

## 東北大学遺伝生態研究センター年報 2001

著者	東北大学遺伝生態研究センター
発行年	2001-03
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/49128">http://hdl.handle.net/10097/49128</a>

## はじめに

平成 12 年度は第 2 次の「遺伝生態研究センター」が発足して 3 年目にあたります。10 年時限の約 1 / 3 の期間が過ぎたことになり、研究や教育活動も軌道に乗り、その成果も確実なものとなってきました。さて、本研究センターは設立から 13 年が経過し、その間全国共同利用施設および中核的研究拠点 (COE) として全国の研究者や学生と共に、共同研究やワークショップを通して「遺伝生態研究」の発展に寄与して参りましたが、この平成 12 年度限りで本研究センターは廃止され、平成 13 年度からは東北大学に新たに設立されます大学院生命科学研究科に移行することになりました。すなわち、本研究センターと大学院理学研究科生物学専攻の全て、それに大学院農学研究科、大学院理学研究科化学専攻、大学院医学研究科、加齢医学研究所の各一部、その他理学部附属臨海実験所や植物園、八甲田植物実験所、反応化学研究所、東北アジア研究センターなどの協力を得て、総勢 65 名にも及ぶ教官 (助手を含む) から成る一大組織を作ろうとするものであります。この生命科学研究科は東北大学の将来の生命科学を担うものとして、平成 7 年頃から本格的にその設置が検討され、この度ようやくその実現を見ることになりました。

このように、本研究センターは長い歴史に幕を閉じることになりますがこの平成 12 年度はその最後を締めくくる年度として、種々の面で極めて多忙で重要な年となりました。先ず本研究センターが高橋秀幸教授を中心として 3 年間にわたって行ってきました重点共同研究「遺伝的多様性を獲得するための配偶子形成における生物分子機構」、および今年度開始された津田雅孝教授を中心とする「遺伝情報のダイナミズム」はこの平成 13 年 3 月で終了することになりました。特に後者の研究においては 1 年という極めて短い期間の研究となり、研究組織の先生方に多大なご迷惑をおかけしてしまいました。しかしながら、他の一般共同研究と同様それなりの立派な成果を挙げられたことは評価に値するものであります。

平成 12 年度はまた、熊谷忠教授の主催する COE 国際シンポジウム「Plants and ultraviolet-B」が開催され、国内外のこの方面の第一人者が多数集まり、大盛会の内に実りある成果をあげることが出来ました。また、大瀧保教授の主催する本研究センターのシンポジウム「植物および微生物の光形態形成の周辺」も開催され、関連する国内の研究者が集まって、光形態形成の現状と展望について鋭意討議が行われました。

前述いたしましたように、平成 12 年度は平成 13 年度から発足いたします大学院生命科学研究科への移行に伴って、その対策や準備で激動の年となりました。それにも拘わらず、本研究センターの自己点検・評価報告書でもありますこの「年報」に記載

されておりますように、本研究センターでは今年度も例年に比較して勝るとも劣らない成果を挙げることができました。これもひとえに国内外の研究者の皆様の御協力の賜であります。本研究センターが大学院生命科学研究科に移行することによって、これまで本研究センターが多大な恩恵を享受してきた全国共同利用施設およびCOE機関としての機能は失われ、私どもが国内外の研究者と共に進めて参りました「遺伝生態研究」の遂行には大変な痛手となることも事実であります。将来への脱皮と益々の発展を夢見て大学院生命科学研究科に参画することにいたしました。今後は若い研究者の育成に重点を置きながらも本研究センターの設立当時の精神と意気込みを忘れずに、教職員一同また頑張る参りたいと思っております。

最後になりましたが、本研究センターが閉鎖されるに際し、これまで長い間本研究センターの管理運営に御協力戴きました運営委員会の先生方、また共同研究やワークショップなど共同利用研究に御協力いただきました運営協議会および共同研究者の先生方、そしてCOE研究を実現可能にして戴きましたCOE外国人研究員、ポスト・ドクトラル研究員(PD-F)、技術補佐員の皆様に心から御礼申し上げます。さらに、長い間本研究センターの共同利用研究に関する業務を献身的に担当されました共同利用掛の職員の皆様にも心より御礼申し上げます。平成13年度からは新しい組織で、また新たな意気込みと目標を持って本研究センターの教職員や学生は再スタートいたします。関係各位の皆様にはこれまでの御厚情に心から御礼申し上げますと共に、今後ともさらなる御支援と御鞭撻を賜りますよう心からお願い申し上げます。

平成13年3月

遺伝生態研究センター長  
大 瀧 保

# 目 次

はじめに .....	1
第1章 遺伝生態研究センターの概要	
1 沿革, 設置目的, 運営 .....	7
2 組織 .....	8
3 職員 .....	9
第2章 研究活動	
1 各研究分野の研究活動 .....	13
2 研究業績等 .....	25
3 COEの形成に係る中核的研究機関支援プログラム .....	61
4 COE国際シンポジウム .....	63
第3章 共同研究等	
1 平成12年度ワークショップ報告 .....	71
2 平成12年度重点共同研究報告 .....	73
3 平成12年度一般共同研究報告 .....	82
4 平成12年度外国人(訪問者等)特別講義 .....	115
第4章 教育活動	
大学院教育(大学院学生一覧) .....	119
第5章 刊行物	
刊行物一覧(昭和63年度～平成12年度) .....	123
◎IGEシリーズ目次(No.29) .....	124
◎ISKシリーズ目次(No.13) .....	125
◎センター通信目次(NS No.7～9) .....	126



# 第1章 遺伝生態研究センターの概要



## 1 沿革, 設置目的, 運営

### (1) 沿革

昭和14年8月 1日 昭和14年8月1日勅令第521号(官制)により農学研究所設置

昭和24年5月31日 国立大学設置法により東北大学附置研究所となる

昭和63年4月 8日 国立大学設置法施行規則の一部改正により, 遺伝生態研究センターに転換  
「生態生理研究部門」, 「適応生態研究部門」, 「遺伝子生態研究部門」, 「環境  
情報研究部門」及び「生態システム(客員)研究部門」の計5研究部門  
で発足

平成4年4月 1日 新たに「臨界生態遺伝研究部門」が設置

平成10年4月 9日 国立大学設置法施行規則の一部改正により, 遺伝生態研究センターに改組  
「遺伝子多様性研究部門」及び「環境変動遺伝生態研究部門」の2大研究  
部門の中に, それぞれ3研究分野を配置し, 6研究分野体制で発足

### (2) 設置目的

遺伝生態研究センターは, 「生態系における生物種の遺伝的基礎に関する研究を行うと同時に, 国立大学の教員その他の者で, この分野の研究に従事するものの利用に供する」研究機関として設置され, 種々の要因が作用し合う複合環境の変動に対して, 植物や微生物がどのように反応し, 適応していくかなどの問題を, それぞれの生物の持つ遺伝子の多様性の面から解析することを目的とする。

### (3) 運営

#### ① 組織・運営体制

本センターには, その組織, 人事, 予算その他運営に関する重要事項を審議する「運営委員会」及び, その共同利用に関する重要事項についてセンター長の諮問に応じる「運営協議会」が設置されている。

運営委員会は, 本センター教授6名, 助教授6名及び学内他部局の教授3名により構成され, 運営協議会は, 本センター教授6名, 学内他部局の教授3名及び他大学の教授4名により構成されている。この運営協議会の下には, 内規に基づき, 本センターの共同研究計画等に関する専門の事項を審議するための「共同利用・共同研究専門委員会」, 「採択専門委員会」及び「研究評価専門委員会」が設置されている。

また, 運営委員会審議事項の検討及び議題整理のため, 本センター教授・助教授により構成する「教授会議」が置かれている。

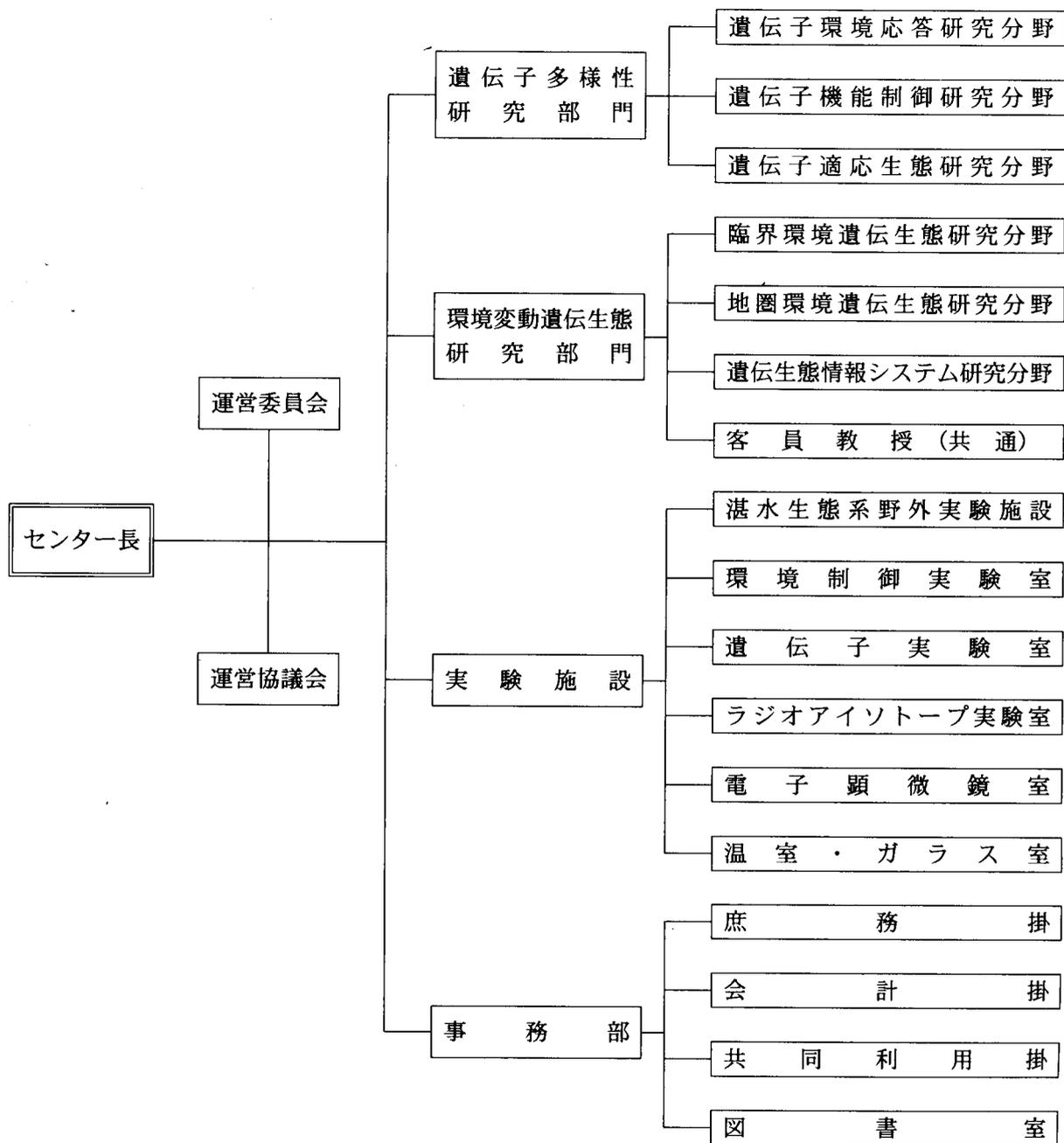
研究部門・研究分野, 実験施設, 事務部の構成は, 次頁の組織図のとおり。

#### ② 研究支援体制

本センター内には, 研究活動を支援するため, 施設整備委員会, 図書委員会, 共通施設運営委員会など各種委員会が設けられている。

また, 電子顕微鏡操作, ラジオアイソトープ管理, 実験植物管理, 大型機器管理など特殊技能を有する技官等による支援によって, 研究活動は円滑に行われている。

## 2 組 織



3 職 員

(平成13年2月1日現在)

