

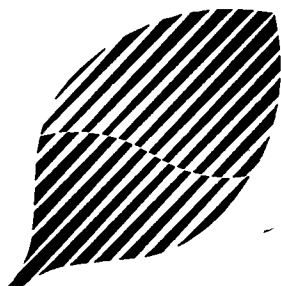
植物・微生物の光反応：変異株などを用いた新しい解析法の開発

著者	東北大学遺伝生態研究センター
雑誌名	IGEシリーズ
巻	10
ページ	1-49
発行年	1991-03
URL	http://hdl.handle.net/10097/49096

IGEシリーズ 10**

植物・微生物の光反応

—変異株などを用いた新しい解析法の開発—



IGE

東北大学遺伝生態研究センター
Institute of Genetic Ecology

IGEシリーズの発刊にあたって

地球上の環境は、今、かつてない大きな問題に直面しております。世界各地で進行している生態系の急速な変化のなかには、人間生活に深刻な影響をもたらす可能性のあるものが、多数含まれています。一方、人間の活動が宇宙空間へと広がるにつれ、地球外生態系の構築が、新しい課題として登場しつつあります。生態系の崩壊を防ぎ、より豊かな環境を創造するための科学的努力が、今日ほど強く求められている時はありません。

本研究センターは、DNA分子技術を中心に遺伝子的段階にまで到達した生物研究の諸成果を生かし、生態系における生物の生活を一層深く解明し、新たな人間環境の創造に貢献することを目指しております。いうまでもなく、この課題はきわめて学際的であり、多分野の研究者との相互交流と協力によって、はじめて達成されるものであります。本研究センターでは、ワークショップによる研究者間の討論と意見交換を重視するとともに、その成果をより多くの方々にご利用いただく出版活動にとり組んでおります。ここに発刊しますIGE (Institute of Genetic Ecology の略) シリーズも、こうした努力

の一環であります。

本シリーズの内容は、多岐にわたる可能性をもっておりますが、3つのタイプに大きく類別されるだろうと考えております。すなわち、(i) 特定のテーマ、又はトピックについての解明に関するもの（*印を付します）、(ii) 特定のテーマ又はトピックに関する最新の文献、実験法の紹介に重点をおくもの（**印）、そして(iii) 新しい可能性を求める学際的交流、対話を試みるもの（***印）であります。

このIGEシリーズが、多方面の方々のお役に少しでも立つことを願って、発刊の辞とします。

1989年3月

東北大学遺伝生態研究センター

❖ 目 次 ❖

植物・微生物の光反応

—— 変異株など用いた新しい解析法の開発 ——

発行に際して 大瀧 保 …………… 1

原生動物の光受容と応答 中岡 保夫 …………… 3

ヒゲカビの光反応に関係する遺伝子単離へのアプローチ 宮崎 厚 …………… 11

アカパンカビの青色光反応, 生物時計の場合

中島 秀明 …………… 21

シロイヌナズナの光, 重力および接触屈性異常突然異体の分離と解析 岡田 清孝 …………… 27

シロイヌナズナを用いた光反応機構変異体利用の可能性 米田 好文 …………… 35

オーキシン作用の分子生物学的研究

山本興太郎 …………… 41

IGE シリーズ第一期分総目次

発刊に際して

大 瀧 保

近年、地球上の環境条件は少しずつ変化していると言われている。その一つは、オゾン層の破壊による紫外線 (UV-B) の増加に見られるように、光環境条件の変化である。葉緑体を含む高等植物のエネルギー獲得はもとより、一見、光とは無縁と思われるようなバクテリアや菌類に至るまで、その形態形成、そして運動や行動が、多くの場合光の制御を受けている。従って、地球上における光条件の変動によって、これら生物は実に重大な影響を受けかねない。一昨年および昨年において、我々は幾つかの代表的な微生物や植物を選び、それらの光形態形成や光運動反応の解析を行い、さらにその機構を解明する上での種々の戦略を検討してきた。すなわち、多くの微生物や植物はフィトクロムやクリプトクロム (青色光吸収色素) の関与する系によって、低エネルギーの光を信号として利用し、それらの形態形成や運動を制御しているが、その機構はまだほとんど解明されていない。特に分子レベルでの解析にいたっては、紫外線を含む青色光吸収色素系の関与する反応解析の遅れが目立ち、多くの研究者の緊急の課題となっていた。このような現状にあって、我々は、適切な突然変異体の作出が、これら光反応の解析をさらに進めるために最も重要な課題の一つであるという認識で一致した。そして、将来分子レベルで解析を行うにあたっては、どのような形質を持った変異体が望ましいか、また効率よくそれら変異体を作成するにはどのような方法が最善であるかを探ってきた。本 IGE シリーズでは、バクテリアや原生動物で同様な課題に取り組んでいる研究者、また

植物を取り扱う上でどうしても避けることのできない重要な課題である植物成長制御物質との関連で光反応を解析している研究者も加わり、さらに広い立場からの検討を試みた。従って、本シリーズは、過去の IGE シリーズ、2「微生物と光」および6「植物の光反応機構の解析と変異株」と密接な関係にあり、これらシリーズの内容をも参考にされることを希望する。

原生動物の光受容と応答

中 岡 保 夫

1. はじめに

鞭毛や繊毛を持っている原生動物の中のいくつかの種類のもので、光を感じ光に集まったり逃げたりする反応をすることは、古くから知られている。しかし、光を受容した細胞がどのようにその細胞内で情報伝達を行い、鞭毛、繊毛の運動を変化させているのかは、まだよく分かっていない。

我々は、繊毛虫に属するゾウリムシを材料として、その光受容、応答の情報伝達機構を調べている。ゾウリムシを選んだ理由は、(1) 電気生理的な測定が出来ること(2) 大量培養が比較的容易であり、かつ安価に行えること、(3) 突然変異株を作成出来ること等であるが、調べてみようという直接的な動機は、顕微鏡下で光刺激に応答するゾウリムシの泳ぎの変化が顕著であり、これならば、光受容応答のモデル系として、解析可能ではないかという期待からである。

2. 走光性の泳ぎ

ゾウリムシのうちで、その細胞内にクロレラを共生させている種類のミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、光の強度変化に応答して適度の光強度の場所に集まって来る。すなわち、適度の光強度からの強度の減少、または増大があると繊毛打の一時的な逆転を起こして、泳ぎの向きをクルリと変える応答を示す。反対に、適度の光強度に向かう変化では、方

向変換しない直進の泳ぎになる。したがって、ゾウリムシは光強度の時間変化を感知して、適度の明るさの場所に集まって来ると考えられる。

同じ繊毛虫に属し、細胞内に大量の赤い色素を持っているブレファリズマとか空色の色素を持つラップムシ等も光を感じ、光強度の増大があると泳ぎの方向変換を起こすが、これらは常に光から逃げようとするのみであ

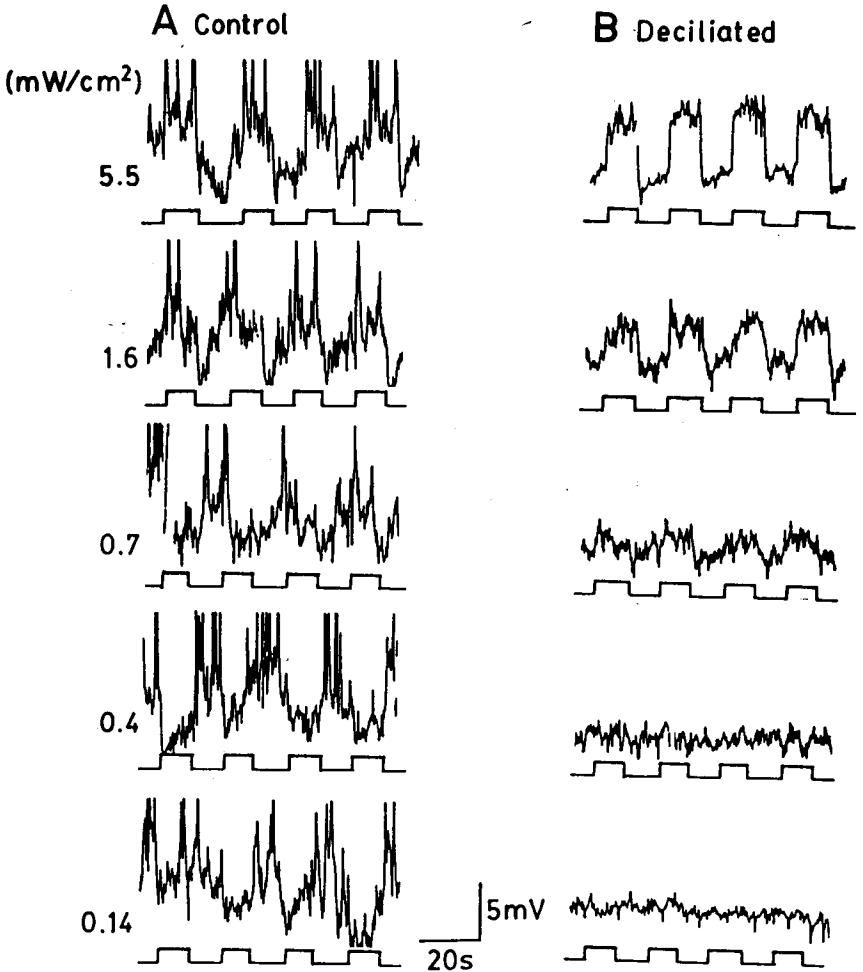


図1 いろいろな強度の光 ON, OFF にともなう膜電位変化。左側の数字は光パルス ON (上向き) 時の光強度 (550 nm)。A) 繊毛有り, B) 繊毛無し。

る。ミドリゾウリムシが光に集まり、共生クロレラが光合成を行うということは、自然の条件にうまく適応した結果であろう。

3. 脱分極型と過分極型の光受容電位

ミドリゾウリムシにガラス微小電極を刺した状態で光刺激を加えると、膜電位の変化が記録される^{3,4)}。はじめ、我々は電極を刺すことの容易さを考えて、ゾウリムシを5%のエタノールと Ca^{2+} を含む液で処理し繊毛を取り除いた細胞で測定を行った。そうすると、光の on によって脱分極し off によって元に戻る電位変化が記録された(図 1B)。細胞内に一定電流を流して膜電位を変え、光受容電位の消失する電位を求めたり、その電位の外液イオンに対する依存性を調べたりすることによって、この光受容電位は、光 on 時に細胞膜の Ca^{2+} に対する透過性が増大することで発生していることが分かった⁴⁾。

ところで、ゾウリムシの膜電位が脱分極した場合、繊毛膜上にある電圧感受性の Ca^{2+} ・チャンネルが開いて、さらに大きな脱分極が起こると共に繊毛の打つ向きが逆転し、後進の泳ぎが引き起こされる⁶⁾。強い光刺激が加えられると、脱分極向きの受容電位が発生するために繊毛逆転が引き起こされて逃げる反応が出るとしてうまく説明できる。しかし、これでは適度の光強度 off の場合にも後進の泳ぎをして暗い所から逃げようとすることを説明出来ない。脱分極型の受容電位では、光の off 時に過分極向きの電位変化を伴うので、逃げる反応はむしろ抑えられてしまうからである。

この問題は、繊毛を取り除かない細胞で光受容電位を記録してみることによって解決した⁵⁾。繊毛を持った細胞では、適度の強度(0.4 mW/cm^2 , 550 nm)以下の光の on 時に膜の過分極が起こり、off 時に脱分極して元の電位に戻る過分極型の光受容電位が発生することが分かった(図 1A, 0.14 , 0.4 mW/cm^2 の時)。この場合、off 時の脱分極に際しては、繊毛打の逆転を引き起こすさらに大きな脱分極スパイクを伴っており泳ぎでの応答とうまく対応が付く。光強度を上げてゆくと、過分極型から脱分極型に変わって行き、繊毛のない細胞の場合と同じ型の受容電位になる。過分極型の受容電位が、細胞膜のどのイオンに対する透過性の変化によっているのか今の所

明かではないが、一定電流を流して膜電位を変えた時、この受容電位は静止電位よりも一側で消えることから、 K^+ に対する透過性の増大による可能性が高い。

ゾウリムシが最もよく集まる光強度は、光受容電位が過分極型から脱分極型に切り変わる付近である。ゾウリムシは、極性の異なる受容電位を、繊毛膜と細胞体膜で発生させることによって適度の強度の光に集まっていると考えられる。

4. 光反応の作用スペクトル

ミドリゾウリムシが感じる光の波長はどのあたりにあるのか？ 一定エネルギーでいろいろな波長の光刺激を与えた場合の応答を調べると、走光性を示して集まる光波長は、420 nm, 560 nm 付近にあった。細胞内に電極を刺して測定した膜電位応答でも、走光性の場合と同じ波長付近で電位変化のピークがみられた²⁾ (図2)。さらに、共生しているクロレラが光の受

