYSIS OF AREB GENES IN THE REGULATION OF DEHYDRATION- AND ABA-RESPONSIVE GENE EXPRESSION OF *rd29B* IN *ARABIDOPSIS*

Mohammad Masud PARVEZ¹, Takashi FURIHATA¹, Kazuo Shinozaki² & Kazuko Yamaguchi-Shinozaki¹. ¹Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), 1-2 Ohwashi, Tsukuba City, 305-8686, Japan, ²RIKEN Tsukuba Institute, 3-1-1 Koyadai, Tsukuba City 305-0074, Japan.

The induction of dehydration-responsive gene *rd29B* is mediated by abscisic acid (ABA) in *Arabidopsis*. Previously we have reported that AREB1 and AREB2 proteins function as transcriptional activators in the ABA-inducible expression of the *rd29B* gene under dehydration condition. In this study, we isolated *Arabidopsis* genomic DNAs of AREB1 and AREB2, and carried out promoter analysis of these genes. We found an intron having 321bp in the genomic DNA sequence of 5' upstream promoter region of AREB1. Under dry condition, AREB1 construct containing the 321bp intron had a significantly higher GUS activity than that of control in transgenic tobacco. High GUS activity was also found in transgenic *Arabidopsis* seedlings with this construct while were treated with dry, exogenous ABA and NaCl. Histochemical analysis of *Arabidopsis* seedlings showed a high correlation with its GUS activity. In *Arabidopsis* plants having AREB1 construct containing the 321bp intron showed that GUS stained strongly in leaf, stem and root under dry, exogenous ABA and NaCl conditions. Deletion analysis of AREB1 construct is underway and will be discussed.

F426

ゼンマイ胞子の葉緑体に多量に存在する蛋白の性質
井上 弘, 蒲池浩之, 中山耕造¹
(富山大・理・生物圏環境, ¹信州大・医・解剖)

ゼンマイの胞子葉緑体中には、サブユニットの分子量が42kDa近辺の可溶性蛋白群、膜に強く結合している24-kDa蛋白、ゆるく結合している22-kDa蛋白などが、多量に存在している。このうち、22-kDa蛋白は精製され、またこの蛋白を特異的に分解するプロテアーゼも休眠胞子から部分精製されている。この蛋白の性質を明らかにする一環として、22-kDa蛋白をコードしているmRNAのcDNAを作成し、その全アミノ酸配列を知ることが計画した。結果として、1080bpのcDNAが得られ、N末端に16残基のシグナルペプチドがついた196アミノ酸がコードされており、成熟蛋白は180アミノ酸で構成されていることが明らかになった。Deinococcus radiodurans, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegansなどのLEA蛋白ホモログと称されている仮説蛋白やクロレラの低温応答蛋白で、グループ3 Lea蛋白ホモログと似ている傾向があるが、LEA3の特徴は少なく、新しいタイプの乾燥耐性蛋白群として検討する必要がある。形質転換細胞を作成して機能を解明することを試みている。

F427

Hypertonic treatment induces a transient Ca^{2+} -dependent cessation of cytoplasmic streaming in *Vallisneria gigantea* mesophyll cells
Teruyuki HAYASHI and Shingo TAKAGI; Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., Toyonaka 560-0043, Japan

Plant cells respond to various kinds of mechanical stimuli, including touch and extracellular changes in osmotic pressure. In mesophyll cells of *Vallisneria gigantea*, an aquatic angiosperm, actin-dependent rotational streaming of the cytoplasm is observed in light. We found that hypertonic treatment with 0.5M sorbitol induced, within a few minutes, a transient cessation of the cytoplasmic streaming. The response depends on the presence of extracellular Ca^{2+} , and was substantially inhibited, even in the presence of Ca^{2+} , after treatment of cells with Ca^{2+} -channel blockers, such as $LaCl_3$, $GdCl_3$, and nifedipine. Hypertonic treatment seems to induce Ca^{2+} influx across the plasma membrane through Ca^{2+} channels to produce a transient cessation of the cytoplasmic streaming. Once cells were plasmolyzed, those cells hardly responded to the second hypertonic treatment until 12 to 24 hours after deplasmolysis. We used Arg-Gly-Asp (RGD) hexapeptide, which is known to inhibit a binding of animal cells to extracellular matrices, to examine whether the intact adhesion of plasma membrane to cell wall is necessary to respond to hypertonic treatment. RGD peptide markedly disturbed the arrangement of bundles of actin filaments, however, it had no effect on the response to hypertonic treatment. This result indicated that an RGD-sensitive adhesion is probably not involved in the response. Monitoring of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ level during the response to hypertonic treatment in mesophyll cells loaded with a ratiometric Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye fura-2 is under investigation.

F428

Differential Display を用いたイネ冠水ストレス誘導性
遺伝子の単離と発現機構

大廻雅治、河野尚由、伊藤治¹、山内靖雄、田中浄 (鳥取大・農・植物機能学、¹農水省・JIRCAS)

植物は大雨や洪水時の異常出水などにより冠水状態になると、大気との接触が断たれるため、植物に対する酸素の供給は水中の溶存酸素だけとなり、急速に酸素欠乏の状態に陥る。したがって、正常な酸素呼吸が急速に減少する反面、嫌気呼吸が増加し植物体内の炭水化物が急速に消費され、枯死にいたる。しかし、冠水に対し耐性を持つ植物では冠水ストレスを受けても生育することができる。この時冠水耐性品種は感受性品種に比べ高度な冠水耐性メカニズムがあり、遺伝子レベルでの特異的な誘導、抑制があると思われる。そこで我々は冠水により誘導される遺伝子の単離を試みた。材料として冠水耐性イネ FR-13A (*Oryza sativa* IND FR-13A) の約 4 週齢の幼苗を用いた。冠水未処理 FR-13A と一週間の冠水後 2 日間脱冠水した FR-13A の mRNA 量を比較した結果、冠水処理により mRNA の蓄積量が増加する遺伝子を単離した。

F429

耐塩性品種イネにおける

高塩ストレス誘導性遺伝子の単離と発現解析

宮田なつ子、伊藤治¹、山内靖雄、田中浄(鳥取大・農・植物機能学、¹農水省・JIRCAS)

耐塩性植物は形態的变化や浸透圧保護物質の蓄積、イオンの積極的排除など何らかの適応機構によって塩濃度の高い土地に適応し生育することができる。このとき耐塩性植物体内では塩ストレス適応機構に関わる遺伝子群が発現していることが期待され、また同じ作物間でも耐塩性には品種間差があることが知られている。本研究ではこの品種間の耐性の違いに着目し、耐塩性品種からの高塩ストレス誘導性遺伝子の単離を試みた。耐塩性品種イネ Nona Bokra と塩感受性品種 IR20 に連続光のもと 0.2M NaCl を含有する培養液を与えて塩処理を行い、処理後 24 時間目のストレス時の遺伝子発現の変化を Differential Display 法によって解析した。その結果、耐塩性品種イネの塩処理サンプルにおいて高塩ストレス誘導性遺伝子であると推測される特異的な断片を得ることができた。現在これらの断片について発現時期や他のストレスによる誘導などをノーザンブロット法によって解析している。

F430

タバコ培養細胞およびシロイヌナズナ変異株の

耐塩性に及ぼす不飽和脂肪酸の影響

小林雄二、田中重雄、武長宏

(東農大・応用生物科学)

高等植物の耐塩性と不飽和脂肪酸との関係についてほとんど明らかとなっていない。そこで、著者らは、脂肪酸の不飽和度の増加が植物の耐塩性に及ぼす影響について検討した。0.2M NaCl 添加培地で選抜された光独立栄養性タバコ緑色培養細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN、選抜細胞) は、無選抜の細胞と比較して C16:1 および C18:3 の含有率が高く、C16:0、C18:0、C18:2 の含有率が低かった。このことは、選抜細胞の脂肪酸の不飽和度が無選抜の細胞に比べて高いことを示している。他方、脂肪酸の不飽和化遺伝子が欠損したシロイヌナズナ変異株は、発根時あるいは子葉の展開時において野生株に比べて耐塩性が減少していた。

これらの結果から、脂肪酸の不飽和度の増加がタバコ培養細胞およびシロイヌナズナの耐塩性に関与していることが明らかとなった。

F431

THE HIGH THROUGHPUT SCREEN FOR THE ISOLATION OF NOVEL CLOCK MUTANTS IN *ARABIDOPSIS*Shigeru Hanano¹, Anthony Hall¹, Ruth Bastow¹, László Kozma Bogner², Ferenc Nagy² and Andrew J. Millar¹. ¹Dept. Biological Science, Warwick University, Coventry, CV4 7AL, UK. ²Biological Research Institute, Hungarian Academy of Science, Szeged, Hungary.

Like many other organisms, plants use an endogenous 24-hour clock to synchronize development and metabolism to the day/night cycle. Genetic screens for clock mutant have identified long- and short-period mutants in *Arabidopsis* and other organisms, such as mice, flies and cyanobacteria. Although some of these mutants have identified central components of the clock mechanism in other species, it is not clear that any such genes have yet been identified in plants.

In *Arabidopsis* the expression of the chlorophyll a/b binding protein (*CAB*) gene has been shown to be regulated by the circadian clock. Here, to isolate mutants in novel aspects of clock function such as a circadian gating, we generated an EMS-mutagenised population of *Arabidopsis* plants carrying the *cab2* promoter-luciferase gene fusion. Using a Packard *Topcount* we assayed the luminescence of 1000 seedlings once every hour for 36 hours in constant darkness. The resulting expression patterns for each seedling were compared with those of non-mutagenised plants (wt.). 18 mutants have been isolated from approximately 15,000 seedlings screened. Six and nine of them show a short- and long-period phenotype, respectively. We have also found mutants with similarity to the gating mutant *early-flowering 3*. These mutants may be involved in the circadian gating of light-activated *CAB* expression.

F432

アルミニウムによるコムギ根細胞内の糖含量の変化

田刈彰^{1, 2}、松本英明¹ (¹岡山大学・資生研、²生研機構)

コムギのアルミニウム (Al) 感受性品種 (Scout) と耐性品種 (Atlas) を 10 μ M の Al 環境下で生育させると、Scout 根では細胞壁伸展性の大きな低下と伸長阻害が見られた。しかし、伸長阻害が見られなかった Atlas 根においても有意な伸展性の低下が見られた。このことから Atlas 根では、Al 存在下でも根の伸長を維持する機構が働いていることが示唆された。本研究では、両品種の根端の細胞内の糖について検討した。根端から採取した細胞液に含まれる可溶性の糖濃度を測定した結果、Al 処理により、Scout では低下し、Atlas では増加することがわかった。細胞液中の糖の大部分は単糖であったことから細胞内の糖濃度の変化は単糖レベルの変化によるものであることが考えられた。これらの結果から、Al に応答した糖の蓄積が Al 耐性機構に関与する可能性が示唆された。

DIFFERENTIAL RESPONSE OF THE H⁺-ATPase ACTIVITY AND PM SURFACE POTENTIALS IN ES8 AND ET8 ROOTS OF WHEAT AFFECTED BY ALUMINUM

Sung Ju AHN^{1,2}, Hideaki MATSUMOTO¹, Res. Inst. Bioresources, Okayama Univ., Kurashiki, Okayama 710-0046, ²Dept. Hort., College of Agri., Chonnam Univ., Kwangju 500-757, Korea.

Here we report the H⁺-ATPase activity and surface potentials (zeta potentials) of plasma membrane (PM) vesicles isolated from tip (1cm) and tip-less roots in Al-sensitive (ES8) and Al-tolerant (ET8) of wheat by Al. Al (2.6 μM) inhibited the H⁺-ATPase activity of PM vesicles of ES8 prepared from only tip roots after 4h treatment. Congruent with H⁺-ATPase activity, the zeta potential depolarized only in the PM vesicles isolated from Al-treated tip roots of ES8 and different resting potentials were observed between ES8 and ET8. Interestingly, H⁺-ATPase activity increased and zeta potentials hyperpolarized slightly after Al treatment in only tip-less roots of ES8 and in both root portions of ET8. H⁺-transport rate of inside-out PM vesicles was monitored by acridine orange and a similar result of activity as H⁺-ATPase was obtained. The H⁺-ATPase activity of tip root vesicles of ES8 was sensitive to Al (0 to 10 μM) in vitro but tip-less root vesicles sustained the activity. However, H⁺-ATPase activity of ET8 PM vesicles of tip root increased, though tip-less root sustained the activity. The zeta potential measured under in vitro Al treatment showed a similar result. Immunolocalization of H⁺-ATPase revealed a decrease in the intensity of apical cells as well as matured cells in ES8 but not in ET8 after 4h Al treatment in vivo.

イネのケイ酸吸収における根毛と側根の役割
馬 建鋒、後藤尚子、一井眞比古 (香川大・農学部)

イネは典型的なケイ酸集積植物として知られているが、そのケイ酸の吸収機構については未だ明らかにされていない。本研究は根毛のない突然変異体 (RH2) と側根のない突然変異体 (RM109) を用いて、ケイ酸の吸収における側根と根毛の役割について検討した。まずはケイ酸濃度の低い (0.15mM) または高い (1.5mM) 溶液からの吸収速度を 3 時間ごとに比較した。その結果、RH2 の吸収は野生型 (WT, 品種 オオチカラ) と変わらなかったが、RM109 の吸収は WT よりはるかに低かった。また一ヶ月間 1.5mMSi のケイ酸を含む培養液で栽培し、地上部のケイ酸含量と吸収量を比較した。RH2 の地上部のケイ酸含量は WT と同程度であったが、RM109 は WT の半分以下であった。さらに、一ヶ月間 3 系統を土耕栽培 (土 1kg あたり 2g Na₂SiO₃ 添加)、地上部のケイ酸含量とケイ化細胞の数を比較した。水耕栽培の結果と同様に RH2 の地上部のケイ酸含量は WT と同程度であったが、RM109 の地上部のケイ酸含量は WT の半分以下であった。RM109 の第 3 葉のケイ化細胞数は WT と RH2 の 3 分の 1 しかなかった。コンパートメントボックスを用いて、根の異なる部位によるケイ酸吸収を調べた。根毛も側根もまだ形成されていない根の先端 (0-1cm) の吸収は WT と RM109、RH2 との間で差が見られなかった。しかし、根毛と側根が形成された部位 (1-2cm) では、RH2 と WT の間に有意差が認められなかったが、RM109 の吸収は WT より明らかに低かった。以上の結果は根毛がケイ酸の吸収に寄与せず、側根がケイ酸の吸収に大きく寄与していることを示している。RM109 と WT との間で F2 を用いて解析したところ、ケイ酸吸収の高低の比率は側根のあるなしの比率と同じく 1:3 であった。このことは側根の形成とケイ酸の吸収を支配する遺伝子は単一の優勢遺伝子である。

クラミドモナス CO₂ シグナル伝達因子 CCM1 の解析と cDNA マクロアレイを用いた標的遺伝子の探索

三浦謙治¹、九町健一¹、井上能宏¹、谷口郁也¹、小日向務¹、能岡智¹、浅水恵理香²、中村保一²、田畑哲之²、大山莞爾¹、福澤秀哉¹
(¹京大院生命・統合生命科学、²かずさDNA研)

クラミドモナスは、CO₂ 欠乏ストレスにさらされるとそのシグナルを伝達し、無機炭素濃縮機構 (CCM) に関わる複数の遺伝子発現が誘導される。こうして CO₂ を能動的に体内に取り込むよう順化する。しかし、そのシグナル伝達の分子機構についてはほとんど分かっていない。我々は複数の遺伝子の調節に変異をもつ高 CO₂ 要求性変異株 C16 を相補する遺伝子 CCM1 を単離した (2000 年度年会)。CCM1 の転写産物及びタンパク質とともに構成的に発現していたことから何らかの修飾によって CO₂ シグナルを伝達していると考えられる。また、このタンパク質はジンクフィンガー様ドメインをもち、このドメインの重要性が示唆された。

CCM1 が CO₂ シグナル伝達経路において重要な役割を果たしていることから、この遺伝子によって調節を受ける遺伝子群を、960 種の遺伝子をスポットした cDNA マクロアレイメンブレンを作成して検索した。変異株 C16 と野生株との発現プロファイルを比較し、16 種の遺伝子で 2 倍以上の発現の差がみられた。これらの遺伝子転写産物の量的変化は CCM1 遺伝子の変異によるものと考えられた。16 種の遺伝子の中には、これまでに報告のあった炭酸脱水酵素をコードする CAH1、Mca などの低 CO₂ 誘導性遺伝子や ABC トランスポーターのオーソログも含まれていた。このことは、CO₂ もしくは HCO₃⁻ の輸送体遺伝子の可能性がある。また、新規な CO₂ 応答性遺伝子が多数存在していたことから、この cDNA マクロアレイの有用性が示された。

緑藻クラミドモナスにおける低 CO₂ 誘導性遺伝子の酢酸による抑制機構

福澤秀哉、九町健一、日吉勇人、大山莞爾
(京大院生命科学・統合生命科学科)

低 CO₂ 条件 (0.04%)、明所で誘導されるクラミドモナスの細胞表面の炭酸脱水酵素 (CA) をコードする CAH1 遺伝子の転写は、酢酸が存在すると抑制される。この原因として ①酢酸添加による呼吸活性の上昇に伴う細胞内 CO₂ 濃度の上昇、②酢酸添加による PSII 活性の低下に伴う光合成電子伝達の低下、の 2 つが提唱されている。クラミドモナス呼吸変異株 *dum-1* を用いて 3 つの低 CO₂ 誘導性遺伝子 (CAH1、ミトコンドリア CA、LIP36) の発現に対する酢酸の影響を調べた。野生株で見られるような酢酸による発現の抑制が *dum-1* 株では見られなかった。また、*dum-1* 株では呼吸活性は酢酸の添加によりほとんど上昇しなかった。さらに PSII 活性は野生株、*dum-1* 共に酢酸の添加により低下した。これらの結果より、酢酸による低 CO₂ 誘導性遺伝子の抑制は、呼吸活性の上昇による細胞内 CO₂ の上昇が主要な原因であることが強く示唆された。

F437

4つのダイズ・フェリチン遺伝子の発現解析
後藤文之・吉原利一・増田太郎（電中研・生物科学）

フェリチンは、1分子に最大4000原子もの鉄を貯蔵することができる巨大タンパク質である。従来植物フェリチンの遺伝子は1つと考えられていたが、最近、複数の遺伝子がcowpea等において明らかにされた。しかし、各遺伝子の発現が外界からの刺激や、生育ステージによりどのように変化するかはほとんど明らかにされていない。また、遺伝子同士の役割分担については不明である。

そこで、我々は、ダイズから4種のcDNA (*fer1-4*)をクローニングし、発現パターンをノーザンプロットにより解析した。その結果、*fer1* (既知)、*fer2* は、Feによる刺激によって強く発現誘導されたが、その他の金属に対して発現が認められた。但し、*fer2*ではCd, Niに対する発現は見られなかった。また、*fer1*は開花後、種子中（直径3-9mm）において発現が強く認められたが、*fer2*では、直径5mm未満の種子中では強い発現が見られたものの、発育が進み5mm以上になると弱くなった。*fer3*, *fer4*については、上記の刺激や、生育ステージでは全く、発現が認められなかった。現在、他の刺激や組織特異性についても検討を加えている。

F438

Synechocystis sp. PCC 6803 の P_{II} タンパク質の機能解析
高谷信之、白髭耕平、小俣達男（名古屋大院・生命農学）

ラン藻の P_{II} タンパク質は窒素栄養条件の変化に応答してリン酸化/脱リン酸化を受けるタンパク質で、翻訳後段階での硝酸同化活性の制御に関与している。本研究では、P_{II} が硝酸同化の制御以外の役割を持つか否かを検討するため、アンモニアを窒素源として硝酸同化系が発現しないようにした条件のもとで *Synechocystis* sp. PCC 6803 の野生株と P_{II} 欠損株の増殖を比較した。種々の光強度のもとでの増殖を比較した結果、強光条件下での P_{II} 欠損株の増殖速度が野生株と比べて低いことがわかった。培地中のアンモニアの減少をモニターすることにより、アンモニア同化速度を測定したところ、野生株の場合には、光強度を上げるにつれてアンモニア同化速度が上昇したが、P_{II} 欠損株では、この上昇が起らなかった。また野生株において見られたアンモニア同化速度の上昇は、タンパク質合成阻害剤のリンコマイシンによって阻害された。これらの結果から、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では、アンモニア同化系の活性発現が光強度に応答して正に制御されており、P_{II} がこの制御に関与していると推定した。

F439

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の *ntcB* 遺伝子の同定と機能解析
愛知真木子、小俣達男（名古屋大院・生命農学研究科）

