

1aG01

維管束分化で働く遺伝子群の大量解析に向けたGATEWAYシステムを利用した発現・機能解析用バイナリーベクター系の開発

久保稔¹, 堀口吾朗¹, 佐々奈緒美¹, 表賢珍^{1,2}, 福田裕穂^{1,2}, 出村拓¹ (1理研・PSC, 2東大院・理)

私たちはcDNAマイクロアレイを用いることで、ヒヤクニチソウの*in vitro*管状要素分化誘導時に特異的発現を示す遺伝子群を多数同定している。今後、これら同定した遺伝子群の詳細な発現と機能を網羅的に解析するためには、発現又は機能解析用の様々なコンストラクトを効率良く作製し、植物体に形質転換し、解析することが必要である。そこで私たちは、多種類のコンストラクトを作製できるGATEWAYシステムを利用したバイナリーベクター系の作製を試みた。発現解析のためにはレポーター遺伝子 (GFP, CFP, YFP, またはGUS) 遺伝子の上流に任意のプロモーター配列を部位特異的組み換え酵素を用いて組み込むことができるGATEWAYバイナリーベクターを作製した。いくつかのプロモーターを用いて作製したGATEWAYバイナリーベクターをテストしたところ、従来のバイナリーベクターと同様に形質転換植物体でプロモーター依存的にレポーター遺伝子の発現が誘導された。また遺伝子の機能解析を行うために、過剰発現用、アンチセンスRNA発現用、細胞内局在観察用のGATEWAYバイナリーベクターも作製した。これらについても従来の方法で作製されたコンストラクトと同様に機能するか確認中である。

1aG02

ゲノム科学的手法を用いた管状要素分化特異的シロイヌナズナ遺伝子の効率的な同定

堀口吾朗¹, 久保稔¹, 佐々奈緒美¹, 福田裕穂^{1,2}, 出村拓¹ (1理研・PSC, 2東大院・理)

我々は管状要素分化に関わる遺伝子発現ネットワークを解明するために、ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞から管状要素への分化誘導系を用いたcDNAマイクロアレイ解析を行い、管状要素分化特異的遺伝子をすでに多数同定している。特に管状要素分化後期の特徴である2次細胞壁肥厚や液胞崩壊に伴う細胞内容物の分解、リグニン化が起こる時期に一過的に発現誘導を受ける遺伝子は100以上存在し、この中には細胞壁合成および分解、細胞内容物の自己分解に関わる酵素遺伝子が数多く含まれていた。これらのヒヤクニチソウ遺伝子のシロイヌナズナホモログをBLAST検索した結果、それらは多くの場合ジーンファミリーを形成していることが分かった。その中から管状要素分化特異的シロイヌナズナ遺伝子を効率的に同定するために、我々が開発したGATEWAYシステムを利用したレポーターコンストラクトを用いてそれらの推定プロモーター領域のレポーター解析を網羅的に行った。その結果、現在までに解析した25種類の遺伝子のうち、11遺伝子は未成熟な管状要素特異的に2遺伝子は維管束特異的な発現が観察された。従って、ヒヤクニチソウcDNAマイクロアレイ解析とシロイヌナズナのゲノム情報を組み合わせることで管状要素分化特異的なマーカー遺伝子を効率よく同定できることが明らかとなった。

1aG03

シロイヌナズナを用いた節部特異的ホメオボックス遺伝子 *ZeHB3* の標的遺伝子の探索

西谷千佳子¹, 佐々奈緒美², 久保稔², 出村拓², 福田裕穂^{1,2} (1東京大院・理, 2理化学研究所・植物科学研究センター)

節部は、光合成産物などを運搬する重要な組織であるが、その形成の分子機構は明らかになっていない。私達はこれまでに、ヒヤクニチソウのHD-Zip I ホメオボックス遺伝子 *ZeHB3* が未成熟な節部特異的に発現すること、*ZeHB3* タンパク質が未成熟な節部細胞の核に局在することを明らかにし、*ZeHB3* が節部形成に関与する転写制御因子であることを示した。今回は、*ZeHB3* の標的遺伝子の同定を試みた。dexamethasone により *ZeHB3* mRNA の発現を誘導できる形質転換シロイヌナズナを作成し、*ZeHB3* 発現誘導直後の遺伝子発現を調べた。8297遺伝子を対象とした *in situ* hybridization により、RNA gel blot での確認により、*ZeHB3* 発現誘導後に発現が誘導される4遺伝子を同定した。これらの上流 2.0 k bp には、HD-Zip I タンパク質の結合配列と考えられる配列が1から3箇所存在した。*in situ* hybridization により、この4つの内の3遺伝子は、野生型のシロイヌナズナにおいて節部に強く発現していることが確認された。以上から、これら3遺伝子は *ZeHB3* 様のホメオボックス遺伝子の標的遺伝子である可能性が示唆された。

1aG04

ヒヤクニチソウ管状要素分化におけるグルタチオン代謝系遺伝子群の発現解析

逸見健司¹, 出村拓², 福田裕穂³, 岩渕雅樹¹, 小川健一¹ (1岡山県生物科学総合研究所, 2理化学研究所・植物科学研究センター, 3東京大学大学院・理学系研究科)

我々はこれまでの解析により、ヒヤクニチソウ管状要素の分化にはグルタチオンの *de novo* 合成およびグルタチオンによるレドックス状態の変化が必要であることを見出した。葉肉細胞から管状要素への分化メカニズムにおいてレドックス状態の変化が遺伝子発現レベルでどのように制御されているのかを明らかにするために、ヒヤクニチソウからグルタチオン代謝系酵素遺伝子群を単離し、それらの発現消長を解析した。PCRクローニング法によって得たcDNAから予想されるアミノ酸配列はそれぞれ他の植物のγ-グルタミルシステインシンターゼ (γ-ECS)、グルタチオンシンターゼ (GS)、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR)、グルタチオンレダクターゼ (GR) と高い同一性を有し、それぞれに特徴的なドメインも保存されていた。RT-PCR法により分化期間中のこれらの遺伝子発現を分化誘導しない条件と比較した結果、γ-ECS、GSおよびGR遺伝子の発現にほとんど変化は見られなかったのに対して、48および60時間後においてDHAR遺伝子の発現が上昇していた。これは分化前の時期に細胞内でGSSGが蓄積していることを示したこれまでの結果を支持していた。

1aG05

維管束に発現するヒヤクニチソウHD-Zip型クラスIII
ホメオボックス遺伝子*ZeHB10, -11, -12*の機能解析
伊藤 (大橋) 恭子¹, 福田裕穂^{1,2} (¹東京大・院・理・
生物科学, ²理研・植物科学研究センター)

陸上植物に必須な組織である維管束の分化の分子機構
の詳細は明らかになっていない。そこで、私達はその分
子機構に迫ることを目的にHD-ZIP型クラスIIIホメオ
ボックス遺伝子に着目し解析を行っている。これまでに
ヒヤクニチソウのHD-ZIP型クラスIIIホメオボックス遺
伝子*ZeHB10, 11, 12*を単離し、*ZeHB10, 11, 12*は*in vitro* 木部
細胞分化系において分化特異的に、また植物体において
維管束に発現することを明らかにした。また、*ZeHB10, 11, 12*
は木部分化に必須なブラシノステロイドにより発現誘導
を受けることがわかった。これらの結果から、*ZeHB10, 11, 12*
は維管束の分化に重要な機能を果た
していると考えられた。そこで*ZeHB10, 11, 12*の機能を解析
するために、各遺伝子とSTARTドメインにアミノ酸置換
を施したconstitutive active型と考えられる遺伝子 (CA型)
をシロイヌナズナに導入し、それらの過剰発現体を作成
した。その結果、*ZeHB10*-CA型のT1植物体ではロゼッ
ト葉が表側を内向きにカールする表現型がみられ、より
強い表現型を示す個体では花芽形成がみられなかった。
ZeHB12-CA型では2枚のロゼット葉が融合したような葉
をもつ表現型が観察された。現在T2植物体の維管束パ
ターンを解析中であり、この結果を併せて*ZeHB10, 11, 12*
の機能を議論したい。

1aG06

シロイヌナズナ *ESR1* のシュート形成における機能
坂野弘美¹, Nam-Hai Chua (¹中部大・応用生物,
²Laboratory of Plant Molecular Biology, Rockefeller Univ.)

我々はシロイヌナズナの根にcDNA発現ライブラリー
を形質転換し、過剰発現により、サイトカイニン非存在
下でシュート形成を誘導するシロイヌナズナのcDNAを
スクリーニングした。その結果、サイトカイニン非存在
下でシュート形成能を与えるcDNA, *ESR1*を単離した。
誘導可能プロモータによる*ESR1*の一過剰な過剰発現
は、サイトカイニン存在下では、シュート形成の効率を
約6倍上昇させた。*ESR1*遺伝子は、植物組織をシュート
誘導培地で培養することにより、一過剰に発現する。
*ESR1*の定常的な過剰発現は、シュート形成の開始を誘
導するものの、その後の正常なシュートへの分化は阻害
し、濃緑色のカルスを形成させた。シュート誘導培地は
植物ホルモンのサイトカイニンを含んでおり、このサイ
トカイニンがシュートを誘導する主な因子である。実
際、サイトカイニン単独でも*ESR1*の発現の誘導する。
*ESR1*はサイトカイニンのシグナルにから、不定芽形成
に至るシグナル伝達に関わっていると推定される。
*ESR1*はAP2/EREBPファミリーに属する転写制御因子を
コードしており、下流の遺伝子の発現制御により、
シュート形成を誘導すると考えられる。

1aG07

根端のトランスファーセルのプロトプラストとしての
単離
野村港二¹ (¹筑波大学・農林)

トランスファーセルは、アポプラストとシンプラスト
の間での輸送を司る細胞として、植物体内の様々な部位
に存在する。フォランスファーセルには、細胞内部に向
かって複雑に入り組む細胞壁を持つと言う形態的特徴
と、その細胞膜に高いプロトンATPase活性が存在する
という生理学的な特徴が存在する。輸送に重要な役割を
持ち、細胞としても際立った特徴を持つトランスファー
セルであるが、その分化の過程についてはまだ明らかで
ない部分が多く残っている。さらに、細胞壁にそって複
雑に入り組んだ細胞膜が通常の植物細胞の細胞膜とは異
なり、浸透圧や塩類、場合によっては界面活性剤に対
しても抵抗性を持つことは知られていても、なぜ、その
ような特徴を有するのは明らかにされていない。そこで、
そのような点を解明するための第一歩として、トランス
ファーセルをプロトプラストとして大量に得ることを試
みた。

ヒマワリ (*Helianthus annuus*) の根を器官培養し、鉄
欠乏処理によって根端にトランスファーセルを誘導し
た。そのような根からプロトプラストを調製し、浸透圧
ショックと密度勾配遠心、篩による濾過を組み合わせる
ことで、分化の時期のそろったトランスファーセルをプ
ロトプラストとして得ることができたので報告する。

1aG08

ネナシカズラの寄生根分化過程における*KNOX*遺伝子
の発現

関原康子¹, 佐野常世¹, 古橋勝久², 山田恭司¹, 若杉
達也¹ (¹富山大・理, ²名産大・環境情報)

寄生植物であるネナシカズラは、他の植物に寄生する
ために、寄生根と呼ばれる吸収器官を形成する。ネナシ
カズラ寄生根の分化は、茎の特定部位の皮層細胞が分裂
を開始し、一過剰な分裂組織を形成することから始まる。
そして、その後、組織の急激な伸長と宿主への侵入が起
き、分化が完了する。我々は、ネナシカズラ芽生えに寄
生根を同調的に誘導させる系を開発し、寄生根分化に関
わる遺伝子について研究を行っている。本研究では、
ホメオボックス遺伝子である*KNOX*遺伝子の寄生根形成
過程における発現パターンについて解析した。

まず、2種類の*KNOX*遺伝子のcDNAを、ネナシカズラ
芽生えからクローン化し、寄生根分化・形成過程におけ
る発現を転写レベルで調べた。*CKN1* (クラス1 *KNOX*)
は、寄生根誘導後8-24hrにかけて発現レベルが高かった
が、この時期は寄生根分裂組織が出現する時期にあたる。
CKN2 (クラス2 *KNOX*)は、寄生根誘導後24-48hr
にかけて発現が高かったが、この時期は寄生根が急速に
伸長する時期にあたる。この結果から、*KNOX*クラス1
ファミリーのホメオボックス遺伝子が、ネナシカズラの
寄生根分裂組織の形成開始に関与していると考えられ
た。最近、新たに3種類のクラス1 *KNOX*遺伝子のcDNA
を単離したので、これらの寄生根分化・形成過程におけ
る発現様式についても合わせて報告する。

1aG09

シロイヌナズナにおけるアラビノガラクトタンパク質 (AGP) 遺伝子群の発現および機能解析

荒関淳¹, 末永冨子¹, 宮腰聡¹, 小泉好司¹, 武長宏¹, 坂田洋一¹, 田中重雄¹ (¹東京農大・応用生物)

アラビノガラクトタンパク質 (arabinogalactan protein; AGP) は植物に広く存在するプロテオグリカンの一種である。AGPの機能としては、植物細胞の分化、発達、細胞間相互作用への関与が示唆されているが、未だ不明な点が多い。

本研究では AGP の機能を明らかにするため、18 種のシロイヌナズナ AGP 遺伝子群 (*AtAGP*) の発現部位をノザン解析により調べた結果、個々の *AtAGP* 遺伝子は異なる時間的、空間的制御を受け発現していることが明らかとなった。

AGP 遺伝子群の1つである *AtAGP8* は AGP 領域に加えて、接着分子様ドメインであるファシクリンドメインを有するという特徴をもつ。シロイヌナズナゲノム中には *AtFLA8* と同様の構造をもつ遺伝子群17種の存在が報告されており、最近になってこれら遺伝子群は FLA (fasciclin like AGP) と命名された。ファシクリンを有するタンパク質の植物における機能としてはボルボックスの胚発生に必須な細胞接着因子として報告されているのみであり、高等植物における機能は未知である。我々は *AtFLA8*, *AtFLA10* 両遺伝子について詳細なノザン解析を行った結果、両遺伝子は長角果が形成時に強く発現していることがわかった。現在、*in situ* hybridization ならびに *pFLA::GFP* コンストラクトにより胚発生過程における遺伝子発現部位の詳細な検討を行うとともに、過剰発現体を作成し機能解析を進めている。

1aG10

植物ホルモンによるリグニン前駆体の分泌の制御について

伊藤康子¹, 佐藤康², 福田裕穂¹ (¹東京大院・理・生物科学, ²愛媛大・理・生物地球)

ヒヤクニチソウ培養系では、オーキシシンとサイトカイニンの存在下で単離葉肉細胞から管状要素と木部柔細胞様細胞が同時に再分化する。そして管状要素分化に特徴的な二次壁のリグニン化に伴い、リグニンの前駆体は管状要素と木部柔細胞様細胞の両方により培地中に分泌され蓄積することが報告されている。

そこで、管状要素分化に影響を与える植物ホルモンが、培地中のリグニン前駆体の蓄積にどのような影響を与えるかどうかを調べた。様々なホルモン条件下で培養した培地からセップバック C18 カラムで疎水性物質を濃縮し、HPLC で組成を解析した。その結果、ベンジルアデニン濃度を通常の 1/200 に下げると管状要素分化がほとんど起こらず、リグニン前駆体の蓄積も見られなかった。一方で、ブラシノステロイドの合成阻害剤としてウニコナゾールを添加して培養すると、管状要素分化は抑制されたが、リグニン前駆体の蓄積は起こった。

このように、内生ブラシノステロイド合成を阻害することで管状要素の分化を抑えてもリグニン前駆体の分泌には影響がでなかった。リグニン前駆体の分泌は管状要素以外に木部柔細胞様細胞も行っているため、内生ブラシノステロイド合成を阻害した時にリグニン前駆体を分泌していたのは、木部柔細胞様細胞であると考えられた。このことから、木部柔細胞様細胞はブラシノステロイドを必要としないメカニズムで制御されると予想された。

1aG11

HALTED ROOT (HLR) Gene Encoding 26S Proteasome Subunit 4 Maintains Root Apical Meristems

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

Root apical meristems (RAMs) control root growth through balanced cell division and differentiation. Although normal root growth requires maintenance of RAM activity, little is known about this maintenance machinery.

We isolated an *Arabidopsis* mutant, *halted root (hlr)*, which exhibits aberrant post-embryonic root growth. We analyzed changes of RAM activity through the root growth using various marker genes. In *hlr*, normal RAM structure established during embryogenesis was disturbed within 1.5 days. Subsequently, *hlr* RAM exhibited auxin accumulation and decreased cell division activity. These results suggest that *hlr* RAM fails to regulate cell division and/or differentiation immediately after germination.

We have cloned the *HLR* gene and have found it encodes a homologue of proteasome subunit 4 isolated from yeast. Proteasome is a huge complex degrading poly-ubiquitinated proteins in various intracellular pathways.

Our data suggest that protein degradation via proteasome might be essential to regulate the meristematic cell division and/or differentiation in RAM.

1aG12

Expression Analyses of the *RBE* Gene

武田征士¹, 松本任孝¹, 岡田清孝¹ (¹京大院・理)

Analyses of the *rabbit ears (rbe)* mutant revealed defects in the formation of petals. The defects were observed more frequently in the adaxial petals than in the abaxial ones. We showed that *RBE* encodes a zinc finger protein.

We analyzed expression of *RBE* using several methods. Transient expression of *RBE::GFP* in onion epidermal cells showed the nuclear localization of the fusion protein, suggesting *RBE* is a transcriptional factor. By *in situ* hybridization and transformants carrying *RBEpromoter::GFP*, we found *RBE* was expressed in four petal-presumptive areas of flowers, suggesting that *RBE* is involved in initiation and development of petal primordia.

Analysis of the distribution of *RBE* is in progress using fusion protein of *RBE* and GFP. To investigate *RBE* function, we generated a gain of function mutant of *RBE*. The distribution of *RBE* and the phenotypes of the transformants will be presented.

1aG13

トレンニア再生系の紅葉誘導におけるアブシジン酸の解析

柳楽洋三¹, 池上啓一², 小柴共一², 小関良宏¹ (農工大・工・生命,²都立大・理・生物科学)

植物の葉が様々な色に変化する紅葉は我々にとって非常に身近な現象でその研究は古くから行なわれているが、温度、光、水分などの外的要因が絡みあっていること、植物体を用いて紅葉を誘導する実験系が未だ確立されていないことからその機構や要因についてはほとんど解明されていない。

当研究室において、トレンニア (*Torenia fournieri* Lind) をトランスジェニック植物のモデルとして、花における様々な遺伝子の発現制御を調べてきた。そこにおいて、トレンニアのリーフ・ディスクからのシュート再生において、高濃度のショ糖を含む培地に移植することによって、紅葉を誘導するモデル実験系を確立した。またその系において、低濃度のショ糖を含む培地においてもアブシジン酸 (ABA) が紅葉を誘導することを示した。そこで紅葉誘導 (アントシアニン合成) と ABA の相互関係を明らかにするために紅葉誘導過程における再生シュート内の内生 ABA 量の定量を行った。さらに、ABA の添加及び除去が紅葉に与える影響などの検討を行った。その結果、アントシアニン合成が誘導される前に内生 ABA 濃度の一過的上昇が見られ、これが紅葉に重要な役割を果たしている事が予想された。

1aH01

ABA 類似化合物を用いた ABA 関連突然変異体の単離
西村宜之¹, 宇賀神勉¹, 村山真紀¹, 浅見忠男², 篠崎一雄³, 平山隆志^{1,3} (横浜市大院・総合理学,²理研・植物機能,³理研・植物分子)

アブシジン酸 (ABA) は種子の成熟から環境ストレス応答やその耐性の獲得など多岐にわたり機能する。しかし、ABA 情報伝達経路およびその制御機構は依然として不明な点が多い。本研究では、遺伝学的手法を用い、ABA 情報伝達経路に関わる因子の同定を目的とし、ブラシカにおいて ABA 結合阻害剤として報告されていた ABA 類似化合物 PBI-51 (以後 ARI と呼ぶ) (Wilenski et al. Plant Physiol 101 469-476, 1993) を用い、突然変異体の探索を行った。

シロイヌナズナより、野生型では発芽可能な $20 \mu\text{M}$ ARI 存在下で発芽が遅延する変異体を探索し、最終的に独立した 8 個の *air* 変異体 (ABA inhibitor responsive) が得られた。これらの変異体は $0.3 \mu\text{M}$ ABA 存在下でも発芽しないことから、ABA 高感受性変異体であると考えられる。現在までの解析で、これらは既に報告されている ABA 高感受性変異 *eral* または *ein2* ではないことが判明しており、新たな ABA 高感受性変異と期待できる。現在、これらの変異のマッピングを試みている。

1aH02

新規 ABA 非感受性変異体 *slh1* の解析

能年義輝¹, 伊藤卓也¹, 保浦徳昇¹, 篠崎一雄¹ (理研筑波・植物分子)

アブシジン酸 (ABA) は、種子成熟過程での貯蔵タンパク質や脂質の合成・休眠性と乾燥耐性の獲得、気孔の開鎖、乾燥・塩・低温等の環境ストレスへの応答といった生理現象に重要な役割を果たしている。我々は、ABA シグナル伝達機構の解明を目的として、シロイヌナズナのトランスポゾンDs挿入ラインを利用したスクリーニングを行っており、乾燥に弱い表現型を示す変異体 *slh1* (sensitive to low humidity 1) を取得した。*slh1* はプレート上で生育させた幼植物体を土に移植すると、生長が止まり枯死してしまった。また直接土に播種した場合には、本葉が小さく萎れた暗緑色になり、矮化した植物体となった。*slh1* は、高い湿度条件では生長し種子を得ることができたが、ABA 噴霧では表現型は回復しなかった。*slh1* 種子は、冷却処理なしで播種した場合にも即座に発芽し、種子休眠性を欠如していることが明らかとなった。また、ABA または NaCl を添加したプレート培地での発芽試験を行ったところ、ABA、NaCl に対して非感受性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、*slh1* は、ABA シグナル伝達経路に異常を示す変異体であることがわかった。現在原因遺伝子の特定を進めている。また、スクリーニングから得られた別の変異体についても紹介する。

1aH03

トマトのアブシジン酸 (ABA) 欠損変異体 *sitiens* におけるシロイヌナズナのアルデヒド酸化酵素遺伝子 *AAO3* 導入による表現型の回復

岡本昌憲¹, Min Xiangjia², 瀬尾光範¹, 中林一美³, 神谷勇治³, 南原英司³, 小柴共一¹ (都立大・院・理,²Department of Forest Science, University of British Columbia,³理研・植物センター)

トマトのアブシジン酸 (ABA) 欠損変異体 *sitiens* は、生化学的な解析からアブシジンアルデヒド (ABAld) の酸化に働くアルデヒド酸化酵素 (AO) の構造遺伝子に欠陥を持つ変異体であると考えられているが、未だ原因遺伝子は単離されていない。シロイヌナズナでは、4 種の AO 遺伝子 (*AAO1-4*) が存在し、そのうちの *AAO3* が ABAld を特異的に酸化し ABA を生成することが明らかになっている。そこで、*AAO3* を *sitiens* へ導入し、*sitiens* がトマトの AO 遺伝子に関する変異であるか否かを検討した。*sitiens* は、蒸散が激しく成長が悪いため、野生型と比較して小さいが、*AAO3* の導入により、それらの形態や蒸散速度が回復した。これらの植物体では *AAO3* による ABAld の酸化活性が確認され、さらに内生 ABA 量も野生型と同等に回復した。以上の結果から、*sitiens* が AO 遺伝子に欠陥をもつ突然変異体であることが示唆された。トマトでは、現在 3 種の AO cDNA (*TAO1*, *TAO2*, *TAO3*) が単離されている。今後、どの *TAO* が ABA 生合成に関与しているかを探っていく予定である。

1aH04

ABA情報伝達系で働くシロイヌナズナMYC及びMYB
相同性タンパク質の解析

安部洋^{1,3}, 浦尾剛¹, 伊藤卓也², 関原明², 篠崎一雄²,
篠崎和子¹ (¹国際農林水産業研究センター, ²理化学
研究所, ³科学技術振興事業団)

乾燥ストレスによる遺伝子発現調節機構を明らかにす
るため、シロイヌナズナの乾燥誘導性遺伝子rd22遺伝子
の転写調節機構について研究を行っている。rd22遺伝子
は乾燥ストレスによって増加した植物ホルモンのアブシ
ジン酸(ABA)を介して誘導される。rd22遺伝子のプロ
モーターにはABA Responsive Element (ABRE)が存在せず
MYC認識配列及びMYB認識配列がABAを介した乾燥応
答性のシスエレメントとして働いている事を明らかにし
た。また、これらのシス配列に結合するMYC相同性因子
AtMYC2 (rd22BP1)とMYB相同性因子AtMYB2を単離し
た。またAtMYC2及びAtMYB2は共にrd22遺伝子の乾燥
応答性のシス領域を介した転写活性化能を有している事
を明らかにしてきた。今回我々は、AtMYC2 及び
AtMYB2を過剰発現させた形質転換植物がABAに対する
感受性が増すこと、rd22遺伝子が過剰に発現すること
を明らかにした。更にrd22BP1 遺伝子破壊植物ではABAに
対する感受性が減少し、rd22遺伝子の発現が減少した。
マイクロアレイ解析結果も含めこれら遺伝子産物のABA
情報伝達系における役割について考察する。

1aH05

シロイヌナズナABA2はキサントキシンからアブシジ
ンアルデヒドへの変換を触媒する新規のShort-chain
dehydrogenase/reductaseである

遠藤亮¹, 瀬尾光範¹, Wan-Hsing Cheng², Jen Sheen³, 小
柴共一¹ (¹都立大院・理・生物, ²Institute of Botany,
Academia Sinica, ³Dept. of Molecular Biology, Massachusetts
General Hospital)

シロイヌナズナのABA欠損 $aba2$ 変異体はキサントキシ
ンからアブシジンアルデヒドへの変換反応に欠陥を持つ
と考えられている。しかしながらこの原因遺伝子は単離
されておらず、この反応に関与する酵素の実体、またそ
の性質等は明らかにされていなかった。

染色体歩行により ABA2 遺伝子の同定に成功した。
ABA2は285アミノ酸から成る約30kDaのペプチドをコー
ドしており、相同性検索の結果、short-chain dehydroge
nase/reductase (SDR) ファミリーに属する酵素であること
が予想された。ABA2 mRNAは、根、茎また葉柄で発現
が高く、promoter::GUS遺伝子導入植物では維管束組織で
高いGUS活性が検出された。これに続き、酵母 (*Pichia
pastoris*) の蛋白質発現系を用いてABA2蛋白質の発現を
行った。ヒスチジンタグを利用して精製したタンパク質
は、HPLC、GC-MSを用いた解析により、ABA2蛋白質
はキサントキシンを基質として用い、アブシジンアルデ
ヒドを生成する活性を有することが明らかにされた。こ
の活性には補酵素としてNADを必要とすることも分かっ
た。これらの結果は、ABA2蛋白質は、ABA合成経路
においてキサントキシンからアブシジンアルデヒドへ
の変換反応を触媒する新規のSDRファミリーに属する酵素
であることが明らかにされた。

1aH06

ジベレリンの一本鎖抗体を発現するイネ形質転換体
の作成と解析

田中洋子¹, 福田あかり¹, 永井靖二¹, 鈴木義人¹, 山
口五十磨¹, 藤原徹^{1,2}, 米山忠克¹, 林浩昭¹ (¹東京大
院・農, ²PRESTO JST)

植物ホルモンの一つであるジベレリン(GA)は、高等
植物の伸長生長に深く関与していることが知られてい
る。GA19およびGA24は、活性型GAであるGA1および
GA4の生合成前駆体であり、それ自体は活性を持たな
い。ジベレリンの植物体内での機能解析を目的として、
GA19, GA24を認識する抗GA24抗体を発現するイネの形
質転換体を作成した。この手法では、これらの前駆体
GAが抗体により捕捉されることにより、活性型GAの量
を減少させることができると考えられる。植物で発現さ
せた抗体は一本鎖抗体であり、epitope tagとしてc-mycを
有している。細胞内での局在を変化させるためにシグナ
ルペプチドやER retention signal (KDEL)を付加したもの
も作成しイネネオレドキシnhプロモータに接続した。
これらの遺伝子をイネに導入し、それぞれに10数株の形
質転換植物を作成した。シグナルペプチドとKDELを持
つ抗体はマイクロゾーム画分で検出された。いずれの遺
伝子の場合にも、得られた独立な形質転換体の多くで、
野生型に対して有意な背丈の低下傾向が見られた。一
方、抗体の代わりにGFPを発現する形質転換植物では矮
化は観察されなかった。Fvこれらの結果は、イネにおい
て抗GA24抗体が活性型GAを低下させ、細胞伸長を低下
させたことを示唆している。

1aH07

春化处理したトルコギキョウの抽だいにおけるグル
タチオン生合成の調節の関与

柳田元継¹, 三野真布¹, 岩渕雅樹¹, 小川健一¹ (¹岡山
県生物科学総合研究所 (RIBS))

トルコギキョウの抽だいは春化处理 (15°C) により促
進される。我々はこの影響が還元型グルタチオン
(GSH) の存在下でさらに促進され、逆にGSH生合成阻
害剤のbuthionine sulfoximineの存在下で抑制されることを
報告した。今回、我々は春化处理を行わなかった場合
においても抽だいがGSH、あるいは酸化型グルタチオンに
よって促進されることを明らかにした。これらの結果は
植物の抽だい過程にはGSH生合成が必要であることを示
唆する。そこで我々は春化处理した植物におけるGSH代謝
系について調べた。まず、GSH生合成の第一段階を触媒
する酵素の γ -グルタミルシステインシテターゼ
(γ ECS) 活性は、15°Cに移植された植物において上昇
した。この高活性は3日間維持され、その後、無処理区
のレベルまで減少した。これは春化处理した植物のGSH
量の変化のパターンと一致した。一方、GSH生合成の中
間体のシステインと γ -グルタミルシステインの量は、
春化处理したにも関わらず、ほとんど一定であることが
明らかになった。以上より、 γ ECSの活性の上昇が、春
化处理されたトルコギキョウの抽だいのためのGSH合成
の重要な段階であることが示された。

1aH08

Isolation and Identification of Allelopathic Substance in Rice Root Exudates

Takeshi Ino¹, Noriko Sata², Shosuke Yamamura², Hisashi Kato¹
(¹Faculty of Agriculture, Kagawa University, ²Faculty of Science and Technology, Keio University)

Since there has so far been reported few studies that the identification of allelochemicals released from living rice to the environment, a search for growth inhibitors in rice root exudates was undertaken. Rice (*Oryza sativa* L.) seedlings inhibited the growth of cress, lettuce and alfalfa seedlings when they were grown with the rice seedlings. An active principal of the inhibitory effect of the rice seedlings was isolated from their culture solution by column chromatography, C₁₈ Sep Pack cartridge and HPLC, and the chemical structure of the inhibitor was determined by spectral data of high-resolution MS and ¹H- and ¹³C-NMR as momilactone B. The concentration of momilactone B was 3.4 nmol per seedling in the culture solution of husked rice seedlings.

1aH09

Isolation and Identification of Allelopathic Substance from Yuzu

Yukitoshi Tanaka¹, Toshifumi Murakami², Shinsuke Fujihara³, Shosuke Yamamura⁴, Hisashi Kato¹; ¹Faculty of Agriculture, Kagawa Univ., ²National Agricultural Research Center for Western Region, ³National Agricultural Research Center, ⁴Faculty of Science and Technology, Keio Univ.

In a series of trials for searching useful substances in wastes from food processing industry, we had found that yuzu (*Citrus junos* Tanaka) peel possess potent allelopathic potential and the powder of the peel can work as weed inhibiting agents. In the present experiment, yuzu peel was extracted with aqueous methanol and an active principal of the inhibitory effect was isolated by column chromatography, C₁₈ Sep Pack cartridge and HPLC. Its spectral data of high-resolution MS and ¹H- and ¹³C-NMR indicate that the chemical structure is abscisic acid-β-D-glucosyl ester.

1aH10

Octa-Galacturonide is the Most Active Oligomer for Cockscomb (*Celosia argentea* L.) Growth

鈴木利貞¹, 富田-横谷香織², 高瀬洋一³, 吉田滋樹², 日下部功², 長谷川宏司² (¹筑波大・院・農, ²筑波大・応生化, ³昭和薬・中央機器)

A mixture of oligogalacturonic acids, the partial degradation substances of polygalacturonic acid, promoted the shoot growth of cockscomb (*Celosia argentea* L.) seedlings. The effect of the mixture of oligogalacturonic acids on the shoot growth of cockscomb was higher than that of the polygalacturonic acid at concentrations higher than 30 ppm. These oligomers were loaded onto an anion exchange column. They were separated into different oligomer sizes using the NH₄HCO₃ eluent system. Each of the isolated oligogalacturonic acids gave a single band on a fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis (FACE), and they showed the *m/z* value which corresponded to their molecular ion peaks [M-H]⁻ on a FAB-MS analysis. Furthermore, we proved that the most effective degree polymerization (DP) of oligogalacturonic acid was 8 on the shoot growth of cockscomb seedlings, and the effects of both smaller and larger oligogalacturonic acids were slightly lower than that of octa-galacturonide.

1aH11

Allelopathy at the Early Seedling Development Stage in *Arabidopsis thaliana*

富田-横谷香織¹, 後藤伸治², 鈴木利貞³, 吉田滋樹¹, 小瀬村誠治⁴, 日下部功¹, 長谷川宏司¹ (¹筑波大・応生化, ²宮城教育大・生物, ³筑波大・院・農, ⁴慶應大・日義キャンパス)

We have been investigating the allelopathic substances in *Arabidopsis thaliana*. The plant is a model plant and it is useful for allelopathy-diversity study. We first tried to investigate the allelopathy of early development stage in *Arabidopsis* seeds because there have not been any reports in allelopathy study on the different development stage of the plant life cycles. In this study, we studied the changes of plant growth-promoting and -inhibiting effects to other plant species as allelopathy in *Arabidopsis* during seed germination. We have already confirmed the occurrence of some growth-promoting substances in the exudates of the plant seeds. The substances were found to be acid polysaccharides included galacturonic acid and rhamnose. The high amount of the substances were confirmed at the first stage of the seed germination process. The details of the substance and the function as allelopathy are in progress.

1aH12

Function And Occurrence Of Allelopathic Substance, Sundiversifolide, During The Early Germinating Stage Of Sunflower (*Helianthus Annuus*) Seeds

加藤貴子¹, 富田-横谷香織², 鈴木利貞³, 小瀬村誠治⁴, 大野修二⁵, 長谷川宏司² (¹筑波大院・生命環境科学, ²筑波大・応生化, ³筑波大院・農, ⁴慶應大・日吉キャンパス, ⁵筑波大院・バイオシステム)

It has been reported that germinating sunflower seeds have a species-selective allelopathic function, and a new allelopathic substance, 4,15-dinor-3-hydroxy-1(5)-xanthene-12,8-olide (sundiversifolide), was isolated and identified from the exudates of germinating sunflower seeds (Ohno, Tomita-Yokotani *et al.* 2001).

The exudates from sunflower seeds cultured for 1 day show a strong stimulating activity in the cat's-eyes growth test, but since then the activity becomes weak, gradually. It has been confirmed the existence of sundiversifolide in the exudates of sunflower seeds, but there is no information about relationship between the substance released from sunflower seeds and endogenous one during seed germinating development stage.

In this study, we investigated the existence of endogenous sundiversifolide in sunflower seeds and seedlings, and considered the function and relationship between the endogenous one and allelopathic activity during this stage.

1aI01

光化学系I核遺伝子におけるコアプロモーターと上流調節領域との選択性

中邨真之¹, Gerit Weinzierl², Irena Sherameti², 日比野浩之¹, Ralf Oelmueller², 小保方潤一¹ (¹名大・遺伝子, ²Inst. Allgemeine Botanik, Friedrich-Schiller-Univ.)

真核生物遺伝子のコアプロモーターは、TATAボックスとイニシエーター (Inr) の有無により (I) TATA+/Inr+, (II) TATA+/Inr-, (III) TATA-/Inr+, (IV) TATA-/Inr-, の4種に分類できるが、このようなコアプロモーター構造の多様性が持つ生理学的意味については未だよくわかっていない。我々は核コード光合成遺伝子の多くがTATAボックス欠損型のコアプロモーターを持つことを見出した。また (III) 型コアプロモーターを持つタバコ光化学系I遺伝子*psaDb*の上流光応答領域は、イニシエーターの存在する (I) 及び (III) 型コアプロモーターの転写を活性化するが、イニシエーターのない (II)・(IV) 型コアプロモーターには作用しないことを発見した。これらの知見は、上流調節領域とコアプロモーター構造との間に選択性があることを植物遺伝子で初めて明らかにしたものである。本研究では、TATAボックスやイニシエーターのない (IV) 型遺伝子でも上流調節領域とコアプロモーター領域の間に選択性が見られるかどうかについて、シロイヌナズナ光化学系I遺伝子を用いて解析した。

1aI02

植物光合成核遺伝子にみられる転写開始点選択機構の解析

吉次友昭¹, 長谷川桂子¹, 湯川泰², 小保方潤一¹ (¹名古屋大・遺伝子, ²名市大・システム自然科学)

コアプロモーターは真核生物遺伝子の基本転写に必須なDNA上の領域であり、そこに含まれるTATAボックスやイニシエーター配列 (Inr) 等のシス因子の働きによって転写開始点の位置が決定されると考えられている。しかし演者らは、植物の光合成核遺伝子群ではこのようなシス因子を持たないプロモーターのほうが一般的であることを見いだした。その様な遺伝子群では、多数の転写開始点が数十塩基の範囲に散らばって出現する傾向があるが、この場合、転写開始点がどの様なシグナルに基づいて選ばれるのかはよくわかっていない。本研究では、植物由来の*in vitro*転写系を使って転写開始点となる塩基が選択されるルールを解析した。まず20塩基ほどの範囲に転写開始点が出るように設計した鋳型DNAを作製し、次いでその領域にInrをはじめとする様々な塩基配列を導入した。その結果、Inrを導入した場合では、転写開始点はその中の一カ所に集中したが、2塩基の繰り返し配列を導入した場合は転写開始点は2塩基毎の周期で出現し、単一塩基のホモポリマーでは転写開始は殆ど観察されなかった。これらの結果を基に、光合成核遺伝子群でみられる転写開始シグナルの多様性について考察したい。

1aI03

トランジェントアッセイシステムを用いたタバコ培養細胞におけるプラスチド*accD*遺伝子の発現解析
米倉大造¹, 平田徳宏¹, 柳澤修一², 射場厚¹ (¹九大・院・理・生物科学, ²東大・総合文化)

プラスチド*accD*遺伝子は脂肪酸合成の初期段階を触媒するアセチルCoAカルボキシラーゼをコードする遺伝子である。*in vitro*転写実験により*accD*遺伝子は、Nuclear-Encoded Plastid RNA Polymerase (NEP) によって転写されていることが明らかとなっている。しかし、*accD*遺伝子の発現機構の詳細は解明されていない。本研究では、NEPによるプラスチド遺伝子の転写機構を解明するために、パーティクルガンを用いたトランジェントアッセイシステムを用いて、*accD*遺伝子のプロモーターを含む5'隣接領域と5'UTRの解析を行なった。*accD*遺伝子の5'隣接領域に部分的な欠失・置換を導入した解析で、発現に必要な幾つかの領域が明らかとなった。例えば、プロモーターの-66から-4には、*accD*遺伝子発現に必要な2つのAT-richエレメントが存在していた。そのAT-richエレメントの1つには、他のNEPプロモーターで見出されたYATAモチーフが-9から-4にTATATAとして存在していた。また、RT-PCR法を用いた解析では、*accD*遺伝子の5'UTRには自らの転写活性に影響を与える領域の存在することが明らかとなった。

1aI04

パーティクルガンにより導入した遺伝子のスプライシング産物の検出

三井路子¹, 室橋好子¹, 浅野義人¹, 政田正弘², 児玉浩明² (¹千葉大院・自然科学, ²千葉大・園芸)

環境の変化や異なる組織間でスプライシングパターンが変化する遺伝子が存在する。このような遺伝子の発現調節を調べるには、発現調節を受けるイントロンが関与するスプライシングを簡便にモニターできる方法が必要である。パーティクルガン法では、プロトプラストを調製することなく、組織もしくは細胞に直接遺伝子を導入できる。そこでイントロンを含むコンストラクトを導入し、一過的に発現する転写産物をRT-PCRにより検出することにより、スプライシングがモニターできるかどうか検討した。導入に用いるプラスミドの調製にあたっては、DNAのメチル化の影響、および大腸菌に由来するエンドトキシンの影響を検討したが、どちらも導入遺伝子の発現には大きな影響を与えなかった。タバコの直径1.9cmのリーフディスクに、190bp、もしくは546bpのイントロンを含むGUSレポーター遺伝子を導入し、一過的に発現する転写産物を検出したところ、スプライシングされた転写産物を検出できた。この際、葉組織の前培養は必要ではなく、遺伝子導入後、3から6時間の培養で、導入遺伝子に由来する転写産物を検出できた。この方法は、alternative splicingの研究を行うにあたって有効な方法であると思われる。

1aI05

シロイヌナズナおよびイネ tRNA 遺伝子のハイスループット転写解析

湯川泰¹, 近藤鋭治², 木下邦則², 續伯彦³, 杉浦昌弘¹ (¹名市大・システム自然科学, ²CTI (株), ³愛知学院大・情報社会政策)

核における遺伝子からの転写は Pol I, Pol II, Pol III の3つのポリメラーゼによって行われる。その中で、低分子安定 RNA は主に Pol III で転写されるが、tRNA はその代表例である。しかし、植物では Pol III の研究が極めて少なく、その分子機構はまだ不明な点が多い。一方、シロイヌナズナおよびイネのゲノムデータ中には大量の tRNA 遺伝子が推定されており、これらをハイスループットな方法で包括的に転写解析することができれば、転写できない偽遺伝子や Pol III プロモーターの特徴を把握できる。そこで、タバコ由来の *in vitro* 転写系を使って、tRNA 遺伝子の大量解析を可能とする手法を考案した。ゲノムデータを元に、PCRで tRNA 遺伝子を含んだ DNA 断片を増幅し、それを転写鋳型として用いてタバコの転写装置で RNA を合成した。反応系に工夫を加えることによって十分な検出感度を得ることができるようになり、Pol III プロモーターの強さを比較することが可能になった。

1aI06

形質転換アラビドプシスを用いた tRNA スプライシング・エンドヌクレアーゼの機能解析

赤間一仁¹, Hildburg Beier² (¹島根大・生物資源科学, ²ヴェルツブルグ大・生化学研究所 (独))

イントロンを含む前駆体 tRNA のスプライシングは酵素の切断反応により行われる。tRNA スプライシング・エンドヌクレアーゼは古細菌から高等植物まで広く分布し、触媒ドメインに高い相同性が観察されている。我々はすでにアラビドプシスからエンドヌクレアーゼの構成サブユニット遺伝子 (*AtSen1* と *AtSen2*) を単離し、分子構造の解析を行っている。

これら遺伝子産物の機能を明らかにするために、変異遺伝子を構築した。酵素の触媒ドメインには保存された三つ組触媒アミノ酸残基 (Tyr-His-Lys) が存在する。*AtSen1* と *AtSen2* cDNA の His コドンに Ala コドンに改変し、アグロバクテリウムを介した胚軸形質転換法に従い、改変遺伝子を植物細胞に導入し、形質転換アラビドプシスを作成した。植物体はいずれも著しい成長遅滞を示した。これら植物から全 tRNA を抽出して、イントロンを含むメチオニン tRNA をプローブとしてノーザン解析を行った結果、変異 *AtSen1* 導入植物ではメチオニン tRNA 前駆体の蓄積が観察された。また、この植物由来の組織にナンセンス・サプレッサー・メチオニン tRNA 遺伝子を導入し、一過性の発現を調べた結果、野生型の標的組織を用いたものに比べて、低いサプレッサー活性が観察された。これらから、少なくとも *AtSen1* へのアミノ酸置換の導入は前駆体 tRNA スプライシング効率を低下させ、植物の成長にも影響を及ぼしたと考えられる。

1aI07

ハツカダイコンの *Gln1;1* 遺伝子の発現を可能にするアラビドプシスのゲノム上領域について

渡辺明夫¹ (¹秋田県立大・生物資源科学部)

外来遺伝子をゲノムに導入する際、挿入部位に依存して発現にばらつきが生じる。こうしたポジションエフェクトはプロモーターアッセイなどを行なう際に深刻な障害となるが原因の解明は進んでいない。我々はアラビドプシスを用いてハツカダイコンの *GS1* 遺伝子、*Gln1;1* のプロモーターアッセイを行なっているが、GUS 遺伝子とのヒュージョン遺伝子を導入した場合、ほとんどのラインで発現せず、正常な発現を示すラインは一つのみであった。こうした発現のばらつきの原因を探るため、ポジティブラインの挿入部位を調べたところ、このラインでは遺伝子が第1染色体上の A/T にとむ領域 (70%) に挿入されていることが分かった。これに対しネガティブラインでは挿入部位近くに A/T にとむ領域は見られなかった。ポジティブラインの A/T リッチな領域は核マトリクス結合領域としての特徴を備えていたことから、ここに挿入された遺伝子が3次的に特殊な構造下におかれていることが示唆された。また、*Gln1;1* 遺伝子の構造解析からも、この遺伝子がハツカダイコンゲノム上でも A/T にとむ領域に埋め込まれていることが示された。その後のプロモーターアッセイなどの結果からも、A/T リッチな領域により作られる特殊な高次構造が *Gln1;1* 遺伝子の発現に必須であることが示唆された。

1aI08

リン酸吸収・蓄積に関するダイズIno1遺伝子の単離
加藤央生¹, 水野幸一¹, 藤村達人¹ (筑波大・農工系)

植物はフィチンとしてリンを蓄積していることが知られている。*myo-inositol-1-phosphate synthase* (Ino1)はフィチン生合成経路の初発のキーエンザイムとして報告されている。本研究はこれを利用してリンの吸収能力を飛躍的に向上させた植物を作出することを目標として着手した。今回は、トウモロコシ、オオムギに比べ数倍のフィチンを蓄積することで知られるダイズの登熟種子からIno1遺伝子を単離し、大腸菌で発現させ、その酵素の機能解析をしたので報告する。シロイヌナズナやイネなどで単離・同定されているIno1の保存領域をもとにPCRプライマーを設計し、ダイズ登熟種子のmRNAを鋳型にRT-PCR、そしてRACEを行った。得られたcDNAには509アミノ酸残基をコードするORFが存在した。これはイネのIno1と87%のアミノ酸配列の相同性がみられた。この遺伝子を大腸菌で発現させ、粗抽出液をSDS-PAGEに供した。その結果56kDaにタンパクが見られ、これは推定される分子量と対応した。HPLCを用いた活性測定法を確認し、この粗抽出液について測定した。その結果イノシトール1リン酸の生成が見られIno1であることを確認した。現在この遺伝子を導入したイネ形質転換体を作成している。

1aI09

ハゲイトウの赤色葉形成と関連したPOR 遺伝子の発現制御

岩本訓知¹, 杉山宗隆², 福田裕穂¹ (1東京大院・理・生物科学, 2東京大院・理・植物園)

ハゲイトウ (*Amaranthus tricolor*) は、夏から秋にかけて頂部に赤色葉を形成する観葉植物であり、この赤色葉はクロロフィルの蓄積が非常に少ないことによって特徴づけられる。赤色葉では、クロロフィル合成の後半に関与する酵素 NADPH-protoclorophyllide oxidoreductase (POR) の mRNA およびタンパク質の蓄積が著しく少ないことから、赤色葉形成は、POR の発現抑圧によるクロロフィル合成活性の欠如に起因するものと考えている。今回は、この発現抑圧が転写レベルの調節によるのか否かについて検討した結果を報告する。

まず、ハゲイトウ POR 遺伝子上流域を GUS レポーター遺伝子につないだコンストラクトを、アグロバクテリウムを介して葉に一過的に導入し、GUS 活性を追跡することにより、POR 遺伝子上流域のプロモーター活性を評価した。その結果、POR 遺伝子上流域のプロモーター活性は、赤色葉でむしろ高く、緑色葉の約2倍に達することが分かった。また、赤色葉における POR mRNA の高い転写活性は、各葉より単離した核を用いて行った run-on 解析によっても示された。以上の結果は、ハゲイトウの赤色葉における POR 発現の抑圧は、POR mRNA 転写段階の制御によるものではなく、転写後調節に依存することを示唆している。

1aI10

Inducible PTGS in Rice

三木大介¹, 谷口卓穂¹, 島本功¹ (1奈良先端大・バイオ)

To study early events in PTGS, we established an experimental system in which PTGS is induced by glucocorticoid treatment of transgenic plants. In transgenic rice carrying the 35S::GFP and an inducible full length sense or antisense or ca. 270 nt fragment of the 3' end of the antisense GFP gene, glucocorticoid treatment of leaves led to degradation of the GFP mRNA. We have 10 independent transgenic rice plants that exhibited inducible PTGS. GFP mRNA degradation was observed in 24 hours after Dex treatment, and most of GFP mRNA were degraded in 48 hours. We obtained a number of independent transgenic rice plants which contain GFP siRNAs that was 23 nt in size, and intact GFP mRNA. These results suggested that there may be cases in which the presence of siRNAs is not correlated with PTGS.

