S458

葉緑体型 ω-3 脂肪酸不飽和化酵素 (FAD8) の温度依存的発現制御に関わる遺伝子機能領域の同定

松田修, 射場厚（九大・院・理・生物科学）

葉緑体を構成する膜脂質は多不飽和脂肪酸であるトリエン脂肪酸を非常に多く含むが、その含量は生育の温度環境により大きく変動する。このため、葉緑体膜脂質を占めるトリエン脂肪酸含量の制御は、温度環境に対する植物の適応性維持に重要な意味を持つものと予想される。ω-3 脂肪酸不飽和化酵素はトリエン脂肪酸合成における鍵酵素であり、シロイヌナズナではその葉緑体型アイソザイムが *FAD7* および *FAD8* の２つの遺伝子によりコードされる。これらの遺伝子は構造的には非常に類似しているにも関わらず、生育温度に対し異なったレスポンスを示す。とりわけ *FAD8* はトリエン脂肪酸含量の変化と同調した発現様式を示すため、その制御機構は植物の温度感知およびシグナル伝達プロセスと密接に関係している可能性が示唆される。本発表では、*FAD7*、*FAD8* 両遺伝子間の様々なキメラ遺伝子を葉緑体型 ω-3 酵素の欠損変異体において発現させる実験系を用いて得られた、温度依存的発現制御に関わる ω-3 遺伝子の機能領域に関する知見を報告する。

S459

光合成の熱失活に対する葉緑体局在性低分子量熱ショックタンパク質の保護作用

呉　国江、李 炳顯、徳富（宮尾）　光恵
（農水省・生物研）

葉緑体局在性低分子量熱ショックタンパク質（smHSP）を構成的に発現する形質転換タバコの成熟葉を用いて、光合成の熱失活に対するsmHSPの効果を検討した。光合成系のうちRubisco activaseが最も熱失活を受けやすく、40℃以下の短時間（5-10分間）の熱処理で失活する。40-50℃の熱処理では光化学系II（PSII）が選択的に失活する。形質転換タバコでは、非形質転換体に比べて、Rubisco activaseとPSIIの熱失活がともに緩和されることが分かった。また、smHSPは40℃以下では水溶性であったが、40℃以上の熱処理でチラコイド膜に結合することがわかった。Rubisco activaseの失活とPSIIの失活はそれぞれ、葉緑体のストロマ内とチラコイド膜内で起こる現象である。以上の結果は、smHSPは二つの異なるメカニズム、すなわち、１）40℃以下ではストロマ内で水溶性の高分子量分子シャペロニンとして、２）40℃以上ではチラコイド膜に結合して膜構造を安定化することによって、光合成系を熱失活から保護する可能性を示唆している。

本研究の一部は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた。

S460

耐塩性ラン藻(*Aphanothece halophytica*)DnaK遺伝子導入タバコの高温ストレス耐性

田中義人、小野清美[1]、日比野隆、鈴木茂敏[2]、中村敏英[3]、高倍鉄子[3]、高倍昭洋[1]（名城大・理工・化学、[1]名城大・総合研、[2]名城大・農・生物資源、[3]名古屋大院・生命農・生物資源）

3 M NaCl 存在下でも生育可能な*A. halophytica*のDnaK1遺伝子は721個のアミノ酸からなる蛋白質をコードし、カルボキシ末端の約65個のアミノ酸が他の生物のDnaKより長い。*A.halophytica*のDnaK1は、*Synechococcus* PCC 7942のDnaKとは異なり、高塩濃度下においても高い蛋白質フォールディング活性を持っていること、また、DnaK蛋白質を過剰発現させたタバコは、塩ストレス耐性が向上することを明らかにしてきた。今回、この形質転換体の高温ストレス耐性について検討した。形質転換タバコ及びコントロールタバコとも、室温での発芽率は同じであったが、40℃ではコントロールタバコの発芽率は27%であるのに対し、形質転換体では80%が発芽した。吸水過程の高温処理でも類似した現象がみられた。また、高温ストレス下における、生育速度、CO_2固定速度、光合成電子伝達速度、蛋白質含量の変動についても検討した。本研究はPROBRAINのサポートを受けた。

S461

ランソウの低温馴化に果たす HtpG の役割

ホサイン モタロブ, 仲本 準（埼玉大・理・分子生物）

The heat shock protein HtpG is homologous to members of the Hsp90 protein family of eukaryotes and is essential for basal and acquired thermotolerance in cyanobacteria. In this study we have examined the role of HtpG in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942, in the acclimation to low temperatures. The inactivation of the *htpG* gene resulted in slower growth than the wild type at 20°C, and no growth at 16°C, both of which became apparent after one to two days at these temperatures. Wild type cells were able to resume growth without a lag period when shifted to 30°C after 5 days at 16°C, while the *htpG* mutant displayed a detectable lag. After the shift from 30°C to 16°C, the rate of photosynthesis in the wild type decreased initially and then recovered to 60% of the level at 30°C, while the rate in the mutant was inhibited but did not recover. Although there was no detectable increase in the level of the *htpG* mRNA and its protein at 20°C, expression of the *htpG* gene was induced by the shift down to 16°C. Overall, our results demonstrate that the HtpG protein, which has low constitutive expression at 30°C and 20°C, and is induced moderately at 16°C, contributes significantly to the ability of cyanobacteria to acclimate to low temperatures.

S462

ランソウの熱ストレス応答に関与する新規な熱ショック遺伝子 *orf7.5* の解析

石川南都子，仲本 準（埼玉大・理・分子生物）

我々は、*Synechococcus* sp. PCC 7942 から熱ショックで発現が（少なくとも転写レベルで）誘導される新規な遺伝子をクローニングした。この *orf7.5* 遺伝子の破壊により、穏やかな高温においても生育が著しく阻害され、致死温度における生存率や獲得性の熱耐性も低下することを既に報告した（石川・仲本、1999 年度年会）。*orf7.5* 変異株においては、*groEL* 及び *htpG* 遺伝子転写産物の熱ショックによる蓄積が顕著に阻害されていたことから、*orf7.5* が他の熱ショックタンパク質（Hsp）遺伝子の発現調節に関与することが示唆された。本研究では、*orf7.5* がグローバルな、ランソウ Hsp の発現調節因子であると仮定して、*orf7.5* が確かにタンパクとして翻訳され、RNA ではなくタンパクとして他の Hsp の発現を調節し高温耐性に関与するのかどうかを調べることにした。現在、Orf7.5 抗体を作製しイムノブロット法でランソウ抽出液中の Orf7.5 タンパクを解析している。また、野性株の *orf7.5* 遺伝子を変異株ゲノムに戻して表現型の回復を調べると共に、フレームシフトやナンセンス変異を起こした *orf7.5* 遺伝子では表現型が回復しないかどうかを解析している。

S463

葉緑体型グルタミン合成酵素(GS2)遺伝子を導入したイネの強光・高温ストレスとGS２の発現

小野清美、田中義人[1]、林泰行[2]、田中章[2]、高倍鉄子[3]、高倍昭洋（名城大・総合研究所、[1]名城大・理工、[2]植物工学研究所、[3]名古屋大院・生命農・生物資源）

グルタミン合成酵素(GS)は、Glu、ATP、アンモニアからGlnを合成する反応を触媒する窒素代謝のキー酵素である。葉緑体型のGS2は、光呼吸にも関与し、塩ストレス等による気孔の閉鎖に伴うCO_2取り込み阻害時に重要な役割を果たすと考えられる。実際、イネのGS２遺伝子をイネに導入した形質転換体を作り、塩ストレス耐性について検討したところ、GS2の発現量の増加は僅か（約1.5倍）ではあるが、塩ストレスの耐性が増加することが明らかになった。今回、同じ形質転換体を用いて、強光・高温ストレスとGS２の発現を植物の発育段階との関連で検討した。GS２を過剰に発現している若い形質転換体は、コントロールイネよりも成長が速かった。一方、GS２の発現量が減少している形質転換体は逆の結果を示した。強光・高温ストレス耐性とGS２発現量の関係をイネの発育段階との関連で調べた結果について報告する。

S464

エチレン合成系酵素の anti-sense DNA を用いた大気汚染抵抗性植物の育成と特性解析

伊藤常雄、中嶋信美[1]、玉置雅紀[1]、青野光子[1]、久保明弘[1]、鎌田博、佐治光[1]（筑波大・生物、[1]国立環境研）

光化学オキシダントの主成分であるオゾンを植物に暴露すると、エチレンが急激に生成し、可視障害が生じる。オゾン暴露前に阻害剤を用いてエチレン生成を抑制するとオゾンによって生じる障害が減少することから、エチレン生成量によって植物のオゾン感受性が決定すると考えられている。本研究はトマトのオゾン誘導性 ACC synthase の anti-sense cDNA（*AS-ACS6*）を用いてエチレン生成を抑え、オゾン抵抗性植物を作出することを目的とした。

アグロバクテリウム法によって *AS-ACS6* をタバコに導入し、*AS-ACS6* をホモに持つ T2 世代の形質転換体を 7 系統得た。これらを 0.2ppm のオゾンに 6 時間暴露したところ、オゾン暴露によって生じる可視障害及び、エチレン生成が wild type より減少したものが 3 系統得られた。また、この 3 系統についてはエチレン生成量の減少と可視障害の減少との間には相関が見られた。得られた 3 系統は wild type と比べてオゾン暴露によって引き起こされる光合成活性の低下も抑えられていた。以上の結果から、*AS-ACS6* を導入した形質転換体はオゾンによって生じるエチレン生成が抑制されたため、オゾンに対する抵抗性を増したと考えられる。

S465

UV-B 照射による緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の光化学系 II 活性の阻害と DNA の損傷について

栗芙沙恵、高柳雅幸、村山真智子、[1]石垣靖人、[1]二階堂修、星名哲（金沢大・理・生物、[1]薬・薬学）

オゾン層の減少によって地球上に到達する紫外線（UV-B、290～320nm）の量が増加している。UV-B は、植物に有害な影響を与えることがよく知られている。例えば UV-B 照射 によって 光化学系 II（系 II）活性の低下、Rubisco、ATPaseの阻害、系 II 反応中心タンパク質（D1、D2）の分解、DNAのピリミジンダイマーの形成（DNA の損傷）などがおこる。しかし、系 II 活性の阻害と DNA の損傷の関連性についてはわかっていない。そのため本研究では系 II 活性、D1、D2 の分解、DNA の損傷に焦点を当て、UV-B による影響を調べた。

材料は *Chlamydomonas reinhardtii* を用いた。2時間の UV 処理によって、系 II 活性（Fv/Fm）が約 50～60%、更に 4 時間の処理で 30～40% に低下し、D1、D2 含量も減少した。細胞から抽出した全 DNA の損傷は 2時間照射でわずかであったが、4 時間で急に増加した。また、UV処理の後、可視光下に移すと系 II 活性が約 80% まで回復した。

なお、全 DNA から核 DNA、葉緑体 DNA を分画し、それらのダイマーの形成について、現在検討中である。

S466

PROMOTER ANALYSIS OF *WIPK* – A TOBACCO WOUND INDUCED MAP KINASE

Yunkiam YAP, Nozomu KOIZUMI, Tomonobu KUSANO, Hiroshi SANO; Res. & Edu. Ctr. For Genetic Information, Nara Institute Of Science & Technology, 8916-5, Takayama, Ikoma, Nara 630-0101.

A MAP kinase, WIPK (Wound Induced Protein kinase) is transcriptionally induced upon mechanical wounding. In order to locate the wound responsive cis–elements, and to understand the regulation mechanism of *WIPK*, TAIL-PCR was used to clone its 5' upstream region. A 1.0kb promoter region was cloned. Four types of promoter-GUS reporter fusion were constructed and transformed into *N. tabaccum*. Transgenic plants containing the 1.0kb full-length *WIPK* promoter-GUS construct showed wound responsiveness by accumulation of blue stain around the wounded leaf area. Analysis of different *WIPK* promoter deletion transgenic plants by northern hybridization and β -glucuronidase enzymatic assay showed that a 0.4kb promoter region was sufficient for transient induction of *WIPK* locally and systemically. These results suggest that cis-elements for local and systemic wound response of *WIPK* are located within the 0.4kb promoter region.

S467

傷害誘導性タバコペルオキシダーゼ*tpoxN1*遺伝子は維管束部および表皮組織において長期間発現する

佐々木克友[1,3]、平賀勧[1,3]、伊藤浩之[1]、松井博和[1]、大橋祐子[2,3] ([1]北大院・農・応生科、[2]農業生物資源研、[3]JST・CREST)

タバコペルオキシダーゼ*tpoxN1*の転写産物は，葉において傷害後0.5~1時間で蓄積するが，根では恒常的に発現している (Hiraga et al. 2000)．今回，我々が*tpoxN1*遺伝子の傷害誘導を，異なった組織，および器官で調べたところ，茎で最も強いことが明らかになった．そこで，茎を用いて，既知の傷害誘導性のシグナル物質，植物ホルモン，および環境刺激に対する*tpoxN1*の影響発現への影響を調べたが，全く応答していなかった．この結果は，以前，その一部について葉で観察した結果と同じであった．これらのことから，*tpoxN1*の発現には，未知の傷害誘導を担うシグナル伝達経路が使われていると考えられる．また，プロテインキナーゼ/フォスファターゼ阻害剤，タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドの処理等により，濃度依存的に*tpoxN1*の傷害後の転写産物の増加が減少していた．更に，*tpoxN1*プロモーター::GUS植物を作成し，組織化学的にGUS活性の解析を行った．結果，*tpoxN1*の転写産物の傷害誘導は維管束部及び表皮組織において観察され，またその誘導は傷害後，長い期間にわたり持続することが明らかとなった．

S468

TMV 感染によるタバコ過敏感反応において WIPK の活性化はジャスモン酸の蓄積に先行して起こる

瀬尾茂美，大橋祐子（生物研・分遺，CREST）

植物の過敏感反応（HR）は，病原体を感染部位に封じ込めるための積極的な細胞死であり（結果として壊死病斑ができる），典型的な病害抵抗性反応である．病斑形成に伴う酸性及び塩基性 PR タンパク質遺伝子群の誘導に関しては，前者は主にサリチル酸が後者は主にエチレンやジャスモン酸（JA）が関与することが示唆されているが，JA 蓄積やその機構に関する知見は限られている．そこで，タバコモザイクウイルス（TMV）に感染したタバコ（TMV 抵抗性遺伝子 *N* を有する）における同調的 HR 誘導系を用い，病斑形成における JA 蓄積を調べた． JA は病斑出現の約 4 時間前に蓄積し始め，病斑の出現と共にその内生量は最大に達して以後減少した．この JA の蓄積は塩基性 PR 遺伝子群の転写産物の蓄積に先行した．また，傷害応答において JA の上流因子として機能することが示唆されている WIPK の活性化を調べたところ，このキナーゼは JA の蓄積に先行して活性化されること，またこの活性化に先だって WIPK の転写産物が蓄積することがわかった．これらの結果は，TMV によるタバコの HR において，WIPK→JA→塩基性 PR 遺伝子群のシグナル伝達系が働いていることを示唆する．

S469

ジャガイモ塊茎および葉におけるエリシター誘導性遺伝子群のディファレンシャルハイブリダイゼーション法による探索

中根栄一・吉岡博文・川北一人・道家紀志（名大院・生命農学・資源生物機能）

ジャガイモ植物を疫病菌菌体壁成分 (HWC)エリシターで処理すると、局部的または全身的に獲得抵抗性が誘導される。防御応答に関わる遺伝子を探る目的で、HWC または水で処理した塊茎組織より Total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて調製した cDNA プローブを用いて differential hybridization を行った。塊茎組織 cDNA ライブラリーに由来する約 2 万プラークから 96 個の cDNA を HWC 応答性遺伝子の候補として単離した。これらのクローンの塩基配列を部分的に決定したところ、細胞壁補強酵素、DNA 結合タンパク質、プロテアーゼインヒビター、酸化還元反応酵素、一次代謝系酵素またはモノオキシゲナーゼ等と相同配列を含むクローンが認められた。一部のクローンを用いてノーザン解析した結果、NADPH-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC)、NAD(P)H-キノンオキシドリダクターゼ (NAD(P)H:QR)、および 26S プロテアソーム AAA-type ATPase の転写が HWC 処理ジャガイモ塊茎組織で誘導された。さらに、PDC および NAD(P)H:QR は、HWC 処理上位葉においても誘導が認められた。

S470

タバコのTMV による過敏感反応初期に、応答する遺伝子の単離と特徴付け

依田寛、小川幹弘、秋山顕治、小泉望、草野友延、佐野浩（奈良先端大・遺伝子教育センター）

タバコモザイクウイルス（TMV）に対する抵抗性遺伝子であるN 遺伝子を持つタバコは、TMV 感染に対して過敏感反応を起こす。この反応は、N 遺伝子が温度依存的に働くため高温（２６℃以上）では起こらない。N 遺伝子の温度依存性を利用し、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法により、過敏感反応の初期に誘導される遺伝子群を単離した。

単離した遺伝子のうち、クローンA3 は単一のWRKY モチーフを持つジンク・フィンガータンパク質であり、核に局在し、W-box に結合する。このことから転写因子として機能すると推測されたが、A3 単独では転写活性化能は認められなかった。もう一つのクローンA4 は、オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）をコードしていた。ODC はポリアミン合成系で働く遺伝子の一つであり、他のポリアミン合成遺伝子の発現を調べたところ、それらもTMV 感染により誘導された。また、ODC の阻害剤処理により、形成される壊死斑が未処理に比べ、小さくなった。

今回、以上の２つのクローンについて報告する。

S471

タバコ Rac 遺伝子過剰発現体における PR 遺伝子発現の変化

加藤丈幸，小林一成（三重大・生物資源）

低分子量Ｇタンパクの Rac は、アクチン細胞骨格や NADPH オキシダーゼの制御を通して細胞の極形成や H_2O_2 生成に関与することが主に動物細胞で明らかにされている。我々は、タバコに病原菌を接種すると Rac 遺伝子の発現量が変化することを見出し、Rac が植物の感染防御応答に何らかの役割を果たしていると考えている。本研究では、タバコ Rac の機能を明らかにする一環として、タバコ Rac3 遺伝子を過剰発現する形質転換体の解析を行った。過剰発現体における PR1a 遺伝子の発現を調べた結果、親株ではベンゾチアジアゾール（BTH）によって誘導的に PR1a が発現するのに対し、形質転換体では無処理でも自発的に発現していた。また、BTH 感受性や非病原菌接種による PR1a の誘導が、過剰発現体では増高していた。一方、傷害刺激を与えても PR1b の発現は認められず、PR1a の発現も抑制された。以上の結果より、Rac は病害応答におけるシグナル伝達系においてサリチル酸経路とジャスモン酸経路の間のクロストークを制御している可能性が示唆された。

S472

TrEnodDR1 遺伝子を導入した形質転換クローバにおける根粒着生能の解析

石場智美，鈴木章弘[1]，阿部美紀子[1]，内海俊樹[1]，東　四郎[1]（鹿児島大・院・理工・生命化学，[1]鹿児島大・理・生命化学）

クローバ根粒菌 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 4S の *nod* 遺伝子に応答して発現量が変動するクローバの遺伝子を differential screening により既に単離している。本研究ではそれらの中から *nod* 遺伝子により発現が抑制される遺伝子 *TrEnodDR1*(Early nodulin down regulation 1)を導入した形質転換体を作出し，根粒着生能について解析した。すなわち本遺伝子を sense および, antisense の方向で CaMV35S プロモーターに連結し，*Agrobacterium* 法によってクローバに導入し，形質転換クローバを得た。それを用いて根粒菌接種試験を行ったところ control の個体は根 1 本あたり平均約 3.8 個の根粒が着生しており，CaMV35S プロモーターの下流に sense 向きに連結した個体は control の個体に比べて根粒がほとんど着生しておらず，逆に antisense 向きに連結した個体では根 1 本あたり平均約 15.3 個で control の個体に比べて約 4 倍の根粒着生が確認された。さらに，窒素固定活性を測定したところ，sense の個体からは窒素固定活性がほとんど検出されなかったのに対し, antisense の個体は窒素固定能を有していることがわかった。現在，形質転換再生体における *TrEnodDR1* 遺伝子の発現解析を行っており，それについても報告する。

S473

イネ TRXh を発現するタバコにおける変異型 ToMV の細胞間移行について

守智子[1]、川上茂樹[2]、林浩昭[1]、米山忠克[1]、渡辺雄一郎[2]、藤原徹[1,3]（[1]東大院・農・応生化、[2]東大院・総文・広域、[3]PRESTO,JST）

tomato mosaic tobamovirus (ToMV) は感染細胞から隣接細胞への細胞間移行に、移行タンパク質（MP）を必要とする。ToMV-MP の 37 番目のセリン残基をアラニン（37A）、グルタミン酸（37E）、トレオニン（37T）に変えると、*N. benthamiana* 及びタバコにおいて細胞間移行能力を持たないことが報告されている (Kawakami et al., 1999)。

またイネチオレドキシン h (TRXh) を発現する形質転換タバコは野生型のタバコに比べ、葉肉細胞の原形質連絡の分子量限界が増大している（1999 年度年会）が、MP を持たない TMV の細胞間移行は観察されない。TRXh を発現するタバコにおいて、変異型 MP を持つ ToMV が細胞間移行をするかどうかを、外被タンパク質の部分に導入した GFP の蛍光で観察をした。その結果、TRXh タバコでは野生型タバコと比べ、2 細胞以上にGFP の蛍光が拡がっている頻度は、37T では変わらなかったが、37E では高かった。

S474

リンドウ由来の抗菌性タンパク質の精製と遺伝子のクローニング

木場章範、西原昌宏、大宮香織、長坂静、阿部善子、山村三郎（財団法人・岩手生物工学研究センター）

遺伝子工学的手法による耐病性植物の作出を目的に研究を進めている。今回、灰色かび病菌の発芽・生育阻害を指標に、リンドウ葉より抗菌性タンパク質を単離し、解析した結果を報告する。リンドウ葉より硫安塩析、SP-sepharose カラム、逆相カラムを用いて3種の抗菌性タンパク質を精製した。Gt AFP-1, 2, 3 は灰色かび病菌、リンゴ斑点落葉病菌、トルコギキョウ立枯病菌の生育を阻害した。ペプチドシークエンスによって得られたアミノ酸配列をもとに作成した縮合プライマーによる RT-PCR によって Gt AFP-1、2、3 の cDNA を単離した。相同性検索の結果、Gt AFP-1 はアミノ酸レベルでトマト、イネの Lipid transfer protrein (LTP) と 50 % の相同性を、Gt AFP-2 はアブラナ、オオムギの LTP と 40 % の相同性を示した。一方、Gt AFP-3 はアラビドプシス、Sedum lineare の peroxiredoxin Q と 約 80 %、大腸菌の Bacterioferritin comigratory protein と 40 %の相同性を示した。サザンブロット解析の結果、Gt AFP-1, 2 は複数コピー、Gt AFP-3 は1コピー 存在することが示された。現在、形質転換タバコを用い耐病性植物作出の可能性を検討している。

S475

オゾンガス処理によるシロイヌナズナ葉緑体局在型 ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(*FAD7*)の発現解析

八丈野 孝、射場 厚 （九大院・理・生物科学）

シロイヌナズナ *FAD7* 遺伝子は、葉緑体局在型 ω-3 脂肪酸不飽和化酵素をコードする。ω-3 脂肪酸不飽和化酵素は、生体防御反応において重要な役割を果たしているジャスモン酸の前駆物質であるトリエン脂肪酸を供給する。様々な植物において、物理的傷害や病原菌感染により *FAD7* 遺伝子の発現が誘導されることがわかっている。本研究において、病原菌感染をシミュレートするオゾンガス処理により、シロイヌナズナ *FAD7* 遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。オゾン処理した *NahG* 形質転換体においては *FAD7* 遺伝子の mRNA レベルは減少した。また、不活性型のサリチル酸アナログ処理では誘導されなかったが、サリチル酸処理により *FAD7* 遺伝子の発現は誘導された。さらに、サリチル酸の下流のシグナル因子である NPR1 タンパクを欠失した *npr1* 突然変異体の解析により、*FAD7* 遺伝子の発現は NPR1 に依存しない経路を介して誘導されることが示唆された。オゾン及びサリチル酸処理による *FAD7* 遺伝子の発現誘導は、NPR1 依存経路を介して誘導される *PR1* 遺伝子の発現に比べ、かなり早いレスポンスを示した。これらの結果から、サリチル酸に依存しかつ NPR1 に依存しない未知の経路によって *FAD7* 遺伝子の発現が誘導される可能性が示唆された。

S476

ＤＮＡマイクロアレイを用いた植物に対するオゾンストレス影響のモニタリング

松山崇[1,2], 玉置雅紀[2], 中嶋信美[2], 青野光子[2], 久保明弘[2], 佐治光[2], 守屋彰悟[3], 市原竜生[3], 鈴木收[3] ([1]科学技術振興事業団, [2]国立環境研究所, [3]日清紡研究開発センター)

オゾンは最も毒性の強い大気汚染物質であり、植物の葉に可視障害を与える。 大気中のオゾンの濃度と植物への毒性のモニタリングは多くの国で広く行われてきている。 今回、我々は植物へのオゾンの影響をモニタリングする新しい手法の開発を行った。この方法はｃＤＮＡマイクロアレイを用い、数十の選んだ遺伝子の発現の変化を検出することで行う。 この方法を用い、シロイヌナズナでオゾンにより誘導される遺伝子発現のプロファイルを得た。 このプロファイルは乾燥や障害により誘導されるプロファイルとははっきりと異なっていたが、ＵＶ－Ｂ照射により誘導されるプロファイルとは良く似ていた。 以上の結果により、選んだ数十種類の遺伝子を持つｃＤＮＡマイクロアレイにより、ストレスを受けている植物のモニタリングが可能であることが示された。

S477

植物(*Flaveria trinervia*)における基本転写因子 $FtTAF_{II}18$cDNA の単離と解析

中谷公美[1]、泉田敦[2]、古本強[1,2]、畑信吾[1,2]、泉井桂[1,2]
（[1]京大院・生命科学、[2]京大院・農）

Flaveria はその属内に C3 光合成から C4 光合成までの異なる光合成を行なう種を連続的に含んでいる。我々は、*Flaveria* の C4 種(*F.trinervia*)の葉において特異的な発現を示す遺伝子をスクリーニングする過程において、偶然 $humanTAF_{II}30$ と高い相同性を示す遺伝子を単離した。TAFII30 は動物で組織によって発現量が異なると報告されているユニークな基本転写因子であるが、植物界では基本転写因子に関する報告例はない。この植物ホモログを、組換え体タンパク質の SDS-PAGE における見かけ上の大きさに基づき、$FtTAF_{II}18$ と名付けた。ノーザンハイブリダイゼーション法により、$FtTAF_{II}18$ 転写産物は根や茎に比較的多く蓄積していることが明らかとなり、さらに *in situ* ハイブリダイゼーション 法により、茎では維管束周辺、根では中心柱の外部、葉では維管束鞘細胞といった部位に、特異的に発現していることが明らかになった。今後、$FtTAF_{II}18$ と結合するタンパク質や細胞内局在性の解析を進め、植物における $TAF_{II}18$ 分子の役割を探索する予定である。

S478

ニチニチソウ alternative oxidase 遺伝子のクローニング

清田誠一郎、矢崎芳明、坂野勝啓 （農水省・生物研）

Alternative oxidase（AOX）は、シアン耐性呼吸の末端酸化酵素である。我々は、AOXが、細胞内pH調節機構やニ次代謝産物の合成調節を通して、ストレス耐性機構に関わっていると考えニチニチソウ培養細胞を用いて研究を行っている。また、近年、ウイルスの複製、移動の抑制に関わっていることが示唆されている。これまでに、AOXが、サリチル酸、プロピオン酸の様な有機酸、バナジン酸等の処理によって誘導されることを報告した。これらの処理は、すべて細胞質の酸性化を引き起こすため、我々は細胞質酸性化がAOXを誘導するのではないかと考え解析を進めている。今回は、その一環として、ニチニチソウAOXのゲノムクローンの単離を行ったので報告する。

すでに単離していたニチニチソウAOX cDNAをプローブとしてニチニチソウDNAライブラリーのスクリーニングを行い、5クローンを得た。シーケンスの結果、5つの共通部分の塩基配列は同一であった。サザンブロッティングの結果とあわせて、ニチニチソウAOXはシングルコピーであると思われる。これは、イネ、シロイヌナズナ、ジャガイモ等では複数コピーが存在し、それぞれのAOXについて発現部位や時期の違いから、役割分担が示唆されているのと対照的である。塩基配列を解析した結果、3つのイントロンがあった。これは、報告されていたAOX遺伝子と共通であった。現在、AOXコード領域を含む約12kbのシーケンスを完了し、プロモーター部分の解析を行っている。

S479

シロイヌナズナはアスコルビン酸とアントシアニン合成系を使い分けて生体内の活性酸素量を調節している

永田俊文[1]，等々力節子[2]，増水章季[3]，菊池尚志[1]（[1]農業生物資源研究所、[2]食品総合研究所、[3]（株）日本電子）

生体にとって、体内の活性酸素種の質及び量的な安定は必須である。植物体内の活性酸素濃度の調節機構を調べる目的で、電子スピン共鳴（electron spin resonance = ESR）法を用いて活性酸素消去能を測定した。通常の状態のシロイヌナズナは、300-500 SOD unit/g の活性酸素消去能を含有している。ESRのパターンや変異体（*vtc1-1*）の解析より、通常の活性酸素消去能の主要（40-50%）な物質はアスコルビン酸であることが判明した。次に酸化ストレス時の制御機構を調べるために、γ線の大量照射（1-3kGy）を行ったところ、活性酸素消去能全体では、γ線照射後通常値の 5-10 倍に増加することが解明された。この際、照射後3日以降の植物体に於いてアントシアニンの蓄積が通常の 10-20 倍量観察され、アスコルビン酸の蓄積も通常の 5-10 倍確認された。2種類の活性酸素消去物質の蓄積は植物に活性酸素消去剤（n-PG, NDGA, PDTC）を加えることで抑制され、活性酸素発生剤（paraquat）を滴下することで誘導される。このことから、γ線照射による水の放射分解によって生成した大量の活性酸素がアスコルビン酸とアントシアニンの合成を誘導していることが示唆された。また、アスコルビン酸とアントシアニンの合成と蓄積量にエコタイプによって差があることが判明した。*Ler* では通常及びγ線照射時のアスコルビン酸量が Col の約2倍であり、逆に Col では通常及びγ線照射時のアスコルビン酸量が *Ler* の約2倍であることが観察された。そして、酸化ストレス時にアスコルビン酸とアントシアニンの合成と蓄積が有効であるかどうかを調べる目的で、野生型、アントシアニン変異体（*tt2*, *tt3*, *tt4*, *tt5*, *ttg*）及びアスコルビン酸変異体（*vtc1-1*）に対してγ線の大量照射後の生物活性を調べたところ、野生型のみで展葉、成長及び開花が観察され、これらの物質の活性酸素ストレスに対する有効性が示された。

S480

酵母におけるエリスロアスコルビン酸合成系の生理的意義と制御

尼子克己 岩本千明 山内祐造 大岸泰香 岸本律子 合田清（神戸学院大・栄養）

酵母のエリスロアスコルビン酸(eAsA)生合成経路は植物のアスコルビン酸生合成経路と最終2段階において類似性が高く、アスコルビン酸生合成研究の良いモデルになると期待できる。本研究では*S. cerevisiae*の野生株YPH250とそのアラビノース脱水素酵素大サブユニット遺伝子(ARA1)破壊株(△ara1::CgHIS3)を用い、eAsA量の変動や酸化ストレス耐性を調べ、酵母におけるeAsAの生理的意義と生合成の制御について検討した。

△ara1::CgHIS3はワンステップ法で調製し、PCRで挿入破壊を確認した。HPLC-ECD法によりeAsA量を測定した。△ara1::CgHIS3のARA活性は野生株の5%以下に低下したが、細胞内eAsA濃度は2μMと野生株の約半分であった。炭素源を種々変えたYP培地での両者の生育速度に顕著な差は見られなかった。△ara1::CgHIS3は過酸化水素に対し野生株より高い感受性を示したが、メナジオンやCd^{2+}, Cu^{2+}では差が見られなかった。野生株はeAsAの前駆体であるD-アラビノースの培地への添加により、eAsA濃度が約30倍にまで上昇したにもかかわらず、過酸化水素感受性は対照と変わらなかった。更にイネDHAR遺伝子を導入した酵母は過酸化水素感受性がむしろ高くなったことから、eAsAはバルクの抗酸化剤としてよりはむしろ、細胞内酸化還元状態を示すシグナル分子として機能することが示唆された。アラビノース脱水素酵素およびアラビノノラクトン酸化酵素活性は菌密度の増加に伴い上昇したが、この挙動ににエタノールの作用が示唆された。

S481

ヒトダイオキシンレセプターキメラ蛋白質の植物体内での発現と芳香族炭化水素に対する応答

津田賢一[1]，田中祐二[1,2]，山崎健一[1]（[1]北大院地球環境，[2]北海道科学・産業技術振興財団）

現在、環境ホルモンを検出するバイオセンサーの報告例はいくつかあるが、植物についてはない。植物は環境ホルモン受容体や内性のホルモンを持たないため環境ホルモンによる影響を受けにくいので、センサーとして堅牢である。さらに植物がすべての動物の食糧であることから人体への環境ホルモンの侵入の過程を把握する上でも植物バイオセンサーの創製は重要である。そこで我々は、ヒトのダイオキシンリセプターを植物体内で発現する Effecter plasmid とその産物に応答する Reporter plasmid を作成し、ダイオキシン類に応答するかどうかをタマネギ表皮細胞を利用したマイクロプロジェクタイル・ボンバードメント法により検討した。シロイヌナズナを用いたトランスジェニック植物の作成も検討中である。これらの実験と平行してダイオキシンアナログであるβ-naphthoflavone をロックウール上で育てたシロイヌナズナに作用させた。その結果形態には全く影響を与えないことがわかった。さらに遺伝子レベルでの変化をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

S482

イネ科植物の環境ストレス耐性に及ぼす H_2O_2 と NO の効果

内田　明男、Andre T. Jagendorf[1]、高倍　昭洋[2]、施　衛明　高倍　鉄子(名古屋大院、[1]コーネル大、[2]名城大総合研)

我々は、日本植物生理学会 2000 年において、H_2O_2 や NO が大麦のグリシンベタイン合成を誘導することを報告した。この結果から、低濃度の H_2O_2 と NO が熱やその他の環境ストレス耐性に関与する適合溶質合成系、熱ショック蛋白質や活性酸素消去系等の遺伝子を誘導し、植物の環境ストレス耐性が強化されるのではないかと推察した。今回、グリシンベタインを蓄積しないイネを用いて H_2O_2 と NO がその耐熱性やその他の環境ストレス耐性にどのような効果を及ぼすかを検討した。

その結果、グリシンベタインを蓄積しないイネについても、低濃度の H_2O_2 と NO 処理で環境ストレス耐性が強化されることを見出した。そのメカニズムについて議論する。(この研究は、生物系特定産業技術研究機構補助金により行われた。)

S483

植物葉内に取り込まれた二酸化窒素から生成される未知窒素 (UN) 化合物の解析

河村義史，高橋美佐，森川弘道（広島大・院・理・数理分子生命理学）

植物は，大気中の二酸化窒素 (NO_2) ガスを葉から吸収・代謝する。我々はこれまで，植物葉内に取り込まれた NO_2 由来の窒素は，その 20-30% が Kjeldahl 法で回収されない未知窒素 (UN) 化合物に変わることを発見した。本研究は，その化合物の構造解析を目的としている。

播種後約 5 週齢のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype C24) 実生葉を4 ppm の $^{15}NO_2$ (51.6 atom% ^{15}N) に 4 時間暴露した後，凍結乾燥・粉砕した粉末試料を用いた。まず，試料のホモジネート中の UN 化合物を含む画分を，ゲル濾過および陽イオンクロマトを用いて分取した。その画分の一つ (第 9 画分) について，Bellec ら (J. Chromatogr., 727: 83-92, 1996) の報告に従って，ポストカラム HPLC 法 (ニトロソ基の photohydrolysis により遊離する NO_2^- をジアゾカップリング反応させ，生成するアゾ色素を 546 nm で検出) で分析したところ，*N*-ニトロソ化合物の存在が示された。さらにそのニトロソ化合物を含む画分を分取し質量分析を行うと，その画分は ^{15}N がエンリッチされていた。現在，その詳細について解析中である。

S484

オゾン感受性シロイヌナズナ突然変異体の解析

青野光子、久保明弘、玉置雅紀、中嶋信美、佐治 光（国立環境研究所）

大気汚染ガスのオゾンにより植物は障害を受ける。その機構には光酸素ストレスによる活性酸素の生成や過敏感反応による細胞死の関与が示唆されているが、詳細は未解明である。

我々は、0.2ppmオゾンに暴露したときの葉の可視傷害を指標として、EMS処理あるいは速中性子線照射を行ったシロイヌナズナ生態型Colから４系統、T-DNAを導入した生態型Wsから５系統のオゾン感受性突然変異体を単離した。これらの突然変異体のオゾン以外の環境ストレス（SO_2、低温、強光、パラコート）に対する感受性はそれぞれ異なっていた。また、今回単離された突然変異体のうち、少なくともWsの突然変異体の一系統については、Inverse PCRによって得られたT-DNAの挿入部位の情報から、新規の突然変異体であると考えられる。この突然変異体のオゾン暴露中のエチレン生成量は野生型Wsとの有意差は認められなかった。

S485

イネ cDNA マイクロアレイプロジェクト：システム構築と遺伝子発現解析

矢崎潤史、岸本直己、藤井文子、真保佳納子、大塚好 美、小田峰裕、射場厚、山本公子、坂田克己、佐々木卓治、菊池尚志
(農林水産先端技術研究所、農水省・農業生物資源研究所、九州大学大学院・理)

Rice Genome Research Program (RGP) における大規模な cDNA 構造解析は、マイクロアレイを利用した網羅的遺伝子発現解析を可能にした。これらの cDNA を利用しイネ遺伝子の網羅的な発現解析を目的とし、イネ cDNA マイクロアレイプロジェクトが全国約 60 の研究グループの参画のもと現在進んでいる。我々はこれまでに RGP で得られた約 9000 個のユニーククローンを選抜し、cDNA マイクロアレイを作製し、イネ遺伝子の発現解析を行うためのシステムを構築した（http://bank.dna.affrc.go.jp/microarray）。イネの茎葉、根、花穂、カルスをターゲットサンプルとして用いた遺伝子発現解析において、本システムはイネゲノム機能解析のツールとして、機能未知遺伝子のキャラクタライゼーションに高い有用性があることが明らかになった。

S486

cDNA マイクロアレイを用いたガンマ線照射イネの遺伝子発現解析

岸本直己，矢崎潤史[1]，等々力節子[2]，藤井文子[1]，真保佳納子[1]，大塚好美[1]，小田峰裕[3]，射場厚[3]，山本公子[1]，坂田克巳，佐々木卓治，菊池尚志（農業生物資源研，[1]STAFF 研，[2]食総研，[3]九州大院・理・生物科学）

ガンマ線や紫外線による生体分子への作用は、それらが標的に直接作用する場合と、ラジカルを介して、特に水分子等の放射分解反応で生じる活性酸素を介して間接的に作用する場合がある。ガンマ照射に対する植物の反応として、アントシアニン合成の誘導・蓄積、毛状器官の形成誘導、根端部の膨潤、根毛の伸長等が知られ、活性酸素を介した生体反応経路の関与が明らかになっている。本研究グループでは、1999 年 4 月よりイネ cDNA マイクロアレイシステムの構築を開始し、イネゲノムの転写レベルでの網羅的な機能解明を目指したプロジェクト研究を推進している（本年度年会、矢崎潤史ら）。現在、イネ実生並びにイネ誘導カルスにおいてガンマ線・紫外線等を照射した後に転写レベルが変動する遺伝子群を明らかにする目的で、イネ cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行っており、本発表ではガンマ線照射に関する結果について報告する。

