1pL08

クラミドモナスのリン酸トランスポーターファミリーのクローニング及びその転写調節 下河原浩介¹,小林功²(¹帝京大・医,²東京薬科大・ 生命科学)

植物のリン酸トランスポーターの遺伝子は、酵母の H'/Pi co-transporter *PHO84*のホモログと、Na'/Pi co-transporter *PHO89*のホモログの2タイプ (以下それぞれタイプ AおよびBと呼ぶ) がクローニングされており、タイプA が高親和型、タイプBが低親和型のトランスポーターを コードしていると考えられている。我々は、先に単細胞 緑藻クラミドモナスよりタイプAのホモログを3種類 (PTA1, PTA2, PTA3) クローニングし、これらの転写調節を検討した結果、クラミドモナスにおいては、リン酸 欠乏で誘導される高親和型リン酸トランスポーターを コードしている遺伝子は、これらのタイプA遺伝子には 含まれないことを指摘した (2001年植物学会)。今回新 たに、タイプBのホモログ2種類 (PTB1, PTB2) のクロー ニングに成功した。PTB1は、クラミドモナスのヒ酸耐性変異株の原因遺伝子としてクローニングされ(次演者) PTB2は、PTB1のホモログとしてクローニングされた。 両遺伝子のリン酸欠乏での転写調節を調べた結果、PTB1 の転写量はPTB2と比較して遙かに少ないこと、また PTB2の転写量は-P処理で強く誘導されることが判明し た。以上の結果から、クラミドモナスにおいては、PTB2 がリン酸欠乏時に誘導のかかる高親和型リン酸トランス ポーターをコードしていると推測された。

1pL09

ルーピンのクラスター根における酸性フォスファ ターゼ遺伝子の発現能

<u>山村卓也</u>¹,和崎淳¹,信濃卓郎¹,大崎満¹(¹北大院·農)

植物はリン欠乏条件下で根から酸性ホスファターゼ (APase) を分泌することにより有機態リンを分解し、吸収利用する。根から多量のAPaseを分泌することで知られるルーピンは、リン欠乏条件下においてクラスター根と呼ばれる密集した側根を形成する。本研究ではルーピン根に形成されたクラスター根におけるAPase分泌能を分析した。

水耕培養(+P、-P条件)により生育させたルーピン根に局在するAPase活性を、活性染色法によりクラスター根を中心に分析した。また、ルーピン根におけるLASAP2(APaseの遺伝子)のmRNA発現量をノーザンブロット解析法により調べた。

活性染色では、-P条件で生育させたルーピン根のまわりで全体的に強く染色されたが、その中で特にクラスター根の付近が濃く染色された。またノーザンブロット解析では、-P条件でのクラスター根においてLASAP2のmRNAが最も強く発現したことが示された。これらの結果から、APaseは-P条件で生育させたルーピン根、その中では特にクラスター根から多量に分泌していることが明らかとなった。

1pL10

C3型PEPC遺伝子のリン酸欠乏による発現誘導の分子 機構の解析

豊田健太郎¹,佐藤文彦^{1,2}(¹京大院・農・応用生命, ²京大院・生命・統合)

C3植物のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(Phosphoenolpyruvate carboxylase、以下PEPC)のリン酸欠乏に対する生理的役割に注目し、その発現制御機存所している。これまでにタバコ(N.tabacum)の生えを用い、PEPCの酵素活性ならびにタンパク質量がリン酸欠乏とショ糖の添加によって数倍に増加すること、この酵素活性が転写レベルであることを用いてあるN.sylvestrisのゲノム遺伝子を用いてもた。すなわち、3種のPEPC遺伝プロの祖先種であるN.sylvestrisのゲノム遺伝子を用いてしてきた。すなわち、3種のPEPC遺伝プロの担先種であるN.sylvestrisのゲノム遺伝子を開いてもなり、は、一個のアと関係であるとしているNsppc1のリン酸欠乏による誘導がであることによって、Nsppc1のリン酸欠乏による誘導がであることによって、Nsppc1のリン酸欠乏にはる誘導がであることによって、Nsppc1のリン酸欠乏にはる誘導がであることによって、Nsppc1のリン酸欠乏には多いがで起こること、また、ショ間は、プロモーターの欠失変異及びgain-of-function実験により、翻訳開始らの大失変異及びgain-of-function実験により、翻訳開始らの大失変異及びgain-of-function実験により、翻訳開始らの欠失変異及びgain-of-function実験により、翻訳開始らの大大の手であると、さらに、この領域をプローブに降力ののタバコにDNAラーブラリーからAT-hookモチーフを持つクローンを単離した結果を報告する。

1pL11

乾燥により誘導される野生スイカの新規タンパク質 DRIP-1の機能

明石欣也¹, 高原健太郎¹, 山田理香¹, 三宅親弘¹, 横 田明穂¹(¹奈良先端大・バイオ)

乾燥耐性の野生スイカはストレスに応答して、アルギニン生合成経路の中間体であるシトルリンを葉内に高蓄 積する1)。シトルリンは活性酸素ヒドロキシルラジカル の消去機能に極めて優れていることが既に判明している 2)。乾燥ストレス下のタンパク質の挙動を二次元電気泳 動により解析したところ、シトルリンおよびアルギニン 生合成の第五段階を触媒する大腸菌の acetylornithine deacetylase (AOD)と20%の配列相同性を有する新規タン パク質DRIP-1が、ストレスに伴い誘導されることが明ら かとなった¹⁾。その機能を同定するために、大腸菌のア ルギニン生合成系酵素変異株を用いて相補性検定を行っ た。その結果、DRIP-1のcDNAが、上述のAODを欠損す るargE-株に加えて、アルギニン生合成の第1段階を触媒 するN-acetylglutamate synthaseの欠損株argA をも相補することが明らかとなった。このことからDRIP-1タンパク 質は、アルギニン生合成の両段階を触媒し得るglutamate acetyltransferase活性を有し、シトルリン蓄積に関与することが示唆された。現在、野生スイカからDRIP-1タンパク質を精製し触媒反応の解析を行っており、それらの結 果と合わせて報告する。

- (1) Kawasaki et al., (2000) Plant Cell Physiol., 41, 864
- (2) Akashi et al., (2001) FEBS Lett., 508, 438

1pL12

耐乾性ラン藻Nostoc communeの単離と生理学的特徴 加藤浩^{1,2}, 滋賀陽子¹, 大森正之¹(¹東大・院・総合文 化、²生研機構)

ラン藻には窒素固定、乾燥耐性をもつユニークな種が 存在する。耐乾性ラン藻 Nostoc commune は自然界からの 単離、純粋培養は困難とされてきた。我々は、乾燥に関 わる遺伝子の解析を進めるために、自然界に存在する N. commune の単離を試みた。日本国内の兵庫県から採取し、乾燥した N. commune を水で戻したのち、好熱性ラ ン藻の培養に用いられるDTN培地を希釈した寒天培地で 培養した。約1ヶ月後に増殖した N. commune を継代培養するため、培地の濃度を変えて比較したところ、希釈し たDTN寒天培地 (1/4-1/20 DTN) での増殖は希釈しな かった寒天培地よりもおよそ2-3倍早かった。希釈しな かった培地では細胞間に細胞外多糖が分泌されていた。 雑菌の増殖を抑制するために薬剤(カナマイシン)を用 い、最終的に無菌化に成功した。無菌化した N. commune は暗下でホルモゴニアと呼ばれる運動細胞へと形態変化 した。またアキネートと呼ばれる胞子細胞の存在を示唆 する結果も得られた。現在、液体培養を行っており、こ の株についての詳細な生理学的解析を進めている。

1pL13

乾燥耐性ラン色細菌Nostoc commune の乾燥過程での 光合成系の変化

平井学¹, 西尾純子¹, 山路隆晴¹, 菓子野康浩¹, 小池 裕幸¹, 佐藤和彦¹ (¹姫路工大·理)

我々は前の学会において、イシクラゲNostoc communeにおける乾燥後の吸水過程での光合成活性の回復過程について報告した。光化学系?の活性がいち早く回復し、光化学系?の活性回復は光合成全体の活性回復とほぼ一致していた。また、吸水させる水の量をコントロールすることで、吸水過程での光合成系の一過性の変化を長時間固定して観察できることも示した。本学会では、イシクラゲのコロニーが乾燥していく過れている。

本学会では、イシクラゲのコロニーが乾燥していく過程での光合成諸活性の変化と乾燥に伴う重量変化との関係について報告する。併せて、ソルビトールを用い、細胞を浸している溶液の浸透圧を変化させることによるコ合成諸活性の変化を報告する。乾燥過程におけるコニーからの水分の蒸発は指数関数的に起こり、活性の変化は吸水過程とほは逆の順序で起、った。ソルビトールと明いた実験からは、乾燥とは、水過程で見られる制度の過渡から対してできることが、予想以上に低いソルビトール濃度で光化学系?活性の阻害が認められた。

乾燥耐性がないラン色細菌との比較についても報告する。

1pL14

乾燥誘導性 NAC 遺伝子 RD26 の機能解析 <u>藤田美紀</u>¹,藤田泰成²,楠城時彦^{3,4},関原明^{1,4},篠崎和子²,篠崎一雄^{1,4}(¹理研・ゲノム総研セ・植物ゲノム,²国際農研・生物資源,³株式会社コンポン研究 所,⁴理研・植物分子)

我々は、植物の乾燥ストレス応答機構を解明することを目的として、ディファレンシャルスクリーニングなどにより、多くの乾燥誘導性遺伝子を単離してきたが、未だ機能のわかっていないものが多い。本研究では、これら乾燥応答性遺伝子の1つである RD26 に注目して研究を行っている。RD26 は、NAC box と呼ばれる高度に保存された領域を有しており、茎頂分裂組織の形成に関与するCUC 遺伝子や、側根の形成に関与する NAC1 遺伝子と高い相同性を示すことから、形態形成に関わる転写制御因子として機能する可能性が考えられる。

Northern およびマイクロアレイ解析の結果、rd26遺伝子は、乾燥だけでなく、高塩濃度および ABA 処理によっても強く発現を誘導されるが、低温によっては誘導されないことが明らかとなった。次に、GAL4 DNA 結合ドメインと RD26 との融合タンパク質を酵母で発現させ、その転写活性化能を調べた。その結果、RD26は、NAC domain を含まないC末側の領域に転写活性化能をもつ転写因子であることが示唆された。さらに、RD26の過剰発現植物を作製し、表現型を解析すると共に、マイクロアレイ解析を行い、RD26によって発現を制御される下流遺伝子の探索を行った。これらの結果から、乾燥ストレスによる遺伝子発現における RD26の機能について議論する。

1pL15

環境ストレス下のシロイヌナズナにおけるポリアミン合成関連遺伝子の発現解析

浦野薫1.2, 吉羽洋周3, 楠城時彦1.4, 篠崎和子5, 篠崎一雄1 (1理研・植物分子, ²筑波大・生物科学, ³日立・中研・ライフサイエンス, ⁴株式会社コンポン研究所, ⁵国際農研)

ポリアミンは微生物から動植物に至るまで広く生体内に存在する生理活性物質である。ポリアミンは古くから、様々な細胞内のプロセスに関与していると考えられてきたが、我々は環境ストレス応答におけるポリアミンの機能について解析を行っている。

植物中に存在する主なポリアミンはプトレスシン、スペルミジン、スペルミンの3種である。プトレスシン合成系の律速酵素はarginine decarboxylase (ADC)、スペルミジン、スペルミン合成系の律速酵素はS-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)である。シロイヌナズナにはそれぞれ2つのADCとSAMDCをコードする遺伝子が存在する。ポリアミン合成関連遺伝子の環境ストレス下での発現所を行ったところ、ADC2が高塩、乾燥により、SAMDC2が低温、乾燥により発現が誘導されることがわかった。また各種ポリアミンもストレスに応答してその量を増加することがわかった。

1pL16

熱帯早成樹ユーカリにおけるストレス応答遺伝子群 の解析並びにアラビドプシス由来ストレス耐性付与 遺伝子(rd29A-DREB1A)のユーカリへの導入効果に ついて

 $\underline{\underline{U}}$ 藤啓子¹,越山淳子¹,土肥敬悟¹,石毛奈緒子¹,助野真一¹,日尾野隆¹,春日美江²,篠崎一雄³,篠崎和子²(¹王子製紙·森林資源研,²農水省·国際農研生 物資源, 3理研·植物分子生物)

塩害、乾燥害、冷害といった環境ストレスは植物の生育を

塩害、乾燥害、冷害といった環境ストレスは植物の生育を妨げる主要因の1つである。これらを解決することは、差し迫る食糧問題の解決を始め、地球環境の改善へ向けて多大なる効果をも与を目的とめて研究を進めている。既に本研究グループにおける篠崎らの研究によったらもでのストレス耐性機構が明らかにされたも可能による値物へのストレス耐性機構が明らかにされたも可能のストレス耐性機構が明らかにされたも可能のストレス耐性機構が明らかにされたも可能のストレス耐性機構が明らかにされた。一方、これに登しているとによる植物への大りとの制御因大きた。特にストレス応答遺伝子の探索・解している。また、既に確立している。また、既に確立している。また、既に確立している。また、既に確立して、ストレス耐性付与が認められた。アラビドプシスにおいてストレス耐性付与が認められた。アラビドプシスにおいてストレス耐性付与が認められた遺伝子(rd29A-DREBIA)をユーカリに導入した。 遺伝子 (rd29A-DREBIA) をユーカリに導入した。 本発表では、以下について報告する。

本元表とは、以下について報言する。 1)樹木におけるストレス耐性応答遺伝子群の解析 既知遺伝子並びに新規遺伝子の探索状況と発現解析 2)ストレス耐性付与遺伝子を導入したユーカリの評価 アラビドプシス由来遺伝子の効果について ** 本研究は世帯機構、本事業創出研究開発事業からの

本研究は生研機構、新事業創出研究開発事業からの支 援を受けて行っている。

1pO01

Overexpression of peroxisomal ascorbate peroxidase gene confers the thermotolerance of Arabidopsis thaliana at both the vegetative stage and reproductive stage

W.M. Shi^{1,2}, A Takamatsu¹, A Ueda³, K. Suzuki⁴, M. Shono⁴, Y. Egawa⁴, T. Takabe¹ (¹Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University, Nagoya 464-8601, ²Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, Tokyo 105-0001, 3Bioscience center, Nagoya University, Nagoya 464-8601, ⁴JIRCAS, Ishigaki, 907-0002)

Barley HvAPX1 encoding peroxisomal type APX was introduced into Arabidopsis thaliana. Higher HvAPX1 transcript level was detected in leaves and flowers/buds of transgenic lines of APX3 and APX5. The total APX activity in leaves and flowers/buds of transgenic lines was around 20%-60% higher than that of WT, while CAT activity was not obviously changed. Under high temperature, total APX activity was observed in transgenic plants than that of WT. But CAT activity was decreased and no difference between WT and transgenic plants. Our results showed that oxerepressing HvAPX1 enhanced Arabidopsis tolerance to heat stress at both the vegetative growth stage and reproductive growth stage.

This research was supported by a grant in aid of PRO-BRAIN.

1pO02

耐塩性ラン藻(A. halophytica) DnaK遺伝子導入植物の 高温ストレス耐性

日比野隆1,新真由美2,田中義人1,島田多喜子3,鈴 木茂敏², 高倍鉄子³, 庄野真理子⁴, 高倍昭洋⁵ (¹名城大·理工·化学, ²名城大·農·生物資源, ³名古屋大 院·生命農·生物資源, 4国際農林·沖縄, 5名城大·

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と報告されている。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、ベタイン 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、ベタイン、温度の効果等 について検討した。

1pO03

葉緑体型グルタミン合成酵素(GS2)を過剰発現させた イネの高温・高塩ストレス防御における光呼吸の役割 田中義人1, 陳能場2, 日比野隆1, 林泰行3, 早川孝 彦3, 高倍昭洋2(1名城大·理工·化学,2名城大·総 合研, 3植物工学研究所)

グルタミン合成酵素(GS)は、Glu、ATP、アンモニアからGlnを合成する反応を触媒する窒素代謝のキー酵素 である。葉緑体型のGS2は、光呼吸にも関与し、塩ストレス等による気孔の閉鎖に伴うCO2取り込み阻害時に重 要な役割を果たすと考えられる。実際、イネのGS2遺伝子をイネに導入した形質転換体を作り、塩ストレス耐性 について検討したところ、GS2の発現量の増加は僅か (約1.5倍)ではあるが、塩ストレスの耐性が増加するこ とが明らかになった(Plant Mol. Biol., 43, 103-111 (2000))。今回、同じ形質転換体を用いて、高温・高塩ストレス下における CO_2 固定、光呼吸、活性酸素発生の関係を明らかにすることを試みた。Rubiscoのカルボキシ レーションおよびオキシゲネーションの反応速度は、net な CO_2 取り込み速度、細胞内 CO_2 濃度、ミトコンドリアの呼吸を差し引いた CO_2 補償点から見積もった。 CO_2 固 定反応および光呼吸反応速度は、高温ストレスにより低 下するが、形質転換体の方がその減少は抑制された。活 性酸素生成速度は高温ストレスにより増加したが、形質 転換体はその増加が抑制された。塩ストレスを与えた結 果についても報告する。

ラン藻の高温耐性に関与するプラスミドpAQ1の解析 木村愛子¹,森田勇人²,藤博幸³,西山佳孝¹,林秀則¹ (「愛媛大院・理工,²愛媛大・遺伝子実験施設,³生物 分子工学研究所)

ラン藻Synechococcus sp. PCC 7002から insertional mutagenesis法を用いて高温感受性株(SHT1株)を単離した。この変異株では内在性のプラスミドpAQ1に変異が起きていた。pAQ1上にある4つのORFの1つであるORF93 が新たに1つ挿入されて重複しており、ORF93 のmRNA量が野生株と比較して増加していた。このSHT1株の高高感受性は、PSIIの熱安定性や熱ショックタンパク質の誘導とは直接関係していないと考えられる。ORF93 はホモロジー検索では、相同性の高いタンパク質が見つからなかったが、アミノ酸配列からはN末端、C末端領域にそれぞれ塩基性領域、酸性領域を有し、 α -へリックス構造をもつことが推測された。この構造から、ORF93が転写因子あるいはシグナル伝達因子として、高温耐性に関ラオーの発現を抑制している可能性が考えられる。

1pO05

常温性ラン色細菌*Synechocystis* sp PCC.6803の高温順 化

平良佳子¹, 星名哲², 菓子野康浩¹, 小池裕幸¹, 佐藤和彦¹(¹姫工大·理·生命, ²金沢大·理·生物)

25℃及び35℃で培養したSynechocystis sp. PCC6803細胞の高温に対する耐性を比較すると、酸素発生活性では、高温処理後処理温度で測定した場合は高温耐性の培養温度による差は小さいが、処理後生育温度に戻して測定した場合には明瞭な差が認められた。一方、光化学系II(PSII)反応中心の活性では、高温処理後その温度で測定した場合に35℃で培養した細胞において高温耐性の増加が見られた。つまり、酸素発生もに高温に順性のの活性は、うことがわかった。そこで、本研究は培養と過度によいうことがわかった。そこで、本研究は培養と温度の対する膜の流動性の変化、タンパク応中心ある合成などの影響を明らかにする目的でPSII反応中心複合体の単離過程における耐熱性の変化を調べた。

まず、CP47 に His-tagをつけた Synechocystis sp. PCC6803 細胞を25℃と35℃でそれぞれ培養し、チラコイド膜を単離し、その酸素発生活性とPSII反応中心の活性を測定し、高温に対する耐性を比較した。次いで、酸素発生活性のあるPSII反応中心複合体を単離精製し、同様の測定を行い、高温に対する耐性を比較した。チラコイド膜標品では両反応とも高温順化が見られたが、PSII反応中心複合体では見られなかった。この相違がもたらされた原因について考察する。

1pO06

Regulation of heat shock gene transcription in cyanobacteria

<u>仲本準¹</u>, Michiru Suzuki¹, Kouji Kojima¹ (¹埼玉大・理・ 分子生物)

The regulation of the expression of cyanobacterial heat shock genes remains poorly understood. The only suggested potential regulatory element of heat shock induction in cyanobacteria is the inverted repeat sequence called CIRCE, which is present upstream of groEL genes. CIRCE is thought to be an operator with which the HrcA repressor protein interacts. We inactivated the hrcA gene in Synechocystis sp. PCC 6803 by targeted mutagenesis and found that the mutant substantially increseased expression of groEL at 30°C. However, the expression was not fully derepressed by the mutation.

We previously proposed that a novel regulatory mechanism suppresses the expression of *hspA* in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* under non-heat-shock conditions. We performed gel-retardation assays with cell extracts from *S. elongatus* which was grown at 50°C. We detected a protein(s) which specifically binds to a novel inverted-repeat located between the transcription start site and the initiation codon of the *hspA* gene.

1pO07

Constitutive expression of small heat-shock protein confers thermal stability on the thylakoid membrane structure in cyanobacteria.

<u>鈴木伸章¹</u>,新田浩二²,金子康子²,仲本準¹(¹埼玉 大·理·分子生物,²埼玉大·理·生体制御)

Previously, we reported that constitutive expression of HspA, a small heat-shock protein (Hsp) from S. vulcanus increased thermal resistance of photosystem II and protected phycocyanin from heat-induced photobleaching in Synechococcus sp. PCC 7942. In the present study, the HspA expressing and reference strains after exposure at 50°C were examined by transmission electron microscopy. Significant differences were observed in cell ultrastructure between these strains. While the integrity of thylakoid membranes was disrupted in heatshocked reference cells, concentric layers of thylakoid membranes at the periphery of cells were still observed in the HspA expressing cells. The association of HspA with thylakoids may serve as a membrane protection mechanism. Experiments such as immunogold localization of HspA using transmission electron microscopy are in progress. In order to elucidate the mechanism for the thermal protection of phycocyanin by small Hsp, we are analyzing the interaction of small Hsp with the isolated phycobilisomes.

Redox-regulated heat-shock gene expression in *Syne-chocystis* sp. PCC 6803

鈴木由起子¹, 仲本準¹(¹埼玉大·理·分子生物)

Recently, it was shown that heat shock strongly enhanced accumulation of transcripts of the *groEL* and *cpn60* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the light, but induction was lower in the dark. DCMU suppressed accumulation of the transcripts in the light. These results suggest that cyanobacteria may have evolved a unique regulatory mechanism to induce heat shock genes.

We examined whether heat-shock induction of a gene other than *groELs* is also affected by light. The light-responsive pattern of heat-shock induction of the *htpG* gene was similar to those of the *groEL* and *cpn60* genes. DCMU and DBMIB differentially affected transcript accumulation of these genes, suggesting that the redox poise of the plastoquinone pool is critical for the gene expression. However, expression of the small Hsp gene was not affected by these treatments, suggesting that not all of the heat shock genes are redox-resposive.

1pO09

好冷性細菌からの熱ショックタンパク質遺伝子dnaK のクローニングとその発現調節機構の解析 山内清司¹, 奥山英登志², 森田勇人³, 林秀則¹(「愛媛 大院・理工,²北大・地球環境,³愛媛大・遺伝子実験 施設)

好冷性細菌 Colwellia maris sp. nov. は5-15 $^{\circ}$ の低温環境で生育している。前回の本大会で我々は $^{\circ}$ C. marisの $^{\circ}$ groEL遺伝子の塩基配列を解析し、約20 $^{\circ}$ CでGroELの発現が誘導されることを報告した。好冷性生物の熱ショックタンパク質の機能や発現機構を明らかにする目的で、今回さらに $^{\circ}$ C. marisから $^{\circ}$ dna $^{\circ}$ K遺伝子を単離して、塩基配列および発現調節機構の解析を行った。

フーザン分析の結果 dnaK 遺伝子は、groESL オペロンと同様に約20℃で発現が誘導されること、またオペロンは構成せず、dnaK 遺伝子単独で発現することを確認列た。C. marisのdnaK 遺伝子単独で発現することを確配列は、大腸菌のDnaKと約80%の相同性を持っていた。また上流にはgroESL 遺伝子と同様、熱ショックプロモーターが確認され、非翻訳領域に相当すると推測される部分のA,T含量値も非常に高かった。このため、C. marisによる熱ショックタンパク質調節機構が存在としびすることが示唆され、 σ^{32} 発現調節の温度依存性およックタンパク質の特異的な発現に関与していると推測される。

1pO10

ラン藻の熱ショック遺伝子のプロモーター領域に結 合するタンパク質の機能解析

奥田賢治¹, 森田勇人², 佐々木博¹, 西山佳孝¹, 林秀 則¹ (¹愛媛大院·理工, ²愛媛大·遺伝子実験施設)

熱ショックタンパク質の発現制御機構を明らかにするため、ラン藻Synechococcus sp. PCC 7002の熱ショックタンパク質であるgroESL遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合するDNA結合タンパク質を単離し、その遺伝子をクローニングした。この新規タンパク質Shl-1を大腸菌で大量発現させて精製し、groESL遺伝子のプロモーター領域に結合することをgel retardation assayにより確認した。

ホモロジー検索の結果、Shl-1 は既知の転写因子とは相同性がなかったが、Streptomyces coelicolorのputative DNA hydrolaseと低い相同性を示した。また、ヌクレオシドニリン酸化合物を加水分解する酵素に特徴的な配列Nudix motifが存在し、さらにC末端側にはADP-riboseとの結合に特徴的な配列が見られた。大量発現によって調製したShl-1にはADP-riboseの加水分解活性が見られたので、Shl-1はNudix hydrolaseとして機能することが示唆された。

1pO11

イネにおける熱ショック応答遺伝子のクローニング 斉藤美佳子¹, 奥山秀二¹, 盛山優子¹, 橋本研志¹, 松 岡英明¹ (¹東京農工大・工・生命工)

演者らは、イネ培養細胞(Oryza sativa L. japonica cv. Nipponbare)におけるストレス応答遺伝子の発現制御に関する研究を行っている。本研究では、ストレス応答遺伝子として多くの種類の細胞で知られている熱ショック応答遺伝子(HSP)に着目し、Nipponbare株としては初めてHSPの発現を確認したので報告する。

他のイネ科のHSPの配列をもとに101mer、109merのプローブを設計し、ノーザンハイブリダイゼーションによりイネ培養細胞におけるHSPの発現パターンを解析した。その結果、どちらのプローブを用いた場合でも、通常の培養温度である25℃よりも高い30℃、35℃、40℃、45℃、50℃でそれぞれ2時間培養したところ、温度上昇に伴い発現量が増加し、40℃で最大となりそれ以上高い温度では発現量が低下していくことが確認された。と培養開始5分後から発現し始め、1時間後から12時間後の間で発現量が最大となった。さらに、この2つのた、1時間で発現量が最大となった。さらに、この2つのを独立行政法人農業生物資源研究所より入手し、ゲノライブラリーよりHSPのスクリーニングを試みた。

季節的低温馴化過程でクワ皮層柔細胞に蓄積するER 局在性低分子量熱ショックタンパク質のin vitroにおけ る機能解析

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

季節的低温馴化過程ではクワ(Morus bonbycis Koidz.)のERに20kDの分子サイズを有する低分子量熱ショックタンパク質、WAP20、が蓄積する(Ukaji et al., 1999)。冬季のクワ皮層柔細胞に蓄積するWAP20の役割を推定するために、単離したcDNAを用いて組み換えWAP20タンパク質(rWAP20)を大腸菌発現系を用いてした。rWAP20タンパク質は目れるではいるで作製した。in vitro における分子シャペロン活性を削影細胞に形で作製した。精製したrWAP20タンパク質はERへの移行シグナルを層柔細いて形で作製した。精製したrWAP20は、クワ皮を削柔細胞由来のWAP20同様に、非変性条件下での電気泳動にいて約300kDの高分子サイズを示した。このrWAP20タンパク質は、6Mグアニジン塩酸により変性したクエン酸合成酵素(CS)および乳酸脱水素酵素(LDH)の活性回復を促進する分子シャペロン活性を有していることが明らを促進する分子シャペロン活性を有していることが明らかとなった。またrWAP20タンパク質は、他の低分子量熱の活性回復を促進した。さらにrWAP20タンパク質は、こ0℃の凍結処理により変性したLDHの活性を回復することが明らかとなった。

1pO13

根における呼吸の温度馴化機構の解析 栗本耕平¹, David A. Day,², Hans Lambers,³, 野口航^{1,2}, 寺島一郎¹ (¹大阪大院・理, ²Department of Biochemistry, University of Western Australia, ³Department of Plant Sciences, University of Western Australia)

呼吸速度は測定温度に依存し、低温では低い値を示す。一方、異なる温度で栽培しても栽培温度で測定すると同じ呼吸速度を示す(=恒常性を持つ)植物が存在する。しかしこの恒常性を引き起こす要因は明らかではない。本研究の目的は恒常性の原因となる生理機構を明らかにすることである。

る。しかしこの恒常性を引き起こす要因は明らかではない。本研究の目的は恒常性の原因となる生理機構を明らかにすることである。 恒常性を示すコムギ2品種(Stiletto、Patterson)、示さないコムギ1品種(Brookton)、イネ1品種(Amaroo)を選抜し、これらの根を用いた。これらを15℃と25℃で栽培し、乾燥重量あたりのチトクロム経路、シアン耐性経路の最大活性の温度依存性を調べた。

1pO14

時間軸依存型体温振動システムによるザゼンソウの 肉穂花序における温度制御機構

伊藤菊一¹, <u>恩田義彦</u>¹, 上村松生¹ (¹岩手大・農・寒冷バイオ)

ザゼンソウ(Symplocarpus foetidus)は早春に花を咲か せるサトイモ科の発熱植物であり、その熱産生部位であ る肉穂花序は、氷点下を含む外気温の変動にも関わら ず、その体温を20℃内外の一定温度に維持する能力を持 つ。本研究においては、ザゼンソウの恒温性に関わる肉 穂花序の温度感知メカニズムを明らかにするため、種々 の環境温度変化における肉穂花序温度の応答を詳細に解 析した。その結果、ザゼンソウ群落地における肉穂花序 の温度変動には特徴的な振動現象が存在することが判明 した。肉穂花序の温度データをフーリエ変換により、よ り詳しく解析したところ、肉穂花序の温度は、およそ1 時間の周期で規則的に振動していることが明らかになっ た。興味深いことに、この周期的な肉穂花序温度の振動 現象は、気温変化に基づく肉穂花序自体の温度変化によ り引き起こされることが明らかになり、本植物の肉穂花 序における温度制御機構を、「時間軸依存型体温振動シ ステム」と命名することとした。また、時間軸依存型体 温振動システムが作動するために必要な肉穂花序の温度 変化に関わる閾値は少なく見積もっても0.5℃であるこ とが判明し、ザゼンソウの肉穂花序には高精度の温度セ ンサーが存在することが示唆された。本研究の一部は生 研機構、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業 により行われた。

1pO15

DNAマイクロアレイを用いたAnabaena sp. PCC 7120のrbp遺伝子破壊株の解析

得平茂樹^{1,2},大森正之²,佐藤直樹¹(¹埼玉大·理, ²東京大·院·総合文化)

Anabaena sp. PCC 7120には、RNA結合タンパク質をコードする遺伝子(rbp遺伝子)が8個ある。そのうち6個が低温誘導性であった。低温誘導性遺伝子の一つであるrbpA1の欠失変異株は、低温における増殖が遅く、rbpA1が低温への適応に必要であると考えられる。さらに、rbp遺伝子破壊株の解析を進めるために、DNAマイクロアレイによる解析を行った。

まず、Anabaena PCC 7120を用いて、培養温度の低下にともなう遺伝子発現量の変化を調べた。32℃から22℃へのシフトにより発現量が増加したものとしては、低温誘導性であることが知られているrbpAI、desA、B、crhC の他に、リボソームタンパク質、ABC-transporterや CO_2 の濃縮に働くccma どがあった。一方、フィコビリソームに関連した数多くの遺伝子の発現量が減少していた。次に、rbpAI 破壊株と親株との間で、遺伝子発現量の違いを調べた。rbpAI 破壊株で発現量が増加した ORFがあったが、機能未知であったが、機能未知であったが、機能未知であったが、機能未知であったが、で発現量に子の発現量は減少していた。これらの遺伝子の発現量の調節におけるrbpAIの役割についてさらに解析を進める予定である。また、その他のrbp遺伝子破壊株のマイクロアレイによる解析の結果も報告する。

RNA結合タンパク質RbpA1の部位特異的変異による機能部位の解析

村上昌吾¹,森田勇人²,林秀則³,佐藤直樹¹(¹埼玉 大·理,²愛媛大·遺伝子実験施設,³愛媛大·理)

Anabaena variabilis M3株のRbpA1タンパク質は、N末 端側にRNA recognition motif (RRM) とC末端側にグリシ ンリッチドメインをもつRNA結合タンパク質である。 RbpA1はpolyU(以下Uとする)に強く結合し、polyA(以 下Aとする), polyC(以下Cとする), polyG(以下Gとする) には同程度の親和性を示した。しかしRbpA1のRRMを含 む 82アミノ酸残基のタンパク質 (RRM82) はUのみに親 和性を示した。RRM84の変異タンパク質R83E, G84Dで はそれぞれUのみ、GとUに親和性を示した。RbpA1の全 長を含むY4SおよびF46V変異タンパク質では、AとCに 対する親和性がなくなった。この結果より、RRMドメインはUに対する親和性が強く、Arg⁸³はGに対する親和性に寄与していると示唆された。AbよびCの結合には少 なくともTyr⁴とPhe⁴⁶が寄与していることが分かった。 RRMは4本のストランドからなる逆平行の β シート構造と2つの α ヘリックスで構成されるが、CDスペクトル解 析の結果、Y4Sでは β シート構造が少なくなっていることが推定された。このことから点突然変異でも分子全体 の構造に影響を与えることがあり、分子全体の構造も RNAとの結合を考察する際には重要であることが示唆さ れた。

1pO17

シアノバクテリアAnabaena variabilis M3株のRNA結合 タンパク質RbpDの解析

濱野敬史 1 , 村上昌吾 1 , 得平茂樹 1,2 , 佐藤直樹 1 (1 埼玉大·理, 2 東大·院·総合文化)

Anabaenaの低温適応の研究から、RNA recognition motifを持つRNA結合タンパク質RbpA1、A2、A3、B、C、D、E、F、Gの存在が確認された。これらをコードする 遺伝子の大部分の発現は低温誘導性であるが、rbpDは恒 常性である事が分かっている。さらにRbpDはグリシン に富んだ領域をC末端側に持たないという特徴を持つ。 本研究はRbpDの機能解析とターゲットとなるRNAの同 定を目的とした。rbpDのコード領域をタグを持たない形 でpET-21bベクターに組込み、大腸菌BL21 (DE3) pLysSで発現させ、可溶性画分を硫安で塩析沈殿後、DNAセル ロースアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過を 行い、RbpDを精製した。SDS-PAGEでRbpDは、予測さ れた分子量10.8kDaより大きな位置に単一バンドとし て検出された。スピンカラムを用いたゲル濾過法により RNA ホモポリマーに対する親和性を調べたところ、RbpDはpoly(U)に対して強い結合を示した。抗RbpD抗体 を作製し、イムノブロット法でAnabaena M3株における RbpDを検出したところ、RbpDの蓄積量は温度シフトの 影響を受けない事が分かった。これはRNAの蓄積レベルと一致する。RbpDが結合するRNA配列については研究 中である。

1pO18

セン類ヒメツリガネゴケのglycine-rich protein 遺伝子の単離と解析

野又毅1,壁谷如洋1,佐藤直樹1(1埼玉大・理)

さまざまな植物でRNA結合モチーフであるRNA recognition motif (RRM) をN末端側に持っているglycine-rich protein (GRP)が数多く見つかっており、転写後調節に関与していると考えられている。またシロイヌナズナでは、この相同遺伝子(AtGRP7, AtGRP8)が低温で誘導され、概日リズムに関与していると報告されている。このGRPの機能を解明するために、ヒメツリガネゴケをDNAの単離を行った。その結果3種類のGRP遺伝子を取得し、PpGRP1, PpGRP2, PpGRP3と名付けた。cDNAよ基、178 アミノ酸残基、155アミノ酸残基であった。PpGRP1, PpGRP2, PpGRP3はRRM領域において、シロイヌナズナのAtGRP7とそれぞれ74%、71%、49%の相同性を示した。PpGRP3はPpGRP1, PpGRP2とは違い、RRM領域の前にミトコンドリアのトランジットペプチドと予測される約30アミノ酸残基があったので、GFP融合タンパクによる局在の確認を進めている。低温とABAによるPpGRP遺伝子群の発現の変化をノーザン解析を用いて調べた結果、3種の遺伝子とも、低温では24時間後に誘導が始まり、36時間で転写産物量が最大になった。またABAでは特に転写産物量の変化は見られなかった。

細胞内局在を異にする外来フェリチンが、遺伝子組換

植物体の各種金属元素濃度に及ぼす影響について <u>吉原利一^{1,2},後藤文之¹,増田太郎¹,姜延波¹(¹電中</u> 研・生物科学,²CREST)

これまでに、ダイスと数種の植物体です。 導入によりることでは、タバンをでは、カイなど数種の植物体ですが、タバンをでは、カルスが、カルスでは

2aA02

コムギおよびタバコにおける二本鎖RNAによる葉緑体局在型 ω -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子FAD7の発現抑制

濱田達朗¹, 大谷基泰¹, 射場厚², 島田多喜子¹(「石川農短大・資源研,²九大・理)

リノレン酸含量の減少による高温耐性能をもった形質 転換コムギを作出するため、高頻度にジーンサイレンシングを引き起こす二本鎖RNAを導入にして、TaFAD7遺伝子の発現抑制を試みた。TaFAD7 dsRNAを発現させるため、発現ベクターpE7113-GUS の GUS の領域を、TaFAD7 cDNA アンチセンス鎖、GUS遺伝子、TaFAD7 cDNAセンス鎖の順に連結したものと置き換えたプラスミドpTWFD1-ASGS13を作製した。pTWFD1-ASGS13を約1,200個の未熟胚に導入し、32個の再分化体を得た。再分化体すべての葉の酸組成を測定したところ、リノレン酸が減少している個体はなかった。

他の植物で FAD7遺伝子の二本鎖 RNA によるジーンサイレンシングが起こるのかどうかを調べるために、コムギと同様の実験をタバコでも行った。発現ベクターpBI121ならびにpBE2113-GUSのGUSの領域を、NtFAD7 cDNAアンチセンス鎖、GUS遺伝子、NtFAD7 cDNAセンス鎖の順に連結したものと置き換えたプラスミドpTH1-ASGSならびにpTH1-ASGS2を作製した。pTH1-ASGSを導入したものは20個体中5個体、pTH1-ASGS2を導入したものは5個体中1個体で、リノレン酸含量が減少していた。

2aA03

転写因子DREB1A遺伝子を過剰発現させたタバコの解 析

春日美江¹, 三浦節子¹, 篠崎一雄², 篠崎和子¹(「国際 農研・生物資源部、²理研・植物分子生物)

我々は、乾燥、塩、低温ストレス応答に関するシスエレメント DRE 配列に結合する転写因子の cDNA、DREB1Aを単離し、既にシロイヌナズナでDREB1Aのターゲットとなる複数のストレス耐性に関与する遺伝子が過剰発現して高いストレス耐性をですことを明らかにした。ストレス誘導性のプロモーターを用いると植物の成長阻害が起こらずに耐性を獲得することを報告したのタバコにおいてもCaMV35Sプロモーターを用いてシロイメナズナのDREB1Aを恒常的に過剰発現させると乾燥および低温ストレス耐性が向上し、また、このDREB1A遺伝子を過剰発現させたタバコからターゲット遺伝子を過剰発現させたタバコからターゲット遺伝子を単離した、LEAタンパク質をコードする5種の遺伝子を単離した。

今回は、ストレス誘導性の rd29A プロモーターを用いてDREB1A遺伝子を過剰発現させたタバコの解析について報告する。

rd29A プロモーターを用いると植物の成長阻害はあまり起こらなかった。また低温、乾燥ストレス時には導入したDREB1A遺伝子が強く発現し、ストレス耐性も向上した。これらの結果はシロイヌナズナにおける報告と一致し、タバコ中でもシロイヌナズナのDREB1A遺伝子がストレス耐性獲得に働き、また、ストレス誘導性のrd29Aプロモーターがシロイヌナズナ中と同様に機能することを示すものである。

2aA04

タバコ葉緑体形質転換法によるプラスチドアセチル CoAカルボキシラーゼ量の増加

円由香¹, 佐々木幸子¹ (¹名大院·生命農学)

脂肪酸合成の最初の段階に関与し、合成量を調節している酵素はアセチルCoAカルボキシラーゼ(ACCase)である。植物のACCase は細胞質とプラスチドにある。植物の脂肪酸合成は主にプラスチド(葉緑体)で行われるので、プラスチドにあるACCaseが脂肪酸合成量を支配していると言える。この酵素量を増加させれば、脂肪酸(脂質)含量が増えると考えられている。このACCaseは4種類のサブユニットからなる複合酵素で、4つのうちaccD遺伝子だけが葉緑体ゲノムにあり、他は核ゲノムにある。この酵素量を増加させるには4種類のサブユニット量を増加させる必要があり、今までその試みは成功していない。

核にある遺伝子の過剰発現は ACCase 量に影響を与えなかった事が報告されている。また、これまでの研究から業緑体ゲノムにあるaccD遺伝子の発現量だけが少なく、この量が酵素量を規定している可能性が示唆された。accDの発現量を多くすれば酵素量が増加することが期待される。本研究では、タバコ葉緑体遺伝子の形質転換法でaccD遺伝子のプロモーターを強いプロモーター(葉緑体のリボソーマルRNAのプロモーターを用いた)に組み換えた形質転換植物を作出した。accDのmRNA量、タンパク質量共に増加した。この増加が核ゲノムにコードされる3種のサブユニットタンパク質量や脂肪酸含量にどの様な影響を与えたかを報告する。

タバコ葉緑体形質転換体における外来タンパク質の 大量蓄積とその光合成におよぼす影響 富澤健一¹,横田明穂^{1,2}(¹地球環境産業技術研究機構

富澤健一¹, 横田明穂^{1,2} (¹地球環境産業技術研究機構 (RITE)・植物分子生理, ²奈良先端大・バイオサイエ ンス)

外来遺伝子を葉緑体ゲノムへ直接導入した場合、その ゲノム数の多さから外来遺伝子の大量発現が期待できる。 この大量発現の結果、葉緑体内に蓄積する外来タンパク 質の宿主植物体に対する効果、とくに光合成能におよぼ す影響についての知見を得ることは、葉緑体形質転換法 を用いた植物による物質生産の実用化において重要であ る。今回、GFP遺伝子をタバコ葉緑体へ導入し、その蓄積 量と光合成におよぼす影響について検討したので報告す る。rbcLとaccDの間に相同組み換えをねらった、プラス ミドベクター pLD200-GFP (PpsbA/GFP/Trps16::Prrn/aadA/ TpsbA)を構築し、パーティクルガンによりタバコ葉緑体 へ導入した。この結果得られた形質転換体において、GFP の蓄積が全可溶タンパク質の38%に達した。これは、1g生 重量のタバコ成葉あたり8.14 mgのGFPの蓄積に相当す る。ガス交換法による二酸化炭素吸収速度を測定したと ころ、多量のGFPが葉緑体に局在するにもかかわらず野生 種と遜色ない光合成能が確認された。以上の結果は、タバ コ葉緑体ストロマは外来タンパク質を大量に蓄積する余 地があり、葉緑体を物質大量生産の場として利用できる 可能性を示すものである。

2aA06

わさび由来のdefensin遺伝子導入による糸状菌病抵抗 性トルコギキョウの作出

西原昌宏¹, 阿部善子¹, 中塚貴司¹, 山村三郎¹ (¹岩手 生物工学研究センター)

トルコギキョウの栽培においては灰色かび病や立ち枯れ病等の各種糸状菌による病害が生じ、生産の阻害要因になる場合がある。我々は糸状菌に対して抗菌活性を示す defensin (γーチオニン)遺伝子をわさびから単離し、解析を進めている。これまでに本遺伝子をイネに導入し、イモチ病抵抗性イネの作出に成功している。今回、トルコギキョウに糸状菌病抵抗性を付与する目的で形質転換体を作出し、解析を行った。

CaMV35S プロモーターの下流にわさび γ ーチオニン 遺伝子を連結したバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウム法により品種フレッシュパープルの実生切片に感染させ、ハイグロマイシンを選抜薬剤として野野換体を作出した。 T_1 あるいは T_2 世代の種子を播種し、ロゼットステージの葉を用いて、まず、灰色かび病菌のお迷りの菌そうの接種試験を行った。その結果、形質転換体の中には灰色かび病菌の病斑形成の進展が全く見られない系統や進展が抑えられた系統が得られた。さらに、ウエスタンブロット解析の結果、灰かび病だ。さらに、ウエスタンブロット解析の結果、灰かび病た。さらに、ウエスタンブロット解析の結果、灰かび病た。現在、抵抗性を示した系統のさらに後代の種子を採取しており、灰色かび病を含め、その他、苗立ち枯れ病菌、菌核病菌等トルコギキョウの有害糸状菌病に対する抵抗性を検定する予定である。

2aA07

PHA生産植物の生産性及び組成を指標とした代謝の 解析

新井祐子^{1,2}, 仲下英雄¹, 小林裕美子¹, 清水俊行¹, 鈴 木義勝¹, 土肥義治¹, 山口勇^{1,2}(¹理研, ²埼大院·理 工)