We will discuss possible early events in PTGS, and relationship between siRNAs and PTGS.

1aI11

イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンを発現抑制する優性突然変異Lgc1の解析

草場信¹, 高野敏弥¹, 西村実¹ (1生物研・放育場)

Low glutelin content 1 (*Lgc1*) はイネ主要貯蔵タンパク質であるグルテリン含量を減少させる優性の突然変異であり、グルテリン多重遺伝子族のうち *GluB* サブファミリーをより強く抑制する。またこの抑制が転写後抑制であること等から *Lgc1* はグルテリン遺伝子に対して post-transcriptional gene silencing (PTGS) を引き起こしているのではないかと考えられた。*Lgc1* は劣性の *GluB* サブファミリーの欠失突然変異と強連鎖することなどから *GluB* 構造遺伝子の変異である可能性を考え、*GluB* をプローブにゲノミックサザン解析を行ったところ、*Lgc1* で変異しているバンドを見出した。この多型は *Lgc1* の表現型と完全に連鎖していたことから、この *GluB* 遺伝子が *Lgc1* である可能性が考えられた。このバンドをクローニングしたところ、tail-to-tail 型 inverted repeat を形成する二つの極めて相同性の高い *GluB* 遺伝子の間に 3.5 kb の欠失が起こっていることが分かった。これはこの構造により *GluB* 遺伝子の二重鎖 RNA が生産されていることを示唆する。実際、*Lgc1* には PTGS で生じるとされる short interfering RNA と考えられる産物が検出された。

1aI12

シスタチオニン γ -シンターゼ遺伝子にみられるmRNAの安定性による制御機構に関わる因子の遺伝学的検索

鈴木昭徳¹, ランバインイングリッド¹, 白田幸枝¹, 千葉由佳子¹, 尾之内均, 内藤哲¹ (北大院・農)

遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ*mtol*突然変異株はメチオニン生合成の鍵段階で働く酵素であるシスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) の第1エキソンにアミノ酸の置換を伴う1塩基置換を持つ。これまでにCGSがメチオニン添加にตอบสนองしてmRNAの安定性の段階でフィードバック制御を受けることが明らかにされている。

今回、CGS 遺伝子の第1エキソンとレポーター遺伝子としてGUS遺伝子もしくはGFP遺伝子を繋ぎ、これをCaMV 35Sプロモーターの制御下においた融合遺伝子を持つトランスジェニック・シロイヌナズナを用いた解析により、第1エキソン領域がこの制御機構において必要十分な領域であることをmRNAの安定性のレベルで明らかにした。現在はこの第1エキソンにみられる制御機構に対してトランスに働く因子を遺伝学的に同定することを目的として、このトランスジェニック・シロイヌナズナに変異誘起処理を行い、レポーター遺伝子の発現を指標とした突然変異株のスクリーニングを行っている。これまでにメチオニンを添加した培地においても高いGFP蛍光を示す候補株を得ている。

1aI13

シスタチオニン γ -シンターゼ遺伝子におけるmRNA安定性の自己制御機構の解析

尾之内均¹, 千葉由佳子¹, 吉野道子¹, 櫻井玲子¹, ランバインイングリッド¹, 内藤哲¹ (北大・院農)

シスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) はメチオニン生合成の鍵となる段階を触媒する酵素である。我々はこれまでに、シロイヌナズナのCGS 遺伝子の発現が、CGS 遺伝子自身の第1エキソンがコードするポリペプチドの関与する反応によって、mRNA安定性の段階でフィードバック制御されることを報告した。CGS第1エキソンポリペプチドはシスに働くことから、この制御はCGS mRNAと新生ポリペプチドが互いに近接している翻訳中に働くと考えられる。昨年の本大会においては、小麦胚芽由来の*in vitro* 翻訳系を用いてCGS第1エキソンを持つRNAを翻訳させた場合にも、メチオニンの代謝産物であるS-アデノシルメチオニン (SAM) にตอบสนองして、CGS第1エキソンによる制御が働くことを報告した。今回、同じ系を用いて、この制御のエフェクター分子についてさらに詳細な解析を行った。また、この*in vitro* 翻訳系を用いて、翻訳反応後のRNA分解中間体の解析を行った。これまでに*in vivo* の実験系でみられたのと同様の5'側を400塩基ほど欠いたRNAがノーザン解析により検出され、また、5'側領域のハイブリッドセクションにより、350塩基程度の短いRNAがSAM存在下で特異的に検出された。さらに、この制御と翻訳との関わりについて明らかにするために、この制御に対する翻訳阻害剤の影響の検討、ならびにポリソームプロファイル解析を行っている。

1aJ01

ダイコン細胞膜、液胞膜水チャネルの植物ホルモン応答

須賀しのぶ¹, 小松節子², 前島正義¹ (1名大院・生命農, 2農水省・農生研)

植物の細胞膜と液胞膜には水チャネルが存在する。植物体内の水輸送、細胞生長や水ストレスへの応答を理解する上で重要な要素であると考えられる。水チャネルの植物体での役割を解明する一環として、ダイコン (*Raphanus sativus*) の細胞膜 (PAQ1, PAQ2) と液胞膜水チャネル (γ VM23, δ VM23) (Planta, 2001, 212 (2)) の植物ホルモン応答について検討した。発芽4日目のダイコン実生を材料とし、植物ホルモン (GA₃, ABA, ブラシノリド) で24時間処理し、子葉、胚軸、根に分け、mRNAとタンパク質を解析した。水チャネルのmRNA、タンパク質いずれも、根においてPAQ2がGA₃、ABA処理後減少した。これに対し、PAQ1とVM23はどの処理においても顕著な変動は見られなかった。胚軸では細胞膜、液胞膜水チャネルともに量は一定していた。また、胚軸のRNAを試料として各分子種のmRNAの絶対量を定量したところ、PAQ1bのmRNA量が特に多かった。浸透圧・水ストレス処理におけるダイコン水チャネルの応答とあわせて、これらの結果から植物のストレス・生理応答における水チャネル機能を考察したい。

1aJ02

オオムギの水チャネルHvPIP2;1の塩ストレスおよび乾燥ストレス下における機能的発現と日周変化

小塩和輝¹, 且原真木¹, 柴坂三根夫¹, 笠毛邦弘¹ (岡山山大・資生研)

水チャネル・アクアポリン (AQP) は、液胞膜と原形質膜に局在し、これらの膜を介して水の輸送をおこなう膜タンパク質である。我々は、オオムギから単離した遺伝子HvPIP2;1 (BPW1から改名) は、原形質膜局在型のAQPをコードし、また、そのタンパク質の発現に日周変化があることや糖鎖によって修飾されている可能性のあること (2001年度本学会)、さらに、塩ストレス下で、mRNAレベルでの発現が減少すること (1999年度本学会) などをすでに報告した。

今回は、日周変化について、タンパク質レベルでの発現をさらに明らかにすると同時に、mRNAレベルでの発現の変化を解析した。また、発現したタンパク質の糖鎖修飾について検証した。さらに、塩ストレスによる本タンパク質の発現の変動をみた。

この結果、日周変化は、タンパク質レベルにおいて、ある一定の複雑なサイクルで発現が変化していることが明らかになった。mRNAレベルの発現の日周変化と本タンパク質の糖鎖修飾については現在検討中である。また、塩ストレスにより本タンパク質の発現は、ストレス処理後48時間後で約50%にまで減少した。

さらに、HvPIP2;1 遺伝子を過剰発現させたイネを作成した。この形質転換イネF3を用いて、塩ストレスや乾燥ストレス下でのHvPIP2;1の機能を解析中である。

1aJ03

シロイヌナズナの根における硫酸イオン吸収を仲介する高親和型硫酸イオントランスポーター遺伝子の機能解析

吉本尚子^{1,2}, 高橋秀樹², Frank W Smith³, 山谷知行^{2,4}, 齊藤和季¹ (¹千葉大院・薬, ²理研・植物科学研究センター, ³CSIRO Plant Industry, Australia, ⁴東北大院・農)

シロイヌナズナのゲノム上には12種の硫酸イオントランスポーター遺伝子が存在する。これらのうち、*Sultr1;1*及び*Sultr1;2*は酵母の硫酸イオントランスポーター遺伝子欠損変異株の硫酸イオン吸収機能を相補する高親和型トランスポーターをコードする。プロモーター・レポーター融合遺伝子を導入したシロイヌナズナの解析より、*Sultr1;1*及び*Sultr1;2*はいずれも根の表皮及び皮層で発現することが示された。*Sultr1;1* mRNAは主に硫黄欠乏条件下で蓄積した。一方、*Sultr1;2* mRNAは硫黄十分条件及び硫黄欠乏条件の両方で強く発現した。シロイヌナズナを硫酸イオンの毒性アナログであるセレン酸で処理すると、根の硫酸イオン含量が減少し、*Sultr1;1*のmRNA発現が誘導された。*Sultr1;1*のmRNA発現をアンチセンス抑制したシロイヌナズナは、セレン酸処理後の根の硫酸イオン含量が野生型植物と比較して有意に減少し、*Sultr1;1*のmRNA発現が外界からの硫酸イオン吸収を促進することが明らかにされた。シロイヌナズナの根における硫酸イオンの取り込みは、硫黄欠乏条件において吸収を担う*Sultr1;1*と、広域の硫黄環境条件において吸収を担う*Sultr1;2*という2種の高親和型硫酸イオントランスポーターにより仲介されると考えられる。

1aJ04

Utilization of nitrate by the rice genetically transformed with a nitrite transporter gene of cucumber (*CsNitr1*)

Sustiprijanto¹, Miwa Sugiura¹, Masaaki Takahashi¹ (¹大阪府立大学大学院農学生命科学)

NO_2^- transport from cytosol into chloroplast supports the efficient assimilation of NO_3^- . Rice prefers NH_4^+ than NO_3^- . We consider that such preference arises from limited transfer of metabolites during NO_3^- assimilation.

Agrobacterium tumefaciens harboring *pIG121Hm::CsNitr1*, that has been cloned in our laboratory infected into scutellum-derived calli of rice (cv.Nipponbare). Transformation of rice with *CsNitr1* cDNA was proven by PCR and Southern blot.

Transgenic plants were hydroponically grown well and healthy even with 40 ppm NO_3^- as sole N source, while the growth of wild type was inhibited. This suggested that *Nitr1*-transgenic rice well utilized NO_3^- .

1aJ05

ラン藻の硝酸イオン基質結合タンパク質の構造と機能の研究

志字寿文¹, 前田真一¹, 小俣達男¹ (¹名古屋大院・生命農学)

大腸菌を始め、一般的にグラム陰性菌では、物質の細胞内への吸収に関与するABC(ATP-Binding-Cassette)トランスポーターの基質結合タンパク質はペリプラズムの可溶性タンパク質として存在している。これに対し、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 のABC型トランスポーターの一つである硝酸イオン能動輸送体(NRT)の基質結合タンパク質NrtAは細胞膜に結合している。本研究ではNrtAの膜結合の意義を調べるため、NrtA欠失株を親株とし、発現プラスミドを用いて膜結合性の野生型NrtAもしくはN末端部を改変した可溶性の変異型NrtAを発現する株を作製して両者の性質を比較した。いずれの株も硝酸イオンを窒素源として増殖し、低濃度の硝酸イオンを培地から完全に吸収したことからNrtAの膜への結合は硝酸イオンの輸送に必須ではないことが分かった。しかし、0-1 μM の低濃度領域では、変異型NrtAをもつ株の硝酸イオンの吸収速度は野生型NrtAをもつ株に比べて有意に低かった。両株を等量混合して窒素制限条件下のケモスタット中で培養したところ、変異型NrtAを発現する株の割合は次第に減少し、12日後には100分の1の細胞数となった。このことからNrtAの膜結合は低濃度領域での基質の効率的な取り込みに寄与しているものと推定した。

1aJ06

リン酸欠乏条件下で単離されたニチニチソウ培養細胞intact液胞によるリン酸取り込み活性

三村徹郎^{1,2,3}, 辻村とも子², 大西美輪¹, 三橋尚登^{1,3}, 鷲谷根本節子², 前島正義⁴, Enrico Martinoia⁵ (¹奈良女子大・理・生物, ²一橋大・生物, ³科技団・CREST, ⁴名古屋大院・生命農学, ⁵Institute of Botany, University of Neuchatel)

ニチニチソウ培養細胞から、高純度のintact液胞を単離し、そのリン酸取り込み活性を、培養液リン酸条件の違いに基づいて検討した。単離液胞によるリン酸の取り込みは、液胞膜起電性 H^+ ポンプ(H^+ -ATPaseと H^+ -PPase)により形成された液胞膜電位によって駆動されている。

リン酸欠乏下の細胞から単離された液胞は、リン酸が十分に存在する状態の細胞から単離された液胞に比べて、高いリン酸取り込み活性を持っていた。リン酸欠乏下の細胞では、いずれの H^+ ポンプにおいても、酵素活性、 H^+ 輸送活性が増大していた。リン酸取り込み機構の活性化の一部は、液胞膜起電性 H^+ ポンプの活性化による、駆動力の増大で説明できると思われる。しかしながら、いずれの H^+ ポンプも、ウェスタンブロッティングにより測定された酵素量には違いが存在しなかったため、液胞膜の起電性 H^+ ポンプには、リン酸欠乏下で、酵素量の増加とは異なる活性化機構の存在することが示唆された。一方、液胞膜起電性 H^+ ポンプのエネルギー基質であるATPとピロリン酸の濃度は、リン酸欠乏下で大きく減少していた。リン酸欠乏下での液胞膜 H^+ ポンプの活性化は、細胞内においては、ポンプ基質濃度の減少によるポンプ活性の補償機構によるものであり、リン酸取り込みの活性化は、その一側面であると考えられる。

1aJ07

イネClチャンネル遺伝子*OsCLC-1, -2*の細胞内局在性
中村敦子¹, 福田篤徳², 酒井慎吾¹, 田中喜之² (筑波大・生物科学, ² (独) 生物研)

塩ストレスは温度や乾燥、光と共に重要な環境要因の一つであり、複雑な調節機構が働き、耐性を獲得している。細胞膜型、液胞膜型のNa⁺/H⁺アンチポーターは、それぞれが塩ストレスの回避に重要な役割を担っている。しかしながら、Na⁺のカウンターイオンであるCl⁻の塩ストレス条件下における挙動については明らかにされていない。

イネから単離したClチャンネル遺伝子*OsCLC-1, -2*にGFPを融合させ、タバコBY-2細胞に形質転換を行い、細胞内局在性を調べたところ*OsCLC-1, -2*は共に液胞膜、およびドット状の小胞にシグナルが検出された。シヨ糖密度勾配遠心により局在性を解析したところ、液胞膜および液胞膜よりやや重めのフラクションに*OsCLC*抗体と反応するタンパクを検出した。この液胞膜よりやや重めのフラクションに検出されたフラクションがドット状の小胞に相当すると考えられる。さらにBY-2細胞に塩処理を行い、Na⁺の蛍光指示薬であるsodium greenを用いてNa⁺の蓄積する過程を観察したところ、液胞膜および*OsCLC-1, -2*が局在した小胞と類似した小胞を経て液胞内に蓄積することが示唆された。

1aJ08

シロイヌナズナプラスチド包膜局在性ジカルボン酸輸送体の機能解析

谷口光隆¹, 谷口洋二郎¹, 川崎通夫¹, 佐藤藤正², 加藤友彦², 田畑哲之², 三宅博¹, 杉山達夫³ (1名大院・生命農, ²かずさDNA研, ³理研・植物センター)

プラスチドの内包膜中には様々な代謝産物輸送体が存在する。ジカルボン酸の輸送は、窒素同化系への炭素骨格の供給、還元力輸送、アミノ酸代謝などにおいて重要である。我々は、リボソームへ再構成した組み換えタンパク質の基質輸送特異性の解析より、2-オキソグルタル酸/リンゴ酸輸送体(OMT)とジカルボン酸全般を輸送するジカルボン酸輸送体(DCT)をコードするシロイヌナズナ遺伝子を同定してきた。今回、これらのタンパク質がオキザロ酢酸も効率良く輸送することを見出したので報告する。¹⁴C-オキザロ酢酸を用いた輸送活性測定では、オキザロ酢酸に対するKm値は0.042 mM (OMT) 及び0.23 mM (DCT)であった。特に、OMTのオキザロ酢酸に対するKm値はリンゴ酸に対するKm値に比べて1桁低く、以前に単離葉緑体を用いて測定されたKm値に近いものであった。今まで、葉緑体包膜中にはオキザロ酢酸を特異的に輸送する輸送体が存在するだろうと考えられてきたが、今回の結果はOMTあるいはDCTがオキザロ酢酸輸送体としても機能しうることが示唆されている。OMT及びDCTの生理機能を明らかにするため、シロイヌナズナタグラインの解析を進めている。スクリーニングの結果、OMT及びDCT遺伝子破壊株をそれぞれ複数単離することができたので、その表現型についても報告する予定である。

1aJ09

トウモロコシ葉緑体のジカルボン酸輸送体の機能と発現の解析

谷口洋二郎¹, 谷口光隆¹, 川崎通夫¹, 三宅博¹, 杉山達夫² (1名大院・生命農, ²理研・植物センター)

トウモロコシに代表されるNADP-マリックエンザイム型C₄植物では、葉肉細胞において大気中のCO₂をオキザロ酢酸の形で一次固定した後、葉緑体に取り込む。次いで、リンゴ酸に転換して維管束鞘細胞葉緑体へと輸送し、脱炭酸反応を行う。このようなリンゴ酸やオキザロ酢酸の葉緑体包膜間の移動を司る輸送体の生化学的解析は行われているが、その遺伝子の単離は行われていない。我々はこれらの輸送体の候補となるトウモロコシ包膜局在タンパク質のcDNAを3種類単離し、各遺伝子が光誘導的かつ、葉肉細胞あるいは維管束鞘細胞特異的に発現することを見出してきた。今回、これらの膜タンパク質を酵母で発現させ、リボソームへの再構成系を用いて輸送特性の解析を行った。その結果、これらの膜タンパク質は2-オキソグルタル酸/リンゴ酸輸送体あるいはジカルボン酸輸送体と推定されるような基質特異性を持つ輸送能をもつことが明らかとなった。また、シロイヌナズナと同様にオキザロ酢酸も効率良く輸送した。これらの結果より、得られたcDNAがコードする膜タンパク質はC₄光合成中間代謝産物の輸送体であることが期待される。現在、特異抗体を用いたタンパク質レベルでの発現の解析も行っており、あわせて報告する予定である。

1aJ10

Al耐性コムギにおけるリンゴ酸分泌機構の解明

片岡達彦^{1,2}, 中西友子¹, Stekelenburg Anton³, Delhaize Emmanuel³, Ryan Peter R.³ (1東大・院・応生化, ²日本学術振興会・特別研究員, ³Division of Plant Industry, CSIRO, Australia)

一遺伝子座(*Alt1*)のみが異なる準同質遺伝系統コムギES8(Al感受性)、ET8(Al耐性)を用いて、ET8においてのみ認められる根端リンゴ酸分泌のAl処理特異性について検討を行なった。無菌的に育成した植物体のうち、切断したコムギ根端部を十分に洗浄した後、100μMの希土類元素(La, Pr, Eu, Gd, Tb, Er, Yb)を含む0.2mM CaCl₂水溶液(pH4.3)で処理を行なったところ、ET8においてES8の5-50倍のリンゴ酸量の分泌が認められた。このうち特にリンゴ酸分泌量の多かったErを用いて、さらに詳細な生理学的な検討を行なった結果、Al処理により引き起こされるリンゴ酸分泌と共通していることが示され、同じメカニズムを介してリンゴ酸が分泌されている可能性が示唆された。さらに、Al耐性能の異なる純同質遺伝系統コムギの交配によって生じたF3世代の植物体を用いた解析により、Al耐性能とEr誘導性リンゴ酸分泌能の分離が一致していることが示され、以上の結果は、Er誘導性リンゴ酸分泌能が遺伝子座*Alt1*に起因することを強く支持する。本研究は、Al以外の元素によりリンゴ酸分泌の誘導されることを示したはじめての研究である。本研究により今後、有機酸分泌メカニズムの解明を遂行するにあたり、希土類元素の有効性が示された。

1aJ11

アルミニウム耐性小麦に特異的な遺伝子のクローニングと機能解析

佐々木孝行^{1,2}, 山本洋子², 江崎文一², 且原真木², 松本英明² (¹生研機構, ²岡山大・資生研)

小麦ではアルミニウム(AI)耐性機構の一つとして、根端からリンゴ酸を放出しAIをキレートする。準同質遺伝子系統小麦のET8 (AI耐性)とES8 (AI感受性)はリンゴ酸放出に関わる遺伝子座*Alt1*が異なっている。我々はET8とES8を用いたサブトラクション法により、AI耐性小麦に特異的なcDNA (*ATS1*, aluminum-tolerant specific)を単離した。ノーザン法により*ATS1*はET8においてES8よりも高い発現を示し、それはAIの有無とは関係なく構成的であること、さらにこの発現が根端に特異的であることが明らかとなった。またAI耐性品種と感受性品種からそれぞれ遺伝子コード領域のcDNAを増幅し配列解析を行った結果、両者において核酸の6塩基、アミノ酸にして2残基に違いがあることが示された。*ATS1*タンパクの機能を明らかにするため、*ATS1*をイネに形質転換した。野生株イネにおいてはAI処理によるリンゴ酸放出は認められないのに対し、*ATS1*の形質転換イネではAI処理特異的なリンゴ酸放出が起こることが明らかとなった。以上の結果から、*ATS1*はリンゴ酸放出機構に関与する遺伝子座*Alt1*であることが示された。現在、アフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系を用いて*ATS1*タンパクがリンゴ酸チャネルであるかどうか検討中である。

1aJ12

原形質流動の光誘発にはH⁺駆動力が必要である

原田明子¹, 岡崎芳次², 永井玲子³, 高木慎吾³ (¹理化学研究所・植物科学研究センター, ²大阪医科大学・生物, ³大阪大学・院・理・生物科学)

淡水産単子葉植物オオセキショウモの葉肉細胞では、アクチンミオシンに依存した原形質流動の誘発・停止が光によって制御されている。原形質流動は、光合成と近赤外光吸収型フィトクロム (Pfr) の存在との両方に依存して誘発、維持される。原形質流動はCa²⁺による調節を受けており、暗黒下でもCa²⁺濃度が1 μMよりも低いと誘発、維持され、高いと停止する。光による原形質流動誘発時には、細胞膜を介してCa²⁺が汲み出される。

原形質流動の光誘発は、細胞膜 Ca²⁺-ATPase の特異的阻害剤エリスロシンBには阻害されず、P型ATPaseの阻害剤バナジン酸、H⁺-ATPaseの阻害剤DCCD、DES、脱共役剤CCCPによって濃度依存的に阻害された。細胞膜H⁺駆動力が重要と予想し、pH 5.5もしくはpH 7.0の溶液中で葉肉細胞を上記の阻害剤で処理し、連続赤色光照射による原形質流動の誘発について調べた。また、同様の条件下で膜電位を測定し、H⁺駆動力を見積もった。Pfrが存在し、かつ20 kJ/mol (-210 mV) 以上のH⁺駆動力が存在する時、原形質流動の光誘発が起こると結論した。

1aK01

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における新規なサイクリックヌクレオチド依存性プロテインキナーゼの活性について

柏尾尚宏¹, 南森隆司¹, 松田吉弘², 東哲司¹, 松岡大介¹, 久保雄昭², 北村晃一¹, 安田武司¹ (¹神戸大院・自然科学, ²神戸大・理)

クラミドモナスは緑の酵母たるモデル植物としてその研究価値が高まっている。配偶子の凝集・接合過程において、cAMPや阻害剤が効果を及ぼすとの報告もある。しかし下流のシグナル伝達機構に関しては未知の領域であると言える。我々はこれまでの研究で、クラミドモナスのプロテインキナーゼ遺伝子CPK1を得た。さらにその塩基配列に基づき、ESTクローンのデータベース検索からCPK1と相同性の高い遺伝子CPK2を得た。これらの遺伝子は、N末端側にサイクリックヌクレオチド結合ドメイン、C末端側にプロテインキナーゼ特有の触媒ドメインを持ち、PKA・PKGと高い相同性をもつ遺伝子であった。ノーザンプロットでは両遺伝子ともクラミドモナス細胞内で発現していることがわかった。CPK1について、抗体を作成し、クラミドモナス栄養細胞でのウエスタンプロットを行った結果、CPK1とみられるバンドがみられた。さらにCPK1を大腸菌でFLAGペプチド融合の組み換え蛋白質として発現させ、そのリン酸化活性を測定した。CPK1の組み換え蛋白質はプロテインキナーゼの一般的な基質に対してリン酸化能を持っていることがわかった。またPKAの阻害剤 (PKI) ではリン酸化活性が阻害されなかったこと、ケンプタイドを基質として用いた場合ではリン酸化が起こらなかったこと、cGMPの添加によってリン酸化能が上昇したことなどから、CPK1がPKGである可能性が示唆された。光合成生物でのPKGの報告は最初のものである。

1aK02

光合成鞭毛虫ユーグレナの同調培養時におけるPKA活性の変化

木村靖子¹, 南森隆司¹, 渡辺義文¹, 松岡大介¹, 東哲司², 安田武司² (¹神戸大院・自然科学研究科, ²神戸大・農)

ユーグレナは鞭毛運動する一方で葉緑体を有し、光合成も行う生物で、分子系統学的に初期に派生した真核生物とされる。我々の研究室で、ユーグレナのcAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) の触媒サブユニットをコードしているEPK2を同定した*。ここではこのEPK2活性が日周期でどのように変化するかを解明するために、明暗期交換による同調培養を行った。タンパク質の可溶性画分を抽出し、EPK2に対する抗体を用いて細胞内のPKA活性を測定した。一方、それぞれにcAMPや阻害剤PKIを加え、リン酸化酵素活性への効果を検討した。その結果、EPK2はすべての細胞周期で恒常的な活性を示す一方で、cAMP添加時の活性変化はEdmundsらの示したcAMPの概日リズムでの濃度変化と類似しており、日周期変動による活性変化の可能性あるいは細胞分裂前に活性が増加する事実が指摘された (明期の分裂前細胞でピークが認められた)。さらに、細胞浸透性のPKA阻害剤を加えると、ユーグレナの正常運動に影響を与えることがわかり、EPK2の何らかの関与が示唆された。

*Kiriya, H., & Nanmori, T. et al. (1999) *FEBS Lett.* 450, 95-100

1aK03

シロイヌナズナ MAPKK、AtMEK1 の活性化について
松岡大介¹, 南森隆司^{1,2}, 安田武司² (¹神大院・自然科学,²神大・農)

MAPK カスケードは全ての真核生物において保存され、細胞の増殖やストレス応答において重要な役割を持つことが知られている。MAPKK はその上流酵素である MAPKKK によりリン酸化され活性化するが、このリン酸化部位は動物においては SxxxS/T という配列が保存されているのに対し、植物では S/TxxxxS/T という少し異なる配列が保存されており、その活性化及び細胞内での役割については不明な点が多い。そこでシロイヌナズナの MAPKK である AtMEK1 を用いてその活性化機構について検討した。AtMEK1 はこのリン酸化配列において T(218)xS(220)xxxS(224) という配列を有しており、それぞれ2カ所のセリン及びスレオニン残基をグルタミン酸残基に置換した変異体は活性化しその基質である ATMPK4 のスレオニン及びチロシン残基を特異的にリン酸化した。また218番目のスレオニン残基及び220番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異体を用いた解析により、218番目のスレオニン残基が自己リン酸化されることが示唆された。また AtMEK1 を特異的に認識する抗体を用いて植物細胞に存在する AtMEK1 を免疫沈降しその活性を検討した。その結果、AtMEK1 は傷害、低温、乾燥や高塩ストレスにより活性化することが明らかとなった。

1aK04

クラミドモナスMAPキナーゼ情報伝達系の解析
西谷哲哉¹, 河本伸¹, 桐沢恒一¹, 松尾真介¹, 山田隆¹, 宇佐美昭二¹ (¹広大・先端研)

シロイヌナズナゲノム情報及びイネEST情報より、高等植物のMAPキナーゼ情報伝達系は数十種からなる非常に複雑な系であり、細胞レベルでの制御系の全体像の解明には多年にわたる研究が必要である。単細胞性緑藻クラミドモナスは、現在EST解析やゲノムプロジェクトが進行中で遺伝情報が蓄積しつつあり、より単純な光合成緑色植物モデル生物として注目を集めている。我々は植物細胞における細胞内情報伝達系の特徴を明らかにするために、クラミドモナスの全MAPキナーゼ情報伝達系の分離と機能解析を行っている。

EST解析よりクラミドモナスのMAPキナーゼ相同遺伝子は4種類程度しかないと推測された。我々はそのうち2種類の全長クローン (*CrMPK1*, *CrMPK2*) の全塩基配列を決定した。その結果、いずれもTEY型で酵素活性を有すること、*CrMPK1* は高等植物の細胞増殖制御MAPキナーゼ *ATMPK4*、*NTF3* に類似し、*CrMPK2* は高等植物に類似の遺伝子がないことを明らかにした。また2種類のMAPキナーゼフォスファターゼの塩基配列も決定し、酵素活性の測定を進めている。

現在、残りのMAPキナーゼ相同遺伝子の分離と塩基配列決定を行うとともに、その機能を明らかにするために、(1)ノザン解析による発現時期の特定、(2)遺伝子導入体による表現型の解析、(3)抗体を用いた *in vivo* のリン酸化や局在化の解析を進めている。

1aK05

クラミドモナスCDPK相同遺伝子の単離と解析
桐沢恒一¹, 山田隆¹, 宇佐美昭二¹ (¹広大・先端研・分子生命)

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は効率的な形質転換が可能な単細胞性モデル植物である。ESTとゲノム情報の蓄積からモデル生物としての重要性が高まるなか、細胞内情報伝達系の研究はあまり進んでいない。我々は、細胞内情報伝達において重要な役割を持つ Ca^{2+} とプロテインキナーゼとの関係を明らかにするために、cDNAライブラリからCDPK (Ca^{2+} -dependent protein kinase) 相同遺伝子 (*CrCDPK1*) の全長クローンを単離し、全塩基配列を決定した。

CLUSTAL W 系統解析により、*CrCDPK1* 遺伝子は *Chlamydomonas* 属の機能不明なCDPK (Z49233) と近縁に分類され、キナーゼ領域で52%の同一性を示した。しかし、N末端側の可変領域の構造が大きく異なるため、異なる機能を持つと推定された。現在、リン酸化活性の測定を行うと共に、ノザン・ウエスタン解析、形質転換体の解析などを通して、細胞内での機能解明を進めている。また、これらとは異なる別のCDPK相同遺伝子 (*CrCDPK2*) を新たに見出した。このCDPKについても同様の解析を行っている。

1aK06

ヒメツリガネゴケのカルモジュリン依存性プロテインキナーゼの解析
竹澤大輔¹ (¹北海道大・低温研)

CCaMKは、C末端に動物のビジニンと相同性のあるカルシウム結合ドメインを持つ植物に特有のカルモジュリン依存性プロテインキナーゼである。CCaMKは植物では広く保存されているがその機能については不明な点が多い。今回、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) から単離したCCaMK遺伝子 (*PCCaMK*) について、生化学的、生理学的機能の解明を試みた。大腸菌で発現させ、カルモジュリンセファロースにより精製したPC-CaMKは、ペプチド基質 (PLSRTLVSVAACK) に対してキナーゼ活性を示し、活性はカルシウム・カルモジュリンにより著しく上昇した。*PCCaMK* はカルモジュリン非存在下でカルシウム依存的自己リン酸化を示したが、これはカルモジュリンの添加により阻害された。*PCCaMK* のカルシウム依存的自己リン酸化による調節機構を明らかにするため、未処理、または自己リン酸化した酵素のペプチド基質に対するキナーゼ活性を調べたところ、自己リン酸化した*PCCaMK* のカルシウム・カルモジュリン依存的活性が未処理のものに比べて著しく減少した。*PCCaMK* の生理学的役割を明らかにするために、ゲノム遺伝子の第3エキソンにカナマイシン耐性遺伝子を挿入し、*P. patens* のプロトプラストに導入したのちG418で選抜した。本発表では、得られた形質転換体のうち、PC-CaMK遺伝子が破壊されていたPC68株の解析結果について報告する。

1aK07

気孔孔辺細胞に発現するカルシウム依存性プロテインキナーゼの解析

重永綾子¹, 木下俊則¹, 島崎研一郎¹ (九大・院理・生物科学)

気孔は青色光に反応して開孔する。青色光は細胞膜のH⁺-ATPaseのC末をリン酸化することによって活性化し、プロトン放出を促進することが明らかになっている。このプロトン放出は細胞膜を横切るマイナスの膜電位を形成させ、気孔開孔の駆動力となる。このプロトン放出はタンパク質キナーゼ阻害剤やカルモジュリン拮抗剤に阻害されることから、この情報伝達系にカルシウム依存性のプロテインキナーゼの関与が考えられた。一方、最近、この情報伝達系の初期過程を担う、青色光受容体としてphot1とphot2が関与することが示された。phot1は青色光に反応してカルシウムの濃度上昇を引き起こすことが報告されており、以上の結果はこの情報伝達系にカルシウム依存性のタンパク質キナーゼが関与する可能性を示している。

本報告ではソラマメ孔辺細胞からカルシウム依存性 / カルモジュリン非依存性タンパク質キナーゼ(CDPK)のクローニングを行い、特に孔辺細胞に多量に発現しているものに着目し、それぞれの生化学的性質、カルシウム依存性、局在部位を調べ、さらに、組織特異性の解析を進めており、その結果についても報告する予定である。

1aK08

シロイヌナズナのカルシウム結合タンパク質 AtCBL2 と相互作用するタンパク質キナーゼ群の解析

野澤彰¹, 澤田康孝¹, 秋山毅¹, 井合宏道¹, 李銀禎¹, 小泉望¹, 佐野浩¹ (奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター)

シロイヌナズナのタンパク質キナーゼAtSR1はカルシウム結合タンパク質 (CBL) と相互作用する一群のファミリー (PKSファミリー) に分類される。私たちはこれまでに、酵母two-hybrid法により、AtSR1が複数のCBLのうち AtCBL2 と特異的に相互作用すること、両者のmRNAの蓄積が光によって誘導されることを報告した。今回、AtSR1とAtCBL2が生体内で相互作用する可能性を検討した。さらに、AtSR1 のキナーゼ活性に対するAtCBL2とカルシウムの関与についての解析を行った。

6種のPKSファミリータンパク質とAtCBL2との相互作用の特異性を、酵母two-hybrid法を用いて比較した。その結果、6種の中でAtSR1がAtCBL2と最も強く相互作用した。これらの遺伝子の発現が時間的、空間的に一致しているかを検定したところ、AtSR1、AtSR1のmRNAだけが光に反応して本葉で増加した。また、プロモーターGUSキメラ遺伝子を導入した形質転換体の解析から、AtSR1、AtSR1ともに葉全体の細胞で発現していることが示された。

バキュロウイルス発現系により、組換え AtSR1 タンパク質を生産させた。このAtSR1タンパク質は、マグネシウムを与えたときに強い自己リン酸化活性を示した。現在、このリン酸化活性に対するAtCBL2及びカルシウムの関与について解析中である。

1aK09

The "Osmosensing" Histidine Kinases of *Escherichia coli*, KdpD and EnvZ, Detect Both Osmotic and Cold Signals
稲葉昌美^{1,2}, 林秀則^{1,3}, 村田紀夫² (愛媛大・ベンチャービジネスラボラトリー, ²基生研, ³愛媛大・理)

Osmolality and temperature affect the physical properties of biological membranes, and, by so doing, might regulate the activity of membrane proteins. To get insights into the role of the osmosensors of *Escherichia coli*, KdpD and EnvZ, in the osmotic and temperature signaling, we analyzed *kdpD* and *envZ* mutants using the DNA microarray technique. In wild-type cells, about 200 genes were induced by hyper-osmotic stress, another set of about 200 genes was induced by cold stress, and 25 genes were induced by both kinds of stress. Inactivation of either *kdpD* or *envZ* suppressed the induction of about 50 genes, of which 20 genes appeared to be under control of both kinases. These results suggest that KdpD and EnvZ detect both osmotic and cold signals, and that there is an as yet unidentified sensor(s) that regulates the gene expression in response to osmotic and cold stress in *E. coli*.

1aK10

ラン藻 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 におけるマンガン感受に関わるヒスチジンキナーゼ

加藤大和¹, 包定輝¹, 柴田真理¹, Maitrayee Pakrasi², 小川晃男¹, Himadri Pakrasi² (名古屋大・生物分子応答研究センター, ²ワシントン大・生物)

ラン藻 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 におけるマンガン輸送体は *mntCAB* オペロンによりコードされており、培地中のマンガン濃度が低い場合に遺伝子発現の誘導が起こる。我々はまず、ピブリオ由来の *luxAB* 遺伝子の上流に *mntCAB* オペロンのプロモーター領域を挿入した DNA を野生株細胞に導入し、低濃度マンガンに反応して発光する変異株 Pmnt::lux を作製した。次に、Tn7トランスポゾンを用いて 6803 ゲノムのコスミドライブラリーにクロラムフェニコール耐性遺伝子をランダムに挿入し、遺伝子破壊用ライブラリーを作製した。これを用いて Pmnt::lux を形質転換し、通常のマンガン濃度の培地でも発光する変異株を 2 株得た。この 2 株は二成分制御系のセンサーであるヒスチジンキナーゼをコードする *slr0640* に変異が入っていることが分かった。さらに、Slr0640 タンパク質は膜画分から検出され、205 番目のヒスチジン残基がリン酸化されることも示唆された。以上の結果は、ラン藻におけるマンガン輸送体の発現制御に二成分制御系が関与していることを示すものである。

1aK11

Membrane-bound Histidine Kinase Hik33 Is a Bifunctional Sensor Involved in Perception of Osmostress and Cold in *Synechocystis* sp. PCC 6803

三上浩司¹, 兼崎友¹, 鈴木石根¹, 村田紀夫¹ (¹基礎生物学研究所)

Hyperosmotic conditions impose stress to living organisms, thus cells should sense the stress to promote processes of response and acclimation to osmotic up-shock. Using DNA microarray system, we identified a membrane-bound histidine kinase Hik33 as an osmosensor in *Synechocystis* sp. PCC 6803. By comparison with genome-wide gene transcription patterns between wild-type and Hik33-mutant cells, we found that Hik33 governed the expression of 3/4 of all osmotic stress-inducible genes, but did not regulate particular classes of genes. Kinetics of Hik33-regulated gene expression suggested that Hik33 is a primary osmosensor in *Synechocystis*. Since Hik33 has been identified as a cold sensor, we concluded that Hik33 is a bifunctional sensor involved in the perception of osmotic stress and cold signals. Genes regulated by Hik33 under osmotic and cold conditions were different from each other except for a few genes, suggesting distinct modes of Hik33 function in osmotic stress and cold responses.

1aL01

イネのNaClストレスに対する応答について

田中喜之¹, 福田篤徳¹, 中村敦子² (¹(独)生物研, ²筑波大・生物科学)

主要作物であるイネは、耐塩性が低く高塩濃度の環境にさらされると生長が抑制され、次世代を残せなくなることはよく知られている。このようなイネにおいても塩ストレスを回避する機構がそなわっており、20 mM程度のNaClが存在しても正常に生育し、50 mM程度においても無処理区の50%程度収穫が確保される。また、イネに限らず耐塩性が高いオオムギなどにおいても観察されるが、塩濃度を徐々に高めてゆくことにより更に高い濃度まで耐えることができる順応性を有している。耐塩性イネとして知られる「ポッカリ」において、塩ストレスにより発現する遺伝子群がマイクロアレイ法により調べられているが、一般的な耐塩性を示す品種である日本晴においても同種の遺伝子が発現することをマイクロアレイ法等により明らかにしてきた。

この日本晴を1週間生育させた芽生えにおいて50 mM-NaClを行い、緩やかに塩濃度を上昇させることにより100 mM NaClにおいても生育に差が見られなくなる。この過程において、塩処理に応答するイオン集積能をはじめとする種々の反応を測定した。また塩処理にともない発現する遺伝子についても報告する。

1aL02

シロイヌナズナのプロリン分解系欠損変異体の解析 楠城時彦^{1,2}, 藤田美紀³, 佐藤修正⁴, 加藤友彦⁴, 田畑哲之⁴, 篠崎一雄² (¹コンボン研, ²理研・植物分子, ³ゲノム科学総研, ⁴かずさDNA研)

多くの高等植物が、乾燥、高塩濃度、低温などの環境ストレスに応答して細胞内にプロリンを蓄積する。これまでにプロリンの機能として、浸透圧の調節、タンパク質の保護、活性酸素の除去、細胞壁の強化などが報告されている。環境ストレス条件下では、プロリンはおもにグルタミン酸経路を介して合成される。一方、ストレスが解除されるとプロリンは速やかに分解される。このように、高等植物における内生プロリンレベルは、合成系、分解系、あるいは輸送系によって制御されることがわかっている。本研究では、プロリン分解系の律速段階の欠損変異体 (*erd5*) をシロイヌナズナのT-DNAタグラインから単離してプロリンの機能解析にもちいた。その結果、*erd5*変異体は外生的に与えたプロリンに対して高い感受性を示した。つまり、野生型シロイヌナズナがまったく影響を受けない10mM以下の濃度でプロリンを与えた場合でも、*erd5*変異体は著しい成長阻害を示した。プロリンは、植物のストレス耐性獲得の過程で重要な役割を果たすと同時に、その過度の蓄積は成長にとって負の影響を与えることが明らかになった。

1aL03

Glucosylglycerol Protects *Synechocystis* Cells against Salt Stress during Cell Division

Ali Ferjani^{1,2}, Laszlo Mustardy¹, Ronan Sulpice¹, Kay Marin³, Martin Hagemann³, Norio Murata^{1,2} (¹National Institute for Basic Biology, ²Graduate University for Advanced Studies, ³Rostock University)

Synechocystis sp PCC 6803 accumulates glucosylglycerol (GG) which enables it to tolerate up to 1.2 M NaCl. Although the regulation of expression of the *ggs* gene which encodes the key enzyme of GG synthesis has been intensively investigated, the protective role of GG remains poorly understood. We investigated by electron microscopy the tolerance to salt stress of wild-type (WT) and *ggs* mutant cells. The salt stress due to 0.45 M NaCl did not significantly affect the growth of WT cells. In *ggs* mutant cells, the salt stress inhibited the cell division and increased the cell size. External supplementation of GG protected the mutant cells against salt stress and restored both cell division and cell size. This study may suggest that the GG accumulation is involved in the proper function of the cell-dividing machinery under salt stress conditions.