S487

傷誘導性の新奇タバコ酸性 PR-1 タンパク質の細胞間隙への蓄積

安藤裕子[1,2]、光原一朗[1,2]、岩井孝尚[1,2]、大橋祐子[1,2]（[1]農水省・農業生物資源研究所、[2]CREST/JST）

植物は病原体感染やそれに類似した状況に応答して、感染特異的（PR）タンパク質の合成を始めとする防御反応を示すことが知られている。タバコの PR-1 から PR-5 までの族に含まれるタンパク質は、さらにサリチル酸（SA）で誘導される酸性 PR タンパク質と、ジャスモン酸（JA）やエチレンで誘導される塩基性 PR タンパク質の 2 つのサブタイプに分類されている。今回我々は PR-1 タンパク質の発現パターンを酸性 PR-1a タンパク質に対する抗体を用いて解析した。この抗体は他の PR-1 タンパク質をも認識する。従来の SDS-PAGE の代わりに Tris-Tricine ゲルシステムを用いることにより、複数の酸性 PR-1 タンパク質を分離したシグナルとして確認することができた。JA 処理したタバコでは既知の 3 つの酸性 PR-1 タンパク質よりもやや易動度の大きい新奇のタンパク質が検出された。このタンパク質はタバコ芽生えの根や老化葉からも検出され、傷処理によって更に蓄積した。この発現は塩基性 PR-1 タンパク質と類似していたが、酸性 PR-1 タンパク質と同様に細胞間隙に局在していることが示された。さらに 2 次元電気泳動によりこのタンパク質が既知の酸性 PR-1 タンパク質よりも更に低い等電点をもつことが明らかとなり、JA または傷で誘導される新奇のタバコ酸性 PR-1 タンパク質である可能性が示唆された。

F501

PS1反応中心のChl *a*結合部位に結合したChl *b*のアンテナ特性

池上勇（帝京大・薬）

PS1 RC complex(PsaA/B)には約100分子のChl *a*が結合しているが、Chl *b*は存在しない。ここからChl *a*の大部分をエーテル処理によって除去してP700当たり12分子のChl *a*しか含まない標品を調製した。(1)これにChl *b*をリン脂質PGと共に加えて、P700当たり9-14分子のChl *b*が結合した標品を得た。(2) P700の光酸化をChl *a*と*b*を共に励起する380-480 nm光により測定したところ、その量子収率はChl *b*結合により約1.9倍に増加した。即ち、結合したChl *b*は抽出されないで残っているChl *a*とほぼ同等のアンテナ機能を持つことが示された。(3) Chl *a*のケイ光(Fl_{680})の励起スペクトルはChl *b*が吸収を持つ480 nmにmain peakを持ち、結合したChl *b*の大部分はChl *a*へ励起エネルギーを伝達していることが示された。(4) P700がemitterであるとされるケイ光(Fl_{695})の励起スペクトルにたいしてもChl *b*の寄与が大きく認められた。したがって、一部のChl *b*はP700のかなり近傍に結合しているものと推定された。

F502

呼吸鎖に応答した光化学系Ⅰ遺伝子の発現調節

松尾充啓、小保方潤一　（名古屋大・遺伝子）

光合成遺伝子群は様々な細胞内シグナルに応答して制御されている。演者らは、クラミドモナスの光化学系Ⅰ核遺伝子の発現に対する様々な光合成阻害剤の影響を解析している過程で、脱供役剤 CCCP が暗所下で系Ⅰの発現を著しく誘導することをみいだした。脱供役剤は ATP 合成を阻害することから、細胞内 ATP レベルの低下が系Ⅰの発現を誘導したのではないかと考え、まず細胞を様々な呼吸阻害剤で処理し、その影響を解析した。暗所下の細胞に呼吸阻害剤であるアジ化ナトリウム（NaN_3）やサリチルハイドロキサム酸を与えたところ、系Ⅰの発現が誘導された。しかし、呼吸阻害剤でも bc1 複合体に作用する、アンチマイシンやミクソチアゾールでは逆に発現が阻害されていた。また NaN_3 とアンチマイシンによる発現の誘導や阻害は、光合成によって ATP が供給される明所下でも観察された。これらの結果は、（1）細胞内 ATP レベルの低下が系Ⅰ遺伝子の誘導を引き起こしているのではないこと、（2）呼吸鎖の阻害部位によって系Ⅰ遺伝子の発現に与える影響が異なることから、呼吸鎖の特定の部位に由来するシグナルが系Ⅰの発現調節に関与していること、を示唆している。

F503

イグサ(*Juncus effusus* L.)におけるクロロフィル代謝酵素：Mg-デキレターゼの部分精製と酵素化学的性質

倉田裕文，足立 勝[1]，東 理恵[1]，高橋芳弘[2]，下川敬之[2]，荒川祐介，山本克巳，手塚隆久，正岡淑邦[3]（九州農業試験場，[1]宮崎医科大・生化学，[2]宮崎大・農，広島大・生物生産）

***In vivo* におけるイグサ(*Juncus effusus* L.)の脱緑機構が，クロロフィル(Chl)色素類（Chl *a*，Chl *b* ならびにその代謝産物）を HPLC 分析することにより調査された．クロロフィリッド *a*，フェオフォルビド *a*，13^2-OH Chl *b*，Chl *b*，13^2-OH Chl *a*，Chl *a* およびフェオフィチン *a* がクロロフィル代謝産物として検出された．さらに，正常および先枯れイグサから粗酵素液を調製し，クロロフィルを代謝する酵素（クロロフィラーゼ，Chl-ペルオキシゲナーゼ，Chl 酸化分解する酵素，Mg-デキレターゼなど）活性を調査した．その結果，先枯れイグサにおいてクロロフィラーゼ，クロロフィル *a* 酸化分解する酵素，Mg-デキレターゼの活性が上昇した．本研究では，イグサに存在する Mg-デキレターゼの部分精製と酵素化学的性質について報告する．**

F504

界面活性剤による緑色光合成細菌クロロゾーム中におけるバクテリオクロロフィルの蛍光消光の変化

時田誠二，嶋田敬三，松浦克美〔都立大、理，生物〕

緑色イオウ細菌の光捕集器官クロロゾームでは、酸化状態で蛍光の消光が見られ，励起エネルギー移動が大きく減少する。我々は緑色糸状細菌 *Chloroflexus aurantiacus* クロロゾームに合成キノンを添加してその蛍光消光の仕組みを解析し、蛍光消光はクロロビウムキノンによるものと推定した。本研究ではさらに広く蛍光消光に関わる因子を解明すべく陰イオン性界面活性剤 SDS、陽イオン性界面活性剤 DTAB ならびに非イオン性界面活性剤 OTG をクロロゾームに添加して蛍光への影響を調べた。酸化状態においては三者とも蛍光消光効果をもつが、還元状態においては SDS は蛍光消光効果をもつが DTAB は逆に蛍光を若干増加させること、OTG は余り大きな変化を与えないことなどが分かった。これらの界面活性剤の添加でバクテリオクロロフィルの集合状態はほどんど変わっていないことから、もともと存在する生理的キノンなどの消光物質とバクテリオクロロフィルとの構造上の関係が変化していることが考えられた。

F505

クラミドモナス Y_D-less 変異種の光化学系Ⅱ電子伝達体間距離のパルス ELDOR による決定：Y_Z-Chl_Z

河盛阿佐子　勝田延宏　石井麻子[1]　皆川純[1]　三野広幸[1]　小野高明[1]（関学大理，[1]理研 PDC・光生物）

D2-161 タンパクのチロシン D を欠く変異種を培養し，光化学系Ⅱ（PSⅡ）コア複合体を精製し，室光下でとトリス処理を行って水分解系を取り除く（試料A）．これを 253 K で 20 秒光照射して凍結すると Y_Z ラジカルが観測される．200 K でさらに 5 分光照射すると Chl_Z^+ が Y_Z ラジカルに重なって観測され，85 K で ELDOR を観測すると，これらラジカル対の双極子相互作用による信号が観測され，2 つのラジカル間距離 31 Å と決定した．

別にトリス処理した試料を $ZnCl_2$ 25 mM のバッファーで処理して非ヘム鉄を Zn に置換した（試料 B）．これを 253 K で 60 秒光照射して凍結すると Y_Z Q_A ラジカル対がトラップされたと考えられる．34 Å の距離に相当する ELDOR が観測されたが Q_A-Chl_Z の可能性がある．

F506

ＦＴＩＲによる光合成水分解系における水分子の検出

野口　巧、杉浦美羽[1]（理研・生体物理化学、[1]大阪府大・農・応用生物化学）

光合成水分解反応の分子機構は未だ謎であるが、その解明には基質水分子の構造や反応を知ることが不可欠である。本研究では、フーリエ変換赤外(FTIR)分光法を用い、水分解系における水分子を初めて検出し、その構造の知見を得た。

ラン藻 *Synechococcus elongatus* の光化学系 II コア標品を用い、250K で水分解系の $S_1 \rightarrow S_2$ 遷移の際の閃光誘起 FTIR 差スペクトルを測定した。S_2/S_1 スペクトルの O-H 伸縮振動の領域には、3618/3585cm^{-1} に正／負のピークが観測された。いずれのピークも $H_2{}^{18}O$ 中で 12cm^{-1} の低波数シフトを示し、これらは水分子の O-H 伸縮振動に帰属された。この水分子は Mn クラスターに結合した基質水分子であると考えられ、その波数位置から、観測された O-H 基は弱い水素結合を形成していることが示された。$S_1 \rightarrow S_2$ 遷移による 33cm^{-1} の高波数シフトは、この O-H 基の水素結合が S_2 形成によってさらに弱まることを示している。また、H_2O/D_2O(1:1)中におけるデカップリング実験から、この水分子は非対称的な構造を持っていることが示され、観測されなかったもう片方の O-H 基は強い水素結合を形成していることが示唆された。

F507

キュウリの低温・暗処理による酸素発生系の阻害
—熱発光によるマンガンクラスターの解析—

樋口　美栄子[1]，野口　巧[2]，園池　公毅[1]（[1]東大・新領域・先端生命，[2]理研・生体物理化学）

光化学系Ⅱは様々な環境変化により阻害を受ける．なかでも酸素発生系は温度変化による障害で失活しやすい部位である．低温感受性植物であるキュウリの葉を 0℃で 24 時間暗所に置くと，表在性タンパク質が光化学系Ⅱから解離し，酸素発生活性が数分の一に減少することが知られている．本研究では熱発光を用い，キュウリの葉の低温・暗処理による失活過程におけるマンガンクラスターの状態を調べた．0℃で 24 時間暗所においたキュウリの葉を 1-3 回閃光照射した際には，ほとんど熱発光は見られなかった．しかし，4 回以降の閃光照射によって，30℃付近にピークを持つ熱発光バンドが観測された．このバンドはマンガンクラスターの S_2 状態と Q_B^- との電荷再結合によるバンドとピーク温度がほぼ一致していた．このことから，低温・暗処理による酸素発生系の失活過程において，S_{-2} 状態などの過度に還元されたマンガンクラスターが形成されていることが示唆された．

F508

光合成光化学系Ⅱシトクロム b-559 の役割

山成敏広，　槇　英昭，　赤堀興造（広島大・総合科学）

光合成光化学系Ⅱ(PSII)を構成する蛋白質の一つであるシトクロム b-559(cytb-559)には酸化還元電位の異なる状態（高電位型：HP；Em' =390 ± 15 mV, 中間電位型：IP；Em' =230 ± 20mV, 低電位型：LP；Em' =105 ± 25mV)を持つと報告されているが、これらの電位の値はまちまちであり、試料調製法によつても変化する。また、反応中心当たりの cytb-559 の数についても論争されてきた。さらに、その機能に関して確固たる証拠を示す報告例も少ない。以前、我々は PSII 光阻害反応に対する防御機構として、HPcytb-559 を経由する PSII 内環状電子移動経路が存在することを予測した。本研究では、(i) cytb-559 のより信頼性の高い酸化還元滴定法を確立した、(ii) 光阻害実験で、反応中心当たりの HPcytb-559 の減少量と β-carotene の減少量との間に一次の相関を見いだしたことを報告する。

F509

Synechocystis sp. PCC6803 HT-3株より単離精製した光化学系II反応中心複合体のポリペプチド組成および光化学反応特性

菓子野康浩、佐藤和彦、Himadri Pakrasi[1]
（姫路工大・理、[1]Washington University）

Synechocystis sp. PCC6803 HT-3株から光化学系II反応中心複合体を単離精製し、その光化学活性およびタンパク質組成を詳細に調べた。蛍光の誘導期現象および閃光照射後の蛍光強度変化の測定により、この精製系II複合体の電子供与側・受容側の健全性が示された。また酸素発生活性は4°C、暗中で２週間後に80%の活性を保っていた。電気泳動によりこの精製標品のポリペプチドを3kDaレベルまで分離し、N末端アミノ酸配列解析およびMALDI mass spectrometryにより全構成成分を同定することができた。さらに金属塩などの補助因子の定量結果も併せ、光化学系IIの詳細な組成を議論する予定である。

F510

光化学系II複合体の結晶構造解析

沈　建仁・神谷信夫（理研・播磨研究所）

好熱性らん藻、*Synechococcus vulcanus*より、酸素発生能を保持した光化学系II粒子を精製し、マイクロダイリシス法を用いて結晶化した。結晶中の系IIは13-14種の膜貫通蛋白質と３種の膜表在性蛋白を含み、計算により求めたモノマーの分子量は320 kDaであった。ゲル濾過により測定した結晶中の系IIの分子量は580 kDaであったため、系IIはダイマーとして結晶化した。SPring-8の放射光を利用し、100 KでX線回折データを収集・分析した結果、分解能4.0 Åを超えるフルデータセットを得た。ソーキング法により重原子同型誘導体を作製し、データ収集・分析した結果、これまで１種の誘導体を得、母結晶との差パターソン関数により初期位相を決定した。これに基づき、系IIの初期電子密度図を得た。現在、他種の重原子誘導体のデータ収集・分析を行うことにより初期位相の改良を進めており、その結果を合わせて報告する。

F511

紅藻の酸素発生系II標品に存在する表在性12 kDa蛋白の機能ドメインの同定

奥村彰規、太田尚孝、井上康則[1]、榎並　勲（東理大・理・生物、[1]東理大・理工・応用生物）

紅藻の酸素発生系II標品に存在する表在性の12 kDa蛋白とチトクロームc550は、高等植物の表在性23, 17 kDa蛋白と類似した機能をもち、これらの蛋白を遊離させると酸素発生活性に高いCaやCl要求性を示す[Enami *et al.*(1998) *Biochem.* 37, 2787-2793]。この12 kDa蛋白の１次構造はすでに決定され、その分子量10,513で93アミノ酸から構成されている[Ohta *et al.*(1999) *B.B.R.C.* 260, 245-250]。

本研究では、この12 kDa蛋白の機能ドメインを明らかにするため、プロテアーゼ処理した12 kDa蛋白の系IIへの再構成を試みた。12 kDa蛋白をキモトリプシン処理すると、N末端の9残基とC末端の10残基が特異的に切除されたペプチド断片が得られた。この標品を系II標品に他の表在性蛋白とともに再構成すると、完全に再結合したが、NaCl非存在下での酸素発生活性は回復しなかった（NaCl存在下での活性は回復する）。一方、V8プロテアーゼで12 kDa蛋白を処理すると、N末端の5残基とC末端の11残基が特異的に切除されたペプチド断片が得られたが、この標品は完全に系IIに再結合し、部分的にではあるがNaCl非存在下での活性も回復した。これらの結果は、12 kDa蛋白のN末端の9残基が酸素発生活性のCl要求性と関連した機能ドメインであることを示唆している。この点をさらに確認するため、N末端の5あるいは9残基、C末端の12残基を欠損した12 kDa蛋白のmutantsを作製した。これら12 kDa蛋白のmutantsの再構成実験の結果についても、合わせて報告する予定である。

F512

プロテアーゼを用いたラン色細菌、紅藻、高等植物の33kDaタンパク質の構造変化の解析

藤利彰彦[1,2]、奥山聡史[1]、太田尚孝[1]、沈 建仁[3]、佐藤公行[2]、榎並 勲[1]
（[1]東理大・理、[2]岡大・自然科学、[3]理研播磨）

酸素発生に必須なMnクラスターの安定化と機能保持に重要な役割を持つ33kDaタンパク質は、すべての酸素発生型生物に存在し、そのアミノ酸配列は植物種間で約40-50%の高いホモロジーを持ちよく保存されている。しかし、ラン色細菌と高等植物の33kDaタンパク質のプロテアーゼによる限定分解部位は大きく異なることが報告されている(1, 2)。最近、筆者らにより紅藻の33kDaタンパク質の限定分解部位はラン色細菌型であることが判明した。そこで、植物種間の33kDaタンパク質の構造と機能の違いを明らかにするため、プロテアーゼ限定分解部位の異なる33kDaタンパク質をラン色細菌、紅藻、高等植物から単離した系IIに再構成し、再結合能と酸素発生の活性化能を比較した。その結果、例えばホウレンソウの33 kDaタンパク質をキモトリプシン処理し、N末16残基を失った標品はホウレンソウの系IIには結合できないが、紅藻やラン色細菌の系IIには部分的に再結合し、酸素発生も活性化することが判明した。プロテアーゼ処理したラン色細菌や紅藻の33 kDaタンパク質についても同様の再構成実験を行い、これらの結果から酸素発生系の進化過程における33kDaタンパク質の構造変化について討論する。

1　Eaton-Rye, J. and Murata, N. (1989) Biochim. Biophys. Acta, 977:219-226
2　Motoki, A., Shimazu, T., Hirano, M., Katoh, S. (1998) Biocim. Biophys. Acta, 1365:492-502

F513

光化学系2酸素発生系23kDa タンパク質のN末端アミノ酸配列とイオン保持能

伊福　健太郎[1]、中津　亨[2]、加藤　博章[2]、佐藤　文彦[1,3]
([1]京大院農・応用生命、[2]理研　播磨研、[3]京大院生命・統合生命)

高等植物、緑藻の光化学系2 (PS II) 酸素発生系に特異的に存在するOEC23 (Oxygen-Evolving Complex 23kDa polypeptide) は、単離PS II膜を用いた生化学的解析から水分解反応に必要とされるCa^{2+}とCl^-のPS IIへの結合に関わっているとされている。しかしながら、そのイオン保持の機構は未だ不明である。イオン保持能に差のあるホウレンソウとタバコ (2AF) OEC23のキメラタンパク質を作成した結果、高度に保存されているN末端のアミノ酸配列がイオン保持能に重要である事が判明した（昨年度本大会）。

本年度はさらにN末端18残基を欠失するOEC23Δ18を用いて解析した。その結果、OEC23 Δ18はPS IIへの結合能は有するもののイオン保持活性を全く失っていた。一方、N末端18残基の欠失によりOEC23 Δ18はプロテアーゼ感受性が高まったが、CDスペクトルの結果からは大きな構造の変化は検出されなかった。また、OEC23と相互作用していると考えられるOEC18存在下ではOEC23Δ18はイオン保持活性を部分的に回復した。これらの結果から、OEC23のN末端18残基は、OEC23のイオン保持活性には必須であるが、その立体構造の維持とOEC18との相互作用には関わっていない事が示唆された。現在OEC23の機能をより詳細に解析すべく、OEC23の結晶化を試みている。

F514

光化学系ⅡD1 蛋白質の損傷・架橋・分解 － 光ストレスと熱ストレスの比較

大平　聡、飛谷和史、廣重健輔、山本　泰（岡山大・理・生物）

光および熱ストレス下では、光化学系Ⅱ反応中心蛋白質 D1 および D2 が架橋する。この D1/D2 架橋は、サンプルの弱光照射（100 μE・m^{-1}・s^{-1}、30 min）や弱い熱処理（40 ℃、10 min）で生じるので、D1 蛋白質損傷のよい指標となると考えられる。

本研究では、特にホウレンソウ光化学系Ⅱ膜の熱処理によって D1/D2 架橋産物が生じる機構（活性酸素が関与）、架橋形成の制御（酸素発生系 OEC33 蛋白質が関与）、架橋産物の分解（ストロマプロテアーゼが関与）、in vitro での架橋産物の形成について調べ、光ストレス下で生じるD1/D2架橋およびそれに関連する諸過程との類似点と相違点を明らかにした。

F515

in vivo での光化学系ⅡＤ１蛋白質の分解機構

水澤直樹[1,2]、徳富（宮尾）光恵[2]（[1]生研機構、[2]農水省・生物研）

単離チラコイド膜を強光にさらすとＤ１蛋白質が選択的に損傷を受け、DEループ上での切断と他の蛋白質との架橋反応がおこる。本研究では、*in vivo* でもチラコイド膜と同様に、Ｄ１蛋白質が損傷を受けるのかどうか、また、損傷を受けたＤ１蛋白質がいかにして完全分解されるのかを解析した。

ホウレンソウ生葉葉片を25℃で強光照射すると、チラコイド膜と同様、Ｄ１蛋白質の切断断片と架橋産物が生成したが、蓄積量は極微量であった。これは、一旦生成した切断断片と架橋産物が速やかに分解され蓄積しない可能性を示唆する。そこで、光照射を2℃でおこなったところ、切断断片と架橋産物が蓄積すること、その後葉片を25℃に移すと、速やかに減少することがわかった。以上の結果から、葉片でもＤ１蛋白質は光照射により切断と架橋を受けたのち、プロテアーゼの作用で分解されることが示唆された。

Ｄ１蛋白質とＤ２蛋白質の架橋部位をペプチドマッピング法により検討したところ、推定されている初期切断の部位と同様、Ｄ１蛋白質のDEループ上で架橋がおこることがわかった。

本研究は生研機構基礎研究推進事業の支援でおこなわれた。

F516

光化学系IIの光損傷後の修復過程におけるPsbTの機能の解析

大西紀和、高橋裕一郎（岡山大・理・生物）

系II複合体のPsbTは、葉緑体にコードされた小型で疎水性のサブユニットである。*psbT*欠損株の生育は、強光照射下で著しく阻害される。すでに我々は、系II活性の光損傷後の回復が欠損株で野生株よりも大きく遅れること示し、PsbTが光損傷した系IIの効率の良い修復に必要な成分であることを明らかにした。本報告では、系IIの光損傷後の修復過程のどの段階にPsbTが関与するかを解析した。

光阻害後の回復過程における系II反応中心タンパクD1の合成量を^{35}Sパルス・ラベル実験により調べると、両株で大きな差は認められなかった。また、ラベルした後にチラコイド膜を単離して可溶化し、クロロフィルタンパクを分画したところ、いずれの株でもラベルされたD1は全て系II複合体を含む画分に検出された。従って、PsbTは損傷を受けた系IIタンパクの置換には関与しないと推測される。現在、系II電子伝達活性の再活性化へのPsbTの関与について、検討中である。

F517

非メバロン酸経路はシロイヌナズナにおいて電子伝達構築に機能する

北條雅也、竹田恵美*、鹿内利治（奈良先端大・バイオ、*大阪女大・基理大）

植物のテルペノイドは二次代謝産物のみならず、カロテノイド色素、ジベレリンやアブシジン酸、クロロフィルや電子伝達物質であるキノンの側鎖等を含む。それらの基本骨格は全てＣ５のイソペンテニルニリン酸（IPP）に由来し、その合成系は、細胞質に存在するメバロン酸系と、プラスチドに存在する非メバロン酸系とがある。この非メバロン酸系については、まだ反応経路のすべてが解明されていない。我々はクロロフィル蛍光画像化システムを用いて光合成電子伝達に異常を持つシロイズナズナ変異株をスクリーニングした。その中で *isp 1* と名付けた変異株は、非メバロン酸系で機能すると考えられている 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase をコードする *ispD* に変異があることが明らかになった。*isp1* は野生型に比べて成長が悪く、強いアレルである *isp1-2* においては、クロロフィル量が著しく減少していた。また電子伝達の解析から、*isp1* では光化学系 II から I への電子伝達が阻害されていることが明らかになった。これらの結果から、この酵素が実際に高等植物の光合成電子伝達系の構築において重要な機能を果たしていることが明らかになった。

F518

チラコイド膜を介したΔpH形成能に欠陥を持つシロイヌナズナ*nrd6* の解析

木村　要、宗景　ゆり、遠藤　剛[1]、鹿内　利治（奈良先端大・バイオ、[1]京大・院生命科学）

光は光合成に必須であるが、過剰な光エネルギーは光傷害をもたらす。そのため光化学系IIの光エネルギー受容効率は、光合成電子伝達に伴うlumenの酸性化をモニターすることによって調節されている。我々はクロロフィル蛍光を画像化するシステムを用いて、強光下で光受容効率を制御できないシロイヌナズナ変異株を単離した。その中の*nrd6*は、過剰な光エネルギーを散逸する機構（NRD）の誘導能力に低下が見られるにもかかわらず、電子伝達効率は正常であった。このような表現型は光化学系　IIのNRD誘導装置そのものに欠陥を持つ変異体にみられる。ポジショナルクローニングの結果、*nrd6*がcytochrome bc_1 複合体の活性化に関与するABC1　familyのメンバーの一つに変異があることがわかった。またコンピュータ予測からNRD6は葉緑体移行が推定された。NRD6はcytochrome bc_1 複合体とよく似た構造を持つ葉緑体のcytochrome b_6f 複合体の活性化に寄与すると考えられる。

F519

葉緑体 ATP 合成酵素制御領域により調節される好熱菌 ATP 合成酵素γサブユニットの回転

Dirk Bald[1,3], 野地博行[2]、吉田賢右[1,3]、久堀徹[1]　([1]東工大・資源研、[2]PREST 、[3]CREST Team 13)

昨年、私たちは、葉緑体 ATP 合成酵素(CF_oCF_1)の活性制御領域の制御機構を調べるために、γサブユニット上の制御領域配列を好熱菌 F_1 のγサブユニットの相当領域に導入したキメラ酵素を作成した。この酵素は、活性の制御に関して、CF_1 の性質をよく保持していた[1]。

今回は、このキメラ分子を用いて、安田・野地らによって開発された一分子観察法[2]により F_1 のγサブユニットの回転がどのように制御されるのかを直接観察した。その結果、γサブユニットの回転は、制御領域のシステインの酸化（ジスルフィド結合の形成）によって抑えられ、還元によって活発になった。この結果は、バルクの酵素活性とほぼ一致した。

今回の発表では、回転の一分子観察の結果をもとに、ATP 合成酵素の分子レベルでの調節機構を考察する。

[1] Bald, D. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 12757-12762.
[2] Noji, H. et al. (1997) *Nature*, **386**, 299-302

F520

フェレドキシンの電子伝達活性に重要なアミノ酸残基

手島圭三、藤田しのぶ、広瀬修一、有賀洋子[1]、長谷俊治[1]（広島大・総合科学、[1]阪大・蛋白研）

トウモロコシのフェレドキシン:NADP+還元酵素（FNR）との電子伝達反応を調べることによって、スギナフェレドキシンⅠとⅡ（FdⅠとFdⅡ）の電子伝達活性の比較を行った。FdⅡのKm値はFdⅠの約6分の1であり、kcat値はFdⅠの約5分の1であった。このことから、FdⅠとFdⅡはFNRと異なる様式で結合することが示唆された。

その原因を探るためにアミノ酸配列を比較したところ、鉄-硫黄クラスター近傍にあるFdⅠのArg39がFdⅡではGln（Gln38に対応する）に置換していた。部位特異的変異法でGln38をArgに変換したFdⅡ（FdⅡQ38R）を調製し、電子伝達活性を調べたところ、Km値は野生型の約7倍となってFdⅠの値と近い値になり、kcat値は野生型の約3倍に増大した。よって、このArg残基はFNRとの結合様式の決定や電子伝達反応におけるFd-FNR複合体の遷移状態の安定化に重要な役割を果たしていると考えられる。

FdⅠでArg39とイオン結合しているGlu28がFdⅡではSerに置換しているので、現在、FdⅡQ38R/S28EやFdⅠR39Q等の調製と活性測定を検討中である。Fdは種々の還元酵素に電子を供与するので、スギナにおけるイソタンパク質FdⅡの役割は大変興味深い。

F521

葉緑体NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ複合体欠損によるストロマ過還元

遠藤　剛、高林厚史、鹿内利治[1]、佐藤文彦（京大院・生命科学、[1]奈良先端大院・バイオ）

葉緑体NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ複合体(NDH)はチラコイド膜に存在し光合成電子伝達鎖のプラストキノンに電子供与することで循環的電子伝達に関与していると推定されている。

ＰＳＩ反応中心Ｐ７００の酸化還元の測定結果から、タバコNDH欠損株では飽和光を数分間照射した後、数時間、還元側律速の状態が続き、白色閃光照射により電荷再結合が観察された。これは、葉緑体ストロマに還元力が蓄積し（いわゆる過還元状態）ている事を示唆している。ストロマ過還元は直接的にＰＳＩの量子収率を低下させるばかりでなく、プラストキノンの還元とそれに伴うＰＳIIの量子収率の低下、さらに光阻害を引き起こすことが示された。循環的電子伝達によるストロマ過還元の回避機構について考察する。

F522

C4 植物 maize 生葉での Alternative Electron Flow

○飯田奈央、横田明穂、三宅親弘（奈良先端大　バイオ）

これまでに、C3 植物で Alternative Electron Flow（AEF）として water-water cycle 及び PSII での cyclic electron flow が機能していることが明らかにされてきた。今回、我々は、C4 植物 maize で AEF の存在を確認し、その解析を行った。maize は明条件[35℃、1,500 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$（強光）、500 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$（弱光）、16h]、暗条件(25℃、8h)で栽培された。ガス交換解析による CO_2 固定速度と Chl 蛍光解析による PSII の量子収率[φPS(II)]測定を同時に行った。その結果、測定光強度がそれぞれ 1,000、300 μmol photon m^{-2} s^{-1} において、理論上 CO_2 固定に要求される光量子数により計算される PSII の量子収率 $\phi PS(II)_{(Theoretical)}$ を上回る Δφ(PSII)[= $\phi PS(II) - \phi PS(II)_{(Theo)}$]の存在を確認した。この Δφ(PSII)は測定 CO_2 分圧範囲[50～1,000 μmol/mol]で認められ、CO_2 固定に必要以上の電子が流れていること、つまり AEF の存在が確認された。測定において、光強度の低下は相対的な AEF 値 [AEF(rel)、Δφ(PSII)×PFD]を減少させ、低 CO_2 分圧下では AEF(rel)の増大が認められた。また、弱光で生育させた maize での AEF(rel)値は強光生育 maize の AEF 値よりも小さかった。現在、AEF の O_2 分圧依存性及びその大きさを検討し、AEF の実体を明らかにしている。

F523

トウモロコシ C4 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを高発現する形質転換イネの解析
II. 光合成と呼吸に対する効果

深山浩，玉井鉄宗，土田博子，松岡信[1]，
徳富（宮尾）光恵
(農水省・生物研，[1]名古屋大・生物分子応答)

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) 高発現の光合成と呼吸に対する効果を、トウモロコシ・C4 型 PEPC 遺伝子を導入した形質転換イネを用いて解析した。生育条件 (21% O_2) での光合成速度は、非形質転換イネに比べて若干低かった。2% O_2 条件で光合成速度を測定した場合、その差がより顕著であったことから、形質転換イネではリン酸再生能力が低下している可能性が考えられた。2% O_2 条件における形質転換イネの光合成速度の低下は、高温でより顕著であった。 わずかな差ではあるが、Γ*（呼吸速度に影響されない CO_2 補償点）の低下と Rd （光照射下での呼吸速度）の増加が認められた。一方、暗黒下での呼吸速度には差が認められなかった。これらの結果、トウモロコシ PEPC の高発現により、光照射下でのミトコンドリアにおける CO_2 放出が促進されることが示唆された。これらの現象を引き起こすメカニズムについて考察する。

本研究の一部は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた.

F524

トウモロコシ C4 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを高発現する形質転換イネの解析
I.　生化学的解析

玉井鉄宗，深山浩，土田博子，泉井桂[1]，徳富（宮尾）光恵（農水省・生物研，[1]京都大学大学院）

トウモロコシ C4 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）遺伝子を導入した形質転換イネにおいて、リン酸化 PEPC を特異的に認識する抗体を用い、トウモロコシ PEPC のリン酸化状態を検証した。トウモロコシ葉で起こるのとは逆に、イネ葉でトウモロコシ PEPC は昼間に脱リン酸化され、夜間にリン酸化された。これらのことは、トウモロコシ PEPC は夜間にある程度活性化され、昼間には低活性型を維持することが示唆された。また、形質転換イネにおいて昼夜を問わず、PEPC の基質であるホスホエノールピルビン酸は減少し、生成物であるオキザロ酢酸とリンゴ酸は増加した。これらの結果は形質転換イネにおいてトウモロコシ PEPC は確かに機能していることを示している。さらには、トウモロコシ PEPC の高発現によってスクロースリン酸合成酵素が活性化し、アミノ酸組成も変化したことから、トウモロコシ PEPC はイネ葉の炭素、窒素代謝を変化させている可能性が示唆された。

本研究の一部は生研機構基礎研究推進事業の支援で行われた。

F525

形質転換イネを用いたホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子のプロモーター解析

末包亜矢子、時岡洋子、田島茂行、松岡信[1]、野村美加（香川大・農、[1]名大・生物分子応答）

我々はこれまでに C4 植物の葉肉細胞で特異的に発現する *Pdk* や *Pepc* 遺伝子を C3 植物であるイネに導入するとイネでも葉肉細胞に特異的に発現することを報告した。一方、C4 植物の維管束鞘細胞で特異的に発現する C4 光合成遺伝子がイネ内でどのような発現制御を受けるのかについては全く解っていない。今回、我々は C4 植物の維管束鞘細胞内で特異的に発現するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子（*Pck*）に注目し、C4 植物であるノシバの *Pck* 遺伝子のプロモーター配列に GUS 遺伝子をつなげたコンストラクトを作成し、イネに導入した。その結果、GUS 活性はイネの葉身、葉鞘などの光合成器官のみならず、茎、根などの非光合成器官においても高いレベルで観測された。また、GUS 活性組織染色の結果、葉身や茎における GUS 活性は葉肉細胞では観測されず、維管束鞘細胞を含む維管束組織で発現していることが確認された。以上の結果とすでに明らかにされている C4 植物の葉肉細胞に特異的に発現する酵素遺伝子がイネ葉肉細胞に特異的に発現することを考えること、イネは C4 植物に存在する細胞特異性を決めているメカニズムと類似のメカニズムを持つと考えられる。本研究の一部は生研究機構「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の支援を受けて行なわれた。

F526

トウモロコシ由来ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの結晶構造解析

松村浩由, 白形俊介, 井上豪, 吉永侃夫, 上野宜久, 泉井桂, 甲斐泰（阪大院工, 京大院医, 京大院農）

ホスホエノールピルビン酸カルボキラーゼ(PEPC) は、ホスホエノールピルビン酸と炭酸水素イオンからオキサロ酢酸と無機リン酸を生じる反応を、Mg^{2+} または Mn^{2+} 存在下で不可逆的に触媒する。トウモロコシなどの C4 植物や、サボテンなどの CAM 植物において、PEPC は空気中の二酸化炭素を炭酸水素イオンの形で最初に固定する役割を果たしている。我々は、本酵素の反応機構および活性調節機構を解明するため、トウモロコシ由来 PEPC と大腸菌由来基質類似物結合型 PEPC の X 線結晶構造解析を行った。

トウモロコシ由来 PEPC については 3.0 Å 分解能、大腸菌由来基質類似物結合型については 2.35 Å 分解能での構造精密化に成功した。トウモロコシ由来 PEPC の全体構造は、大腸菌由来 PEPC と同様、2 つのサブユニットが互いに強く相互作用した構造をとっており、サブユニット内の二次構造も大腸菌由来のものと非常に類似していることが確認できた。トウモロコシ由来 PEPC と大腸菌由来 PEPC の構造比較を行ったところ、βバレルの C 末端側の活性部位のループ構造に大きな変化が見られた。今回得られたトウモロコシ由来 PEPC の立体構造と大腸菌由来基質類似物結合型 PEPC の立体構造を比較し、本酵素の反応機構と活性調節機構を考察する。

F527

イネの胚乳に発現するピルビン酸リン酸ジキナーゼ（PPDK）の機能解析

片山健一、田島茂行、富尾光恵[1]、松岡信[2]、野村美加（香川大・農、[1]農水省・生物研、[2]名大・生物分子応答）

C_4 型 PPDK 遺伝子は 1 つの遺伝子から 2 つの転写産物を転写し、長い転写産物は葉緑体型 PPDK 遺伝子をコードしており光合成型の酵素を産生し、短い転写産物は細胞質型 PPDK 遺伝子をコードし非光合成型の酵素を産生する。この 1 遺伝子から 2 種類の機能の異なる酵素産物を産生するという特徴的な性質は C_4 植物の PPDK 遺伝子のみならず、C_3 植物であるイネの PPDK 遺伝子のおいても同様な発現制御系が存在する事が我々により明らかにされた。さらにイネにおける PPDK 遺伝子の発現は葉緑体型酵素きわめて低い一方で胚乳における細胞質型 PPDK は高いレベルで発現していることが明らかになった。そこで我々はイネの胚乳内での細胞質型 PPDK の生理的意義について興味を持ち、細胞質型 PPDK 遺伝子を高発現させたイネ、アンチセンスにより発現を減少させたイネ、また細胞質型・葉緑体型 PPDK 遺伝子の両方をともに高発現させたイネを作成した。既にそれぞれの形質転換体についてサザンブロット解析を行い、これらのコンストラクトの導入を確認した。現在これらの形質転換体の生理的および生化学的解析を行っており、得られた結果について報告する。本研究の一部は生研究機構「新技術・新分野創出のために基礎研究推進事業」の支援を受けて行なわれた。

F528

海洋性珪藻類 *Phaeodactylum tricornutum* の高親和性光合成に重要な細胞内カーボニックアンヒドラーゼの精製および cDNA クローニング

平岡　康隆、佐藤　暖、松田　祐介（関西学院大学・理・化学）

藻類は一般的に溶存無機炭素濃縮機構（CCM）を持っており、水中での高い光合成能力の原動力と考えられている。海洋性珪藻類は水圏におけるきわめて重要な一次生産者の一つと見なされており、海水中の HCO_3^- を積極的に利用して光合成を行っていると考えらているが、まだ不明な点も多い。本研究では、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum*（UTEX642）の細胞内 carbonic anhydrase(CA : EC 4.2.1.1)の高親和性光合成における役割を検討した。CA 阻害剤である AZA および EZA 添加した結果、溶存無機炭素に対する親和性が AZA では変化しなかったが、EZA では溶存無機炭素に対する親和性が減少した。この事から EZA により細胞内 CA がケイ藻の持つ無機炭素に親和性の高い光合成に必須の役割を負っていることが示された。また、この CA の精製を 2 つのカラムを用いて行うとともに、RACE 法により完全長 cDNA のクローニングも行った。この結果、β型 CA であることが分かったが、活性部位の一部のアミノ酸が他のβ型 CA とは異なっていた。

F529

イネとコムギにおける葉身窒素あたりの RuBP 再生産能力の違いについて

須藤 恵美、牧野 周、前 忠彦 （東北大院・農・応生科）

コムギの葉身窒素あたりの光合成速度はイネよりも高く、それは Rubisco の酵素の触媒能力がコムギの方が高いことにより説明されてきた（Makino *et al.*, 1988, *Planta* 174, 30-38）。しかしコムギにおいて、他の光合成の律速因子であるタンパク量や酵素などの活性も高いかどうかについては分かっていない。そこで私たちは、もうひとつの光合成の律速要因である RuBP 再生産能力に着目し、両種におけるその差異およびその決定因子について解析した。