センター長 (併) 教 授 大 瀧 保		
<b>【研究部門・研究分野】</b>		<b>【事務部】</b>
<p><b>■遺伝子多様性研究部門</b></p> <p>●<b>遺伝子環境応答研究分野</b>            教 授 大 瀧 保            助 授 片 岡 博 尚            助 手 宮 嵯 厚            技 官 金 野 弘 記            技 術 補 佐 員 千 葉 あ け 美            事 務 補 佐 員 鈴 木 美 奈            事 務 補 佐 員 高 野 久 栄</p> <p>●<b>遺伝子機能制御研究分野</b>            教 授 亀 谷 壽 昭            助 授 塩 月 (菅野) 明            助 手 庄 司 舜 一            中核の研究機関研究員            落 合 利 紀            技 官 東 海 林 英 夫</p> <p>●<b>遺伝子適応生態研究分野</b>            教 授 高 橋 秀 幸            助 授 東 谷 篤 志            助 手 藤 井 伸 治            教務職員 西 澤 武 明            中核の研究機関研究員            陳 磊</p>	<p><b>■環境変動遺伝生態研究部門</b></p> <p>●<b>臨界環境遺伝生態研究分野</b>            教 授 熊 谷 忠            助 授 佐 藤 雅 志            助 手 日 出 間 純            中核の研究機関外国人研究員            孫 伝 清            技 術 補 佐 員 山 口 弘 子</p> <p>●<b>地圏環境遺伝生態研究分野</b>            教 授 南 澤 究            助 授 三 井 久 幸            助 手 佐 藤 孜            中核の研究機関研究員            斉 藤 明 広            生物系特定産業技術研究推進機構派遣研究員            宮 木 太 郎            葉 濱            技 術 補 佐 員 西 岡 き よ            技 術 補 佐 員 東 海 林 比 呂 子            技 術 補 佐 員 鈴 木 理            技 術 補 佐 員 青 砥 千 佳            技 術 補 佐 員 三 浦 亜 希 子</p> <p>●<b>遺伝生態情報システム研究分野</b>            教 授 津 田 雅 孝            助 授 永 田 裕 二            助 手 石 栗 義 雄</p> <p><b>【客員教授】</b>            教授 (併) 百 町 満 朗            (岐阜大学農学部)</p>	<p>事 務 長 佐 藤 正 義</p> <p><b>【庶務掛】</b>            掛 長 福 井 秀 樹            主 任 菅 原 公 美 子            事 務 官 下 山 真 樹</p> <p><b>【会計掛】</b>            掛 長 庄 子 守 美 子            主 任 佐々木 富 弘            事 務 官 八 木</p> <p><b>【共同利用掛】</b>            掛 長 福 田 一 朗            事 務 官 井 上 香 織</p> <p><b>【図書室】</b>            事 務 官 菅 原 育 子</p> <p><b>【技官室】</b>            技 官 相 澤 光 秋            技 官 熊 谷 儀 一</p>
<b>【実験施設】</b>		
<p>◆<b>湛水生態系野外実験施設</b>            主任・助教授 (併)            佐 藤 雅 志            技 官 一 條 邦 夫</p> <p>◆<b>環境制御実験室</b>            主任・助教授 (併)            佐 藤 雅 志            教務職員 武 蔵 昭 一</p>	<p>◆<b>遺伝子実験室</b>            主任・教授 (併)            津 田 雅 孝</p> <p>◆<b>ラジオアイソトープ実験室</b>            主任・助手 (併)            佐 藤 孜</p>	<p>◆<b>電子顕微鏡室</b>            主任・教授 (併)            大 瀧 保</p> <p>◆<b>温室・ガラス室</b>            主任・教授 (併)            亀 谷 壽 昭</p>



## 第2章 研 究 活 動



## 1 各研究分野の研究活動

### ■ 遺伝子多様性研究部門

当研究部門では、光、重力、温度そして水分など環境要因の変化、およびこれらの要因の作用し合う複合環境の変動に対して、生物の形態形成や行動、そして生活や生態がどのように変化し、適応していくか、また遺伝子を改変された生物が生態系の中でどのような動態を示すかを、生物の有する遺伝子（群）の違いや変異性から解明することを目的としている。

#### 〔遺伝子環境応答研究分野〕

当研究分野においては、光、重力、温度および培養条件などの環境要因の変化、さらに、それら要因の複合的な変動に対する微生物や植物の形態形成や生殖の変化の機構を、これら生物の有する遺伝子群の多様性と発現調節に視点を置きながら、遺伝学、分子生物学および細胞生理学的な手法を用いて解析を行っている。具体的には接合菌類に属するヒゲカビ(*Phycomyces*)やミズタマカビ (*Pilobolus*)、それに黄色藻類に属するフシナシミドロ (*Vaucheria*)を使用し、これら多核体に特有な核間の相互関係、核の細胞内での位置と遺伝子発現との関係、光や重力刺激受容体と刺激受容部位の同定、刺激受容から応答反応までの間を架橋する刺激伝達機構の解明をめざして研究を行っている。平成 12 年度は以下のような成果を得た。

1) ヒゲカビの有性生殖では、(+) と (-) の菌糸がお互いに分泌する性フェロモンに応答し、一連の形態形成反応を介して接合胞子ができる。この時接合胞子には両親から多数の核が移行するわけであるが、次世代胞子の遺伝解析から、1 あるいは 2 組の 2 倍体核だけが有性生殖を担っていることが遺伝学的に証明されている。接合子の発芽までに接合胞子内でどのような変化が起こるかを細胞学的および生化学的に解析した。核の大きさは接合後 10 日目頃から減少し、DNA 量は 10 日目から 30 日目の間で急激に減少した。逆に、DNA の分解活性は接合後 10 日目から 30 日目にかけて増大した。また、接合後 10 日目から 30 日目の間に多くの小さい油滴が融合して一つの大きな油滴になったが、それは発芽直前には消失した。油滴は $\gamma$ -リノレン酸を 25-30%含む点が特徴的であったが、脂肪酸組成自体は 10 日目と 30 日目で大きな変化はなかった。

2) ヒゲカビ(*Pb*)の菌糸や胞子嚢柄の細胞壁は、主にキチンやキトサンから構成されている。光屈性、重力屈性、また接合反応などで見られる刺激応答反応は、細胞壁の偏差成長やダイナミックな形態的变化を伴う。したがって、これら環境応答反応には細胞壁の構築や分解を制御している遺伝子（群）の発現が関与していると考えられる。ヒゲカビに存在する 10 個のキチン合成酵素(*CHS*)遺伝子群の発現様式を解析した結果、クラス I の *PbCHS5* および *PbCHS6* は無性世代ではほとんど発現していなかった。クラス II の *PbCHS1* は菌糸と胞子形成期で、*PbCHS2* は菌糸のみで、*PbCHS4* は胞子嚢柄形成期およびそれ以降で発現していた。*PbCHS3* はほとんど発現が認められなかった。クラス IV の *PbCHS7* はどの時期でも構成的に発現していた。クラス V の *PbCHS8* (*PbCSMI*)も全生活環で構成的に発現していた。

が、とくに *PbCHS9*, *10* は孢子嚢柄形成期に強く発現する傾向にあった。有性生殖である接合孢子形成過程では、*PbCHS5* の発現は見られたが、無性生殖時に発現していた *PbCHS4* および *PbCHS9* の発現が認められなかった。

3) 分子生物学的アプローチに必須である形質転換系を開発するため、まず、ヒゲカビ孢子発芽体を用いてプロトプラストを大量に得る系を開発した。その結果、プロトプラスト形成にはキチナーゼのみで十分なこと、牛血清アルブミンの添加が著しく収量を増大させること、形成効率は孢子の発芽段階に大きく依存すること、等を明らかにした。今の進んだ菌糸、孢子嚢柄、孢子嚢には強い DNA 分解活性があることが判明したため、形質転換系の開発にはプロトプラストを用いる方が有利と考えられた。阻害剤実験から DNA 分解は DNase I によることが示された。

4) 微生物の形態形成を遺伝子レベルで理解するため、細胞性粘菌の子実体形成時に発現する cDNA 群をクローン化し、遺伝子破壊株作成用のプラスミドコンストラクトを作成した。それらを形質転換して形態に異常を生じさせた 2 クローンの塩基配列を決定したところ、それぞれ、superoxide dismutase, calmodulin-binding protein と相同性が高かった。

(大瀧 保, 宮寄 厚, 及川胤昭, 鄭 明淑, 高本耕三, 福井 丈, 金野弘記, 千葉あけ美)

5) 青色光による側枝誘導: 多細胞植物の形態形成は局所的な核分裂・細胞分裂によって起こる。組織を大きくするには細胞を増殖するしかないからである。細胞質分裂の起こらない多核細胞フシナシミドロ (*Vaucheria*, *Stramenopiles*) を用いて、多細胞、多核細胞を問わず、形態形成に必要なことは狭い領域に核を高密度に集めることであり、核分裂は必ずしも必要でないことを明らかにした。

多核細胞フシナシミドロの疎らに分岐した枝の先端で活発な先端成長をしている。青色光 (BL) 照射は先端成長の誘導と維持に欠かせないが、細胞基部の狭い領域を適当な強度の BL で照射すると、照射域の中央に新しい成長点が誘導される。この光細胞形態形成反応の時間経過を示すと、1) 細胞表層の葉緑体の BL 照射域への集合は照射開始直後に始まり、60 分以内で完了する。2) 原形質内層にある核や他の細胞器官の集合は 30 -40 分後から始まり、枝が発生するまで続き、照射域の核の密度は 4 時間後元の 2 倍まで増え、隣接領域のそれは 20 -30% 減少する。3) 集合した核は照射域にとどまり、新たな遺伝子発現が起こる。4) 枝原基は照射域中央に決定され (極性誘導)、既存の細胞壁が局所的に可塑性化し、内圧により生じた突起が新しい枝として先端成長を開始する (極性固定)。

Cytochalasin A, Amiprophos Methyl, Actinomycin D などの薬理効果から判断すると、1) はアクチン、2) は微小管が関与する運動と考えられる。2) は機構的にも時系列からも 1) とは異なる光反応と思われる。3) も別の光反応である可能性が高いが、証拠はまだない。葉緑体集合は先端成長のためのエネルギー補給源として必要であるが、それだけでは十分ではなく、引き続いて起こる核の集合と新規の遺伝子発現が必須であると結論できる。核の集合に関して興味深い構造—機能相関を見いだした。すなわち、全ての核は中心体近傍から 1 本の長い (50-60  $\mu\text{m}$ ) 微小管束を細胞軸に平行に伸ばしており、微小管が核を引っ張って BL 照射域へ導いていたのである。

これらの結果は以下のことを示す。i) 細胞形態形成には核が近距離に位置する必要がある。

ii) 形態形成に必要な遺伝子産物の供給は核分裂によらずとも必要数の核を近傍からかき集めることで可能となる。iii) このような核集合は多核細胞が進化させた、多細胞生物には採用できない有利な形質である。

今後、核移動の光受容体のありか、核—微小管複合体の挙動とその移動運動を駆動する細胞質モーターの実体、BL によって発現する遺伝子群を明らかにする予定である。(片岡博尚, 高橋文雄)

### 〔遺伝子機能制御分野〕

当研究分野においては、環境ストレス耐性植物の作出と遺伝子発現、雌雄異株植物の性分化機構、及び *Zoysia* 属の資源植物の生態について研究を行っている。本年度の研究課題と成果は以下の通りである。

#### (1) 遺伝子導入法の検討と遺伝子改変植物の遺伝子発現

昨年に引き続き LEA (Late Embryogenesis Abundant) 遺伝子をアグロバクテリウム法によりダイズとインゲンマメの種子に注入して得られた形質転換体の世代更新を行った。それぞれの形質転換体から、カルスを作成して NaCl を含む培地における生育量を調査して、非形質転換体と比較したところ、明らかに形質転換体は耐性を示した。さらに、後代を用いて形質転換体の耐性の遺伝的安定性について検討している。本形質転換法は組織培養による再分化系を必要としないが、高率の形質転換率を得るために、使用する種子の状態、発芽条件、アグロバクテリウム注入法、について再度検討している。

イネの開花時に突然変異剤を処理することによって得られた後代の種子から得られた 5-メチルトリプトファン耐性株 (TR1) の耐性機構を明らかにするためにトリプトファン合成に関わる酵素の遺伝子、特にアントラニル酸合成酵素遺伝子の変異領域を特定するために、塩基配列の決定を行っている。この耐性株由来の後代から、耐塩性の系統を育成することが出来た。今後、この系統の耐性機構を解明することは、他に類を見ない新しい耐塩性を育成するための有効な戦略であると考えられる。

#### (2) 雌雄異株植物の性分化機構

雌雄異株植物である食用アスパラガス (*Asparagus officinalis*) の性分化機構を明らかにするために、食用アスパラガスの花器官形態形成遺伝子の単離及び遺伝子発現に関する研究を進めた。双子葉植物で提唱されている花器官形成の ABC モデルで働く遺伝子群のうち、クラス B に属する GLOBOSA-like 遺伝子の cDNA 断片を RACE 法により 2 クローン単離した。またこの cDNA 断片をプローブに用いて、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行い、それぞれの遺伝子のコピー数が 1-2 であることを明らかにした。またノーザンハイブリダイゼーションにより、これらの遺伝子が花特異的に発現していることを明らかにした。

また、同花被花のユリ科植物の花器官形成のモデルを構築するために、ユリ (*Lilium regale*) 及びチューリップ (*Tulipa gesneriana*) より、MADS-box 遺伝子群の単離を進め、それぞれの植物から 10 個ずつ MADS-box 遺伝子の cDNA クローンを単離した。そのうち、チューリップからは開花や離層形成に関与する STMADS11-like 遺伝子が単離された。この cDNA 断片をプローブに用いて、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行い、この遺

伝子のコピー数が1-2であることを明らかにした。またこの遺伝子は alternative splicing により2種類の mRNA が合成されることを明らかにした。

さらにマップベースドクローニングにより食用アスパラガスの性決定遺伝子を単離する準備段階として、λファージベクターを用いて食用アスパラガスのゲノミックライブラリーの作製を行った。また大阪教育大学の鈴木剛博士との共同研究により食用アスパラガスの BAC ライブラリーの構築を試みている。

(亀谷壽昭、塩月(菅野)明、落合利紀、河内義景、朴珍姫、佐伯裕史、石川優一、佐藤敏昭、尹弼勇、下館寿紀、朴炳振、稗貫誉、谷なつ子)