ラン藻は植物と同様硝酸を還元、同化して増殖する。一般にラン藻では、硝酸同化に関わる NRT、NR、NiR の遺伝子がオペロンを形成していて、その発現はアンモニアにより抑制され、アンモニアの除去により脱抑制される。また我々は、*Synechococcus* sp. PCC7942 (以下 7942) において LysR 型の転写制御因子 NtcB が亜硝酸を検知して硝酸同化系オペロンの転写を活性化することを明らかにしている。*Synechocystis* sp. PCC6803 (以下 6803) の場合は、NRT と NR をコードする遺伝子群と NiR 遺伝子が別個の転写単位となっているが、これらの転写はアンモニアによって抑制され、アンモニアの同化を阻害すると脱抑制され、さらに亜硝酸イオンに応答して活性化される点で 7942 の場合と同じだった。6803 の遺伝子の中で *ntcB* と最も高い相同性を示す *slr0395* を破壊した変異株では、脱抑制時の上述の 2 つの転写単位の誘導レベルが低く、亜硝酸による転写活性化も起こらなかった。このことから、*slr0395* を 6803 の *ntcB* と同定した。*ntcB* 欠失株の NR、NiR 活性は、7942 においては野生株の 70~80%であるのに対して、6803 では野生株の約 50%であり、硝酸培地における *ntcB* 欠失株の世代時間も、7942 では野生株の 1.5 倍であるのに対して、6803 では野生株の 3 倍となって増殖速度が大幅に低下した。以上の結果から硝酸を窒素源として増殖する場合、NtcB による転写活性化が、7942 より 6803 において、より重要な生理的意義をもつことが明らかとなった。

F440

形質転換イネを用いたムギネ酸合成酵素遺伝子の同定

小林高範¹、中西啓仁¹、高橋美智子²、川崎信二³、西澤直子¹、森敏^{1,2}

(¹東大院・農学生命科学、²CREST、³農水省・生資研)

オオムギ根から単離された鉄欠乏誘導性遺伝子 *Ids3* (Iron deficiency specific clone no. 3) は、ムギネ酸類の生合成経路のうち 2'-デオキシムギネ酸 (DMA) からムギネ酸 (MA) への水酸化反応を触媒する dioxygenase をコードすると推察された。これを証明するため、*Ids3* を持たず、DMA のみを分泌し、MA 以降のムギネ酸類を分泌しないイネに *Ids3* 遺伝子を導入した。CaMV35S プロモーターの下流に *Ids3* cDNA をつないだコンストラクトを導入した形質転換イネでは、水耕液の鉄の有無によらず *Ids3* mRNA は恒常的に発現していた。一方、*Ids3* を含む 20 kbp のオオムギゲノム配列を導入した形質転換イネでは、鉄欠乏処理により根での *Ids3* の発現が顕著に誘導され、鉄欠乏の葉でもわずかながら *Ids3* の発現が検出された。鉄欠乏条件下で、野生型のイネは DMA のみを分泌したのに対して、2種類の形質転換イネはともに DMA だけでなく MA を分泌した。これは、IDS3 が 2'-デオキシムギネ酸からムギネ酸を合成する「ムギネ酸合成酵素」であることを *in vivo* で証明したものである。

F441

オオムギ鉄欠乏応答性遺伝子 *Ids2* のプロモーター領域の解析; タバコにおける 5 ' 欠失変異体の解析結果について
吉原利一¹・小林高範^{1,2}・後藤文之¹・増田太郎¹・樋口恭子³・中西啓仁²・西澤直子²・森敏^{2,3} (1.電中研生物科学、2.東大農学生命科学、3.CREST)

オオムギより単離した鉄欠乏応答性遺伝子の一つである *Ids2* は、最近ムギネ酸の生合成に関与することが明らかにされている。これまでにノーザンハイブリダイゼーションによって、*Ids2* の鉄欠乏応答性と根における特異的発現が示されているが、この遺伝子が鉄吸収戦略を異にする植物においても同様の発現を示すのか、また、どの配列がその特異的発現を担っているのかは、明らかにされていない。そこで、本研究では *Ids2* の 5' 上流配列を欠失させたいくつかの変異体を GUS 遺伝子と共にタバコに導入し、その発現について解析を行った。その結果、*Ids2* は、タバコにおいてもオオムギと同様に一定の鉄欠乏によって発現が誘導されることが明らかとなった。また、欠失変異体のうち最も短いもの (-272/-47) においても発現量は減少するものの、特異的発現に関しては変化が認められず、転写装置近傍における配列に特異的発現を制御する領域が存在するものと考えられた。

F442

正常な花の形態形成と種子の成熟にはニコチアナミン鉄 (NA-Fe) が必要である

高橋美智子^{1,2}、中河卓也²、根岸孝至²、寺田靖子²、中井泉³、吉村悦郎²、西澤直子²、森敏^{1,2}
(1.CREST, 2.東大院・農, 3.東京理科大・理)

ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (NAAT) はムギネ酸生合成経路上の酵素であり、鉄欠乏ストレスによって発現が誘導される。NAATは双子葉には存在せずイネ科のみに存在する。このイネ科植物に特異的な酵素NAATを双子葉植物で発現させるとどうなるのかという興味から、この遺伝子の一つ (*naat-A*) を過剰発現する形質転換タバコ (*naat-tobacco*) を作成した。*naat-tobacco*の新葉は顕著な葉脈間クロロシスを呈し、花は異常な形態を示し不稔であった。シンクロトロン蛍光X線解析や金属含量の測定により *naat-tobacco* が特に鉄輸送に異常を来していることがわかった。また *naat-tobacco* ではNAが検出されなかった。ニコチアナミン (NA) と鉄の投与によって葉脈間クロロシスは回復し、NA合成酵素 (NAS) を過剰発現するタバコに継ぎ木することで正常な花が形成され、不稔も回復した。しかしながら、WT tobaccoへの継ぎ木では種子が成熟しなかった。これらの結果からニコチアナミン鉄 (NA-Fe) は正常な花の形成と種子の成熟に必須であることがわかった。

F443

UTILIZATION OF N-FERTILIZERS BY TRANSGENIC JAPONICA RICE EXPRESSING CUCUMBER NITRITE TRANSPORTER (*CsNitr1*)

Sustiprijatno, Miwa Sugiura, and Masaaki Takahashi; Dept. Applied Biol. Chem., Osaka Pref. Univ., 1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531

In the nitrate (NO_3^-) assimilation of higher plants, nitrate is firstly reduced by cytoplasmic nitrate reductase to nitrite (NO_2^-), which is then reduced to ammonium by nitrite reductase in chloroplast. Rapid transfer of NO_2^- from cytosol to chloroplast is necessary to support the efficiency of NO_3^- assimilation and to lower the concentration of toxic NO_2^- . Although rice plant can absorb NO_3^- and reduces it to NO_2^- , rice utilizes NH_4^+ better than NO_3^- . We consider that NO_2^- transfer might be slow in rice plant distinct from general higher plants.

We have cloned a NO_2^- transporter gene, *Nitr1*, transcript of which localizes on chloroplast envelope membranes. *Agrobacterium tumefaciens* cells that contain T-DNA harbouring cucumber *Nitr1* infected into rice calli and we got the transgenic Japonica rice plants. Phenotypic observation indicated that the transgenic plants were hydroponically grown well with 40 ppm NO_3^- as sole N source, while the growth of untransformed control was inhibited.

F444

シロイヌナズナのニコチアナミン合成酵素 (*AtNAS*) 遺伝子の上流域解析 (II)

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

双子葉植物である *Arabidopsis thaliana* からのニコチアナミン合成酵素 (NAS) の3つの遺伝子 (*AtNAS1-3*) はそれぞれ異なるプロモーター活性を持っている。今回、これらの上流配列について更に詳細な解析を行ったのでこれを報告する。*AtNAS1* の上流域においては、Fe, Cu, Zn の欠乏条件で GUS 活性の上昇がみられたものの、Mn の欠乏条件では GUS 活性の上昇はみられなかった。この金属欠乏に反応に関すると考えられる部位についてさらに細かくデリベーションシリーズを構築し、解析をおこなっている。*AtNAS2* の上流配列の解析では、様々な環境の変化の下でも GUS 活性に変化はみられなかった。*AtNAS3* の上流域においてはカーネーションの *GST-1* 遺伝子のの上流などにみられるエチレン反応に関する配列によく似たものが存在することが分かった。この配列に変異を入れたところ、エチレンに対する反応がなくなり、この配列がエチレンの反応に関与する配列であることがわかった。このことから *AtNAS3* とエチレンとの関与が示唆された。

F445

CO₂濃度とpH環境が好熱性ラン藻の性質に与える効果

宮入祥夫 (工技院・生命研)

好熱性ラン藻 *Synechococcus elongatus* は0.04%から100%にいたる広いCO₂濃度条件下で生育する。非常に高いCO₂濃度下では生育速度が低下するが、これはCO₂により培地のpHが低下することによるものと考えられた。異なるCO₂濃度下で生育したラン藻は光合成色素の含量や光合成活性が異なっていた。

今回は高濃度CO₂により生ずる低pHの効果調べのために、低濃度CO₂で且つ低pH条件下で生育したラン藻の様々な性質を種々のCO₂濃度で生育したラン藻と比較した。低CO₂低pHで生育したラン藻細胞の光合成酸素発生活性は、高CO₂低pHの場合と低CO₂高pHの場合の中間的な値を示したが、活性のpH依存性は高CO₂低pHの場合に類似した性質を示した。

F446

塩ストレスにより発現が調節されるイネの遺伝子群

田中喜之、福田篤徳、1 中村敦子、(農水省・生物研、1 筑波大・生物科学)

イネの根、葉、茎などにおいて塩ストレスにより発現が調節される遺伝子をマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。

イネ (日本晴) を水耕法により7日間生育させたのち、NaClを添加し経時的に根および葉を採取し、フェノール-SDS法により抽出したRNAからポリA+RNAを調製した。これを鋳型にcy5により標識した一本鎖cDNAを合成し、スライドガラス上に貼りつけたRice Genome Research ProgramのESTクローン由来のcDNAとハイブリダイゼーションを行った。内部標準による濃度依存性を調べると、良い直線性を示したので各スポットにおける処理・無処理における発現量の差を信頼性高く検出できると結論した。0.2M NaCl処理により短時間内に10~20個のクローンが発現し、急速に減少した。一方塩処理により速やかに発現が抑制されるクローンも見いだされた。50mM NaCl処理によりより緩やかに誘導され、そのレベルを維持あるいは緩慢に現象するクローンが見いだされた。

F447

塩害イネにおけるナトリウムの吸収経路

落合久美子、間藤 徹 (京都大院農・応用生命・植物栄養)

水耕14日齢 (3.5葉) のイネ (IR36) に100mM NaCl含有培養液を与えると平均10日で枯死する。このとき塩添加後72時間まで葉身Na⁺濃度は直線的に増加した。葉身Na⁺濃度の増加速度は光条件に影響されなかった。しかし培地pHが6から4に低下したり、培地Ca²⁺濃度が0.5mMから0.05mMに低下するとNa⁺輸送速度は約2倍に増加した。同一条件下でイネ根をCalcoflourで染色すると、対照区では染色されない根端分裂組織、導管内壁が塩共存下では強く染色された。これらの結果はNa⁺が根端からアポプラストを経由して導管に侵入する可能性を示す。この実験系を用いて水耕イネのNa⁺吸収に影響する化合物を検索したところ、エチレンジアミン誘導体 (EG) に顕著な効果を認めた。塩添加土壌 (40 mmol NaCl / kg) で栽培したイネは1ヶ月で枯死したが、5gのEGを補った塩添加土壌ではイネは登熟まで生存し対照区の30%のモミ収量を挙げた。この結果はイネ根に侵入するNa⁺がアポプラストを経由しており、この部分を修飾することでNa⁺吸収を抑制し塩害を軽減できる可能性を示している。

F448

ソバにおけるアルミニウムの分布、移動と局在性
沈 仁芳、馬 建鋒 (香川大・農学部)

ソバは高濃度のアルミニウムを地上部に集積しても毒性を示さないアルミニウム耐性植物である。我々はソバのアルミニウム集積機構を明らかにするために、ソバ体内におけるアルミニウムの分布、体内での再移動及び細胞内の局在性について検討した。28日間アルミニウム (50μM) 処理したソバにおけるアルミニウムの分布を調べたところ、アルミニウム濃度は古い葉から新しい葉に向かって順に減少した。しかし、一日だけアルミニウムを処理したソバにおいては葉令と関係なく均一な分布を示した。第4葉を透明なビニルバッグで覆う処理をすると、その葉のアルミニウム濃度は処理しなかった葉の4分の1であった。これらの結果はアルミニウムの地上部への分布は蒸散量によってコントロールされていることを示唆している。体内におけるアルミニウムの再移動はアルミニウム溶液に一定期間処理してからアルミニウムのない溶液に移し、異なる葉のアルミニウムの集積量を測定することによって検討した。その結果、新しく展開した葉でのアルミニウム濃度は極めて低く、また古い葉のアルミニウム集積量は減少しなかった。これらの結果はアルミニウムが一旦集積すると、古い葉から新しい葉への再移動がないことを示している。アルミニウム処理した葉のプロプラストと液胞を単離し、アルミニウムの細胞内の局在性を調べたところ、すべてのアルミニウムは液胞に局在していた。アルミニウムは細胞内にシュウ酸と1:3の錯体の形態で存在していることがすでに明らかにされているので、この錯体の液胞内への局在は高濃度のアルミニウムを集積する上で重要であると考えられる。

F449

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の重金属結合タンパク質 SmtA の溶液構造解析

森田勇人、溝尾昌也、小佐田高史¹、山崎俊夫¹、京極好正²、林秀則¹ (愛媛大院・理工・物質理、¹阪大・蛋白研、²福井工業大・工)

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の SmtA は細胞内の重金属イオン濃度の上昇に伴い、その発現が誘導されるメタロチオネン様タンパク質である。しかし、SmtA は真核生物のメタロチオネンとのアミノ酸の相同性が低いことから、SmtA における重金属結合様式は真核生物のメタロチオネンとは異なると推測される。本研究では、安定同位体標識法を併用した多次元 NMR 分光法による SmtA の溶液構造決定を行い、SmtA の重金属結合様式を解明することを目的とした。

大腸菌による大量発現系を用いて、¹⁵N 又は ¹³C 及び ¹⁵N で安定同位体標識し、SmtA 標品を作製した。Zn²⁺ と結合した SmtA の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定し、さらに、多次元 NMR スペクトルから得られた各プロトン間の距離情報をもとに、シュミレーテッドアニーリング法により、SmtA の溶液構造決定を行った。この構造から、SmtA 中には重金属と結合する領域が 2 ケ所に分かれて存在すること、各領域間はフレキシブルなリンカーによりつながり、一方には重金属イオンが 2 個結合し、他方には 1 個結合することを明らかにした。立体構造が知られているメタロチオネンの場合も、重金属と結合する領域が 2 ケ所に分かれて存在し、各領域はそれぞれ独立して存在するが、SmtA の構造的特徴とは異なっており、SmtA は真核生物のメタロチオネンの機能領域の原形であると考えられる。

F450

シロイヌナズナ重金属応答遺伝子の単離と解析

鈴木伸昭、小泉望、草野友延、佐野浩 (奈良先端大・遺伝子教育研究センター)

植物による重金属汚染土壌の浄化 (phytoremediation) を最終目標に、重金属の植物に与える影響を分子レベルで調べた。植物種としてシロイヌナズナを、重金属元素としてカドミウム (Cd) を用い、500 μM、2 時間のカドミウムストレスにより特異的に蓄積される約 150 の mRNA 由来の PCR 断片を蛍光ディファレンシャルディスプレイ法により決定した。さらにノーザン解析と BLAST による同源性検索の結果、Cd ストレスにより蓄積量が増加する約 30 の遺伝子を確認できた。

HSP を含むシャペロンと思われる 4 種の遺伝子、グルタチオン S トラंसフェラーゼ、モノオキシゲナーゼのようなストレス応答遺伝子、硫黄代謝に関わるアデノシンホスホ硫酸還元酵素遺伝子などがあつた。また、機能未知のものを含めて 4 種の転写因子と 3 種のリン酸化酵素、さらにカルモジュリンと推定されるタンパクをコードする遺伝子も含まれており、シグナル伝達に関わると考えられる多数の因子の存在が確認できた。しかし、約半数は機能未知の遺伝子であつた。

単離した遺伝子のうち 13 は H₂O₂ ストレスにも応答し、これらの遺伝子は Cd によって生じた酸化的ストレスに関与している可能性が考えられた。転写因子やリン酸化酵素の一部は、Cd に加えてスタウロスポリンの添加により mRNA の蓄積量が減少した。このことは Cd ストレスによるシグナルの伝達にリン酸化の経路が関与していることを示唆する。銀 (Ag)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn) イオンに対するこれらの遺伝子の応答を調べたところ、それぞれについて mRNA 蓄積量はかなり異なり、植物への影響は金属種によってかなり違うことが推察された。植物に与える Cd の影響として、タンパク質のフォールディング阻害や酸化的ストレスなどが挙げられる。今回の実験で示された HSPmRNA 蓄積量の増加や、いくつかの遺伝子の H₂O₂ ストレスへの応答はこの仮説を支持する。

今後、さらに詳細な研究を行うとともに、機能未知の遺伝子の解析を進めることで重金属に対する植物の生理機構を理解し、実用的な環境浄化植物の創出につなげたいと考えている。

F451

コムギ Phosphoethanolamine Cytidyltransferase (ET) の cDNA クローニングと低温馴化過程における発現誘導

佐貫展也^{1,2}、榎剛²、今井亮三¹ (¹農水省・北海道農試、²北海道東海大・工)

低温馴化過程で観察される主要生理応答の一つに膜脂質の低温適応がある。これまでに脂肪酸の不飽和化による膜流動性維持機構に関しては分子レベルで詳細に解析されているが、リン脂質レベルの変動については不明点が多い。

我々は cDNA マクロアレイ解析により、コムギ低温馴化組織に蓄積し ET をコードする cDNA *WECT1* の生合成における鍵酵素であり、phosphoethanolamine 及び CTP から CDP-ethanolamine を生成する。WECT1 遺伝子は 1266bp よりなる ORF により、46.7kD のタンパク質をコードしており、推定 WECT1 タンパク質は、ヒトの hET 及び出芽酵母の ECT1 とそれぞれ 43% と 34% の相同性を示した。ET に共通な保存配列の繰り返し構造は WECT1 にも見いだされたが、N 末端の 40 アミノ酸よりなる疎水領域は、動物及び酵母の ET にはみられないユニークな構造であった。WECT1 の発現は 4℃、2 週間の低温馴化誘導期間中 1 日目より顕著に誘導され 3 日目にピークとなり以後 14 日目まで高いレベルで維持された。

現在、低温馴化中の PtdEtn 量の変動について測定を行っており、その結果についても報告する。

F452

新規抗菌タンパク質 δ-ピューロチオン遺伝子は低温馴化過程で誘導される

岡本貴史、今井亮三 (農水省・北海道農業試験場)

植物の越冬には耐凍性と並んで耐病性の獲得も重要である。コムギにおいては積雪下 0℃ 環境で起こる雪腐菌の感染は大きな被害となっている。チオニンは分子量 5kD の 6-8 個の Cys 残基をもつ抗菌タンパク質である。発見の端緒となったコムギでは α1, α2, β, γ および typeV が知られている。我々は低温馴化コムギ冠部における低温誘導遺伝子をマクロアレイ法により解析し、Petunia の γ-thionin と高い相同性を示すクローンを見いだした。塩基配列から予想されるアミノ酸配列からコムギの γ-purothionin とは異なる新しいタイプのチオニン(δ-purothionin)である事が示された。構造上の特徴として N 末端にはシグナル配列をもつこと、α, β 型分子とは異なり C 末端の酸性ドメインは存在しないこと、また全体で 8 個存在するシステイン残基は非常によく保存されていることがあげられる。低温誘導したコムギのノーザン解析では、処理後 24 時間で強い発現誘導が見られた。また一方でジャスモン酸、サリチル酸処理では発現誘導されず、多くのチオニンで知られている感染応答による発現制御は受けないと考えられた。低温下での耐病性獲得は感染応答とは異なる機構で起こることが示唆された。

F453

シロイヌナズナの葉位により変化する凍結耐性能と低温馴化能について

高木太郎¹, 中村正展^{1,2}, 林浩昭³, 西田生郎¹ (東大・院理・生科,²生研機構,³東大・院農・応生化)

シロイヌナズナのロゼット葉は、低温馴化し、その凍結耐性を高める。ロゼット葉の中心部が凍結により強いと観察されたが、凍結という厳しい環境条件下で生長点を含む若い組織を優先的に保護することは合目的的である。我々は、葉位毎にロゼット葉を分離して行った電解質漏出を指標とした凍結耐性の測定で、葉位が高い(=若い)葉ほど凍結耐性および低温馴化能が大きいことを見いだした。さらにプロリン含量・浸透圧を測定した。これらは個体の凍結耐性の高まりと共に上昇することが知られているが、今回、葉位が高い程その上昇幅が大きいことを明らかにした。しかし、凍結耐性と、これら測定値とは直接的に相関が無く、その他の要素も考慮する必要がある。低温誘導性遺伝子の転写産物など、低温に応答して変化することが知られるいくつかの要素についても葉位をわけて解析し、報告する予定である。