*p*Ci>60Pa での光合成速度もコムギの方が高く、コムギではイネよりも RuBP 再生産能力も高いことが示された。そこで、RuBP 再生産速度の律速要因とされている電子伝達系、Pi 再生産系に特に着目し解析を進めた。その結果、電子伝達速度の律速である Cyt *f*、CF_1のうち、Cyt *f*含量がコムギの方で高く、種間差を越えて Cyt *f* 含量と *p*Ci>60Pa での光合成速度との間に定量的な高い正の相関が見られた。逆に CF_1 含量はイネの方が高かった。一方、Pi 再生産系の律速因子である SPS 活性には、顕著な差異は認められなかった。また Chl 含量や、チラコイドが多く含まれる不溶性画分窒素、可溶性タンパク窒素および遊離アミノ酸が含まれる TCA 可溶性画分窒素の含量にも種間差は見られなかった。そして、Calvin 回路を構成するいくつかの酵素の活性はコムギにおいて高かった。以上よりコムギではイネよりも、Rubisco による炭酸固定能力のみならず RuBP 再生産能力も高く、そしてその違いは Cyt *f* 含量の差と密接に関わっていることが示唆された。

F530

光強度・CO_2分圧の変化に対する Rubisco 活性の応答 －*rbc*S アンチセンスイネを用いた解析－

山口 直人、牧野 周、前 忠彦（東北大・院・農）

生体内の Rubisco 活性は、弱光や高 CO_2 分圧といった Rubisco が光合成を律速しない環境下では down regulation を受ける。Rubisco の down regulation には1)酵素タンパク質の脱カルバミル化（活性化率の低下）、2)リン酸糖などの inhibitor の関与(total 活性の低下)が知られている。そこで *rbc* S 遺伝子をアンチセンス方向に導入し、Rubisco 量を特異的に減少させたアンチセンス(AS)イネを用いて、Rubisco 量の減少が光強度やCO_2分圧が変化したときの Rubisco の活性にどのような影響を及ぼすかについて解析した。WT では弱光域で Rubisco の活性化率および total 活性は大きく減少しており、1)と2)の両方の関与が示唆された。一方、AS イネでは弱光域の活性化率は、高く維持されており、AS イネでは Rubisco タンパク量の減少を活性化率を高めることで補償していることが考えられた。次に Rubisco の活性化率と高い相関関係にあることが指摘されている NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH)の活性化状態を調べた。しかし AS イネにおいては NADP-MDH の活性化状態は常に WT のそれより低く、Rubisco の活性化率と相関はなかった。強光下での CO_2濃度に対する応答では、WT の Rubisco 活性化率は CO_2 濃度の上昇に伴い幾分低下しており 1)の関与が示唆された。しかし AS イネでは高 CO_2 下でも活性化率は高く維持されており両者に違いが見られた。AS イネでは total 活性が大きく減少しており、2)の関与が強いことが示唆された。以上より AS イネでは量的に少ない Rubisco を、活性を高めて補おうとする機構が存在することが示唆された。しかし total 活性の低下もしばしば観測され、これには生体内での Rubisco active site とリン酸化糖の濃度比が関係しているのかもしれない。

F531

ラン藻の炭素欠乏への応答におけるCbbRホモログの役割

高橋由香里、西村崇史[1]、原野よしみ、小俣達男（名古屋大院・生命農学、[1]名古屋大・農学部）

CbbRは、化学合成細菌や光合成細菌において、カルビン回路の酵素群の遺伝子の発現を活性化するLysR型の転写調節因子である。ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803には、CbbRのホモログが3つ（*sll0030*, *sll1594*, *sll0998*）あるが、それらのうちの1つ（*sll0030*）が、HCO_3^-能動輸送体をコードする*cmp*オペロンの炭素欠乏による発現誘導に必須であることを我々は既に報告した。ラン藻には他にも炭素欠乏により活性化される遺伝子が多く存在するので、本研究では、これらとCbbRホモログの関係を網羅的に調べるためDNAマイクロアレイを用いた解析を行った。野生株においては、炭素欠乏によってNAD(P)Hデヒドロゲナーゼ遺伝子群（*ndh*）、RNAポリメラーゼσ因子遺伝子（*rpoD*）、フィコビリゾーム分解に関わるNblAの遺伝子（*nblA*）、*slr0373*、*slr0374*、*ssr2595*が、*cmp*オペロンと同様の転写産物量の増加を示した。*sll0030*の欠失株を用いた実験からは、*sll0030*は*cmp*オペロンだけでなく、*rpoD*、*nblA*、*ssr2595*、*slr0228*などの転写活性化に関与する可能性が示唆された。一方、*sll1594*は、*cmp*オペロンの転写活性化には関与しないが*slr0373*、*slr0374*、*rpoD*、*ssr2595*、*nblA*などの転写活性化に関与する可能性が示唆された。さらに、*sll1594*の欠失株では、*ndhF3*、*ndhD3*の発現が炭素充足下でも欠乏条件下でも高くなっており、*sll1594*がこれらの遺伝子を負に制御している可能性が示された。

F532

イネ（C3植物）の*rbcS*プロモーターは、トウモロコシ（C4植物）で組織特異的、光依存的発現を誘導するが維管束鞘細胞特異的な発現は誘導しない

野村美加、片山健一、千徳直樹[1]、石田祐二[2]、太田象三[2]、小鞠敏彦[2]、宮尾光恵[3]、田島茂行、松岡信[1]（香川大・農、[1]名古屋大・生物分子応答、[2]日本たばこ・植物育種研、[3]農水省・生物研）

C3植物の*rbcS*遺伝子は葉肉細胞で発現するが、C4植物の*rbcS*遺伝子は主に維管束鞘細胞で発現する。そこで、イネ（C3植物）とトウモロコシ（C4植物）の*rbcS*プロモーター遺伝子にGUS遺伝子をつなげたキメラ遺伝子をトウモロコシに導入し、どのような発現制御を受けるのか調べた。その結果、両形質転換体ともに、光合成器官特異的に高いGUS発現を示したが、非光合成器官ではGUS発現を示さず、また光を照射するとGUSの発現は増加した。しかし、GUS活性染色の結果、イネ*rbcS*プロモーターは主に、トウモロコシの葉肉細胞でGUS発現を示し、トウモロコシ*rbcS*プロモーターは主にトウモロコシの維管束鞘細胞でGUS発現を示した。以上の結果から、*rbcS*遺伝子プロモーターのC3、C4植物の違いについてC4植物の進化という点から考察する。本研究の一部は、生研機構「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の支援を受けて行われた。

F533

C4 型キビ（*Panicum miliaceum*）のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子プロモーターのイネでの発現解析

時岡洋子[1]、谷口光隆[2]、松岡信[3]、田島茂行[1]、野村美加[1]（[1]香川大・農、[2]名大・農、[3]名大・生物分子応答）

NADP-ME 型 C4 植物であるキビ（*Panicum miliaceum*）の C4 回路に関与するアスパラギン酸アミノ基転移酵素（AspAT）は、葉肉細胞のサイトゾルと維管束鞘細胞のミトコンドリアに存在する。イネ C3 植物においても 2 タイプの AspAT が存在し、サイトゾル型は根、茎といった非光合成器官で強く発現し、ミトコンドリア型はどの器官でもほとんど発現していない。

我々はキビの AspAT 遺伝子の発現パターンを形質転換イネを用いて比較した。

その結果、細胞質型 AspAT プロモーターは根、茎などの非光合成器官のみならず、葉身、葉鞘といった光合成器官でも強い GUS 発現を示した。また、GUS 活性染色の結果、葉肉細胞特異的に発現することが確認された。一方、ミトコンドリア型はイネ内でどの器官でも全く発現を示さなかった。現在、なぜミトコンドリア型が発現しなかったのか検討を行なっている。

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

F534

SPATIAL AND TEMPORAL EXPRESSION OF SUCROSE SYNTHASE IN THE RADISH HYPOCOTYL IN RELATION TO THICKENING GROWTH

Hervé ROUHIER, Hideaki USUDA, Lab. of Chemistry, Teikyo University, School of Medicine, 359 Ohtsuka, Hachioji, 192-0395

Sucrose synthase (SuSy) is a key enzyme in the development of storage root of radish *(Plant Cell Physiol. 40, 369-377; 1210-1218, 1999)*. Clarification of its spatial and temporal expression during the thickening growth of radish (*Raphanus sativus* L.) hypocotyl was carried out immunologically using light microscopy. Sequential harvests at 3, 7, 11 and 13 days after sowing (DAS) were performed on two radish cultivars having different sink capacity. White Cherrish with a strong storage root ability and Kosena with a lower storage root being similar to the wild radish. Very low expression of SuSy was observed 3 DAS for both cultivars. White Cherrish showed a maximum expression of sucrose synthase between 7 and 11 DAS with increased cell development (thickening) while in Kosena the expression was remaining high after 13 days of growth. Strong expression of SuSy was found in companion cells which is consistent with previous observation but was also expressed in xylem parenchyma, phloem parenchyma and some of the cortical cells. The expression of SuSy proved to be different according to the localization and highly dependent on the cell development. Analysis of structural changes showed that both cell division and cell enlargement were stimulated in White Cherrish compared with Kosena. The role of SuSy during thickening growth of radish hypocotyl is discussed in terms of photosynthates utilization.

F535

シロイヌナズナにおける水溶性クロロフィルタンパク質ホモログの DNA クローニングとその組換タンパク質の性質

佐藤 浩之，小林 由花，井出 有美枝，中山 克己，岡田 光正（東邦大・理・生物分子）

水溶性クロロフィルタンパク質（ water-soluble chlorophyll protein; WSCP）はアブラナ科などの植物に見い出されている機能未知のクロロフィル結合タンパク質である。過去の研究により，WSCPは乾燥ストレスにより誘導され，また，配列中にKünitz proteinase inhibitor や LHC に見られるモチーフを有している事が明らかとなっている。

近年のゲノムプロジェクトの進展によりシロイヌナズナにおいてもWSCP homolog (At WSCP homolog) が見い出された。この homolog の予想されるアミノ酸配列とカリフラワーWSCPの相同性は約 66％であったが，多くのWSCPで保存されている配列モチーフは At WSCP homolog においても良く保存されていた。現在，大腸菌中で発現させたAt WSCP homolog について，そのクロロフィル分子への結合能について分析を進めている。一方，シロイヌナズナに存在する，乾燥ストレス時に発現が抑制されるタンパク質，AtDr4 もWSCPと部分的な相同性（約 31％）を示す。大腸菌中で発現させた AtDr4 のクロロフィル結合能に関しても併せて解析を進めているが，AtDr4 のクロロフィルへの結合性は未だ確認できていない。

F536

微弱蛍光スペクトルによる長鎖カロテノイド(共役二重結合数 $n=9\sim13$)の一重項状態の解析

藤井 律子，石川 達也，小山 泰，[1]磯部 良江，[1]田口 美和，[2]長江 裕芳，[1]渡辺 泰堂（関学大・理・化、[1]関学大・理・物、[2]神戸市外大）

光合成細菌のアンテナ複合体(LH2)中で、カロテノイド(Car)は光を捕獲してバクテリオクロロフィル(BChl)へ伝達する「光捕獲」の役割を担っている。これは、「Car の $1B_u^+$状態→BChl の Q_x状態」「Car の $2A_g^-$状態→BChl の Q_y状態」という二つの一重項エネルギー伝達チャンネルで行われるといわれている。最近、共鳴ラマン励起プロフィールによって、n=9~11 の Car で一重項エネルギーが $1B_u^+ > 1B_u^- > 2A_g^-$の順に並ぶことが示され、$1B_u^+$→(状態間混合)→$1B_u^-$→(振電相互作用)→$2A_g^-$ という内部転換の機構が提唱された。ここで新たに発見された $1B_u^-$状態エネルギーの共役二重結合数(n)の逆数($1/(2n+1)$)に対する依存性は、$1B_u^+$、$2A_g^-$状態に比べて非常に強いため、紅色光合成細菌の LH2 内に結合している n=9~13 の Car でのみ上記のエネルギー順列が成立することが予測された。これらの事実より、LH2 内での BChl→Car のエネルギー伝達に、Car の $1B_u^-$状態の関与した第 3 のチャンネル、即ち「Car の $1B_u^-$状態→BChl の Q_xまたは Q_y状態」というチャンネルの存在が示唆された。

今回、我々は赤外検出感度の高い検出器を用いて、n=12、13 の長鎖 Car、アンヒドロロドビブリン及びスピリロキサンチンの微弱蛍光スペクトルを測定することに成功し、n=12、13 でも $2A_g^-$、$1B_u^-$状態のエネルギーが $1/(2n+1)$に対して直線上にのることを実験的に確認し、さらに蛍光では初めて $1B_u^-$状態を検出した。これらの新しい結果と共に、今まで測定した n=9~11 の Car の蛍光スペクトルをもとにして、一重項状態のエネルギーを統一的に議論する。

F537

高度好塩アーキア *Halabacterium salinarum* の色素組成における光の効果

Wael El-Sayed[1]，高市真一[2]，才田春夫[3]，關文威，桑原朋彦（筑波大・生物科学，[1]Ain Shams Univ.・ Microbiol. Dept.[2]日本医大・生物，[3]筑波大・農林工学）

高度好塩アーキア *Halabacterium salinarum* は主な色素として，バクテリオルベリン，ベータカロテン，レチナールを持つが，それらの環境による変動は包括的には調べられていない。その理由の一つとして，レチナールがオプシンタンパク質にシッフ結合しているために有機溶媒で完全には抽出できないことがあげられる。本研究では，細胞をヒドロキシルアミン処理してレチナールをオキシム型に変換し，他の色素とともに有機溶媒で完全抽出して定量する系を確立した。

細胞を暗黒下あるいは光照射下で培養して色素組成を調べたところ，光は細胞あたりのバクテリオルベリンおよびレチナール量を増加させるが，総ベータカロテン合成量（ベータカロテン+1/2 レチナール）には影響しないことがことがわかった。この事実は，光はバクテリオルベリンの合成およびベータカロテンからレチナールの合成を促進するが，ベータカロテンの生成には関与しないことを示している。

F538

F039へ移動

F539

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

橘高　隆一，原納　究，石田　裕幸，岩城　俊雄，和田野　晃（大阪府大・農・応生化）

ラン藻において RuBisCO の濃度の変化が光合成速度に大きく影響を及ぼすことが予想されている．しかし，ラン藻は無機炭素濃縮機構を有していることにより，RuBisCO 量の変化が光合成速度に及ぼす影響をみることを困難にしている．本研究では，carboxysome 欠損株(KO mutant)を用いることにより，細胞外からの受動拡散に依存した光合成速度が RuBisCO 量の変化によってどのように変化するのかを調べた．carboxysome 欠損株の作成には *Synechococcus* PCC7942 を用い，carboxysome を構成する遺伝子である *ccmK* から *ccmO* の領域をカナマイシン耐性遺伝子と相同組換えすることにより獲得した．こうして得られた carboxysome 欠損株は高濃度の CO_2 条件下でしか生育することができず，その RuBisCO 活性の 90%が cytosol 画分に存在することが確認できた．さらに carboxysome 欠損株の光合成酸素発生最大速度の 1/2 の速度を示す CO_2 濃度は野生株のそれに比べ 155 倍であることが分かった．carboxysome 欠損株と野生株を低 CO_2 条件下に移すと，RuBisCO 活性の上昇がそれぞれの株でみられる．これらの活性の上昇は転写レベルで調節されており，遺伝子上に調節する因子があることが示唆された．転写レベルの増加とともに，RuBisCO 量の増加もみられ，その上昇は RuBisCO 量に依存していると考えられた．carboxysome 欠損株を 5%CO_2 から 0.5%CO_2 培養条件下に移したとき光合成速度もまた上昇した．0.5%CO_2 条件下において，無機炭素濃縮機構の誘導は起こっていないため，carboxysome 欠損株におけるこの光合成速度の上昇は RuBisCO 活性の上昇によるものであると考えられる．

F540

紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の光合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子の機能

永島賢治、永島咲子、松浦克美、嶋田敬三（都立大院・理・生物）

紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の光合成遺伝子の多くは約37 kbにわたるクラスターに含まれている。このクラスターには35個の遺伝子が含まれ、そのうち25個は色素合成酵素(*bch*, *crt*)および光捕集・光化学反応中心複合体の構造遺伝子(*puf*, *puh*)と推定された。残りの遺伝子の機能を明らかにするために、本研究ではこれらの遺伝子のうち８個についてカナマイシン耐性遺伝子で置き換えた変異株を作成し、光合成器官の合成および生育に与える影響を調べた。いずれの変異株も好気培養では野生株とほぼ同じ生育速度を示すものの、光合成培養では 1.3—4 倍生育が遅くなった。特に光捕集タンパク遺伝子(*pufB*, *pufA*)のすぐ上流に位置する 147 塩基からなる小さな遺伝子に対する変異株では生育速度の低下が顕著であり、光捕集タンパク(LH1)の合成量も明らかに減少していた。そのほか３種類の遺伝子変異株でも同様の傾向が見られた。これらの遺伝子産物は光合成に必須ではないものの、光合成遺伝子の発現、光捕集複合体の構造の最適化や反応中心複合体と光捕集複合体との適切な相互作用を形成する上で重要な働きを持つものと思われる。

F541

紅色光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* における好気条件下での光合成遺伝子の発現

若木あすか、増田真二、嶋田敬三、永島賢治、松浦克美（都立大・生物）

多くの紅色光合成細菌は、好気条件下において光合成器官の発現を抑制しているが、*Rhodovulum sulfidophilum* では、発現することが知られている。光捕集及び反応中心タンパク質をコードする遺伝子群である *puf* オペロンの上流に近接して存在するプロモーター活性は、好気条件下での光合成器官合成量を十分には説明できなかったことから、好気条件下でも、さらに上流からの継続的な転写（readthrough）が行われていることが示唆された（Masuda et.al. 1999）。

本研究では、このreadthrough転写に関わるプロモーター活性を、好気条件下及び嫌気条件下において調べることを目的とした。*puf* オペロン上流約 6.3Kb の塩基配列を決定した結果、この領域の遺伝子配置は、近縁の *Rhodobacter capsulatus* や *Rhodobacter sphaeroides* のものと同じだった。また、2 つのプロモーター様の配列や、*Rhodobacter capsulatus* における酸化還元感受性転写制御タンパク質である CrtJ、RegA の結合部位様配列が見られた。現在、*sulfidophilum* における、これらのプロモーターの酸化還元条件に対する応答について検証中である。

F542

光合成細菌の新奇ペリプラズムタンパク質の遺伝子構造による機能の推定

阿部美保、原郷美、松崎雅広、山本勇、佐藤敏生（広島大、院理、生物科学）

脱窒光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*より、グルコース、ピルビン酸では誘導されずに、リンゴ酸で多量に誘導されるペリプラズム局在の分子量約35kDaのタンパク質とその遺伝子を分離したが、その遺伝子の塩基配列からは機能を推定することができなかった。本研究ではさらにその遺伝子の下流の遺伝子構造を明らかにし、このタンパク質の生理的役割を検討した。

35kDaタンパク質の遺伝子ORFAから構成されるオペロンには5つのORFが存在し、ORFABCDEとした。その中で、ORFDは、大腸菌のリン酸ABC輸送系のATP結合タンパク質であるPstBと約45%の相同性が認められた。また、ORFB、CにはABC輸送系の膜タンパク質に保存されているループ配列が存在した。これらの結果から、35kDaのペリプラズムタンパク質はABC輸送系の基質結合タンパク質であることが推定された。現在、構築した35kDaタンパク質の遺伝子破壊株の解析により、このABC輸送系の機能を検討している。

F543

緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* 反応中心の Fd との反応と電荷再結合反応

瀬尾悌介、桜井英博、Sétif, P.（早大・教育、C.E. de Saclay, France[1]）

緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* から4つの Fd 画分 A～D を精製したが、これらは光化学反応中心（PS-C）とホウレンソウ FNR からなる反応系で、いずれも高い光還元活性を示した（226～304 μmol $NADP^+ \cdot \mu$mol BChl $a^{-1} \cdot h^{-1}$）。ホウレンソウ FNR に対する親和性は、いずれも比較的高く、FNR 濃度 0.2 μM で Vmax の 80%以上であった。PS-C は、PSI と同様に 3 種の Fe-S クラスター（FX, FA, FB）を結合している。多連閃光励起分光法により、3 つの還元型 Fe-S と $P840^+$の間の室温における電荷再結合速度を測定した。PS-C 結合 cyt *c* および P840 の酸化還元差吸収が小さい 440nm における測定から、Fe-S の光化学的還元の大きさは、連続した 3 つの閃光それぞれにおいてほぼ同じだと結論された。このことは、主な電子受容体は A_0 と 3 つの Fe-S で、キノンは電子伝達の主経路にはたらいていないというわれわれの結論と調和している。また、$P840^+$の測定から、1, 2, 3 発目の閃光照射後の $P840^+$の、再還元の見かけの半減期は、1.4 s, 260 ms, 12 ms であった。この見かけの値から、結合 cyt *c* と P840 との間の酸化還元平衡を考慮して、真の電荷再結合速度を推定した。

F544

光合成細菌 *Heliobacillus mobilis* のフェレドキシンの精製とその諸性質

羽田野敦史、井上和仁、瀬尾悌介[1]、桜井英博[1]（神奈川大・理・応用生物、[1]早大・教育・生物）

光合成細菌ヘリオバクテリアの光化学反応中心（RC）は、光化学系Ⅰや緑色硫黄細菌の RC と同様に電子受容体として鉄硫黄クラスターを持ち、その主要な光合成色素はバクテリオクロロフィル *g* である。ヘリオバクテリア *Heliobacillus mobilis* より 2 種のフェレドキシン（FdA、B）を嫌気条件下で精製し、その諸性質を調べた。N 末端アミノ酸配列分析より、両者は異なる Fd である。両 Fd の吸収スペクトルは、385, 285 nm に吸収極大、300 nm に肩を持ち、4Fe-4S 型 Fd の特徴を示した。精製 FdB は、酸素に対する感受性が著しく高く、4℃で空気に暴露すると、385nm の吸収が 90 分で約 50%に低下した。一方、FdA は、同条件下で 24 時間後も 385nm の吸収に減少がほとんど認められなかった。緑色硫黄細菌 *C. tepidum* から精製した RC とホウレンソウ FNR を用いて FdA と FdB を介した $NADP^+$光還元反応を測定したところ、FdA および FdB の光還元活性は、それぞれ Vmax=121 および 58 μmol $NADP^+ \cdot \mu$molBChl $a^{-1} \cdot h^{-1}$、Km=0.18 および 0.24 μM であった。

F545

紅色細菌の光合成反応中心結合型チトクロムサブユニット遺伝子の他種への導入と機能相補

横 英昭, 松浦 克美, 嶋田 敬三, 永島 賢治
〔東京都立大院・理・生物〕

紅色細菌 *Blastochloris* (*Blc.*) *viridis* の光合成反応中心複合体はX線結晶構造解析により詳細な立体構造が解明されている。この複合体のチトクロムサブユニットは４つの *c* 型ヘムを含み、光酸化された反応中心を速やかに還元する。個々のヘムの機能解明のため遺伝子変異導入系の確立が望まれるが、*Blc.viridis* は好気条件下では生育が著しく遅く、光合成器官への変異導入が困難である。

本研究では、*Blc.viridis* のチトクロムサブユニットをコードする遺伝子を呼吸による生育能力を持つ紅色細菌 *Rubrivivax* (*Rvi.*) *gelatinosus* の相同遺伝子と置換して導入し、キメラ反応中心複合体を形成する変異株を作成した。変異株の結合型チトクロムの４つのヘムは、それぞれ *Blc.viridis* 野生株のそれと同様の酸化還元中点電位を示し、速い光酸化も見られた。また、この変異株は野生株より生育速度が約 5 倍遅いものの、光合成的生育が可能であった。これらのことより、*Blc.viridis* のチトクロムサブユニットは *Rvi.gelatinosus* 中のキメラ反応中心複合体においてもその構造および機能を維持していると考えられた。本研究により、これまで困難であった *Blc.viridis* の反応中心結合型チトクロムサブユニットに対する変異導入が容易になり、結晶構造が解明され速度論的研究の蓄積されたこのタンパク質内での電子移動機構の研究の更なる展開が可能となった。

F546

紅色光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* の近縁種での反応中心結合型チトクロムの解析

塚谷祐介、増田真二、松浦克美、嶋田敬三、永島賢治
（都立大・理・生物）

紅色細菌の光合成反応中心結合型チトクロムには４つのヘムが結合しており、光酸化されたバクテリオクロロフィル（P^+）を還元する。いくつかの紅色細菌ではこの結合型チトクロムが存在せず、絶対嫌気的条件から酸化的な環境条件への適応過程で、結合型チトクロムが失われた可能性が考えられている。近年、結合型チトクロムを持たない種である *Rhodobacter capsulatus* などに近縁の *Rhodovulum sulfidophilum* で、結合型チトクロムにヘムが３つしか存在しないことが見出され、結合型チトクロムを失う進化過程における過渡的な段階である可能性が考えられた。そこで、その近縁種１０種で解析をおこない、さらに過渡的なものがないかを調べた。

その結果、*Rhodovulum* 属に含まれる７種はすべて、３ヘムー結合型チトクロムをもち、これらの種が系統樹上で一群をなしていることがわかった。つまり、結合型チトクロム全体を失う進化以外に、ヘムを１つだけ減らすことが、これらの種の生育環境で有利に働き、新しい様式の電子伝達系が生まれ、種分化の過程でも安定的に存在していることが示唆された。３ヘムー結合型チトクロムの欠損変異株を作成すると、その光合成的生育速度が通常の約２分の１に遅くなることからも、３ヘムー結合型チトクロムが生存に有利に働いていることが支持された。

F547

らん藻における光合成速度の調節

井上 則子, 原納 究, 小島 佳代, 岩城 俊雄, 和田野 晃
（大阪府大・農・応生化）

高等植物において、光飽和及び高 CO_2 条件下における CO_2 固定速度は電子伝達速度及び RuBP 再生速度によって制限されていると考えられている。しかし C3 型高等植物と同様の光合成をすると言われるらん藻においては最大光合成速度の制限要因は明らかとなっていない。本研究ではらん藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 野生株に CO_2 との親和性の高い紅色硫黄光合成細菌 *C. vinosum* の RuBisCO (Km_{CO_2}=37 μM)を高発現させた株 AIIX を作製した。AIIX 株を用い、光飽和および高 CO_2 条件下において total RuBisCO 活性の増加が光合成最大速度に及ぼす影響を検討し、らん藻の光合成速度の調節について考察した。現在、total RuBisCO 活性が野生株に比べて約 2~5 倍の活性をもつ HX 株を作製し、HX 株についても同様の実験を行っている。

F548

葉緑体アスコルビン酸ペルオキシダーゼはパラコートによる葉の酸化的傷害の最初のターゲットである

真野純一, 堂前喜章[1], 浅田浩二[2]（京都大・食糧科学研, [1]京都大院・農, [2]福山大・工）

パラコート（MV）による葉の傷害機構を解明するため，ホウレンソウ葉でのMVストレス初期の生化学的変化を調べた。MV存在下で単離葉緑体に光照射するとストロマ型とチラコイド結合型のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）が同時に速やかに失活した。失活速度はアスコルビン酸（AsA）濃度が高いほど遅く，APXはストロマでのH_2O_2の蓄積とAsAの枯渇により失活したと考えられる。APXに遅れて葉緑体SOD，NADP+-GAPデヒドロゲナーゼが失活したが，デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ，モノデヒドロアスコルビン酸（MDA）レダクターゼ，PSII，PSI，FNRはほとんど失活しなかった。MVを与えた葉では，葉緑体APXに続き細胞質APX，グアヤコールペルオキシダーゼの順で失活したが，カタラーゼは失活しなかった。即ちMVによる酸化的傷害は葉緑体APXの失活から始まり，葉緑体で光生成するH_2O_2が消去されなくなるためH_2O_2感受性の諸酵素が失活し細胞全体の抗酸化能が低下する，という順序で進行することが明らかになった。MV処理葉の細胞のH_2O_2消去能の低下を，葉に光パルスを照射した後のMDAシグナルの寿命のESR測定から見積もることができた。

F549

ENHANCED STRESS-TOLERANCE OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS THAT EXPRESS A HUMAN DEHYDROASCORBATE REDUCTASE GENE

Sun-Mee CHOI[1], Suk-Yoon KWON, Haeng-Soon LEE, Yong-Mok PARK[1], Sang-Soo KWAK; Plant Cell Biotech. Lab., Korea Res. Inst. Biosci. & Biotech. (KRIBB), Oun-dong 52, Yusong, Taejon 305-333, Korea, [1]Dept. Biol., Chongju Univ., Chongju 360-764, Korea

Dehydroascorbate reductase (DHAR; EC 1.8.5.1) is an enzyme catalyzing the reduction of dehydroascorbate (DHA) to ascorbic acid (AsA, ascorbate). To analyze the physiological role of DHAR in environmental stress adaptation, we developed transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) plants expressing a human DHAR gene in chloroplasts and investigated their protection effect to oxidative stresses induced by methyl viologen (MV), hydrogen peroxide (H_2O_2), chilling and salt. DHAR activity and AsA content in DHAR transgenic plants were 1.43 and 1.8 times higher than those of non-transgenic (NT) plants, respectively. When tobacco leaf discs were subjected to MV (5 μM) and hydrogen peroxide (200 mM), DHAR transgenic plants showed 40% and 25% less cellular damage against MV than NT plants, respectively. The enhanced tolerance to chilling (15℃) or salt stress will be also introduced. Taken all results together, enhanced AsA content by DHAR may contribute to the protection against the oxidative stress derived from various sources.

F550

DIFFERENCIAL RESPONSES OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS THAT EXPRESS BOTH SOD AND APX IN CHLOROPLASTS TO VARIOUS STRESSES

Yu-Jeong JEONG[1], Suk-Yoon KWON, Haeng-Soon LEE, Jae-Wook BANG[1], Sang-Soo KWAK; Plant Cell Biotech. Lab., Korea Res. Inst. Biosci. & Biotech. (KRIBB), Oun-dong 52, Yusong, Taejon 305-333, Korea, [1]Dept. Biol., Chungnam Natl. Univ., Taejon 305-764, Korea

To understand the protection mechanism of plant against stresses such as methyl viologen (MV), cadmium (Cd), hypoxia (submerging), chilling, drought and salt, we developed transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) plants that overexpress superoxide dismutase (CuZnSOD, MnSOD) or/and ascorbate peroxide (APX) in chloroplasts. The simultaneous expression of SOD and APX in chloroplasts provided much better protection from MV-mediated oxidative stress than single expression of SOD or APX. Transgenic tobacco plants showed more resistance against Cd (50 μM), hypoxia (4 days), or chilling stress (15℃) compared to non-transgenic (NT) plants. When 4% PEG-8000 as a drought stress or 100 mM NaCl was treated for 25 days, each transgenic plant showed a different response. Interestingly, triple transformants expressing CuZnSOD, MnSOD and APX showed more sensitive to salt stress the NT plants. The results suggest that the overexpression of SOD or/and APX in chloroplasts may differently contribute to the protection against the oxidative stress derived by various stresses.

F551

スピンラベルEPR法によるクロレラ細胞の光活性の測定

山田修嗣，松田祐介，河盛阿佐子
（関西学院大・理）

Chlorella ellipsoidea は培養過程における CO_2 濃度によって無機炭素濃縮機構（CCM）が発現及び抑制されることが知られている。我々は CCM の発現が抑制される高 CO_2 濃度下(5%)と、CCM が発現する低 CO_2 濃度下(0.034%)で育てた 2 種類のクロレラを用意した。それにスピンラベル TEMPONE、再酸化剤 $K_3Fe(CN)_6$、細胞外部に存在する TEMPONE ラジカルを失活するための $Na_2MnEDTA$ を混入することによって細胞内部の TEMPONE のみから寄与する EPR シグナルを観測した。その状態で光照射しシグナルの変化を追ったところ、細胞の光活性により TEMPONE ラジカルが還元されることが分かった。そこで電子伝達経路を阻害する DCMU 等を混入し、TEMPONE ラジカルの還元部位を調べたところ、電子伝達経路の PSII 以降で還元されていることが確認された。

F552

超高 CO_2 耐性微細緑藻における低温蛍光スペクトルに及ぼす CO_2 濃度と光条件の影響

佐藤朗、蔵野憲秀、宮地重遠（海洋バイオ・釜石）

1-5%CO_2 条件で生育させたラン藻および緑藻を低濃度 CO_2 (0.04%) に適応させると、低温蛍光スペクトルにおける相対的なアンテナサイズが光化学系 I（PS I）よりに変化する。これは、低 CO_2 における溶存無機炭素ポンプに PS I 環状電子伝達により生成される ATP エネルギーが必要であることを反映すると考えられる。一方、超高濃度（20-40%）CO_2 への適応については、超高 CO_2 耐性株 *Chlorococcum littorale* を用いて、細胞内 pH 維持のための H^+ 排出ポンプ様機構への PS I 環状電子伝達による ATP 供給の可能性を提唱してきた。しかし、これまでは低 CO_2 から超高 CO_2 への適応過程において認められる生育・光合成のラグの期間における検討であり、超高濃度 CO_2 に完全に適応した細胞についての検討は十分ではなかった。そこで本研究では、生育・光合成のラグが無い 3%CO_2 から 40%CO_2 への適応に伴う低温蛍光スペクトルの変化を調べ、低 CO_2 への適応過程におけるそれと比較・検討を行った。CO_2 濃度の違いによる生育速度の変化によって細胞濃度すなわち光条件も変化する影響を考慮するため、実験は全て高および希薄細胞濃度の両条件で行った。3%CO_2 で生育させた *C. littorale* 細胞では細胞濃度に無関係に LHC II 由来の蛍光ピーク（685 nm 付近）が優位であるスペクトルを示した。40% CO_2 に適応した細胞においては、希薄細胞濃度では 3% CO_2 条件のスペクトルと違いが無かったが、高細胞濃度では LHC I 由来のピーク（714 nm 付近）が優位であった。これらのスペクトルの変化は低 CO_2 への適応においても同様であった。また、同じく超高 CO_2 耐性株である *Chlorella* sp. UK001 を低 CO_2 から 40%CO_2 に移行した場合には、生育・光合成のラグを伴わずに細胞濃度の増加にしたがって LHC I 由来のピークの増大が認められた。以上の結果から、微細藻類の低 CO_2 および超高 CO_2 への適応には、光エネルギーが不十分な条件においては PS I 環状電子伝達により生成される ATP エネルギーが必要となることが示唆された。（*Chlorella* sp. UK001 を分与して頂いた住友化学の村中俊哉博士に感謝いたします。）

F553

常温性ラン色細菌 *Synechocystis* sp. PCC6803 における高温応答

平良佳子，井上名津子，菓子野康浩，小池裕幸，佐藤和彦（姫工大・理・生命科学）

常温性ラン色細菌 *Synechocystis* sp. PCC6803 を種々の温度で培養した時、光合成及び光化学系Ⅱの反応がどの様に温度順化するかをより詳しく調べた。その結果、２５－３５℃培養では光合成および光化学系Ⅱの活性が共にほぼ一定値になるように順化するが、４０℃以上では活性が増加した。

さらに２５℃及び３５℃で培養した細胞の高温に対する耐性をより詳しく比較したところ、光化学系Ⅱの反応中心の活性が高温処理を行った温度で測定すると３５℃で培養した細胞の高温への耐性が増加が観察された。高温処理後生育温度に戻し、活性を比較したところ、両者での差は認められなくなった。このことは光化学系Ⅱの熱失活過程には以前考えられた２つの中間段階に加えて、高温への順化現象を示すもう１つの中間段階があることを示している。

F554

低温・光ストレスによる光化学系Ⅰの不可逆的な阻害

工藤英樹、園池公毅（東大・新領域・先端生命）

低温感受性植物は、低温下において不可逆的な生育障害を受ける。古くから低温傷害の不可逆性は農学的にも大きな問題であったが、その原因は不明であった。低温・弱光処理により光化学系Ⅰが選択的に阻害されることから、その回復が低温傷害の不可逆性を解明するカギを握ると推測した。そこで低温傷害の不可逆性と系Ⅰ阻害の関係を解明するために、低温・光阻害後の系Ⅰ活性の回復を低温感受性植物であるキュウリの生葉を用いて追跡した。その結果、1）光化学系Ⅰの活性回復は遅く、阻害６日後でさえも阻害が残った。2）処理直後には変化が見られないクロロフィル量が処理後３日間に減少し、その時点におけるクロロフィル量と P-700 光酸化量との間には強い相関があった。3）減少したクロロフィルに対応して PsaA/B サブユニットが分解した。以上の結果は、光阻害を受けた光化学系Ⅰの回復は遅く、低温処理による阻害が、反応中心サブユニットの実質的な減少を伴う不可逆的な阻害であることを示唆している。この阻害が低温傷害の不可逆性の主な原因であると考えられる。

F555

Synechocystis sp. PCC6803 における Ycf33 の機能解析

大塚雅子・菓子野康浩・小池裕幸・佐藤和彦（姫工大・理・生命）

Synechocystis sp. PCC6803 に存在する Ycf33 は、分子量 7.5 k Da の２回膜貫通部位をもつタンパク質である。これのホモログは、紅藻、珪藻、クリプト藻、灰色藻の葉緑体で見出されている。さらに *A. thaliana* では、この遺伝子は核に見出されていることから、"green"の系統ではこの遺伝子は核に移行していると考えられている。このタンパク質の機能は、現在のところ不明である。私達はこの遺伝子を欠失させた変異体の表現型から、その機能を推定することを試みた。

変異体は、通常光強度下での生育が野性株に比べて遅かった。変異体の吸収スペクトルを測定すると、クロロフィルの吸収がフィコシアニンの吸収に対して減少していた。このことから、変異体では PSII/PSI の量比が変化していると考えられた。この現象は、強光条件で野性種を培養した時の応答に似ている。現在、光強度、光の質等の、光環境を変えて培養した時の PSII/PSI 比の変化や、その時の遺伝子発現の様子を、DNA チップを用いて解析している。

F556

Synechocystis sp. PCC 6803 の異なる光質下での遺伝子発現
—DNA マイクロアレイを用いて—

日原由香子、池内昌彦[1]（埼玉大・理・分子生物、[1]東大・教養・生物）

シアノバクテリアは光化学系２を優先的に励起する光（系２光）、光化学系１を優先的に励起する光（系１光）等に対し、光化学系量比の変動、フィコビリソームの組成変化等の順化応答を示すことが古くから知られている。今回我々は、新たな試みとして遺伝子発現レベルでの順化応答を *Synechocystis* sp. PCC 6803 の全 ORF を網羅した DNA マイクロアレイを用いて調べた。白色光下で培養した野生株を系２光、系１光下に移し、30 分、3 時間、16 時間の３点において２種の光質間での遺伝子発現の差異を調べたところ、系２光下では、*sll1800* から *sll1812* 近辺の *rpl*、*rps* 遺伝子群その他の転写や翻訳に関わる遺伝子転写産物が相対的に多く蓄積していた。また *sll1471* (*cpcG*)、*sll0928* (*apcD*)の蓄積が多く見られた。系１光下で相対的に誘導される遺伝子は *sll1515*、*slr1634*、*slr0373* 等多くが機能未知であったが、*slr0750* (*chlN*)、*slr1311* (*psbA2*) 等も含まれていた。これまでに調べた光強度変化や光合成電子伝達阻害剤添加への応答とは対照的に、光質の変動に対して応答する遺伝子は少なく、光化学系やフィコビリソームの転写産物レベルもほぼ一定に保たれていた。また 30 分から 16 時間にかけての遺伝子誘導又は抑制の変動幅もそれほど大きくなかった。*sll1471* (*cpcG*)、*sll0928* (*apcD*)については、光質変化に対する順化応答への関与が強く示唆されるため、現在遺伝子破壊等の解析を進めている。