### (3) *Zoysia* 属の資源植物の生態

わが国に自生する *Zoysia* 属植物について、特に耐塩性植物生態を明らかにする目的で植生調査を行っている。

本年度は気候帯を異にする地域の汽水域に認められる二、三の群落を調査した。ナガミノオニシバ (*Z. sinica* var. *nipponica*) 群落は低温帯南部では砂質や砂泥質の土壌からなる汽水立地に発達しているが、亜熱帯地域においては、上記群落に替って耐塩性の強いソナレシバ (*Sporobolus virgicus*) の純群落が出現する。また本群落がより海側に位置するのに対し、コオニシバ (*Z. sinica*) はより内側の砂浜に群落の形成をみる。

広域分布するオニシバ (*Z. macrostachya*) の群落において前年生の穂をもつ茎の上部節に本年生の花序の形成が観察された。しかし *Zoysia* 属種においてはこのような事例報告はなく出穂茎の寿命に関して興味あることで今後の検討に俟ちたい。(庄司舜一)

### 〔遺伝子適応生態研究分野〕

当研究分野では、生物が特定の環境条件あるいは環境ストレス下で生活するために有用な形質・遺伝的変異性およびその生理・分子機構を解明するための研究を行っている。本年度の研究成果は以下の通りである。

これまでに、スペースシャトルによる宇宙実験の結果から、ウリ科植物に特有の形態形成であるペグ形成が重力によりネガティブに制御されること、およびペグ形成誘導のためのオーキシンレベルに閾値が存在することを明らかにした。本年度は、重力によって制御されるオーキシン輸送機構とペグ形成の関係を明らかにするため、キュウリ芽ばえにオーキシン輸送阻害剤 (TIBA, NPA) を処理し、ペグ形成とオーキシン制御遺伝子 (*CS-IAA1*) の発現を解析した。その結果、TIBA 処理によって、根の重力屈性阻害、重力刺激側および反刺激側の両面へのペグ形成誘導、ペグ形成部位における *CS-IAA1* 遺伝子の発現増大が認められた。これらの結果から、重力によって誘導されるオーキシン再分布がペグ形成に必要で、そのためにオーキシン輸送キャリアが機能することが示唆された。そこで、オーキシン輸送タンパク質をコードする cDNA をキュウリから単離を試みた。その結果、influx, efflux キャリアそれぞれ、少なくとも2分子種の単離に成功した。一方、これまでオーキシン誘導性を示す *CS-IAA1* を宇宙実験などにおいてマーカー遺伝子として用い、その有用性を示したが、オーキシンによるペグ形成誘導機構を明らかにするためには、本遺伝子産物の機能解明が必要である。そこで、*CS-IAA1* の属する Aux/IAA タンパク質ファミリーが機能する際の標的タンパク質と予想されている ARF (Auxin Response Factor) タンパク質をコ

ードする cDNA (*CS-ARF1*–*CS-ARF5*) をキュウリから単離し、その塩基配列の決定と構造解析を行った。また、光がペグ形成を阻害することを明らかにし、オーキシン局在性と光の関係を検討した。

宇宙実験において観察されたキュウリ側根の伸長方向が水分屈性によって制御されたことを、疑似微小重力実験によって証明した。また、キュウリの主根における水分屈性実験系を確立し、*CS-IAA1* の発現解析を行い、水分屈性と根におけるオーキシン局在性の関係を明らかにした。さらに、アラビドプシスを用いた根の水分屈性実験系を確立した。その結果、アラビドプシスが水分勾配に敏感に反応することが明らかになった。次いで、各種突然変異体の水分屈性を解析し、水分屈性の発現にはアブシジン酸が関与することを明らかにした。また、重力屈性や光屈性が異常となった変異体の水分屈性が正常であったことから、水分屈性では重力屈性や光屈性と異なる分子機構が存在すると考えられた。

中国の黄土高原では、第一節間伸長能力に優れ、深播き耐性であるコムギ品種、紅芒麦が乾燥ストレスを回避する目的で栽培されている。ジベレリンにより発現が誘導される転写因子 *GAMyb* 遺伝子発現を解析した結果、紅芒麦がジベレリンに超感受性であることを発見した。そして、紅芒麦のジベレリンによる第一節間伸長にはカリウムイオンが不可欠であること、第一節間中のカリウムチャンネル遺伝子の発現がジベレリンによって誘導されること、ジベレリンにより第一節間の細胞のカリウムの取り込みが促進されることを明らかにした。また、ジベレリンによる第一節間伸長には細胞壁分解酵素活性の著しい増大を伴い、同時に *Endo-glucanase EI* 遺伝子の発現誘導が認められた。これらの結果から、紅芒麦の深播き条件における第一節間伸長にはジベレリンと浸透圧調整物質としてのカリウムイオンが重要な役割を担うことが示された。これらの知見は、深播き耐性の分子機構解明とストレス耐性コムギ新植物の開発に道を開くものである。

遺伝的多様性を獲得するための配偶子形成における分子機構を解明するための解析を線虫、オオムギ、及びキュウリを用いて行った。線虫の減数分裂過程の制御に関わる *Ce-atl-1* 遺伝子、*Ce-chk-2* 遺伝子に注目して解析を行い、以下の成果を得た。(1) 線虫 *Ce-atl-1* 遺伝子の機能解析によって、*CeATL1* の発現抑制個体は紫外線照射に対して感受性を示すことを明らかにした。(2) 線虫 *Ce-chk-2* 遺伝子の発現解析ならびに機能解析の結果、生殖腺での特異的な発現と、減数分裂過程へ関与が見出された。また、線虫 *CeATL1* タンパク質と相互作用する因子の検索を行なった。遺伝的多様性を獲得するための減数分裂と遺伝的組換えの分子生物学的研究として、線虫への X 線照射実験を行った。その結果、野生株では減数第一分裂期パキテン核の細胞が X 線に高耐性を示したが、線虫における *RecA* 様遺伝子、*Ce-rdh-1* の発現を抑制した個体ではその耐性が失われることを明らかにした。さらに、減数分裂異常を起こす線虫 *let-427* 変異体の原因遺伝子の探索を行い、原因遺伝子候補を 2 つ、RNAi 法により見出した。そのうちの 하나가ヒトやマウスで発見されている細胞周期を調節する *RBX-1* と高い相同性を持つことがわかった。現在、この *RBX-1* 様遺伝子について詳細な解析を行っている。

植物の生殖成長過程は種々の環境ストレスに感受性が高いことが知られている。前年度までにオオムギを用いて、人工的に高温ストレスにより不稔を誘導する系を確立し、異常となる生殖器官・細胞の形態解析を行った。本年度は、この不稔現象に関与している可能

性のある遺伝子としてカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素遺伝子に着目し、RT-PCR法による遺伝子発現解析を行い、カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素遺伝子が高温耐性に関与している可能性を示した。また、高温処理区（30°C/25°C 5日間）と対照区（20°C/15°C）のオオムギの幼穂（第5葉展開期）から抽出した mRNA を用いて、Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法による解析を行い、cDNA 由来の Tag 配列の塩基配列を決定した。その結果、非処理区と高温処理区で発現の明らかに異なる遺伝子群を見出し、発現解析を行っている。

キュウリは品種により異なる性表現を示し、各品種の性表現は主に *F* および *M* ローカスにより遺伝的に制御されている。雄性両性同株型キュウリでは、混性型キュウリや雌性型キュウリに比べてエチレン応答性が低下していることを示し、初めてエチレンシグナルが *M* ローカスの産物を介して雄蕊の発育を抑制することを示した。同時に、*F* および *M* ローカスによって制御されるキュウリの性表現の遺伝学的モデルを確立した。

（高橋秀幸，東谷篤志，藤井伸治，西澤武明，陳磊，青木秀年，山崎聖司，高浪タカ子，鎌田源司，阪田忠，水野英俊，安彦真文，高橋信行，笹川洋平）

## ■環境変動遺伝生態研究部門

### 〔臨界環境遺伝生態研究分野〕

今日、成層圏オゾン層の破壊による紫外線 UVB 量の増大や、大気 CO<sub>2</sub> 濃度の増大とそれに伴う温度上昇など、地球規模での環境の変化が地球上の生物や生態系に及ぼす影響についての懸念が非常に高まっており、その解明は世界的に緊要な課題となっている。我々は、そのような地球環境の変化のなかで農耕地生態系に生息する植物や微生物の生活はどのように変わり、その変化が土壌に生息する植物や微生物のどのような影響を及ぼすのか。ひいては、農耕地生態系はどのような変貌をとげることになるのか、に大変関心をもってしている。この課題に対処するために、われわれは想定される未来環境を人工的に作りだし、そこで植物や微生物は未来環境にどのように適応し、作物生産はどのように変化するかを解析し、さらに、未来環境に適応した有用な植物遺伝資源の探索と新しい品種の作出の基礎に役立たせる一連の遺伝生態研究を行っている。

今年度のハイライトのひとつは、国際シンポ「Plant and Ultraviolet-B Radiation: Effects of increasing ultraviolet-B radiation on ecosystem and resistance of plant to ultraviolet-B radiation」を開催したことである。シンポには、国外からの参加者は29名を含め約85名が参加した。BJORN 氏 (Lund University, Sweden) によるレビュー講演「植物と紫外線 B をめぐる諸問題」の後、1) 紫外線 B 量の変化とモニタリング：世界各地の紫外線 B 量の変動、生物を利用した紫外線 B 量の観測法の確立、森林地帯における UVB の動態、2) 紫外線 B の増大が生態に及ぼす影響：紫外線 B が作物の病気発生、森林生態に及ぼす影響、南アルゼンチンの生態に及ぼす影響、紫外線 B および大気 CO<sub>2</sub> 濃度の増大が植物に及ぼす影響、3) 生理・生化学的影響：生理機能（活性酸素の発生と消去）から見た植物の紫外線 B 感受性、フラボノイドが示す紫外線 B 防御作用、4) 紫外線 B が遺伝子発現とタンパク質合成に及

ぼす影響：光合成タンパクの合成と分解に及ぼす影響、紫外線 B による遺伝子発現の調節ならびにシグナルトランスダクション、5) 紫外線 B による DNA 損傷の誘発と光修復：植物の光回復酵素の光受容体と光回復酵素を多量に有する導入植物体の反応、DNA 光回復酵素とクリプトクロームタンパク質の構造、紫外線の増大に対して植物が示す分子生物学的、生物学的戦略をめぐって、19 の口答発表と 31 のポスター展示発表が行われました。最後に SUTHERLAND 氏 (Brookhaven National Institute, USA) による総括講演で、シンポジウムは締めくくられました。国内外の一線級の研究者が一堂に介して行われた「植物と紫外線」に関する本シンポジウムは世界初のものであり、数年後の国際会議の開催が強く要望されました。

二つめとして、当分の研究目標を挙げておく(科研費の報告書より)。研究成果はペーパーを参照されたい。環境紫外線は植物のタンパク質合成やバイオマスの増加を抑制する。この UVB の効果に対する感受性は植物種固有の草型や葉の形態に左右されるが、分子レベルでは紫外線スクリーニング効果を示す葉内 UV 吸収物質含量によって大きく左右される事が知られている。一方、我々は、UVB により直接生成する DNA 損傷の一つであるシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPDs) の光修復能力が紫外線抵抗性を決める重要な要因となる可能性を指摘してきた。本研究では、生育面で見出した紫外線抵抗性の異なるイネ品種を実験材料に用い、光修復能力を決める CPDs 光修復酵素をクローニングし、遺伝子の塩基配列やタンパク質の構造、酵素反応の特性を解析する。さらに、光修復酵素遺伝子を導入した形質転換体を作成し、それらを用いて生理的な機能面からイネの紫外線防御機構を明らかにする。

(1) 紫外線抵抗性品種および感受性品種の CPDs 光修復酵素遺伝子のクローニングと遺伝子産物の精製：アラビドプシス、大腸菌をはじめ幾つかの生物の既知の CPDs の光修復酵素遺伝子のシークエンスを参考にして、紫外線抵抗性品種ササニシキより CPDs 光修復酵素遺伝子をクローニングし、遺伝子産物を精製し、酵素反応機構を明らかにする。紫外線感受性品種農林 1 号からも CPDs 光修復酵素遺伝子をクローニングし、遺伝子産物を精製する。

(2) 各種イネ品種の UVB 抵抗性と UVB 誘導 CPDs 生成の光修復能力との関係およびその遺伝的背景の解析：UVB が分げつやバイオマス、光合成活性などの生育因子に及ぼす影響試験の結果明らかにしてきた異なる紫外線感受性を示す種々の日本型、インド型イネ品種および上記した交雑後代の CPDs 生成能およびその光修復能を解析し、UVB 抵抗性と UVB 誘導 CPDs 生成の光修復能力との関係とその遺伝的背景を明らかにする。

(3) CPDs 光修復酵素発現の光調節反応機構の解析：連続暗黒下で生育した黄化植物には本酵素活性は認められず、その発現には短時間の光照射を必要とする。この光調節が転写レベルで制御されるのかあるいはそれ以降のタンパク質合成の過程で制御されるのかを明らかにすると同時にこの光調節反応の光受容体を同定する。台北 65 号と台北 65 号と紫イネの戻し交雑により作られたアントシアニン含量の異なる準同質遺伝子イネ系統 3 種を用い、UVB による CPDs の生成能とその光修復能と紫外吸収物質の蓄積との関係を明らかにする。