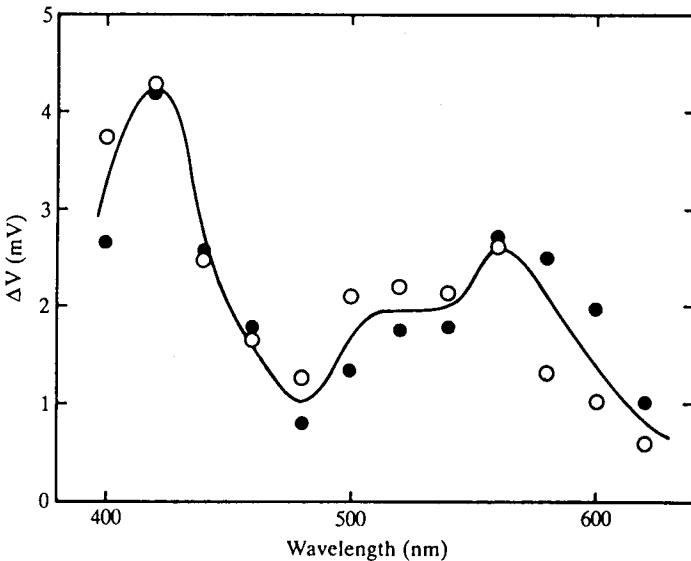


図2 光 ON 時の膜電位変化でみた作用スペクトル。○；クロレラ無し，●；クロレラ有りのゾウリムシ。

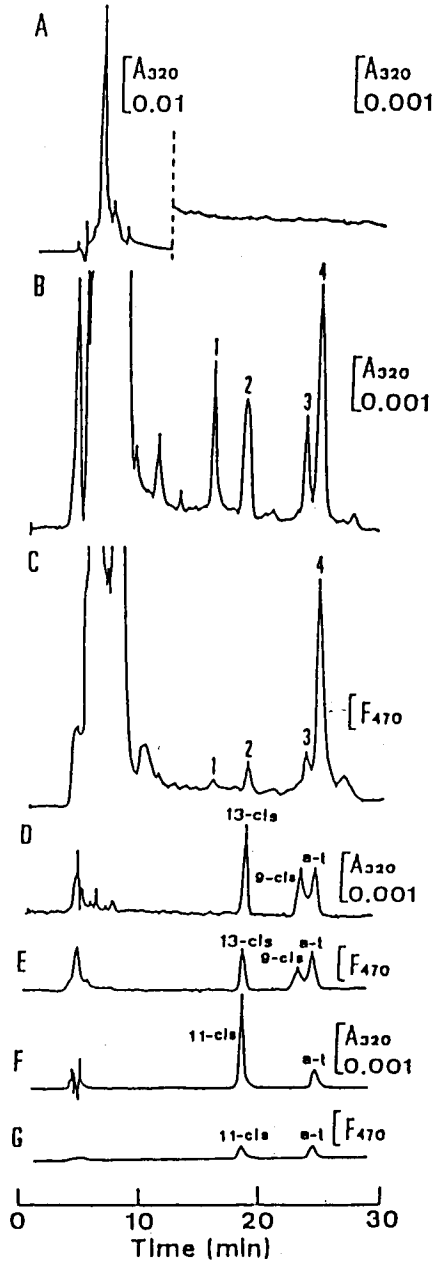


図3 ミドリムシからの抽出成分 (A-C) とスタンダード・レチノール (D-G) の HPLC。抽出成分を精製してレチノール付近の成分のみにし (A), これを NaHBO_4 で還元した (B, C)。溶出はヘキサンで行った。

容、応答に何らかの役割を持つかどうかをみるために、クロレラを持たない白色系統のミドリゾウリムシを用いて、同じ方法で取った作用スペクトルでもほぼ同じ結果であった(図2)。したがって、ここでみた光感受性はゾウリムシの細胞自身が備えているものであり、共生クロレラの有無は重要ではない。ただし、走光性を観察していると、クロレラを持つ細胞の方が、白色系統に比べ明かによく集まる傾向があるので、クロレラが光受容、応答の経路で何らかの調節をしている可能性がある。

5. 光感受性物質

視細胞を持つ多細胞動物の光感受性物質は、一般にロドプシンであることはよく知られている。しかし単細胞の原生動物については、その光感受性物質に関する報告がいくつかあるものの、共通の物質としては明らかにされていない。鮮やかな色素を持っている繊毛虫のプレファリズマ、ラッパムシ等はその色素こそが光感受性物質であるとする報告が出されている⁷⁾、緑藻類のクラミドモナスではロドプシンではないかという報告が出されている⁸⁾。

ゾウリムシの場合、我々はロドプシンである可能性を検討してみた。そのために、ロドプシンに含まれるレチナール部分の抽出を試みた⁹⁾。大量培養したミドリゾウリムシからホルマリン法⁹⁾で抽出した成分を高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分画、精製する。はじめに、レチナールと同じ程度の極性を持つ成分のみを集めて(図3A)、これよりも極性の高い成分及び低い成分は完全に取り除いてしまう。集めた成分に NaHBO_4 を加えて還元反応を行わせると、レチナールが含まれておればより極性の高いレチノール(ビタミンA)となりHPLCでのピークの位置が移動することになるので、大量の不純物の中からレチナールのみを検出出来るはずである。実際にこの還元反応行うといくつかのピークが現れた(図3BとC)。このうちのいくつかはスタンダードのレチノール(図3C-G)とその溶出位置が一致し、それぞれのピークで蛍光、吸収強度の相対比からもレチノールの異性体であることが確認された。検出されたピークの量を元の細胞数で割ると、分子数にして1細胞当たり 10^6 個のオーダーになる。

検出されたレチナールが、実際にロドプシンに組み込まれ光受容物質として機能しているのかどうかはさらに別の角度からの研究を行う必要があり、現段階では何とも言えない。しかしながら、カエルのロドプシン抗体を用いてミドリゾウリムシ細胞との反応性を調べたところ、繊毛膜、繊毛間の外皮膜との結合が認められた⁵⁾。したがって、ゾウリムシがレチナールと結合したロドプシン様蛋白を光受容物質としている可能性が高いと考えられる。

赤い色素を持つプレファリズムで、その色素を合成できない変異株(伊、カメリノ大、春本晃江さんよりいただいた)の光反応性を調べたところ、野生種と同じように光から逃げる反応を示し、さらにレチナールの抽出を試みると、細胞当たりゾウリムシの場合と同程度の量が検出されている(金森、中岡らの実験)。プレファリズムの場合でもロドプシン様物質が働いているのではないだろうか。

6. 今後の問題

ゾウリムシ等の原生动物でも、光受容物質が光を受けると、これが何らかの信号となって細胞膜上のイオン・チャンネルの開閉状態を変え光受容電位を発生させる。この経路が多細胞高等生物と比べ、どのように相同性があるのか、特に何が光感受性のチャンネルの開閉調節を行っているのが問題である。また、ここでは述べなかったが、光受容が引き金となって、接合が開始されたり日周リズムの位相が変化したりするが、これらも興味深い問題である。ゾウリムシの電気生理的測定は容易であるが、突然変異株を作ることはそれほど容易ではない(少なくとも私にとっては)。光感受性の変異株を用いることが、これらの問題解決の有効な手段となるに違いないが、そのためには専門を越えた研究者間の協力が望まれる。

参考文献

- 1) Foster, K.W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. and Nakanishi, K. (1984). A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature*, 311 :

756-759.

- 2) Matsuoka, K. and Nakaoka, Y. (1988). Photoreceptor potential causing phototaxis of *Paramecium bursaria*. J. Exp. Biol. **137** : 477-485.
- 3) Nakaoka, Y. (1989). Localization of photosensitivity in *Paramecium bursaria*. J. Comp. Physiol. **165** : 637-641.
- 4) Nakaoka, Y., Kinugawa, K. and Kurotani, T. (1987). Ca²⁺-dependent photoreceptor potential in *Paramecium bursaria*. J. Exp. Biol. **127** : 95-103.
- 5) Nakaoka, Y., Tokioka, R., Shinozawa, T., Fujita, J. and Usukura, J. (1990). Photoreception of *Paramecium* cilia: Localization of photosensitivity and binding with anti-frog rhodopsin IgG. (submitted).
- 6) Saimi, Y. and Kung, C. (1987). Behavioral genetics of *Paramecium*. Ann. Rev. Genet. **21** : 47-65.
- 7) Song, P.-S. (1983). Protozoan and related photoreceptors: Molecular aspects. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **12** : 35-68.
- 8) Suzuki, T., Fujita, Y., Noda, Y. and Miyata, S. (1986). A simple procedure for the extraction of the native chromophore of visual pigments: the formaldehyde method. Vision Res. **26** : 423-429.
- 9) Tokioka, R., Matsuoka, K., Nakaoka, Y. and Kito, Y. (1990). Extraction of retinal from *Paramecium bursaria*. Photochem. Photobiol. **51** : in press.

ヒゲカビの光反応に関係する 遺伝子単離へのアプローチ

宮 崎 厚

1. はじめに

ヒゲカビ (*Phycomyces*) は接合菌類ケカビ目に属する糸状菌であり、菌糸上に直径 100 μm 、高さ 10 cm にも及ぶ巨大孢子囊柄を形成し、まさに“ヒゲ”が生え、伸びた様である。近縁に、ケカビ (*Mucor*) やクモノスカビ (*Rhizopus*) 等があるが、これらも名は体を表現している。後 2 菌は工業的に重要なカビで、アミノ酸や有機酸、凝乳酵素 (ケカビ) の産生菌として使われている。ヒゲカビには今のところ産業的に重要な位置は与えられていないが、基礎分野で、接合反応、光屈性やカロチノイド合成に関する研究が積極的に行われている¹⁾。特に光屈性では、屈性の機構や光生物学の最大の興味になっている青色光受容体に関する議論が展開されてきた。また、種々の突然変異体が数多く単離され出番を待っている²⁾。このような状況にあって、ヒゲカビから遺伝子、特に光反応に関する遺伝子を単離する研究に着手することになり、以下の筆者の考えたことを紹介させて頂く。用いるヒゲカビは標準株 NRRL1555 (-) とし、変異株も標準株由来の株を使用する。

2. 遺伝子を単離するための手法

遺伝子を単離する場合、作製したライブラリーから目的の cDNA や遺伝子を釣り出す操作であるスクリーニングが要点になる。幾つかの参考書を

調べてみると、9つぐらいに分類できた。

スクリーニング法	特 徴 等
(1) Immunoscreenig	目的タンパク質の抗体が必要
(2) 合成 DNA プローブを用いたスクリーニング	目的タンパク質のアミノ酸配列の一部がわかっている場合
(3) Heterogenous probing	目的遺伝子の1次配列が近縁種で知られている場合
(4) Differential hybridization	遺伝子転写に確実に差がある場合
(5) 相補性によるスクリーニング	突然変異体があるときに有効、形質転換系の確立が前提
(6) Gene tagging	形質転換系の確立が前提、染色体への挿入効率が高いこと
(7) Chromosome walking	染色体地図で、目的遺伝子の近傍に既知の遺伝子や検出し易い遺伝子(酵素等)が存在する場合
(8) 発現によるスクリーニング	動物の系で用いられている
(9) ポリゾームによる免疫沈降	RNase freeの抗体が必要

(1) (2) (3) (8) (9) は目的遺伝子のタンパク質あるいは近縁種で目的遺伝子が得られている場合に適用できる手法である。ヒゲカビでは、光に応答して発現量に変化するタンパク質はまだ知られていなので、これらの方法は使えない。そこで、(4) (5) (6) (7) の手法を利用し、遺伝子単離に挑むことになる。なお、(6) の手法は、有用な形質転換系があれば原理的にはどの現象にも適用できる。アラビドプシス³⁾などで報告されている。また、(2) では PCR を利用した方法もアラビドプシス G タンパク質遺伝子の単離³⁾などに用いられ始めた。

3. ヒゲカビの示す反応と光

ヒゲカビで研究対照になってきた反応¹⁾について以下にまとめた。

- (1) 接合反応
- (2) カロチノイド合成
- (3) 孢子囊柄、孢子囊の形成
- (4) 孢子発芽と接合孢子休眠

- (5) 胞子嚢柄切片からの再生
- (6) 光, 重力屈性
- (7) タンパク質性結晶の胞子嚢柄での合成

これらの反応の中で, 光によって制御されることが報告されているのは(1)(2)(3)(6)であるので, スクリーニングとの関連でのどの現象をターゲットにするのが妥当か検討した。

(1) 接合反応: 接合反応を解析するために信頼できる突然変異体はないので, Differential hybridization を用いる場合を検討した。接合反応を暗所及び明所 (40 W 蛍光灯直下 30 cm) で観察したところ, 接合子形成が明所で抑制されたが, その程度は極わずかであった。また, 接合過程のステージ1から8までのどこがどの程度抑制されているのかが明かでない。さらに, 一定時刻にサンプリングする場合, 顕微鏡下でみると常に複数のステージが混在している。これらは, どの2つのステージを比較したらよいのか, また, mRNA を調整するために特定のステージをできるだけ早く比較的大量に, しかも顕微鏡下からサンプリングすることになり, 現象的にも技術的にもかなりの困難を予想させた。

光との関連はなくなるが, 接合反応を細かくみてみると, 接合子(接合胞子でない)形成, 相互認識, 配偶子嚢内での核の挙動など興味ある現象があり, これらについては解析を進めたいと考えている。