F557

シアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 遺伝子破壊株の蛍光挙動モニタリングによる表現型解析

相場洋志[1]、池内昌彦[2]、小川晃男[3]、園池公毅[1]（[1]東大・新領域・先端生命、[2]東大・教養・生物、[3]名大・生物分子応答研究センター）

シアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 株は全ゲノムのシークエンスが決定されており、それら遺伝子の発現様式に関してはDNAチップを用いた網羅的な解析が進められている。しかし、それら遺伝子を破壊した株の表現型は実に多様なため、1つ1つを個別に検討していくしかなかった。光合成反応については蛍光測定によって表現型を解析できることが知られているが、シアノバクテリアの光合成電子伝達鎖は一部呼吸の電子伝達にも使われ、また他の代謝系とも影響し合っていると考えられる。そこで、呼吸系やその他の代謝系の遺伝子破壊株について、蛍光カメラを用いてクロロフィル蛍光を測定したところ、これらの遺伝子の変異が蛍光挙動の変異として検出されることがわかった。この蛍光カメラはクロロフィル蛍光の経時変化を二次元的に解析できるため、遺伝子破壊株の表現型を網羅的に解析できると考えている。遺伝子破壊に由来する蛍光変異の特徴付けについて論じたい。

F558

フタバネゼニゴケのプロトクロロフィリド還元酵素遺伝子の光による発現制御

鈴木崇紀, 滝尾進[1], 山本勇, 佐藤敏生
（広島大院・理・生物科学, [1]熊本大・理・生物科学）

プロトクロロフィリドの還元は、光依存型(LPOR)と光非依存型(DPOR)の2つの酵素によって触媒されるクロロフィル合成のキーステップである。それら酵素遺伝子の発現は、緑化過程に応じて制御されると予想される。

これまでに私達は、苔類フタバネゼニゴケから植物体と同様に光合成遺伝子発現の光制御能を有する黄色細胞株と、一部の光応答性を欠如した緑色細胞株を分離し、両株を用いて2つの酵素遺伝子が光依存的に発現することを報告してきた。また、緑色細胞における両遺伝子発現の光応答性は異なり、それらの制御に関わる光情報伝達経路は異なると考えている。そこで、光による両遺伝子の発現制御機構を解明するため、暗所で従属栄養的に培養した黄色株に光強度の低い単色光を照射した結果、両遺伝子の転写産物の蓄積にフィトクロムが関与することが明らかとなった。また、光合成電子伝達阻害剤を用いた解析から、光合成電子伝達系も光受容体の一つとしてLPOR遺伝子の発現制御機構に関わることが示唆された。一方、緑色株では、LPOR遺伝子の発現は弱光下では誘導されず、DPOR遺伝子は明暗関わらずに強発現していたため、緑色株はフィトクロムより下流の光情報伝達因子が欠損した変異株であることが示唆された。

F559

緑藻 *Pandorina morum* におけるプラストシアニンの銅による発現調節

青木義徳，中村真樹[1]，高柳進之輔[1]，吉崎文則（東邦大・理・生物，[1]東邦大・医・生物）

光合成電子伝達系のシトクロム *f* と P700 の間では，プラストシアニン（PC）またはシトクロム c_6 が働いている．一部の緑藻とシアノバクテリアは，培地中に銅が存在するとPCをつくり，存在しないとシトクロム c_6 をつくる．緑藻 *Pandorina morum* もその1種であり，今回，PCの発現調節段階を調べた．既知の緑藻PC塩基配列をもとにプライマーを作製し，ゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い，PC遺伝子の塩基配列を決定した．また，1 μM $CuSO_4$ を含む培地と，銅を含まない培地で培養した細胞から全RNAを抽出し，PC遺伝子断片をプローブとしてノーザンブロット分析を行った．その結果，銅添加細胞中には，無添加細胞中より数倍多いmRNAが蓄積していた．これは，主にmRNA蓄積の段階でPCの発現が調節されていることを示唆している．

F560

ラン藻 *Synechosystis* PCC 6803 の亜鉛 ABC transporter とその制御に関わる遺伝子

柴田真理、加藤大和、Himadri B. PAKRASI[1]，小川晃男、Maitrayee Bhattacharyya-PAKRASI[1]（名大・生物分子応答研究センター、[1]Washington Univ.）

Synechosystis sp. PCC 6803 のゲノム上にある ABC transporter をコードする遺伝子 slr2044 の変異株を作成し、亜鉛欠乏条件の BG11 での生育を見たところ、ほとんど生育しなかった。共転写されると思われる前後の遺伝子も破壊したところ、同様に亜鉛欠乏条件下では生育しなかった。このことはこれらの遺伝子が亜鉛の取込みに関与することを示している。また slr2043-2045 の上流に逆向きにコードされている sll1937 遺伝子変異株を作成し、野生株と比較したところ、野生株で slr2043-2045 遺伝子が発現しない条件下（0.77μM Zn の BG11）で変異株ではこれらの遺伝子発現が強く見られた。このことは Zn 取込みに関わる遺伝子を sll1937 遺伝子が制御していることを示唆している。

S501

Synechocystis sp. PCC6803 のミキソール・ジメチルラムノシド（ミキソキサントフィル）

高市真一，眞岡孝至，正元和盛
（日本医科大・生物，京都薬科大，熊本大・教育）

ラン藻類に存在する高極性のカロテノイド配糖体は，一般には"ミキソキサントフィル myxoxanthophyll"と呼ばれ，糖部分はラムノースと考えられている．しかし糖の同定が不十分な例も多く，また充分な分析結果に基づいたものではラムノースばかりでなくメチル・ラムノース，フコースなどの例もある．そこでカロテノイド分野では配糖体が未同定のばあいミキソール配糖体 myxol glycoside，同定されたときは例えばミキソール・ラムノシド myxol rhamnoside と称することになっている．

Synechocystis sp. PCC6803 は全遺伝子が判明しているので，カロテノイド生合成経路を確定し，各段階の遺伝子を確定することは重要である．本研究では全てのカロテノイドの立体構造を含む化学構造を決定した．"ミキソキサントフィル"はミキソール・2,3-ジメチルラムノシドであり，糖の同定と立体構造はＮＭＲ，ＣＤなどを用いて解析中である．他のカロテノイドはβ-カロテン，(3*R*,3'*R*)-ゼアキサンチン，エキネノン，(3'*R*)-3'-OH-エキネノンであることを同定した．

S502

高等植物におけるクロロフィル代謝とその生理的意義

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

老化葉・成熟果実の脱緑は劇的な現象であるものの、クロロフィル代謝の研究はその代謝産物の抽出・同定が困難なために、明らかではない。

これまでに、*Arabidopsis haliana* の老化葉とトマト果皮よりクロロフィラーゼ遺伝子とクロロフィル*b* リダクターゼ遺伝子を単離した。さらに，pheophorbide *a* モノオキシゲナーゼ酵素を部分精製し，この酵素による pheophorbide *a* の*in vitro* での酸化開裂機構を検討した。酸化開裂機反応での $^{18}O_2$ 添加アッセイ系では、pheophorbide *a* 代謝産物中に2分子の酸素原子が挿入され、分子状酸素の一つの酸素原子がホルミル基に添加された。

現在、クロロフィル代謝過程とその生理的機能を抗ビリルビンモノクローナル抗体 (24G7) を用いて解析中である。

S503

ウンシュウミカン(*Citrus unshiu* Marc.)におけるクロロフィラーゼ遺伝子の発現の解析

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

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

現在，エチレン処理をしたウンシュウミカン果実果皮より クロロフィラーゼ遺伝子を単離し，その発現様式について解析を行い，さらにその遺伝子の機能についても解析中である．

S504

エチレン処理したブロッコリー(*Brassica oleracea* L.)花蕾における新しいクロロフィル代謝産物

高橋芳弘，古田宗宜，山元洋幸，倉田裕文[1]，東　理恵[2]，下川敬之，足立　勝[2]（宮崎大・農，[1]九州農業試験場，[2]宮崎医科大・第二生化）

クロロフィル分解の促進は，エチレン生理作用の一つである．前回，エチレン処理したブロッコリー花蕾から抽出した粗酵素液によるクロロフィル*a*分解経路は，複数の酵素反応により，クロロフィル*a*⇒クロロフィリド*a*⇒フェオフォルビド*a*⇒C13^2-カルボキシルピロフェオフォルビド*a*⇒ピロフェオフォルビド*a*へ代謝されることが明らかとなった．

今回，高速液体クロマトグラフィーを使用して，エチレン処理したブロッコリー花蕾の粗酵素液によるクロロフィル*a*代謝系の調査を行った．今回の実験条件で，クロロフィル*a*代謝産物として，クロロフィリド*a*，Mg-C13^2-カルボキシルピロフェオフォルビド*a*および新しいクロロフィル*a*代謝産物が検出された．

以上のことから，ブロッコリー花蕾のクロロフィル代謝に，クロロフィル*a*から新しいクロロフィル*a*代謝産物への反応系が関与していることが示唆された．

S505

光化学系IIにおけるSQDGの役割

養田歩・園池公毅[1]・岡田克彦・佐藤典裕・都筑幹夫
（東京薬大・生命、[1]東大・新領域・先端生命）

緑藻クラミドモナスのスルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)欠損変異株(*hf-2*)では、単離チラコイド膜でのフェリシアン化カリウムを電子受容体とした時の酸素発生速度が低下していたが、その低下はSQDGを与えて培養すると回復した。このことは、クラミドモナスにおいてSQDGが光化学(PS)II活性維持に貢献していることを示唆する。水からDCIPの電子伝達速度も*hf-2*では同様に減少した。水とジフェニルカルバジド(DPC)を電子供与体とすると野性株ではDPCの影響はみられなかったが*hf-2*ではその電子伝達速度が野生株の約9割に増加した. SQDGを与えて培養した*hf-2*では水からDCIPの電子伝達速度は増加し、DPCの電子供与体としての効果はみられなかった。様々なキノンを用いた酸素発生速度の測定から野性株と*hf-2*においてQ_B部位環境の差が示唆されたが、野生株と*hf-2*でQ_AQ_B間の電子伝達速度に差はみられなかった。*hf-2*では、SQDG欠損の為にPSII酸化側での電子伝達効率の低下が生じ、PSII活性が減少していると予想される。

S506

光合成の初期過程におけるホスファチジルグリセロールの機能

萩尾美樹、桜井勇[1]、Zoltan GOMBOS、和田元（九大院・理・生物、九大・理・生物[1]）

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

私達は、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 からホスファチジルグリセロール（PG）の合成欠損株（*pgsA* 破壊株）を作製し、その性質を野生株と比較することにより光合成における PG の機能を解析している。これまでに、PG がこのラン藻の増殖と光合成に必要であることを明らかにしている。今回は、PG が光合成の初期過程の中でも、光化学系 2 において重要な機能を担っていることを明らかにしたので報告する。また、高等植物における PG の機能を調べるために、シロイヌナズナからホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素の cDNA（*PGS1*, *PGS2*）をクローニングしたのでこれについても報告する。

S507

ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）は光化学系 II 機能に必須の成分

Zoltan Zoltan Gombos, Zsuzsanna Varkonyi, 萩尾美樹 1, 岩城雅代 2, Laszlo Kovacs, 正元和盛 3, 伊藤繁 2, 和田元 1; Inst.Pl. Biol., Biol.Res.C., Hungarian Acad. Sci., 1 九大院　理　生物., 2 名大院　理　物理, 3 熊大　教育　生物.

ＰＧ合成を止めた PCC6803 pgsA- mutant 細胞で光合成機能を調べた。この細胞をＰＧ無添加の培地に移すとＰＧ量の減少とともに酸素発生能が減少し, ＰＧ添加で再回復した。蛍光インダクション、２閃光法によるマイクロ秒時間での蛍光収率変化、熱発光強度などの測定結果から、この阻害が光化学系　反応中心クロロフィルＰ６８０へのＹｚからの電子供与反応の遅延および電子受容体ＱＢ機能の特異的変化によるものであることが示された。一方ＱA 機能は正常だった。これらの結果からＰＧが系　反応中心機能に必須の成分であることを初めて明確に示した。

S508

酢酸処理 PS Ⅱの光誘起信号の Dual-Mode CW と Pulse EPR による研究

勝田延宏[1]，河盛阿佐子[1]，三野広幸[2]
（[1]関学大・理・物理、[2]理研・PDC・光生物）

酢酸処理した PSII に光照射を行うと、g＝2.0 と g＝11.5 の領域に２つの EPR 信号が誘起される。g＝2.0 に発生する信号は perpendicular mode で観測され、Ca^{2+}除去，Cl^-除去，アンモニア処理サンプルなどでも検出されており、数多くの研究がなされている。一方、今回 g＝11.5 で観測された信号は parallel mode でのみ検出され、酢酸処理サンプルにおいては初めての観測となる。

今回 doublet signal を pulse EPR で測定することによりその信号の非対称性が明らかになり、さらに $Y_D^{\cdot}$ と doublet signal の pulse ELDOR の観測より、$Y_D^{\cdot}$ とのラジカル間距離約 30Å を得た。

今回得られたこれらの結果を Ca^{2+}除去サンプルの結果と比較することにより、酢酸処理と Ca^{2+}除去 PSII 内で起こる酸化還元との関係を議論した。詳細は当日議論する。

S509

光合成酸素発生系光活性化機構ーメタロラジカル仮説の提唱ー

小野高明（理研PDC・光生物１）

酸素発生型光合成システム構築過程において、光合成酸素発生反応の活性中心である４核Ｍｎクラスターは全ての光合成構築成分がチラコイド膜にアセンブルされた後、最後に生成される。光化学系IIの高親和結合部位に結合したMn^{2+}は光化学系IIにより酸化され最終的に活性な４核Mnクラスターが構築される。この過程は光活性化と呼ばれる。光活性化反応過程は現存する全ての酸素発生型光合成生物において共通であると考えられている。反応は、律速過程である暗反応を介して直列につながった２つの光化学反応過程より構築されていることが、速度論的解析より明らかとなっているが、その詳細については解明が進んでいない。本研究では、光活性化反応機構の新たな仮説として、メタロラジカル機構を提唱する。ここでは、Y_Zチロシンの中性ラジカルが高親和部位に結合したMn^{2+}を酸化し、さらに、D1-His190とともにMn^{2+}に結合した水分子の脱プロトン化反応を駆動する。これらの基本反応過程は酸素発生反応で提案されているメタロラジカル仮説で提案されているものと同等である。酸素発生と光活性化は互いに異なった種類の反応ではなく、基本的には同じ反応過程が関与する一連の反応であると考える。

Biochemi. Biophys. Acta, 1503 (2000) 40-51

S510

熱処理葉緑体の光再活性化反応による高い酸素発生活性の回復

山下　巍　（鳥取市　若葉台南三丁目、自家内実験室ーグラナム（愚楽菜虫））

葉緑体を還元型DCPIPとともに５０℃で３０秒間熱処理するとその酸素発生活性が可逆的に１５％に減少した。この葉緑体に弱光下でMn^{2+}とCa^{2+}と還元剤を加え２０分間光再活性化処理をすると活性が７６％まで回復した。

この可逆的熱処理では、還元型DCPIPが酸素発生中心MnをMn^{2+}に還元してその解離・流出を促進し、０.２Mショ糖を含む緩衝液中で膨潤した葉緑体を短時間効率よく熱処理したため不可逆な蛋白質の変性や生体膜の破壊が軽微で、光再活性化後に高い酸素発生活性が再現する。熱処理葉緑体は、光再活性化反応が３００ｌｕｘの弱光で飽和し、Mn^{2+}とCa^{2+}と還元剤を要求し、２０℃・２０分で最高値に至る点でトリス処理葉緑体に類似している。

今後、酸素発生中心の内在性ペプチドの解離・再結合やチトクロムb559の酸化還元電位の変化も調べるとともに、熱処理生葉や光化学系Ⅱ粒子の光再活性化も検討する。

S511

Foレベルの高い突然変異体（Arabidopsis）における酸素発生系33kDaタンパク質遺伝子（*psbO*）の変異

村上怜子、伊福健太郎、遠藤剛、宗景ゆり[1]、鹿内利治[1]、佐藤文彦（京都大・生命科学、[1]奈良先端大・バイオ）

クロロフィル蛍光をもとにしたスクリーニングにより単離された、Foレベルの高い突然変異体の解析を行った。ウエスタン解析により、これらの突然変異体の１つ、LE18-30では、酸素発生系のOEC33タンパク質の発現が、野生型に比べ著しく低下していることが判明した。さらに、OEC33タンパク質遺伝子*psbO*のシークエンスから、LE18-30では、159番目のアミノ酸Glnがストップコドンに変化していることが分かった。一方、別種のOEC33コード遺伝子、*psbO2*には変異はなかった。現在、２種の*psbO*遺伝子の発現に差があるか検討している。

S512

酸素発生標品に存在する表在性タンパクの分子進化

桑山聡史、太田尚孝、奥村彰規、上野匡司、加藤宝、鈴木健裕、沈建仁[1]、榎並勲（東理大・理・生物、[1]理研・播磨）

［目的］
我々は、紅藻チアニジウムから単離した精製酸素発生系Ⅱ標品に、4種の表在性蛋白（33 kDa, チトクローム *c*550, 12 kDa および 20 kDa）が結合している事をすでに報告した［Enami *et al.* (1995) *B.B.A.* 1232, 208 - 216］。これまでに、これら表在性タンパク全てをのクローニングし、その全塩基配列を決定するとともに、その遺伝子の大腸菌による大量発現に成功し、本学会等で報告してきた。今回我々は、紅藻チアニジウムの表在性タンパクの構造的特徴を他種の光化学系IIの表在性タンパクと比較等することにより、表在性タンパクからみた分子進化について報告する。
［方法］
チアニジウムの4種の表在性蛋白のアミノ酸配列をデータベースサーチを行い、各表在性タンパクとホモロジーを持つものを全てピックアップし、その配列とのアライメントをClustal X にて行い、NJ 法で系統樹を作成した。
［結果］
I. アミノ酸配列からみた特徴
33 kDa、12 kDa および 20 kDa タンパクは葉緑体およびチラコイド膜貫通シグナルを持つことから核ゲノムに、チトクローム *c*550 のみが葉緑体ゲノムにコードされていることが明らかとなった。
II. 各表在性タンパクのホモロジー
33 kDa タンパクは全植物種にわたり、42-50%のホモロジーを持つ。一方、20 kDa タンパクは他種の PSII-Q (17 kDa) タンパクと 19%（シロイヌナズナ）-36%（クラミドモナス）と低いながら相同性を持つ。しかし、大腸菌で発現させた 20 kDa タンパクを抗原にしたポリクロナール抗体はクラミドモナスの表在性タンパクとは反応しなかった。これは、チアニジウム 20 kDa タンパクの系Ⅱ酸素発生における役割が高等植物のそれと大きく異なっていることと関係があるかもしれない。現在、クラビドモナスおよびチアニジウム系Ⅱ標品との間で表在性タンパクの相互置き換え実験を進行中である。
III. 系統樹からみた他植物種との位置づけ
33 kDaタンパクは早期にラン色細菌のグループと緑藻、高等植物とのグループで分岐しており、その後、チアニジウムはラン色細菌のグループから分岐したと考えられる。一方 20 kDa は緑藻類および高等植物が分岐するのと同時期に分岐し、独自の進化を遂げた可能性が示唆される。また、チトクローム *c*550 および 12 kDa についてもその進化からみた特徴について報告する。

S513

PsbKの系IIコア複合体における存在部位の解析

杉本育代、高橋裕一郎（岡山大・理学部・生物）

PsbKは小型で疎水的な系IIサブユニットで、緑藻クラミドモナスの*psbK*欠損株の解析から系II複合体の分子集合や安定性に必須であると報告されている。本研究ではPsbKに対する抗体を作製し、PsbKの系IIコア複合体における存在部位を解析した。

様々な系II欠損株に残存する各系IIサブユニットの定量的な解析から、PsbKの蓄積量はコア・アンテナ複合体の一つであるCP43の蓄積量とほぼ一致することが見出された。従って、CP43の存在によりPsbKは安定に蓄積されることが明らかにされた。また、細胞内のすべてのPsbKは、ドデシルマルトシドを用いて単離した系IIコア標品に結合していることが示された。さらに、チオシアン酸カリウムを用いて系II複合体を部分解体した結果、PsbKはCP43に特異的に結合していることが明らかにされた。

S514

PSII-I タンパク質は光化学系２複合体の二量体化に必要である

加藤浩、池内昌彦（東大・教養・生物）

PSII-I は植物やシアノバクテリアの光化学系２反応中心複合体に結合している 4.8kDa の膜貫通タンパク質であるが、その役割はよくわかっていない。我々は、このタンパク質をコードする *psbI* 遺伝子の破壊株を好熱性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* で作出した。遺伝子破壊株は光独立栄養条件下で野生株と類似の増殖を示した。2,6DCBQ による酸素発生活性を細胞、チラコイド膜、粗系２標品で測定したところ、野生株よりも約 20-40% 低下した。MonoQ カラムクロマトグラフィで系２複合体を分画したところ野生株とは異なり、二量体のピークが消失していることがわかった。以上のことは、PSII-I タンパク質が系２複合体の二量体化、もしくは二量体化の安定化に特異的に関わっている可能性を示唆している。

S515

好熱性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* の小サブユニットタンパク質 PSII-T の機能解析

岩井雅子、加藤浩、池内昌彦（東大・教養・生物）

我々は好熱性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* を用い、光化学系２複合体の構造と機能を解明することを目的として、系２の主要サブユニットの CP47 の遺伝子(*psbB*)、小サブユニット PSII-T の遺伝子（*psbT*）の塩基配列を決定した。PSII-T は光化学系２複合体に結合している小サブユニットだが、その役割についてはよくわかっていない。そこで我々は、*S. elongatus* の形質転換系を用い、*psbT* 破壊株（Δ*psbT* 株）を作製した。Δ*psbT* 株は光独立栄養条件では野生株とほぼ同じ増殖を示し、2,6-DCBQ を受容体とする系２の酸素発生活性には顕著な違いは認められなかった。さらに解析するため、野生株とΔ*psbT* 株からチラコイド膜を単離した。他の小サブユニット遺伝子破壊株とは異なり、Δ*psbT* 株の系２の酸素発生活性は野生株と比べて顕著な違いは認められなかった。現在、Δ*psbT* 株から単離した光化学系２複合体をより詳細に解析しており、その結果も報告する予定である。

S516

光ストレス下での D1 蛋白質の架橋と分解の制御：蛋白質リン酸化の役割

三宅晶子、和気佳代子、大嶽美和、馬場仁美、友川裕加、逸見隆博、山本　泰（岡山大・理・生物）

光化学系 II が強い可視光で照射されると、反応中心 D1 蛋白質が損傷を受け、分解される。この D1 蛋白質の損傷-分解の中間過程で、D1 蛋白質と光化学系 II の他の蛋白質 (D2 や CP43) との架橋が生じる。また、D1 蛋白質など光化学系 II の幾つかの蛋白質は、光でリン酸化されることが知られている。本研究では、この蛋白質リン酸化が D1 蛋白質の架橋とその後の分解にどのように関係しているかをホウレンソウ葉緑体チラコイドで調べた。その結果、（１）D1 蛋白質などのリン酸化は、光損傷を受けた D1 蛋白質の周辺蛋白質との架橋を促進すること、（２）D1 蛋白質の架橋産物はストロマプロテアーゼで分解されるが、リン酸化された D1 蛋白質とされていない蛋白質では分解の程度に差が無いことが分かった。

S517

D1タンパク質上のHis272における*Synechocystis* sp. PCC 6803変異株の機能解析

鎌田知江[1]，山里明弘[1]，佐藤公行[1,2]
([1]岡山大院・自然科学，[2]岡山大・理・生物)

光化学系 II の構造と機能の解析を目的に行われた D1 タンパク質のランダムなアミノ酸置換の実験によって、反応中心の非ヘム鉄のリガンドの 1 つと推定される His-272 の Arg への置換が *Synechocystis* sp. PCC 6803 株の光独立栄養性を喪失させることが明らかにされた。興味ある点は、このアミノ酸置換が複合体の還元側近傍で生じているにも関わらず、その影響が還元側の DCMU の反応性だけでなく、酸化側における水分解の機能に及んでいることである。本研究では DEAE カラムクロマトグラフィーを用い、変異株から光化学系 II コア複合体を単離した。この標品では水分解活性は認められず、人工の電子供与体 DPC からの部分的な光化学系 II 活性が大きく低下していた。さらに非ヘム鉄の存在状態や酸化側成分の機能状態を解析し、この特定のアミノ酸置換が光化学系 II の構造と機能に影響を与える仕組みについて考察する予定である。

S518

Synechocystis 6803 における D1 タンパク質前駆体のC末端延長部分の切断機構－2段階切断の可能性－

稲垣言要，山本由弥子[1]，佐藤公行[1]（農水省・生物研，[1]岡山大・理・生物）

光化学系 II 反応中心のサブユニットである D1 タンパク質は、C末端に延長部分を持つ前駆体として合成され、この延長部分は、ルーメン内腔に局在する特異的なタンパク質分解酵素（CtpA）により切断除去される。この過程は酸素発生系 Mn クラスターの構築に不可欠であるが、延長部分の存在の生物学的意味は明確にされていない。この延長部分の長さは生物の種類によって多様で、シアノバクテリアでは 16 残基である。一方、高等植物では進化の過程でそこから 7 残基が失われたと考えられ、9残基から構成される場合が一般的である。

本研究では、ランソウ *Synechocystis* 6803 における D1 タンパク質前駆体のプロセッシングをパルス・チェイス実験で解析した結果を報告する。電気泳動による解析の結果、前駆体と成熟体のバンドの間に一過的に新たなバンドが出現することが明らかになった。ペプチドマップなどの結果は、このバンドが D1 タンパク質のプロセッシング中間体であることを示しており、このことは、この株ではC末端延長部分が 2 段階の酵素反応で切断除去されていることを示唆している。本報告では、その反応機構と生物学的意義について考察する。

S519

シトクロム b6/f 複合体の蓄積量に関わるシロイヌナズナ新規変異体

佐藤武史、山嵜裕之、宗景ゆり、鹿内利治（奈良先端大・バイオ）

植物には様々な光によるダメージからの回避機構が存在するが、その一つに NRD (non-radiative dissipation of absorbed light energy from photosystem II) がある。NRD の導入はチラコイド膜を介したプロトン勾配(ΔpH) をモニターして制御されている。シトクロム b6/f 複合体はΔpH を形成する重要なポイントを占め、複合体の活性に関わる変異は NRD 誘導に影響する。我々は強い光強度にて NRD 誘導能が減少しているシロイヌナズナのミュータントを作出した。シトクロム f に対する抗体でウェスタンブロッティングを行った結果、*pgr2* と *pgr3* においては定常状態におけるシトクロム b6/f 複合体の量がかなり減少しており、その結果、NRD 誘導能が低下していると思われる。*pgr2* と *pgr3* はそれぞれクロモゾーム II と IV にマップされ、シトクロム b6/f 複合体生合成もしくは安定性にかかわる、新規の変異体である。

S520

フェレドキシンとフェレドキシン-NADP$^+$還元酵素複合体の立体構造

栗栖源嗣、楠木正巳、恩田弥生、有賀洋子、長谷俊治
(阪大・蛋白研)

フェレドキシン-NADP$^+$還元酵素(FNR)は、電子伝達蛋白質フェレドキシン(Fd)と NADP$^+$の間の酸化還元反応を触媒している酵素である。反応に必要な電子の授受は FNR と Fd が蛋白質・蛋白質複合体を形成した後に行われると考えられている。今回、我々はトウモロコシの葉緑体に存在する FNR と Fd を用いて電子伝達複合体を結晶化し、その立体構造を明らかにした。FNR:Fd複合体の形成は、主に静電的相互作用により成り立っていた。また、酸化還元中心である FAD と鉄・硫黄クラスターが極めて近い距離に位置しており、その近傍は疎水的な環境となっていた。今回得られた複合体構造と FNR、Fd 単独での構造とを比較したところ、複合体を形成することにより FNR、Fd 双方に構造変化が引き起こされることが明らかになった。このような分子間相互作用による構造変化が FNR の酵素作用の調節要因となる可能性を議論する。

S521

光化学系Ⅰの電子受容側に異常のある *Arabidopsis nrd5* の解析

宗景ゆり、北條雅也、遠藤剛[1]、鹿内利治（奈良先端大・バイオ、[1]京大・院生命科学）

我々は光エネルギー過剰条件下の明反応制御機構を解明するため、クロロフィル蛍光画像化システムを用いたスクリーニングを行い、多数の *Arabidopsis* 変異株を得た。その中の *nrd5* (*non-radiative dissipation*)は弱光下では比較的正常な電子伝達を示すが、強光下で光化学系Ⅰの反応中心が還元状態に陥ってしまう変異株で、強光ストレスに非常に弱い。光化学系Ⅰからの電子受容体である低濃度の methyl viologen を加え、光照射を行ったところ、酸化型の P700 の活性が得られたことから、*nrd5* は光化学系Ⅰの電子受容側に欠陥があることが明らかになった。また、*nrd5* の表現型は、CO_2 free air や N_2 ガス中において光化学系Ⅰの電子受容体となる $NADP^+$や O_2 を減少させた時に著しく強調された。この結果は NRD5 が光化学系Ⅰから $NADP^+$や O_2 以外への電子供与に関わってる可能性を示唆している。Map-based クローニングにより *NRD5* は新規の低分子葉緑体タンパク質をコードしていることが明らかになった。NRD5 はラン藻、ボルボックスにホモログが存在し、光合成生物が共通して持つタンパク質であると考えられる。NRD5 は光化学系Ⅰの過還元を防ぎ、ストレス下での補助的電子伝達経路に関わる重要な役割を果たすと考えられる。

S522

タバコ葉緑体形質転換による *ndhC-J-K* オペロン破壊株の作出とその解析

高林厚史、遠藤　剛、鹿内利治[1]、佐藤文彦（京大院・生命科学、[1]奈良先端大院・バイオ）

高等植物の葉緑体NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ複合体(NDH)は、葉緑体ゲノムにコードされている１１のサブユニットと核ゲノムにコードされている複数の未同定のサブユニットから構成されている。現在までに複数の研究室で、タバコ葉緑体形質転換系を用いてNDHの各サブユニットの破壊株が作成されているが、破壊株の形質は必ずしも一致していない。そこで我々は、新たにK-JおよびC-K-Jサブユニットの破壊株を作出し、すでに得ているBサブユニット破壊株とその形質、特に光合成活性について比較、解析した。結果として、弱光照射後の一時的なプラストキノン還元の欠失、強光照射後のストロマ還元というB破壊株で観察された形質が新たな形質転換株でも認められた。現在、各形質転換体チラコイドでのNDH複合体の構造と活性を生化学的に解析している。

S523

一酸化窒素（NO）による葉緑体光リン酸化反応の抑制

高橋俊一、山崎秀雄（琉球大・理・海洋自然）

NO は反応性の高いラジカルであり、活性窒素種に分類される。本研究では、NO が葉緑体チラコイド膜の電子伝達及び光リン酸化に対して抑制的に働くことを報告する。チラコイド膜はホウレンソウ葉から調製し、NO の生成には SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) を用いた。NO により、NPQ 及び ETR 値の低下が見られたが、PSII の最大量子収率 (Fv/Fm) の低下は見られなかった。10μM の NO により、チラコイド膜のΔpH は 60%、光リン酸化は 80%抑制されたが、このような抑制は NO 分解産物である NO_3^-や NO_2^-では起こらなかった。また、NO による抑制効果は NO 消去作用を持つヘモグロビンにより消失した。これらの結果は、植物細胞中で僅かな NO が生成された場合でも、光合成活性の低下が起こることを示唆している。

S524

ラン藻fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase導入によるシンク/ソース器官の炭素代謝系への影響

宮川佳子[1)]、市原健志[1)]、田茂井政宏[2)]、重岡成[1,2)]
(近畿大・院・応生命化[1]，農・食栄[2])

高等植物葉緑体のfructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)およびsedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) は、光還元力による活性調節を受ける光合成炭素還元系の律速酵素の1つである。本研究では、FBPaseとSBPase活性の両方を有し、光調節を受けず、H_2O_2耐性を示すラン藻*Synechococcus* PCC 7942のFBP/SBPaseを葉緑体および細胞質へ導入した形質転換タバコ(TpFSおよびTcFS)を作成し、高等植物のソース／シンク器官における光合成および転流を含めた炭素代謝系に及ぼす影響を検討するため、両株の生育、光合成能、PCRサイクル酵素、光合成最終産物（hexose, sucrose, starch)、代謝中間体(RuBP, PGA, F6P, G6P, DHAP)を測定した。その結果、TpFS-3の生育は野生株よりも速く、最終的な背丈は野生株の1.5倍、乾燥重量は1.5倍に上昇した。上葉ではヘキソースおよびシュクロース含量が、下葉および根ではデンプン含量が著しく増加した。大気CO_2条件下(360 ppm、1500 $\mu E/m^2/s$)におけるTpFS-3の光合成速度は野生株の1.24 ±0.03倍に上昇した。栽培条件下(400 $\mu E/m^2/s$、RH 60%、25℃)でTpFS-3の面積当たりのRuBP量は野生株の約1.8倍に、PGA、G6P、DHAP、F6P量は野生株の約1.4～1.5倍に上昇していた。

一方、TcFS-1の生育、光合成能は野生株との間に顕著な差は認められなかった。栽培条件下での上葉のヘキソース含量は野生株の数倍に増加していたが、sucrose、starch、RuBP量に顕著な差は認められなかった。現在、TcFS-1でのシンク器官への転流と炭素代謝に及ぼす影響を詳細に検討中である。

S525

イネ葉の一生における ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase の量的変動に対する要因解析

鈴木 雄二、牧野 周、前 忠彦 （東北大院・農）

イネ葉の一生における ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)の生合成と分解、および *rbcL* と *rbcS* mRNA との間の量的関係を調べた。これらのパラメータは葉 1 枚全体あたりで定量し、相互比較した。

Rubisco 量は葉の展開過程において著しく増加し、ほぼ完全展開時にピークを迎え、以降の老化過程において徐々に減少した。Rubisco の生合成と分解は ^{15}Nトレーサー実験により解析した。Rubisco の生合成は展開過程において最も盛んであり、この後に著しく低下し、老化過程においてはわずかに行われているだけであった。*rbcL* および *rbcS* mRNA 量は葉の抽出と共に著しく増加し、抽出の早い段階でピークを迎えた後に急激に減少し、完全展開時にはすでにわずかであった。一方、Rubisco の分解は葉の完全展開の直後に始まり、老化過程において生合成よりも盛んになった。

以上のことから、Rubisco の生合成はイネ葉の一生を通じて主として遺伝子の転写レベルで制御され、葉の完全展開時にはほとんどが完了していること、また、Rubisco の分解が葉の老化過程において Rubisco の量的変動の主要因となっていることが示唆された。

S526

ラン藻*Synechococcus* PCC7942 RuBisCOの細胞内活性化率測定

佐藤良平、原納 究、小林大輔、道端順子、岩城俊雄、和田野晃（大阪府大・農・応用生化）

ラン藻*Synechococcus* PCC7942を界面活性剤（alkyltrimethylammonium bromide）で処理すると、細胞のイオン透過性が上昇し、in situ酵素活性測定が可能となる。我々は同界面活性剤を用いてラン藻RuBisCOのinitial活性（CO_2とMg^{2+}による活性化をしていない）及びtotal活性（CO_2とMg^{2+}により十分活性化）を測定し、RuBisCOの細胞内活性化率を評価した。

initial活性は明処理した細胞の方が暗処理した細胞の約4倍高かった。それに対して、total活性は両者で差が見られなかった。RuBisCOの細胞内活性化率は明処理細胞で98％、暗処理細胞で29％であった。また、暗処理細胞を明条件下に移行した際に観られる光合成CO_2固定活性の上昇は、RuBisCO活性化率の上昇と高い相関性を示したが、逆に明から暗への移行においては相関性を示さなかった。これらの結果から、ラン藻において明暗の環境変化に対して光合成がどのように調節を受けているかについて考察する。また、ホスホリブロキナーゼについても同様な測定を行ったので併せて報告する。

S527

ラン藻の HCO_3^-能動輸送体遺伝子の *cis* 制御領域の解析

山口修、小俣達男（名古屋大院・生命農学研究科）

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の *cmpABCD* オペロン（以下 *cmp* オペロン）は ABC 型の HCO_3^-能動輸送体をコードしており、その転写は炭素欠乏条件下で活性化される。*cmp* オペロンの転写活性化には、化学合成細菌の炭酸同化系遺伝子の転写調節因子である CbbR のホモログである CmpR が関わっているがその作用機構は不明である。本研究では *cmp* オペロンの上流領域と *luxAB* レポーター遺伝子をつないだ融合遺伝子の発現をモニターすることにより *cmp* オペロンの転写活性化に関わる *cis* 制御領域を解析した。その結果、*cmp* オペロンの転写開始点から数えて-195～-86 塩基の領域に転写の活性化に必須な領域が存在し、これに-319～-253 塩基の領域が加わることにより炭素欠乏条件下での発現レベルは 2 倍に高まり、さらに-514～-320 塩基の領域が加わると発現レベルがさらに 3.5 倍増加することがわかった。-195～-86、-319～-253 の領域には、 CbbR の認識配列と相同な配列が存在しており、これらの部位への結合によって CmpR が転写の誘導と活性化に関わることが推測された。一方、-514～-320 塩基の領域には、このような配列が存在せず、CmpR 以外の制御因子が存在することが推測された。

S528

ラン藻 *Synechosystis* PCC6803 における高い親和性と低い親和性を示す 2 つの CO_2取込み機構

下山雅哉、柴田真理、大河浩、Aaron Kaplan[1]、小川晃男 （名大・生物分子応答研究センター、[1]The Hebrew Univ. Jerusalem）

Synechosystis PCC6803 は親和性の異なる 2 つのタイプの CO_2 取込み機構を持ち、 1 つは *ndhD3* に依存し、その Km (CO_2)値は 0.6 μM であった。もう一方は *ndhD4* に依存しており、Km (CO_2)値は 4.5 μM であった。どちらのタイプも低 CO_2 条件下にしても Km 値は変わらないが、*ndhD3* 依存タイプのみ Vmax が増加した。*ndhD3* の発現量は低 CO_2 に移して 1-2 時間後に約 20 倍、20-24 時間後に約 100 倍に増加した。*sll1594* (*rbcR*)遺伝子変異株の *ndhD3* の発現量は高 CO_2条件でも野生株の 60 倍であった。

ndhD3 の発現量の増加に従って、*ndhD3* 依存性 CO_2 取込みの Vmax は上昇したが、両者の間には量的な相関関係は見られなかった。

S529

Source-limit 状態におけるサツマイモの source-sink モデル植物の光合成代謝および酵素活性の解析

佐藤真樹子，葛西哲人，矢尾知大輔，亀谷陽次郎，葛西身延，澤田信一（弘前大・農学生命・生物機能）

我々は、塊根が肥大成長するサツマイモのモデル植物を用いて、source-limit 状態における光合成の source-sink 制御機構の解析を行ってきた。その結果、1）サツマイモのモデル植物においては、他の器官（葉、葉柄、shoot）はほとんど sink 器官としては機能せず、主要な sink 器官となった塊根に同化産物が集中的に分配された。2）塊根の肥大による sink 能の増大に伴って、source 能も増加した。3）この source 能の増大は、主に葉面積の増加と光合成速度の上昇とに起因していた。4）この光合成速度の上昇は、主に RuBPcase の活性化率と、その含量の増加に起因していた。