F454

低温誘導性遺伝子 *rbpA1* の調節に *cis* に働く配列の解析

得平茂樹^{1,2}, 大森正之², 佐藤直樹¹ (埼玉大・理・分子生物,²東大・院・総合文化)

ラン藻 *Anabaena variabilis* M3株では、培養温度の低下にともない7個のRNA結合タンパク質をコードする遺伝子 (*rbp* 遺伝子) の発現が誘導される。その内のひとつである *rbpA1* は、低温での発現誘導が特に顕著であり、その転写産物には158塩基の5'非翻訳領域が存在する。この5'非翻訳領域の配列は、その他の低温誘導性の *rbp* 遺伝子でも保存されている。特にRBS (5'-TTYGGAGA-3'), BOX I (5'-TCTCCGAA-3'), BOX II (5'-TTGTTTTNAGT-3') および BOX III (5'-TTCGGYGA-3') と名付けた4ヶ所の配列の保存性が非常に高い。これら4個の保存配列にそれぞれ変異を導入し、その低温における発現誘導への影響を *lacZ* 融合遺伝子を用いて解析した。その結果、RBS領域を変異させると低温における転写産物の蓄積が見られなくなった。転写産物の安定性を調べると、5'非翻訳領域をもつ転写産物は、低温において非常に安定であった。一方、RBS領域に変異を入れた5'非翻訳領域をもつものでは、非常に不安定となっていることが明らかとなった。RBS領域による転写産物の安定化が、*rbpA1* の低温での蓄積に重要な役割を果たすことが示唆された。

F455

アブシジン酸処理によるヒメツリガネゴケの耐凍性上昇と遺伝子発現

長尾学, 南杏鶴, 竹澤大輔, 荒川圭太, 藤川清三¹ (北大・低温研,¹北大院・農)

本研究では、遺伝子破壊により特定の遺伝子の生理機能を解析できるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用い、耐凍性の誘導など植物の寒冷環境への適応機構を調べることにした。ヒメツリガネゴケの原糸体を植物の耐凍性誘導と関連性のあるアブシジン酸 (ABA) および低温で処理した後、耐凍性 (LT₅₀) を電解質漏出法により測定した。未処理の原糸体ではLT₅₀は-1.8°Cであったのに対し、10 μM の ABA で1日間処理すると-8.0°C、4日間処理すると-10.0°Cにまで上昇した。一方、同日数2.0°Cで原糸体を低温処理した場合、耐凍性はほとんど上昇しなかった。さらに ABA と低温処理による遺伝子発現の変化を解析すると、コムギの低温誘導性遺伝子 *WCOR 413* と相同性のある遺伝子の発現が ABA 処理により短時間で増加した。それに対し、低温処理を数日間行ってもこの遺伝子の発現はわずかな増加にとどまった。これらの結果から、ヒメツリガネゴケの耐凍性上昇と ABA 誘導性遺伝子の発現との関わりが示唆された。

F456

ジャガイモ塊茎の低温貯蔵における糖変動機構

遠藤千絵, 小林晃, 森元幸 (農水省・北海道農試)

ジャガイモ塊茎は低温貯蔵すると一般に還元糖が増加するが、増加程度には品種間差がある。本研究では、強い難糖化性を有する系統や、還元糖ではなくスクロースを特異的に集積する品種等、6品種を用いて、貯蔵中 (20°C/4°C, 湿度90%, 暗所) の糖変動メカニズムを解析している。これまでに20°C貯蔵はいずれの品種もグルコース, フラクトース, スクロース量とも低く推移するが、4°C貯蔵では、糖変動は①還元糖増加型, ②糖量低推移型, ③スクロース増加型の3タイプに分かれること、この時の還元糖の増加には酸性イハルターゼの活性の有無が関与することを明らかにしてきた (植物生理学会, 2000)。

今回、酸性イハルターゼ活性の調節機構を明らかにするために、RT-PCR法により貯蔵中の塊茎における本酵素の遺伝子発現について解析した。その結果、①の還元糖増加型品種では4°C貯蔵で本酵素の遺伝子発現が誘導されるのに対し、②③型の品種では低温での特異的な誘導は認められなかった。貯蔵過程で塊茎を4°Cから20°C, あるいは20°Cから4°Cに移行させた場合について検討中であり、糖変動の制御メカニズムについて考察する。

F457

ラン藻 *Anabaena variabilis* M3のRNA結合タンパク質 RbpA1の溶液構造解析

村上智英、森田勇人、山崎俊夫¹、佐藤直樹²、京極好正^{1,3}、林秀則（愛媛大院・理工・物質理、阪大・蛋白研¹、埼玉大・理・分子生物²、福井工業大・工^{1,3}）

ラン藻 *Anabaena variabilis* M3のRNA結合タンパク質 RbpA1は低温環境下で誘導され、mRNA上の部分的相補領域が低温ストレスによって形成した二本鎖を解きほぐし一本鎖のランダムコイル状に戻すことでmRNAのタンパク質への翻訳効率の低下を防いでいると考えられる。また、RbpA1は他の原核生物から高等植物などの真核生物まで普遍的に見られる構造単位であるRNA recognition motif(RRM) 1つとglycine-rich domain (GD) 1つから構成されることからRbpA1は進化的に最も基本的なタンパク質であると考えられる。本研究では、ラン藻から真核生物まで普遍的に存在する低温環境応答機構を解明することを目的とし、安定同位体標識法を併用した多次元NMR分光法を用いたRbpA1の溶液構造解析を行い、RbpA1によるmRNAの構造転移誘導の分子機構を解析した。¹⁵Nのみあるいは¹⁵Nおよび¹³Cで安定同位体標識したRbpA1を用いた多次元NMRスペクトルの測定により得られた各プロトン間の距離情報をもとに、シュミレーテッドアニーリング法によりRbpA1の溶液構造決定を行った。その結果、RRMは二本の α ヘリックスと一枚の β シートから構成されるが、GDはRbpA1が溶液中で単独に存在する条件下では明確な構造をとらないことが分かった。現在、RbpA1およびGDを取り除いたRbpA1と二本鎖形成したモデルRNAとの反応性を比較することで、二つの機能領域、特にGDが二本鎖を形成したRNAの認識や解きほぐしの過程で果たす役割の同定を試みている。

F458

コムギフルクタン合成遺伝子の糖誘導発現及びそのプロモーターの糖シグナル応答

吉田みどり、Lin Dingbo、川上顕（農水省、北海道農試）

フルクタンはスクロースにフルクトースが重合したオリゴ糖及び多糖で、ストレスに曝された植物内で重要な機能をはたしていると考えられている。コムギではハードニング中のフルクタンの蓄積量がその耐凍性と雪腐病抵抗性に強く関わっている。我々は、コムギからフルクタン合成に関わる2つの遺伝子、1-SST (sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase) と6-SFT (sucrose: fructan 6-fructosyltransferase) を単離し、その発現とコムギのハードニング中のフルクタン蓄積との間に高い相関があることを明らかにした(植物生理学会, 2000)。この2つの遺伝子の5'上流域を単離したところ、種々のシグナル応答シスエレメントが存在する可能性が示された。そこで、レポーター遺伝子としてsGFP(S65T)を用い、コムギ葉における一過発現によりプロモーター解析を行った。1-SSTと6-SFTのプロモーターともGFPの発現は光によって顕著に誘導されたが、低温では発現が抑制された。フルクタン蓄積については糖誘導性が示唆されているため、1-SSTのプロモーターについて糖応答を調べた結果、グルコース、フルクトース、スクロースによってGFPの発現が増加した。糖処理葉での1-SST遺伝子発現も同様の結果を得た。さらに1-SSTプロモーター内の糖応答領域を調べた結果、TATA-boxから250bp内に、ヘキソースに強く応答する領域とその応答を制御する領域の存在が示唆された。

F459

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 の高温感受性変異株において特異的に減少するタンパク質の解析
木村愛子、森田勇人、林秀則（愛媛大院・理工・環境科学）

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 から insertional mutagenesis 法によって高温感受性変異株 (SHT1株) を単離したところ、この変異株では内在性プラスミド pAQ1 の *orf93* に変異が起きていた。このプラスミドにおける変異と高温耐性の変化の関連を明らかにする目的でタンパク質組成の変動について解析した。

SHT1株と野生株のタンパク質を二次元ゲル電気泳動を用いて解析し、両者で含有量の大きく異なるタンパク質の1つについてクローニングを行った。このタンパク質は192アミノ酸残基からなり *orf93* の直接の産物ではなかったが、ホモロジー検索によって *Synechocystis* sp. PCC 6803 の hypothetical protein である Slr 0006 と約40%の相同性が確認された。また相同性が見られたタンパク質の多くが好熱性細菌由来のものであったことから、このタンパク質は高温に対して安定である、あるいは高温耐性に関与している可能性がある。

現在このタンパク質をコードしている遺伝子を欠損させた変異株を作製し、このタンパク質と高温耐性の関与についての解析を進めている。

F460

好冷性微生物からの熱ショックタンパク質遺伝子のクローニングおよびその発現機構の解析

山内清司、奥山英登志¹、森田勇人、林秀則（愛媛大院・理工・物質理、¹北大・地球環境）

好冷性生物は、一般の生物と異なり低温環境で生育する（最適生育温度0~20℃）。このような生物の一つである好冷性細菌 *Colwellia maris* sp. nov. は5~15℃で生育するため、比較的低温の25℃程度で熱ショックタンパク質を発現することが予測される。このような常温で発現する熱ショックタンパク質の機能や発現機構の違いを明らかにする目的で、*Colwellia maris* sp. nov. から熱ショックタンパク質の一つである *groEL* 遺伝子を単離し、その塩基配列の解析および発現機構の解析を行った。

Colwellia maris sp. nov. の高温耐性を解析すると、30℃1時間の処理で生育の割合が激減した。また、穏やかな熱ショックを与えることにより、さらなる高温に対する耐性の獲得が見られた。このため好冷性生物でも熱ショックタンパク質が機能していることが推測される。*Colwellia maris* sp. nov. の *groEL* 遺伝子をクローニングしたところ、推定されるアミノ酸配列の80%が大腸菌のものと同じであった。また、*groES* とオペロンを構成しており、その上流には大腸菌に見られるような熱ショックプロモーターが確認された。一方、非翻訳領域に相当すると推測される部分のA,T含量は非常に高かった。このため、*rpoH* 遺伝子機能の温度依存性および非翻訳領域の塩基配列が好冷性細菌における特異的な発現に関係していると推測される。

現在、*groE* オペロンのノーザン分析および *rpoH* 遺伝子のクローニングを行っている。

F461

cDNA マイクロアレイシステムを用いたイネの *spl* 突然変異株の遺伝子発現解析

小田峰裕¹, 楠見健介¹, 山本公子², 坂田克巳³, 佐々木卓治³, 藤井文子², 大塚好美², 真保佳納子², 矢崎潤史², 岸本直己³, 菊池尚志³, 射場厚¹, (1九州大・院・理・生物科学, 2農林水産先端技術研究所, 3農水省・農業生物資源研究所)

イネの突然変異株 *spl* (*spotted leaf*) は、屋外で生育したとき、ネクロシスを起こした葉細胞からなる茶色もしくは白色の斑点を葉に生じる。これまで遺伝子座の異なる 11 系統の *spl* 変異株 (*spl1*~*spl11*) が単離されており、いずれも特定の生育環境下で擬似病斑を葉に形成する。本研究では、最近遺伝子の発現パターンの大量解析のためのツールとして使われている cDNA マイクロアレイシステムを利用し、*spl* 突然変異株における遺伝子発現パターンの比較から、共通して抑制もしくは過剰発現している遺伝子群を探索することを目的として、野生株と 20°C または 30°C で生育した幾つかの *spl* 変異株を解析した。その結果を報告する。

F462

乾燥・低温・塩ストレス下におけるシロイヌナズナ完全長 cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

鳴坂真理¹, 関原明¹, 楠城時彦², 藤田美紀¹, 石田順子¹, 神谷麻子¹, 佐藤将一¹, 櫻井哲也¹, Piero Carninci³, 林崎良英³, 篠崎一雄¹

(1理研・ゲノム科学セ・植物ゲノム, 2コンボン研, 3理研・ゲノム科学セ・遺伝子構造)

2000年にシロイヌナズナの全ゲノム配列が決定されたが、今後、遺伝子やタンパク質の機能解析を進めるには完全長 cDNA を用いることが有効であると考えられる。

我々は乾燥や低温ストレスにより誘導される遺伝子の機能や発現について研究を進めている。そこで、乾燥および低温処理をしたシロイヌナズナ植物体などを出発材料に用い、ピオチン化 cap trapper 法により完全長 cDNA ライブラリーを作製した^{1), 2)}。これらより cDNA クローンを単離し、これまでに約 40000 クローンの 3' 側塩基配列を決定し、クラスタリングを行った結果、それらは約 14000 個の独立した cDNA グループに分類された。これまでに約 1300 個の cDNA クローンを含む完全長 cDNA マイクロアレイを用いて乾燥、低温ストレス誘導性や転写因子 DREB1A の target 遺伝子の同定を目指して研究を進めてきた³⁾。今回新たに約 7500 個の独立した完全長 cDNA を含む cDNA マイクロアレイを作製した。現在、作製した完全長 cDNA マイクロアレイを用いて乾燥、低温および塩ストレス応答遺伝子の研究を進めている。今回の発表では 7500 個の完全長 cDNA クローンを含むマイクロアレイを用いた解析によりこれまでに得られた結果について報告する。

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

2) Seki et al. (2001) Plant Physiol. Biochem. (in press)

3) Seki et al. Plant Cell (revision)

F463

凍結制御に関わる植物由来の氷核活性物質

岸本 正、石川 雅也
(生研機構、農水省・生物研)

耐凍性を示す温帯性木本植物は凍結温度下で組織特有の凍り方をする。木部放射性柔細胞や花芽の小花は多くは組織を凍らせない(過冷却する)。一方、花芽鱗片や皮層組織は -5°C 程度で積極的に凍り、器官外凍結や細胞外凍結を行う。後者の木本組織には積極的な凍結を導く水の核となる物質(氷核活性物質)が関与すると考えられるが、その実体の詳細はあまりよく分かっていない。そこで、氷核活性物質の同定を目的に調査した。様々な植物の枝・葉・実・花芽について氷核活性を測定したところ、枝に高い活性が示された。枝の髄や木部には活性が認められず、韌皮組織を含む樹皮に強い活性が存在していた。一方、枝から誘導した培養細胞は活性を示さなかった。細胞分画法では細胞壁画分にのみ、強い活性が認められ、セルラーゼとペクチナーゼ処理により遊離してきた物質に部分的な活性が見られた。現在、細胞壁画分から氷核活性物質の可溶化について成功し、様々な特性についての調査を進めている。

F464

ウンシュウミカンの低温応答性デハイドリンの凍結保護効果
原 正和、寺島彰吾、久保井徹 (静岡大・農)

われわれは、ウンシュウミカンのデハイドリン (CuCOR19) の cDNA クローニングと低温ストレスによる mRNA 量の増加を報告した。ここでは、CuCOR19 タンパク質の水ストレス応答、性質、機能について報告する。ウンシュウミカンの若葉を採取し、低温 (4°C)、ABA (0.1~10 μM)、NaCl (50~200 mM)、乾燥の各処理を施した。ノザンおよびウエスタン解析で CuCOR19 の mRNA とタンパクを検出したところ、低温処理によってのみ両者の蓄積が見られた。pET ベクターによる大腸菌発現系で得た CuCOR19 タンパクについて円二色性分析を行ったところ、CuCOR19 の構造は、10 mM SDS を加えることにより、ランダムコイルから α-ヘリックスへ変化することがわかった。これは、CuCOR19 が、デハイドリンに一般的に見られる両親媒性ヘリックスを持つことを示している。CuCOR19 は、カタラーゼと乳酸脱水素酵素の凍結失活を保護し、その効果は適合溶質や BSA よりも高かった。CuCOR19 に多いランダムコイルは、水の結合やタンパク質の構造保持をもたらさるので、CuCOR19 は、低温ストレスからの植物細胞の保護作用をもつと思われる。

F465

ミトコンドリア型 sHSP を過剰発現させた形質転換タバコの解析

Ishwar SINGH^{1,2}、 Jian LIU³、 三宮一幸^{1,4}、 庄野真理子¹ (¹ 農水省・国際農研・沖縄、 ² Indian Inst. Sugarcane Res.、 ³ 山東師範大・中国、 ⁴ 生研機構)

トマトからクローニングしたミトコンドリア型 sHSP 遺伝子を CaMV35S プロモーター制御により過剰発現させた形質転換タバコを用いて、その機能の解析を行った。

sHSP 形質転換タバコは花粉においても sHSP を多量に発現しており、その花粉はコントロールと比較して高温耐性を持つことが明らかとなった。平常温度区 (28℃)、高温処理区 (37℃) 共に形質転換体は、コントロールと比較して常に高い呼吸量、光合成量、蒸散量を示した。一方、平常温度区での呼吸量に対する高温処理区での呼吸量を比率で示すと sHSP 形質転換体はコントロールと比較して低い値を示した。sHSP 形質転換タバコは個体レベルにおいてもコントロールと比較して高い高温耐性を示した。

本研究の一部は、生研機構基礎推進事業の支援で行われた。

F466

タバコ *ERF3* 遺伝子のシクロヘキシミドによる発現誘導の制御機構の解析

西内 巧, 進士秀明, 鈴木 肇
(工技院・生命研・植物分子生物)

タバコ *ERF* は防御遺伝子の転写制御に関与する転写因子である。*ERF* 遺伝子は傷やエリシターだけでなくタンパク質合成阻害剤として知られているシクロヘキシミド (cycloheximide, CHX) 処理によって、迅速で顕著な発現応答を示す。しかし他のタンパク質合成阻害剤アニソマイシン (anisomycin) 及びピューロマイシン (puromycin) 処理には、このような顕著な応答は示さない。傷やエリシターで活性化する初期応答遺伝子の多くが、CHX 応答性を示すことが知られており、CHX による遺伝子発現活性化機構を解析することは大変興味深い。*ERF* 遺伝子のプロモーター領域と *GUS* の融合遺伝子をタバコに導入して解析を行った結果、CHX 処理によって、*ERF* 遺伝子の転写活性化が起こることが示唆された。最も顕著な応答性を示す *ERF3* 遺伝子の CHX 応答性転写制御についてさらに解析を行った。*ERF3* 遺伝子のプロモーター領域の deletion 解析の結果、翻訳開始点から-163bp までの領域に CHX 応答性エレメントが含まれていることを明らかにした。さらにこの領域中の特定の配列と特異的に結合する核タンパク質が存在し、CHX 処理によってその結合活性が顕著に増加することを明らかにした。

F467

インゲンマメさや貯蔵タンパク質遺伝子の傷害応答性発現の解析
岡部利彦、岡本龍史、南川隆雄、山内大輔 (都立大院・理・生物)

インゲンマメさや貯蔵タンパク質 (PSP) はさやに加え若い茎・葉などの栄養器官においても蓄積され、葉では傷害ストレスに応答して合成されることが現在までに示されている。今回、我々は、葉における PSP の傷害応答性発現について解析を行った。

葉に傷害処理を与えると、48時間後に約3倍までに PSP の蓄積量が増加し、PSP mRNA 量もそれに対応して増加した。また同一植物体の傷害葉以外でも PSP 遺伝子の発現が誘導され、植物体全身の応答であることが示唆された。傷害応答への関与が報告されている植物ホルモン等を葉に添加すると、PSP の蓄積量はメチルジャスモン酸 (MeJA) によって増加したが、サリチル酸 (SA) と ACC は傷害や MeJA による PSP の増加を抑制した。これらのことから傷害による PSP 遺伝子発現のシグナル伝達系にはジャスモン酸合成経路が介在し、その下流を SA やエチレンが抑制することが推定された。さらに、PSP 遺伝子を単離し、その 5'-上流領域の塩基配列を決定したところ、エリシター応答配列 TTGACTが見出され、この配列が傷害応答に関与すると推定された。

F468

活性酸素消去系酵素とイオウ代謝系酵素形質転換植物の亜硫酸耐性

佐々木良造、芦口篤広、石田純規、大島健太、山内靖雄、田中浄 (鳥取大・農・植物機能学)