ポリー3-ヒドロキシアルカン酸(PHA)は微生物により合成される生分解性共重合ポリエステルである。我々はこれまでにペルオキシソーム内に3-ヒドロキシブタン酸(C4)、3-ヒドロキシペンタン酸(C5)及び3-ヒドロキシペキサン酸(C6)を構成ユニットとした短鎖型PHAを合成するタバコ及びアラビドプシスの作出に成功している。本研究ではPHAが植物に内在する酵素は分解せずに蓄積する性質を利用し、各器官及び生育条件におけるPHA生産量及び組成から、PHAの基質である(R)-3-ヒドロキシアルカン酸の供給に関与する代謝系について解析した。

生育期間における生産性を検討した結果、タバコ及びアラビドプシス共に老化した葉で最も高い生産性が示された。また、暗所において発芽・生育させることにより、生産性が上昇することが示された。さらに、 β -酸化を誘導することが知られているpolyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20)を添加することにより、PHAの生産量が著しく増加した。この結果から、形質転換体におけるPHA生合成の基質が β -酸化系の中間体から基質が多されていることが示唆された。また、葉、種子、支の各場官でPHAの生産性及び組成が異なることが示された。

2aA08

イネ Waxy 遺伝子の相同組換えによるジーン・ターゲティング

寺田理枝¹,浦和博子¹,稲垣善茂²,栂根一夫¹,飯田 滋¹('基生研,²岡山大)

高等植物の相同組換えによるジーン・ターゲティング 選抜マーカー遺伝子などの相同組換えを介した機能 回復を指標にしたモデル遺伝子を使って長年試みられて きたが、高等植物のゲノム上に存在する通常の遺伝子を 相同組換えにより破壊したトランスジェニック植物は、 アラビドプシスで1例報告されただけである。我々は、 ゲノム解析が進んでいる主要穀物で、しかも単子葉植物 のモデル植物でもあるイネのWaxy遺伝子を標的遺伝子と して、再現性のある相同組換えによるジーン・ターゲ ティングの確立にはじめて成功した。高発現ハイグロマ イシン耐性(hpt)遺伝子とジフテリア毒素タンパクのA チェーン (DT-A) 遺伝子を用いた強力なポジティブ・ ネガティブ選抜と高頻度のアグロバクテリウム形質転換 により、Waxy 遺伝子の第一イントロン内の配列を hpt 遺 伝子と置換させた、正常稔性を示す独立に得られた6系 統のトランスジェニックイネを単離した。得られた植物 のhpt遺伝子は何れもターゲットされた Waxy 遺伝子内に だけヘテロ型で存在し、次世代にメンデル遺伝した。

タバコ培養細胞を用いた抗体産生 矢野明¹, 竹腰正隆², 前田史子², 花田信弘¹(¹感染 研・口腔, ²東海大・医学部)

近年、多くの組換え生物製剤の開発が行われている。 臨床研究段階にある、またはすでに医薬品としての認可 を得た生物製剤の多くは、成長因子、ホルモン、サイト カイン、ワクチン、そしてモノクローナル抗体といった ものである。

米国研究製薬工業協会によると2000年に臨床研究にあるバイオ製剤は、80以上のモノクローナル抗体薬をインカルとのボイオ製剤は、80以上のモノクローナル抗体薬をインカルとのがしている。しかしこれいるのとと類に変は深刻な製造関備の不足に直面しているとい題でいる。と関連の大き、19,184-185)。長期的には、この問題をでいるのでは、2-3年のうちに出しるであろう。しかし、トを行うことである。実際にいくつかの組換え動植物あの由来シアである。実際にいくつかの組換え動植物あの由来シアである。大きであるが世界のであるがは、4年の生活に影響するとながも大きの研究が必要である。前来研究が必要である。前来研究が必要である。前来研究が必要である。がは近年、クタの生活に影響するとながは近日中の生活においてく、抗細菌、および抗、組換え植物を用いた医薬品をおよび抗、組換え植物を用いた医薬品をおいての研究を始めたので報告する。

2aA10

in plantaトランスフォーメーション法によるアラビドプシスALS遺伝子の相同組み換え

遠藤真咲^{1,2}, 刑部敬史^{1,3}, 野村美子¹, 市川裕章¹, 西村繁夫², 土岐精一¹(¹生物研, ²筑波大·農林, ³生研機構)

高等植物の遺伝子の相同組み換え系は、遺伝子破壊や遺伝子の部位特異的変換による機能研究に不可欠な技術である。本研究ではアラビドプシスのALS (acetolactatesynthase) タンパク質が1アミノ酸置換で除草剤imazapyrに耐性になることを利用し、相同組み換えにより野性型ALS遺伝子を耐性型に置換することを試みた。

具体的にはALS遺伝子をALSタンパク質の653番目のセリンがアスパラギンになる様にAGT (Ser) \rightarrow AAC (Asn) o2塩基置換を行い除草剤耐性型とし、さらに機能的なタンパク質をコードできない様にコード領域の57側を削り、バイナリーベクター上に配置した。これをin planta トランスフォーメンションにより植物体に導入したところ除草剤耐性植物体が得られ、解析の結果相同組み換えによって2塩基置換が植物体のALSゲノム遺伝子に導入されたことが示された。

2aA11

選抜マーカー開発のための各種プロモーターを用いたイネ改変アントラニル酸合成酵素遺伝子導入個体の解析

小松晃¹,吉川暁子¹,長谷川久和²,川岸万紀子¹,西澤洋子³,杉本和彦³,戸澤譲⁴,若狭暁¹(¹農研機構・作物研,²北興化学・開発研,³生物研,⁴三菱化学・生命研)

イネのアントラニル酸合成酵素(AS) α サブユニット 遺伝子(OASAI)のフィードバック制御部位に変異を加え た改変遺伝子(OASAID)を導入したイネは、トリプト ファン (Trp) によるフィードバック阻害を受けずTrp含 量が高まるとともに、Trpのアナログである5-メチルト リプトファン(5MT)に対して抵抗性を示す。このことか ら、OASAIDはイネ形質転換体の選抜マーカー遺伝子と しての利用が可能である。本改変遺伝子を効率的に選抜 マーカーとして利用するため、発現特性の異なる種々の プロモーター (ユビキチンプロモーター、CaMVの35Sプ ロモーター、OASAIプロモーター、レトロトランスポゾ ンTos17プロモーター、イネキチナーゼ由来Pro3プロモー ター) に改変遺伝子OASAIDをつないでイネに導入し、 カルスでの5MT抵抗性を調査した。その結果、ユビキチ ンプロモーターで最も抵抗性カルスの出現頻度が高く、 次いで35S、Pro3両プロモーターも有効であることが見 い出された。これらのプロモーターを用いた場合の再分 化個体とカルスにおける導入遺伝子の発現特性や、ユビ キチンプロモーターで見られる種子でのTrpの蓄積の有 無を明らかにして、効率的な選抜マーカー用プロモー ターとしての利用の可能性について考察する。

2aA12

ゲノム機能解析を目的とした多機能型挿入変異導入 システムの構築

<u>谷本岳志</u>¹,岩田扶美¹,中西弘充¹,田口悟朗¹,小平律子²,丹羽康夫³,林田信明¹,岡崎光雄^{1,2}(「信州大学・遺伝子実験施設,²信州大学・繊維・応生,³静岡県立大院・生活健康)

Arabidopsis thalianaのゲノムプロジェクトは既に終了し、そのデータも公開されている。次なる課題は各遺伝子産物の機能と役割の解析、相互の関係の解明である。ミュータントを用いたアプローチはそのための手段として多くの実績を挙げている。ミュータントを作製する方法は幾つかあるが、ミュータント取得後の解析の容易さと大規模なミュータントライブラリーを簡便に作製できる可能性からtransposon tagging法が優れていると考えられる。

本研究では、Ac/Ds transposonシステムを改良し、薬剤耐性遺伝子や薬剤感受性遺伝子を組み合わせる事により多数の変異体を一挙に作成できるtransposon tagging用プラスミドpGTIIを作製した。

pGTII を用いた場合、面倒な植物体の掛け合わせや遺伝子導入作業の手間を大幅に削減することができる。また、Dsトランスポゾン内にGFP遺伝子をレポーターとして組み込んであるので、被挿入遺伝子の産物のタンパク質の細胞内における局在や、発現パターンの解析も行うことができる。

クラミドモナス葉緑体における人為的遺伝子発現制 御系の開発

葛西精太郎¹, 小田滋¹, 加藤晃¹, 新名惇彦¹(「奈良先端大・バイオ)

葉緑体遺伝子発現機構や葉緑体機能に関する知見を得るためには、葉緑体遺伝子の発現や導入遺伝子産物が葉緑体機能に及ぼす影響などを経時的に観察することが必要である。本研究では、葉緑体の形質転換が比較的容易なクラミドモナスを材料として、大腸菌由来のlac系を用いた葉緑体での人為的遺伝子発現制御系の構築を行った。

大腸菌由来の lacl がクラミドモナス葉緑体内で発現し、Lacリプレッサーが蓄積することをウエスタン解析により確認した。次に、16S rRNAプロモーター、rbcL5'、3'非翻訳領域、GUS遺伝子よりなるキメラ遺伝子を構築した。人工オペレーターを転写開始点の上流34bpおよび下流24bpの位置に挿入し、lacl発現カセットと共にクラミドモナス葉緑体へ導入した。得られた形質転換体を用いて、ノザン解析およびGUS活性測定をつた。その結果、IPTG非存在下でのLacリプレッサーによる完全な発現抑制と、IPTGの添加による発現誘導が認められた

2aA14

新規ウイルスベクターの構築 堀孝一',渡辺雄一郎'('東京大学総合文化研究科)

本研究では、ToMV およびTMV-Cg 系統を母体とした新たな形のウイルスベクターを作製し、外来遺伝子の発現、ジーンサイレンシング導入方法としての検討を行った。このベクターを用いた結果Nicotiana tabacum cv.Samsun、Nicotiana benthamianaにおいて全身でグリーン蛍光タンパク質を高発現させることに成功した。またNicotiana benthamianaにおいてサイレンシングによりフィトエンデサチュラーゼの抑制に成功した。

2aA15

ゲートウェイクローニング技術が利用できるバイナリーベクター、Gateway Binary Vector (pGWB) の開発とその応用

黑瀬高章¹, 芦田裕之¹, 田中克典², 川向誠², 松田英幸², 中川強¹(¹島根大·遺伝子, ²島根大·生物資源)

ゲートウエイクローニングはラムダファージの組み込み反応を応用してin vitroでDNAの組換えを行うもので、制限酵素、リガーゼを使用することなく簡単な操作で効率よくプラスミドを構築することができる。また、基本プラスミドから、様々な発現ベクター(デスティネーションベクター)にワンステップでcDNAを移すことが出来る。この際、全ての発現ベクターで自動的にフレームが合うように全体設計がなされている。このシステムを紹いることでプラスミドコンストラクションが格段に容易になる。そこで今回ゲートウェイクローニングが利用できるパイナリーベクター、Gateway Binary Vector (pGWB)の開発を行った。

アイナリーベクターはハイグロマイシン選択が可能なpBI-Hmを用い、組換えサイトを有するカセットを組み込むことで、ゲートウェイ化を行った。これにより、制限酵素サイトを気にすることなく、少量の出発材料でバイナリーベクターを構築することが可能になった。め、GFP、6xHis、FLAG、3xHA、4xMyc、GSTの各種タンでクターの作製も行った。これらを用いることが可能を発現させるためのバイナリーベクターを1ステー値で構築することが可能になった。これらを用いて、内でタンパク質を発現させた結果も報告したい。

2aB01

ラン藻ゲノム構造解析と構造比較 金子貴一¹,中村保一¹,佐藤修正¹,田畑哲之¹(¹かず さDNA研)

ラン藻ゲノムの比較解析からラン藻に特徴的な遺伝子 遺伝子制御機構を明らかにするために、分子系統 的に異なるグループに属する3種のラン藻の全ゲノム構 造を決定した。Anabaena sp. PCC 7120は糸状性ラン藻 で、窒素固定の場となるヘテロシストを分化させることができる。そのゲノムは6413771 bpの染色体と5584-408101 bpの6つのプラスミドで構成されていた。染色体 上には5368タンパク質遺伝子、4コピーのrRNA遺伝子クラスター、48のtRNA遺伝子が、プラスミドには764タン パク質遺伝子、22のtRNA遺伝子様構造が同定され、全 タンパク質遺伝子産物の42.2%はアミノ酸配列の類似性 から機能を推定することができた。Thermosynechococcus elongatus BP-1は単細胞性の好熱ラン藻、Gloeobacter violaceus PCC 7421はチラコイド膜をもたず、細胞膜で光合成をする単細胞性のラン藻で、いずれも古く分岐した種 であることが分子系統解析から示唆されている。配列解 析からこれらのゲノムはそれぞれ2593857 bp、4659004 bpの染色体からなり、プラスミドは存在しないことがわかった。2001年12月現在、これらのゲノム上の遺伝子領 域を解析中である。本発表では3種のラン藻に、単細胞性のSynechocystis sp. PCC 6803を加えた4種のゲノムの比 較解析についても報告する。

nad7遺伝子を用いた陸上植物の系統解析 中村美砂¹, 壁谷如洋¹, 橋本和宣¹, 佐藤直樹¹ (¹埼玉 大・理)

nad7遺伝子はNADHデヒドロゲナーゼの複合体Iのサブユニット7をコードする遺伝子で、多くの植物でミトコンドリアDNAに存在する。被子植物ではnad7遺伝子に4個のグループIIイントロン(イントロン1、2、3、4)が存在することが知られており、コケ植物セン類綱ヒメツリガネゴケのもつ2個のイントロンは被子植物のイントロン1、2に対応することが当研究室で発見されている(Hashimoto and Sato 2001)。本研究では、nad7遺伝子における4個のイントロンの有無を進化の指標として、陸上植物の系統解析を行うことを目的とした。

50 種の植物から DNA を抽出し、PCR およびサザンブロット解析によりそれぞれのイントロンの有無の確定をのは対応するイントロンは存在した。シダ植物でイントロン3が存在した。シダ植物で検出された出現した。イントロン4は一部のシダ植物で検出されたが、その分布の詳細はさらに検討が必要である。裸子植物と被子植物では既知の4個のイントロ単系統では気に、なる大人の結果により、シダ植物で検出された。本話群であることが示唆された。本研究でもことを確別、大のおれての40であることを確認のいての40であることをであるが示唆ののいに対応することを確別、その結果も併せて報告する。

2aB03

植物ミトコンドリアのゲノム解析 (その2) 渡瀬雄介¹,長瀬正和¹,杉浦昌弘²,平井篤志³,<u>杉山</u> 康雄¹(¹名古屋大・遺伝子,²名市大院・システム自 然科学,³東京大院・生命農学)

我々は植物細胞の3つのゲノム-核、葉緑体、ミトコンドリア-間での遺伝子転移と再編成、ミトコンドリアの未知遺伝子の機能、ミトコンドリアゲノム構成の多様性の起源、等を明らかにする目的で植物ミトコンドリアのゲノムを解析している。

タバコミトコンドリアのゲノム構成を決定するため、ゲノムDNAの制限酵素切断断片ライブラリーを作成した。全てのクローンについて挿入断片の両端約500塩基を決定した。そして、それらのBLASTによるホモロジー検索、及び、Phred/phrap/consedによるassemblyを組み合わせて10-60kbの大きさのcontig(15個)とした。shotgun法とprimer walk法を併用して配列未決定部分のシークエンシングを進めている。

タバコミトコンドリア遺伝子のうちでnad2遺伝子について他の植物(マツヨイグサ、シロイヌナズナ、テンサイ、コムギ)の場合と比べた。その結果、1)nad2遺伝子は5つのexonからなり、exon bとexon cはtrans-splicingで連結する。2)intronの配列を他の植物と比較したところ、タバコから系統的に遠くなる程、ホモロジーが低くなっていた。3)コムギの場合exon a の5'上流域にホモロジーが見られないので転写シグナルや調節等が他の植物と違う可能性があることが示唆された。今後、すべての遺伝子のintron等を様々な植物種間で比較することによって、ミトコンドリアから見た高等植物の多様性についての知見を得る予定である。

2aB04

三次元ゲノムビューアーを利用した色素体ゲノムの 比較

佐々木直文¹, 佐藤直樹¹ (¹埼玉大·理)

色素体ゲノムは核ゲノムと独立して存在し、色素体に よって維持されている。色素体を含め、一般的にゲノム は種間において全長、塩基配列共に流動的でありゲノム の全体的な機能メカニズムなどを解析する上で、塩基配 列の比較を基本とする従来の方法とは別のゲノム構造に 基づいた巨視的な比較方法が有効である。本研究ではゲ ノム構造の中で、特に遺伝子の配置順序に着目し、配置 順序を複数ゲノム間で立体的に捉えることのできるアプ リケーションを開発し、配列データベース上の色素体ゲ ノムの配列を適応することによって、配置順序の保存の 度合とシャフリングの様式を分析した。その結果、色素 体ゲノムは種間で高度にシャフリングされており、 の遺伝子群を除き、配列順序にほとんど相関性が見られ なかった。一方リボソームタンパク質クラスタなどの遺 伝子クラスタは種間で比較的保存されており、これらの クラスタが別個に機能単位を構成している可能性が示唆 された。しかしながら、これらの保存的クラスタ間の相 対位置および距離は種間によって異なっており、これら のクラスタがゲノム上でゲノム上の位置と無関係に特別 に保存されていると推測された。

2aB05

シロイヌナズナデータベースにおける遺伝子注釈の 補足

伊藤有紀¹,孫崇栄²,木下邦則¹,近藤鋭治¹,續伯 彦³,杉浦昌弘⁴(「株)シーティーアイ・ライフサイエ ンス推進G,²復旦大・生化,³愛学大・情報社会政策, ⁴名市大院・システム自然科学)

[目的]イネゲノムプロジェクトの一環の「葉緑体ゲノム発現ナビゲーター」を開発する過程で、シロイヌナズナデータベース(DB)より葉緑体へ移行すると予測される遺伝子(推定葉緑体移行遺伝子)の収集と整理を行なった。これらの遺伝子のなかで推定タンパク質(hypothetical protein・putative protein)または機能未知(unknown protein)と注釈が付けられた遺伝子が数多く存在する。しかし、既に機能が明らかにされているにも関わらず、DBの注釈が推修が明らかにされているにも関わらず、DBの注釈が推定子があることを見出した。推定葉緑体移行遺伝子を網羅的に検索するために、既知の遺伝子機能名の補足を行った。

[方法]既に機能が同定されている遺伝子のアミノ酸配列をクエリーとしてfasta検索を行った。それぞれ、検索元の遺伝子がシロイヌナズナの場合は類似性が90%以上、ナズナ以外の遺伝子の場合は類似性が60%以上を示した場合に、DB上の遺伝子注釈に既知の機能名の補足を行なった。

[結果]fasta検索より、新たに既知の遺伝子機能を持つと示唆されるシロイヌナズナ遺伝子は数十を超えた。これらの知見は、推定葉緑体移行遺伝子を網羅的に探索する突破口となるだけでなく、研究者にも更なる情報を与えると考える。

A Large Scale Genome Analysis of *Lotus japonicus* I. Genome Sequencing and Mapping

佐藤修正¹,中村保一¹,金子貴一¹,加藤友彦¹,浅水 恵理香¹,田畑哲之¹(¹かずさDNA研)

In order to investigate the whole genetic system of legume species, we have started large-scale sequencing of the genome of a model legume, *Lotus japonicus*. For genome sequencing, we have constructed a genomic library of *L. japonicus* accession MG-20 in a transformation competent artificial chromosome (TAC) vector. Seed clones for sequencing were selected based on the EST, cDNA and gene information.

As of November 2001, a total of 608 seed clones have been selected, and 149 of them have been sequenced. We have obtained the annotated sequences of 73 TAC clones. A total of 744 protein coding genes were identified in 7.1 Mbp covered by 73 TAC clones. Mapping of the seed clones has also been performed by generating PCR-based markers from sequence information, and 123 clones have been mapped on the linkage map. The sequence data, gene information and mapping information are available through the web site at http://www.kazusa.or.jp/lotus/.

2aB07

A Large Scale Genome Analysis of *Lotus japonicus* II. Annotation pipeline and WWW database 中村保一¹, 佐藤修正¹, 金子貴一¹, 浅水恵理香¹, 加藤友彦¹, 田畑哲之¹ (「かずさDNA研究所)

We are in the process of several large-scale sequence analyses aimed at elucidating the genetic system involved in nitrogen fixation and photosynthesis. One of such projects is the genome analysis of the model leguminous plant, Lotus japonicus. Intensive genomic studies including generation of DNA markers and a genetic linkage map, construction of genome and cDNA libraries and their sequencing are in progress. In this presentation, we will review on our annotation pipeline and data providing system on the WWW. To analyze long-range genomic sequence rapidly, we developed a system to automate the execution of similarity search and gene prediction programs. Then the results are parsed and loaded into a WWW based gene-composing system. High-throughput analysis of Lotus japonicus genomic sequences are being carried out with the assistance of this pipeline. The sequence data, gene information and mapping information are available through the World Wide Web at http://www.kazusa.jp/lotus/.

2aB08

ミヤコグサ根粒非着生原因遺伝子 Sym70 の HEGS/AFLPによるsaturation mapping

村上泰弘^{1,2}, 今泉 (安楽) 温子^{1,2}, 川口正代司³, 川崎信二¹ (「農業生物資源研究所, ²生研機構, ³新潟大)

ミヤコグサの根粒非着生変異体sym70の原因遺伝子を ポジショナルクローニングにより単離することを目的として、我々が開発した高効率ゲノム走査法(HEGS: High Efficiency Genome Scanning)とAFLPとを組み合わせて Sym70のsaturation mappingを行った。HEGS は今回、SCARマーカーによるF2分析とBACライブラリーのスクリーニングにも利用して短期間で分析を完了し、その高 効率性と広い応用範囲とが実証された。Sym70にリンク したHEGS/AFLPマーカーのスクリーニングは、多型率2%のGifu(変異体)とMiyakojimaの交雑後代を使って EcoR I(+3)/Mse I(+3) プライマーの全組み合わせ、4,096 で行った。その結果、F2集団の形質判定を含めて約半年 間で407の劣性ホモ個体に対して1.25 cMの近傍に31マー カーが得られた。この密度は、ゲノムの平均よりかなり 大きくセントロメア領域に有るものと考えられる。次 に、マーカーをさらに絞り込むため、Sym70近傍のAFLP マーカーをSCAR化した。現在1,000以上のF2あるいはF3 集団から、Sym70の両サイドのSCARマーカーを使って Sym70の近傍で組み換えを起こした個体を選抜し、高密 度連鎖地図を作成している。さらに我々が構築した高品 質のBACライブラリー(平均インサートサイズ138 kb) を用いて物理地図の作製を試みる。

2aB09

ミヤコグサ根粒菌整列化コスミドライブラリーの構 築とそれを利用した変異株の作製

服部嘉行 l , 大森博文 l , 金子貴 $^{-2}$, 田畑哲之 2 , 佐伯和彦 l (l 大阪大院・理, 2 かずさDNA研)

Two Genes Each for RAD51 and LIM15/DMC1 Are Expressed in Rice

耳田直純^{1,2},清水武史^{1,2,3},中島麻里奈^{1,2},島津樹 一^{4,5},吉岡藤治⁶,新関稔⁴,中村信吾,川崎信二²,刑 部敬史^{1,2},土岐清一²,市川裕章²,中村信吾⁷(「生研 機構,²農業生物資源研,³岩手生工研,⁴弘前大,⁵野 菜茶業研,⁶農研機構,⁷東北農研)

Both RAD51 and LIM15/DMC1 play key roles in meiotic and/or homologous recombinational repair. To characterize these genes in rice, we have cloned cDNAs for both the gene homologs by RT-PCR, and interestingly two genes each for the RAD51 and LIM15 homologs, designated as OsRAD51A/B and OsLIM15A/B respectively, were isolated. The putative OsRAD51A/B proteins are highly homologous to maize RAD51A/B equivalents. OsLIM15A/B proteins also share high homology to those from other species. Both the proteins possess two nucleotide-binding domains which are well conserved among various organisms. OsRAD51 genes were induced by gamma-ray irradiation causing DSB with higher responsiveness in OsRAD51B. Additional expression analyses using RT-PCR and in situ hybridization will be presented.

2aB11

アラビドプシスRAD51B相同遺伝子の機能解析 刑部敬史^{1,2}, 吉岡藤治³, 市川裕章², 加藤友彦⁴, 田畑哲之⁴, 浅野智哉⁵, 榑井俊介⁵, 吉岡泰⁵, 町田泰則⁵, 関原明^{6,7}, 小林正智⁸, 篠崎一雄^{6,7}, 土岐精一² (¹生研機構, ²農業生物資源研, ³農研機構, ⁴かずざDNA研, ⁵名大院・理・生命理, ⁶理研ゲノム総合研究セ・植物ゲノム, ⁷理研筑波研・植物分子, ⁸理研筑波研、バイオリソースセ)

遺伝子相同組み換えは減数分裂期組み換えやDNA傷害の修復等に関わり、生物の多様性と子孫の安定な保持のために重要である。真核生物における遺伝子相同組み換えはRad52経路に属するタンパク質群を介して行われることが酵母、高等動物を用いた実験から明らかになってきた。一方、高等植物においては相同組換えに関与する因子の単離、解析は遅れている。

Rad52 経路の中で酵母や脊椎動物の Rad51 類似タンパク質群は、組み換え反応の中心であるRad51の機能の補助に重要な役割を果たすことが分かっている。我々は植物における遺伝子相同組み換えのメカニズムを明らかにすることを目的として、アラビドプシスより 4 種のRAD51類似遺伝子のカウンターパート遺伝子を単離し解析している。本発表では、これらの中でRAD51B相同遺伝子(AtRAD51B)の単離、遺伝子の発現様式及びタンパク質間の相互作用実験の結果について報告する予定である。また、我々はT-DNA挿入による本遺伝子の破壊株を見い出したので、その解析についても併せて報告したい。

2aB12

コケ植物におけるgermin-like proteins遺伝子ファミリーの解析

渡辺弥生',中田克',塩野忠彦',橋本有加',松崎雅 広',佐藤敏生'('広島大院・理)

germinはもともとコムギの発芽時に発現するタンパク質として見出されたものであるが、その後、様々な植物にgerminと配列に相同性のあるタンパク質、germin-like proteins (GLPs)が見出された。GLP遺伝子はゲノム内に複数存在し、遺伝子ファミリーを形成している。穀類のgerminは、oxalate oxidase活性を持つが、その他のGLPsにはこの活性がなく、機能についてはほとんど分かっていない。当研究室では、コケ植物から初めて細胞外にMn-SOD活性を持つGLPを分離した。

本研究では、植物におけるGLP遺伝子の分子系統進化を明らかにすることを目的とし、最も原始的な陸上植物であるコケ植物に注目した。材料としては、遺伝子導入系が確立している蘚類Physcomitrella patensを用いた。

R. patensでは11種類のGLP遺伝子の一部がGen Bankに登録されており、7種類の別々のGLPであった。これらの配列をもとに作製したプローブで、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、現在までに3種類のGLPの全長配列を決定した。これらのGLPには輸送配列が存在し、細胞外へ輸送されると予想された。全長配列を解析したGLPについて、系統解析を行うと、P. patensのGLPは裸子植物のGLPと近い関係にあった。

2aB13

Analysis of the Function of the MOM1 Protein in Transcriptional Gene Silencing in *Arabidopsis*

<u>土生芳樹</u>¹, Susanne Lienhard¹, Muhammad Tariq¹, Aline Probst¹, Jerzy Paszkowski¹ (¹Friedrich Miescher Institute, Basel, Switzerland)

In plants and animals, the involvement of DNA methylation in heritability and flexibility of epigenetic states is widely accepted, although its function is far from clear. We have isolated an Arabidopsis gene, MOM1, whose product is required for maintenance of transcriptional gene silencing (TGS). Mutations of this gene result in the rapid release of TGS at several previously silent, heavily methylated loci. Despite the transcriptional reactivation, the dense methylation at these reactivated loci is maintained, suggesting that transcriptional activity and the methylation pattern are inherited independently. Although the MOM1 protein shows partial similarity to the AT-Pase region of the SWI2/SNF2 chromatin remodelling proteins, results of overexpressin of a part of the MOM1 protein in heterologous systems, a screening for the MOM1-interacting proteins, and inducible expression of the antisense MOM1 RNA suggest that the function of the MOM1 protein is distinct from those of known chromatin remodelling proteins.

脱窒光合成細菌Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans IL106に見出された2つの挿入配列 田畑敦也¹, 劉恵萍¹, 佐藤敏生¹, 山本勇¹ (「広島大 院・理)

原核生物のDNA可動因子である挿入配列(IS)はその転移によりDNAの欠損、挿入、複製などの様々なゲノム再配列が起こり、細菌に多様性をもたらす原因となる。脱窒光合成細菌R. sphaeroides f. sp. denitrificans IL106の硝酸還元酵素遺伝子napKEFDABCの上流に非脱窒性のR. sphaeroides 2.4.1株には検出されないISが見出された。

本研究では、IL106株のnapオペロン上流のISの全塩基配列を決定し特徴を検討した。その結果、二つのISを見出し、ISRhs1及びISRhs2と命名した。ISRhs2は1009bpから成り、両端に 12bp の逆向きの繰り返し配列(LIR, RIR)をもつ。しかし、標的配列は同定できなかった。ORFのアミノ酸配列のホモロジー検索から、ISRhs2はIS110/IS429ファミリーに属する。860bpから成るISRhs1はISRhs2によってORF1とORF2に分断されていた。これらのORFのアミノ酸配列はIS5ファミリーのIS427サブファミリーのトランスポゼースのN端とC端の領域に各々ホモロジーがあった。ISRhs1の標的配列はYTAGと同定した。コピー数は、IL106株DNA上にORF1が2、ORF2が5、ISRhs2が1であった。ISRhs1のLIR、RIRをプライマーにし、IL106 DNAを鋳型としたPCRは ORF2に約80%相同なIS様配列(469bp)を少なくとも2種与えた。転移活性の有無を更に検討する。

2aC01

イネにおけるNADHグルタミン酸脱水素酵素遺伝子の 単離と発現解析

牧英樹¹,潮田明子¹,安彦友美¹,早川俊彦¹,山谷知行^{1,2}(¹東北大・院農・応用生命科学,²理研・PSC)

高等植物において、NADHグルタミン酸脱水素酵素(NADH-GDH)は、ミトコンドリアに局在し、2-オキソグルタル酸のamination反応とグルタミン酸のdeamination 反応を可逆的に触媒する酵素である。一般に、NADH-GDHタンパク質は分子量42-43kDaの2種のサブユニット(α および β -鎖)から成る6量体構造をとり、これら2種のサブユニットの構成比の違いから7種のアイソザイム(GDH1-7)に分類される。これまでGDHに関する解析は遺伝子レベル、タンパク質レベルで数多く行われているものの、未だその生理機能は不明なままである。

そこで本研究では、高等植物における GDH の生理的 役割を解明することを目的として、イネGDH1および GDH2 cDNAの単離と、それらのタンパク質レベルでの発現解析を行った。両cDNA はそれぞれ1575bpおよび 1476bpであり、ゲノミックサザンブロット解析の結果から両遺伝子はともにシングルコピーで存在することが推定された。一方、抗トウモロコシNADH-GDH抗体を用いたwestern blot解析から、GDHタンパク質はイネの葉身、葉鞘、穎果と広く各器官に分布していた。組織内分布を解析したところ、各器官において主に維管東組織に局在していた。このことから、GDHがイネにおいて簡管や導管輸送を介したアミノ酸あるいは有機酸の代謝に関与していることが示唆された。

2aC02

NADHグルタミン酸合成酵素cDNAを導入したインド型イネT1・T2世代の解析

<u>森谷佳奈美</u>¹, 古川創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)

NADHグルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)は、 未抽出葉身や登熟初期の穎果等の若い器官で、老化器官より転流されるグルタミンの再利用に重要な役割を担うことが示唆されている。また、インド型イネKasalathでは新鮮重当たりのNADH-GOGATタンパク質含量が日本型イネSasanishikiと比較して低い。N利用効率の向上をめざし、Sasanishiki由来NADH-GOGAT遺伝子を高発現する形質転換Kasalathを作出し、TO世代の結果を昨年の本年会で報告した。

本研究では、形質転換イネ自殖後代(TI-T2 世代)を用いた解析を行った。この世代ではまだ導入遺伝子が多コピー(2-6)存在しており、ホモ接合体としては固定されていない。これらの集団から、未抽出葉身におけるNADH-GOGATタンパク質含量が、対照と比較して最大1.8倍まで増大した個体、1/10まで減少した個体を獲得した。成長解析と収量形質の解析の結果、NADH-GOGAT含量と分げつ数、主桿の穂重量、一粒重との間に正の相関関係が認められた。これらのことから、NADH-GOGATはイネにおいて、生育、収量に直接的に影響を与える酵素であることが示唆され、これはTO世代での解析結果を支持するものであった。現在、葉の窒素含量、貯蔵タンパク質量とその組成に与える影響等について解析中である。

2aC03

NADHグルタミン酸合成酵素遺伝子の維管束組織特異 的な発現に関わるシス配列の解析

小島創一¹,早川俊彦¹,山谷知行^{1,2}(¹東北大院・農, 2 理研・PSC)

我々は、イネNADHグルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)遺伝子とGUS構造遺伝子との融合遺伝子を導入した形質転換イネを用いて、同プロモーターの発現特性解析を行なっている。このプロモーターは、形質転換イネの根において、外来のアンモニアの供給に伴って活性が約4倍に増強される。さらに成長中の若い組織と維管束組織で強く発現する特徴を持つ。

NADH-GOGAT 遺伝子の維管束組織特異的な発現は、 デリーション解析の結果、-142から-42の100bpの領域に よって制御されることが判明した。

イネ培養細胞から核抽出物を調製し、ゲルシフト解析を行った結果、この領域の中でも、-122 から -103 のAATA配列、-103から-83のGGGACGCGA配列、-72から-53のTGGリピート配列に核タンパク質が相互作用することが判明した。

サウスウエスタン法により、これらの DNA 領域に相 互作用する核タンパク質の分子量を調査したところ、-72から-53のTGGリピート配列には75kDaの核タンパク 質が相互作用していることが判明した。

2aC04

イネアンモニウムトランスポーターOsAMTI;3の機能 解析

齋木里文²,園田裕¹,池田亮¹,山谷知行³,山口淳二¹
(¹北大院・理,²北大院・農,³東北大院・農)

これまでにイネ(Oryza sativa L.)においてアンモニウムイオンを特異的に輸送するトランスポーター遺伝子OsAMT1;1、1;2についてその機能の解析を行ってきた。その過程において新たなアンモニウムトランスポーター遺伝子であるOsAMT1;3を単離し、その機能の解析を行った。

OsAMTI;3 は OsAMTI;1、1;2 と同様に AMTI 遺伝子族 に属しており、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列の構造解析の結果、膜結合型タンパク質であることが 示唆された。

OsAMTI;3 の発現様式を RT-PCR 法を用いて検討した。組織特異性を検討した結果、OsAMTI;3は根特異的に発現が認められた。また、窒素欠乏状態の植物体にアンモニウムイオンおよび硝酸イオンを与えた場合の発現様式を検討した結果、OsAMTI;3は窒素欠乏状態で発現が誘導され、アンモニウムイオンおよび硝酸イオンを与えることによって抑制された。この空素化合物によって発現が制御されており、窒素欠乏状態でのアンモニウムイオンの取り込みに関与していることが推察された。イネにおけるOsAMTI;3の機能を明らかにするためにさらなる発現解析を行っている。

酵母変異株を用いた相補実験の結果、OsAMTI;3 翻訳 産物が実際にアンモニウムイオンの取り込み機能を有していることが明らかとなった。

2aC05

ヒメツリガネゴケの亜硝酸還元酵素の窒素による発 現制御

<u>吉川彰</u>¹, 山崎秀将¹, 二村美佳¹, 小俣達男¹(¹名古屋 大院·生命農学研究科)

硝酸同化においては、硝酸イオンは、硝酸イオン能動 輸送体(NRT)によって細胞内に輸送され、硝酸還元 酵素(NR)と亜硝酸還元酵素(NiR)によってアンモ ニアに還元される。NRT、NR および NiR の発現は窒素 によって正負両面の制御を受けており、一般に硝酸イオ ンまたは亜硝酸イオンによって活性化され、アンモニア、グルタミンまたはその代謝産物によって抑制され る。我々は植物の硝酸同化系の発現制御の機構を研究す るため、相同組み換えが可能なヒメツリガネゴケ(Physcomitrella patens)を用いて、まず NiR 遺伝子(Niil)の cDNA をクローン化し、次に様々な窒素条件に おける Niil の mRNA の発現を調べた。ヒメツリガネゴ ケの NiR のアミノ酸配列は高等植物のものと約60%、ラ ン藻のものと約52%一致しており、系統樹では緑藻と高 等植物の間に位置していた。培地の窒素条件を変えて mRNA の蓄積量の変化をノーザン解析で調べたところ、 Niil の転写は硝酸イオンにより活性化され、アンモニアにより抑制されることが示唆された。これらの結果は本 質的には植物において報告されている結果と同じであ り、ヒメツリガネゴケが硝酸同化の研究においても高等 植物のモデルとなり得ることが示された。

2aC06

アラビドプシスのグルタチオン依存型ホルムアルデヒド脱水素酵素はS-ニトロソグルタチオン還元酵素である

坂本敦¹,上田愛美¹,森川弘道^{1,2}(1 広島大院·理, 2 CREST)

植物において一酸化窒素(NO)は、病原菌への防御応答の活性化シグナル分子として働き、おそらられるの生理・発生プロセスをも調節していると考えられる。植物における複数のNOシグナル経路の存在が明らは対照的に、その代謝についてはとんど知られていない、NOとその派生化合物の代謝の経研究は、NOシグナリング機構の解明をもれたらすのとばかりでなく、植物の窒素代謝の新周面をもれたらずかりでなく、植物の窒素代謝の新周面をもれたらずルンではがある。アラビドプシスのグルタチオン依存型され、発現酵素がNOとグルタチオンの付加物でありNOの生体、リボーバーとして知られる S- 二トロソグルタチン(GSNO)を還元することを示した、本結果は、植物とでいてもNO関連代謝が活発に行われていることを引いてもNO関連代謝が活発に行われていることの過程で共通に保存されていることを示唆して進化の過程で共通に保存されていることを示唆して進化の過程で共通に保存されていることを示している。

2aC07

植物における未解明窒素(UN)化合物の生成-硝酸塩からのUNの生成

森川弘道 1,2 ,福永一成 2 ,高橋美佐 1 ,河村義史 1 ,坂本敦 1 (1 広島大院・理, 2 CREST)

我々は、最近植物体内に取り込まれた二酸化窒素由来の窒素の約1/3は、ケールダール窒素画分に回収されず、無機窒素画分にも回収されない未解明の窒素(UN)となることを見出した。本研究では、このような未解明窒素を含む化合物(UN化合物)が硝酸由来の窒素からも生じるか否かについて研究した。その結果、タバコ葉にいて、同レベルのUNが生成することが初めて見出けれた。UN生はタバコ葉内の無機イオンレベルと比例する「傾向が認められた。以上の結果から、UN化合物は、二酸化窒素または硝酸性窒素から生じる新規な窒素メリタイトであると結論された。二酸化窒素由来のUN化合物の化学分析から、有機ニトロ、ニトロソ化合物が、有力な候補の一つであることが示された。詳細な化学構造の解析を現在進めている。

2aC08

二酸化窒素暴露により植物内で生成するニトロチロ シンに関する研究

<u>高橋美佐</u>¹, 重藤潤², 森川弘道^{1,3} (¹広島大・院理, ²広島大・理, ³CREST, JST)

二酸化窒素(NO_2)を植物は葉に吸収し、硝酸還元経路→GS/GOGATサイクルを介して有機アミノ化する。しかし、 NO_2 由来の窒素全てが植物体内で還元態窒素と無機窒素になるかは分かっていない。我々は、多くの植物で細胞内に取り込まれた NO_2 由来のケールダール窒素(還元態窒素(RN))と無機窒素(IN)の和が NO_2 由来の全窒素(TN)量に等しくならないことを見出した。TNでもTN0%に相当し、この窒素化合物画分を未知窒素(TN0%に相当し、この窒素化合物画分を未知窒素(TN0%に相当し、この窒素化合物画分を未知窒素(TN0%に相当し、この窒素化合物画分を未知窒素(TN0%に相当し、この窒素化合物画分を未知窒素(TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に相当し、この窒素化合物。TN0%に一つであると考えられる。そこで、本研究では、TN0%に一つであると考えられる。そこで、本研究では、TN0%に関すした。

タバコ(Nicotiana tabacum cv. Xanthi)を4 ppm NO_2 で8時間暴露し、植物葉から粗抽出液を調整し、SDS PAGE あるいは2D PAGEで分離した。抗ニトロチロシン抗体を用いてウェスタンプロット法を用いてチロシンがニトロ化されているタンパク質を調べた結果、抗ニトロチロシン抗体と反応するバンドおよびスポットを検出した。現在、そのスポットについて解析を進めている。

2aC09

タバコ「葉型」及び「根型」亜硝酸還元酵素 (NiR) 遺伝子の発現解析

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

は3個のみである。
本研究では、これまでにクローニングされていなかったタバコの「根型」nii4 のcDNAと genomic DNAをクローニングし、4個(2種)の遺伝子の特徴、発現パターンを解析した。業型と根型cDNAの相同性は高く(83%)、nii4 cDNA から推定したアミノ酸配列には、フェレドキシン結合部位と補欠分子(シロヘム、鉄-硫黄クラスター)結合部位が「葉型」NiR と同様に存在した。mRNAの発現を解析すると、どちらの遺伝子も硝酸によって誘導されるが、葉と供では明らかに2種の遺伝子もの発現パターンは異なり、葉におけるNiRmRNAの蓄積量は葉型:根型が4:1、根では葉型:根型=3:100であった。

2aC10

植物葉内に取り込まれた二酸化窒素から生成する新 規窒素(UN)化合物の解析

河村義史¹,高橋美佐¹,森川弘道^{1,2}(¹広島大院·理·数理分子生命理学,²CREST)

我々は植物葉内に取り込まれた二酸化窒素(NO_2)由来の窒素(NO_2 -N)の代謝的運命を研究した。播種後約5週齢のシロイヌナズナ ($Arabidopsis\ thaliana\ ecotype\ C24$)実生葉を4ppmの $^{15}NO_2$ ($51.6\ atom% ^{15}N$) に4時間曝露したところ,全 NO_2 -N の約30% が Kjeldahl 法で回収されない未知窒素 (UN) 化合物に変わることを発見した。他の野生植物 $11\ density$ 他一个物の生成は植物における一般現象であることが示唆された。また亜硝酸還元齢よける一般現象であることが示唆された。また亜硝酸還元齢の生を野生株の5% 以下に抑制したトランスジェニック 月 が 10% が 10% が 10% が 10% が 10% の生成が確認され、10% のと、10% のにない、10% のを表ができることが示唆された。また 10% のを表ができることが示唆された。

さらに ¹⁵NO₂ に曝露したシロイヌナズナ実生葉の陽イオン性画分を用いて、Kjeldahl 分解中に排出されるガスあるいは分解液のアンモニア蒸留後の残渣をキャピラリー電気泳動法や質量分析法などによって分析したところ、Kjeldahl 法で回収されないこれら UN 化合物がニトロソ化合物やニトロ化合物であるという実験的証拠を得た。これらのことから、UN 化合物は植物の新規窒素代謝産物であると考えられる。

2aC11

グルタミン酸合成酵素欠損ラン藻株を用いた光合成窒素・炭素同化バランスの調節機構の解析 新村佳奈子¹, 奥原宏明^{1,3}, 藤田祐一¹, 木田隆夫², 長谷俊治¹ (「阪大蛋白研, ²味の素中央研, ³ (株) オリ

ラン藻の一種 Plectonema boryanumは、2種類のグルタ ミン酸合成酵素 (GOGAT) を持ち、電子供与体として フェレドキシン(Fd)とNADHを用いる。各々の欠損株の 解析から、Fd-GOGATが光合成エネルギーに依存したア ンモニア同化に主要な役割を担っていることをこれまで に明らかにした。今回、野生株と Fd-GOGAT 欠損株 (HOF12) を光強度と炭酸ガス濃度の異なる環境下で生 育させ、窒素・炭素同化バランスの観点から細胞内の Gln及びGlu含量を解析した。その結果、野生株はいずれ の条件下でもアミノ酸プールに大きな変動は認められな かったのに対し、欠損株では強光、CO。補填下、すなわ ち炭酸同化が活発になる条件下でのみ顕著なGlnプール の増加が観察された。次に、野生株のFd-GOGATの蛋白 質含量を検討した所、強光、CO。補填下で2倍程度の増加 が認められた。また、HOF12に人工プロモータ制御下に おいたこの遺伝子を導入すると、基本的にはアンモニア 同化能の欠損が相補できたが、Fd-GOGATを過剰発現さ せると生育が阻害されることも判明した。これらの結果 から、炭素同化レベルに応答する窒素同化レベルの調節 点の一つがFd-GOGATであり、両同化バランスを維持す るために、この遺伝子発現のup-regulation とdown-regulationが巧みに行われていると推察される。