1aL04

コケ植物のMn-SOD活性をもつgermin様タンパク質の塩ストレス応答

中田克¹, 塩野忠彦¹, 渡邊弥生¹, 佐藤敏生¹ (¹広島大・院理・生物科学)

当研究室で蘚類ネジクチゴケ (*Barbula unguiculata*) から初めて見出した細胞外Mn-SOD (BuGLP) は、植物界に広く存在するgermin様タンパク質 (GLP) の1つであった。germinやGLPの生理機能についてはあまり明らかになっていない。そこで、本研究ではBuGLPのSOD活性を基にした解析によりGLPの生理機能を明らかにすることを目的とした。

生育とBuGLPの発現レベルを調べた結果、mRNA量は対数期に多く、タンパク質量は培養後期になるほど多くなった。次に、塩ストレスでの影響を見た。培養の初期と後期に高濃度のNaClを添加してBuGLPの発現量を調べた。培養初期ではBuGLPの大部分は細胞壁から解離して培養液中に溶出し、BuGLP mRNAは多量に蓄積した。培養後期では部LGPの培養液への溶出はほとんど見られず、BuGLP mRNAの蓄積も少なかった。これらのことからBuGLPは細胞壁の合成に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、活性酸素を生成するパラコート培地を添加するとタンパク質の溶出は起こらなかったが、mRNA量は減少した。このmRNAの減少の生理学的意義は不明であるが、パラコートより生成した活性酸素からBuGLPが過酸化水素を生成し、BuGLPと細胞壁の結合がより強くなり、BuGLPの変化が抑えられたのではないかと推測された。

1aL05

*Atriplex gmelini*由来のNa⁺/H⁺アンチポーター遺伝子導入によるイネの耐塩性強化

太田賢¹, 林泰行¹, 中島麻恵¹, 常富紀子¹, 濱田玲³, 田中章², 中村辰之介⁴, 早川孝彦¹ (¹植物工学研究所, ²三菱化学・ライフサイエンス研, ³名城大・総合研, ⁴千葉大・薬)

植物の耐塩性機構には、Na⁺/H⁺アンチポーターによるNa⁺イオンの液胞への隔離や、ベタイン等の適合溶質の蓄積による浸透圧調整がある。我々はアンチポーター活性を強化する目的で、塩性植物*Atriplex gmelini*由来のNa⁺/H⁺アンチポーター遺伝子(*AgNHX1*)を導入した形質転換イネを10系統作出した。これらの後代(T2)のサザン分析の結果、1コピーの遺伝子をホモで持つ個体が得られた。この個体についてのノザン分析で約2kbの転写産物を、ウェスタン分析で液胞膜への局在を確認できた。形質転換イネから誘導したカルスより液胞膜を調製し、アンチポーター活性を測定したところ、親株であるキヌヒカリの約8倍の活性を示した。耐塩性に対する*AgNHX1*遺伝子導入の効果を検討するために、形質転換イネとキヌヒカ리를0.3MのNaClで3日間処理した後、通常の培地で育成させた。この処理でキヌヒカリは全て枯れてしまったが、形質転換イネは80%以上の生存率を示したことから、*AgNHX1*遺伝子が耐塩性強化に寄与していることが示唆された。現在、ベタイン合成遺伝子を導入したイネとの交配を行っているため、その交配種についての解析結果も併せて発表する予定である。

(本研究は、バイオ組合の砂漠CO₂固定化プロジェクトの一環として行われたものである。)

1aL06

アラビドプシスSTO遺伝子は耐塩性機構に関与している

長岡修一¹, 高野哲夫¹ (¹東京大学・アジアセンター)

カルシニューリンを欠失した酵母は培地に塩が存在すると生育することができなくなることからカルシニューリンはナトリウムストレス応答に関与していると考えられている。シロイヌナズナのSTO遺伝子はカルシニューリン欠失酵母の表現型を相補するため、シロイヌナズナにおいてもSTO遺伝子が耐塩性に関与しているのではないかと推測されている。

STO遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させたところ耐塩性の上昇が確認された。また、STO遺伝子についてシロイヌナズナのcDNAライブラリを用いてYeast two-hybrid screeningを行いSTO遺伝子と相互作用する遺伝子を調べたところHPPBF(H-protein promoter binding factor)遺伝子がSTO遺伝子と相互作用を持つことが確認された。HPPBF遺伝子は配列のC末側にMyb遺伝子群と類似のDNA結合領域を持っていた。Myb遺伝子と類似した構造をもつDNA結合タンパク質は高等植物においても多数発見されていて転写調節因子として働く例が報告されており、HPPBFも耐塩性に関与することが示唆された。

1aL07

植物、動物と相同性の高いNhaPタイプNa⁺/H⁺アンチポーターの耐塩性ラン藻(*A. halophytica*)からの単離とその性質

Rungaroon Waditee¹, 日比野隆², 中村辰之介³, Aran Incharoensakdi⁴, 軸屋博之⁵, 高野純⁵, 高倍昭洋¹ (¹名城大・総合研, ²名城大・理工・化学, ³千葉大・薬・膜機能, ⁴チュラロンコン大・理・生化, ⁵鳥津製作所・GR室)

Na⁺/H⁺アンチポーターは、Na⁺の細胞外への汲み出し、細胞内体積、pHの調節に関与する重要な蛋白質と考えられている。植物では、液胞膜のアンチポーター(*AtNHX1*)に引き続き、細胞質膜のアンチポーターと思われる遺伝子(*sos1*)が単離された。*Synechocystis* PCC 6803には、少なくとも5種類のNa⁺/H⁺アンチポーター遺伝子が存在するが、我々は、その中に植物、動物、バクテリアのものと同様の高いNhaP型Na⁺/H⁺アンチポーターが存在する(*synnhaP*)ことを見出した(Plant Physiology, 125, 437-446 (2000))。また、耐塩性ラン藻からNhaPタイプNa⁺/H⁺アンチポーター遺伝子(*apnhaP*)を単離した(J. Biol. Chem 276, 36931-36938 (2001))。ApNhaPは大腸菌の欠損株を相補して、0.2M NaClでも生育し、Na⁺/H⁺及びLi⁺/H⁺の交換活性をもち、しかもその活性は、pH5-9の広い範囲で高い値を示した。ApNhaPはSynNhaPとは異なり、高いNa⁺/H⁺交換活性をもっていた。ApNhaPのイオン輸送に関与するアミノ酸残基、およびトポロジーモデルについても検討したので、これらの結果について報告する。

1aL08

耐塩性ラン藻 (*A. halophytica*) のNapA型Na⁺/H⁺アンチポーターの単離とその性質

Nuchanat Wutipraditkul¹, 日比野隆², 中村辰之介³, Rungaroon Waditee⁴, 高倍鉄子¹, 軸屋博之⁵, 高野純⁵, 高倍昭洋⁴ (¹名古屋大院・生命農・生物資源, ²名城大・理工・化学, ³千葉大・薬・膜機能, ⁴名城大・総合研, ⁵島津製作所・GR室)

植物が高塩濃度下でも生育するためには、Na⁺の細胞外への汲み出し、または液泡への蓄積が重要である。Na⁺/H⁺アンチポーターはこれらに関与する重要な蛋白質と考えられている。我々はNa⁺/H⁺アンチポーターは9種類に分類できると考えている。1) NhaA, 2) NhaB, 3) ChaA, 4) NhaP, NHX1, SOS1, NHE1, 5) Sod2/Nha1, 6) NapA, 7) Pha system, 8) NhaC, 9) NhaD。我々はすでにNhaP型Na⁺/H⁺アンチポーターを*Synechocystis* PCC 6803 (Plant Physiol., 125, 437-446 (2000)) および*A. halophytica* (J. Biol. Chem 276, 36931-36938 (2001)) から単離している。そこで、今回、耐塩性ラン藻からNapA型アンチポーターを単離し、その分子的性質について検討することにした。*A. halophytica*から2種類のNapA型アンチポーターを単離した。このアンチポーターの塩ストレス耐性付与への寄与、Na⁺/H⁺及びLi⁺/H⁺の交換活性、およびトポロジーモデルについて報告する。

1aL09

コリンモノオキシゲナーゼ遺伝子導入アラビドプシスの塩・高温・低温ストレス応答

日比野隆¹, 荒木悦子², Rungaroon Waditee², 田中義人¹, 岸谷幸枝³, 高倍昭洋² (¹名城大・理工・化学, ²名城大・総合研, ³東北大院・農・応用生命)

コリンモノオキシゲナーゼは、コリンをベタインアルデヒドに酸化する酵素で植物のベタイン合成のキーエンザイムといわれている。動物、および大腸菌の場合はコリン脱水素酵素がこの反応を触媒する。しかし、コリンモノオキシゲナーゼは、アカザ科、ヒユ科においてのみ検出されている。今回、アカザ科のハウレンソウからコリンモノオキシゲナーゼ遺伝子を単離し、その分子的性質について検討した。コリンモノオキシゲナーゼ遺伝子はハウレンソウのcDNライブラリーからPCR法で単離した。単離した遺伝子をpeTベクターに組み込み、大腸菌で発現させた後、精製し抗体を作成した。単離したコリンモノオキシゲナーゼ遺伝子をアラビドプシスに導入した形質転換植物を作出した。また、ハウレンソウのコリンモノオキシゲナーゼとベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの両遺伝子をアラビドプシスに導入した形質転換植物も作出した。コリンモノオキシゲナーゼは、アラビドプシスの葉とともに根においても検出された。ベタイン蓄積量は、コリンを添加すると数倍増加した。これら形質転換植物の塩・高温・低温等のストレスに対する耐性について検討した。

1aL10

アマランサスのコリンモノオキシゲナーゼ遺伝子の単離と塩ストレスに応答したベタイン合成

濱田玲¹, 田中義人², 日比野隆², 小野清美¹, 石川浩², 高倍昭洋¹ (¹名城大・総合研, ²名城大・理工・化学)

*Amaranthus*は野菜と花卉として利用されている双子葉のC₄植物である。*A. tricolor*は花が咲く前から葉の先端が緑、中央が黄色、基部が赤色を呈するようになる。我々は、黄色と赤い部位のクロロフィル含量は、緑の部分の数%であるが、CO₂取込み速度は、緑の部分の約40%と高い活性をもつことを明らかにした (Plant Cell Physiol. 40, 668-674 (1999))。また、塩ストレスを加えると、ベタイン合成酵素に関与すると考えられているコリンモノオキシゲナーゼが誘導されるとともに、ベタインの蓄積が見られることを報告した。今回、アマランサスのコリンモノオキシゲナーゼのcDNAおよびジェノミックDNAを単離し、塩ストレスによるコリンモノオキシゲナーゼ遺伝子の発現とベタイン蓄積の関係について検討した。塩基配列から、鉄・イオウクラスター、酸素結合部位、葉緑体ターゲティングシグナルの存在が予想された。コリンモノオキシゲナーゼの蛋白質およびmRNAの蓄積が塩で誘導されるので、プロトプラストおよび形質転換植物を用いて、プロモーター領域に塩で誘導されるシグナル配列が存在するかどうか検討している。

1aL11

単子葉植物におけるベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの酵素学的解析

尾崎啓子¹, Weiming Shi¹, 日比野隆², 高倍昭洋^{2,3}, 高倍鉄子¹ (¹名古屋大・生命農, ²名城大・理工, ³名城大・総合研)

乾燥や高塩濃度環境に強い植物の多くは、細胞内にグリシンベタインを蓄積している。

高等植物において、グリシンベタインはコリンからの2段階の酸化により合成され、その第1段階をコリンモノオキシゲナーゼ (CMO) が触媒し、第2段階をベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ (BADH) が触媒する。

私達は以前に、BADHには葉緑体に局在する双子葉型とペルオキシソームに局在する単子葉型の2タイプが存在することを報告した。最近、単子葉植物であるオオムギとシバムギモドキ (*Aneurolepidium chinense*, 塩生植物) より、cDNAライブラリーを作成し、両植物にペルオキシソーム型他に、葉緑体にもペルオキシソームにも局在しない新規のBADH遺伝子のクローニングに成功した。新規BADH遺伝子とペルオキシソーム型BADH遺伝子には局在性の他に、様々な環境ストレスに対する発現様式の違いがあり、新規BADH遺伝子の方がより強く発現誘導がかかることが認められた。BADHのタンパク含量はオオムギよりシバムギモドキの方が多いことがわかった。

シバムギモドキの遺伝子を大腸菌で発現させ、マンダローブ、ハウレンソウ、塩生植物であるホソバナハマアカザから抽出したBADHとその基質特異性や酵素の安定性の比較を行ったので報告する。

1aL12

マングローブの葉緑体型グルタミン合成酵素遺伝子の単離とその分子的性質

青木健治¹, 日比野隆², 濱田玲³, 鈴木茂敏¹, 川満芳信⁴, 高倍昭洋³ (¹名城大・農, ²名城大・理工・化学, ³名城大・総合研, ⁴琉球大・農・熱帯)

我々は葉緑体型グルタミン合成酵素が、イネの塩ストレス防御に重要な役割を果たすことを明らかにした(Plant Mol. Biol., 43, 103-111 (2000))。ある種のマングローブは強光下における酸化ストレスを防御するため高レベルの活性酸素消去システムをもっていることが報告されている。厳しい環境下で生育するマングローブの光呼吸の生理的役割は興味あるところである。今回、ペタインを蓄積するマングローブである*Avicennia marina*から葉緑体型グルタミン合成酵素遺伝子を単離し、その分子的性質について検討を行なった。*Avicennia marina*の葉から作成したcDNAライブラリーから葉緑体型グルタミン合成酵素遺伝子を単離した。葉緑体移行シグナルを除いた成熟型グルタミン合成酵素遺伝子とともに、C-末端の十数個のアミノ酸を削除したグルタミン合成酵素遺伝子を作成した。これら遺伝子、およびイネのグルタミン合成酵素遺伝子を大腸菌で発現させた後、精製して酵素化学的性質を調べた。グルタミン合成活性、およびトランスフェラーゼ活性に対する、塩、ペタイン、温度の効果等について検討した。

1aO01

微小重力環境における植物への養水分供給システムの開発(二酸化炭素濃度、基質水分量が成長に与える影響)

笠原宏一¹, Lanfang Levine², Georgiana Tynes², Howard Levine² (¹北海道東海大・工, ²Gravitational Biology Laboratory, Life Sciences Support Facility, Kennedy Space Center)

我々は以前より多孔質材のチューブやフェルト布を用いたコムギ幼植物への微小重力環境における養水分供給システムの開発(Water Offset Nutrient Delivery Experiment; WONDER)に取り組んでいる。

今回我々は多孔質チューブ周囲にフェルト布を巻き、さらに養水分の保持力向上および根への酸素供給のために、フェルト布周囲にsurfaceを充填するシステムを考案した。

このシステムを用いて、コムギ種子発芽からの成長に対する二酸化炭素濃度(400 ppm, 1500 ppm, 10000 ppm)、基質水分量(0.6, 0.8, 1.1 ml H₂O/g surface)の影響を、蒸散量、成長量、デンプン含有量等に注目して比較検討した。

その結果、基質水分量が高いと、葉からの蒸散量が少ない事が明らかになった。また、基質水分量が高いほどデンプンの蓄積量が増加した。これらの結果について検討する。

1aO02

イネ幼葉鞘の回旋運動における重力受容の役割
吉原毅¹, 飯野盛利¹ (¹大阪市大院・理・附属植物園)

回旋運動の仕組みはよく分かっていない。重力屈性に基づいて解釈する説と重力屈性とは基本的に異なるという説がある。我々はイネ(ニホンマサリ)の幼葉鞘を用いて回旋運動における重力受容の役割を調べた。本学会2000年度年会で報告したように、暗黒下で育てたイネ幼葉鞘の先端は円軌道上を規則的に回旋している。幼葉鞘の回旋運動は赤外線フラッシュを用いて撮った連続写真から解析した。また、幼葉鞘2側面(正面と側面)の写真像から回旋運動の3次元解析を達成した。本研究で次の結果を得た。(1)回旋の方向は個々の芽ばえによって異なり、静置状態において方向が逆転することはなかった。(2)2次元クリノスタットで芽ばえを回転すると回旋運動は消失した。(3)芽ばえを30度傾けて重力刺激を与えると、重力屈性をした後に回旋運動を継続し、その位相がほぼ同調した。また、重力刺激が与えられるタイミングによっては、回旋の方向が逆転した。(4)赤色光で短時間照射すると幼葉鞘の成長が抑制されるとともに、回旋運動も消失した。この幼葉鞘を浸水すると成長は促進されるが、回旋運動は回復しなかった。しかし、短時間(例えば5分間)だけ30度の重力刺激を与えると回旋運動は再開した。以上の結果から回旋運動には重力受容が重要な働きをしていることが明らかになった。また、植物は重力屈性の機構を用いて回旋運動を行っていると考えられる。

1aO03

宇宙における高等植物の形態形成は地上において模擬することが可能である

宮本健助¹, 勇田友和², 一橋礼子², 山下雅道³, 上田純一¹ (¹大阪府大・総合科学, ²大阪府大院・理学系研究科, ³宇宙科学研究所)

宇宙環境下において、黄化エンドウ芽生えは自発的形態形成を示し、上胚軸は子葉から離れる方向に約45度傾斜して伸長すると共に鉤上部形成が阻害され、根は気中に向かって上胚軸成長方向と逆方向に伸長した。微小重力環境下におけるこの様な自発的形態形成機構を明らかにする目的で、3次元クリノスタットにより作出された疑似微小重力環境下、暗所でエンドウ種子を発芽、生育させたところ、宇宙環境下と極めて類似の形態形成を示した。さらに、地上において、オーキシン極性移動阻害剤(2,3,5-トリヨード安息香酸、9-ヒドロキシフルオレン-9-カルボン酸及びナフチルフタラミン酸)存在下、暗所でエンドウ種子を発芽、生育させた結果、宇宙及び疑似微小重力環境下と同様、上胚軸の傾斜及び根の気中への伸長が認められた。しかし、オーキシン作用の阻害剤であるp-クロロフェノキシ酢酸はそのような効果を示さなかった。一方、黄化エンドウ芽生えの鉤状部形成はエチレンにより制御されていると考えられていることから、エチレン生成を測定した結果、クリノスタット上では1g下に比べエチレン生成が抑制されており、また、1g下においてアミノオキシ酢酸を処理すると鉤状部形成が阻害された。以上の結果、宇宙環境における微小重力刺激は黄化エンドウ芽生えにおいて、植物ホルモン動態、特にオーキシン極性移動やエチレン生成に影響することにより、自発的形態形成を誘導することが示唆された。

1aO04

ヤマザクラ幼植物の茎のあて材形成における重力および植物ホルモンの影響

菅野真実¹, 根岸容子¹, 平岡美緒¹, 松原未央¹, 山田晃弘², 中村輝子¹ (¹日本女子大・理, ²放送大)

ヤマザクラ幼植物の茎のあて材形成における重力および植物ホルモンの影響について検討した。

既にヤマザクラ4週齢植物(およそ3-4節間を有する)の茎の内皮デンプン鞘細胞中に沈降性アミロプラストが存在し、それが重力感受に関わることを報じた。今回、この茎において、阻害剤であるサイトカラシンDおよびEGTAの処理が、あて材形成を抑制し、負の重力屈性を阻害することを明らかにした。このような結果は、マイクロフィラメントおよびCa²⁺が、重力感受機構に関係している可能性を示すものである。

また、外生のジベレリンA3(GA₃)が、引張りあて材形成を促進すること、また「あて材」部は、茎の下側の組織に比べて内生ジベレリンA1(GA₁)レベルが、著しく高いことが明らかになった。このような結果により、重力刺激に応答しておこなわれる「あて材」形成に、ジベレリンが関与している可能性が示された。さらに3Dクリノスタットを用いて、疑似微小重力環境下における二次木部形成におよぼすジベレリンの影響についても調べた。

当研究により、ヤマザクラ幼植物の負の重力屈性における沈降性アミロプラスト等による重力感受のメカニズム、および生体反応におけるあて材形成におよぼすジベレリンの作用が、検討された。

1aO05

ホテイアオイ花茎の重力反応におけるオーキシンの働き

津島美穂¹, 中山依子¹, 羅和容¹, 坂井貴三子¹, 中村輝子¹, 増田芳雄² (¹日本女子大・理, ²藍野学園短大)

ホテイアオイ(*Eichhornia crassipes*)の花茎は、開花後負から正への重力屈性の転換を示す。この屈曲は花茎上部の一次屈曲と、基部の二次屈曲があるが、本研究では一次屈曲を調べた。上方へと伸長している花茎を、正の屈曲を示す前に疑似微小重力環境(3次元クリノスタット)におくと花茎は屈曲を示さない。しかし24時間後に地上に戻すと、直ちに重力屈性を示した。この過程におけるオーキシンの役割を検討した。開花前後から花茎屈曲の過程の各時期に、花序部、花茎屈曲部の上側、下側、および花茎下部の内生オーキシン量を調べた。花序で非常に高いレベルのオーキシンが認められたが、花茎屈曲の開始直前に屈曲部上側(凸部)における急激なオーキシン・レベルの上昇が見られ、その後、屈曲の進行に従い、減少する傾向が認められた。さらに、屈曲部の下側に比べ、上側において著しい細胞伸長の促進が見られた。また、花序を切除した花茎の側面へ外部からオーキシンを塗布すると、その部分を凸形とする顕著な屈曲が起こった。これらの結果から、花茎屈曲部の上側(凸部)に偏在するオーキシンにより、その部分の表皮細胞の偏差成長が起こり、正の重力屈性反応が誘導されたと考えられる。花茎における負から正への重力屈性の転換の機構は、今後の検討課題である。

1aO06

キュウリ芽ばえのペグ形成に機能するオーキシンの輸送と分布

鎌田源司¹, 藤井伸治¹, 東谷篤志¹, 高橋秀幸¹ (¹東北大・院・生命科学)

ウリ科植物の芽ばえは、発芽直後にペグとよばれる突起状組織を根と下胚軸の境界部(TRゾーン)に発達させる。これまでわれわれは、芽ばえが重力刺激側に1個のペグを形成するのは、反重力刺激側でオーキシンが閾値以下に減少するために、そこで発達すべきペグ形成が抑制された結果である可能性を示した。

そこで本研究では、キュウリ芽ばえのペグ形成におけるオーキシンの輸送と分布の役割を明らかにするために、ペグ形成に対するオーキシン輸送阻害剤の影響を解析するとともに、オーキシン(IAA)の内生量を定量した。その結果、オーキシン輸送阻害剤によって、芽ばえの重力屈性は阻害され、重力刺激側と反重力刺激側に2個のペグが形成された。したがって、重力応答によるペグ形成の抑制には、オーキシンEffluxキャリアの関与することが示唆された。また、ペグ形成初期における内生IAA量は、重力刺激側に比較して反重力刺激側で顕著に減少することが明らかとなった。一方、結合型IAA量は、反重力刺激側で多く、重力刺激側で少ない結果となった。さらに、ペグ形成期のTRゾーンは、比較的多くの遊離型IAAを含むことが明らかになった。以上の結果は、反重力刺激側におけるペグ形成の抑制が、オーキシンの輸送あるいは代謝によるオーキシンレベルの低下に起因することを支持している。

1aO07

キュウリの芽ばえのペグ形成におけるオーキシンとエチレンの役割

齊藤綿子¹, 山崎聖司¹, 藤井伸治¹, 高橋秀幸¹ (¹東北大・院・生命科学)

キュウリの種子を水平に置いて発芽させると根と下胚軸の境界部(TR領域)で屈曲し、その内側に突起状組織(ペグ)を形成する。ペグ形成部位の決定は重力依存的であり、これまでにオーキシン処理によるペグ形成の誘導や、エチレン生合成阻害剤によるペグの発達阻害が報告されている。

本研究では、ペグ形成におけるオーキシンとエチレンの役割を解明することを目的とし、オーキシン誘導性遺伝子CS-IAA1とオーキシン応答性遺伝子の転写制御を担うauxin-response factor(CS-ARFs)、ならびにエチレン前駆体である1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC)の合成酵素をコードするCS-ACSsのTR領域での発現を比較した。その結果、TR領域の内側と外側におけるCS-ARFsの発現量に差異は認められなかったが、CS-ACS1はCS-IAA1と同様に、外側に比べて内側で高い発現を示すことが明らかとなった。CS-ACS1はオーキシン誘導性を示すことから、CS-ACS1の偏差的な発現は重力刺激によるオーキシンの偏差分布を反映したものと考えられる。

以上のことから、オーキシンはペグ形成に必須であり、オーキシンで誘導されたエチレンはペグの発達に促進的に作用するものと考えられた。

1aO08

病傷害誘導性タバコレセプター様プロテインキナーゼWRKの解析

高畠令王奈^{1,2}, 伊藤直子³, 村上高¹, 瀬尾茂美^{1,2}, 光原一朗^{1,2}, 大橋祐子^{1,2} (1農業生物資源研究所, 2CREST/JST, 3新潟医療福祉大学医療技術学部健康栄養学科)

WRK (Wound-induced Receptor-like protein Kinase) は、TMV感染に伴う同調的な壊死病斑形成の初期段階においてその転写産物の蓄積が認められる遺伝子の一つとして単離された。WRKは傷処理後15分で転写産物の一過的な蓄積が認められる。今回、大腸菌による組換えタンパク質を用いた解析により、WRKのキナーゼ部位は、高い自己リン酸化活性を有することが明らかとなった。さらに、WRKの機能を調べるために、TMV抵抗性遺伝子*N*をもつタバコ (Samsun NN) にWRK遺伝子を高発現させた形質転換植物を作成した。この形質転換植物は、矮性になり葉の中肋の伸長が阻害されると共に茎の上位表層部や葉柄のふちに壊死が形成されるなどの表現型を示した。これらの表現型は*N*遺伝子が働ける20℃前後において顕著であり、28℃を越えると全く観察されなくなった。さらに、*N*遺伝子をもたないタバコ (Samsun nn) にWRK遺伝子を高発現させても、先に述べたような表現型は温度に関わらず一切検出されなかった。WRK遺伝子は、健全葉を30℃ (*N*遺伝子が働けない) から20℃に移して1-2時間後に発現誘導を受ける。これらの結果は、WRKが*N*遺伝子の上流で機能している可能性を示唆する。

1aO09

Characterization of NtWAF, a protein that interacts specifically with wound-induced protein kinase (WIPK) from tobacco plants

Yun-Kiam Yap¹, Yube Yamaguchi¹, Nozomu Koizumi¹, Hiroshi Sano¹ (1Research and Education Centre for Genetic Information, Nara Institute of Science and Technology, Nara 630-0101, Japan)

WIPK is transcriptionally activated in response to mechanical wounding and upon activation of hypersensitive response (HR). In order to understand its roles in the above pathways, we isolated a protein, NtWAF, which interacted with WIPK using a yeast two-hybrid system. NtWAF contained a predicted B3 DNA binding domain at the N-terminal; however, its C-terminal which interacted with WIPK, showed no similarity to any known proteins. The middle region of NtWAF conferred transactivation activity to a luciferase reporter gene. NtWAF transcripts were also induced in response to wounding and upon activation of HR. In addition, we observed that the N-terminal and C-terminal of NtWAF interacted with each other in a yeast two-hybrid system. Taken together, we propose that the interaction of WIPK-NtWAF as well as the interaction of different domains within a NtWAF protein or between two NtWAF dimers might play important roles in the wound and pathogen signalings.

1aO10

セイヨウアカネのβ-primeverosidaseの精製と characterization

中西史¹, 堂前直², 伊藤愛里¹, 瀧尾擴士², 関本弘之³, 下村講一郎⁴ (1東京学芸大・生物, 2理研・生体分子, 3東大・院・総合文化・生命環境, 4東洋大・生命科学)

セイヨウアカネ (*Rubia tinctorum* L.) の若い根には、二糖配糖体であるlucidin-3-O-β-primeveroside [β-primeveroside (=6-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside) of lucidin; LuP] が主要アントラキノン系色素として大量に含まれている。Lucidinはアントラキノン系色素の中でも最も強い変異原性を示し、細胞毒性も持つことが報告されているが、LuPはそれらの活性は示さない。我々は、セイヨウアカネの根を押しつぶすと、その直後からLuPの減少とlucidinの増加が起こり、無傷な根の抽出液中にLuPをlucidinへと変換するβ-primeverosidase活性が存在することを既に報告した。今回はこのprimeverosidaseの精製と characterization について報告する。

硫安沈殿分画および2種の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE上で分子サイズ69kと66kの位置にバンドを示す活性画分を得た。これらのバンドはともにPAS染色に陽性であり、同じペプチドマップを示すことから、異なる糖鎖を持つ同一のポリペプチドである可能性が考えられた。ゲル濾過クロマトグラフィーから推測される酵素の分子量は69kであり、SDS-PAGE上で確認されるタンパク質の片方もしくは両方がモノマーとして機能すると推定される。本酵素はlucidin-3-O-β-D-glucosideに対する加水分解活性も示したが、LuPに対し、より高い活性を示した。

1pA01

ラン藻光化学系II複合体の3次元立体構造
沈建仁¹, 神谷信夫¹ (理研・播磨研究所)

光化学系II (PSII) は、13-14種の膜貫通蛋白質と3種の膜表在性蛋白質を含む分子量310 kDaの超分子複合体である。PSIIの立体構造は、Wittらにより、好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* 由来のPSIIを用いた結晶構造解析から3.8Å分解能で報告された。一方我々は、近縁の好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* からPSIIを精製・結晶化し、その構造を、SPring-8放射光のX線を用いて3.7Å分解能で解析した。我々が得た結晶構造は、Wittらが報告した *T. elongatus* のものと全体的によく似ていた。新たに分かったことは、表在性の12 kDa蛋白質が *T. elongatus* では見えなかったが、*T. vulcanus* の結晶構造で見えたことと、Mnクラスターの周辺の構造をより詳細に解析したことである。Mnクラスターにリガンドを提供しているアミノ酸残基について、そのうちの一つがD1蛋白質のC末であることが示唆され、その他のリガンドについてもいくつか推定された。また、酸素発生に関与している表在性蛋白との相互作用が示唆されている膜貫通CP47, CP43蛋白質のルーメン側に突出している大きなループ構造の一部を特定した。本講演では、*T. elongatus* と比較しながら我々が解析した *T. vulcanus* のPSII構造について報告する。

1pA02

CP47のC末端にHis-tagを付けたクラミドモナスの酸素発生系II標品の精製と諸性質

鈴木健裕¹, 太田尚孝¹, 鞆達也², 皆川純³, 榎並勲¹
(¹東京理科大・理・生物, ²日本大・文理, ³北大・低温科学研)

すでに、D2のC末端にHis-tagを付けた緑藻クラミドモナスから酸素発生系II標品が精製されているが、この標品には表在性の33 kDa蛋白質は結合しているが他の23, 17 kDaの表在性蛋白質は結合していない(杉浦ら, FEBS Lett. 426, 140-144, 1998)。本研究では、CP47のC末端にHis-tagを付けたクラミドモナスから、全表在性蛋白質を結合した酸素発生系II標品を精製し、その諸性質について調べた。チラコイド膜をsucrose monolaurateで可溶化した後、Ni²⁺ affinityカラムにかけ精製した。得られたPSII標品は、D1, D2, CP47, CP43および数種の小型サブユニットからなる膜内在性蛋白と33, 23, 17 kDaの3種の表在性蛋白から構成されており、ferricyanideを電子受容体に用いた場合、高い酸素発生活性を示した。しかし、DCMUによる阻害がほとんどみられず、Q_Bサイトは構造変化している可能性が高い標品であった。このPSII標品から3種の表在性蛋白質を精製し、再構成実験により、これら表在性蛋白質のPSIIへの結合様式と機能について調べた結果を報告する。

1pA03

高等植物光化学系IIのPsbLサブユニット機能の遺伝子破壊による解析

岩田達也¹, 椎名隆², 豊島喜則¹ (¹京大院・人間環境, ²京都府大・人間環境)

高等植物の光化学系II (PSII) 複合体には、機能が分かっていない小分子量サブユニットが複数存在する。その一つPsbLは、37アミノ酸からなる膜タンパク質で、PSIIのシトクロム b559 のサブユニットをコードするpsbE, psbFとともに共転写される。psbLは進化の過程で高度に保存されており、PSIIの機能発現に重要な役割を担っていると考えられる。我々は、in vitro再構成実験の結果から、PsbLサブユニットがPSII酸化側の電子移動調節因子として作用している可能性を指摘した(Hoshida et al., 1997)。本研究では、葉緑体遺伝子操作によってpsbL遺伝子を破壊した形質転換タバコを作製し、高等植物におけるPsbLの生理的役割の解明を目指した。ΔpsbL変異体は、光独立栄養的に生育できず、ショ糖を含む培地上でも野生株に比べて成長が極端に遅れた。成葉は薄緑色の表現型を示し、クロロフィル含量は野生株の半分以下であった。PAMによるPSII蛍光の測定の結果から、ΔpsbL変異体ではPSII活性が失われていることが分かった。しかし、この変異体にはPSIIのD1タンパク質が野生株の約半分存在しており、活性を失ったPSII複合体が相当量存在することが示唆された。PsbLは、PSIIの複合体形成もしくは、PSIIでの電子移動制御に重要な働きをしていると思われる。

1pA04

PsbKの系IIコア複合体における役割の解析
杉本育代¹, 高橋裕一郎¹ (¹岡山大・理・生物)

PsbKは、葉緑体コードの小型で膜を一回貫通すると考えられている疎水的な系IIサブユニットである。分子量は約4kDaで、N末にトランジェットペプチドを含む前駆体として合成され、プロセッシングにより成熟型となる。緑藻クラミドモナスのpsbK欠損株の解析から、PsbKは系II複合体の分子集合や安定性に必須であると考えられている。ドデシルマルトシド (DM) を用いて単離した系IIコア標品にすべてのPsbKが結合することを示し、チオシアン酸カリウムを用いて部分解体した系IIコア標品を分画した実験により、PsbKはCP43に特異的に結合していることを明らかにした。興味深いことに、種々の系II変異株の解析ではPsbKの蓄積量はCP43の蓄積量と一致し、CP43の存在によりPsbKの蓄積は安定化されることが分かった。一方、psbK欠損株のチラコイド膜をDMで可溶化し、ショ糖密度勾配超遠心法によりクロロフィルタンパク複合体を分離したところ、わずかに蓄積した系IIコア複合体から一部のCP43が遊離することが見いだされた。野生株では同条件下でCP43は全く遊離しないので、PsbK非存在下ではCP43の系II複合体への結合が弱くなることが示唆された。さらに、psbK欠損株に微量に存在する系IIコア複合体の構造や活性の安定性におけるPsbKの役割についての解析結果についても報告する。

1pA05

光化学系IIの光損傷と電子伝達成分の修復におけるPsbTの機能の解析

大西紀和¹, 菓子野康浩², 佐藤和彦², 高橋裕一郎¹
(¹岡山大学・理・生物, ²姫路工大・理・生命)

葉緑体にコードされたPsbTは、光化学系II(系II)反応中心D1/D2ヘテロダイマーに結合した小型で疎水性のサブユニットである。緑藻クラミドモナスの*psbT*欠損株は強光下で生育できず、系II活性の光損傷後の回復が野生株よりも大きく遅れる。これまでに我々は、光損傷後の系IIの修復、特に新たに合成されたタンパクが複合体に挿入された後の過程にPsbTが関与することを報告してきた。本報告では、系II電子伝達成分の光損傷後の修復へのPsbTの関与について解析を進めた。

強光照射により系IIを部分的に失活させた後にクラミドモナスの細胞を弱光下で培養すると、系IIの主要なタンパクの蓄積量は一定であるが、DPCからDCIPへの電子伝達活性の回復が欠損株で大きく遅れた。また、光阻害前後において系IIに結合するマンガンの量は、両株でほぼ一定であった。従って欠損株では、酸素発生系ではなく Y_Z から Q_B の間の電子伝達成分の修復が遅くなったと結論した。これまでに、系IIの電子伝達成分であるフェオフィチンとプラストキノン(Q_A)の定量を行ったが、大きな変化はなかった。また、フェオフィチンの光還元活性も両株でほぼ一定で、少なくともフェオフィチンとP680は失活していないことが示された。現在解析を進めている Q_A と Y_Z の機能回復の結果も総合して、系IIの光損傷後の修復におけるPsbTの役割について議論する。

1pA06

Photoconsumption of oxygen in PSII Preparations under Impairment of Water-Oxidation Complex

S.A. Khorobrykh¹, A.A. Khorobrykh¹, V.V. Klimov¹, Boris N. Ivanov¹ (¹Inst Basic Biol Rus Acad Sci)

The rate of oxygen consumption in PS2 preparations in the light was increased 5-fold, and fast decline of Fv was observed at pH 9.0 in comparison with pH 6.5. The addition of the artificial electron donors for PS2, MnCl2 or diphenylcarbazide, resulted in a decrease of oxygen consumption rate and restored fluorescence characteristics to those at pH 6.5. These data testified to the stimulation of oxygen uptake at basic pHs could be caused by the damage to the water oxidation system. This was supported by the fact that in experiments with PS2 preparations treated with TRIS to destroy water-oxidizing complex, photoconsumption of oxygen in all pH region was close to the values in untreated preparations at basic pHs. It is suggested that the light-induced oxygen consumption in PS2 may be caused by interaction of O2 with organic radicals formed due to oxidation of components of the donor side of PS2 by cation-radical P680+.

1pA07

高温ストレス下での光化学系II反応中心D1蛋白質の分解と光損傷

大平聡¹, 山本泰¹ (¹岡山大学・理)

高等植物は、高温下では光阻害が起りやすく、40℃以上では光化学系II活性が大きく低下する。我々はホウレンソウのチラコイド膜に40℃で光照射を行い、D1蛋白質の光損傷が常温に比べて非常に起りやすいことを見出した。このD1の損傷は熱処理だけで見られる23kDaの分解断片形成と、光照射で見られる架橋産物及びその他の分解断片の形成とに分けられる。架橋はD1とD2, CP43, Cytb₅₅₉との間で生じ、光を強くすると増加した。逆に、23kDa分解断片は架橋産物の増加に伴って減少した。

PSII膜の光照射で見られるD1の架橋は、O₂⁻の消去剤(TironおよびSOD)の存在下で抑えられた。また、O₂⁻の発生系や過酸化水素をPSII膜に直接加えたところ、常温ではD1の架橋や分解はほとんど見られなかったが、40℃ではD1の架橋・分解産物が形成された。その一方、無傷チラコイドを嫌気・暗条件で熱処理しても23kDaのD1分解断片は形成され、この分解は活性酸素によらないことが示された。また、この分解はメタロプロテアーゼの阻害剤によって阻害された。

これらの結果から、高温下ではD1蛋白質は、(1)活性酸素による架橋と分解、(2)プロテアーゼによる切断、の両方を受けやすいと考えられる。

1pA08

強光照射下で生じる活性酸素による光化学系II膜表面性33 kDaタンパク質の損傷

逸見隆博¹, 山本泰¹ (¹岡山大学・理・生物)

光化学系II(PS II)のチラコイドルーメン側に存在する33 kDaの膜表面性タンパク質(OEC33)は、PS IIの重要な機能である水の酸化・酸素の発生に関わる膜表面性タンパク質の一つである。PS IIのターンオーバーの過程でOEC33は反応中心タンパク質D1の分解に伴ってPS IIから遊離し、反応中心の修復後に再結合する。これまで、生理条件下でのOEC33の分解は報告されていない。

本研究では、まずホウレンソウから単離した無傷チラコイドに強光(1,500 μE m⁻² s⁻¹)を照射したときのOEC33の動態について調べた。60分間の照射により、OEC33のPS IIからの遊離が起り、また遊離したOEC33の一部は損傷を受け、SDS/urea-PAGEでバンドの高分子側へのわずかなシフトとして現れた。このようなOEC33の損傷は、PS II膜に強光を照射した場合にも見られた。次に、損傷を受けたOEC33を用いて再構成実験を行った。その結果、損傷を受けたOEC33はPS II複合体に再結合しないことがわかった。一方、無傷チラコイドに強光を照射したときにみられるOEC33の遊離・損傷は、外から加えたカタラーゼやアスコルビン酸によって抑制された。これらの結果は、強光照射によりチラコイドのストロマ側で生じる活性酸素がチラコイドルーメンに存在するOEC33にも損傷を与えることを示唆する。

1pA09

地衣酸による光合成電子伝達阻害—植物種による違い

高萩敏和¹, 遠藤剛¹, 伊福健太郎¹, 山本好和², 木下靖浩³, 竹下俊治⁴, 佐藤文彦¹ (¹京大院・生命科学, ²秋田県立大・生物資源, ³日本ペイント, ⁴広大・学校教育)

地衣類の生産する有機酸類には地衣特有のものが多く、地衣酸と呼ばれている。地衣酸が植物の生育を阻害する機構として、地衣酸が光化学系IIの酸化側と還元側を阻害することを、これまでにホウレンソウチラコイド膜を用いて明らかにしてきた。今回、地衣酸による光合成阻害が植物種により異なることを報告する。まずインタクト細胞を用いた実験により、単細胞緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* では、PSIIの酸化側が強く阻害されること、タバコ培養細胞やコケ培養細胞 (*Marchantia polymorpha*) では、還元側が強く阻害されること、3種の地衣共生藻 (*Trebouxia impressa*, *Trebouxia* sp. *Trebouxia excentrica*) では、PSIIの酸化側も還元側もほとんど阻害されないことを明らかにした。一方チラコイド膜を調整して解析した結果、地衣共生藻も他の植物種と同程度に阻害されることが明らかになった。これらの結果から、地衣共生藻には細胞レベルで地衣酸の光合成阻害活性を緩和する仕組みがあることが示唆された。また植物種による地衣酸に対する感受性の違いから、地衣酸がアレロパシー化合物として機能することが示唆された。

1pA10

表在性蛋白を指標とした酸素発生系の進化II

中田淑子¹, 太田尚孝¹, 沈建仁², 榎並勲¹ (¹東京理科大・理, ²理研播磨)

酸素発生系II標品に結合した表在性蛋白は植物種間で異なる。高等植物には、33, 23, 17 kDaの3種の表在性蛋白が存在するが、ラン色細菌には33, 12 kDa蛋白とcyt c550の3種の表在性蛋白、また紅藻には33, 20, 12 kDa蛋白とcyt c550の4種の表在性蛋白が結合している。本研究では、表在性蛋白を指標とした酸素発生系の進化を調べる目的で、種々の植物のPSIIあるいはチラコイド膜と、高等植物や紅藻の表在性蛋白の抗体との反応性を調べた。その結果、褐藻や珪藻のチラコイド膜は、紅藻の20 kDa蛋白 (R20) とcyt c550 (Rc550) の抗体と反応するが、緑藻のPSIIやチラコイド膜は高等植物の23 kDa蛋白 (H23) の抗体と反応することが示された。また、灰色植物シアノフォラのチラコイド膜はRc550とR12 (紅藻の12kDa蛋白) の抗体と反応したが、ユーグレナのチラコイド膜はH23の抗体のみならずR20とR12の抗体とも反応した。これらの結果は、紅藻の表在性蛋白は、褐藻や珪藻 (紅藻が2次共生したと考えられている) に保存されてきたが、ユーグレナから緑藻への進化の過程で、23 kDaと17 kDa蛋白に変化していった可能性を示唆している。

1pA11

光合成水分解複合体の部分的再構成 (2)

大石涼子¹, 下川麻希¹, 松尾志央¹, 大坪蘭子¹, 田村典明¹ (¹福岡女子大・人間環境)

水を分解し酸素を発生する反応は、葉緑体チラコイド膜に存在する光化学系2で行われ、4原子のマンガンからなるマンガククラスターにより触媒されている。このクラスターの構築の際、4個のうち2個のマンガン配位には光が必要とされるが、これに続く残り2個のマンガンの配位には光を必要としないと考えられている。しかし、後者の光を必要としないマンガン配位の直接的証拠は報告されていない。ただ、佐藤らは、好熱性ラン藻から単離した光化学系2標品を低張溶液中、EDTAで処理してマンガンを部分的に遊離させた後、暗所でMn²⁺とCa²⁺を添加することによってマンガククラスターが再構成できると報告している。

そこで、ホウレンソウから単離した光化学系2標品を用いて、1) 暗所でマンガククラスターの再構成ができるかどうか、2) マングククラスターの再構成をどのような条件で促進できるか、について調べた。主な膜表在性タンパク質を欠いた光化学系2標品をEDTAで処理すると、約10分後には酸素発生活性が30-40%失われることが分かった。その後、暗所でMn²⁺を添加すると、失活した酸素発生が部分的に回復した。この回復に対する濃度依存性のKmを調べたところ、50mM CaCl₂共存下で数10μMであった。この得られた値は、全てのマンガンを欠いた標品でのマンガククラスターの再構成 (光活性化) の場合と比べると、著しく小さかった。

1pA12

酸素発生系33kDaタンパク質遺伝子 (*psbO*) を欠損したシロイヌナズナ突然変異体の解析

村上怜子¹, 伊福健太郎¹, 鹿内利治², 佐藤文彦¹, 遠藤剛¹ (¹京都大院・生命科学, ²奈良先端大院・バイオ)

酸素発生系は、その大きさから33kDa、23kDa、16kDaタンパク質と呼ばれる3つのタンパク質からなる複合体で、水を酸化し、酸素と電子を発生させる反応に寄与している。これらのタンパク質は全て核にコードされ、細胞質で合成された後チラコイド膜へ輸送される。このうち33kDaタンパク質はマンガン安定化タンパク質とも呼ばれ、マンガククラスターの安定化に寄与し、その欠損により光化学系IIのコアが不安定になる。シロイヌナズナにおいて33kDaタンパク質をコードする遺伝子は、*psbO*と*psbO2*の2つが存在する。このうちの1つ*psbO*遺伝子が欠損した突然変異体を、光化学系IIのクロロフィル蛍光を指標としたスクリーニングによって単離した。この突然変異体は、正常な*psbO2*遺伝子を持つにも関わらず、野生型に比べ光化学系IIの電子伝達の量子収率が低く、生育の遅滞が見られた。すなわち、*psbO2*遺伝子から合成されるOEC33タンパク質のみでは、正常な光合成機能を持つ光化学系IIの構築ができないことが示された。一方で、この突然変異体の解析から、*psbO*遺伝子から合成されるタンパク質が欠失することにより、*psbO2*遺伝子から合成されるタンパク質の量が増加することが示され、両者の発現が相補しあっていることが示された。

1pA13

部位特異的変異体を用いたD1タンパク質C末端残基Leu343とAla344の機能解析

皆川純¹, 高橋裕一郎², 伊原大輔², 岩崎(葉田野)郁², 石井麻子³, 三野広幸⁴, 小野高明³ (¹北大・低温研, ²岡山大・理・生物, ³理研PDC・光生物, ⁴名大・理・物理)

D1タンパク質C末端のプロセッシングは、酸素発生Mn複合体の形成に必須である。C末端付近のアミノ酸残基の性質がプロセッシングやMn複合体の機能に多様な影響を与えることがわかってきた(PMB 42: 353-363, 2000, BBA 1504: 299-310, 2001)。本研究では緑藻*C. reinhardtii*を用い、プロセッシング後のC末端の2残基Leu343とAla344にPro残基をそれぞれ導入してその効果を検討した。1) 変異体Leu343→Pro(LP)は光独立栄養条件下で生育したが、変異体Ala344→Pro(AP)は光従属栄養条件下でしか生育しなかった。2) 熱発光の測定より、LP、AP両変異体ともS₂状態の酸化還元電位が低下していることがわかった。3) 蛍光収率のキネティクス解析より、LP変異体は電荷再結合の速度が若干遅くなっており、AP変異体ではP₆₈₀⁺の還元速度が大きく低下していることがわかった。4) EPRスペクトルの解析より、LP変異体は正常なマルチライン信号を示すのに対し、AP変異体はマルチライン信号を示さず、S₃スプリット信号が現れることがわかった。以上の結果はC末端残基であるAla344の置換がMn複合体により大きな影響を与えることを示しており、この残基がMn複合体の構造/機能に重要であると結論した。

1pA14

酸素発生系の可逆的熱失活と光再活性化反応に関連した葉緑体チラコイド膜の特性変動の解析

山下魏¹ (¹自家内実験室愚楽菜虫)

葉緑体を0.1mM還元型ジクロロフェノール インドフェノール試薬で処理すると、50℃・30秒の短時間熱処理という簡単な方法で酸素発生系を選択的に失活出来るが、この熱失活は可逆的で、Mn²⁺とCa²⁺とアスコルビン酸を添加し弱光下で約20分間光再活性化処理をすると、高い酸素発生活性を回復できる事を昨年度の学会で発表した。その後、この失活再活性化反応に関連した葉緑体チラコイド膜の様々な特性変化を詳しく調べ、以下に示す変化がトリス処理阻害・光再活性化反応の際のチラコイド膜特性変化と比較的良く一致している事を確認した。光再活性化必須成分のMn²⁺とCa²⁺のKmは1μMと0.12mMであり、必要光強度や再活性化時間の半数値は1.4μE/m²secと8.1分であった。クロロフィル蛍光のFv成分は熱失活で激減し光再活性化で回復増加した。この光再活性化反応にはCl⁻イオンが必須成分で、このイオン除去で再活性化が阻害された。チラコイド膜は熱失活や光再活性化されてもその電子伝達反応が脱共役剤のNH₄Cl添加で著しく促進されるし、チトクロムb559が熱失活で低電位型になり光再活性化で高電位型に戻る事など、葉緑体の失活処理方法が異なっても再活性化可能なチラコイド膜成分の変化は類似している事が分かった。

1pA15

低温・暗黒処理による酸素発生系の構築過程の解析
樋口美栄子¹, 野口巧², 園池公毅¹ (¹東大・院新領域, ²筑波大・物質工学)

光合成の酸素発生系において、触媒部位のマンガンは光依存的な反応により光化学系?複合体に組み込まれる。生体内における酸素発生系の構築過程の研究は、間欠光による緑化過程の解析などの例がわずかにあるのみで、多くの情報は*in vitro*の実験に負っている。我々は、低温感受性植物であるキュウリの葉を氷上・暗所で処理することにより一度失われた酸素発生活性が、室温弱光照射のもとで回復するという実験系を*in vivo*での酸素発生系の構築過程の研究に利用できると考え解析を行った。処理葉から光化学系?粒子を単離し、原子吸光分光光度計を用いて光化学系?に結合するマンガン数を測定した。マンガン数は処理時間の増加に伴い減少し、低温・暗黒処理により光化学系?からマンガンが解離することが示された。また熱発光測定の結果から、解離せず光化学系?に結合しているマンガンクラスターは通常のS状態(S₀-S₄)よりも還元された状態(S₁, S₂, S₃)として存在することが示された。閃光照射による活性化の効率を観察した結果、解離したマンガンは数百回の閃光照射により再構築され、還元状態のマンガンクラスターは数回の閃光照射により酸化され活性な状態となることが示唆された。このような光によるマンガンクラスターの構築と酸化は、生体内における酸素発生系の構築過程を反映していると考えられる。

1pA16

フーリエ変換赤外分光法による光合成酸素発生系Mnクラスターの配位構造に関する研究:カルシウム除去及び金属キレーターの効果

木村行宏¹, 小野高明¹ (¹理研・光生物1)

光合成酸素発生は光化学系IIに存在する4核Mnクラスターにより触媒される。この反応にはクラスター近傍に存在するカルシウムが必須である。本研究ではカルシウム除去及び金属キレーター添加によるMnクラスター近傍の配位構造への影響をフーリエ変換赤外吸収差スペクトル法を用いて調べた。未処理の光化学系II膜標品の光誘起S₂/S₁差スペクトルではアミドI及びIIの振動構造、及びMnクラスターの配位子と推測されるカルボキシレートの対称及び逆対称伸縮振動が観測された。これらの特徴的な振動構造はカルシウム除去により影響を受けず、Ca²⁺はS₂生成に伴うMnクラスター近傍の蛋白質の構造変化には関与していないことが示唆された。一方、カルシウム除去標品に金属キレーター(EDTA及びEGTA)を添加すると特徴的な振動構造が消失した。しかし、S₂状態のMnクラスターの酸化還元電位や磁気構造はほとんど影響を受けなかった。以上の結果は、キレーターのカルボキシレートがネイティブなカルボキシレート配位子と置換したため、酸化還元電位や磁気的性質を保持したまま、S₂生成に伴うMnクラスター配位子の構造変化が抑制された可能性を示唆している。

1pA17

Doublet signalの起源はマルチラインとの相互作用ではない

三野広幸^{1,2}, 石井麻子², 小野高明² (1名古屋大学・理, 2理化学研究所・光生物1)

Low-pH処理によってCa²⁺を除去するとマンガングラスタを保持したまま酸素発生能は可逆的に阻害されるとともにマンガングラスタ(S2)由来のマルチライン信号もまた影響をうける。Ca²⁺を除去した光化学系?ではS₂マルチラインの消失と同時に新たなESR信号(doublet signal)が観測できる。この信号の起源については、マンガングラスタとチロシン残基Zとの磁気的交換相互作用と考えられてきた。実際にdoublet signalのdecayとマルチライン信号のrecoveryのkineticsは273Kでよく一致している(t_{1/2}=7分)しかし、S₂状態でDCMUを加えたQ_A⁻存在下の試料ではdoublet signalのdecayとマルチラインのrecoveryのkineticsは273K下で全く異なる(doublet signal: t_{1/2}=1min, マルチライン: t_{1/2}=7min)。また、77K下ではdoublet signalのdecayはするがマルチラインのrecoveryは確認されなかった。これはマルチラインとdoublet signalが独立した存在であることを示す。

Q_A⁻とdoublet signalとの電荷再結合を熱発光で観測したところ、観測されたQ_A⁻/doubletの熱発光は強いpH依存性を示した。(pH 5.5で7 C, pH 7.0で17 C) これらのpH依存性はY₂あるいはY₂近傍ラジカルのpH依存性を示したものと考えられる。

1pB01

葉緑体チオレドキシシン新規標的タンパク質の酸化還元制御

本橋健¹, 近藤愛子², 川上直人³, 久堀徹^{1,2} (1科技団・ERATO・ATPシステム, 2東工大・資源研, 3明治大・農・生命科学)

高等植物の葉緑体では、光合成反応を効率的に行うために炭酸同化系をはじめとして様々な代謝経路の酵素が葉緑体内の還元状態によって調節されていることが知られている。葉緑体に存在する2種類のチオレドキシシンは、光化学系から受け取る還元力を利用して標的タンパク質のジスルフィド結合を還元することによってその酸化還元状態を制御しており、この酸化還元調節機構において重要な役割を担っている。

これまで、私達は、葉緑体チオレドキシシンに調節される酵素群を網羅的に捕捉する方法として、チオレドキシシン変異体の固定化担体を用いていくつかの新規標的タンパク質を同定してきた(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11224-11229, 2001)。今回は、この方法で標的タンパク質として新規に同定された酵素のうち、ペルオキシレドキシシンとシクロフィリンについて、葉緑体チオレドキシシンによるジスルフィド結合の酸化還元とその酵素活性の関係を詳細に検討した。還元型の葉緑体チオレドキシシンは、酸化状態においてジスルフィド結合を形成しているこれらの酵素を効率よく還元することができた。また、これらの酵素活性は酸化還元状態によりその活性に変化が観察された。

1pB02

高等植物細胞質型チオレドキシシンのクローニングとその標的タンパク質の解析

山崎大介¹, 本橋健², 近藤愛子¹, 川上直人³, 久堀徹^{1,2} (1東工大・資源研, 2科技団・ERATO・ATPシステム, 3明治大・農・生命科学)

チオレドキシシン(Trx)は、活性中心の2個のシステインの酸化還元を介して標的タンパク質の酸化還元を行う酸化還元酵素である。葉緑体では、光化学系によって生じる還元力を利用して、光の有無をTrxがチオール・ジスルフィドの酸化還元シグナルとして標的酵素に伝え、それらを活性化することが知られている。一方、植物細胞の細胞質には複数種のTrxが存在するが、その機能はまだよく知られていない。今回、我々はシロイヌナズナに存在する細胞質型Trx 5種類をクローニングし、各々の標的タンパク質を網羅的に解析することを試みた。シロイヌナズナの全RNAを鋳型として、RT-PCR法により5種類のTrx遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた大量発現系を構築した。さらに、Trxと標的タンパク質との相互作用が中間体を形成した段階で止まるようなTrx変異体を作成し、これをゲル担体に固定した。この担体にシロイヌナズナ細胞質抽出液を混合して保温し、Trxと標的タンパク質間でジスルフィド結合を形成させることで、標的タンパク質を担体に保持させた。この担体を還元処理して、各Trxに対する標的タンパク質を得た。得られたタンパク質溶液を2次元電気泳動法によって解析した。これまでの研究で、2種類の細胞質型Trxについては、標的タンパク質の特異性の違いを確認している。

1pB03

Two Possible Mechanisms for the Fe²⁺-mediated Site-specific Cleavage of the Large Subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase

羅申¹, 石田宏幸¹, 牧野周¹, 前忠彦¹ (1東北大院・農)

We have demonstrated that the large subunit (LSU) of purified Rubisco is cleaved at G329 by the Fe²⁺/ascorbate/H₂O₂ system. In this study, we aimed at solving the mechanism for this fragmentation. Besides G329, five other cleavage sites were found by increasing the incubation time or Fe²⁺-concentration. All these cleavage sites are around the metal-binding site within a radius of 12 Å; moreover their C_αH groups are exposed to the bound metal. We suggest that the LSU is cleaved by reactive-oxygen-species produced by bound Fe²⁺ and that the fragmentation is probably proximity and orientation dependent. Interestingly, EDTA promoted the cleavage at G329 and led to a new cleavage at R303, but inhibited other fragmentation. G329 and R303 are not only close to but also exposed to K334. Therefore, it indicates that interaction of H₂O₂ with K334 followed by reaction of these H₂O₂ with free Fe-EDTA may be also involved in the fragmentation.