S530

ホナガアオビユ(C4)葉における光合成・光呼吸酵素の分布：特に葉肉及び維管束鞘以外の葉構成細胞について

上野　修（農水省・生物研）

ホナガアオビユ(NAD-ME 型)の葉では、葉肉細胞(MC)や維管束鞘細胞(BSC)だけでなく、維管束柔細胞(VPC)、伴細胞(CC)、表皮細胞、及び孔辺細胞(GC)にも小型ながら葉緑体を含む。本研究では、これらの葉構成細胞における C3,C4 及び光呼吸酵素の分布を免疫電顕法により検討した。PEPC に対する標識は MC の細胞質に強く見られたが、その他 CC や GC の細胞質にも弱い標識が観察された。PPDK に対する標識は、CC を除く全ての細胞の葉緑体に見い出された。Rubisco に対する標識は、MC を除く全ての細胞の葉緑体に観察された。NAD-ME とグリシンデカルボキシラーゼ(P-protein)に対する標識は、BSC のミトコンドリアに強く、VPC のミトコンドリアに幾分弱く観察された。以上の結果は、MC や BSC だけでなく他の葉構成細胞も含めると、C4 植物葉における光合成・光呼吸酵素の細胞特異発現は従来知られていた以上に複雑であることを示している。これらの酵素の分布を代謝機能との関連からも考察した。

S531

C4 植物 *Flaveria trinervia* からの PEPC リン酸化酵素 cDNA のクローニングと解析

土田祐平[1]、古本強[1,2]、畑信吾[1,2]、泉井桂[1,2]
（[1]京大院・農、[2]京大院・生命）

PEPC は C4 植物において葉肉細胞に局在し、初期炭酸固定を行う鍵酵素であり、光依存的リン酸化により活性が調節されている。このリン酸化に至るシグナル伝達、及び活性調節機構を明らかにするには PEPC に特異的なリン酸化酵素（PEPC-PK）のクローニングが必須であるが、C4 植物では未だ単離されていない。

***Flaveria* は、C4 光合成の実験植物として（1）同族内に C4 型と C3 型の両方の種が存在し、分子進化学的研究に適している、（2）形質転換系が確立している、という点で優れている。我々は *Flaveria* から PEPC-PK 遺伝子を単離し、機能解析を行うことを目指している。degenerate PCR により得られた DNA 断片をプローブとして C4 型 *Flaveria*（*F. trinervia*）cDNA ライブラリーをスクリーニングし、全長をコードしていると思われるクローンを単離した。シーケンス解析の結果、推定 281 アミノ酸からなる蛋白質をコードしており、ほぼ触媒ドメインのみからなる構造をとっていた。PEPC-PK の mRNA は C4 型 *Flaveria* で特異的に発現しており、C3 型 *Flaveria* では発現が認められなかったことから、この PEPC-PK は C4 代謝に深く関与していることが示唆された。**

S532

ノルフルラゾン(NF)処理により白化したトウモロコシ葉における C４光合成酵素およびシャペロンなどの葉緑体タンパク質の発現

玉田　洋介[1]、今成　英司[1]、黒谷　賢一[2]、泉井桂[1,2]（[1]京大・院・生命科学、[2]京大・院・農）

カロテノイド生合成阻害剤である NF 存在下で植物を発芽・生育させると、いわゆる photobleach を受けて葉緑体の内部構造が破壊された白化葉が得られ、葉緑体と核とのクロストークの研究によく利用される。*Cab* や *RbcS* などの核の遺伝子の発現は白化葉では抑制されることが知られている。今回我々は、C４光合成の核由来遺伝子の発現が白化によりどのように影響されるかを調べた。細胞質に局在する PEPC は、以前の報告のように、mRNA・蛋白質ともに量的変化は少なかった。また、PEPC のリン酸化も検出された。葉緑体に局在するリンゴ酸酵素（ME）およびピルビン酸リン酸ジキナーゼ(PPDK)の mRNA 量はともにさほど低下しなかったが、蛋白質量は PPDK のみ顕著に低下し、翻訳レベルでの核と葉緑体のクロストークの存在が示唆された。葉緑体の形成や機能維持に関わる蛋白質のうち、Tic110 および Toc34 は著しく発現が抑制されたが、SecA、chHSC70、GroEL および Cpn20 の抗体により検出される蛋白質は全く減少しなかった。以上のことから、葉緑体に局在するC４光合成およびいくつかの分子シャペロンなどの蛋白質の遺伝子は葉緑体の存否による制御を強く受けないことが示唆された。

S533

蒸散流を介して与えたアクチン脱重合促進剤と水チャネル阻害剤が個葉光合成の CO_2 濃度依存性におよぼす影響

寺島一郎、高木慎吾（大阪大・院・理・生物科学）

個葉の光合成速度(A)と蒸散速度などを測定すると、細胞間隙 CO_2 濃度(C_i)を計算することができる。この方法によって気孔の影響を除外することによって、葉肉の光合成の CO_2 濃度依存性を知ることができる。光強度が十分である条件下で測定したAを、C_iにしてプロットした時、低 C_i 濃度域における傾きは、Rubisco の量、活性化レベル、細胞間隙から葉緑体までの CO_2 拡散抵抗などによって決定される。

葉緑体の位置や細胞膜の CO_2 透過性は、細胞間隙から葉緑体までの CO_2 拡散抵抗に大きな影響をおよぼすことが予想されている。本研究の目的は、葉緑体の位置と、CO_2 が透過する可能性が指摘されている水チャネルとがA-C_i 曲線の低 CO_2 濃度域における傾きにおよぼす影響を定量的に把握することである。インゲンの初生葉に、アクチン繊維の脱重合促進剤（サイトカラシン D）や水チャネルの阻害剤（$HgCl_2$）を投与する前後で、A-C_i 曲線の低 CO_2 濃度域における傾きを比較した結果を報告する。

S534

単離葉緑体におけるストロマタンパク質の分解－活性酸素によるグルタミン合成酵素の断片化機構の解析－

石田宏幸、安澤大輔、国分紀元、牧野 周、前 忠彦（東北大院・農・応生科）

私たちは、光照射下の単離葉緑体及びその破砕液において、Rubisco 大サブユニットが活性酸素の直接作用により部位特異的に断片化されることを報告してきた。また Rubisco と同じくストロマに局在するグルタミン合成酵素（GS）が、同様の系において断片化されることを見出した。本研究では、葉緑体におけるストロマタンパク質の分解機構の一端を明らかにすることを目的として、活性酸素を介した GS の断片化についてさらに解析した。

コムギ葉緑体から GS タンパク質を高度に精製し、GS に対する活性酸素の影響について調べた。その結果、精製 GS は金属イオンを介したヒドロキシルラジカル発生系により直接断片化され、主に4つのフラグメントを生ずることがわかった。これらフラグメントの相対分子量は、光照射下の葉緑体破砕液で見出されたものと同一であった。この精製 GS の断片化、葉緑体破砕液における GS の断片化は、いずれも methionine sulfoximine が GS に結合することにより完全に抑制された。これらの結果は、GS の断片化が Rubisco の場合と同様に、活性中心近傍で発生する活性酸素の直接作用により引き起こされていることを示唆した。

S535

クラミドモナスの低光呼吸突然変異株

鈴木健策、Gulnara I. HASANOVA（農水省・東北農試・生理生態研）

クラミドモナスの低光呼吸突然変異株 RPR の光呼吸速度は野性株の半分程度しかなく、高い CO_2 濃度で生育させた時でも光合成の無機炭素に対する親和性が高い（Suzuki 1995, Suzuki et al. 1999）。RPR 株では低い光呼吸速度とルビスコの CO_2/O_2 相対特異性との関連性は認められない。むしろ EZA や Na_2S を用いた阻害剤実験から、RPR 変異は CO_2 濃縮機構に密接に関わっていると考えられる。前回、クロロフィル蛍光が野性株等と異る特性を示したことを報告した。今回、交配で得た子孫株を用いてさらに検討した。その結果用いた全ての RPR1 変異株で唯一共通していたのは、明所・無 CO_2 で定常状態となった時に CO_2 添加によって野性株等で見られる F の急激な一時変動がないことであった。また SHAM 添加によって光合成の無機炭素に対する親和性が野性株と同程度まで低下した。これらのことから、RPR1 変異と光化学系の直接的関係は考えにくいが、CO_2 濃縮機構へのエネルギー供給との間に何らかの関係が示唆される。今後は主として形質転換株を用いた解明を試みる。

S536

AN EUKARYOTIC PHOSPHOGLYCOLATE PHOSPHATASE *FROM CHLAMYDOMONAS*

Tarlan G. MAMEDOV, Kensaku SUZUKI, Kenji MIURA[1], Kenichi KUCHO[1] and Hideya FUKUZAWA[1]; Plant Eco-Physiol. Lab., Tohoku Natl. Agric. Exper. Station, Morioka 020-0198, [1]Lab. of Plant Mol. Biol., Kyoto University, Kyoto 606-8502

Phosphoglycolate phosphatase (PGPase), a key enzyme of photorespiration, is essential for photosynthetic organisms, and is also important in animals tissues. There was, however, quite little information about its regulation and no information about the molecular structure of eucaryotic PGPases. In the previous meeting we reported about the first purification of eukaryotic PGPase from *C. reinhardtii* and it's some properties. In this report we determined whole cDNA sequence of PGPase from *C. reinhardtii*. The deduced amino acid sequence from cDNA had two domains. The N-terminal region was very similar typical stroma-targetting transit peptides reported in *C. reinhardtii*, and the following major domain was very similar to *p*-nitrophenyl phosphatase-like putative proteins from both eukaryotes and prokaryotes. It was reported that PGPase activity increased by about 60% within 5 h after transfer 5% CO_2-grown cells to air. We found, however, no change in the amount of mature PGPase subunit and the mRNA, between 5%-CO_2 grown cells and the 5h-adapting cells of *C. reinhardtii*. Our results showed that PGPase is Ca^{2+}-binding protein and probably regulated by Ca^{2+}. Possible regulatory mechanisms during adaptation to limiting CO_2 will be discussed based on the characteristics of purified PGPase and the deduced amino acid sequence.

S537

クロロフィリド*a*オキシゲナーゼ(CAO)の過剰発現によって光化学系IIのアンテナサイズが増大する

田中亮一、田中歩　(北大・低温研)

高等植物が様々な光環境に適応する上で、光化学系のアンテナサイズの調節は、重要な手段の一つであると考えられている。アンテナサイズ調節のメカニズムは明らかではないが、クロロフィル*b*の合成が重要な役割を果たしているのではないかと考えられてきた。そこで、我々は、クロロフィル*b*の合成酵素である、クロロフィリド*a*オキシゲナーゼ(CAO)を過剰発現するシロイヌナズナの形質転換株を作製し、CAOがアンテナサイズに及ぼす影響を解析した。

弱光 (50 $\mu mol/m^{-2}, s^{-1}$)下で生育した形質転換株では、クロロフィル*a*/*b*比が、親株の2.85から2.65へと下がっていることが観察された。また、LHCIIとCPaの比率は親株と比べて形質転換植物の方がおよそ20%高いこと、また、LHCPとCP47の量比は、形質転換株でおよそ40%高いことが明らかとなった。これらの結果から、クロロフィル*b*合成がアンテナサイズを制御している要因の一つであることが示された。

S538

シロイヌナズナのNADPH-プロトクロロフィリド還元酵素アイソザイム破壊株 *porB* の単離および解析

房田直記、増田建、大沢直騎、粟井光一郎、島田裕士、太田啓之、大藤雅章 [1]、中村研三 [1]、加藤友彦 [2]、田畑哲之 [2]、高宮建一郎 (東工大・大学院・生命理工・生体システム、[1]基生研・発生生物、[2]かずさDNA研)

被子植物のクロロフィル合成系において、NADPH-プロトクロロフィリド還元酵素(POR)は、光依存的にプロトクロロフィリドを還元する。昨年の本学会において我々は、シロイヌナズナにおける新規の POR(PORC)が存在し、このアイソザイムの光照射による発現制御がこれまで報告されてきた2種類の PORのアイソザイム(PORA,PORB)と異なることを報告した。

今回我々は、これらのアイソザイムの機能を明らかにするため、T-DNA ラインより PORB 破壊株を得て解析を行った。この破壊株は、野生株と同程度のクロロフィル蓄積を示した。この結果より、シロイヌナズナではクロロフィル合成にとってPORBは不可欠ではなく、PORB破壊株では PORC が PORA とともにクロロフィル合成を担っていると考えられた。また野生株でのこれらのPOR の発現解析結果も考慮すると、緑化した組織でのクロロフィル合成にはPORCが機能していると考えられる。

S539

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 で合成されたクロロフィル *b* は CP1 の特定のクロロフィル *a* と置換する

佐藤　壮一郎, 田中　歩 (北大・低温研)

光合成色素は特定のタンパク質と結合し、色素-タンパク質複合体を形成している。以前、我々のグループはシロイヌナズナの *CAO* (クロロフィル *a* オキシゲナーゼ) をラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノムに導入した形質転換株を作製し、クロロフィル *b* と結合したタンパク質の種類とそのタンパク質におけるクロロフィル *b* のエネルギー伝達を調べた。合成されたクロロフィル *b* の多くは、光化学系Ⅰの反応中心複合体のタンパク質である CP1 と結合していた。さらに、CP1 と結合したクロロフィル *b* はクロロフィル *a* に光エネルギーを伝達していた。これらの結果から、クロロフィル *b* によって CP1 が機能的に変化したことが明らかになった。

今回、形質転換株の光化学系Ⅰの吸収スペクトルを、ベクターのみを導入したコントロール株と比較した。形質転換株はコントロール株に比べ、クロロフィル *b* の吸収ピークである 650nm 付近で高い吸収を示したが、686nm 付近では、逆に低い吸収を示した。また、両者の差スペクトルと形質転換株のクロロフィル *b* の合成量には良い一致が見られた。これらの結果は、形質転換株で合成されたクロロフィル *b* が、光化学系Ⅰの特定のクロロフィル *a* と置換したことを示唆している。

S540

ラン藻 (*Anabaena* sp. PCC7120, *"Synechococcus elongatus"* Toray, *Gloeobacter violaceus* PCC7421) ゲノムの構造解析

金子貴一、中村保一、笹本茂美、C. Peter Wolk [1]、田畑哲之 (かずさDNA研、[1]ミシガン州立大)

ラン藻は植物と類似の酸素発生型光合成をおこなう原核生物の総称であり、様々な形態、生理生化学的特性をもつ種が含まれる。我々はラン藻のゲノム比較を目的として、3種の系統の異なるラン藻のゲノム構造解析を進めている。糸状性ラン藻の *Anabaena* sp. PCC7120は、ヘテロシストを分化させ窒素固定を行う。*"Synechococcus elongatus"* Toray は好熱性で、増殖の至適温度が55℃である。 *Gloeobacter violaceus* PCC7421 は細胞質内にチラコイド膜系が発達しておらず、光合成系は細胞膜に配位されている。それぞれのゲノムサイズは6.4 Mb, 2.4 Mb, 4.6 Mbである。ゲノム構造解析は全ゲノムショットガン法により行った。2000年11月現在、*A.* sp. PCC7120 は配列確定作業が進行中であり、全ゲノムの38%の配列決定が終了している。*S. elongatus* と *G. violaceus* PCC7421 はランダム配列をそれぞれのゲノムサイズの4.7倍、4.8倍重複分蓄積を終了しており、現在配列確定作業を進めている。本発表では、ゲノム構造解析の状況、および推定遺伝子の類似性にもとづく比較解析の2点について報告する。

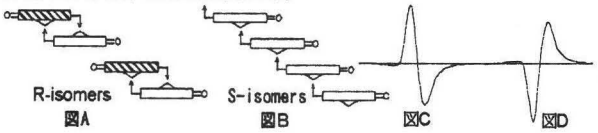
S541

光学活性の異なるBChl *c* 高次会合体のCDスペクトルの考察

和田光司、原 一公、小山 泰(関西学院大・理、)

緑色硫黄細菌のアンテナ複合体「クロロゾーム」は、主要構成色素であるバクテリオクロロフィル *c*(BChl *c*)の異性体混合物の高次会合体であることが知られている。電子吸収においてクロロゾームと同様の Q_y 吸収帯を与える *in vitro* 系会合体の基本構造が既に提唱されており、R体では図Aの様な、S体では図Bの様な高次会合構造を持つと結論されている。今回我々は *Chlorobium limicola* のクロロゾームを構成するBChl *c* 同族体を用いて、単一、あるいは2種類の混合物(R体とR体、S体とS体、R体とS体)で、高次会合体を作成しCDスペクトルを測定した。

Chlorobium limicola から単離・精製した各異性体を用いて、ジクロロメタン:*n*-ヘキサン=1:250 に、様々な異性体混合比で、最終的にBChl *c* 濃度が 1×10^{-5}M となる会合体溶液を調製し、CDスペクトルを測定した。R 体のみ、S 体のみの単一組成で作成した会合体では、R・Sの違いによってCD強度には差があるものの、どちらも図Cの様な形のCDを与えた。我々の持つクロロゾームは図Dの様なCDを与えるので、上述のCDと異なっている。またR体とR体、S体とS体の混合物も同様に図Cの様なCDを与えたが、R体とS体を混合して作成した会合体では、図CのCDをキャンセルする図D的なCDを与える成分が現れた。R体の一部が、本来S体のみが取るとされる図B的な会合を作ったと説明される。



図A　図B　図C　図D

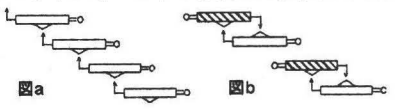
S542

固体NMR分光によるクロロゾームの構造の決定

原 一公、江川文子[1]、藤原敏道[1]、阿久津秀雄[2]、濵口 正[3]、小山 泰
(関西学院大・理、[1]横浜国立大・理、[2]大阪大・蛋白研、[3]立命館大・理工)

緑色光合成細菌のアンテナ複合体「クロロゾーム」は、主要構成色素であるバクテリオクロロフィル *c* (BChl *c*)の異性体混合物の高次会合体であることが知られている。すでに、電子吸収においてクロロゾームと同様の Q_y 吸収体を与えるS[I,E] BChl *c* とR[P,E] BChl *c* 高次会合体の溶液中での部分解体成分が、それぞれ「単量体の階段状配列(図 a)」と「二量体の階段状配列(図 b)」を基本構造としていることを溶液高分解能 NMR 分光から明らかにした[1) 2)]。今回は上記の結果を基礎に、天然クロロゾームに固体高分解能 NMR 分光を応用し、分子間 ^{13}C-^{13}C 磁気双極子相互作用から、天然クロロゾームそのものの全体構造を決定しようと試みた。

^{13}C 培養した *Chlorobium limicola* のクロマトフォアを蔗糖密度勾配遠心にかけ、^{13}Cクロロゾームを単離精製した。得られたサンプルを遠沈し、上澄みを捨てて凍らせた状態で取り出し、固体NMRのサンプルとした。RFDR 法によって個々のシグナルを帰属してケミカルシフトを決定し、空間的な相互配置情報を得るために Spin Diffusion 法を用いて NOE 的な情報を含んだ 2 次元スペクトルを得た。コンピューターでシミュレートした距離・相関情報を元にシグナルを一つずつ帰属した結果、下図 a のような S[I,E] BChl *c* 的な階段状構造だけで矛盾なく説明できることが判った。


図a　図b

1)T. Mizoguchi et al., *Chem. Phys. Lett.*, **260** (1996) 153-158
2)T. Mizoguchi et al., *Photochem. Photobiol.*, **71** (2000) 596-609

S543

カロテノイドの励起状態のダイナミクスにおける
共役鎖長依存性

稲葉 徹、張 建平、石川 達也、藤井 律子、小山 泰
(関西学院大・理)

光合成細菌のアンテナ複合体において全トランス体カロテノイドは主に補助集光作用を行っている。細菌の種類によって多種多様なカロテノイドが利用されているが、それら光合成カロテノイドは共役二重結合鎖長(n)が 9 ～ 13 であるという共通点がある。

近年、共鳴ラマン励起プロフィールによってカロテノイドの一重項励起状態である $1B_u^+$状態と $2A_g^-$ 状態の間に光学禁性な $1B_u^-$ 状態が存在することが発見された。このことはすべての光合成カロテノイドに当てはまると予測されている。本研究はこれらのカロテノイドの内部変換のダイナミクスを解明することを目的とする。

光合成細菌 *Rb. sphaeroides* G1C、2.4.1 からそれぞれneurosporene (n = 9)、spheroidene (10)、トマトジュースから lycopene (11)、*C. vinosum* から anhydrorhodovibrin (12)、spirilloxanthin (13)を抽出し、カラムクロマトグラフィーと再結晶によって全トランス体を得た。そして、これらのヘキサン溶液の近赤外領域 (780 – 1080 nm) のサブピコ秒時間分解吸収スペクトルを測定した。

SVD と global fitting による解析によって $1B_u^+$ 状態からの吸収と発光、$1B_u^-$ 状態からの吸収が検出され、$1B_u^+ \rightarrow 1B_u^- \rightarrow 2A_g^-$ の内部変換が確認された。また、各カロテノイドの $1B_u^+$ 状態と $1B_u^-$ 状態の寿命は表1のように決定された。

自然が n = 9 ～ 13 のカロテノイドを選択したことの理由の一つとして、これらの場合に $1B_u^-$ 状態の存在によって内部変換が促進されることが挙げられる。

表1　カロテノイド (n = 9 ～ 13) の $1B_u^+$、$1B_u^-$ 状態の寿命 (単位 : ps)

	neurosporene	spheroidene	lycopene	anhydrorhodovibrin	spirilloxanthin
$1B_u^+$	0.32	0.25	0.17	0.10	0.18
$1B_u^-$	0.30	0.26	0.16	0.090	0.14

S544

Rb. sphaeroides G1Cからスクロース勾配遠心分離法を用いての沈降係数の異なる2種類のcore(RC-LH1)複合体の調製・精製および それぞれのLH1環に含まれるサブユニット数の決定

植田 博之、石川 達也、 銭 朴、稲葉 徹、矢倉 達夫、小山 泰(関西学院大・理)

core(RC-LH1)複合体のLH1環はRCを取り巻くような環状構造になっている。しかしその環の大きさやまたその構造が実際に完全であるかという点において、現在も論争的である。LH1環における α,β アポプロテインのサブユニット数(n)は2つの異なった化学量論 n=12, 16 がFranke,CやAmesz,Jらによって提唱されている。当研究室の銭がRh.marinumより調製した沈降係数の異なる2種類のcore複合体のうちupper bandを分析した結果、n=16という値を確立している。そこで我々はRb. sphaeroides G1Cからcore複合体を調製・精製し、さらにそのcore複合体より色素(BChl a, BPhe a)を抽出しHPLC分析を行い、得られたBChla / BPhe aの比の分析結果とRCでの結果と比較することで、core複合体のLH1に存在しているサブユニット数およびBChl aの数の決定を試みた。core複合体の調製の際に沈降係数の異なる2つの分画が得られたので、lower band, upper bandそれぞれのcore複合体において上の操作を行い、両者より得られたサブユニット数の比較 考察を行おうとした。なお2種類のcore複合体の調製は以下の手順でおこなった。

まずRb. sphaeroidesのクロマトフォア膜の懸濁液[50mM-glycylglycine(pH7.8)]を調製し、界面活性剤として 0.75%-OTG(n-Octyl β-D-ThioGlucopyranoside) と 0.25%-SC(Sodium Cholate)を併用し可溶化した後、遠心分離をおこなった。その結果得られた上澄みを 界面活性剤を含んだスクロース勾配(0.3,0.6,0.9,1.2M)に添加し、遠心分離をおこなった。得られる沈降係数の異なる2種類の core 複合体分画の割合はスクロース勾配に含まれる界面活性剤(主にOTG)の濃度に依存しており、lower bandを分取するには0.3%-OTG,0.2%-SCを、またupper bandを分取するには0.45%-OTG,0.3%-SCをスクロース勾配 に用いるのがもっとも理想的であるという結果が得られた。次に上で調製した2種類のcore複合体をウルトラフィルターユニットを用いて、脱塩、濃縮、そして新しい界面活性剤0.25%-SMC(Sucrose Mono Cholate)での界面活性剤の交換をおこない、最終的にSMC内で安定化し、濃縮した2種類のcore複合体のFPLC分析および精製をおこなった。

現在のところ、Rb.sphaeroidesより調製したRCから抽出し、HPLC分析を行い得られた色素の比(BChl a / BPhe a)の結果として1.31±0.07という値が得られており、同様にlower bandのcore複合体から抽出した色素をHPLCで分析し得られた8.91±0.42という測定値よりこのcore 複合体のLH1環のサブユニット数を算出したところ、11.6±1.5 という結果が得られている。現在upper bandの分析が進行中であると同時に当研究室の石川が銭の実験を引き継ぎ、Rh. marinamからのlower bandの分析も進行中である。

S545

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* のシトクロム *c* 酸化酵素

松田優治[1]、稲森啓一郎[2]、川畑俊一郎[1,2]、荒田博行[1]（[1]九大院・理・生物科学、[2]九大院・医・分子生命）

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* のシトクロム *c* 酸化酵素は、ヘム *c* とヘム *b* を 1:2 の割合で含み、ヘム *a* やヘム *o* は含まない。この酵素は少なくとも 1 分子の High-spin ヘムを持ち、またヘム *c* 1 分子あたり1原子の銅を持つ。SDS-PAGE で37 kDa と 18 kDa の位置に検出される 2 つのサブユニットからなり、18 kDa のサブユニットはヘム *c* を持つ。

精製した酵素は、脱窒系で機能する一酸化窒素還元酵素（NorB と NorC からなる）とサブユニット構成およびヘムの構成において非常に類似している。18 kDa のサブユニットの N-末端アミノ酸配列は、現在知られている一酸化窒素還元酵素の NorC サブユニットの配列と高い相同性がある。このことは *R. denitrificans* のシトクロム *c* 酸化酵素と一酸化窒素還元酵素の進化的な関連を示唆しているが、精製したシトクロム *c* 酸化酵素では一酸化窒素還元酵素の活性は確認できない。また、銅を 1 分子持つ点で一酸化窒素還元酵素とは異なっている。

S546

緑色イオウ細菌の反応中心で機能する Chl *a* 型色素の構造決定

秋山 満知子[1]、安久津 聡[1]、富永 啓介[1]、木瀬 秀夫[1]、渡辺 正[2]、西田 文子[3]、Jan Amesz[4]、小泉 美香[5]、石田 信昭[5]、狩野 広美[6]、大岡 宏造[7]、小林 正美[1]（[1]筑波大・物質、[2]東大・生研、[3]海洋バイオ・清水研、[4]ライデン大、[5]食品総研、[6]農業生物資源研、[7]阪大・理）

光合成反応中心は、電子受容体に Fe-S センターを持つ系Ⅰ型反応中心と、それを持たない系Ⅱ型反応中心とに二分される。我々は反応中心で機能する特殊なクロロフィルに着目することで、その分類を試みてきた。その結果、系Ⅰ型の一次電子受容体 A_0 が Chl *a* 型色素であるのに対し、系Ⅱ型では中心金属 Mg の外れたフェオフィチン型色素であるらしいことを見出した。

緑色イオウ細菌の反応中心は、Fe-S センターを有することから系Ⅰ型に分類されているが、A_0 の正体は不明で、有機溶媒中での吸収極大波長（663 nm）から、BChl 663と呼ばれている。BChl 663の構造決定が困難だったのは、クロロソームに存在する多量の BChl *c* のためである。

本研究では、クロロソームを除去した標品を調製することで、高純度の BChl 663を mg オーダーで得ることに成功した。吸収スペクトル、FAB-mass スペクトルおよび NMR 測定より、BChl 663の環構造は Chl *a* と同じだが、フィトールの P6-P7間に二重結合が一つ余分に存在することが明らかとなった。このことは、$NAD(P)^+$ を還元するには、フェオフィチン型色素やバクテリオクロロフィルでは不十分で、より還元能が高い Chl *a* 型色素が不可欠であったことを強く示唆する。

S547

ヘリオバクテリアの Ⅰ 型反応中心と *bc* 複合体間の電子伝達反応の特異性

大岡宏造、岩城雅代[1]、伊藤 繁[2]（阪大院・理・生物、基生研[1]、名大院・理・物理[2]）

ヘリオバクテリアの反応中心は緑色イオウ細菌と同じⅠ型反応中心に分類されるが、両者の酸化側の反応様式はかなり違う。緑色イオウ細菌では、N 末端の 3 本の膜貫通ヘリックスにより膜に結合するチトクロム c_z（cyt c_z）が存在し、*bc* 複合体から反応中心への電子伝達に直接関与していることを既に報告した。一方、グラム陽性のヘリオバクテリアは外膜をもたず、可溶性の cyt *c* は存在しない。そこで *H. gestii* の細胞と膜標品を用い、反応中心への電子供与反応について検討した。可溶性成分が除かれた膜標品でも *bc* 複合体→反応中心の電子伝達反応が観測された。膜標品には少なくとも 2 種類の cyt *c* が存在しているが、N 末端のシステイン残基に脂肪酸を共有結合している cyt *c* が複合体間の反応に関与しているものと推測される。膜標品でのフラッシュ照射後の cyt *c* による $P798^+$ の再還元速度（$t_{1/2}$=約 3ms）は、生細胞（$t_{1/2}$=約 10～100μs）に比べると極端に遅かった。この速度は、温度および二価カチオン Mg^{2+} の添加で大きく促進された。今回は陽イオンの反応速度に対する影響を調べることにより、反応中心と *bc* 複合体間の特異な電子伝達反応機構について考察した。

S548

クロロソームを欠く緑色繊維状光合成細菌 *'Roseiflexus castenholzii'* HLO8 株の反応中心複合体

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

Chloroflexus に代表される緑色繊維状光合成細菌は紅色細菌と共に最も古いタイプの光合成器官を持つと考えられている。しかし 1)クロロソームが高い吸収を持つこと、2)チトクロムサブユニットを含む反応中心の精製が困難なことから、紅色細菌に比べ、光合成電子伝達系の解析が不十分であった。中房温泉から得られた *'Roseiflexus castenholzii'* HLO8 株は 16S rRNA を用いた系統解析からは *Chloroflexus* に近縁であることが明らかとなっている。しかし本菌は *Chloroflexus* に特徴的なクロロソームを持たないため光合成電子伝達反応の測定が容易である。先に、我々は反応中心複合体への電子供与体として膜結合型チトクロム *c* が関与することを発表した。今回はさらに詳細な検討を目的とし、チトクロムサブユニットを含む反応中心複合体の部分的精製を行った。

Octylglucoside と Triton X-100 を用いて可溶化した膜画分を調製用電気泳動法により分画したところ、反応中心複合体と光補集器官を含む画分を得た。酸化還元差スペクトルからはスペシャルペア（864nm）、及び *c* 型チトクロム(553.5nm)が検出された。閃光照射実験からは、膜画分と同様なチトクロム *c* の速い光酸化が認められた。このことはチトクロムサブユニットが反応中心に結合した状態で可溶化されることを示し、反応中心複合体の電子伝達のより詳細な計測が可能であると考えられた。

S549

Low-temperature stress inhibits repair of photodamaged photosystem II in *Synechocystis*

S.I.Allakhverdiev and N. Murata

National Institute for Basic Biology, Okazaki 444-8585, Japan

The photosynthetic machinery, in particular the photosystem II complex (PSII) is damaged by strong light, and this phenomenon is called photodamage or photoinhibition. The extent of photodamage in living organisms is a result of balance between the photo-induced damage to PSII and the repair of the photodamage PSII. In this study, we separately measured the two processes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. We discovered that the rate of photodamage was proportional to light intensity in the range between zero to 2000 μE m^{-2} s^{-1} and unaffected by temperature. By contrast, the rate of repair of the photodamage PSII depended on the light intensity with saturation at 300 μE m^{-2} s^{-1}, and this saturation level of repair was lowered by low temperature.

S550

TEMPERATURE EFFECTS ON PHOTOSYNTHETIC O_2 EXCHANGE AND RUBISCO CARBAMYLATION IN TOBACCO

Hiromi Nakano, Murray R. Badger, T. John Andrews, Susanne von Caemmerer; Molecular Plant Physiology Group, Research School of Biological Sciences, The Australian National University, GPO Box 475, Canberra ACT 2601, AUSTRALIA

Temperature dependence of gross O_2 evolution and uptake rates were investigated between 25 and 42°C using leaf disks of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) grown at either 25°C or 35°C. The optimum temperature for O_2 evolution at high CO_2 was 36°C in the 25°C-grown plants and 39°C in the 35°C-grown plants. The 35°C-grown plants maintained about 90% of maximum rate at 42°C compared to 56% for the 25°C-grown plants. At the CO_2 compensation point (Γ), O_2 exchange rates declined above 33°C for the 25°C-grown plants and 36°C for the 35°C-grown plants. Rubisco carbamylation at Γ decreased with increasing leaf temperature and the decline became steeper above 33°C for the 25°C-grown plants and 36°C for the 35°C-grown plants. This indicated that the reduced O_2 exchanges at Γ could be partly explained by the decline in Rubisco carbamylation. We conclude that: 1) the heat stability of electron transport is affected by the growth temperature in tobacco; 2) at high CO_2 electron transport capacity could be maintained at relatively high temperature compared to Rubisco capacity. Comparative results in transgenic tobacco plants with reduced amounts of Rubisco or Rubisco activase will be also discussed.

S551

光酸化的ストレス防御機構へのチラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの過剰発現の影響

吉村和也[1], 橋本美保子[2], 薮田行哲[1], 宮川佳子[1], 石川孝博[3], 重岡　成[1,2]
([1]近大院・応生命化, [2]近大・農・食栄, [3]島根大・生物資源・生命工)

[目的]　高等植物の葉緑体には光からの過剰エネルギーの消去のために、スコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)を中心とする酸化還元系が発達している。最近我々は、光酸化的ストレス条件下において、ストロマ型およびチラコイド型APX(sAPX,tAPX)アイソザイムはアスコルビン酸の酸化還元状態の変化もしくは減少に伴って失活していることを明らかにした(*Plant Physiol.*, 123, 223-233, 2000; *Plant Cell Physiol.*, 41, 311-320, 2000)。そこで今回、tAPXを過剰発現させた形質転換タバコ(tAPX-12)を用いて、tAPXの発現量が光酸化的ストレス防御機構に及ぼす影響を検討した。
[方法・結果]　tAPX過剰発現株は野生株と比較して約20~30倍のtAPXタンパク質量および活性を有していた。正常条件下でのCO_2固定速度、PSII活性および抗酸化酵素活性は両株間で有意な差は認められなかった。野生株およびtAPX-12にパラコート(50 μM)を噴霧し、400 μmol m^{-1} s^{-2}の光条件下に24時間静置した。その結果、tAPX-12は野生株に比べ明らかに可視的傷害が軽減されており、CO2固定速度およびPSII活性も野生株では著しく低下(66%, 91%)していたが、tAPX-12では高く保持(90%, 96%)されていた。また、野生株では総アスコルビン酸量が著しく減少(60%)し、tAPXもほぼ失活していたていた(17%)のに対し、tAPX-12ではどちらも高いレベル(96, 93%)で維持されていた。これらの結果から、tAPXの高発現により光酸化的条件下における活性酸素消去能が向上したため、その結果として葉緑体内のアスコルビン酸量およびその酸化還元状態が保持されたと考えられる。現在、この条件下での抗酸化系レベルの変動を詳細に検討している。

S552

光独立栄養培養細胞における強光適応機構：葉緑体色素組成とクロロフィル蛍光の変化

竹田恵美，辻容子，池本智子，上田恵子（大阪女子大・理・環境理学）

培養細胞ながら発達した葉緑体を有し，光合成のみによって生育する光独立栄養培養細胞を材料として強光ストレス適応機構についてキサントフィルサイクルに注目して調べた。ペチュニア培養細胞を強光（200μE/m^2/s）あるいは弱光下（50μE/m^2/s）で７日間培養し，葉緑体色素組成とクロロフィル蛍光を調べた。その結果，強光下で培養した細胞（HL 細胞）では弱光下で培養した細胞に比べて，キサントフィルサイクルに関与する violaxanthin (V), antheraxanthin, zeaxanthin (Z)の合計含量が高いだけでなく，強光処理により Z に変換される V の割合が高く，さらに Z の形成速度も速かった。また，NPQ の形成能力も高かったことから HL 細胞ではキサントフィルサイクルが強光ストレス適応機構の重要な因子であることが示唆された。現在，光強度の変化に対するチラコイド中の色素-タンパク質複合体の変化を電気泳動により検討中である。

S553

クラミドモナスにおける光化学系II集光装置遺伝子群の強光による発現抑制

寺本陽彦，中森審，小野高明，皆川純（理研・PDC・光生物）

単細胞緑藻クラミドモナスを暗所で12時間培養した後、異なる温度条件下（18、22、26℃）において様々な強度の光（0、50、100、200 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$）を6時間照射した場合の光化学系II（PSII）集光装置（LHC）遺伝子群の発現を調べた。4つの主集光装置（LHCII）タンパク質と2つの補助集光装置（CP29とCP26）タンパク質のmRNAのレベルをRT-PCRを用いて解析した。これらの遺伝子の発現はいずれの温度条件においても強光により抑制された。また、その抑制効果は低温ほど大きかった。これらの結果から、光合成反応にとって過剰な光エネルギーが捕捉された時にこれらの遺伝子の発現は抑制されると考えられる。集光装置を小さくすることにより光エネルギーの捕捉量を減少させることは光合成生物の光ストレス回避機構の一つなのかもしれない。集光装置遺伝子群の転写または転写後調節と光ストレス回避機構との関わりについて論じる。

S554

緑藻クラミドモナスのグルタチオンペルオキシダーゼの活性発現機構におけるセレンの役割

武田　徹、田茂井政宏、重岡　成　（近畿大・農・食栄）

緑藻*Chlamydomonas reinhardtii* C9 (*C. reinhardtii*)のグルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）の活性中心と予想される部位は、動物由来のセレン（Se）依存性GPXと異なりセレノシステインではなくシステイン（Cys）である。しかし、ネイティブおよびリコンビナント酵素において、Seに依存した酵素活性の発現が認められた。また、Seに依存して発現したネイティブおよびリコンビナントGPXは酵素タンパク質1モル当り4モルのSeを含んでいた。さらに、これらSe原子はKCN処理により酵素タンパク質から遊離し、それに伴い酵素活性の失活が認められた。これらのことから、*C. reinhardtii*におけるSeに依存したGPX活性の発現は、タンパク質合成後生成したCys残基に由来するセレノール基によるものと推測される。そこで今回、点突然変異させたリコンビナント酵素を作成し、*C. reinhardtii* GPXの活性発現におけるセレンの役割について検討した。

活性中心と推測される37番目のCysをSerに変換した点突然変異リコンビナント酵素（*Crm*GPX）を作成した。大腸菌培養時に種々のセレン化合物を添加しても、リコンビナント酵素の場合と異なりセレンに依存した酵素活性は認められなかった。亜セレン酸ナトリウム（67 μM）を含むLB培地で培養した大腸菌より精製した*Crm*rGPXにはセレンは存在しなかった。現在、他の2つのCys残基をそれぞれ点突然変異させたリコンビナント酵素を作成中である。