2aC12

ラン藻の硝酸同化系遺伝子の亜硝酸に応答した転写 制御機構の研究

愛知真木子¹, 小俣達男², 永井和夫¹(¹中部大·応用 生物, ²名古屋大院·生命農学研究科)

ラン藻の硝酸同化系遺伝子の転写は、窒素欠乏に応答 するグローバルな転写制御因子NtcAによって活性化され る。これに加えて我々は、Synechococcus 7942とSynechocystis 6803において硝酸同化の中間産物である亜硝酸 が硝酸同化系の遺伝子の発現を促進し、この過程にLysR型の転写因子NtcBが関与していることを示してきた。一方、Anabaena 7120では、硝酸同化系遺伝子の発現は亜硝 酸に応答せず、NtcBは亜硝酸の有無に関わらず硝酸同化 系の遺伝子発現に必須であると報告されている。7942株 ではNtcBが欠損しても硝酸同化活性の発現への影響はわ ずかである。6803株については詳しい解析の結果、硝酸 同化系遺伝子群の十分な活性化のためにはNtcAだけでな くNtcBも必要であり、NtcBは亜硝酸が無くても窒素欠乏 条件下でNtcAと協調して転写を活性化することがわかっ た。しかし、6803株でも亜硝酸があれば、NtcBはさらに 転写を促進した。さらに我々は、7120株でも亜硝酸への 応答を確認した。これらのことから、亜硝酸のない場合 の硝酸同化系遺伝子の発現に対するNtcBの寄与は株に よって異なるものの、亜硝酸イオンへの応答は一般に NtcBによって担われているものと結論した。

2aC13

Synechocystis sp. PCC 6803 のPIIタンパク質の機能解析 高谷信之¹, 小俣達男¹ (¹名古屋大院・生命農学)

ラン藻のPIIタンパク質は窒素栄養条件の変化に応額にてリン酸化/脱リン酸化を受けるタンパク質で、、PII 後段階での硝酸同化の制御に関与している。我々はした結果、Synechocystis sp. PCC 6803 のPII欠損株においてグラウスを検討した結果、Synechocystis sp. PCC 6803 のPII欠損株におして対した結果、Synechocystis sp. PCC 6803 のPII欠損株におした結れしたがGSを見い出し、これがGSをコレドしていることを見い出し、これがGSをコレドしていることを見い出し、これがGSをコレドしていることを見い出し、これがGSをコレドしているの発現量の当加にとび、CRP型の名ことを明らかにした。glnA、glnN遺伝子は、CRP型のを転写調節因子NtcAにより窒素条件に応答した発現調節の音に対しているのかにした。glnA、glnN遺伝子は、CRP型節とでは、CRP型節を受けることが知られているので、PIIがNtcAの活り発発のではよりでは、PIIがNtcAのが高いたのがでは、PIIがNtcAの音に対するPII欠損の影響を調べた。その結果、アントのとの音に対するPII欠損の影響を調べた。その結果、アントの音に対するPII欠損の影響を調べた。この記とから、PIIがアの発現を存るgifA、gifB遺伝子に対してのみPII欠損にアントでは、PIIがアンのと推定した。

2aC14

Rhodobacter capsulatus の窒素固定に必須なRnf複合体の解析: 膜貫通サブユニットの膜配向性とrnfH下流の新規orf

水戸千恵1, 佐伯和彦1(1阪大・院理)

R. capsulatus の窒素固定に必須なmfオペロンの産物は、NADH結合部位を持つ膜表在性サブ複合体と膜貫通サブ複合体からなるフェレドキシン還元酵素を構成すっと考えられている。膜貫通サブ複合体の構成サブユニットに関しては、ナトリウム輸送型NADH-キノン酸化党元酵素(NQR)の膜貫通サブユニットと類似性を示す以外、知見が限られている。今回、既に報告したRnfA以外の疎水性サブユニットRnfDとRnfEの膜配向性を、大腸菌アルカリ性フォスファターゼ(PhoA)との融合実験に関カルカリ性フォスファターゼ(PhoA)との融合実験に関カ調べた。その結果、361残基から成るRnfDは8回膜貫通であり、<math>148-207と256-316残基目の2つの比較的大島領域がペリプラズム側に露地すると見積られた。RnfEに関しては、PhoA活性測定に加えてクロマトフォア画分の領域がペリウスイオン処理を行い、N末端側の疎水性の領域が際に埋もれていることを明らかにした。興味深いる域が際に埋もれていることを明らかにした。興味深いるとにRnfEは36%のidentityを示すRnfAと同様に6回膜貫通だが、RnfEは36%のidentityを示すRnfAと同様に36%のidentityを示す360回膜貫通だが、360回に

さらに、mfH下流に存在して共転写され得るorfを見つけた。このorfの産物はflavocytochrome c sulfide dehydrogenaseのサブユニットと類似性を示した。

2aD01

ニンジン体細胞胚形成の初期段階に特異的に発現するタンパク質(P-19.5)の遺伝子の解析

佐野卓磨¹, 木村淳夫², 西本完², 保田浩³, 得字圭 彦¹, 大和田琢二¹, 増田宏志¹(¹帯畜大・生物資源科 学, ²北大院・農, ³岩手大・農・寒冷バイオ)

私達は私達が開発したニンジン体細胞胚形成系をもちいて体細胞から胚発生の最も初期段階に発現する遺伝子を検索している。今回は体細胞が分裂して細胞塊が形成される初期過程に特異的に発現し、球状胚や心臓型、魚雷型胚には存在しないタンパク質(P-19.5)を見出し、そのタンパク質の遺伝子を解析したので報告する。

この体細胞胚形成の初期段階に特異的に発現する P-19.5タンパク質をプロテアーゼで消化し数個のペプチド断片を得、それぞれのアミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列からプライマーを作成し、cDNAから目的遺伝子を増幅した。得られた遺伝子には154個のアミノ酸からなる翻訳領域が認められ、プロテアーゼ消化で得られたペプチド断片の配列が入っていた。相同性検索の結果、得られた遺伝子はcelery allergen(75%)、carrot root allergen (70-72%)、Pimpinella brachycarpa pathogenesis-related protein (71%)、Petroselinum crispum pathogenesis-related protein (60%)、European white birch pollen allergen(45%)と相同性を示した。

ニンジン体細胞胚形成における単細胞から胚発生過 程の連続観察

伊藤崇博¹,保田浩²,得字圭彦¹,大和田琢二¹,増田 宏志¹(¹帯畜大・生資科,²岩手大・農・寒冷バイオ)

2aD03

ニンジン不定胚からの水チャネル遺伝子の単離と発 現解析

塩田肇¹,長尾典子²,湊本芳朗²,鎌田博³,田中一朗¹ (¹横浜市大・院・総合理,²横浜市大・理,³筑波大・生物)

水チャネルは生体膜に存在し、水分子を選択的に通過 をせる能力を持つとされる膜タンパク質である。高等植物においても、30種類以上の水チャネル特定の組織や子組織や予想されており、これらがそれぞれ特定の組まな生現、機能することで、発生の過程に大いると考していると考えの細胞内内の、20k4のの水チャネルが関与していると考え、20k4の水分の大力では、10k4のの水が関連を表生が表生の水が、20k4の水の水の水が関連を表生が表生の水が、20k4の水の水が関連を表生が表生の水が、20k4の水の水が関連を表生が表生の水が、20k4のが、20k4の

2aD04

シロイヌナズナにおける新しい体細胞不定胚誘導系 の確立

岩井美穂¹,梅原三貴久¹,佐藤忍¹,鎌田博¹(¹筑波 大·生物)

植物においては、一度特定の機能を持つように分化した体細胞であっても、特定条件下では脱分化し、種子胚と同じ形態変化を経て完全な植物体を再生することが知られている。この体細胞不定胚形成は、植物細胞の持つ分化全能性を証明する優れた実験系であり、植物細胞の脱分化と再分化の機構を研究する上で良いモデル系となっている。しかし、分子遺伝学的研究のモデル植物であるシロイヌナズナにおいては、再現性のある体細胞不定胚形成系は確立されていない。

我々は、シロイヌナズナの茎頂部を含む外殖片を用い、さまざまなストレス処理を施すことによって不定胚を誘導することに成功したので報告する。

高浸透圧ストレス、重金属イオンストレス、乾燥ストレスのいずれの処理においても不定胚を誘導することが可能であったが、ストレスの処理条件(濃度や時間)は不定胚誘導率に顕著な影響を与えた。一方、不定胚形成頻度は異なるものの、Col、Ler、Wsの3種のエコタイプの野生型においても不定胚を誘導することができた。

ストレスによって誘導された不定胚は、正常な形態を持つ幼植物体を経て完全な植物体にまで成長し、開花、結実した。また、不定胚においては胚特異的遺伝子(ABI3、LEC1、FUS3)が発現していることも確認された。

2aD05

Isolation of Promoter Elements Conferring the Expression Pattern Associated with the Embryogenic Dedifferentiation in a Tobacco Pollen Culture System

山地直樹¹, 京正晴¹ (「香川大·農)

Embryogenesis from immature pollen is a typical example of expression of totipotency and also an important tool for breeding work. However, little is known about the induction mechanism of the phenomenon. Using a tobacco pollen culture system, we previously isolated a dozen cDNAs for genes that showed expression associated with the dedifferentiation process from immature pollen to embryogenic cells. The 5'-upstream region was isolated by ligation-mediated PCR or inverse PCR from several genes, fused to a reporter gene (histone H3::sGFP) in a binary vector and introduced into tobacco by agroinfection. Immature pollen was isolated from the resulting transformants, cultured and observed under a fluorescent microscope. As for two constructs, fluorescence from sGFP in vegetative cell nuclei was observed transiently under the culture condition for inducing the dedifferentiation.

根の静止中心特異的に発現するWUS型ホメオボックス遺伝子の解析

<u>神谷紀子</u>¹,森上敦²,松岡信¹(「名大・生物分子応答センター、2中部大・応用生物)

植物は両端に存在する頂端分裂組織の働きによって一生を通じて形態形成を行うため、これらの分裂組織が維持されることは非常に重要である。このうち根端分裂組織において静止中心(QC)と呼ばれる細胞群がその周囲に存在する各組織の始原細胞を未分化な状態に保つのに重要な役割を果たしていることが示唆されている。我々はこれまでにQCで特異的に発現するホメオボッ

我々はこれまでに QC で特異的に発現するホメオボックス遺伝子QHB (QC specific homeobox gene)をイネ及アクス遺伝子QHB (QC specific homeobox gene)をイネ及アクス遺伝子QHB (QC specific homeobox gene)をイネ及アクス遺伝子QHB (QC specific homeobox gene)をイネ及アクロイヌナズナより単離している。QHBはシロイヌナズナより単離している。中において茎頂分裂組織の形成・維持に関与シードとなりでででである。と類は、一般ではないのでは、現代の形を生過程における発現を開始していることが担当のであるいは根端の形と組織の形成のことが推測される発現を開始していることが推測される発現を開始していることが推測される。最自体の構築に関与していることが推測される。まれたの、QHB-GFP形質転換体の作成を行っており、この結果を含めQHB遺伝子の機能について考察する。

2aD07

野生型FWA遺伝子の発現と胚乳発生に伴うメチル化 パターンの変化

<u>木下哲</u>¹, 三浦明日香¹, 角谷徹仁^{1,2}(「遺伝研, ²CREST, JST)

fwaは開花時期遅延突然変異体として単離されている一方で、ddm1 (decrese in DNA methylation) 変異体の自殖を繰り返した系統からも、同一の遺伝子座にマップされる変異体fisが単離されている(Kakutani T. Plant J. 1997 12: 1447-1451)。遺伝子クローニングの結果、これらはホメオドメインを持ったタンパク質と相同性を示し、転写因子をコードする可能性が示唆された(Soppe W. et. al. Molecular Cell 2000, 6: 791-802)。野生型ではFWA遺伝子は栄養組織で発現しておらず、鞘のみに発現が見られた。また、野生型のFWA遺伝子はプロモーターのリピート配列がメチル化されているが、fiwa変異体では現、チル化が見られる。結果として、fiwa変異体では異所的に遺伝子発現がおこり、開花遅延を引き起る回に、また、野生型FWA遺伝子は鞘を含む組織で発現することから、本来は初期発生型FWAの発現解析で発現することから、本来は初期発生型FWAの発現解析のりに胚発生・胚乳発生に伴うFWA遺伝子プロモーターのリピート配列のメチル化パターンの変化を解析したので報告する。

2aD08

糖により誘導されるシロイヌナズナのタンパク質キ ナーゼの役割

小泉望¹, 井合宏道¹, 野沢彰¹, 李銀禎¹, 佐野浩¹ (¹奈良先端大·遺伝子)

光合成産物である糖は主にショ糖として転流し、生体 構成成分やエネルギーとして利用されるが、シグナル因子としても働く。シロイヌナズナのタンパク質キナーゼ AtSR2はカルシウムにより活性が制御される一群のファ ミリーに分類され、そのmRNA量はショ糖に応答して増 加する。糖シグナル応答におけるAtSR2の関与を検討す るために、発現様式を詳細に調べるとともにT-DNA挿入 による遺伝子破壊株の単離と解析をおこなった。切葉や 芽生えに糖飢餓処理を施すとAtSR2のmRNAは速やかに 消失し、糖添加により約1時間後には再び蓄積が検出さ れた。普通に育てた植物体においてはシンク器官である 根や花においてmRNA蓄積が多く認められた。GUS遺伝 子をレポーターに用いた発現解析の結果、GUS活性は維 管束に特異的に検出され、転流への関わりが示唆され た。現在さらに詳細な発現部位の特定をおこなってい 一方、T-DNA挿入による遺伝子破壊株は通常の生育 条件では野生型と顕著な違いは見られなかった。しか 発芽における糖の影響を調べたところ、破壊株は野 生型よりも低い糖濃度で子葉の展開が抑制された。糖に よる発芽の阻害はABAを介していることが示されてい る。そこで、破壊株のABAに対する感受性を調べるとともに、ABA応答遺伝子の発現を調べている。

2aD09

イネ未熟種子におけるデンプン生合成はプロティンキナーゼSPKによるショ糖合成酵素の活性化により統御される

浅野敬幸¹, 井部宏和¹, <u>島田浩章¹</u>(¹東京理科大·生物工学)

イネのプロティンキナーゼSPKはショ糖合成酵素をリ ン酸化することが明らかになっている。ショ糖合成酵素 はリン酸化によりショ糖分解活性が現れることが報告さ れているため、SPKはショ糖合成酵素の活性化因子の1 つであることが示唆された。一方、アンチセンスSPK遺 伝子を導入した形質転換体では、未熟種子のデンプンお よび貯蔵タンパクの生合成が阻害され、高濃度のショ糖 が蓄積した水モミとなった。シンク器官では、転流され たショ糖が出発物質となってデンプンなどの物質が生産 されるため、SPKは、ショ糖からこれらへの物質変換に 強く関与することが示唆された。ところで、アンチセン ス形質転換体の未熟種子には、野生型よりは減少してい るが、十分量のショ糖合成酵素量の産生が認められた。 一方、アンチセンス形質転換植物の未熟種子には、SPK が存在せず、また未熟種子粗抽出液のショ糖合成酵素に 対するリン酸化活性は、野生型よりも著しく低下してい ることが確認された。これらの結果から、アンチセンス 形質転換体の未熟種子における貯蔵物質の生合成の阻害 とショ糖の蓄積は、SPKによるショ糖合成酵素のリン酸 化(活性化)の欠損が大きな原因であることが示唆され た。また、未熟種子における物質生産にはSPKによる ショ糖合成酵素の活性化が不可欠であることが明らかに なった。

イネ発芽種子·糊粉層細胞で発現する2つの転写調節 因子の機能相関

鷲尾健司¹(¹北海道大・地球環境科学・環境分子生物学)

穀物種子・糊粉層細胞で機能するジベレリン酸 (GA) 誘導性遺伝子群の転写調節領域にはGA応答性シ ス配列 (GARE) とともに、ピリミジン配列 (P-box) と 呼ばれる共通配列が観察される。GAREにはMybタンパク質であるGAMybが作用することが知られており、Pboxに作用する因子としてDofタンパク質の一種である OsDof3を同定している。OsDof3は糊粉層、胚盤組織で の発現が顕著であり、GAによる早期の発現誘導を受け るGA初期反応遺伝子である。イネ糊粉層、酵母細胞を 使った転写活性化能の検定では、OsDof3単独では顕著な 転写活性化因子としての性質を示さなかったが、 GAMybとの共発現によりレポーター遺伝子の転写活性 化を増強する傾向を示した。また酵母ツ?ハイブリッド 系を用いた検定では、OsDof3はGAMybのMybドメイン と直接的に相互作用をする結果が得られている。発芽種 子でのGAの作用で中心的役割をはたすGAMybである その遺伝子発現のホルモン応答性や組織特異性は比 較的低く、その機能発現には自らの翻訳後修飾や他の協 調因子の存在が必要であるとされている。今回、2つの 転写因子間で見られた物理的・機能的相関は、OsDof3が GAMybの補助因子であることを示唆する。

2aD11

ジベレリンはイネα-アミラーゼⅡ-4発現の転写後過程を促進する

南條洋平¹, 浅妻悟¹, 三上暁¹, 堀秀隆¹, 伊藤紀美子², 三ツ井敏明¹ (¹新潟大院・自然科学, ²新潟大・農)

我々は発芽イネ種子においてα-アミラーゼII-4のホ ルモンによる発現調節について調べた。α-アミラーゼ I-1,II-4の時期・組織特異的な発現をティッシュプリント 解析したところ、発芽早期の胚乳組織においてα-アミ ラーゼI-1,II-4の発現時期・組織は、異なっていた。しか し後期のアリューロン層での2つのアイソフォームの発 現は同様であった。その遺伝子のプロモーター領域にジ ベレリン応答シス配列(GARE)を持たない α-アミラーゼ II-4分子のジベレリンによるアリューロン層での発現 は、その遺伝子にGAREをもつα-アミラーゼI-1分子の 発現と類似していたが、α-アミラーゼII-4のmRNAは誘 導されてはいなかった。そして α -アミラーゼII-4のジベ レリンによる誘導はCa²⁺キレーターであるEGTAやホス ファイノシチドCa²⁺情報伝達経路を阻害するネオマイシ ン、またカルモデュリンのアンタゴニストであるW-7に よって変化を示した。さらにヘテロ3量体Gタンパク質の αサブユニットの欠損した矮性変異体であるdlにおい て、α-アミラーゼII-4をジベレリンで誘導したところ野 生型と比べて変化はなかった。これらの結果からジベレ リンによる α-アミラーゼII-4分子の誘導はGタンパク質 を介さず、Ca²⁺やカルモデュリンを介した転写後調節に よるものと考えられた。

2aD12

発芽イネ種子胚盤組織蛋白質のプロテオーム解析 朝倉剛¹, 木村信¹, 三上暁¹, 堀秀隆¹, 三ツ井敏明¹ (¹新潟大院・自)

発芽イネ種子において胚盤組織は、胚乳に貯蔵された デンプンの分解、吸収・利用に関して重要な役割を果たすことが知られている。本報告においては、発芽イネ種 子胚盤組織において比較的多く発現する蛋白質のプロテ オーム解析について報告する。発芽イネ種子(4日目) の胚盤組織から抽出した全タンパク質を2D-PAGEで分離 し、得られた泳動パターンを画像解析することによっ て、発現タンパク質の等電点と分子量を決定しナンバリング (GS-1?417) を行った。また、プロテインシークエ ンサーおよびMALDI-TOF MSを用いて2D-PAGEによっ て分離・精製されたタンパク質の同定を行った。さら に、発芽イネ種子胚盤組織において時期特異的に発現が 変化する蛋白質および様々なホルモンによって発現が変 化する蛋白質の同定を行った。これらの解析の結果か にする蛋白質の同定を行った。これらの解析の結果が ら、GS-129の発現は発芽が進むにつれて強くなること、 並びにアブシジン酸やインドール酢酸添加によって発現 が誘導されることおよびアブシジン酸による誘導はジベ レリンによって打ち消されることが見いだされた。GS-129は、プロテインシークエンサーおよびMALDI-TOF MS解析によりOSR40g2 protein であることが分かった。 GS-129の諸性質についても報告する。(本研究の一部は イネゲノムプロジェクト(PR-1102)の援助を受けた。)

2aD13

命科学研究科)

エチレンがキュウリの性分化に影響を与える花芽の発育段階の特定と、その花芽でのエチレンレセプター 様遺伝子群とACC合成酵素遺伝子の発現 山崎聖司¹、藤井伸治¹、高橋秀幸¹(¹東北大・院・生

雌雄同株植物であるキュウリの花芽の雌花あるいは雄 花への分化は,がく片,花弁,雄蕊,雌蕊のそれぞれの 原基が求心的に発生して両性花的な発育段階を経た後, 雄蕊もしくは雌蕊のいずれか一方の器官の発育が停止す ることによって起こると考えられている. しかし, エチ レンが性分化に対して作用する花芽の発育段階は, 明ら かにされていない. そこで, 走査型電子顕微鏡(SEM)と トルイジンブルーO染色法を用いて花芽の発育段階を詳 細に観察した. その結果, エチレンがキュウリの性分化 に影響を与える花芽の発育段階は, 雄蕊の初生突起形成 前から, 雄蕊の初生突起形成後の間であることが明らか になった. 次に、キュウリの花の性分化におけるエチレ ン作用の分子機構を組織レベルで明らかにする目的で、 上記の発育段階の花芽におけるエチレンレセプター様遺 伝子群(CS-ERS, CS-ETR1, CS-ETR2)とACC合成酵素遺伝 子(CS-ACS2)の発現の局在性を, 混性型, 雌性型, およ び雄性両性同株型キュウリを用いて, in situ分析法を用 いて検討した. その結果, CS-ACS2遺伝子は, 雌性型の 雌蕊と, 混性型の雌蕊の基部および雄蕊に接する花弁の 向軸側で発現していた. さらに、CS-ERS遺伝子は、雄 蕊の発育抑制に、CS-ETR1およびCS-ETR2遺伝子は、雌 蕊の発育促進と雄蕊の発育抑制の両方に関与している可 能性が示された.

両性型キュウリTiv-1におけるエチレン生成量とエチレン応答性の解析

遷田亮平¹, 山崎聖司¹, 藤井伸治¹, 水野秀雅², 松浦誠司², 高橋秀幸¹(¹東北大・院・生命科学, ²(株)トーホク)

雌雄同株が基本であるキュウリ(Cucumis sativus L.)の 性表現は、FとM遺伝子の優劣の組み合わせによって制 御されている. また, 植物ホルモンの1つであるエチレ ンが、キュウリの雌性化を促進することが知られてい る. 我々は、これまでに雌性型(M-F-)、混性型(M-ff) および雄性両性型品種(mmff)の比較から、F遺伝子産物 がエチレン生成量を制御し、その下流でM遺伝子産物が エチレンシグナルを介して雄蕊の発育を抑制することを 想定したキュウリの性表現に関する遺伝学的モデルを提 唱している.しかし,両性型品種(mmF-)に関する知見 は得られていない. 本研究では、雄性両性型品種(mmff) に比べて両性花を多く分化する品種であるTiv-1におけ るエチレン生成量とエチレン応答性を解析した. その結 果, Tiv-1の茎頂では混性型や雄性両性型品種に比べて エチレン生成量が多く、かつ CS-ACSIの発現が強いこと が明らかになった. また, エチレン処理によって雌蕊の 発育は促進されたが、雄蕊の発育は抑制されなかった. 以上のことから、Tiv-1では、F遺伝子を持つためにエチ レン生成量が多く,かつ, M遺伝子の機能が欠失してい るために, エチレンシグナルを介する雄蕊の発育抑制が 起こらないものと考えられる. このことは, Tiv-1が両 性型品種(mmF-)である可能性を示唆するものである.

2aF01

シロイヌナズナ側根欠失変異体slr/iaa14のサプレッサー変異体slpの単離と解析

深城英弘1, 田坂昌生1(1奈良先端大・バイオ)

オーキシンは細胞の分裂・伸長・分化の制御を介し て、器官伸長・側根形成・屈性反応など多くの形態形成 に関わる。しかしこれらの過程を制御する分子機構はほ とんど不明である。そこで我々はオーキシンを介した側 根形成の分子機構を解明することを目的として、側根を 完全に欠失するシロイヌナズナのオーキシン耐性変異体 solitary-root(slr)と原因遺伝子であるIAA14(オーキシン誘導性Aux/IAA遺伝子)の解析を行なっている(Fukaki et al., Plant J. in press)。今回、側根形成においてSLR/ IAA14と相互作用する遺伝子座を同定する目的で、slrの 側根欠失表現型を抑制する変異体の単離と解析を行なっ まずEMSで変異原処理した約5000粒のslr-1種子の次 世代約30万個体から、側根形成を行なう系統を多数単離 した。それらはIAAI4遺伝子領域内に別の変異を持つ遺伝子内サプレッサー(slr-IRI~slr-IR4)と、他遺伝子座 に変異を持つ遺伝子外サプレッサー (slp, slr suppressor) とに分類された。そのうちslp1は単一劣性変異であり、 slp1 slr 二重変異体において側根形成異常のみが回復さ れ、他のslrの表現型(根毛形成・重力屈性異常)が回復 されない。したがってSLP1は側根形成特異的にSLR/ IAA14と遺伝的に相互作用すると考えられる。

2aF02

シロイヌナズナの不定根形成に関する温度感受性突 然変異体rodlの解析

小西美稲子¹, 杉山宗隆¹ (¹東大院·理·植物園)

シロイヌナズナの胚軸を発根誘導培地で培養すると不定根を生じる。私達はこの過程に異常の見られる温度感受性突然変異体を多数単離した。そのうちのひとつ、rod1 (root organization defective 1)について、表現型と責任遺伝子の単離を報告する。

rodl 変異体の胚軸を制限温度下、不定根誘導培地で培養すると、細胞増殖は開始し、不定根原基が途中まで形成されたが、それ以上発達せず、根端分裂組織の形成がおこらなかった。許容温度下で不定根原基を形成したrodl変異体外植片を制限温度下に移したときには正常な不定根が発達した。rodl変異体の胚軸を制限温度下、カルス誘導培地で培養すると、初期の増殖は正常におこるが、その後増殖が停止した。これらのことから、rodl変異は根原基または原基的な状態における細胞増殖の持続に特に強く影響すると考えられる。

に特に強く影響すると考えられる。 精密染色体マッピングにより、RODI遺伝子は4番染色体の83 cM付近に位置することが分かった。さらにnodI変異体のふたつのアリルについてこの領域の塩基配列を決定したところ、CDS.F17M5.260にそれぞれ異なるアミノ酸置換を伴う1塩基置換が見い出された。今後、変異形質相補能を調べて最終的な検定を行う予定である。

2aF03

アラビドプシス左巻き変異株*lefty*の解析 チタマデーシリポン¹,<u>橋本隆</u>¹ (¹奈良先端大・バイ オ)

アラビドプシス右巻き変異株spiral1(spr1)の根の表皮細胞層は右巻きにねじれており、固い寒天培地上を右方向に伸長する。spr1-1をEMS処理したM2世代植物体的ら、根が左方向に伸長する変異株lefty1とlefty2を単離した。lefty変異はspr1変異に対しepistaticである。遺伝子地図に基づき原因遺伝子を同定したところ、lefty1とlefty2ではそれぞれ異なる a チューブリンの同一のアミノ酸の置換変異であった。lefty1 は微小管薬剤(propyzamide, taxolなど)に対し高感受性であり、薬剤感受性は半優性を示した。<math>lefty1とlefty2の左巻き形質を野生型に戻異けたる。lefty1とlefty2の左巻き形質を野生型に戻異けた。a チューブリンにストップ・コドンがさらに挿入さまをスル変異であった。lefty型の変異 a チューブリンは表層微小管に取り込まれ、表層微小管は右巻きの配向を示した。

2aF04

改変チューブリン発現アラビドプシス植物体にみられる形態変化

阿部竜也¹, 直井国子¹, 樫木博昭¹, 橋本隆¹(「奈良先端大・バイオ)

当研究室では軸様器官の表皮細胞層が一定方向にねじれる変異株を解析している。spirallとspiral2では右巻きにねじれ、lefty1とlefty2では左巻きにねじれる。SPR1とSPR2は共に植物特有の新規の遺伝子であり、leftyは共にαーチューブリンのドミナントネガティブ変異であった。

 α -チューブリン6のN末端側にヘマグルチニンやmyc エピトープペプチドまたはGFPを付加し、CaMV35Sプロモーターで強制発現させたアラビドプシス形質転換植物体では導入した α -チューブリンが微小管ポリマーに組み込まれ、spiral変異株と同様に表皮細胞層が石巻きにねじれた。更に、一部の形質転換体系統ではトライューブリン6のC末端側にmycタグを付加して強制発現させたっした。これらの結果では、野生型形質を示した。これらの結列をで変化を引きを示した。なり、かり、加すると α / β -チューブリンダイマーの構造が微妙に変化すると α / β -チューブリンダイマーの構造が微妙に変化すると α / β -チューブリンダイマーの構造が微妙に変化するとにより、ねじれをはじめとする形態変化を引き起こしたと推定している。

2aF05

シロイヌナズナ右巻き原因遺伝子SPIRAL2の解析成田典之¹,橋本隆¹(¹奈良先端大・バイオ)

シロイヌナズナねじれ変異株spiral2(spr2)は花弁,葉柄,黄化胚軸などの軸様器官の表皮細胞列が右巻きにねじれている。 α -チューブリンのN末端に余分なアミノ酸を付加して強制発現させたアラビドプシス形質転換植物はspr2と同様の右巻きのねじれを示すことから,SPR2は微小管の機能に関与している可能性がある.

SPR2 を染色体地図を基にクローニングしたところ, SPR2はHEATドメインを持つ植物特有の新規タンパク質であった。HEATドメインはタンパク-タンパク相互作用に関わるモチーフである。SPR2-GFPをタマネギ表皮細胞で発現させたところ, 細胞質にドット状に局在した。シロイヌナズナゲノムにはSPR2ホモログが1つ存在する。この遺伝子SP2LにT-DNAが挿入したノックアウト株を単離したところ, sp21の雄ずいと花弁は未発達であった。spr2sp2l二重変異株の表現型, ならびにSPR2とSP2Lが変異形質を相互に相補できるか, など現在調べている

2aF06

微小管薬剤に対し高感受性を示すシロイヌナズナ変 異株の解析

直井国子1,金子弥生1,橋本隆1(1奈良先端大・バイオ)

シロイヌナズナの左巻きねじれ変異株leftyはpropyzamide等の微小管重合阻害剤に対して高感受性であり、 α-tubulin遺伝子のdominant negative変異である。微小管 の機能を分子遺伝学的に研究するため、propyzamide高感 受性変異株を新たに複数単離した。この中には、微小管 切断活性を持つとされるkatanin様遺伝子の変異と似た表 現型を持ち、このkatanin様遺伝子の近くに遺伝子座が マッピングされた変異株も含まれていた。また、この変 異株とは別の変異株42-31は劣性変異であり、薬剤を添 加していない寒天培地で発芽させると根がleftyと同様に 左方向に伸長する。また、42-31株はleftyとは異なり微小 管重合安定剤のtaxolには高感受性を示さなかった。42-31の遺伝子座は、第5染色体のやや北側にマッピングさ れ、新規な遺伝子座であった。42-31の遺伝子座が存在 する可能性のあるゲノム領域50kbにある予想遺伝子を全 てシーケンスしたところ、1つのORFにアミノ酸置換変 異を見出した。現在、この候補遺伝子を用いて相補試験 を行っている。

2aF07

フラベリアにおける基本転写因子 $FtTAF_{II}$ 18とそのシロイヌナズナホモログの性状解析

玉田洋介 1 , 中谷公美 1 , 古本強 1,2 , 畑信吾 1,2 , 泉井桂 1,2 (1 京大院·生命, 2 京大院·農)

2aF08

シロイヌナズナの側生器官の横側領域で発現している*PRS*遺伝子の機能解析およびプロモーター解析 <u>舟木俊治</u>¹, 松本任孝¹, 槻木竜二¹, 岡田清孝(¹京都 大院・理・植物)

pressed flower (prs) 突然変異体は、花序分裂組織及び花芽分裂組織に対する横側領域における器官形成に異常がみられる突然変異体である。prs 突然変異体では、花序分裂組織に対して横側のがく片が欠失または未発達になる。一方、向背軸側のがく片は正常な大きさまで成長するが、がく片の周縁部(花芽分裂組織に対し横側)に特有の細胞が欠失する。PRS遺伝子は核局在性を示すホメオドメインタンパク質をコードし、花原基、花器官および葉の横側で発現していることがすでに明らかにされている(1)。PRS遺伝子を異所的に発現させた形質転換植物体では、様々な器官の表皮細胞で細胞の異常な増殖、膨張がみられた。以上のことからPRS遺伝子は花原種、花器官、葉の横側領域の表皮細胞において細胞の増殖、伸長に関与してると考えられている(1)。

現在、PRS遺伝子の横側特異的発現を制御するシスエレメントを特定するためPRS遺伝子のプロモーター解析を行っている。また、35SプロモーターやPRSプロモーターを用いてPRS::GUS、あるいはPRS::GFP融合タンパク質を発現させ、タンパク質レベルでの発現と表現型を同時に解析する準備を進めている。これらの結果も併せて報告する予定である。

(1) Matsumoto & Okada (2001) Genes & Development 15, in press

2aF09

シロイヌナズナTCP遺伝子群の機能解析 武田泰斗¹,佐藤修正²,加藤友彦²,田畑哲之²,上口智治¹(¹名大・生物分子応答研究センター,²かずさ DNA研究所)

TCP遺伝子ファミリーはTCPドメインと名付けられた 高等植物固有のDNA結合ドメインをもつ蛋白質をコード している。シロイヌナズナにおいてTCP遺伝子は24個存 在し、それらは構造上の特徴からTB1/CYCタイプとPCF タイプの2種類に分けることができる。TB1、CYCはそ れぞれトウモロコシ、キンギョソウにおいて、側性器官 の成長を制御する因子として同定された。シロイヌナズ ナのTB1/CYCタイプに属するTCP遺伝子群の生物学的機 能を調べるために、T-DNA 挿入変異体のスクリーニン グを行い、TCP10遺伝子の変異体を単離した。 体のホモ接合体は矮性、暗緑色の葉、葉柄の伸長阻害、 稔実率の低下などの多面的な表現型を示す。過剰発現形 質転換体では逆に、胚軸や葉柄が伸長する。TCP10のフ ロモーター領域とGUSの融合遺伝子を導入した形質転換 体を解析することにより、TCP10の発現領域が胚軸、 葉、花柱に特異的であり、変異体において伸長阻害の見 られた花茎では発現していないことが明らかとなった。 これらの結果はTCP10が細胞の極性伸長を何らかの機構 で制御していることを示唆する。

2aF10

シロイヌナズナCUCI遺伝子はKNOX遺伝子を誘導する

檜原健一郎¹,高田忍²,田坂昌生¹(¹奈良先端大・バイオ,²RIBS岡山)

我々はシロイヌナズナにおいて茎頂分裂組織の形成お よび器官の分離に関与する CUC1 (CUP-SHAPED COTYLEDON1) を同定した。本研究ではCUC1の機能を 解析することを目的として、CUCIをCaMV35Sプロモー ターの制御下で過剰発現させた形質転換体 (35S::CUC1) の表現型の詳細な解析を行った。 35S::CUC1の芽生えでは、子葉の側面2カ所に対称性を 持った切れ込みが生じ、切れ込みの間の表皮細胞は小さ な細胞のまま保たれ、そしてその領域に異所的な不定芽が形成される。このことから、CUCIは子葉の細胞の一部を未分化な状態に保つことによって子葉上に異所的な茎頂分裂組織を誘導することが示唆された。現在までに 茎頂分裂組織の形成や維持に関与する遺伝子として STM、CUC2、WUS、KNATIなどが知られている。そこ で35S::CUCIにおけるこれらの遺伝子の発現を調べた。 その結果、異所的不定芽の形成に先だって子葉上にSTM およびKNATIが発現していた。次に両遺伝子の変異体 (stm-1、bp-101) でCUC1を過剰発現させたところstm の子葉上に不定芽は形成されず、bpの子葉上には形成さ れた。これらの結果からSTM遺伝子は35S::CUCIの子葉 上での不定芽形成に必須であるが、KNAT1は関与してい ないことが示唆された。

2aF11

茎頂分裂組織形成に関与するCUCI及びCUC2遺伝子に制御される遺伝子群の網羅的解析 富川泉¹, 田坂昌生¹ (¹奈良先端科学技術大学院大 学・バイオサイエンス研究科)

高等植物において、葉・茎・花など地上部の器官は茎 頂分裂組織 (SAM) から産生されるが、その形成や維持 に関わる分子機構はほとんど解明されていない。我々が 単離したシロイヌナズナのCUCI (CUP-SHAPED COTYLEDONI)、CUC2遺伝子は胚発生においてSAM形 成に必要であり、N末の保存されたNACドメインとC末の転写活性化ドメインとから成るよく似たタンパク質を コードする。通常cucl cuc2二重変異体由来のカルスで は、外来遺伝子を導入して不定芽を誘導すると野生型のものと比べほとんど不定芽を形成しない。しかし、CaMVの35Sプロモーターを融合させたCUCIもしくは CUC2遺伝子をcuc1 cuc2カルスに導入すると、高い不定 芽形成能を示す。そこで今回、ヘルペスウィルスVP16遺 伝子の転写活性化領域とグルココルチコイド受容体 (GR) を融合させたキメラ遺伝子 (35S::CUC1-VP16GR or 35S::CUC2-VP16GR) をcucl cuc2カルスに導入した。 その結果、グルココルチコイドの誘導体であるデキサメ タゾン依存的に高頻度で不定芽形成を誘導させることが できた。そこで、このシステムを用いてcDNAマイクロ アレイを行い、CUC1、CUC2遺伝子の下流で不定芽形成 に関与する遺伝子を網羅的に解析することを試みたので 報告する。

2aF12

シロイヌナズナの葉の左右相称的形成に関わる ASYMMETRIC LEAVES2 及び ASYMMETRIC LEAVESI 遺伝子の解析

岩川秀和¹, Endang Semiarti², 上野宜久¹, 小嶋晶子³, 塚谷裕一⁴, 町田千代子³, 町田泰則¹(¹名大院·生命理, ²Gadjah Mada Univ. Indonesia, ³中部大·応用生物, ⁴基生研)

2aF13

正常な葉身や葉脈の形成に必須な遺伝子産物AS1とAS2はclass1-KNOXの抑制因子である

上野宜久¹,岩川秀和¹,小笠原史明¹,荒木智史³,町田千代子⁴,町田泰則¹(¹名古屋大·院·理·生命理, ²Faculty of Biology, Gadjah Mada Univ., ³石原産業·中央研, ⁴中部大·応用生物)

葉身の形や葉脈パターンに異常のみられるシロイヌナズナの変異体asymmetric leaves1 (as1)およびasymmetric leaves2 (as2)では、葉片を培養すると、培地に植物ホルモンを添加しなくても、ある頻度でシュートを再生する。つまり、AS1、AS2は葉の分化状態の制御因子と考えられる。これらの変異体の葉では、class1-KNOXの転写産物が異所的に蓄積している。今回、AS1またはAS2-GR(グルココルチコイドリセプターとの融合タンパク質)を構成的に発現する形質転換シロイヌナズナをそれぞれ独立に作成し、交配した。予備的ではあるが、これらの形質転換体の茎頂におけるclass1-KNOXの転写産物体では発現が抑制されていた。以上の結果から、AS1とAS2-GR 上の結果から、AS1とAS2は共存することで茎頂メリステムにおいてもclass1-KNOXを抑制することができる制御因子であると考えられる。

2aF14

高等植物の葉の極性伸長制御遺伝子ANGUSTIFOLIA のゼニゴケ(Marchantia polymorpha)における相同遺 伝子MpANの単離と解析

上野華子¹, Gyung-Tae Kim³, 塚谷裕一^{3,4}, 梶川昌孝⁵, 大和勝幸⁵, 大山莞爾⁵, 小野莞爾², 高野博嘉² (「熊本大院・自然科学, ²熊本大・理・生物科学, ³基生研・統合バイオ, ⁴総研大・先導科学, ⁵京大院・生命科学)

シロイヌナズナのANGUSTIFOLIA(AtAN)遺伝子は、葉の細胞の横方向への伸長を制御する。コケ植物苔類のゼニゴケは単純な体制を持つ陸上植物で、その配偶体は葉状体と呼ばれる。ゼニゴケの葉状体は扁平で、系を持たない。見られない仮根や気室等を持つ一方維管束系に記すたない。また葉・茎・根の区別がない。ゼニゴケにおおるAN相同遺伝子MpANの解析は葉状体と葉の関係を知為来ない。またされる前遺伝子MpANの解析は葉状体とでの関係を知為来ない。となるだろう。MpANは最初ゼニゴケの未成熟を開と対応するゲノム領域が決定された。MpANは推定開始メチオニンからポリA直前まで2264bで、7つのエキソンからなり、推定アミノ酸数は639残基であった。在ANとの相同性は50%であった。サザン解析はMpANがシンからなり、推定であることを示した。葉状体のRNAとの相同性は50%であった。とを示した。葉状体のRNAとの用いたノーザン解析では2.9kpの転写を物が得られた。センス及びアンチセンスMpANを導入した形質転換ゼニゴケの作成と、シロイヌナズナへのMpAN遺伝子でが、これらの表現型の解析を進めている。

2aG01

Homodimeric formation of GhCesA2 expressed in insect cells

Yuri Ihara¹, Fukumi Sakai¹, Takahisa Hayashi¹ (¹京都大· 木質研)

The full-length GhCesA2 gene, a cotton homolog of bacterial cellulose synthase gene, was isolated from cotton (Gossypium hirsutum) fiber cells and expressed as a membrane-bound protein in insect cells using baculovirus systems. The hydrodynamic properties of the recombinant protein were determined in order to estimate its molecular weight in its native state. The recombinant GhCesA2 appeared three days post-infection with multiplicity of 10. The recombinant protein in the membrane fraction was solubilized with PBS containing 1% Triton X-100. The results obtained from gel-filtration chromatography of the recombinant GhCesA2 showed that the protein had two peaks in size. Each peak fraction was applied into H₂O/D₂O sucrose gradient sedimentation respectively and the partial specific volume, Stokes radius and molecular weight of the two protein-detergent complexes were calculated. The molecular weights of the two proteins were estimated as 142,000 and 285,000, showing that the recombinant GhCesA2 can form a homo-dimer.