(2) カロチノイド合成: Differential hybridization の手法を用いる場合を検討した。ヒゲカビは光照射により β -カロチンを多量に合成蓄積して黄色を呈するが, この現象は菌糸で顕著に見られる。そこで, 胞子嚢柄や寒天培地の混入を防ぐために菌糸の液体振盪 (8 字) 培養を行ったところ, 暗所及び明所の菌糸は同様に成長し, しかも同様に黄色を呈した。液体静置培養では, 酸素の供給が悪いためか成長が悪く, また明・暗所の菌糸はともにほんのわずかに黄色を呈するだけであった。このように, ヒゲカビのカロチノイド合成は, 液体培養に持ち込むと光依存性がなくなってしまう。

カロチノイド合成の異常を引き起こす種々の変異株の中に, 合成の光促進反応が見られなくなった *pic* 変異株がある。ヒゲカビ形質転換系を確立

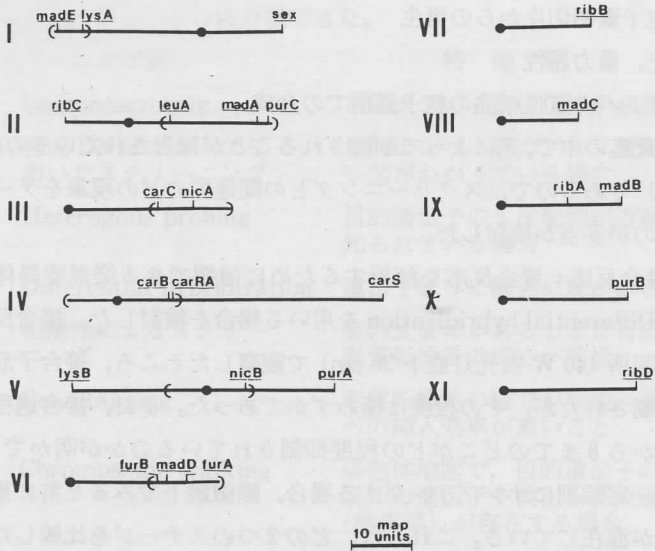


図1 接合交雑法によりマッピングされたヒゲカビ遺伝子⁹⁾。括弧内の遺伝子の配置は端に位置する遺伝子 (outside marker) に対しては決定されていない。
●は動原体を示す。

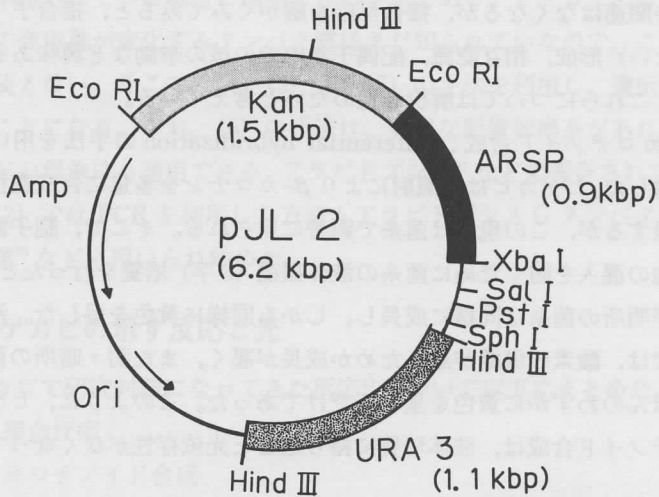


図2 ヒゲカビ大腸菌シャトルベクター⁹⁾。ARSPはARS活性を持つヒゲカビDNA。このベクターを改変してクローニング用コスミドベクターを作製中。

し、Shotgun cloning により *pic* 変異を相補する遺伝子を単離することは可能と思われる。

(3) 胞子囊柄, 胞子囊の形成: 成書¹⁾によれば, 胞子囊柄(Macrophore)及び胞子囊の形成は光によって促進されるとなっているが, 筆者が培養した標準株は明所及び暗所で殆ど違わなかった。胞子囊柄でも, 高さ数 mm の Microphore の形成は明所で完全に抑制されたが, 標準株を用いると Macrophore の形成がどうしても煩わしい。

当研究室で, 胞子囊柄を暗所で形成せず, 明所で形成するような変異体の単離を試みているがいまのところ成功していない。しかし, 明・暗所とともに Macrophore 及び Microphore を形成しない *imb* 変異株を単離することはできた⁴⁾。胞子囊柄形成自体を解析するためには有用な変異株と思われる。

(6) 光屈性: 光屈性異常変異株には *madA* から *madI* までの 9 つの遺伝子が知られており, *madA* と *madB* 変異株は, 光受容体側に支障が起こった変異株と考えられている。

ところで, ヒゲカビでは 24 遺伝子がマッピングされている(図 1)⁵⁾。ここで注目したいのが II リンケージグループの *madA* と *purC* である。*purC* はプリン合成系変異株でありプリン要求性を示す。栄養要求性変異を相補する遺伝子の単離は他のカビで成功しており, また, *madA* 産物は青色光受容体であるかも知れないという期待もあり, *madA* 遺伝子の単離は魅力的である。形質転換系を確立し, *purC* 変異を相補する遺伝子を単離し, それをプローブにして chromosome walking により *madA* 遺伝子を単離できないかと考えている。pJL2(図 2)は Revuelta と Jayaram によって開発されたヒゲカビ-大腸菌シャトルベクターである⁶⁾。現在, このベクターを改変して URA3 を除き, カナマイシン抵抗性遺伝子を選択マーカーに持ち, ARS 活性を持つヒゲカビ DNA (ARSP) と *cos* 領域を導入したクローニング用コスミドベクターの作製を試みている。

4. 形質転換系開発の試み

ヒゲカビの示す光反応と用いることができるスクリーニング法について

検討した結果、種々ある突然変異株の利用が得策であるように思われた。突然変異体を利用して遺伝子を単離するには、効率のよい形質転換系の開発が必要不可欠である。また、変異体を利用しないスクリーニング法を用いても、単離した遺伝子をヒゲカビに戻して解析を進めるために形質転換系の開発は必要になると思われる。

形質転換系には直接導入法と生理的現象を利用する方法があり、以下にまとめた。

(1) 直接導入法

- | | |
|-----------------|---------------|
| ① カルシウム法 | 大腸菌に用いられる |
| ② PEG法 | プロトプラストに用いられる |
| ③ エレクトロポレーション法 | プロトプラストに用いられる |
| ④ リポソーム法 | プロトプラストに用いられる |
| ⑤ マイクロインジェクション法 | 細胞や組織に用いられる |

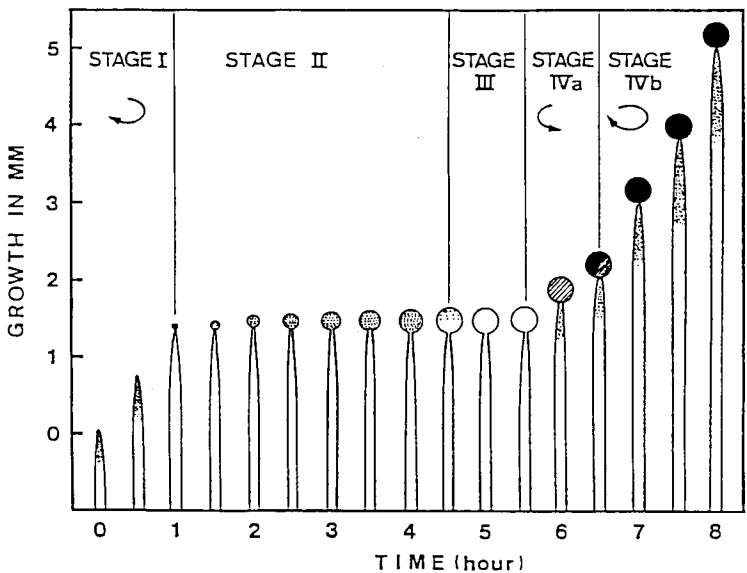


図3 胞子嚢柄及び胞子嚢形成過程の模式図。Stage II-IIIは上方への成長が止まるため回転も止まり、胞子嚢が形成される。Stage IVaになり再び成長及び回転が始まる。矢印は胞子嚢柄の回転方向を示す。

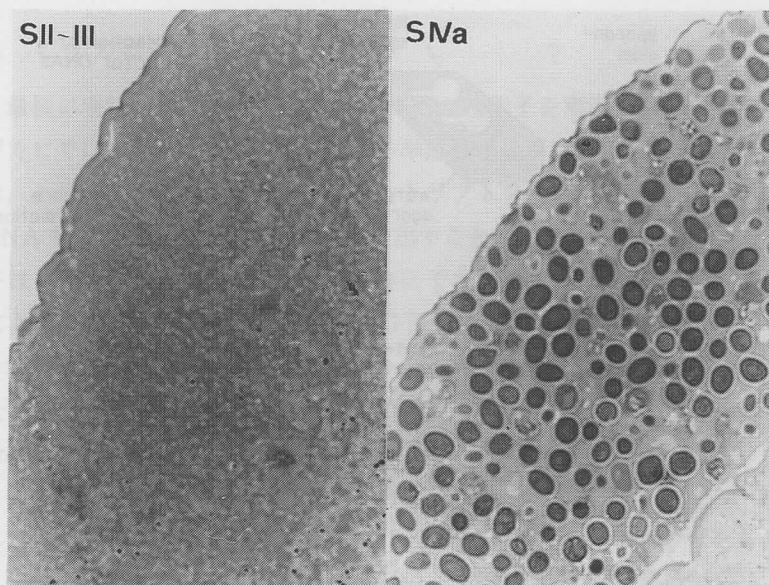


図4 胞子嚢内部の状況(筆者原図)。SIIIまでは胞子が形成されていないが、SIVaになると多数の胞子が形成されている。1個の胞子嚢に約 10^5 個の胞子が形成される。400倍で撮影。

⑥ 微小物衝突法
(パーティクルガン法)

細胞や組織に用いられる

(2) 生理的現象を利用する方法

① アグロバクテリウム-Ti (Ri) プラスミド法

高等植物(双子葉類)で用いられる。Gene taggingに有効。

② DNA注入法

ヒゲカビで開発中

ヒゲカビにおける報告⁶⁾⁷⁾⁸⁾では、発芽初期の菌糸からスフェロプラストを調製し、それにベクターを取り込ませるPEG法が用いられている。ヒゲカビの細胞壁はキチンとキトサンを含むが、キトサナーゼは市販されていないために適当な微生物から精製しなければならない(極く最近、BRL社から市販されるようになった)。このような問題点に加え、カビではもと

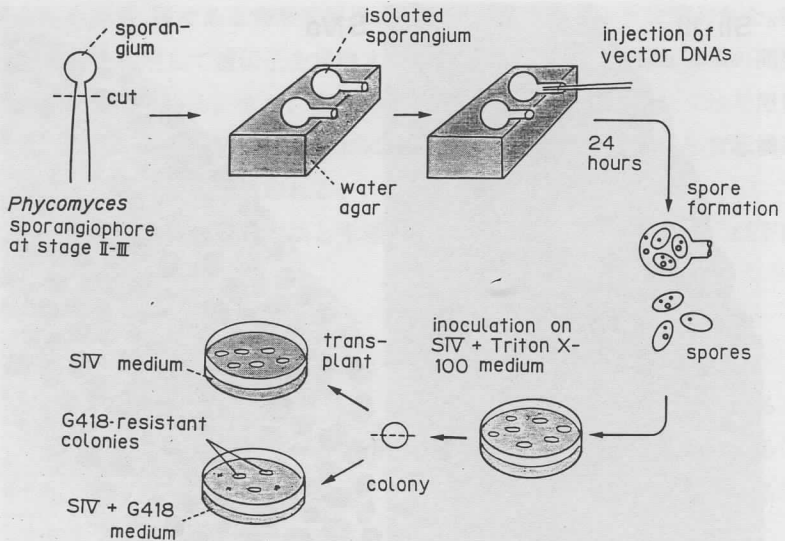


図5 ヒゲカビ形質転換系のアイデア。孢子嚢に注入されたDNAが孢子形成時に孢子内に取り込まれるならば、選択マーカー(例えばG-418)の入った培地で形質転換コロニーを得ることができる。

もと形質転換頻度が低いことから、より有用な形質転換系の開発が望まれる。現在開発中の形質転換系の原理を紹介する。

孢子嚢柄及び孢子嚢の形成過程の模式図を示した(図3)。一連の過程において、SII-SIII 孢子嚢と SVIa 孢子嚢の顕微鏡用切片を作製して内部の状況を観察すると、SIII までは孢子が形成されていないことがわかる(図4)。SII-SIII から孢子嚢直下で孢子嚢柄を切り出し、寒天上に静置して20°Cに保存すると12-24時間後には孢子形成がみられ、その孢子は正常に発芽した。また、切り出した孢子嚢内にエオシンを極少量注入し、30分ほどしてから蛍光顕微鏡下で観察すると、エオシンが孢子嚢内全体に一樣に拡散していることが確認された。これらの事実から、孢子嚢内でみられる孢子形成をそのまま利用した形質転換系が考えられた(図5)。前述のコスミドベクターの作製を待って、形質転換効率、安定性などを検討したい。