1pB04

暗所下のコムギ葉におけるRubisco分解

石田宏幸¹, 榎本剛士¹, 千葉啓¹, 牧野周¹, 前忠彦¹
(¹東北大院・農)

植物個体や切離葉を暗所に移すとRubiscoの分解が促進される。この際、葉緑体が液胞に取り込まれるとする報告がある一方で、細胞あたりの葉緑体数は変化しないとする報告もあり、そのメカニズムについて統一的な見解は得られていない。本研究では、暗所下に置いたコムギの着生葉におけるRubisco分解の特性について調べた。

はじめにRubisco、GS2、CA、LHC II、Cyt f、CF₁の6種類の葉緑体タンパク質量の変動について比較した。暗所区ではそれら全てのタンパク質量の減少が明所より促進されたが、減少の程度及び開始時期についてはそれぞれのタンパク質間で差異が見られ、一様ではなかった。Rubisco量が処理開始前の25%にまで減少した時期において、葉緑体の液胞への取り込みや崩壊の様子は観察されなかった。暗所下ではRubisco-LSUの48 kDaと32 kDaの分解産物ごく微量に検出された。しかしながら³⁵S-Rubiscoを用いたトレーサー実験により、これらの分解産物は*in vivo*で生じたものではないことがわかった。以上の結果から、暗所下のコムギ葉においても、Rubiscoは自然老化の過程と同様にその大部分が葉緑体の崩壊が起こる前に、葉緑体内かあるいは葉緑体外に特異的に排出され、速やかに分解されていることが示唆された。

1pB05

葉緑体破碎液におけるRubisco大サブユニットの44-kDaフラグメントへの断片化

国分紀元¹, 石田宏幸¹, 牧野周¹, 前忠彦¹ (¹東北大院・農・応生科)

葉の自然老化の過程において、Rubiscoタンパク質量の減少は葉緑体数の減少より先立って起きていることから、Rubiscoは主に葉緑体内で分解される可能性が示唆されている。本研究では、葉緑体内におけるRubiscoの分解機構を明らかにするため、コムギ葉から単離した葉緑体を用いて、Rubisco分解活性の検出を試みた。

その結果、単離葉緑体の破碎液を、37℃、pH 7.5、暗所下でインキュベートする事で、Rubisco大サブユニット(LSU)が断片化を受け、44 kDaの分解フラグメントが生じる事を見出した。この時のLSUの切断部位を同定するため、44 kDaフラグメントのN末端アミノ酸配列分析を行った結果、LSUはArg-41のN末端側で切断を受けていることが明らかになった。この断片化は、ロイペプチン、E-64、DFP、PMSFにより阻害されなかった。また、サーモリシン処理した葉緑体破碎液をインキュベートした場合にも、その出現が認められた。これらの結果から、44 kDaフラグメントへの断片化は葉緑体内に存在する因子により引き起こされる事が強く示唆された。

現在、このLSUの断片化を担う因子の特定に向けて検討を行っている。

1pB06

炭素欠乏と強光条件下への応答におけるLysR型調節因子CmpRの役割

高橋由香里¹, 小俣達男¹ (¹名古屋大学大学院・生命農学研究科)

ラン藻の*cmp*オペロンは炭酸水素イオン能動輸送体をコードしており、炭素欠乏下において発現が誘導される。以前に*Synechococcus* PCC 7942の*cmp*オペロンの強光による誘導が報告されているので、空気通気条件下、弱光から強光条件へシフトさせたところ*cmp*オペロンの誘導が確認された。*cmp*オペロンの炭素欠乏による活性化に関わるCmpRの欠損株では強光による*cmp*オペロンの活性化も見られなかったため、*cmp*オペロンの強光による誘導は、炭素欠乏による誘導と本質的に同じ現象であると結論した。一方、強光誘導性遺伝子として知られる*psbA2*, *psbA3*の発現が炭素欠乏によっても誘導されたことから、この場合にも、炭素欠乏と強光は同一の現象としてラン藻に感知されていることがわかった。しかし、*psbA2*, *psbA3*の発現誘導はCmpR欠損株でも起きたので、CmpR以外の因子により制御されていると考えられる。ただし、*psbA2*, *psbA3*の発現量はCmpR欠損株で有意に低下していたので、CmpRが従来、その存在が指摘されてきた*psbA2*, *psbA3*の発現のエンハンサータンパク質であると推定した。

1pB07

ラン藻 *Synechococcus* PCC7942におけるBCT1の生理的重要性

西村崇史¹, G.D. Price², 小俣達男¹ (¹名古屋大院・生命農学, ²Research School of Biological Sciences, Australian National Univ.)

ラン藻は無機炭素(Ci;二酸化炭素、炭酸水素イオン)を細胞内に能動的に取り込む機構を有しているため、低Ci条件下でも効率的に光合成を行うことができる。この無機炭素の取り込みには、基質の特異性及び親和性の異なる複数の機構が関わっており、近年これらの構造が明らかになりつつある。*Synechococcus* sp. PCC7942においては、炭酸水素イオンに対して高い親和性を示す輸送体(BCT1)が*cmpABCD*にコードされており、低Ci条件下でその発現が誘導される。本研究においては、複数存在する無機炭素取り込み機構の中でのBCT1の役割を検討することを目的として実験を行った。野生株と*cmpAB*欠損株M42を用いて、低Ci条件下(約50ppm)で異なるpHにおける増殖速度を測定した結果、野生株のほうがM42株より増殖が速く、その差はpHが高い場合において顕著であった。また両株を低Ci制限条件下、同一培養槽内で培地を定流速で交換しながら連続的に培養した結果、M42株の細胞数は経時的に減少した。また、培地の流速速度から計算した結果、M42株はほとんど増殖していないことが明らかとなった。これらの結果は、野生株がM42株よりも無機炭素を効率良く取り込んでいることを示すものであり、BCT1が低Ci条件下における無機炭素の取り込みに重要であることが明らかとなった。

1pB08

Mutation of a low-affinity CO₂ uptake system leads to a constitutive, high-affinity state for inorganic carbon uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942

前田真一¹, M.R. Badger², 小俣達夫¹, G.D. Price² (¹名古屋大院・生命農学, ²Research School of Biological Sciences, Australian National Univ.)

The cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 has multiple inorganic carbon (Ci) uptake systems that have different properties and are distinct in substrate specificity (CO₂, bicarbonate). BCT1, encoded by the *cmpABCD* operon, was characterized as a low-Ci inducible high-affinity bicarbonate transporter. Putative CO₂ hydration proteins (ChpX and ChpY) were characterized as involvement in a constitutive low-affinity and an inducible high-affinity CO₂ uptake, respectively. The wild-type cells show a low-affinity state for Ci uptake when grown under high-Ci conditions; the high-affinity state is induced only when cells are exposed to low-Ci conditions. However, the *chpX* mutant was found to show a high-affinity state for Ci uptake even when grown under high-Ci conditions. Northern analysis showed that BCT1 and the high-affinity CO₂ uptake system were expressed in the *chpX* mutant under high-Ci conditions. These results suggest that the low-affinity CO₂ uptake system is involved in the signal sensing of the environmental CO₂ level in cyanobacteria.

1pB09

葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ前駆体 mRNA の組織特異的選択的スプライシングを制御するトランス因子の解析

吉村和也¹, 山田聖¹, 菅野耕作¹, 石川孝博², 重岡成^{1,3} (¹近畿大・農・食栄, ²鳥根大・生物資源・生命工, ³近畿大・院・応生命科)

高等植物葉緑体にはチラコイド膜及びストロマにアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (tAPX, sAPX) が局在し、光照射に伴い常時生成する活性酸素の除去に機能している。葉緑体型 APX は前駆体 mRNA の 3'-領域の選択的スプライシング機構により tAPX と sAPX をコードする 4 種類の成熟型 mRNA が生成している。これまでの解析から、葉緑体型 APX 前駆体 mRNA の 3'-領域に存在する選択的スプライシングの制御のエンハンサーと考えられるシス配列 (SRE) により組織特異的に制御されていることが明らかになった。そこで、SRE を特異的に認識し、葉緑体型 APX の組織特異的選択的スプライシングの制御に関与するトランス因子の解析を行った。RNA-核タンパク質ゲルシフトアッセイの結果、ホウレンソウやタバコにおける葉などの緑色細胞に SRE に特異的に結合する核タンパク質 (トランス因子; Factor X) が存在することが明らかになった。North-western 法による解析の結果、Factor X は核の 20-50% 硫酸アンモニウム画分に分離された。現在、葉緑体型 APX の 3' 末端領域のミニ遺伝子をタバコに導入することによる *in vivo* でのスプライシング解析、North-western 法および酵母の Three-Hybrid system による Factor X の同定を行っている。

1pB10

タバコ由来葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの結晶構造

和田啓¹, 多田俊治¹, 中村祥浩¹, 石川孝博², 藪田行哲³, 吉村和也³, 重岡成³, 西村勁一郎¹ (¹阪府大・先端研, ²鳥根大・生物資源・生命工, ³近大・農・食栄)

〔目的〕高等植物は、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) アイソザイムを中心とする酸素毒防御系を発達させている。APX アイソザイムの特性は、特異的電子供与体であるアスコルビン酸 (AsA) 欠乏下で不安定なことである。特に、葉緑体型 APX のこの性質は他のアイソザイムと比較して最も顕著であり、AsA 非存在下で数秒間のうちに失活する。本研究は、葉緑体型 APX アイソザイムの不安定性の原因を立体化学的側面から解明することを目的とした。

〔方法・結果〕タバコ葉緑体ストロマ型 APX のリコンビナント酵素の立体構造を X 線結晶構造解析法により明らかにした ($R_{work} = 19.7\%$, $R_{free} = 23.4\%$)。本酵素は 12 個のヘリックスから構成され、2 つのドメインを形成していた。また、本酵素と既報の細胞質型 APX の構造との比較を行った。その結果、両者の全体構造はよく似ていたが、本酵素にはヘム近傍に特徴的なランダムコイル構造が存在していた。また細胞質型 APX ではヘムの安定化に His169 が関与していたが、本酵素ではその代わりに Arg169 が配置していた。Arg169 の側鎖はヘム近傍のランダムコイル構造の一部と水素結合を形成しており、ヘムの安定化には関与できない環境にあった。

1pB11

Photosynthetic Acclimation of Rice to Free Air CO₂ Enrichment (FACE) Depend on Carbon and Nitrogen Relationship during Ontogeny

Saman Seneweera¹, Jann Conroy², Kazuhiko Kobayashi³ (¹Dept. of App. Plant Sci., Grad. Schl. of Agri. Sci., Tohoku Univ., ²Centre for Hort. and Plant Sci., Univ. of Western Sydney, NSW 2753, Australia, ³National Inst. of Agro-Envi. Sci.)

Relationships between photosynthetic acclimation and changes in the balance between source-sink supply and demand of carbon (C) and nitrogen (N) were tested. Plants were grown at ambient CO₂ or free air CO₂ enrichment (FACE, 26-32 Pa above the ambient). Photosynthesis (A) and biochemical parameters were measured at eighth and flag leaves representing stages with contrasting balance between C and N supply and demand in sources and sinks. Acclimation due to FACE was pronounced in flag leaves and this was not fully accounted by reductions in leaf N concentrations because A/N and V_{cmax}/N were lower in FACE. Acclimation didn't occur in the eighth leaf and A/N and V_{cmax}/N was unchanged. Growth at FACE increased the number of panicles hence total N demand increased. We conclude that photosynthetic acclimation in flag leaves occurs at FACE due to large N demand for reproductive development relative to current uptake and remobilization.

1pB12

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* 細胞内 β 型カーボニックアンヒドラーゼ遺伝子のプロモーター解析
原田尚志¹, 松田祐介¹ (関西学院大・理)

藻類は、水圏における炭素固定に重要な役割を果たしていると考えられている。これらは一般的に無機炭素濃縮機構 (CCM) を持つことにより、無機炭素に対して極めて親和性の高い光合成を行うことが出来る。我々はこれまでに海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX642) において、細胞内に局在する β 型 carbonic anhydrase (CA; EC 4.2.1.1) が高親和性光合成に必須であることを示し、またこのCA遺伝子及びタンパク質が、生育環境中のCO₂濃度変化に鋭敏に反応して発現制御を受けることを報告した。本研究ではこのCA遺伝子のプロモーター配列をinverse PCRにより単離し、生育環境中のCO₂濃度変化に応答した遺伝子発現調節に関与するシス領域の解析を試みた。さらに数種の海洋性珪藻に対してNorthern解析を行い、海洋性珪藻類における β 型CAの一般性とその役割について考察した。

1pB13

クラミドモナス炭酸脱水酵素遺伝子 *Cah1* の低CO₂誘導に関わるエンハンサーとDNA結合タンパク質の解析
九町健一¹, 能岡智¹, 谷口郁也¹, 大山莞爾¹, 福澤秀哉¹ (京大院・生命科学)

緑藻クラミドモナスはCO₂欠乏条件下で複数の遺伝子発現が誘導される。細胞表層に局在する炭酸脱水酵素をコードする *Cah1* は、5%のCO₂を通気している間は全く発現しないが、0.04%のCO₂を含む大気を通気すると、1時間以内に転写の活性化が起こる。またその活性化には光が必須である。

Cah1 の CO₂ 応答性にはサイレンサー領域とエンハンサー領域が関与している (ref.1)。今回リンカーシキャン解析により、エンハンサー領域に2つのコア配列、EE-1とEE-2を見いだした。ゲルシフト分析を行ったところ、EE-1、EE-2に配列特異的に結合するタンパク質が核抽出液中に存在した。またEE-1プローブに競合DNAとしてEE-2を加えるとタンパク質の結合が阻害されたため、EE-1結合タンパク質はEE-2にも結合すると考えられた。同様にEE-2結合タンパク質はEE-1にも結合すると考えられた。このことからEE-1とEE-2の共通配列がCO₂応答性エンハンサー配列である可能性が示唆された。

1) Kucho et.al. Plant Physiology (1999) 121: 1329-1337

1pB14

RbcSアンチセンスイネの葉の老化 - 葉位別に見た光合成キーコンポーネントの変化について -
石塚道生¹, 牧野周¹, 鈴木雄二¹, 前忠彦¹ (東北大・院・農・応用生命科学)

私達は、イネ *rbcS* アンチセンス遺伝子を導入し、Rubisco量を特異的に減少させた形質転換体イネを作成している。この *rbcS* アンチセンスイネは、Rubisco量の減少が確認される一方、Rubisco量の減少分に相当するChl、Cyt f、SPSなどの量的増加が認められた。本研究では、このアンチセンスイネの葉の葉位別葉身における光合成系の各キーコンポーネントの変化について調べた。

RbcS アンチセンスイネは、草丈や葉齢には非形質転換体イネと大きな差はなかったが、基数の減少が認められた。また、上位葉での葉面積の拡大が認められた。ChlやSPS酵素活性、およびNADPH-G3PDH、Cp-FBPase、Ru5P kinaseなどのカルビンサイクルの酵素活性においては、非形質転換体イネと大きな差は認められなかった。しかし、Rubisco量においてのみ、下位葉においてその減少が明らかに抑えられていた。しかしながら、*rbcS* mRNA、*rbcL* mRNA量は、非形質転換体イネと同様、下位葉でほとんど残っていなかった。このことは、*rbcS* アンチセンスイネでは老化葉において、Rubiscoの分解を特異的に抑制するメカニズムが存在することを示唆している。

1pB15

光合成におけるホスファチジルグリセロールの機能
桜井勇¹, 萩尾美樹¹, Zoltan Gombos², 和田元¹ (九州大院・理, ²Biol. Res. Cent., Hung. Acad. Sci.)

植物の葉緑体やラン藻のチラコイド膜は、光合成の初期過程が起こる場であり、脂質二重膜を形成する脂質と光エネルギー変換に関与したタンパク質から主に構成されている。チラコイド膜に含まれる脂質の多くは糖脂質であるが、その中でホスファチジルグリセロール (PG) は、唯一のリン脂質として存在し、光合成において重要な機能を持つと考えられている。我々の研究室では、これまでに、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 からPG合成欠損株を単離し、PGが同株の生育に必須であり、かつ、光合成において重要な役割をもつことを明らかにしている。

本研究では、変異株のチラコイド膜におけるPG含量の低下にともなう光感受性の変化について調べ、光合成の光阻害に対するPGの関与について解析した。PG含量の低下した変異株に強光を照射すると、光合成の光阻害がおこったが、PGを再添加すると低下した光合成活性は短時間で回復した。しかし、この際タンパク質合成を阻害しておくことで活性の回復は起こらず、更に活性は低下した。また、この回復は、PGの分子種に依存し、不飽和脂肪酸を結合したPG分子種の方が、飽和脂肪酸を結合したPG分子種に比べてより効果的であった。これらの結果はPGが、強光下で生じる光合成活性の回復の過程において重要な働きをもつことを示している。

1pB16

アイズプラントのCAM化に伴うプラスチドリ酸輸送体の転写産物量の変化

是枝晋¹, Cushman John C.² (1埼玉大・理, 2ネバダ大・生化学)

高等植物プラスチドのリン酸輸送体には、トリオースリン酸 (TP) と無機リン酸 (Pi) のみを輸送するもの (TPT)、それらに加え、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) も輸送するもの (PPT)、グルコース6-リン酸 (G6P) も輸送するもの (GPT) の3種類がある。多肉植物型酸代謝 (CAM) 型アイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) の葉緑体は通常のC3植物の葉緑体も輸送するPiとTPに加え、PEPとG6Pも輸送することが知られており、PPTとGPTとはCAMにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。

我々はC3型およびCAM型アイズプラントの葉から約1万個のESTクローンを単離し、データベース化した。現在までにこの中に、Hauslerらが報告した3つ (TPT1、PPT1、GPT1) のアイソザイムに加え、さらに3つ (PPT2、PPT3、GPT2) をコードすると思われるESTを見出している。これらに加え、CAM化で誘導されるPEPカーボキシラーゼ遺伝子 (PPC1) の転写産物量の日周変化を半定量的RT-PCR法を用いて、C3型とCAM型の葉で比較した。PPC1、GPT1、GPT2はC3型ではほとんど発現が見られなかったが、CAM型では特に明期で強く発現していた。PPT1もCAM化に伴う誘導が見られたが、C3型でも一日を通じて比較的強い発現が見られた。これらに対し、TPT1とPPT2とはC3型でもCAM型でも大差なく一日を通じて発現していた。

1pB17

シロイヌナズナP1?ゼータクリスタリンはタバコ葉中に酸素依存的電子プールを形成する

真野純一¹, Enric Belles-Boix², Elena Babychuk², Marc Van Montagu², Dirk Inze², Sergei Kushnir², 浅田浩二³, Luit Slooten⁴ (1山口大・農, 2ゲント大, 3福山大・工, 4ブリュッセル自由大)

酵母に酸化的ストレス耐性を与える因子としてシロイヌナズナcDNAからクローニングされたP1-ゼータクリスタリン (P1-ZCr) はキノンとアゾジカルボニル化合物に特異的なNADPHレダクターゼである。P1-ZCrの植物での生理的機能を解明するために、P1-ZCr遺伝子を過剰発現させたタバコ株を作成した。過剰発現株はP1-ZCr遺伝子を導入しない対照株に比べ、メチルピオローゲン耐性が高かった。過剰発現株の電子伝達速度およびCO₂固定速度は、2% O₂/0.2-0.5% CO₂では対照株より大きかったが、空気条件下ではCO₂固定収率の低下が過剰発現株でより大きかった。一方、過剰発現株は開花後の葉の老化時、葉周縁の壊死が顕著であり、種子の収率が低かった。過剰発現株では、P1-ZCrのキノンレダクターゼ反応に伴うラジカル連鎖反応によってO₂依存的な電子シンクが形成され、光合成産物の損失が大きくなったと考えられる。

1pB18

トウモロコシの葉位/葉齢と光合成特性との関係
深谷泰子¹, 吉岡尚子¹, 酒井敦¹ (1奈良女子大・理)

トウモロコシ (*Zea mays*) は代表的なC₄植物であるが、第一葉や老化葉はC₃的な光合成特性を示すという報告もある (Crespo *et al.* 1979, Williams and Kennedy 1976)。我々はトウモロコシ (品種Goldencross buntam T51) の芽生えを用いて、葉位/葉齢による光合成特性変化の可能性を再検討した。まず葉位の違いについて調べた結果、第一葉、第二葉、第三葉は、成熟直後にはいずれも低いCO₂補償点 (数ppm)、Kranz構造、C₄型PEPC遺伝子の発現など、C₄型光合成に特徴的な性質を示すのに対し、幼葉鞘は400-600ppmと異常に高いCO₂補償点を示し、Kranz構造やC₄型PEPC遺伝子の発現も見られないことから、C₃型光合成を行っていると考えられた。次に、第一葉の老化にともなう変化を調べた結果、CO₂補償点は老化とともに急激に上昇すること、維管束鞘細胞よりも葉肉細胞の方が早く老化の兆候が現われることが分かった。また、western解析の結果、老化にともなってPEPC/Rubisco比が低下することが分かった。これらの結果から、老化葉がC₃的な光合成特性を示すのは、葉肉細胞が先に老化し、CO₂濃縮機能が低下するためであることが示唆された。これらの結果に基づき、葉位/葉齢による光合成特性変化の意味について考察する。

1pC01

イネサイトゾル型グルタミン合成酵素遺伝子にレトロトランスポゾンTos17が挿入された変異体の解析
田淵真由美¹, 早川俊彦¹, 佐藤雅志², 山口淳二³, 山谷知行^{1,4} (1東北大・院農・応用生命科学, 2東北大・院生命科学, 3北大・院理・生物科学, 4理研・PSC)

イネのサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1) は、免疫組織化学的解析などにより、篩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主として関与していることが示唆されている。本研究では、この生理機能についてGS1欠損変異体を用いて証明することを目的とした。

イネの内在性レトロトランスポゾン Tos17 を転移させて作製されたイネ「日本晴」遺伝子破壊系統群 [イネゲノムプロジェクト、ミュータントパネル (廣近、宮尾)] より、GS1遺伝子上にTos17が挿入されていると予想される系統の当代の種子を分譲していただいた。ガラス室内で土耕法により生育させ、ゲノミックサザンロットにより解析したところ、GS1遺伝子第8 exonにTos17が挿入された遺伝子がホモ接合体となった変異体が20個体のうち4個体得られ、11個体がヘテロ接合体であり、5個体はGS1上にTos17は挿入されていなかった。ホモ接合体として挿入された変異体は、生育が遅延し、個体は細く小さく、出穂から開花の日数も長く、ほとんどが登熟しなかった。この表現型は、GS1が正常な生育に必須であることを示している。現在、変異体のGS1に関する生化学的解析を進めている。

1pC02

形質転換イネを用いたサイトゾル型グルタミン合成酵素の機能解析

半澤咲子¹, 松村志保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)

イネにおけるサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1) は、老化器官から師管を介して転流される窒素の主形態であるグルタミンの合成に機能している可能性が強く示唆されている。そこで本研究では、イネにおけるGS1の生理機能をより直接的に証明することを目的として、転写開始点から上流域約2.5kbのGS1プロモーターに、GUS遺伝子とイネGS1cDNAをそれぞれ連結した融合遺伝子を、アグロバクテリウム法によりイネ(ササニシキ)に導入した形質転換体を作成した。GUSを導入した形質転換体において、GS1プロモーターの発現組織内分布を調べたところ、葉身、葉鞘の師部維管束組織に特異的に発現しており、GS1タンパク質の組織内分布と一致した。また根、穂などにおいても維管束組織に特異的な発現が見られ、葯では葯壁周辺にシグナルが得られた。一方、GS1cDNAをセンス方向で導入した形質転換体は26ライン作出された。これらのGS1タンパク質の含量をウエスタンブロット法で定量したところ、野生型のGS1タンパク質含量と比較して、25%から180%変化しているラインを得ることができた。現在これらのラインについてより詳細な解析を行い、GS1タンパク質含量の増減がイネの生育に及ぼす影響について検証中である。

1pC03

イネの老化葉身におけるサイトゾル型グルタミン合成酵素及び生長中の葉身におけるNADH依存性グルタミン酸合成酵素タンパク質含量に関するQTL解析

小原実広¹, 佐藤雅志², 山谷知行^{1,3} (¹東北大・院農・応用生命科学, ²東北大・院生命科学, ³理研・PSC)

イネの窒素転流には、老化葉身におけるサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1) と生長中の器官におけるNADH依存性グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) が重要な機能を担っていることが示唆されている。窒素転流を制御している機構全体を解明する目的で、老化葉身におけるGS1並びに生長中の葉身におけるNADH-GOGATタンパク質含量を規定している遺伝子座のマッピングを行った。

日本型イネ Nipponbare 及びインド型イネ Kasalath に由来する98系統の戻し交配系統群 (BILs) を、ガラス室内にて土耕法により生育させた。イムノブロット法によりタンパク質含量を定量したところ、BILsにおいて新鮮重当たりのGS1並びにNADH-GOGAT含量に超越分離が認められた。QTL解析を行ったところ、GS1含量を規定しているQTLが7個、NADH-GOGAT含量を規定しているQTLが6個検出された。それらのQTLが検出された領域には、新鮮重当たりの可溶性タンパク質含量、主稈の穂重量及び全粒数、一粒重、クロロフィルの減少速度を規定しているQTLが検出された。このことは、この集団においてGS1及びNADH-GOGAT含量の変異により、窒素の再利用効率が変化した結果であると考えられた。

1pC04

イネの老化葉身におけるGS1含量および穂重量を規定している第2染色体上のQTLに関する連鎖解析および特徴付け

佐々木昌平¹, 小原実広¹, 榎葉健二¹, 佐藤雅志², 矢野昌裕³, 蛭谷武志³, 山谷知行^{1,4} (¹東北大・院農・応用生命科学, ²東北大・院生命科学, ³生物研, ⁴理研・PSC)

日本型品種Nipponbareとインド型品種Kasalathに由来する98系統のBILsを用いた解析より、イネの第2染色体上に老化葉身のGS1含量、主稈の穂重量及び全粒数に関するQTLの存在が見いだされた。本研究では、このQTLの詳細な位置付け及び機能の推定を目的とし、その分離集団あるいは自殖後代を用いて解析を行った。

遺伝背景である日本型品種KoshihikariとKasalathに由来し、第2染色体上の目的領域のみが分離した遺伝型となつているC系統群42個体を土耕法により栽培を行った。収量形質に関する連鎖解析を行った結果、第2染色体上のマーカーR1843の近傍に主稈の穂重量及び全粒数を規定するQTLが位置付けられた。

次にC系統の自殖後代から、目的のQTLを含む約50cMの領域のみがKasalath由来の染色体断片で置換された系統であるC-22を選抜し、ガラス室並びに水田で栽培した。その結果、Koshihikariに比較してC-22は栄養生長の初期において分けつ数が30-80%多く、最終的な穂数も最大で約30%多かった。またC-22は個体あたりの穂重量が大きく、特に低窒素処理区でこの傾向が強かった。よって目的のQTLは、分けつおよび穂の分化に機能していると推定された。現在、GS1含量との関連性を検証するとともに原因遺伝子を特定するため解析を行っている。

1pC05

イネGlnDホモログ遺伝子の単離とその発現特性の解析

早川俊彦¹, 伊藤貴司¹, 山谷知行^{1,2} (¹東北大院・農, ²理研・PSC)

大腸菌や窒素固定細菌では、glnD遺伝子産物のUridyl transferaseが、細胞内のグルタミンと2-オキシグルタル酸の濃度比を検知し、PIIタンパク質を介して、下流のNtrB/NtrC二成分制御系へ情報伝達して、最終的にグルタミン合成酵素遺伝子の発現を制御する。演者らは、イネにおける細胞内窒素ステータス検知システムを解析する第一歩として、イネからGlnDホモログ遺伝子を単離した。

イネEST検索の結果、Rhizobium GlnDとアミノ酸レベルで有意な相同性を有する独立した2種のESTクローン(部分断片EST; C10149 (OsGlnD1)、完全長EST; C12549 (OsGlnD2))を見出した。OsGlnD1については、イネ根から5', 3'-RACE法により完全長cDNAを単離した。OsGlnD1とOsGlnD2は、ともに分子量51 kDaのポリペプチドをコードし、両者のアミノ酸レベルでの相同性は89%と高かった。サザン解析の結果では、イネでは両ホモログ遺伝子ともに単一遺伝子であると示唆された。OsGlnD1遺伝子は、転流窒素が著しく流入するイネ未抽出葉身で主に発現し、かつ、OsGlnD1翻訳産物はミクロゾーム画分に検出された。現在、これらイネGlnDホモログ遺伝子産物のさらに詳細な発現蓄積特性を解析している。

1pC06

イネGS/GOGATサイクルへの2-オキソグルタル酸供給系の解明

安彦友美¹, 牧英樹¹, 潮田明子¹, 早川俊彦¹, Michael Hodges², 山谷知行^{1,3} (¹東北大・院農・応用生命科学, ²IBP (CNRS UMR8618), Universite Paris XI, Orsay, France, ³理研・PSC)

イネは主にアンモニアを窒素源として吸収し、GS/GOGATサイクルにより同化を行う。このサイクルにおいて、2-オキソグルタル酸(2-OG)は炭素骨格をN代謝に渡す役割を果たす。つまり、GS/GOGATサイクルはCとNの接点となる反応である。窒素代謝や転流については多くの研究がなされてきたが、2-OGの供給系については明らかとされていない。そこで本研究では、2-OGを生成するNAD型およびNADP型イソクエン酸脱水素酵素(IDH、ICDH)、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)の3種酵素に注目し、GS/GOGATサイクルへの2-OGの供給系の解明を目的とする。

まず第一歩として、イネの第10葉の葉身、葉鞘、穎果を対象にin vitro系で活性測定を行った。いずれの器官においても、ICDHの2-OG生成能が高いことが示された。そこで、抗タバコICDH抗体を用いて組織局在性を観察したところ、ICDHは穎果の背部維管束に特異的にシグナルが検出され、NADH-GOGATの組織局在性と近似していることが判明した。

一方、IDHの機能を探るため、タバコIDHの配列をもとに、イネIDH cDNAをPCR法により単離した。IDHaは全長を含む1080bpを、またIDHcについては3'末端断片の810bpの配列を決定した。現在、遺伝子産物の発現解析を進めている。

1pC07

イネ培養細胞における硝酸による非共生型ヘモグロビンの誘導

大脇良成¹, 川岸万紀子², 若狹暁², 米山忠克³, 藤原伸介¹ (¹中央農研, ²作物研, ³東大院・農学生命科学)

植物には共生型ヘモグロビン (symbiotic Hbs) と非共生型ヘモグロビン (non-symbiotic Hbs) の2種のヘモグロビンが存在することが知られている。non-symbiotic Hbsは植物に広く存在するが、その機能や誘導因子についてはほとんど明らかになっていない。そこで、non-symbiotic Hbsの窒素同化における機能を明らかにするため、イネの懸濁培養細胞を用いて、non-symbiotic Hbsの誘導に対する培地の窒素形態の影響について検討した。イネの懸濁培養細胞を、硝酸態窒素および有機体窒素を窒素源として生育させ、細胞内のnon-symbiotic Hbタンパクの変動をウエスタンブロットにより解析したところ、硝酸を窒素源として生育させた場合、培養開始後数時間以内にnon-symbiotic Hbタンパクの増加が認められた。一方、有機体窒素を窒素源とした場合、細胞中のnon-symbiotic Hbタンパクは低く推移し、培養期間中における大きな変動は認められなかった。また、細胞中のnon-symbiotic Hbタンパクは、培地の硝酸濃度依存的に増加する傾向にあった。これらのことより、イネ培養細胞において、non-symbiotic Hbsは硝酸により誘導を受けることが明らかになった。このイネ培養細胞におけるnon-symbiotic Hbタンパクの誘導パターンは、硝酸還元酵素活性の誘導パターンと類似しており、硝酸によるnon-symbiotic Hbsの誘導において硝酸還元酵素が何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

1pC08

菌体外多糖類合成および共生窒素固定能を欠くミヤコグサ根粒菌変異株 $exo-22$ の遺伝的解析
三島絵里奈¹, 温子 今泉(安楽)², 川口正代司², 佐伯和彦¹ (¹阪大・理, ²東大・総合文化)

根粒菌の菌体外多糖類 (EPS) と菌体外膜のリポ多糖 (LPS) は、マメ科植物と共生関係を成立させる過程で、根粒菌が宿主植物の防御反能を免れるために重要な機能を果たすことが知られている。ミヤコグサ根粒菌 $exo-22$ は、Calcofluor培地で蛍光を示さないことを指標に単離されたTn5変異株のひとつで、EPS合成変異形質(Exo)と窒素固定能欠失形質(Fix)を示す株である。この株はゲノム上の領域を少なくとも20kbpに渡って欠失している。

本研究では2種の形質異常に関わる遺伝子の同定を目指して、1) 部分部分的に重複するコスミド群、2) 相補クローンのインサート部分を短縮したプラスミド群と、3) 相補クローンにミニ・トランスポゾン挿入した派生物群を用いて、相補実験を行った。この結果、*Salmonella typhimurium*の膜内在性trans-acylase (OafA) 類似物がExo-形質に必須であることが判明した。OafAとこの類似物の間のidentityは29%、similarityは45%であった。

また、Fix-の形質については、候補遺伝子を3つのORFに絞り込み、相補実験と同時に個別遺伝子の破壊実験を行っている。

1pC09

ミヤコグサを用いたアクティベーションタグラインの作製

今泉隆次郎¹, 亀谷七七子², 中村郁郎², 綾部真一¹, 青木俊夫¹ (¹日本大・生物資源・応用生物, ²千葉大院・自然科学)

アクティベーションタギング法は、エンハンサーエレメントの植物への無作為な導入により機能獲得型突然変異体を作成する方法である。本法をマメ科モデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に適用することにより、マメ科に特徴的な共生窒素固定能や(イソ)フラボノイド代謝などに関する新規遺伝子の単離が期待される。本研究では、3コピーのCaMV35S エンハンサーを持ち、さらにエクソントラップ効果も期待できる多機能タギングベクターpEKB35S EXTraを、*Agrobacterium tumefaciens* EHA101株を用いてミヤコグサ B-129Gifu系統の胚軸に導入した。これに先立ち、ジュネティシンによる形質転換体選抜条件をモデルプラスミドpIG121Hmを用いて検討した結果、ジュネティシン50mg/lが最適選抜濃度であることがわかった。現在、独立1000系統を目標にアクティベーションタグラインを作製中である。pIG121Hm形質転換体の再分化率および選抜効率(ジュネティシン耐性個体中の形質転換体比率)が11%および55%であったのに対して、pEKB35SEXTraを導入したタグラインではそれぞれ36%および100%と大きく改善され、また再分化までの期間が平均38日から平均30日へと短縮されていた。この1つの原因として、選抜マーカー遺伝子の発現がエンハンサーの作用によって活性化されたことが考えられた。

1pC10

マメ科植物における芳香族アミン β -phenethylamine の生成について

寺門純子^{1,2}, 藤原伸介² (1) 科技団・科技特, ² 中央農業総合研究センター)

マメ科植物は根粒菌の感染により根に根粒を形成し、根粒菌の固定した大気窒素を利用している。この高等植物と微生物の相互作用の結果生じる根粒組織の内部では、非共生時には現れない特異な機能が発現する。今回、私達は多くのマメ科植物に芳香族アミンの一種、 β -phenethylamine (β -PHA) が根粒組織に特異的に出現することを見出した。また、非マメ科植物の樹木を含む多種植物の根粒組織中における β -PHA の分布を調べた結果、*Bradyrhizobium* との共生によって生じる根粒中のみで β -PHA は検出され、根粒の成熟に伴う濃度の上昇および老化に伴う減少が確認された。さらに、これらの根粒をバクテロイドとサイトソル画分に分離し、それぞれの画分の β -PHA を測定した結果、 β -PHA はバクテロイド画分から高濃度に検出され、サイトソル画分中の検出濃度は低かった。また、アズキ根粒から分離した根粒菌など各種根粒菌を液体培養し、菌体内 β -PHA の存在を調べた結果、いずれの培養根粒菌からも検出されなかった。以上の結果から、 β -PHA は根粒内のバクテロイド中で特異的に生産されることが明らかになった。今後、根粒内における β -PHA の生成条件や生産された β -PHA のバクテロイド内での機能、根粒形成過程や窒素固定に与える影響などを明らかにする必要がある。

1pC11

全ゲノム塩基配列情報に基づくミヤコグサ根粒菌の網羅的遺伝子発現解析

内海俊樹¹, 大和田琢二², 折笠善丈², 南澤究³, 三井久幸³, 板倉学³, 金子貴一⁴, 田畑哲之⁴, 横山正⁵, 手島光平⁵, 佐伯和彦⁶, 大森博文⁶, 室岡義勝⁷, 林誠⁷, 田島茂行⁸, 野村美加⁸, 下村憲司朗⁸, 阿部美紀子¹, 鈴木章弘¹, 下田宜司¹ (1) 鹿児島大・理, ² 帯広畜大・生物資源, ³ 東北大院・生命科学, ⁴ かずさDNA研究所, ⁵ 東京農工大・農, ⁶ 大阪大院・理, ⁷ 大阪大院・工, ⁸ 香川大・農)

日本で全ゲノム塩基配列が解読されたミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株の全ゲノム塩基配列情報 (7.6 Mb, 7281 ORFs) に基づいて、M13 リソースから 3832 クローンを選択し、ほぼ全ゲノムをカバーするマクロアレイを作成した。ミヤコグサ根粒菌の培養菌体と根粒中のバクテロイドから抽出した RNA を鋳型とし、³²P 標識 cDNA を合成した後に、ハイブリダイゼーションを行った。共生によって約 200 のクロノンの発現量が 10 倍以上上昇し、共生アイランドの発現量上昇が目立った。フラボノイド添加や飢餓条件下の結果についても報告する予定である。

1pC12

ダイズ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遺伝子の発現制御機構

中川知己¹, 高根健一², 泉井桂^{1,3}, 河内宏², 畑信吾^{1,3} (1) 京大院・農・植物生理, ² 生物研・窒素固定, ³ 京大院・生命・分子代謝)

ダイズ根粒には、非常に高い相同性を示す 2 種類の PEPC 遺伝子が存在し、*GmPEPC7* が根粒特異的で高レベルの発現を示すのに対して、*GmPEPC15* は植物体各器官で低く発現する。我々はレポーター遺伝子を用いた *GmPEPC7* プロモーターの 5' 末端からの削り込み実験により、転写開始点上流 -466 ~ -400 の領域 (シス A) が根粒における発現に必須であるという知見を得た。そのうえ *GmPEPC7* と *GmPEPC15* は 5' 上流領域においても非常に高い相同性を有するが、*GmPEPC7* プロモーターのシス A を *GmPEPC15* の対応する領域と置換すると活性が消失した。さらに根粒核抽出液を用いたゲルシフトアッセイを行ったところ、シス A の下流の -400 ~ -318 の領域 (シス B) において、*GmPEPC7* に特異的に結合するタンパク質が検出された。*GmPEPC7* におけるこれら 2 つの領域を *GmPEPC15* プロモーターに移植する gain-of-function 実験を行ったところ、シス A のみを移植したプロモーターは、根粒において低い活性を発揮した。しかしシス A と共にシス B を移植したプロモーターは、根粒特異性を維持したまま非常に強い活性を示した。削り込み実験でシス B のみではプロモーター活性がないことが示されていることから、シス A は根粒特異的な発現を一義的に規定しており、シス B はこれに対する増幅エレメントであることが推測された。

1pC13

ミヤコグサにおけるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) と PEPC キナーゼの発現解析

泉智子¹, 中川知己², 馬場真里¹, 梅原洋佐³, 河内宏³, 泉井桂^{1,2}, 畑信吾^{1,2} (1) 京都大・院・生命科学, ² 京都大・院・農, ³ 農業生物資源研究所)

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) は、マメ科植物の窒素固定根粒において、炭素代謝の中心的役割を果たしている。また PEPC は、PEPC-PK による特異的なリン酸化によって活性調節されることが知られている。

今回、ミヤコグサ根粒 cDNA ライブラリーより、前回報告した *LjPEPC1* (2000 年会発表) に加えて新たに *LjPEPC2* をクローニングした。系統樹解析により、*LjPEPC1* はアミド植物の根粒に高発現する PEPC と同一のクラスターに分類されたが、*LjPEPC2* はかなり離れた関係にあることが判明した。かずさ DNA 研究所のミヤコグサ EST データベースを検索した結果、ミヤコグサのゲノムにおいて PEPC は *LjPEPC1* と *LjPEPC2* の 2 遺伝子が存在し、PEPC-PK は *LjPEPC-PK* の 1 遺伝子のみが存在することが示された。2 つの PEPC は共に、*LjPEPC-PK* によるリン酸化部位と推定されるセリン残基 (Ser11) を有していた。また *LjPEPC-PK* の組換えタンパク質を作製し、*in vitro* においてその活性を証明した。ノーザン解析より、*LjPEPC2* は主に地上部で発現し、*LjPEPC1* は根粒において高発現することが示唆された。*In situ hybridization* の結果、*LjPEPC1* と *LjPEPC-PK* は、根と根粒において同様な部位に発現がみられた。

1pC14

Proteome Analysis of Differentially Displayed Proteins in Mitochondria from Soybean Roots and Nodules

Hoa Le Thi Phuong¹, 松島弘和², 野村美加², 田島茂行²
(¹愛媛連合大院・農, ²香川大・農)

The symbiosis between legumes and nitrogen-fixing bacteria involves in many differentiation steps in nodule formation and in establishing new metabolic systems. In this process differentiation of mitochondria was supposed to adapt to low oxygen concentration in nodules. To elucidate molecular mechanism occurring in mitochondria during symbiosis, proteome analysis of differentially displayed proteins was surveyed.

Mitochondria from root and nodules of soybean (*Glycine max* L.Merr.) inoculated by *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 were isolated and purified by Percoll and PVP gradient centrifugation. Mitochondria fraction was separated into two bands (light and heavy) by PVP gradient centrifugation. Cytochrome c oxidase activity was present in both fractions. After breaking mitochondria, two-dimensional gel electrophoresis was used to identify proteins extracted from those fractions. Total protein image visualized by silver staining showed many differences between nodule mitochondria and root mitochondria. Identification of these proteins by peptide-finger printing with MALDI-mass spectrometry is underway in our laboratory.

1pC15

アンチセンス法によるウリカーゼ発現生理的意義の解析

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, 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80の形質転換個体から種子(T1)を得ている。そこでT1世代に対しての、サザンブロット、ノーザンブロット解析結果および、各器官の発達や根粒形成、ウリカーゼ活性、窒素固定能などの観察結果より、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。

1pC16

Expression Analysis of SNARE-like genes in *Lotus japonicus*

Ha MaiThu¹, 福家貴子¹, 野村美加¹, 竹川薫¹, 浅水恵理香², 田畑哲之², 田島茂行¹
(¹香川大・農, ²カズサDNA研究所ケンキュウジョ)

The orderly transport of proteins within the secretory pathway of eukaryotic cells is mediated by the recognition of donor membrane-derived vesicles with distinct target organelles. This process involved in integral membrane proteins called SNAREs on vesicle surface (v-SNAREs), target membrane (t-SNAREs).

From EST clones of *Lotus japonicus*, we obtained SNARE-like clones (Sn6, Sn66, Sn72, Sn35) showing high homologies to SNARE genes from yeast and *Arabidopsis*. After complete DNA sequencing of the clones, homologies and protein structures were analyzed by computer search. Northern-blot experiments revealed Sn6 (Sed5 type) expression only in nodule tissue, not in leaf, root and stem tissues while Sn35 expression in both leaf and stem, not in the nodule. These data suggested some of SNARE-like genes express in tissue specific manner. At present, *in-situ* hybridization experiments are carried out to get data of localization of the expression of these genes in *Lotus japonicus*.

1pC17

Phylogeny and Diversity of Malic Enzymes Among Local Rhizobia from Thailand.