2aG02

アラビドプシス温度感受性acw (altered cell wall)2変異体の解析

冨田啓治¹, 佐藤茂¹, 宮下京子¹, 掛川弘一², 石井 忠², 高部圭司³, 加藤友彦⁴, 柴田大輔⁴(¹王子製紙・森林資源研,²森林総研,³京大院・森林科学,⁴かずさ DNA研)

植物の細胞分裂では、プログラムに則って分裂面挿入位置が決定され、cytokinesisにはその位置に新たな細胞壁が合成される。これら一連の現象をつなぐメカニズムを明らかにすることは、植物の生長・分化を考える上で大変興味深い。細胞分裂面の方向異常がありかつ細胞壁合成にも異常を持つ変異なを解析することは、それらをリンクさせ制御しているメカニズムに関して、重要な知見が得られることが期待できる。

見が得られることが期待できる。 非許容温度下 (31°) で細胞伸長が阻害される温度感受性変異体acw2は、細胞壁の染色性の異常が電顕で観察されることから、細胞壁成分の変化が予想された。そこで、acw2の細胞壁成分の分析を行った結果、wtと比べセルロース量が約50%に減少していたことから、acw2はセルロース合成の変異体であることが明らかとなった。さらに、根端切片では、cell fileの異常もおきていることがわかった。これらの結果から、ACW2遺伝子はセルテ唆された。

2aG03

アラビドプシス温度感受性変異体acw2遺伝子の単離 と解析

佐藤茂¹, 冨田啓治¹, 宮下京子¹, 掛川弘一², 石井 忠², 高部圭司³, 加藤友彦⁴, 柴田大輔⁴(¹王子製紙・ 森林資源研, ²森林総研, ³京大院・森林科学, ⁴かずさ DNA研)

非許容温度下(31℃)で細胞伸長が阻害される温度感受性変異体acw2では、セルロース合成の異常だけでなく分裂面の方向異常もおきることから、ACW2遺伝子はセルロース合成だけでなく、分裂面決定過程にも関与することが示唆された。そこで、ACW2遺伝子のマップベースクローニングを行った。acw2変異遺伝子座は第5染色長腕のS0191からDFRの間にマップされ、F2個体389系域を用いてファインマッピングを行った結果、ACW2頃は約100kbに絞られた。次にこの領域をカバーするTACコンティグを構築し相補テストを行った結果、1つのクローンで相補に成功した。マッピングの結果と相補したTACクローンのオーバーラップから、ACW2遺伝子領域の全ORFの領域に存在することが示唆されたので、その領域の全ORFの領域に基基配列を決定した。その結果、1つのORFに塩基置換とそれに起因するアミノ酸の置換が生じている。現在このORF単独での相補テストを行っている。

2aG04

細胞壁再生過程におけるタバコpurple acid phosphataseの機能解析

<u>海田るみ</u>¹, 金子堯子² (¹日本女子大院・理・物生機能, ²日本女子大・理・物生)

私たちは、細胞壁に局在するpurple acid phosphatase (PAP)が、プロトプラストの細胞壁再生系において、β-グルカン微繊維を細胞膜上に蓄積させる働きを有すると 推論している1)。本機能の機構を解明するため、タバコ PAP遺伝子(TPAP4, TPAP12, TPAP19およびTPAP21) のプ ロトプラスト細胞壁再生過程における発現解析を行い、 TPAP12およびTPAP21の転写レベルが壁再生過程におい て速やかに増加することを確認した²⁾。そこで、本研究 では、ノーザンブロット解析で高い転写レベルが認めら れた TPAP12 を高発現する形質転換体を作製した。 TPAP12 cDNAのタバコ細胞XD-6への導入は、cDNAを binary vector, El2 Ω-GUS (Mitsuhara et al. 3) に挿入したコ ンストラクトを作製し、アグロバクテリウム共存培養法 によって行った。その結果、細胞壁酸性ホスファターゼ 活性が、野生型に比較して約15倍高い形質転換体が得ら れた。この転換体のプロトプラスト細胞壁再生系におけ るβ-グルカン微繊維の蓄積を観察した結果、野生型に 比べ転換体のβ-グルカン微繊維の蓄積が速まった。以 上の結果は、私たちが推論するTPAP12機能を証明する ものと考えられる。

- 1)日本植物学会2000年度大会研究発表記録P051
- 2)日本植物生理学会2001年度年会講演予稿集S133
- 3) Plant Cell Physiol. 37;49-59,1996

2aG05

連続的に過重力刺激に曝されたコムギ幼葉鞘細胞壁の構造

<u>若林和幸</u>¹, 曽我康一¹, 神阪盛一郎², 保尊隆享¹(¹大阪市大·院理, ²富山大·理)

私達は、地上の1gの重力下で生育したトウモロコシ 芽生えを過重力条件下に移すと、細胞壁多糖量やその分 子サイズが数時間以内に増加することを報告してきた。 しかし、連続的(長時間の)過重力刺激が細胞壁の構造 にどのように影響するのかについては明らかではない。 本研究では、300gの過重力条件下で発芽・生育したコム ギ芽生えを用い、幼葉鞘細胞壁構成成分の量や多糖類の 分子サイズについて検討した。3日及び4日間の連続的過 重力処理により、幼葉鞘の長さは対照の60-70%に減少 した。幼葉鞘の単位長さ当たりの細胞壁多糖量、特にへ ミセルロース性多糖量は過重力条件下で大きく増加した が、その分子量分布には対照と過重力処理の間で明らか な差は見られなかった。イネ科植物の細胞壁多糖に結合 し、架橋形成に関与するフェノール性化合物のフェルラ酸とその二量体であるジフェルラ酸を調べたところ、こ れらの量は過重力条件下で増加した。ジフェルラ酸の増 加は、4日間過重力処理した幼葉鞘で顕著であった。以 上の細胞壁成分の変化は、過重力に抗する強固な細胞壁 を構築する過程を構成すると考えられる。

2aG06

ユリ花粉管伸長における細胞壁関連遺伝子の発現解 析

竹田浩之¹,周薇²,劉希珍²,中川直樹¹,李一勤²,桜 井直樹¹(¹広島大·総合,²清華大·生命科学)

柱頭についた花粉が花粉管を伸ばすプロセスは植物の生活環の中で重要なプロセスであり、また先端生長の代表的なモデルとしても知られている。Kotakeらはユリ(Lilium longiforum)の花粉管細胞壁にexo-1,3:1,4-beta-グルカナーゼが存在することを報告した(Sex. Plant Reprod., 2000)。このユリのグルカナーゼのN末アミノ酸配列はオオギで報告されたグルカナーゼと酷似しており、またグルカナーゼ活性を持つことが確認された。このことは細胞壁に分泌されるグルカナーゼが花粉管の伸長に重要な働きをしていることを示唆している。

我々は花粉管が伸長する時にグルカナーゼ遺伝子が発現することを確かめるため、伸長中のユリ花粉管からRNAを抽出し、RT-PCRによってグルカナーゼcDNAをクローニングした。このcDNA断片からプローブを作成しノーザン法を用いて花粉管の伸長にともなうmRNA量の変化を確認した。また細胞壁多糖を切断、あるいは転移することで細胞壁の物性を変化させ、花粉管生長に寄与している可能性があると考えらどの他の酵素にもったり、それらの遺伝子のクローニングも試みている。これら遺伝子の発現解析の結果とあわせて花粉管伸長がどのように制御されているか考察する。

2aG07

モノクローナル抗体を用いて明らかになった木部分 化に伴う細胞壁成分のダイナミックな変化 篠原直貴¹,福田裕穂¹(「東大院・理)

近年、動物細胞において細胞外マトリックスが分化の制御に不可欠な役割を果たしていることが分子レベルで明らかになってきた。植物細胞壁は、動物の細胞外マトリクスに類似の超分子構造で、分化に伴ってダイナミシーを変化する。しかし、その分化における変化は、主に構造学的解析や全体の組成分析により明らかになってたもので、分子レベルでの変化は殆ど明らかにを虚成分をとい。そこで、本研究では、分化特異的な細胞壁成化にない。そこで、本研究では、分化特異することで、分ににとない。そこで、カローナル抗体を作製することで、分ににした。

木部分化を誘導できるヒャクニチソウ培養細胞の細胞壁を抗原として、ファージディスプレイ差し引き法にクリ分化特異的な三種類の細胞壁成分を認識するモノクローナル抗体を単離した。得られた抗体を用いれるで発表に共通して存在し、管状要素に共通して存在し、管状要素に共通して存在し、管状要素に共通して存在し、管状要素の二次壁にのみ一週的に出現するでは、では、管状要素の二次壁にのみ一週的に出現するではよいになった。これらの結果は、従来の方法では捕らかになった。これらの結果は、従来の方法では捕らかが難しかった細胞壁の分子レベルでの変化を捕らいまりが難しかった細胞壁の分子レベルでの変化を捕らいる。現在、抗原の機能を探る第一歩として抗原及び出る。現在、抗原の機能を探る第一歩として抗原及びより、その結果についても併せて報告したい。

2aG08

Involvement of Cellulase Activity in Cellulose Biosynthesis Yong Woo Park¹, Takahisa Hayashi¹ (¹Wood Research Institute, Kyoto University)

When young poplar leaf was cultured in the presence of radioactive sucrose, autoradiography showed that radioactivity incorporated into cellulose corresponded to both expression patterns of two poplar cellulases. In addition, the inhibitor of cellulose biosynthesis not only inhibited cellulose deposition but also repressed the cellulases. Thus, the promoters of cellulases are involved in cellulose biosynthesis as a common key regulation at transcriptional level in poplar. Here, we isolated the cellulase negative mutants of Acetobacter xylinum, which resulted in the low production of cellulose. Then, the complement with cellulase caused the mutants to produce the high level of cellulose. We have concluded that the endohydrolysis of $1,4-\beta$ –glucan is probably associated with cellulose deposition.

2aG09

単子葉イネ科植物の芽生え細胞壁中に存在するアミ ラーゼの特性

<u>宇野久仁子</u>¹, 曽我康一¹, 若林和幸¹, 神阪盛一郎², 保尊隆享¹ (¹大阪市大·院理, ²富山大·理)

双子葉植物であるエンドウ芽ばえ細胞壁から抽出され たタンパク質画分に、アミラーゼ活性が存在することが 報告されている。しかし、単子葉イネ科植物では、発芽 過程での種子アミラーゼに関する研究は数多くなされて いるが、芽ばえ細胞壁中のアミラーゼに関する報告はな い。本研究では、オートムギ及びトウモロコシ芽ばえを 用いて、細胞壁画分に含まれるアミラーゼの特性について検討した。暗所で生育させた芽ばえを磨砕し、細胞壁を十分に洗浄した後に高濃度のNaCl(1-3 M)で抽出され る細胞壁タンパク画分を調べたところ、確かにアミラー ゼ活性が検出された。活性は、両植物とも幼葉鞘の成長 に伴って増加し、その後減少する傾向を示した。次に、 このタンパク質画分に含まれる活性をイオン交換及びゲ ルろ過カラムにより精製した結果、数種のアミラーゼア イソザイムが存在することがわかった。これらの中に は、オリゴマルトースを基質とした場合に、2糖単位で 加水分解するものと単糖にまで分解するものが存在し た。また、これらのアイソザイムは4.0-6.5に至適pHを 持っており、一部はSDS-PAGEにおいて、約40kDaの単 ーバンドを示した。

2aG10

あて材形成で発現が誘導される塩基性ペルオキシ ダーゼの全長cDNA

<u>馬場啓一¹</u>, 日尾野隆² (¹京大·木研, ²王子製紙·森 林資源研)

あて材は、重力方向の変化を感知して形成される特殊 な二次木部である。広葉樹の引張あて材の二次壁は、通 常の材よりもセルロースが多くリグニンが少なく、また ミクロフィブリルが細胞長軸にほぼ平行に配向する。引 張あて材は引張の生長応力を発生することにより、伸長 生長の終わった幹や枝を重力に対して正しい位置に戻す 機能がある。これまでに筆者らは、ユーカリを用いて引 張あて材形成中の木部分化帯で特異的に発現する遺伝子 のcDNAクローンを9種得ていたが、いずれも5'側を大き く欠いた不完全なものであった。今回、それらクローン のうち塩基性ペルオキシダーゼと高い相同性を示したク ローンについて、ほぼ全長と思われる配列を得た。予想 される翻訳領域はアミノ酸で333残基、分子サイズ37.6 kDであった。この予想されるアミノ酸配列で相同性検索 を行ったところ、多くの塩基性ペルオキシダーゼにヒッ トした。特にワタやダイズの種子由来や、タバコの分泌 性のPOと80%以上の高い相同性を示した。また、ペルオ キシダーゼに必須といわれる3カ所の配列も良く保存さ れていた。高い相同性を示した相手も、植物中における 役割については未だ不明のようで、記載が無かった。-方、モノリグノールの重合に働くと言われるペルオキシ ダーゼ群とは相同性が低く、別の何らかの役割を果たし ていることが考えられる。

2aG11

高等植物糖ヌクレオチド合成酵素群のクローニング 小林優¹, 大屋文代¹, 中川広宣¹, 須田泉¹, 宮川功¹, 間藤徹¹(¹京都大院・農・応用生命・植物栄養学)

我々の目的は、細胞壁多糖の機能解析のため多糖の分子構造を改変した変異体植物を作出することである。そのような変化は、多糖への糖供与体である糖ヌクレオチドのプールサイズを操作することで起こる可能性がある。そこで現在高等植物の糖ヌクレオチド合成酵素群のクローニングを進めている。これまでにUDP-D-glucuronateを基質とする以下の2酵素について実験を行った。

(1) UDP-D-glucuronate carboxy-lyase (UDP-D-xylose synhase)

エンドウからアフィニティクロマトグラフィーを用いて酵素を精製し、部分アミノ酸配列を基にcDNAを取得した。本酵素は可溶性・膜結合型の両方が存在すると考えられているが、今回精製した蛋白質は可溶性であった。推定アミノ酸配列のN末端には精製酵素に存在せずシグナルペプチドと考えられる領域が存在したが、その配列からターゲティングを予測することはできなかった。

(2) UDP-D-glucuronate 4-epimerase

本酵素はStreptococcus pneumoniaeでクローニングされている。そのホモログをシロイヌナズナcDNAライブラリから単離し、組換蛋白質の酵素活性について検討中である。

2aG12

Isolation and characterization of an Arabidopsis vw331 mutant defective in root and hypocotyl elongation

伏木田地¹, Ryuji Tsugeki¹, Shigeru Sato², Keiji Tomita², Tadashi Ishii³, Koichi Kakegawa³, Kiyotaka Okada¹ (¹京都大学大学院理学研究科植物学教室, ²Oji paper Co. Ltd., Forestry Research Institute, Nobono-cho 24-9, Kameyama, Mie 519-0212, ³Forestry and Forest Products Research Institute, P. O. Box 16, Tsukuba Norin Kenkyu Danchi-nai, Ibaraki 305-8687)

Plant cells are enclosed with rigid cell wall. Cell elongation therefore requires cell wall expansion. During cell wall expansion, cellulose polysaccharides are known to be newly synthesized and rearranged into cell wall components. However, the process and its regulatory mechanism are still unclear.

The vw331 mutant is defective in cell elongation of roots and hypocotyls. In vw331, the surfaces of these organs were abnormally bulging, which was due to swelling of epidermal, cortex and endodermal cells. vw331 was allelic to acw7, in which cellulose contents were decreased. VW331 was mapped on the top of the chromosome I. In the finely mapped region, there is no gene known to be required for cell wall biosynthesis, suggesting that VW331/ACW7 encodes a novel component for cellulose biogenesis coupled to cell elongation.

2aG13

植物の "Cell Wall Integrity Signaling" について 中川直樹¹, 桜井直樹¹(「広島大・総合科学)

細胞にとって、その表面(細胞表層)は外部環境と相互作用するフロンティアであり、細胞機能の細胞膜の外側に細胞壁が発達している。近年、酵母やカビで強力とは、細胞壁の健全性(Cell Wall Integrity)が、細胞表層の強度ととれる。近年、で動りないの強情や、細胞骨格を制御する。を表して働いていることが明らかになっ存在し、XTH(xyloglucan endotransglucosylase hydrolase) 遺る(PCP 42(2): 240(2001))。しかし、植物では細胞壁の異常また、のシグナルが環境にと細胞壁の異常またかするととではない。酵母では組みに関する知見は全くない割も定をのとがない。酵母では組みに関する知見は全くす役割とに気達する仕組みに関する知見は全くす役割とでのシグナルが環境に、細胞壁の異常にいる。対するのとグナルが環境に、細胞壁の異常にいる。対することが知られている。成阻害剤に対することが知られている。成阻害剤に質を調べなが変化することが知られている。現在その性質を調べている。変異遺伝子のマッピングを行なっている。

キュウリ苗条の緑化におけるカボチャ根導管液中のゼアチン-O-グルコシドの関与

加藤千尋¹,加藤尚志²,浅見忠男²,吉田茂男²,野田響¹,鎌田博¹,佐藤忍¹(¹筑波大·生物,²理研·植物機能)

高等植物は、根と地上部といった異なる環境に適応し た器官をもち、これらの器官は相互作用することで個体 統御に関わっている。根から地上部へと流れる導管液中 には様々な有機物質が含まれていることが明らかになっ ており、今回、栄養成長段階のカボチャの根から採取し たカボチャ根導管液をSephadexG-25ゲル濾過カラムに よって分画したところ、ギュウリ黄化子葉の緑化誘導の 系において、高い緑化促進活性が見出され、この活性は 土壌の水分環境を多湿にすることにより減少した。そこ で、この促進因子をHPLCシステムの逆相ODS-120Tカラ ムと順相Spherisorb W silicaカラムに順次かけることで精 製し、LC/MS/MSによって同定したところ、この緑化促 進因子は従来不活性型サイトカイニンと報告されていた ゼアチン-O-グルコシド (ZOG) であることがわかっ た。また、このZOGはゼアチンや導管液中に存在するこ とが知られている輸送型サイトカイニンのゼアチンリボ シドに比べてはるかに高い活性を有し、極低濃度であっ ても活性を現した。また、土壌を湿潤状態することによ り導管液中の濃度の低下が確認された。

以上のことから、土壌の環境状態を認識し、根で合成されて導管を介して輸送され、地上部の葉の緑化を制御する生理活性因子の一つとして、従来不活性型と言われていた糖結合型サイトカイニンZOGが重要な役割を担っていることが考えられた。

2aH02

根導管液中に存在するゼアチンリボシドによる不定 根形成の抑制

黒羽剛¹, 加藤尚志², 浅見忠男², 吉田茂男², 鎌田博¹, 佐藤忍¹(¹筑波大·生物, ²理研)

2aH03

ジベレリンと光周期によるキュウリ根導管液タンパク質XSP30の遺伝子発現制御

小田篤¹,作田千代子¹,朝比奈雅志¹,增田進²,鎌田博¹,佐藤忍¹(¹筑波大·生物,²野田産業科学研究所)

2aH04

タマネギ(Allium cepa L.)の鱗茎形成を制御する内生 因子

<u>斎藤新</u>¹,幸田泰則¹(¹北海道大院·農)

タマネギの鱗茎形成は長日条件下で起こる。鱗茎形成 を引き起こす内生的な要因として、鱗茎形成促進因子 (Bulbing hormone) と鱗茎形成阻害因子 (Bulbing-inhibiting hormone) の存在が想定され、鱗茎形成は両者のバ ランスによって制御されているのではないかと考えられ ている。様々な植物ホルモン類がそれぞれの候補に挙 がったが、いずれの植物ホルモン類も鱗茎形成を十分に 説明出来なかった。そこで、本研究ではタマネギの鱗茎 形成を制御する内生因子を調べるために、まず、特定の 矮化剤と高濃度ショ糖を用いて、無菌培養下で鱗茎形成 が確実に起こるような実験系を開発した。この実験系を 用いて、タマネギ植物体中に含まれる内生因子について 検討したところ、タマネギの葉身のエタノール抽出物から得られたヘキサン可溶性分画に強い鱗茎形成阻害活性 が、また水溶性分画には鱗茎形成促進活性がみられた。 この鱗茎形成阻害活性の経時的変化について検討したと ころ、鱗茎形成開始に先立って活性は大きく減少し、鱗茎肥大の完了に伴い、再び活性が増加することが分かった。こうしたことから、この鱗茎形成阻害活性は先に述 べた鱗茎形成阻害因子であると考えられる。現在、 この 活性について純化を進めており、鱗茎形成促進活性との 関連についても調べていきたい。

ダイコン(Raphanus sativus L.)の抽だい阻害物質の検出

吉田祐子1,幸田泰則1(1北海道大院・農)

ダイコンは代表的な二年生植物であり、抽だい・開花 には冬の低温とその後の長日条件を必要とする。栄養生 長の段階ではロゼット形であり根が肥大するが、生殖生 長に移行すると急激な茎の伸長(抽だい)を起こし開花 に至る。これまでの研究では、内生GA量の増加によっ て抽だいが開始するとされてきた。しかし、抽だいの直 前にそれを説明できるほどの内生GA量の増加は起こっ ていないという報告が出された。そこでいくつかのGA、 投与実験を行ったところ、低温処理により外生のGAに 対する感受性が上昇すること、また易抽性の品種のほう が晩抽性の品種に比べてGAに対する感受性が高いとい うことが分かった。これらの結果は「抽だい阻害物質」 が存在し、その量によってGAに対する感受性が決定さ れる可能性を示している。ロゼット葉に含まれる抽だい 阻害活性の検出を試みた結果、強い活性が検出された。 この抽だい阻害活性の経時的変動を調べたところ、その 活性は急激に抽だいが起こる時期に大きく低下すること が判明した。また抽だいの完了に伴い、再び抽だい阻害 活性が検出されるようになった。以上の結果より、ダイ コン植物体中には抽だい阻害物質が存在し、この物質が ロゼット形の維持に働き、抽だいを制御しているものと 思われた。またGAに対する見かけ上の感受性もこの物 質の量によって決定されるものと考えられる。現在この 活性物質の純化を試みている。

2aH06

イネの体内でジベレリンはどこで合成されどこで受 容されるか

金子美幸!, 伊藤博紀!, 松岡信! (!名大・生物分子応答センター)

ジベレリン(GA)は、発芽、節間伸長、花芽形成等を 制御するホルモンであり、生合成酵素遺伝子や情報伝達 に関与する遺伝子が多数単離されている。しかしGAが いつどこで合成され受容されるかについては不明な部分 が多い。本研究ではGAがイネの形態形成にどのように 作用するのかについて解析する目的で、GA合成の最終 段階を触媒する酵素遺伝子 OsGA20ox、OsGA3ox1、 OsGA3ox2 と情報伝達に関与する遺伝子D1 (G protein αsubunit)、SLRI、GAMyb の器官特異的な発現を、各遺伝子のプロモーター領域にGUS遺伝子を連結したキメラ遺 伝子を導入して得られた個体を用いて観察した。イネに おいてGAの最も顕著な生理作用であると考えられてい る節間伸長は、栄養生長から生殖生長への転換以降に生 じる現象である。実際、伸長節間では、花での特異的発 現が報告されているOsGA3ox1を除き供試したすべての 遺伝子の発現が伸長帯で観察された。また、栄養成長期 の茎頂ではOsGA3ox2、D1、SLR1の発現が観察され、生 殖生長への転換期にはGAMybの発現も観察された。以上 の結果から、栄養成長から生殖生長への転換期における GAの果たす役割について考察する。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。

2aH07

イネジベレリン2酸化酵素による内生ジベレリン含量 の制御

坂井美穂¹, 坂本知昭², 斎藤臣雄³, 松岡信⁴, 萱野暁明¹, 田中宥司¹, 小林正智⁵(「生物研, ²筑波大・農林, ³理研・植物分子, ⁴名大・生物分子応答, ⁵理研・バイオリソース)

ジベレリン (GA)2酸化酵素は、2位の炭素を水酸化することにより、活性型GAおよびその前駆体を不可逆的に不活性化する。シロイヌナズナから単離されたGA2酸化酵素遺伝子は、GA処理による負のフィードバック制御を受けたことから、植物体内における活性型GA含量の調節に関与していると考えられている。一方、演者らがイネから単離したGA2酸化酵素遺伝子OsGA2oxIの発現は、栄養生長期の茎頂基部に局在しており、活性型GAおよびGA合成阻害剤の処理の影響を受けなかったことから、内生の活性型GA含量の調節には関与していないと考えられた。

そこで演者らは、イネの内生 GA 含量の調節に関与している、新規のGA2酸化酵素遺伝子の単離を試みた. OsGA2ox1との相同性を利用したスクリーニングにより、2種類の候補遺伝子、OsGA2ox2とOsGA2ox3が得られた. OsGA2ox2は野生型イネのいずれの器官にも発現が確認されなかったが、OsGA2ox3は供試した全ての器官において発現が認められた. またOsGA2ox3 の発現量は、活性型GA処理により増加し、GA合成阻害剤処理により減少した. これらの結果から、OsGA2ox3はイネ素の内生活性型GA含量の調節に関与するGA2酸化酵構基礎研究推進事業の支援を受け推進された.

2aH08

細胞内局在性から見た非メバロン酸経路におけるIPP イソメラーゼの必要性

岡田憲典¹, 笠原博幸², 神谷勇治² (¹東京学芸大・生物, ²理化学研究所・植物科学センター・生長生理研究グループ)

全てのイソプレノイドの基本骨格となるイソペンテニル2リン酸(IPP)は、2つの独立した経路であるメバロン酸経路と非メバロン酸経路により生合成される。続くイソプレノイド生合成では、IPPは異性体のジメチルアリルニリン酸(DMAPP)に変換される必要があり、この反応をIPPイソメラーゼ(IPI)が触媒する。とご直接が、近年、非メバロン酸経路では、IPPを介さずまグロン酸経路で果たす役割について疑問が生じている。Arabidopsisにおいても2種のIPIアイソザイム(IPP1, IPP2)が報告されているが、それらの細胞内局在性や非メバロン酸経路との関りは明らかにされていない。

そこで本研究では、ArabidopsisのIPIの細胞内局在性について、GFPを用いて観察を行った。その結果、cDNA中にトランジットペプチド様配列をコードするIPP2遺伝子は、IPP2-GFP融合タンパク質として発現させた場合、ミトコンドリアに局在していることが明らかとなった。一方、cDNAの配列中にトランジット様配列を持たるいIPP1遺伝子は、細胞質に留まることが予想されるものの、IPP1遺伝子のゲノミック配列中にトランジット様配列が存在のの、IPP1遺伝子のゲノミック配列中にトランジットは配列が存在のの、IPP1遺伝子のゲノミック配列中にトランジットは配列が存在していても観察を進めている。現在、持つとIPIL-GFPについても観体を作成中であり、IPIの持遺性のアンチセンス植物体を作成中であり、IPIの持遺性理作用からも、非メバロン酸経路との関係をさらに追求して行きたい。

ジベレリンは葉緑体の非メバロン酸経路により生合成されるか?

<u>笠原博幸</u>¹, 山口信次郎¹, 葛山智久², 神谷勇治¹ (¹理 化学研究所・植物科学センター・生長生理研究グ ループ, ²東大・分子細胞生物学研究所)

ジベレリン (GA) はジテルペン系植物ホルモンであ り、その前駆物質であるカウレンは葉緑体内でゲラニル ゲラニルニリン酸 (GGPP) より生合成される.一方. GGPPはイソペンテニルニリン酸 (IPP) とジメチルアリ ル二リン酸 (DMAPP) から生合成されるが、高等植物 ではメバロン酸 (MVA) 経路が細胞質やミトコンドリア で、最近見い出された非メバロン酸 (nonMVA) 経路が 葉緑体で、それぞれIPP/DMAPPの生合成に関わること が示されている. GA生合成の初期段階においてはnon-MVA経路により産生されたIPP/DMAPPがGAに変換さ れていると推測されるが、未だこれを証明した報告は無 い. 本研究ではnonMVA経路の1-デオキシ-D-キシル ロース5-リン酸合成酵素 (DXS) に欠陥を有するアラビ ドプシスのclal-1変異体を用い、[2-13C]1-デオキシキシ ルロースを投与した際にnonMVA経路由来の代謝物を効 率的に標識する実験系を開発した. GC/MS分析の結果, ¹³C-ラベルされたカウレンが優位に検出されたことか ら, 高等植物においてnonMVA経路由来のIPP/DMAPP がGAに変換されていることを証明した。また2つの生合 成経路の細胞内クロストークを追究する目的で、MVA経 路由来のIPP/DMAPPが葉緑体内の代謝物に変換される かについても検討している.

2aH10

種子発芽時の低温処理によるジベレリン生合成酵素 遺伝子の発現誘導

山内雪香¹, 小川幹弘¹, 神谷勇治¹, 山口信次郎¹ (「理 化学研究所植物科学センター生長生理研究グループ)

種子発芽は、水・光・温度などさまざまな環境要因によって制御されている。シロイヌナズナにおいては、吸水後の低温処理や光が種子の休眠打破に働くことが知られている。植物ホルモンのひとつであるジベレリン(GA)は、その生合成変異体(ga1, ga2, ga3)が発芽出来ないこと、および活性型GA生合成の最終ステップを触媒するGA 3-oxidaseをコードする2つの遺伝子(AtGA3ox1、AtGA3ox2)の発現が光制御を受けることから、発芽の制御に重要な働きを持つと考えられる。

マイクロアレイを用いた解析から、GA 生合成関連遺伝子のうち、AtGA3ox1遺伝子のmRNAレベルが乾燥種子と比較して、低温処理(4℃、2日間、暗所)後に顕著に増加していることを見出した。一方、AtGA3ox2のmRNAは検出限界以下であった。次に吸水後4℃または22℃に暗黒下で2日間おいた種子を用いて各遺伝子のmRNAレベルをリアルタイムPCRを用いて調べたところ、4℃においたものでは22℃に比べてAtGA3ox1のmRNAが顕著に高かった。更に、発芽過程においてGA依存的に発現が誘導されるエクスパンシンおよびシステインプロテアーゼをコードする遺伝子のmRNA量も低温処理により上昇していたことから、低温処理が活性型GA生合成に促進的に作用することが示唆された。

2aH11

シロイヌナズナの種子発芽過程におけるジベレリン 応答遺伝子群の解析

<u>小川幹弘</u>¹, 山内雪香¹, 豊増知伸², 大塚稔², 桑原亜由子¹, 花田篤志¹, 神谷勇治¹, 山口信次郎¹ (「理化学研究所植物科学センター生長生理研究グループ, ²岩手大学大学院連合農学研究科)

ジベレリン (GA) はシロイヌナズナの種子発芽過程 に必須であり、その生合成に欠陥を有するgal-3などの 突然変異体はGAを投与しない限り発芽することができ ない。本研究では発芽過程におけるGAの作用を調べる ために、マイクロアレイ (GeneChip, Affymetrix) を用い て、発芽時GAに応答する遺伝子を調べた。シロイヌナ ズナのGA欠損突然変異体であるgal-3にGAを与えた場 合に、約800遺伝子の転写量の変化が認められた。伸長 生長に関わると推定されるエクスパンシンや種子貯蔵物 質の分解に関わる加水分解酵素遺伝子群のmRNA量が GA処理で顕著に増加した。情報伝達に関わると推定さ れるいくつかのプロテインキナーぜや転写調節因子など もGA依存的にmRNA量が変化した。興味深いことに、 アブシジン酸、ブラシノライド、エチレンなど発芽に関 わる他の植物ホルモンの生合成量が、GA依存的に変化 する可能性が示唆された。次に、gal-3へ外からGAを与 えた実験より得られたこれからGA応答遺伝子群が、野 生株の発芽過程で内生GA量の増加に対応して変化する かどうかを調べた。その結果、gal-3へGA処理後短時間 でmRNA量が増加する遺伝子は、野生株の発芽時に吸水 後短時間で増加するなど、高い相関性が認められた。

2aH12

bZIP型転写因子RSGによるジベレリン生合成酵素遺伝子の発現制御

<u>深澤壽太郎</u>¹, 神谷勇治², 高橋陽介¹(¹東大院·理, ²理化学研究所)

RSG は bZIP 領域を持つタバコの転写活性化因子である。ドミナントネガティブ型 RSG によりRSGの機能を抑制した形質転換タバコは、活性型ジベレリンGA1量が低下し矮化した。形質転換植物にGA を投与すると個体の形態は対照植物とほぼ同程度まで回復した。これまでに我々はRSGがGA生合成酵素の一つent-カウレン酸化酵素をコードするシロイヌナズナGA3を活性化すること、RSGの機能を抑制した形質転換タバコではent-カウレン酸化酵素遺伝子の発現が低下している事を報告した。

最近、シロイヌナズナの全6種のGA生合成酵素遺伝子の同定が完了した。RSGが他のジベレリン生合成酵素遺伝子の発現も制御している可能性について検討するため、タバコの全6種のGA生合成酵素遺伝子cDNAをクローニングし、RSGの機能を抑制した形質転換タバコで発現を定量的 RT-PCR によって解析した。その結果、RSGの機能を抑制した形質転換タバコで発現量が低下しているのはent-カウレン酸化酵素遺伝子のみであることが明らかとなった。したがってRSGの機能を抑制した形質転換タバコでのGA内生量低下はent-カウレン酸化酵素遺伝子の発現減少が原因と考えられる。さらに、タバコのent-カウレン酸化酵素遺伝子のプロモーターを単離し、RSGはプロモーター領域に直接結合し転写を活性化できることを明らかにした。

シロイヌナズナのGA3β-水酸化酵素,GA4の発現制御機構の解析

松下茜¹, 高橋陽介¹(¹東大院·理)

ジベレリン (GA) は、発芽から種子形成まで多くの 局面で作用する植物ホルモンである。GA合成酵素の-つであるGA 3β-水酸化酵素は活性型GAの合成を直接触 媒し、GA合成系において重要な役割を持つ。シロイヌ ナズナにおいてこの酵素遺伝子は小さなファミリーを形 成しているが、中でもGA4は、その発現量から主要なGA3 β -水酸化酵素遺伝子であり、その発現制御はGAの作用する組織、時期の決定に重要であると考えられる。ま た同遺伝子、及びGA 20-酸化酵素遺伝子、GA 2-酸化酵 素遺伝子は、内生GA量に応じて転写レベルでフィー バック制御を受けることが知られている。フィードバッ ク制御はGAのシグナル伝達系と合成調節系の接点であ り興味深いシステムであるが、その制御の分子メカニズ ムについてはほとんど解明されていない。本研究では GA4のフィードバック調節と組織特異的発現に関与する シス領域を決定するため、まず様々な長さのGA4プロ モーターにレポーターとしてGUSを結合したコンストラクトを有する形質転換体を作製し、フィードバック制御に重要なシス領域の同定を試みた。その結果、フィードバック調節には5'上流域2000 bpで十分であり、フィード バック制御に重要な領域を200 bpの範囲まで限定した。 現在更に詳細な解析を行っている。

2aI01

イネ登熟種子で発現する新規LOX遺伝子(9-LOX1) 水野幸一¹, 高野淳¹, 飯田年以², 横山峰幸², 藤村達 人¹(¹筑波大・農工系, ²資生堂・基盤研)

イネ種子にはリノレン酸の9位を過酸化する9-リポキシゲナーゼ(LOX)の強い活性があることが知られている。しかし、近年解析が進んでいるジャスモン酸の生合成に関与する13-LOXと異なり、その機能については不明な点が多い。本研究ではこの9-LOX遺伝子の単離と機能解析を目的とした。今回は、イネ登熟種子より新規LOX遺伝子を単離し、大腸菌の発現系を用いてその組換え型酵素について調べたので報告する。

数種の高等植物から同定されているLOXのアミノ酸配 列を比較し、それらの保存領域に相当する合計4種類の オリゴヌクレオチドを設計した。これらをプライマーと してイネ登熟種子のmRNAを鋳型にRACEを行った。そ の結果、最終的に1種類の完全長cDNAの単離に成功し た。これをプローブとしたノーザンブロット分析より、 開花後7日から10日の種子での発現を確認した。またサ ザンブロット分析の結果から、この遺伝子はシングルコ ピーであることが判明した。大腸菌の発現系を用いて得 られた組み換え型酵素の粗抽出液をSDS-PAGEに供した ところ、塩基配列から推定される分子量と一致する約 97kDaのバンドが見られた。この粗酵素液の活性を調べ たところ9-HPOTの生成が見られ、イネ種子より抽出し たLOXの基質特異性および生成物特異性と同様に9位酸 化型LOXであることが示された。以上より本遺伝子をイ ネ9-LOX1と命名した。

2aI02

DNAマクロアレイを用いたABA代謝関連P450遺伝子の探索

山本幸美¹, 松原俊介¹, 田窪桂子¹, <u>太田大策</u>¹(¹阪府大院·農)

アブシジン酸 (ABA) は、ABAの8'位水酸化によって 生成したPhaseic Acidを経てDihydrophaseic acid-4-O-glucosideに至る経路によって代謝される. ABAの8'位水酸 化反応は、P450モノオキシゲナーゼ (P450) によって触 媒され, この経路の律速段階であると考えられている が, その実体は不明である. 本研究では, 植物組織中で のABAレベルを人為的に操作することを目的として,本 P450遺伝子の同定とcDNAクローニングを開始した. ウモロコシ懸濁培養細胞では、ABA添加によって本酵素 活性が迅速に誘導され、10数時間のタイムコースで最大 活性に到達し、その後は低下することがわかっている. そこで、シロイヌナズナ個体を発芽後1週間、白色連続 光下で液体振盪培養した後, 200 μMの (7) -ABAを添 加13時間後にサンプリングし、このABA処理によって誘導されるP450遺伝子をDNAアレイフィルターを用いて探 索した. シロイヌナズナゲノム上には273個のP450遺伝 子が存在し、そのうち約100個のESTがフィルター上にカ バーされている.解析の結果,4種類のP450遺伝子の転 写産物量が、それぞれ14倍、10倍、8倍、7倍に上昇して いた. 今後, これらのP450遺伝子の発現誘導タイムコー スを個別に解析し、全長cDNAクローニングと組換えタ ンパクの発現により、その酵素活性を検討する. (本研 究では、シロイヌナズナDNAアレイコンソーシアムによ るアレイフィルターを使用した)

2aI03

アラビドプシスのメチル化結合ドメイン(MBD)タンパク質

伊藤美佳子¹, 小池晶子¹, 山口夕¹, 小泉望¹, 佐野浩¹ (¹奈良先端大・遺伝子教育研究センター)

脊椎動物のゲノムでは5'-CpG-3'のシトシンがメチル 化修飾を受ける。その生理機能は長く不明であったが、 最近、メチル化シトシン(5メチルシトシン)に結合す るタンパク質(MBD)が見いだされた。MBDタンパク質 はヒストンデアセチラーゼなどと複合体を形成し、転写 の調節に関与する。植物ではCpGに加えてCpNpGのメチ ル化も起こり、動物とは異なる転写制御系の存在が推定 された。私たちは植物のMBDタンパク質を解析するため アラビドプシスのゲノムシークエンスを探索し、 チル化結合ドメイン (MBD) を持つ配列 を8個、同定し た(AtMBD1~8)。GFPとのフュージョンタンパク質をタ マネギ細胞に導入したトランジェントアッセイでは、全 て核に移行した。しかし、大腸菌で発現したタンパク質を用いて、ゲルシフトアッセイをしたところ、AtMBD5 のみが5メチルシトシンを認識した。AtMBD5は器官別の ノーザン解析により、特に花で強く発現をしていた。 た、AtMBD5プロモーターにMBD5-GFPをつないだ遺伝 子を導入したアラビドプシス形質転換体では、核にGFP シグナルが観察された。これらの結果からAtMBD5は植 物細胞DNAのメチル化シトシンに結合し、動物のMBD に類似した機能を持つ新規のタンパク質であることが示 唆された。

2aI04

液胞プロセシング酵素によるタバコ植物PRタンパク質のin vitroプロセシング

中嶋英裕¹, 西村いくこ², 西村幹夫³, 道家紀志¹, 川 $\frac{1}{1}$ (「名大・院生命農, ²京大・院理, ³基生研・細胞生物)

タバコ植物を疫病菌菌体壁成分(HWC)やサリチル酸(SA)のような種々のエリシターで処理すると、過知を感細胞死を含む種々の抵抗反応が誘導されることが知れている。タバコ葉をHWCあるいはSAで処理するとの変胞タンパク質の成熟化に関与するシステインプテーゼである液胞プロセングで酵素(VPE)の遺伝おけれている液胞であるため、今回、VPEの応にタンパク質として感染解異的タンパク質(PR-タンパク質)とでおいば一般では、これらのVPEによるin vitroでのプロセシングを検討した。タバコキチナーゼとのプロセシングを検討した。タバコキチナーゼッとアローとシングを検討とせ、VPEで処理した後それぞれの抗体を用いたウエスタン解析を行った。キチルでの場合、反応時間の経過に伴い51kDaのバンドの増に予想される32kDaのバンドの満少とプロセシング後に予想された。一方、PI-IIの場合、反応時間の経過にれる36kDaのバンドの減少とプロセシング後に予想された。

2aI05

GUS遺伝子との融合遺伝子を用いたシロイヌナズナにおける3種のMGDG合成酵素遺伝子の発現解析 小林康一¹, 粟井光一郎¹, 島田裕士¹, 増田建¹, 高宮建一郎¹, 太田啓之¹(「東工大・大学院生命理工)

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) は緑色光合成細菌の一部および、植物やラン藻などの酸素発生型の光合成生物に特徴的な糖脂質であり、葉緑体チラコイド膜においては50%以上を占める膜構成脂質である。また、MGDGが光化学系?の反応中心に強く結合していることが最近報告され、MGDGが直接的に光合成に関与している可能性も示唆されている。

我々はシロイヌナズナより3つのMGDG合成酵素遺伝 子 (atMGD1、atMGD2、atMGD3) を単離し、その発現 や機能の解析を行っている。以前に行われたRT-PCRに よる組織特異的発現解析から、atMGD1は調べたすべて の器官で主要に発現し、atMGD2、atMGD3はそれぞれ 花、根といった非光合成器官で特異的に発現することが わかっていた。そこで、より詳細な発現部位を調べるた めに3種のMGDG合成酵素遺伝子のプロモーターとGUS 遺伝子の融合遺伝子をシロイヌナズナに導入した形質転 換体を作成し、その発現解析を行ったので報告する。ま た、リン酸欠乏時にこれまでに知られている主要なガラ クト脂質の合成経路とは異なる合成経路が働くことが最 近報告されたことから、同条件における各MGDG合成酵 素遺伝子の発現をRT-PCRおよびGUS遺伝子を用いたレ ポーター解析で調べたのでその結果も合わせて報告す る。

2aI06

ラン藻の糖脂質合成経路は2つ存在していた 川畑千絵¹, 萩尾美樹², 粟井光一郎¹, 島田裕士¹, 増 田建¹, 高宮建一郎¹, 和田元², 太田啓之¹ (¹東工大・ 大学院生命理工, ²九大院・理・生物)

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) は光合成生物に 多量に存在する糖脂質であり、ラン藻および高等植物の 葉緑体チラコイド膜で共に50%以上を占める主要な膜構 成脂質である。この様なラン藻と葉緑体の脂質組成の相 似は細胞内共生説の一つの根拠ともなっているが、 MGDGの合成経路はラン藻と高等植物では異なることが 知られている。植物ではUDP-ガラクトースを糖供与体 とし、ジアシルグリセロールを基質として合成されるの に対し、ラン藻ではUDP-グルコースを糖供与体として グルコースが転移された後、異性化酵素によってMGDG が合成される事が示されている。今回我々は2種のラン 藻 (Synechocystis PCC6803、Anabaena PCC7120) におい て膜画分を調製し、放射性化合物で標識したUDP-糖を 用いて酵素活性を調べ、UDP-グルコース依存の経路だ けではなく、UDP-ガラクトース依存のMGDG合成経路 の存在を示す結果を得た。このことは、ラン藻に植物と 同じタイプのMGDG合成酵素が存在していることを示唆 している。しかし、全ゲノム配列が公開されているこれら2種のラン藻に、植物のMGDG合成酵素と相同性のあ る遺伝子が存在しないことから、ラン藻では高等植物と は全く違うタイプのタンパク質がMGDG合成を担ってい ると考えられる。

2aI07

シロイヌナズナ葉組織破壊によって誘導される膜脂 質分解代謝系

松井健二¹,小田久美子¹,浜満寛子¹,梶原忠彦¹(¹山口大·農)

【目的】植物は害虫や草食動物などによる食害、ある いは風雨などによる傷害を受けた時に、その傷口からの 病原菌感染を防ぐために種々の生化学反応を引き起こ す。その中には膜脂質の分解から始まる脂肪酸代謝系が 含まれ、短鎖アルデヒドは数分で大量に生成される。し かし、この時の脂質代謝系に関しての精細な研究はな く、膜成分のどの脂質がどのような機構で分解されてい くかについては明らかでない。そこで、シロイヌナズナ 葉組織破壊に伴う脂質の分解過程と短鎖アルデヒドなど の脂質から誘導されるオキシリピン類の生成過程を詳細 に検討した。【方法】シロイヌナズナロゼット葉を凍結 融解、あるいは乳鉢により破砕した。抽出した脂質はこ 次元TLCにより各脂質種に分離し、エステル交換反応 後、脂肪酸メチルエステルとしてGC-MSにより定量し た。短鎖アルデヒドはヒドラゾン誘導体、酸化脂肪酸類 は蛍光誘導体とし、それぞれHPLCで定量した。【結果】 シロイヌナズナ葉を破砕するとMGDGが急激に減少し た。中でも18:3 (n-3)、16:3 (n-3)の減少が顕著であっ た。ガラクト糖脂質から生成した18:3、16:3はその多く がリポキシゲナーゼにより酸化され、短鎖アルデヒド、 ケト酸、ヒドロキシ酸へと変換された。現在、このガラ クト糖脂質加水分解に関与する酵素について検討を進め ている。

2aI08

植物の茎の伸長におけるリン脂質合成の役割 溝井順哉¹,中村正展¹,西田生郎¹(¹東大・院理・生 物科学)

2aI09

植物培養細胞においてショ糖飢餓条件下でおこる生 体膜リン脂質分解

<u>井上悠子¹</u>,福井雅子²,森安裕二²,三好泰博² (¹静岡県大·院·生活健康,²静岡県大·食品栄養)

植物培養細胞をショ糖飢餓条件下に置くと、正味のタンパク質分解やリン脂質分解が起こることが知られている。私たちはこれまでこれらの分解の機構を解析し、タンパク質分解は主に自食作用を介して起こるが、リン脂質の分解は自食作用とは異なる機構を介して起こることを明らかにしてきた。さらにこのリン脂質の分解が、培地にグリセロールを添加することにより阻害される事を明らかにした。

本研究ではリン脂質分解の機構をさらに詳しく知るために、蛍光色素で標識した脂肪酸およびホスファチジルコリンを、タバコおよびシロイヌナズナの培養との動向を蛍光顕微鏡で観察した。その動向を蛍光顕微鏡で観察した。その動向を蛍光顕微鏡で観察した。とり込まれた蛍光がショ糖飢餓処理後約12時間には液的に移動することが分かった。ケスに対して、培地にグリセロールを添加してが、当た知能では、蛍光が液胞に移動すず、細胞内にと対とした細胞では、蛍光が液胞に移動すず、細胞内が、現を持つ顆粒が蓄積した。私たちはこれらの異粒が、現を持つ顆粒が蓄積した。私たちはこれらの異粒が、現在質分解の機構と関連のある構造であると考え、現在さらに詳しく調べている。

2aI10

ラン藻光合成系におけるPGの役割 須田邦裕¹,佐藤典裕¹,都筑幹夫¹(¹東京薬科大・生 命科学)

CDP-diacylglycerol synthase (CDS) はphosphatidylglycerol (PG) 合成経路上の酵素である。我々は以前、ラン藻 Synechocystis sp. PCC6803からCDS遺伝子を欠損した変異株 (SNC1) を作製し、その解析からPGが生育に必須であり、またChlの蓄積に貢献することを示した¹。本本ではSNC1株を利用して、光化学系の存在量の規定や高さはSNC1株を利用して、光化学系の存在量の規定や高さないでの光合成能維持において、PGが果たへ移行すると、その後の細胞分裂と共に細胞当たりのPG含量が減少する。この移行後、経時的にチラコイド膜を単し、dodecylmaltoside-PAGEにかけたところ、PSI complexの存在量の減少が細胞当たりで観察された。また、チラコイド膜タンパク質のSDS-PAGEにより、PSI及びPSII複合体サブユニットの存在量の減少が認められた。以上の結果は、PSI、PSII両複合体の存在量の維持にPGが公上の高温ストレスにSNC1を曝し、CO、依存性の光合成能の測度速度を調べたところ、PG添加条件で生育させた細胞に比べ、非添加条件へ移行後、24時間以上経過した細胞でより速い減衰が観察された。以上の結果は、PGが光合成能の熱安定性に関与することを示している。