S555

ホウレンソウ葉緑体型モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼの精製とcDNAクローニング

佐野智、遠藤祐子、稲葉朋美、Mohamed Anwar Hossain[1]、三宅親弘[2]、松尾道憲[3]、浅田浩二[4]、齋藤和實（京都府立大・農、[1]ダッカ大・生物化学、[2]奈良先端大学院大・バイオ、[3]オックスフォード大・生理学、[4]福山大・生物工学）

葉緑体では光合成に伴い活性酸素が不可避的に発生する。アスコルビン酸（AsA）はAsAペルオキシダーゼの電子供与体として過酸化水素の消去に機能する際、1電子酸化されモノデヒドロアスコルビン酸（MDA）ラジカルとなる。MDAラジカルは光化学系の還元力によってAsAに再生されるが、その経路の一つを担うのがMDAレダクターゼ（MDAR）である。細胞質型MDARの基本的な性質は決定されているが、植物の活性酸素傷害防御にとって最も重要である葉緑体型アイソザイムは未だ精製されていない。ホウレンソウの葉緑体からMDARを精製したところ、51 kDaの単量体の酵素が得られた。これは既知の細胞質型酵素よりも約4 kDa大きい。NADHおよびNADPHに対する*Km*値はそれぞれ5 μM、12 μMであった。SH基修飾試薬やジクマロールによる阻害は細胞質型酵素と類似していた。N末端アミノ酸配列は細胞質型酵素のものと相同性が高かったが、この配列をもとにして単離したcDNAはトランジットペプチドをコードすると思われる配列を含んでいた。*Arabidopsis*のESTクローンの中にはこのトランジット様配列と相同性の高い配列を持つものは見いだせなかった。

S556

クラミドモナスの配偶子誘導期での光合成活性の変動

松尾妃佐子、山本さもも、諫山史子、田村典明（福岡女子大学・人間環境・環境理学）

単細胞緑藻であるクラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）は、無機培地中で無性的に栄養増殖を繰り返す。しかし、NH_4ClやNH_4NO_3などの窒素源を除いた培養液に栄養細胞を移すとやがて配偶子に分化する。この状態で雌株（mt(+)株）と雄株（mt(−)株）を混合すると一連の接合過程を経て接合子を形成する。本研究では、野生型１３７ｃ株を用いて、配偶子誘導条件や配偶子誘導および接合子形成過程での電子伝達活性や膜透過性を調べた。

同調培養系と非同調培養系の細胞で、生育最適温度（２２℃）よりも低い温度（１４℃）で最も高い配偶子誘導（接合子形成率の増加）がみられた。配偶子誘導培地に移してからの接合子形成（メイティング）率の時間変化を調べたところ、非同調培養系では、１６時間経過まではメイティング率は数%と低かったが、２４時間を経過するとメイティング率が５０%以上に増加した。一方、同調培養系でも、同様な配偶子誘導の時間変化を示したが、２４～２８時間の数時間の間に急激にメイティング率の上昇が観察された。この時、光合成の電子伝達速度を蛍光誘導によって測定したところ、メイティング率の増加とほぼパラレルに電子伝達活性の減少がみられた。

S557

陸生ラン色細菌 *Nostoc commune* における吸水過程での光合成系の変化

西尾純子，山路隆晴，菓子野康浩，小池裕幸，佐藤和彦（姫工大・理・生命科学）

陸生で耐乾性のラン色細菌 *Nostoc commune* は長期の乾燥に耐え、吸水すると光合成や窒素固定などの反応を回復することが知られている。水を充分に与えた場合、吸水過程には３つのフェーズがあり、それぞれのフェーズ毎に吸水量が決まっている。しかし、吸水過程には２つのファクター、即ち吸水量と吸水開始後の時間が存在するので、それぞれを分離してその効果を測定することを試みた。その結果、（１）光合成活性には乾燥重量とほぼ同じ量の水を吸収できれば充分であること、（２）時間のファクターが重要であること、（３）種々の濃度のソルビトール溶液を利用することで細胞を各フェーズの状態に安定に維持できること、等が明らかとなった。

S558

ラン藻カルビンサイクル調節の分子機構

田茂井 政宏、宮崎 崇、小林 大輔[1]、武田 徹、和田野 晃[1]、重岡 成 (近大農・食栄、[1]阪府大院・応生化)

[目的] 高等植物葉緑体では、カルビンサイクルのチオール酵素 (FBPase, GAPDH, SBPase, PRK) がフェレドキシン／チオレドキシン系を介した光還元力により活性調節を受けている。しかし、ラン藻および真核藻類のこれらの酵素では調節部位の構造が異なっているため調節を受けない。そこで、ラン藻カルビンサイクルの調節因子として CP12 の存在と機能に注目し、本研究では分子特性を明らかにし、生理的意義を考察した。

[方法・結果] *Synechococcus* PCC 7942 細胞を還元剤を含まない緩衝液中で破砕しゲル濾過を行ったところ、PRK, GAPDH は分子量 520 kDa の複合体として検出された。この複合体は NADPH 存在下で解離した。また、CyanoBase に基づいて *Synechocystis* 6803 CP12 遺伝子を単離し、大腸菌により His-Tag 融合リコンビナント CP12 タンパク質を作成した。Ni アフィニティーカラムにリコンビナント CP12 を結合させたカラムを作成し、PRK、GAPDH、FBP/ SBPase および FBPase-II との反応性を検討した結果、CP12 は NAD^+ 存在下で PRK および GAPDH と結合することが明らかになった。これらの結果から、ラン藻細胞内で 2 分子の CP12 がそれぞれ 2 分子の PRK, GAPDH と複合体をすることが明らかになった。また、CP12 遺伝子を破壊した *S.* 6803CP12 欠損株は、連続光培養条件では、野性株と同様の生育を示した。一方、明/ 暗期（12：12 時間）の培養条件下で、野生株の生育は明らかな同調性を示したが、CP12 欠損株では明／暗による同調が認められず、生育の遅延も認められた。このことから、CP12 は明/ 暗条件でのカルビンサイクルの調節因子として機能し、炭素代謝に影響を及ぼすことが示唆された。現在、CP12 の欠損が S. 6803 の光合成活性、炭素代謝に及ぼす影響を検討している

S559

2 つのピロフェオホルビド生成経路の存在

鈴木康予，土井道夫[1]，塩井祐三（静大・理・生物環境，[1]九大・大教センター）

植物の老化において，クロロフィルの分解は光合成能の低下，および葉緑体膜の構造に変化を与えることにより，老化を起こすシグナルになると考えられている．しかしながら，クロロフィルの分解経路の詳細については，ほとんどわかっていない．

フェオホルビド *a* はクロロフィル *a* から 2 段階の反応を経て生成されることを報告した．最近の研究で我々は，フェオホルビド *a* からピロフェオホルビド *a* の生成は，メチルアルコールを遊離する加水分解と自発的な脱炭酸の 2 段階反応による系と，NADPH 存在下でギ酸メチルを脱離する還元反応による系の，2 つの経路が存在することを発見した．本講演では，2 段階反応の加水分解に関与する酵素，フェオホルビダーゼと NADPH が関与する酵素，NADP-フェオホルビド デメトキシカルボニラーゼ（NPD）について報告する．

フェオホルビダーゼはダイコン（*Raphanus sativus*）の葉より，NPD は *Chlamydomonas reinhardtii* の突然変異株より精製した．両酵素共に構成型と老化誘導型の 2 種類存在するが，クラミドモナス NDP は老化誘導型の存在量が大きい．さらに，酵素化学および物理化学的解析を行ったところ，分子量はフェオホルビダーゼが 113,000, NPD が 170,000 であり，またフェオホルビド *a* に対する K_m 値はフェオホルビダーゼが 15 μM，NDP が 283 μM であった．

S560

フタバネゼニゴケのプロトクロロフィリド還元酵素遺伝子の光合成電子伝達による発現調節

江口幸栄子[1]，高野博嘉[2]，小野尭爾[2]，滝尾進[2]（[1]熊大院・自然科学，[2]熊本大・理・生物科学）

クロロフィル合成における鍵反応を触媒するプロトクロロフィリド還元酵素には二種類ある。それらは核遺伝子（*por*）と葉緑体遺伝子（*chlL/N, chlB*）にそれぞれコードされている。フタバネゼニゴケ(*Marchantia paleacea* var.*diptera*)培養細胞において，有機栄養条件では両遺伝子は光依存的に発現したが，光独立栄養条件では*por*遺伝子のみが光依存的に発現し，その制御に光合成電子伝達系が関与することが示唆されていた。

本研究では，抗フタバネゼニゴケPOR抗体を用いてPORタンパクの光応答パターンについて調べた。１）PORタンパクは，変性状態で37kDaであり，チラコイド膜と結合していた。２）長期間暗所で培養した有機栄養細胞では，PORタンパクは検出されなかった。３）光独立栄養細胞を暗所に移すと*por*mRNAは１日後には消失したが，PORタンパク量は変化しなかった。４）光独立栄養細胞を光合成電子伝達の阻害剤DCMUで処理すると*por*mRNAは１日後には消失したが，PORタンパク量は変化しなかった。

以上の結果から，光合成電子伝達系はPORタンパクの安定性には関与せず，おもに転写または転写後での調節に関与することが示唆された。

S561

Synechococcus PCC6301株ゲノムの構造解析

杉田　護[1,2]、續　伯彦[3]、石浦正寛[1]、杉田千恵子[1]、軸屋博之[4]、高野　純[4]、杉浦昌弘[5]
([1]名大・遺伝子実験施設、[2]名大・院人間情報、[3]愛知学院大・情報社会政策学部、[4]島津製作所・分析ジェノミックリサーチ室、[5]名市大・院システム自然科学)

単細胞性のラン藻*Synechococcus* 6301株（旧名*Anacystis nidulans* 6301)のゲノムは2.7 Mbの大きさをもつ。6301株のもつ全遺伝情報を明らかにするため、ゲノムのほぼ全域をカバーする２００個のλクローンの挿入DNA断片をLA PCR法で増幅した。それぞれの増幅DNA断片を細断して得られた小断片をpUC18の*Sma*Iサイトにショットガンクローニングし、５倍重複分の塩基配列決定を開始した。本発表では塩基配列解析の進行状況と情報解析の結果を報告する。

F601

アンチセンス法によるウリカーゼの生理学的意義の解析

下村憲司朗[1]、高根健一[2]、野村美加[1]、河内宏[2]、田島茂行[1]（[1]香川大・農・生命機能科学　[2]農業生物資源研究所）

マメ科植物は根粒菌との共生により大気窒素を固定し、生育に利用できる特性を持つ。この共生窒素固定は固定産物の転流形態により、アミド型とウレイド型に大別される。ウリカーゼは尿酸を酸化分解しアラントインを生成する反応を触媒し、霊長類を除く様々な生物で見受けられる。特にウレイド型の固定窒素転流を行なっている根粒においてウリカーゼ遺伝子（Nod-35）が多く発現しており、同化産物の地上部への転流に大きく関わっている。

マメ科植物のミヤコグサ（*Lotus japonicus*）は近年急速にゲノムプロジェクトが進展し、マメ科モデル植物として利用されつつある。このミヤコグサはアミド型の窒素同化を行なうにも関わらず、根粒非感染細胞においてウリカーゼが発現し、パーオキシゾームに局在化することが報告されている。そこで本研究では、ミヤコグサにミヤコグサウリカーゼcDNAのアンチセンス鎖を導入し、その表現型よりミヤコグサにおけるウリカーゼの生理学的意義を解析することを目的とした。

現在までに、*Agrobacterium*を用いた胚軸感染法によって作成した約60の形質転換個体から種子（T_1）を得ている。このT_1世代から後代を得ようとしたところ矮性化が起こっており、後代を得ることが困難であった。そこでT_1世代に対して、サザンブロット、ノーザンブロット解析を行ない、ウリカーゼ発現抑制の様々なミヤコグサ表現型に与える影響を検討する。

F602

大量発現系を用いたダイズウリカーゼ遺伝子発現産物の解析

小寺周,高根健一[1],野村美加,河内宏[1],田島茂行（香川大・農,　[1]農業生物資源研究所）

マメ科植物は根粒菌を自身の細胞内に取り込み大気中の窒素を固定する共生組織を誘導する。この共生組織において特異的に誘導される遺伝子のうち、ウリカーゼは尿酸を酸化分解してアラントインを産生する反応を触媒し、Cu^{2+}を活性中心に持つなど酵素化学的視点からも興味深い酵素である。既に当研究室においてダイズcDNAゲノミックライブラリーから*UR2*、*UR9*という2種類のウリカーゼ遺伝子がクローニングされているが両クローン発現産物の比較検討は行われていない。本研究では、これら2つのウリカーゼクローンを大量発現用プラスミドに組み込むことにより大量の酵素を得、両ウリカーゼの酵素化学的特徴を解析した。

***UR2*、*UR9*のcDNAクローンが組み込まれた発現ベクター（pET32a）を大腸菌（BL21）に形質転換し、IPTGと共に培養し菌体内で融合タンパク質を産生させた。超音波処理後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製された融合タンパク質はエントロキナーゼでタグを切断し、以後このウリカーゼタンパクを用いて至適pH、尿酸に対するKm値、酸素に対するKm値、様々な試薬による阻害など酵素化学的特徴を解析した。**

F603

糸状窒素固定型ラン色細菌におけるヒドロゲナーゼの分布とその遺伝子破壊の水素生産に及ぼす影響

増川一、中村賢介、岩田俊輔、持丸真里[1]、桜井英博（早稲田大・教育・生物、[1]駒沢大・文・自然科学）

ラン色細菌の水素代謝には、ニトロゲナーゼと2種類のヒドロゲナーゼ（双方向性Hoxと取込み型Hup）が直接関与する。ラン色細菌は一般に両方の型のヒドロゲナーゼを持つと考えられていたが、近年Hoxを欠く種の存在が報告されている。IAM、PCC、UTEXカルチャーコレクションからの12種の糸状ラン色細菌について、ヒドロゲナーゼ遺伝子の存否を*hoxH*、*hupL*遺伝子プローブを用いたサザン解析により調べた。すべての種が*hupL*については陽性であったが、用いた*hoxH*プローブに対しては2種が陰性であった。細胞抽出液のHox活性測定からも、この2種は活性を全く示さなかった。*Anabaena* sp. PCC7120の*hupL*$^-$、*hoxH*$^-$、*hupL*$^-$ *hoxH*$^-$株を作製し、ニトロゲナーゼによる水素生産に対する影響を調べた。窒素欠乏条件下における*hoxH*$^-$株の水素生産は野生株と同程度だったが、*hupL*$^-$と*hupL*$^-$ *hoxH*$^-$株では約5倍に増大した。以上の結果から、*Anabaena* sp. PCC7120のニトロゲナーゼにより発生された水素の再吸収は、Hupの関与が大きく、Hoxはは小さいことが示された。

F604

エンドウ根粒におけるシステインクラスターが保存されたノデュリン遺伝子の発現

加藤孝司、菅沼教生、川島和也、三輪雅美、三村好史、玉置雅紀、河内宏[1]（愛知教育大・生命科学、[1]農水省・生物研）

サブトラクション法によって、エンドウ根粒から根粒で特異的に発現する十数種類のノデュリン遺伝子を単離し、それらの発現を窒素固定活性が欠落したエンドウ突然変異体E135の根粒と正常な根粒で比較したところ、6種類の遺伝子の発現がE135根粒で減少した。これらは、レグヘモグロビン遺伝子とシステインクラスターで特徴付けられる5種類のノデュリン遺伝子であった。後者は、初期ノデュリン遺伝子*PsENOD3*と*PsENOD14*、後期ノデュリン遺伝子*PsNOD6*と同様に、シグナルペプチドと思われる領域を有し、Cys-X_5-CysとCys-X_4-Cysという2つのシステインクラスターが保存された約60個のアミノ酸から構成される低分子のタンパク質をコードすると推定された。これら5種類は、いずれもレグヘモグロビン遺伝子と同様な時間的発現様式を示し、また、根粒のearly symbiotic zoneで発現がみられたことから、窒素固定活性と密接な関係にあるノデュリンであることが示唆された。

F605

共生後期におけるミヤコグサの根粒菌認識機構解明へのアプローチ

馬場真里[1]、中森一樹[2]、泉井桂[1,2]、畑信吾[1,2]
（[1]京大院・生命科学、[2]京大・農）

根粒菌とマメ科植物との共生における初期応答反応機構が比較的よく研究されているのに対して、共生成立後の相互認識には不明な点が多い。我々はこれまでにミヤコグサ*Lotus japonicus* B-129 'Gifu' がインゲン根粒菌*Rhizobium etli* CE3と一旦は共生を成立させ、窒素固定活性を発現させた後急速に共生を停止させることを見出した[1]。この実験系は、共生後期において植物が菌を認識する未知の機構や防御反応誘導機構を解明するための良い材料となり得ると期待された。

我々は上記の機構に関与する遺伝子を単離するためにアクティベーションタギング法を適用しようと考えた。まず我々はタンデムに並んだ6個のCaMV35Sエンハンサーを持つ、新たなアクティベーションタギング用プラスミドを構築した。この手法を用いるには効率の良い遺伝子導入法が要求されるが、そのために我々は*Agrobacterium rhizogenes*による毛状根形質転換法を用いることにした。LUC遺伝子をレポーターとして用いた予備実験の結果、内在性Riプラスミドとのco-transformation系が働くことが確認された。より良い形質転換効率を得るための条件検討を現在行っている。

[1] Banba M. et al. (2001) MPMI in press.

F606

イネにおけるグルタミンを介した窒素代謝系制御機構

早川俊彦[1]，山谷知行[1,2]（[1]東北大院・農・応生科，[2]理研・PSC）

イネ根の外来NH_4^+同化系では、NH_4^+供給後極短時間で表皮・外皮で増加するNADH依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)が重要な役割を担う。この際、同遺伝子の発現は、グルタミンまたはその代謝産物により転写レベルで制御されることが示唆されている。また、グルタミンは、イネでの主たる転流窒素形態の一つであり、転流グルタミンはシンク組織でNADH-GOGATによりグルタミン酸に変換されて再利用される。これらの結果は、イネにおいてグルタミンを介した窒素代謝系制御機構が存在する可能性を示唆する。大腸菌や窒素固定細菌では、*glnD*遺伝子産物のUridylyl transferaseが、細胞内のグルタミンと2-オキソグルタル酸の濃度比を検知し、PIIを介して情報伝達してグルタミン合成酵素遺伝子の発現を制御する。また、哺乳動物の中枢神経細胞間でのグルタミン酸を介した興奮性情報伝達系においては、シナプス前終末のグルタミン酸プールの維持に、グリア細胞から放出されたグルタミンを細胞内に取り込むグルタミン輸送担体が重要である。近年、ラットからグルタミン輸送担体遺伝子cDNA(GlnT, ATA2)が単離された。そこで、イネでのグルタミンを介した窒素代謝系制御機構の存在を検証する第一歩として、GlnD及びGlnTホモログの単離を試みた。

イネEST検索での配列情報をもとにした5'-及び3'-RACE法により、1mM NH_4^+で12時間処理したイネ根から、完全長のラットGlnTホモログ(OsGlnT)及び窒素固定細菌*A. vinelandii* GlnDホモログ(OsGlnD1, OsGlnD2)を単離した。OsGlnTは458アミノ酸をコードする新規アミノ酸輸送担体ホモログであり、11個の膜貫通領域を有することが推定された。OsGlnD1及びOsGlnD2は、各々452アミノ酸、453アミノ酸をコードし、窒素固定細菌群のGlnDタンパク質のC末端側領域と20-40%程度のidentityを示した。現在、イネでのこれら遺伝子ホモログの発現特性を解析している。

F607

Lotus japonicus を用いた形質転換体の作成及び発現解析

渡邉晴美、高根健一[1]、河内宏[1]、野村美加、田島茂行
（香川大・農、[1]農業生物資源研究所）

ダイズ根粒内で *Bradyrhizobium japonicum* が行なう窒素固定反応の結果生ずるアンモニアはプリン塩基合成に使用され、アラントインとなり、導管経由で地上部へ転流される。ウリカーゼは尿酸からアラントインを合成する反応を触媒する酵素である。既に当研究室で *UR2* は低レベルながら全組織で恒常的に発現し、*UR9* は根粒感染後発現増幅することが明らかにされている。そこで、ダイズゲノミックライブラリーからクローニングしているウリカーゼ遺伝子 *UR2*、*UR9* のプロモーターと GUS 遺伝子と pLX412 とを結合させ、ミヤコグサ（*Lotus japonicus*）形質転換用のコンストラクトとし、形質転換ミヤコグサを作成した。*UR2* の f1 での GUS 活性測定、GUS 染色、ゲノミックサザンを行なったところ、コンストラクトが入った再生植物が 5 ライン得られ、その全てに GUS 活性が認められた。今後、*UR9* の形質転換体を作製し、*UR2* との違いを観察していく予定である。

F608

タバコ「葉型」及び「根型」亜硝酸還元酵素(NiR)遺伝子の発現解析

加藤千晴、高橋美佐、森川弘道（広島大院・理・数理分子生命理学）

NiR は葉緑体や根のプラスチドに局在し、還元型フェレドキシンを電子供与体とし て亜硝酸イオンを 6 電子還元する酵素である。NiR 遺伝子の数やタイプは植物によっ て異なり、ライス、トウモロコシには 2 つ存在するが、シロイヌナズナ、ホウレンソウ、オオムギでは 1 つである。タバコには主に葉で発現する「葉型」と主に根で発現 する「根型」の 2 種類の NiR 遺伝子がそれぞれ 2 個ずつ、計 4 個ある。この内、クロ ーン化されているのは 3 個のみである。

本研究では、これまでクローン化されていなかったタバコの「根型」*nii4* をクローニ ングし、4 個（2 種）の遺伝子の特徴、発現パターンを解析した。cDNA の相同性は、 葉型同士、根型同士の場合は 97%、葉型と根型間の場合は 83%であった。また、RT-PCR 法による解析の結果、硝酸誘導前では、「葉型」の発現は明らかに葉>根で、「根型」の発現も葉<根あった。硝酸誘導後では、根では「根型」のみの発現が顕 著に高まった(約 18 倍)が、葉では「葉型」と「根型」両者の発現が高まった(ともに 約 6 倍)。この結果は、いわゆる「根型」NiR 遺伝子は葉組織においても生理的機能を 持つことを強く示唆する。

F609

クラミドモナスにおける硝酸還元酵素（NR）依存性の一酸化窒素（NO）生成

崎浜靖子、中村宗一、山崎秀雄（琉球大・理・海洋自然）

一酸化窒素（NO）はフリーラジカルの一種であり、微量ながら植物細胞内でも生成されることが知られている。しかし、植物における NO の発生源は未だ不明な点が多い。本研究では、緑藻のクラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* を用い、*in vivo* での NR 依存性の NO 生成を検討した。野生型のクラミドモナスに暗黒下で亜硝酸を加えると、電極法または DAF-2DA 蛍光検出法の両方で NO の生成が観察され、シアンによって完全に阻害された。同条件下で NR 欠損株 cc-2929 に亜硝酸を加えても、NO の生成は見られなかった。また、この NO 生成反応に対する NO 合成酵素(NOS)の関与を明らかにするため、NOS の基質であるアルギニンと阻害剤 N^{ω}-ニトロアルギニン(L-NNA)の効果を調べた。その結果、野生株にアルギニンを加えても NO の生成は見られず、亜硝酸依存性の NO 生成は L-NNA による阻害をまったく受けなかった。以上の結果は、クラミドモナスにおいて亜硝酸依存性の NO 生成は NOS ではなく NR によるものであることを示している。

F610

コマツナ葉硝酸還元酵素リン酸化酵素(NR-Kinase)の精製と機能解析

中村浩介、細尾信悟、白石斉聖、杉本敏男、王子善清(神戸大・農・植物栄養学)

高等植物における窒素代謝の律速酵素である硝酸還元酵素（NR）は遺伝子レベルで制御されると共に、環境条件に応じてタンパク質レベルで活性が制御される。NR タンパク質は、NR リン酸化酵素（NR-Kinase）によりリン酸化され、そのリン酸化した NR に、14-3-3 タンパク質が結合することで不活性化する。NR-Kinase は少なくとも 2 種類存在することが確認されているが、本研究では、材料にコマツナを用いて性質や詳細の不明なカルシウム非依存型 NR-Kinase(Ca^{2+}-independent NR-Kinase)について研究を行った。緑葉を明条件から暗条件下に移すと、NR は急激に不活性化し、Ca^{2+}-independent NR-Kinase の活性は短時間で一過的に上昇した。NR のリン酸化部位の配列を含む合成ペプチドを基質として各種クロマトグラフィーにより精製を試みた。得られた Kinase は分子量約 50KDa で NR のリン酸化部位を特異的にリン酸化した。

F611

NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 cDNA を導入したインド型イネの解析

中嶋啓之[1]、首藤愛呼[1]、早川俊彦[1]、山谷知行[1,2]([1]東北大院・農・応生科、[2]理研・PSC)

イネの NADH 依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)は、未抽出葉身や登熟初期の穎果などの若い器官において転流されてきたグルタミンの再利用反応の鍵を握っている。一方、インド型イネ Kasalath は、種々の日本型イネと比較して、未抽出葉身、登熟過程の穎果における新鮮重あたりの NADH-GOGAT タンパク質含量が低いことが明らかになっている。従って、インド型イネの若い器官において NADH-GOGAT 含量を増強させることにより、窒素利用効率や生産性の向上にむすびつくことが期待できる。

そこで本研究では、Kasalath に Sasanishiki NADH-GOGAT 遺伝子の転写開始点上流域約 2.8 kb の下流に NADH-GOGAT cDNA を連結させたキメラ遺伝子を導入した形質転換体を作出した。その結果、野生型と比較して、未抽出葉身において新鮮重当たりの NADH-GOGAT タンパク質含量が最大で 80%増大したラインや、80～100%減少したラインが複数得られた。NADH-GOGAT 含量が増大した個体は草丈が高く、旺盛に生長し、主幹の穂重量が増加する傾向が認められた。逆に減少した個体では草丈が低く、不稔、穂重量の減少がみられた。これらの結果は、イネにおいて NADH-GOGAT が生長性、生産性に直接関わる酵素であることを示唆している。現在、これらの個体を用いて登熟過程の穎果における NADH-GOGAT 含量の増減を調査し、NADH-GOGAT が収量に及ぼす影響を検証している。

F612

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

櫻井望[1]、片山義博[2]、山谷知行[1,3]([1]東北大院・農・応生科、[2]農工大・院・BASE、[3]理研・PSC)

イネの未抽出葉身において、サイトゾル型グルタミン合成酵素（GS1）タンパク質は、主に二次細胞壁の未発達な厚壁組織細胞や木部柔細胞などに存在する。これらの細胞の細胞壁にはリグニンが沈着することから、GS1 がリグニン化の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）の反応により放出される NH_4^+ の同化を行っている可能性が示唆された[1)]。PAL の反応により放出される NH_4^+ は、GS により同化されることが明らかとなっているが、どの分子種の GS がこの反応を触媒するかについては充分な検討がなされていない。そこで本研究では、in situ hybridization 法により未抽出葉身における両 mRNA の蓄積部位を解析し、構造生物学的側面から両者の機能関連について考察を与えることを目的とした。

3'-UTR 113 bp を含む 703bp の GS1 cDNA 部分断片、および、三種類のイネ PAL cDNA に高度に保存された 403 bp の部分断片を鋳型に DIG ラベル RNA プローブを合成し、イネ葉身から調製したパラフィン包埋切片に対して in situ hybridization を行った。その結果、未抽出葉身の中央部の維管束組織において、強いシグナルが得られた。PAL、GS1 mRNA はともに、厚壁組織細胞、木部柔細胞、メストム鞘細胞に強く検出され、特に厚壁組織細胞に富む中肋部分の大維管束で強いシグナルが得られた。また、これらの細胞群にはリグニンの沈着が観察された。

1999 年の本大会で報告した、抗イネ GS1 特異抗体及び抗ポプラ PAL 抗体を用いた免疫組織化学的解析に加え、これらの結果は、PAL の反応により放出される NH_4^+ の同化に GS1 が機能している可能性をさらに強く示唆するものである。

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

F613

NADH 依存性グルタミン酸合成酵素遺伝子のシス配列の解析

小島創一[1]、早川俊彦[1]、山谷知行[1,2]（[1]東北大院、農、応用生命科学、[2]理研・PSC）

我々は、イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素（NADH-GOGAT）遺伝子と GUS 構造遺伝子との融合遺伝子を導入した形質転換イネを用いて、同プロモーターの発現特性解析を行なっている。これまでに同プロモーターは、成長中の若い組織と維管束組織や糊粉層で強く発現することを報告した。デリーション解析の結果、NADH-GOGAT 遺伝子の-142 から+886 の領域に、NADH-GOGAT の組織特異的な発現を制御するシス配列が存在すると推定した。この領域の中でも、-72 から-52 の領域に既知のシス配列と類似した配列が集中して見いだされた。

イネ培養細胞及びイネ幼植物根から核抽出物を調製し、-72 から-52 をプローブとしてゲルシフト解析を行ったところ、それぞれの核抽出物中にはこの領域に相互作用する分子が存在した。-72 から-52 に類似した配列を用いた阻害実験から、-72 から-52 の中でも TGG リピート配列或いは CAAC 配列が認識されていることが分かった。

F614

海水性ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7002における微量栄養素としてのニッケル

坂本敏夫[1,2]、DA Bryant[1]（[1]Dept. Biochem. Molec. Biol. Penn State Univ. University Park, PA16802, USA、[2]金沢大・理・生物）

ニッケルはウレアーゼ（尿素加水分解酵素）およびNADHデヒドロゲナーゼの活性中心の構成要素である。通常のラン藻の培地にはニッケルが含まれていないため、研究室においてラン藻はニッケル欠乏下で培養されているものと考えられる。海水性ラン藻*Synechococcus* sp. PCC 7002を尿素を窒素源にして２２℃で培養すると窒素飢餓により黄化するが、ニッケル（5 μM $NiSO_4$）を培地に添加すると窒素飢餓が解消される。ウレアーゼの活性はニッケルを培地に添加すると２時間で１０倍にまで上昇する。ウレアーゼのα-サブユニットをコードする*ureC*遺伝子の転写量はニッケルの有無および窒素源に依存せず一定である。これらの結果は、ニッケルの欠乏によりウレアーゼの活性中心が構築されず尿素の利用効率が低下していることを示唆する。

また、淡水性ラン藻*Synechocystis* sp. PCC 6803および*Anabaena* sp. PCC 7120においては、ニッケルを培地に添加してもウレアーゼ活性は上昇しない。これらの結果は、淡水性ラン藻はニッケルに対する高親和性の輸送システムを持つことを示唆する。

F615

C. paradoxa cyanelle からの包膜の分離とその性質

由佐史江、菓子野康浩、佐藤和彦、小池裕幸　（姫路工大・理・生命科学）

灰色藻 *C. paradoxa* の葉緑体、cyanelle はラン藻の特徴を色濃く残しており、一番原始的な葉緑体と考えられている。ラン藻が共生したことによって葉緑体が成立したと考えられていることから、cyanelle は共生時の特徴を一番多く残している葉緑体と考えられ、葉緑体の成立過程を推定するのに一番適した材料である。本研究では cyanelle から包膜を分離し、その性質を調べた。

単離した cyanelle を軽くリゾチーム処理した後フレンチプレスで破砕し、密度勾配浮上遠心法により包膜を分離した。二つのカロチノイドに富む画分が分離された。ひとつは報告されている内包膜と浮上密度が一致しており、内包膜画分と推定された。もう一つの画分は非常に密度が軽く、ショ糖を含まない層に分離されてきた。カロチノイド組成を分析したところ内包膜画分はゼアキサンチンに富み、より軽い画分はβ－カロチンに富んでいた。それぞれの画分を電子顕微鏡で観察したところ、内包膜画分は膜構造を持っていたが、より軽い画分は粒子状の構造を持っており、膜画分ではなかった。外包膜画分はペプチドグリカン層を付着していて重く、チラコイド膜画分から分離されていないと考えられた。現在外包膜の分離を試みている。また各画分の脂質組成およびタンパク質組成についても報告する。

S601

ミヤコグサ根粒におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼとそのリン酸化酵素のクローニングと性状解析

泉智子[1]、中川知己[2]、梅原洋佐[3]、河内宏[3]、泉井桂[1,2,4]、畑信吾[1,2,4]
（[1]京大・農、[2]京大・院・農、[3]農業生物資源研究所 [4]京大・院・生命科学）

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）はマメ科植物の共生窒素固定根粒の炭素代謝における中心的な役割を果たしている。また、PEPCは特異的なリン酸化酵素（PEPC-PK）によって修飾を受けて活性化されるアロステリック酵素である。我々は、ミヤコグサ根粒cDNAライブラリーより*LjPEPC*cDNAを、マメ科植物では初めて*LjPEPC-PK*cDNAを単離した。

*LjPEPC*は、961個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする完全長クローンであった。この*LjPEPC*はミヤコグサ根粒において高発現する分子種であることが示唆された。
一方、*LjPEPC-PK*は、277個のアミノ酸をコードする完全長クローンであった。また、根粒における*LjPEPC-PK*のmRNAレベルは、*LjPEPC*のレベルの1/100程度であることが示された。

今後は、組換えPEPCとPEPC-PKを用いてin vitroでリン酸化活性を証明するとともに、in situ hybridizationなどにより両遺伝子の根粒における発現状況を調べる予定である。

S602

ダイズにおける2種類のPEPC遺伝子のプロモーター解析とそれらを制御する転写因子の探索

中川知己[1]　高根健一[2]　河内宏[2]　泉井桂[1,2]　畑信吾[1,2]
([1]京大院・農・植物性理, [2]農水省・生物研, [3]京大院・生命・分子代謝)

ダイズゲノムには、根粒で特異的に高く発現するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)遺伝子*GmPEPC7*と、植物全体に低く発現する相同な遺伝子*GmPEPC15*が存在する[1]。この2つの遺伝子は5'上流領域においても非常に高い相同性を有しているにもかかわらず、*GmPEPC7*のプロモーター活性は根粒で非常に高く、*GmPEPC15*の活性は低かった[2]。

根粒特異的遺伝子の分子進化の過程を追究するために、今回さらに詳細に*GmPEPC7*プロモーターの削り込み実験を行った結果、転写開始点から約400 bp上流にある66 bpの領域が根粒における高発現に重要であるという知見を得た。しかしこの66 bpのみを除いたプロモーター(1.3 kb)も根粒で有意な活性を示したことから、複数の領域が根粒での高発現を制御していると考えられた。Mobility shift assayを行ったところ、上記の66 bpの前後において、*GmPEPC7*にも*GmPEPC15*にも共通に結合するタンパク質が検出された。また、*GmPEPC7*の66 bp領域と*GmPEPC15*の対応する領域には異なるタンパク質が結合するという予備的な知見が得られたので、現在その確認を行っている。

[1] Hata, S. *et al.* (1998) *Plant J.* 13: 267-273
[2] Nakagawa, T. *et al.* (2000) *PCP* 41: s159

S603

イネ根におけるアスパラギン合成酵素の分布と発現解析

中野健太郎[1]、田渕真由美[1]、早川俊彦[1]、山谷知行[1,2]([1]東北大院・農・応用生命科学、[2]理研・PSC)

イネにおいてアスパラギン合成酵素(AS)は、ゲノム中に単一コピーで存在している。これまで我々はイネAS cDNAを大腸菌内で発現させ、AS特異抗体を獲得している。この抗体を用いて、ASタンパク質、mRNAが完全展開前後の葉鞘と登熟課程の穎果に多く存在することを示した。また、これら器官におけるASタンパク質の組織内分布を明らかにした。

本報告では、根粒を除きほとんど知見の得られていない根でのASについて、組織内分布を明らかにするとともに、イネ幼植物を用いて暗処理、窒素栄養処理に対する応答を調べた。

イネの根においてASは恒常的に発現しており、主に中心柱、分枝根原基に存在し、外皮、表皮にも存在していた。双子葉のアラビドプシスASN1、エンドウAS1では暗処理によりAS mRNAが速やかに蓄積することが知られているが、イネASでは暗処理によってその発現がmRNA、タンパク質ともに蓄積することはなかった。種子栄養が枯渇した状態の幼植物を用いて、窒素栄養処理を行ったが、地上部、地下部ともに顕著な応答は見られなかった。

S604

イネ着生葉の一生におけるサイトゾル型グルタミン合成酵素の活性調節の可能性

小原実広[1]、佐藤雅志[2]、山谷知行[1,3]　([1]東北大院・農・応生科、[2]東北大・遺生研、[1,3]理研・PSC)

イネのサイトゾル型グルタミン合成酵素(GS1)は、師管を介して老化葉身から転流されるグルタミンの生合成に関与していることが示唆されている。NipponbareとKasalathの着生葉の一生を通してGS1含量及び活性を比較したところ、老化過程においてKasalathではNipponbareに比較して新鮮重あたりのGS1含量は常に高いもののGS1活性は同程度あるいは低く、GS1含量と活性の挙動は一致しないことが判明した。イムノブロット法で求めたGS1タンパク質当たりの活性には、両品種間で大きな差が認められた。そこで、この差を解明する目的で、GS1の反応動力学的性質の比較並びに翻訳後修飾による活性調節の可能性を検討した。

Nipponbare及びKasalathの葉身よりGS1の精製を行った。精製GS1のturnover number並びにグルタミン酸、ATP及びNH_2OHに対する*Km*値は、両品種間で大きな差は認められなかった。品種間のGS1タンパク質当たりの活性の差は、その反応動力学的性質の相違によるものではなく、翻訳後修飾により生じていることが推察された。硝酸還元酵素はそのセリン残基がリン酸化された後、14-3-3タンパク質との相互作用により活性調節されていることが知られている。精製GS1に対するanti-phosphoserine抗体との交差性をイムノブロット法により解析した結果、anti-phosphoserine抗体は両品種のGS1を認識し、GS1のセリン残基がリン酸化されていることが示唆された。現在、GS1活性やリン酸化に影響を与える因子の単離、同定を行っている。

S605

イネにおけるアンモニウムトランスポーターの機能解析

園田　裕、池田　亮、石綿愛子、山谷知行[1]、山口淳二(名古屋大学生物分子応答研究センター、[1]東北大院・農・応用生命科学)

本研究ではイネにおいてアンモニウムイオンを特異的に輸送するトランスポーター遺伝子*OsAMT1;1*および*OsAMT1;2*に着目し、その解析を行った。

_OsAMT1;1_および_OsAMT1;2_においてその発現様式をノーザンハイブリダイゼーション法を用いて検討した。組織特異性を検討した結果、_OsAMT1;1_は茎葉部および根といった様々な組織で発現が認められたのに対し、_OsAMT1;2_は根特異的に発現が認められた。またアンモニウム添加による発現の誘導性を検討した結果、_OsAMT1;1_はアンモニウム添加によって発現の上昇はみられるものの、構成的な発現が認められたのに対し、_OsAMT1;2_はアンモニウム添加によってはじめて発現の誘導が認められた。

酵母変異株を用いた相補実験の結果、今回得られた*OsAMT*の翻訳産物が実際にアンモニウムイオンの取り込み機能を有していることが明らかとなった。

S606

単細胞性窒素固定型藍藻の窒素固定遺伝子群の単離と発現の解析

西山健一[1,2]　富澤健一[1]　([1]RITE　植物分子生理　[2]奈良先端大　バイオ)

窒素固定に関与するニトロゲナーゼは一般に酸素によって不可逆的に失活する。好気性の単細胞性窒素固定藍藻である *Synechococcus* sp. strain Miami BG 43511 は明期に光合成を暗期に窒素固定をそれぞれ行い、時間的な隔たりによってニトロゲナーゼの酸素による失活を防いでいると考えられている。このメカニズムを解析する一環としてまず我々はニトロゲナーゼ (*nif*) 遺伝子をこの藍藻より単離し、解析を行った。