植物の二酸化硫黄障害は亜硫酸イオンそのものと二次的に生成する活性酸素による障害がある。植物の SOX 耐性を高めるためには活性酸素消去系を強化することが有効であることは既に報告してきた。より以上に SOX 耐性を高めるには、活性酸素消去系をさらに高発現させることと同時に、植物のイオウ代謝系を高める、毒性化学種亜硫酸を無毒な硫酸に変える亜硫酸酸化酵素を強化することが重要であると思われる。本研究ではグルタチオン還元酵素 (*Arabidopsis*)、アスコルビン酸サンベルオキシダーゼ (*Arabidopsis*)、スーパーオキシドジスムターゼ (イネ)、ATP-sulfurylase (*Arabidopsis*)、亜硫酸酸化酵素 (ラット肝臓) の cDNA を植物高発現プラスミドベクター (農水生物資源研の大橋、光原両博士より分譲していただいた) を利用し、*Arabidopsis* の葉緑体型グルタチオン還元酵素の葉緑体シグナルペプチド遺伝子を連結することにより、葉緑体で高発現させた。これらの形質転換タバコの亜硫酸耐性について検討した結果を報告する。

F469

オオシャジクモにおける傷害電位の解析

新免輝男 (姫路工大・理・生命)

植物体の一部が傷害を受けると、その植物は全身的な応答を示す。傷害に関する情報の受容は、まず、死んだ細胞に隣接した細胞において行われると考えられる。細胞が大きく、組織が単純であるというシャジクモ類の特徴を利用することにより、この最初の受容過程を記録することが可能になった。オオシャジクモを用いて、二つの節間細胞がつながった試料を作製した。一方の細胞を切断すると、生き残ったもう一方の細胞で10分以上も続くゆっくりとした脱分極と活動電位が発生することを明らかにし、日本植物学会第63回大会(秋田)において報告した。今回は、同じ実験系を用いて、さらに解析を進めた。その結果、ゆっくりとした脱分極や活動電位の前に非常に速い脱分極応答があることを明らかにした。また、これらの電位応答の発生メカニズムについての解析を行った。

F470

シロイヌナズナの UV-B 照射による葉の損傷に対する培地に添加したショ糖の効果

藤部貴宏、竹内裕一¹、山本興太郎 (北海道大・地球環境・生態環境、¹北海道東海大・工・生物工)

植物の UV-B 吸収色素量の増加がその遮蔽作用によって UV-B 損傷を軽減する効果があるかどうか調べるために、UV-B 吸収色素合成促進効果を持つショ糖を添加した培地で栽培したシロイヌナズナの UV-B 照射による損傷を、葉より溶出してくる電解質を定量することによって評価した。培地に 2%ショ糖を添加して栽培したシロイヌナズナの葉(葉柄を含む)を切り取り、24 時間 UV-B と可視光を同時照射した場合、葉からの電解質の溶出は 0.5%ショ糖添加培地の場合より少なかった。培地へのショ糖の添加によって葉の UV-B 域に吸収を持つ色素の量は増加した。また、UV-B により誘起される DNA 損傷である cyclobutane-pyrimidine dimer (CPD)含有量は、2%のショ糖を添加して生育した植物の方が少なかった。さらに、UV-B 照射によって発生する活性酸素を除去する酵素のひとつであるペルオキシダーゼの活性もショ糖の添加に伴って増加した。培地へのショ糖の添加が UV-B 照射による損傷を軽減する効果は、CPD 含有量の低下が示唆する UV-B 吸収色素による UV-B 遮蔽効果と、活性酸素除去酵素系の活性増加という二つの作用の結果であると考えられる。

F471

クロロイソニコチン酸誘導体による全身獲得抵抗性誘導に関する研究

安田美智子,新田貴子,仲下英雄,鈴木義勝,山口勇(理研)

病害に対する植物の全身獲得抵抗性 (SAR) の誘導機構は、サリチル酸の生合成を介していることが明らかになっている。この経路を活性化する低分子化合物 benzoisothiadiazole (BTH)、probenazole(PBZ)は、それぞれサリチル酸の下流および上流に作用し、SAR 研究の有効な分子プローブとなっている。N-cyanomethyl-2-chloroisonicotinamide (NCI)はイネにイもち病抵抗性を付与する化合物であり、その作用の詳細は明らかでなかった。タバコおよびアラビドプシスを用いて、NCI の作用機構に関する研究を行ったので報告する。

NCI はタバコにおいてタバコモザイクウイルスに対する抵抗性を誘導し、双子葉植物に対しても効果があることが示された。また、NCI はアラビドプシスにおいて SAR のマーカー遺伝子である PR-1 遺伝子の発現を誘導した。この誘導はサリチル酸分解酵素を導入したアラビドプシスでは認められなかったことから、NCI はサリチル酸生合成を介して SAR を誘導していることが明らかとなり、PBZ と類似の作用機構であることが示唆された。

F472

Potential Symbiotic and Protective Activities of Compounds from the Water Fern *Azolla*

Michael E. COHEN, Yojiro TAKAGI, Mami KAINUMA, Hideo YAMASAKI; Fac. Sci., Univ. the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0213

Species of the water fern *Azolla* retain symbiotic cyanobacteria that provide fixed nitrogen to the plant. Here we report on two components that may be involved in maintaining the symbiosis. *Nostoc punctiforme*, a model symbiotically competent cyanobacterium, upregulates expression of a symbiotic-related *hrmA* gene in response to naringin, a flavonoid found in many plant species including some ferns [1,2]. We have characterized a component in extract of *Azolla imbricata* that shows significantly higher *hrmA-luxAB* inducing activity than naringin. A red flavonoid pigment common in *Azolla* species does not induce *hrmA* but was found to have potent antimicrobial activity, especially against cyanobacteria, gram-positive bacteria and fungi. We hypothesize that these components may act in concert to limit the cyanobacterium to the leaf cavity.

[1] Cohen, MF & Yamasaki, H (2000) J. Bacteriol 182: 4644-4646.

[2] Cohen, MF et. al. (2000) In Recent Res. Developments Plant Physiol., Research Signpost, *in press*.

F473

GENETIC TRANSFORMATION OF ORIENTAL CYMBIDIUM BY A MODIFIED AGROBACTERIUM INFECTION METHOD

Hye-Joung KIM, Sang-Hyun SHIN, Young-Soo CHUNG, Jong-Suk LEE¹; Dept. Bioresources, Dong-A Uni., Pusan 604-714, Korea, ¹Dept. Hort., Seoul Women's Univ., Seoul 139-744, Korea

Genetic transformation of Oriental *Cymbidiums* (*C. lancifolium* and *C. kanran*) was performed to create high value of variants. An expression vector (pAT6K) containing a transposable element was used for genetic transformation with a modified transformation method. In the method, rhizomes were precultured for 3 days or 7 days in MS liquid media. For efficient wounding, seasands were added into the precultured rhizomes in flask and wounding has been proceeded for 0, 2, or 4 days, respectively. GUS expression was analyzed to confirm appropriate genetic transformation. In the experiment to optimize preculture condition, 7 days preculture period showed higher frequency of transformation (42%) than 3 days preculture (22%). In the wounding analysis, 67%, 30%, and 17% of rhizomes were identified as GUS positives for 4 days, 2 days, and 0 day wounding treatment, respectively.

F474

イネいもち病菌エリシターで活性化される遺伝子の単離
澤田和敏¹、岩田道頭² (¹出光興産中央研、²明治製菓
菓総研、³植物防御システム研)

いもち病菌(*Magnaporthe grisea*)由来セレブロシドエリシターで活性化されるイネ(*Oryza sativa* cv. Akitakomachi)の遺伝子を mRNA ディファレンシャルディスプレイ法により単離した。

単離した cDNA クロノンのうち、クロノン No. B1x A2-700 はほ乳類で解毒機能に関係することが報告されているセレンウム結合タンパク(SBP)と高い相同性を示した。C4x A5-800 は細胞壁強化に関与するグリシンリッチタンパクと、B2x B1-650 は β 1, 3-グルカナーゼと相同性を示した。2つのクロノン (C4x A5-750 と B2x A5-700) は新規遺伝子の可能性が示唆された。また B1x A2-700、C4x A5-750 および B2x A5-700 遺伝子はイネいもち病菌の接種によっても発現が誘導され、とくに B1x A2-700 および C4x A5-750 遺伝子は非親和性菌 031 接種において親和性菌 007 に対してより、早く発現応答することが認められた。

F475

ミヤコグサのグロビン遺伝子群の共生微生物感染に対する発現応答

内海俊樹, 下田宜司¹, 鶴田智子¹, 向吉由美, 鈴木章弘, 阿部美紀子, 東 四郎 (鹿児島大・理・生命化学,¹鹿児島大院・理工)

植物のグロビンとしてマメ科植物の根粒内に大量に存在するレグヘモグロビンが知られているが、マメ科以外の植物にも広くグロビンの存在が明らかとなってきた。レグヘモグロビンのように微生物との共生に関与するグロビンを symbiotic globin, 広く植物に存在するグロビンを nonsymbiotic globin とよんでいる。根粒細胞内におけるグロビン遺伝子の特異的な大量発現機構、及び、植物における nonsymbiotic globin の機能については興味を持たれるところである。

ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)には、3種の symbiotic globin 遺伝子と1種の nonsymbiotic globin 遺伝子が存在する。symbiotic globin 遺伝子は、成熟個体では根粒細胞のみで特異的に発現していたが、根粒菌を接種していない幼植物でも発現していた。nonsymbiotic globin 遺伝子は、植物体全体で発現していたが、根粒では発現量が増加していた。しかし、菌根菌が感染した根では、発現が著しく抑制されていた。

F476

タバコ培養細胞 BY-2 キチナーゼ (TBC) の単離と解析

新屋友規、片木徹也、斉藤美佳子、松岡英明 (東京農工大・工・生命工学)

タバコ培養細胞 BY-2 キチナーゼに関する一連の研究を行っており、これまでに *Alternaria alternata* の培養上清を作用させた際に、細胞内外において、複数のキチナーゼ活性をもつ酵素が誘導されることを確認している。細胞内キチナーゼ (TBC-I1、2、3) においては作用後 3 時間で、細胞外 (TBC-S1) においては作用後 12 時間で活性が最大になった。それぞれの時点でキチナーゼを抽出し、TBC-I1~3 については、コロイダルキチンアフィニティー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換 HPLC を、TBC-S1 は塩析、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分離をおこなった。その結果、それぞれのキチナーゼの分子量と等電点は、TBC-I1~3 は 15~20kDa、pI=4.0 付近、TBC-S1 は 18~25kDa、pI=4.0~4.5 と推定された。現在アミノ酸配列の解析を行っており、併せて報告する。

F477

コムギ赤カビ病菌のトリコテセン、マイコトキシンが植物の生育及び形態形成に及ぼす影響について

西内巧、木村真、山口勇

(理研・植物セ・レメディエーション)

コムギが赤カビ病菌に感染すると、減収や品質劣化だけでなく、本菌が産生するトリコテセン等のマイコトキシンによって、人や家畜が中毒症状を起こすことから、世界的に大きな問題となっている。動物細胞では、トリコテセンが蛋白質合成の阻害やアポトーシスを誘導することが知られている。一方、植物では、トリコテセンが宿主非特異的毒素としてコムギへの感染過程で作用するが知られているが、その作用機構についてはあまり解明されていない。トリコテセンの植物細胞への影響について調べるために、T2 toxin, DON (deoxynivalenol), あるいは DAS (diacetoxyscirpenol)等のトリコテセンを含む培地上にコムギ及びシロイヌナズナを播種し、生育させたところ、いずれのトリコテセンも発芽には顕著な阻害効果は見られなかったが、1-10 μM のDONやDASは根の伸長を顕著に阻害し、また、シロイヌナズナの葉ではアントシアニンの蓄積が見られた。~1 μM のT2 toxinは、シロイヌナズナの葉の形態形成に異常を引き起こすことが分かった。一方、蛋白質合成阻害剤として広く知られているシクロヘキシミドは、発芽を顕著に阻害したが、トリコテセンで見られたような作用は確認できなかった。これらの結果は、トリコテセンが蛋白質合成阻害に加えて、低濃度で植物の生育や形態形成に影響を及ぼすことを示唆している。

F478

ジャガイモ塊茎におけるエリシター誘導性遺伝子群のサブトラクション法による探索

井戸邦彦、竹本大吾、吉岡博文、道家紀志、川北一人 (名大院・生命農学・資源生物機能)

植物が病原菌の侵入に対して動的抵抗反応を発動する際、種々の抵抗性関連遺伝子の発現を伴うと考えられる。今回、抵抗性関連遺伝子を単離するため、疫病菌菌体壁成分(HWC)エリシター未処理および処理後3、6時間のジャガイモ塊茎より全RNAを抽出し、Subtraction法を用いたクローニングを行った。120クローンの部分塩基配列を決定したところ、63クローンが既知遺伝子と相同性を示し、PR-タンパク質や、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、アミノシクロプロパンカルボン酸オキシダーゼの各遺伝子や傷処理誘導性遺伝子が含まれていた。HWCやアラキドン酸処理に反応したこれら遺伝子の発現の増加がノーザン解析により認められた。また、ジャガイモ疫病菌接種時の応答性を調べたところ、親和性菌と非親和性菌の接種により異なる発現パターンを示す遺伝子が4種存在した。

F479

ブラシノステロイドによる病害抵抗性誘導に関する研究

仲下英雄、新田貴子、浅見忠男、安田美智子、藤岡昭三、吉田茂男、山口勇 (理研)

ブラシノステロイドが植物の病害抵抗性に与える効果について検討した。タバコにブラシノライド(BL)を5日間処理した後タバコモザイクウイルスを接種したところ、N 遺伝子を介した抵抗性反応の結果生じる病斑のサイズが小さくなり、BL 処理が抵抗性を増強している可能性が示唆された。そこで、他の病原菌についても検討した結果、タバコ野火病(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)、うどん粉病(*Oidium lycopersici*)に対しても抵抗性を示した。さらに、単子葉植物であるイネについても検討したところ、BL はイネいもち病(*Magnaporthe grisea*)、白葉枯れ病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)に対しても抵抗性を誘導した。イネいもち病に対しては、BL 濃度が 0.001 mg/pot から抵抗性誘導が認められた。これらの結果から、BL が双子葉植物と単子葉植物の両方においてウイルス、細菌、糸状菌に対して抵抗性を誘導することが明らかとなり、ブラシノステロイドが高等植物の抵抗性誘導に関わる植物ホルモンであることが示された。

F480

根圏における芳香族化合物の分解に関与する植物酵素の研究

河口篤美、高橋美佐、森川弘道 (広島大院・理・数理分子生命理学)

自然界に放出されたダイオキシンや PCB など難分解性多環芳香族塩素化合物の生物分解については、脱塩素、水酸化、開環等に関与する微生物酵素が比較的研究されている。しかし、植物酵素については未だ研究が少ない。そこで、本研究は、植物細胞組織外に分泌され、芳香族化合物の分解に関与する植物酵素の研究を目的として行った。多環芳香族化合物色素(Remazol brilliant blue R)の分解を指標として、植物根圏のスクリーニングを行い、ギシギシ(*Rumex crispus* L.)が高い分解能を持つことをみつけた。さらに、ギシギシの培養液に過酸化水素を添加すると、色素分解の促進が観察された。この培養液を加熱した場合には色素分解活性が無くなった。これらの結果から、色素分解促進活性は植物の根から分泌された酵素(おそらくペルオキシダーゼ)によるものと推定された。現在、培養液中の色素を分解するタンパク質について解析を進めている。

F481

In vivo ESR 法による植物のストレス応答の実時間計測
多田美香¹、白石卓夫¹、大矢博昭^{1,2}、青山正明^{1,2}、尾形健明³
(¹ 科技団・地域結集型、² 生物ラジ研、³ 山大院・理工)

本研究では、植物のストレス(外部刺激)に対する応答機構の解明を目的として、*in vivo* 電子スピン共鳴(ESR)法による実時間計測を試みた。

計測には、表面コイル型共振器(SCR)を設置した低周波(700 MHz)ESR装置を開発し用いた。供試植物にはタバコを用いた。枝または葉にスピンプローブ剤(Glucosyl-TEMPO, GT)溶液を切り口から取込ませ、試料挿入空間(5 cm × 5 cm × 30 cm)に給水させた状態で保持した。SCRの検出部であるループ(検出空間: 14 mmΦ × 4 mm)を葉の測定対象部位に密着させた。葉中のGT信号を確認し、冷却、傷等の刺激によるESR信号強度(SI)の経時変化を追跡した。

GTは植物中で還元され、そのESR信号を消失するが、酸化されると再びESR信号として検出される。冷却刺激によってSIは急激に増加し、約4分で処理前の約3倍のレベルに達した。傷刺激では、SIは緩やかに増加し刺激後20分間で1.5~2倍に増加した。これらの結果は、刺激の違いによって葉内部の酸化還元バランスの移行パターンが異なることを示す。本計測法によって、その移行を実時間で観測することが可能となった。

F482

植物ESR計測用スピンプローブ剤
白石卓夫¹、伊東治²、青山正明^{1,2}、大矢博昭^{1,2}
(¹ 科技団 山形県地域結集型共同研究事業、² 生物ラジカル研究所)

我々は電子スピン共鳴(ESR)計測による植物のストレス応答検出を目的として、植物の計測に適したスピンプローブ剤を探索してきた。今回は、開発した植物用プロローブ剤の取り込み・ストレス応答様式を検討した。

一般的なスピン化合物TEMPO, PROXYLにglucoseを結合させたプロローブ剤 Glucosyl-TEMPO (GT), Glucosyl-PROXYL (GP)を合成した。植物試料としてトネズミ・イネを用い、取り込み量は葉の水抽出液のESR測定により求めた。葉中のプロローブ剤のESR信号は、開発済みの植物計測用セルを用いて生理的条件下で観察した。

GT, GPの葉への取り込み量は、トネズミの茎から取り込ませた場合、glucoseを結合していない4-hydroxy-TEMPO, 3-carbamoyl-PROXYLの5倍以上であった。イネに取り込まれたGTは、暗所で還元され、paraquat存在下での照射によって速やかに再酸化し、消光により同程度の速度で還元された。一方、葉中のGPのESR信号は、約5分の遅延時間を経た後に緩やかに増大し、消光後も減衰しなかった。GTは細胞内まで取り込まれ酸化還元を受け、GPは葉中に取り込まれた後も細胞間スペースに止まっていると推定される。

F483

樹木葉のα-トコフェロール・アスコルビン酸含量の季節変化
高見常明、中島貴道、小倉あゆみ、柴田勝(長岡高専・物質工学)

樹木のストレス感受性の違いを明らかにするために活性酸素を効率よく消去できる低分子抗酸化物質であるアスコルビン酸(AsA)、デヒドロアスコルビン酸(DAsA)、α-トコフェロール(α-Toc)に注目し、これらの季節的な葉内含量変化と共に樹種間差の測定を行った。常緑広葉樹・ゲツケイジュ(*Laurus nobilis*)、落葉樹広葉樹・キリ(*Paulownia tomentosa*)葉片のAsA+DAsA含量は、9~11月にかけて葉内含量が増加しており、特にキリでは同期間に4.8倍の濃度上昇を示した。ゲツケイジュのα-Toc濃度は7~11月に増加していたが、キリでは落葉月に急激な減少を示した。このような、秋口のAsA+DAsA量増加は、主にDAsA増加によるものであったことから、気温の低下と共に葉内で発生する活性酸素の消去にAsAが用いられた結果、DAsAが増加したと考えられる。AsA/DAsA比の低下と共に、葉内α-Toc含量が増加していたことから、葉緑体の膜内で発生した活性酸素消去にα-Tocが働いており、さらにα-Toc再生のためにAsAからDAsAへの反応が促進されていることが示唆された。これらの結果は、葉内抗酸化物質が樹木の枯死原因である活性酸素の消去に有効であり、各抗酸化物質との相互反応により効率的に働いているとことを示唆している。

F484

樹木の季節的なカロチン組成変化
小倉あゆみ、中村舞子、高見常明、柴田勝(長岡高専・物質工学)

樹木のストレス耐性能と活性酸素消去能力の高い低分子抗酸化物質との関係を明らかにするために、20種の樹木を対象として、21種の葉内代謝産物含量の季節変化を調べ、その中で特に顕著な季節変化を示したカロチン(Car)について報告を行なう。

新潟県長岡市に生育する樹木を対象として色素・抗酸化物質を1998年7月~2000年12月の30ヶ月間、測定を行なった結果、多くの樹種において草本植物の葉片にはほとんど見られないα-カロチン(α-Car)を樹木葉に見出した。クロロフィル(Chl)とカロチン(α, +β-Car)比が樹種に関係なく一定(Chl/Car=10/1;mol/mol)であり、樹木葉内で同様な色素組成比を持つ色素タンパク質の存在を示唆した。また、α-Car量が春~夏にかけて増加し、秋~冬に低下しており、β-Car量がα-Car量の低下と共に増加していた。これは、樹木、特に針葉樹ではCar組成を変化させることにより季節的な環境ストレスへの耐性機構を獲得していることを示している。常緑樹ではCarをはじめとした抗酸化物質の季節的な濃度変化は緩やかであることから、環境ストレスに対して葉内の環境を一定に保つ働きが強いと考えられる。

F485

ストロマのキノン結合性タンパク質

柴田勝, 長谷川健武, 小倉あゆみ, 高見常明(長岡高専・物質工学)

葉緑体のチラコイド膜に存在している主なキノンとして、PSI 反応中心のフィロキノンや光合成電子伝達体であるプラストキノン、低分子抗酸化物質のトコフェロールがある。これらのキノン種は、全て包膜で合成され、水溶性ストロマを通過し、チラコイド膜に移動するが、葉緑体におけるキノン種の膜間移動に関する研究はほとんど行なわれていなかった。このことから、キノン種の膜間輸送系について調べた結果、ストロマタンパク質(tocopherol transfer protein; TTP)によりトコフェロールの膜間移動が行なわれていることが明らかとなった。しかし、TTPの基質特異性やフィロキノン・プラストキノンの膜間移動を行なうタンパク質の有無やその差異などの基本的な性質については今なお明確ではない。多くのキャリアータンパク質が基質と特異的に結合するのを利用し、ストロマに存在するキノン結合性タンパク質(quinone binding protein in stroma; QBPS)の測定を行なうことにより、キャリアータンパク質の存在の可能性を調べた。そして、還元型フィロキノニンに特異的に結合する 110kDa のタンパク質(phyloquinol binding protein(s): PBP)を見出した。これらの結果をもとにPBPのキノン基質特異性およびプラストキノン、トコフェロールなどのキノン種と特異的に結合するタンパク質(quinone binding protein in stroma; QBPS)について報告する。

F486

EXPRESSION OF AN SUPEROXIDE DISMUTASE GENE IN TRANSGENIC CUCUMBER AND TOMATO

Eun-Jeong PARK¹, Haeng-Soon LEE, Suk-Yoon KWON, Kwan-Sam CHOI¹, Sang-Soo KWAK; Plant Cell Biotech. Lab., Korea Res. Inst. Biosci. & Biotech. (KRIBB), Oun-dong 52, Yusong, Taejon 305-333, Korea, ¹Dept. Agr. Biol., Chungnam Natl. Univ., Yusong, Taejon 305-764, Korea

Superoxide dismutase (SOD) plays an important role in cellular defense against oxidative stress in plants and may be very useful in the field of medicinal, food and cosmetic industries. In this report, to develop the fruits of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) producing high yields of SOD as a plant bioreactor, the cassava SOD cDNA (*mSOD1*) was introduced into cotyledone segments by *Agrobacterium*-mediated transformation. The kanamycin (KA)-resistant tomato shoots were selected on the selection medium containing MS basal salts, 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan and 100 mg/L KA. The cucumber explants were cultured on selection medium with 5 mg/L Basta. PCR and Southern analysis confirmed that the *mSOD1* gene was incorporated into the tomato and cucumber genomic DNA of regenerants. Further characterization of transgenic plants will be described.