(4) イネの CPDs 光回復酵素の光受容体の同定ならびに光反応機構の解析：紫外線抵抗性品種および感受性品種から単離精製した酵素標品を用いて酵素反応のキネティクス、作用スペクトルならびに温度依存性を解析することによって光受容体を同定すると同時に、紫外線感受性の差異

の原因を明らかにする。(5) イネ光修復酵素抗体の作製ならびにイネ光修復酵素の生理生化学的解析：精製した光修復酵素の標品を用い、イネ光修復酵素を作製し、それを用いて1: 生育の進行に伴う本酵素の動態および局在部位（組織、細胞、細胞内のコンパートメント）、2: 紫外線抵抗性の異なる、各種イネ品種における本酵素の発現量ならびに比活性を解析し、本酵素の生理的機能と紫外線抵抗性との関係を明らかにする。(6) イネの光修復酵素遺伝子導入形質転換体の作出：紫外線抵抗性品種ならびに感受性品種から単離した光修復酵素遺伝子をパーテイクルガンあるいはアグロバクテリウムの系を用いてそれぞれ紫外線感受性品種ならびに抵抗性品種に導入し、形質転換体の紫外線抵抗性を検定し、イネの紫外線防御機構を明らかにする。

### 〔地圏環境遺伝生態研究分野〕

当研究部門では、根粒菌やエンドファイトといったような植物と相互作用する窒素固定微生物を主な対象にして、生物資源の豊富な熱帯も含めた地圏生態系における植物と微生物の多様性とその分子基盤を解明し、地球環境の恒常性の理解と食糧環境問題の解決に貢献する研究を行っている。既存の各課題を進めると同時に、本年度は、根粒菌の網羅的な遺伝子発現解析を利用して、根粒菌と植物の生物間相互作用の多面性や根粒菌のストレス環境下における生存戦略の基盤研究をコンソーシアム方式の共同研究として開始した。

植物ホルモンであるエチレンは植物の生活環をコントロールしているが、マメ科植物の根粒形成を負の方向で制御している。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* が生産するエチレン生合成阻害剤リゾビトキシンは、初期感染よりは根粒形成後期過程を促進していることが明らかになった。リゾビトキシン生合成経路を遺伝子破壊および LC/MS で検討したところ、既知の *rtxA* 遺伝子以外に二重結合を導入するジヒドロリゾビトキシンドキサチューゼをコードする遺伝子 *rtxC* を見出した。マメ科モデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に異種エチレンレセプター *Cm-ERS1* またはその改変遺伝子 *H70A* を導入したエチレン感受性が低下することが期待される形質転換体を作成し、一部に根粒数が増加した系統と減少した系統が見いだされた。以上の研究をさらに進めることにより、エチレンが介在した根粒菌とマメ科植物の相互作用が一層明らかになるものと期待される。(岡崎 伸、安田 剛、貫井憲之、遊橋健一、南澤 究)

本センターに保存されている野生イネから分離された *Herbaspirillum* 属窒素固定細菌をイネに接種したところ、分離源である野生イネ地上部組織に定着し、窒素固定活性を示したが、定着および窒素固定の両面で宿主特異性が認められた。共焦点レーザー顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察から、野生イネ地上部組織の細胞間隙にこれらの菌が定着していることが明かとなった。自生している野生イネおよび荒廃地に自生しているパイオニア植物から窒素固定菌は高頻度で検出されるにもかかわらず、当初単離が困難であった。しかし、それは偏性嫌気窒素固定菌と好気性（または通性嫌気性）細菌が共同して窒素固定能を発現する「窒素固定嫌気コンソーシアム」のためであることが明らかとなった。

(Adel Elbeltagy、伊沢 剛、鈴木 永、宮木太郎、葉 濱、西岡キヨ、東海林比呂子、鈴木 理、南澤 究)

アルファルファ根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* を研究材料に、根粒菌による宿主植物の細胞

内共生成立の分子機構解明に向け、共生窒素固定に必須なシグマ因子遺伝子として当方で同定した *rpoH1*、*rpoH2* の機能解析を進めた。各遺伝子の変異株の解析により、シグマ因子 *RpoH* がメジャーなヒートショックタンパク質 (Hsp) である GroEL、DnaK 等の熱ショック誘導に関与していることを示した。*groE* は *S. meliloti* ゲノム上で5つの多重遺伝子として存在することを考慮しつつ、各種ヒートショック遺伝子の転写と RpoH との関連を試験している。更に、細胞分裂制御機構と共生成立との関連を調べるため、新規制御遺伝子の解析を開始した。(三井久幸、佐藤俊文、斉藤明広、伊東尚文、南澤 究)

近年の微生物のゲノム科学の進歩は著しいが、複雑な自然界の微生物生態現象や生物間相互作用の解明に生かされて、その真価を發揮し裾野が広がっていく。根粒菌はマメ科植物に共生し窒素固定を行う *alpha-Proteobacteria* に属するグラム陰性の土壌細菌であり、ゲノム科学のアプローチと微生物生態学を結び付けて研究展開するための格好の材料である。昨年度、かずさ DNA 研究所からミヤコグサ根粒菌(*Mesorhizobium loti*) の全ゲノム配列が、その他、*S. meliloti*、*B. japonicum* などの全ゲノム配列の公表が予想される。そこで、単生培養、飢餓状態、共生状態などの *M. loti* の網羅的な遺伝子発現解析を行うために、全ゲノムをカバーするマクロアレーをミヤコグサコンソーシアム根粒菌分科会を中心とした共同体で作成した。多コピーの挿入配列(IS)を保有し、生育の極めて遅い *Bradyrhizobium japonicum* HRS 株は、通常の non-HRS 株と比較して、ストレス環境に暴露された後のコロニー形成速度が逆に早くなる場合のあることが分かり、特定の圃場生態系で HRS 株が優占する機構の一部ではないかと考えられた。(板倉 学、鮫島玲子、三井久幸、南澤 究)

### 〔遺伝生態情報システム研究分野〕

当研究分野では、環境要因及び複合環境の変動に伴う生態系変化の研究を、生態系を構成する生物種の遺伝子群の再編成や水平伝達、機能発現の観点からと異なった環境に適応した植物や微生物の集団分化に関する遺伝生態的観点から行っている。本年度は以下のような成果を得た。

セパシア菌(*Burkholderia cepacia*) ATCC17616 株のゲノムは3本の環状染色体から構成される。本ゲノム構造を解明するために、mini-Tn5 挿入突然変異体を約 5,000 ほど取得した。これらの中から各種の栄養要求性変異体を選抜し、染色体上での mini-Tn5 挿入部位をパルスフィールドゲル電気泳動で調べた。数種のトリプトファン(*trp*)要求性変異のうち、3種の変異は3.4 Mb 染色体の5 kb 断片内に存在していたが、2.5 Mb 染色体上の変異も見い出され、*trp* 合成遺伝子群は2種以上の染色体に分布していることが示唆された。一方、他のアミノ酸合成遺伝子群の多くは、3.4 Mb 染色体上に散在していた。また、本菌の基本的生命維持・活動に関与する遺伝子群や各種の挿入配列(IS)を PCR 法により 20 種類ほど取得するとともに、ゲノム再編成に大きく寄与すると想定される IS を幾種か同定した。各遺伝子をプローブとしたゲノミックサザン解析により、*dnaA* および 16S rDNA の染色体上の配置を決定したが、さらに別の各種遺伝子のゲノム上での位置の決定を実施している。(井村喜之、永田裕二、源河浩之、小松春伸、大堀陽、津田雅孝)

mini-Tn5 挿入による *B. cepacia* ATCC17616 株の鉄獲得能異常変異体を多数獲得した。これらの中でシデロフォア産生能増大変異体では、mini-Tn5 が鉄レギュロンの統括的リプレ

ッサー遺伝子 *fur* に挿入されていた。本菌ゲノム遺伝子の knockout 系を構築し、Fur 機能は本菌の生存に必須ではないことを現在確認している。また、レポーター遺伝子としてプロモーターを欠く *gfp* 遺伝子を付与した mini-Tn5 を構築し、鉄濃度の変動により転写制御を受ける挿入変異体の選抜を試み、現在までに、鉄添加時または欠乏時で GFP 蛍光発生量の異なる変異を 6 株ほど得た。(小松春伸, 大堀陽, 井村喜之, 津田雅孝)

プラスミド pWW0 上のトルエン分解遺伝子群を担う Tn3 型トランスポゾン Tn4651 の転移反応の後半過程で、同一分子上の 2 コピーの *res* 間での部位特異的解離には、*res* に隣接する *tnpS* と *tnpT* の両遺伝子産物を必要とする。1 コピーずつの *res* を保持する 2 種のプラスミドを用いた実験から、TnpS は 2 つの *res* 間で部位特異的組込み反応をも触媒することを見出し、TnpS と TnpT は  $\lambda$  フェージの Int と Xis に機能的類似性を持つ蛋白質であると推定した。一方、土壌ならびに海洋由来の 63 ほどの細菌株での Tn4651 転移関連 DNA 領域の検出を行い、*Burkholderia* 属や *Sphingomonas* 属などの多くの菌株が Tn4651 の転移酵素遺伝子や *tnpS-res-tnpT* を保持することが示唆された。(源河浩之, 大石健朗, 津田雅孝)

重要な環境汚染物質である  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH) 分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 由来の  $\gamma$ -HCH dehydrochlorinase (LinA) は、他に報告例のないタイプの脱塩化水素酵素である。コンピューター解析により、LinA が、一次配列上は保存されていないが立体構造が類似しているファミリーの一員であることが明らかになった。ホモロジーモデリングにより予測した LinA の立体構造モデルに基づき、部位指定変異導入実験を行ったところ、モデルの正当性が確認されると共に、LinA の活性には Asp25 と His73 のペアによるプロトンの引き抜きが必須であることが明らかになった。また、LinA による反応産物の詳細な解析により、LinA は基質の塩素と水素の trans and diaxial (TD) pair を立体特異的に認識し、脱塩化水素反応を行っていることが確認された。(永田裕二, 津田雅孝)

UT26 由来の  $\gamma$ -HCH 分解代謝に関与する 1,4-TCDN halidohydrolase (LinB) は、 $\alpha/\beta$ -hydrolase fold enzymes に属するハロアルカン脱ハロゲン酵素の一員である。ハロアルカン脱ハロゲン酵素は、酵素の構造・機能相関の研究に適した材料であると考えられ、我々は LinB についての蛋白質工学的研究を行っている。本年度は LinB の立体構造の解明に成功し、LinB が他のハロアルカン脱ハロゲン酵素と比較して、特徴的な活性中心ポケット、及び酵素の表層からそこへ至る通路の構造をしていることが明らかになった。さらに、これらの情報に基づいた基質特異性の改変・新規能力の付与を目的とし、LinB の部位指定変異導入実験を進めた。(永田裕二, 津田雅孝)

ポリ塩化ビフェニル(PCB)分解菌である *Pseudomonas* sp. KKS102 由来の PCB/biphenyl 分解(*bph*)遺伝子群の発現制御系の解析を行った。その結果、*bph* 遺伝子群の発現誘導基質はビフェニルではなく、代謝中間産物のメタ開裂物質であることが明らかになった。さらに、*bph* オペロンの上流部に存在する GntR タイプの制御因子をコードしている遺伝子産物が負の制御因子として *bph* オペロンの発現誘導に関与していることが示された。また、制御系の改変による高効率分解菌の育種を目的として、KKS102 の *bph* オペロンのプロモーター配列を改変し、*bph* 遺伝子群を構成的に発現する組換え体の作製を行った。その結果、野生株に比べて顕著に PCB 分解活性が上昇した株の育種に成功した。(永田裕二, 津田雅孝)

タネツケバナおよびミチタネツケバナは低温要求性の長日植物であるが、エイジ依存の

性質をもつ量的長日植物である。この性格は花芽分化や分枝形成節位など可塑的形質を適応的に調節して独自の集団分化が可能である。この適応過程をタネツケバナの集団解析でこれまで明らかにしてきたが、現在、日本各地に定着の過程にあるミチタネツケバナとの比較を解析している。本種の特長は抽苔期に基部に多数のロゼットを残し、この資源を利用してタネツケバナより 2-3 倍の長さを持つ分枝を形成することにある。この特性は乾燥地および非競合的な環境での集団形成に有利である。オオバタネツケバナとタチタネツケバナはともに短日条件下で花芽分化しない。この結果、両種は越年して翌春一斉に開花する生活環であり、種の集団分化を限定的にする有力な要素である。野外では両種共に、渓谷の河川敷に集団を形成しているが、オオバタネツケバナよりも多数の節形成を行い、2 倍の草丈となるタチタネツケバナはより競合的な環境に集団を形成する。オオバタネツケバナはオープンな環境に集団を形成し、種の住み分けが見られる。このような種の発育生理的な特長を実験的に明らかにして種の生態的な特長を理解することが本研究のねらいである。

(石栗義雄)

ハクサンハタザオ (*Arabidopsis gemmifera*)の種生態的解析本種の個体群動態調査を新川(仙台市青葉区作並) 溪流沿いで開始した。フィールドにおける調査と共に個体を採取し、実験的に環境の変化に対応して発現形質の発育生理的な解析をしている。さらに、シロイヌナズナのプローブを活用して遺伝生態的な解析を試みつつある。(石栗義雄)