Synechococcus sp. strain Miami BG 43511 のゲノムライブラリーから、これまで明らかになっている他の生物の *nifD*,*nifK* の相同性の高い部分をプローブとして 5 つの独立した陽性クローンを単離した。それぞれのクローンの塩基配列を決定した結果、全長約 18kb の中に 16 個の nif 遺伝子群があることが確認された。次にリポーター遺伝子としてルシフェラーゼ (*luxAB*) を用い、その上流へ個々の *nif* 遺伝子間領域を組み込みプラスミドを構築し、大腸菌と窒素固定能を欠く単細胞性藍藻 *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 へ導入しプロモーター活性が他の生物でもあるのかまた明暗周期を示すのか否かの検討を行った。その結果導入した遺伝子間領域の違いによって生物発光の強い株と弱い株が確認された。これらの結果から窒素固定しない藍藻や大腸菌でも *nif* 遺伝子が発現する可能性が示唆された。

S607

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

高橋美佐、森川弘道 (広島大院・理・数理分子生命理学)

亜硝酸還元酵素 (NiR) は亜硝酸イオンをアンモニアに還元し、二酸化窒素還元、硝酸還元に必須の酵素であるが、我々はこれまでに NiR 活性がほぼゼロに抑制されているトランスジェニック植物が野性株とほぼ同レベルの硝酸還元能を持っていることを見つけた。切り取り葉を用いた実験でも同様な結果が得られた。本研究では、NiR 活性を抑制したトランスジェニック植物において亜硝酸イオン還元に関与しているタンパク質を明らかにすることを目的として研究を行った。

植物材料として、タバコの NiR cDNA のアンチセンス鎖を導入したトランスジェニック・タバコ植物(Vaucheret et al. 1992)と野性株を１０週間生育させたものを実験に用いた。植物葉から抽出した粗抽出液を２次元電気泳動で分離し、メチルビオローゲンを電子供与体として、亜硝酸還元酵素活性について活性染色を行った。その結果、野生株では２つの活性が強いスポットと活性が弱い２以上のスポットが存在することが分かった。アンチセンスタバコ植物では活性が弱いスポットのみが観察された。現在それらのスポットについて解析を進めている。

S608

ミヤコグサ根粒における硝酸還元酵素とスクロース合成酵素の解析

加藤一幾, 岡村好倫, 中川弘毅[1], 金山喜則 (東北大院・農・園芸, [1]千葉大・園芸・生物生産)

マメ科根粒窒素固定の硝酸阻害機構には不明な点が多い。この現象には、根粒内における植物由来の硝酸還元酵素 (NR) やスクロース合成酵素 (SS) が関与しているとの説がある。そこで、モデルマメ科植物であるミヤコグサを用いて両酵素について調べた。

硝酸無処理区の葉・根の NR 活性は検出感度以下であったが、処理区では顕著な上昇を示した。一方根粒では無処理区でも NR 活性は検出され、硝酸処理による活性上昇はなかった。このような根粒 NR の特徴は他のマメ科植物でもみられている。次にミヤコグサ根粒から抽出した RNA を用いて、RT-PCR により NR の cDNA 断片をクローニングした。得られたクローンはダイズ・タバコ等の NR と高い相同性を示し、サザン解析の結果から、シングルコピーであることが示唆された。NR mRNA レベルは硝酸無処理区の各器官では低かったが、その中では根粒が最も高く、活性の結果と対応していた。しかし、硝酸処理による mRNA の上昇は、葉・根と同様に根粒でもみられ、活性の結果と一致しなかった。また、ウェスタンブロットにおける NR タンパク質の挙動も mRNA レベルに対応していた。従って、根粒で硝酸非誘導型の活性を示す原因として、翻訳後の NR 活性の調節が示唆された。

ミヤコグサにおいて硝酸処理 5 日後の根粒における SS 活性を測定したところ、ニトロゲナーゼ活性の低下に伴う可溶性タンパク質量あたりの SS 活性の低下はみられなかった。また、ダイズにおいても硝酸処理 3 日後にニトロゲナーゼ活性が 20%に低下するのに対して、SS 活性はほとんど変化しなかった。従って SS は、少なくとも硝酸処理による初期のニトロゲナーゼ活性低下には関与していないと考えられる。

S609

ホウレンソウ硝酸還元酵素誘導に関わるプロモーターの解析

今西未悟、白石斉聖、杉本敏男、王子善清 (神戸大学・農・植栄)

硝酸還元酵素 (NR) は植物の硝酸同化を律速する酵素である。NR 遺伝子の発現には NR 遺伝子上流域の AGTCA 配列が必要であることがシロイヌナズナにおいて示されている。ホウレンソウ NR 遺伝子上流域には 3 個所にこの配列が存在している。そこでどの配列が遺伝子発現に必要であるのか検討した。レポーター遺伝子を用いた上流域のデリーション解析から、-265～-261 にある AGTCA 配列が必要であることが示された。さらに NR 遺伝子の発現にはこの領域の上流にある AT Rich な配列が必須であるという結果を得た。そこで AGTCA タンデム配列と AT Rich+AGTCA タンデム配列を含む 2 種類のベクターを作製し Gain of Function 実験を行った結果、NR 遺伝子発現には AGTCA 配列と AT Rich 配列の両方が必要であることが明らかとなった。

S610

硝酸還元酵素遺伝子発現に関与する転写調節因子とcDNAクローニング

白石斉聖、遠藤元、杉本敏男、王子善清（神戸大学・農・植物栄養）

高等植物の硝酸還元酵素（NR）遺伝子発現にはNR遺伝子上流プロモーター領域のAGTCA配列が必要であることが報告されている。しかしこの配列に特異的に結合する転写調節因子は未だ同定されていない。AGTCA配列を含む合成オリゴDNAを用いてゲルシフトアッセイを行った結果、NR活性変動に伴い量的変動を示す2つのDNA結合タンパク質を見いだした。このDNA結合タンパク質のcDNAを単離するため酵母One-Hybrid Systemを用いたスクリーニングを行い、約４０万の組換え体から１０個のクローンを単離した。塩基配列からこの中の1つのcDNAが新規の遺伝子であることが明らかとなった。この遺伝子のコードするタンパク質のDNA結合能について検討したところ、AGTCA配列を特異的に認識して結合することが示された。

S611

植物ミトコンドリアのゲノム解析（その1）

渡瀬雄介、長瀬正和、杉浦昌弘[1]、杉山康雄（名大・遺伝子・植物ゲノム、[1]名市大・院・システム自然科学）

【序】我々は植物細胞の3つのゲノム-核、葉緑体、ミトコンドリア-間での遺伝子転移と再編成、そして、ミトコンドリアの未知遺伝子の機能等を明らかにする目的で植物ミトコンドリアのゲノム解析を始めた。

【材料】タバコ *Nicotiana tabacum* BY-4の緑葉、ジャガイモ *Solanum tuberosum* の塊茎、ヤエナリ *Vigna radiata* の胚軸からミトコンドリアを単離した。

【結果と考察】それぞれの植物組織から呼吸活性（酸素電極で測定）を保持したミトコンドリアを調製した。1キログラムのタバコ緑葉、ジャガイモ塊茎、ヤエナリ胚軸から、それぞれ、30μg、100μg、200μgのDNAを調製した。いずれも制限酵素で切断され多数のバンドとなることを確認した。現在タバコミトコンドリアの制限酵素切断断片をクローニングしそれらの塩基配列を順次決定している。その結果、既知のミトコンドリアゲノム配列（シロイヌナズナ、テンサイ）とホモロジーのない配列を多数検出した。ゲノム構成の比較も含め報告する。

S612

ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* のゲノム塩基配列解析

中村保一、金子貴一、佐藤修正、田畑哲之
(かずさDNA研究所)

土壌細菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 はミヤコグサ *Lotus japonicus* の根に根粒形成を誘導し、根粒内部での窒素固定能をもつことが知られている。根粒菌のもつ全遺伝システムを解明するために *M. loti* MAFF303099 のゲノム塩基配列決定と遺伝子推測を目標とした解析を開始した。*M. loti* MAFF303099 は 3 つの環状複製単位をもち、7.0 Mb の染色体、350 Kb、210 Kb の 2 つのプラスミドから構成され、ゲノムの平均 GC 含量は 61.7% と推測された。多くの Rhizobium 属は Sym と呼ばれる巨大なプラスミドを持ち、その上に多くの窒素固定と根粒形成の遺伝子があるが、M. loti の場合、巨大プラスミドはなく、これらの遺伝子は染色体上にある。*M. loti* MAFF303099 ゲノムの全塩基配列解析はホールゲノムショットガン法により行った。まず、全 DNA より平均インサートサイズが異なる 4 種類のクローンライブラリーを作成し、ここからランダムに選抜したクローン DNA の末端配列データをゲノムの長さの重複度約 7 倍となるように蓄積した。続いて計算機による配列結合をおこない、クローンの末端配列情報を整理することで、370 のコンティグに分割された粗配列データを得ることができた。合計長は 7,589 Kb で、全複製単位のほぼ全域をカバーしていた。2000 年 11 月現在までに、コンティグ間のギャップのすべてをプライマーウオーキングによる配列分析で埋め、配列の編集と確認作業を行い、3 つの複製単位のサイズをそれぞれ 7,036, 352, 208 kb で確定した。現在、塩基配列からの遺伝子の構成と機能の予測、公開データベース *RhizoBase* (http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/) の構築を進めている。

S613

マメ科のモデル植物ミヤコグサのゲノム解析

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

マメ科植物は根粒菌との共生窒素固定などの特徴を持つことに加えて、食料資源としての有用性も持っている。我々はマメ科植物の持つ遺伝情報の包括的理解を目的として、分子遺伝学的解析に好適な形質を有するマメ科植物ミヤコグサの大規模ゲノム塩基配列決定プロジェクトを開始した。配列解析にはアクセッション MG-20 から作製した平均インサートサイズ約 100kb で形質転換可能な TAC クローンを用いている。他のマメ科植物の DNA マーカーやミヤコグサ EST プロジェクトから得られた配列情報を利用し PCR 法を用いて起点となるクローン(シードクローン)を選抜し、配列解析を進めている。塩基配列はショットガン法(重複度約 5 倍)により決定し、相同性検索やコード領域予測プログラムを利用したアノテーションを行っている。2000 年 11 月現在、200 のシードクローンを選抜し、そのうち 31 について配列解析を進めている。また得られた配列情報を利用して DNA マーカーを作製することにより、シードクローンの遺伝子地図上へのマッピングも進めている。年間 30Mb のペースで配列決定を行うことを予定しており、本プロジェクトから得られる配列情報及び位置情報がミヤコグサの遺伝解析を促進することが期待される。

S614

モデル植物の大規模 cDNA 構造解析プロジェクト

浅水恵理香[1]、中村保一[1]、三浦謙治[2]、九町健一[2]、井上能宏[2]、福澤秀哉[2]、中嶋舞子[3]、嵯峨直恆[3]、佐藤修正[1]、田畑哲之[1]（[1]かずさ DNA 研、[2]京大院・生命科学、[3]東海大・海洋研）

様々な植物種の進化や多様性を説明するためには、シロイヌナズナやイネに加えて、新たにモデルとなりうる植物種の確立が必要である。我々は、遺伝子の配列情報と発現に関する情報から、各植物種固有の遺伝子や発現システムを明らかにすることを目的とし、その第 1 段階として、大規模な EST 塩基配列情報の蓄積を進めている。材料としては、ゲノム解析や分子遺伝解析が可能なミヤコグサ（マメ科）、クラミドモナス（単細胞緑藻）、スサビノリ（多細胞紅藻）を用い、2000 年 11 月現在、それぞれから 13,477、10,182、4,517 の独立した cDNA 種を得た。

S615

シロイヌナズナのFunctional Genomics - ジーントラップ法による遺伝子発現の網羅的解析

加藤友彦、佐藤修正、田畑哲之（かずさDNA研）

シロイヌナズナ全ゲノムの塩基配列決定作業はほぼ終了し、今後は遺伝子の機能解析が加速されると考えられる。植物においては多数のタグラインの解析が、遺伝子の機能解析を進めるうえで重要な手法となる。我々は、包括的な遺伝子の機能解析にむけてT-DNAタグラインの大規模な作製を進めている。この際、個々の遺伝子の発現パターンを解析する目的で、GUS遺伝子をレポーター遺伝子としたジーン・エンハンサートラップのシステムを導入している。またT-DNAの中には Ac/Ds系トランスポゾンが含まれており、T-DNA挿入位置からさらにトランスポゾンを転移させ近傍の遺伝子を破壊することが可能である。現在までに35,000ラインのタグラインを作製し、そのうち13,000ラインについてGUS染色による発現パターンの解析を行った。またトランスポゾンの基点になるラインの整備も進めている。

F701

シスタチオニン γーシンターゼ遺伝子にみられる
mRNA 安定性の自己制御の研究

千葉由佳子, 大湊公博, 秋田啓志, 吉野剛史, 尾之内 均, 内藤 哲
(北大院・農・応用生命)

遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ突然変異株(*mto1*) の解析により, メチオニン生合成の鍵段階に働く酵素であるシスタチオニン γーシンターゼ(CGS) が mRNA の安定性の段階でフィードバック制御を受けており, この制御には CGS 自身の第1エキソンのポリペプチドが重要であることがわかった(Science 286: 1371-1374, 1999). CGS 第1エキソンのアミノ酸配列を7植物間で比較すると *mto1* 変異を含む 38 アミノ酸において高い保存性を示した. (この領域を MTO1 領域と呼ぶ.) 一過的発現系を用いて, CGS mRNA の安定性の自己制御に必要な最小領域を決めたところ, MTO1 領域だけでメチオニン添加に応答することがわかった. また, MTO1 領域のアラニンスキャニングを行ったところ, *mto1* 変異の集中しているC末端側がより重要であることが明らかとなった. 一方, CGS mRNA の分解の中間産物と思われる 5' 末端の欠けた断片についても解析を行った. CGS mRNA の 5' 末端が翻訳開始点の約 70bp 上流であることから, 断片の 5' 末端は第1エキソン中の GC-rich な領域にあると考えられる.

F702

Study of cystathionine γ-synthase mRNA stability in *Arabidopsis* callus and tobacco BY2 suspension cultures

Ingrid Lambein, Yukako Chiba, Tatsuo Kanno, Hitoshi Onouchi and Satoshi Naito

Graduate School of Agriculture, Hokkaido University

We are studying an *Arabidopsis thaliana* mutant, *mto1*, which over-accumulates soluble methionine. We have shown that cystathionine γ-synthase (CGS), a key enzyme in methionine biosynthesis, is regulated at the level of mRNA stability, and that the exon1 polypeptide of CGS is responsible for this regulation. This mechanism is impaired in the *mto1* mutant.

To further analyse this regulation, *Arabidopsis* callus cultures were used to investigate the response to exogenously applied Met. Application of Met to wild type callus resulted in a decrease of CGS mRNA, this decrease was not seen in *mto1* callus. Tobacco BY2 (Bright Yellow 2) cells, which are suspension culture cells and therefore easier to manipulate than callus, were chosen as a heterologous system to further analyse this mechanism and transformed with a construct containing the wild type or mutant *Arabidopsis* CGS exon1 under the control of a 35S promoter and fused to the GUS reporter gene. The response to Met has been shown in tobacco BY2 cells, both *Arabidopsis* and endogenous tobacco CGS mRNA levels were reduced after Met application.

F703

トランスジェニックシロイヌナズナを用いたシスタチオニン γ-シンターゼ遺伝子にみられる mRNA 安定性の自己制御機構の解析

鈴木 昭徳, 白田 幸枝, 千葉 由佳子, 尾之内 均,
内藤 哲 (北大院・農・応用生命)

遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナの突然変異株(*mto1*)を用いた解析から, メチオニン生合成の鍵となる段階を触媒するシスタチオニン γ-シンターゼ(CGS)が mRNA の安定性により自己制御を受けていることが明らかにされている. また, 一過的発現系を用いたこれまでの解析から, CGS 第1エキソンにはメチオニン添加に応答する領域が存在し, CGS 第1エキソンのポリペプチドはシスに働く, すなわち, 自身の CGS mRNA に対してのみ働くというモデルが考えられている.

CaMV 35S プロモーターの下流に CGS 第1エキソンとレポーター遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入したトランスジェニックシロイヌナズナを用いた解析を行ったところ, 導入遺伝子の mRNA の蓄積量はメチオニン添加により減少した. このことは, 一過的発現系でみられた現象が構成的発現下においても起きていることを示している. また, 遺伝的掛け合わせにおいても CGS 第1エキソン領域はシスに働くことが示された. これらの結果にも基づき, CGS 第1エキソンによる発現制御を遺伝学的に解析する系を確立した.

F704

シスタチオニンγ-シンターゼ mRNA 安定性は *S*-アデノシルメチオニンに応答してフィードバック制御される

尾之内均、櫻井玲子、石川真理、大湊公博、

千葉由佳子、内藤 哲 (北大・院農・応用生命)

我々はこれまでに、シロイヌナズナにおいて、メチオニン生合成の鍵段階で働くシスタチオニンγ-シンターゼ (CGS) が、mRNA 安定性の段階でメチオニンもしくはそれ以降の代謝産物によってフィードバック制御されることを明らかにした。今回、カルスを用いた一過的発現系において、この CGS mRNA 安定性制御系が、メチオニンだけでなく、メチオニンの次の代謝産物である *S*-アデノシルメチオニン (SAM)にも応答を示すことが分かった。さらに、小麦胚芽由来の *in vitro* 翻訳系を用いた解析では、CGS mRNA 安定性制御系はメチオニンにはほとんど応答せず、SAM には応答を示した。また、SAM の次の主要な代謝産物である *S*-アデノシルホモシステインに対しては、この系は応答を示さなかった。これらの結果は、CGS mRNA 安定性制御が、実際には SAM に応答して行われていることを示唆する。

F705

モモ果実におけるアスコルビン酸の生合成・再生に関与する酵素遺伝子の単離

田村茂之，今井剛[1]，菅谷純子[2]，松田長生[1]（筑波大・生物資源，[1]果樹試験場，[2]筑波大・農林学系）

アスコルビン酸（ビタミン C）は水溶性ビタミンの一種であり、果実はヒトのビタミン C 摂取源として重要である。アスコルビン酸は、細胞内外の活性酸素の捕捉ならびに種々の物質の酸化に対して抗酸化作用をもつ還元物質として、酵母から動植物まで広く存在している。

本研究ではモモ果実よりアスコルビン酸の生合成に関与する L-galactono-γ-lactone dehydrogenase（GLDH）、GDP-D-mannose pyrophosphorylase（GMPyP）、再生に関与する dehydro ascorbic acid reductase（DHAR）の cDNA 単離を行った。既知の配列情報よりプライマーを設計し、モモ cDNA の部分配列を PCR にて増幅した。開花後約 1 ヶ月および収穫期のいずれの cDNA でも増幅産物が得られた。GLDH は 920 塩基、GMPyP は 660 塩基の断片が得られ、アミノ酸翻訳後、サツマイモ GLDH とは 79%、アラビドプシス GMPyP とは 86%の一致が見られた。

今後、全長 cDNA 単離、ゲノミックサザン、ノーザン解析を行う予定である。

F706

モモ果実で発現するcDNAの大量解析

今井剛，田村茂之[1]，井下美加乃[2]，山本俊哉，松田長生，林建樹（果樹試，[1]筑波大・生物資源，[2]果樹試・カキブドウ）

果実で発現している遺伝子群を網羅的に解析し，果実形質との関連を明らかにするため，モモ果実のcDNAライブラリークローンの大量解析を行っている。

品種「あかつき」の果実(1999年4月27日(#1)・7月22日(#5)採取)よりcDNAライブラリーを作製した。インサート長は0.2-1.8kbに分布し，平均0.8kb程度であった。500base以上のインサートを持つクローンについて5'側の塩基配列を決定し，FastAによりGenBank登録配列とのホモロジーサーチを行ってcDNAクローンの機能を推定した。

現在までに#1由来約700，#5由来約100クローンの塩基配列を決定した。このうち4割程度が既知遺伝子との相同性を示し，5割程度はESTとの相同性が認められた。残りの1割未満のクローンは，新規な遺伝子クローンと考えられた。#1と#5のライブラリーで重複して得られたクローンは少なく，ライブラリー内の重複を含め全体の10%未満であった。既知遺伝子と相同性を示したもののうち20%程度は，タンパク質コード領域全長を含むと推定された。10クローン程度に単純反復配列がみられ，5' または3' 非翻訳領域に存在すると考えられた。

F707

CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF MYO-INOSITOL-1-PHOSPHATE SYNTHASE cDNA FROM SESAME (*SESAMUM indicum* L.) SEEDS

Un-Ho JIN, Jin-Woo LEE, Bong-Ho LEE[1], Chung-Han CHUNG; Division of Biotech., Faculty of Life. Res., Dong-A Univ., Pusan 604-714, [1]Nat. Crop Exp. Station, RDA, Su-Won 441-100, South Korea

A cDNA encoding myo-inositol-1-phosphate synthase (SeINO1) has been characterized from sesame(*Sesamum indicum* L.) seeds and its functional expression analyzed. The *SeINO1* gene was highly homologous with those from other plant species, while a much lower degree of sequence homology was found with those of other organisms such as human, mouse, algae, yeasts, *Drosophila*, bacteria, and other prokaryotes. A yeast-based complementation assay system confirmed that the *SeINO1* gene product was functional and encodes a myo-inositol-1-phosphate synthase of sesame. Phylogenetic analysis exhibited that the *SeINO1* gene might have diverged in slightly different ways. Northern hybridization indicated that the *SeINO1* gene expression at the transcriptional levels might be tissue-specifically regulated and Southern hybridization revealed that several copies of the *SeINO1* gene are present in sesame. During germination of sesame seeds, the *SeINO1* gene expression was temporally regulated and greatly affected by addition of salt (NaCl). These results suggested that not only the SeINO1 polypeptide play an important role during sesame seed germination but also the *SeINO1* gene would be exploitable for salt-related genetic improvement of crop plants.

F708

好熱性ラン藻*Synechococcus elongatus* FNRのフィコビリプロテインとの複合体と、プロテアーゼによる分解について

中嶋正人、浅野可奈子、村松早苗、和田敬四郎（金沢大・理・生物）

ラン藻のferredoxin-NADPH oxidoreductase(FNR)は高等植物とは異なり、そのN末端にフィコビリソームのリンカーペプチドの一種であるCpcDと高い相同性を示すドメインが付加されていることが知られている。このCpcDドメインは、FNRがフィコビリソームから遊離すると、プロテアーゼにより他のドメイン（FAD-、NADP-結合ドメイン）から取り除かれてしまう。

好熱性ラン藻*S. elongatus*よりFNRの精製を試みたところ、SDS-PAGE gel上での分子量は45kDaであった。一方、フィコビリプロテインとFNRの分離は容易ではなく、ゲル濾過では複合体として分子量約80kDaの位置に溶出された。これらの結果から、*S. elongatus* FNRはフィコビィソームが解離した後もフィコビリプロテインと複合体を形成した状態で存在していると考えられる。また、*S. elongatus* FNRのプロテアーゼに対する安定性は、FNRのフィコシアニン、もしくはアロフィコシアニンとの複合体形成によりもたらされたものであると考えられ、実際FNRとフィコビリプロテインを分離すると、速やかにCpcDドメインは切断されてしまう。以上の結果は、らん藻のFNRの局在性、及びフィコビリソームとの複合体を考える上で興味深い知見である。

F709

Synechocystis sp. PCC6803 が生産する hemolysin の精製と性質

加藤　彰, 永井孝志, 汝　少国[1], 桑原朋彦
筑波大・生物科学, [1]青島海洋大・海洋生命

我々は光独立栄養生物であるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 が 3 μM Cu (II)を含む BG11 培地中で溶血毒素 hemolysin を生産して細胞外に放出することを見出し、昨年度の本学会で発表した。本研究では PCC6803 の hemolysin を硫安分画によって部分精製し、その性質を調べた。hemolysin を含む培養液(細胞を除いたもの)を透析チューブに入れ、PEG20,000 を用いて 650 倍に濃縮した。硫安分画を行ったところ hemolysin は 0〜50%飽和硫安画分に得られた。この部分精製標品を用いて、SDS-PAGE における泳動度に対する熱処理の影響を調べた。hemolysin は 1.7% SDS 存在下で煮沸してから電気泳動すると、173 kDa の位置に泳動された。一方、1.7% SDS 処理を 50℃以下で行うと 116 kDa であった。また、SDS 非存在下で煮沸した hemolysin は、煮沸直後に 1.7% SDS 処理した場合は 173 kDa の大きさを示し、室温まで冷却後に 1.7% SDS 処理した場合は 116 kDa の大きさを示した。これらの結果は、hemolysin が加熱冷却過程で可逆的なコンフォメーション変化を起こすことを示唆している。hemolysin は SDS 非存在下で 100℃で 10 min 熱処理しても溶血活性は全く失われなかった。この事実は上記のコンフォメーション変化の推論と矛盾しない。

F710

ラン藻*Synechocystis* sp. PCC6803のssDNA結合画分に存在するプロテインキナーゼとそのリン酸化タンパク質の生化学的解析

金勝一樹, 葛西　智(東京農工大・農)

葉緑体の遺伝子発現では、RNA結合タンパク質(RNP)が転写後制御機構において重要な機能を有していると考えられている。我々は、ホウレンソウ葉緑体からssDNA-celluloseカラムクロマトグラフィーを用いて精製したRNP画分中に、カゼインキナーゼII(CK-II)が共存することを見い出し、RNPはCK-IIによってリン酸化されることを報告した。しかしながらこのリン酸化の果たす役割については未だ不明な点が多い。今回、葉緑体の祖先型の原核生物であると考えられているラン藻を用いて、RNPをリン酸化するプロテインキナーゼの存在について検討した。

***Synechocystis* sp. PCC6803細胞から1.5M KClを含む緩衝液(pH7.4)によってタンパク質を抽出し、ssDNA-celluloseカラムグラフィーによってssDNA結合画分を得た。この画分中に存在するプロテインキナーゼ活性について解析した結果、①ミエリン塩基性タンパク質(MBP)を強くリン酸化するプロテインキナーゼ(SDKと命名)が存在すること、②SDKはヒストンやカゼインをリン酸化しないこと、および③SDKによるMBPのリン酸化はssDNA存在下で促進されることなどが明かになった。さらに、ssDNA結合画分中に共存するSDKのリン酸化基質として28kDaおよび66kDaのタンパク質が認められ、現在これらのタンパク質に関する解析を進めている。**

F711

タバコの配糖化酵素 NTGT1 の異種発現とその性質

田口悟朗[1]、矢澤照義[2]、林田信明[1]、岡崎光雄[1,2]
([1]信州大・遺伝子、[2]信州大・繊維・応生)

【目的】タバコ培養細胞 T-13 株はクマリンの一種であるスコポレチン生産能を持ち、その配糖体であるスコポリンとして液胞に蓄積する。このような配糖化現象に関わる配糖化酵素群のタバコ細胞内での作用を明らかにする目的で、配糖化酵素遺伝子を単離し、大腸菌で発現させた酵素の解析を行った。
【結果】タバコT-13細胞より作製したｃＤＮＡライブラリーからNTGT1aと1bを単離した。大腸菌発現させた酵素を用いて基質特異性を検討したところ、フラボノイド類及びクマリン類の水酸基に反応性を示し、とりわけ、フラボノイドの3位およびクマリンの3，6，および7位の水酸基に対して高い活性を示した。また、これらの酵素はUDP-glucoseを糖供与体とするが、UDP-Xyloseも活性は弱いものの糖供与体になり得るという興味深い性質を示した。この酵素の作用を明らかにするためにノーザン解析を行ったところ、NTGT1はサリチル酸及び2,4-Dの処理でそれぞれ異なった時間応答で誘導されることが明らかとなった。

F712

形質転換イネ篩管液中からのGreen Fluorescence Protein (GFP), β-glucuronidase (GUS) タンパク質の検出

福田あかり[1], 藤原徹[1,3], 山谷知行[2], 米山忠克[1], 林浩昭[1]
([1]東大院・農・応生化, [2]東北大院・農・応用生命科学, [3]PRESTO,JST)

イネ篩管液中からは多種のタンパク質が検出されるが、篩管を構成する篩部要素は核やリボソームを消失しており、タンパク質合成能力を持たないと考えられる。故に、篩管液中のタンパク質は、篩部要素に隣接する伴細胞で合成され、原形質連絡を介して輸送されると推察される。

イネ篩管液中の主要タンパク質のひとつチオレドキシンh(TRXh)は、そのmRNAが成熟葉で主に伴細胞に存在することが確認されている。今回、我々はTRXh遺伝子のプロモーター下流にGreen Fluorescence Protein (GFP)(分子量27kDa)、あるいはβ-glucuronidase (GUS)(分子量68kDa)遺伝子を導入した形質転換イネを作製し、その篩管液中の外来タンパク質の存在の有無を調べた。ウェスタン法による解析の結果、形質転換イネ篩管液中からGFP、GUSそれぞれが検出された。イネ篩管液中のタンパク質は大部分が分子量40kDa以下のものであるが、今回の実験結果から分子量60kDa以上の外来タンパク質も篩部要素内に輸送され得ることが示された。

F713

植物におけるグリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質の代謝について

Levan Darjania[1]、 一瀬信敏[2]、 市川聡子[2]、
岡本貴史[2]、奥山英登志[2]、Guy A. Thompson, Jr[1].
([1]テキサス大・生物科学、[2]北海道大院・地球環境)

1998 年にナシ培養細胞でアラビノガラクタンタンパク質 (AGP) がグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質であることが、明らかになって以来、GPI アンカーAGP がシロイヌナズナやバラの培養細胞にも存在することがわかってきている。本来 GPI により細胞膜に結合している AGP が培養液に放出されるのは、GPI アンカーAGP が GPI 特異的なホスホリパーゼにより脂質部分を切断されるためと考えられる。しかし、AGP の代謝に関してはホスホリパーゼによる消化を含めてほとんど明らかになっていない。本研究ではシロイヌナズナ培養細胞の AGP の代謝について検討した。

シロイヌナズナ培養細胞を、SDS を用いて抽出することにより、完全長 GPI アンカーを持つ AGP と GPI の脂質部分を欠く AGP (可溶性 AGP) が得られた。一方、培養液には可溶性 AGP のみが検出された。双方の AGP を、逆相カラムを用いた HPLC に供したところともに 15 種類以上の分子サイズの異なる分子種からなることが分かった。一方、細胞を[^{3}H]酢酸によりパルス標識したとき、培養時間の経過に伴って標識される AGP の分子種が高分子量のものから低分子量のものに移動した。このことから初めに合成され蓄積された高分子量 AGP が細胞内で再利用されていると考えられる。

F714

サツマイモ懸濁培養細胞のポリフェノールオキシダーゼアイソザイムの発現と活性化

野末雅之、田中一平、金沢孝治、春名一樹、塩入秀成、小島峯雄 (信州大・繊維・応用生物)

サツマイモ(*Ipomoea batatas*)培養細胞の色素体から 60-kD と 65-kD の 2 種類のポリフェノールオキシダーゼ (PPO) アイソザイムを精製し、それらの cDNA をクローニングした。予測されるアミノ酸配列から、両アイソザイムの N-末端側には葉緑体ストロマ輸送シグナルとチラコイド内腔輸送シグナルが存在していた。ノザン解析から 65-kD PPOmRNA レベルが細胞を新鮮培地へ移植した直後に急激に増加するが、60-kD PPOmRNA は細胞の成長に伴い緩やかに増加することがわかった。また、これら二つの PPO アイソザイムはショ糖を含む培地で培養した細胞では不活性型で存在しているが、ショ糖飢餓培地へ細胞を移植すると PPO 活性を持つ 39-kD と 40-kD PPO が出現した。このショ糖飢餓でのプロテオリシスによる PPO の活性は、システインプロテアーゼインヒビターにより阻害された。これらの結果から、サツマイモ培養細胞の PPO の機能発現は、転写レベルと翻訳後の 2 段階で調節されていることが示唆された。

F715

Synechocystis sp. PCC6803 は生育にスルホキノボシルジアシルグリセロールを必要とする

青木元秀、佐藤典裕、都筑幹夫 (東京薬大・生命・環境生命)

スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) はチラコイド膜に存在する酸性糖脂質である。*Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて、*sqdB* と相同なコード領域の破壊株を作製した。Gülerらの *Synechococcus* sp. PCC7942 における報告 (*J. Biol. Chem.* **271**, 7501 (1996)) とは異なり、このPCC6803のSQDG欠失株は生育にSQDGを要求し、培地に20 μMのSQDGを添加することにより野生株と同等の生育速度を示した。SQDG添加下で生育した細胞を添加しない培地に移し、脂質組成の変化を調べたところ、SQDG含量の減少にともなって同じ酸性脂質であるホスファチジルグリセロール含量の増加が観察された。このときモノガラクトシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロールの含量に大きな変化は見られなかった。さらに、CO_2依存の光合成活性を調べたところ、クロロフィルあたりの光合成活性に影響は見られなかった。現在、クロロフィル含量、集光性色素であるフィコビリンの含量および酸性脂質合成系遺伝子の発現量についての解析を進めており、それらの結果についても報告する。

F716

シロイヌナズナのミトコンドリア局在型脂肪酸合成酵素cDNAのクローニングとその機能解析

安野理恵、和田元 (九大・理・生物)

植物細胞において脂肪酸は主にプラスチドで合成されるが、最近ミトコンドリアにおいても少量ながら脂肪酸が合成されることが分かってきた。しかし、ミトコンドリアの脂肪酸合成系に関与する酵素の実体はまだまったく解明されていない。

本研究では、大腸菌やプラスチドの脂肪酸合成酵素の1つ、3-ketoacyl-ACP synthase Ⅱ(KASⅡ)と相同性のある遺伝子(*mtKASⅡ*)をシロイヌナズナからクローニングし、その機能解析を行った。mtKASⅡのN末端には、ミトコンドリアへの移行シグナル様配列が存在し、この配列をGFPとの融合タンパク質として細胞内で発現させたところ、ミトコンドリアへ移行することを確認した。また、大腸菌のKASⅡ欠損株を *mtKAS* cDNAで形質転換すると変異が相補されることから、この遺伝子がKASⅡタンパク質をコードする事が明らかとなった。

F717

シロイヌナズナのプラスチド局在型リポ酸転移酵素についての研究

和田実穂, 安野理恵, 和田元（九大院・理・生物）

リポ酸は呼吸代謝系において重要な機能を担っているピルビン酸脱水素酵素などの活性発現に必要不可欠な補酵素であり、リポ酸転移酵素の働きで酵素の特定のリジン残基に転移される．植物ではリポ酸を補酵素とする酵素はミトコンドリアとプラスチドに存在することが知られており、リポ酸転移酵素も両オルガネラに存在するものと推測される．ミトコンドリアに局在するリポ酸転移酵素については、私達によって既にcDNA(*LIP2*)がクローニングされ、酵素の一次構造などが明らかになっている．

本研究ではプラスチドに局在するリポ酸転移酵素をコードするシロイヌナズナcDNA(*LIP2p*)のクローニングを行い、同酵素の実体や性質について解析した．*LIP2p* cDNA は 273アミノ酸残基からなるLIP2と高い相同性を示すタンパク質をコードし、このcDNAを大腸菌のリポ酸転移酵素欠損株において発現させると変異が相補されることから、このcDNAがリポ酸転移酵素をコードしていることが確認された．また*LIP2p* にコードされたタンパク質のアミノ末端のトランジット様配列とGFPとの融合タンパク質を植物細胞で発現させると、葉緑体にターゲットされることから、この酵素がプラスチドに局在することが示唆された．

F718

シロイヌナズナに存在する 2 つの糖脂質合成経路における 3 つの MGDG 合成酵素の役割

粟井光一郎, Delphine Brun[1], Eric Maréchal[1], Maryse A. Block[1], 増田建, 島田裕士, Jacques Joyard[1], 高宮建一郎, 太田啓之（東工大, 大学院生命理工学研究科, 生体システム専攻; [1]CNRS/CEA, Grenoble, France）

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) は、光合成生物に特徴的な糖脂質である。我々は前回大会において、シロイヌナズナより単離した 3 つの MGDG 合成酵素 (atMGD1, atMGD2, atMGD3) が葉緑体に局在し、ガラクト脂質の 2 つの合成経路（原核型経路および真核型経路）において、それぞれが異なる役割を果たすことを示唆した。今回、各酵素の生化学的な解析を行ったので報告する。基質特異性の解析の結果、atMGD2/3 は真核型の diacylglycerol に特異性が高いが、atMGD1 は原核型・真核型双方を基質とすることがわかった。atMGD1 がどの組織においても主要に発現していたこと、また、atMGD2/3 がそれぞれ根や花芽で主に発現していたことを考え合わせると、atMGD1 が糖脂質合成の主要な酵素であり、atMGD2/3 は根や花芽で主に真核型糖脂質の合成に関与していると考えられる。現在、光や植物ホルモン、外部環境に対する各遺伝子の mRNA 発現解析を行っており、それについても報告する予定である。

F719

ペチュニアの花の形成時における糖脂質の生合成

有満妃登美、粟井光一郎、山領和紀、今井博之[1]、島田裕士、増田建、高宮建一郎、太田啓之（東工大・大学院生命理工、[1]甲南大・理・生物）

monogalactosyldiacylglycerol （ＭＧＤＧ）や digalactosyldiacylglycerol (ＤＧＤＧ) は葉緑体に特徴的な糖脂質であり、光合成機能の発現に深く関わっていると考えられている。しかし、最近の結果からこれら糖脂質合成の鍵酵素であるＭＧＤＧ合成酵素遺伝子が葉などの光合成組織だけでなく、意外にも非光合成組織である花、蕾でも高いレベルで発現していることがわかった。そこで、花における糖脂質の分布や生合成、機能などについて明らかにするため、花弁が大きく、生化学的な解析に適したペチュニアを用いて、花の形成時における脂質や脂肪酸組成、糖脂質合成活性の変化などを調べた。花の形成時において、sterylglycoside(SG)の増加がみられ、逆にプラスチド由来の糖脂質はＤＧＤＧを除きいずれも減少し、花の形成に伴いＭＧＤＧとＤＧＤＧの量比の逆転がみられた。また各脂質の構成脂肪酸を解析したところ、特に糖脂質において、花の発達に伴い 18:3 が減少し、逆に 18:2 および 16:0 が増大する傾向がみられた。さらに並行して、糖脂質合成活性の変化、その反応に由来する反応生成物の変化を調べたところ、特に、ＳＧ生合成活性の顕著な増大がみられたが、ＭＧＤＧ含量が低下するにも関わらず、ＭＧＤＧ合成活性の増大も認められた。また、ＳＧの合成においては UDP-グルコースを良い基質としたが、UDP-ガラクトースでも高い合成活性が検出された。

F720

トマトフルクトキナーゼアイソザイムのアンチセンス遺伝子導入による栄養生長および生殖生長への影響

小田中佐保里・金山喜則（東北大院・農・園芸）

トマトの転流糖であるスクロースは果実においてグルコースやフルクトース等のヘキソースへと代謝され、果実の主要な糖となる。フルクトースをリン酸化するフルクトキナーゼには Frk1 と Frk2 という 2 つのアイソザイムの存在が知られており、異なる発現パターンを示す。本研究では、Frk1 と Frk2 のアンチセンス遺伝子を 35Ｓプロモーターにつないで別々にトマトに導入し、それぞれのアイソザイムの生理機能の解明を行った。

Frk1 アンチセンス個体（AFrk1）と Frk2 アンチセンス個体（AFrk2）に共通した表現型は、成熟葉における新鮮重当たりのヘキソース・デンプン含量の低下、植物体当たりの花数・果実数の低下であった。これらはいずれも AFrk1 より AFrk2 で強く現れた。一方、AFrk1 特有の表現型は着花節位の上昇であったことから、Frk1 の花芽分化への関与の可能性が考えられた。AFrk2 特有の表現型は、伸長生長・根の生長の抑制、成熟果実の新鮮重の低下と種子数の減少であり、Frk2 はこれらに特異的に関与していると考えられた。果実の新鮮重当たりのデンプンおよび糖含量については、両アンチセンス個体で対照個体との差異はほとんどみられなかった。

F721

シロイヌナズナ５番染色体より転移したトランスポゾン *Ds* エレメントの挿入部位同定

伊藤卓也[1]、本橋令子[2]、水門佐保[1]、関原明[1,2]、篠崎一雄[1,2]（[1]理研・植物分子生物、[2]理研・ゲノム科学総合研究センター・植物ゲノム機能）

我々のグループではシロイヌナズナの機能ゲノム学に向けて、トランスポゾン(*Ds*)タギングラインの作成と *Ds* 挿入部位の同定を行っている。近傍転移システム（１）を用いて、５番染色体に *Ds* ドナー部位がマッピングされている４系統から、現在までに約 5,000 転移ラインを作成した（２）。これら転移ラインについて、TAIL-PCR 法を用いた *Ds* 隣接ゲノム DNA の回収、部分塩基配列の決定、シロイヌナズナ・ゲノム DNA 塩基配列データベースとの比較を行い、現在までに約 1,000 ラインの *Ds* 挿入部位を同定した。その結果、9, 17, 8, 17, 49%が、それぞれ、1, 2, 3, 4, 5 番染色体に転移していた。また、*Ds* ドナー部位近傍以外に、２カ所の転移ホットスポット――NOR (nucleoli organizer region) 2, NOR4 領域――が見られた。NOR2 と NOR4 領域には、9%が転移していた。現在、残りの転移ラインの挿入部位マッピング及び、挿入部位のデータベース化を行っている。

(1) Smith *et al.*, Plant J. **10**, 721-32.
(2) Ito *et al.*, Plant J. **17**, 433-44.