5. ヒゲカビで単離された遺伝子

最後に現状として、ヒゲカビで単離された遺伝子を簡単に紹介したい。ヒゲカビでは、今までに3つの遺伝子の単離が報告されている。*trp1* 遺伝子は、トリプトファン要求性の大腸菌をトリプトファン非要求性に相補するDNAを遺伝子ライブラリーから釣り出すことにより得られた⁹⁾。*leu1* 遺伝子は *Mucor circinelloides* の *leuA* 遺伝子を用いた Heterogous probing によりスクリーニングされた¹⁰⁾。*pyrG* 遺伝子は、コスミドベクターに作製された遺伝子ライブラリーから、*Aspergillus niger* の *pyrG* 遺伝子を用いた Heterogous probing により単離された¹¹⁾。これらを見ると Heterogous probing は有用な方法であり、今後も同様の手法を用いた単離が行われることはまちがいないと思われる。ヒゲカビを用いた相補性によるスクリーニング法はまだ報告されていないが、いままで見てきたことから考えると、ヒゲカビにおいて光反応に関する遺伝子を単離するにはこの方法が妥当だと思う。

参考文献

- 1) Cerdá-Olmedo, E. and Lipson, E.D. (Edt) (1987). *Phycomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 2) Ootaki, T. and Koga, K. (Edt) (1982). *Phycomyces strain catalogue*.
- 3) Meyerowitz, E.M./杉田 護・李 育慶 (訳) (1990) .蛋白質・核酸・酵素 **35** : 2146-2151.
- 4) 大瀧 保(1990). ヒゲカビの光反応変異株の単離とその解析, IGE シリーズ 6「植物の光反応機構の解析と変異株」, pp. 3-11, 東北大学遺伝生態研究センター
- 5) Orejas, M., Peláez, M.I., Alvarez, M.I. and Eslava, A.P. (1987). *Mol. Gen. Genet.* **210** : 69-76.
- 6) Revuelta, J.L. and Jayaram, M. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 7344-7347.
- 7) Suárez, T. and Eslava, A.P. (1988). *Mol. Gen. Genet.* **212** : 120-123.
- 8) Arnau, J., Murillo, F.J. and Torres-Martínez, S. (1988). *Mol. Gen. Genet.* **212** : 375-377.
- 9) Revuelta, J.L. and Jayaram, M. (1987). *Mol. Cell. Biol.* **7** : 2664-2670.
- 10) Iturriaga, E.A., Díaz-Minguez, J.M., Benito, E.P., Alvarez, M.I. and

- Eslava, A.P. (1990). *Nucleic Acids Research* **18**: 4612.
- 11) Díaz-Mínguez, J.M., Iturriaga, E.A., Benito, E.P., Corrochano, L.M. and Eslava, A.P. (1990). *Mol. Gen. Genet.* **224**: 269-278.

アカパンカビの青色光反応, 生物時計の場合

中 島 秀 明

1. はじめに

アカパンカビ, *Neurospora crassa*, は生化学遺伝学の端緒となった生物である。従ってこの生物を用いた様々な生理学的, 生化学的研究の成果が蓄積していることは言うまでもない。さらに様々な突然変異株が登録されており, 自由に利用できる。このような好条件に恵まれていることもあり, 青色光反応の解析はこの生物でもその研究の対象になっている。

アカパンカビの示す青色光反応は以下のようなものが報告されている。

- (1) カロチノイド合成¹⁾
- (2) 膜電位の過分極²⁾
- (3) 被子器形成の促進³⁾
- (4) 被子器口の屈光性⁴⁾
- (5) 分生子形成リズムの発現の阻害と位相変化⁵⁾

このほかにも最近青色光によって発現する mRNA 群の報告もある⁶⁾。このなかで最もよく研究されているのはカロチノイド合成の青色光による促進である。

我々の関心は生物時計の分子機構であるが, この時計の制御に青色光が大きな働きをしていることから, この光の受容機構の解析によって生物時計の分子機構についてのなんらかの手がかりを得ることができると考えている。(5) に挙げたように, 光によるリズムへの影響は2種類あるが, 始

めのもの、すなわちリズム発現の阻害については残念ながらあまり関心もなく、実験も行っていない。しかし後者、位相変化については若干の解析を行っているので、我々の研究成果を中心にして話を進めてみたい。なお位相変化をもたらす光として青色光が最も有効であり、作用スペクトルから、これが典型的な青色光反応であることは Feldman の研究室で確かめられている⁷⁾。始めにこの現象に我々が係わったのは、光による位相変化は温度依存で、温度が高くなると、阻害されることを発見したことから始まる⁸⁾。このとき位相応答曲線の形の傾向は変化せず、ただ起こる位相変化の大きさが徐々に小さくなり、最終的には 36°C で完全に阻害されてしまう。アカパンカビの成長はこの温度くらいで最大になるので、この温度がカビの代謝に不都合なものではないことは確かである。光受容系と時計をつなぐ過程の中に高温で不安定になる反応があるのではないかという類推をしたが、それ以上のことはなにも分からなかった。この後、原形質膜 ATPアーゼやエネルギー代謝の阻害剤がこの過程に与える効果の解析から、光は膜 ATPアーゼ活性を促進して、膜電位が過分極し、その結果として位相変化が起こる可能性を示唆した⁹⁾。この青色光による膜電位の過分極については、若干の問題はあるが、最近になって確かめられている。

2. タンパク合成の関与

生物時計と光受容系のあいだをつなぐ過程に新たなタンパク合成が必要であるかどうかを調べた¹⁰⁾。この研究の出発は光による新 mRNA 群の発現が報告される前であったが、我々も、もしタンパク合成が関与しているなら、当然新しい mRNA ができているはずで、もしそうなら、光処理をしたものとそうでないもの、または光による位相変化が顕著に起こる位相と全く起こらない位相で、mRNA の差を取れば、必ずこの両者をつなぐ過程に必須の mRNA を発見できるはずであると考えた。mRNA の合成阻害剤はその効果の特異性が確かめられ、さらに時計への影響を見たものはなかった。そのため、これまで我々自身もよく使ってきたタンパク合成阻害剤、シクロヘキシミドで実験を行なうことをまず考えた。光、シクロヘキシミド両者とも位相変化をもたらすので、結果の解釈は大変困難であるこ

とは予想できるが、好運であったことは、両者が最も位相変化をもたらす位相は全く異なることであった。光が最も位相変化をもたらす位相はシクロヘキシミドでまったくといってもよいほど影響を受けない。位相全体にわたって、光とシクロヘキシミドをそれぞれ単独に、また両者を同時に与えたときの位相応答曲線を比較すると、同時処理したものの位相応答曲線はまったくシクロヘキシミドのみで処理したものと一致した。このシクロヘキシミドの効果はシクロヘキシミド耐性株では起こらないことから、我々はシクロヘキシミドはタンパク合成を阻害することによって、光による位相変化を阻害していると結論した。したがって次の段階として、先に述べた mRNA の解析を行ないたいと考えている。

3. カルシウム代謝変異株の光受容

生物時計の機構の中で、カルシウム代謝が重要な働きをしている可能性

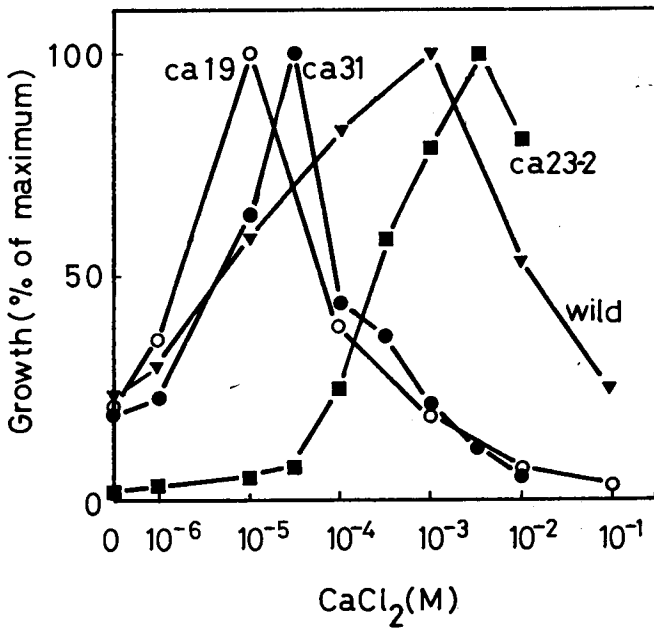


図 1

が強いという結論を得たので¹¹⁾, 両者の関係を知るためにここ数年, カルシウム代謝変異株の分離を試みている。これは高濃度カルシウムと A23187 を含む培地中で成長しない変異株を分離することによって行なっている。そのうちのあるものは, 液胞カルシウムポンプの活性が顕著に低くなっているために, 正常な培地で成育できなくなっていることは既に報告した¹²⁾ (図 1)。この変異株は少なくとも周期や分生子形成の位相については野生株と同じであったが, それ以上の解析はまだ行なっていない。しかし光と関連して面白いのは ca23-2 と名付けられた変異株で, これはさまざまな表現型の変化を見せるが, 興味のあるのは, この株は低濃度のカルシウム培地では全く成長しない。先に述べた変異株とは全く逆の性質を示す点である (図 1)。また光による位相変化が起こらない。この光不感受性は二つの可能性によって説明できる。一つは実験を行なった条件下では生物時計が働いていない, したがって光による位相変化も起こらない。もう一つはこの変異株は時計と光受容系のあいだのなんらかの反応が阻害されたような変異株であると考え。しかし前者の考えはまちがっていることが明らかになった。それは同じ実験条件下で温度変化に対する位相応答曲線を作成してみると, この変異株と野生株は全く同じであった。これは時計は正常に動いていることを意味している。我々はこの変異株の解析に大変興味を持っている。同じような性質を持つ変異株が最近新たに分離されたこともあり, この変異株の解析はアカパンカビのカルシウム代謝そのものの解析と同時に, 先に述べた時計と光受容系のあいだをつなぐ過程についての手がかりを与えてくれそうである。現在この変異株を用いて, この遺伝子のクローニングの準備をしている段階である。

参考文献

- 1) Harding, R.W. and Shropshire, W. (1980). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 217-238.
- 2) Potapova, T.V., Levina, N.N., Belozerskaya, T.A., Kritsky, M.S. and Chailakhian, L.M. (1984). *Arch. Microbiol.* **137**: 262-265.
- 3) Degli innocent, F., Pohl, U. and Russo, V.E.A. (1983). *Photochem. and Photobiol.* **37**: 49-51.

- 4) Harding, R.W. and Melles, S. (1983). *Plant Physiol.* **72**: 996-1000.
- 5) Sargent, M.L. and Briggs, W.R. (1967). *Plant Physiol.* **42**: 1504-1510.
- 6) Sommer, T., Chambers, J.A.A., Eberle, J., Lauter, F.R. and Russo V.E.A. *Nucleic Acid Res.* **17**: 5713-5723.
- 7) Feldman, J.F. and Dunlap, J.C. (1983). *Photochem. Photobiol. Rev.* **7**: 319-368.
- 8) Nakashima, H. and Feldman, J.F. (1980). *Photochem. Photobiol.* **32**: 247-252.
- 9) Nakashima, H. (1982). *Plant Physiol.* **69**: 619-623.
- 10) Johnson, C.H. and Nakashima, H. (1990). *J. Biol. Rhythm.* **5**: 159-167.
- 11) Nakashima, H. (1984). *Plant Physiol.* **74**: 268-271.
- 12) Cornelius, G. and Nakashima, H. (1987). *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2341-2347.