Suphawat Sinsuwongwat¹, Achara Nuntagij², 野村美加³, 田島茂行³
(¹Fac. of Agro-Industry, Chiangmai Univ., ²Biological Nitrogen Fixation Resource Center, Dept. of Agriculture, ³香川大・農)

The microorganisms in nodule of leguminous plants play a significant role in nitrogen fixation to promote plant growing. We were identified twenty-six isolates from nodule of various host plants by a 16S-rRNA gene analysis. Nucleotide sequences were related to *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium galegae* than others nitrogen fixing bacteria. Assay of DME and TME activities were performed in all isolates and other 19 *Bradyrhizobia*. Thirty-five *Bradyrhizobium* sp. and 5 *Rhizobium* sp. possessed higher DME activity than those of TME activity. Five *R. gallicum* as main symbionts of *S. rostrata* nodule showed reverse tendency of malic enzyme activities. The sequence of ME-6,7 probe showed higher homology to NAD malic enzyme genes of *M. loti* and *S. meliloti*. ME-6,7 probe detected malic enzyme genes in broad range of symbiont with strong signal at size 6.5, 9.4 and 23.1 Kb.

1pC18

ダイズ根粒ウリカーゼ遺伝子の発現調節機構

廣田敦子¹, 高根健一², 中川知己³, 畑信吾³, 田島茂行¹, 河内宏² (¹香川大・農, ²農業生物資源研究所, ³京都大・農)

ウリカーゼは、マメ科植物根粒中で非感染細胞のパロキシソームに局在し、尿酸を酸化分解してアラントインやアラントイン酸といったウレイドの生成に関与する。よって、ウレイドを転流する根粒において固定窒素の同化に必要な不可欠な酵素である。

我々は以前、わずかに構造の異なる二つのウリカーゼ遺伝子、GmUR2、GmUR9をダイズより単離した。両遺伝子は共に通常非感染組織で非常に弱く転写されているが、根粒組織においてはGmUR9のみがきわめて強い発現を示す。これらの遺伝子の5'-上流域とGUS遺伝子を融合させたキメラ遺伝子を作成し、削り込み実験、他の植物とのウリカーゼ遺伝子5'-上流域の比較、loss-of-function実験、及びgain-of-function実験を行った結果、プロモーター領域に存在する"GTAATG" (Box I) というモチーフが非感染細胞特異的な発現に必要であることが示された。次に、ウリカーゼ遺伝子のプロモーター領域に由来するDNA断片と、ダイズ根粒の核タンパク質を用いたゲルシフトアッセイ及び、コンペティションアッセイを行った結果、根粒核タンパク質中にBox Iを含む領域と特異的な結合活性を示す因子の存在が確認され、さらにBox Iとその両側10bpを含む26bpの領域内に根粒非感染細胞特異的な発現に必要なcis-elementが存在することが示された。

1pD01

シアノバクテリアkai時計遺伝子の転写制御

中平洋一^{1,2}, 片山光徳^{1,2}, 岩崎秀雄^{1,2}, 近藤孝男^{1,2} (¹名古屋大・理, ²CREST)

シアノバクテリア (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) のkaiABC時計遺伝子群は概日時計の機能にとって必須なタンパク質をコードしている。KaiCがkaiBCプロモーターの活性を抑制し、KaiAが促進因子としてはたらくことによって遺伝子発現の自己制御ループが振動していると考えられる。しかしながら、Kai蛋白質がどのようなメカニズムによって自己の転写を制御しているのかは不明である。本研究では、まずランダムなゲノム断片を発光レポーターの上流につなげたプロモーター・トラップ・ライブラリーを作製し、KaiC過剰発現株に導入した。その結果、KaiCの一過的な過剰発現が、ほぼ全てのプロモーター活性に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに、概日リズムを失ったkaiBC不活性株に対して、大腸菌由来の典型的なプロモーター (P_{trc}) によって発現させたkaiBCを導入したところ、適当なレベルでの発現誘導によって概日リズムが回復した。以上の結果から、Kai蛋白質はプロモーター特異的な転写制御に関与するのではなく、何らかの基本的な転写機構に作用することによってゲノム全域にわたる転写リズムを制御しており、その一環としてkaiBC遺伝子の自己制御ループが形成されることが示唆された。

1pD02

シアノバクテリアのkaiAkaiC二重突然変異体を用いた概日時計周期決定機構の解析

竹内しのぶ¹, 小山時隆¹, 近藤孝男¹ (¹名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻、科技団)

シアノバクテリアは、昼夜の周期にあわせてくり返される概日リズムを示すことが知られており、そのリズムを生み出す振動体が細胞内に存在すると考えられている。またシアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC 7942で、全ての遺伝子の発現が概日リズムを示すことが知られている。私達の研究室では、ルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに組み込み、概日リズムを生物発光としてモニターしている。野生型は約24時間周期の概日リズムを示すが、これまでに24時間以上の長周期、24時間以下の短周期、無周期となるリズム突然変異体が得られている。それらのリズム突然変異体の解析から、時計遺伝子であると考えられる3つの隣り合ったkaiA, kaiB, kaiC遺伝子が同定された。それらは振動体で中心的な役割をになうと考えられるが、周期を安定した24時間に保つ時計機構は未だに不明である。私達は、リズムの周期決定機構をそれらの遺伝子の遺伝学的相関関係から解明しようとしている。リズムの表現型と変異部位が既に分かっているkaiA変異体とkaiC変異体のそれぞれの変異を含む遺伝子を6種類ずつ、相同組み換えを用いて野生型遺伝子と置換し、二重突然変異体を作製した。それらの概日リズムの周期を、野生型やそれぞれの単一突然変異体のリズムの周期と比較することによって、それらの遺伝学的相関関係を調査する。

1pD03

多数のkaiC変異体によるシアノバクテリアの概日振動発生機構の解析

今井圭子^{1,2,3}, 中平洋一^{1,2,3}, 岩崎秀雄^{1,2,3}, 西脇妙子^{1,2,3}, 近藤孝男^{1,2,3} (¹名古屋大学大学院理学研究科生命理学, ²CREST, ³JST)

これまでに、シアノバクテリアの概日振動の発生がkai遺伝子の発現制御に起因することが示されてきた。本研究ではこの振動発生のフィードバックループの中核と考えられているkaiCの多数の変異体を作成し、kaiBCの発現レベル、温度や光の環境要因の効果等を比較することにより、KaiCの機能ドメインを同定し、安定した24時間振動を発生し続けるメカニズムを解明する手がかりとすることを目的とした。519個のアミノ酸からなるKaiCを三つの領域にわけ、それぞれの領域についてPCRエラーを利用してランダムに変異を導入し、その変異と概日リズムの表現型との相関を調べた。約900クローンの変異体を作成し、その一部について変異導入部位を特定した。得られた表現型の割合が変異を導入した領域によって偏りがあることがわかり、KaiC上のそれぞれの領域は周期の決定や振幅の維持などの、異なった機能をもつことが示唆された。また、いくつかの光強度によって周期が変化する変異体や、温度補償性が変化する変異体も単離した。Kai蛋白質量の調節機構も含めてKaiCを中心とした振動発生機構について論じる。

1pD04

The APRR1/TOC1 Quintet Implicated In Circadian Rhythms of *Arabidopsis thaliana*: [I], Characterization In APRR1-ox and CCA1-ox Plants

松鹿昭則¹, 山篠貴史¹, 水野猛¹ (1名古屋大院・生命農)

In higher plants, a clock-mediated circadian rhythm is a very old issue in physiology. In *A. thaliana*, molecular genetic studies have begun to shed light on the molecular bases of such biological clocks. Indeed, several *Arabidopsis* genes have been proposed to encode potential clock-associated components, including CCA1/LHY and TOC1. Previously, we identified a novel family of clock-associated proteins, named pseudo-response regulators (APRR1/TOC1, 3, 5, 7, and 9). Intriguingly, each of these APRR-transcripts starts accumulating rhythmically and sequentially after dawn with about 2 h intervals in the order of 9, 7, 5, 3, and 1 (circadian waves). We thus assumed that such light-dependent rhythmic waves of the APRR1/TOC1 family of circadian-associated components are crucially implicated in a biological clock in higher plants. To address this issue further, here we extensively characterized such rhythmic waves of the APRR1/TOC1 quintet in APRR1-ox and CCA1-ox plants.

1pD05

The APRR1/TOC1 Quintet Implicated In Circadian Rhythms of *Arabidopsis thaliana*: [II], Characterization of APRR3

小島正也¹, 中道範人¹, 山篠貴史¹, 水野猛¹ (1名古屋大院・生命農)

Several *Arabidopsis* genes have been proposed to encode potential clock-associated components, including CCA1/LHY and TOC1. Previously, we identified a novel family of clock-associated proteins, named pseudo-response regulators (APRR1/TOC1, 3, 5, 7, and 9). Intriguingly, each of these APRR-transcripts starts accumulating rhythmically and sequentially after dawn with about 2 h intervals in the order of 9, 7, 5, 3, and 1. We thus assumed that such light-dependent rhythmic waves of the APRR1/TOC1 family of circadian-associated components are crucially implicated in a biological clock in higher plants. To address this issue further, here we characterized the APRR1/TOC1 quintet with special reference to APRR3. It was revealed that APRR3 interacts with a novel Ser/Thr kinase, and undergoes phosphorylation. Transcription of this kinase gene also showed a free-running rhythm, coordinately with that of APRR3. We will present intriguing natures of APRR3-ox transgenic plants.

1pD06

イネcDNAマイクロアレイを用いた転写量に日周変動のみられる遺伝子の解析

岩本政雄¹, 矢崎潤史¹, 藤井文子¹, 真保佳納子², 島谷善平², 橋本晶子², 長田夕子², 太田智弥¹, 佐藤友紀¹, 本多幸子¹, 山本公子², 坂田克己¹, 佐々木卓治¹, 岸本直己¹, 菊池尚志¹, 肥後健一¹ (1生物研, ²STAFF研)

イネ (*Oryza sativa* L.) において、光のない条件下でどれくらいの数の遺伝子が転写量に日周変動を示し、どのような機能を有するか理解することを目的として、8987個のイネcDNAクローンを含むマイクロアレイを用いて解析を行った。1日16時間明期・8時間暗期の条件下で育てた幼苗イネを暗黒条件下に移し、葉身と葉鞘を4時間おきにサンプリングし、精製したトータルRNAをターゲットとして用いた。葉身由来トータルRNAを用いた解析から、422個のクローン (全体の4.7%) が日周変動を示すことがわかった。変動パターン別に分けると、主観的明期開始後6時間でピークを示すクローンが多くみられた。遺伝子の機能を推測するために、日周変動を示したクローンの部分塩基配列を用いて類似性検索 (Gapped BLAST) を実施したところ、422のうち141個のクローンが既知の遺伝子と有意な類似性を示した。これらのクローンを機能別に分けると、エネルギー及び物質代謝、シグナル伝達、翻訳で働く遺伝子が多く含まれることがわかった。一方、葉鞘由来トータルRNAを用いた解析の結果、305個のクローン (全体の3.4%) で日周変動がみられ、その殆どは葉身では検出されなかったクローンであることがわかった。本研究は農水省イネ・ゲノムプロジェクト (MA-2219) により行われた。

1pD07

ムギネ酸類分泌と小胞極性輸送:イネcDNAマイクロアレイを用いた鉄欠乏オオムギ根の遺伝子発現解析からの仮説

根岸孝至¹, 中西啓仁¹, 矢崎潤史², 岸本直己³, 藤井文子², 真保佳納子², 山本公子², 坂田克己³, 佐々木卓治³, 菊池尚志³, 森敏¹, 西澤直子^{1,4} (1東京大院・農学生命, ²STAFF研, ³生物資源研, ⁴CREST)

イネ科植物は、鉄欠乏を感知すると根からムギネ酸類を根圏に分泌し、可溶化した鉄を「鉄ムムギネ酸」錯体として吸収し鉄欠乏を回避する。オオムギにおいて、ムギネ酸類の分泌は日の出後数時間に集中するという顕著な日周性を示す。ムギネ酸類分泌の日周変動を制御する機構を分子レベルで明らかにすることを目的に、イネcDNAマイクロアレイを用いて鉄欠乏オオムギ根の遺伝子発現解析をおこなった。オオムギを鉄欠乏処理し、十分にムギネ酸類を分泌する状態にしてから、ムギネ酸の分泌が最も盛んな午前11時と、分泌が完全に終了している午前1時に根を採取してマイクロアレイ解析の試料とした。鉄を十分に与えて育て、ほとんどムギネ酸を分泌していないオオムギの根を午前11時に採取したものをコントロールとした。

午前11時の鉄十分条件と鉄欠乏条件を比較したところ、鉄欠乏によってその発現が誘導されていた遺伝子は、9000クローンのうち約200であった。鉄欠乏により発現が誘導され、さらに午前11時と午前1時とで発現量に差がみられた、ムギネ酸分泌の日周変動に関わる可能性のあるクローンは約50であった。その一部についてノーザン解析により24時間の経時変化を調べたところ、発現量に日周変動のみられる遺伝子が見いだされた。小胞輸送に関する遺伝子が含まれており、ムギネ酸類分泌と小胞極性輸送との関連を示唆していた。

1pD08

イネの開花時期を制御する遺伝子ネットワーク
早間良輔¹, 井澤毅^{1,3}, 矢野昌裕², 島本功¹ (1奈良先端大・バイオ, 2生物研, 3現・生物研)

短日植物イネにおける光周性反応の分子機構を解明するために、*GIGANTEA* (*GI*) のイネ相同遺伝子 *OsGI* の機能解析を行った。*GI* は長日植物シロイヌナズナにおいて長日条件下での開花促進に機能する遺伝子である。*OsGI* の発現は *GI* と同様のパターンの概日リズムを示したことから、双方の *GI* の発現制御機構は保存されていることが示唆された。また、*OsGI* 過剰発現株は開花が遅れると共にその日長反応が減少したことから、*OsGI* は長日条件下での花成の抑制に機能することが示唆された。シロイヌナズナにおいて、*GI* は *CO* の発現を活性化し、さらに *CO* は *FT* の発現を誘導する。そこで、*Hd1* (*CO* のイネ相同遺伝子) および *Hd3a* (*FT* のイネ相同遺伝子) の *OsGI* 過剰発現株における発現様式を調べたところ、*Hd1* の発現は *OsGI* 過剰発現株において上昇しており、*GI* による *CO* の発現調節と同一の関係を示した。しかしながら、*Hd3a* の発現は *OsGI* 過剰発現株において減少しており、*GI* による *FT* の発現調節とは逆の関係を示した。以上の結果より、イネとシロイヌナズナの光周性の違いを決定する分子基盤は、*CO* (*Hd1*) による *FT* (*Hd3a*) の発現調節機構にあると考えられた。

1pD09

新奇花成関連キナーゼ、*AtC401* と相互作用するタンパク質の解析

小野公代¹, 大山真紀子¹, 藤原すみれ¹, 小野道之¹, 鎌田博¹ (1筑波大・生物)

SNF1-関連キナーゼをコードすると推定されているシロイヌナズナの *AtC401* 遺伝子は、サーカディアン発現と葉特異的発現パターンを示す。また、*AtC401* の過剰発現形質転換体は、花成促進、*AtC401* の突然変異体では、花成遅延の表現型を示すことから、光周性花成誘導への関連が予想される。*AtC401* は、N末側半分にキナーゼドメイン、C末側半分に調節領域として機能する *C401* ドメインを含んでいる。本研究では、*AtC401* タンパク質のターゲットを明らかにするため、*AtC401* の *C401* ドメインをベイトとして用いて *Yeast Two-hybrid screening* を行った。スクリーニングの結果、*C401* ドメインと特異的に相互作用する15種のタンパク質が単離された。これらのタンパク質の中の一つは、*B-box Zn²⁺ finger motifs* を持ち、光周性花成誘導に関与する *CONSTANS* のホモログであった。これらの遺伝子の発現解析の結果についても合わせて報告する。

1pD10

光周性花成誘導に関連する時計制御遺伝子 *GLP* の局在解析

小野道之¹, 福井晴隆¹, 小野公代¹, 鎌田博¹ (1筑波大・生物)

アサガオ (*Pharbitis nil* cv. Violet) の子葉において短日性の花成誘導条件で特異的に増加する葉タンパク質の遺伝子 *Germin-Like Protein* (*PnGLP*) と、その相同遺伝子としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から単離した *AtGLP1*, 2 は、転写レベルで概日時計制御の振動を示す。概日振動のピークの時刻は、短日植物のアサガオでは暗期開始から約10時間目、長日植物のシロイヌナズナでは明期開始から約16時間目であり、各々の光周性花成の性質を反映する。これらの遺伝子がコードするタンパク質の生化学的な機能は不明であるが、シグナル配列をN末端に持つことなどから小胞体を経て細胞外へ移行する可能性がある。本研究では、これら葉タイプの *GLP* タンパク質の細胞内の局在等を解析した。*GFP* (*Green Fluorescent Protein*) 等と融合した *PnGLP* のタマネギ表皮及びアサガオ子葉を用いた一過性発現及び、*GFP* を融合した *AtGLP2* のシロイヌナズナの形質転換植物を作成して、蛍光像を観察した結果、これらの *GLP* は小胞体と細胞外のアポプラスト及び細胞内の小顆粒に局在することが明らかとなった。局在様式から *GLP* の機能について考察する。

1pD11

ルシフェラーゼレポーター形質転換植物を用いた光周性花成誘導に関連する時計制御遺伝子 *AtC401* のプロモーター解析

小口太一¹, 小野公代¹, 小野道之¹, 鎌田博¹ (1筑波大・生物)

PnC401 遺伝子は、短日植物アサガオ (*Pharbitis nil* cv. Violet) において花成誘導暗期中で特異的に発現する遺伝子として単離された。*PnC401* 遺伝子および長日植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) におけるホモログ *AtC401* 遺伝子の mRNA は、暗期増加型のサーカディアンリズム振動を示す。我々は *C401* 遺伝子のサーカディアンリズム発現制御機構を明らかにするため、*AtC401* 遺伝子プロモーター断片をホタルルシフェラーゼ遺伝子に連結した融合遺伝子を導入した形質転換体を作成し、T3世代以降の固定系統を確立した。5'プロモーターディリーションの結果、既知のサーカディアンリズム制御に関連するシス配列が認められない -75/+71 領域のプロモーター断片を含む形質転換体においても、恒常的明条件下で明確なサーカディアンリズム振動を示した。また、レポーター形質転換植物を各種光周条件で栽培後、恒常的光条件に移行しレポーターアッセイを行ったところ、内生リズム依存性の最初のピークは、最終の *light-on* シグナルから約26時間目に出現し、栽培期間の光周条件による影響を受けなかった。さらに、この融合遺伝子を形質転換したタバコからも同様の発光リズムが観察された。

1pD12

アオウキクサの花成誘導とCa²⁺依存性タンパク質キナーゼとの関係

別府敏夫¹, 加藤紀行¹, 山林孝彰¹, 田中修² (¹帝京科学大・バイオ, ²甲南大・理)

我々は、アオウキクサの花成誘導時に、細胞外からCa²⁺が細胞内へ流入し、細胞内Ca²⁺濃度が高まることを示してきた。細胞内のCa²⁺濃度が高まると、Ca²⁺依存性タンパク質キナーゼの活性化が予想される。そこで我々は花成にともないCa²⁺依存性タンパク質キナーゼの活性化が起るのか否かを検討した。Cキナーゼの阻害剤である塩化ケレトリン、カルボスチンC、ビスインドリルマレイミドおよびフィシゴシンをそれぞれ安息香酸と共にウキクサに投与すると、フィシゴシンを除いてnMのオーダーで花成を特異的に阻害した。後者はμMのオーダーで阻害した。一方、Ca²⁺/CaM依存性タンパク質キナーゼの阻害剤であるKN-62およびK-252aはμMのオーダーまで花成を全く阻害しなかった。従ってアオウキクサの花成にはCa²⁺/CaM依存性タンパク質キナーゼが関与するのではなく、動物のCキナーゼとよく似たCa²⁺依存性タンパク質キナーゼの関与が示唆された。また、インゲンパッセイ法によって、安息香酸による花成誘導時にCa²⁺依存的にタンパク質キナーゼの活性化が起ることが示された。現在、このCa²⁺依存性タンパク質キナーゼの活性化が上記のCキナーゼの阻害剤によって阻害されるが否かを検討中である。

1pD13

アサガオ茎頂において短日処理依存的に発現が変動する遺伝子

上島雄一郎¹, 樽井裕¹, 平澤栄次¹ (¹大阪市大・院理・生物地球)

アサガオムラサキ (*Pharbitis nil* Choisy cv. Violet) は、短日処理に対し感受性が高く、一回の短日処理により花芽形成が誘導される。芽生えの茎頂付近の腋生分裂組織は、短日処理によってほとんど同調的に栄養成長から花芽形成に移行する。この性質を利用して、花芽形成の初期過程に関与すると考えられる遺伝子の単離を試みた。短日処理により花芽誘導した芽生え、および誘導していない芽生えの分裂組織からcDNAを調製し、断片化・PCR増幅の後、suppression subtractive hybridization法を用いて、花芽形成期に発現量の変化する遺伝子をスクリーニングした。その結果、protein kinaseやMYB因子のほか、glycolate oxidaseやserine carboxypeptidaseなどに相同性の高い遺伝子断片などが得られた。これら遺伝子の多くは量的に変動するものであった。また、光呼吸やタンパク質分解に関係する遺伝子の発現が花芽形成により大きく変動することは、器官分化による大きな代謝的変動を反映していると考えられる。

1pD14

シロイヌナズナにおける光強度依存的な花成へのグルタチオンの関与

岩崎(葉田野) 郁¹, 柳田元継, 逸見健司¹, 岩淵雅樹¹, 小川健一¹ (¹岡山県生物科学総合研究所 (RIBS))

我々は最近、シロイヌナズナにおいて、グルタチオン (GSH) が花成に関与し、またその生合成は光合成と相関があることを報告した。そこでGSH生合成系の律速段階を触媒する酵素をコードするGSH1遺伝子をcauliflower mosaic virusの35Sプロモーターを用いて過剰発現させたシロイヌナズナの形質転換植物を作製し、光強度に依存した花成とグルタチオンの関係を調べた。これらの形質転換体と野生型、GSH欠乏変異体*cad2-1*を異なる光強度下 (25-500 μE m⁻² sec⁻¹) で生育させ、GSHレベルと花成を調べたところ、100から500 μE m⁻² sec⁻¹の間では、GSHレベルは光強度に伴って、野生型では上昇し*cad2-1*では減少した一方、形質転換植物では変動は認められなかった。これは、GSH生合成系が光強度に依存していることを示している。また、花成はGSHレベルによって影響を受けていた。これらの結果は、光強度依存的な花成がGSH生合成によって決定されていることを示唆している。

1pD15

シロイヌナズナの半優性突然変異体*constitutive differential growth 1-D (cdg1-D)*の形態異常はRLCKVIIサブファミリーに属するタンパク質・キナーゼの過剰発現により引き起こされる

武藤秀樹¹, 矢部尚登², 連沼仰嗣², 山本興太郎¹ (¹北大院・地球環境, ²横浜市大・木原生研)

シロイヌナズナに35Sエンハンサーを含むT-DNAを導入したアクティベーション・タギング・ラインから半優性の突然変異体、*cdg1-D*を単離した。*cdg1-D*変異体は矮性で、葉は著しい上偏成長の結果、下側に丸まった形態を示した。この形態異常はホモ個体ではヘテロ個体より強かった。*cdg1-D*の暗黒下での芽生えは、胚軸の長さは野生型と差はないものの、螺旋状、またはねじれた伸長を示した。白色光下で栽培した変異体の胚軸は野生型より著しく長くなり、表皮細胞が長軸方向に長いことが観察された。このことから、この変異体は光による成長制御にも異常があることが予想される。この変異体に導入されたT-DNAは3番染色体に存在し、エンハンサー近傍には、受容体様タンパク質・キナーゼのサブファミリーであるが、受容体ドメインと膜貫通ドメインを持たない細胞質局在型のタンパク質・キナーゼ群であるRLCKVIIサブファミリーに属する遺伝子が存在した。ノーザン解析の結果、この遺伝子のmRNAは野生型では検出されず、*cdg1-D*変異体のみで蓄積していることが分かった。また、この遺伝子のcDNAを野生型で過剰発現させると、葉の上偏成長、明所での胚軸の徒長など、*cdg1-D*で見られた異常が生じた。

1pD16

陽葉と陰葉の分化と光認識

矢野覚士¹, 寺島一郎¹ (阪大・院・理・生物)

陸上植物は生育する光環境に応じて陽葉と陰葉を形成する。現在までに、陽葉と陰葉を生理学的、生態学的に比較した研究が数多く行われてきたが、その発分化過程、特に制御機構を解析した研究は数少ない。陽・陰葉化においては光環境を認識することが非常に重要であるが、現在までこれらの現象に関わっている光認識機構の解析は行われていなかった。

また植物は、光環境に応じて葉緑体の形態を変化させ、強光下でsun-type、弱光下でshade-typeと呼ばれる葉緑体を形成する。今回我々は、これら葉緑体の分化に成熟した葉における光環境が関わっているのかも検証した。

茎頂部分のみを強光条件にしたとき(下位葉は弱光, High-light Apex [HA] 処理), 茎頂部分のみを弱光条件にしたとき(下位葉は強光, Low-light Apex [LA] 処理)に形成される葉の形態と葉緑体の形態を観察した。その結果、葉の形態はHA処理で陰葉, LA処理で陽葉が形成されていた。またHA処理ではsun-type, LA処理ではshade-typeの葉緑体が形成されていた。

これらの結果から、形態の分化は成熟した葉の光環境が支配しており、葉緑体の分化には局所的な光環境が支配しているといえる。よって、成熟した葉から発分化中の葉への情報伝達系が存在していると考えられる。(PCP2001年12月号, 公表済み)

1pD17

Effects of Red-light on Gibberellin 3 β -hydroxylase Gene Expression in Dark-grown Seedlings of Dwarf and Tall Cultivars of *Pisum sativum*

加藤尚¹ (香川大学・農学部)

Two commercial cultivars of *Pisum sativum*, Alaska and Progress No. 9, have been often used for comparative studies on stem growth. The factor for tallness in the *Pisum* was associated with gibberellin (GA) biosynthesis. However, the regulation of GA 3 β -hydroxylase gene expression has not yet been examined and associated with their growth habits. This study examined the red-light regulation of GA 3 β -hydroxylase in dark-grown seedlings of Progress No. 9 and Alaska by relative quantitative RT-PCR determination. Red-light inhibited the shoot elongation of Progress No. 9 much greater than that of Alaska, and the elongation of Progress No. 9 during initial 48 h was 23% that of Alaska. The transcript level of GA 3 β -hydroxylase gene was slightly greater in the shoots of Alaska than that of Progress No. 9. The results indicate that the difference in the transcript levels in both cultivars is not apparent.

1pD18

マメ科植物の重金属耐性とフィトケラチン合成能

井上雅裕¹, Dharmendra Gupta^{1,2}, 遠山鴻¹, 城尾昌範¹
(¹愛媛大学・理・生地, ²Bioremediation Lab., NBRI, Lucknow, India)

グルタチオン (GSH) から合成されるフィトケラチン (PC) とその関連ペプチドはそれぞれ植物の重金属耐性に重要な役割をもっている。本研究では、マメ科植物数種の根や培養細胞の成長と上記各チオール濃度に対する重金属イオンの影響を調べた。

PC合成能をもつトマトなどの培養細胞は100 μ M Cdに耐性をもつ。一方、アズキ細胞はPC合成能が殆ど無く、芽生え(根)、カルス、懸濁細胞のどの系においても、Cd感受性を示した。生育温度(18-33 $^{\circ}$ C)を変化させてカルスを長期間培養した場合でも、Cd耐性は全く増加しなかった(<6 μ M)。また、PC合成活性の低下に加えて、アズキはGSH酸化活性が相対的に高いこと、しかし、銅と亜鉛(100 μ M)には耐性をもつことが判明した。

ヒヨコマメとエンドウの根はアズキの根より高い Cd耐性を示したが20 μ M以上のCd濃度では成長阻害を受けた。この際、Cd濃度に応じてPCとホモフィトケラチン(hPC)が根で合成されたが、地上部では殆ど検出されなかった。Cdストレスはまた、根と地上部のGSH合成も著しく促進した。このGSH合成の促進は、ヒ素、コバルト、ニッケル、亜鉛の添加でも観察されたが、銅イオンではおこらなかった。

以上の結果から、GSH および PC 代謝がマメ科植物の重金属耐性に、重要であることが示唆された。現在、培養細胞を用いてさらにPC、hPC種の同定とそれらの機能の解析を進めている。

1pF01

葉緑体の成立と硝酸同化系の進化の関連

小俣達男¹, 山下円¹, 上田七重², 小酒井紀詠¹, 愛知真木子³ (1名古屋大院・生命農学, 2理化学研究所・植物科学センター, 3中部大・応用生物)

葉緑体の起源となった原核光合成生物が、宿主の従属栄養細胞の中に物理的に取り込まれた経過は不明であるが、理論的には捕食から内部共生にいたった場合と外部共生から内部共生へと進行した場合があり得る。いずれの場合も、安定な共生関係を維持することが、その後のオルガネラ化の進行にとって必須であったと推定される。一般に共生状態の維持には両パートナー間に相利的な関係が生じることが重要であるが、上記の場合には共生体(原核光合成生物)側にとっての利益が不明である。我々は、現存の葉緑体のもつ代謝機能を検討し、共生成立初期の宿主と共生体の間の代謝的な相互作用の可能性について検討した。葉緑体は脂肪酸合成や窒素・イオウの同化を担っているが、これらの代謝系は、共生に関わった宿主と共生体の双方がそれぞれ備えていたと考えられる。現在では葉緑体がこれらの代謝機能の主たる場であるが、硝酸の還元同化の第一段階を触媒する硝酸還元酵素(NR)が例外で、この酵素はNAD(P)H依存性の真核型NRで細胞質に存在する。換言すれば共生体にあつたはずの原核型NRは失われている。NRは硝酸の同化に必須であり、原核型NRの喪失は、共生体の増殖を宿主に依存させて共生関係を安定化するのに大きく寄与したと推定される。硝酸同化系の変異と共生関係の成立との関係について可能な2つのモデルを検討した結果を報告する。

1pF02

窒素化合物の授受を介したラン藻と糸状菌の人工共生系の構築

山下円¹, 上田七重², 小酒井紀詠¹, 愛知真木子³, 加藤雅士¹, 小林哲夫¹, 小俣達男¹ (¹名古屋大院・生命農学, ²理化学研究所・植物科学センター, ³中部大・応用生物)

葉緑体は原核藻類の細胞内共生により生じたことが一般的に認められているが、共生の経緯についてはよく分かっていない。宿主となった真核非光合成生物が共生体から炭酸同化産物の供給を受けることで共生による利益を得たとしても、共生体側にとっての共生の利点は不明である。そこで我々は植物の硝酸同化系の成り立ちに着目して、「硝酸同化を介した共生」説を提案する。植物細胞の硝酸還元酵素 (NR) は糸状菌や一部の酵母と共通の真核非光合成生物型の酵素であるのに対し、亜硝酸還元酵素 (NiR) はフェレドキシン依存性でラン藻のものによく似ている。このことからNiRを欠く真核生物とNRを欠く原核藻類が硝酸同化を補い合ってまず安定な外部共生関係を築き、これが内部共生に発展したと考えたのである。本研究では原核藻類のモデルとしてラン藻、真核非光合成生物のモデルとして糸状菌を用いて両者の間に共生関係が成立するかどうかを検討した。ラン藻や糸状菌の硝酸同化系においてNRとNiRは必須な酵素であり、NiRを欠く糸状菌変異株もNRを欠くラン藻も硝酸還元酵素を利用して生育することができなかった。しかし両者を硝酸を窒素源として混合培養すると、相互に依存しつつ、光依存的に増殖した。これはラン藻と糸状菌の変異株の間に硝酸同化を介した共生関係が成立することを証明するものであり、上記の説の実験的基盤となるものである。

1pF03

プラスチド核様体タンパク質の比較生化学 — プラスチドゲノム装置の不連続進化仮説 —

佐藤直樹¹, 平間岳史¹, 宮島一徳¹, 関根康介¹, 壁谷如洋¹, 得平茂樹^{1,2} (¹埼玉大・理, ²東京大・総合文化)

プラスチド核様体は、プラスチドDNAとタンパク質の複合体であり、DNAの複製、分配および転写の機能的単位である。プラスチドゲノムは、シアノバクテリアの祖先生物と推定される共生体のゲノムに由来すると考えられているが、それに結合してゲノムを機能させるタンパク質群すなわち「ゲノム装置」の実態の解明は遅れている。断片的な証拠を集めると、細胞内共生の後、速やかに原核型ゲノム装置の大部分が失われたことが推定され、現在の被子植物葉緑体に存在するゲノム装置構成成分の大部分は、陸上植物の進化の過程で獲得された真核起原のものと考えられる。この不連続進化仮説を実証するため、*Anabaena* (シアノバクテリア)、ヒメツリガネゴケ [セン類]、シアニジオシゾン (単細胞紅藻)、エンドウ (被子植物) を用いて核様体を単離し、その構成タンパク質の分析を行った。その結果、DNAの凝縮に関わる主要タンパク質成分に大きな違いがあることがわかり、上記の仮説を裏付ける結果が得られた。

1pF04

可逆的DNA凝縮を介した亜硫酸還元酵素による葉緑体核様体の転写調節

関根康介¹, 長谷俊治², 佐藤直樹¹ (¹埼玉大・理, ²大阪大・蛋白研)

プラスチドDNAは様々なタンパク質と核様体と呼ばれる複合体を形成している。プラスチド核様体の転写活性はプラスチドの発達段階により転写量が大きく異なることが知られており、これは核様体の形態的、分子的变化が関与していると考えられる。エンドウでは、葉緑体核様体の主要構成成分である70-kDaタンパク質が亜硫酸還元酵素 (SiR) であり、葉緑体DNAの凝縮に働くことが示されている。昨年の本年会において私たちは、エンドウ葉緑体核様体の転写活性がヘパリンにより増加することと、ヘパリン処理によりSiRが核様体から遊離することを示しており、今回は、SiRとヘパリンによるDNA凝縮への影響を更に詳しく解析した。DAPIで染色した単離葉緑体DNAの蛍光を測定したところ、SiRによって蛍光が弱まり、ヘパリンを添加することで蛍光が強くなることが分かった。蛍光強度がDNA凝縮の評価に利用できることが考えられた。この手法により、単離した葉緑体核様体を測定したところ、核様体内でのDNA凝縮が外部からのSiRの添加によって更に高まり、逆にヘパリン処理によって低下することが示された。また、*in vitro*転写実験系において、単離した核様体の転写がSiRにより抑えられることが分かった。これらの結果からDNA凝縮が葉緑体核様体の転写活性を調節していることが示唆される。

1pF05

葉緑体母性遺伝の分子機構 — 雄葉緑体をターゲットとする雌配偶子のヌクレアーゼ —

西村芳樹¹, 三角修己¹, 東山哲也¹, 黒岩常祥¹ (¹東京大・院・理・生物科学)

クラミドモナスの葉緑体DNAの母性遺伝は、雌雄配偶子接合直後における雄葉緑体DNAの選択的かつ積極的な分解によって引き起こされる (Kuroiwa et al., 1982; Nishimura et al., 1999)。その雄葉緑体DNA分解の分子機構を探るため、Native-PAGE-ゲル内アッセイ法を用いて接合子の葉緑体でのヌクレアーゼの活性変化を解析した。その結果、雄葉緑体DNA分解の時期に一致して、接合子葉緑体で著しく活性を上昇させるCa²⁺依存性ヌクレアーゼ (NUC-C) が検出された。さらに接合子の雌雄の葉緑体を、デンプン蓄積量の差を利用して分離し、それぞれにおけるNUC-C活性を比較解析したところ、NUC-C活性はDNA分解が起きる雄葉緑体で特異的に上昇することが明らかとなった。これらの結果より、今回検出されたCa²⁺依存性ヌクレアーゼ (NUC-C) が、母性遺伝において雄葉緑体DNA分解を担う鍵酵素である可能性が強く示唆された。

NUC-C は配偶子誘導と共に雌性配偶子のみで活性化され、細胞核遺伝子の転写、翻訳阻害剤により著しく阻害される。これよりNUC-Cは細胞核コードの雌性配偶子特異的遺伝子発現によって制御されることが考えられる。以上の結果より、葉緑体母性遺伝の分子機構について、雌性配偶子特異的遺伝子によって制御されるNUC-Cを基盤とした、新しいモデルが考えられた。

1pF06

タバコ培養細胞BY-2のアミロプラスト分化に対するメバロン酸合成阻害剤 (lovastatin) の影響

宮沢豊¹, 加藤尚志¹, 鈴木優志², 村中俊哉², 吉田茂男^{1,2} (¹理化学研究所・植物機能, ²理化学研究所・植物科学研究センター)

定常期のタバコ培養細胞BY-2を2,4-Dを除去した培地に植え継ぐとアミロプラストの形成が起こる。この分化は、benzyladenineの添加により促進される。これまでにデンプン合成に必須な遺伝子の転写産物蓄積量が2,4-D添加により減少し、benzyladenineの添加により促進されることが明らかになっている。しかしながら、BY-2細胞には内生のサイトカイニンが存在するため、アミロプラスト分化に対するサイトカイニンの効果は不明であった。本研究では、BY-2細胞のアミロプラスト分化におけるサイトカイニンの効果を検証するために、すでにBY-2細胞においてメバロン酸合成阻害により、内生のサイトカイニン量を減少させる阻害剤として用いられているlovastatinを用いて解析を行った。オーキシン存在下におけるlovastatin処理はBY-2細胞の増殖を阻害した。この阻害はbenzyladenineの添加により回復したことから、lovastatin処理によりサイトカイニンの産生が阻害されていると考えられた。そこで、アミロプラスト分化を起こすオーキシン非存在下においてlovastatin処理を行ったところ、デンプン蓄積は、非処理細胞の半分以下に減少していた。この阻害はbenzyladenineの添加により回復した。現在サイトカイニン量とデンプン蓄積との関係に関して解析を行っており、この結果に関しても報告したい。

1pF07

プラスチド包膜上のタンパク質透過装置の変異による葉緑体発生におよぼす影響

丹羽康夫¹, 森安裕二¹, 梶原英之², 加藤友彦³, 田畑哲之³, 柴田大輔^{3,4}, 関原明⁵, 小林正智⁵, 篠崎一雄⁵ (¹静岡県大院・生活健康, ²生物研, ³かずさDNA研, ⁴三井業際植物バイオ, ⁵理研)

葉緑体の発生過程で機能しているほぼ全てのタンパク質は核ゲノム中にコードされているため、細胞質で翻訳後、プラスチド包膜を通過する必要がある。プラスチド包膜に存在するタンパク質の透過に関与している因子は、その局在部位からToc (外包膜), Tic (内包膜) と命名され、そのうちのいくつかは生化学的手法によりアミノ酸配列が明らかにされている。シロイヌナズナTic40遺伝子はハプロイドゲノムあたり1コピーで存在する。その遺伝子の破壊株では子葉、本葉ともにその緑化が抑制されたことから、この変異体では葉緑体の発生に異常があることが予想された。形態学的解析ならびに生化学的解析結果から、子葉と本葉とでは異なる機構により葉緑体の発生に影響をおよぼしているという結果が得られた。

1pF08

タバコ葉緑体におけるstromuleのストレス制御
椎名隆¹, 安田浩之¹, 山下博史¹, 竹葉剛¹ (¹京都府大・人間環境)

色素体表面から伸びる細長い管状構造であるstromuleは、GFPを発現する形質転換植物を利用して可視化することができる。これまでに、stromuleが激しい伸縮運動を行うこと、離れた葉緑体同士を連結しGFP分子の輸送に関係すること、葉緑体分化に伴って制御されていることなどが明らかになっている。Stromuleは、葉緑体間の分子輸送やコミュニケーション、細胞質との相互作用において何らかの重要な生理機能を担っていると考えられる。しかし、その制御、構造と運動の分子基盤については殆ど分かっていない。一般に、発達した葉緑体を含む葉の細胞では、stromuleは未発達である。我々は、乾燥、高浸透圧、塩などのストレスによってstromuleが誘導されることを見いだした。いったん誘導されたstromuleは、その後長時間に渡って観察された。膨圧変化がstromuleの誘導制御に関係していることが示唆される。一方、サイトカラシンDを処理すると、原形質流動の停止にほぼ同期してstromuleの活発な運動も停止することが観察された。しかし、長く伸びたstromule構造は、そのまま維持されていた。Stromuleの運動はアクチンフィラメントに依存しているが、stromule構造の維持には関係していないことが示唆された。

1pF09

細胞分裂方向に異常をきたしたシロイヌナズナ*crumpled leaf*変異体の葉肉細胞には巨大化した葉緑体が含まれる

浅野智哉¹, 吉岡泰¹, 樽井俊介¹, 坂本巨², 蘇都莫日根³, 町田泰則¹ (¹名古屋大院・理, ²岡山山大・資生研, ³北京大学・生命科学院)

シロイヌナズナの*crumpled leaf* (*cri*) 変異体は矮性で黄緑色をしており、葉の形態が異常になるという表現型を示す。我々はこの変異体においては細胞分裂の方向がおかしくなっていることを茎頂、根端、胚の組織学的な解析から明らかにしている。また、*cri*変異体には変異と強く連鎖するT-DNAがゲノム上に存在するが、このT-DNAの挿入によって新奇なタンパク質をコードする遺伝子が破壊されていた。今回我々は*cri*変異体の根端部分の表層微小管の配向に異常がないこと、および変異体の葉肉細胞が巨大化した数個の葉緑体を含んでいることを見いだしたので報告する。変異体の茎頂部分の切片をDAPI染色すると、葉原基においてDAPIで染色される核DNAの領域と同程度の大きさに染色される葉緑体DNAが数個すでに細胞内に存在していた。また、透過型電子顕微鏡を用いた解析から、葉における葉緑体の内部構造は変化していないこと、ミトコンドリアの大きさ構造は野生型と同じである事が明らかとなった。以上の結果から*cri*変異体においては細胞の分裂と共に葉緑体の分裂も何らかの形で異常をきたしていると考えられた。*CRL*遺伝子の機能をより詳細に明らかにするために上記新奇タンパク質の細胞内局在、および、相互作用する分子のスクリーニングを現在進めている。

1pF10

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) から単離された葉緑体分裂に関与する MpftsZ1, MpftsZ2 の機能解析

荒木裕子¹, 滝尾進², 小野莞爾³, 高野博嘉³ (¹熊大院・自然科学, ²熊大・沿岸センター, ³熊大本・理・生物科学)

チューブリンの構造的ホモログである FtsZ は原核生物の細胞質分裂面で機能する分裂リングの主要タンパク質であり、原核生物は基本的にゲノム中に1つの ftsZ 遺伝子を持つ。陸上植物では核にコードされる ftsZ1, ftsZ2 の2つのタイプが存在し、それぞれが葉緑体分裂に関与している。我々は苔類ゼニゴケから ftsZ 遺伝子の単離を試み、MpftsZ1, MpftsZ2 の2つを得た。cDNA 長はそれぞれ 1997bp, 2165bp で 446 残基、530 残基の推定アミノ酸配列をコードしていた。共に葉緑体移行シグナルを持つと推定され、アミノ酸配列で 63% の相同性を示した。ftsZ 遺伝子で系統樹を作成すると MpftsZ1, MpftsZ2 はそれぞれ葉緑体型 ftsZ1, ftsZ2 の各グループに分類された。サザン解析から両遺伝子共に核ゲノムに1コピーずつ存在することが分かった。ノーザン解析で MpftsZ1 は 2.2kb の転写産物のみが確認されたが、MpftsZ2 は 2.3kbp に加えて 2.7kb のバンドも検出された。CaMV35S プロモーターに MpftsZ2 遺伝子をつないだプラスミドを構築しゼニゴケに遺伝子導入をした結果、野生型と比べ葉緑体が大きく1細胞中での数が少ない形質転換体を得られ、葉緑体分裂との関連が明らかとなった。MpftsZ2 のアンチセンス RNA 発現系、MpftsZ1 発現系については現在解析を行っている。

1pF11

ミトコンドリアと色素体に共通な原核生物型分裂機構の解析

高原学¹, 黒岩晴子¹, 宮城島進也¹, 森稔幸¹, 松崎素道¹, 黒岩常祥¹ (¹東京大・院・理・生物科学)

ミトコンドリアと色素体は真正細菌の細胞内共生により誕生した半自律的なオルガネラであり、分裂によってのみ増殖する。細胞内共生によるオルガネラ誕生の際の細菌の持つ分裂装置の変遷は、進化的にも興味深い。FtsZ は原核生物の最も主要な分裂タンパク質であり、分裂面にリング状構造を形成するが、FtsZ が色素体の分裂にも関与し、分裂面にリング状構造を取ることが近年知られてきた。

単細胞原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* は、オルガネラ分裂の研究に適した特徴を持ち、細胞核ゲノムの決定もまもなく終了するため、3核のゲノム情報に基づいてオルガネラの動態の研究ができる。我々はこれまでに、*C. merolae* から色素体型 ftsZ (*CmftsZ2*) に加えミトコンドリア型 ftsZ (*CmftsZ1*) を初めて単離し、解析を行ってきた。*C. merolae* の同調培養系を用いた解析から、両 ftsZ が分裂期直前で特異的に転写されること、両 FtsZ タンパク質の量が分裂期に増加し、分裂期終了後速やかに分解されることが示唆された。これらは両 FtsZ の発現が分裂周期の中で、転写とタンパク質分解の両方で制御されることを示唆している。またミトコンドリアでも *CmftsZ1* が分裂面の内側にリング状構造を作ること初めて見いだした。本研究の結果はミトコンドリアと色素体の FtsZ が、それぞれの分裂リングと協調しつつ、共通の機構で機能していることを示唆している。

1pF12

An *Arabidopsis* dynamin-like protein (ADL2b) is functioning in mitochondrial division.

有村慎一¹, 堤伸浩¹ (¹東大院農学生命科学)

Recently, the FtsZ protein, which is known as a key component in bacterial cell division, was reported to be involved in mitochondrial division in algae. In yeast and animals, however, mitochondrial fission depends on the dynamin-like proteins DNM1 and Drp1, respectively, while in green plants, no potential mitochondrial division genes have been identified. BLAST searches of the *Arabidopsis* genome sequences did not find any obvious homologue of the α -proteobacterial-type ftsZ genes. While, we cloned a cDNA for ADL2b, an *Arabidopsis* homologue of DNM1, and tested its subcellular localization and its dominant-negative effect. The fusion protein of GFP and ADL2b was observed in punctate structures that were localized at the tips and at the constriction sites of mitochondria. Cells expressing mutant ADL2b proteins showed a significant fusion, aggregation and/or tubulation of mitochondria. We propose that mitochondrial division in higher plants is conducted by the dynamin-like protein ADL2b in *Arabidopsis*.