F487

ルシフェラーゼレポーターを用いた遺伝子トラップ

山本義治, 津原優美, 合田和史, 鈴木久美子, 松井南
(理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター)

シロイヌナズナの全ゲノム配列の決定に伴い遺伝学的並びに逆遺伝学的研究が促進されている。研究の速度をさらに加速するためにはゲノム機能解析のためのリソースの整備が必須である。理化学研究所での植物ゲノムグループのプロジェクトの一環として私達はルシフェラーゼレポーターを用いた遺伝子トラップのベクターを構築した。このベクターをシロイヌナズナゲノム中にランダムに挿入し、その中から芽生えの時期にレポーターを発現している個体を選抜し、ライン化を進めている。確立されたラインを用いて環境応答や芽生え期での形態形成の解析に試用したのでそれについて報告する。

S401

イネ cDNA マイクロアレイを用いた乾燥と低温ストレスによって誘導される遺伝子の単離と解析

M.A.Rabbanji, 安部洋, 斉藤扶美恵, 嶋坂真理¹, 関原明¹, 篠崎一雄¹, 篠崎和子

(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・ゲノム科学センター)

近年ゲノム科学の発展はめざましく、多くの情報が得られてきている。我々は単子葉植物のモデル植物であるイネにおいて乾燥または低温ストレスによって誘導される遺伝子を単離し解析する事を目的として実験を行っている。乾燥、高塩濃度、低温処理を行ったイネ植物体より作製したcDNAライブラリーよりランダムにクローンを選抜、塩基配列を決定し独立した1500 ESTクローンよりなるcDNAマイクロアレイを作製した。そこで10時間の乾燥、高塩濃度、低温、アブシジン酸処理を行ったイネ植物体よりmRNAを調整しCy3, Cy5による二蛍光標識法によりマイクロアレイ解析を行った。その結果、いくつかの陽性クローンを得る事ができた。これらクローンの中には既に乾燥や低温ストレス誘導性遺伝子として報告されている*rab21*や*lip19*遺伝子などが含まれていた。更にこれまで報告されていない新規のストレス誘導性遺伝子も存在していた。これら遺伝子のノーザン解析などの結果も含めて報告する。

S402

マングローブ TCP-1 の耐塩性強化機能の解析

関口美紀子、山田晃世、齋藤丈夫、三村徹郎¹、小関良宏
(農工大・工・生命、¹奈良女子大・理・生物)

演者らは、マングローブ (*Brougniera sexangula*) cDNA ライブラリーから大腸菌を利用した機能スクリーニング法で耐塩性関連因子の探索を進めている。その結果、マングリン cDNA の他にシャペロニン的一种として知られている T-complex polypeptide 1 (TCP-1) をコードしていると考えられる cDNA が得られた。このマングローブ TCP-1 は、アラビドプシス由来の TCP-1 とアミノ酸レベルで 89.4% の相同性を有していた。一般に TCP-1 は真核生物において、ATP を利用したアクチンやチューブリンのフォールディングを行う機能を有する事が知られている程度であり、TCP-1 の発現と耐塩性の関連を検討した研究はこれまでにない。本研究では、宿主に大腸菌を利用し、マングローブ、及び耐塩性の低い植物であるアラビドプシス由来の TCP-1 cDNA、さらに ATP 結合領域に部位特異的変異を導入した TCP-1 cDNA を用いて、TCP-1 の発現と宿主の耐塩性の関係を明らかにすることを旨とした。その結果、アラビドプシス 由来の TCP-1 にもマングローブ TCP-1 と同様な機能が確認され、また、この機能は ATP に依存するものではないことが示唆された。さらに本研究では Mang TCP-1 を酵母等の真核生物に導入し、得られた形質転換体の耐塩性について検討したのでその結果を報告する。

S403

Gene expression profiling of salinity stress responses using expressed sequence tag (EST)-based microarrays in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*.

Sakae Agarie¹, MaryAnn Cushman³, Shin Kore-eda⁴, Michael Deyholos², David Galbraith², John Cushman³.
¹Fac. Agr., Saga Univ., Saga 840-8502. ²Dept. Plant Sci., Univ. Arizona, Tucson, AZ 85721, USA. ³Dept. Biochem., Univ. Nevada, Reno, NV 89557-0014, USA. ⁴Dept. Biochem. Mol. Biol. Saitama Univ. Urawa 338-8570.

Mesembryanthemum crystallinum, a facultative CAM halophyte, can shift from C₃ to Crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis following exposure to environmental stresses such as high salinity and water deficit. We have simultaneously analyzed changes in the expression pattern of ~3000 selected genes in response to salt stress (500 mM NaCl) using EST-based microarrays. Approximately 30% of transcripts showed significant up- or down-regulation from 3 to 72 hours following the imposition of salinity stress. The most pronounced changes in transcript abundance were observed at 48 hours after stress, a time that corresponds temporally to the buildup of CAM enzymatic machinery. Several hundred unique transcripts showed at least a two-fold increase in abundance, whereas in excess of 200 genes were down regulated to a similar extent. Up-regulated genes were mainly involved in photosynthetic processes. Surprisingly, more than 30% of the induced transcripts were functionally unknown, including many novel genes. The detailed temporal dynamics of salinity stress responses revealed by this study provide novel insights into the perception and response mechanisms that contribute to survival following exposure to high salinity stress.

S404

水ストレスによって誘導されるキウリ子葉 β-アミラーゼの精製と生化学的解析

戸高大輔、金勝一樹、諸橋征雄¹(東京農工大院・農、¹埼玉大・理)

水ストレスに適応することは、植物にとって極めて重要であり、乾燥に対する様々な耐性機構があることが分かっている。我々は、これまでにキウリ子葉に対して水ストレスを与えると、高い β-アミラーゼ活性が誘導されることを見出している¹⁾。この β-アミラーゼの生理機能を明らかにするために、本酵素を精製して生化学的解析を行った。

風乾、または水(コントロール)で6時間処理したキウリ子葉(50g)より 50 mM リン酸緩衝液(pH5.5) で抽出したタンパク質画分から、DEAE Toyopearl, glycogen 沈殿, Superdex 200 pg ゲルろ過によってデンプンを分解する活性をそれぞれ部分精製した。Superdex 200 pg ゲルろ過では、105kD(A-I)と 40kD(A-II)に活性が分離した。A-I も II も PNP65 を分解したが PNP67 を分解する活性がなかったことから、どちらも α-アミラーゼではなく β-アミラーゼであることが明らかとなった。さらに A-II を 2次元(等電点と Native-PAGE)電気泳動で分離後、活性染色したところ、β-アミラーゼのスポットが複数検出された。これらの内、特に pI が 5.8 から 6.8 の4つのスポットの活性は、風乾処理した場合に著しく強いことが明らかとなり、水ストレスに対する応答機構で重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

¹⁾Todaka et al. (2000) J. Experimental Botany 51: 739-745

S405

乾燥ストレス耐性におけるシロイヌナズナ galactinol synthase 遺伝子の機能解析

太治輝昭^{1,2}, 大住千栄子³, 関原明¹, 井内聖¹, 篠崎和子⁴, 篠崎一雄¹(¹理研・植物分子, ²筑波大・生物科学, ³味の素(株)・中研, ⁴農水省・国際農研・生物資源)

Raffinose Family Oligosaccharides (RFO) は種子の乾燥過程において蓄積し、種子の乾燥耐性に重要であることが知られている。しかしながら RFO の植物における機能については不明であった。そこで我々はシロイヌナズナを用いて RFO の植物体における機能の解明を目的として研究を進めた。

植物体に乾燥などの水ストレスを与えたところ、植物体においても raffinose の蓄積が認められ、植物体の乾燥耐性にも RFO が関与することが示唆された。RFO の合成はこれまでの研究で galactinol synthase が律速段階と考えられている。そこでシロイヌナズナより3種の水ストレス応答性 galactinol synthase 遺伝子 (*AtGolS1*, *AtGolS2*, *AtGolS3*) を単離した。これらの酵素活性を調べたところすべて galactinol synthase 活性を示した。そこで各々の遺伝子について過剰発現、あるいは発現抑制させたトランスジェニック植物を作成し、乾燥ストレスに対する耐性試験を行った。その結果、*AtGolS2* を過剰発現させた植物は野生型と比較して乾燥耐性を示し、逆に *AtGolS1* を発現抑制させた植物は乾燥高感受性を示した。これらの耐性の程度は遺伝子の発現量の増減、さらには galactinol, raffinose 含量の変化と相関を示した。

S406

シロイヌナズナの乾燥・低温・高塩濃度ストレス応答性トランス因子をコードする遺伝子 *DREB* の類似遺伝子の解析、および *DREB2A* 破壊株の解析

佐久間 洋、三浦節子、Joseph G. DUBOUZET、Emilyn G. DUBOUZET、¹Anna N. STEPANOV、¹Joseph R. ECKER、²篠崎一雄、篠崎和子
(農水省・国際農研・生物資源、¹Plant Science Institute, University of Pennsylvania、²理研・植物分子生物)

シロイヌナズナの乾燥・低温・高塩濃度ストレス応答性シス因子 DRE (Dehydration Responsive Element, TACCGACAT) に結合するトランス因子には、DREB1 と DREB2 の 2 種類が確認されており、DREB1 には A、B、C の 3 つ、DREB2 には A、B の 2 つのホモログが存在する。すべての DREB タンパク質は DNA 結合ドメインとして ERF/AP2 ドメインを持ち、DREB1 は低温の、DREB2 は乾燥・高塩濃度ストレスのシグナル伝達に関与するが、ABA 応答性の遺伝子発現には関与しない。乾燥応答性遺伝子の一つ *rd29A* はプロモーター領域に DRE を有し、DREB により乾燥・低温・高塩濃度ストレス応答性の発現誘導を受けている。*rd29A* は乾燥により、葉と根の両方において強く発現が誘導されるが、DREB2A、B では乾燥による発現は根において強く、葉ではあまり強くない。このため、*rd29A* の葉での乾燥による発現誘導に関与している新たなトランス因子の存在が予測されている。この新しいトランス因子を特定するために、DREB タンパク質の ERF/AP2 ドメインのアミノ酸配列を元にシロイヌナズナのゲノム配列を検索した結果、DREB1 に近い配列が 7 つ、DREB2 に近い配列が 6 つ見いだされ、これらの配列を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行い発現パターンを解析した。また、DREB2A の破壊株を用いて、ノーザンハイブリダイゼーションにより *DREB2A*、*rd29A* およびその他の DREB ターゲット遺伝子の発現パターンの変化を解析した。

S407

Promoter analysis of *erd1*: An *Arabidopsis* ClpA-homologous-gene, up-regulated in response to dark-induced senescence and dehydration stress.

Sean D. Simpson¹, Kazuo Nakashima¹, Yoshihiro Narusaka¹, Kazuo Shinozaki², Kazuko Yamaguchi-Shinozaki¹, ¹Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), ²Tsukuba Institute (RIKEN).

The *erd1* gene encodes a 97kDa protein with sequence homology to the regulatory ATPase-subunit of the plant Clp protease, and is thought to function in protein degradation in chloroplasts. Expression of *erd1* was found to be strongly induced by dehydration and salinity stress, plus natural and dark-induced senescence. Analysis of the *erd1* promoter was performed by fusing a number of discrete portions of the promoter to the coding region of the LUC (Luciferase) reporter gene. Luciferase activity was subsequently measured in transgenic plants exposed to dehydration or dark conditions. These experiments revealed that a 69bp region of the *erd1* promoter may contain *cis*-acting elements involved in the senescence-induced expression of *erd1*. This region contains the ABRE (ABA responsive element)-like sequence (ACGTG) and a second ACGT sequence. Data from constructs containing base substitutions in each of these elements revealed that they may both be involved in *erd1* gene expression during senescence. Further analysis was performed in order to assess the activity of this 69bp sequence in response to other senescence-inducing conditions.

S408

CLONING OF TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1B SUBUNIT γ FROM A HALOPHYTE *ANEUROLEPIDIUM CHINENSE* BY DIFFERENTIAL DISPLAY*

Weiming SHI¹, Keiko OZAKI, Tetsuko TAKABE
Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., Nagoya 464-8601
¹Bio-oriented Tech. Res. Adv. Inst., Tokyo105-0001

As compared to crop plants, wild plants experience more severe abiotic stresses like drought, high salt, cold, and heat in natural environments and therefore have developed particular adaptation mechanism. Sheep grass (*Aneurolepidium chinense* (Trin.) Kitag), a wild perennial plant grown naturally in semi-desert region of Mongol, has strong tolerance to abiotic stresses. We have used differential display (DDRT-PCR) technique to isolate the heat-stress responsive genes from this plant. And a 1.4 Kb long cDNA clone was isolated with high homology to plant translation elongation factor 1B subunit gamma (*eEF1B gamma*). The deduced amino acid sequence of the sheep grass *eEF1B gamma* (*AceEF1B gamma*) had about 60% homology to the protein from rice and sweet berry and low homology to that from human or yeast (10-15%). Southern blot analysis indicated that *eEF1B gamma* was encoded by a single-copy gene in the sheep grass genome. Northern blot analysis showed that *AceEF1B gamma* transcript increased remarkably in response to heat or drought stress.

* This research was supported by Program for Promotion of Basic Research Activities for Innovative Biosciences (PROBRAIN).

S409

EST塩基配列情報を利用した通性CAM植物アイスプラントにおける塩ストレス応答の解析

是枝 晋¹, Mary Ann CUSHMAN, 東江 栄², Elizabeth CLARK, John C. CUSHMAN (ネバダ大学・分子生物,¹ 埼玉大・理・分子生物,² 佐賀大・農・生物生産)

高濃度の塩による水ストレスでC₃型光合成からCAM (Crassulacean acid metabolism)型光合成へ転換するアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は近年CAM植物のモデルとして注目を集めているが、分子生物学的に解析された遺伝子の数は限られている。我々は、アイスプラントの塩ストレス応答に関わる新規遺伝子の発見とその発現制御の解明を目標として、水を十分与えたアイスプラントと、0.4 M NaClを30時間または48時間与えたアイスプラントからcDNAライブラリーを作成後、約10,000個のクローンの部分塩基配列 (expressed sequence tag; EST) を5'側から決定した。これらは約4,500種類の転写産物に由来しており、そのうち約2/3は機能の解っているタンパク質と相同性を持っていた。このうち、集光性複合体、光化学系複合体及びC₃経路に関わる転写産物の出現頻度は水ストレスにより大幅に減少するのに対し、CAM及び様々なストレス応答に関与する転写産物の出現頻度は増加していた。さらに、代謝産物輸送体と高い相同性を持つ転写産物も10種類以上見いだした。現在、これらの完全長cDNAの単離と機能解析を行っている。

S410

低浸透圧及びプロリンで誘導される *ProDH* 遺伝子のプロモーター解析

佐藤里絵、中島一雄、篠崎一雄¹、篠崎和子

(農水省・国際農研・生物資源、¹理研・植物分子生物)

プロリンは、水分ストレスを受けた植物が浸透圧調節物質として細胞内に蓄積する適合溶質のひとつである。我々はプロリン分解酵素、プロリンデヒドロゲナーゼ (*ProDH*) の cDNA 及びそのプロモーター領域をシロイヌナズナから単離した。これまでに、*ProDH* 遺伝子の発現は乾燥処理で抑制され、吸水、低浸透圧及びプロリン処理で促進されることを報告している。そこで、*ProDH* 遺伝子の低浸透圧及びプロリン応答性発現に関わるシス因子を明らかにするため、*ProDH* 遺伝子のプロモーター領域に欠失及び変異を加えたものとルシフェラーゼ (*LUC*) または β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子とのキメラ遺伝子を導入した形質転換植物を用いて詳しく解析した。その結果、70bp のプロモーター領域に、*ProDH* 遺伝子の低浸透圧及びプロリン誘導性発現に関与するシス因子、ACTCAT 配列を見出した。また、乾燥ストレスを受けたシロイヌナズナではプロリンが蓄積されるにも関わらず、*ProDH* 遺伝子の発現は抑制される。形質転換植物の解析から、この *ProDH* 遺伝子の発現抑制に関与するシス因子も 70bp のプロモーター領域に含まれていることが示唆された。

S411

イネ *AOX* 遺伝子の環境ストレス及び ABA に対する発現応答

大津和弘¹・伊藤裕介^{1,2}・雑賀啓明¹・中園幹生¹・堤伸浩¹・平井篤志¹ (1. 東大農学生命科学、2. 国際農研・生物資源)

植物のミトコンドリアには、通常働いているシトクローム系呼吸のほか、ATP 合成と共役していないオルタナティブ呼吸という呼吸経路が存在する。しかし、この呼吸経路の存在意義に関してはいまだ不明な点が多い。

この意義を解明するため、オルタナティブ呼吸を担う末端酸化酵素である *AOX* に関して様々な解析が行われ、いくつかの知見が蓄積されている。以前私達は、イネ *AOX* 遺伝子の発現が低温によって誘導されるという事を示したが、これは、植物の環境ストレスに対する応答に *AOX* が関与していることを示唆している。

そこで今回私達は、低温以外の環境ストレスである、塩ストレス及び乾燥ストレスに対するイネ *AOX* 遺伝子の発現応答に関して解析を行った。その結果、いずれのストレスをかけた場合でも、イネ *AOX* 遺伝子の発現は誘導された。

一方、多くの環境ストレスに対する植物の応答に、植物ホルモンである ABA が関与している事が知られている。そこで私達は、イネに ABA 処理を加え、*AOX* 遺伝子の発現を調べてみた。その結果、イネ *AOX* 遺伝子の発現は、ABA 処理によっては誘導されなかった。このことは、低温、塩、乾燥といったストレス条件下におけるイネ *AOX* 遺伝子の発現は、ABA の関与していない経路によって制御されている事を示している。

S412

カタラーゼおよびベタイン合成遺伝子を共発現させた淡水性ラン藻 *Synechococcus* PCC 7942 の塩ストレス応答

荒木悦子、加来伸夫、日比野隆¹、田中義人¹、高倍昭洋 (名城大・総合研、¹名城大・理工・化学)

植物が高塩濃度下でも生育するためには、ベタインのような適合溶質の蓄積、 Na^+ の細胞外への汲み出し、または液胞への蓄積が重要である。同時に、塩ストレスによる CO_2 取込み速度の低下は、電子伝達鎖の過剰な還元を招き、活性酸素の生成をもたらすことが考えられる。塩ストレスがもたらす酸化ストレスの寄与について検討するために、*Synechococcus* PCC 7942 にカタラーゼ (*katE*)、ベタイン合成遺伝子 (*bet*)、及び両者 (*katE/bet*) を導入した。*katE* 及び *katE/bet* 遺伝子導入株のカタラーゼ活性は、コントロール株の 1.4-1.8 であった。低い塩濃度のとき、形質転換体はコントロール株と同じ生育速度であったが、高塩濃度下において、コントロール株よりも速い生育速度を示した。また、*katE/bet* 株は、*katE* のみ、*bet* のみを発現させた場合よりも生育速度は速かった。これらの結果について報告する。

S413

DREB genes in Rice, *Oryza sativa* L.