シロイヌナズナの光、重力および接触 屈性異常突然変異体の分離と解析

岡田清孝

高等植物が、光、温度、重力、接触、養分などの環境刺激を感知し、その方向や強度に応じて成長のパターンを変化させることはよく知られている。これらの成長変化を生じる機構を調べるために、これまで種々の生理学的な解析が行われてきた。私達は、分子遺伝学的な側面からこれらの反応を調べ、遺伝的制御機構を解明したいと考えている。特に、根が光、重力、接触などの物理的な刺激を感知して伸長の方向を変化させる反応について解析している。

1. 研究材料 — シロイヌナズナ —

研究材料には、突然変異体の分離解析が比較的容易なシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いている。この植物は、アブラナ科の野草であるが、栽培が簡単で、多数の植物体を扱うことができ、遺伝的な解析に優れているので、植物のショウジョウバエと呼ばれている。特徴を下にまとめた。

1. 世代時間が短い。播種後、約3-4週間で開花し、5-6週間で種子を得ることができる。
2. 栽培が容易で、栽培条件をコントロールできる。恒温 (22-25°C) で常に照明した実験室で栽培することができる。水耕栽培ができる。
3. 多数の植物を取り扱うことができる。草丈が小さく (20-30 cm) 小型なので、数個のプランターで数千個体を育てることも可能である。

4. ゲノムサイズが小さい。 ハプロイドあたり 7×10^7 塩基対である。
5. 遺伝解析に適している。 染色体数が少ない ($n=5$)。遺伝子地図が作られている。
6. 系統の維持が容易である。 自家受精し、一個体あたり数百から数千の種子をつける。種子は乾燥状態で長期間保存することができる。

上に示した特徴に加えて、種子を突然変異誘起剤で処理することによって効率よく突然変異体を生じさせる方法や、Ti プラスミドベクターを用いて植物細胞に遺伝子導入する技術、プロトプラストから植物体を再生させる系も開発されており、これらの実験技術を組み合わせて研究を展開させることが可能になった。また、この植物を用いる国内外の研究者の数が近年急激に増加しており、ほぼ毎年開かれる国際研究集会などで情報の交換も活発におこなわれるようになってきた。

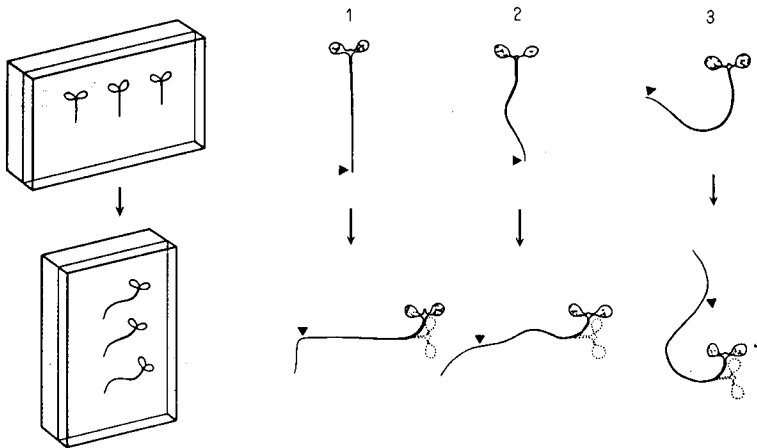


図1 シロイヌナズナの根の重力屈性が異常になった突然変異体を分離する方法。寒天培地の上に種子をまき、培地を垂直に立てて発芽させる。発芽後3~4日で培地の向きを90度回転させる。正常な重力屈性を示す植物は、根が曲がって下向きに伸び、莖は上向きに起き上がる(1)。この方法で、2種類の突然変異体、反応が鈍いもの(2)と、反応しないもの(3)、が分離された。いずれの突然変異体も莖の重力屈性は正常であった。

2. 根の重力屈性に異常を持つ突然変異体の分離と解析

我々は、重力屈性に異常を持つシロイヌナズナの突然変異体を分離するために、垂直に立てた寒天培地上で幼苗を育て、栽培途中で培地を横に置いて重力方向を変化させて主根の伸長方向を調べた(図1)。正常な植物体の根はかぎ型に屈曲するが、屈曲反応が異常になった突然変異体はいくつか分離された。突然変異体は大きく2種に分けられる。第一のグループは、屈曲反応が遅くかつ不完全になるもので、根の伸長方向と重力方向のずれの最大値が野生型の倍になっている(reduced response mutants)。第二のグループは、根の伸長方向がランダムで、重力方向の変化に反応しない(no response mutants)。

遺伝的な解析から、得られた突然変異体は二つの遺伝子座(aux1, agr1)にマップされた。興味深いことに、それぞれ遺伝子座にマップされた突然変異体には、第一グループと第二グループの両方が含まれている。また、同

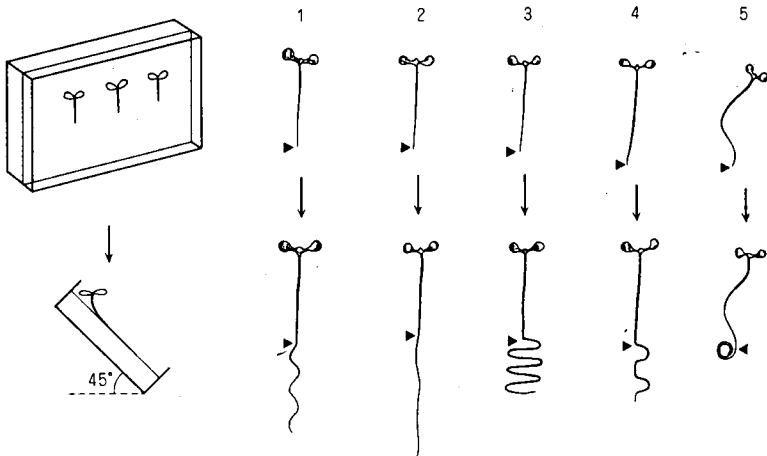


図2 シロイヌナズナの根の障害物回避反応が異常になった突然変異体を分離する方法。寒天培地の上に種子をまき、培地を垂直に立てて発芽させる。発芽後3~4日で培地を傾ける。正常な植物は、根の先端部が回転し、かつ一定時間(約6時間)ごとに回転方向が逆転するので、根が寒天の表面を波型に成長する(1)。この方法で、4種類の突然変異体(2~5)が分離された。

じ遺伝子座に属する突然変異体を掛け合わせた F1 は、第一のグループの形質を示す。このことは、少なくとも 2 個の遺伝子が、重力方向の変化を感知したあと、伸長領域に情報を伝達する機構に関与していることを示唆する。

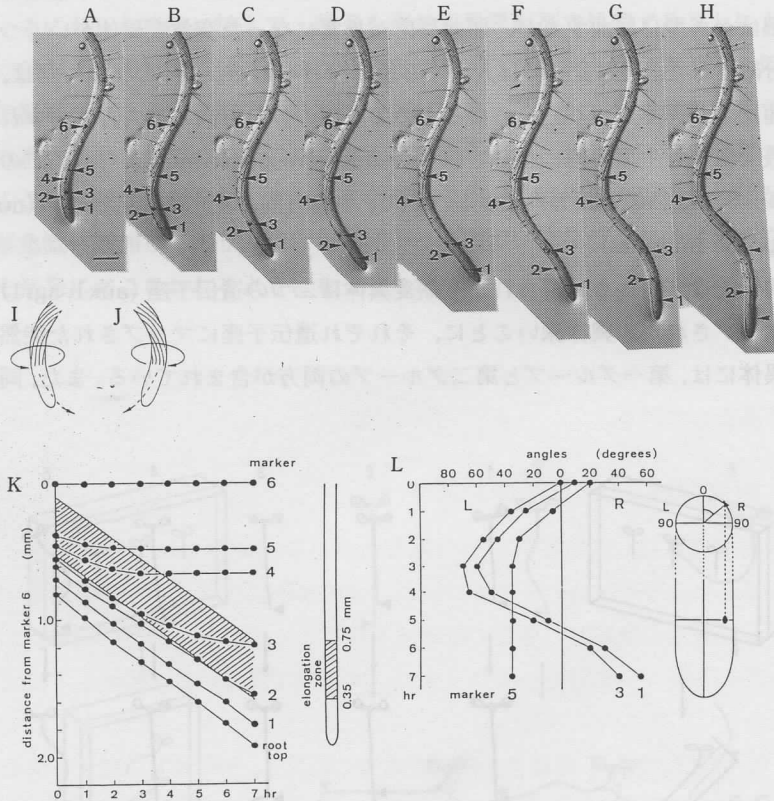


図3 45度斜めに置いた寒天培地上のシロイヌナズナ芽生えの根の成長 (Okada & Shimura, Science, 1990 より)。

(A-H) : 根の上に炭素の粉末(1-6)を置き、一時間ごとに撮影して炭素粉末の動きを調べた。(I, J) : 根の先端部の回転方向と根の成長方向の対応を示す。(K) : 根の先端から各炭素粉末までの距離の変化。0.35-0.75 mm の伸長領域にある炭素粉末の位置は大きく変化する。(L) : 炭素粉末(1, 3, 5)が根の上でどのような角度に位置しているかを追跡した。粉末1, 3は3時間目まで左方向に移動し、ついで右方向に移動する。これは根の先端が回転し、3時間目に回転方向が逆転したことを示す。粉末5は2時間目以降位置が変化しない。2時間目には粉末5は伸長領域を離れている(K図参照)。したがって、回転するのは伸長領域より先端部であることがわかる。

3. 根の障害物回避反応に異常を持つ突然変異体の解析

根が土中を伸びていく際に石や他の植物の根などの障害物に接触すると、これらを回避するために一時的に根の伸長方向を変える。我々は、この反応に関わる遺伝機構を調べるために、シロイヌナズナの芽生えを45度傾けた寒天培地の上に置いて育て、根の成長パターンを解析した(図2)。野生型植物の根は、先端部分が回転してねじれ、かつ回転方向が約6時間ごとに逆転するために、傾けた寒天培地の上に波型をえがいて伸びていく(図3)。根端部(先端から約0.7 mmまでの部分)が右ネジの方向に回転すると根は反時計まわりに円弧を描くように伸長し、逆に根端部が左ネジの方向に回転すると根は時計まわりに円弧を描く。この波型の伸長パターンが異

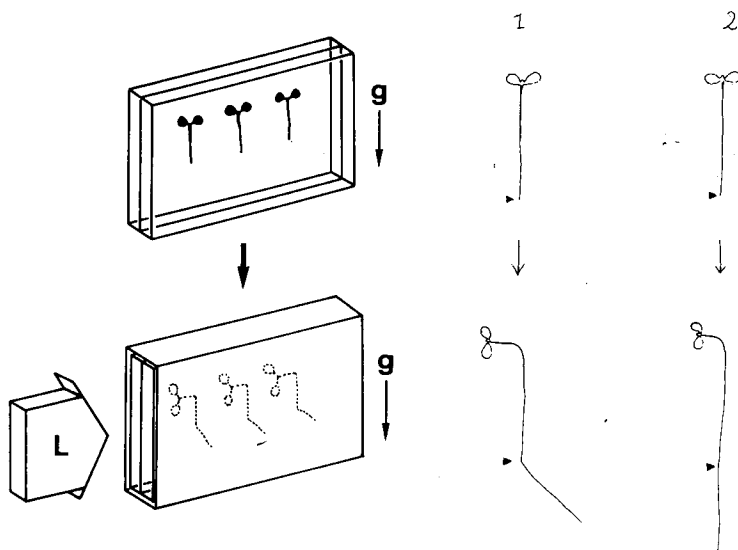


図4 シロイヌナズナの根の光屈性が異常になった突然変異体を分離する方法。寒天培地の上に種子をまき、培地を垂直に立てて発芽させる。発芽後3-4日で、左の側面のみを残して培地全体を黒い紙で覆う。左側から白色光を照射する。正常な植物の根は約45度右の方向に伸びる(1)。重力屈性は正常だが光屈性を示さない突然変異体の根は、まっすぐ下に伸びる(2)。

常になった突然変異体には、ねじれを生じないものや、強くねじれるもの、回転方向が逆転しないものなどがある。これらの突然変異体は、正常な障害物回避反応を示さない。

これらの突然変異体の中には、重力屈性も異常になったものがあるので、重力屈性過程とねじれ伸長過程は異なる制御機構の下にあるが、その一部には同じ遺伝子が関与していると考えられる。

4. 根の光屈性に異常を持つ突然変異体の分離と解析

シロイヌナズナの根は、光（白色光）を避けるように光のくる反対方向に伸長する。我々は、根の負光屈性に異常を持つシロイヌナズナの突然変異体を分離するために、垂直に立てた寒天培地上で幼苗を育て、栽培途中で培地を黒い紙で覆った。寒天培地の一方の側面からのみ光（白色蛍光灯）を照射して主根の伸長方向を調べた（図4）。正常な植物体の根は垂直方向から約45度の角度で光照射の逆方向に伸びる。これは、正の重力屈性による下向き伸長と負の光屈性による横向きの伸長のベクトル和の方向に伸長するためと解釈される。したがって、シロイヌナズナの根では光屈性と重力屈性が同時に作用すると考えられる。（上に示した接触刺激による回転反応の際には、重力屈性機構は抑制されている。この結果は、物理的刺激による反応に階層性があることを示している。）これまでに分離された光屈性突然変異体は、横方向から光を照射してもまっすぐ下に伸長する。この突然変異体の重力屈性は正常である。

上記の三種類の物理的刺激は、いずれも根の先端部分で感知されると考えられる。重力方向は根冠の細胞で感知されると考えられており、障害物の接触刺激も当然根の先端で受容されるであろう。また、根の先端部にフィトクロームが存在するという報告もあるので、光もまた先端部で感知されている可能性が高い。しかし、屈曲や回転をおこなうのは根の伸長領域である。この領域は根の先端から0.35-0.75 mm 離れているから、根の先端部で感知された刺激の情報は、数十個の細胞を介して伝達されなければならない。これまでに分離された突然変異体は(1) 刺激の感知、(2) 刺激情報の伝達、(3) 屈曲または回転、の各段階のいずれかに異常を持つと考えら

れる。

現在我々は、これらの突然変異体を用いて遺伝子の分離を試みている。このような分子遺伝学的解析の結果をこれまでに蓄積された生理学の知見をつきあわせることによって、重力屈性或障害物回避反応の機構をより詳細に理解することが可能になると期待される。