#### 〔客員研究分野〕

本研究分野では、植物の根に深くかかわっている土壤伝染性の植物病原菌類、根系生息性の生物防除要員となりうる有用菌類、および菌根菌の遺伝生態的側面を明らかにすることを当面の研究活動の目標にして、病原性変異機構、病原性制御機構、植物への全身的な病害抵抗の誘導機構、および共生機構の解析研究を展開している。主要な研究成果は以下の通りである。

**AFLP 分析による *Rhizoctonia solani* AG2-2LP と *R. solani* AG2-2IIIB のゴルフ場における個体群構造**：ゴルフ場におけるノシバ・コウライシバ葉腐病菌 *Rhizoctonia solani* AG2-2LP (LP 菌) とベントグラス葉腐病 *R. solani* AG2-2IIIB (IIIB 菌) は、菌糸融合反応と RAPD 分析によりそれぞれ特有な個体群構造を示すことがわかった。RAPD 分析より精度が高いとされる Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 分析を用いて菌株の類縁関係を調べたところ、両菌とも RAPD 分析と同様の結果が得られた。すなわち、LP 菌では、同一個体群がノシバ、コウライシバの草種に関係なく、同一ゴルフ場のみならず地理的に異なるゴルフ場でも広く分布していた。しかし、同じ暖地型芝草であるセントオーガスチンやバミューダグラスから分離された個体群は、ノシバ・コウライシバの個体群とは異なっていた。IIIB 菌では、同一個体群が同一グリーンだけでなく同一ゴルフ場の異なるグリーンにも存在したが、異なるゴルフ場には存在していなかった。また、異なる個体群が異なるゴルフ場だけでなく、同一グリーンにおいても混在していた。

**インゲン根腐病菌におけるキービトンヒドロラーゼ遺伝子破壊株の作出**：インゲン根腐病菌 *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* においては、インゲンのファイトアレキシンであるキービトン解毒する酵素、キービトンヒドロラーゼが病原性に関与していることが示唆さ

れている。f.sp. *phaseoli* におけるキービトンヒドロターゼと病原性との関係を明確にするために、キービトンヒドロターゼ遺伝子 (khs) 破壊株を作出し、khs 破壊株と元株との病原性を比較したところ、これらの中で明確な病原性の違いは認められなかった。

アズキ根腐病菌における交配と交配型遺伝子共通領域の **high mobility group box** の検出：*Fusarium solani* f.sp. *adzukicola* は rDNA-ITS 領域の塩基配列において f.sp. *phaseoli* 及び f.sp. *glycines* と 99.0%以上の非常に高いホモロジーを持つ。これらの3分化型について分化型内及び分化型間での交配を試みたところ、f.sp. *adzukicola* を雌としたときにのみ、他の f.sp. *adzukicola*、f.sp. *phaseoli* 及び f.sp. *glycines* と交配させることで赤い子嚢殻構造が形成されることがあった。ただし、形成された子嚢殻構造にはいずれも子嚢胞子は形成されなかった。*Nectria haematococca* MPVII の high mobility group (HMG)-box をプローブとしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、f.sp. *adzukicola* でのみ特異的なバンドが検出される株があった。子嚢殻構造は HMG-box を持つ f.sp. *adzukicola* と HMG-box を持たない3分化型の菌株の組み合わせで形成されることが明らかとなった。

植物生育促進菌類 *Fusarium equiseti* を処理したトマト茎内での病原菌量の増殖阻害：養液及び土耕栽培トマトにおいて *F. equiseti* を処理することにより萎凋病菌接種3ヶ月後には導管褐変程度を基準とした防除価 64 及び 52 と高い発病抑制効果が認められた。発病程度が同一の指数を示したトマトの地際部から上部 20cm までの茎内の病原菌濃度を調べたところ、養液栽培試験では全ての発病程度別について *F. equiseti* を処理した区では無処理と比較して明らかに病原菌量が少なく、土耕栽培試験では程度2以外の *F. equiseti* を処理したトマトで無処理と比較して明らかに病原菌量が少なかった。養液及び土耕栽培試験のトマト茎部磨砕液に萎凋病菌を置床したセロファン膜を浮かべ12時間後までの胞子発芽率を調査したところ、*F. equiseti* を処理したトマト磨砕液では共に12時間後まで無処理区と比較して発芽率が低く推移し、8時間までは発芽管長が短かった。

植物生育促進菌類の培養ろ液によるペルオキシダーゼ活性およびリグニン化の誘導：植物生育促進菌類 (PGPF) の培養ろ液をキュウリの根や葉に処理することで、キュウリ炭そ病に対する抵抗性が誘導される。暗所で生育させたもやしキュウリに PGPF の培養ろ液およびバイオン (100ppm) を処理し、24時間後に炭そ病菌を接種すると、18時間後には炭そ病菌の付着器周辺にリグニン集積が認められた。また付着器を形成せずに発芽管のみを伸ばしている胞子も多く観察された。そこでリグニン合成や細胞壁強化に関係が深いと考えられるペルオキシダーゼ (POX) 活性を調べたところ、PGPF の培養ろ液処理後、速やかに POX 遺伝子の転写活性増加が認められ、対照区と比較して培養ろ液処理区においては、処理後24時間までにキュウリ体内における POX 活性が増加していた。その後、POX 活性は炭そ病菌を接種することによりさらに増加した。このことから PGPF の培養ろ液により、キュウリ体内ではあらかじめ POX が活性化され、病原菌の侵入に対し速やかにリグニン集積のような防御応答反応を示していることが示唆された。

## 2 研究業績

### (1) 論文

#### ■ 遺伝子多様性研究部門

##### 〔遺伝子環境応答研究分野〕

Kataoka, H., Takahashi, F. and Ootaki, T.: Bimodal polarotropism of *Vaucheria* to polarized blue light: parallel polarotropism at high fluence rate corresponds to negative polarotropism. J. Plant Res. 113:1-10, 2000.

Species of *Vaucheria* (Xanthophyceae) exhibited cruciform polarotropism when they were grown under polarized white or blue light for several days. The coexistence of two groups of branches growing perpendicular and parallel to the electric vector (*E*-vector) resulted in cruciform polarotropic orientation. Such polarotropic bending was, however, not detected within 24 hr. As the fluence rate of polarized white or blue light increased, parallel orientation to the *E*-vector became dominant. Polarized red light produced exclusively perpendicular polarotropism. This shift in pattern was much obvious in *V. terrestris* sensu Götz than *V. sessilis* and *V. dichotoma*. Since the photoperception is restricted to the tip of the apical dome and since this region receives maximum photons when the *E*-vector is at a right angle to the cell axis, *Vaucheria* becomes oriented normal to the *E*-vector as far as the fluence rate is optimum. The direction of growth is expected to change into parallel to the *E*-vector when the fluence rate is supraoptimum. The perpendicular (normal) and parallel polarotropism of *Vaucheria*, thus, correspond to positive and negative phototropism, respectively. Orientation of photoreceptor molecules is suggested to be predominantly parallel to the surface of the apical dome.

大瀧 保, 宮崎 厚, 三原 等: ミズタマカビの話. 遺伝 54 (4), 73 – 78, 2000.

1. ミズタマカビとは
2. ミズタマカビの生活史と分化
3. ミズタマカビの孢子囊噴射
4. ミズタマカビの光屈性
5. ミズタマカビの重力および遠心力屈性
6. おわりに

大瀧 保, 宮崎 厚, 三原 等: ミズタマカビ(*Pilobolus*)における刺激応答反応. 日本菌学会報 41 (3): 137 – 149, 2000.

*Pilobolus*, characterized by formation of swollen subsporangial vesicles and projection of sporangia into the air when sporangiophores mature, is one of the most useful model organisms in considering the "signal perception-stimulus transduction-response" system in fungi. In *Pilobolus*, as in the closely related fungus *Phycomyces*, light effectively controls sporangiophore initiation and growth, sporangium development, and determination of phototropic direction. *Pilobolus* also responds to gravitative and centrifugal stimulation by bending in the negative direction. These responses, however, depend on the species of *Pilobolus* and the developmental stage of the sporangiophores. Comparative analyses of these responses among different species of *Pilobolus* and between *Pilobolus* and *Phycomyces* are effective to elucidate the mechanisms of sensory physiology of fungi.

Fukui, J., Miyazaki, A. and Ootaki, T.: Isolation and characterization of chlorate resistant mutants from nitrate-nonutilizing fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycoscience* 41 (6) :633-640, 2000.

Chlorate-resistant mutants, which were first isolated in the zygomycetous fungus *Phycomyces blakesleeanus*, were found to be resistant up to a concentration of at least 300 mM of potassium chlorate. The dose-response relationship showed that although the mutants could be divided into two groups based on chlorate resistance in the mycelial elongation assay on the solid minimal medium, this was not observed in the assay using liquid culture. Genetic analysis of heterokaryons revealed the mutant alleles to be dominant. Enzymatic activities of three nitrate reductases and chlorate reductase were deficient in both the parent strain and the mutants. Intracellular incorporation of chlorate ion varied from strain to strain; however, the variation could not explain the mechanism of chlorate resistance. One unexpected characteristic of the mutants was that the intracellular sulfate ion concentration was 3.5 to 5.5 times higher than in the parent strain. We designated this mutant genotype crw, chlorate-resistant mutant from nitrate-nonutilizing wild type.

Yamazaki, Y., Miyazaki, A., Kataoka, H. and Ootaki, T.: Effects of chemical components and nitrogen sources on zygospore development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycoscience* 42 (1) (in press), 2001.

We examined the effects of chemical components and nitrogen sources on zygospore development, using 62 different ingredients based on Sutter's synthetic medium SI, which has been widely used for studies of sexual physiology in *Phycomyces*. An increase of inorganic microelements such as ZnSO<sub>4</sub>, NaMoO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub> promoted an increase in the number of zygospores per unit area. Glutamate (Glu) contained in SI as the sole nitrogen source was indispensable for sexual development, and replacement of Glu with NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Am) strongly inhibited it, mainly because of growth inhibition. However, zygospore production was enhanced 1.8-fold by equivalent amounts of both Glu and Am as compared with Glu alone. A newly developed medium, mSI+Am, enriched with Am and the above-mentioned effective microelements doubled the number of zygospores formed per unit area (density), compared with Sutter's original SI, and increased both the density and the weight (volume) of zygospores, 1.6- and 2-fold, respectively, compared with potato-dextrose-agar medium enriched with yeast extract and casitone (PDAYC). Sexual stimulation by mSI+Am was also observed in the mating of a pair of β-carotene-deficient mutants. Methionine sulfoxime, an inhibitor of glutamine synthetase, strongly inhibited the progress of mating without significant growth inhibition.

Fukui, J., Choi, K-S., Miyazaki, A., Ootaki, T. and Oikawa, T.: Analysis of the formation of protoplasts and regeneration of cells in *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11 (1) (in press), 2001.

It is possible to prepare protoplasts of the zygomycete fungus, *Phycomyces blakesleeanus* by digesting the cell wall of spore germlings with commercially available chitinase and chitosanase. However, the cells without any cell walls immediately form large aggregates, and thus, it is difficult to isolate the individually separated protoplasts. Inherent problem with the formation of aggregates in preparing protoplasts could be solved by the use of bovine serum albumin (BSA). As a result, we were able to prepare a large number of single protoplasts quickly and easily. We took time-lapse photomicrographs of the formation of protoplasts, and found that there were certain regions of the cell wall of spore germlings that were sensitive to chitinase and chitosanase, although the cell wall of the original spores is known to be

insensitive to these enzymes. There have two kinds of cell wall on a spore germling, one where a bound wheat germ agglutinin (WGA), and the other a bound concanavalin A (ConA). Furthermore, only cells with walls which had bound WGA were able to regenerate, while those with walls with bound ConA were not able to regenerate.

Fukui, J., Choi, K-S., Miyazaki, A., Ootaki, T. and Oikawa, T. : Demonstration of stage-specific nucleolytic activity in cell-free extracts of *Phycomyces* and inhibition of this activity by EDTA and G-actin. *Mycoscience* 42 (1) (in press), 2001.

Stage-specific nucleolytic activity was identified in cell-free extracts (CFEs) of *Phycomyces*. Such activity was not detected in spore germlings or mycelia for the first 36 h after the start of cultivation. However, it was detected in mycelia more than 48 h after the start of cultivation, as well as sporangiophores and sporangia. The nucleolytic activity was completely inhibited by the addition of EDTA or G-actin to the CFE, and the various results together suggest that the activity was due to deoxyribonuclease I (DNase I).

Takahashi, F., Hishinuma, T. and Kataoka, H.: Blue light-induced branching in *Vaucheria*. Requirements of nuclear accumulation in the irradiated region. *Plant Cell Physiol.* 42 (3) (in press), 2001.