F722

ソバ子実の登熟過程のルチン,イソクエルシトリン含量とそれらの分解活性

鈴木達郎、本田裕、船附稚子（北海道農業試験場）

我々はソバ子実のルチン含量を高めたいと考えており、そのための基礎的な情報を得る目的でルチンの代謝機構に注目している。今回は登熟過程子実のルチン、イソクエルシトリン（ルチンの前駆体と考えられている）含量と、それらの分解活性を調査した。フツウソバでは、ルチン、イソクエルシトリン含量ともに受粉後２７日目まで緩やかに上昇した。完熟子実ではイソクエルシトリンを検出する事は出来なかったが、ルチンは２７日目とほぼ同じ量存在した。ルチン、イソクエルシトリンの分解活性は、受粉後緩やかに上昇し、完熟子実でも２７日目とほぼ同程度であった。上記の結果は、フツウソバの 30-100 倍近いルチン含量と、100 倍近い分解活性を持つダッタンソバでもほぼ同様の傾向であった。ルチン、イソクエルシトリンと、それらの分解活性が共存するというのは一見矛盾した現象である。そこで、完熟子実の各器官におけるルチン、イソクエルシトリン含量と、それらの分解活性を調べたところ、ルチン、イソクエルシトリンの大部分は胚に存在し、分解活性の大部分は甘皮に存在した。これらの結果から、ルチン、イソクエルシトリンの分解活性がソバ子実のルチン含量の主要な制限要因ではないと推測した。（ルチン：血圧降下作用、抗酸化能等の機能性を持つフラボノール）

F723

シソ(*Perilla frutescens*)のlimonene synthaseの発現解析

松本　隆、植田浩一、井上文秀、　田淵　晃、
唐沢傳英（信大農、応用生命科学）

シソ（*Perilla frutescens*)のlimonene synthase (LC) は，geranyl pyrophosphateからlimoneneを合成する酵素であり，生成物のlimoneneからの代謝生成物perillaldehydeはシソ精油の主成分である。本研究の目的は，環境応答の情報伝達系の影響下にあるLC遺伝子の発現解析を行う事である．

まず，シソを初めとするいくつかのハッカ属植物のLCについて，スペアミントのLCタンパクに対する抗体を用い，交叉反応の確認を行った．その結果，いくつかのハッカ属植物において，このLCタンパクの抗体との交叉反応によるシグナルが確認された．

次にシソの成葉をサリチル酸を含む緩衝液に浸漬後，経時的に粗タンパクを抽出し，LCタンパクに対する抗体を用いてwestern blotを行った．検出されたシグナルについて，デンシトグラフを用い，LCタンパクの発現量の解析を行った．同時に，total RNAを抽出し，RT-PCRによりLCmRNA量の解析を行った．その結果，シソの成葉においても，培養細胞の場合と同様に，サリチル酸存在下，LC遺伝子の発現が誘導的に増加した．それは，mRNAの増加に続きタンパク量の増加が現われ，特徴的なほぼ二つの発現ピークとして 認められた．

F724

芳香族化合物を基質とするプレニルトランスフェラーゼの構造と機能解析

國久美由紀、佐藤文彦、矢崎一史
（京大院・生命・統合生命）

芳香族化合物のプレニル化は、高等植物の二次代謝産物の多様化にとって大きな役割を果たしている。我々は、ムラサキから4-hydroxybenzoic acid (4HB)を基質とするプレニルトランスフェラーゼをコードすると考えられるcDNAを２種クローニングし、それらの構造及び機能の解析を行った。推定された蛋白質は８回膜貫通領域を有する膜酵素で、局在部位は小胞体と予想された。酵素活性の測定において障害となりうる内在性の 4HB: hexaprenyltransferase 遺伝子 (COQ2) を破壊した酵母株をホストとして単離した遺伝子を発現させたところ、両蛋白質ともミクロソーム画分においてgeranyl diphosphate を選択的に基質とする高い 4HB: geranyltransferase 活性を有することが証明された。これらは高等植物から単離された初めての芳香族トランス・プレニルトランスフェラーゼ である。

F725

タマネギのAlliinase遺伝子プロモータ領域の構造・機能解析

上西愛子、野村研、大矢武志、北宜裕（神奈川農総研）

アリイナーゼ(AI)はタマネギ鱗茎に含まれるアリインを加水分解して特有の揮発性辛味成分であるアリシンを生成させる酵素である。タマネギ鱗茎にはこのAIが可溶性タンパク質の6%以上も含まれていることから、AI遺伝子のプロモータには非常に高い活性が期待される。すでにIPCR法によりAI遺伝子のプロモータ領域を含む新規のDNA断片を得ている。そこで本DNA断片をpBI101に組み込み、赤タマネギ鱗片裏側表皮を用いてパーティクルガンによりGUS遺伝子をレポーターに一過性発現検定を行ったところ、CaMV35Sプロモータと同レベルの活性が認められた。このコンストラクトを用いてシロイヌナズナを形質転換したところ、部位特異的なプロモーター活性が認められた。さらに本DNA断片をタマネギ初生根端細胞由来カルスにアグロバクテリウム法により導入した結果、すでに単離されているAIプロモータと相同性の高い領域(約400bp)に高いGUS活性が認められた。

F726

植物フェノール代謝におけるアグロバクテリウム腫瘍遺伝子AK-*6b*の機能

垣内康孝、Ivan Galis、我彦広悦（秋田県立大、生物資源、生物工学研究所）

目的：根頭癌腫病を引き起こすアグロバクテリウムの*6b*遺伝子は機能がいまだ明らかでない。我々はAKE10株由来の*6b*(AK-*6b*)遺伝子を導入したタバコがホルモンフリー培地で生育し、内生フェノール化合物代謝が影響を受けていることを示してきた。ここではAK-*6b*遺伝子の発現レベルとフェノール化合物動態の関連を調べる。　方法：発現レベルの異なるAK-*6b*-カルスについて、内生フェノール化合物量をHPLCにより定量した。フェノール物質生産に関わる遺伝子の発現レベルをノーザン解析した。
結果：AK-*6b*タバコでは野生型タバコに比べてスコポレチンが少なく、反対にクロロゲン酸は多かった。これらの生成を調節するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)、ケイヒ酸4ヒドロキシラーゼ(C4H)およびクマリルCoAリガーゼ(4CL)の発現レベルはほぼ一定であり、AK-*6b*遺伝子はこれらとは別の方法で代謝調節を行っていると考えられる。スコポレチンやクロロゲン酸は植物の病原抵抗に関係することから、pathogenesis-related (PR) 遺伝子の1つであるPR-1の発現レベルを調べた。PR-1遺伝子の発現レベルはAK-*6b*タバコで抑えられており、AK-*6b*遺伝子が宿主植物の防御機能を抑制する働きを持つことが示唆された。

F727

シアン耐性呼吸の二次代謝における役割

坂野勝啓、矢崎芳明、清田誠一郎(農水省・生物研)、野末雅之(信州大・繊維)M. Greksák (Inst. Animal Biochem Genetics, Slovak Acad Science) 瓜谷郁三(名古屋大学)

植物に特有のシアン耐性呼吸の機能は熱発生、活性酸素生成の抑制に加え、細胞質pH調節があげられる (Sakano, 1998)。しかし、この呼吸が傷害や罹病時に増加することの理由は説明されていない。黒斑病菌に罹病したサツマイモ塊根組織ではシアン耐性呼吸の増加に伴い、多量のポリフェノール、ファイトアレキシンであるイポメアマロンが合成・蓄積される。これら二次代謝産物のブドウ糖からの生合成について化学量論を検討した結果、予想に反してATPの需要は小さく、副産物として多量の還元当量NAD(P)H＋H^+が生成することを見いだした。これは「これら二次代謝産物の生合成が進行するためには過剰の還元当量が呼吸により酸化・除去されねばならない」ことを示している。この場合、これらの生合成はATPをあまり必要としないのでAECの調節を受けるチトクロム系の呼吸は適当ではなく、シアン耐性呼吸が適している。実際、オランダのHagendoornら(1994)は植物細胞による「アントシアン等の二次代謝産物生産が細胞質pHの低下と密接な関係がある」ことを示しており、酸性条件下のBiochemical pH-statであるシアン耐性呼吸の関与(Sakano 1998)を強く示唆する。われわれは野末らが開発した光誘導性アントシアニン合成能を持つサツマイモ培養細胞で、光誘導時に呼吸がシアン耐性系に切り換えられるかどうかを、酸素安定同位体を用いて検討している。

F728

シロイヌナズナのヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子の単離と解析

[1]太田大策，[2]藤森功（[1]大阪府大院・農生命科学，[2]大阪バイオサイエンス研）

我々はこれまでに高等植物の L-ヒスチジン(His)生合成経路を解明した．一方，His の分解酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素（Histidine decarboxylase; HDC）についての研究はほとんど無く，植物組織におけるヒスタミンの生理的役割は不明である．今回，RACE 法によりシロイヌナズナから完全長 HDC cDNA(AtHDC)を単離した．AtHDC cDNA は 482 アミノ酸からなる 54.1 kDa のタンパク質をコードする翻訳領域を含んでいた．一次構造の比較を行ったところ，トマト HDC に 39%，微生物のホスホリボシルピロリン酸（PLP）依存性 HDC に 21～24%の相同性を示したが，哺乳類の PLP 依存性 HDC には相同性を示さなかった．一方，PLP 結合領域周辺配列はヒトやショウジョウバエのグルタミン脱炭酸酵素と相同性を示した．*AtHDC* 遺伝子を単離し，それが第 1 染色体に存在することを明らかにした．またサザン解析の結果から，*AtHDC* 遺伝子は染色体中に 1 コピーのみ存在することが示された．*AtHDC* 遺伝子は，成長過程を通して，葉・根で強く発現しており，この発現分布は His 生合成系の酵素遺伝子の発現分布と一致していた．His 代謝活性の生理的意味について検討するため，さらに詳細な発現様式の解析中である．

F729

タマネギ鱗茎での感染防御物質としてのフェノール性化合物と活性酸素の生成

高浜有明夫、鬼木隆幸　（九州歯科大学、一般教育）

感染に対して強い耐性をもっている黄タマネギ鱗茎の外鱗葉は成熟過程で褐色に変化していくが、感染しやすい白タマネギではその様な変化は見られない。我々は、この変化は、黄タマネギに含まれているケルセチンのペルオキシダーゼに依存した酸化のためであり、その酸化過程で生成する化合物の一つに抗菌作用をもつ3,4ーdihydroxybnenzoic acidが合成されることを報告している（1）。今回は、褐色に変化した鱗葉中に活性酸素を生成する成分が存在するのでその生化学的性質について報告する。

褐色鱗葉を水に懸濁すると酸素吸収が見られる。この酸素吸収に伴って赤色物質が溶出し、過酸化水素が生成した。褐色鱗葉の水抽出液から単離した赤色物質はペクチン様化合物と結合していた。この化合物は酸素を吸収し、それにともないスーパーオキシドラジカルと過酸化水素を生成した。また、この物質は安定なラジカルであった。これらの性質は酸加水分解でペクチンを除いた場合にも観察された。以上の結果に基づいて、タマネギ外部鱗葉の褐変の生理的意義について報告する。

(1) Takahama and Hirota (2000) Plant Cell Physiol. 41: 1021-1029.

S701

ゲノムDNAアレイを用いたシロイヌナズナ5番染色体長腕部の詳細な遺伝子発現解析

天谷正行,桑田主税,津金胤昭,花野　滋[1],中村保一,田畑哲之,柴田大輔（かずさDNA研究所,[1]Warwick大）

シロイヌナズナのゲノム解読プロジェクトは2000年の終わりに終了した。このプロジェクトで得られた情報は植物ゲノム解析の基礎となるばかりでなく、他の作物における育種事業にとっても重要なものである。シロイヌナズナにおける詳細な遺伝子発現解析に向けて、我々はゲノムDNAアレイ法を開発した。今回我々は、平均長2.9kbの連続するゲノムクローンで5番染色体長腕部の約50％をカバーしたアレイを作成した。これはテロメア側から6.8Mbにわたる領域に相当し、1914個のコンピュータ上で構造予測された遺伝子を含んでいる。これらのDNA断片をナイロンメンブラン上にスポットし解析を行った。モデル実験として生育時に低温ストレス等を与えた材料を用い、アレイ上の各遺伝子がどのように発現しているのかを解析した。この結果、ストレスに対応した遺伝子発現の変化を検出することができた。また、遺伝子発現はアレイ化した領域全体に渡り起きていることが示され、シロイヌナズナのゲノム構造を反映した結果であると考えられた。

F730

CLONING AND EXPRESSION OF *NICOTIANA GLUTINOSA* ORNITHINE DECARBOXYLASE HAVING BOTH L-ORNITHINE AND L-LYSINE DECARBOXYLASE ACTIVITY

Yong Sun LEE and Young Dong CHO, Dept. of Biochemistry, College of Sci., Yonsei Univ., Seoul 120-749, Korea

Ornithine decarboxylase (ODC) is one of the key enzymes in polyamine biosynthesis, decarboxylating ornithine to produce, putrescine. In this study, we have cloned and sequenced ODC from *Nicotiana glutinosa* cDNA library (Accession No.AF32910). *N. glutinosa* ODC showed 90% homology to tomato and 41.4% to human ODC. The ODC clone was expressed and purified as a GST-fusion protein. The native molecular weight of this enzyme was 92,000 dalton, while the subunit molecular were 46,000 daltons, indicating that the active enzyme is a homodimer. The optimal pH and temperature of this enzyme was 7.0 and 37°C, respectively. Kinetic study of ODC showed a novel character of *N.glutinosa* ODC decarboxylating both L-ornithine and L-lysine with K_m values of 885 *u*M and 1.59mM, respectively. Site-specific mutagenesis were also performed on *N.glutinosa* ODC to introduce mutations at conserved residues such as cystein (Cys^{96}, Cys^{338} and Cys^{377}) and lysine[95], which were proved to be involved in enzymatic activity by chemical modifications. The ODC mutants (K95A and C377A) lost almost 90% of their activity, demonstrating that lysyl and sulfhydryl groups are important for its catalytic activity.

S702

セリンアセチル転移酵素高発現シロイヌナズナにおける硫黄同化系の制御機構の解析

落合智子, 野路征昭, 斉藤和季（千葉大・薬）

セリンアセチル転移酵素 (SATase) は、システイン生合成の重要な中間体である *O*-アセチルセリン (OAS) を生成する酵素である。OAS は硫黄同化系酵素遺伝子の発現誘導物質としての役割も果たしている。そこで硫黄同化能の高効率化と OAS の硫黄同化系の調節物質としての役割を解明するため、SATase 遺伝子を導入した形質転換植物の作製と解析を行った。細胞質局在性であるスイカ SATase はシステインによりフィードバック阻害を受けるが、阻害を受けない点変異 SATase 遺伝子（SATG277C）が既に作製されている。これらの遺伝子をシロイヌナズナに導入し、得られたトランスジェニックシロイヌナズナの OAS、システイン、グルタチオン含量を測定した結果、野生型シロイヌナズナと比較して顕著に増加していた。細胞質中の OAS 含量が増加している形質転換植物では、硫黄同化系酵素遺伝子の発現が増加している可能性が考えらるため、硫黄同化系酵素遺伝子の発現量の変化について現在検討中である。

S703

ジャガイモのβ-シアノアラニン合成酵素とシステイン合成酵素遺伝子の単離

丸山　明子, 石澤　公明[1], 斉藤和季（千葉大, 薬, [1]東北大, 院, 理, 生物）

β-シアノアラニン合成酵素(CAS)は,シアン代謝の主要酵素として知られ,シアンとシステインからβ-シアノアラニンと硫化水素を生成する反応を触媒する。また,システインの生成を触媒するシステイン合成酵素(CS)も同様の反応を触媒する。植物体内ではシアン化合物の分解やエチレン生成に伴ってシアンが生成され,生体防御,窒素の供給,アミノ酸代謝の調節などの役割が示唆されている。両酵素の役割をさらに追求するため,ジャガイモ塊茎より精製したCASとCSに相当するcDNAをRACE法により単離した(*PCAS-1*,*PCAS-2*,*PCS-1*,*PCS-2*)。大腸菌発現系における各酵素のCASおよびCS活性を調査したところ,PCS-1,PCS-2がCAS活性と比較して非常に高いCS活性を示したのに対し,PCAS-1ではCAS活性が非常に高かった。各酵素の基質に対するKm値も,PCAS-1とPCS-1,PCS-2では異なっていた。これらの結果と他のタンパク質との相同性から,PCS-1,PCS-2はサイトソル,プラスチドCSに,PCAS-1はCASに相当すると結論した。各器官におけるCSとCASの活性,酵素タンパク質量及び遺伝子発現,及びこれらに対するエチレンの影響について報告する。

S704

カルモジュリン結合能の異なる二種のイネグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）の分子解析

赤間　一仁，秋廣高志[1]，高岩文雄[2]（島根大・生物資源・生物科学，[1]筑波大，[2]農業生物資源研究所）

グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)は，グルタミン酸の脱炭酸反応を触媒し，γ-アミノ酪酸 (GABA) を産生する．GADは原核生物から高等真核生物まで普遍的に存在する酵素であるが，植物のGADのみがC末端にカルモジュリン結合ドメイン(CaMBD)を持つ．CaMBDはGADの活性調節において重要な役割を担っていると考えられている．

我々は単子葉植物（イネ）で初めて，GADをコードする二種の核遺伝子(*OsGAD1*，*OsGAD2*)を単離・同定したので報告する．推定されるイネGADは，アミノ酸レベルで既知の植物GADと67～78％の一致が見られた．CaMBDをコードするDNA領域を発現ベクターに組込み，大腸菌内で発現・誘導した融合蛋白質とCaMとの結合実験を行った．この結果，OsGAD1はCaMと結合し，OsGAD2は結合しないことが判明した．

S705

イネにおける 2 種のカボチャ CmPP16 ホモログは維管束で特異的に発現する

浅野敬幸[1,2]、若生俊行[1]、奥田知弘[2]、久保中央[1]、高野誠[1]、西口正道[1]、島田浩章[2]、門脇光一[1]
（[1]農水省・生物研、[2]東京理大・生物工）

1999 年にカボチャからウイルスの movement protein 様タンパク質遺伝子が同定された。我々は、イネ師部における同遺伝子の機能を明らかにするために、イネから 2 種類のカボチャの師部タンパク質ホモログ遺伝子を単離した。この 2 種の遺伝子の発現部位を in situ ハイブリダイゼーションにより解析した。また、ウエスタン分析を行った結果、これらのタンパク質はイネだけでなく、サトウキビやアラビドプシスにおいても蓄積していることが明らかになった。このことから、このタンパク質は単子葉植物だけでなく双子葉植物においても幅広く高度に保存されていることが示唆される。さらに、これらの遺伝子の組織特異的発現はプロモーター領域によって制御を受けているかを解析するために、2 種の遺伝子のプロモーター領域をそれぞれ単離し、GUS 融合遺伝子としてイネに導入した形質転換体を作成した。現在、これらの形質転換イネでの GUS 発現を解析中である。

S706

導入遺伝子の転写産物が蓄積してもコサプレッションが成立することがある

児玉浩明、濱田達朗[1]、堀口吾朗[2]、政田正弘、射場厚[2]（千葉大・園芸・生物化学、[1]石川農業短大・農業資源研、[2]九州大院・理・生物）

タバコ小胞体型ω-3脂肪酸不飽和化酵素 (NtFAD3) は、α-リノレン酸の合成を触媒する。*NtFAD3*遺伝子を高発現プロモーターに接続してタバコに導入すると、多くの形質転換体ではリノレン酸含量が増加する。しかし、S44と名付けた系統では葉でのリノレン酸含量が野生株よりも大幅に低下した。S44では導入遺伝子と内在性の*NtFAD3*遺伝子および葉緑体局在型ω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*NtFAD7*) が抑制されたコサプレッションが生じていると思われる。しかし、S44では完全なORFを持つ導入遺伝子の転写産物が、導入遺伝子の遺伝子量にしたがって蓄積していた。一方、内在性の*NtFAD3/7*遺伝子の転写産物のプロセシングは阻害され、その後分解されていることが推定された。これらの結果は塩基配列特異的なRNA分子の排除をともなう従来の転写後ジーンサイレンシングとは異なる分子機構が存在することを示している。

S707

クスノキω－3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 cDNA の単離と発現解析

本田朋子[1]、桑野祐子[2]、堀口吾朗[3]、射場厚[3]、小林善親[2]（[1]九大・農・林、[2]九大院・農・植物資源、[3]九大院・理・生物科学）

高等植物は種々の環境の変化に対する適応機構を発達させてきたが、特に生体膜中のトリエン脂肪酸含量の調節は温度適応性の獲得に重要な役割をもつことが知られている。樹木、特に常緑樹は草本植物とは異なり、葉の寿命が長いことから、独自の適応機構を備えている可能性が考えられる。本研究では樹木における膜脂質脂肪酸の不飽和度が環境ストレス適応に果たす役割を明らかにするため、クスノキを用いて２つのω－３脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 cDNA (*ChFAD7-1, ChFAD7-2*) のクローニングと発現解析を行った。これらの cDNA シークエンスから推定されるアミノ酸配列は、草本植物のω－３脂肪酸不飽和化酵素のアミノ酸配列と比較して 60-70%ほどの相同性を示した。N 末端側には葉緑体移行に必要なトランジットペプチド様のアミノ酸配列が見られた。*ChFAD7-1* は主に葉で mRNA が強く蓄積し、傷害処理によってその蓄積量は減少した。*ChFAD7-2* は *ChFAD7-1* とは異なり、主に根で mRNA が蓄積し、葉での蓄積量はごくわずかだった。葉での *ChFAD7-2* の蓄積量は傷害処理、低温処理によって一時的に増加した。以上のことからクスノキには葉緑体移行型ω－３脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が少なくとも２つ存在し、環境要因によってそれぞれの遺伝子発現が異なった調節を受けていることが示唆された。

S708

FUNCTION AND DISTRIBUTION OF FNR AND FERREDOXIN ISOFORMS IN MAIZE

G. Hanke, Y. Onda, Y. Ariga, C. Bowsher[1], M. Emes[1] & T. Hase[1]
Institute of Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita Osaka 565 0871 Japan; [1]School of Biological Sciences, the University of Manchester, 3.614, Stopford building, Oxford Rd., Manchester M139PT, UK

FNR enzymes catalyse reduction, either of NADP+ by photosynthetically reduced ferredoxin (Fd), or of oxidised Fd by NADPH. Direction of electron flow depends on the photosynthetic capacity of the tissue, and this is reflected in the distribution of different FNR and Fd isoforms. LFNR, FdI and FdII are restricted to photosynthetic tissue while RFNR and FdIII are found mainly in the root.

Western blotting was used to further investigate the tissue and sub-oganellar distribution of FNR isoforms. FNR isoproteins were found to vary in distribution within the plastid; LFNR being membrane bound, while RFNR is soluble. Young leaves were found to contain LFNR and RFNR. LFNR and RFNR vary in affinity to different Fd isoforms (1). Recombinant proteins have been used to investigate the relationship with separate Fd isoforms of LFNR and RFNR in terms of sub-organellar location and redox state, respectively. The physiological implications of these, and related results will be discussed.

1. **Onda, Y.** *et al* 2000. *Plant Physiol.* **123**, 1037-1046

S709

ミヤコグサの２種のカルコン異性化酵素

嶋田典基，青木俊夫，綾部真一（日本大・生物資源・応用生物）

カルコン異性化酵素 (CHI) はカルコンから (2*S*)–フラバノンへの異性化を触媒し，フラボノイド生合成の初期段階で働いている．多くの植物で CHI は 6'-ヒドロキシカルコンのみを基質とするが，マメ科植物の CHI は 6'-デオキシカルコンに対する触媒活性も持ち，ファイトアレキシンなどマメ科に特有の 5-デオキシ型フラボノイドの生合成に関与している．マメ科・非マメ科植物の CHI で特徴的なアミノ酸配列が示されているが，同一植物から両タイプの CHI が検出された例はなく，基質特異性の差異の機構は不明である．今回マメ科モデル植物ミヤコグサを材料に既知アミノ酸配列から設計したプライマーによる PCR を行い，2 種の異なる CHI cDNA 断片を取得した．RACE 法を利用して得られた全長 cDNA クローン LjCHI1 はマメ科，LjCHI2 は非マメ科植物の既知 CHI とそれぞれ高い相同性を示し，両者の推定アミノ酸配列の相同性は 53.7% であった．これらの酵素の基質特異性および遺伝子の発現様式について報告する予定である．

S710

ミヤコグサ根粒におけるスクアレン合成酵素のクローニング及び性状解析

赤嶺里美[1]、馬場真里[2]、梅原洋佐[3]、河内　宏[3]、泉井　桂[1,2]、畑　信吾[1,2]（[1]京大・農、[2]京大・生命科学、[3]農業生物資源研究所）

スクアレン合成酵素（SqS）はステロール生合成における重要な酵素で、ファルネシルピロリン酸二分子から中間体を経てスクアレンを合成する。

我々はダイズのスクアレン合成酵素遺伝子をプローブに用いて、ミヤコグサ（*Lotus japonicus*）根粒のcDNAライブラリーをスクリーニングし、ミヤコグサスクアレン合成酵素遺伝子（*LjSqS5*)を単離した。*LjSqS5*は４１３個のアミノ酸から成るタンパク質をコードしていた。このタンパク質を他の植物のSqSのアミノ酸配列と比較したところ、非常に保存性の高い領域が３カ所存在し、それらは活性中心を形成していると思われた。また、タンパク質のＣ末端に、疎水性の高い領域が見られた。これはスクアレン合成酵素が小胞体に埋まった状態で存在しているためと考えられた。

ノーザンハイブリダイゼーションによって根粒には*LjSqS*の発現が高いことが示された。同時にゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った結果、複数のバンドが見られたので、ミヤコグサゲノムには本遺伝子が２コピー以上ある可能性も示された。

今後組換えSqSを調製して酵素活性を測定し、in situ ハイブリダイゼーションを試みる予定である。

S711

ミヤコグサにおけるミトコンドリアリン酸輸送体cDNAのクローニング

中森一樹[1]、高畠令王奈[2]、梅原洋佐[3]、河内宏[3]、泉井桂[1,2,4]、畑信吾[1,2,4] ([1]京大・農、[2]京大院・農、[3]農業生物資源研究所、[4]京大院・生命科学)

ミトコンドリアリン酸輸送体(MPT)は、無機リン酸をミトコンドリアマトリックスに輸送するという、酸化的リン酸化における主要な役割を果たす内膜貫通タンパク質である。また、共生窒素固定根粒内の細胞は比較的嫌気的な環境にあると思われるが、ミトコンドリアはやはり重要な役割を果たしていると考えられる。

我々は、モデルマメ科植物であるミヤコグサ根粒cDNAライブラリーよりダイズの*MPT*cDNAをプローブとして*MPT*cDNAを単離した。得られたcDNAは完全長で、356アミノ酸からなり6つの疎水性領域を有する典型的なMPTをコードしており、そのタンパク質はダイズのMPTとも高い相同性を示した。その後、ノーザン解析、*in situ*ハイブリダイゼーションを試みた。現在、そのリン酸輸送活性を確認するため組換え体MPTを用意し、リポソームとの再構成実験を行っている。また、他の動植物のMPTにおいて高度に保存されているシステイン残基が、リン酸輸送活性に必須であるか否かを、site-directed mutagenesisによって調べる予定である。

S712

円石藻 *Emiliania huxleyi* における硝酸還元酵素の精製と特性解析

岩本浩二，白岩善博（筑波大・生物）

円石藻は，海洋において大規模なブルームを形成し、環境に大きな影響を与えることが知られている。円石藻の増殖は培地中の窒素濃度に制御され、海水レベルの硝酸濃度(10-30 μM)では、窒素供給が生育の制限要因の一つとなっていると推測される。そこで，本研究では，円石藻 *Emiliania huxleyi* を用い，窒素固定系の律速酵素である硝酸還元酵素(EC 1.6.6.1)を精製し，その酵素学的諸性質を明らかにした。

精製は、Blue Sepharose, Mono-Q, およびSuperdex 200 HR によるカラムクロマトグラフィーを用いて行った。その結果，SDS-PAGE 上で85 kDの位置に単一のバンドを示すまでに精製された。ゲルろ過によるnative formの推定分子量500 kDから、ホモ6量体であることが示された。硝酸およびNADHに対する K_m 値はそれぞれ355 μM，54 μMであり、NADPHは基質となり得なかった。本酵素はNADH:NR還元活性の他、NADH:Cyt *c*還元活性およびMV:NR還元活性を示し、また、NADH:NR還元活性の至適pHは8.0であった。さらに阻害剤の影響から、本酵素の活性にはSH基およびヘム鉄が関与していると考えられる。酵素学的諸性質，特にnative formおよびサブユニットの分子量から，本酵素は陸上植物等に存在するNRとは異なり、特有の構造を有していると推測される。

S713

Rma1 はリングフィンガーを持つ膜結合型ユビキチンリガーゼである

松田憲之[1]，鈴木俊顕[2]，田中啓二[2]，中野明彦[1] ([1]理研・生体膜研究室，[2]臨床研・分子腫瘍研究部門)

RMA1 は出芽酵母 *sec15* 変異を多コピーで抑圧するシロイヌナズナ遺伝子であり，その産物はN末端側に典型的なリングフィンガーモチーフを，C末端に膜結合部位を有する(1)．ヒトや線虫にも相同遺伝子が存在することから，*RMA1* は重要な役割を担っていると予想されるが，その機能は不明であった．ごく最近になって，一群のユビキチンリガーゼがリングフィンガーモチーフを持つという報告が相次いだ．そこで，Rma1p がユビキチンリガーゼ活性を有するかどうかを生化学的に検討した．精製した MBP-Rma1p にユビキチン，ATP，小麦胚芽抽出液を添加すると，見かけの分子量が顕著に増大した．アミロースレジンを用いて MBP-Rma1p を反応液から回収して調べた結果，この修飾はユビキチン化であることが示された．

興味深いことに，MBP-Rma1 のユビキチン化は ATP，ユビキチン，E1，Ubc4/UbcH5a，および MBP-Rma1p だけで再構成可能であった．また *RMA1* のヒト相同遺伝子 *HsRMA1* についても一連の実験を行い，同様の結果を得た．したがって，Rma1 ファミリーは Ubc4/5 と共に働く，広く保存された新奇膜結合型ユビキチンリガーゼであることが明らかになった．

(1) Matsuda and Nakano (1998) Plant Cell Physiol. 39, 545-554.

S714

ダイズフェリチンサブユニットの多様性と鉄貯蔵・放出能の関係

増田太郎、後藤文之、吉原利一、斉木博 （電中研・生物科学）

フェリチンは高等植物、動物、微生物など幅広い生物種に見出される鉄貯蔵タンパク質である。あらゆる生物種におけるフェリチンは24量体として存在し、その高次構造が鉄貯蔵能に大きく寄与していると考えられている。マメ科植物のフェリチンは、種子中のプラスチドに28 kDa及び26.5 kDaサブユニットの混合物として存在している。アミノ酸配列解析の結果、両者は異なる一次構造を有しており、複数のフェリチンサブユニット種の存在が示唆された。本研究では、この新規フェリチンサブユニットをコードする遺伝子を単離し、両サブユニットの機能解析を行った。その結果、26.5 kDaサブユニットではC-末端の16残基が切断されており、この切断によって24量体構造が不安定化され、内部に蓄えられた鉄原子の放出につながっていることが明らかとなった。一方、28 kDaサブユニットはこのような切断を受けず、24量体の安定化に寄与していることが明らかとなった。このことから、植物フェリチンにおいてもフェリチン遺伝子ファミリーが存在し、それぞれ相補的な役割を担っていると考えられる。

S715

シロイヌナズナのセラミド合成に関与する遺伝子の機能解析

森本泰明、田村謙太郎、西浦英樹、森潤一郎、今井博之
（甲南大・理・生物）

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド長鎖塩基（LCB）に、主として２－ヒドロキシ脂肪酸が結合したセラミドを基本骨格とする。セラミダーゼはこの LCB と脂肪酸との N－アシル結合を加水分解を触媒する酵素である。植物において、セラミド合成阻害物質の作用により、細胞内の LCB の濃度が上昇し、細胞死の誘導が促進されることから、細胞内のセラミド、および LCB の濃度をコントロールするセラミダーゼが植物細胞の生死の決定に重要と考えられる。しかしながら、セラミドの代謝調節の分子メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、酵母（*S. cerevisiae*）セラミダーゼ（YPC1p）とアミノ酸配列の相同性を有する cDNA のクローニングをシロイヌナズナより行い、その機能を調べた。

得られた cDNA クローンは 768 bp の ORF を持ち、予想されるアミノ酸配列は 255 アミノ酸残基からなり、YPC1p と 43％の相同性を示した。カルボキシル末端側には ER リテンションシグナル様の配列が見られた。また、ハイドロパシープロファイルによって、YPC1p と同様、6 つの膜貫通領域の存在が推定された。現在、この cDNA を大腸菌内で発現させ、その発現タンパクの機能の解析をすすめており、この結果も併せて報告する。

S716

シロイヌナズナにおけるスフィンゴ脂質長鎖塩基合成酵素 AtLCB2の機能解析

田村謙太郎、西浦英樹、森潤一郎、森本泰明、今井博之
（甲南大・理・生物）

セリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT; EC 2.3.1.50)は植物スフィンゴ脂質生合成の初発反応を支配しており、それ故、細胞内スフィンゴ脂質含量を決める鍵酵素であると考えられている。我々は植物におけるスフィンゴ脂質合成のメカニズムを明らかにする目的で、シロイヌナズナより、酵母SPTの触媒サブユニットLCB2ホモログであるAtLCB2 cDNAを単離し報告した（昨年度本学会）。

今回我々は、AtLCB2の発現様式の解析を試みた。組織でのAtLCB2のmRNA量をRT-PCRで調べた結果、AtLCB2はシロイヌナズナの花、茎、葉および根で同程度に発現していることがわかった。また、SPT活性を欠く酵母lcb2変異株にこのcDNAを導入すると、ミクロソーム画分にAtLCB2タンパクがターゲッティングされ、SPT活性を回復させた。AtLCB2がコードするタンパク質には数個の膜貫通ドメインあり、この実験結果と併せて考えると、AtLCB2は他の生物のLCB2同様、膜タンパクであることが予想される。そこで、より詳細にシロイヌナズナでのAtLCB2の局在を調べるために、AtLCB2のN末付近を認識できる抗体を作製した。現在、この抗体を用いた解析を行っている。

S717

シロイヌナズナのスフィンゴ脂質長鎖塩基酵素 *AtLCB1* 遺伝子のクローニング

森潤一郎、田村謙太郎、西浦英樹、森本泰明、今井博之
（甲南大・理・生物）

セリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT)は、スフィンゴ脂質生合成系の初発反応を触媒する。この反応は、セリンとパルミトイル-CoA の縮合により 3-ケトスフィンガニンを生成する反応で、補酵素としてピリドキサル 5'-リン酸を必要とする。また、SPT はスフィンゴ脂質の生合成を制御する律速段階の酵素として考えられている。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)において、SPT は少なくとも２つの遺伝子、*LCB1*、*LCB2* によってコードされている。本研究では、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)より SPT の LCB1 サブユニットをコードする遺伝子、*AtLCB1* の cDNA を単離し、機能を解析した。*AtLCB1* の cDNA は 1449bp の ORF を含み、483 アミノ酸(推定分子量 53,000)をコードし、3 つの膜貫通領域をもつことがわかった。また、AtLCB1 タンパクのアミノ酸配列と酵母の LCB1 タンパクのアミノ酸配列を比較すると、50%の相同性が見られた。RT-PCR によって各組織の mRNA 量を解析した結果、*AtLCB1* 遺伝子は、葉、茎、根、花で同程度に発現していることがわかった。現在、*AtLCB1* 遺伝子を発現させた酵母の *lcb1* 欠損株を用い、SPT 活性の解析を進めており、あわせて報告する。

S718

タバコ培養細胞BY-2アミロプラスト分化誘導系における，糖代謝に関わる遺伝子群の発現解析

宮沢豊，河野重行[1]，黒岩常祥（東大・院・理・生物科学，[1]東大・院・新領域・先端生命）

アミロプラストは，植物体が獲得した炭水化物を，根端や貯蔵組織においてデンプンとして合成・貯蔵する分化した色素体である．我々は，定常期まで生育させたタバコ培養細胞 BY-2 を，オーキシン含有培地から，オーキシン除去培地に植え継ぐことにより，細胞増殖の抑制が起こると同時に，白色体からアミロプラストが分化する系を開発し，解析を行ってきた(Sakai et al. 1992).この組織分化という情報を排除した，単純なアミロプラスト分化誘導系を用いることで，未解明の問題であるアミロプラスト分化の普遍的な機構が解明できると考えられる．

アミロプラスト分化過程で，代謝経路のどのステップに関わる遺伝子発現が，デンプン蓄積に重要であるかを調べるために，培地中のショ糖の取り込みからデンプン合成に至る各ステップに関わる遺伝子を単離し，アミロプラスト誘導・非誘導過程における発現パターンを比較した．その結果，Sucrose transporter，Sucrose synthase，Glc-6-phosphate translocator，ADP-Glc pyrophosphorylase，Granule-bound starch synthase は,分化過程で特異的にmRNA 量が増していた．一方,Invertase，Hexokinase，Phosphoglucomutase，UDP-Glc pyrophosphorylase は，アミロプラスト分化過程と非分化過程で同程度の発現を示した．このことは，アミロプラスト分化過程において細胞増殖過程とは異なるショ糖の代謝経路が活性化されていることを示唆しているものと考えられた．