参考文献

- Estelle M.A and Somerville C.R. (1986). The mutants of *Arabidopsis*. Trends Genet. **2**: 89-93.
- Meyerowitz E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. Ann. Rev. Genet. **21**: 93-111.
- Okada K. and Shimura Y. (1990). Reversible root-tip rotation in *Arabidopsis thaliana* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. Science **250**: 274-276.
- 岡田 清孝(1989). 花の形態と根の重力屈性を制御する遺伝子群. 生物物理 **29**: 1-4.
- 小牧 正子, 岡田 清孝, 志村 令郎(1989). シロイヌナズナの突然変異体とゲノム構造—シロイヌナズナを用いた高等植物の分子遺伝学の展開—遺伝学雑誌 **64**: 57-74.
- 岡田 清孝, 志村 令郎(1989). 高等植物の器官分化過程を制御する遺伝子群の解析. In 細胞社会とその形成(江口吾朗, 鈴木義昭, 名取俊二 編) pp 147-157, 東京大学出版会.
- 岡田 清孝, 志村 令郎(1990). 形態変化の遺伝子支配, 植物. In 岩波講座 **9**. 分子生物学, 「個体の生涯 II」 pp 35-59. 岩波, 東京

シロイヌナズナを用いた光反応 機構変異体利用の可能性

米 田 好 文

シロイヌナズナは、高等植物のうちで最も分子遺伝学的研究に適した材料であることは周知の事実となってきた¹⁾。我々は、特に三つの側面から重要な素材であると捉えている。即ち、遺伝子 DNA 源、トランスジェニック・植物の宿主、および遺伝子歩行法などによる突然変異遺伝子単離の出発材料である。このような観点に立って、環境要因としての光を用いる光反応に関連した生物現象のうち、フィトクロムタンパク質遺伝子発現調節を解明するためのトランスジェニック宿主および花芽形成機構研究のための材料に使用している。この2つのトピックスについてまとめてみたい。

光形態形成反応が起こるためのスタートとなる光情報の受容は、種々の光受容体が行なうことが知られる。そのうち赤色光受容タンパク質であるフィトクロムのみが単離されており種々の研究が蓄積してきた²⁾。フィトクロムタンパク質遺伝子の研究は、最近になり遺伝子の単離とともに可能となり双子葉植物ではエンドウを用いた研究が活発に展開されつつある³⁾。我々は既に、エンドウ遺伝子上流約 2.3 kbDNA をレポーター遺伝子 (GUS 遺伝子を用いた) に結合してペチュニアに導入した。このトランスジェニック・ペチュニアは、レポーター活性の赤色光による down-regulation を示し導入 2.3 kbDNA 中にフィトクロム自身による発現抑制のシグナルの存在を示した。このようなレポーター遺伝子を、続いて種々の発現調節変異体の単離を目指してシロイヌナズナに導入した。シロイヌナズナ内でのレポーター活性は白色光下でもかなり高く、暗条件にするとさらに

活性発現が上昇した。したがって、フィトクロムによる down-regulation を明確に再現できなかつた。その原因が、シロイヌナズナ内在のフィトクロムによるのか否かについて追求中である。また、突然変異手法を用いてエンドウ中での発現調節(すなわち down-regulation)を回復できないかと検討している。こうして、発現調節機構解明に寄与したいと思っている。

花芽形成の問題は、古くから植物生理学者の非常な興味を引きつけ多くの研究が蓄積してきた。光との関連では、短日植物アサガオを中心に展開されてきた。我々は、ここでも遺伝学的手法が強力かつ必須であると思い、シロイヌナズナを花芽形成研究の材料としたいと考える。実は、突然変異単離研究の初期より、花成が遅れる変異体が認識されていたが主として計量遺伝学的形質として多量遺伝子支配の例として集団遺伝学的なアプローチが中心であった。我々は、そのうち質的形質と呼び得るような花成遅延の明らかな単一遺伝子変異を対象に収集、研究してきた。まず、突然変異頻度は、色素異常などの他の突然変異と同程度で明確な花成遅延変異(即ち質的形質)が得られることがわかった。今のところ、通常の頻度では花成が全く起こらない変異体は得られていない。その原因となる作業仮説として、花芽形成過程の反応は大部分が多重反応過程であり、阻止されるとその後の反応がすべて止まるといった反応を持つ過程はきわめて少数であるということ考えた。これに基づき各花成遅延を支配する遺伝子作用を1つずつ明らかにしたいと考えている。

光情報は、野生の植物にとり重要な環境情報である。アサガオ等の短日植物では光との相互作用につき明確な連関があるが、長日植物はそれほど明確ではない。特に、シロイヌナズナの属するアブラナ科植物では、青色光、遠赤色光が花成に促進的であり、どのような光受容体が関与するか未だに不明とされる。将来、光との関連で花成を考える基本として光無しでの花成を調べることは、有意義なアプローチであると考えた。光を無くしても光合成産物(シヨ糖)を補うと花芽形成する事がわかっているの、野生型系統をもちいて種々の暗黒花成条件を検討した。光のない条件では、糖を補うので無機塩の合成培地を用いてしかも無菌栽培で行なった。寒天等を使う固形培地では、90 mm シャーレ、内容積の大きいガラス管ビンとも

に双葉以上には展開せず花成反応も起こらなかった。ネジロ試験管に入れた液体培地を用いて培養すると、振盪をかけた場合にのみ植物が伸長して花成反応を示した。光があると液体振盪培養では阻害物質が蓄積するのか植物の生長が阻害され花成しないこともわかった。このように暗黒花成は、光以外の条件も関連しているらしい。その状況証拠として、花成遅延変異体の一種 *co* 変異体では、液体振盪培養以外に内容積の大きい管ビンでも増殖して花成するし、矮性変異体の一種 *br* 変異体では、それらの条件に加えて 90 mm シャーレ中でも増殖し花成することを見いだした。野生型で花成する液体振盪培養を暗黒花成の標準法として採用して、種々の花成遅延変異体の暗黒花成を調べた。*co*, *gi*, *ld* を含めて調べた変異体すべて、暗

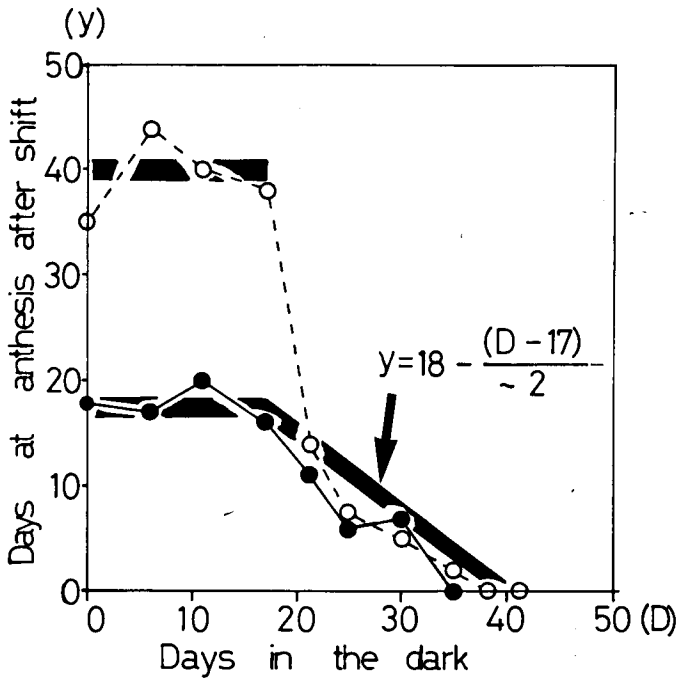


図1 明暗シフトによる花成反応。

D 日間、暗黒液体振盪培養後、明条件に移して花成までに明条件で要する日数を y 日で示す。実線が野生型株、点線が *gi* 変異体。例えば D=0 は、明条件での花成反応であり、y=0 は暗黒下での花成を示す。

黒花成は正常即ち野生型と同一の花成反応を示した。いわゆる花成遅延変異体は、この条件下での暗黒花成は正常ということになった。表面的に言えば、これらの実験条件下でシロイヌナズナの花芽形成にとり光は抑制的でありその抑制効果を阻止するため種々の遺伝子が作用する。その遺伝子変異を花成遅延変異として同定していると考えることができよう。

続いて明暗シフト実験を行なった。暗黒培養（液体振盪培養）した植物を明培養（固形培地）に換え花芽形成を観察した。図1に示すように花芽形成までに必要な日数を明条件に移してからの日数で示すと当初増加するが2週間を過ぎる辺りから直線的に減少した。これは、図に示す例えば *gi* 変異体（点線で示す）を用いると顕著な不連続な線となった。増殖の指標に花芽形成時のロゼット葉数を縦軸に用いると、*gi* 変異体ではその不連続性がさらに明確になる。即ち、暗黒培養の初期には、変異体型のロゼット葉数（30枚程度必要）を示すが、不連続点以後は野生体型葉数（8枚程度必要）で花芽形成を完了することがわかった。後者の葉数が暗黒培養の葉数そのものであるから、図1の最も単純な解釈は、暗黒培養当初は暗黒型の花芽形成反応をスタートしていないが、不連続点以後暗黒培養型の花芽形成がスタートしたということである。この解釈をさらに進めると、図1に示すグラフが横に書いた関数に近似できるとすれば図2に示すような作業仮説が導かれる。花芽形成反応として明型（LFで示す）と暗型（DFで示す）の2つの経路があつて、途中で暗-明と換えてもそのまま花芽形成に至るところから初期反応が特に区別され後半は共通らしい。更に、いわゆる花成遅延変異体は、明型の初期反応変異体であるといったものである。図2では、Col.（野生型）と *gi* のみを示すが暗型花成ではいずれも40日で花成する。明型花成では、各々18日と40日を要する。暗型花成（DF）は、その中身は均一ではなく前半（pre-com. で示す）と後半（post-com. で示す）に分かれる。前半期に明条件にされるとLF型の反応が相加的に加わり、その合計の日数が花成に要することになる。ただし、暗黒下で一般的増殖は始まっているので光なしでは約半分進むと考えた（図1の関数の係数 ~ 2 ）。後半期に明条件に移されても既にDF型花成はスタートしており、後半の23日分の残りを明条件下で消化すればよい。

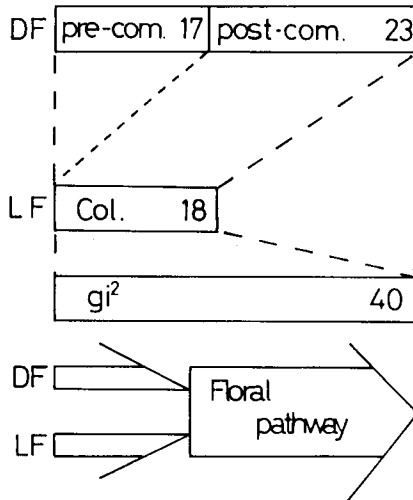


図2 明型および暗黒型花成反応の作業仮説。暗黒型花成 (DF で示す) と明型花成 (LF で示す) の日数を数字で示す。DF は、pre-com. と post-com. に分かれ各々17日、23日要する。点線はその発生過程のだいたいの対応関係を示す。下の矢印は、花芽形成反応の時間的経過を示す模式図。

このようにして現在までに遺伝子地図上に位置づけられている。co, gi, 及び多くの明条件下で得られてきた質的突然変異体を用いることによって、今までなかった観点から花芽形成における光との相互作用についてアプローチできることが期待される。

野生状態では、光無しで植物は生育できないので暗黒下での花成反応は実験室でのみ達成される。これに関連して、最近米国の J. Chory らは興味深い突然変異体を報告した⁴⁾。上記のように、野生型植物ではシャーレ等で生育させると暗黒下で双葉以上には展開しない。彼女らは、その条件でも本葉を展開し光要求性遺伝子群が発現している *det* (*de-et* isolation) と命名した単一劣性変異体を単離した。暗黒下で本葉が展開しないという形質も遺伝子支配によることを見事に示したことになる。彼女らの記述によると本葉は展開するが花芽形成しないという。我々の上記の知見と照らし合わせると花成に到るまでまだステップがあることを示している。*det* 変異体と我々 *co*, *br* 変異体との関連を知りたいところである。上記のように、暗

黒下では液体振盪培養のみで花成した。第一義的にはおそらく栄養補給が最も容易な条件にと思われるが、かなり水過剰ストレス状態にあると思われる。そのため我々は、SOS flowering と呼ぶことがあるが水ストレス以外に暗黒そのものもストレスかも知れない。また、暗黒花成に培養器の内容積が関連していることからストレスホルモンエチレンとの関連を予想させ、その線から追求してみたいところである。

以上のように、シロイヌナズナを用いて突然変異体単離とその遺伝子単離を行なうことにより光形態形成の問題への有効なアプローチ法になると考えられる。

付 記

ワークショップの際いただいた、岡山大学中島秀明先生はじめとするご討論に感謝致します。

参考文献

- 1) Meyerowitz, E.M. (1987) *Ann. Rev. Genet.* **21** : 93-111.
- 2) Furuya, M. (1989) *Adv. Biophys.* **25** : 133-167.
- 3) Sato, N. (1988) *Plant Mot. Biol.* **11** : 697-710.
- 4) Chory, J., C. Peto, R. Feinbaum, L. Pratt, and F. Ausubel (1989) *Cell* **58** : 991-999.