1pF13

シロイヌナズナにおけるミトコンドリア局在型 GFP を用いたミトコンドリア形態突然変異体の T-DNA タギング

星野徹¹, 村田稔¹, 坂本亘¹ (¹岡山大・資生研)

これまで、ミトコンドリア局在化シグナルを持つ GFP 融合遺伝子をシロイヌナズナに導入したトランスジェニック植物を作製し、生細胞におけるミトコンドリアの動態が観察可能である事、さらにこの遺伝子と T-DNA タギングを用いて、ミトコンドリアの形態が変化した突然変異体をスクリーニングしたことを報告した。現在までに2つのミトコンドリア形態突然変異体を得て、これらの解析を進めている。その1つである 34-7 系統では、円盤状もしくは極端に細長い繊維状のミトコンドリアが根の表皮細胞に多く観察される。この系統の表現型分離とカナマイシン耐性の結果に基づいて、突然変異は1箇所の T-DNA の挿入によって引き起こされていることがわかった。また、T-DNA の挿入領域を同定するために、TAIL-PCR 法を用いて挿入領域付近の塩基配列をクローニングし、シークエンスした所、タンパク翻訳開始因子の一種である *eIF4B2* 遺伝子の下流約 400bp 付近に挿入されていることが確認された。現在、RT-PCR 法を用いて *eIF4B2* 遺伝子の発現量に変化が見られるかを調べている。

1pF14

ヒメツリガネゴケのT7ファージタイプRNAポリメラーゼの解析

壁谷如洋¹, 橋本和宣¹, 佐藤直樹¹ (1埼玉大・理)

葉緑体には、細胞核にコードされたT7ファージタイプRNAポリメラーゼ (RPOT) と葉緑体ゲノムにコードされた原核タイプのRNAポリメラーゼ (PEP) が存在していることが知られている。また、ミトコンドリアではRPOTのみが転写を行っている。ヒメツリガネゴケでRPOT 遺伝子をコードする cDNA を 2 個単離した (*PpRPOT1*, *PpRPOT2*)。それらの細胞内局在を調べたところ、どちらもミトコンドリアに局在することが分かった。また、ヒスチジンタグとの融合タンパク質を発現・精製し転写活性を調べたところ、どちらも活性を持つポリメラーゼであることが確認された。ヒメツリガネゴケの二つのRPOTに関して系統解析を行ったところ、高等植物の葉緑体タイプとミトコンドリアタイプが分岐する以前にヒメツリガネゴケが分岐するという結果が得られた。これはヒメツリガネゴケには葉緑体タイプのRPOTが存在しないことが示唆する結果であった。ヒメツリガネゴケの葉緑体のRPOTの存在の有無を調べるために、単離葉緑体を用いてPEPのみを阻害するTagetitoxin (Tag)の効果を見た。葉緑体の転写はTagによってほぼ阻害された。各遺伝子に対するTagの効果の解析も行っているため、その結果も報告する予定である。

1pF15

*psbD*における光応答転写に関与する青色光により発現するシロイヌナズナ色素体シグマ因子Sig5

角山雄一¹, 椎名隆², 豊島喜則³ (1京大・RIセンター, 2京都府大・人間環境, 3京大院・人環)

葉緑体中に存在する原核生物型転写酵素PEPは、葉緑体ゲノムコードのコア酵素と核ゲノムコードの転写開始因子シグマ因子からなる。既に高等植物ではシグマ因子遺伝子が複数(シロイヌナズナでは6種) 同定されていることから、高等植物においても原核生物と同様に環境や成育段階に応じて因子の使い分けがなされ、葉緑体遺伝子の転写制御がなされていると考えられる。しかしながら、各シグマ因子の機能や認識配列特異性等については殆ど分かっていない。そこで、各因子を一過的に過剰発現させたプロトプラストを用いてRun-on転写実験を行い、各因子が認識する葉緑体遺伝子を調べた。その結果、三つの因子において各々異なる遺伝子での転写活性化が見られた。この実験から、PSII複合体のD2タンパクをコードする*psbD* 遺伝子の転写活性化にSig5が関与していることを明らかにした。この*psbD*には青色光応答性プロモーター(*psbD* BLRP)が存在する。また、各シグマ因子遺伝子の発現について、mRNAレベルでの光質や光強度依存性を調べたところ、Sig5のみが青色光特異的に発現することを見出した。核コードシグマ因子Sig5を介した葉緑体遺伝子*psbD*の青色光応答転写の制御機構について論ずる。

1pF16

ヒメツリガネゴケの葉緑体RpoAをコードする核遺伝子について

小林勇氣¹, 杉浦千佳², 杉田護¹ (1名大・遺伝子, 2名大・人間情報)

我々はセン類の一種であるヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* の葉緑体ゲノムの全塩基配列を決定した。その結果、82種のタンパク質遺伝子と34種のRNA遺伝子を同定したが、RNAポリメラーゼのサブユニット α をコードする*rpoA*遺伝子が存在しないことを見出した。このことから、ヒメツリガネゴケにおいては葉緑体*rpoA*が核ゲノムに転移していると考えられる。そこで、ヒメツリガネゴケのESTデータベースを検索したところ、*rpoA*相同配列をもつcDNA配列情報を見出したので、その全長cDNA配列を単離しその塩基配列を決定した。得られたcDNAは450アミノ酸からなる蛋白質をコードし、その推定アミノ酸配列は、大腸菌のRpoA (329アミノ酸)と29%、葉緑体ゲノムコードのものとは50% (ゼニゴケ、340アミノ酸)と45% (タバコ、337アミノ酸)のアミノ酸が一致していた。N末端の約100アミノ酸はトランジット配列と予想された。ヒメツリガネゴケの*rpoA*遺伝子のコピー数、遺伝子構造、mRNAの蓄積レベル、細胞内局在性についても合わせて報告する。

1pF17

ヒメツリガネゴケ葉緑体ゲノムに存在する*ycf66*の構造と発現

萩原充¹, 杉田護² (1名大・人間情報, 2名大・遺伝子)

ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* の葉緑体ゲノムには82種のタンパク質遺伝子が存在する。このうち、*ycf66*はゴケ以外の陸上植物の葉緑体ゲノムには存在しないことが知られている。ヒメツリガネゴケの*ycf66*は141アミノ酸からなる蛋白質をコードし、その推定アミノ酸配列はゼニゴケ (ORF135)、オドンテラ (ORF99)、ラン藻 *Synechocystis* 6803株 (slr0503) のものと、それぞれ47%、58%、64%のアミノ酸が一致していた。ヒメツリガネゴケ*ycf66*は、第1エキソン (106bp)、イントロン (543 bp)、第2エキソン (320 bp) からなり、その上流と下流には*psbM*と*ycf6*がそれぞれ隣接していた。*ycf66*の機能は不明であり、その転写物の有無についても報告がない。そこで、ヒメツリガネゴケ*ycf66*の転写様式について調べた。その結果、*ycf66*の第1エキソンをプローブに使用してノーザン解析を行ったところ、4.5-0.5 kbの7本の明瞭なバンドが検出された。このことは、*ycf66*が活発に転写されている遺伝子であることを示している。*ycf66*の転写開始点、プロモーター配列、転写単位についても合わせて報告する。

1pF18

ヒメツリガネゴケ葉緑体のRNAエディティング
宮田有希¹, 杉浦千佳², 小林勇氣¹, 杉田護¹ (¹名大・
遺伝子,²名大・人間情報)

葉緑体のRNAエディティングは陸上植物に普遍的に見られるが、藻類では起こらないことから、植物が陸上化する過程で新たに獲得した分子機構と考えられている。コケ植物は、陸上植物の中で最も古くに分岐した群であり、セン類、タイ類、ツノゴケ類の3つのグループから構成されている。タイ類であるゼニゴケの葉緑体ではRNAエディティングが起こらないのに対して、ツノゴケ類であるホウライツノゴケの葉緑体では、多数のRNAエディティングが起こることが報告されている。一方、セン類の葉緑体でRNAエディティングが起こるのかどうかは不明である。そこで、セン類の仲間であるヒメツリガネゴケ葉緑体のRNAエディティングの有無について調べた。ヒメツリガネゴケ葉緑体の全塩基配列から推定される蛋白質のアミノ酸配列を、ゼニゴケ、タバコ、イネなどのものと比較することにより、RNAエディティング部位を予測し、ついでRT-PCR法で得たcDNA (mRNA)配列をゲノム配列と比較した。その結果、これまでに *rps14* 遺伝子と *ndhA* 遺伝子が転写後にC→U変換することを明らかにした。その他の遺伝子のRNAエディティングの有無についても報告する。

1pF19

アクティベーションタグされたシロイヌナズナ光合成遺伝子組織特異的発現促進遺伝子 *CES101* の同定
後藤新悟¹, 丹羽康夫¹, 小林裕和¹ (¹静岡県大・生活健康科学)

核遺伝子による葉緑体機能構築制御機構を解明するために、シロイヌナズナを用い、非光合成組織(カルス)において光合成遺伝子が発現するようになった突然変異系統の選抜を試みた。*RBCS-3B* プロモーターの制御により薬剤耐性遺伝子を発現するようにした形質転換系統のカルスを用いて、アクティベーションタグ法を適用し、*RBCS* 遺伝子が発現するようになった突然変異系統 *ces101* (*callus expression of RBCS*) を選抜した。*ces101* 系統カルスは緑色を呈し、ノーザン解析による *RBCS* 遺伝子の発現量は、野生系統カルスの約3.5倍であった。また、葉緑体光合成遺伝子発現を制御する σ 因子遺伝子 *SIG1* の発現も増大していた。*ces101* 系統においては、ゲノム当たり1コピーのT-DNAが、第3染色体上部P1 clone *MSL1* 部位に挿入されていた。この近傍のORFを検索したところ、レフトボーダー側にはエチレン反応タンパク質および *Ser/Thr kinase*、また、ライトボーダー側にはモータータンパク質である *kinesin* と相同性の高い配列が見つかった。リアルタイムPCR法より、これら遺伝子の発現を野生系統カルスと比較したところ、*Ser/Thr kinase* の発現に顕著な増加が認められた。そこで、エンハンサー配列と *Ser/Thr kinase* 配列を連結したバイナリーベクターを作成し、親系統カルスに導入した。

1pG01

アズキ上胚軸におけるキシログルカンオリゴ糖によるキシログルカン分解/転移酵素の活性化と細胞壁伸展性の増加

加来友美¹, 田渕彰², 若林和幸¹, 保尊隆享¹ (¹大阪市天院・理・生物,²岡山山大・資生研)

アズキ上胚軸細胞壁には、キシログルカンの加水分解とエンド型転移反応とを触媒するキシログルカン分解/転移酵素(XGH/T)が存在する。XGH/Tによる *in vitro* のキシログルカンの分解は、キシログルカン転移反応のアクセプター基質としてはたらくキシログルカンオリゴ糖を付加することによって促進される。本研究では、アズキ上胚軸の細胞壁構造内でキシログルカンオリゴ糖がXGH/Tの活性に与える影響と、この時の細胞壁の力学的伸展性の変化を調べた。メタノールで固定したアズキ上胚軸切片から表皮組織を調製し、様々な濃度のキシログルカンオリゴ糖存在下でXGH/Tとインキュベートした。キシログルカンオリゴ糖が存在しない場合は、XGH/Tは細胞壁中のキシログルカンの量およびその平均分子量には影響せず、また、細胞壁伸展性にも変化は見られなかった。しかし、100 μ Mのキシログルカンオリゴ糖が存在すると、XGH/Tによって細胞壁中のキシログルカンの分子量が低下し、細胞壁伸展性が増加した。以上の結果から、キシログルカンオリゴ糖は実際の細胞壁構造内でXGH/Tによるキシログルカンの分解を促進し、細胞壁伸展性を増加させることが示された。

1pG02

オオムギ胚乳のキシラン合成酵素および1,3:1,4- β -グルカン合成酵素の性質

浦原健¹, 土屋光司¹, 小竹敏久¹, 円谷陽一¹, 河田尚之², 小前幸三² (¹埼玉大・理・分子生物,²農業研究機構・作物研究所)

アラビノキシラン、1,3:1,4- β -グルカンは単子葉植物の細胞壁の主要成分であるが、それらの合成については明らかになっていない。本研究ではオオムギ胚乳のキシラン合成に関わるキシロース転移酵素(XTase)および1,3:1,4- β -グルカン合成酵素(GTase)の性質を調べた。

開花後3週目の登熟過程のオオムギ(四国裸97号)の胚乳から膜画分を調製して酵素源とした。UDP-Xylを供与体、ピリジルアミノ基(PA)で蛍光標識したキシロオリゴ糖(Xyl₃-PA)を受容体として反応させたところ、Xyl₃-PAにXylが転移したXyl₄-PA、さらにXyl₅-PA、Xyl₆-PAが生じた。XTaseの最適pHは6.8、最適温度は20℃で、0.5% Triton X-100、5 mM MnCl₂により活性は促進された。1,3:1,4- β -グルカン合成活性を検出するために、UDP-[¹⁴C]-Glcを基質として反応を行ったところ、リケナーゼで特異的に分解される β -グルカンが生成された。GTaseの最適pHは9.0であった。

オオムギ胚乳の成長段階を追って(開花後7から35日目)XTase、GTaseの活性を測定した結果、XTaseは13日から16日目、GTaseは16から19日目で著しく活性が高いことが明らかになった。

1pG03

ラムノガラクトンIIの構成糖、3-デオキシ-D-manno-オクツロソンの合成酵素遺伝子の単離と解析

松浦啓一¹, 宮川功¹, 小林優¹, 間藤徹¹ (京都大院・農・応用生命・植物栄養学)

細胞壁ペクチン質多糖のネットワーク構造はラムノガラクトンII(RG-II)部位でのホウ酸とカルシウムによる架橋によって細胞壁に保持されている。ホウ酸はRG-IIのアピオース、カルシウムは3-デオキシ-D-manno-オクツロソンのKDO同士をそれぞれエステル結合、配位結合で架橋している可能性がある。KDOは、高等植物ではRG-IIに特異的な構成糖であり、グラム陰性菌の外膜のリポ多糖にも存在する。本研究は、特にカルシウムによるRG-II架橋の生理的意義を明らかにするため、KDOを量的に減少させた形質転換植物の作成を目的としている。そのため、シロイヌナズナのcDNAライブラリーから KDO-8-リン酸合成酵素 (KDOS) の候補cDNA (*AtkdsA1*) を単離した。このcDNAについて大腸菌で組換え蛋白質を発現させ、KDOS活性を確認した。また、同源性検索を行ったところ、シロイヌナズナのゲノム上に *AtkdsA1* とアミノ酸配列で93%の相同性をもった遺伝子 *AtkdsA2* が存在していた。現在、これら2つの遺伝子について発現解析を行っている。

1pG04

イネの開花期の穂と発芽種子の両方で発現するエンド型1,3-β-グルカナ-ゼ遺伝子:cDNAクローニングと組換え酵素の性質

秋山高¹, M.Arumugam Pillai¹ (独立行政法人・北農研)

イネ実生のcDNAライブラリーをオオムギのエンド型1,3-β-グルカナ-ゼGII遺伝子をプローブに用いてスクリーニングを行った結果、新規遺伝子が単離された (AF443600)。このcDNAのORFは334個のアミノ酸を含むが、成熟酵素部分は305個のアミノ酸からなり、その推定分子量は32794、推定等電点は9.43を示した。遺伝子の3'UTRをプローブに用いてノーザンブロット解析を行った結果、開花期の穂及び発芽期の種子で高い発現が観察された。穂では開花直後から発現が増大し、高い発現レベルが5日間ほど持続、その後徐々に下降すること、種子では発芽1日目が発現量が上昇し始め、その後約6日目まで高いレベルが続き、その後急速に減少することなどが解明された。一方本遺伝子がコードするタンパク質の1,3-β-グルカナ-ゼ活性の有無を調べるため、成熟酵素部分をGST融合タンパク質発現ベクターに組み込み、大腸菌内での大量発現を行った。精製された組換え酵素は、1,3-β-グルカナ-ゼの代表的な基質ラミナリンに対して高い活性を示した。酵素反応産物をTLCを用いて分析した結果、オリゴ糖が検出されたため本酵素はエンド型に分類された。その他の実験結果も合わせて、本遺伝子がコードするエンド型1,3-β-グルカナ-ゼの推定される生理的役割について考察する。

1pG05

側根原基で発現するエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子 (*EXGT-A1*) の解析

多田功生¹, 横山隆介¹, 西谷和彦¹ (東北大院・生命科学)

エンド型キシログルカン転移酵素 (*EXGT*) は、細胞壁中のセルロース微繊維間を架橋しているキシログルカン分子の接ぎ換え反応を触媒する酵素である。*EXGT* をコードしている遺伝子は大きな遺伝子ファミリー (*XTH* ファミリー) を形成し、シロイヌナズナでは33個の遺伝子が存在している。それぞれのメンバーの発現は独自の器官特異性やホルモン応答性を持つことが確認されており、植物の生長の諸過程における細胞壁の構築と再編において独自の役割を担っていると考えられる。我々は、*XTH* ファミリーの中でも発現量の多いメンバーの一つである *EXGT-A1* について、リアルタイムRT-PCR、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、側根原基や特定の維管束で特異的に発現することを明らかにしてきた。今回は更に *EXGT-A1 promoter::GUS* 形質転換植物を用いて、側根形成における *EXGT-A1* の発現を詳細に観察した。*EXGT-A1* は側根原基形成の初期の段階から発現しているが、伸長した側根では発現は見られない。また発芽後の主根では発現していないことが明らかとなった。更に、根における *EXGT-A1* の発現量とオーキシンとの関係についても現在調査している。これらの結果から側根原基形成における *EXGT-A1* の機能について考察する。

1pG06

Integration of Xyloglucans into Pea Stem Segments

Takumi Takeda¹, Yuzo Furuta², Tatsuya Awano³, Koichi Mizuno⁴, Yasushi Mitsuishi⁵, Takahisa Hayashi¹ (1)Wood Research Institute, Kyoto University, (2)Laboratory of Wood Technology, Kyoto Prefectural University, (3)Division of Forest and Biomaterial Sciences, Kyoto University, (4)Department of Biology, Osaka University, (5)National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Xyloglucan and its fragment oligosaccharide were integrated into the cell walls of either the cut surface of pea stem segments longitudinally split into halves or the inner surface of pea stem segments with epidermal tissue peeled off. The integration of the xyloglucan resulted in the suppression of cell elongation giving rigidity to the walls, whereas that of the oligosaccharide resulted in the loosening of the walls accelerating cell elongation. Their integration was competitive with each other and inhibited by the presence of antibody against pea xyloglucan endotransglycosylase. The integration of xyloglucan into the cell walls could act as a brake by cross-linking (tether) between parallel microfibrils, whereas that of the oligosaccharide could cause the cleavage of xyloglucan tether to accelerate cell elongation.

1pG07

エンドウ芽生え細胞壁リグニンに対する紫外線照射の影響

柿田美智子¹, 中川直樹¹, 桜井直樹¹ (¹広島大・総合科学)

UV-B域に吸収を持つ細胞壁成分のリグニンはUV-Bの遮蔽に有効であると考えられる。明暗条件(12hr/12hr)で6日間水耕栽培したアラスカエンドウを用い、可視光、+UV-A、+UV-(A+B)、+UV-(A+B+C)を4日連続照射後、芽生えの生長の変化を、第4節間の表皮・内部組織、葉の長さとし生重量・乾燥重量測定により調べた。同時にフラボノイド吸光度を80%のエタノール抽出液から求めた。胚軸と葉の横断面を蛍光顕微鏡により観察し、リグニンの分布を調べた。破碎した胚軸の表皮と内部組織および葉の沈殿画分をアルカリ処理で除タンパクしたのち乾燥させ、リグニンをアセチルプロマイド法で定量した。また、チオアシドリシスを行いGC-MSによりリグニンの構成単位の割合を調べた。

+UV-(A+B+C)照射は、葉の長さ、生重量・乾燥重量の増加を顕著に抑制した。UV-(A+B)照射は生長にほとんど影響のない照射量であった。葉のリグニン含量は、+UV-(A+B+C)照射後1日目で、+UV-(A+B)照射では2日後に有意に増加した。胚軸では表皮で増加していたが、内部組織では4日目では増加していなかった。芽生えの胚軸・葉の横断面を蛍光顕微鏡で観察すると、UV-(A+B+C)の照射開始12時間後から、UV-(A+B)では2日後から表皮の外側で蛍光物質の蓄積が観察され、その部分にリグニンが存在していることが示唆された。これらの組織中のフラボノイド量に変化はなかった。

1pG08

ヒヤクニチソウ管状要素分化過程における細胞外リグニン合成関連物質の解析

徳永順士¹, 鈴木史朗², 梅澤俊明², 佐藤康¹ (¹愛媛大・理, ²京都大・木研)

私達はこれまでヒヤクニチソウ管状要素分化実験系を用い、細胞死の過程にある管状要素がどのようにしてリグニン化するかを解析してきた。そして現在までに管状要素のリグニン化は培地中に分泌されたモノリグノールが管状要素のペロキシダーゼまたはラッカーゼによって重合する事により進行する事を示した。培養過程の培地をHPLCで調べた結果、培地中の主要なモノリグノールであるコニフェニルアルコール(CA)量は二次壁形成の直前に増加した後急激に減少し、その後再び増加することが示された。今回は培地中に検出されるCA以外の物質の解析を行った。

分化誘導後の培地をHPLCによって分析した結果、CA以外に4つの主要なピークをはじめ12個以上のピークが検出された。また二次壁形成が起き始める時期に100 μ MのCAを添加し、培養を行ったところ、添加されたCAは6時間後には著しく減少し、代わりに他の主要な4つのピーク値が大きくなる事が示された。この結果から外生のCAが培地中でこれらの物質に変換される事が示された。

またフェニルアラニンアンモニリアーゼの阻害剤処理によりリグニン合成を阻害した細胞に、今回検出された各物質を単離し添加したところほとんどの物質でリグニン化の回復がみられた。これらの結果からこれらの物質はCAから生じた、リグニン合成に関与する物質であることが示され、現在これらの物質の更に詳細な解析を進めている。

1pG09

ゲルマニウムによる細胞壁中のペクチンの架橋は僅かである

石井忠¹, 松永俊朗², 林徳子¹, 岩井宏暁³, 佐藤忍³, 田尾下潤二⁴ (¹森林総研, ²九州沖縄農業研究センター, ³筑波大生物, ⁴島津製作所)

植物の微量必須元素であるホウ素(B)は細胞壁中でラムノガラクトuronan II (RG-II)を架橋して、ホウ酸と2分子のRG-IIからなるダイマー(dRG-II-B)として存在する。ホウ素欠乏した植物ではRG-IIはモノマー(mRG-II)として存在し、組織は脆い。これらの事実から生理的に重要なホウ素の機能の1つは、ペクチンを架橋して細胞壁の力学的強度を保持することと考えられる。ゲルマニウム(Ge)はBの代替をするという報告があるが、Geがペクチンを架橋するかは不明である。本研究ではB欠乏したカボチャをBの代わりにGe(28 μ M)を含むHoagland培地で7日間栽培し、子葉、第1-4葉に含まれるRG-IIダイマーの存在比やdRG-II-BとdRG-II-Geの存在比を測定した。その結果、次のことが明らかになった。1) 第2葉のGe濃度が最も高く(260 μ g/g 乾重量)、第4葉では(120 μ g/g乾重量)であった。2) 取り込まれたGeの70%以上は細胞壁に存在した。3) 第2葉から第4葉の細胞壁のRG-IIダイマーは、全RG-IIの12-34%であり、Geを含むRG-IIダイマーは2%以下であった。4) Bの代わりにGeを含む培地で栽培したカボチャの葉柄は、B欠乏したものと同様に折れやすかった。

1pG10

半数体プランバギニフォーリアの細胞接着ミュータント(*nolac-H18*)におけるペクチンのグルクロン酸量の減少

岩井宏暁¹, 石井忠², 佐藤忍¹ (¹筑波大・生物, ²森林総研)

多くの種の培養細胞では、継代を続けることにより、形態形成能力の消失と同時に細胞間の接着性が弱くなることが観察される。なかでもニンジン培養細胞の自然変異体Non-embryogenic callusでは、ペクチンの中性糖側鎖のアラビノガラクトタン構造に変異が生じていることが判明している。近年我々は、*Nicotiana*属中で最小のゲノムを持つ *Nicotiana plumbaginifolia*の半数体植物の葉切片にT-DNAを挿入して培養し、不定芽形成能力を失うと同時に、細胞間接着性の弱くなったlooseな細胞塊を形成するミュータントの作出と解析を行ってきた。その結果、*nolac-H14*では、ヘミセルロースと挙動を同じくするペクチンの中性糖側鎖において、アラビナンが存在していないことが判明した(Planta 2001)。本研究では、同じく細胞接着ミュータントである*nolac-H18*について解析を行った。*nolac-H18*の細胞壁成分全体の糖組成を解析したところ、グルクロン酸量がNormalと比較して、13%以下しか存在していなかった。さらに、分別抽出した細胞壁画分でのグルクロン酸は、Normalでは主に炭酸ナトリウム画分に存在し、それが*nolac-H18*ではほとんど存在していなかった。また、アラビノース、ガラクトース量が*nolac-H18*では、Normalの約半分になっていた。

1pG11

メリステムにおける強い細胞接着には新規ペクチン-グルクロン酸転移酵素遺伝子の発現が必須である岩井宏暁¹, 石井忠², 佐藤忍¹ (¹筑波大・生物, ²森林総研)

*nolac-H18*ゲノムDNA中のT-DNAが挿入された遺伝子は、予想酵素活性領域が動物のグルクロン酸転移酵素の酵素活性領域と相同性が高いことが判明し、*NpPGUT* (Pectin Glucuronyltransferase) と命名した。*NpPGUT*を *nolac-H18*において過剰発現させた形質転換体を作成した結果、約 80%が不定芽を形成し、グルクロン酸 (GlcA) 量が回復し、細胞壁成分はNormalとほぼ同様の成分を示した。Normalのラムノガラクトノナン-II (RG-II) では、その全てがRG-II-ホウ素二量体 (dRG-II-B) として存在したが、*nolac-H18*のRG-IIはGlcAを欠き、82%以上がRG-II単量体として存在した。相補体では、全て dRG-II-B として存在した。以上のことから、*NpPGUT*が*nolac-H18*の変異遺伝子であることが判明した。*NpPGUT*タンパク質の局在性をGFP融合タンパク質を用いて調べたところ、小胞体に局在することが示された。また、*NpPGUT*は茎頂、根のメリステムで発現が強いことが *in situ* hybridizationおよび *P_{NpPGUT}::GUS* 形質転換体により示された。以上の結果は、*NpPGUT*が、ペクチンに対する新規のグルクロン酸転移酵素遺伝子であり、またその発現はメリステムにおける強固な細胞接着に必須である事を示している。

1pG12

子葉に存在するyieldin様タンパク質の解析
高橋宏二¹, 中里(岡本)朱根², 木藤伸夫¹, 加藤潔¹
(¹名古屋大・情文・生物システム, ²昭和薬科大・生物)

Yieldinは、細胞壁の臨界降伏張力 (γ) をpH依存的に調節する因子としてササゲ黄化胚軸伸長成長域の細胞壁から抽出・単離されたタンパク質 (分子質量32kDa) であり、高等植物の軸性器官の伸長成長における細胞壁の不可逆的伸展の調節に大きく寄与していると考えられる。我々はyieldinの器官・組織分布を調べる過程でササゲ黄化芽生えの子葉に抗yieldin抗血清に交叉反応する28kDaタンパク質を見出した。さらにこの精製タンパク質が γ 調節活性を示すことを明らかにした。そこで、この28kDaタンパク質をyieldin様タンパク質と考え、CYLP (cotyledonary yieldin-like protein) と呼ぶことにした。種子 (未熟、乾燥、および吸水種子) の子葉から抽出したRNAをRT-PCRの材料としてCYLPのcDNAクローニングを行ったところ、未熟種子からのRNAを用いた場合のみCYLPの完全長cDNA (*Vu-CYLP*) を得ることができた。この結果は、CYLPの転写産物は種子の形成過程で発現し、蓄積していることを示唆している。現在、CYLP発現と種子形成との関係を明らかにする目的で、CYLP遺伝子発現の時期を決定するための詳細な発現解析を進めているところである。

1pG13

大腸菌を用いたyieldin高発現系の構築: 部位特異的突然変異誘発による変異yieldinの産生およびその生理活性変化

木藤伸夫¹, 平田晋也¹, 高橋宏二¹, 加藤潔¹ (¹名古屋大・情報文化)

ミトリササゲ下胚軸の伸長成長域細胞壁より抽出され、pHに依存して細胞壁臨界降伏張力 (γ) を制御するタンパク質、yieldin、の活性発現機構を明らかにする目的で、大腸菌における組換えyieldin (rYLD) 高発現系の構築を行った。使用したpUT7クローニングベクターは、pET-15bのT7転写発現領域を有し、T7プロモーターの下流に遺伝子を挿入することで、大腸菌における目的タンパク質の大量発現が可能となる。シグナルペプチド領域を除いたyieldin遺伝子をpUT7にクローニングし、BL21 (DE3) 株においてrYLDを産生させた。産生されたrYLDは不溶性の凝集塊となったが、8M尿素で可溶化後尿素濃度を徐々に下げることで可溶化rYLDを得ることができた。このrYLDは内生のyieldinを熱失活させたグリセリン処理ササゲ中空胚軸 (GHC) の γ 調節能を回復させた。

Yieldinはclass III acidic endochitinaseと相同性を示し、活性部位のアミノ酸配列も保存されている。そこで、chitinase活性部位に相当するyieldinの124番目のアスパラギン酸と128番目のグルタミン酸を、それぞれアスパラギン、グルタミンに変換する部位特異的変異を導入し、変異 rYLD (D124N)、rYLD (E128Q) の発現系を作成した。現在これらのタンパク質の精製を行い、熱失活GHCを用いてyieldin活性を測定している。さらに、yieldin活性とchitinase活性の相関を明らかにしたいと考えている。

1pG14

yieldinに構造相同性を示すキュウリクラスIIIエンドキチナーゼのクローニングと大量発現系の構築

平田晋也¹, 高橋宏二¹, 木藤伸夫¹, 加藤潔¹ (¹名古屋大・情文・生物システム)

ミトリササゲ下胚軸において細胞壁臨界降伏張力を調節するタンパク質yieldinは、植物のクラスIIIキチナーゼと高い相同性を示す。そこで、yieldin活性とキチナーゼ活性の相関を調べるため、キュウリのクラスIIIキチナーゼ (*CHI*) のcDNAクローニング、及び大腸菌による発現系の構築を行った。キュウリの*CHI*遺伝子は、互いに90%以上の相同性をもつ*CHI1*、*CHI2*、*CHI3*の多重遺伝子族からなる。青長地這胡瓜の芽生えよりtotal RNAを抽出し、RT-PCRにより各*CHI*遺伝子のcDNAを増幅した。DNA塩基配列を決定したところ、*CHI1*のDNA塩基配列は報告されている塩基配列と完全に一致したが、*CHI2*については1箇所、*CHI3*については3箇所の塩基配列が報告されている*CHI*遺伝子と異なることが確認された。しかし、RT-PCRにより増幅した全てのcDNAで同様の変異が認められたため、これらの変異は今回用いた品種固有の変異であると考えられた。

次に、シグナルペプチド領域を除いた各*CHI* cDNAをpUT7クローニングベクターにクローニングし、大腸菌を用いて*CHI*タンパク質の大量発現を試みた。IPTGで誘導されたタンパク質は不溶性の凝集塊を形成したため、8M尿素で可溶化後、透析により尿素を除くことで可溶性の*CHI*タンパク質を得た。現在、得られたタンパク質を用いて、キチナーゼ活性とyieldin活性の相関について調べている。

1pG15

タバコ培養細胞BY-2におけるキネシン様タンパク質TBK10の解析

田家英治¹, 松井啓祐², 浅田哲弘³, 長田敏行¹ (東京大・院・理学系, ²京都大・院・理学系, ³大阪大・院・理学系)

微小管モータータンパク質であるキネシン様タンパク質は、微小管構造の維持や微小管を介した物質の輸送などに関与している。Matsui ら (*Protoplasma* **215**: 105 2001) によりタバコBY-2細胞からクローニングされたTBK10 (Tobacco BY-2 Kinesin-like Polypeptide 10) は703残基のアミノ酸からなるタンパク質で、アミノ酸配列の中央領域にモータードメインを持ち、central motor subfamilyに属する。しかしその機能の大部分は未解明である。

本研究ではTBK10の機能を解析するために、細胞周期とタンパク質との発現の関係を、同調化したBY-2細胞の発現量変化を追うことで調べた。その結果、このタンパク質は分裂期のみならず細胞周期全体で発現していることが明らかになった。また、細胞の増殖期でその発現が多く、定常期では発現がやや減少することが分かった。この事実はTBK10が分裂期のみならず細胞周期全体でその機能を果たしていると考えられる。他の多くのキネシン様タンパク質と異なる特徴的なこの発現パターンは、細胞周期全体を通じた微小管構造とキネシン様タンパク質の関係を探る上で注目すべき点である。現在は局在解析と、微小管との相互作用を生化学的に解析することにより、その機能の解明に努めており、その結果について報告する。

1pG16

Optical trap nanometry of higher plant myosin (myosin XI) reveals its processive movement on an actin filament at 35 nm steps

富永基樹¹, 小嶋寛明¹, 横田悦雄², 織井秀文², 中森鈴奈¹, 新免輝男², 大岩和弘¹ (通総研・生体, ²姫工大・理)

We measured forces and movement developed by single molecules of a 175kDa higher plant myosin purified from tobacco cultured BY-2 cells by using optical trap nanometry. Analysis of a cDNA clone showed that this myosin is a member of class XI myosin. To determine mechanical properties of this myosin, a latex bead coated with one or a small number of myosin molecules was captured with the optical trap and then brought into contact with an actin filament fixed on glass surface. Beads carrying just a single myosin molecule moved processively along actin filaments in 35 nm steps at ca. 4 μ m/s in the presence of 0.1 mM ATP. The maximal force measured was less than 1 pN, much smaller than that produced by skeletal muscle myosin IIs. These results suggest that this plant myosin is highly specialized for the production of fast processive movement with concomitant low force generation.

1pG17

タバコ培養細胞におけるアルミニウムのアクチン動態への影響

山本洋子¹, Saddikuti Rama Devi^{1,2}, 力石早苗¹, 松本英明¹ (¹岡山大学・資生研, ²生研機構)

アルミニウム (Al) は、Ca溶液中では容易に細胞に吸着し、増殖阻害を引き起こす。我々は、Alを吸着したタバコ培養細胞を高張液に懸濁することにより、Alが原形質膜と細胞壁を接着する現象を見出した (2000年、本大会で報告)。膜と壁との接着は細胞伸長を阻害する可能性が高い。本研究では、この接着現象にアクチン線維が関与する可能性を検討するために、アクチン線維に特異的なRhodamine phalloidine 染色法を用い、Al処理に伴うアクチン動態を観察した。コントロール細胞に比較して、Al処理細胞では大部分の細胞で太いアクチン線維が観察された。さらに、Al処理細胞でも高張液中で正常な原形質分離を示し丸くなった細胞では、環状のアクチン線維が見られるが、接着により異常形態を示す細胞では、接着点ならびに異常な細胞形態に沿ってアクチン線維が見られた。以上の結果から、Al処理ではアクチン線維が太くなり、ついで可塑性を失う結果、アクチン線維による膜と壁との接着が固定されてしまう可能性が示唆された。Al耐性タバコ培養細胞株を用いた接着現象の解析結果についても報告する。

1pH01

トウモロコシ幼葉鞘の光屈性に関する光誘導性成長抑制物質

瀧上千鶴¹, 長谷川剛², 山田小須弥³, 繁森英幸³, 上田純一⁴, 長谷川宏司³ (¹筑波大院・生命環境, ²大阪府大院・理, ³筑波大・応生化, ⁴大阪府大・総合科学)

近年の高性能の機器分析や注意深い実験手法により、光屈性に伴う光・影側におけるオーキシン量の偏差分布は全く起こらず、オーキシンの横移動なしでも光屈性が誘導されること等が明らかとなった。同時に光誘導性の成長抑制物質が光側組織で生成された結果、光側の成長が抑制され屈曲することも明らかとなり、光屈性はオーキシンではなく、成長抑制物質の偏差分布により誘導されるという Bruinsma-Hasegawa 説 (1990年) が提唱され、数々の証拠が提示されてきた。

本研究ではトウモロコシ幼葉鞘の光屈性における光誘導性成長抑制物質の本体を徹底的に解明し、光屈性に伴う動態を明らかにすることを目的とした。青色光照射側と影側とのHPLC-PDクロマトグラムの比較から、少なくとも4種類の光誘導性物質の存在が確認された。また、同時にIAAは光・影側に均等に分布することもHPLC-FLによって再確認された。4種類の物質のうち、2つは6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA) と6-methoxy-3-methyl-chromen-2-oneであることがNMR等のスペクトル解析から明らかになった。特にMBOA含量は光側で影側より顕著に高いことがHPLC-FLによって明らかになった。また幼葉鞘の片側に投与した場合、投与側に屈曲させることもわかった。他の物質の構造解析および動態は現在、研究中であるが、トウモロコシ幼葉鞘の光屈性はMBOAを初めとする光誘導性成長抑制物質により制御されていることが強く示唆された。

1pH02

ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* 1倍体茎葉体と被子植物2倍体シュートにおけるオーキシン分布の比較

阪口寿子¹, 藤田知道³, 佐藤利幸², 長谷部光泰³ (1信州大院・工, 2信州大学・理, 3基礎生物学研究所・種分化第2)

被子植物の2倍体世代のシュートではオーキシンの合成、代謝、極性輸送などによって作られるオーキシンの分布が様々な生理・形態形成過程を制御している。コケ植物セン類の1倍体世代は、茎葉体とよばれる被子植物のシュートに類似した構造を持つ。この独立に進化したシュート構造においてオーキシンの分布の制御はどのように行われ生理・形態形成過程に影響しているのだろうか。

我々はコケ植物体内で内生オーキシンの局在や応答性の変化を調べるため、被子植物由来のオーキシン応答遺伝子 *GH3* のプロモーターとレポーター遺伝子 *GUS* の融合遺伝子を作成し、ヒメツリガネゴケの *PpMADS2* 遺伝子座に導入し、*GH3* プロモーター: *GUS* 形質転換体を作成した。

この茎葉体において、*GUS* の発現は仮根、茎葉体の基部、茎の一部で検出された。さらにオーキシンを添加した時の表現型と、*GUS* の発現が対応し、*GH3* プロモーターで誘導される *GUS* の発現パターンはオーキシンの反応性、局在を反映していると考えられた。また胞子体では胚発生が進むにつれて *GUS* の発現パターンが胚全体から胚上部へ、そして胚下部へとダイナミックに変化しており、オーキシン分布の変動が示唆された。さらに、数種類のセン類の茎葉体、胞子体でのオーキシン輸送を ¹⁴C-IAA を用いて調べた結果をあわせて報告する。

1pH03

The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*

澤進一郎¹, 大岸麻紀², 郷田秀樹², 嶋田幸久², 吉田茂男², 小柴共一¹ (1都立大院・理, 2理研・植物科学センター)

Affymetrix DNA microarray of *Arabidopsis* has been used to analyze the transcripts from seedlings treated with IAA for 15 minutes to gain a more comprehensive understanding of auxin primary responses. An early downregulated gene has been identified for the first time. Twenty nine early upregulated genes have been also identified, including a few types of typical transcription factors, suggesting that the auxin signals are mediated by a master set of diverse transcriptional regulators. Auxin treatment rapidly induced the homeobox HAT2 gene, and 35S::HAT2 transgenic plants showed auxin related phenotypes of long hypocotyls, epinastic cotyledons, long petioles and small leaves. HAT2 gene expression was induced by auxin, far-red light, and dark treatment, but not by the other phytohormones. These findings, together with results from northern blot analysis and histochemical analysis of HAT2::GUS transgenic plants, suggest that HAT2 is an important transcription factor to regulate auxin mediated morphogenesis.

1pH04

メロン ACC 合成酵素遺伝子 (CMe-ACS2) のオーキシンによる発現機構について

坂本木綿子², 龍野由美恵¹, 千葉智之¹, 平林哲夫³, 中川弘毅¹, 佐藤隆英^{1,2} (1千葉大・園芸, 2千葉大・院自然科学, 3日本園芸研)

CMe-ACS2 はメロンのマルチリスボンスタイプの ACC 合成酵素遺伝子でオーキシンなど種々の因子により発現誘導を受ける。メロン果実においては、プレクリマクテリック期に発現しており、成熟過程のエチレン生成に関与していると考えられている。この遺伝子のプロモーター領域に、オーキシン誘導シス因子である TGCTC 様エレメント (AuxRD 2A と AuxRD 2B) が存在する。本研究は CMe-ACS2 発現の調節機構を解明する一段階として、これらの因子がオーキシンによる発現誘導に関与しているか検討した。断片化した CMe-ACS2 プロモーターを pBI221 に結合し、タマネギ表皮細胞に導入して、一過的発現系によるオーキシンによる *GUS* 活性誘導を測定した。この結果、TATAbox の約 100bp 上流に存在する AuxRD 2A (CGGACATggcgaTGCTC) のみを含む断片でオーキシンによる活性誘導があった。この因子を削除すると活性誘導がなくなった。この因子をミニマムプロモーターに結合させると活性誘導がみられた。これらことから、AuxRD 2A がオーキシンによる誘導シス因子として働いていることが明らかになった。さらに、TGTC を 2塩基づつ置換すると活性誘導がなくなるので TGTC の回文状構造が発現に関わっていることがわかった。

1pH05

初期胚発生においてシュート領域の決定に異常を示すイネ突然変異体 aberrant regionalization of embryo 1 (are1) の解析

伊藤百代¹, 千徳直樹¹, 北野英己², 長戸康郎³, 松岡信¹ (1名大・生物分子応答センター, 2名大・農, 3東大・農生)

胚発生過程における器官や組織の分化は、それに先立つ基本軸や分化領域の決定に基づいて行われる。我々は、初期胚発生過程におけるシュート分化領域決定のメカニズムに興味をもち研究を行っており、イネ胚発生過程においてシュートの形態的な分化以前からシュート分化予定領域に特異的な発現の見られるホメオボックス遺伝子 OSH1 の発現を指標として、OSH1 の初期球状胚における発現が異常になる突然変異体をいくつか単離した。その1つである are1 は、初期球状胚における OSH1 の発現領域が野生型イネに比べて広くなり、完成胚ではシュートが2つ分化する。また、この OSH1 の発現は領域の拡大のみならず場所も異常になっていた。胚発生以降の形態を解析した結果、いくつかの点において KNOX 遺伝子の過剰発現体やオーキシンの極性輸送異常変異体と類似の表現型を示した。さらに、DR5::GUS を用いた解析により、are1 ではオーキシンの分布が異常であることが分かった。これらの結果をもとに ARE1 遺伝子の機能を考察したい。

1pH06

HMG-CoA Reductase阻害剤を用いた細胞伸長メカニズムの解析

鈴木優志¹, 永田典子¹, 加藤尚志², 上出由希子¹, 吉田茂男^{1,2}, 村中俊哉¹ (¹理化学研究所・植物科学研究センター, ²理化学研究所・植物機能)

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR)はHMG-CoAをメバロン酸に還元する反応を触媒する酵素で、酢酸-メバロン酸経路の律速酵素である。HMGRは多くの植物ホルモンの生合成やある種の蛋白質のファルネシル化を制御していると考えられている。現在までにBY-2を材料にHMGR阻害剤を利用した研究が進められ、HMGR阻害剤は細胞分裂を抑制することが報告されている。しかし植物個体に対する影響はわかっていない。そこでシロイヌナズナをHMGR阻害剤であるlovastatinを含む培地で育てた。

その結果、lovastatinは細胞分裂のみならず細胞伸長も阻害することを見いだした。下流代謝産物を用いた回復実験を行った結果メバロン酸からBrassinolideに至る代謝産物を投与した場合は細胞の大きさはほぼ回復したが、cytokininには回復効果はなかった。

次にlovastatin添加が遺伝子発現にどのような影響を与えるかをGene Chipを用いて網羅的に解析した。*XTR9*や*extensin-like*といった細胞伸長関連蛋白質をコードする遺伝子はlovastatin処理により発現が減少していた。しかしbrassinolideを添加しても発現は回復しなかった。その一方でbrassinosteroid誘導遺伝子として知られる*TCH4*や*XTR6*の発現はlovastatinによる影響を受けなかった。これらの結果からbrassinosteroidを経由しない細胞伸長シグナルがHMGRの下流に存在することが示唆された。

1pH07

イネにおけるDWF4相同遺伝子の解析

坂本知昭¹, 上口(田中)美弥子², 萱野暁明³, 田中宥司³, 岩堀修一¹, 松岡信² (¹筑波大・農林, ²名大・生物分子応答, ³生物研)

ブラシノステロイドを欠損する突然変異体はシロイヌナズナに数多く見出されている。それぞれの突然変異体について生合成変異部位と原因遺伝子の特定が進んだ結果、ブラシノステロイド生合成経路のほぼ全貌が明らかとなっている。そのうちの1つシロイヌナズナ矮性突然変異体*dwarf4* (*dwf4*)の原因遺伝子DWF4は、ブラシノステロイド生合成の主要なステップであるC22-水酸化に触媒するシトクロムP450モノオキシゲナーゼをコードしていた。

我々はイネにおけるブラシノステロイド生合成とその生理的機能を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナDWF4と同一性を示す遺伝子*OsDWF4*を単離し解析を行った。*OsDWF4*は506アミノ酸で構成されるタンパク質をコードしており、推定されるアミノ酸配列はシロイヌナズナDWF4と66%の同一性を示した。シトクロムP450モノオキシゲナーゼに特徴的な6つのドメイン構造はいずれも*OsDWF4*に保存されていた。さらに我々はこの6つの保存されたドメインのうちの1つ、ドメインCにレトロトランスポゾン*Tos17*の挿入変異を生じたイネ「日本晴」遺伝子破壊系を得ることができた。この突然変異体の解析も併せて、*OsDWF4*の機能について考察する。

本研究は生研機構基礎研究推進事業の支援を受け推進された。

1pH08

イネ3量体Gタンパク質 α サブユニット遺伝子の機能解析

藤澤由紀子¹, 山崎優¹, 加藤久晴¹, 岩崎行玄¹ (¹福井県大・生物資源)

高等植物3量体Gタンパク質は、植物ホルモン(ジベレリン、オーキシシン、ABAなど)、光、エリシターなどの外来シグナルを細胞内へ伝達する変換分子と考えられている。しかし、上記の植物3量体Gタンパク質を介するシグナリングの分子機構は、どれも不明な点が多い。我々は、イネ3量体Gタンパク質 α サブユニット遺伝子(RGA1)を欠損した変異体、*d1*を用いて、3量体Gタンパク質シグナリングの解明を進めている。昨年度、 α サブユニット遺伝子内にアミノ酸置換を導入した改変遺伝子(RGA1QL)の酵素化学的諸性質を報告した。RGA1QLは、GTP結合能を有するが、GTPase活性を失っていることより、恒常的に活性型を示すと考えられた。この改変遺伝子を、 α サブユニット自身のプロモーターに連結させた後、アグロバクテリア法を用いて*d1*に導入した。今回は、この形質転換イネの解析結果について報告する。

RGA1QLを導入した*d1*形質転換体(*d1QL*)は、野生型とほぼ類似した形態を示し、徒長型にはならなかった。種子に関しては、若干、長径が長くなった。次に、半種子を用いて α -アミラーゼの合成を検討したところ、*d1QL*の半種子は、ジベレリンを与えなくても、 α -アミラーゼを合成していた。現在、RGA1QLが α -アミラーゼを誘導する機構について解析を進めている。

1pH09

BRI1キナーゼドメインと相互作用する細胞内情報伝達因子の探索

平林周一¹, 松下保彦¹, 佐藤道生¹, 大井理恵¹, 安部浩², 丹生谷博¹ (¹東農工大・遺伝子, ²農学部)

シロイヌナズナおよびイネにおいて明らかにされたBRI1タンパク質は、細胞外ブラシノステロイド(BRs)シグナルを細胞内に伝達する受容体膜タンパク質である。BRI1の細胞外ドメインにBRsが結合することによって細胞内プロテインキナーゼドメイン(KD)の自己リン酸化が促進されることが示されたが、その下流の細胞内情報伝達経路は未だ不明である。今回我々は、GSTとイネcDNAの融合タンパク質を発現するファージライブラリーから、固相リン酸化法を用いてKDによりリン酸化されるタンパク質のスクリーニングを行なった。その結果、53の陽性クローンが得られ、これらはその塩基配列から35種類に分類された。さらに陽性ファージクローンの解析を進め、KDによりリン酸化されるクローン以外に、KD非依存的に自己リン酸化されるクローンやリン酸化型KDに結合するクローンに分類することができた。また、各クローン由来のGST融合タンパク質を精製し、*in vitro*リン酸化実験およびKDとの結合実験を行なったところ、リン酸化活性と結合活性はクローン間で差異があり、両活性を有するクローンも存在した。さらに、ブラシノライドを処理したイネ第2葉基部(lamina joint)において、各クローンに対応するmRNA転写量の変化をマクロアレイによって検討した結果、数種のmRNAにおいてその発現量の変化が認められた。

1pH10

アラビドプシスの種子成熟に関与するネオザンチン開裂酵素をコードする*AtNCED2*遺伝子の解析
保浦徳昇¹, 井内聖¹, 小林正智², 篠崎和子³, 篠崎一雄¹ (理研・植物分子,²理研・BRC,³国際農研)

ABAは植物体においては乾燥、塩、低温といったストレスにตอบสนองして増加し、一方、種子においては、その成熟過程においてABAの量が増加している事が生理学的な研究により示されている。

トウモロコシでは親植物体上で発芽してしまう変異体*vp14*の原因遺伝子が単離されている。*VP14*遺伝子はアブシジン酸の生合成系の酵素ネオザンチン開裂酵素(*NCED*)をコードしていることが示され、またこの*NCED*がABAの量を調節している律速酵素であることが示唆されている。しかし、この様なABAの量に深く関与する*NCED*の発現部位等の詳細な解析は、まだほとんど進んでいない。

そこで、まず、アラビドプシスより *VP14* 遺伝子の相同性遺伝子*AtNCED1*, *AtNCED2*, *AtNCED3*, *AtNCED4*, *AtNCED6* および *AtNCED9*を単離し、葉において乾燥耐性獲得に関与する*NCED*遺伝子あるいは種子の成熟に関与する*NCED*遺伝子の探索を行った。その結果、これまでに*AtNCED3*は葉における乾燥耐性獲得時のABAの増加に関与していることを示した(Luchi *et al.*, *Plant Journal* (2001) 27, 325-334)。本年会では、種子成熟期のABAの増加に関与していると思われる*AtNCED2*を同定し、そのプロモーターにGUS遺伝子をつないだ*AtNCED2p::GUS*形質転換植物体を作製して、その発現パターンあるいは発現組織について報告する。

1pH11

アサガオ花成誘導に必須な暗期処理中における内生 α ケトールリノレン酸 (FIF) の変動

横山峰幸¹, 山口祥子¹, 鈴木壯幸², 寺西弘美², 飯田年以¹, 渡辺修治² (資生堂・基盤研究センター,²静岡大・農)

α ケトールリノレン酸(FIF, 9-hydroxy-10-oxo-12(Z),15(Z)-octadecadienoic acid)とノルエビネフリンの反応物はアオウキクサ花成を強く誘導する(*Plant Cell Physiol* 41:110 (2000), 42:1201 (2001))。我々は、生体中でのFIFの役割に興味を持ち、暗処理中のアサガオの内生FIFの変動を調べ、花成誘導との関連を調べた。

【実験方法】アサガオ(ムラサキ)は発芽処理1週間後(子葉が展開)に液体無機塩培地に移植し、その時点で16時間の暗期を与えることを基本とした。その後、連続光で2週間培養し、花芽数を数えた。内生FIFについては、液体窒素で粉碎したサンプルからクロロホルム:メタノール(2:1)で抽出し、9-anthryldiazomethaneでエステル化した後、HPLCで蛍光測定(Ex 365 nm, Em 412 nm)した。

【結果】FIFは子葉展開時には地上部組織中に平均30 pmol/g(生重量)含まれていた。暗所(26°C, 16時間)に移すと、13時間目までは変化なかったが、14時間目に180 pmol/g程度に急増した。その後、16時間までその値が維持された。明所に戻すと1時間以内に基底レベルにもどった。暗期8時間目に10分間の光中断を与えると、花芽は形成されず、FIFも暗期処理で増加しなかった。さらに、暗処理に対する子葉の感受性は日にちのオーダーで減少したが、その感受性の変化とFIFの増加率は強く相関していた。以上の結果は、花芽形成のシグナル生成にFIFが関与することを強く支持する。

1pH12

リン酸化によるACC合成酵素の代謝回転調節機構
岩田美根子¹, 立木美保^{1,2}, 森仁志¹ (名古屋大・院生生命農学,²果樹研究所)

ACC合成酵素はエチレンの生合成経路の律速段階の反応を触媒する酵素であり、その発現は主に転写段階で制御されている。しかし我々はトマト傷害誘導性ACC合成酵素LE-ACS2のC末端がリン酸化され、転写段階のみならず、翻訳後の制御も受けていることを明らかにしたので報告する。まず、ACC合成酵素のリン酸化状態を認識する特異抗体を調製した。トマト果実に傷害を与えLE-ACS2の誘導を、抗LE-ACS2抗体および抗リン酸化抗体を用いて解析した結果、LE-ACS2は翻訳後直ちにリン酸化されることが明らかになった。次に、トマト果実に傷害とともにカリクリンAあるいはオカダ酸で処理すると、傷害処理のみに比べ、LE-ACS2の蓄積が増加した。逆にk252aあるいはスタウロスポリンで処理すると、リン酸化LE-ACS2のみならずLE-ACS2自身の蓄積も減少した。このことはリン酸化が酵素の半減期を制御していることを示唆している。そこで³⁵Sメチオニンを用いたパルス-チェイス実験を行い、LE-ACS2の半減期を求めた。傷害処理のみの場合は60分であり、傷害処理とともにカリクリンAで処理した場合は100分、k252a処理の場合は45分であった。これらことから我々は、LE-ACS2は翻訳後直ちにリン酸化され細胞内で働き、役目が終わると脱リン酸化され、分解されるという翻訳後制御機構を提唱する。

1pH13

Cloning and Characterization of a Homolog of the *ETHYLENE-OVERPRODUCER1* Gene in Tomato.