Joseph G. DUBOUZET¹, Yoh SAKUMA¹, Emilyn G. DUBOUZET¹, Kazuo SHINOZAKI² and Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI¹
¹Japan Intl Res Cent Agric Sci (JIRCAS), Tsukuba 305-8686, ²Inst Physic Chem Res (RIKEN), Tsukuba 305-0074

DRE-Binding proteins (DREB) play key roles in the response to environmental stress such as drought, high salt and low temperature. This report deals with the isolation and functional characterization of the DREB homologues in rice (OsDREBs).

Two sequences (OsDREB1G1 and OsDREB1G2) in the GenBank database have putative translations that are homologous to the DREB1A protein. An OsDREB1G1 fragment was used to probe cDNA libraries but only OsDREB1A was isolated. OsDREB1B was obtained as an EST clone from the Rice Genome Project. Blast and tblastn search of the Monsanto database revealed 4 more DREB1A homologues. OsDREB1A and OsDREB1B, like DREB1A, are upregulated by cold stress. OsDREB1A is sensitive to salt and wound stress as well. OsDREB2 was obtained from a cDNA library and, like DREB2A, it is induced by drought and salinity but not by cold exposure. Experimental results indicate that OsDREB1A and OsDREB2 specifically bind in vitro to the DRE-motif of the stress-inducible *rd29A* of *A. thaliana*. OsDREB1A and OsDREB2 effector constructs transactivated a GUS reporter gene fused to the DRE motif. The OsDREB genes may be useful in the production of rice varieties that are resistant to multiple stress environments.

ベタインを蓄積するマングローブのベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の分子的性質
 且比野隆、孟玉玲¹、田中義人、上原直子²、馬場繁幸²、川満芳信²、高倍鉄子³、石井忠⁴、高倍昭洋¹
 (名城大・理工・化学、¹名城大・総合研、²琉球大・農・熱帯、³名古屋大院・生命農・生物資源、⁴森林総研・生物機能)

我々はマングローブの環境ストレス応答機構の分子レベルの解明を目的とし、マングローブのうちベタインを蓄積するマングローブである *Avicennia marina* のベタイン合成遺伝子について検討を行なった。*Avicennia marina* の葉から cDNA ライブラリーを作成した。そして、ライブラリーからベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ (BADH) 遺伝子を単離したところ 2 種類の BADH 遺伝子を単離した。一方の遺伝子の mRNA の蓄積量は、塩により増加したが、他方は蓄積量も少なく、塩による誘導はほとんどみられなかった。マングローブ BADH を大腸菌で発現させた後、精製して酵素化学的性質を調べたところ、マングローブ BADH とホウレンソウ BADH はベタインアルデヒドデヒドに対する親和性は同じであったが、 ω -アミノアルデヒドに対する親和性、及び安定性において異なることが明らかになった。

S415

シロイヌナズナの bZIP 型転写因子 AREB1 による ABA を介した乾燥応答性遺伝子発現制御機構
 降旗 敬¹、宇野 雄一^{1,2}、安部 洋¹、吉田 理一郎³、篠崎 一雄³、篠崎 和子¹

(¹農水省・国際農研・生物資源、²神戸大・農・植物資源、³理研・植物分子)

シロイヌナズナ *rd29B* 遺伝子の乾燥応答による発現は、主に ABA を介して制御されていると考えられる。われわれはこれまでに、*rd29B* 遺伝子のプロモーター領域に存在する 2 個の ABRE (ABA Responsive Element) が乾燥誘導に与するシス因子であり、酵母の one-hybrid 系を用いて単離した新規の bZIP 型転写因子 AREB (ABA Responsive Element Binding Protein) がこの ABRE に特異的に結合して下流の遺伝子発現を制御する転写因子であることを明らかにした。

葉肉細胞プロトプラストを用いたトランスアクティベーション実験において、AREB1 による転写の活性化は ABA の添加によって付加的に増大し、ABA 欠損変異体である *aba2* を用いた場合、ABA 非存在時の転写活性が極めて低かった。このことから AREB の活性化には、ABA に応答したリン酸化などの翻訳後の修飾が必要であると考えられた。そこで、AREB タンパク質の保存領域を基質として活性ゲル内リン酸化実験を行ったところ、シロイヌナズナの T87 培養細胞から抽出したタンパク質中に ABA 処理に依存して AREB タンパク質断片をリン酸化する kinase 活性が存在した。さらに保存領域中のリン酸化 target 配列にアミノ酸置換を導入したところ、活性ゲル内リン酸化実験におけるリン酸化バンドは検出されなくなり、トランスアクティベーション実験においても ABA による転写活性化が抑制された。

低温誘導性転写因子 DREB1A を過剰発現させたシロイヌナズナのプロリンの蓄積

春日美江、楠城時彦¹、佐藤里絵、篠崎一雄¹、篠崎和子
 (農水省・国際農研 生物資源、¹理研 植物分子生物)

我々は、乾燥、塩、低温ストレス応答に関するシスエレメント DRE 配列に結合して働く転写活性化因子 DREB1A についての解析を行っている。これまでに DREB1A 遺伝子をシロイヌナズナ中で過剰発現すると、ストレス耐性に与する複数のターゲット遺伝子が過剰発現し、高い乾燥、塩、低温ストレス耐性が付与されることを報告した。35S プロモーターを用いて DREB1A を過剰発現させた遺伝子導入植物を用いて、ストレス時に適合溶質として働くプロリンの蓄積について解析した。その結果、この遺伝子導入植物では野生株と比較してストレスのないコントロール時や乾燥後の再吸水時にも高いレベルのプロリンが蓄積されていることが明らかになった。この DREB1A を過剰発現させたシロイヌナズナをノーザン解析した結果、プロリン合成の律速酵素をコードする P5CS 遺伝子の発現は変化が見られず、DREB1A のターゲット遺伝子ではないと考えられた。一方、プロリンの分解に与する ProDH 遺伝子の発現は明らかに抑制されていた。また、遺伝子導入植物のプロリンの蓄積量と ProDH 遺伝子の抑制のレベル、さらに DREB1A 遺伝子の発現レベルには相関関係が認められた。DREB1A がなんらかの機構で ProDH 遺伝子の発現を抑制してプロリンの蓄積量を増加させていると考えられる。

S417

マングリンを導入した形質転換体の細胞内イオン組成の検討
 山田晃世、齋藤丈夫、三村徹郎¹、小関良宏
 (農工大・工・生命、¹奈良女子大・理・生物)

当研究室ではマングローブ植物の耐塩性に与する遺伝子の探索とその応用に関する研究を進めている。その結果、ヒルギ科のマングローブ (*Bruguiera sexangula*) に特異的に存在し、大腸菌の耐塩性を強化する機能を有する新規タンパク質をコードする cDNA の単離に成功した。我々は、このタンパク質をマングリンと命名した。マングリンは、大腸菌の他、酵母やタバコ培養細胞の耐塩性を強化する機能を有することも既に確認されている。また、*B. sexangula* の懸濁培養細胞におけるマングリン mRNA 量は、その細胞懸濁液に 100 mM NaCl を添加した場合、約 10 分で急激に増加することが明らかになっている。これらの結果から、マングリンは原核生物から酵母、高等植物に至る、幅広い生物群の耐塩性を強化する機能を有し、*B. sexangula* 自身が NaCl 存在下で生育する上でも何らかの重要な役割を担っているものと考えられた。しかし、何故マングリンにこのような機能があるかは全く明らかになっていない。そこで本研究では、マングリン cDNA を導入した大腸菌、酵母等の形質転換体を用い、その細胞内における各種イオンの量、組成を検討することで、マングリンが有する耐塩性強化機構の解明を目指した。

S418

ホウレンソウと大腸菌のベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの基質特異性と安定性
Aran Incharoensakdi、日比野隆¹、孟玉玲²、荒木悦子²、石川浩¹、高倍昭洋² (チュラロンコン大・理・生化、¹名城大・理工・化学、²名城大・総合研)

ベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ (BADH) は、植物や微生物においてベタイン合成に関与する酵素である。近年、BADHがベタインアルデヒド(Bet-ald)以外にポリアミンの代謝などいくつかの反応を触媒することが報告された。そこで我々は、ホウレンソウおよび大腸菌の本酵素を大腸菌で大量発現し、その基質特異性、安定性について検討した。また、基質のトンネル入り口に存在すると思われる103番目のGluをGlnとLys変えたmutant、及びホウレンソウと大腸菌のBADHのハイブリッドBADHも作成した。ホウレンソウBADHは、Bet-aldに対しては、大腸菌BADHと同じ親和性を示したが、3-アミノプロピオンアルデヒド及び4-アミノブチルアルデヒドに対しては大きな値を示した。E103K変異体は活性がなかったが、E103Q変異体は ω -アミノアルデヒドに対して野生型より小さい値を示した。これらの結果について報告する。

S419

野生種スイカで乾燥誘導されるメタロチオネインの機能解析
西村宜之、明石欣也、三宅親弘、河内孝之、横田明徳 (奈良先端大・バイオ)

我々は、植物の耐乾燥性機構を明らかにするにあたり、超乾燥条件下においてほとんど水分を失わず、C3型光合成代謝を営むアフリカ・ボツアナ原産の野生種スイカ(*Citrullus lanatus*)に注目した。野生種スイカ生葉を用い、乾燥による遺伝子発現の変動を蛍光ディファレンシャルディスプレイ法より解析し、そのうちの一つがメタロチオネイン-II (MT-II) 遺伝子と高い相同性を有していた。ノーザン解析よりその mRNA の蓄積は、乾燥ストレスにより約3倍に増加していることが明らかとなった。

植物と動物の MT はアミノ酸における相同性は低く、構造・機能上の特徴であるシステインの数も動物が20個あるのに対し、植物は14個しか有さない。これまでに動物の研究から MT が活性酸素(O_2 、 $OH\cdot$) 消去に働くことが知られているが、植物においてはいまだ不明である。現在、野生種スイカの MT-II が活性酸素種消去に働くかを詳細に解析を行っている。

S420

野生種スイカで蓄積される高濃度シトルリンの活性酸素消去能
明石欣也、三宅親弘、河内孝之、横田明徳 (奈良先端大・バイオ)

アフリカ・ボツアナ原産の野生種スイカは、乾燥・強光ストレスに対して高い耐性を示す。その葉組織では、アルギニン生成経路の中間物質であるシトルリンが約 600 mM まで高蓄積する。しかし蓄積したシトルリンの分子機能は明らかでなく、その生理的意義は不明であった。そこで本研究では、シトルリンの適合溶質性、活性酸素消去能などについて調べた。600 mM のシトルリンは、野生種スイカのリンゴ酸脱水素酵素などの機能を阻害せず、シトルリンの適合溶質性が確認された。サリチル酸の水酸化をラジカル検出の指標とした競争反応解析により、シトルリンとヒドロキシルラジカルの二次反応速度定数は約 $3 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ と算出され、植物一般で水ストレスにより蓄積されるプロリンやグリシンベタインに比べ約1桁及び2桁大きいことが示された。またシトルリンは、ヒドロキシルラジカルによるビルビン酸リン酸化酵素の失活や、DNA二本鎖の切断などに対し顕著な保護作用を示した。以上の結果から、乾燥下の野生種スイカにおいて、シトルリンが活性酸素スカベンジャーとして、酸化的障害に対する防御に寄与する可能性が示唆された。

S421

コケ植物のMn-SOD活性をもつジャーミン様タンパク質の生理機能の解明
中田克、塩野忠彦、鈴木崇紀、渡辺弥生、山本勇、佐藤敏生 (広島大・院理・生物科学)

当研究室では蘚類ネジクチゴケ (*Barbula unguiculata*) から細胞外Mn-SODを見出した。このタンパク質はそのcDNAの解析によりジャーミン様タンパク質 (BuGLP) の一つであった。ジャーミンはoxalate oxidase活性を持つことが知られているが、BuGLPは持っていなかった。本研究はBuGLPの生理機能を明らかにすることを目的とした。

生育とBuGLPの発現レベルを調べた。mRNAレベルでは対数期に多く発現したが、タンパク質量は後期になるほど増加していた。次にストレスに対するBuGLPの発現を調べた。培地にNaClを加えた塩ストレス状況下ではBuGLPはmRNA量およびタンパク質量ともに増加した。しかし、BuGLPタンパク質の大部分は培養液中に溶出した。BuGLPは細胞壁にゆるく結合し、細胞壁合成と関係あるのではないかと推定した。

藜類ネジグチゴケ葉緑体における銅によるFe-SODの転写抑制とCuZn-SODの転写誘導

塩野忠彦、宮田幸典、中田克、鈴木崇紀、山本勇、佐藤敏生
(広島大院・理・生物科学)

コケ植物は、最も原始的な陸上植物であり、植物の陸上化に伴う酸素ストレスへの適応を考える上で重要な位置にあると考えられる。私達は、コケ植物の活性酸素除去に関わる酵素のうちsuperoxide dismutase(SOD)に着目し、その種類と性質について調べてきた。

藜類ネジグチゴケのSODイソ酵素の分布は高等植物と類似し、葉緑体にはFe-SODとCuZn-SODが局在していた。これら2つの葉緑体SODは、培地中の銅濃度により発現が制御されており、銅濃度0.1 μM以下の低濃度ではFe-SOD、それより高濃度ではCuZn-SODが発現していることが活性染色により明らかになった。さらに、葉緑体Fe-SOD、CuZn-SODのcDNAを単離し、これらを用いてノザン解析を行った。Fe-SODは、培地中の銅濃度0.1 μMまで転写されており、それより高濃度では転写が抑制されていた。一方、CuZn-SODは、培地中の銅濃度0.1 μMまで転写が抑制されており、高濃度では転写が促進されていた。これらの結果より、培地中の銅濃度の増加により転写レベルで葉緑体Fe-SODの発現は抑制され、CuZn-SODは誘導されていることが分かった。一方、体制がより古い苔類フタバネゼニゴケでは、これらの現象は見られなかった。

チューリップ花弁の膨圧および細胞伸長におけるトレハロースの作用機序
井上眞理・高田隆美・戸田智子¹・和田博史¹・福山寿雄¹・池田敬²・野並浩¹

(九州大院・農・植物資源科学,¹愛媛大・農,²京都府大・農)

エチレン非(低)感受性として知られるチューリップでは、切り花の花弁の離脱や老化に対し50mMトレハロースが最も効果的であることを明らかにした¹⁾。トレハロースの老化抑制の機構については90MHz¹H-NMR分光計、等圧式サイクロメーター²⁾による水分生理学的な解析を中心に行った。トレハロースは花弁の表皮細胞および孔辺細胞の生理活性の維持に寄与した。細胞伸長においては、トレハロースによる効果は認められなかったが、横方向への細胞拡大を維持した。花弁の含水率および膨圧はトレハロースにより初期値に近い値を保ち、液胞に由来すると考えられるπの長い成分とよく相関した。膨圧の保持は横方向への細胞拡大が維持されていることを裏付ける結果と考えられ、液胞が健全な状態であることが示唆された。トレハロースによる生長阻害はダイズ胚の培養細胞においても認められ、スクロースに比べ細胞内への水透過性が阻害されていることを明らかにした³⁾。切り花花弁において、スクロース投与は浸透圧調節物質やエネルギー源として効果的であることが知られているが、トレハロースはスクロースと異なる作用機序として、膜系を保護することで花弁の老化を抑制していることが示唆された。

1) Iwaya-Inoue, M. & M. Takata (2001) *HortScience* 36 In press

2) Nonami, H., J.S. Boyer & E. Steudle (1987) *Plant Physiol.* 83:592-595

3) Ikeda, T., M. Iwaya-Inoue, T. Fukuyama & H. Nonami (2000) *Plant Biotech.* 17:119-125

塩ストレスによってトウモロコシ根の内皮カスバリー線の発達は促進されるか?

唐原一郎、近藤貴宜、池田敦夫(富山大・理・生物)

カスバリー線は根の内皮に形成され、アポプラストにおける物質輸送のバリアとして物質輸送の要となる構造であるため、その発達は土壌環境の影響を受ける可能性が考えられる。実際、ワタの根においては根端から内皮カスバリー線の形成位置までの距離が、塩ストレス下では短くなるという報告がある。しかしそれだけではカスバリー線の形成が細胞レベルで促進されたとはいえない。そこでこの可能性を定量的に検証した。

トウモロコシ種子を蒸留水または0.2 Mの濃度のNaCl水溶液で湿らせたパーミキュライトに播き、暗所で8日間育て、各条件で長さが最頻値周辺の根を選び、カスバリー線形成を調べた。塩ストレス下においては蒸留水と比べて根端から内皮カスバリー線形成位置までの距離は短くなっていった。各条件下で育てた根端からカスバリー線形成位置までの部分を切り出して包埋し、1列分の内皮細胞数を数えたところ、根端からカスバリー線形成位置までの細胞数は塩ストレス下においては蒸留水の約半分であった。しかし次に芽生えを各条件下で育てた4日齢の芽生えの根における内皮細胞の産生速度を求めたところ、塩ストレス下においては蒸留水の場合の約半分に低下していた。これらの値を用いて、各条件下において内皮細胞が産生された後カスバリー線を形成するまでにかかる時間を求めたところ、余り変わらないことがわかった。以上より、塩ストレス下で根端からカスバリー線形成位置までの距離が蒸留水の場合に比べて短くなったのは、内皮細胞の産生速度が低下したためであり、個々の内皮細胞でカスバリー線形成の過程が促進されたわけではないことが示唆された。

H₂O₂がヒヨス毛状根の酸化ストレス関連代謝に及ぼす影響
高橋佐知子、高山真策(東海大・開発工・生物)

活性酸素は様々な代謝過程および生体外の物質によって発生し、消去されなければ細胞障害の原因となる。このため、活性酸素の発生する組織や細胞内局所には抗酸化物質や抗酸化酵素が分布し、これらを利用して生体を防御している。本研究では、ナス科のヒヨス毛状根の培地へ活性酸素の一つであるH₂O₂を添加して、酸化ストレス防御系のアスコルビン酸グルタチオン経路、カタラーゼ、SOD活性等について調べた。

ヒヨスの毛状根(*Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834株)の接種により誘導を、シュクロース30 g/lを添加したB5液体培地で振とう培養して増殖し、実験材料とした。培養は、300 ml三角フラスコにシュクロース30 g/lを添加したB5液体培地100 mlを入れ、新鮮重0.5 gの根を移植して、23℃、連続照明下(PPFD: 6 μmol m⁻² s⁻¹)、毎分100回転で振とう培養した。培養14日後に、H₂O₂を培地に0、1.0、2.5、5.0、7.5、10、25、50、75、100mM添加して培養し、添加3日後の生育、呼吸活性、ラジカル消去系の代謝等について調べた。

その結果、培地へのH₂O₂添加濃度の上昇にともなって毛状根の生育(FW, DW)は抑制された。H₂O₂添加量25mMまでの区では対照区と同様な呼吸活性が保持されていた。しかし、50mM以上の添加区では、呼吸活性が顕著に抑制され75、100mM添加区ではほとんど呼吸活性を示さなかった。細胞のカタラーゼ、SOD、AsAPOX活性はH₂O₂添加により低下する傾向があった。これに対してDHAR、MDAR、GRなどの抗酸化酵素の活性はH₂O₂濃度10mM付近で増加する傾向が見られた。細胞中の酸化型と還元型アスコルビン酸はH₂O₂添加により減少する傾向が見られた。これに対してグルタチオンは還元型のみが減少し、酸化型についてはH₂O₂濃度10mMから50mMの添加区で増加した。以上のことから、ヒヨス毛状根はH₂O₂添加によって酸化ストレスが高まるが、特に10mM付近のH₂O₂濃度でアスコルビン酸-グルタチオン代謝系が活発となり、酸化ストレスによる細胞障害を防いでいるものと考えられる。

ヒヨス毛状根へのH₂O₂処理がトロパンアルカロイドの透過吸収ならびに代謝に及ぼす影響
高橋佐知子、孟山真策（東海大・開発工・生物）

ヒヨスの毛状根培養にH₂O₂を添加すると、細胞内で生産蓄積されたトロパンアルカロイドの培地中への透過が促進された。本報告ではH₂O₂が細胞膜の透過ならびに培地からの吸収に及ぼす影響について述べる。