When a narrow region of the fresh water coenocytic alga, *Vaucheria terrestris* sensu Götz is irradiated with moderately intense blue light, a branch is induced from the center of the irradiated region after 4 - 5 h. Movement of organelles and microtubule bundles during the photocytomorphogenetic response were investigated. Chloroplasts in the cortical layer immediately started to accumulate in the blue light-irradiated region and their accumulation almost completely finished 30 - 40 min after the onset of light when the nuclei residing in endoplasm started to accumulate. Accumulation of nuclei synchronized with disorientation and shortening of microtubule bundles, which originally run parallel to the cell axis. Not only amiprophos-methyl, a potent microtubule-decomposing reagent, but also cytochalasin A strongly inhibited the branch induction. Amiprophos-methyl completely and cytochalasin A mostly destroyed microtubules and completely inhibited nuclear accumulation, but both drugs allowed the accumulation of chloroplasts in the cortical layer of irradiated region. These indicate that the accumulation of nuclei is indispensable for branch induction while the chloroplast accumulation is insufficient by itself for branch induction. Ineffectiveness of cytochalasin A on chloroplast movement brings conventional view of sliding movement of chloroplast on long actin cable in question. Morphological and functional relation between a nucleus and a microtubular bundle are discussed.

Sasaki, H., Kataoka, H., Murakami, A. and Kawai, H.: Inorganic ion compositions in brown algae, with special reference to sulfuric acid ion accumulations.

*Hydrobiologia* (in press), 2001.

Cellular pH estimated from cell extract pH and the ion compositions of major inorganic ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) were studied by ion chromatography in 61 species of 10 orders (Dictyotales, Desmarestiales, Ectocarpales, Chordariales, Scytosiphonales, Dictyosiphonales, Cutleriales, Sporochnales, Laminariales and Fucales) of Phaeophyceae. Three species in the order Dictyotales, *Dictyopteris* sp., *Spatoglossum solierii* (Chauv.) Kützing and *Zonaria stipitata* Tanaka et K. Nozawa, were newly found to be highly acidic (pH 0.6 and 1.4 within cells), in addition to previously reported dictyotalean species, *Dictyopteris latiuscula* (Okamura) Okamura, *D. prolifera* (Okamura)

Okamura, *D. repens* (Okamura) Boergesen and *Spatoglossum crassum* J. Tanaka. They all contained high concentration of  $\text{SO}_4^{2-}$  perhaps within the vacuoles. Furthermore, *Delamarea attenuata* (Kjellman) Rosenvinge (Dictyosiphonales) and *Talassiophyllum clathrus* (Gmel.) P. et R. (Laminariales) were shown to contain relatively high concentrations of  $\text{SO}_4^{2-}$  balanced by relatively high concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ .

片岡博尚. 2001. 光走性と光屈性. In 朝倉植物生理学講座 5. 環境応答.

寺島一郎編. (印刷中) 朝倉書店. 東京.

## 2-2 光走性と光屈性

### a. 光走性

- 1) 光走性の定義と関連する光運動反応
- 2) 光運動反応の生物界での分布
- 3) 光受容体と作用スペクトル
- 4) 光方向の受容機構
  - i) 光受容体のありか
  - ii) 光方向の認識
- 5) 信号伝達と光走性反応の発現

### b. 光屈性

- 1) 光屈性の定義と関連する反応
  - 2) 光屈性の分布と屈曲の仕組み
    - i) 偏差成長による光屈性
    - ii) 先端成長細胞の突出屈曲
    - iii) 偏光屈性
  - 3) 光受容体
  - 4) 光方向の受容
  - 5) 光強度と反応の大きさ
    - i) 子葉鞘の一次正屈曲と二次正屈曲
    - ii) フシナシミドロの正と負の光屈性
  - 6) 信号伝達と光屈性反応の発現
- 引用文献

## 〔遺伝子機能制御分野〕

Efendi, H. Kisaka, A. Kanno and T. Kameya. Transformation of soybean by infecting embryonic calli with *Agrobacterium tumefaciens* and that of soybean and kidney bean by injecting the bacteria into germinating seeds. *Plant Biotechnology* 17: 187-194 (2000)

An effort was made to generate transgenic plants from embryogenic callus soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) by using *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA101 harbouring the binary vector pIG121, which contains neomycin phosphotransferase (NPTII), hygromycin phosphotransferase (HPT) and B-glucuronidase (GUS) genes. Analysis by PCR and Southern blotting analysis of putative transgenic soybean showed that the plants carried the genes for GUS, NPTII and HPT. The germinating seeds were injected with *Agrobacterium tumefaciens*, followed by sonication and

vacuum infiltration. Analysis of the progeny plants by PCR and Southern hybridization showed that the transformed plants maintained the transferred DNA. Compared with transformation of embryogenic callus, that of germinating seeds was simple and repeatable, since it required no prior tissue culture steps and produced transgenic plants more efficiently. Transgenic plants of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) were also obtained by injection with the *Agrobacterium* into germinating seeds.

Theissen, G., A. Becker, A. Di Rosa, A. Kanno, J.T. Kim, T. Muenster, K.-U. Winter and H. Saedler. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42: 115-149 (2000)

Evolutionary developmental genetics (evodevotics) is a novel scientific endeavor which assumes that changes in developmental control genes are a major aspect of evolutionary changes in morphology. Understanding the phylogeny of developmental control genes may thus help us to understand the evolution of plant and animal form. The principles of evodevotics are exemplified by outlining the role of MADS-box genes in the evolution of plant reproductive structures. In extant eudicotyledonous flowering plants, MADS-box genes act as homeotic selector genes determining floral organ identity and as floral meristem identity genes. By reviewing current knowledge about MADS-box genes in ferns, gymnosperms and different types of angiosperms, we demonstrate that the phylogeny of MADS-box genes was strongly correlated with the origin and evolution of plant reproductive structures such as ovules and flowers. It seems likely, therefore, that changes in MADS-box gene structure, expression and function have been a major cause for innovations in reproductive development during land plant evolution, such as seed, flower and fruit formation.

#### 〔遺伝子適応生態研究分野〕

Takahashi, H., Kamada, M., Yamazaki, Y., Fujii, N., Higashitani, A., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Kamigaichi, S., Mukai, C., Shimazu, T and Fukui, K: Morphogenesis in cucumber seedlings is negatively controlled by gravity. *Planta* 210: 515-518 (2000)

Seedlings of most cucurbitaceous plants develop a peg (protuberance caused by cell outgrowth) on the transition zone between the hypocotyl and root. The peg is necessary for removing the seed coat after germination. In our spaceflight experiments on the STS-95 space shuttle, Discovery, we found that cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings grown under microgravity conditions developed two pegs symmetrically at the transition zone. Thus, cucumber seedlings potentially develop two pegs and do not require gravity for peg formation itself, but on the ground the development of one peg is suppressed in response to gravity. This may be considered as negative control of morphogenesis by gravity.

Aoki, H., S. Sato, T. Takanami, T. Ishihara, I. Katsura, H. Takahashi and A. Higashitani: Characterization of *Ce-atl-1*, an *ATM*-like gene from *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and General Genetics* 264: 119-126 (2000)

An ATM-like gene was identified in the genome of *Caenorhabditis elegans*. The putative product of the gene, termed *Ce-atl-1* (*C. elegans ATM-like 1*) consists of 2514 amino acid residues. The C-terminal sequence, which contains a PI-3 kinase-like domain, showed good homology with the products of the gene *MEC1/ESR1* from budding yeast, the *rad3+* gene of fission yeast and mammalian *ATM* (ataxia-telangiectasia and *rad3+* related) genes. The results of RNA-mediated interference indicated that the major phenotype associated with repression of *Ce-atl-1* was lethality

(approximately 50-80%) during early embryogenesis. Among the surviving progeny, males (XO animals) arose at a high frequency (2-30%). In addition, 5% of oocyte chromosomes demonstrated aneuploidy due to a defect in pre-meiotic chromosomal segregation. Gene expression analyses indicated that *Ce-atl-1* mRNA was expressed in all larval stages and that its level increased about fivefold in the adult stage. The adult expression level was decreased in the *glp-4* mutant, which is defective in germ line proliferation. *Ce-atl-1* was strongly expressed in both the mitotic and meiotic cells of adult gonads. In summary, *Ce-atl-1* appears to be important for early embryogenesis, and loss of its function results in a defect in chromosome segregation, similar to what has been observed for AT-related proteins.

Endo, M., T. Kokubun, Y. Takahata, A. Higashitani, S. Tabata and M. Watanabe: Analysis of expressed sequence tags of flower buds in *Lotus japonicus*. DNA Research 7: 213-216 (2000)

In order to study gene expression in a reproductive organ, we constructed a cDNA library of mature flower buds in *Lotus japonicus*, and characterized expressed sequence tags (ESTs) of 842 clones randomly selected. The EST sequences were clustered into 718 non-redundant groups. From BLAST and FASTA search analyses of both protein and DNA databases, 58.5% of the EST groups showed significant sequence similarities to known genes. Several genes encoding these EST clones were identified as pollen-specific genes, such as pectin methylesterase, ascorbate oxidase, and polygalacturonase, and as homologous genes involved in pollen-pistil interaction. Comparison of these EST sequences with those derived from the whole plant of *L. japonicus*, revealed that 64.8% of EST sequences from the flower buds were not found in EST sequences of the whole plant. Taken together, the EST data from flower buds generated in this study is useful in dissecting gene expression in floral organ of *L. japonicus*.

Fujii, N., M. Kamada, S. Yamasaki and H. Takahashi: Differential accumulation of *Aux/IAA* mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Molecular Biology 42: 731-40 (2000)

The plant hormone auxin transcriptionally activates *Aux/IAA* genes. We have isolated three *Aux/IAA* cDNA from cucumber, two cDNAs (*CS-IAA1* and *CS-IAA2*) containing the complete open reading frame (ORF), and one partial cDNA (*CS-IAA3*). Northern blotting analysis showed that *Aux/IAA* mRNAs were induced during the emergence of radicles from seed coats. After radicle emergence, their mRNAs accumulated in the basal part of the hypocotyl much more than in the apical part, and later in elongating region of hypocotyls. *CS-IAA1* and *CS-IAA3* mRNA significantly accumulated in response to auxin, although the increment of the former mRNA accumulation by auxin application was much greater than that of the latter. *CS-IAA2* did not show an apparent change by auxin treatment in our experiment. In horizontally germinating seedlings, the transition zone between hypocotyl and root curves due to downward gravitropic growth. On the other hand, vertically germinating seedlings of cucumber do not curve in the early stage of seedling development. The *CS-IAA1* mRNA accumulation in horizontally germinating seedlings was more than that in vertically germinating ones during radicle emergence. Furthermore, asymmetrical distribution of *CS-IAA1* mRNA was detected in the transition zone in *in situ* hybridization analysis. These results suggest that the *CS-IAA1* gene product may be involved in the gravity response during early development of seedlings.

Higashitani, A., H. Aoki, A. Mori, Y. Sasagawa, T. Takanami and H. Takahashi: *Caenorhabditis elegans* Chk2-like gene is essential for meiosis but dispensable for DNA repair. FEBS Letters 485: 35-39 (2000)

A Chk2-like gene was identified in the genome of *Caenorhabditis elegans*. The putative gene product, termed Ce-chk-2 consists of 450 amino acid residues, and shows good homology with the Chk2/Cds1 gene family. The results of RNA-mediated interference (RNAi) indicated that the F1 generation from dsRNA injected animals grew to adulthood, but approximately 95% of their eggs (F2) died during early embryogenesis. Among the few surviving progeny, males (XO animals) arose at an abnormally high frequency (30%). In addition, 12 univalents were observed in full grown oocytes of the F1, while six bivalents were normally observed in wild-type oocytes. Ce-chk-2 gene expression increased in the adult stage, and their expression level decreased in the *glp-4* mutant, which is defective in germ line proliferation. The radiation sensitivity of F1 embryos carrying Ce-chk-2 RNAi was not significantly affected.

Kamada, M., N. Fujii, S. Aizawa, S. Kamigaichi, C. Mukai, T. Shimazu and H. Takahashi: Control of gravimorphogenesis by auxin: accumulation pattern of *CS-IAA1* mRNA in cucumber seedlings grown in space and on the ground. Planta 211: 493-501 (2000)

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings grown in microgravity developed a peg on each side of the transition zone between hypocotyl and root, whereas seedlings grown in a horizontal position on the ground developed a peg on the concave side of the gravitropically bending transition zone. The morphological features of the space-grown seedlings were similar to those of seedlings grown in a vertical position on the ground with their radicles pointing down: both became two-pegged seedlings. Morphogenesis of cucumber seedlings is thus inhibited by gravity. Analysis by in-situ hybridization of an auxin-inducible gene, *CS-IAA1*, showed that its mRNA accumulated to a much greater extent on the lower side of the transition zone in the horizontally placed seedlings on the ground just prior to and during the initiation period of peg formation. On the other hand, when seedlings were grown in microgravity or in a vertical position on the ground, accumulation of *CS-IAA1* mRNA occurred all around the transition zone. Accumulation of *CS-IAA1* mRNA in horizontally grown seedlings appreciably decreased on the upper side of the transition zone and increased on the lower side upon gravistimulation, compared with the two-pegged seedlings. Application of IAA to seedlings in a horizontal position caused the development of a peg on each side of the transition zone, or a collar-like protuberance, depending on the concentration used. These results suggest that upon gravistimulation the auxin concentration on the upper side of the horizontally placed transition zone is reduced to a level below the threshold value necessary for peg formation. Space-grown seedlings of cucumber might develop two pegs symmetrically because the auxin level in the entire transition zone is maintained above the threshold. This spaceflight experiment verified for the first time that auxin does not redistribute in microgravity.