吉田均¹, Kevin L.-C. Wang², Joseph R. Ecker² (中央農業総合研究センター,²Salk Institute)

Arabidopsis ETHYLENE-OVERPRODUCER1 (ETO1) is a negative regulator of ethylene biosynthesis, that physically interacts with and inhibits ACC synthases. To further investigate the function of the ETO1 protein family, we isolated and partially characterized an *ETO1* homolog from tomato. TBLASTN search detected several homologous ESTs of tomato, falling into one contig. We cloned the full-length cDNA by RACE PCR, and named the gene as *LEO1* (*Lycopersicon ETO1-LIKE 1*). *LEO1* encodes a putative protein with 886 amino acids with BTB/POZ, TPR and coiled-coil domains, as is also conserved in ETO1/EOL (*ETO1-LIKE*) proteins. Expression pattern of *LEO1* was investigated by RT-PCR. *LEO1* is expressed in leaf, stem, root and flower. The most remarkable expression was detected in red-ripe stage of fruit, further suggesting its regulatory role in ethylene biosynthesis. Interaction between *LEO1* and several members of ACSs will be also discussed.

1pH14

植物にADP、ATPを利用するサイトカイニン合成系路は存在するか

武井兼太郎¹, 山谷知行¹, 榎原均¹ (¹理研・植物科学)

これまでサイトカイニン合成系の律速段階はdimethylallylpyrophosphateとAMPからisopentenyladenosine monophosphate (iPMP)を生成する反応であり、イソペンテニルトランスフェラーゼ (IPT)がこの反応を触媒すると考えられてきた。我々はアラビドプシスから9つのIPT遺伝子を単離し、その中の一つAtIPT1の大腸菌発現系で得たタンパク質がAMPに加えADPやATPも基質とすることを明らかにしている。このことは植物内でADPやATPを利用する経路が存在する可能性を示している。

これを検証するために、*in vitro*反応での産物の同定を試み、isopentenyladenosine diphosphate (iPDP)及びisopentenyladenosine triphosphate (iPTP)であることをNMR解析等により明らかにした。また、トウモロコシ根抽出物を逆相カラムを使用したHPLCで分離し、抗isopentenyladenosine抗体を用いたELISA法で分析したところ、iPMPやiPDP、iPTPを含むと予想される分画に反応する物質を検出した。現在、植物抽出物を用いて活性レベルでの検出を試みており、その結果を合わせて報告したい。

1pH15

シロイヌナズナのisopentenyltransferase遺伝子産物の細胞内局在部位の解析

上田七重¹, 青木考¹, 武井兼太郎¹, 山谷知行¹, 榎原均¹ (¹理研・植物科学)

高等植物のサイトカイニン合成は、isopentenyltransferase (IPT)によって触媒される。現在までに我々はシロイヌナズナから、9種類のIPT遺伝子 (AtIPT1-AtIPT9)を同定した。これら遺伝子産物の生化学的解析から、AtIPT2とAtIPT9はtRNAの転写後修飾酵素であるtRNA-IPTであり、AtIPT1, AtIPT3-AtIPT8がサイトカイニンの合成に関与するIPTであることを報告している。サイトカイニンは細胞分裂・分化に重要なホルモンであるが、細胞内における生合成の場などの基本的な事柄が明らかにされていない。そこで我々は、AtIPTの細胞内における局在性を明らかにするため、各IPTのC末端でGFPと融合したキメラタンパク (AtIPT1-GFP-AtIPT9-GFP)を発現するコンストラクトを作製し、パーティクルボンバードメント法によりシロイヌナズナの根細胞、および葉細胞に導入した。一過的な発現時におけるそれらタンパク質の細胞内局在性を観察したところ、AtIPT5-GFPをはじめとするいくつかのAtIPT-GFP遺伝子導入細胞においてプラスチドに強い蛍光が検出された。このことはプラスチドがサイトカイニンの合成場所の1つであるとともに、その基質であるDMAPPが非メバロン酸経路から供給されることを示唆している。

1pH16

ヒヤクニチソウ管状要素分化過程でのファイトスルホカインによる細胞間相互作用の解析

本瀬宏康¹, 松林嘉克², 坂神洋次², 小澤憲明³, 出村拓¹, 福田裕穂^{1,3} (¹理研・植物科学センター, ²名古屋大院・生命農学, ³東大院・理・生物科学)

ファイトスルホカイン- α (PSK- α)は、植物細胞増殖因子としてアスパラガス葉肉細胞培養系を用いて単離された硫酸化ペプチドホルモンである。その後の解析から、被子植物の多くがPSK- α を生産しており、細胞増殖以外にも様々な生理活性をもつことが明らかになった。ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞からの管状要素分化過程においてもPSK- α が生産・分泌され、管状要素分化を促進することがわかった。この結果は、PSK- α が管状要素分化に必要な細胞間相互作用を担うことを示した。

PSK- α が仲介する細胞間相互作用の特性を解析するため、ヒヤクニチソウの管状要素分化に対するPSK- α の影響を詳細に調べた。その結果、PSK- α が管状要素分化過程の比較的初期に働き、局所的な細胞間相互作用を担うことが示唆された。次に、ヒヤクニチソウのPSK前駆体をコードすると思われる遺伝子ZePSKIを単離し、管状要素分化過程における発現を調べたところ、分化誘導培養の初期に発現することがわかった。また、ZePSKIとGFPの融合タンパク質を培養細胞で一過的に発現させ、ZePSKIタンパク質の輸送を可視化する試みについても報告する予定である。

1pI01

パールミレットのPLA₂ cDNAのクローニングと遺伝子発現

藤川律子¹, 藤川愉吉¹, 実岡寛文¹, 飯島憲章¹, 江坂宗春¹ (¹広島大学・生物生産)

ホスホリパーゼA2 (PLA2)はグリセロリン脂質の2位のアシル鎖を加水分解し、遊離脂肪酸とリン脂質を産生する酵素である。動物では、PLA2は分泌型PLA2 (sPLA2)、細胞質型PLA2、Ca²⁺非依存型PLA2およびPAFアセチルヒドロラーゼに分類されており、アラキドン酸カスケードの初発酵素であると同時に、食餌性リン脂質の消化や膜リン脂質の代謝回転、再構築など生体内で多様な役割を担っている。哺乳類のsPLA2はよく研究され、多様な分子種の存在や様々な組織に発現していることが明らかになっている。一方、植物のsPLA2の研究は、哺乳類のsPLA2の研究に比べるとあまり進んでいない。そこで、パールミレットにおけるsPLA2の生理機能を解析するために、パールミレットsPLA2のcDNAクローニングを行った。

パールミレットの葉および根から mRNA を単離し、RT-PCRを行った。プライマーは既知のPLA2 cDNA間でよく保存されている領域をもとに設計・作成した。得られた増幅断片の塩基配列を決定した後、3'RACEを行い、パールミレットPLA2 cDNAの部分塩基配列を決定した。本cDNAの塩基配列から推定したアミノ酸配列はイネPLA2のものと同じ高同源性を示した。現在、パールミレットPLA2の発芽に伴う発現様式やストレスに対する発現応答について調べている。

1pI02

Sensitivity of Characean Myosin to SH Reagent

山本啓一¹, 関雅也¹, 檜山拓², 伊藤光二¹ (1千葉大・理・生物, 2順天堂大学・医・薬理)

It is well known that SH reagent such as N-ethyl maleimide (NEM) exerts an inhibitory effect on characean cytoplasmic streaming. Target of the reagent was thought to be myosin because the activity of animal muscle myosin is readily inhibited by the reagent. We examined if this really occurred in characean cells by treating characean myosin motor domain with NEM. We used chimeric myosin which contained the motor domain of *Chara corallina* myosin and neck and tail domain of *Dictyostelium* myosin. NEM did not inhibit the motor and ATPase activities of the chimeric myosin whereas it inhibited those of muscle myosin. These results suggest that actual target of the reagent in characean cell is not myosin.

1pI03

酵母アラビノース脱水素酵素の分子の性質

尼子克己^{1,2}, ミヤグマースレンセンギー¹, 大桐由華子¹, 岸本律子¹, 合田清^{1,2} (1神院大・栄養, 2神院大・ハイテク)

酵母等の真菌類に見いだされるエリスロアスコルビン酸(eAsA)はアスコルビン酸(AsA)と化学的性質が類似し、また植物のAsAと相同な経路で生合成される。出芽酵母のアラビノース脱水素酵素(ARA)はeAsAの直接的前駆体であるアラビノラクトンを生成するヘテロ二量体だが、大サブユニット遺伝子(*ara1*)は既に同定され、その破壊株が低eAsA量を示す(昨年度本大会で発表)のに対し、小サブユニットの当該遺伝子は未同定である。本研究ではその同定と活性化組換え体ARAの調製を目的とする。

酵母 YPH250 のゲノム DNA から PCR で増幅した *ara1* 遺伝子を pQE30 ベクターに挿入し、組換えタンパク発現系を構築した。組換え体大腸菌全タンパクの SDS-PAGE では 38kDa, 36kDa の 2 つのポリペプチドが高度に発現していた。ネイティブ条件下で得た精製標品でも両方のバンドが認められた。ARA1 遺伝子内には大腸菌のマイナーコードンが多数含まれていたが、これらを増強した宿主大腸菌でも二成分比は変わらず、ARA は合成後に特異的分解を受けると思われる。精製酵素は大サブユニットのみで ARA 活性を示したが、その比活性は既報の 10% 程度であった。更にヒスチジンタグ融合 *ara1* 遺伝子を pFL61 ベクターに挿入し、YPH250 の *ara1* 遺伝子破壊株に導入すると、ARA 活性は回復した。この精製酵素から明らかにした、ARA のサブユニット構造を報告する。

1pI04

コムギのフルクタン合成酵素、fructan:fructan fructosyltransferase の単離

川上顕¹, 吉田みどり¹, 寺見文宏¹ (1農技研機構・北農研)

フルクタンは主にユリ科、キク科、イネ科植物の組織でデンプンに代わって組織に貯蔵されるフルクトオリゴ糖および多糖である。エネルギー源だけではなく、植物の種々の環境ストレスにおいて浸透圧調整剤として機能すると考えられている。また、人や動物の健康に対する機能性糖としての重要な働きを持つ。我々はすでにコムギからフルクタン合成遺伝子の 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase) と 6-SFT (sucrose:fructan 6-fructosyltransferase) を単離している(植物生理学会、2000)。本年は、これらの遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子をコムギ cDNA ライブラリーからクローニングした。この遺伝子を組み込んだ酵母の発現タンパクを利用してこの酵素活性を調べたところ、この酵素は sucrose だけではこれを基質として利用せず、3糖の 1-kestose が与えられると 4糖の nystose を生産した。この結果から、本クローンは FFT (fructan:fructan fructosyltransferase) 遺伝子であることが明らかになった。 β (2-1) 結合と β (2-6) 結合の両者を持つタイプのフルクタンを合成するイネ科植物において FFT 遺伝子が初めて単離された。

1pI05

シトクロム P450 イソフラボノイド骨格合成酵素によるアリール基転位反応機構

澤田有司¹, 二艘木宣匡¹, 明石智義¹, 青木俊夫¹, 綾部真一¹ (1日本大・生物資源・応用生物)

イソフラボノイドの骨格は CYP93C サブファミリーの P450 2-hydroxyisoflavanone synthase (IFS) によるフラバノンの 2 位へのヒドロキシル化と特異な分子内アリール基転位反応によりつくられる。また同酵素の副生成物として 3-ヒドロキシフラバノン (3HF) が報告されている。これまでに我々は、マメ科カンゾウの IFS (CYP93C2) の Ser 310 と Lys 375 がアリール基転位の鍵残基であることを明らかにした。今回アリール基転位と 3 位のヒドロキシル化の pH 依存性を調べたところ、CYP93C2 の転位反応は pH 7.5-8.5 が至適で、pH 5.5-6.5 では減少した。3HF は pH 7.5 では 8% 生じ、pH 5.5-6.5 では僅かに増加した。3HF のみを生成する変異酵素 K375T の至適 pH は、6.5 であった。一方基質 (7,4'-dihydroxyflavanone) の類縁体 4'-hydroxyflavanone は全く反応せず、7-hydroxyflavanone では 3 位のヒドロキシル化のみが起こった。よって (1) IFS によるアリール基転位と 3 位のヒドロキシル化は異なるアミノ酸残基が関与している、(2) フラバノン 7 位 OH 基は Lys 375 との相互作用を通じた基質認識に関わり、4' 位 OH 基はアリール基転位に必須である、と結論された。進化の過程で flavanone 3-hydroxylase 活性を持つ P450 の構造変化によりイソフラボノイド骨格が形成され、この新機能がマメ科で固定されたと考えられる。

1pI06

Purification and Characterization of Three Forms of Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase from Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.

中嶋正人¹, 和田敬四郎¹ (¹金沢大院・自然科学)

Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR) of cyanobacteria has a unique domain which is distinct from higher plant FNRs. The N-terminal domain is homologous to the CpcD phycobilisome linker polypeptide, and it has been proposed that cyanobacterial FNR is docked at the phycobilisome rod. It has been demonstrated that cyanobacterial FNRs are susceptible to proteolytic cleavage at the region between CpcD-like and FAD-binding domain, and little is known about biochemical characteristics of FNR with CpcD-like domain.

The *petH* gene from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, was overexpressed in *E. coli* cells in the active form with the CpcD-like domain, and the overexpressed product was purified homogeneously. The truncated FNR without the CpcD-like domain was also overexpressed and purified. FNR associating with phycocyanin was purified from *S. elongatus*. The effect of the CpcD-like domain and the association with phycocyanin on the enzymatic properties of three forms of FNRs will be discussed.

1pI07

Rubiscoのグリケーションが引き起こす活性の減少とプロテアーゼ感受性の増加

江尻千徳¹, 山内靖雄¹, 田中浄¹ (¹鳥取大学農学部植物機能学研究室)

グリケーションは還元糖がタンパク質と非酵素的に結合することでタンパク質の機能低下を引き起こす反応であり、老化現象の一因とされている。今回我々は、Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)、還元糖であるグルコース (Glc) とアスコルビン酸 (AsA) に注目し、植物体内で起こるグリケーションの可能性を検討した。

精製キュウリRubisco (1mg/ml) を1.7M Glc (37°C)、10mM AsA (25°C) とそれぞれpH7.5で30日間共存させた結果、グリケーションに特徴的な化学構造がモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出された。¹⁴C標識した10 mM Glc とAsAをRubiscoと3日間反応させ、その結合量を定量的に測定した結果、AsAは1日あたりRubisco 1 molに2 mol結合し、Glcに比べ3倍タンパク質に結合することが分かった。またグルタチオン、Lys、Argを加えるとAsAの結合は阻害された。さらにAsAと共存させたRubiscoの活性は半減期10日で減少した。グリケーションを受けたRubiscoはNativeなものに比べプロテアーゼに強い感受性を示した。これらの結果、植物体内でもAsAによりグリケーションが引き起こされ、グリケーションを受けたタンパク質はプロテアーゼにより速やかに分解されるモデルが考えられた。

1pI08

高等植物のミトコンドリア電子伝達系成分遺伝子の単離と機能解析

田窪桂子¹, 野中泰樹², 水谷正治³, 竹中重雄¹, 津山伸吾¹, 太田大策¹ (¹阪府大院・農, ²甲子園大院・栄養, ³京大・化研)

アドレノドキシシン (ADX) およびアドレノドキシシン還元酵素 (ADR) は、哺乳動物においてステロイド合成に関与するミトコンドリア型シトクロムP450 (P450) 電子伝達系を構成する。一方微生物においてこの電子伝達系成分はFe-Sクラスター合成に必須である。本研究では高等植物のADXおよびADRホモログをコードするORF (*AtMFDX1*, *AtMFDX2* および *AtMFDR*) を GenBank/EMBL/DBJゲノムデータベースを利用して同定し、それらのcDNAをArabidopsisから単離した。AtMFDXsがコードする推定アミノ酸配列は2Fe-2S内Fe結合性システイン4残基と、ADRおよびP450との相互作用に関与する酸性アミノ酸クラスターを含む、ADX family特有のモチーフを保存していた。AtMFDRタンパクにはFADおよびNADP⁺結合部位と、ADXとの相互作用に関与する塩基性アミノ酸が保存されていた。組み換えAtMFDX1およびAtMFDRタンパクはそれぞれ2Fe-2Sタンパクとフラビンタンパクがもつ絶対吸収スペクトルの特徴を示し、また、膜再構成系において牛副腎ミトコンドリア型P450を最終電子受容体とする電子伝達活性を示した。AtMFDXsおよびAtMFDR遺伝子は花において特に強く発現し、他の器官では極微量だが発現していた。これらの結果はAtMFDXとAtMFDRタンパクが、組織特異的生合成系に関与するミトコンドリア型P450への電子伝達、およびFe-Sクラスター合成の両方に関与する可能性を示唆する。

1pI09

Identification of a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase from *Dunaliella tertiolecta*

Marinela Anderca¹, Takuya Furuichi¹, Reinhard Pinontoan², Shoshi Muto^{1,3} (¹Graduate School of Biocultural Sciences, Nagoya University, ²Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ³Nagoya University Bioscience Center, Nagoya University)

A clone encoding a nucleoside diphosphate (NDP) kinase was isolated by homology cloning from a *Dunaliella tertiolecta* cDNA library. The full-length sequence consisting of 857 bp contained an open reading frame encoding for 221 amino acids protein with a calculated molecular mass of 24 kDa. The protein, which possesses all the residues involved in nucleotide binding and catalysis and putative targeting sequences to mitochondria in its long N-terminus was named DtNDK1. The phylogenetic analysis situated it in the group of plant organellar isoforms. When expressed in *E. coli*, the full-length protein was retained in inclusion bodies in a catalytically inactive form. To express the recombinant His-tagged protein as a soluble and catalytically active form, the first 70 amino acids from the N-terminus were removed. The truncated protein, purified by affinity chromatography to near homogeneity, showed NDP kinase activity and the activities for autophosphorylation and phosphorylation of phosvitin.

1pI10

黒緑豆もやしのアスコルビン酸オキシダーゼの精製および塩類による阻害様式

山本淳子¹, 大羽和子¹ (名古屋女大・家政)

[目的] 多くの植物にはアスコルビン酸オキシダーゼ(AAO, EC1.10.3.3.)が存在するため、野菜の収穫後もAAOの作用によってビタミンC (VC) 量が減少することが考えられる。AAOに関しては、果菜類のきゅうりとかぼちゃでよく研究されているが、他の野菜での研究は殆どない。そこで、黒緑豆もやしからAAOを精製し、性質を調べ、精製酵素の活性に及ぼす塩類の影響を解析した。

[方法] 黒緑豆もやしのAAOを硫酸分画(40-70%飽和)、カラムクロマトグラフィにより精製した。AAO活性は、10mMアスコルビン酸(AsA)の存在下50mM酢酸緩衝液(pH5.0)(30℃)中で反応させ、265nmの吸光度の減少を経時的に追跡して求めた。

[結果] 黒緑豆もやしには、2つのAAOアイソザイムが存在した。アイソザイムIおよびIIのAsAに対するKm値は、 $12.5 \cdot 10^{-5} M$ および $4.4 \cdot 10^{-5} M$ であった。アイソザイムIおよびIIの活性はNa-CitrateNaClKClMgCl₂NH₄ClNaSO₄の順に阻害された。クエン酸塩および食塩によるアイソザイムIの阻害様式は拮抗型阻害であり、各々のKi値は114mMと160mMであった。クエン酸塩および食塩によるアイソザイムIIの阻害様式は拮抗型阻害であり、各々のKi値は22mMと39mMであった。したがって、アイソザイムIIはIよりも塩類に対する感受性が高いことが判明した。

1pI11

葉緑体とミトコンドリアに輸送されるシロイヌナズナのオルガネラ型モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ

溝田年伸¹, 河津依志子¹, 安田周祐¹, 森田重人^{1,2}, 佐野智¹, 齊藤和實¹ (1京都府大・農・生資化, 2京都府農資センター)

生体内でアスコルビン酸(AsA)が抗酸化剤として機能する際、1電子酸化されモノデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルが生成する。MDAレダクターゼはNAD(P)Hを電子供与体としてMDAラジカルをAsAに還元するFAD酵素であり、植物ではアイソフォームが細胞質や葉緑体、ミトコンドリア、ミクロボディと言ったオルガネラに存在することが知られている。シロイヌナズナのゲノム配列を検索した結果、既知のMDAレダクターゼと相同性の高いタンパク質をコードするORFが5つ存在した。これらのORFの翻訳産物の内、オルガネラ移行のためのトランジットペプチドと思われる付加配列をN末端に持つものは1つだけであった。このORF由来のESTクローンをを用いて以下の実験を行った。付加配列を除いた領域を大腸菌で発現させたタンパク質はMDAレダクターゼ活性を有していた。付加配列のN末端には8残基離れて2つのMet残基が存在する。そこで、それぞれのMet残基が開始コドンになるように、付加配列とGFPの融合タンパク質のコンストラクト(M1A57-sGFP, M8A57-sGFP)を作製し、タバコプロトプラストに導入した。その結果、M1A57-GFP導入細胞ではミトコンドリアに、M8A57-GFP導入細胞では葉緑体にGFPの蛍光が見られた。すなわち、シロイヌナズナでは葉緑体型とミトコンドリア型のMDAレダクターゼが1つの遺伝子でコードされていることがわかった。

1pI12

アラスカエンドウ(*Pisum sativum* L. var. Alaska)由来の49 kDa apyraseの細胞内分布とアイソタイプの性質
柴田幸一¹, 米田基人¹, F.M.ムスタファモハメド¹, 阿部俊之助¹, デービスエリック² (1愛媛大・農, 2ノースカロライナ州大・植物)

ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5)はNTPやNDPをNMPに加水分解する酵素で、植物においては核から細胞壁まで多様な局在と機能が報告されている。そこで、本研究ではアラスカエンドウのapyraseの細胞内局在を免疫電子顕微鏡法により調べ、細胞内に広く分布していることをまず確認した。また、このapyraseはpIの異なる5つの主要なアイソタイプ(pI 5.8, 6.0, 6.3, 6.6, 6.8)を持ち、細胞下画分ごとにその量比が異なった。これらのアイソタイプをアニオン交換カラムを用いて分離し、各アイソタイプの基質特異性を調べたところ特徴的な違いがみられ、活性はpI 6.3のものが最も高かった。これらアイソタイプの分子量はより酸性のものになるほど高くなっていった。アミノ酸配列解析の結果から、このapyraseが4種類17箇所のリン酸化サイトやアミド化など合計24箇所の修飾サイトを持つことが、このapyraseのアイソタイプ生成の主な原因であると考えられた。また、apyraseをコードするmRNAには3'端非コード領域(3' UTR)の長さが違うものが存在することも明らかになり、これによってapyraseをコードするmRNAの輸送先が決定される可能性も考えられた。この研究は日本学術振興会科学研究費補助金(基盤C #12660296)の補助を受けた。

1pI13

サツマイモ懸濁培養細胞の新規液胞タンパク質、VP24のアミノペプチダーゼ活性ドメインについて

馬場茂治¹, 北村有里¹, 徐文新², 塩入秀成¹, 小島峯雄¹, 野末雅之¹ (1信州大・繊維, 2ネブラスカ大)

VP24はアントシアニンの液胞集積と呼応して発現する分子質量約24 kDaの新規液胞タンパク質としてサツマイモ懸濁培養細胞でみだされたが、その機能の詳細は明らかでない。VP24 cDNA (accession No. AB025531)の解析から、VP24は分子質量約96.3 kDaの前駆体タンパク質として合成され、液胞に輸送され成熟型VP24にプロセッシングされると考えられる。ホモロジー検索の結果、成熟型VP24領域にはアミノペプチダーゼ(AP)の活性部位との相同性が示されたが、他の領域では特に認められなかった。VP24の機能を解明する上で、AP活性の有無は重要と考えられる。そこで今回、成熟VP24領域のAP活性について検討を行った。大腸菌で発現させ、尿素で可溶化し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した成熟VP24領域を含む融合タンパク質を調製し、leucine-p-nitroanilideを基質に用いてAP活性を測定した。その結果、この融合タンパク質はCo²⁺で活性化されるAP活性を持つことが明らかになった。一方、アントシアニンを集積してしているサツマイモ培養細胞から部分精製したVP24タンパク質にもCo²⁺で活性化されるAP活性が認められた。これらの結果は、サツマイモ懸濁培養細胞のVP24は液胞局在性の新規アミノペプチダーゼとして機能している可能性が示唆された。

1pI14

キュウリ緑葉に存在するオリゴペプチダーゼB様セリンプロテアーゼはアルギニン、グアニジノ化合物、二価カチオンにより阻害される

山内靖雄¹, 杉本敏男², 末吉邦³, 王子善清², 田中浄¹
(¹鳥取大学農学部, ²神戸大学農学部, ³新潟大学農学部)

キュウリ緑葉に存在する3つの主要なプロテアーゼのうち、等電点が5.0、分子量が80kDaで、Arg、LysのC末端側を切断するセリンプロテアーゼを精製し詳細に性質を検討した。このプロテアーゼは低分子量基質を分解することはできたが、BSAやカゼインのようなタンパク質基質を分解することができなかつた。このプロテアーゼはアルギニン(Ki=3.5 mM)や種々のグアニジノ化合物により拮抗的に阻害され、それらの阻害効果を比較検討した結果、インタクトなグアニジノ基を含んでいること、疎水性が高いこと、の2つが阻害作用に必要であることが分かった。また、このプロテアーゼは、Mg²⁺、Ca²⁺によっても阻害された(Ki=10 mM)。アルギニン、グアニジノ化合物とMg²⁺、Ca²⁺との阻害は、相加的であり、植物体内での生理的濃度でも阻害を受けている可能性が示された。CNBr処理により得られたペプチド断片のアミノ酸配列は、オリゴペプチダーゼBとの類似性を示した。そこで、キュウリセリンプロテアーゼに対する抗体を用いて、アラビドプシスのオリゴペプチダーゼB遺伝子を大腸菌で発現させたものについてウエスタンブロッティングを行った結果、反応性を示した。以上の結果から、キュウリ緑葉に存在するオリゴペプチダーゼB様セリンプロテアーゼはアルギニン、グアニジノ化合物、Mg²⁺により生体内で活性制御を受けている可能性が示された。

1pI15

イネ篩管液中glutathione S-transferaseの同定

福田あかり¹, 藤原徹^{1,2}, 米山忠克¹, 林浩昭¹ (¹東大院・農, ²PRESTO,JST)

イネ篩管液中からは、100種を超えるタンパク質が検出されるが、そのほとんどが未だ同定されていない。本研究ではイネ篩管液中の31 kDaタンパク質(RPP31)について、そのN末端アミノ酸配列を決定し、これをコードする遺伝子の同定を行った。その結果、RPP31が植物のglutathione S-transferase (GST)と高い相同性を持つことがわかった。GSTは、グルタチオン(γ -Glu-Cys-Gly; GSH)と様々な求電子化合物の抱合を触媒する酵素である。大腸菌内で合成したRPP31は、in vitroでGST活性を持ち、またイネ篩管液自体も、GST活性を示したことから、RPP31が篩管内で活性を持つGSTである可能性が示された。さらに、イネ植物体内におけるRPP31の存在場所をwestern法により確認した結果、葉抽出液と篩管液中からRPP31が検出されたが、根抽出液からはRPP31は検出されず、根におけるRPP31が極めて少ないことが分かった。また、イネ葉鞘の免疫組織染色実験の結果、RPP31が、葉鞘の篩部要素と伴細胞に局在することが示された。植物GSTの中には、除草剤処理に対し、発現が誘導されるものがあるが、RPP31は、除草剤pretilachlorやsafenerのfenclorim処理に対してはタンパク質量が変化せず、外来の薬剤に応答しないタイプであった。

1pI16

セレンのグルタチオンペルオキシダーゼタンパク質への取り込みによる活性発現

武田徹¹, 辻本優子¹, 重岡成¹ (近畿大・農)

緑藻*Chlamydomonas reinhardtii* C9 (C. C9)のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)の活性中心と考えられる部位はシステイン(Cys38)であるが、セレン(Se)に依存した活性を有していた。また、活性が発現したネイティブおよびリコンビナント酵素のSeはCys38に局在していた。そこで今回、本GPXへのSeの翻訳後の取り込みによる活性発現について検討した。

Se無添加培地で培養した大腸菌より精製したリコンビナントGPXは活性を持たず、Seも認められなかつた。この酵素をDTTにより還元し、種々の濃度比の亜セレン酸塩およびGSH存在下で反応させた。亜セレン酸塩の存在下で、Se添加培地から調製した精製酵素活性の約5%の活性、GSHの添加で活性が全く認められなかつた。亜セレン酸塩およびGSH存在下(Na₂SeO₃:GSH=1:4)で、Se添加培地から調製した精製酵素に相当する活性があり、酵素1モル当たり約4モルのSeの取込みが確認された。Cys38をSerに変換した変異酵素で同様の実験を行ったところ、亜セレン酸塩およびGSH処理による酵素活性の発現とSeの取り込みは認められなかつた。以上より、C. C9GPXにおいて、Seは翻訳後Cys38に特異的に取り込まれ、生成した-S-SeH基により酵素活性が発現することが明らかになった。

1pI17

シロイヌナズナ培養細胞に見出された新しいGPIアンカータンパク質

市川聡子¹, 奥山英登志¹ (北海道大学・院地球環境)

GPIアンカータンパク質は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)を介して細胞膜に結合するタンパク質の一群であり、これまで哺乳類、酵母などから多数報告されているが、植物では、アラビノガラクトンタンパク質、パープリアシッドホスファターゼなど、その種類は極めて少ない。

本研究では、植物における新たなGPIアンカータンパク質の存在を明らかにするため、同タンパク質がGPI特異的ホスホリパーゼC(PI-PLC)に感受性をもつことを利用して、スクリーニングを行った。シロイヌナズナの培養細胞から調製した細胞膜をTriton X-114で可溶化した。回収した膜タンパク質をPI-PLCで処理し、水溶性となったものをSDS-PAGEに供したところ、数種類のバンドが検出された。これらのタンパク質のN末端アミノ酸配列を決めて、データベース上で検索した結果、少なくとも3種類のcDNAから予想されるアミノ酸配列と高い相同性を示した。これらのタンパク質は、いずれもこれまでGPIアンカータンパク質としては報告されていなかったが、PSORTによる分析結果も、それぞれのC末端にGPIアンカータンパク質に特徴的なアミノ酸配列を持つことを示していた。いずれも新しいGPIアンカータンパク質であると考えられる。

1pI18

タバコ細胞核のMAR結合タンパク質の分子構造と機能解析

藤原詩織¹, 松田奈緒¹, 深見裕之¹, 園部誠司², 前島正義¹ (¹名古屋大院・生命農, ²姫路工業大・理)

染色体DNA上のマトリクス結合領域 (MAR) はATに富む塩基配列をもち、核マトリクスの特定タンパク質と結合し、染色体高次構造やDNA複製、遺伝子発現制御にも深く関わっているとされる。MAR領域は特定の配列をもち、MAR結合タンパク質も複数あるとされる。本研究では、タバコ培養細胞を対象に、MAR結合タンパク質の1種を分子クローニングし、その構造特性、MAR DNAへの結合特性、細胞周期にともなう変動に焦点をあて解析した。

タバコBY-2細胞のcDNAライブラリーからクローニングされた全長cDNA (1688bp) は、556アミノ酸からなるタンパク質 (NtMARBP61) をコードしている。NtMARBP61の一次構造は、たとえばエンドウのMARBPと75%の相同性を示したが、C端側にはLysに富む領域が4箇所あり、新しい特徴をもつMAR結合タンパク質であるといえる。大腸菌で発現させたりコンビナントNtMARBP61は、BY-2より調製した10種以上のMAR DNA断片と結合することを確認した。結合活性はC端側12kDa部分の配列でも確認されることからC端側にDNA結合ドメインがあるものと推測した。特異抗体を用いた核内分布の詳細、細胞周期にともなうmRNAとタンパク質レベルの変動についても合わせ報告する。

1pJ01

シロイヌナズナ孔辺細胞のABAシグナリングにおける活性酸素種産生とそれによって活性化されるカルシウムチャンネル

村田芳行¹, Zhen-Ming Pei,² 森泉³, Julian I. Schroeder,³ (¹岡山大・農, ²Dept. Biology, Duke Univ., ³Dept. Biology, UCSD)

植物ホルモンの1つであるアブシジン酸 (ABA) は、植物の環境ストレス応答や生長を制御している。これまでに、ABAが孔辺細胞での活性酸素種の産生を誘導し、この活性酸素種がカルシウムチャンネルを活性化し、それによって細胞内のカルシウム上昇し、最終的に、気孔閉口が起きることを明らかにした。本研究では、2種のprotein phosphatase 2C (PP2C) mutant (*abi1-1*, *abi2-1*) における、ABAによって誘導される活性酸素種の産生およびカルシウムチャンネルの活性化について調べた。

*abi1-1*では、ABAによって活性酸素種の産生が誘導されなかったが、過酸化水素によってカルシウムチャンネルの活性化が起き、気孔の閉口が起きた。一方、*abi2-1*では、ABAによって活性酸素種の産生が誘導されたが、過酸化水素によってカルシウムチャンネルの活性化は起きず、気孔の閉口も起きなかった。以上の結果より、ABA、*abi1-1*、活性酸素種産生、*abi2-1*、カルシウムチャンネル活性化、気孔閉口という順序でABAシグナルが変換されていくことが明らかになった。

1pJ02

シロイヌナズナCa²⁺チャンネル遺伝子*AtTPC1*の単離と機能解析

古市卓也¹, 武藤尚志¹ (¹名古屋大学生物分子応答研究センター)

Ca²⁺シグナリング系は植物のシグナル伝達の中樞を占めると考えられている。その初発反応を担うのはCa²⁺チャンネルの開孔である。植物の形質膜や細胞内Ca²⁺貯蔵オルガネラにはCa²⁺チャンネルが存在し、様々なシグナルに応答して活性化され[Ca²⁺]_{cyt}上昇を引き起こす。これらのチャンネルの性質は電気生理学的に解明されてきたが、遺伝子レベルの解析は進んでいなかった。我々は、シロイヌナズナの全ゲノムデータベース中に、哺乳類Ca²⁺チャンネルと相同性を持つ遺伝子を見出しクローニングに成功した。このチャンネルは動物のL-タイプ電位依存型Ca²⁺チャンネルに特徴的な4回繰り返し(4-domain)構造の半分に相当する2-domain構造をもつ新規なタイプのチャンネル蛋白で、two-pore channel 1 (*AtTPC1*) と命名した。*AtTPC1*は出芽酵母の仮想的Ca²⁺チャンネル欠損株*cch1*の生育とCa²⁺取り込み活性を回復させた。さらに*AtTPC1*が形質膜の脱分極により開孔しCa²⁺を流入させる能力があることを、Ca²⁺依存性発光タンパク質エクトリン導入植物組織を用いる機能解析によって証明した。また、*AtTPC1*はシロイヌナズナ植物体の全体に発現していることから、細胞の基本的な生理過程に関与していることが示唆される。

1pJ03

イネCa²⁺/H⁺対向輸送体の機能解析

神谷岳洋¹, 前島正義¹ (¹名大院・生命農)

Ca²⁺/H⁺対向輸送体はV-ATPase, H⁺-PPaseによって形成された液胞膜pH勾配を利用しCa²⁺を液胞内へ輸送する能動輸送体である。その酵素的性質から液胞膜におけるCa²⁺取り込みの主要な役割を果たしていると考えられる。これまでに、*A. thaliana*、緑豆、トウモロコシ、酵母からcDNAがクローニングされており、Ca²⁺を運ぶCAX1タイプと重金属を運ぶCAX2タイプの二つに分けられる。

本研究では、*A. thaliana*のCa²⁺/H⁺対向輸送体であるCAX1, CAX2の配列を元に、イネよりOsCAX1, OsCAX2, OsCAX3をクローニングした。それらのアミノ酸配列の比較によりOsCAX1はCAX1タイプに、OsCAX2,3はCAX2タイプにそれぞれ属することが解った。液胞型のCa²⁺-ATPase, Ca²⁺/H⁺対向輸送体の両方を欠損した酵母(K665)においてOsCAX1を発現させたところ、OsCAX1についてはCa²⁺耐性になることを確認した。また、分子内にNa⁺/Ca²⁺対向輸送体に見られるような繰り返し配列を新たに見つけた。現在この繰り返しモチーフについて*in vitro* mutagenesisを用いた機能解析を行っており、その結果についても報告したい。

1pJ04

植物の液胞膜型Na⁺/H⁺アンチポーター遺伝子の機能解析

福田篤徳¹, 中村敦子², 田切明美¹, 田中宥司¹, 田中喜之¹ (¹農業生物資源研究所, ²筑波大・生物科学)

液胞膜を介したpH勾配をエネルギー源として利用し、細胞質に存在するNa⁺を液胞内に輸送する液胞膜型Na⁺/H⁺アンチポーターは、植物の耐塩性に重要であるが、その機能については未だ不明な点が多い。当研究室で3種類の植物からクローニングした液胞膜型Na⁺/H⁺アンチポーター遺伝子、*OsNHX1* (イネ)、*HvNHX1* (オオムギ)、*SkNHX1* (オカヒジキ) は、出芽酵母Na⁺/H⁺アンチポーター変異体 (*nhx1*) をNaCl、LiCl及びハイグロマイシン耐性について機能相補することが確認されたが、新たに確認された*nhx1*が示す高濃度のKCl耐性の低下も機能相補した。また、それぞれのアンチポーター遺伝子は、植物体に対する高濃度のNaCl処理以外にもKCl処理でも発現上昇が起こる。これらの結果は、植物の液胞膜型Na⁺/H⁺アンチポーターがNa⁺以外にK⁺も輸送することを示唆している。本発表では、*OsNHX1*のイネ細胞内局在について、GFPとの融合タンパク質を作製した結果も併せて報告する。

1pJ05

HKT系Na⁺/K⁺トランスポーターのNa⁺/K⁺イオン選択性残基の同定

Pascal Maser¹, Eckelman Brendan², Julian Schroeder¹, 山田克幸², 老木成稔², Evert Bakker³, 五島志伸⁴, 細尾佳宏⁴, 魚住信之⁴ (¹Division of Biology, UC San Diego, ²福井医科大学, ³Univ. of Osnabruck, ⁴名古屋大学生物分子応答研究センター)

植物HKT1は酵母のTRK1-2、大腸菌のTrkGやTrkH、*Enterococcus hirae*のKtrII、*Vibrio alginolyticus*のKtrBとスーパーファミリーを形成している。このファミリーは4量体K⁺チャネル構造に類似した特徴的な4 x Membrane-Pore-Membrane膜貫通構造(トポロジー)を形成していることをこれまでに明らかにしている。一方、小麦HKT1 (TaHKT1)を酵母やアフリカツメガエル卵母細胞で機能解析するとNa⁺とK⁺の輸送を示し、シロイネナズナHKT1 (AtHKT1)はNa⁺輸送活性のみを有することが分かっている。今回は両HKT系ホモログのイオン選択性が異なる原因を明らかにすることを目的とした。本トランスポーターの膜貫通構造のP領域を検討したところTaHKT1のイオン透過孔に存在するGly-LeuがAtHKT1ではSer-Metに置換されている。AtHKT1とTaHKT1のこの2残基を交換置換した6種類のトランスポーター遺伝子を作成して酵母の相補テストとアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学測定を行った。その結果、本アミノ酸残基がNa⁺/K⁺イオン選択性に関与していることが明らかとなった。

1pJ06

らん藻*Synechocystis* sp. PCC6803のK⁺トランスポーターの機能解析

松田信行¹, 小林弘², 中村辰之介², Evert Bakker³, 加藤大和⁴, 小川晃男⁴, 魚住信之⁴ (¹名古屋大・生命農, ²千葉大・薬, ³Osnabruck大, ⁴名大・生物分子応答研究センター)

微生物や植物には3-4種類のK⁺輸送体(トランスポーター、チャネル)が存在し、外界環境変化への応答や細胞内の情報伝達に深く関与しており、その重要性からこれまでに数々の生物種からK⁺トランスポーター遺伝子が単離され、その機能や構造が調べられてきた。らん藻*Synechocystis* sp. PCC6803のゲノムにはK⁺トランスポーターとして主要なファミリーの1つである植物のNa⁺/K⁺トランスポーター(HKT系)や海洋性細菌*Vibrio alginolyticus*のK⁺トランスポーター(KtrB)と高い相同性を示す遺伝子が存在している。このKtr/HKT系トランスポーターの生理的機能と役割は不明な点があることから、本研究ではこのらん藻のホモログタンパク質を解析し、知見を得ることを目的とした。我々は、PCRによりらん藻のゲノムから本遺伝子のクローニングを行った。本遺伝子がコードしている膜タンパク質がどのようなイオンを輸送するのかを明らかにするために、3種類のK⁺トランスポーター(*trk*, *kdp*, *kup*)が欠損した大腸菌に本遺伝子を導入したところ、本遺伝子産物はK⁺輸送能欠損変異を相補することが分かった。次に本遺伝子産物のK⁺取込み活性測定を行ったところ、K⁺輸送活性を検出した。

1pJ07

シロイネナズナ変異株をもちいたH⁺-ピロフォスファターゼの生理機能の研究

若見俊介¹, 中西洋一¹, 稲垣麻由¹, 森上敦², 鈴木孝征¹, 加藤友彦³, 田畑哲之³, 佐藤修正³, 前島正義¹ (¹名古屋大・生命農, ²中部大・応用生物, ³かずさDNA研究所)

液胞型H⁺-ピロフォスファターゼ(V-PPase)は無機ピロリン酸の加水分解に共役し、H⁺を輸送するプロトンポンプである。植物では主に液胞膜に存在し、V-AT-Paseとともに液胞内部の酸性を維持している。一方、さまざまな生体高分子合成反応の副産物である無機ピロリン酸を、細胞質から分解除去することもV-PPaseの機能の一つである。

この分子の細胞レベル、植物個体レベルでの生理機能を知る目的でシロイネナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のT-DNAタグライブラリーを検索した。その結果、V-PPase遺伝子(*AVPI*, 1コピー)の破壊株が2株得られた。これらを栽培したところ、破壊株は野生株に比べて湿重量が30%程度の小さい植物体となった。この結果はV-PPaseによる液胞酸性化が巨大液胞発達および細胞成長に不可欠であるとの我々の説を支持するものである。

1pJ08

カサノリ V-ATPase サブユニットアイソフォーム及び V-PPase の酵母での機能発現

池田己喜子¹, 馬見公子¹, 中西洋一², 前島正義² (岡山県大・保福, ²名大院・生命農学)

カサノリは、緑藻類に属し、巨大な単細胞から成る海棲の生物体である。我々は、このカサノリの液胞膜にも、高等植物と同様に二つのプロトンポンプ、V-ATPase 及び V-PPase が存在することを生化学的並びに遺伝子レベルで明らかにしてきた。昨年の本学会では、恒常的なプロモーターを持つ酵母発現ベクター (pKTΔATG) を用いた系で、V-ATPase, proteolipid subunit の 6 種類のアイソフォーム (VC1-6) のうち 4 種類 (VC2, 4, 5, 6) が、酵母 VMA3 欠損株で機能発現することを報告した。今回、V-ATPase, proteolipid subunit アイソフォームの機能発現について、誘導型のプロモーターを持つ酵母発現ベクター (pYES2) を用いた系を組み立て検討した結果、VC1, 3 を含めた 6 種類すべて機能発現できることを見出した。液胞膜画分を調製し、イムノプロットによる V-ATPase 複合体の集合を調べた結果、分子集合に差がみられることが明らかとなった。このような差をもたらす構造と機能の関係について議論する。更に、酵母 VMA11 欠損株の作成、発現を進めている。V-PPase についても、両酵母発現ベクターに組み込み、欠損株に導入した結果、pYES 系でのみプロトンポンプ機能を回復できるという結果を得た。現在、生化学的解析を進めている。また、液胞内への蛍光色素の蓄積強度から、V-ATPase の ΔpH 形成能力が V-PPase よりも高いことが示唆された。

1pJ09

空色西洋アサガオ花卉の開花に伴う液胞膜プロトンポンプ活性

森美穂子¹, 吉田久美¹, 小山内美奈子², 近藤忠雄³ (1名大院・人間情報, ²名大・化測セ, ³名大院・生命農)

(目的) 空色西洋アサガオ (*Ipomoea tricolor* cv. *heavenly blue*) は開花に伴い表層の着色細胞液胞 pH が 6.6 から 7.7 に上昇して色が赤から青へと変化する。我々はこの pH 上昇機構の解明を目指し研究を行った。

(方法、結果) 液胞のアルカリ化の原因としてまず液胞膜上のプロトンポンプの停止を推定し、有色細胞の液胞膜のプロトンポンプ活性を調べたが栽培条件による活性変動がみられ比較が困難であった。そこで今回特につばみからの液胞膜の調製法を検討し、ほぼ同時期に調製した膜を用いて比較した。一方アルカリ金属イオンの濃度上昇も pH 上昇の要因となり得るので液胞内のカリウムイオン濃度の変化を細胞内微小電極法で測定した。つばみは有色花卉部のみをカットして酵素処理や膜調製時の条件検討を行い再現よく液胞膜を得ることができた。得られた花卉、つばみそれぞれの液胞膜のピロリン酸依存性プロトン輸送活性は 0.25 (%Q/μg protein/min) と 0.10 でむしろ花卉の活性が高かった。液胞内 K⁺濃度は花で 38 mM、つばみで 70 mM で、これも花で低値であった。現在、ATP 依存性プロトンポンプ活性を測定し、胚軸や葉の活性との比較を行い、pH 上昇の原因特定を進めている。

1pJ10

液胞膜 H⁺-ATPase を再構成したプロテオリポソーム膜でのアシルステリルグルコシドおよびステリルグルコシドによる H⁺ 輸送の調節

山口峰生¹, 笠毛邦弘¹ (岡山県大・資生研)

イネ (*Oryza sativa* L. var. *Boro*) 培養細胞から精製した液胞膜 H⁺-ATPase を糖脂質のステリルグルコシド (SG) またはアシルステリルグルコシド (ASG) を含むアゾレクチンリポソームに再構成し、H⁺ 輸送活性、ATP 加水分解活性、および H⁺ 透過性に対する SG と ASG の影響を調べた。SG を含むプロテオリポソームでは、10 mol% SG で H⁺ 輸送活性および ATP 加水分解活性がコントロールの約 140% まで促進された。ASG を含むプロテオリポソームでは、15 mol% ASG で H⁺ 輸送活性および ATP 加水分解活性は、コントロールの 1/10 まで減少した。一方、SG と ASG はプロテオリポソームの受動的な H⁺ 透過性を減少させた。

これらの結果から生体内において SG と ASG が液胞膜を介しての H⁺ 輸送をそれぞれ促進および抑制することによって調節していることが考えられた。さらに、これらの糖脂質は液胞膜の H⁺ 透過性を減少させていることが考えられた。

1pJ11

高等植物原形質膜構成分子の非対称性--なぜ水性二相分配で right-side-out 原形質膜小胞が単離できるのか 武田裕一¹, 笠毛邦弘¹ (岡山県大・資生研)

デキストララン T500 とポリエチレングリコールの水性二相分配は、高等植物組織より right-side-out 原形質膜小胞 (RO-PM) を高純度に単離する簡便な方法として広く研究に用いられている。この方法は膜表面の疎水性と荷電の違いに基づいているが、なぜ RO-PM を他の膜と分離できるのかは解っていないかった。

我々はこれまでヤエナリ胚軸より単離した RO-PM における膜構成分子の膜の表と裏における分布を解析し、その主要なリン脂質はほぼ対称的に分布していたが、膜表面の表在ペプチド量は非常に少ないことを明らかにした。

下相に分配した内膜小胞を 1M KCl あるいはトリプシン、プロテイナーゼ K で処理し、表在ペプチドを取除いた。これらの内膜小胞を再び二相分配したところ、いずれの場合も減少した表在ペプチド量にほぼ比例して上相への分配率が上昇した。前者の処理では表面荷電は減少したが、後者では逆に増加した。そのため、表在ペプチド量の減少に伴う水和(親水性)の低下が、表面荷電よりも、この分配率上昇には重要であると考えられた。

高等植物では細胞表面の表在ペプチドが非常に少なく、そのため RO-PM が上相に分配しやすくなると考えられる。

1pJ12

オウレンにおける MDR 様 ABC トランスポータ CjMDR1 のベルベリン輸送機能

士反伸和¹, 団一幸¹, Ingrid Bazin², Cyrille Forestier², 佐藤文彦¹, 矢崎一史¹ (¹京大院・生命, ²CEA/Cadarache, France)

アルカロイドは植物二次代謝における主要な化合物群の一つである。キンポウゲ科多年生草本のオウレンにおいて、主アルカロイドのベルベリンは根茎に蓄積される。しかし、その生合成酵素は根において発現しており、本アルカロイドは根から根茎に輸送され蓄積していると考えられる。我々は、ベルベリン高生産性オウレン培養細胞からアルカロイド輸送体の候補として MDR (multi-drug resistance) タイプの ABC トランスポータ CjMDR1 をクローニングした¹⁾。実際に CjMDR1 がベルベリン輸送機能を持つことを、*Xenopus oocytes* で発現させ確認した結果を報告する。CjMDR1 発現 *oocytes* はコントロールよりも高いベルベリン取込み能を示し、この取込みは ABC トランスポータ阻害剤である vanadate や nifedipine, glibenclamide により顕著に抑制された。これらの結果は、CjMDR1 がベルベリンの組織特異的蓄積に関与していることを示唆している。

¹⁾ Yazaki, K., et al. (2001) J. Exp. Bot., 52: 877-879.