オーキシン作用の分子生物学的研究

山 本 興太郎

オーキシンの作用を、オーキシンによる遺伝子発現の調節という側面から理解しようとする試みは1960年代から散発的に行われてきた。このアプローチは、オーキシンによって植物組織の伸長成長がおこる系や、その維持にオーキシンが必須である組織培養の系で主に行われてきた。前者は、オーキシン投与後10分程度で検出できる早い反応で比較的単純な現象と考えられることから、オーキシンの作用を研究するうえで良い系となっている。本稿では、この現象に関して今までに単離された遺伝子を整理するとともに、筆者らが最近得た知見をあわせて紹介する。また、伸長成長以外の系でオーキシンに関して単離された遺伝子についても必要に応じて言及する。

高等植物の伸長成長に、特定の遺伝子の転写調節が関与しているかどうかという点は1960年代後半より問題になっていたが、長いあいだ信頼できる実験結果が得られなかった。1980年になって、poly(A)⁺RNAの*in vitro*翻訳ができるようになってはじめて、オーキシン処理が少なくとも数種類のmRNAの翻訳活性を増加させることが疑問の余地なく明らかになったのである¹⁾。引続いて、オーキシン処理によって変動するmRNAのcDNAクローニングが行われ、最初のクローンとして1982年には黄化ダイズ芽生え下胚軸切片より2種類のcDNAクローンが得られている(後述のaux28とaux22)²⁾。それ以来、比較的多数のクローンが発表されているが、それ

表1. オーキシシンによる成長制御に関連して単離された遺伝子およびその周辺の遺伝子

遺伝子	由来する組織	コードしている 蛋白質の大きさ (kDa)	文献
Arg1	ヤエナリ下胚軸	44	4
Aux28	ダイズ下胚軸	28	3
Aui (Gmhsp26-A)	ダイズ下胚軸	26	5, 6
Aux22	ダイズ下胚軸	22	3
Sar	イチゴ花托	12.5	10
Arg3	ヤエナリ下胚軸	10	4
Saur	ダイズ下胚軸	0.9-10.5	8
Par	タバコ・プロトプラスト	25	11
Dbp	シロイヌナズナ	21	16

表2. オーキシシンによって誘導されるプロモーターにみられる保存されている DNA 配列要素 (シス・エレメント) (文献13を一部拡張・改変)

配列	プロモーター	位置	文献
1) GCAC-CATGCGT	aux28	-210	3
GCAG-CATGCAC	aux28	-285	3
GCAG-CATGCAT	aux22	-207	3
GCATTCATACGC	gmhsp26-A	-179	6
CCA--TATGCC	saur	-130	8
GCA--CATACGT	nos	-114	13
2) AGTTTTTTT	gmhsp26-A	-229	6
AGTTTTTTT	dbp	-470	16
AGTTTTTTT	par	-594	12
AGTTTTTTT	par	-705	12

らは mRNA の大きさとしては高々1 kb 程度、蛋白質の大きさとして22 から28 kDa 前後の、比較的小さいクローンであることが多い。これらのクローンの内いくつかのものについては最近になってやっと塩基配列が明らかになってきたので、それらの配列について説明する (表1)。

Aux22 と Aux28 最初に塩基配列が明らかになったオーキシン誘導遺伝子が aux28 と aux22 である³⁾。両者の配列は互に関連があり、相同な 5 カ所の部分がまったく関連のない 6 カ所の部分の間に交互にはさまっている。しかし、たがいにクロス・ハイブリダイズするほど相同性は高くない。両 aux にホモロジーのある遺伝子は他には発表されていない。両遺伝子ともに、コードする蛋白はイオン性のアミノ酸残基を多く含み、非常に親水性である。aux28 には 4 個、aux22 には 3 個のイントロンがある。

aux の mRNA は下胚軸の成長部位に多く存在し、その切片にオーキシンを与えることによって 10 倍近く増加する。下胚軸をオーキシン処理するとエチレンが生成するが、mRNA の増加はエチレン処理によっては起こらない。この効果はオーキシン処理開始 15 分後には検出されることからオーキシンの一次反応に近い現象である可能性がある。

両 aux 遺伝子のプロモーターの塩基配列を比較することによって、オーキシン誘導に関与する塩基配列 (シス・エレメント) を特定することが試みられている。その結果、9 bp の TGATAAAAG と GCANNNTGC の二つが候補として挙げられている (表 2)。両 aux 遺伝子のコピー数はともに 1 ないし 2 コピーと推定されている。筆者らは最近、黄化ヤエナリ下胚軸よりディファレンシャル・スクリーニングでオーキシン誘導性 cDNA クローンを 6 個単離した⁴⁾。その内 3 個は aux22 のホモログであった。ただし、3 個の内の一つは、蛋白をコードしている領域の塩基配列に関して aux22 との相同性が 58% と低く、mRNA の大きさも 1.3 kb で 1 kb 内外の他の aux22 mRNA に比べてはるかに大きいことから、他の aux22 ホモログとは若干性質の異なる遺伝子ではないかと考えている。この知見から、aux 遺伝子ファミリーの構成は実際はもっと複雑であろうと思われる。

AUI (AUxin Induced) または Gmhsp26-A この遺伝子もダイズ組織から得られたものだが⁵⁾、その塩基配列を調べてみるとダイズ下胚軸から得られた熱ショック蛋白 (hsp) の遺伝子 gmhsp26-A⁶⁾ と同一であった。ただし、この遺伝子は下胚軸では熱ショックで誘導されるが、幼芽では同処理で誘導されることはない。また、カドミウムを代表とする重金属イオンに

よっても誘導をうけるが、種々の重金属による誘導のかかりかたも器官によって異なる。オーキシンに反応することからも分かるように、*au1* は性質が他の *hsp* とはかなり違うように思われる。熱ショックがかかっていない時にもかなりの量が発現しているし、熱処理しても普通の *hsp* ほどは誘導されない。低分子量の *hsp* はオーガネラに局在するものが多いのだが、*au1* は細胞基質に存在している。

au1 はカドミウムや銅イオン処理をうけると、オーキシンや熱処理時に誘導される 1 kb の mRNA のほかに 1.4 kb の mRNA も増加する。この遺伝子にはイントロンが一つあり、重金属が転写を促進するとともに転写産物のプロセッシングを阻害している。また、*au1* は 5, 6 個の成員からなる遺伝子ファミリーを形成しているらしい。

au1 のプロモーターには、相同性の程度は低いもののショウジョウバエの熱ショック・エレメントや、ホ乳類の金属応答エレメント (metal-responsive element) と相同性のある配列がある⁶⁾。*au1* のアミノ酸配列を動植物で広く見られる低分子量の *hsp* と比較してみると、アミノ末端側ではほとんど似ていないが、カルボキシ末端側のエクソン部分では 15 から 30% 程度の相同性があり、そこでのハイドロパシー・プロフィールはたがいによく似ている。

SAUR (Small Auxin-Up RNAs) オーキシンに反応する 550 b 程度の小さい mRNA の cDNA クローンが 10 種類近く報告されており⁷⁾ (一部未発表), *saur* と名づけられている。この遺伝子は発現が早いことに特徴があり、ダイズ下胚軸切片を 50 μ M 2,4-D で処理すると 2.5 分以内に mRNA が増加し始める。これらの内三つのクローンについては詳細な研究が報告されている⁸⁾。この三つの中で、二つの mRNA には発現に関する器官特異性があり、下胚軸の伸長部位ではオーキシンに反応するが、第一葉ではほとんど反応しない。残りの一つは両器官でオーキシンに反応する。in situ ハイブリダイゼーションで調べてみると、*saur* は下胚軸伸長部位の表皮と皮層細胞でその発現が検出されたが、維管束では発現していなかった⁹⁾。

saur の転写産物の量は、シクロヘキシミド等の蛋白合成阻害剤の投与に

よっても一時的に増加するが、これは転写産物が蛋白合成阻害剤の投与によってより安定になるためで、遺伝子の転写活性は変化しない。

saur のゲノム解析の結果、互に相同で 240 から 270 bp の ORF が 5 個、約 1.25 kbp の間隔をおいて集合している約 7 kbp の領域が見つかった⁸⁾。この 5 個の ORF の内三つは前述の三個の cDNA クローンに対応しているが、残りの二つの ORF は実際に発現しているかどうかは確認されていない。約 60% の塩基配列が五つの ORF で共通であった。どの ORF にもイントロンがなく、0.9 から 10.5 kDa の親水性蛋白をコードしている。等電点は pH 6 とやや酸性に推定されている。アミノ酸配列は 56% が五つの *saur* で一致している。

五つの ORF の上流域を比較すると、TATA ボックスの外に、その約 100 bp 上流に二つのよく保存されている領域を認めることができた。その内の一つは、*aux* でシス・エレメントの候補として挙げられた配列の一つとある程度の相同性があつた(表 2)。また、ORF の約 20 bp 下流にもよく保存されている領域があるが、この配列に類似の配列は今までにまったく報告されていない。ORF より約 700 bp 下流、すなわち *saur* 遺伝子間のほぼ中間あたりに、もう一つよく保存された約 20 b にわたる領域がある。この配列はダイズの熱ショックの 3' 非翻訳領域 (ORF より約 15 bp 下流) に見られる配列と相同であった。

一方、*saur* cDNA クローンでこの五つの ORF に対応しないものがまだ相当数残っていることから、*saur* 遺伝子の構成は実はもっと複雑であろうと考えられている。筆者らもヤエナリ組織より *saur* の cDNA クローンを一つ単離している

SAR (Strawberry Auxin-Repressed) イチゴ花托 (食用にする部分) はオーキシンによって肥大する典型的なオーキシン反応性器官である。この現象でレベルが変動する cDNA クローンが 3 種類単離されているが、その中の一つはオーキシン投与によって発現のレベルが減少するクローンで、*sar* と名づけられた¹⁰⁾。これは、オーキシンによって発現が抑えられることが明らかになった最初の遺伝子である。この系でレベルが増加するクロー

ンについては、まだ塩基配列が発表されていない。

オーキシンによる伸長成長にもなって変動する遺伝子で、今までに明らかになったものについてまとめてきたが、伸長成長以外のオーキシンが関与する系でも、これらの遺伝子となんらかの関係がある遺伝子がいくつか報告されている。次にそのような遺伝子を概観する。

PAR (Protoplast Auxin-Regulated) par はタバコ・プロトプラストをオーキシン (2, 4-D) の存在化で培養したときに発現する遺伝子である¹¹⁾。プロトプラストをオーキシンとサイトカイニンのもとで培養すると細胞分裂が起こり、脱分化がはじまる。par は、DNA 合成開始以前、オーキシン添加後 30 分以内に発現しはじめるので、par の産物が DNA 合成の開始になんらかの関係があると想像されている。

par がコードする蛋白のアミノ酸配列を比較すると aui (すなわち、gmhsp26-A) と 34% の相同性が認められた。par 遺伝子のプロモーターのシス・エレメントを同定する試みが、GUS 遺伝子との融合遺伝子を用いて行われている¹²⁾。その結果、転写開始点の約 700-500 bp 上流にかけて存在する 111 bp の繰返し配列がオーキシンに対する反応に必要であることが分かった。また、その繰返し配列の中に含まれる AGTTTTTT は、gmhsp 26-A や dbp のプロモーターにも存在しており (表 2)、シス・エレメントではないかと考えられる。

NOS ノバリン合成酵素 (nos) は、Ti プラスミドの T-DNA にコードされている遺伝子である。Ti プラスミドで形質転換されたタバコでは、傷害によって nos が誘導されるが、この時オーキシンを投与すると nos プロモーターは一層活性化される¹³⁾。nos プロモーターにレポーター遺伝子 cat をつないだ融合遺伝子を用いた研究により、シス・エレメントの同定が行われている。その結果、GCACATACGT の配列が傷害誘導にもオーキシンに対する反応にも必須であることが分かった。この配列の後半は、カリフラワーモザイクウイルス 35SRNA 遺伝子¹⁴⁾ やコムギ・H3 ヒストン遺伝子

の発現調節に重要な役割をはたしている hex エLEMENT (ACGTCA)¹⁵⁾ と一部重なっていることが注目される。

DBP (DNA-Binding Protein) dbp は、シロイヌナズナのすべての器官で常に相当のレベルで発現している遺伝子として単離されたものであるが、特に茎頂と根端で高い発現が観察されている¹⁶⁾。花茎の切片にオーキシンを投与すると dbp が誘導されるが、その誘導のかかりかたは伸長成長にともなって発現誘導される遺伝子のそれとはかなり異なっている。まず反応が遅く、オーキシン投与後 4-8 時間後に誘導がかかるので、オーキシンの dbp に対する効果はより間接的で長期的であると思われる。また、オーキシン濃度依存性も異なる。伸長成長に付随する多くの遺伝子は、その発現量が 10^{-4} - 10^{-3} M のオーキシンで飽和するが、dbp の場合は 10^{-6} M に極大があり、それ以上の濃度では発現が阻害される。

dbp 蛋白はリシン含量が高く、非特異的な DNA 結合能を持っているという点で H1 ヒストンに似ている。しかし、リシン含量以外のアミノ酸組成がヒストンと大きく異なること、ゲノムに 1 コピーしかないこと、イントロンがあることなどヒストンと異なる点も多く、一応ヒストンではないとされている。