Sakata, T., H. Takahashi, I. Nishiyama and A. Higashitani: Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. Journal of Plant Research 113: 395-402 (2000)

The development of the inflorescence, microspores and anthesis were well synchronized among individuals or in the panicles of barley under controlled environmental conditions. To study the effects of high-temperature stress on the development of pollen mother cells (PMCs) and microspores, the plants were subjected to high temperature treatment at

different stages of reproductive growth. When plants were exposed to high temperature for five days at the early differentiation stage of the panicle, pollen grains became had apparently normal exine but no or little cytoplasm. At the pre-meiotic stage of PMCs, high temperature caused subsequent development of short anthers possessing no pollen grains. When plants were exposed to high temperature during meiosis of PMCs, all pollen grains possessed exine and were swollen but showed little starch accumulation. In these plants treated at high temperature, the panicles at the heading stage had a normal appearance, but their seeds were virtually sterile. These results indicated that there are at least three stages of reproductive growth hypersensitive to high temperature, which resulted in abnormal terminal phenotypes different from one another.

Takanami, T., A. Mori, H. Takahashi and A. Higashitani: Hyper-resistance of meiotic cells to radiation due to a strong expression of a single *recA*-like gene in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Research* 28: 4232-4236 (2000)

Sensitivity of meiotic cells to DNA damaging agents is little understood. We have demonstrated that the meiotic pachytene nuclei in the *Caenorhabditis elegans* gonad are hyper-resistant to X-ray irradiation, but not to UV irradiation, whereas the early embryonic cells after fertilization and the full grown oocytes are not. The *Ce-rdh-1* gene [*RAD51*, *DMC1* (*LIM15*), *homolog 1* or *Ce-rad-51*], which is essential for the meiotic recombination, is the only bacterial *recA*-like gene in the nematode genome, and is strongly expressed in the meiotic cells. Following silencing of the *Ce-rdh-1* gene by RNA interference, the meiotic cells become more sensitive to X-ray irradiation than the early embryonic cells. This is the first report that meiotic cells are hyper-resistant to DNA strand breaks due to the high level of expression of the enzyme(s) involved in meiotic homologous recombination.

Yamasaki, S., N. Fujii, and H. Takahashi: The ethylene-regulated expression of *CS-ETR2* and *CS-ERS* genes in cucumber plants and their possible involvement with sex expression of flowers. *Plant and Cell Physiology* 41: 608-616 (2000)

It has been reported that ethylene production by cucumber plants is strongly related to the sex expression of their flowers. It has also been shown that both *CS-ACS2* gene expression and ethylene evolution are much greater in gynoecious cucumber plants than monoecious ones. To investigate the action mechanism of ethylene in the induction of femaleness of cucumber flowers, we isolated three ethylene-receptor-related genes, *CS-ETR1*, *CS-ETR2* and *CS-ERS*, from cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. Of these three genes, *CS-ETR2* and *CS-ERS* mRNA accumulated more substantially in the shoot apices of the gynoecious cucumber than those of the monoecious one. Their expression patterns correlated with the expression of the *CS-ACS2* gene and with ethylene evolution in the shoot apices of the two types of cucumber plants. Accumulation of *CS-ETR2* and *CS-ERS* mRNA was significantly elevated by the application of Ethrel, an ethylene-releasing agent, to the shoot apices of monoecious cucumber plants. In contrast, the accumulation of their transcripts was lowered when aminoethoxyvinyl glycine (AVG), an inhibitor of ethylene biosynthesis, was applied to the shoot apices of gynoecious cucumber plants. Thus, the expression of *CS-ETR2* and *CS-ERS* is, at least in part, regulated by ethylene. The greater accumulation of *CS-ETR2* and *CS-ERS* mRNA in gynoecious cucumber plants may be due to the higher level of endogenous ethylene, which plays a role in the development of female flowers.

Kitaya, Y., Tani, A., Goto, E., Saito, T. and Takahashi, H.: Development of a plant growth unit for growing plants over a long-term life cycle under microgravity conditions. *Advances in Research* 26: 281-288 (2000)

To study the effect of the space environment on plant growth including the reproductive growth and genetic aberration for a long-term plant life cycle, we have initiated development of a new type of facility for growing plants under microgravity conditions. The facility is constructed with subsystems for controlling environmental elements. In this paper, the concept of the facility design is outlined. Subsystems controlling air temperature, humidity, CO<sub>2</sub> concentration, light and air circulation around plants and delivering recycled water and nutrients to roots are the major concerns. Plant experiments for developing the facility and future plant experiments with the completed facility are also overviewed. We intend to install this facility in the Japan Experiment Facility (JEM) boarded on the International Space Station.

Tani, A., Saito, T., Kitaya, Y., Takahashi, H. and Goto, E.: Performance of a water suction system using hydrophilic fibrous cloth under low gravity and microgravity in parabolic flight. *Environmental Control in Biology* 38: 89-97 (2000)

For suction of water from a water supply vessel including both water and air under microgravity and g-jitter conditions, a water suction system using hydrophilic fibrous cloth was developed and its performance was evaluated at 0.01-0.02 g-realized for 20 s by parabolic flight in an aircraft. Vessels used for the experiment were glass flasks and had a suction port for suction filtration. A piece of hydrophilic fibrous cloth was arranged along the inner surface of the vessels and the end was fixed to the suction port of the vessels. In vessel without hydrophilic cloths and containing 220 mL of water, the water did not move more than 5 mm along the inner surface and did not reach the suction port under low gravity. When hydrophilic cloths were used, on the other hand, water gathered onto the cloth surface, moved up along the cloth and reached the suction port under low gravity. The amount of water sucked from vessels varied with the amount of water in the vessel and the sectional area of hydrophilic cloths. When the vessels including both water and air were flown during parabolic flight ( $10^{-4}$  g), water in the vessel moved along the cloth and a water film was formed on the cloth. These results indicated that it is possible to suck water using the fibrous cloth suction system under low gravity and microgravity conditions. Under low gravity conditions, it was difficult to suck water only. However, it is not necessary to separate water from air when the system is used for supplying water to plant root medium consisting of both liquid and gas phases.

Tani, A., Kitaya, Y., Goto, E., Saito, T. and Takahashi, H.: Effects of gravity on output of humidity sensors with different detection mechanisms at constant humidity. *Journal of Agricultural Meteorology* 56: 209-215 (2000)

The effects of gravity on output of sensors with different detection mechanisms under constant humidity were investigated to screen humidity sensors for small plant growth chambers under microgravity. Different levels of gravity were established by parabolic flight using aircraft in which air pressure and temperature were maintained almost constant (the variations were within 0.6kPa and 0.2°C, respectively). Four types of polymer sensors, a thermistor sensor and an electrolytic sensor were used for the experiment. Air with relative humidities of 75% and 58% was prepared using saturated salt solutions of NaCl and NaBr, respectively. Six types of sensors were fixed either in a vessel (1 L) or

independently in small vessels (10 mL) including the solution absorbed by polymer film. When the sensors were placed in a vessel, only the output signal of the thermistor 't under both sensor varied with gravity level. It was lowest under 2 G and highest under low gravity relative humidity conditions. This variation was observed in both cases when air in the vessel was and was not stirred. This might be due to a filter protecting the sensor surface to cancel the effect of wind velocity on sensor. Air diffusion inside the filter in both cases seemed to be governed by natural convection of which the strength was affected by gravity level. The same tendency in thermistor sensor output was observed in the small vessels in which each sensor was independently fixed, indicating that an interaction between sensors placed in one vessel is negligible. Thus the change in air diffusion with gravity seemed to be the reason why the output signal of thermistor sensor changed with gravity level.

Chen, L., T. Nishizawa, A. Higashitani, H. Suge, Y. Wakui, K. Takeda and H. Takahashi: A variety of wheat tolerant to deep-seeding conditions: elongation of the first internode depends on the response to gibberellin and potassium. *Plant, Cell and Environment* (in press) (2001)

The addition of gibberellin A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) to culture media induced a dramatic elongation of first internode in Hong Mang Mai, a wheat variety tolerant to deep-seeding conditions. Length of the first internode in the GA<sub>3</sub>-treated seedlings reached approximately 45 cm, twice as long as that of the control, whereas first internodes of other varieties were 3- to 12-cm long and hardly affected by GA<sub>3</sub>. The level of endogenous gibberellins (GA) in Hong Mang Mai was not greater than that of other wheat varieties. The expression of *GAMYb*, a transcription factor, was abundant in the first internode and substantially increased by GA<sub>3</sub> application in Hong Mang Mai, compared with other wheat varieties. These results suggest that the first internode of Hong Mang Mai is more sensitive to GA in inducing strong elongation. The presence of potassium in the culture media was indispensable for the first internode elongation. Application of GA<sub>3</sub> enhanced the uptake of potassium in Hong Mang Mai. Higher sensitivity of the first internode to GA could cause strong elongation by increasing an amount of osmotic solute, which plays an important role in the tolerance mechanism of Hong Mang Mai to deep-seeding conditions.

Yamasaki, S., Fujii, N., Matsuura, S., Takahashi, H.: The *M* locus and ethylene control sex determination in andromonoecious cucumber plants. *Plant and Cell Physiology* (2001) (in press)

Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants is genetically controlled by the *F* and *M* loci. The *F* and *M* loci interact to produce three different sex phenotypes: gynoeocious (*M-F*-), monoecious (*M-ff*), and andromonoecious (*mmff*). Gynoeocious cucumber plants produce more ethylene than do monoecious plants. We found that the levels of ethylene evolution and the accumulation of *CS-ACS2* mRNA in andromonoecious cucumber plants did not differ from those in monoecious plants and were less than the levels measured in gynoeocious plants. Ethylene inhibited stamen development in gynoeocious cucumber but not in andromonoecious one. Furthermore, ethylene caused substantial increases in the accumulation of *CS-ETR2*, *CS-ERS*, and *CS-ACS2* mRNA in monoecious and gynoeocious cucumber plants, but not in andromonoecious plants. In addition, the inhibitory effect of ethylene on hypocotyl elongation in andromonoecious cucumber plants was less than that in monoecious and gynoeocious plants. These results suggest that ethylene responses in andromonoecious cucumber plants are reduced compared to those in monoecious and gynoeocious plants. This is the first evidence that ethylene signals may mediate the product of the *M* locus to inhibit stamen development in cucumber. The andromonoecious line provides novel material to study the function of the *M* locus during sex determination in flowering cucumbers.

高橋秀幸：軌道上概論 —宇宙・流れ・生命—。小田原修監修。日本マイクログラビティ応用学会編。海文堂 (2000)。286 p. ISBN4-303-73410-1。第 12 章執筆。

第 1 章 人類の宇宙展開，第 2 章 真空と宇宙：宇宙真空環境の利用，第 3 章 微小重力環境，第 4 章 軌道上研究，第 5 章 流体力学と熱・物質移動の基礎方程式，第 6 章 自然対流，第 7 章 気泡と液滴の運動，第 8 章 結晶成長，第 9 章 デンドライト成長とシミュレーション，第 10 章 熱物性測定，第 11 章 宇宙生物学，第 12 章 植物の宇宙実験，第 13 章 宇宙環境と人間

高橋秀幸：宇宙環境利用のサイエンス。井口洋夫監修。岡田益吉・朽津耕三・小林俊一編集。裳華房 (2000)。316 p. ISBN4-7853-0008-6。第 5 章 5 節執筆。

1 章 宇宙環境利用 研究序説，2 章 有人宇宙飛行と科学・技術，3 章 微小重力下の物質科学，4 章 微小重力と基礎物理学，5 章 重力と生物学，6 章 高層大気の科学，7 章 宇宙放射線，8 章 生命物質と宇宙環境利用 —タンパク質の結晶作製—，9 章 短時間の微小重力実験手段

高橋秀幸・東谷篤志：朝倉植物生理学講座第 5 巻 環境応答。寺島一郎編集。朝倉書店 (2001) (印刷中)。

植物の環境応答に関する最新の知見を盛り込み、光、水分環境、温度、化学物質、物理的刺激、病原体、傷害などに対する応答、生物リズムと環境の関係、環境応答の生理生態学などについて解説した。その中の「重力応答」を担当し、これまで得られた知見、最近の分子生物学的アプローチ、宇宙実験などから得られた成果をまとめた。

## ■環境変動遺伝生態研究部門

### 〔臨界環境遺伝生態研究分野〕

Hidema, J: Mechanisms of UVB-resistance in rice-cultivar differences in the sensitivity to UVB radiation in rice. *Gamma Field Symposia* 39: in press, 2001.

We have been studying physiological and biochemical aspects of effects of UVB radiation on growth and yield of rice plants (*Oryza sativa*), regarding the mechanisms of resistance to UVB radiation in rice. We investigated the sensitivity to UVB radiation of rice cultivars of 5 Asian rice ecotypes, and found following results: (1) rice cultivars vary widely in UVB sensitivity; (2) among Japanese rice cultivars, Sasanishiki is more resistant to UVB, while Norin 1 is less resistant, although these cultivars are closely related; (3) UV-sensitive Norin 1 cultivar is deficient in photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers (UV-induced DNA damage), and the sensitivity to UVB radiation could seriously with deficient CPD photorepair. (4) this deficiency in Norin 1 results from a functionally altered photolyase.