1 Sato, N. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10655-10660.

2aI11

シロイヌナズナにおけるホスファチジルグリセロー ルの機能

| 萩尾美樹¹, 桜井勇¹, 佐藤修正², 加藤友彦², 田畑哲|| 之², 和田元¹(¹九大・院・理, ²かずさDNA研究所)

ホスファチジルグリセロール (PG) は酸性のリン脂質であり、プラスチド、ミトコンドリア、小胞体で合成される。これらのオルガネラ膜を構成するPGは、各膜の機能発現において重要な機能を持つと考えられるが、その機能はまだ明らかになっていない。

本研究では、高等植物における PG の機能を明らかにするために、まずシロイヌナズナからPG合成に関わるホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素をコードする遺伝子(PGPI)を同定した。次に、その遺伝子が破壊されたタグラインをスクリーニングし、得られたPGPIタグラインの性質を野生株と比較した。PGPIタグラインはアルビノの表現型を示し、葉肉細胞において葉緑体が未発達であった。また、葉や根の発達が悪く、発芽後3週間程で成長が停止した。これらの結果は、PGが植物の発生や成長において重要な機能を担っていることを示している。

2aI12

シロイヌナズナのセリンパルミトイルトランスフェ ラーゼ遺伝子の解析

松村牧¹,森潤一郎¹,森本泰明¹,今井博之¹(「甲南 大・院・生物)

スフィンゴ脂質生合成の最初の段階を触媒する酵素セ リンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) は、 SPTLC1とSPTLC2の2種類の遺伝子によってコードされる ヘテロ二量体酵素である。我々は、シロイヌナズナより SPTをコードすると思われる遺伝子を2種類単離し、それ らの遺伝子産物が確かにSPT活性を有することを昨年度 報告した (AtLCBIおよびAtLCB2.1と名付けた)。最近、 AtLCB2.1と非常に相同性の高い遺伝子がもう一つシロイ ヌナズナゲノムに存在することが分かったので、本研究では、この遺伝子(AtLCB2.2)を解析した。AtLCB2.2の cDNAは1,470 bpのORFを含み、489アミノ酸(推定分子 量54,000) をコードし、3つの膜貫通領域をもつことがわ かった。また、AtLCB2.1 タンパクのアミノ酸配列と AtLCB2.2タンパクのアミノ酸配列を比較すると、91%の 相同性が見られ、AtLCB2.2タンパクはAtLCB2.1タンパ クと同様にピリドキサル5'-リン酸結合領域をもつこと がわかった。現在、酵母のlcb2欠損株においてAtLCB2.2 を発現させ、SPT活性の解析を進めており、あわせて報 告する。

2aI13

シロイヌナズナにおけるセラミダーゼ遺伝子のクローニングと機能解析

森本泰明¹, 寺田志穂¹, 森潤一郎¹, Mao Cungui², Obeid Lina², <u>今</u>井博之¹ (¹甲南大・院・自然科学, ²サウスカロライナ医科大・医生化)

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド長鎖塩基 (LCB) に、主として2-ヒドロキシ脂肪酸がN-アシル結合したセ ラミドを基本骨格とする。セラミダーゼはこのN-アシル 結合を加水分解する反応を触媒する酵素である。本研究 では、シロイヌナズナを用い、酵母のアルカリ性セラミ ダーゼ (yeast phytoceramidase, YPC1p) とアミノ酸配列 の相同性を有するcDNAのクローニングを行い、その機 能を調べた。クローニングされた cDNA (Arabidopsis thaliana phytoceramidase遺伝子, AtPHC1) はORFが768 bp、予想されるアミノ酸配列は255アミノ酸残基からな り、YPC1pと43%の相同性を示した。このAtPHC1タン パクを、酵母のセラミダーゼ遺伝子欠損株 $(\Delta ypc1 \Delta ydc1)$ で過剰発現させると、セラミダーゼの 活性が検出された。この結果は、植物において初めてセ ラミダーゼの存在を示唆するものである。またRT-PCR 法により、シロイヌナズナの組織でのAtPHCIの発現を 調べた結果、根、茎、葉および花でmRNAの存在が確認 された。現在、GFPによるAtPHC1タンパク質の細胞内局 在の解析を進めている。また、培養細胞を用いて AtPHC1遺伝子の発現レベルに及ぼす各種スフィンゴ脂 質合成阻害剤の影響を解析しており、あわせて報告す る。

2aJ01

活性酸素によるタンパク質へのグルタチオンの結合 伊藤寿¹,岩渕雅樹¹,小川健一¹(「岡山県生物科学総合研究所)

植物細胞は様々なストレスによって活性酸素を生じ、活性酸素消去系が誘導される。また、病害抵抗性反応において、活性酸素を生成し、シグナル伝達物質として利用していると考えられている。このように、植物細胞には活性酸素を認識する機構が存在するが、その詳細は不明である。そこで我々は活性酸素によりグルタチオンが結合するタンパク質が活性酸素を認識していると考え、ビオチン標識したグルタチオンを利用し、その解析を行った。

材料はアラビドプシスの培養細胞を用いた。界面活性 剤を含まない緩衝液中で破砕し、遠心によって不溶物を除き、可溶性画分を得た。ビオチン標識したグルタチオンは、グルタチオンとbiotinamidocaproic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimideを脱水縮合することによって得た。ビオチンはストレプトアビジン・ホースラディッシュパーオキシダーゼによって検出した。培養細胞の可溶性画分とビオチン標識したグルタチオンをインキュベートし、電気泳動、ブロッティングしたところ、いくつかのバンドが検出された。これよりグルタチオンが結合するタンパク質が存在することが示された。

次に、グルタチオンエチルエステルをビオチン標識 し、培養細胞とインキュベートした。過酸化水素をイン キュベート中に加えた場合、グルタチオンが結合するタ ンパク質が可溶性画分に存在することが明らかになっ た。

2aJ02

アクティベーションタグラインを用いた、硫酸イオン、システイン、およびグルタチオン高蓄積変異株の 選抜

<u>栗津原元子</u>¹, 早瀬亜紀子¹, 小林正智², 野路征昭¹, 山崎真巳¹, 関原明³, 篠崎一雄³, 斉藤和季¹(「千葉大院・薬, ²理研・バイオリソースセンター, ³理研・植物分子生物)

高等植物において、根から取り込まれた硫酸イオンは、システインに同化され、さらにタンパク質やグルタチオンなどの様々な化合物として、生体内で利用される。現在までに、硫黄同化に関わる酵素タンパク質をコードする遺伝子のほぼすべてが明らかにされ、それらの発現様式についての制御に関わる要因および遺伝子は、未だ明らかにはされていない。

演者らは、硫黄同化系の制御に関わる因子の解明を目的とし、アクティベーションタグラインを用いて、硫酸イオン、システイン、グルタチオンなどの、硫黄同化系に関わる化合物含量の変化した変異株の単離を目指している。これらの変異株では、硫黄同化系の酵素遺伝子が活性化されていることが期待され、制御に関わる遺伝子が活性化されていることが期待され、かになることが期待される。

1次スクリーニングとして、約6000ラインのアクティベーションタグラインのシロイヌナズナを約3週間生育させ、各個体ごとに硫酸イオン濃度をキャピラリー電気泳動を用いて、システインおよびグルタチオン濃度をHPLCを用いてそれぞれ測定し、各化合物の蓄積量の変化したラインを選抜中であり、現在までにいくつかの候補株が得られている。これらのラインについて2次スクリーニングを行っているところである。

2aJ03

イネ糖センサー型ヘキソースキナーゼOsHXK1の機能 解析

<u>砂子智美</u>', 吉野聖¹, 山口淳二¹(¹北大院・理・生物 科学)

高等植物の細胞内糖濃度認識に関与する糖センサーとしてヘキソースキナーゼが注目されている。私たちは現在までイネよりヘキソキナーゼ2種類(OsHXKI、2)、フルクトキナーゼ2種類(OsFRKI、2)をクローニングし、その中でOsHXK1のみが糖センサーとして働いていることを明らかにしてきた。本研究ではヘキソキナーゼによる糖濃度認識機構の一端を明らかにすることを目的としてOsHXK1の機能解析を行った。.

まず、ヘキソースキナーゼの酵素化学的な解析を行った。OsHXK1タンパク質を大腸菌で発現させ検討したところ、OsHXK1は ADPに強く阻害されることが明らかとなった。また、GFP融合タンパク質を用いて細胞内局在性について調べた結果、OsHXK1はミトコンドリアに局在していたことが確認できた。これらのことからOsHXK1の糖濃度認識にはミトコンドリアのATP/ADP比が重要であることが示唆された。

2aJ04

Tos17ミュータントパネルから選抜したスターチシンターゼI型イネ変異体の性質

藤田直子^{1,2}, 宮尾安藝雄³, 廣近洋彦³, 中村保典^{1,2} (¹秋田県大·生資, ²戦略的基礎研究推進事業, ³生物研)

イネのデンプン合成には10種類以上のアイソザイムが関連しており、各アイソザイムの機能解明のために、それらの変異体の解析が必要不可欠である。本研究では、レトロトランスポゾンTos17を用いたノックアウトイネ集団からこれまでいかなる植物でも単離されていなかったスターチシンターゼI型(SSI)の変異体を選抜した。その解析結果を以下に示す。1)Tos17はSSI遺伝子のイントロン2に挿入されていた。2)変異体ホモ個体はSSI酵介を野生型のものと比較すると、グルコース重合度(DP)が8-15の α -1,4鎖が減少していた。4)糊化粘度ピーク値が野生型よりやや低く、糊化開始温度、糊化熱量は野生型よりやや高かった。

以上の結果から、この変異体では SSI 活性が低下したことでアミロペクチンの構造が変化し、それが原因で粘度特性や糊化特性が変化したものと考えられた。また、イネのSSIはDP8-15の α -1,4鎖を合成する機能を持つと考えられた。さらに、イネ胚乳の可溶分画ではSSIがメインのSS活性を示すが、その活性の大部分が低下したにもかかわらず、種子重量やデンプン粒の形態には大きな変化がないことが明確になった。

2aJ05

コムギIsoamylase遺伝子を導入したイネsugary-I変異 体の解析

<u> 久</u>保亜希子^{1,2}, Rahman Sadequr³, Morell Matthew³, 宇 垣正志⁴, 佐藤光⁵, 原田久也⁶, 中村保典^{1,2} (¹秋田県 大・生資, ²CREST, ³CSIRO, ⁴東大・農, ⁵九大・農, ⁶千葉大・園芸)

我々はこれまでに、胚乳にフィトグリコーゲンを蓄積 するイネsugary-1変異体を用いた研究から、Sugary-1遺 伝子がデンプン枝切り酵素(DBE)のひとつであるイソア ミラーゼ(ISA)をコードする事を明らかにした。本研究 では、コムギISA遺伝子を含むBACクローンをイネsugary-1変異体に導入した形質転換体の解析を行った。種 子の形質はしわ型から正常型になり、種子断面のヨウ素 反応の結果、胚乳にデンプンが蓄積していることが明ら かになった。胚乳に蓄積するα-ポリグルカンの分子構 造解析の結果、α-ポリグルカンの分子構造がフィトグ リコーゲン型からアミロペクチン(AP)型へかわってい ることが分かった。しかし、正常型のAPとは完全に同一ではなく、DP12までが多く、DP13から24までが少ない 傾向があった。また、形質転換体におけるDBE活性を Native-PAGE/活性染色法を用いて検出したところ、コム ギ由来と思われるISAのバンドが観察されたが、イネの ISAと比較して活性が低い事が分かった。これらの結果 から、1) コムギISAがsugary形質を相補する事が明らか になり、ISAがAP合成において鍵となる役割を持つこと が強く示唆された。2) 形質転換体でコムギISAがイネ ISAの機能を完全には相補できないのは、発現したISA活 性が低いか、両種のISAの機能が異なることが原因であ ると推測された。

2aJ06

種々の炭素源によるイネ培養細胞における澱粉合成 関連遺伝子の発現応答

秋廣高志¹, 水野幸一¹, 藤村達人¹ (¹筑波大院·農)

【演題】種々の炭素源によるイネ培養細胞における澱粉合成関連遺伝子の発現応答

【目的】植物の澱粉の蓄積は、糖代謝産物や植物ホルモンによって巧妙に制御されていることが示唆されている。本研究では、イネ培養細胞 (Oryza sativa L. cv. Nipponbare) を用いて、その澱粉合成に対する炭素源の影響を調べた。

【方法】イネカルスの培養には N6D 培地を基本とし、 炭素源を0-10%のスクロースまたはグルコースとした培 地を用いた。浸透圧による影響を考慮して22%のPEGを 含む培地も用いた。澱粉合成応答は培養後のカルスをヨ ウ素染色し調べた。澱粉含量はグルコアミラーゼ消化炭 水化物として求めた。転写レベルにおける澱粉合成関連 酵素遺伝子(AGPase, GBSS, SSS RBE)の応答はActin1 の転写量を内部標準としてノーザンブロット分析によっ て解析した。

【結果】糖を含まない培地、PEGを含む培地では、カルスはヨウ素液では染色されなかったが、糖を含む培地で培養したカルスはヨウ素液で濃く染まった。これらの澱粉含量を測定した結果、10%のグルコースを含む培地で多くの澱粉が蓄積することが分かった。ノーザンブロット分析の結果、糖を含まない培地、PEGを含む培地では、澱粉合成関連酵素遺伝子の転写量に違いは見られなかったが、糖を含む培地で培養した場合には相違が認められた。

2aJ07

タイバジル(Ocimum basilicum 'Siam Queen')種子表層の構造と繊維状多糖

三宅寛子1, 坂本正弘1, 東順一1(1京大院・農)

バジル(Ocimum basilicum L.)の種子は、水にひたすと表層が膨潤し水和コロイドを形成する(ISWPC III, 166-169, 1999)ので、目薬や食材として用いられている。本研究では、タイバジル(O. b. *Siam Queen')の種子の表層の構造を観察するとともに、表層構成物質の分画と水和コロイド物質の単離・精製を試み、その化学的性質を分析した。

2aJ08

超高圧電顕トモグラフィー法を用いた分裂準備帯の 小胞分布の定量的解析

唐原一郎¹, Marisa Otegui², Andrew Staehelin², 峰雪芳 宣³(¹富山大・理・生物, ²MCD Biology, University of Colorado at Boulder, ³広島大・院・理・生物科学)

分裂準備帯(PPB)は、植物の細胞の分裂直前に出現する、微小管が細胞表層に帯状に並んだ構造である。PPBは前中期に消失するが、PPBの存在していた位置に細胞板が挿入されるため、細胞板の挿入に必要な因子がPPBの位置に蓄積されると考えられている。PPBに小胞が存在することは、PPBの役割を探る上で興味深い。私達はこれまでに、加圧凍結したタマネギ子葉表皮細胞を用いた足量的解析を行った。その結果、PPB領域においては、PPB以外の領域に比べて20倍の解像度を持つ超高圧電顕・詳細に超で存て20倍の解像度を持つ地高、产品に出る。とに、PPBにおける小胞の形態を開切に表を用いて、PPBにおける小胞の形態を関切に表を用いて、PPBにおける小胞の形態を対して観り、クラスリン被覆小胞と、内容物の電気があることに気付いた。

本研究では、PPBに加えて間期細胞の表層領域における超高圧電顕トモグラフィー法を行い、小胞の形態および3次元分布を定量的に解析した。PPB領域に見られた2種類の小胞は、間期細胞の表層領域にも見られ、いずれの領域においても、電子密度が高い小胞はクラスリン被覆小胞よりも細胞膜から離れた距離にまで分布していた。しかし、電子密度が高い小胞の直径の分布はPPB領域と間期細胞の表層領域において異なっていた。

2aJ09

急速凍結法を用いた水溶性蛋白質の細胞内局在の電 子顕微鏡による定量的解析

<u>吉田智子</u>¹, 久田明子², 矢部寿美子², 古谷雅樹^{1,3} (¹日立計測器サービス, ²日立中央研究所, ³日立基礎 研究所)

光照射により細胞内局在が顕著に変化するフィトクロムAをモデルとし、抗フィトクロムAアポ蛋白(PHYA)抗体を用いた金コロイド標識の免疫染色により、電子顕微鏡レベルで水溶性タンパク質の局在検出を試みた。試料固定に急速凍結法を導入し、自動化した金属圧着式の装置(Hisada et al, PCP 42: 885, 2001)を用いて液体ヘリウム温度で再現性よく試料を凍結した。

5 日齢のエンドウ黄化幼植物に赤色光 (cR) を異なる 時間照射した後に、上胚軸フック部分を摘出して急速凍 結および凍結置換法により試料を作製し、免疫染色によ りPHYAの細胞内局在を観察した。核膜からの距離ごと に単位面積あたりの金粒子の数を比較したところ、照射 1分では細胞質に多く、5分あるいは10分では核で増加し て核と細胞質とでほぼ同程度となった。20分では核膜の 内側1μm以内に多く、30分では核の中心部に多かった。 一方、光照射により形成される凝集体の数を核と細胞質 で比較したところ、5分では核と細胞質に同程度、10分 では両方で増加、20分、30分に細胞質で減少し、3時間 では核でも減少した。以上より、PHYAはcR照射により 細胞質から核へ移行することを電子顕微鏡レベルで初め て確認できた。これらの結果から、急速凍結-凍結置換 法により、水溶性タンパク質の細胞内局在変化を高い時 間分解能で定量的に解析できることが判った。

2aJ10

PENDタンパク質の細胞内局在の解析 寺沢公宏¹,大木康人¹,佐藤直樹¹(「埼玉大・理)

PENDタンパク質は、エンドウ葉緑体の包膜に存在す るDNA結合タンパク質である。N末端近くにbZIP様の DNA結合ドメインがある。シロイヌナズナの第3染色体にあるATF4F15.280と,アブラナの核の転写因子として発 表されているGSBF1(X91138)が、エンドウのPENDと相 同であることがわかった。新たに、ソメイヨシノ・キュ ウリ・イネからも、相同なゲノム配列を得た。PENDタンパク質が被子植物に広く存在し、cbZIP領域とC末端の 膜貫通領域が特によく保存されていることがわかった。 以前の研究で、開始コドンの上流-132からcbZIP領域の 途中+265までを,GFPのコード領域と融合させてできる融 合タンパク質が、葉緑体に局在し約半数の細胞ではさら に核にも局在することが報告されている。シロイヌナズ ナとアブラナのゲノム配列を用いてGFPとの融合遺伝子を作り、これをプロトプラストに導入し発現させ、融合 タンパク質の局在を観察したところ、細胞核と葉緑体の 両方に局在することが認められた。PENDタンパク質の 全長を含むコンストラクトについても,報告する予定で ある。

2aJ11

シロイヌナズナ新規液胞膜シンタキシン関連分子 AtSYP5の解析

佐藤雅彦 1 , 光田展隆 2 , <u>植村知博</u> 3 (1 京大·総合人間, 2 京大院·人間環境学, 3 京大院·生命科学)

演者らは出芽酵母のvam3変異を相補するシロイヌナ ズナのたんぱく質としてAtVam3を単離し、その解析を 行い、AtVam3は液胞膜に存在するシンタキシンファミ リーに属するたんぱく質であることなどを明らかにして きた。しかしながら、現時点でAtVam3に相互作用し、 液胞への膜輸送に働いているたんぱく質は同定されてい ない。一方、動物の後期エンドソームの融合の過程では Syntaxin7, Syntaxin8, Vti1b, VAMP8などのSNARE分子が複合体を形成することが知られている。我々はAtVam3が Syntaxin7に高い相同性を持つことに注目し、Syntaxin7に相互作用するSyntaxin8に相同性を持つ分子をシロイヌナ ズナゲノムより探索した。その結果、AtSYP51,AtSYP52 というSynaxin8に有意な相同性をもつ分子を同定した。 AtSYP51とAtSYP52は互いに81.0%の相同性を持ち、膜輸 送過程で同じ機能を持つことが推定された。AtSYP51に 対する抗体を用いてショ糖密度勾配遠心法により解析し たところ、AtSYP51はPPaseの存在する画分に存在するこ とがわかった。また、AtSYP51,AtSYP52にGFPを融合したコンストラクトを作成し、シロイヌナズナの培養細胞に一過性的に発現させ解析したところ両たんぱく質とも 液胞膜に存在することがわかった。

2aJ12

シロイヌナズナv-SNARE分子の細胞内局在の系統的 解析

植村知博¹,中田真美¹,光田展隆²,竹安邦夫¹,佐藤 雅彦³(¹京大院·生命科学,²京大院·人間環境学,³ 京大·総合人間学)

シロイヌナズナのt-SNARE 分子は AtVam3,AtPep12, KNOLLE, AtTIg2, AtSed5など様々なものが単離され、解析されている。一方、v-SNARE分子はシロイヌナズナゲノム上に多数存在することは確認されているが、その多くは機能、細胞内局在などまだ未同定である。我々はつロイヌナズナゲノム配列からすでに酵母、動物などで同定されているv-SNARE分子の配列を元にして24種類のv-SNARE分子を同定した。次にそれらを分子系統樹に従い。8つのグループに分類し、それぞれのグループに属するv-SNARE分子のGFP融合たんぱく質を作成し、シロイヌナズナ培養細胞に発現させて、それぞれの細胞内局在を調べた。その結果、グループ1に属するv-SNARE分子はAtVAMP727を除いて全て細胞膜に局在していた。グループ3に属するv-SNAREは小胞体に、グループ4,5は液胞膜に、グループ6はPVCと細胞膜か液胞膜、グループ7、8はゴルジ体に局在していた。AtVAMP727はFM4-64を用いた解析からエンドソームに局在することが示唆された。現在全てのv-SNAREの組織特異性も解析中である。

2aK01

ユビキチン結合酵素NtUBC2は物理的にも機能的にも タバコ転写抑制因子ERF3と相互作用する 小山知嗣^{1,2}, 岡田崇¹, 北島佐紀人^{1,3}, 高木優⁴, 進士 秀明⁵, 佐藤文彦^{1,2}(「京大院・農, ²京大院・生命科 学, ³RITE, ⁴産総研・ジーン, ⁵産総研・分子細胞)

エチレン応答性転写因子ERFは植物特有のDNA結合領域を持つ転写因子ファミリーであり、転写活性化因子と抑制因子が存在する。ERF転写抑制因子はERF転写活性化因子による転写を抑制することができることより、ERF転写抑制因子の活性制御は標的遺伝子の発現調節に重要であると考えられる。

これまでにERF転写抑制因子の遺伝子発現レベルでの解析は行われてきたが、翻訳後制御に関する知見は少ない。転写因子の翻訳後制御はタンパク質間相互作用を介して行われることが知られていることより、タバコ転写抑制因子ERF3と相互作用するタンパク質を酵母two-hybrid systemにより探索した。その結果、ユビキチン結合酵素NtUBC2を単離した。また、NtUBC2がERF3に特異的な領域と相互作用し、ERF2転写活性化因子とは相互作用しないことを明らかにした。また、一般的遺伝子型現実験においてNtUBC2の活性中心に変異を持つ変好の状UBC2はERF3の転写抑制活性を増強したことから、NtUBC2がERF3の転写抑制活性の制御に関与することが考えられた。

2aK02

キチンエリシター応答性RING fingerタンパク質EL5は ユビキチンリガーゼ(E3)である

 $\frac{6 + 6 \times 1}{6}$, 松田憲之², 中野明彦², 長谷川宏司¹, 秋本千春³, 渋谷直人³, 南栄一³ (¹筑波大, ²理研, ³農業生物資源研究所)

エリシター活性をもつキチンオリゴマー (N-アセチ ルキトオリゴ糖)をイネ培養細胞に処理すると、RING-H2フィンガータンパク質をコードする遺伝子EL5が誘導 される。近年、いくつかのRINGフィンガータンパク質 がE3として機能することが示されており、EL5について もその可能性を検討した。EL5とマルトース結合タンパク質(MBP)の融合タンパク質(MBP-EL5)を、ユビ キチン活性化酵素 (E1)、Ubc4/5サブファミリーのユビ キチン結合酵素 (E2)、ATPおよびユビキチンと共に反応させたところ、ユビキチン化によるMBP-EL5の分子 量の増加が確認された。EL5はMBPをユビキチン化する 活性があり、またEL5のRING-H2フィンガー中のCys残 基をSer残基に置換するとその活性は消失した。以上の 結果から、EL5はE3活性をもつと結論された。また、イ ネ EST から同定した Ubc4/5 サブファミリーの E2 (OsUBC5a, 5b) を用いても、MBP-EL5のユビキチン化 反応が観察された。さらに、OsUBC5bはEL5と同様にキチンエリシターによって誘導されることが明らかになっ た。これらの結果から、EL5とOsUBC5bは植物のエリシ ター応答反応におけるユビキチン/プロテアソーム系に よるタンパク質分解に関わることが示唆された。

2aK03

イネ培養細胞原形質膜に存在するラミナリオリゴ糖 結合蛋白質の親和性標識による検出

伊藤ユキ¹,前原有美子²,山口武志¹,渋谷直人¹(¹農業生物資源研究所,²植物ゲノムセンター)

ラミナリン(直鎖 β -1,3グルカン)及びラミナリオリゴ糖は、イネを含む多くの植物に種々の生体防御反応を引き起こすことが知られている(1)。我々はイモチ病菌細胞壁 β -グルカンのうち特定の構造を持つオリゴ糖が、イネ懸濁培養細胞にフィトアレキシンを誘導することを報告しているが(2)、このエリシターの結合部位同定の試みの過程で、原形質膜上にラミナリオリゴ糖と結合する蛋白質が存在することを親和性標識により見出した。

ラミナリン (L.digitata) およびラミナリオリゴ糖 (DP=8-15)の125I誘導体を調製し、この親和性標識リガンドを水性二層分配法で調製した原形質膜と反応させた後、グルタルアルデヒドによる架橋反応を行った。この膜画分を可溶化しSDS-PAGEにかけたところ、分子量85kDaの蛋白質が単一バンドとして標識された。結合はラミナリオリゴ糖により阻止されたが、N-アセチルキトオリゴ糖 (DP=8)では阻止されなかった。結合の飽和に必要なラミナリンの濃度は5-10μg/mlであった。現在この蛋白質がラミナリオリゴ糖エリシターの受容体として機能している可能性を調べている。

- (1) Inui, H. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 61, 975-978 (1997)
 - (2) Yamaguchi, T. et al., The Plant Cell, 12, 817-826 (2000)

2aK04

イネ培養細胞のキチンエリシターにより誘導される防御反応におけるPhosphatidic Acidの役割について 山口武志^{1,2}、南栄一¹、渋谷直人¹(「農業生物資源研究所、²生研機構)

Phosphatidic acid (PA)とDiacylglycerol (DG)はイネ培養細胞に対してエリシター刺激なしに活性酸素生成を誘導する。1-Butanol存在下でエリシター刺激を行うことによりイネ培養細胞中にPhospholipase D (PLD) 特異的Phosphatidylbutanol (PtdBut)が検出された。一方、DGは膜画分に存在するDiacylglycerol kinase (DGK)活性により速やかにPAに変換された。これらの結果はキチンエリシターによりPhospholipase C (PLC)とPLDが活性化され、ドメッとよりPhospholipase C (PLC)とPLDが活性化され、ドメッとシジャーとして作用することを示唆している。PAはさらにエリシター刺激なしに、防御関連遺伝子であるEL2、EL3、PAL、Chitinaseの発現を誘導することから、PAがイネ培養細胞の防御反応の誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2aK05

N-アセチルキトオリゴ糖エリシター及びジベレリンによって発現が誘導されるイネGRASファミリー遺伝子

Robert Day¹, 腰岡政二², 三ツ井敏明³, 上口(田中) 美弥子⁴, 松岡信⁴, 渋谷直人¹, 南栄一¹(¹農業生物資源研究所, ²農業技術研究機構・花き研究所, ³新潟大学大学院自然科学研究科, ⁴名古屋大学生物分子応答研究センター)

N-アセチルキトオリゴ糖((GlcNAc)nと略)はイネ懸濁 培養細胞に対して強力なエリシターとして作用する。 我々は以前、(GlcNAc)7によって誘導されるVHIIDモ チーフを有する2種類のイネ遺伝子(CIGR1,2)を単離した *。今回はそれらの挙動を解析し、以下の結果を得た。 ?GFPとの融合タンパク質はタマネギ表皮細胞において 核に局在した;?(GlcNAc)7によりこれらは5分以内に発 現が顕著に誘導された;?両遺伝子は活性型ジベレリン (GA1,3,4)に応答し、不活性型ジベレリン(GA13,17)には 応答しなかった;?タンパク質脱リン酸化酵素阻害剤オカダ酸、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤ラベンダスチ ンAはジベレリンによる発現誘導のみを阻害し、(Glc-NAc)7による誘導は阻害しなかった;?CIGR1,2のいずれ も1コピーの遺伝子であった。これらの結果は(Glc-NAc)7とジベレリンのシグナルがそれぞれ異なった経路 を通って同一の遺伝子に伝達されることを示すもので、 CIGR1,2において両シグナルがクロストークしているも のと考えられる。

*NIAR-COE/BRAIN/CREST Joint International Symposium, "Self-defense Signaling Pathways in Plants" (2000) p-6

2aK06

エリシター処理によるイネのイネいもち病菌に対す る抵抗性の誘導

田部茂¹, Day Robert B.¹, 南栄一¹, 渋谷直人¹ (「農業生物資源研究所)

イネ培養細胞を用いた実験系では、N-アセチルキー オリゴ糖がエリシターとして認識され、活性酸素成成、遺伝子発現の変化、ファイトアレキシンのイネだされても、ファイトアレキシンのインとして記憶なり、つた種を大場で切断した。これではいても、が認識されらることが示ったを造ら、イネを関係を関係した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。これが自動を解析した。といるの、をでいるの、をでいるの、をでいるの、をでいるの、をでいるのでは、近れ、さらにいるのである菌が、は、ないののでは、が、は、ないののでは、でいる。といいる。といるにいる。といるにいる。といるにいる。といるには、ないるには、ないるには、ないるには、ないるには、ないるには、ないるのでは、ないるには、N-アレーを表している。といるには、N-アレーを表している。といるには、N-アレーを表している。といるには、N-アレーを表している。といるには、N-アレーを表しましている。といるには、N-アレーを表している。といるには、N-アレーを表している。といるには、N-アレーを表している。 N-アレーを表しているには、N-アレーを表している。 N-アレーを表している。 N-アレーを表

2aK07

Downregulation of metallothionein expression by small GTPase OsRac1 potentiates oxidative burst and disease resistance

黄漢崚¹, 坂本剛¹, 川崎努¹, 島本功¹(¹奈良先端大・バイオ)

In rice, the small GTPase OsRac1 is thought to play a key role in defense signaling by regulating reactive oxygen species (ROS) production via activating NADPH oxidase. Plants must distinguish ROS produced during pathogenesis from those produced under abiotic stresses. ROS derived from abiotic stresses are rapidly removed by ROS scavengers, which are induced by ROS. Metallothioneins are known to be ROS scavengers. In transgenic cultured cells that overexpress the constitutively active (G19V) form of OsRac1 gene, the metallothionein OsMT1-4 mRNA is downregulated. The OsRac1-dependent downregulation of OsMT1-4 mRNA was also observed in dexamethasone-treated inducible OsRac1 transgenic cultured cells. OsMT1-4 mRNA is also transiently downregulated in Nacetylchitoheptaose and cerebroside elicitors-treated cells. Transgenic plants that overexpress OsMT1-4 showed increased lesion length after bacterial blight inoculation, indicating increased susceptibility. Taken together, OsRac1 may downregulate OsMT1-4 expression, thereby potentiating oxidative burst and disease resistance.

2aK08

Gタンパク質を介した耐病性シグナリングのプロテ オーム解析

藤原正幸¹, 井手香¹, 常塚創¹, 島本功¹(¹奈良先端 大・バイオ)

我々の研究室ではイネにおける耐病性シグナル伝達経 路に関する研究を行っている。これまでの研究から、低 分子量Gタンパク質OsRaclがNADPHオキシダーゼの活 性調節因子として機能していること、3量体Gタンパク質 αサブユニット (Gα) の病原体、エリシター認識への 関与が示された。そこで本研究では、細胞内で機能しているタンパク質をターゲットとし、その発現動態を網羅的に解析することにより、イネの耐病性シグナル伝達経 路を明らかにすることを目的とした。まず網羅的解析の ために、活性型OsRac1と $G\alpha$ 欠失のd1変異体イネを供試 材料とし、2次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析 を行った。野生型、活性型OsRac1、d1変異体のそれぞれ の培養細胞から全タンパク質を抽出、精製後、2次元電 気泳動によりゲル上に展開、スポットとして分離した。それぞれから得られたデータをもとに、野生型?活性型OsRac1、野生型?d1変異体間の分離パターン比較を行っ たところ、発現差異が認められたスポットが確認され た。そのスポットをゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化によりペプチド断片化を行った後、質量分 析計を用いた解析を行い、そのタンパク質の同定を試みた。また、それぞれエリシター処理によって発現変動が 認められたタンパク質についても解析を進めている。

2aK09

イモチ病菌感染により発現が誘導されるイネペルオ キシダーゼ遺伝子の解析

佐々木克友¹, 岩井孝尚², 平賀勧¹, 伊藤浩之¹, 佐々木卓治², 松井博和¹, 大橋祐子² 2 3 (¹北大院・農, ²農業生物資源研究所, ³JST.CREST)

2aK10

病傷害に応答するタバコカルモジュリンの解析 山川博幹^{1,2,3}, 光原一朗^{2,3}, 伊藤直子⁴, 瀬尾茂美^{2,3}, 鎌田博¹, 大橋祐子^{2,3} (¹筑波大・生物科学, ²農業生物 資源研・分子遺伝, ³JST・CREST, ⁴新潟医療福祉大・ 健康栄養)

我々は、タバコモザイクウイルス(TMV)の感染あるいは傷害をうけたタバコより、13種類のカルモジュリン(CaM)遺伝子NiCaMI?13を単離した。これらの遺伝子は、それぞれTMV感染、傷害、サリチル酸およびジャスモン酸に対して異なる転写制御をうけており、異今日は、NtCaM1、NtCaM3およびNtCaM13について(1)シパク質レベルでの発現解析および(2)標的酵素のは、NtCaM1、NtCaM3およびNtCaM13について(1)タ活性化について報告する。特異的抗体を用いた解析質が表して、TMV感染後にはNtCaM13タイプのタンパク質かが、ならにはNtCaM1タイプが蓄積量は転写後の制御により、少なくとも傷害後に26Sプロテアソームに、防におり、少なくとも傷害後に26Sプロテアソームとが示唆された。さらに、in vitro酵素反応においてした、NtCaM1およびNtCaM3はNADキナーゼおよびタンパク質脱リンとのおいたこれらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これらの結果は、ターゼをより強く活性化した。これの名とを示唆する。

2aK11

タバコの傷害誘導性MAPキナーゼ、WIPKを活性化するタバコ内生低分子物質の単離と同定

<u>瀬尾茂美</u>^{1,2},瀬戸秀春³,大橋祐子^{1,2}(¹農業生物資源研,²JST/CREST,³理研・植物機能)

タバコのMAPキナーゼ、WIPKをコードする遺伝子は、TMV感染に伴う過敏感細胞死の初期に特異的に発現する遺伝子として単離された。WIPKは傷害やTMV感染によって酵素レベルで活性化されること、活性化されたWIPKは傷害応答や病害抵抗性に係わることが我々を含む研究グループによって報告されている。このようにWIPKは病傷害シグナル伝達経路において重要な役割を果たすことが示されているが、その活性化を誘導する因子は不明である。

そこでまず低分子の WIPK 活性化誘導因子の単離を試みるべく、TMV接種タバコ葉のアセトン抽出物を酢酸エチル可溶性の酸性、中性及び塩基性区に分画し、各区と、WIPKのMBPリン酸化活性を指標とした生物検定に高酸性及び中性区にその活性が検出できたので、精製各種たところ、単一の物質が得られた。機器分析による種たところ、単一の物質が得られた。機器分析による種たところ、単一の物質が得られた。機器分析による種にところ、単一の物質が得られた。機器分析による種にところ、単一の物質が得られた。機器分析による種でところ、単一の物質が得られた。機器分析による一種によると、WIPKのみならずSIPKも活性化され、傷の転が手えると、WIPKのみならずSIPKも活性化され、傷ののが質性のプロテイナーゼインヒビター遺伝子発現の誘導因子、と写産物の蓄積も起こった。これらの結果は、この物質がまたいる場合に、こののシグナル物質として働くことを示唆する。

2aK12

ジャガイモ植物のエリシター応答性MAPキナーゼ StMPK1によりリン酸化されるタンパク質PhoMの解析

加藤新平¹, 吉岡博文¹, 道家紀志¹, 川北一人¹(¹名大院·生農)

ジャガイモ植物の感染応答における種々の抵抗反応の誘導にはプロテインキナーゼが関与すると考えられている。これまでに我々はジャガイモ塊茎においてエリシター処理により活性化されるMAPキナーゼStMPK1を単離した。今回、StMPK1の機能を調べるため、その基質タンパク質の単離を試みた。MAPキナーゼは翻訳後のリン酸化によりその活性が調節される。そこで、上流のMAPキナーゼキナーゼ(StMEK)cDNAをPCRにより単準し、アミノ酸置換により恒常的活性型のStMEK^{DD}を作製した。StMEK^{DD}およびStMPK1を大腸菌で発現・精製後、StMEK^{DD}によりStMPK1をリン酸化して活性型のStMPK1を得た。活性型StMPK1を用いたIn vitro expression cloning法により、in vitroにおいてStMPK1によりリン酸化されるタンパク質PhoM(protein phosphorylated by MAP kinase)1-7を単離した。PhoM1、3、5は既知タンパク質と相同性がなかったが、PhoM2はAtWRKY6と、PhoM4はMYB-CC型 tansfactorと、PhoM6はshort-chain dehydrogenase/reductaseと、PhoM7はTATA-binding protein associated factorとそれぞれ相同性が認められた。

2aK13

エリシター誘導性硝酸還元酵素遺伝子のジャガイモ 植物における発現

 $\underline{\text{山本文子}}^{\text{I}}$, 加藤新平 $^{\text{I}}$, 吉岡博文 $^{\text{I}}$, 道家紀志 $^{\text{I}}$, 川北 -人 $^{\text{I}}$ ($^{\text{I}}$ 名大院·生農)

一酸化窒素(NO)は植物の抵抗反応に関与すると考えられているが、その生成系については未知である。我々は、植物におけるNO生成酵素の一候補である硝酸分元 酵素(NR)に着目した。ジャガイモ疫病菌菌体壁成分で、NR遺伝子の発現と処理後6時間をピークとしたNRタンパク質の蓄積が認められた。HWC処理後6時間の免疫したの境質のと成活性をDAF-2を用した可溶性が認められた。GMではよりによりにあるNR時により低いでは、この活性はNR阻害剤タンをところ、液治性が認められ、この活性はNR阻害剤タンをところ、ででは、この活性はNR阻害剤タンをところ、でででは、この活性はNR阻害剤タンをところ、でででは、発現誘導にカルシウム非依存に、から質リン酸化酵素が関与する可能性が示された、を行ったとより、発現誘導にカルシウム非依存に、があったことより、発現誘導にカルシウム非依存に、があったことより、発現誘導にカルシウム非依存に、があったことより、発現誘導にカルシウム非依存に、が新聞によりなが存在する可能性が示ったが存ったとより、ジャガイモ、複数のNR遺伝子が存在する可能性が示されため、ジャガイモ塊茎でNNR債はHWC処理ジャガイモ塊茎において誘導された。

2aK14

NahG 形質転換体を用いたイネにおけるストレス抵抗 性メカニズムの解析

平山真裕子¹,楠見健介¹,佐藤光²,射場厚¹(1 九州大院・理, 2 九州大・農)

サリチル酸は、一般的に病原菌の感染後に見られる過 敏感反応 (HR) や全身獲得抵抗性 (SAR) の誘導に関 わっており、病害抵抗性における重要性が示されてい イネにおいては、品種間の病原菌に対する抵抗性の 程度とサリチル酸含量には相関があり、サリチル酸が抵 抗性を定常的に高めているということを示唆している。 しかし、一方でシロイヌナズナやタバコで報告されてい る病原菌感染後のサリチル酸含量の上昇は観察されず、 イネにおける抵抗性獲得メカニズムにサリチル酸が直接 関与しているかは明らかになっていない。本研究では、 サリチル酸水酸化酵素salicylate hydroxylaseの遺伝子NahG を導入し過剰発現させた形質転換イネを作製した。その 結果、NahG 形質転換イネにおいて、サリチル酸含量は 野生株と比べて10%程度まで抑制され、病原菌の感染な しに葉に病斑形成が見られた。また、同時に病原菌の感染なしに葉に病斑が形成されるイネの突然変異株spl6に、NahGを導入した形質転換イネを作製した。spl6の サリチル酸の含量は野生株と比較してほとんど変化がな い。spl6-NahG 形質転換イネにおいては、野生株の25% 程度に抑えられ、病斑の形成パターンなど、表現型に違 いが見られた。

イネ紫外線感受性に関与するQTLのマップベースクローニング

上田忠正¹,佐藤雅志²,沼寿隆¹,矢野昌裕¹(「独立行政法人・農業生物資源研究所, 2 東北大大学院・生命科学科)

イネは品種により紫外線に対する抵抗性が異なる。紫外線抵抗性品種日本晴 (japonica) と感受性品種 Kasalath (indica) の戻し交雑後代系統を利用したQTL解析により、3種類の紫外線抵抗性に関わるQTLが見いだされた。そのうちの第10染色体上のQTL (qUVR-10) は最も寄与率が高く、日本晴のアレルが紫外線抵抗性にする作用をもつ。マップベースクローニング法によるqUVR-10 は電子の単離・同定を目的として、1850個体の分離集団を用いた詳細な連鎖解析を行った。その結果、qUVR-10 は限FLPマーカーC913AとC1757Sに挟み込まれる領域に位置づけられた。さらにqUVR-10候補領域について、日本晴PAC (P1-derived artificial chromosome) クローンの切にを図ったところ、qUVR-10 を含む単一のPACクローンが同定できた。このクローンの塩基配列を解析し、新列化を図ったところ、qUVR-10 を含む単一のPACクローンが同定できた。このクローンの塩基配列を解析し、新列化を図ったとで、このクローンの塩基配列を解析と流のないに作出したマーカーによる連鎖解析を行ったと補領イヌレアを復費のORFが予測され、そのうちの1つはシロテンプ・カー大で、表現では、そのうちの1つは、また。現在、この候補遺伝子の機能を確認中である。

2aL02

紫外線及びγ線に対して感受性を示すシロイヌナズ ナ変異株の解析

坂本綾子¹, Thuong Lan Vo Thi ^{1,2}, 鹿園直哉¹, 田中淳 ¹ (¹日本原子力研究所·植物資源利用, ²Center of Biotechnology, Vietnam National Univ.)

2aL03

シロイヌナズナのパラコート耐性突然変異体の単離 とその UV-B 耐性

藤部貴宏¹, 矢部尚登², 竹内裕一³, 山本興太朗¹ (¹北海道大·地球環境, ²横浜市大·木原生研, ³北海道東海大·工)

パラコート (メチルビオロゲン) は光合成系を利用し て葉緑体中で活性酸素を発生させる。そこで植物の活性 酸素に対する抵抗性の獲得について研究するため、パラ コートを含む寒天培地上で生育可能なシロイヌナズナの 突然変異体 (pqr1) を単離した。pqr1 は野生型が $0.6 \mu M$ のパラコートを含む寒天培地上でほぼ枯死するのに対 し、1.0 μM以上でも生育可能であり、野生型と比べて 小さく、クロロフィルとアントシアニン含量が増加して いた。pgr1 は劣性で、一番染色体上に変異が生じてい た。pgrl では一部の活性酸素除去酵素の活性や同酵素遺 伝子の mRNA 量が増加していることが分かった。また アントシアニン合成系の鍵酵素であるカルコン生成酵素 とカルコン異性化酵素の mRNA 量も増加していた。活 性酸素を発生させることが知られているUV-B を照射し た植物体で同様に調べたところ、pgr1、野生型ともに、 これらの酵素すべてで UV-B 照射によって mRNA 量が 増加した。pqr1 は UV-B 照射後の光化学系II活性の損傷 や細胞からのイオンの漏出量、ピリミジンダイマーの生 成量も野生型より少なかった。これらの結果より、pqrl は UV-B の遮蔽効果と活性酸素除去系の活性の増加に よって、UV-B 照射に対する耐性が増加していることが 示唆された。

2aL04

Polysaccharides in DNA samples from forest trees affect ELISA for cyclobutane pyrimidine dimers.