ヒヨスの毛状根 (*Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834株の接種により誘導)を、300ml三角フラスコにシュークロース30g/lを添加したB5液体培地100ml当たり新鮮重0.5gを移植して、23°C、連続照明下、毎分100回転で振とう培養した。培養14日後に、脱イオン水100ml中に毛状根2g (FW) を入れ、H₂O₂を0、1.0、2.5、5.0、7.5、10、25、50、75、100mMの濃度で添加して培養し、EC値の変化およびトロパンアルカロイド量を測定した。また、培地に10mMのH₂O₂を添加した後、1.5、3、6、12、24、48、72、120、168、240時間後の培地中および細胞中のトロパンアルカロイド (6β hydroxyhyoscyamine, scopolamine, hyoscyamine, littorine)を測定した。

培養14日後に、脱イオン水に毛状根2gを入れ、H₂O₂を0、1.0、2.5、5.0、7.5、10、25、50、75、100mMの濃度で添加した結果、添加濃度に依存してEC値が上昇した。細胞内に生産蓄積されたトロパンアルカロイドの細胞外への透過も同様であった。10mMH₂O₂添加時のトロパンアルカロイドの細胞外への透過を経時的に測定した結果、H₂O₂添加後 hyoscyamine, scopolamine, littorineの細胞外への透過が促進された。6β hydroxyhyoscyamineの透過は促進されなかった。透過は6~12時間後まで促進され、その後は細胞内への再吸収が始まり、48~120時間後までは培地中にはトロパンアルカロイドはほとんど検出されなかった。細胞内のトロパンアルカロイドは培地中とは逆の濃度変化を示した。しかし、細胞から細胞外へ透過したアルカロイドが48時間の後までに再吸収された後、240時間後まで6β hydroxyhyoscyamineと hyoscyamineは低下し続け、littorineと scopolamineの濃度は維持あるいは上昇した結果、240時間後のトロパンアルカロイドの組成比率がH₂O₂無処理の場合と比較して大きく変動した。

PETIS法を用いたオオムギ、イネでの金属元素(⁵²Fe, ⁵²Mn, ⁶²Zn)の吸収・移行・転流解析

中西啓仁¹, 清宮正一郎¹, 吉村将志¹, 渡辺 智², 石岡典子², 長 明彦², 内田 博³, 辻 淳憲³, 松橋信平², 関根俊明², 橋本昭司², 森 敏¹

(¹ 東大院・農学生命科学, ² 日本原子力研究所, ³ 浜松ホトニクス)

ポジトロン核種, ⁵²Fe, ⁵²Mn, ⁶²Znのオオムギ、イネ体内における吸収・移行・転流をPETIS(positron emitting tracer imaging system)法で可視的かつ経時的に測定した。

①⁵²Cr(α, n)⁵²Feにより生成した⁵²Feをムギネ酸とキレートさせ、オオムギ根から吸収させた。⁵²Feは根と葉の付け根部分であるdiscrimination center (d.c.)へ15分で到達し、その後最新葉、最大展開葉へと移行した。鉄欠乏処理により、地上部への移行量は増加したが、1.5倍程度であった。②⁵²Mnはオオムギのd.c.へ40分で到達し、マンガン欠乏処理により最新葉、d.c.への蓄積は数十倍に増加した。③イネでの⁶²Znを用いた吸収実験では、d.c.には吸収開始後40分で到達した。亜鉛欠乏処理でd.c.への移行は10倍以上に増加した。また、亜鉛欠乏の葉での⁶²Znの移行は単調に増加するのではなく、他では見られなかった波動パターンを示した。3種の元素ともd.c.への移行は¹⁵O-水の移行(1-2分)に比べて一桁以上おそい。それが微量元素たる所以かもしれない。暗処理、アブシジン酸処理、その他の要素欠乏処理の影響の結果も報告する。

銅イオンによるフィトケラチン合成とCd耐性の阻害機構
井上雅裕, 寺岡里予, 伊藤祥子, 遠山 鴻, 城尾昌範
(愛媛大・理・生地)

トマト懸濁培養細胞はCd耐性を持ち200~1000 μMという高濃度でも成長可能である。ところが、Cuには弱く、通常50~100 μM以上の濃度で殆ど成長できない。この違いは重金属結合ペプチドであるフィトケラチン(PC)の合成と関係があると思われる。本研究はトマト細胞のPC合成とCd耐性に対するCuの影響を調べた。

以前報告した様に、トマト細胞はCd存在下でPCを多量に合成し、Cu存在下では全く合成しなかった。このため、50~100 μM Cu培地で数カ月継代培養してもCu耐性は殆ど増加しなかった。逆に、その細胞のCd耐性は野生株より低下していた。また、100~400 μMに順応し、かつPCを多量に生産可能になった細胞でも、Cd添加の有無に拘らず、Cu耐性は野生株と同程度だった。これら細胞中のPCペプチドの濃度がCuイオンの存在によって減少していることが判明した。そこで、細胞から抽出した酵素蛋白質のPC合成酵素活性に対するCuの作用を調べた結果、本酵素活性を強く阻害することがわかった。Cdは逆にその活性を数倍に高めていた。

以上の結果からCuはCdと競争的に働くPC合成酵素の阻害剤であり、それによってCd耐性を減少させることが判明した。

アルミニウム (Al) 耐性タバコ細胞株 ALT301 における抗酸化物質の増加：アルミニウム耐性機構の可能性

Saddikuti RAMA DEVI^{1,2}, 山本洋子¹, 松本英明¹
(¹ 岡山大資生研, ² BRAIN)

アルミニウム(Al)耐性タバコ細胞株 ALT301 は、親株(SL)に比較して、カルシウム溶液中での Al 処理を行なった後も高い増殖能を維持している。ALT301 における Al 耐性機構を明らかにすることを目的として、特に原形質膜損傷及び脂質過酸化について親株と比較検討するとともに、抗酸化物質についても検討した。親株では、Al 処理後の増殖期間中に原形質膜損傷と脂質過酸化が増加するが、ALT301 ではその程度が低かった。ALT301 は、通常の増殖条件において、親株よりも高いアスコルビン酸(ASA)含量とグルタチオン(GSH)含量を示した。両株において Al 処理期間中の ASA ならびに GSH 含量の変動はみられないが、Al 処理後の増殖期間において、親株の GSH 含量は 1/10 に低下したが、ALT301 株は 1/2 に低下したのみであった。以上の結果より、ALT301 の Al 耐性は、ASA や GSH 含量の増加により Al 処理後の増殖に伴う脂質過酸化や原形質膜損傷を抑制することによる可能性が考えられる。

S430

タバコ培養細胞におけるアルミニウムによって誘導されるミトコンドリアの障害について

小林由樹子、山本洋子、松本英明 (岡山大、資生研)

アルミニウム (Al) は植物根の生育を阻害するが、その毒性機構については不明である。我々は、タバコ培養細胞を用いて Al 毒性におけるミトコンドリアの関わりについて検討した。タバコ細胞の Al 処理をカルシウム溶液中で行うと、Al 添加後、細胞への Al 集積が直ちに目に見られ、9~12 時間経過した後に、カロース (β -1,3-グルカン) の分泌や増殖能の低下がみられた。細胞内のミトコンドリア活性の指標として、MTT 還元能並びに ATP 含量を用いて検討した。異なる濃度の Al を用いた 24 時間処理後の MTT 還元能ならびに ATP 含量は、Al 濃度に依存して低下し、増殖能低下の Al 濃度依存性とも一致した。さらに、経時変化をコントロール細胞と Al 処理細胞で比較すると、Al による MTT 還元能の抑制は Al 処理開始後 3 時間目から、また、ATP 含量の低下は 15 時間目以降にみられた。

以上の結果から細胞内に集積した Al は、細胞内ミトコンドリアの機能を抑制し、カロース分泌や増殖能の低下を引き起こしている可能性が示唆された。

S431

タバコ培養細胞におけるアルミニウムによるミトコンドリア障害に対する抗酸化剤による抑制効果

山本洋子、小林由樹子、力石早苗、松本英明 (岡山大・資生研)

タバコ細胞 (SL 株) の Al 処理をカルシウム溶液中で行うと、Al が細胞に集積し増殖能の低下がみられる。増殖能の低下の原因を明らかにすることを目的に、Al 処理期間中のミトコンドリア活性について検討した結果、MTT 還元能の低下と ATP 含量の低下 (小林ら、本大会で発表) に加え、ミトコンドリアの膜電位に依存する Rhodamine123 の取り込みの低下もみられた。さらに、蛍光プローブ (DCFH₂/DA) を用いることにより Al 処理に伴う細胞内過酸化水素の増加が示唆された。そこで、抗酸化剤による Al 毒性の抑制効果について検討したところ、Butylated hydroxyanisole (BHA) は、Al による増殖能の低下、ミトコンドリア機能障害、過酸化水素の増加を抑制した。従って、Al はミトコンドリアの機能障害と共に活性酸素ストレスを誘発し増殖能の低下を引き起こしている可能性が示唆された。

S432

電気的活動を指標とした幹一枝、枝一枝間の生理的相関、および、光周性の解析

中鉢誠、依田清胤、鈴木均 (石巻専修大・理工、理研・フォトダイナミクス)

ベンケイソウ科木本 (*Crassula portulaca* L.) の幹、および、3 本の枝表面に、双極電極を取り付け、3 ヶ月の間、3 秒間隔で連続的に電位を計測した。その結果、全ての部位で 24 時間の周期的な電位変動が記録された。その周期の、幹一枝、あるいは、枝一枝間での相関は、数日にわたって同期したあと、脱同期することが認められた。この点を全ての幹、枝の組み合わせについて、一日ごとの相関係数を並べ、二次元表示したところ、つぎのことが分かった。1) 幹と特定の枝との間での相関は数日周期で、同期-脱同期を繰り返す。2) 幹と特定の枝が同期しているとき、幹と他の枝は脱同期している。3) 同期している状態から徐々に位相のずれが起き、その後脱同期にいたる。これらの現象は幹、および、枝内部の生理的相関の様子を示していると考えている。そこで、この点について時間的な変化を明確に示すために、Wavelet 解析を実施した。

S433

クロレラの窒素化合物取り込みの青色光制御
神谷明男 (帝京大・薬)

青色光により誘導される現象の光受容体は、DNA photolyase, Cryptochrome, NPH1 など知られている。クロレラでは、原形質膜結合の 120Kd と 34Kd タンパクのリン酸化反応が青色光で誘導される。この現象は Protein kinase の阻害剤 Staurosporine で阻害される。クロレラの青色光で誘導されるデンプン分解・呼吸促進、硝酸取り込み・培地の酸性化現象は Staurosporine で阻害されることを以前報告した。一方、クロレラの硝酸還元酵素 (補酵素中に FAD を含む) は青色光により活性化される。同じ細胞のアンモニア取り込みは逆に青色光により阻害される。この点を以下のように解析した。アンモニアをアミノ酸に固定するグルタミン合成酵素をメチオニンサルフォキシミンで阻害する (細胞内でのアンモニア蓄積が認められる) と外部からのアンモニア取り込みは阻害される。クロレラをアンモニアで培養すると硝酸還元酵素のない細胞が得られる。この細胞はアンモニア取り込みに対する青色光阻害を示さない。これらの結果から、クロレラの青色光によるアンモニア取り込み阻害は硝酸還元酵素がその光受容体と考えられる。またクロレラのアミノ酸の取り込みも青色光により制御される。今回その光受容体についても議論する。

トウモロコシにおける光制御性リボヌクレアーゼ (RNase) の同定

黒谷賢一¹、泉井桂^{1,2} (1京都大・院・農、2京都大・院・生命科学)

トウモロコシにおいてホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの遺伝子 (*Ppc1A*)は黄化葉に光を照射して緑化する過程で、光に誘導されて発現する。また、明暗周期のもとで生育するトウモロコシ葉においては、明期にのみmRNA蓄積が見られ、暗期にはほとんど蓄積が見られない。この*Ppc1A*と光誘導性遺伝子として知られる*Cab*の発現調節機構に、転写段階の調節と同時にmRNAの安定性の調節が関与している可能性を発表者らは以前に見出した [Plant Cell Physiol. 40(4): 423-430 (1999)]。本研究においては光誘導性遺伝子の転写後のmRNA安定性調節に関わるRNaseの同定を目指し、明暗各条件下での、RNase活性をRNase activity gel アッセイを用いて調べた。まずトウモロコシ総タンパク質中より少なくとも8種のRNaseを10 kDaから45 kDaのサイズで検出し、光の有無、黄化葉の緑化により活性の変動するRNase分子種が数種類存在している事を見出した。また、総タンパク質をゲル濾過により分離した後、RNase activity gel アッセイを行い、ある種のRNaseが他の分子と相互作用している可能性を見出した。

孔辺細胞プロトプラストの青色光依存プロトンポンプ活性と zeaxanthin 含量

土井道生、島崎研一郎¹ (九州大・大教センター、¹九州大・理・生物)

気孔開口は青色光やUV-Aにより引き起こされ、これらの光は孔辺細胞中の青色光受容体により吸収される。又、この反応は赤色光が存在すると促進されることが知られている。そこで、ソラマメ孔辺細胞プロトプラスト (GCP) を材料としてプロトンポンプ活性化における赤色光の関与について又、青色光受容色素として提唱されている zeaxanthin が機能する可能性について検討した。GCPのプロトンポンプ活性は青色光やUV-Aの光強度に対してhyperbolicに依存し、同時に赤色光が存在すると青色光に対する感受性の増加と最大活性の増大が見られた。この赤色光による促進は光合成電子伝達阻害剤により抑制された。これらの結果は光合成によるプロトンポンプへのATPの供給と赤色光照射による光受容体の増加を示唆する。また赤色光照射により zeaxanthin 含量は増加し、光合成電子伝達阻害剤存在下ではこの増加は抑制された。以上の結果に基づいて気孔の青色光受容色素について議論する。

イネの *PHOT* 相同遺伝子、*OsNPH1a* と *OsNPH1b* は、光によって異なる発現制御を受けている。

鐘ヶ江弘美、Federica SAVAZZINI、M. TAHIR¹、鐘ヶ江健²、和田正三²、高野誠 (農業生物資源研究所・分子遺伝部、¹生物系特定産業技術研究推進機構、²東京都立大学・理学研究科)

PHOT 遺伝子群は、植物において光屈性に関与する青色光受容体をコードしている。私たちはこれまでに、イネから2種類の *PHOT* 相同遺伝子 (*OsNPH1a* と *OsNPH1b*) を単離して解析を進めてきた。これら2種類の遺伝子産物は、全体で54%、*PHOT* に特徴的なLOV1、LOV2、PKドメインでは70~85%の高い相同性を示した。また、*OsNPH1a* はシロイヌナズナの *PHOT1* と、*OsNPH1b* は *PHOT2* と類似していた。

黄化芽生えにおける組織別の発現を調べると、*OsNPH1a* が子葉鞘で多量に発現しているのに対して *OsNPH1b* は葉における発現の方が高かった。黄化芽生えを暗所から明所に移すと、子葉鞘に多量に存在していた *OsNPH1a* は急速に減少した。一方、葉における *OsNPH1b* の発現量は徐々に増加した。これらの結果は、*OsNPH1a* と *OsNPH1b* が、イネの黄化芽生えの子葉鞘と葉でそれぞれ特徴的な発現を示し、さらにそれらの転写産物は光によって異なる発現制御を受けていることを示している。

フィトクロムphyAによるトマト種子発芽の抑制

七條千達子、片田和也¹、田中修¹、橋本徹² (神戸大・理・生物、¹甲南大・理・生物、²神戸女子大・家政)

光は種子発芽を促進する場合と阻害する場合がある。遠赤色光 (FR) の連続照射による、種子発芽阻害の光受容体は、phyAであることを、トマトのフィトクロム欠損突然変異体を用いて明らかにした。フィトクロム反応を増幅する突然変異体 *hp-1^w* と、phyA欠損二重突然変異体 *hp-1^w, fri¹*、及び phyB1欠損二重突然変異体 *hp-1^w, tri¹* を用い、次の結果を得た。1) これらの種子を暗黒で吸水させると発芽した。2) 暗黒吸水1~3時間目のFRパルス照射で発芽は抑制されたが、その後赤色光 (R) パルスを与えると再び発芽した。3) このR/FR可逆性は、いずれの突然変異体でも認められたことから、phyAとphyB1がこの反応に不可欠であるとは考えられない。4) 暗黒吸水18時間目以後のFRパルスは発芽を抑制できなかった。これはPfr作用が、FRの打消しからエスケープした為と考えられる。5) その場合でも、連続FR照射では発芽が抑制された (High-irradiance反応)。この発芽阻害は、*hp-1^w* と *hp-1^w, tri¹* では認められたが、*hp-1^w, fri¹* では全く認められなかった。よって、トマトの発芽過程は、Low Fluence 反応により制御される初期とHigh-irradiance 反応の制御を受ける後期に分けられ、後者の光受容体はphyAであることが示された。

S438

シロイヌナズナの根における光にตอบสนองした葉緑体の発達
宇佐見健、中村賢志、望月伸悦、長谷あきら (京大・理・植物)

シロイヌナズナにおいては、COPI1, HY5 などの光シグナル因子により、根の緑化が制御されている (Deng and Quail 1992; Oyama et al. 1997)。さらに、フィトクロム B (phyB) 欠損変異体では、白色光下における根の緑化が抑制される (合田ら、日本植物生理学会 1998 年度年会)。そこで本研究では、種々の光受容体関連変異体や、phyB 遺伝子導入植物を用いてこの現象をさらに詳しく解析した。

まず、連続単色光での根の緑化を各種変異体で調べたところ、赤色光下では主に phyB により緑化が促進されること分かった。一方、連続青色光下では phyB、クリプトクロム 1 (Cry1)、クリプトクロム 2 (Cry2) の関与が示唆された。次に、暗黒下で発芽させた芽生えから地上部を切除し、根のみに赤色光を当てたところ、切り離れた根単独でも緑化した。このことから、根に存在する phyB が根の緑化を制御していることが示唆された。現在、青色光についても同様の実験を行っている。

次に、我々の研究室で作出された phyB-sGFP 遺伝子導入シロイヌナズナ (Yamaguchi et al. 1999) を用いてこの現象を調べた。これらの系統は、phyB 欠損変異株に当該遺伝子を導入したものである。予想通り、phyB-sGFP 融合タンパクを全身で強く発現する系統では、連続赤色光による根の緑化反応が認められた。また、phyB-sGFP 融合タンパクを主に根で発現する系統でも同様の結果が得られた。現在、我々のグループで作出した組織特異的に phyB-sGFP 融合タンパクを発現する系統を用いて (中村ら、本大会)、この応答の光受容体部位についてさらに詳しく解析を進めている。

S439

エンドウ SCR 遺伝子の組織特異的発現とプロモーター解析

佐々奈緒美¹、松下保彦²、丹生谷博²、中村輝子¹
(¹日本女子大・理、²東京農工大・遺伝子)

高等植物の地上部の重力応答に関する遺伝的情報を蓄積することを目的に、シロイヌナズナにおいて重力感受部位である内皮の分化に関与することが報告されている SCARECROW (SCR) ホモログをエンドウ地上部の cDNA ライブラリーから単離した。

in situ ハイブリダイゼーションによって、エンドウ SCR が茎では茎頂分裂組織および葉原基で高く発現し、根では内皮と考えられる細胞層のみで発現していることを確認した。

さらにゲノム DNA からプロモーター領域ををクローニングした。SCR の内皮特異的発現に関わる配列の解析を、SCR プロモーター領域を GFP につないだものをアグロバクテリウムによってエンドウ茎切片に感染させ、得られた毛状根を観察することで行なっている。

S440

アラビドプシスの光ストレスによる転写制御
木村光宏^{1, 2}、吉積毅¹、真鍋勝司²、松井南¹、山本義治¹ (¹理化学研究所ゲノム科学総合研究センター、²横浜市立大学総合理学研究科)

植物への強光照射は、葉緑体並びに細胞質におけるストレス防御機構として転写制御を含む様々な反応を引き起こす。この光ストレスによる転写制御の分子機構を解析するため、本研究ではルシフェラーゼレポーターを用いて、強光ストレスに対する転写応答を *in vivo* でモニタリングするシステムを構築した。本システムを用いて強光シグナル伝達系の解析を行った。

S441

アズキとレタスの細胞の成長に対する植物ホルモンと疑似微小重力の影響

小林 充、井上 雅裕、保尊 隆享¹ (愛媛大・理・生地、¹大阪市大・理・生物)

明所で生育したアズキとレタスの芽生えを用いて、茎の細胞の成長に対する疑似微小重力 (1Dクリノスタット) と植物ホルモンの影響を調べた。その結果、24~72時間クリノスタット上で生育させたアズキの芽生えは伸長成長が阻害され、茎の肥大成長が促進されていた。この疑似微小重力条件下でのアズキの伸長成長の阻害はジベレリンを根から与えることにより回復した。また、疑似微小重力条件下の茎の肥大成長もエチレン阻害剤 (AOA) によって阻害されることが明らかになった。これらの結果は、疑似微小重力によって生じるアズキの芽生えの伸長成長と肥大成長の変化にはジベレリンとエチレンが関係していることを示している。