1pJ13

タバコ BY-2 細胞の細胞周期進行に伴う液胞膜の動態の観察

朽名夏麿¹, 馳澤盛一郎¹ (¹東京大・院新領域・先端生命)

高等植物細胞の液胞はさまざまな機能を持ち、形態も多様である。近年、ひとつの細胞内において、液胞の機能が分化に伴って変換することや機能の異なる複数の液胞が共存しうることが示されている。一方、細胞の形態変化や細胞分裂といったイベントに液胞がどのように関与しているかについてはまだ不明な点も多い。

我々は、脂溶性の蛍光色素である FM4-64 によるパルスラベルを行ない、タバコ BY-2 細胞の細胞周期各期における液胞膜の動態を可視化した。また、GFP とチューブリンの融合タンパク質を恒常的に発現する BY-2 の形質転換株 (BY-GT16) を用いて、液胞膜の動態を微小管の構造とあわせて検討した。

これらの観察の結果、(1)G₂ 期の終わりよりフラグモソーム中にチューブ状の液胞が連なったネットワークが分裂装置をとりまくように生じること、(2)M 期後期以降において、類似の液胞構造が赤道面付近に出現し、フラグモプラスト近傍でも見られるようになること、(3)G₁ 期初期において、細胞板と娘核の間にある液胞構造は、核が細胞板から離れていくにつれて体積を増して大きな液胞へと生長すること等の現象が見出された。

1pJ14

溶質吸収速度のステップ状時間変化に対する、Standing Osmosis の過度応答の代数的解析

水野昇治¹, 水野暁子¹ (¹日本福祉大・情報社会)

動物の小腸上皮細胞による栄養吸収や胆嚢での分泌 (Diamond & Bossert 1967) や植物の伸長成長時の一見能動的な吸水 (Katou & Furumoto 1986) に際しては、水吸収と溶質吸収の coupling 現象が見られる。これらの系には、上皮細胞の微繊毛や細胞壁のアポプラスト・カナルのような、standing osmotic gradient を発生させる細長い構造が必要である。植物のカナルに関する定常状態の場合の代数的解析を昨年度の本大会で報告した。今回は、溶質吸収速度が時間的にステップ状に変化する場合について検討した。x を位置、t を時間としたとき、カナルの環境が一定に保たれる場合、カナル内の溶質濃度 $C_a(x, t)$ が従う非線形偏微分方程式 (Katou & Furumoto 1988) を摂動法により代数的に解いた。これから、水吸収速度 $I_v(t)$ の近似解を代数的に得た。

$$I_v(t) = I_{vs}(1 - \exp(-t/\tau))$$

ここで、 I_{vs} は定常状態のときの $I_v(t)$ 、時定数 τ は、

$$\tau = \delta / 2L_p R T K$$

である。ここで、 δ はカナルの厚さ、 L_p は細胞膜の水の透過性、 R は気体定数、 T は絶対温度、

$$K = C_i - (P_i - P_a) / RT$$

で、 C_i はシンプラスト内の浸透濃度、 P_i は膨圧、 P_a はカナル内の静水圧である。本報告は、植物のカナルにおける standing osmosis に関し、その非定常解を代数的に求めた最初のものである。

1pJ15

点変異セリンアセチル転移酵素遺伝子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

野路征昭¹, 落合智子¹, 斉藤和季¹ (¹千葉大院・薬)

セリンアセチル転移酵素 (SATase) は、システイン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と考えられている。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。これらの遺伝子およびそれらに葉緑体への輸送配列を融合したキメラ遺伝子を導入し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。その結果、SATG277C を高発現しているトランスジェニック植物では、スイカ SATase gene を高発現しているトランスジェニック植物や野生型植物に比べ OAS、システイン含量が顕著に増加していた。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れるため、硫黄同化系酵素遺伝子の発現量の変化について検討中である。

1pJ16

シロイヌナズナ種子発芽過程におけるイノシトールリン酸代謝の解析

三橋尚登^{1,2}, 三村徹郎^{1,2} (1奈良女子大・理, 2科技団・CREST)

イノシトール6リン酸すなわちフィチン酸は、種子の形成過程において大量に合成され、植物細胞内に最も豊富に存在する有機リン酸化合物である。しかし、発芽時のリン酸供与体として以外その生理機能および合成・代謝のメカニズムに関しては、ほとんど解明されていない。私達は、イオンクロマトグラフィーを用いることによって、生体内の微量なイノシトールリン酸を検出し、定量的に解析する方法を確立している。

本研究では、この高感度定量法を用いてシロイヌナズナ種子発芽過程のイノシトールリン酸化合物の変動を測定した。発芽種子におけるフィチン酸分解過程において、リン酸欠乏下では発芽後4日目までイノシトール2リン酸が一過的に蓄積すること、また*pho2*突然変異体では、その蓄積が著しく増加することが判明した。しかし野生型では、リン酸欠乏下で蓄積したイノシトール2リン酸が、発芽後4日目から6日目の間に消失した。イノシトール5リン酸および4リン酸は、発芽後に減少する傾向がみられたが、ABA存在下ではほとんど変化しなかった。イノシトール3リン酸は、ABA存在下でのみ発芽後に増加する傾向がみられた。今後、発芽過程における内生のフィチン酸分解酵素（フィターゼ）活性について解析を進めていく予定である。

1pJ17

生体外異物であるナフトールの代謝に関与すると考えられるタバコの配糖化酵素の解析

田口悟朗¹, 中村美奈子¹, 産形峰久¹, 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)

配糖化はその対象物の物性を大きく変化させる。植物における配糖化の役割として、物質の蓄積、生理活性物質の活性調節、解毒、生合成の中間産物の供給などが考えられているが、その生理的な意義には不明な点が多い。我々がタバコから単離した配糖化酵素遺伝子*NtGT1a/1b*及び*NtGT3*の異種発現酵素は、生体内に存在するフェノール性低分子化合物の他、生体内には含まれていないと考えられる細胞毒性の高い化合物も配糖化することが明らかになっている。これら配糖化酵素の生体内での役割について解明する目的で、タバコ細胞におけるナフトールの代謝について検討を行った。

タバコ細胞に1-及び2-ナフトールをそれぞれ投与し、20時間振盪培養したところ、1mMでは細胞が生存できなかった。一方0.25mM以下では、細胞は生存し、投与したナフトールのほとんどが配糖体として細胞内に蓄積されていた。この時の細胞内のナフトールに対する配糖化活性を測定したところ、投与したナフトールの濃度に応じて2-5倍に増大していた。RT-PCR解析を行ったところ、ナフトールの投与によって*NtGT1a/1b*及び*NtGT3*の発現が誘導されていることが明らかとなった。これらの結果は、これらの配糖化酵素が生体外異物であるナフトールの代謝・蓄積に関与していることを強く示唆している。

1pJ18

樹木葉におけるトコフェロール中間体大量蓄積について

高見常明¹, 小倉あゆみ¹, 柴田勝¹ (1長岡高専・物質工学)

葉緑体に存在する脂溶性 α -トコフェロール (α -Toc)は、高い活性酸素除去能を有することから、生合成経路・機能などについて数多くの研究が行われてきた。Sollらはキュウリ、ハウレンソウなどの草本植物の葉緑体を用いて、 α -Toc生合成が経路-I (homogentisate \rightarrow 2-methyl-6-benzoquinol (MMPQ) \rightarrow 2,3-dimethyl-6-phytyl benzoquinol \rightarrow γ -Toc \rightarrow α -Toc) により行われていることを明らかにしている。しかし、当研究室において樹木葉片のToc分析をHPLC, GC-Mass, 分光光度計により行ったところ、多くの樹種において草本植物の完全展開葉にはほとんど見られない α -Toc前駆体 (δ , γ and β -Toc)が見い出された。特にヤツデの葉片には大量の前駆体が蓄積されており、全Toc類合計の50%以上が α -Toc前駆体であった。樹木葉の α -Toc中間体種から、Toc合成経路は経路-I以外に経路-II (homogentisate \rightarrow MMPQ \rightarrow δ -Toc \rightarrow γ -Toc \rightarrow α -Toc) および経路-III (homogentisate \rightarrow MMPQ \rightarrow δ -Toc \rightarrow β -Toc \rightarrow α -Toc)が存在すると考えられる。

また、これらの中間体含量および蓄積比率が季節的に変化していたことから、生育温度とToc中間体蓄積・生理的意義との関係について考察する。

1pK01

タバコの*EIN3*ホモログ、*TEIL*遺伝子を過剰発現させたタバコの解析

日比忠晴^{1,2}, 小杉俊一^{1,2}, 岩井孝尚^{1,2}, 光原一郎^{1,2}, 大橋祐子^{1,2} (1農業生物資源研究所, 2CREST/JST)

タバコ酸性*PR1*プロモーターに特異的に結合する因子としてタバコから単離された*TEIL* (Tobacco EIN3-Like)は、シロイヌナズナの*EIN3* (Ethylene-Insensitive3)ホモログであり、アミノ酸配列上60%の相同性を有する。*EIN3*は、エチレン応答性遺伝子群の転写因子*ERF1* (Ethylene-Responsive-Factor1) 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を制御することが報告されている。我々は、*TEIL*結合配列が多くの傷害誘導性の塩基性*PR*遺伝子のプロモーター領域に含まれることを明らかにした (Kosugi and Ohashi, 2000)。そこで、*CaMV35S*プロモーターの支配下に*TEIL*遺伝子を過剰発現させたタバコを作成し、3系統についてその当代、後代における*PR*遺伝子の発現を解析した。このうち2系統では、健全植物では通常発現していないはずの傷害誘導性遺伝子、塩基性*PR1*, 2および5遺伝子の発現が観察された。*TEIL*遺伝子自身の発現は傷害誘導性であり、非形質転換体では傷害により、これら塩基性*PR*遺伝子群の発現に先立ってその転写産物が蓄積した。形質転換体の目立った形態異常はなかったが、花器の雌蕊の長さの増大が観察された。

1pK02

ERFドメイン転写因子の機能解析: 遺伝子発現における転写制御因子の役割

松井恭子¹, 平津圭一郎¹, 太田賢¹, 高木優¹ (1産総研・ジーン)

ERFドメインを有する転写因子は、植物に特異的に存在し、大きなジーンファミリーを形成している。シロイヌナズナには、約120個のERFドメインを持つタンパク質因子が存在する。ERFは、種々のストレス、およびエチレン、ABA、JAなど、ストレス応答関連ホルモンによって誘導される遺伝子の発現制御に関与している事が明らかにされてきた。当研究室では、これらのERFファミリーのうち、クラスIIに属するものは転写抑制因子として機能することを明らかにした。これらの転写抑制ドメインを同定するために、タバコERF3転写抑制因子の様々な欠変異クローンを作成してその転写抑制活性を測定した。その結果、転写抑制ドメインはC末端領域にあることが明らかになった。他のERF転写抑制因子との相同性検索の結果、C末端領域に、両親媒性の6アミノ酸残基の相同配列がみられた。また、この配列は植物特異的なzinc fingerタンパク質の中にも存在し、これらのタンパク質も転写抑制活性があることが確認された。現在、転写抑制ドメインのさらに詳細な機能解析を行っており、その結果もあわせて報告する。

1pK03

MBF1 Mediates Ethylene Responses in Dark-grown Seedlings of *Arabidopsis thaliana*

Yuji Tanaka¹, Masamichi Nanba¹, Ken-ichi Yamazaki¹

(¹Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University)

MBF1s (multiprotein bridging factor 1) have been described as an evolutionary conserved transcriptional coactivator in yeasts, insects, and mammalian including human. However, physiological role of plant MBF1 has been poorly understood.

We found the existence of three mbf1 genes from the genome-database of *Arabidopsis thaliana*. One of them, we called mbf1a localised on chromosome II and other mbf1 genes (mbf1b and mbf1c) localised on chromosome III. The deduced amino acid sequence of MBF1a appeared more similar to that of MBF1b than MBF1c: MBF1b (93% amino acid identity) and MBF1c (48% amino acid identity). For better understanding of physiological role of MBF1s, we constructed mbf1a-overexpression line and mbf1a-antisense overexpression line. Reduction of inhibition of hypocotyl elongation by the addition of ACC (1-amino-1-cyclopropane-carboxylic acid) on dark-grown seedlings was observed in both lines. These observations suggested that MBF1a could be addressed as a novel component of ethylene responsive pathway.

1pK04

形質転換系を用いたイネOsDREB遺伝子の機能解析
伊藤裕介^{1,2}, 桂幸次¹, 篠崎一雄³, 篠崎和子¹ (1国際農林水産業研究センター, 2科学技術振興事業団科学技術特別研究員, 3理化学研究所植物分子生物学研究室)

我々はこれまで、シロイヌナズナの乾燥・塩・低温応答性の遺伝子の発現調節に関わる転写因子DREBについての解析を行い、さらにイネのDREBのホモログを同定した。このイネのDREBホモログ(OsDREB)がシロイヌナズナのDREBと同様の機能を持つことを、シス因子(DRE)との結合能や転写活性化能について、ゲルシフト法やプロトプラストを用いたtransactivationの実験により確認してきた。さらにOsDREB1A遺伝子を導入したシロイヌナズナでは、DREB1Aタンパク質の標的遺伝子の転写産物の蓄積及び塩耐性の向上を確認した。本発表では、イネ植物体においてOsDREBがストレス応答に関与していることを確認するため、このOsDREB遺伝子をイネに導入した形質転換体を解析した。

OsDREB1A, 1B遺伝子、シロイヌナズナのDREB1B, 1C遺伝子を、トウモロコシのエピキチン遺伝子のプロモーターを用いて恒常的に発現させたところ、導入したDREB遺伝子が発現している形質転換体では、イネの乾燥・高塩・低温ストレス誘導性の遺伝子が過剰発現していた。このストレス誘導性遺伝子のプロモーターにはDREBが結合するDREが存在していた。現在この形質転換体の乾燥・高塩・低温ストレス耐性について解析している。

1pK05

低温誘導性転写因子DREBA1の標的遺伝子の検索
圓山恭之進¹, 春日美江¹, 関原明², 篠崎一雄², 篠崎和子¹ (1国際農林水産業研究センター, 2理研・植物分子)

DREB1A遺伝子は、低温、乾燥及び塩ストレスによる遺伝子発現を制御するシス領域、DRE (Dehydration Responsive Element) に結合するタンパク質をコードするcDNAとして単離された。このDREB1A遺伝子は、低温ストレス条件下において特異的にmRNAが蓄積し、DREB1Aタンパク質は詳細なゲルシフト分析によりA/GCCGAC配列に結合することが示されている。CaMV35SプロモーターをもちいてDREB1A遺伝子を恒常的に過剰発現させた形質転換体は、低温、乾燥、塩ストレスに対する耐性能が向上した。この形質転換体から調製したmRNAを用いて1300マイクロアレー解析を行った結果、12種類の遺伝子がDREB1Aの制御下にあることが明らかになった。本研究では、さらに7000マイクロアレー及びAffymetrix社製GeneChipを用いて網羅的にDREB1A遺伝子の下流に存在する遺伝子を検索し、ストレス処理後の経時的なノーザン解析およびプロモーター領域の解析によってDREB1Aの標的遺伝子を検討した。これらの解析により得られた遺伝子は、適合溶質合成酵素、膜タンパク質、RNA結合タンパク質、LEAタンパク質、転写因子、リン脂質代謝関連酵素等をコードする遺伝子群であった。DREB1A遺伝子はストレス耐性に関係する種々の遺伝子を制御することが示唆された。

1pK06

The *LSH1* locus encodes a novel nuclear protein involving in positive light signalling in *Arabidopsis*

Zhao Li¹, Miki Nakazawa¹, Takanari Ichikawa¹, Masatomo Kobayashi^{2,3}, Motoaki Seki^{3,4}, Kazuo Shinozaki^{3,4}, Minami Matsui¹ (¹RIKEN GSC PLant Function Exploration, ²RIKEN BRC Experimental plant Div., ³RIKEN Plant Molec. Biol., ⁴RIKEN GSC Plant Mutation Exploration)

By screening 4000 *Arabidopsis* activation-tagged T2 lines, one mutant line showing enhanced response to light was obtained, which is named as *lsh1-D* for light dependent shorter hypocotyl and dominant phenotype. The genomic DNA adjacent to the borders of the T-DNA was cloned. A candidate gene (named as *LSH1*) near the border of the insertion was predicted. The *LSH1* gene encodes a protein with no significant sequence similarity to any proteins of known function and defines a new multigene family. The *LSH1* protein contains a predicted nuclear localization signal and is targeted to the nucleus by GFP-*LSH1* fusion transgenic analysis. Northern blotting revealed that the expression of *LSH1* in *lsh1-D* mutant was indeed highly enhanced than in wild type. As *lsh1-D*, 35S::*LSH1* transgenic plants also showed shorter hypocotyl than wild type in light, which confirmed that the enhanced response to light is conferred by over-expression of *LSH1*.

1pK07

Identification of a Novel *cis*-Regulatory Element Involved in ABA-Responsive Gene Expression in the *AREB* Gene in *Arabidopsis thaliana*

Mohammad M. Parvez¹, 降旗敬¹, 篠崎一雄², 篠崎和子¹ (¹国際農研・生物資源, ²理研・植物分子生物)

ABA-responsive element binding proteins - *AREB1* and *AREB2* act as transcriptional activators in ABA-inducible expression of the *rd29B* gene. Promoter regions of the *AREB1* and *AREB2* genes were analyzed. A 5' UTR exist in the *AREB1*. The *AREB1* promoter construct with 5' UTR had a high GUS activity under dehydration stress in transgenic tobacco, and also in dehydration, high-salt and exogenous ABA conditions in transgenic *Arabidopsis*. Histochemical analysis of *Arabidopsis* showed a strong GUS staining in whole plant. 5' deletion of the *AREB1* promoter showed a drastic decrease in GUS activity at -150 to -108bp. The *AREB1* promoter contains two 9bp repeat sequences (AATTAGTAA) within -169 and -148bp. Base substitution revealed that two 9bp repeat sequences act additively, and at least one of the AATTAGTAA is essentially required for the expression of the *AREB*; indicating that AATTAGTAA function as a novel *cis*-regulatory element in dehydration and ABA specific expression of *AREB* gene.

1pK08

形質転換植物体によるABA誘導性受容体型キナーゼ RPK1のABAシグナル受容機構の解析

刑部祐里子^{1,2}, 関原明³, 篠崎一雄³, 篠崎和子¹ (¹独行法・国際農研セ・生物資源部, ²科技特, ³理研・植物分子)

アブシジン酸 (ABA) は乾燥、低温ストレスの応答及び耐性の獲得、種子の成熟や休眠、発芽などの様々な過程に関わる植物ホルモンである。近年、高等植物に存在するレセプター型キナーゼが、頂芽分化、病原菌抵抗性、ブラシノステロイド受容体 *BRI1* に示されるホルモンシグナル伝達等様々な過程に関与することが示された。本報告は、ABAシグナル伝達に機能する制御因子の候補として、ABAにより転写誘導がおこるシロイヌナズナ受容体型キナーゼ *RPK1* に着目した。*RPK1* 遺伝子発現に与える数種類の植物ホルモンの効果について解析を行ったところ、*RPK1* 遺伝子はABA処理により発現誘導されるが、その他のホルモン処理では発現誘導は起きないことが明らかとなった。また、タンパク質レベルでもABAによる発現誘導が起きた。次に、*RPK1* のアンチセンス形質転換シロイヌナズナを作製しABA感受性について解析した。その結果、形質転換体は発芽及び成長の両過程にABA非感受性を示した。*RPK1* アンチセンス形質転換けん濁培養細胞を用いた場合も、増殖におけるABAの抑制効果が減少していた。さらに、いくつかのABA誘導性遺伝子がアンチセンス植物体で抑制されていることが、ノーザン解析により示された。*RPK1* がABAシグナル伝達に重要な役割を持つことが明らかとなり、現在 *RPK1* に制御される遺伝子についてマイクロアレイを用いて解析を進めている。

1pK09

ABA誘導性遺伝子 *rd29B* プロモーターを用いたABA関連変異体の単離

中島一雄¹, Mohammad M. Parvez¹, 大河原依久子¹, 山本美恵¹, 篠崎一雄², 篠崎和子¹ (¹国際農研・生物資源, ²理研・植物分子生物)

我々は、ABAによるシグナル伝達機構を明らかにすることを目的に、ABA誘導性遺伝子 *rd29B* の発現に異常が見られる変異体の単離と解析を行っている。すなわち、水ストレスを受けた植物体や成熟種子においてABA依存的に発現する *rd29B* プロモーターとルシフェラーゼ (*LUC*) 遺伝子を融合してシロイヌナズナに導入した。これにアクティベーションタギング用ベクター pPCVICEn4HPTあるいはpSKI015をもつアグロバクテリウムを感染させることにより、アクティベーションT-DNAタグラインを作成した。得られたタグラインの中から、発芽時の植物体、あるいは成熟植物体において非ストレス条件下でも発現する変異体、あるいはABA処理時に *LUC* の発現が異常になる変異体をスクリーニングしている。その結果、いくつかのラインにおいて *rd29B::LUC* 遺伝子の異常な発現が見られた。得られた変異体のうち4HPT755系統は、非ストレス時においても高い *LUC* 活性を示した。現在、変異体のスクリーニングを続ける一方で、得られた変異体の生理学的、分子生物学的、および遺伝学的解析を行っている。

1pK10

ブラシノステロイドが誘導する抵抗性の機構の解析
安田美智子^{1,2}, 仲下英雄¹, 長谷川賢¹, 新田貴子¹, 浅見忠夫¹, 吉田茂男^{1,2}, 山口勇^{1,2} (¹理研, ²埼玉大院・理工)

最近我々は、ブラシノステロイドがイネおよびタバコに幅広い病原微生物に対する抵抗性を誘導することを示してきた。タバコおよびアラビドプシスにおけるこの抵抗性誘導機構を、活性本体と考えられるプラスノライド(BL)を用いて解析した。BL処理はPR-1遺伝子の発現およびサリチル酸(SA)合成を誘導しなかったことから、この抵抗性は全身獲得抵抗性(SAR)とは異なる機構によることが明らかとなった。また、BLによる抵抗性とSARは病原菌に対して相加的に作用し、互いに抑制する現象は見られなかった。BLはジャスモン(JA)酸生合成を誘導することが示唆されているが、JA非感受性のアラビドプシス*jar1*株においてもBLは抵抗性を誘導していた。これは、non-pathogenic rhizobacteriaが誘導する抵抗性(ISR)とも異なる抵抗性であることを示しており、BLはSA、JAを介して誘導される抵抗性とは異なる抵抗性を誘導に関わる植物ホルモンであることが示唆された。

1pK11

His-to-Asp Phosphorelay And Cytokinin Signaling: [I] AHK2/3/4 His-Kinase Are Cytokinin-Binding Receptors.
石川邦子¹, Kazunori Terada¹, Tomomi Suzuki¹, Hisami Yamada¹, Takafumi Yamashino¹, Takeshi Mizuno¹ (¹名大・農)

During the last three decades, intensive efforts have been made to find a cytokinin-binding protein that plays a crucial role in the hormone-mediated signal transduction. Recently, two papers, including ours, independently suggested that the *Arabidopsis* AHK4 (or CRE1) His-kinase functions as a sensor for cytokinins, suggesting that a His-to-Asp phosphorelay is implicated in the cytokinin-signaling pathway. Nevertheless, the results did not necessarily prove that they are the primary receptors that directly bind the plant hormone. Here we show that this is indeed the case. Furthermore, by employing *E. coli*-mediated and AHK2/3/4-dependent cytokinin-responsive systems, we succeeded in isolating a set of mutant AHKs that function independently of cytokinins. These results will be discussed with special reference to the AHK2/3/4-dependent and cytokinin-mediated signal transduction in higher plants.

1pK12

His-to-Asp Phosphorelay And Cytokinin Signaling: [II] Characterization of Type-A ARR Implicated In AHK4 (CRE1)-Mediated Cytokinin-Signaling

Takatoshi Kiba¹, Takeshi Mizuno¹ (¹Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya Univ.)

Recently, two papers, including ours, independently suggested that the *Arabidopsis* AHK4 (or CRE1) His-kinase functions as a sensor for cytokinins, suggesting that a His-to-Asp phosphorelay is implicated in the cytokinin-signaling pathway. It was thus assumed that certain downstream His-to-Asp phosphorelay components (such as ARRs) must also be implicated. Indeed, we previously demonstrated that expression of type-A ARR genes are rapidly induced by cytokinins. Here we extensively characterized a null-mutant of AHK4, named *cre1-1*, in the hope of finding downstream phosphorelay-components of the AHK4-mediated signal transduction, with special reference to cytokinin-inducible type-A ARRs. We found that expression of certain ARRs were specifically (two out of 11) down-regulated in roots, suggesting that they most likely function at downstream of the AHK4-mediated cytokinin-signaling pathway in roots. Therefore, natures of these particular ARRs were characterized extensively.

1pK13

His-to-Asp Phosphorelay And Cytokinin Signaling: [III] Characterization Of A Type-B Response Regulator, ARR11

Aya Imamura¹, Toshimasa Yamazaki², Takeshi Mizuno¹ (¹Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya Univ.)

Recently, two papers, including ours, independently suggested that the *Arabidopsis* AHK4 (or CRE1) His-kinase functions as a sensor for cytokinins, suggesting that a His-to-Asp phosphorelay is implicated in the cytokinin-signaling pathway. It was thus reasonably assumed that certain downstream components of His-to-Asp phosphorelay (such as ARRs) must also be implicated in the cytokinin-signaling. Based on these, here we extensively characterized certain representatives of type-B ARRs, which presumably act as a transcriptional regulator. ARR10 and ARR11 thus characterized indeed showed an ability to specifically bind to DNA, and to enter into nuclei. The 3D-structure of the DNA-recognition domain of ARR10 has been determined. Furthermore, transgenic plants that express an ARR11 C-terminal domain encompassing its DNA-binding and gene-activating domains were constructed, and then, their impressive phenotypes were extensively characterized with special reference to the cytokinin-signaling in plants.

1pK14

緑藻ドナリエラのクロロフィル・アンテナサイズの光強度適応機構における情報伝達機構の解明

増田建^{1,2}, 田中歩^{1,3} (1カリフォルニア州立大学パークレー校, 2東京工業大学院・生命理工, 3北海道大・低温科学研究所)

We investigated the mechanism of irradiance-dependent adjustments the chlorophyll antenna size of photosynthesis in *Dunaliella salina*. Among the chlorophyll biosynthetic enzyme tested, only the chlorophyll *a* oxygenase (CAO) gene responded to changes in irradiance with steady state levels and kinetics of changes similar to those of the *Lhcb* genes. Evidence is presented to suggest that a canonical signal transduction pathway involves a heterotrimeric G-protein activation, phospholipase-C activation to Ca²⁺ release, and activation of a downstream Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase, through which the light intensity signal is transmitted for the rapid and significant induction of both CAO and *Lhcb* gene expression. The redox-state of the plastoquinone pool also regulates both genes expression as long-term photoacclimation. It is proposed that irradiance-dependent adjustment of chlorophyll antenna size in *D. salina* is regulated by coordinate expression of CAO and *Lhcb* genes via a shared signal transduction pathway in photosynthetic organisms.

1pK15

ダイズ光独立培養細胞SB-Pにおける光合成関連遺伝子の光発現誘導に関わるホスホリパーゼD

榮容子¹, 西村浩二¹, 牟田孝洋¹, 地阪光生¹, 長屋敦¹, 横田一成¹ (1島根大・生物資源)

高等植物の光合成関連遺伝子の光発現誘導には、光受容体やCa²⁺、cGMPなど種々の細胞内情報伝達因子の関与が報告されているが、照射後のホスホリパーゼC (PLC) によるイノシトール脂質代謝の活性化も報告されており、植物の光情報伝達経路において脂質情報伝達因子の関与が想定された。本研究では、植物の様々な細胞内情報伝達においてPLC経路と相互作用することが報告されているホスホリパーゼD (PLD) 経路について、光合成関連遺伝子の光発現誘導における関与を調べた。

ダイズ光独立培養細胞 SB-P を3日間暗所適応させた後、明所で培養を続けた。暗所適応終了1時間前にPLD阻害剤である1-ブタノール (1-BuOH) を添加し、細胞を明所にシフトさせたときの光合成関連遺伝子の光発現誘導に及ぼす1-BuOHの効果をノーザンブロット解析により調べた。その結果、1-BuOHによりクロロフィル ab 結合タンパクをコードする cab 遺伝子やマグネシウムキラーゼIサブユニットをコードする chl 遺伝子の光発現誘導の抑制が見られた。このとき細胞内のクロロフィル含量も減少していた。以上から、SB-P細胞において、光合成関連遺伝子の光発現誘導にPLDが関与している事が示唆された。

1pK16

*Thermosynechococcus elongatus*の走光性変異株の波長依存的性質の解析

近藤陽一¹, 真鍋勝司¹ (1横浜市大院・総合理)

走光性は光の方向を認識し、運動性を示す現象である。ラン藻の走光性に関する研究は古くから行われており、近年単細胞性の*Synechocystis* PCC6803を用いた分子遺伝学的研究により、この現象に関与している幾つかの遺伝子が同定されている。しかし走光性の光受容系に関しては、未だ解っていない事が多い。我々は好熱性ラン藻である*Thermosynechococcus elongatus* (旧名:*Synechococcus elongatus*) においても走光性が見られる事を発見し、詳細な作用スペクトルを測定する事により、幾つかの異なる光受容系が存在する事を生理学的に明らかにした。そこで個々の光受容系の性質を詳細に解析するために、波長依存的に走光性能に変異が生じた突然変異株を単離した。

突然変異を誘発するための薬剤処理を行った*T. elongatus*にコロニーを形成させ、緑色光により走光性を誘導させた後、照射方向を直角に変え赤色光を照射し、野生型と異なる反応を示す株の単離を試みた。その結果、波長依存的な走光性突然変異株M32を単離した。M32は緑色光に対しては野生型様に反応するが、赤色光に対しては野性株に比べて感度が低下している。さらにこの突然変異株の詳細な生理的解析を行う事により、*T. elongatus*の走光性の個々の光受容系の特徴の解明を目指す。

1pK17

イネGA非感受性変異体GA insensitive dwarf1 (*gid1*) の解析 (3)

上口(田中)美弥子¹, 芦荻基行¹, 伊藤博紀¹, 小林正智², 北野英巳³, 松岡信¹ (1名古屋大・生物分子応答研究センター, 2理研, 3名古屋大・生命農学研究科)

*gid1*は、ジベレリン (GA) 非感受性で極矮性を示す新しいイネの変異体である。すでに我々は、*GID1*が、GAシグナル伝達の抑制因子である *SLENDER RICE1* (*SLR1*) の上流に位置し、核内に存在するSLR1のGAシグナル依存的分解に必須であることを明らかにしている (昨年度本大会)。今回は、*GID1*の機能をさらに明らかにするために、変異体の原因遺伝子のポジショナルクローニングを行ったので報告する。

その結果、*gid1* 変異体の原因遺伝子は、5番染色体長腕に位置し、*serin hydrolase*をコードしている可能性が示唆された。そこで、この領域を含む6.7kbのゲノム断片を用いて相補性試験を行ったところ、この領域は、*gid1*変異を完全に相補した。さらに、*gid1*の4つのアレルのシークエンスを行い、すべてのアレルがこの酵素遺伝子に変異が起きていることを明らかにした。以上のことより *GID1*は、*serin hydrolase*をコードしていると結論した。一方、*yeast two hybrid*の結果は、*GID1*がSLR1と直接、作用することを示唆した。従って、*GID1*がSLR1を基質として加水分解反応を行うことにより核内SLR1のGAシグナル依存的分解を引き起こすというモデルが考えられた。現在、*in vitro*における*GID1*のSLR1に対する反応性を検討中である。

本研究の一部は、生研機構基礎推進事業の支援で行われた。

1pK18

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 の概日時計リセットに異常を持つ突然変異体の検索

片山光徳¹, 富田淳¹, 清原洋太¹, 中平洋一¹, 近藤孝男¹ (¹名古屋大・理)

シアノバクテリアの概日時計は他の生物と同様、24時間周期で変動する光や温度などの環境変化に同調する機構を持つ。この機構に関わる因子はほとんど同定されていないが、唯一バクテリオフィトクロームをコードする CikA が暗パルスによる概日時計のリセットに関わる因子として同定されている。我々は概日時計のリセットに関わる新しい因子を同定するために以下の実験を行った。約7kbのゲノムDNAを含むプラスミドライブラリーに *in vitro* によるトランスポゾン導入反応を行い、これを用いて発光レポーターを持つ *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 を形質転換した。続いて概日時計の位相シフトを引き起こす5時間の暗パルスを与え、これに対する応答に異常を示す突然変異体をスクリーニングした。その結果3種類の突然変異体が得られた。これらはそれぞれ糖の輸送に関わると思われる ABC 輸送体の ATP 結合サブユニット、Na⁺-ATPase の J サブユニットおよび機能不明のタンパク質 SH0624 をコードする遺伝子にそれぞれトランスポゾンが挿入されていた。

1pL01

塩生植物由来 eEF1A の機能解析

野崎亜沙美¹, 山田晃世¹, 三村徹郎², 小関良宏¹ (¹農工大・工, ²奈良女子大・理)

当研究室では大腸菌を利用した耐塩性因子の機能スクリーニング法を用いてマングローブの cDNA ライブラリーから耐塩性因子をコードする cDNA の探索を進めてきた。その結果、伸長因子 elongation factor 1A (eEF1A) をコードしていると考えられる cDNA の単離に成功している。eEF1A はタンパク質の合成に関与し、全ての真核生物において保存されているタンパク質である。本研究ではマングローブ以外の高い耐塩性を有する植物として、アカザ科の塩生植物 (オカヒジキ, シチメンソウ) に着目し、それらの eEF1A cDNA のクローニングとその機能解析を試みた。オカヒジキ及びシチメンソウの cDNA ライブラリーを作成し、大腸菌を用いた機能スクリーニングを行ったところ、それぞれの cDNA ライブラリーから共通して高等植物の eEF1A cDNA と高い相同性を示す cDNA が単離された。よって、アカザ科植物の有する eEF1A もマングローブの eEF1A と同様に大腸菌の耐塩性を強化する機能を有することが明らかになった。これらの cDNA を導入した大腸菌の NaCl 及びソルビトール耐性を比較したところ、特にマングローブ eEF1A においてその機能が明らかに高いことが確認された。また、酵母を宿主として用いた実験においてもマングローブ eEF1A に高い耐塩性強化機能が見出された。本研究ではこれらの形質転換体のキャラクタリゼーションを行うことで eEF1A の有する耐塩性強化機能の解明を目指した。

1pL02

大腸菌を用いたシチメンソウの耐塩性に関する cDNA のクローニング

山田晃世¹, Groria Nozawa¹, 谷本静史², 小関良宏¹ (¹農工大・工, ²佐賀大・農)

当研究室では、大腸菌を用いた機能スクリーニング法によりマングローブ植物の耐塩性に関する遺伝子 (cDNA) の探索を進めてきた。本研究では新たに有明海の海岸に生息するアカザ科の塩性植物の一種であるシチメンソウに着目した。スクリーニングの結果、全長 1778 bp、ホウレンソウのホスホエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼ (PEAMT) とアミノ酸レベルで 85% の相同性を有するタンパク質をコードしていると考えられる cDNA が得られた。この cDNA を導入した大腸菌形質転換体はベクターのみを導入したコントロールと比べ明らかに高い NaCl 耐性、ソルビトール耐性を有することが明らかになった。一般に PEAMT はシチメンソウが有する浸透圧調節物質の 1 つであるグリシンベタインの前駆体であるコリンの合成系に関与していることが知られていることから、シチメンソウ PEAMT の発現は大腸菌においてグリシンベタインの合成系になんらかの影響を与えているものと考えられた。シチメンソウの懸濁培養細胞を用いたノーザンブロット解析の結果、PEAMT mRNA 量は NaCl, ソルビトール, アブシジン酸の添加により急激に増大することが確認された。これらの結果から PEAMT はシチメンソウの耐塩性を決定する重要なキエンザイムの 1 つであると考えられた。更に、本研究では PEAMT をタバコ培養細胞 (BY2) に導入し、得られた形質転換体の耐塩性を評価した結果を報告する。

1pL03

塩生植物 *Atriplex nummularia* の高塩時転写遺伝子のクローニングとその特徴

多淵知樹¹, 東哲司¹, 南森隆司¹, 安田武司¹ (¹神戸大院・自然科学)

アカザ科の塩生植物 *Atriplex nummularia* を材料に用い、耐塩能力に関わる遺伝子のクローニングを行った。バーミキュライトを用いて育成し、生長がほとんど阻害されない塩処理区 (NaCl 500mM) の個体の葉より cDNA ライブラリーを作成した。同塩処理区とコントロール区の葉から RNA を抽出し、そのライブラリーからデフェレンシャルハイブリダイゼーションにより塩ストレス下で mRNA 発現量が増加する 7 つのクローンを得た。このうちの 3 つは耐塩性に強く関わると思われる choline monoxygenase, S-adenosylmethionine synthetase, lipid transfer protein と非常に高い相同性があった。また別の 2 つはこれまでに報告されているタンパク質と高い相同性があるが、それらのタンパク質は機能が未知である。残りの 3 つは相同性のあるタンパク質すら報告されていない。これらの遺伝子の mRNA とタンパク質の各種ストレスやホルモンに対する応答性の解析を行っている。

1pL04

オオムギの根における塩ストレス誘導性遺伝子群の同定と機能解析

上田晃弘¹, 施衛明², 山本祐子², 高倍鉄子² (¹名大・生物分子応答研究センター, ²名大院・生命農学)

塩ストレスは浸透圧ストレスと塩分の蓄積により植物の生産性に影響を及ぼす。根は塩ストレスを最初に感知する器官であるために、根における塩への適応を理解することは重要である。我々は塩ストレスにより発現が誘導される遺伝子を同定するために、塩ストレス処理を行ったオオムギの根を用いてディファレンシャルディスプレイを行った。その結果、全220遺伝子断片を得ることができた。ノーザン解析を行った遺伝子のうち86%は葉ではなく根において塩誘導性遺伝子であることが示された。このことは塩への応答・適応が根と葉で異なることを示唆している。またPIP5 kinaseやproline transporter, trehalose-6-phosphate synthase, aldehyde oxidase, oxalate oxidase, proline rich protein等は塩ストレスにより強く誘導されていた。そのうちproline transporter (HvProT)はプロリン特異的トランスポーターであり、その発現は根冠で強いことが示された (Ueda et al., 2001)。さらに我々は新たな塩誘導性遺伝子としてAMSH, splicing factor, apoptosis protein, EPS15等を得ることができた。得られた遺伝子の機能解析は現在進行中である。

1pL05

低リン酸耐性ニンジン培養細胞のクエン酸輸送特性
大野隆史¹, 小山博之¹, 原徹夫¹ (¹岐阜大・農)

酸性土壌におけるAl毒性及び低リン酸に対する有効的な対策のひとつとして、土壌への有機酸の放出が注目されている。我々が選抜した低リン酸耐性ニンジン培養細胞 (LPT細胞) は、クエン酸を多量に合成、放出することによりリン酸Al培地中でも良好に生育することができる。我々は、その放出が短時間で急速に起こることを突きとめ、これは代謝以外に細胞膜における輸送システムが有意に関与していると推測した。そこで本研究では、細胞膜上における放出面の特性的について詳細な解明を行った。

LPT細胞のクエン酸放出はアニオンチャンネルブロッカーのひとつであるniflumic acidにより強く阻害され、また細胞膜上のH⁺-ATPaseを阻害するバナジン酸によっても減少した。つまり、LPT細胞のクエン酸放出はアニオンチャンネルを介しており、アニオン放出時の随伴イオンとしてH⁺が放出されていることが示唆された。実際、定量的なH⁺の放出がLPT細胞でのみ認められ、またP-type H⁺-ATPaseの活性、タンパク量及び転写量もLPT細胞で野生型より増加していた。

1pL06

異なる植物種における有機酸代謝のリン酸欠乏応答
木原智仁¹, 小山博之¹, 原徹夫¹ (¹岐阜大・農)

不良土壌における植物の生育阻害要因の1つは間接的に起こるリン酸欠乏である。その回避機構として根からの有機酸放出が注目されており、有機酸放出能力強化による不良土壌耐性作物の作出が望まれている。我々が選抜したクエン酸放出能力が極めて高いニンジン細胞は、クエン酸を余剰に生産するのに有利な酵素活性変動を起こしていた。また組換え体を用いた研究から、有機酸放出にはその代謝が大きく貢献していることが明らかになってきている。これらのことから、有機酸代謝を操作することにより高有機酸放出能を付与できると思われる。しかし様々な植物種にこれを適用するためには、個々の植物の有機酸代謝について理解しておくことが重要である。そこで、ルービン、イネ、コムギ、シロイヌナズナにおける有機酸代謝のリン酸欠乏応答を調べた。イネ及びコムギの根においてリンゴ酸含量が減少した。それ以外の植物種ではリン酸欠乏によりリンゴ酸とクエン酸の含量が増加した。しかし、リンゴ酸含量に対するクエン酸含量の比を比較したところ、シロイヌナズナの根においては比が減少したがイネの根及びルービンのプロテオイド根では増加した。コムギの根及びルービンプロテオイド根においてリン酸欠乏による顕著な酵素活性変動が認められ、NADP-ICDH活性の低下が両者に共通していた。

1pL07

クラミドモナスのヒ酸耐性株AR3ではリン酸トランスポーター遺伝子ホモログが欠損している

小林功¹, 藤原祥子¹, 貝瀬利一¹, 白田秀明², 都筑幹夫¹, 下河原浩介² (¹東京薬科大学・生命科学, ²帝京大・医)

クラミドモナスヒ酸耐性株AR3は、遺伝子タギング法により作製された劣性変異株で、この株では、リン酸とヒ酸の取り込みが野生型と異なり、野生株に比べ10倍以上ヒ酸に対する耐性が高まっている。今回、遺伝子タグを手がかりに、このヒ酸耐性株AR3の変異の原因遺伝子のクローニングに成功した。野生株のゲノムライブラリより得られた12.9kbpのフラグメントは、この変異株の変異形質を完全に相補した。cDNAライブラリより得られたこの遺伝子に対応するcDNAクローンは全長約6kbpであり、1666のアミノ酸残基よりなる、分子量172kDaのポリペプチドをコードしていた。相同性検索の結果、このポリペプチドは、酵母のNa⁺/Pi co-transporter Pho89pと有意の相同性を示すが、中央部分にグルタミンとグリシンに富む大きな挿入領域があることがわかった (*PTB1*と命名)。クラミドモナスからは、この遺伝子のホモログとして、中央部分の挿入領域を持たない遺伝子 (*PTB2*) もクローニングされた (前演者)。これら2つの遺伝子および以前に我々がクローニングしたタイプA遺伝子 (*PTA1*, *PTA2*, *PTA3*) の遺伝子発現調節とヒ酸耐性耐性との関係について論ずる。