橋本徹¹,中川典子¹,栄谷直美¹,三尾幸子¹,岡野通明²,二階堂修³(¹神戸女子大·家政, ²森林総研, ³金沢大·薬)

For reliable determination of the solar UVB-induced DNA lesion in forest trees, DNA sample requires the removal of ELISA inhibitors. DNA extracts from cherry, Japanese cypress, and others with CTAB buffer often give only weak or null cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) responses in ELISA. This does not always mean the absence of dimers, but the presence of ELISA inhibitors. The findings supporting the conclusion are: 1) Repeated extraction of the same tissues with fresh buffer gave increasingly more ELISA-positive DNA samples; 2) DEAE-cellulose column (sodium phosphate buffer, pH 7.4) separated two inhibitors eluted with plain buffer and then with 0.3 M NaCl, and one ELISA-positive DNA (0.5 M NaCl); 3) Combining these eluates reduced or nullified the positive response of the DNA. Besides the finding 2) the electrophoretic behavior also suggested that the first-eluted inhibitor may be neutral and the second one, acidic polysaccharides.

高等植物におけるUV-B照射量の増加にともなう遮蔽 化合物の蓄積

田中智之¹, 米村健², 長嶺考行¹, 石川孝博¹, 澤嘉 弘¹, 柴田均¹ (¹島根大学・生物資源, ²近畿中国四国 農業研究センター)

UV-Bの生物作用には、DNA損傷とともに、活性酸素の生成源となる可能性も強く示唆されている。このため、DNA損傷を修復する系と、近紫外線を遮蔽出来る化合物の蓄積、抗酸化成分の合成などが、高等植物のUV-Bに対する適応戦略として確認されている。最近になってUV-Bの影響や適応戦略の発現がPARに強く依存することが認められてきたので、野外栽培条件下において、時々刻々変化している太陽光に由来するPAR量に連動して変動しているUV-B量(I倍区)を常時測定しながによる照射によりUV-Bの生物学的影響量を2倍と3倍に増加させて栽培したホウレン草またはカリフラワーを供試材料とした。

重量や葉面積で表現した生長量には顕著な差は認められなかった。水溶性の低分子の遮蔽成分を含む画の分をSep-Pak(Waters)により、4画分に分画し、これらの画画に存在する近紫外線域に吸収をもつ成分は,カリフラ特に存在する近紫外線域に吸収をもつ成分は,カリフラ特に存在する近紫外線域に吸収をもつ成分は、カリフラ特にではUV-B照射量に対応して明確に増加していた。り、物とは、一下セトニトリルで溶出された成分はHPLC分析により、が上には多種類の活近性の表別であると同定した。クロロゲン酸で素を重視の活性性の表別であると同定した。クロロゲン酸を素種物が近紫外線連を変れている。カラムを素通りは大くしてクロロゲン酸を蓄積することは、極する成分が存在することを確認した。

2aL06

強光ストレスにより制御されるシロイヌナズナ遺伝 子のマイクロアレイによる同定

木村光宏^{1,2}, 山本義治¹, 関原明^{3,4}, 櫻井哲也³, 佐藤 将一³, 篠崎一雄^{3,4}, 真鍋勝司², 松井南¹(「理研ゲノム科学総研セ植物変異探索,²横市大・総合理学,³理研ゲノム科学総研セ植物変異開発,⁴理研植物分子)

植物は日光を吸収し、光エネルギーを駆動力ととして植物は日光を吸収し、光方で過剰な光量(強光)体にをして有害であり、光合成器官として編組、活対は、光音の電子の漏出、スにないらの電子の漏出、スにないなどを引き起こされまでの生理学のがでは、これまでの生理学のでは、これまでの生理学のでは、これまでの生理学のでは、これまでの生理学のでは、これまでの生理学のでは、これがの生理学のでは、これがの生理学のでは、これがのでは、近代では、これがでは、近代では、これがのが、光化学反応操体内および質にしてがががが、でいるというががいた。これがのかれるに、ががいるに、これがのかれまで答まして、ががいる。レステムががいたに、これがのかったががが、でいるといいがでは、シースとに、がいるに、とを用いては、シースとに、シースとに、シースとに、シースとに、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、シースとは、カースを収り、カー

2aL07

過酸化水素を媒介しないシロイヌナズナの光ストレスに対する転写応答の特徴

山本義治¹, 木村光宏^{1,2}, 真鍋勝司², 松井南¹ (¹理研·GSC·植物変異探索, ²横浜市立大·総合理学)

植物にとって太陽光は光合成を行うための唯一のエネルギー源であるが、過剰な光環境は葉緑体内部、 植物間での傷害を引き起こす原因となむから高して、転写制御を含容もして、転写制御を含容を目れている。私たちは強光の受を目れている。私たちは強光の受を目れている。私たちは強光の受を目れている。私には強光になるが明明を含めている。はじめに強光にを性ELIP2プテを追れている。はじめに強光にを生して日本のルシブナーででは、 立て子を明した。よれて、 立となり、 ことなり、 立となり、 ことなり、 立となり、 ことなり、 こ

2aL08

イネ光回復酵素遺伝子の解析

<u>広内篤久</u>¹,藤野貴奈²,寺西美佳²,日出間純²,熊谷忠²,山本和生¹ (¹東北大院・生命科学・遺伝子システム学,²東北大院・生命科学・環境遺伝生態機能学)

太陽光に含まれる紫外線は、染色体DNAにシクロブ タン型ピリミジン二量体 (CPD) や6-4付加体を作り突 然変異や致死を引き起こす。これらの損傷に対し、生物 は様々な修復機構を持つが、その一つに光回復がある。 光回復酵素は、CPD、6-4付加体に対し特異的に結合す る二種類が存在し、どちらも近紫外光・青色光を利用し て損傷を修復する。この酵素遺伝子は広く生物界に存在 し単離されているものも多いが、光に最も多く依存して 生活している植物ではシロイヌナズナと緑藻の二種でし か単離されていない。しかし、その一方でいくつかの植 物で光回復の存在を示す報告がされている。我々日本人 にとって最も身近な農作物"イネ"も光回復活性が観察さ れる植物の一つである。イネでは、紫外線耐性の「ササ ニシキ」と、このササニシキに系統的に近いが紫外線に 対し感受性の「農林1号」が存在する。この2つの品種の 紫外線に対する感受性の違いは、それぞれの光回復の違 いによるものと考えられる。本研究では、シロイヌナズ ナと緑藻で高度に保存されているアミノ酸配列をもとに プライマーを作成し、ササニシキから光回復酵素遺伝子 を単離する事に成功した。また、この遺伝子がCPD光回 復遺伝子を欠損した大腸菌の紫外線感受性を緩和し、更 にこの遺伝子産物を精製したものも光回復活性を示すこ とが観察された。

イネのUV感受性とCPD光回復酵素の構造変化について

<u>寺西美佳</u>¹,藤野貴奈¹,日出間純¹,広内篤久²,山本 和生²,熊谷忠¹(¹東北大院・生命科学・環境遺伝生 態機能学,²東北大院・生命科学・遺伝子システム 学)

イネ (Oryza sativa L.) においてUVB感受性品種である 農林1号は、UVB誘導cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) の光修復能力がUVB抵抗性イネ品種であるササニシキと 比較して低下している。農林1号の光回復酵素は、single photoflash法を用いた解析より、ササニシキと比較して酵 素と基質であるCPDとの結合速度が遅いこと、またこの 結合の温度安定性が低いことが示されたため、2品種間 では光回復酵素のタンパク質構造に差があることが推定 された。そこで農林1号の光回復酵素遺伝子の塩基配列 を決定し、ササニシキと比較したところ、推定アミノ酸 配列に違いが見られた。この塩基配列の違いが遺伝的な ものとして他の近縁種にも見られる可能性を考え、他の 近縁な日本型栽培イネ品種を用いてUVB抵抗性の解析を 行った。UVB付加条件下での生育、また一定量のCPDを 有するλDNAを基質として用いたin vitroでの光修復活性 を測定したところ、近縁種の中でもササシグレはUVB抵 抗性でありCPDの光修復活性も高いが、ハツニシキは UVB感受性であり光修復活性は低かった。光回復酵素の 遺伝子配列の差異は、ササシグレはササニシキと同様で あり、ハツニシキは農林1号と同様であったことから、 光回復酵素の構造的差異がイネ品種のUVB抵抗性の差を 生み出す一因であることが示唆された。

2aL10

イネにおける紫外線B誘導ピリミジン二量体光回復酵素活性の光誘導調節

日出間純¹,成日慶¹,広内篤久²,山本和生²,熊谷忠¹ (¹東北大院・生命科学・環境遺伝生態機能学,²東北 大院・生命科学・遺伝子システム学)

紫外線B(UVB)によって生成されるDNA損傷の一つ に、シクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)がある。 植物は主に、生成したCPDを光回復酵素によって修復し ている (光修復能力)。これまでに我々は、暗黒下で生 育したイネ黄化幼植物は光修復能力を有していないが、 この光修復能力は、(1) 青色光あるいは赤色光を少なく とも5分照射することで、1時間後にその活性が誘導され ること、(2) この光誘導効果は、青・赤色光照射後の近 赤外光の照射により打ち消されることから、フィトク ロームによってその誘導が調節されていることを報告し しかし、このフィトクロームによる光誘導効果が、 光回復酵素遺伝子の光発現調節の結果によるのか、また は光回復酵素自身の光活性化を含む転写後の調節による 結果であるかは不明ある。そこでこの点を明らかにする ため、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX)で処理した後、青、赤、近赤外光を前照射したイネ黄化幼植物、さらには、青・赤色光照射後の近赤外光を照射した黄化幼植物を材料に、イネ・ササニシキか ら単離したイネ光回復酵素のcDNAクローンを用い、光 回復酵素遺伝子の発現パターンと光修復能力の誘導につ いて解析を行った。本講演では、フィトクロームによる 光誘導効果に関して、光回復酵素遺伝子の発現様式から 考察する。

2aL11

紅藻Galdieria partitaの活性酸素消去酵素Ascorbate peroxidase (APX) を導入した形質転換タバコの解析 北島佐紀人¹, 富澤健一¹, 重岡成², 横田明穂¹ (¹RITE, ²近畿大・農)

葉緑体にAPXを大量蓄積させた形質転換植物は酸素毒 に耐性を示す。活性酸素の生成部位が光化学系であることを考慮すると、細胞質局在型APXなどの過酸化水素抵 抗性アイソザイムをチラコイド膜上に局在させることが 最も効果的であると思われるのでこの点の検討を試み た。G. partitaの細胞質局在型APXのN末端に葉緑体移行 シグナル配列、C末端にチラコイド結合型ホウレンソウ APX由来の疎水アミノ酸配列を付加し、これをタバコ核ゲノムに導入した。形質転換タバコの子葉における全 APX活性は0.1 mmol AsA / min / mg Chlで、野生型のおよ そ3倍であった。膜画分のAPX活性は野生型の数倍に上 昇しており、ウェスタン解析により導入APXが膜画分に 検出されたことから、この改変APXが触媒活性を保持し たまま膜に局在化したものと結論された。しかし、可溶 性画分のAPX活性も上昇していた。3μMのメチルビオ ローゲン含有培地における芽生えの生存率は、野生型の 12%に対し、76%であったので、この形質転換体が酸素 毒耐性を有することは明らかである。C末端に疎水領域 を付与されていないGaldieria APX遺伝子を導入した場合 と比較をした結果を報告する。

2aL12

真核藻類 Spirogyra は葉緑体局在性の葉緑体型CuZn-SODを持つ

 $\frac{\pm \alpha \overline{B} \mu}{4}$, 入口延正1, 浅田浩二2 (1南九州大·食工, \overline{A} 2福山大·工)

CuZn-SOD は葉緑体型と細胞質型のアイソザイムがあ り、それぞれ特徴的なアミノ酸配列を持つが、最近、葉 緑体型の配列を持ちながら、細胞質に局在する SOD が コケ植物で報告され、高等植物の CuZn-SOD アイソザイ ムの起源に興味が持たれている。我々は本学会で陸上植物 CuZn-SOD の祖先 SOD と考えられる緑藻、Spirogyra の SOD は、N末端アミノ酸配列から葉緑体型であること を示した。今回はその全長 cDNA を、またコケ植物、シ ダ植物、トウモロコシからは部分 cDNA をクローニング し、塩基配列を比較してアイソザイム間の関連を明らか にしようとした。まずRT-PCR 法によってそれぞれの生 物からcDNA 断片を得て塩基配列を決定した。Spirogyra cDNA はさらに RACE法によってクローニングした。 Spirogyra のクローンは約850 bpの大きさで、コード領域 は588 bpであった。N末端アミノ酸配列との比較からト ランジットペプチドの存在が確認され、単離した cDNA は葉緑体局在性の CuZn-SOD をコードしていることが明 らかになった。コケ植物、シダ植物、トウモロコシから 得られた複数の部分 cDNA はアミノ酸配列の特徴から葉 緑体型または細胞質型に区別された。現在葉緑体型に区 分させたSODはトランジットペプチドを持つかを検討し ている。Spirogyra cDNA は葉緑体型に区別され、またト ウモロコシの葉緑体型 SOD は最近報告されたものと異 なり通常の SOD であった。

Isolation and characterization of a cDNA encoding ascorbate peroxidase of Euglena gracilis Z.

ラポル マドゥスダン¹, Takahiro Ishikawa¹, Yoshihiro Sawa¹, Shigeru Shigeoka², Hitoshi Shibata¹ (¹ 鳥根大・生物資源, ²Graduate School of Advanced Life Science, Kinki Univ.)

Unlike higher plants, Euglena contains a single isoform of ascorbate peroxidase (APX) localized only in cytosol. Here we report the isolation of a cDNA of the enzyme obtained by screening Euglena cDNA library using a monoclonal antibody raised against the Euglena APX. The 1.3 kbp cDNA fragment would encode for 358 amino acids but lacks 33% of the full-length in the 5'. However, several internal amino acid sequences of the purified enzyme were identified in the deduced amino acid sequence of the cDNA. The partial sequence of the Euglena APX exhibited a higher degree of homology (56% identity) with that of cytosolic APX as compared to the chloroplastic form (40%) of spinach. The Euglena APX had the highly conserved heme-binding His residues and several other amino acids that are correlated with the active site of plant APX.

2aL14

植物ESR計測用スピンプローブ剤の特性 <u>白石卓夫</u>¹,青山正明^{1,2},大矢博昭^{1,2} (¹科技団山形地 域結集プロジェクト, ²生物ラジカル研究所)

我々はこれまでに植物のストレス応答検出を目的として、植物に容易に取り込まれ内部の酸化還元状態を伝える植物電子スピン共鳴(ESR)計測用のスピンプローブ剤を開発してきた。今回は、最も取り込まれやすく強光ストレスに鋭敏に反応するGlucosyl-TEMPO(GT)について、その局在性と反応性を検討した。

て、その局在性と反応性を検討した。 イネ展開業の基部切口から 通気・光照射下で15 mM GT溶液を給水し、葉中のGTをX-band ESR装置で追跡した。細胞内外のGT分布は、葉切片を蒸留水中で数回減圧した後に、葉・外液中のGTを定量し調べた。無傷葉緑体はホウレンソウから調整した。

葉中に取り込まれたGTは大部分が還元体となりESR信号を消失したが、排出・分解を受けることなく総量の約80%が細胞内に存在すると見積もられた。取り込みから3時間後でも細胞内に留まり、葉表面へのparaquat塗布・光照射によって再酸化されESR信号の増加を示した。無傷葉緑体は1-10 mM GTの存在下1時間の室温放置で、外液とほぼ同濃度のGTを取り込んだ。これらの結果は、葉中のGTは速やかに細胞内に分布し、さらに葉緑体に取り込まれ得ることを示す。光照射時の葉緑体内での反応について、現在検討中である。

2aN01

DNAマイクロアレーを用いたシネコシスティスPCC 6803の酸性ストレスに応答する遺伝子群の同定 柴田庸介¹,太田尚孝¹,亀井綾子²,奥村彰規¹,池内雅彦²,榎並勲¹(¹東京理科大・理・生物,²東大・教養・生物)

植物は常に強光、低温、酸性雨といった環境ストレスにさらされ、その生存のために細胞応答をしている。すでに強光あるいは低温などの環境ストレス対する応答のメカニズムについては数多くの報告があるが、酸性ストレスに対するものはほとんどない。そこで、我々は、酸性pH条件をいろいろ検討した上で、シネコシスティスPCC 6803をpH 5.0の培地で30分間培養した細胞と通常pH条件で培養した細胞からRNAを精製し、マイクロアレー(TAKARA社 CyanoCHIP)を用いて両者の遺伝子発現の違いを網羅的に比較した。その結果、低pH処理により、2.5倍以上に上昇した27遺伝子、1/4以下になった28遺伝子を同定することができた。さらに、これらの主なた3とでの発現量の相違をリアルタイムPCRにより確認した。そのうち、特に発現量の高い遺伝子は multidrug resistance-associated protein, cell division cycle protein と phycocyanin alpha subunit などであった。これらの遺伝子と酸性ストレスに対する 適応機構との関連について討論する予定である。

2aN02

シロイヌナズナRIラインにおけるAI耐性遺伝子群の QTL解析

小山博之¹, <u>小林佑理子</u>¹, 関谷佳代子¹, 原徹夫¹(1 岐阜大·農)

アルミニウムの過剰害は酸性土壌において作物の生育を最も制限する因子である。その障害部位は根端組織あり、根伸長が著しく阻害される。ある種の植物は、遺伝的な形質としてAIを排除若しくは解毒する耐性能力を持つが、これには複数の戦略が存在する。これに関与する遺伝子群を特定することができれば、分子育種学的れる。一般に、複数の対立遺伝子が関与する表現形質の原因遺伝子座を特定するためにはQTL解析が有効である。そこで、AI耐性が異なるシロイヌナズナ2系統から作成された、RIラインを用いて、AI耐性のQTL解析を行った。

AI添加水耕液で、100系統からなるRIラインを1週間栽培し、根長により各ラインのAI耐性程度を数値化した。この際、1)環境要因による影響を排除するために全てのラインを同一容器中で同時に栽培し、2)個体間差の影響を排除するために20個体中で最も伸長した上位5個体の平均値を採用した。さらに、この実験を2回繰り返したデーターを用いて、再現性を確認した。この方法で評価したAI耐性の程度は、根端でのカロース合成やAI集積等の他のAI耐性評価指標と一致した。この条件下で、複合区間マッピング法によりQTL解析を行ったところ、これまでに変異体で報告されている遺伝子座とは異なる位置に、2カ所の明瞭なQTLを検出した。

2aN03

ArabidopsisのGST遺伝子を用いたAlストレスでの発現 誘導メカニズム解明の試み

 $\underline{\text{江崎文}^{-1}}$, 鈴木正勝 1 , 元田弘敏 1 , 河村雅子 1 , 松本英明 1 (1 岡山大、資生研)

AIストレス誘導性を示すArabidopsis のGST遺伝子(glutathione S-transferase)を用いて遺伝子発現誘導機構の解明を進めている。まずデーターベース検索の結果から 95% 以上の相同性で 2 つの遺伝子(AtGST1 と AtGST11)が存在することがわかった。両者の発現量をRT-PCRで別々に測定したところ、ともにAIストレスに対して誘導性を示した。プロモーター部位の塩基配列にも高い相同性が見られたが、AtGST11遺伝子には2ケ所の塩基の欠落が有り、AtGST1遺伝子にはA-rich regionが見られるなどの相違点もあった。さらにリポーター遺伝子(p-AtGST1::GUS、p-AtGST11::GUS、p-CaMV35S::GUS)を染色体上に挿入させた形質転換を各々構築し、AIストレス誘導性(AI濃度依存性、発現応答の経時変化など)についてGUS 酵素活性によりのを各々構築し、AIストレス誘導性(AI濃度依存性、発現応答の経時変化など)についてGUS 酵素活性によりのを各々構築し、AIストレス誘導性(AI濃度依存性、発現に答の経時で発現し、ともまず根で発現し、が見られた(AtGST1と11は、それぞれ約2時間にはと8時間)ほか、AI特異性も異なっていた。プロモター間にあり、AI特異性も異なっていた。プロモター間にあり、AI特異性も異なっていた。プロモター間にあり、AI特異性も異なっていた。プロモターをと思われた。

2aN04

Analysis of expression of xyloglucan hydrolase genes by aluminum in azuki bean

田渕彰^{1,2}, 保尊隆享³, 森仁志⁴, 加来友美³, 神阪盛一郎⁵, 江崎文一¹, 松本英明¹(¹岡大·資生研, ²生研機構, ³大阪市大院·理, ⁴名古屋大院·生命農, ⁵富山土, 珊)

Root cell wall likely plays important roles in response and tolerance to Aluminum (Al), because Al causes cell wall stiffening and growth inhibition of roots. Xyloglucans are the major matrix polysaccharides of the primary cell wall in dicotyledons. Previously, an endoxyloglucan hydrolase was isolated from azuki bean (1) and caused cell wall loosening (2). To understand the regulation of this enzyme activity in Al-stressed roots, we isolated several genes encoding possible this enzyme from azuki bean and analyzed their expression patterns under Al stress. The expression of one of the isolated mRNAs was found mainly in roots and Al treatment increased the expression in roots. These results suggest that at least one of these genes participates in the response of root cell wall to Al. (1) Tabuchi et al. (2001) Plant Cell Physiol 42: 154-161 (2) Kaku and Tabuchi et al. (2002) Plant Cell Physiol in press

2aN05

チオリンゴ酸放出能を指標にした酵母発現系による コムギのアルミニウム応答性リンゴ酸トランスポー ターの探索

大澤裕樹^{1,2}, 松本英明¹(¹岡山大・資生研, ²生研機 構)

アルミニウム(AI)に応答した根端からのリンゴ酸の放 出はコムギにおけるAI耐性機構の1つである。リンゴ酸 の放出経路を同定するために、出芽酵母(Saccahromyces cerevisiae) にコムギのリンゴ酸通過型タンパク質遺伝子 を発現させてクローニングする系を作成した。分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe) のリンゴ酸トランスポー ターをコードする遺伝子SpMAEIを発現させた出芽酵母 は、リンゴ酸を唯一の炭素源とする培地で良好な生育を 示すとともに、より多くのリンゴ酸を吸収した。 SpMAE1を発現させた出芽酵母においてチオリンゴ酸に 対する感受性が増大したことから、チオリンゴ酸は SpMAE1タンパク質を通過する細胞毒であることが示唆 された。チオリンゴ酸で前処理したAI耐性コムギ品種では、AIに応答してチオリンゴ酸の放出が根端において誘 導され、この誘導的な放出はアニオンチャンネル拮抗剤 のniflumic acidによって阻害された。これらの結果より、 チオリンゴ酸の放出は、コムギにおいてAIにより活性化 されるリンゴ酸通過型タンパク質を経由すること、酵母 においてコムギのリンゴ酸トランスポーターが発現機能 した際の指標となることが示唆された。

2aN06

極強酸性土壌に生育するソバの葉におけるアルミニ ウム形態の同定

<u>沈仁芳</u>¹, 岩下孝², 馬建鋒¹ (¹香川大·農, ² (財) サントリー生有研)

Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench, cv Jianxi) detoxifies high Al internally by both forming a 1:3 Al-oxalate complex and sequestrating the complex into vacuoles in the leaves. However, when buckwheat was grown in an extremely strong acid soil, we found that internal oxalate in the oldest leaf was not high enough to form a 1:3 Al-oxalate complex. We therefore investigated the Al form in the leaves with different Al concentrations using ²⁷Al-NMR. Two peaks were observed in leaves with high Al concentrations (100mM), which were assigned to be Al-oxalate (1:3) and Al-citrate (1:1), based on the chemical shift of ²⁷Al. However, in leaves with low Al concentrations, only one peak was observed, which corresponds to Al-oxalate (1:3). Our results suggest that both Alcitrate (1:1) and Al-oxalate (1:3) are present in the leaves when Al concentration is extremely high.

2aN07

アルミニウム耐性タバコ培養細胞におけるヌクレオシドニリン酸キナーゼ(NDPK)遺伝子のクローニングおよび発現解析

三藤値栄¹, 山本洋子¹, 佐々木孝行^{1,2}, 松本英明¹(¹ 岡山大・資生研, ²生研機構)

Al 耐性タバコ培養細胞株 (ALT213) には、親株 (ALTSL)と比較していくつかの高発現蛋白質が存在し、 その中に部分アミノ酸配列がヌクレオシドニリン酸キ ナーゼ(NDPK)と高い相同性を示しているものがあっ た。そこで、AI耐性機構におけるNDPKの関与を解明す ることを目的とし、この部分アミノ酸配列をもとにこの 蛋白質をコードしていると予想される遺伝子のクローニ ングを行った。その結果、クローニングされたcDNAは ホウレンソウのNDPK IIと高い相同性(約70%)を示すと ともに、予想されるアミノ酸配列の等電点および分子量 が上記の高発現蛋白質と一致した。よってAI耐性株にお ける高発現蛋白質の1つはこのクローニングされたNDPK 遺伝子であることが示された。このNDPK遺伝子は、タ バコでは初めてクローニングされたものである。次に、 対数増殖期の親株とAI耐性株におけるNDPK遺伝子の発 現量の差をノーザンブロット解析により比較した結果、 AI耐性株でのみ構成的に強く発現する一方、親株では殆 ど検出されず、AI処理による発現量の変動も見られな かった。さらに、サザンブロット解析により、親株に対 してAI耐性株のNDPK遺伝子が増幅しているという結果 が得られた。これらの結果から、遺伝子コピー数の増加 により発現量が増加していると思われる。

2aN08

Genes Highly Expressed In An Aluminum-Tolerant Tobacco Cell Line ALT301

Saddikuti Rama Devi ^{1,2}, Yoko Yamamoto¹, Takayuki Sasaki¹, Hideaki Matsumoto¹ (¹岡山大・資生研, ²BRAIN)

We isolated an aluminum (Al) tolerant cell line ALT301 from a cell line SL (Physiol. Plant. 112: 397, 2001) which also exhibited cross-tolerance to oxidative stress. To understand the tolerance mechanism, we cloned several cDNA which were expressed more in ALT301 than SL by a subtractive hybridization. The homology search and the expression analyses of these genes indicate that the genes encoding anionic peroxidase, mitochondrial import receptor, glutathione-stransferase, sucrose synthase, osmotin-like protein and tyrosine kinase were expressed higher in ALT301 than SL under normal growth conditions in MS medium. Under Al stress conditions in Ca medium, expression of the gene encoding osmotin-like protein was repressed, whereas all others were induced by Al in both cell lines compared to their untreated controls. Among the Al-inducible genes, only anionic peroxidase gene was highly induced by Al in ALT301 than SL. The functional importance of these genes in Al tolerance is discussed.

2aN09

アルミニウム耐性タバコ培養細胞株ALT107のペルオキシダーゼの解析 - 活性上昇と基質特異性の変動 田中宏明', 山本洋子', 山口雪子², 山田秀徳³, 松本 英明'(「岡山大・資生研, ²岡山短大, ³岡山大・工)

アルミニウム (AI) 耐性タバコ培養細胞ALT107株は過酸化水素 (H_2O_2) にも交差耐性を示す。本研究では、ALT107株の H_2O_2 耐性能の原因として H_2O_2 消去に関わるペルオキシダーゼ (POD) に着目し、親株 (SL株) との相違を調べた。対数増殖期後期の細胞を超音波破砕し、超遠心分離後、得られた上清を50 mM酢酸ナトリウム緩衝した。粗酵素液のPOD活性を測定において、ピロガロールを電子供与体とした場合、ALT107株では親株の4倍の比活性が見られ、さらにNAD(P)Hを電子供与体とする方に性は、107株においてのみ見られた。ALT107株の粗酵素での場合には、107株においてのみ見られた。ALT107株の粗酸を弱陽イオンカラムクロマトグラフィーで分画した4つかとは、107株においてのみ見られた。ALT107株の粗酸を表ころ、ピロガロールを電子供与体とするPOD活性を引られた。NAD(P)Hを電子供与体とする活性が見られた。NAD(P)Hを電子供与体とする所が見られた。NAD(P)Hを電子供与体とする所が見られた。NAD(P)Hを電子供与体とするの蛋白質がポテトのアニオン性ペルルオキシダルが見られる。以上の結果より、ALT107株ではピロガロールならびにNAD(P)Hを電子供与体とするPOD活性の上昇により、 H_2O_2 を速やかに消去している可能性が考えられる。

2aN10

エンドウ根におけるアルミニウムによるミトコンドリア機能障害とスーパーオキシドアニオンの誘導 小林由樹子¹,山本洋子¹,松本英明¹(「岡山大、資生研)

これまでにタバコ培養細胞においてアルミニウム (AI)による増殖能の低下の原因として、ミトコンドリアの機能阻害ならびに活性酸素の誘発が示唆されている。そこで培養細胞で得られた知見を植物体に応用し、AIによる根伸長阻害とAIによるミトコンドリアの機能阻害ならびに活性酸素の誘発との関わりを検討した。

害ならびに活性酸素の誘発との関わりを検討した。
0.1 mM CaCl₂ (pH 4.75) 中でAl処理されたエンドウ
(Pisum sativum cv. Alaska) の根端のAl障害部位を用いて、ミトコンドリア活性の指標として呼吸量とATP含量を測定した。呼吸量ならびにATP含量はともに、根伸便阻害と同様に、Al濃度とAl処理時間の増加に依存して供いた。次に、ジヒドロエチジウムを用いた組織化学的染色法によりAlによる活性酸素種(ROS)の誘発は根伸長阻害と同時期に始まり増加し続けた。ところでAlは根端の伸長域から映入られた。のまりにも強めた。このように、Alによる根伸長阻害へのミトコンドリア機能阻害なら認められた。

以上の結果より、AIによるミトコンドリアの機能阻害によって生じた細胞内ATP含量の低下ならびにROSの誘発が根の伸長を阻害している可能性が示唆された。

2aN11

タバコ培養細胞がリン酸欠乏処理によって獲得するアルミニウム耐性におけるグルタチオンの関わり 山口雪子¹,山本洋子²,松本英明²(¹岡山短大,²岡山 大・資生研)

タバコ培養細胞はアルミニウム(AI)と鉄(Fe)の共存下 ではFe依存性脂質過酸化を促進し細胞死に至る。AlとFe による脂質過酸化の抑制はAI耐性の獲得に繋がる。対数 増殖期の細胞(+P細胞)をリン酸(Pi)のみ除いた培養液(Pi 欠乏培養液)で6日間培養した細胞 (-P細胞) は脂質過酸 化抑制に伴うAI耐性を示す (Yamamoto et al. 1996)。また 細胞内グルタチオン(GSH)はAlとFeによる脂質過酸化の 抑制に関わっている(Yamaguchi et al. 1999)。本研究では -P細胞が獲得する脂質過酸化耐性への細胞内GSH並びに GSH関連酵素の影響を検討した。細胞内GSHは、Pi欠乏 培養液での培養開始後1日目に含量が約2倍増加したが、 その後は+P細胞と同程度(約24 nmol/100 mg FW cells)の 値だった。GSH関連酵素を粗酵素液で検討した結果、 GSH還元酵素(GR)が1.9倍、GSH-S-トランスフェラーゼ (GST)が1.7倍、リノール酸ヒドロペルオキシドを基質とするGSHペルオキシダーゼ(GPx)が2.4倍、-P細胞で+P細 胞より活性が高かった。更に陰イオン交換クロマトグラ フィーの分画結果はGPx活性がGSTのアイソザイムであ る事を示唆していた。-P細胞ではGRやGST(特にGPx活 性)を高めGSHを効率良く利用し、脂質過酸化並びにAI 耐性を獲得している可能性が考えられる。

2aN12

デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子のクローニング 根岸孝至', 高橋美智子', 中西啓仁', 森敏', 西澤直 子^{1,2} (¹東大大学院・農学生命科学, ²CREST)

イネ科植物は根からムギネ酸類を分泌し, 「鉄-ムギ ネ酸」錯体として土壌中の鉄を吸収する. ムギネ酸類の 合成と分泌は鉄欠乏によって著しく増加し、イネ科植物 における鉄欠乏耐性能は、分泌されるムギネ酸類の種類 と量とに依存する。我々はこれまでムギネ酸類生合成経 路の酵素遺伝子のほぼすべてを単離してきたが、ケト体 から2'-デオキシムギネ酸への反応を触媒する還元酵素 のみが唯一単離されていなかった。この酵素はNAD(P)H依存型還元酵素であることから、様々なNAD(P)H依存型 還元酵素を網羅するaldo-keto reductase gene superfamilyに 属するものと仮定してオオムギからの単離をめざした. このファミリーで比較的保存されているアミノ酸配列か らディジェネレイトプライマーを設計しPCRを行った結 果、3つのPCR断片が得られた、そのうち鉄欠乏オオム ギ根で発現が誘導されていたPCR断片を用いて2つのク ローンを得た. 2つはオオムギ根において鉄欠乏によっ てその発現が強く誘導された. さらにそのタンパク質産 物はケト体から2'-デオキシムギネ酸を生成する酵素活 性を示した.以上の結果,最後に残されていたデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子(DMAS1、DMAS2)の単離に 初めて成功した.

2aN13

ムギネ酸生合成系酵素遺伝子を導入した鉄欠乏耐性 イネの作成(1)

中西啓仁', 鈴木基史', 塚本崇志', 中山優子', 小林高範', 高橋美智子', 川崎信二', 森敏', 西澤直子'.³ (「東大院・農学生命科学, ²農業生物資源研究所, ³CREST)

われわれはこれまでにムギネ酸の生合成経路を確定 し、さらに生合成に関わる酵素の遺伝子のすべてをオオ ムギから単離した. ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (NAAT-A, NAAT-B)を含むオオムギのゲノム断片約11 kbpを導入したイネは、石灰質アルカリ土壌での生育が対照区の4.1倍に改善した(Nature Biotechnology 19: 466-469). ここでは2つのムギネ酸生合成系の酵素遺伝子, ニコチアナミン合成酵素遺伝子(nas1), naat-A遺伝子, ムギネ酸の生合成に深く関わっていると考えられるアデ ニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (HvAPTI)のオオムギのcDNAを、鉄欠乏の根で発現が強 く誘導されるムギネ酸合成酵素遺伝子(Ids3)の5'上流領 域2.2 kbpにつないだものを作成し、これらをさらに2つ,あるいは3つタンデムにつないだものを作成した. これらをイネ(月の光)に導入した. さらにオオムギの Ids3遺伝子のゲノム断片約20kbpを導入したもの、35Sプ ロモーターの下流にIds3 cDNAをつないだものを導入し たイネを作成した. そしてそれぞれの後代を用いて石灰質アルカリ土壌での生育試験を行った. いずれの形質転 換体においても石灰質アルカリ土壌での生育に改善が見 られたが、その改善の様相は導入した遺伝子によって異 なった. 鉄欠乏耐性能, 種子中の金属含量への効果につ いても考察する.

2aN14

オオムギ鉄欠乏誘導性 Ids2 遺伝子プロモーターを導入した形質転換タバコの解析:微量金属の単独および複合欠乏に対する応答性

小林高範 1,2 , 吉原利 $^{-2}$, 姜廷波 2 , 中西啓仁 1 , 森敏 1 , 西澤直子 1,3 (1 東大院・農学生命科学, 2 電中研・生物科学, 3 CREST)

オオムギ根から単離した鉄欠乏誘導性遺伝子 Ids2 (Iron deficiency specific clone no. 2) は、ムギネ酸類の生合 成経路の水酸化反応に関与している。我々は、Ids2遺伝 子のプロモーター領域がタバコにおいてもオオムギと同 様の鉄欠乏誘導性・根特異的発現を付与することを、レ ポーター遺伝子に β -glucuronidase (GUS) を用いた形 質転換タバコの系によって示した (2001年度年会)。こ の形質転換タバコにおいてIds2プロモーターの微量金属 に対する応答を詳細に解析したところ、鉄欠乏が強く発 現を誘導したのに対し、亜鉛またはマンガンの欠乏また は過剰によって発現に顕著な誘導はみられなかった。一 方、鉄と同時に他の微量金属を欠乏させると、鉄のみの 欠乏時に比べて発現の誘導レベルが緩和され、それとと もに鉄欠乏レベルの指標となる葉のクロロシス度合が軽 減されることが確認された。これらの植物体の地上部お よび根部における鉄、亜鉛、マンガン、銅の金属含量を 測定した。鉄と同時に亜鉛またはマンガンを欠乏させた 植物体内の鉄含有量は、鉄のみを欠乏させた植物体の場 合と同程度であった。これらの結果をもとに、鉄以外の 微量金属欠乏が鉄欠乏植物体内の鉄栄養状態に及ぼす影 響について考察する。

Influence of Environmental Stress on DNA Methylation in Maize

Nicolas Steward¹, 佐野浩¹ (¹奈良先端科学技術大学院 大学·植物細胞工学)

In our previous study on maize DNA methyltransferase, we observed that Ac/Ds sequence is demethylated by cold stress. In order to deepen the hypothesis that environmental changes cause epigenetic modification on plant genomic DNA, we applied a severe cold stress to root of maize siblings and found by HLPC analysis that this treatment induced an irreversible genome wide demethylation. We isolated a retro-transposon generated sequence by CpG island amplification and PCR differential display screening, and demonstrated cold induced demethylation by southern blotting. The methylation pattern of this sequence analysed by DNA metabisulfite modification directly showed that cold induced demethylation was spread along the sequence. These findings give new evidence that the environment plays an essential role on the DNA epigenetic modifications.

2aO02

低温馴化過程で変化するシロイヌナズナ細胞膜タン パク質の同定

河村幸男1,上村松生1(1岩大・寒冷バイオ)

シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana L.) は僅か1日の低 温馴化処理でも十分に耐凍性を上げ、1週間の処理でほ ぼ最大耐凍性を得る。凍結傷害の主な原因は細胞膜の半 透過性の喪失であり、低温馴化中の細胞膜の変化が凍結 傷害回避には必要不可欠と考えられている。低温馴化中 の細胞膜脂質の変化と凍結傷害との関係についてこれま で多くの研究がなされてきたが、細胞膜蛋白質の研究は ほとんど行われていない。近年、シロイヌナズナのゲノムプロジェクトが終了したことにより質量分析法による 迅速な蛋白質の微量同定が可能となった。本研究では質量分析器を用いて低温馴化1週間以内に変化する細胞膜 蛋白質の同定を行った。細胞膜蛋白質を尿素、チオ尿素、CHAPSにより可溶化したのち、等電点二次元電気泳 動にて展開した。その結果27個の蛋白質が低温馴化中に 変化している事が分かり、現在までに18個の膜蛋白質に ついて同定を終えた。同定した蛋白質すべてに膜貫通部 位が無いことが予測されたため、これらの蛋白質はおそ らく細胞膜表面に結合しているものと推測された。低温 馴化1日目から迅速に増加してくる膜蛋白質の中に炭酸 固定や蛋白質分解、浸透圧ストレス緩和に関与する蛋白 質やdehydrinがあり、これらの蛋白質は凍結傷害回避に 直接的もしくは間接的に関与していると推察された(本研究は生研機構の援助の下に行われた)。

2aO03

低温馴化過程における細胞内凍結の変動 中川原千早¹,河村幸男^{1,2},吉田静夫¹,江藤剛治³,竹原幸生³,上村松生¹(¹岩手大・農・寒冷バイオ,²生研機構、³近畿大・理工・土木工学)

植物細胞は、凍結融解過程で様々な形の傷害を受け る。そのうち、細胞内に氷晶が形成される「細胞内凍 結」は、比較的速い冷却速度で発生することが知られて いるが、発生機構や低温馴化過程における変動様式など 未解決の点が残されている。本研究では、植物細胞の凍 結融解過程をリアルタイムで観察できる低温顕微鏡を用 いて、シロイヌナズナ低温馴化過程における細胞内凍結 発生頻度や発生温度、冷却速度依存性の詳細な検討、さ らに、細胞内凍結が開始する際の氷晶形成場所の同定を 試みた。未馴化の葉肉細胞から単離されたプロトプラス トでは、毎分0.5-1.0℃という遅い冷却速度でも細胞内凍 結が発生し、毎分2.5-10℃では半数以上のプロトプラス トが細胞内凍結した。低温馴化を1日行うと、毎分1℃以 下では細胞内凍結がほとんど見られなくなった。低温馴 化を2-7日行うと、細胞内凍結の発生温度範囲は低温側 ヘシフトした。高速ビデオカメラによる観察は、低温馴 化の有無・発生温度・冷却速度に関わらず、細胞外氷晶 と接した細胞膜のすぐ内側で氷晶形成が起こり、つい で、氷が細胞内部へ進行していくことを明らかにした。 これらの結果は、細胞内凍結発生に関する低温馴化の効 果が少なくとも2段階で現れること、及び、細胞内凍結 発生は細胞膜の傷害により細胞外の氷晶が細胞内に侵入 することが原因であること、を示唆している。(本研究の 一部は生研機構の援助により行われた。)

2aO04

シロイヌナズナの転写因子DREB1をコードする遺伝 子の低温応答機構の解析

井村喜之¹,鳴坂義弘^{1,2},中島一雄¹,篠崎一雄³,篠崎和子¹(¹国際農研·生物資源,²神戸大院·自然科学,³理研·植物分子)

シロイヌナズナDREBは乾燥、塩、低温ストレス応答 性シスエレメントであるDREに結合し、これらのストレ ス耐性に関わる複数の遺伝子群を活性化させる転写因子 である。DREBの発現はアブシジン酸に非依存的であり DREB1Aは低温により、DREB2Aは乾燥・塩ストレスにより誘導される。我々はこれまでに2つのDREBIAホモロ グ(DREB1B, 1C)を単離し、3種のプロモーター領域を比 較すると9種の共通保存配列(Box-I-IX)が存在すること を見い出した。今回、DREB1の低温応答機構を明らかに する目的で、DREBIA及びICプロモーター上の低温応答に関与するシスエレメントを解析した。DREBICの様々 なデリーションプロモーターを構築し、低温処理後の GUSレポーター遺伝子の転写変動をノーザン解析により 調べた。その結果、65bpのプロモーター領域が低温応答 に必要十分であることが明らかとなった。さらに、本領 域に内在するG-box様配列であるBox-VあるいはBox-VI に変異を導入し、低温応答の有無を調べたところ、 DREBIAにおいてはBox-VまたはBox-VIの変異により応 答性が消失した。一方、DREBICではBox-VIを変異させ た場合にのみ応答性が消失した。しかし、両プロモーター共にBox-V及びBox-VIだけでは低温応答を示さない ことから、65bp領域内に存在する新規な配列の関与が示 唆され、複数のシスエレメントが低温誘導に関与してい ると考えられた。

イネcDNAマイクロアレイを用いた低温処理ブロムグラスの遺伝子発現解析

中村敏英^{1,2},石川雅也¹,矢崎潤史³,藤井文子³,真保住納子⁴,島谷善平⁴,長田夕子⁴,橋本晶子⁴,太田智弥³,佐藤友紀³,本多幸子³,山本公子⁴,坂田克己³,佐々木卓治³,岸本直己³,菊池尚志³(¹農業生物資源研究所・限界機能,²生研機構,³農業生物資源研究所,⁴STAFF研究所)

ブロムグラス(Bromus inermis Leyss)培養細胞は、低温処理やアブシジン酸(ABA)処理により耐凍性を獲得する。我々は耐凍性機構を解明するために、低温処理やABA処理による遺伝子群の発現変化をマイクロアレイを用いて解析した。

低温、ABA処理をしたブロムグラス培養細胞よりそれ ぞれ mRNA を調整し、約9,000 クローンよりなるイネ cDNAマイクロアレイを用いて解析を行った。その結果、特異的なものや共通に発現する遺伝子などが確認された。また、いくつかの興味深いクローンを見出すことができた。

現在、ブロムグラスより単離した遺伝子について解析 を進めている。

2aO06

季節、生育段階に伴う氷核活性の発現 岸本正^{1,2},石川雅也¹(¹農業生物資源研, ²生研機構)

耐凍性を示す温帯性木本植物は凍結温度下で組織特有 の凍り方をする。木部放射性柔細胞や花芽/小花の多く は組織を凍らせない(過冷却する)。一方、花芽鱗片や皮層組織は-5℃程度で積極的に凍り、器官外凍結や細胞 外凍結を行う。後者の木本組織には積極的な凍結を導く 氷の核となる物質 (氷核活性物質) が関与すると考えら れるが、その実体の詳細はあまりよく分かっていない。 前回の報告で氷核活性は様々な温帯性木本植物に存在 し、一般に枝・花芽>実>葉の順にその活性が強いこと を示した。さらに、皮層組織の細胞外凍結はその細胞壁 上の氷核活性に起因することを示唆した. 本報告では最 も氷核活性の強かった一年目の枝についてその活性の変 動を調査した。凍結制御に必要な氷核活性は冬の枝のみ ならず、夏の枝にも認められ、ともに靭皮組織を含む樹皮に強い活性を示した。春の新枝における氷核活性の出現は肥大生長期のリグニン化した部分からみられた。伸 長生長期のリグニン化してない新枝の氷核活性はどの部 分も非常に低かった。事実、新枝は基部から頂端部に向かってリグニン化し、それに続いて氷核活性が出現・上 昇した。一方、氷核活性の出現した枝から誘導した培養 細胞は氷核活性を示さなかった。以上の結果は氷核活性 が枝の成熟化に伴い出現し、靭皮組織中の細胞壁に存在 していることを示唆している。

2aO07

ミカンのデハイドリンは脂質の過酸化を抑制することにより形質転換タバコの低温耐性を向上させる原正和¹, 寺島彰吾¹, 深谷智子¹, 久保井徹¹(¹静岡大・農)