また疑似微小重力条件下で生育させたレタスについても、第一葉と下胚軸において同様なジベレリンによる伸長成長の回復が観察された。しかし、レタスの芽生えを密閉した容器に入れて生育させた場合、ジベレリンによる伸長成長の回復はあまり見られなかった。これは蒸散流がジベレリンによる伸長成長の回復に必要であるからと思われる。

BADH 遺伝子が CMO 形質転換タバコのベタイン合成能に及ぼす影響

西村 哲、小池あゆみ、竹内由枝、山中陽子、近藤 聡
(トヨタ自動車・バイオラボ)

我々は、耐塩性を有するシロザ(*Chenopodium Album* L.)のベタイン合成機能に着目し、シロザのベタイン合成能付与のキー酵素である 2 遺伝子-コリンモノオキシゲナーゼ (CMO) 遺伝子、ベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ (BADH) 遺伝子について研究を行ってきた。

これまでに、シロザ CMO に葉緑体移行ペプチドを付与した形質転換タバコが、コリン存在下でベタインを蓄積できることがわかっている。このことは、タバコが内在の BADH 活性を有していることを示している。しかし、シロザ CMO 形質転換タバコでは、コリン 10mM を供給した寒天培地でのベタイン蓄積が $2\mu\text{mol/gFW}$ と、低いことが問題としてあがっていた。そこで、シロザ BADH がシロザ CMO 形質転換タバコのベタイン合成能を向上させ得るかについての評価を実施した。

その結果、CMO 形質転換タバコにおいて葉緑体移行ペプチドを付与した BADH を発現させることによって、 $8\mu\text{mol/gFW}$ のベタイン蓄積が可能であることがわかった。この蓄積量は、通常条件下での耐塩性植物シロザベタイン蓄積の半量相当であるが、CMO と BADH を同時に強発現させることによってさらにベタイン蓄積能を高められることが明らかとなった。

今後、ベタインの局在、発現量の制御を行うことによってさらに蓄積量を向上させ得ると期待される。

抗マンダリン抗体を用いたマンダリントタンパク質の検出

齋藤丈夫、山田晃世、三村徹郎、小関良宏

(農工大・工・生命、1奈良女子大・理・生物)

当研究室ではマンダリン植物の耐塩性に関する遺伝子の探索とその応用に関する研究を進めている。その結果、ヒルギ科のマンダリン (*Bruguiera sexangula*) の cDNA ライブラリーから大腸菌、酵母、タバコ培養細胞の耐塩性を強化する機能を有する新規タンパク質をコードすると考えられる cDNA の単離に成功した。我々は、このタンパク質を「マンダリン」と命名した。*B. sexangula* の懸濁培養細胞におけるマンダリン mRNA 量は、NaCl やソルビトールを添加した場合、急激に増加することが既に明らかになっており、このことから、マンダリンは、マンダリンが NaCl 等のストレス環境下で生育するための重大な役割を担っているものと考えられた。しかしながら、実際にマンダリントタンパク質の量が上記のストレスにตอบสนองして増大しているか?については全く明らかになっていない。そこで、本研究では、大腸菌のタンパク質発現系を利用してマンダリントタンパク質を生産させ、これを用いてウサギより抗マンダリン抗体の作成を行った。さらに、ここで得られた抗体を用いて、様々なストレス環境下でのマンダリン培養細胞の生育とマンダリントタンパク質の含量の関係を調べた。

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の転写因子 SmtB の塩基配列認識機構の解析

若松美紀、三浦晃、森田勇人、林秀則 (愛媛大院・理工・物質理)

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の転写因子 SmtB は、メタロチオネイン様タンパク質 SmtA をコードする *smtA* 遺伝子の転写を抑制するリプレッサーであると同時に、細胞内で亜鉛イオン等の重金属イオン濃度のセンサーとしても機能する。SmtB が亜鉛イオンと結合すると、オペレーター/プロモーター領域に対する親和性を失い、*smtA* 遺伝子の転写が誘導される。SmtB の認識塩基配列は、自己相補的配列を形成しており、それは 6塩基から成るリンカーにより結ばれている。またこのような配列は、*smtA* 遺伝子のオペレーター/プロモーター領域に 2箇所 (Bbs1、Bbs2) 存在している。このような配列が 2箇所存在する理由を解明する目的で、2箇所の認識配列、Bbs1 と Bbs2 に対する SmtB の親和性および形成されるタンパク質-DNA 複合体の構造の相違をゲルシフト法によって解析した。その結果、Bbs1 と Bbs2 では、SmtB と形成されるタンパク質-DNA 複合体の種類に相違がみられ、この相違には自己相補的配列中のリンカー配列の相違と、直列反復配列の有無が関与していることを明らかにした。現在、点変異を導入した SmtB を用いた場合の Bbs1、Bbs2 中の認識塩基配列に対する親和性やタンパク質-DNA 複合体形成能の変化についての解析を行うことで、それぞれのタンパク質-DNA 複合体の形成に重要なアミノ酸の同定を進めている。

シロイヌナズナ耐塩性突然変異体 *psl2* における高 Na⁺ 排出機構

加藤裕子、小林京子、榎根一夫¹、木下俊則²、島崎研一郎²、小林裕和 (静岡県大院・生活健康科学、¹ 現 基生研、² 九州大院・理・生物)

シロイヌナズナを用い、耐塩性光合成生育突然変異体 *psl2* (*photoautotrophic salt tolerance*) を 2系統得た (*Plant Cell*, 11, 1195-1206, 1999)。これらのうち、耐塩機構が未解析の *psl2* について、その機構を解析した。Na⁺ 放出を ²²Na⁺ により、植物体内への K⁺ 取り込みを Rb⁺ により、測定した。200mM NaCl 含有培地において、*psl2* における Na⁺ の植物体外への排出は、野生体のそれよりも有意に高かった。また、*psl2* のこの能力は、NaCl 処理に係わらず、恒常的に検出された。一方、脱共役剤 CCCP の培地への添加および培地の pH を上昇させる実験により、*psl2* の耐塩性が野生体と同程度まで弱くなることが観察された。以上のことより、*psl2* においては、細胞外 NaCl 濃度が高い場合も、H⁺ をサイトゾルから放出して細胞膜を介した H⁺ 勾配を形成し、Na⁺/H⁺-アンチポーターにより、Na⁺ が排出されるという機構が想定された。細胞内 H⁺ 濃度の低下は、細胞膜 H⁺-ATPase、液胞膜 H⁺-ATPase、および液胞膜 H⁺-PPase の関与が考えられる。*psl2* の耐塩性は継続的で、200mM NaCl 存在下で開花まで可能であることから、細胞膜 H⁺-ATPase の関与が最も有力であると考えた。ウェスタンブロット法により、根における細胞膜 H⁺-ATPase の含量を比較したところ、*psl2* と野生体との間に、有意な差は見出せなかった。したがって、他の機構について検討を加えた。

S446

植物、動物、バクテリアの Na^+/H^+ アンチポーターと相同性の高い*Synechocystis* PCC 6803の Na^+/H^+ アンチポーターの分子的性質

濱田玲、日比野隆¹、石川浩¹、中村辰之介²、Rungaroon Waditee、高倍昭洋（名城大・総合研、¹名城大・理工・化学、²千葉大・薬・膜機能）

植物が高塩濃度下でも生育するためには、 Na^+ の細胞外への汲み出し、または液胞への蓄積が重要である。 Na^+/H^+ アンチポーターはこれらに関与する重要な蛋白質と考えられている。ごく最近、液胞膜のアンチポーター(AtNHX1)に引き続き、細胞質膜のアンチポーターと思われる遺伝子(*sos1*)が単離された。*Synechocystis* PCC 6803には、少なくとも5種類の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子が存在するが、我々は、その中に植物、動物、バクテリアのものと同様の高いものが存在する(*SynNhaP*)ことを見出した。*SynNhaP*は大腸菌の欠損株を相補して、0.2M NaClでも生育した。*SynNhaP*は Na^+/H^+ 及び Li^+/H^+ の交換活性をもち、しかもその活性は、pH5~9の広い範囲で高い値を示した。*SynNhaP*のAsp138をGluあるいはTyrに変換するとアンチポーター活性は消失した。これらの結果とともに*SynNhaP*のトポロジーモデルについても報告する。

S447

cDNA-AFLP法によるダイズのイオンストレスおよび浸透ストレス応答性遺伝子の単離

梅澤泰史、水野幸一、藤村達人（筑波大・農工系）

植物における塩ストレスの影響は、「イオンストレス」と「浸透ストレス」に分けられる。植物の耐塩性機構を解明するためには、まずこの2つを分離することが必要であると考え、以下の実験を行った。NaCl処理（イオン+浸透ストレス）あるいはPEG処理（浸透ストレス）を24時間施したダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) からストレス応答性遺伝子を別々に単離することで、これら二つの影響を分離・解析することを試みた。遺伝子単離法としてcDNA-AFLP法を採用し、より解像度の高い解析を目指して若干の改良を行った。cDNA-AFLP法によって、ダイズから最終的に143個のcDNA断片を単離し、*Glycine max* Stress-Responsive genes (GSRs) と名付けた。塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、約60%が既知の遺伝子と相同性を示した。それらは、推測される機能から、イオン輸送、炭水化物代謝、アミノ酸代謝、シグナル伝達系、酸化還元酵素、二次代謝、病害・傷害応答、プロテアーゼ類、ストレス応答、老化、ヒストンおよびその他の12グループに大別できた。GSRの分布状況から、ダイズではイオンストレス応答と浸透ストレス応答に関与する遺伝子がほぼ同数であるという結果を得た。このことは、塩ストレス下のダイズにおいて、浸透ストレスと同等か、もしくはそれ以上にイオンストレスの影響が大きいことを示している。

S448

耐塩性ラン藻(*Aphanothece halophytica*)の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子と塩ストレス防御

Rungaroon Waditee、日比野隆¹、田中義人¹、濱田玲、中村辰之介²、Aran Incharoensakdi³、高倍昭洋²（名城大・総合研、¹名城大・理工・化学、²千葉大・薬・膜機能、³チュラロンコン大・理・生化）

*A. halophytica*は3 MのNaCl存在下でも生育可能なユニークなラン藻である。*A. halophytica*の培養液のNaCl濃度を増加させると、急速な Na^+ イオンの取込みとそれに続く、 K^+ イオンの蓄積、最後にベタインの合成が生じる。培養液のNaCl濃度を急激に減少させるとベタイン濃度も減少する。この減少には、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素が関与している。今回、*A. halophytica*はの塩ストレス防御における Na^+/H^+ アンチポーターの役割の解明を目指し Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子の単離を試みた。*A. halophytica*のゲノムライブラリーを大腸菌のアンチポーター欠損株を用いて相補実験を試みたが遺伝子は単離できなかった。PCR法を用いて遺伝子の単離を試みた。これらの結果について報告する。

S449

ヨシ K^+ トランスポーター (PcHAK) cDNAの単離と機能解析

高橋童一、長岡修一、高野哲夫（東大・アジアセンター）

ヨシ (*Phragmites communis*) は河口のような汽水域から河川敷のような淡水域まで、様々な立地に分布している野生植物であり、中国の塩類集積地にもその分布が認められている。塩類集積地（塩池、南皮）に自生しているヨシは、河川敷（宇都宮）に自生しているものに比べて、土壌中のNaCl濃度が2倍以上の条件下でも生育することが確認されており、両者を比較することは中生植物の耐塩性メカニズムを探る手がかりになると考えられる。

そこで本研究は、 Na^+ の流入および K^+ との選択性に関与していると考えられる K^+ トランスポーターに着目し、各地域のヨシの根からHAKタイプ K^+ トランスポーターcDNA (PcHAK cDNA) を単離した。

発現解析を行ったところ、 K^+ を含まない養液で生育させたものよりもコントロールの方が発現量が多く、NaCl存在下では地域間で異なる発現パターンを示した。

続いて K^+ トランスポーターを欠失させた酵母にPcHAKを導入し、 K^+ の吸収特性を調べた。

S450

アルミニウム耐性タバコ培養細胞株における脂質過酸化抑制機構の解析—グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)について

山口雪子¹,山本洋子²,田中宏明²,松本英明² (¹岡山短大,²岡山大・資生研)

タバコ培養細胞SL株より分離されたアルミニウム(AI)耐性株ALT107は、種々の脂質過酸化誘発剤に耐性を示す。ALT107株の示す高い脂質過酸化抑制能に関わる酵素として、GPx活性を見い出している。ALT107株のGPx活性は、過酸化水素(H₂O₂)を基質とした場合、動物のGPxと同様にモノヨード酢酸やメルカプトコハク酸により阻害された。さらに、陰イオンクロマトグラフィーによる分画によって、ALT107株のGPx活性は、H₂O₂を基質とするものと、リノール酸ヒドロペルオキシド(LOOH)を基質とするものとに分かれること、LOOHを基質とするものはGST活性と共に溶出するGSTのアイソザイムの一つである可能性を見出した。このように、ALT107株では、親株に比べ2種類のGPx酵素の活性を高めることにより高い脂質過酸化耐性を獲得していると考えられる。

S451

シロイヌナズナ胚軸カルスのアクティベーションタグラインの作製と耐凍性に関わる突然変異体の分離

田坂恭嗣^{1, 2}, 大坪蘭子¹, 和田元¹ (¹九大院・理・生物, ²生研機構基礎研究推進事業)

シロイヌナズナを低温処理(2°C・明・5日間)すると糖やプロリン、適合溶質等を蓄積し耐凍性が付与されることが知られている(低温馴化)。本研究では、低温馴化に関わっている遺伝子をクローニングすることを目的として、耐凍性が向上したシロイヌナズナ突然変異体をアクティベーションタギング法を用いて分離したので報告する。35Sプロモーターのエンハンサーを備えたベクターpPCVICEn4-HPTを使って約33,000の胚軸カルスを形質転換し、アクティベーションタグラインを作製した。未馴化の野生株のシロイヌナズナ胚軸カルスは-20°C凍結により完全に死滅するのに対し、馴化カルスでは約5%が生き残った。そこで、ラインの中から低温馴化させなくても高い耐凍性を示すラインを分離するために、ラインをいきなり-20°Cで凍結しても生き残るラインをスクリーニングした。その結果、耐凍性が向上した突然変異体を80ライン分離することが出来た。

S452

冬小麦WAS-3aタンパク質の雪腐れ病菌への効果
桑原慎子、竹澤大輔、藤川清三¹、荒川圭太(北海道大・低温研、¹北海道大院・農)

冬小麦の低温馴化過程で蓄積する病原菌関連タンパク質の雪腐れ病菌抵抗性における役割を明らかにするために、私達は、低温馴化によってアポプラストに蓄積する抗菌性タウマチン様タンパク質WAS-3aの解析を行っている。異なる分類群に属する雪腐れ病菌に対するWAS-3aの抗菌作用を調べたところ、*Microdochium nivale*の菌糸の成長を阻害したが、*Typhula* spp.や*Sclerotinia borealis*に対する阻害効果は見られなかった。これらの雪腐れ病菌は異なる細胞壁成分を持つことから、菌から調製した細胞壁とWAS-3aの親和性を調べたところ、属によって親和性に差が認められた。これらの結果をふまえて、WAS-3aの抗菌活性と雪腐れ病菌の細胞壁に対する親和性との関係について考察する。

S453

凍結耐性におけるグリシンベタインの役割：
形質転換植物を用いたアプローチ

坂本 敦, Zoran JEKNIC¹, Raweewan YUWANSIRI¹, Tony H.H. CHEN¹, 村田紀夫(基生研, ¹Oregon State Univ.)

私たちは以前に細菌由来のコリンオキシダーゼ遺伝子(*codA*)の導入がアラビドプシスに適合溶質グリシンベタイン(GB)の合成能を付与するとともにその凍結耐性を増強することを報告した^{*}。凍結耐性におけるGBの役割を明らかにすることを目的に、葉緑体、細胞質、あるいはその両コンパートメントでベタインを産出する形質転換アラビドプシスを作出した。またプロリンを過剰生産し恒常的に凍結耐性であるアラビドプシスの*eskimo1*変異株にも*codA*遺伝子を導入し、GBを蓄積する本変異株の形質転換植物を得た。これらの形質転換アラビドプシスの凍結耐性を、GBの蓄積量および細胞内局在性、またGBによる凍結耐性の増強に対する*eskimo1*変異の影響と関連づけて議論する。

^{*}Sakamoto et al. (2000) *Plant J.* 22: 449-453.

S454

植物型 Cold shock protein (Csp) の構造と低温馴化における機能

中南健太郎^{1,2}、豊増知伸¹、今井亮三² (¹山形大・農、²農水省・北海道農試)

コムギをはじめとする越冬性植物では、長期間の低温処理により高度な耐凍性を獲得する低温馴化現象が知られている。しかし、低温馴化発現の分子機構に関しては不明な点が多い。大腸菌など原核生物では、低温ショックにより誘導される一群の Cold shock protein (Csp) の存在が知られている。これらは、一本鎖 DNA または RNA に結合し、転写因子または RNA シャペロンとしての機能が推定されている。

今回、我々は冬コムギの低温馴化クラウン組織より、大腸菌の *cspA* ときわめて相同性の高いクローン (*wcsp1*) を単離した。*wcsp1* は 142 アミノ酸をコードし、N 末端側は Csp 及び Y-box タンパク質の RNA/DNA 結合ドメインと相同性の高い部分を持ち、C 末端側は RNA 結合タンパク質に多く見られる Gly-rich 領域からなっている。*wcsp1* の低温馴化過程における誘導を調べたところ、低温処理 3 日目までに顕著な発現が見られ、その後、高度な耐凍性を獲得する 14 日目までそのレベルは維持された。詳細な発現解析及び機能解析についても併せて報告する。

S455

季節的低温馴化過程でクワ皮層柔細胞に蓄積する 18kD 細胞内 PR タンパク質

宇梶徳史^{1,3}・竹澤大輔²・荒川圭太²・藤川清三³
(¹生研機構、²北海道大・低温研、³北海道大・院農)

クワ皮層柔細胞から抽出した可溶性画分を SDS-PAGE で解析したところ、季節的低温馴化過程と並行して蓄積する 18kD の分子サイズをもつポリペプチドバンドの存在が明らかとなった。このポリペプチドは pI 5.0 付近の等電点を有し、少なくとも 2 つの isoform が存在する。これらのポリペプチドは 80% 飽和硫酸処理しても塩析されず、この可溶性画分を疎水性カラムで分画することにより容易に精製された。特異抗体を用いた免疫プロットにより、18kD タンパク質の冬季特異的な蓄積が確認された。抗体スクリーニング法により得られた cDNA は細胞内 PR タンパク質と高い相同性を持つことが明らかとなった。18kD タンパク質の冬季特異的な蓄積と、クワ皮層柔細胞における耐凍性獲得の関係について議論する。

S456

ディファレンシャルディスプレイを用いたレンゲツツジの耐凍性に関する遺伝子の単離

中村敏英^{1,2}、西尾直美^{1,2}、石川雅也¹ (¹農業生物資源研究所・植物保存、²生研機構)

越冬植物は、気温が低下するにつれて徐々に耐凍性を獲得 (低温馴化) する。我々は耐凍性機構を解明するために、低温馴化の初期過程で発現する遺伝子の単離を行った。

レンゲツツジの内鱗片を用いて低温馴化特異的に発現誘導される遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法によって探索した。480 種の RAPD プライマーを用いて探索し、これまでに 137 クローンを単離した。単離した遺伝子の塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った結果、そのほとんどが機能不明なタンパク質をコードしていた。

現在、単離した遺伝子の発現様式について解析を進めている。

S457

低温誘導性 *rbpA1* 遺伝子の 5' 非翻訳領域に結合するタンパク質の解析

圓山恭之進、佐藤直樹 (埼玉大・理・分子生物)

シアノバクテリア *Anabaena variabilis* M3 株には、9 個の RNA recognition motif タイプの RNA 結合タンパク質遺伝子 (*rbp* 遺伝子) が存在する。その内の 1 つの *rbpA1* 遺伝子は、低温誘導性であり、5' 非翻訳領域 (5'-UTR) には特徴的な 4 つの保存領域が存在する。ゲルシフト解析の結果、この 5'-UTR の DNA 塩基配列には結合するタンパク質が存在し、生育温度の違いにより結合するタンパク質複合体が異なる事が解った。高温条件で培養した細胞から 5'-UTR に結合するタンパク質複合体を精製し、2 種のタンパク質の N 末端配列を同定した。それらは、SSB タンパク質と新規タンパク質 CRR タンパク質であった。大腸菌で発現し得られた CRR タンパク質は、DNA との結合性を示した。現在このタンパク質が *rbpA1* 遺伝子の転写調節にどのように関わるかを遺伝子破壊株等の作成により解析している。