以上、オーキシンの作用になんらかの関係があると考えられる遺伝子を紹介したが、筆者らはこれらの遺伝子とはまったく異なる塩基配列をもつ cDNA クローン、arg1 と arg3 をヤエナリ下胚軸より単離している(表 1)。表 1 にあげた蛋白はみな親水性であるが、arg1 がコードしている蛋白は大きな疎水性領域を持っており、膜蛋白の遺伝子である可能性が強い。一方、arg3 はオーキシンの効果よりは小さいが、熱ショックによっても若干誘導されることが特徴である。

最近数年間の研究によって、オーキシンによって特異的に誘導される遺伝子群の姿がかなり分かってきた。これは、ディファレンシャル・スクリーニングの威力をまざまざと示す一例ではあるが、その当然の欠陥としてこれらの遺伝子産物の機能についてはまったく分かっていない。これらの遺

伝子は確かにオーキシンによって誘導されるが、オーキシン作用とはなんら関係がない恐れも多分にある。この点を調べるために、McClure と Guilfoyle¹⁷⁾ はダイズ芽生えの地上部が屈地性を示す時の *saur* の発現の様子を調べた。芽生えが直立しているときは *saur* の転写産物は成長軸に対称的に分布している。この分布は芽生えを水平に保持して重力刺激を与えはじめから 10 分間は変化しないが、20 分たつと偏差成長がおこるはずの下側で *saur* のシグナルが強くなり、上側では減少する。45 分以上たつと下胚軸が曲るのが明らかに見てとれるようになるが、シグナルは曲っている部分の下側の皮層に強く現われる。3 時間たつと下胚軸上部は再び直立するが、この時にはシグナルは再び対称的な分布に戻っている。屈地性と密接な相関を示すこの結果は、*saur* がなんらかの生理的働きを持っていることが示唆している。また、この結果は *saur* mRNA の代謝回転が非常に早いことを示しているが（半減期約 10 分）、この早さが前述の蛋白合成阻害剤による *saur* mRNA の蓄積という現象を引きおこしていると考えられる⁹⁾。

オーキシン作用の分子生物学的研究にはこれらの遺伝子がオーキシンによって誘導される機構をさらに追及することと、これらの遺伝子産物の生理的機能を明らかにすることが必要であることは言うまでもない。前者に関しては、表 2 に示したようなシス・エレメントの解析がすでに進んでおり、これらと相互作用するトランス・ファクターの同定が期待される。また、後者の課題を解決するために、筆者らはこれらの遺伝子のアンチセンス RNA を導入した形質転換植物を作製しているところであり、近い将来にオーキシンの作用機構を分子レベルで明らかにできることを期待している。

参考文献

- 1) Zurfluh, L.L. & J. Guilfoyle (1980) PNAS 77, 357-361.
- 2) Walker, J.C. & J.L. Key (1982) PNAS 79, 7185-7189.
- 3) Ainley, W.M., J.C. Walker, R.T. Nagao and J.L. Key (1988) J. Biol. Chem. 263, 10658-10666.
- 4) Yamamoto, K.T., H. Mori & H. Imaseki, in preparation.

- 5) Hagen, G., N. Uhrhammer & T.J. Guilfoyle (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6442-6446.
- 6) Czarnecka, E., R.T. Nagao, J.L. Key & W.B. Gurley (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1113-1122.
- 7) McClure, B.A. & T. Guilfoyle (1987) *Plant Mol. Biol.* **9**, 611-623.
- 8) McClure, B.A., G. Hagen, C.S. Brown, M.A. Gee & T. Guilfoyle (1989) *Plant Cell* **1**, 229-239.
- 9) Franco, A.R., M.A. Gee & T.J. Guilfoyle (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15845-15849.
- 10) Reddy, A.S.N. & B.W. Poovaiah (1990) *Plant Mol. Biol.* **14**, 127-136.
- 11) Takahashi, Y., H. Kuroda, T. Tanaka, Y. Machida, I. Takebe & T. Nagata (1989) *PNAS* **86**, 9279-9283.
- 12) Takahashi, Y., Y. Niwa, Y. Machida & T. Nagata (1990) *PNAS* **87**, 8013-8016.
- 13) An, G., M.A. Costa & S.-B. Ha (1990) *Plant Cell* **2**, 225-233.
- 14) Katagiri, F., E. Lam & N.-H. Chua (1989) *Nature* **340**, 727-730
- 15) Tabata, T., H. Takase, S. Takayama, K. Mikami, A. Nakatsuka, T. Kawata, T. Nakayama & M. Iwabuchi (1989) *Science* **245**, 965-967.
- 16) Alliotte, T., C. Tire, G. Engler, J. Peleman, A. Caplan, M. Van Montagu & D. Inze (1989) *Plant Physiol.* **89**, 743-752.
- 17) McClure, B.A. & T. Guilfoyle (1989) *Science* **243**, 91-93.

IGE シリーズ第一期分総目次

本研究センターのワーク・ショップは平成3年度から新しい方針で行なわれることになりました。この機会に、これまでの13回分のIGEシリーズを第一期分として、その総目次を掲げます。

IGE シリーズ1* 植物の系統発生と重力反応

IGE シリーズの発刊にあたって

ワークショップのねらい……………菅 洋

重力研究の史的展開……………藤伊 正

細胞性粘菌の生長に対する

人工重力の影響……………河崎 行繁

ヒゲカビにおける重力屈性……………大瀧 保

藻類、コケ、シダ類の重力反応……………片岡 博尚

高等植物の重力反応

根の重力反応……………鈴木 隆

高等植物の重力反応

電気生理の立場……………石川 秀夫

高等植物の重力反応

突然変異種の利用……………高橋 秀幸

高等植物の重力反応

細胞壁研究の立場……………神坂盛一郎・保尊 隆享

ワークショップのまとめに代えて……………菅 洋

IGE シリーズ2* 微生物と光

ワークショップ「微生物と光」

開催の目的と意義	大瀧	保
バクテリアと光		
光合成細菌による水素生産	伊藤	一敏
真性粘菌と光	上田	哲男
細胞性粘菌と光	前田	靖男
接合菌類と光	大瀧	保
子のう菌, 不完全菌類と光	熊谷	忠
担子菌類と光	鎌田	堯
藻類と光 (I)		
光走性を中心として—単細胞鞭毛藻類の		
光運動反応の作用スペクトルと光受容部位—	渡辺	正勝
藻類と光 (II)		
光屈性を中心にして	片岡	博尚
高等植物と光からのコメント	菅井	道三
ワークショップ「微生物と光」のおわりに	大瀧	保

IGE シリーズ 3* 水田湛水生態系の新研究 (1)**
遺伝情報, エントロピー則から見る

はじめに		
水田研究への新しい試み	服部	勉
土壌生成・土壌生化学から		
みた水田	木村	真人
水田生物群集の種の		
多様性と安定性	川端善一郎	
エントロピーの立場からみた		
水田・湛水生態系	勝木	渥

新しい試みへの期待

まとめに代えて服部 勉

IGE シリーズ 4 トランスジェニック植物および
オルガネラの遺伝子発現**

- ワークショップのねらい亀谷 寿昭
トランスジェニック植物
の作出法について内宮 博文
ミトコンドリアの構造と機能 (I)山谷 知行
ミトコンドリア構造と機能 (II)
蛋白質の膜透過の分子機構竹田 真敏
イネオルガネラ DNA の構造平井 篤志

IGE シリーズ 5* エチレンの生態的役割

- ワークショップのねらい菅 洋
Regulation of biosynthesis and action
of ethyleneShang Fa Yang
ACC 合成酵素の不活性反応佐藤 茂
生態系におけるエチレンの動態について
澤田 信一
種子発芽とエチレン江刺 洋司
水生植物の生長とエチレン菅 洋
植物の重力反応とエチレン高橋 秀幸
接触刺激とエチレン太田 保夫
傷害とエチレン兵藤 宏
病害抵抗誘導とエチレン関沢 泰治

IGE シリーズ 6** 植物の光反応機構の解析と変異株

ワークショップ「植物の光反応 機構の解析と変異株」の目的……………	大瀧	保
ヒゲカビの光反応変異株の 単離とその解析……………	大瀧	保
藻類光反応変異体 分離の現状と夢……………	片岡	博尚
シダ配偶体の光形態形成の研究に おける突然変異体の利用……………	菅井	道三
突然変異体を用いたレタス種子 発芽機構の解析（計画案）……………	井上	康則
シロイヌナズナにおける光形態形成 突然変異体の単離の試み —— 長胚軸 (<i>ky</i>) 突然変異を中心として ——		後藤 伸治
生物物理学的立場からのコメント フィトクロムとクラミドモナス……………	徳富	哲
ワークショップの終わりに……………	大瀧	保

IGE シリーズ 7*** 土壌微生物アセスメントの背景 (1)

—— 検出・定量の諸問題 ——

はじめに……………	服部	勉
1. 自然界における破傷風菌の分布 —— とくに定量的分析の試み ——		海老沢 功

2. 土壤中のボツリヌス菌 ……………阪口 玄二
3. 土壤中の軟腐病菌 ……………菊本 敏雄
4. 土壤中の軟腐病菌のファージ特異性
富樫 二郎
5. 土壤中のセルロース分解菌の分布
山本 広基
6. 平板法による土壤中の細菌の検出・定量
服部 勉
7. 微生物アセスメントをめざして
—— まとめて代えて —— ……服部 勉

IGE シリーズ 8* イネの遺伝子発現と系統分化

- はじめに ……………亀谷 寿昭
- イネ培養細胞におけるアイソザイム
遺伝子の発現 ……………石川 隆二
- イネ植物再体分化にともなう遺伝子発現の変動
阿部 利徳, 笹原 健夫
- イネ細胞質ゲノムの遺伝子発現
平井 篤志, 菅野 明
- イネ生態型分化と環境適応に関わる発現形質
佐藤 雅志, 上埜 喜八
- イネの粒大および粒形に係わる主動遺伝子
高牟禮逸朗, 木下 俊郎
- Multi-locus association としてのイネの進化
佐藤洋一郎

IGE シリーズ 9*** 生態研究と環境制御

- ワークショップのねらい……………菅 洋
発芽生態学の二つの目標と実験における環境
制御 ……………鷺谷いづみ
作物の根系研究における実験的方法
……………鯨 幸夫
制御環境下における植物の表現型可塑性の解析
石栗 義雄, 工藤 洋, 河野 昭一
生態研究・環境制御・成長モデル……………広瀬 忠樹
植物の形質発現機構と進化……………河野 昭一

IGE シリーズ 10** 植物・微生物の光反応

—— 変異株などを用いた新しい解析法の開発 ——

- 発刊に際して ……………大瀧 保
原生動物の光受容と応答 ……………中岡 保夫
ヒゲカビの光反応に関する遺伝子単離への
アプローチ ……………宮崎 厚
アカパンカビの青色光反応, 生物時計の場合
……………中島 秀明
シロイヌナズナの光, 重力および接触屈性異常突然
変異体の分離と解析 ……………岡田 清孝
シロイヌナズナを用いた光反応機構変
異体利用の可能性 ……………米田 好文
オーキシン作用の分子生物学的研究……………山本興太郎

IGE シリーズ 11*** 水田濁水生態系の研究 (2)
化学生態学と元素の周期律

はじめに	服部 勉
水田土壌の化学組成と元素の周期率.....	浅見 輝男
イネの元素組成から何がわかるか.....	高橋 英一
水田元素の移動分布における水の役割	
— 水と K^+ 及び Na^+ の相互作用の	
相違を中心として —	木村 優
水田の土壌を分析する	一國 雅巳
地球誕生から水田まで	野津 憲治
水田化学生態学建設への道程	
— まとめにかえて —	服部 勉

IGE シリーズ 12* 植物病原体の分子生態学

はじめに	菊本 敏雄
1. ウイロイドの分子疫学	高橋 壯
2. 植物ウイルスの分子生態学	江原 淑夫
3. 遺伝子操作細菌の行動	豊田 秀吉
4. プラスミドの生態	佐藤 守
5. DNA からみた <i>Alternaria</i> の生態	
	柘植 尚志・足立 嘉彦
6. プラスミドからみた <i>Rhizoctonia</i> の生態	
	羽柴 輝良
ワークショップのおわりに	菊本 敏雄

IGE シリーズ 13* 土壤環境——保全と機能の増進——

はじめに	佐藤 匡
土壤及び水系の硫酸及び硫黄の挙動と微生物	
	若尾 紀夫
土壤中の非標的微生物に対する農業の影響	
一.その研究動向をめぐって—	佐藤 匡
菌類と土壤動物の相互関係	斎藤 紀
土壤および根圏における蛍光性シュードモナス	
について	加藤 邦彦
土壤中におけるダイズ根粒菌の遺伝的	
多様性と生態	南沢 究
水田及び畑の土壤酵素とその分布.....	金沢晋二郎
土壤中における有機物の変化と土壤条件	
	菅家文左衛門
作物根圏のバイオマス窒素循環.....	丸本 卓哉
むすび	佐藤 匡

IGEシリーズ 10

植物・微生物の光反応

— 変異株などを用いた新しい解析法の開発 —

発行 1991年3月
発行者 東北大学遺伝生態研究センター
〒980 仙台市青葉区片平2-1-1
☎022-227-6200(代)
印刷所 笹氣出版印刷株式会社