ミカンのデハイドリンは低温ストレスによって誘導される。ミカンのデハイドリンの生理機能を解明するを作は、デハイドリンを発現タバコ(pC19T)のめばえた。デハイドリン発現タバコ(pC19T)のめばえ成出した。デハイドリン発現タバコ(pC19T)のが成出、した。デハイドリン発現タバコ(pC19T)のが成出、してコントロール株を低温がますがで早く発芽しば、出地が、pC19Tでは抑制されたと、一様間でると大って、株間でると、すが、pC19Tでは抑制された。と一様間でると大りますが、pC19Tでは抑制された。と一様間でると大りますが、pC19Tでは抑制された。と一様間でると大りますが、pC19Tでは抑制された。と一様間であると大いますが、pC19Tでは抑制というがよりによいでは、デルスによる最初の障害部位であるに、デーの、がリンは、ダルタン、プロリンよら、デルスによる最初の障害部位であるに、アンジカルスカベンジャーとして保護している性が示唆された。

2aO08

活性酸素消去能向上によるイネ耐冷性強化の試み <u>林泰行</u>¹,中島麻恵¹,伊藤香苗¹,早川孝彦¹,藪田行 哲²,吉村和也²,重岡成²,宮坂均³(¹(株)植物工学 研究所,²近畿大・農,³関西電力(株)総合技術研究 所)

近年、安定型活性酸素消去系酵素の遺伝子導入によ り、葉緑体内のSOD活性およびH₂O₂の消去活性を高める ことで、植物の光障害や酸素毒に対する耐性を強化する ことが試みられている。我々のグループは、大腸菌の Catalase (katE) 遺伝子をタバコで発現させ、乾燥・強光 ストレス耐性の強化に成功している。さらに最近、クラ ミドモナスの葉緑体型Ascorbate peroxidase (apx) 遺伝子 を単離し、その酵素のアスコルビン酸欠乏時の失活に対 する安定性が、高等植物のそれに比べて高いことを明ら かにした。したがって、この酵素遺伝子をイネで発現さ せることで、HoOo消去能を飛躍的に向上させ、耐冷性・ 耐塩性を強化できると考えられる。さらに、我々は酵母 のMn-SOD (sod) 遺伝子を葉緑体型に改造しイネに導入 して耐塩性を強化する事に成功しており、sod遺伝子と apx遺伝子の複合化により環境ストレス耐性がより強化 される可能性がある。そこで本研究では、クラミドモナ スapx遺伝子をイネに遺伝子導入し形質転換体を作出し た。T1世代の植物体で遺伝子発現が確認され、活性測定 によりAPX活性が形質転換体では約5倍強化されている ことが明らかになった。この形質転換体について耐冷性 検定を行った結果を報告する。sod遺伝子とapx遺伝子の 複合化に関しても報告する。

低温ストレス耐性に関与するスペルミジン合成酵素 遺伝子の機能解析

春日部芳久¹,三澤修平¹,猪原泉¹,名田和義²,橘昌 司²(¹_東洋紡総合研究所,²三重大学·生物資源学 部)

ポリアミンは、植物の生長や発育のほかに各種の環境ストレスに対する抵抗性増大にも関与している。本研究では、根が高い低温伸長性を示すクロダネカボチャ(Cucurbita ficifolia)におけるポリアミン代謝関連酵素遺伝子の発現特性を解析するとともに、本植物のスペルミジン合成酵素遺伝子を導入したシロイヌナズナの環境ストレス抵抗性について評価した。

ストレス抵抗性について評価した。 クロダネカボチャ幼植物を25℃と14℃の人工気象室で 6日間栽培したのち、葉、茎、根から3種のポリアミン代 謝関連酵素(スペルミジン合成酵素:SPDS、S-アデノ シルメチオニン脱炭酸酵素、アルギニン脱炭酸酵素) cDNAを単離した。ノーザン解析の結果、3種の遺伝子の いずれも14℃で生育した植物の根で発現レベルが高まっ た。そこで、SPDS遺伝子(FSPDI)をCaMV 35Sプロ モーターにつなぎ、減圧浸潤法でシロイヌナズナに導うン した。形質転換体は野生株に比べて、葉のスペルトレス した。形質転換体は野生株に比べて、東のスペルトレス といるでは、水プコートレス抵抗 性が明らかに高かった。以上の結果により、種々の環境 ストレスに対する植物の抵抗性をSPDS遺伝子の組換え によって高められることが明らかになった。

2aO10

シロイヌナズナの低温馴化過程における過酸化水素 の役割

大坪繭子¹, 斉藤敦^{2,3}, 山田理香², 井上晋一郎², 田坂 恭嗣⁴, 和田元² (「福女大・人間環境, ²九大院・理, ³生研機構基礎研究推進事業, ⁴産総研・生物遺伝子資源)

シロイヌナズナを低温処理すると、糖やアミノ酸などを蓄積し耐凍性が増大する。この低温馴化の過程では、内生のアブシジン酸が増加し、COR遺伝子などの低温誘導性遺伝子が発現することが知られている。また、一方で低温により活性酸素種が生成されるという報告もある。本研究では、シロイヌナズナの胚軸由来カルスを用いて、低温馴化における活性酸素の関与について調べた。

低温処理していないカルスでは、-15 ℃で凍結させると殆どのカルスが死滅するが、2℃で5日間の低温処理をおこなったカルスでは、-15℃で凍結しても約16%が生き残った。また、アブシジン酸や過酸化水素で処理したカルスでは低温でインキュベートしなくても耐凍性が増大した。逆に、過酸化水素のスキャベンジャーである塩化セリウムなどをカルスに与えて過酸化水素の濃度を低化させると、低温処理をしても耐凍性が増大しなかった。これらの結果は、低温馴化の過程において過酸化水素がシグナルとして働いていることを示唆している。

2aO11

アブシジン酸によるヒメツリガネゴケの耐凍性の上 昇と生理学的変化に関する研究

長尾学¹,南杏鶴¹,荒川圭太¹,藤川清三²,竹澤大輔¹ (¹北海道大·低温研,²北海道大院·農)

本研究では、植物の耐凍性機構を解明するために、遺伝子破壊が容易なヒメツリガネゴケ(Physcomitrella patens)を用いて、アブシジン酸(ABA)による耐凍性の変化を調べている。これまでに $0.1\,\mu$ M $-100\,\mu$ MのABAで処理することにより短時間で原糸体の耐凍性が顕著に上昇することが電解質漏出法により明らかになった。

また、フリーズ・フラクチャー電子顕微鏡法で観察したところ、平衡凍結による原形質膜の膜内粒子の欠如やフラクチャージャンプなどの構造変化が未処理細胞では $10\,\mu$ M ABA処理後の細胞に比べ、高い頻度で発生していた。未処理細胞の内膜ではヘキサゴナル $_{\rm II}$ 相の発生も見られた。これらの構造変化は凍結傷害と関連していることが知られており、ABA処理により原形質膜の構造変化が抑えられ、細胞の凍結傷害も緩和されたと考えられる。

そこで $10\,\mu$ M ABA処理による細胞の浸透濃度および含水量の変化を調べたところ、含水量はABA処理前後で大きな変化はなかったが、浸透濃度は未処理細胞では約0.33Mであったのが、わずか1日間のABA処理で約0.49Mまで上昇した。さらに細胞内の糖含量も1日間の $10\,\mu$ M ABA処理で未処理細胞の2倍以上にまで増加することがわかった。これら細胞の浸透濃度や糖含量の上昇は、耐凍性の上昇に寄与していることが示唆される。

2aO12

cDNAマイクロアレイを用いたイネ花粉発育過程における冷温ストレス応答遺伝子の解析

山口知哉¹,中山克大¹,林高見¹,矢崎潤史²,藤井文子³,真保佳納子³,山本公子³,坂田克己²,佐々木卓治²,岸本直己²,菊池尚志²,小池説夫¹(¹東北農研センター,²生物研,³STAFF研)

東北・北日本の稲作にとって重要な穂ばらみ期耐冷性 について、その分子機構に基づいた効率的選抜や遺伝子 導入による高度耐冷性イネの作出が望まれている。イネ の花粉の冷温感受性は、減数分裂終了直後の四分子期か ら四分子が小胞子に解離する小胞子初期に最も高くな り、実際、この時期の冷温処理によって高度の雄性不稔 が誘発されることが明らかになっている。この段階で鍵 を握ると考えられる四分子細胞を包むカロース膜溶解酵 素の協調的活性発現には、葯腔液の酸性化やタペート細 胞層からの酵素の分泌過程が前提となるが、これらの過 程に関与する酵素タンパク質や遺伝子についての解析は 現在までなされていない。そこで、冷温障害発生メカニ ズムにリンクする遺伝子を特定し機能を解明する目的 で、小胞子初期を含む花粉母細胞期から小胞子中期まで のそれぞれの発育過程で発現して、冷温ストレスによって変動する遺伝子群の発現パターンをcDNAマイクロア レイシステムを用いて網羅的に解析した。本発表では、 冷温ストレスに加えて花粉発育過程で発現の変動する遺伝子プロファイルについて報告する。

キクイモ塊茎の凍結傷害過程で生じる細胞膜蛋白質 の組成変化

荒川圭太1(1北海道大·低温研)

過度の細胞外凍結によって植物細胞が傷害を被る場合、生体膜脂質間の相互作用による細胞膜の不可逆的な構造変化がその要因のひとつであるといわれている。しかし、細胞膜の凍結傷害過程における膜蛋白質の関連性についてはほとんど知見がない。

緩速凍結法によって致死的な凍結温度(-10° C)まで凍結処理したキクイモ($Helianthus\ tuberosus\ L$)の塊茎を融解することなく破砕して細胞膜画分を調製し、未凍結組織由来のものと膜蛋白質組成を比較すると、複数の細胞膜蛋白質(frost susceptible proteins: FSPs)の含量が凍結処理によって著しく減少していた。本研究では、凍結要をFSPのひとつで分子量120 kDaのFSP120元着目し、凍結のにすることを目的とした。抗FSP120抗体を用いたイクブロット法により、 -10° Cまで緩速凍結処理した判断することを目的とした。抗FSP120抗体を用いたイクでは、凍結前に比べてFSP120含量は著しく減少することが明ら解産物は検出されなかった。また、凍結前とほとが明ら解産物は検出されなかった。また、凍結がとほと、カク解産物は検出されなかった。また、凍結がとほと、キタの分解産物は大いなかった。これらの実験結果に基づき、そ客で化していなかった。これらの実験結果にあると、大き察化していなかった。これらの実験結果にある、そ客をでは、東結過程におけるFSP120の挙動について考察する。

2aO14

イネshaggy/GSK-3ホモログの機能解析 加藤英樹 1 , 千徳直樹 2 , 今井亮三 3 (1 科技団・科技特, 2 名大院・生命農, 3 農技研機構・北農研)

我々は、イネの低温刺激に対する応答機構を明らかにする目的で低温に応答する遺伝子のスクリーニングを行ったところ、葯を低温処理(12°)するとshaggy様遺伝子(osSGGI)の転写産物が増加することを見いだした。shaggyはショウジョウバエのWinglessシグナル伝達系を構成するSer/Thr protein kinase遺伝子であり、Wntシグナル伝達系を構成する哺乳動物のGSK-3に相当する遺伝子として知られている。Shaggy様遺伝子は、アラビドプシスなどの高等植物にも見いだされており、アラビドプシスケノム中には、約10個の相同遺伝子が存在する。。高等植物のshaggy様遺伝子は、その相同性から大別して3つのグループに分類されるが、OsSGGIは花芽形成等に関与することが示されているAtSKIIのグループに分類される

る。 イネESTデータベースには、4種類のshaggy相同遺伝子 (OsSGGI-4)が登録されており、northern blot解析により これらの発現様式を比較した。吸水後2週間後のseedling では、OsSGGIのみが低温に応答した。また植物体各組 織での発現量はOsSGG間で発現様式に差がみられたが、 共通して強い発現が花序分裂組織及び花芽分裂組織にお いて観察された。現在、OsSGG Iの発現様式をin situ hybridizationにより詳しく検討するとともに、形質転換植 物体を作成してこの遺伝子の機能解析を進めている。

2pA01

P700濃縮粒子のサブピコ秒レーザーフォトリシス: P700からaccessory Chl(A)へ0.8 psで電子移動が起こる熊崎茂一 1 , 古澤宏好 1 , 安田周一郎 1 , 吉原経太郎 1 , 池上 $\underline{9}^2$ (1 北陸先端大, 2 帝京大・薬)

光化学系?は約100分子のChl aを結合しており、antenna Chlを励起すると、20-30 psの時間でP700と A_0 の間の電荷分離が観察される。一方、P700当たり約12分子のChl aしか含まないP700濃縮粒子を用いてP700を直接励起すると、励起エネルギー移動過程の寄与が小さくなるため、約2 psの時間で電荷分離が起こる。今回は、同じ標品を用いてP700を直接励起したときに、Chl (A or A_0)が還元されると新たに750 nm付近に吸収帯が現れることが還元されると新たに750 nm付近に吸収帯が現れることとが選元されると新たに750 nm付近に吸収帯が現れることとの活用して電荷分離速度を測定した。その結果、最も早い成分の電荷分離速度は0.8 psであることを見出した。PSIの反応中心cofactorの立体配置から考えて、これはP700からその最も近くに位置するA(Accessory Chl)への電子移動によるものと推定された。

2pA02

SpinachとAcaryochloris marinaの光化学系1反応中心の 比較:エネルギー移動と電荷分離

<u>熊崎茂一</u>¹, 伊藤繁², 岩城雅代³, 池上勇⁴, 安孫子和樹¹, 吉原經太郎¹ (¹北陸先端大学院·材料, ²名大·理, ³University college, London, ⁴帝京大·薬)

クロロフィルaを主要色素とするSpinachの光化学系1 反応中心 (PSI) と、クロロフィルdを主要色素とするAcaryochloris marina (A. marina) のPSIにフェムト 秒過渡吸収分光を適用し、エネルギー移動と電荷分離過程の差を調べた。SpinachのPSIでは、5ピコ秒の時定数で励起エネルギーの再分配が見られ、cyanobacteriaのPSIでの報告と整合性の高い結果を得た。一方、A. marinaのPSIでは、対応するような励起エネルギー再分配に対応するスペクトル変化が見られなかった。A marinaのPSIでは、対応するとうないが思く、クロロフィルスペクトル種の空間分充のイフィルが無く、クロロフィルスペクトル種の空間分充明と大に均一性が高いためこのような差異が生ずると明される。さらにA. marinaのPSIでは、酸化型サンプルの差から電子移動に関わる信号を選択的に抽出することができた。

2pA03

Synechocystissp. PCC 6803のPsaK2サブユニットは強光下でフィコビリソームから光化学系1へのエネルギー伝達に関与している

藤森玉輝¹, 園池公毅¹, 日原由香子²(¹東大院·新領域·先端生命, ²埼玉大·理·分子生物)

シアノバクテリア Synechocystissp. PCC 6803において、psaKはゲノム上に複数のコピーが存在する唯一の光化学 系1遺伝子である。PsaK1は系1の構成成分であるが、PsaK2は、実験条件により系1複合体中に検出される場合 とされない場合がある、遺伝子を破壊しても通常の光強 度下では野性株との違いが見られない、などのことか ら、その機能は全く分かっていなかった。しかしなが ら、強光下でpsaK2の発現が特異的に増加することが観 察され (Hihara et al. (2001) Plant Cell 13: 793-806)、この 遺伝子産物が強光順化に関わる可能性が示唆された。 こで野性株とpsaK2破壊株を、通常光および強光条件下 で24時間培養し、パルス変調蛍光法を用いて光合成パラ メーターを測定したところ、強光下での非光化学消光 (qN) のみに両株の差が現れた。すなわち野性株では強光下でqN が増加していたが変異株では変動が見られなかった。このことからPsaK2が強光下でのステート変 化、つまりフィコビリソームから系1へのエネルギー伝 達に関与していることが示唆された。さらに、液体窒素 温度でのクロロフィル蛍光測定によってpsaK2破壊株でフィコビリソームから系1へのエネルギー伝達効率が減 少していることが確かめられた。

2pA04

Acaryochloris marina の光化学系で機能する微量な鍵 クロロフィル

秋山満知子¹, 宮下英明², 木瀬秀夫¹, 渡辺正³, 三室 守⁴, 宮地重遠⁵, 小林正美¹(「筑波大・物質, ²東京農 工大・工, ³東大・生研, ⁴山口大・理, ⁵海洋バイオ研)

2pA05

ESRを用いたアカリオクロリス・マリーナの電子移動成分の研究

伊藤邦浩¹, 三野広幸¹, 河盛阿佐子², 伊藤繁¹(¹名古屋大院·理, ²関西学院大·理)

アカリオクロリス・マリーナはクロロフィルdを主要な色素として用いる。光化学系?の反応中心P740はクロフィルdの二量体と推定されている。P740の酸化還元電位は通常の光化学系?反応中心で見られるクロロフィルa2量体P700とは異なるためその電子移動担体や酸化還元電位にも違いがあると考えられる。各電子移動担体の性質を検討するためESRを用いて調べその周辺環境の上的を検討した。ENDORからP740がクロロフィルd由といる検討した。ENDORからP740がクロロフィルを由まりP700と良く似た分子環境にあることを支持するおりP700と良く似た分子環境にあることを支持するおりP700と良く似た分子環境にあることを支持する。との場別と関手と対した。のの関因子は通常のほうれん草などのF4下4センターのもほぼ一致する。しかしg=2.048信号は通常のF4センターとは異なる境がかなり異なることが示された。またなEPR信号な環境がかなり異なることが示された。またなEPR信号が観測された。この信号は[3Fe-4S]鉄硫黄クラスターと対象の信号と良く似ており、その起源については検討している。

2pA06

Ycf4タンパクのエンジニアリングと光化学系I複合体のアセンブリーへの影響

冨田智之¹, 高橋裕一郎¹(¹岡山大·理·生物)

葉緑体ゲノムにコードされているYcf4タンパクは、光 化学系I(系I)複合体のアセンブリーに必須のタンパク である。しかし、Ycf4が系I複合体のアセンブリーを介添えする分子機構は不明のままである。そこで、Ycf4タンパクの機能を解明するために、緑藻クラミドモナスの ycf4遺伝子に部位特異的突然変異を導入し、系I複合体の アセンブリーが部分的に変異をもつ形質転換体の作出を 試みた。クラミドモナスの葉緑体形質転換法を用い、こ れまでにN末端側から9番と10番目、17と18番目の並んだ アルギニンを正電荷のないグルタミンに1つないし両 方を置換した形質転換体 (R10Q、R9/10Q、R17Q、 R18Q、R17/18Q) を作出した。そのなかでR17Q、R18QとR17/18Q株はYcf4タンパクを正常に蓄積したが、R10Q とR9/10Q株ではYcf4の蓄積量が大きく減少した。また、 Ycf4タンパクに2ケ所存在する膜を貫通すると考えられ る疎水領域の間の親水領域の一部を欠失させたり、N末 端側から2残基ずつ欠失させた形質転換体も作出した。 本報告では得られた形質転換体の系I複合体のアセンブ リーに関する解析結果からYcf4タンパクの機能について 議論する

2pA07

光化学系I複合体の分子集合に必須なYcf4タンパクが 形成する複合体の部分精製

中尾光治¹, 高橋裕一郎¹ (¹岡山大·理·生物)

光化学系I(系I)複合体の機能的な形成には、数多ないが、成分が秩序正しくアセンブリーされなければなられていが、アセンブリーの分子機構は、ほとんど解明さ質Ycf4は、系Iのアセンブリーに必須の成分で、分子量の大一党を複合体を形成し、新たに合成される系I複合体を形成し、新たに合成される系I複合体を形成し、新たに合成される系I複合体のアセンブリー装とで行った。を進が、系I複合体のアセンブリー装をで行った。を進が、表I複合体のアセンブリー装を行った。を進が、表I複合体のアセンブリー装をでかし、シーンでは、系I複合体のアセンブリー装をでかした。を進が、対象をでから、Ycf4が形成する複合体が膜を可溶化し、よりながでが、シーンでが発展ででが、Ycf4はがいるが、でチラコと、Ycf4は系Iを合体を分との表があられているが、まだ数多くのタンパク質が含まれているが、まだ数多くのタンパク質が含まれているが、まだ数多くのタンパク質が含まれているが、まだ対分があるにはYcf4がかなれ、エスタン分析により、Ycf4複合体と系Iタンパクの結合はかなり安定であるとそf4複合体と系Iタンパクの結合はかなり安定であると考えられる。

2pA08

Ycf4タンパクが形成する複合体のタグを用いた精製 法の開発

<u> 寺尾彰啓'</u>, Jean-David Rochaix², 高橋裕一郎¹ (¹岡山 大・理, ²ジュネーブ大・理)

数多くの構成成分を含む光化学系I(系I)複合体のアセンブリーには、葉緑体ゲノムにコードされるYcf4タンパクが必須である。Ycf4は大きな複合体を形成していると考えられ、Ycf4複合体は新たに合成された系I複合体と結合して存在することが示されている。

本研究では、Seraphin らにより開発された、プロテインAのIgG結合部位、TEVプロテアーゼ切断部位、カルモジュリン結合部位の3つのドメインを含むポリペプチドから構成されたTAP(tandem affinity purification)タグをYcf4のC末に融合し、Ycf4複合体の精製にIgGとカルモジュリンを用いた2段階のアフィニティクロマトグラフィを行うことを試みた。まず、ycf4遺伝子にTAPタグをコードするDNAを融合したベクターを作製し、葉緑体形質転換法により緑藻クラミドモナスの形質転換株を作出した。得られた形質転換株は、光独立栄養積量は大化でもしたが、Ycf4複合体の形成は正常であった。ここでは、アフィニティクロマトグラフィを用いたTAPタグ融合Ycf4複合体の精製について報告する。

2pA09

PS?におけるフォスファチジルグリセロールの機能 <u>赤井新平</u>¹, 伊藤邦浩¹, Zoltan Gombos², 萩尾美樹³, 和田元³, 伊藤繁¹ (「名大院・理・物理,

²Inst,Plant,Biol,Biol,Res,Cent,Hung,Acad,sci,Szeged,Hungary., ³九大院·理·生物)

Synechocystis PCC 6803のphosphatidylglycerol (PG) 合成を特異的に阻害したpgsA-変異株(1)を用いて我々はPGが光化学系?の電子受容体プラストキノン Q_B の機能に必須であることを最近示した(2)。一方、X線結晶学によりPS?反応中心に強く結合した3分子のPGの存在が明らかとなった。PS?におけるこれらのPGの機能を調べるために我々はPG欠乏条件下で、更に長期間培養を行い細胞内に残存するPG分子を一層減らし、PS?活性を調べた。この結果、細胞内のクロロフィル量が劇的に強少しP700の過渡吸収変化量も減少した。また時間分解蛍光イメージング法によりPS?の蛍光が減少することが明らかとなった。これらの結果からPGがPS?の機能に必須であることが示された。

- (1)[M.Hagio.et.al.(2000) Plant Physiol. 124:795-804]
- (2)[G.Zoltan.et.al. Biochem.in press]

2pB01

Eleocharis viviparaにおけるC3/C4変換に伴うグリシンデカルボキシラーゼの細胞レベルでの発現調節 上野修¹,小林由布子²(「生物研,²東薬大・生命)

水陸両生植物のE. viviparaは、陸上と水中で各々C4型 とC3型の光合成代謝特性と組織構造を表すが、両生育型 で光呼吸がどのように調節制御されているかは知られて いない。本研究では、グリコール酸回路の鍵酵素である グリシンデカルボキシラーゼ(GDC)の細胞レベルでの発 現と光合成・光呼吸関連酵素の活性を調査し、光呼吸の 調節機構の一端を検討した。Eleocharis属の他のC4植物 と比べると、E. viviparaの陸生型はC3酵素の活性が高 また葉肉細胞(MC)に多量のRubiscoを蓄積し、厳密 にはC4-likeな特徴をもつものと考えられた。また、E. viviparaでは光呼吸酵素の活性も他のC4植物と比べ相対 的に高く、維管束鞘細胞(BSC)の中に多数のミトコンドリアを含み、多量のGDCを蓄積していた。水生型では BSCに比べMCがよく発達し、GDCはBSCだけでなくMCのミトコンドリアにも発現していた。このことからE. viviparaでは、光合成代謝と組織構造の変化に伴い、陸 生型と水生型の間でGDCの細胞レベルでの発現調節が行 われているものと考えられた。一方の型から他方の型へ 変換するとき、変換の初期の段階では、典型的な陸生型 と水生型に見られた光合成組織とGDCの発現パターンの 間の関係が崩れる場合が認められた。

2pB02

風変わりなC4型葉構造をもつトダシバにおける光合 成酵素の発現パターン

若山正隆¹,上野修²,大西純一¹(¹埼玉大·理·分子 生物,²生物研)

イネ科のNADP-ME型C4植物であるトダシバの葉で は、葉肉細胞 (MC) と維管束鞘細胞 (BSC) ばかりでな く、distinctive cell(DC)という、BSCと同等な光合成機能をもつ細胞がMCの間に分化している。DCは、BSCと異なり、維管束を取り囲むことなく孤立したファイルを形 成する。本研究では、これらの光合成細胞の分化形成に 伴い、C3,C4酵素がどのように発現するのかを、免疫電 顕法を用いて解析した。成熟した葉身では、PEPCはMC の細胞質に、Rubisco はBSCとDCの葉緑体に、また、 PPDKは、MCの葉緑体に多量に、BSCとDCの葉緑体に 少量蓄積していた。発達中の葉身の解析から、光合成細胞の分化の初期にC3酵素のRubiscoが発現し、少し遅れ てC4酵素のPEPCとPPDKが発現し始めることが明らかに なった。また、BSCとDCのPPDKは、MCのPPDKより遅 れて発現し始めた。BSCとDCにおける葉緑体の発達過程 に差はなく、RubiscoとPPDKの蓄積量の増大パターンに も、両細胞間で違いがなかった。また、BSCに隣接して いるMCと、DCに隣接しているMCとの間には、PEPCと PPDKの蓄積量の増大パターンに差がなかった。これらの結果から、DCは、維管束から孤立しているにもかか わらず、C4光合成酵素の発現調節に関してBSCと等価で あると考えられた。

2pB03

トウモロコシC4型 PEPCの高発現はイネの明所での呼吸を促進する

深山浩¹, 玉井鉄宗¹, 土田博子¹, 徳富(宮尾)光恵¹ (¹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、C4植物では光合成初期炭酸固定に、C3植物では主トウモロコシC4型PEPCを高発現する形質転換イネを局成が大気を伸下(21% O_2)での光合成では対するPEPC高発現の効果を検討した。形質転換イネの大気条件下(21% O_2)での光合成イネの大気を排りていた。形質転換イネに比べて若干低く、非形質転換を動物がであった。PEPC高発現による光合より強イネの約50倍のPEPCを発現する形質転換イネでは非形質を対しまる光で大震度は非形での光合成速度のCO2機度体であった。21% O_2 下での光合成速度のCO2機度を測であった。21% O_2 下での光合成速度のCO2機度を測であった。形質転換イネでは、たま験で、PEPCを高発現させるとRubisco活性、呼吸が促進されることが存出しないが呼吸が促進されることが存出を測定したが呼吸が促進されることがでの呼吸に関係での呼吸は、21% O_2 下に比べて2%より酸合成に関与するに比べると、窒素欠乏条件下でより酸合成に関与するに比べると、窒素欠乏条件下では非形質転換イネでは非形質転換イネに比べると、窒素欠乏条件下ではは非形質を対していると、変素欠乏条件下では、2%は2%に対していると、2%に関与ないないが確認された。

2pB04

生葉における電子伝達制御について 津山孝人¹,小林善親¹(¹九大・生物資源環境科学府)

生葉に光を照射すると、光化学系?から供給された電子は光合成や光呼吸、亜硝酸還元、water-waterサイクルによって消費される。これらの電子消費反応のうち亜硝酸還元とwater-waterサイクルによる電子消費は非常される。電子伝達反応における電子の供給量は消費量との供給を消費がどのように制御されているかを明らかに再りからいる。本研究では、生葉における電子の供給と消費がどのように制御されているかを明らかに同時が成め、光合成炭酸固定速度と射する光の頭度を変光的のとき気中で葉に肝m'、を測定するとき、免免を系?量子収率が低下した。このとき、免免の光ルス光照射直後にケイ光強度が一時的に低下すの現象を解析しない、知知照射直後にケイ光強度が一時的に低下すの現象を解析した結果、光呼吸条件下では光呼吸経路における電子消費が建速となり電子の供給を抑制する系?のdown regulationが起きることが分かった。

2pB05

クラミドモナスの低光呼吸突然変異株における CO_2 適応特性

鈴木健策¹, Gulnara I. Hasanova¹ (¹東北農研センター・ 環境生理)

Chlamydomons reinhardtiiの低光呼吸突然変異株7FR2Nは、ホスホグリコール酸ホスファターゼ欠損突然変異株pgpI-18-7Fをさらにエチルメタンスルホン酸処理して突然、大気条件下でも生育できるサプレッサー二重突然を異株(RPRI-pgpI)である(Suzuki 1995, Suzuki et al. 1999)。この株を野性株と数回かけ合わせて得たRPR1株 N21等で調べた結果からは、おそらくこの突然で要異に発現に発現させるため光呼吸が小さくなるものと考えら、のの感機能に欠陥を生じ、それがCO2機機に発現させるため光呼吸が小さくなるものと考えら、(RPR2-pgpI)を、Zeomycin耐性遺伝子Bleを含むそうる、(RPR2-pgpI)を、Zeomycin耐性遺伝子Bleを含むそうる、ミドpSP124Sを用いた形質転換により得たので、気に対していてN21と比較検討した結果を報告の表別ではよく似ていた。しかし細胞を異なるではよく似ていた。しかし細胞を異なるといずれの株も、その光合成の CO_2 に対する。性が明らかに異なる挙動を示し、その時のクロロフィンらの明らかに異なるを対象で、 CO_2 機度の応応に対した。これらの株のると地較が、 CO_2 適応/利用機構の解明の一助となると期待する。

2pB06

ベンケイソウ型酸代謝の内在性リズムと概日時計に 対する温度の影響

荒田博行¹,中村俊博²,吉武春樹²,吉松孝宏²,八丈 野孝¹,射場厚¹(¹九州大院·理,²九州大·理)

ベンケイソウ型酸代謝(CAM)は連続明条件下で概日リズムを示すことが知られている。しかし、この内在性のリズムは約30℃より高温になると見られなくなり、さらにこの温度以下に戻すことでリセットされる。私たちは時計本体がどうなっているのかという情報を日ファルは時計本体がどうなっているのかという情報を日ファルルルが結合タンパクの遺伝子(CAB)の発現を調べた。CAMの制御の中心的な役割を持っているPEP-Cのリン酸化のリズムは32℃連続明条件では持続しない。CABのmRNA量のリズムも20℃では持続するが32℃では見られなくなり、時計本体も止まっていることを示唆してにされなくなり、時計本体も止まっていることを示唆してにされる。このときCABのmRNA量のリズムはリセットさい。またげるとPEP-Cのリン酸化のリズムはリセットない。またでげるとPEP-Cのリン酸化のリズムはリセットない。またではるとPEP-Cのリン酸化のリズムはリセットない。またでは見えてこない。このともそABのmRNA量のリズムは見えてこない。の理由はよく分からない。別の因子によるCABの発いの制御が強くなって時計による制御が隠れてしまっていることも考えられる。

2pB07

C4モデル植物Flaveria trinerviaにおけるPEPCリン酸化酵素の機能解析

土田祐平¹, 大島健太², 古本強^{1,2}, 泉井桂^{1,2} (1 京大院・農, 2 京大院・生命)

PEPCはC4光合成において初期炭酸固定反応を担う鍵酵素であり、N末端近傍の特定のSer残基の光依存的リン、C4モデル植物であるFlaveria trinerviaからC4植物でしたモデル植物であるFlaveria trinerviaからC4植物でした場でなる。今回我々初めてPEPCリン酸化酵素(FtPEPC-PK)をクローニングの機能解析を行った。大腸菌で組換えたタンパク質を作りした。大腸菌で組換えたろ、PEPCをリイブリダインションの結果、FtPEPC-PK遺伝子は葉に特異的に発現しており、光依存性を示した。また、Flaveria属のC3種物であるF. pringleiではサザンハイブリダイゼーションの結果、FtPEPC-PK遺伝子は葉に特異的に発現しており、光依存性を示した。また、Flaveria属のC3種物であるF. pringleiではサザンハイブリダイゼーションの結果、FtPEPC-PK遺伝子の発現してはサザンハイブリダイゼーションであるF. pringleiではサザンハイブリダイゼーションであるF. pringleiではサザンハイブリダイゼーションであるF. pringleiではサザンハイブリダイゼーションが記められたが、mRNAの発現レベルは関与された。以上からこのFtPEPC-PKはC4光合成に関された。以上が多くに関わっていることが考えられる「きたことが考えられる」。また、対域基をセリン残基に置換した変異酵素を作製したで、現を表している。では、対域を関係を表している。Tsuchida、Y. et al. FEBS Lett. 507(3):318-22 (2001)

2pB08

単細胞紅藻Cyanidioschyzon merolaeにおけるCO₂濃度に応答した葉緑体遺伝子の転写制御

養田歩¹, 長沢桐奈¹, 田中寬¹, 高橋秀夫¹(¹東大·分 生研)

緑色植物における葉緑体ゲノムの転写調節は、全て核から送り込まれる因子に依存すると考えられる。しかれる、これでの葉緑体ゲノムには転写因子が4種コードを想定の葉緑体ゲノムには転写因子が4種コードを想定のまり、自立的な転写調節エットワークの存在が予せされる。我々は単細胞紅藻Cyanidioschyzon merolaeをモデル生物とし、光合成機能に関わる転写調節系とそ関わる転を解明しようとしている。今回我々はCO。同代に問題を知る目的で、高CO。通気培養を行なった細胞をを解析した。この解析には、Cyanidioschyzonの葉泉緑口で、高時に起こる葉緑体遺伝子発現のを体にコードされる全てのORFをスポットしたDNAマイ遺ので、上で解析した。その結果、rbcL、rbcS、cfxQ、dnaK型では、その転写産物量の急速な増加が観察され、また幾合のでコードされる全てのORFをスポットしたDNAマイ遺伝のでの転写産物量の急速な増加が観察され、また幾つのでコードされる全てのの表現が観察され、また幾一個では発現の変体に見ら確かめられた。、葉緑体細菌にみのでは発現の変がは見ら確かめる。大合成細節因子であり、RuBisCo発現調節因子であるとが強く示唆されている。現在、Ycf30 タンパク質とrbc遺伝子発現の関連について検討中である。

2pB09

Expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase from a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* (SvPEPC) in *Arabidopsis* and its effects on nitrogen and carbon metabolism

陳麗梅¹, 李昆志¹, 泉井桂^{1,2} (¹京大院・農, ²京大院・ 生命)

SvPEPC was introduced into *Arabidopsis* for installing a C4-like metabolism in C3 plants. The expression was confirmed by northern and western blot analyses. The transformants showed three phenotypic changes. The major type (Type I) was characterized as growth inhibition with block in true leaf development in seedlings grown on agar medium with kanamycin. Further analysis of Type I plants showed that aromatic amino acids were 1/4 that of control, while the content of Gln was dramatically increased. The plant growth was rescued by supplement of aromatic amino acids to the medium. Thus the introduced SvPEPC exerted its activity in plants and the growth inhibition is primarily due to decrease of PEP for shikimate pathway. Since hexose contents were higher in transformants than control and phenotypes of type I were similar to the reported glucose–repressed plants in many respects, sugar repression might be involved in block of true leaf development.

2pB10

Effects of elevated CO₂ on growth and photosynthesis with three different cultivars of radish.

臼田秀明¹(¹帝京大学·医学部·化学)

Radish cultivar of White Cherrish (WC) with big storage root did not show down-regulation of photosynthesis and overaccumulation of carbohydrates under elevated CO₂ (EC) (PCP 39, 1- '98). Cherry Belle which showed down-regulation of photosynthesis under EC (Plant Cell Environ 21, 905- '98). Kosena (K) with a lower storage root being similar to the wild radish. Three cultivars were grown under four different conditions (9hL/15hD or 14.5hL/9.5hD and 35 Pa or 75 Pa CO2) to evaluate the effect of sink capacity on the acclimation of photosynthesis. Under EC DW increased 1.4 to 2.5 folds. The rate of photosynthesis with the first leaves were similar within the cultivars at the exception of K grown under 14.5hL/9.5hD and EC which showed lower rate. The results will be also addressed to which is the most limiting for maximal growth of radish, source or sink capacity.

2pC01

ラン藻Synechocystis sp. PCC6803のNa⁺依存HCO₃⁻ transporter

<u>柴田真理</u>',加藤大和',福澤秀哉²,小川晃男'('名古屋大・生物分子応答研究センター,²京大院生命・総合生命科学)

ラン藻は CO₂ 濃縮機構を持ち、CO₂ 取り込み系と HCO_3 可り込み系が存在する。これまで NdhD3 型と NdhD4型の両方のNAD(P)H デヒドロゲナーゼを破壊した変異株は CO_2 取り込み活性を持たないことが明らはとなった。これらの変異株はpH7.0のBG11、空気中では野生となった。これらの変異株はpH7.0のBG11、空気中では野生となった。これらの変異株はpH7.0のBG11、空気中では野生となった。とかし培地がpH9.00で空気・神送により、pH9.01のででは野生と素源が十分に供給されていると考えられる。そこで、CO₂取り込み系を破壊した変異株に遺伝子タギング法で気に変異をランダムに挿入し、pH9.01の目に変異ない変異を要した。選別した。選別した変異株の中で4株は同じ遺伝子(shr1512)の異な部位に変異料の中で4株は同じ遺伝子(shr1512)の異と部で変異様の中入った4株は同じ遺伝子(shr1512)の異と部で変異がの取り込み活性はほとんど見られなかった。またこの取り込み活性はpH11に依存していることも確認した。

2pC02

Anabaena sp. PCC 7120におけるヒドロゲナーゼ遺伝子 破壊の光生物的水素生産およびニトロゲナーゼ活性 に対する影響

 $\frac{\dot{\Pi}\Pi^{-1}}{\pm m}$, 持丸真里², 桜井英博¹ (¹早稲田大・教育・生物, ²駒沢大・文学部・自然科学)

糸状窒素固定型ラン色細菌Anabaena sp. PCC 7120を利 用した光?水素生産系では、光合成的酸素発生条件下においてニトロゲナーゼ反応により持続的に水素を生産す ることができる。その水素生産性は低いが、その原因の 1つとして2種類のヒドロゲナーゼ(取込み型Hupと双方向性Hox)による水素の再吸収が考えられる。Anabaena sp. PCC 7120のヒドロゲナーゼ構造遺伝子hupLとhoxHを破壊することによりhupL-、hoxH-、hupL-/hoxH-の3種の遺伝子破壊株を作製し、水素生産効率およびニトロゲナーゼに対する効果を調べた。遺伝子破壊は、Wolkらの triparental mating法によった。hupL-株の水素生産は野性 株の4-7倍に増大したが、hoxH-株の水素生産は野性株よ りも有意に低かった。hupL-/hoxH-株の水素生産は野性 株よりも顕著に高かったが、hupL-株と同程度であっ ニトロゲナーゼ活性に対するヒドロゲナーゼ遺伝子 破壊の効果は、全ての変異株を通じて、ほとんど認められないかあってもごくわずかであった。hupL-株による光?水素エネルギー最大変換効率は、アルゴン気相下、 10 W/m²⁺(PAR)の弱光下において1.2%であった。した がって、Anabaena sp. PCC 7120株においては、hupL遺伝子破壊が水素生産性増大に有効であることが示された。

2pC03

ヘテロシストをもつ海産窒素固定糸状シアノバクテ リアの水素生産能と系統関係

宫下英明1, 富士原智子1, 松本光史1, 竹山春子1, 松 永是1 (1東京農工大·工)

窒素固定シアノバクテリアは、嫌気条件下で水素を生 産する。形態に基づき、単細胞、糸状細胞、ヘテロシス トを有する糸状細胞に大別される。本研究では当研究室 で保有しているヘテロシストを有する海産の窒素固定糸 状シアノバクテリアの水素生産能を測定した。さらに、 シアノバクテリアの16SrDNA約1.2kbpを特異的に増幅で きるプライマーを用いて16SrDNAの部分断片を増幅・配 列決定した。得られた配列に基づきこれらの株の分子系 統関係を明らかにし、水素生産能と分子系統関係の関連 について検討した。

ヘテロシストをもつ海産窒素固定糸状シアノバクテリ ア全てにおいて水素の生産が確認された。生産能は0.3-1.0 μ l/mg dry wt/day であり、海産の単細胞シアノバクテ リアCyanothece属の株の水素生産能の平均が200 μ l/mg dry wt/day であるのに比べ、低かった。分子系統関係を 調べた結果、今回の測定に用いたシアノバクテリアの多 くがNodularia属に帰属された。Nodularia属内は、分子系 統上6-9のグループに大別されたが、水素生産能にグ ループ間差異は見られなかった。これらの結果から、海 産の窒素固定糸状シアノバクテリアのヘテロシストに依 存した水素生産能は、そのシアノバクテリアの系統によ らず、単細胞シアノバクテリアの水素生産能にくらべ遙 かに小さく、その生産性も系統間においてあまり変わら ないことがわかった。

2pC04

ラン藻Synechococcus PCC7942 phosphoribulokinase の 過酸化水素耐性

小林大輔1, 田茂井政宏2, 重岡成2, 岩城俊雄1, 和田 野晃1(1阪府大院·応生化,2近大農·食栄)

ラン藻 Synechococcus PCC7942 (S.7942) のcalvin cycle を構成するPRK, NADP-GAPDH, FBP/SBPaseは, 高等植物チオール酵素に見られるような明暗変化の活性調節が 見られないと報告されている (Tamoi et. al. 1998).ラン藻 のNADP-GAPDH, FBP/SBPaseに光活性化が見られない理 由は、光活性化に関わるCys 残基の欠損と考えられている。しかし、S.7942 PRK 遺伝子の単離・解析及びアミノ 酸配列解析によると、高等植物PRKの光活性化に関わる Cys16,55に相当する二つの Cys 残基が両残基間が 18 残 基欠損しているが、S.7942 PRKに存在していた. そこで ラン藻光合成制御酵素の内, 唯一光活性化に関与する Cys 残基を持つPRK の過酸化水素耐性を検討した. 1 mM までの過酸化水素に対して組換精製酵素の活性は, すでに過酸化水素耐性が示されているNADP-GAPDH, FBP/SBPase と比して感受性を示したが、高等植物 PRK よりも耐性であった。また、基質である ATP 共存で耐性が改善した。これら結果からラン藻 PRK はNADP-GAPDH、FBP/SBPaseと異なり酸化還元の調節を受ける が、高等植物 PRK ほどcalvin cycle 調節において重要な 役割を担わないこと、また基質である ATP が存在すると さらに酸化の影響を受けにくいことが示唆された.

2pC05

ラン藻Synechocystis sp. PCC 6803の暗中でのall-trans lycopene生合成にはcis carotene異性化のための遺伝子 が必要である

正元和盛1,和田元2,金子貴一3,高市真一4(1熊本 大·教育·生物, ²九大·院理·生物, ³かずさDNA研 究所, ⁴日本医大·生物)

ラン藻Synechocystis sp. PCC 6803の野生株は光混合栄養の培養でも、暗中培養(LAHG, light-activated heterotrophic growth)でも、生成するクロロフィル、カロテノ イド成分は同一であった。sll0033遺伝子破壊株は光混合栄養条件下では上記と同じ色素成分を含んでいた。しかし、LAHG条件下で生育させたところ、シス型カロテンが蓄積し、通常のカロテノイド成分は見られなかった。 このシス型カロテノイドは主にcis-lycopeneであった.こ の細胞を光照射すると、cis-lycopene はall-trans lycopene に変化した。この遺伝子(crtHと命名)を大腸菌で過剰発現させて得られたタンパク質は、crtH遺伝子破壊株を LAHG条件下で生育させた細胞から単離したチラコイド 膜標品のcis-carotenesをall-trans lycopeneに異性化した。 これらの結果は、この遺伝子がcis-carotenesを暗中でalltrans型に異性化するのに必要であり、また光照射下では 光異性化がおきていることを 示している. Masamoto, K. et al. (2001) Plant Cell Physiol. 42(12)

1398-1402.

2pC06

ラン藻の遺伝子置換における異種rps12遺伝子の利用 高濱一貴¹, 松岡正佳¹, 小川隆平¹(「崇城大・工・応 微工)

30SリボソームのS12タンパク質をコードするrps12遺伝子は、ストレプトマイシン耐性(Str')変異が起こるいくつかの部位をもち、野生型rps12遺伝子は優性のストレプトマイシン感受性(Str')を付与する。この性質を利用して、ラン藻Synechococcus sp. PCC 7942の染色体上の任意のターゲット部位での組換え体を得る方法(rps12媒介遺伝子置換法)を開発した[1]。しかし、rps12部分2倍体は自然的に10-5の頻度で遺伝子変換を起こすという問題点があった。そこで、異種ラン藻Synechocystis sp. PCC 6803のrps12遺伝子を改変し、S12タンパク質のアミノ酸配列相同性が高く、rps12塩基配列相同性を低くして遺伝子変換率を低下させた実験結果について報告する。

文献[1]Matsuoka, M., K. Takahama and T. Ogawa (2001) Microbiology 147: 2077–2087

2pC07

rps12媒介遺伝子置換による好熱性ラン藻光化学系 II psbA1遺伝子の中温性ラン藻ゲノムへの組み込み 服部真¹, 池畑正太郎¹, 堀田幸嗣¹, 松岡正佳¹, 小川 隆平¹(¹崇城大・工・応微工)

タンパク質の熱安定性の差を利用した精製法を光化学系II膜タンパク質複合体にも適用することを目標として、好熱性ラン藻のpsb遺伝子を中温性ラン藻ゲノムへ組み込む実験をrps12媒介遺伝子置換法[1]を用いて行った。好熱性ラン藻Synechococcus vulcanusの最も発現しているD1タンパク質をコードするpsbAI遺伝子を中温性ラン藻Synechococcus sp. PCC 7942のpsbAI遺伝子座へ組み込むため、PCC 7942内で自律複製可能な組換えプラスミドpUC3036を作成した。これを用いて psbAI遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子が挿入されたストレプトマイシン感受性部分2倍体ラン藻株を形質転足した結果、psbAI遺伝子座に好熱性ラン藻由来のpsbAI遺伝子のORFが組み込まれた組換え体が得られた。現在、psbAI遺伝子の転写解析およびチラコイド膜へのD1タンパク質の組込みの解析を行っている。

文献[1] Matsuoka, M., K. Takahama, and T.Ogawa (2001) Microbiology 147, 2077-2087

2pC08

フィコビリゾームの蛋白質を欠失したSynechocystis sp. PCC6803 変異株4種でのエネルギー移動と光合成系

伊藤繁¹, 赤井新平¹, 杉浦花菜¹, Bettina Ughy², Ajlani Ghada², Mustardy Laszlo³, Zoltan Gombos³ (¹名古屋大院・理・物理, ²SEC/Saclay, France, ³BRC Szeged, Hungary Acad. Sci.)

アンテナ複合体フィコビリゾームの一部あるいは全部 を欠くシアノバクテリア変異株4種のエネルギー移動と 光合成機能を検討した。PAL株(アロフィコシアニン APC,とフィコシアニンPC、ベースリンカーの欠損変異 株)、CK株 (core のみをもつ=PC-,APC+), CB株 (2ロッ ドリンカーが欠損しPCの1/3が結合、残りは遊離してい るらしい)、cpcD-欠損株、の4種を対象に77Kでの時 間一波長イメージング蛍光分光、共焦点蛍光スペクトル 顕微鏡と電子顕微鏡による観察を行った。PAL変異株は フィコビリゾームを持たず、高カロチノイド含量を示 し、シアノバクテリアとは思えない黄緑色を示しPSII/ PSI比は高かった。CK株はクロロフィルとAPCのみの蛍 光を示した。cpcD-株は野生型とほとんど同じ特性を示 し、いずれも期待通り正常なPSI,PSII光化学系反応中心 を持つ。一方CB株は630nmPC励起でPC、クロロフィル 蛍光ともに長寿命だが、406nmのクロロフィル励起では 後者は短寿命となる不思議な結果を示し、光エネルギー が遊離PC中に保存された後クロロフィルに移動すること が示唆された。さらに個別細胞のスペクトルと形態を検 討した。

2pC09

DNAマイクロアレイによるSynechocystis sp. PCC 6803 のレドックス制御遺伝子の探索

旦原由香子¹, 園池公毅², 金久實³, 池内昌彦⁴(「埼玉 大·理, ²東大·新領域, ³京大·化研, ⁴東大·総合文 化)

高等植物や緑藻の葉緑体、シアノバクテリア等では、 光合成電子伝達鎖のレドックス状態によって遺伝子発 現、転写産物の安定性、翻訳等の調節が行われているこ とが知られている。しかし、一つの光合成生物の中でど れだけの遺伝子がレドックス制御の影響下にあるか、そ の全貌は全くわかっていない。そこで本研究では、Synechocystis sp. PCC 6803に弱光または強光下で光合成阻害 剤のDCMU (プラストキノン(PQ)プールの還元を阻害) またはDBMIB (PQプールの酸化を阻害)を添加し、 時間培養したときの全転写産物量への影響をDNAマイク ロアレイを用いて網羅的に調べた。阻害剤の添加によ り、明らかに転写産物量が変動した遺伝子は弱光下、強 光下、共に80個前後であった。その内両阻害剤の効果が 正反対に現れたものは弱光下、強光下、共に3、4個、 DBMIBでのみ強い誘導効果が現れたものを含めても20個 程度であった。これらの内訳は一連の熱ショックタンパ ク遺伝子といくつかの機能未知遺伝子であり、その転写 産物量はPQプールのレドックス状態によって制御され ている可能性が高い。一方、光化学系I、フィコシアニ ン、色素合成系、ATP合成酵素、リボソームタンパク等 をコードする遺伝子等には、両阻害剤が同様な効果を顕 著に及ぼしていた。これらの結果をもとにシアノバクテ リアのレドックス調節戦略について論じる。

2pC10

Synechocystis sp. PCC 6803の強光下における光化学系? 量調節のメカニズム

村松昌幸¹, 日原由香子¹(¹埼玉大·理)

2pF01

葉の発生分化を制御する因子の解析 キムキョンテ^{1,2}, 伊藤卓也³, 関原明³, 篠崎一雄³, 塚 谷裕一^{1,2,4} (¹基生研, ²岡崎国立共同研・統合バイオ, ³理研・植物分子生物, ⁴総研大・先導科学)

葉を含む植物の器官の発生分化は、シュート頂分裂組織の形成と密接に関係している。近年、遺伝学的解析により分裂組織の制御・維持や葉の分化に関わる遺伝子群の存在が明らかになりつつある。しかし、分裂組織からの葉器官形成を直接司る遺伝的制御については、まだ明らかになっていない。

そこで、シュート頂分裂組織からのシグナルによる葉 の発生分化制御の側面に注目し、これに関連する遺伝子 の探索を行なった。その結果、葉分化パターンの異常を 示す変異体356-2を同定した。356-2は細葉および細い フィラメント状となる異常な表現型を示すほか、葉の器 官の向軸側が背軸側化する表現型を示すことが判明し た。さらに、背腹性パターンの異常を示す filamentous flower変異体との二重変異体を作成し、遺伝学的解析を 行なった。その結果、それぞれ単独の変異体より顕著な 葉形の異常を示すほか、葉の器官にシュート頂分裂組織 の形成が認められた。356-2遺伝子はクローニングの結 果、酵母やショウジョウバエの遺伝子と相同性を示す植 物新規のElongator-associate proteinをコードしていること が判明した。多細胞生物においてのこの遺伝子の解析 は、本研究が初めてである。以上の結果から、356-2遺 伝子は分裂組織から葉への分化を制御していると考えら れる。本学会では上述の結果をもとに、シュート頂分裂 組織と葉の発生分化との関係について考察する。

2pF02

The Characterization of AN Protein Regulating Polar Elongation of The Leaf Cells

<u>チョキュヒョン</u>¹, キムキョンテ^{1,2}, 塚谷裕一^{1,2,3} (¹岡崎国立共同研・統合バイオ, ²基生研, ³総研大・先導科学)

AN gene of Arabidopsis encodes the homolog of the human CtBP, which regulates polar elongation of the leaf cells. To understand the role of AN in control of leaf morphogenesis, we analyzed the AN using yeast two-hybrid and in-vitro-interaction assay. Since Drosophila CtBP interact with itself, we examined the ability and the required domain for self-association. The results showed the AN self-associates in its Cterminal region. On the other hand, the human CtBP was identified as a protein that binds with the C-terminus of adenovirus E1a, and we tested the interaction of AN with E1a. AN has tree putative domains: LXCXE required RB, 2-hydroxyacid dehydrogenase and NLS domain. The possibility of interaction of AN with RB was also examined. In addition, the putative proteins with PXDLS domain were examined for the possibility of interaction with AN. Based on these results, possible role of AN in protein-protein interaction will be discussed.

2pF03

光シグナルによる葉の伸長制御に関する解析 小塚俊明^{1,2,3}, キムキョンテ^{1,2}, 塚谷裕一^{1,2,3} (¹基生 研, ²岡崎国立共同研・統合バイオ, ³総研大・先導科 学)

植物の光環境による伸長制御の解析には、比較的単純 な系である胚軸が多く用いられ、他の器官における解析 は少なかった。葉は、胚軸とは異なる伸長パターンを示 す点で興味深い系であり、光合成を遂行する主要な器官 であることから、葉の展開を制御する光シグナル機構の 解明は、形態形成の理解に重要である。本研究では、ま ず基本的な光による制御機構を明らかにするため、 容体の変異体を用い、各種光環境下における葉の伸長パ ターンを解析した。また、葉の縦方向の伸長を制御して いるROT3遺伝子は、以前に報告した通りブラシノステ ロイド合成系との関連を強く示唆する結果が得られてい る (Kim et al., 1998, 1999)。そこで、rot3変異体の各種光 環境下における伸長パターンを解析した。その結果、 rot3変異体は暗黒下において葉柄の伸長が阻害され、芽 生えでは赤色光下において胚軸の伸長が阻害された。さ らに、ROT3プロモーターの制御下においたGUSマー カー遺伝子の発現パターンを調べた結果、暗黒下の葉柄において強い発現が認められた。これらの結果から、葉 の伸長には光シグナルによるROT3発現制御系が強く影響していることが示唆された。以上の結果を踏まえ、光 シグナルによる葉の伸長機構の分子メカニズムについて 考察する。

2pF04

Isolation and Characterization of Arabidopsis Mutants Affected in Vascular Development

槻木竜二¹, 岡田清孝¹ (¹京都大院·理·植物)

The molecular mechanism that regulates vascular pattern formation is largely unknown. Although auxin and its flow have long been implicated in vascular differentiation, their mode of action is still unclear. To genetically dissect vascular pattern formation, we are screening for mutants affected in vascular development.

A dominant mutant line, CA22, defective in vascular development was found among T-DNA insertion lines. CA22 exhibits narrow cotyledons and leaves with reduced vascular network. Auxin distribution in CA22 was analyzed using synthetic auxin-responsive promoter fused to GUS reporter gene (DR5::GUS). Although auxin distribution in roots of CA22 was as normal as those in wild type, the amount of auxin in young leaves and in the region corresponding to the shoot apical meristem was greatly reduced in CA22, suggesting auxin distribution is defective in CA22.

Further screening for new mutations using EMS-mutagenized population of a vascularture-enhancer-trap line will also be reported.

2pF05

Arabidopsis flowering gene TERMINAL FLOWER2 (TFL2) encodes an HP1-like protein and negatively regulates FT expression.

高田忍^{1,2}, Toshihisa Kotake¹, Koji Goto^{1,2} (¹岡山県生物 科学総合研究所, ²CREST, JST., ³University of California, Davis)

Flowering of plants is regulated by day length and temperature. Mutations in the TFL2 gene cause early flowering and strongly reduce photoperiod sensitivity. Among four of key flowering-time genes (SOC1, LFY, FT, and CO), only FT is highly upregulated in tfl2 from the early stage of vegetative development. The fact that ft mutation suppresses the phenotype of tfl2 suggests upregulation of FT is the main cause of the early flowering of tfl2. We have cloned the TFL2 gene and found that it encodes a nuclear protein with chromo and chromo-shadow domains. TFL2 belongs to the HP1 family, members of which are known to mediate heterochromatin formation. TFL2 is expressed in undifferentiated cells of shoot apical meristems, young leaves, and root meristems. Together, these results suggest that TFL2 functions as an epigenetic repressor and regulates flowering time by repressing FT expression during non-inductive conditions.

2pF06

FASと相互作用するシロイヌナズナASF1の機能欠損 変異体の単離

賀屋秀隆¹,白靜熹²,李鐘煥²,久保知大³,加藤友彦⁴,田畑哲之⁴,白野由美子⁵,林浩昭⁶,柴田大輔⁴,関原明⁷,小林正智⁷,篠崎一雄⁷,西川伸一¹,荒木 崇³, 柴原慶一^{8,9} (¹京大・医, ²京大院・生命, ³京大 院・理, ⁴かずさDNA研, ⁵三井業際植物バイオ, ⁶東大 院・農生,7理研筑波分子生物,8科技団,9京大ウイル

2pF07

トマトLFY/FLOホモログTOFLの機能 小又佳子1, 荒木貴裕1, 加藤一幾1, 金浜耕基1, 金山 喜則1(1東北大院・農)

トマトの花芽形成突然変異体lfiは全く花芽を形成せ ず、無限生長する葉化花房を形成する。SEMによると、 Ifi花序は栄養器官の生長点と似た分裂組織を連続的に形成した。葉化花房では通常葉の他に、細長い棒状の、あ るいは小葉状の器官(擬葉)が形成された。また、葉化 花房の軸の合着、擬葉の多肉化や合着、さらには果実様 体化は、Iff花序が心皮形成能を維持していることを示唆した。一方、花房着生節を検討したところ、野性型より 上位であったため、LFIは花芽形成時期にも関与すると 考えられた。lfiと野性型の未熟花房から、RT-PCRによ りトマトにおける花芽決定遺伝子であると考えられる TOFL (LEAFYホモログ) とTDR4 (APIホモログ) を単 離したところ、IfiのTOFLに12bpの欠損がみられた.この 欠損部位は配列の良く保存された領域であったためlfi表 現型の原因と考えられた. しかしlfi花序での擬葉の多肉 化においてはTAGI (AGAMOUSホモログ) の発現がみら れたため、TOFLはTAGIの発現とそれに伴う心皮形成に は必ずしも必要ではないと考えられた.

2pF08

Analysis of Rice Mutant Reducing the Number of Spikelets per Panicle

田淵宏朗¹, 寺尾富夫¹(¹農研機構・北陸研究センター)

Genes determining the number of spikelets per panicle were studied using a thin panicle mutant, of which most of the spikelets on primary and secondary rachis branch except the one on top were aborted, derived from Nourin8 (N8).

RNAs were prepared from the young panicles of this mutant and N8 at the early panicle differentiation stage. cDNA subtraction was carried out, and 10 clones were primarily selected. Secondary screening was done with RT-PCR. Only one of clones was promising; a fragment was multiplied using N8 cDNA as a template, but not with mutant cDNA. Northern blot analysis using this clone as a probe confirmed this; signal was detected in young panicle in N8, but not in mutant. This gene may need for normal development of spikelet primordia. Isolation of full length cDNA as well as characterization of this gene are in progress.

2pF09

雌ずい形成に関与するリボソーム蛋白質遺伝子の機 能解析

西村泰介^{1,2},和田拓治²,佐藤修正³,加藤友彦³,田畑哲之³,岡田清孝^{1,2}(¹京都大院・理・植物,²理研・植物科学センター,³かずさDNA研究所)

リボソーム蛋白質遺伝子における突然変異が植物の発 生や生育に影響する例が、現在までにいくつか報告され ている。私たちが新規に単離したシロイヌナズナ short valve 突然変異体 (stv) も、L24 リボソーム蛋白質をコー ドする遺伝子が欠失した突然変異体であり、多面的な形 態異常を示す。この突然変異体では、既知のリボソーム 蛋白質遺伝子の突然変異体で見られる表現型(細葉、生 育の遅延など)に加えて、雌ずいの形態(子房を構成す る部分が短くなり、その欠損部分が子房柄に置き換わっ ている) にも異常が観察される。このことから L24 リボ ソーム蛋白質は、他のリボソーム蛋白質と異なり、雌ず い形成にも関与することが示唆される。ノーザン解析並 びにレポーター遺伝子を用いた解析より、STV遺伝子は 分裂活性の高い細胞で強く発現することが示された。 STV-LIKE PROTEIN (SVL) 遺伝子はシロイヌナズナゲ ノム上のL24 リボソーム蛋白質をコードするもう1つの 遺伝子であるが、STV遺伝子とほぼ同じ発現パターンを 示したことから、この遺伝子もSTV 遺伝子と同様の機能 を持つ可能性が考えられる。現在、SVL 遺伝子へのT-DNA 挿入植物体の単離を行っており、その結果と併せ て、雌ずい形成における STV 遺伝子と SVL 遺伝子の機能 を考察したい。

2pF10

ペチュニアの雄薬形成に関与する遺伝子産物間の相 互作用

間山智子¹, 土本卓¹, 大坪栄一¹(¹東京大·分生研)

ペチュニアのクラスB遺伝子GREEN PETAL (GP) は、花弁の形成には必要だが、典型的なクラスB遺伝子とは異なり、雄薬の形成には必要ではない。我々は以前、ペチュニアには雄薬形成に関与する仮想的なクラスB遺伝子 PhBX (Petunia hybrida class B gene X) が存在することを報告した。ペチュニアにはクラスB遺伝子のパラロとして単離された pMADS2 と PhTM6 が存在するが、これらがPhBX かどうかは明らかにはなっていない。ペチュニアの 雄薬形成にはクラスB遺伝子のほかにクラス C遺伝子 pMADS3 と、クラスE遺伝子FBP2 が関与してもり、これらの産物が複合体を形成して作用していると考えられる。そこで、今回我々は PhBX 遺伝子を同定分ととの、PMADS3 及びFBP2 と相互作用する遺伝子産るため、PMADS3 及びFBP2 と相互作用する遺伝子産るを酵母の three-hybrid system を用いて調べた。その結果、PMADS2 と PhTM6 の産物がどちらも、FBP2 およびのMADS3 と三重複合体を形成することが明らかとなった。この結果は、pMADS2 または PhTM6 が PhBX 遺伝子であることを示唆している。

2pG01

タバコ培養細胞BY-2より単離した210 kDa 微小管結合タンパク質

濱田隆宏1,新免輝男1,園部誠司1(1姫路工大・理)

タバコ培養細胞BYム2のミニプロトプラストから微小管タンパク質を調製し、重合・脱重合サイクルおよマトグマイオン交換、hydroxyapatite、ゲル濾過カラムクロマトクーをリカラ量210 kDaの微小管結合タンパク質を単離した。部分アミノ酸配列をもとにホモロジー検索を行ったところ、XMAP215/TOG関連タンパク質である可能性が示唆された。210 kDaタンパク質のtubulinのも間互作用に対する影響を濁度測定に濁度た場所といき間の相互作用に対する影響を測定に濁度た場別によりを加えた。はかし、これにはxolを添加し場合には濁度が大きく上昇した。これになるを添加し場合には濁度が大きく上昇した。これにないで加えた試料合には濁度が大きく上昇した。これのサンプルを電験を行った。微小管に210 kDaタンパク質全てを同時に混合には後者の上滑に多くのtubulin及が210 kDaタンパク質全でを同時に記念のは後者の上清に多くのtubulin及が210 kDaタンパク質ががみられた。452,000 xg, 10 minではそれらのほとんとでがみられた。この結果は、210 kDaタンパク質存在下るに、この結果は、210 kDaタンパク質をでないが、といいのではそれらのほとんとでがなられた。この結果は、210 kDaタンパク質をででした。この結果は、210 kDaタンパク質をででしている。

2pG02

植物における機械的刺激受容チャンネルによる重力 刺激の受容

<u>曽我康一</u>¹,若林和幸¹,神阪盛一郎²,保尊隆享¹(¹大阪市大・院理,²富山大・理)

過重力環境下でアズキおよびシロイヌナズナ芽生えを 生育させると、キシログルカンの分解が抑制されて、細 胞壁伸展性が低下し、茎成長が阻害される。しかし、そ の刺激受容のメカニズムについては明らかになっていな い。近年、機械的刺激受容チャンネルが動物細胞の重力 刺激の受容体として働くと考えられつつある。そこで、 本研究では、過重力刺激による成長阻害に機械的刺激受 容チャンネルが関与しているのかを調べた。機械的刺激 受容チャンネルの阻害剤であるランタン(La)およびガド リニウム(Gd)で処理した芽生えでは、過重力刺激はキシ ログルカンの代謝および細胞壁伸展性に影響を与えず、 成長を阻害しなかった。カルシウムイオンで前処理する と、LaおよびGd存在下でも過重力刺激によって茎成長が 阻害された。また、LaやGdで処理をした茎でも、重力屈 性は対照と同様であった。さらに、シロイヌナズナsgr1/ scr、pgm重力屈性突然変異体でも、野生型と同様に過重 力刺激によって下胚軸の成長が阻害された。以上の結果 から、植物芽生えはカルシウムイオン透過性機械的刺激 受容チャンネルで重力刺激を受容し、キシログルカンの 代謝を調節することにより細胞壁伸展性を変化させ、茎 の成長速度を調節している可能性が示された。また、過 重力刺激による成長阻害と重力屈性とでは、重力刺激の 受容機構が異なっている可能性が示唆された。

2pG03

Transgenic poplars overexpressing sucrose synthase <u>小西照子</u>¹,大宫泰德¹,酒井富久美¹,林隆久¹(¹京都大·木研)

Sucrose synthase is believed to function to channel UDP-glucose to cellulose synthase during secondary cellulose synthesis. We produced transgenic poplars overexpressing sucrose synthase in order to assess the function of the enzyme in the synthesis of cell wall polysaccharides in the sink tissues. When [14 C-glucose] [3 H-fructose] sucrose was fed from the phloem of leaf, 14 C and 3 H was symmetrically incorporated into cellulose in the stems of the wild-type plant. The transgenic poplars overexpressing sucrose synthase enhanced the incorporation of both 14 C and 3 H into cellulose and that of 3 H into hemicelluloses compared with the wild-type plant. The result showed that an overexpressed sucrose synthase carried out to enhance not only cellulose deposition but also fructose recycling in hemicellulose synthesis in poplar stem.

2pG04

準同質遺伝子系統イネを用いた葯の低温障害機構の 解析

川口健太郎', 刈屋国男', 佐藤裕', 秋山高', 船附秀 行, 松葉修一', 邑上豊隆'('北海道農業研究セン ター)

イネ葯は小胞子期に12-18℃の低温ストレスを受けると、花粉形成が阻害され、雄性不稔となり農業生産上の問題となるが、その低温障害の生理機構についてはいまだ解明されていない。演者らはこれまでに小胞子期の葯に特異的に蓄積するアラビノガラクタンプロテイン(AGP)並びにその代謝について低温障害との関連性を検討し、低温処理によるアラビノガラクトオリゴ糖濃度の低下程度が耐冷性弱品種ほど大きいことを示してきた。さらにイネ耐冷性との関与を明らかにするため、準同質遺伝子系統を用いた解析を行ったので報告する。

北海道水稲品種で耐冷性極強の「はやゆき」に、耐冷性弱の「豊光」を5回戻し交雑することにより作出した準同質遺伝子系統「510-2」の低温処理下での稔実歩合は62%となり、一方の親系統である豊光(同22%)と比較し強度の耐冷性を示した。

この2系統の小胞子期正常葯及び、穂ばらみ期(小胞子期)に12℃4日間の低温処理した葯を採取し、可溶性糖類の定量を行ったところ、「豊光」ではアラビノガラクトオリゴ糖濃度が顕著に低下したが、「510-2」ではほとんど低下しなかった。本結果は、AGPと耐冷性の関与を示唆すると共に、耐冷性機構解析において準同質遺伝子系統利用の有効性を示した。現在、本系統を用い、葯タンパクのプロテオーム解析を行っており、関連タンパクの情報についても、同時に報告する予定である。

2pG05

出芽酵母を利用したカロース合成酵素制御因子の探 索

渡辺大輔¹, 阿部充宏¹, 関谷 (川崎) 真理子², 園池公 毅¹, 大矢禎一¹ (¹東京大院·新領域, ²Dept. of Mol. Cell Biol., Univ. of California, Berkeley)

2pG06

タバコ培養細胞のホウ素欠乏に対する応答 武藤隆¹, 小林優¹, 間藤徹¹(¹京都大院・農・応用生 命・植物栄養学)

ホウ素は高等植物の微量必須元素であるがその生理機能は明らかでない。我々はこれまでホウ素が細胞壁に局在すること、ペクチン質多糖のラムノガラクツロナンII領域に結合し多糖を架橋していることを明らかにしてきた。しかしホウ素が欠乏しペクチン質多糖が架橋されないことで細胞に致死的な傷害が発生する機構は未解明のままである。本研究ではホウ素欠乏時の代謝変化を明しまることでホウ素欠乏による細胞死メカニズムを解明しようと考えた。

対数増殖期のタバコ培養細胞をホウ素欠除培地に移すと、処理後36時間前後からヨウ化プロピジウム(PI)で染色される細胞が増加し始めた。それらの細胞ではPIが原形質膜上に集積しており、過酸化水素やTriton X-100添加による細胞死の場合(核が染色される)とは異なっていた。

またホウ素濃度を通常の1/20とした低ホウ素培地に馴化した細胞を選抜した。この細胞では低ホウ素ストレスに由来する遺伝子、あるいはホウ素の機能を一部補償する因子が発現している可能性がある。そこで馴化細胞と対照細胞の間でcDNAサブトラクションを行い、馴化細胞特異的な遺伝子を検索した。

2pH01

ブラシノステロイドの代謝に関わるtomato CYP72Bの 機能解析

大西利幸¹, 水谷正治¹, 太田大策², 坂田完三¹(1 京大·化研, 2 阪府大·農)

【目的】ブラシノステロイド(BR)は植物の生長、分化、形態形成、光応答において重要な役割を担う植物ホルモンである。しかし、BRが植物体内で「いつ、どこで、どのように」作用しているのか詳細は明らかでない。今回、我々はBR代謝経路に関わるトマト由来シトクロームP450に注目し、その機能について検討した。

プロームP450に注目し、その機能について検討した。 【実験・考察】 生化学的研究からブラシノライドの不活性化に数種類のP450酵素が関与していることが示された。最近、BR代謝に関わる酵素としてP450遺伝子BASI(CYP72BI) が単離され、ブラシノライド26位水酸化酵素である可能性が示唆された。そこで我々は、BAS1と60%の相同性をもつtomato CYP72B全長cDNAを取得し、昆虫細胞発現系を用いて発現させた組み替えを取得し、昆虫細胞発現系を用いて発現させた組み替えの情質について検討した。CO差スペクトル測定の結果、tomato CYP72B はP450酵素に特徴的な吸収スペクトルを示した。またアグロバクテリウム法を用いて、35Sプロモーター下流に本CDNAを導入と組み替えタバコを作成した結果、野生型と比べき著した組み替えタバコを作成した結果、野生型と比べき著した組み替えタバコを作成した結果、野生型と比べき著したは、tomato CYP72B組み替え酵素を用いて酵素活性の測定を試みるとともに、組み替えタバコのブラシノライド含量の測定を行う。

2pH02

イネにおけるブラシノステロイド生合成変異体、Osdwarfの単離と解析

洪治¹,上口(田中)美弥子¹,魚津桜子²,揚妻正和¹, 芦苅基行¹,嶋田幸久³,藤岡昭三³,北野英巳²,松岡信¹(¹名古屋大・生物分子応答研究センター,²名古屋大・生命農学研究科,³理研)

我々は、イネの矮性突然変異体d61(OsBril機能欠損変異体)の解析から、ブラシノライド(BR)が、イネの茎葉部の形態形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。今回は、BRに関連すると予想される複数のイネ矮性変異体より、トマトのBR生合成欠損変異体の一つであるdwarfに対応するOsdwarf変異体を単離し解析したので報告する。

BR 生合成経路において、C6 位の酸化活性を触媒する酵素遺伝子はトマトやアラビドプシスにおいて単離されており、これらの遺伝子配列をもとにDWARF遺伝子のイネのホモログをイネゲノミックライブラリーより単離し、OSDWARF遺伝子の候補とした。一方、イネBR関連矮性変異体の内、2系統についてこのOSDWARF遺伝子と完全連鎖する系統があった。この2系統の変異体のOSDWARF遺伝子にはそれぞれ1塩基置換および113bpの欠損が存在することから、これらはOsdwarf変異体の2つのアリルであることが強く示唆された。Osdwarf変異体は、極端な奇形を伴った矮性を示し、葉鞘はほとんど形成されない一方、葉身は奇形ながら形成された。この結果は、dwarf遺伝子の発現が葉鞘に高い結果と一致した。

本研究の一部は、生研機構基礎推進事業の支援で行われた。

2pH03

ソラマメのブラシノステロイド生合成欠損突然変異 体

福田直子¹,藤岡昭三²,高津戸秀³,吉田茂男²,中山 真義¹(「花き研究所,²理研・植物機能/植物科学研 究センター、³上越教育大・化学)

植物ホルモンの機能解析を進める上で、生合成突然変 異体は有効な材料である。ブラシノステロイドについて は、これまでにシロイヌナズナ、エンドウ、トマトで生 合成欠損および非感受性変異体が発見され、多くの知見 が得られている。演者らは新たにソラマメのブラシノス テロイド生合成欠損突然変異体を発見したので報告す

ソラマメ品種「倫玲」は新潟在来種に y 線照射を行って得られた矮性突然変異体である。本品種は節間長と葉柄長が短く、葉が濃緑である等の特徴的な形質を有し、これらの形質は劣性の1遺伝子によって支配されている。この矮性品種の葉柄長と葉色はジベレリンに反応せず、ブラシノライド処理によって野生型に回復した。内生ステロールやブラシノステロイドを分析した結果、矮性品種は野生型品種よりも高濃度の24-methylenecholesterolを蓄積している一方で、これより下流のcampesterolをオブラシノステロイドの量は減少していた。従って、矮性ソラマメ「倫玲」はシロイヌナズナの dwf1(dim,cbl1)やエンドウのlkbと同様に24-methylenecholesterolからcampesterolへの変換に欠損のあるブラシノステロイド生合成突然変異体であることが明らかになった。

2pH04

オーキシン早期応答性遺伝子SAUR-AC1 遺伝子はブラシノステロイドで早期に誘導される

<u>中村郁子</u>^{1,2}, 郷田秀樹¹, 藤原誠³, 嶋田幸久¹, 浅見忠 男³, 吉田茂男^{1,2,3} (¹理化学研究所植物科学研究セン ター生長制御, ²埼玉大院・理工, ³理化学研究所植物 機能)

オーキシンとブラシノステロイド(BR)は様々な生理現ではおいて相乗効果が認められ、密接な相互作用を持っていると考えられてきた。我々はDNAマイクロアレイを開伝を開伝されていると考えられてきた。我々はDNAマイクロアレイを開伝を開始を誘導するとを昨年度報告した。これらの遺の発現を誘導するとを昨年度報告した。これらの遺の発現を誘導するに、大較的解析を行った。アラビドブシスのBR欠損変異体det2を明所、でそれぞれ7日間生育し、10-8Mのブラシノライド(BL)処理をしたところ、mRNA量はいずれの光条件下でも15分から30分で増加し、その後12時間まで発現が上昇し続けた。このことから、SAUR-AC1はまで発現が上昇し続けた。このことから、SAUR-AC1は出まで発現が上昇し続けた。このことから、SAUR-AC1は出まで発現が上昇し続けた。このことがら、SAUR-AC1のBRに答性の組織特異性を調べるために、SAUR-AC1のBRに答性の組織特異性を調べるを表し、BRによってもおり、暗所では明でははでは、のUSA、中で処理し、GUSA、色を対した。の結果、明下胚軸がBL処理によりキシンで処理した場合ももシンだり、SAUR-AC1はオーキシンとBRにはオーキシンとBRに共通する、細胞仲長の制造された。

2pH05

ブラシノステロイド応答性遺伝子を単離するための 実験系

<u>田仲究</u>¹,波多野康裕¹,中村考志²,浅見忠男³,吉田茂男³,松尾友明¹,岡本繁久¹(¹鹿大農·生物,²京府大·人環,³理研)

ブラシノステロイド(BRs)は、植物ホルモンで唯一ス テロイド骨格を持つホルモンである。今回、私たちは BRによって発現制御を受ける遺伝子を単離するための 新しい実験系を開発したので報告する。一般にBRsは低濃度で生理作用を示すことが知られている。ところが、植物体内にはもともとBRsが存在するために、多くのBR 応答性遺伝子の発現は外から与えたBRsに反応しないと 考えられる。事実、既知のBR応答性遺伝子の多くは比 較的高い濃度のBRに応答することを指標に単離されてきた。そこで、BR生合成阻害剤ブラシナゾール(Brz)を用いて植物体内のBRsを枯渇させた後に、ブラシノライ ド(BL)を投与することで発現量が変動する遺伝子を探 索することにした。先ず、14日齢のシロイヌナズナを 5uMのBrzを含む液体培地に移して培養したところ、2日 目には既知のBR応答性遺伝子TCH4の発現低下が見られ た。さらに、培養3-4日目には、根や葉柄の伸長阻害、 新鮮重の増加抑制が観察された。この結果は、Brz添加 後2日目までに内生BRの顕著な低下があったことを示唆 する。続いて、Brz添加後2日目に0.1uMのBLを与えたと ころ、TCH4遺伝子の一過的な発現誘導が見られた。現 在、ディファレンシャルディスプレー法を用い、Brz存 在下で2日間培養した後10p-0.1uMのBLを投与すること で発現量が変動する遺伝子のクローニングを行ってい

2pH06

Analysis of brassinosteroid-regulated gene expression by microarray

郷田秀樹¹,嶋田幸久¹,宮内成真¹,関亦克彦²,浅見 忠男²,藤岡昭三¹,吉田茂男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・植物機能研究 室)

Recent studies of the brassinosteroid (BR) –deficient mutants have revealed that brassinosteroid plays essential roles to control plant growth and development, such as cell elongation, division and photomorphogenesis. However, its regulatory mechanisms and signal transduction pathway are still under unclear. We used DNA microarray (Gene Chip, Affymetrix) to analyze BR–regulated genes comprehensively. We identified quick responding genes, late responding genes as well as dark-responding genes and light–responding genes. We will analyse expression profiles and organised BR–regulated gene depending on their responses and their putative functions, including auxin signaling, cell elongation and cell wall organization as well as that of P450 genes, including BR metabolic genes that contribute to endogenous BR homeostasis.

2pH07

ブラシノライドにより表現型の回復するわい性突然 変異体の解析

森昌樹¹,大岡久子^{1,2},杉本和彦¹,佐藤浩二¹,廣近洋 彦¹,山元皓二²,菊池尚志¹(¹農業生物資源研究所, ²長岡技術科学大学)

ブラシノライド (BL) は茎の伸長、葉の展開、管状要素の分化、環境ストレスへの応答など、植物に様々な生理的、及び形態的影響を及ぼすことが知られている。これらの知見のほとんどは双子葉植物によるものであるのに対して、単子葉植物での知見はまだわずかである。我々は BL により表現型の回復するわい性変異体の単

我々は BL により表現型の回復するわい性変異体の単離について昨年度報告した。この変異体は葉鞘が著しく短く、葉身は縮れており、両形質はBL添加により回復する。両形質はGA3の添加では回復されなかったので、BL依存的な変異であると考えられBlassinolide dependent 1 (brd1)と命名した。この変異は労性で、イネの培養された。葉身の横断切片の観察により機動細胞の肥大が見れた。葉身の横断切片の観察により機動細胞の肥大が見いだされ、これが葉身の縮れの原因であると考えられた。またこの変異体は分げつが少なく、極まれに出穂するが、出穂した穂は少数の不稔性の極小粒の種子をつけた。以上のことから、BLがイネにおいて葉鞘の伸長、葉身の展開、機動細胞の分化、生殖成長など多くの成長過程に、関与していることが示された。

¹⁾Mori et al., Plant Cell Physiol., 42, Supplement s84 (2001)

2pH08

イネの内生ブラシノステロイド含有量およびDWARF 遺伝子の発現に対する光の影響

田牧祐治¹, 竹内敬一¹, 野村崇人², 米山弘一¹, 竹内安智¹, 丹生谷博³, 松下保彦³, 高津戸秀⁴, Gerard J. Bishop⁵, 横田孝雄²(¹宇都宮大学野生植物科学研究センター, ²帝京大学バイオサイエンス学科, ³東京農工大, ⁴上越教育大学, ⁵ウェールズ大学)

内生プラシノステロイド(BR)の生合成における光の役割を明らかにするために、イネを白色光、青色光、赤色光、近赤外光、暗黒の条件下でそだて、内生BR含量を測定した。その結果、白色光は茎葉部の内生BR含量を上昇させた。特に6-deoxocastasterone, typhasterol ならびによな近赤外光ではそのような効果は得られなかった。青色光で照射した場合は、白色光の場合とほぼ同じ効果が得られた。

6-deoxocathasterone や 6-deoxoteasterone の含量はいずれの 光条件でも同じような値を示した。したがって、青色光は 茎葉部におけるBR生合成の後半部において合成促進効果を もっており、そのことにより内生BRの含量を高めていると 考えられる。なお、根におけるBR生合成は光によってあま り影響を受けないことが分かった。このことより根にはBR 生合成を調節するための光感受機構はないものと思われ

また、茎葉部におけるイネDWARF遺伝子の発現量を調べた。このために、まずイネのmRNAを用いて5'-RACE法によりイネDWARF遺伝子の全長cDNAを単離した。これよりプローブを作成し定量RT-PCRによりイネDWARF遺伝子を定量したところ、白色光、青色光で増加することが確認できた。このことより青色光がC-6の酸化を促進することによりtyphasterolおよびcastasteroneの内生量を増加させることがわかった。

2pH09

エンドウ種子の成熟過程における内生ブラシノステロイドの変動

<u>上野雅昭</u>¹, 竹内安智¹, 高津戸秀², 野村崇人³, 横田孝雄³(¹宇都宮大・野生植物科学研究センター, ²上越教育大・化学, ³帝京大・バイオサイエンス学科)

エンドウ WT、lka、lkb の種子について、1 粒あたり 0.04g、0.10g、0.18g、0.45g程度に成長した4段階の成熟 段階のものを分析に供した。植物体をメタノール抽出して内部標準を加えた後、溶媒分画、活性炭カラムクロマトグラフィー、セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離・精製した。現在、GC-SIMで各ブラシノステロイドの含量を分析中である。

2pH10

Regulation of Expression of the Brassinosteroid Receptor *Lka* Gene in Pea

Takahito Nomura^{1,4}, Gerard Bishop², James Reid³, Takao Yokota¹ (¹Dept. of Biosciences, Teikyo Univ., ²Univ. of Wales Aberystwyth, ³Univ. of Tasmania, ⁴JSPS Research Fellow)

The pea mutant lka has reduced sensitivity to brassinosteroids (BRs) and increased levels of endogenous BRs, suggesting that lka dwarfs are defective in the BR signaling. We isolated a pea homolog (termed PsBRII) of the Arabidopsis BRII gene encoding a leucine-rich repeat kinase which functions as a BR receptor. The predicted amino acid sequence of PsBRI1 shows 68% identity with BRI1. Sequence analysis indicated that lka PsBRII has a single base substitution resulting in a missense just before BR-binding region. Co-segregation between the RFLP and phenotype strongly implied that lka mutation results in dwarf. Thus, PsBRI1 functions as a BR receptor in pea and can be mapped to the Lka locus. We also examined the expression pattern of PsBRI1. The transcript level of PsBR11 was down-regulated by applications of brassinolide and castasterone. Furthermore, the PsBRI1 expression decreases in gibberellin-deficient mutants, indicating that gibberellin may regulate the BR response in pea.

2pI01

importin α との相互作用によるイネ新奇核タンパク質の同定

郭長虹¹, 伴浩志¹, 本間美智紀¹, 山本直樹², <u>岩崎俊</u> $\underline{\Lambda}^1$ (¹新潟大・理, ²お茶の水大・理)

importin α は、真核生物の細胞質においてタンパク質の核局在化シグナル(NLS)を認識してimportin β と結びつけ、核輸送複合体を形成する。イネのimportin α la は、業において負の光応答発現を示すことから、暗条件下で核に蓄積するタンパク質の核移ケンパク質の単離・同定を目的として、importin α laをプローブとするFar Western法によりイネの黄化葉cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、新奇な122 kDaタンパク質をコードするcDNAクローンが単離された。この新奇遺伝子も負の光応答発現を示すこと、さらに推定NLSを含むC末端断片はin vitroでimportin α laに特異的に結合することが示された。

2pI02

原形質連絡に局在するTMV MP結合タンパク質の探索 岸光子¹,村田隆²,渡辺雄一郎¹(「東大院・総合文化, ²基礎生物学研究所)

高等植物の原形質連絡では細胞膜とデスモチューブルが細胞壁を貫通しており、この構造を通してタンパク質や核酸などが輸送される。しかし原形質連絡に局在するタンパク質についての知見は少なく、タンパク質などの輸送を調節する機構は未解明である。一方、原形質連絡は植物ウイルスが隣接細胞へ感染していく通り道としても利用される。タバコモザイクウイルスの移行タンパク質(MP)は、ウイルス感染の進行にともない原形質連絡に局在し、排除分子量限界を拡大する事が知られている。

原形質連絡における MP の機能には、細胞間の物質輸送に関与する原形質連絡タンパク質との相互作用が考えられる。こうしたタンパク質の同定、機能解析を目指し、原形質連絡中のMP結合タンパク質を探索した。まず、MP:GFP形質転換タバコ、MP形質転換タバコ(Nicotiana tabacum)の原形質連絡を含む細胞壁画分から、MP:GFPおよびMPを抽出した。MP:GFPおよびMPは細胞壁画分に強固に結合しており、Triton X-100あるいはNaClではほとんど抽出されないが、高濃度のLiCl処理により半分ほどが抽出された。この処理により原形質連絡の構成要素が抽出された事をTEMで確認した。このMP抽出画分からいくつかのMP結合タンパク質を同定したので報告する。

2pI03

 ω -3 デサチュラーゼの細胞内局在に関する解析 坂本光 $^{\rm l}$, 松田修 $^{\rm l}$, 射場厚 $^{\rm l}$ ($^{\rm l}$ 九大院・理・生物科学)

高等植物の生体膜脂質にはトリエン脂肪酸が多く含ま れている。この脂肪酸は植物の環境ストレス耐性におい て重要な役割を担うことが示唆されている。トリエン脂 肪酸の合成は膜結合性酵素である ω-3 デサチュラーゼ により触媒されるが、シロイヌナズナではこの酵素の3 つのアイソザイム FAD3、FAD7、FAD8をコードする遺 伝子が同定されている。これらの遺伝子はさまざまな環 境ストレスに対して異なったレスポンスを示す。このこ とは、3つのアイソザイムが異なる環境ストレスに対す る適応過程において、機能分化している可能性を示唆する。我々は、各アイソザイムの局在する特定の膜領域に おけるトリエン脂肪酸含量の変動が、植物の環境応答と 関連するのではないかと考えている。ω-3デサチュラー ゼは膜結合性酵素であるため特異抗体の作製が困難であ り、細胞内におけるその移送、局在化の過程については 未知の部分が多い。本研究ではエピトープタグおよび GFPと ω-3 デサチュラーゼとの融合タンパク質を発現 させた形質転換シロイヌナズナを作製した。これらの形 質転換シロイヌナズナを用いた実験系により得られた ω-3 デサチュラーゼの局在に関する知見について報告 する。

2pI04

エンドウGTPase,pra2及びpra3の細胞内局在の解析 稲葉丈人¹, 永野幸生¹, 佐々木幸子¹(「名大院・生命 農学・生物情報制御)

エンドウGTPase, pra2及びpra3はYpt3/Rab11に属するタ ンパク質で、細胞内小胞輸送を行っていると考えられ る。高等植物にはヒトや酵母に比べはるかに多くのYpt3/ Rab11遺伝子が存在するが、なぜ多いのかは明らかでな い。私たちはこれらの遺伝子はそれぞれ異なる機能を細 胞内で担っている、つまり細胞内局在が異なるのではな いかと考え、その代表例としてpra2及びpra3タンパク質の細胞内局在を調べた。まず、ショ糖密度勾配遠心法によりこれらのタンパク質がエンドウの細胞内において異 なる場所に局在していることを明らかにした。さらに、 GFP融合タンパク質を用いた解析により、pra2はゴルジ 体及びエンドソームに局在すること、pra3はtrans-Golgi network もしくはprevacuolar compartmentに局在するらし いことを明らかにした。これらの結果から、pra2及び pra3タンパク質は細胞内の異なる場所に局在し、それぞ れ違う機能を担っていると結論づけた。pra2及びpra3遺 伝子が茎伸長部位で特異的に発現しており光により発現 抑制されることやYpt3/Rab11の多様化が植物でのみ起 こっていることを踏まえ、Ypt3/rab11の多様性と植物生 長過程で必要な小胞輸送の関係についても考察したい。

2pI05

シロイヌナズナのエンドサイトーシスを制御するRab/ Ypt GTPase群の解析

上田貴志¹, 矢原夏子¹, 中野明彦¹ (¹理研·生体膜)

細胞外から細胞内へと物質を輸送するエンドサイトーシス機構は、動物細胞においては多彩かつ重要な役割を演じていることが知られている。しかしながら植物においては、高い膨圧のためにエンドサイトーシスはおこらない、と考えられてきた歴史的経緯ゆえか、ほとんどその分子機構に関する解析はなされてこなかった。われとその分子機構を明らかにすることを目的とし、エンドサイトーシスを制御するRab/Ypt GTPaseの網羅的な解析に取り組んでいる。

シロイヌナズナゲノムには、8個のRAB7関連遺伝子と3個のRAB5関連遺伝子を含む少なくとも57個のRab/Ypt GTPaseをコードする遺伝子が存在する。われわれはその中でも特に、Rab5に最も高い相同性を示しながらも、非常にユニークな構造を持つAra6について解析を行っており、Ara6がエンドソームに局在し、その融合を制御していること等を明らかにしてきた。本大会では、Ara6に関する新しい知見とともに、それ以外のRab5 ホモログであるAra7及びRha1の細胞内局在、及びその機能に関する解析結果について報告する。さらに、エンドサイトーシおいて機能すると予測されるRab7ホモログに関しての解析結果も同時に報告する。