Many other UV-sensitive rice cultivars or other important plant species have been found in field and laboratory tests. In most cases the origin of the sensitivity is unknown, making the design of bioengineering or breeding programs difficult for improving UVB resistance. Thus, determination of the susceptibility of such plants to UV-induced CPD and their ability to photorepair CPD should allow complementation of deficiencies to increase UVB resistance to increase crop yields.

Finally, we have been investigating the effects of supplemental UVB radiation on the growth and yield of Japanese rice cultivars under the field in a cool rice-growing region of Japan (Miyagi Prefecture) since 1993. This study indicates

that supplemental UVB radiation has inhibitory effects on the growth and yield of rice. Furthermore, we found that grain size tends to be smaller with supplemental UVB radiation. This observation is commercially very important in Japan. It is assumed that the reduction in grain size might result in a change in protein content in grain, which is very important for taste. This problem also should be examined in future studies.

Hidema, J., T. Kumagai and B. M. Sutherland: UV radiation-sensitive Norin 1 rice contains defective cyclobutane pyrimidine dimer photolyase. *The Plant Cell* 12: 1569-1578, 2000.

Norin 1, a progenitor of many economically important Japanese rice strains, is highly sensitive to damaging effects of ultraviolet B radiation (290-320 nm). Although Norin 1 seedlings are deficient in photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers (Hidema et al., 1997), the molecular origin of this deficiency was not known. Since rice photolyase genes have not been cloned and sequenced, neither the structural genes nor upstream regulatory elements could be examined for mutations. Using a photoflash approach, we show that the in vivo photorepair deficiency results from a functionally altered photolyase. These results were confirmed by in vitro studies showing that the Norin 1 photolyase-dimer complex was highly thermolabile relative to that of the wild type Sasanishiki photolyase. This deficiency results from a structure/function alteration of photolyase rather than in non-specific repair, photolytic or regulatory elements. To our knowledge, this is the first determination of the molecular origin of a plant DNA repair deficiency resulting from a spontaneously-occurring mutation to UV-sensitivity.

Bennett, P.V., M. Hada, J. Hidema, A.M. Lepre, L.C. Pope, F.E. Quaitie, J.H. Sullivan, S. Takayanagi, J.C. Sutherland and B.M. Sutherland: Isolation of high molecular length DNA: alfalfa, pea, rice, sorghum, soybean and spinach. *Crop Science*, in press, 2001.

Measuring DNA damage in higher plants is important in assessing impacts of environmental conditions, e.g., increased UV from ozone depletion, and in testing relations of productivity to DNA damage and repair. Sunlight exposure of plants produces UV-induced DNA damages in measurable by treating DNA with damage-specific enzymes and dispersion of DNA molecules in denaturing media. Such DNA must be enzyme-digestible, with few single strand breaks. DNA isolation must preclude repair, providing a "snapshot" of DNA damage. We developed a method for isolating DNA from several crop plants, both monocots and dicots - alfalfa (*Sativa Medicago* L.), pea (*Pisum sativum* L.), rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max*), sorghum (*Sorghum bicolor* Moench) and spinach (*Spinacia oleraceae*). This method is simple, readily deals with multiple samples, and avoids organic solvents.

We show that pyrimidine dimers can readily be quantified in DNA prepared by this method. This method should also be useful for other experiments requiring high molecular length, enzymatically-digestible plant DNA.

Kumagai, T., J. Hidema, H-S. Kang and T. Sato: Effects of supplemental UV-B radiation on the growth and yield of two cultivars of Japanese lowland rice (*Oryza sativa* L.) under the field in a cool rice-growing region of Japan. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 83: 201-208, 2001.

An investigation was made of the variations in growth and grain yield in response to increased exposure to UV-B radiation of Japanese lowland rice (*Oryza sativa* L.) in a cool rice-growing region. Two cultivars, UV-resistant cv. 'Sasanishiki' and UV-sensitive cv. 'Norin 1', were examined in a lowland field at Kashimadai (37.28°E, 141.06°E) in Miyagi Prefecture, Japan, for four cropping seasons from 1994 to 1997. The two cultivars were grown in a lowland field

with or without supplemental UV-B radiation, which was provided by UV-B-emitting fluorescent lamps, with a 0.1-mm-thick cellulose diacetate film as a filter. In both cultivars, significant decreases in tiller number as the result of supplemental UV-B radiation were observed during the tillering stage in 1994, 1995 and 1997. Furthermore, decreases in grain size from supplemental UV-B radiation were recorded in all seasons. The trend towards small grain size was pronounced in 1996. In that year, the mean daily middle temperatures were lower throughout most of the cropping season and the mean daily hours of sunshine during the tillering stage and between the end of the panicle differentiation stage and the beginning of the ripening stage were shorter. In 1993 when the temperature and the amount of sunshine were both lower, the tiller number, the dry mass of aboveground parts and the panicle number were significantly reduced by supplemental unfiltered UV-B radiation. There was a cultivar difference in the inhibitory effects of supplemental UV-B radiation on growth between the sensitive cultivar Norin 1 and the resistant cultivar Sasanishiki.

These results indicate that supplemental UV-B radiation has a positive effect on the growth and grain development of rice, which may be enhanced by unusual climatic conditions such as lower temperature and less sunshine, in cool rice-growing regions.

Maekawa, M., T. Sato, T. Kumagai, T. and K. Noda: Differential responses to UV-B irradiation of three near isogenic lines carrying different purple leaf gene for anthocyanin accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*, 51:27-32, 2001.

We produced nearly isogenic lines (NILs) for three purple leaf genes, Pl, Plw and Pli of rice with genetic background of T-65 to characterize each allele. Three NILs brought characteristic tissue-specific anthocyanin pigmentation, respectively. Newly, T-65 Plw was found to make root purple when root is exposed under light condition. To explore the inducible characteristics of the three genes, we examined the responses of the three NILs to UV-B irradiation. Although the accumulation of anthocyanin increased in all NILs with increases in the intensity of the UV-B irradiation, we observed differential responses for the accumulation of anthocyanin in the NILs: T-65 Pli accumulated the largest amounts of anthocyanin under weak and intermediate intensity of UV-B, though this NIL reduced anthocyanin accumulation under high intensity of UV-B. T-65 Pl or Plw increased anthocyanin accumulation with increasing intensity of UV-B. Anthocyanin accumulation of the Pl NIL was higher than that of the Plw NIL under each intensity of UV-B. In addition, the total biomass of the irradiated all NILs decreased with the dose of UV-B irradiation and it was observed that increasing anthocyanin accumulation was negatively correlated with decreasing total biomass with the dose of UV-B irradiation.

Obara M. Sato T. and Yamaya T.: High content of cytosolic glutamine synthetase does not accompany a high activity of the enzyme in rice (*Oryza sativa* L.) leaves of *indica* cultivars. *Physiol. Plant.* 108: 11-18. 2000.

Reproductive stages of 5 japonica, 9 *indica*, and 2 javanica cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) were provided to compare the contents of protein for cytosolic glutamine synthetase (GS1; EC 6.3.1.2.) in the lowest position of the attached leaf blade (position 6 from the primary leaf) and those for NADH-glutamate synthase (NADH-GOGAT, RC 1.4.1.14.) in non-green portion of the expanding 10th leaf blade. Some of the *indica* cultivars, including Kasalath, contained GS1 protein twice as high as other japonica and javanica cultivars based on total leaf nitrogen. Most of the *indica* cultivars, on the other hand, contained less NADH-GOGAT protein than japonica and javanica cultivars.

Immunostaining proved that GS1 protein was located in vascular tissues of the leaf blades of Kasalath, which was identical to our previous results with a *japonica* cultivar {Sakurai et al. *Planta* 200:306-311 (1996)}. Although relative contents of GS1 protein in the leaf blade of Kasalath increased as a function of leaf age, GS1 activity remained relatively constant. In addition, Kasalath showed lower activity than other *japonica* and *javanica* cultivars, especially during leaf expansion. GS1 activity, based on GS1 protein amount, changed during the life span of the leaf blade and we thus assume that GS1 activity was modulated post-translationally in rice leaves.

Obara M., M. Kajiura, Y. Fukuta, M. Yano, M. Hayashi, T. Yamaya and T. Sato: Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* In press 2001.

Ninety-eight backcross inbred lines (BC1F6) developed between Nipponbare, a *japonica* rice, and Kasalath, an *indica* rice were employed to detect putative quantitative trait loci (QTLs) associated with the contents of cytosolic glutamine synthetase (GS1; EC 6.3.1.2) and NADH-glutamate synthase (NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14) in leaves. Immunoblotting analyses showed transgressive segregations toward lower or greater contents of these enzyme proteins in these backcross inbred lines. We detected seven chromosomal QTL regions for GS1 protein content and six for NADH-GOGAT protein content. Some of these QTLs were located in QTL regions for various biochemical and physiological traits affected by nitrogen recycling. These findings suggested that the variation in GS1 and NADH-GOGAT protein contents in this population is related to the changes in the rate of nitrogen recycling >from senescing organs to developing organs, leading to changes in these physiological traits. Furthermore, a structural gene for GS1 was mapped between two RFLP markers, C560 and C1408, on chromosome 2 and co-located in the QTL region for one-spikelet weight. A QTL region for NADH-GOGAT protein content was detected at the position mapped for the NADH-GOGAT structural gene on chromosome 1. A QTL region for soluble protein content in developing leaves was also detected in this region. Although fine mapping is required to identify individual genes in the future, QTL analysis could be a useful post-genomic tool to study the gene functions for regulation of nitrogen recycling in rice.

#### [地圏環境遺伝生態研究分野]

Yuhashi K, N. Ichikawa, H. Ezura, S. Akao, Y. Minakawa, N. Nukui, T. Yasuta, K. Minamisawa K: Rhizobitoxine production of *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation competitiveness in *Macroptilium atropurpureum*. *Appl Environ Microbiol.* 66: 2658-2663, 2000.

Application of 1-aminoocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, decreased nodulation of *Macroptilium atropurpureum* by *Bradyrhizobium elkanii*. *B. elkanii* produces rhizobitoxine, an ethylene synthesis inhibitor. Elimination of rhizobitoxine production in *B. elkanii* increased ethylene evolution and decreased nodulation and competitiveness on *M. atropurpureum*. These results suggest that rhizobitoxine enhances nodulation and competitiveness of *B. elkanii* on *M. atropurpureum*.

Ezura, H., N. Nukui, K. Yuhashi and K. Minamisawa: *In vitro* plant regeneration in *Macroptilium atropurpureum*, a legume with a broad symbiont range for nodulation. *Plant Sci* 159: 21-27, 2000.

*Macroptilium atropurpureum* is a model legume with a broad symbiont range for nodulation. We have achieved the first *in vitro* plant regeneration of this species using cv. Siratro. Hypocotyl explants excised from dark-grown seedlings generated slimy, friable calli after three weeks culture on B5 medium containing 1-2 mg/l kinetin and 0.05 mg/l  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid. This was followed by the generation of green organogenic callus with shoot buds by subculturing the explants to hormone-free B5 medium 20 days after the start of culture. The green organogenic calli with shoot buds were maintained as organogenic callus by subculturing on the same medium, and shoots were elongated on hormone-free B5 medium. Elongated shoots were rooted on half-strength B5 medium. Most regenerated plants were morphologically normal, diploid and fertile, although tetraploid plants appeared at a low frequency (8%).

Nukui N, H. Ezura, K. Yuhashi, T. Yasuta and K. Minamisawa K: Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. *Plant Cell Physiol.* 41: 893-897, 2000.

Inhibitors of ethylene synthesis or its physiological function enhanced nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. In contrast, the application of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, a precursor of ethylene biosynthesis, reduced the nodule number in these legumes. These results suggest that an ethylene-mediated signaling pathway is involved in the nodulation process even in the determinate nodulators.

Elbeltagy A, K. Nishioka, H. Suzuki, T. Sato, Y. Sato, H. Morisaki, H. Mitsui and K. Minamisawa K: Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46: 617-629, 2000.

Endophytic bacteria were isolated from surface-sterilized stems, seeds, and leaf sheaths of wild and traditionally cultivated rice. Morphologic and 16S rDNA analyses revealed wide phylogenetic divergence among the isolates. Biochemical and 16S rDNA analyses showed that the most frequently isolated groups were *Methylobacterium* sp. in the alpha-subdivision of *Proteobacteria*, and *Curtobacterium* sp. in the high G+C gram-positive group. We assessed various phenotypic traits likely to be involved in the persistence and functions of the bacteria. In this regard, most isolates excreted pectinase, were motile, and had osmotic resistance to 0.6 M sucrose, whose traits may be involved in endophytic features in rice. About 50% of the isolates showed cellulase activity. A few isolates fixed nitrogen, produced indole-3-acetic acid, and formed capsules; these activities partially correlated with the phylogenetic group.

Yokoyama T, N. Kobayashi, H. Kouchi, K. Minamisawa, H. Kaku and K. Tsuchiya: A lipochito-oligosaccharide, Nod factor, induces transient calcium influx in soybean suspension-cultured cells. *Plant J.* 22: 71-78, 2000.

Lipochito-oligosaccharides (Nod factors) produced by *Rhizobium* or *Bradyrhizobium* are the key signal molecules for eliciting nodulation in their corresponding host legumes. To elucidate the signal transduction events mediated by Nod factors, we investigated the effects of Nod factors on the cytosolic  $[Ca^{2+}]$  of protoplasts prepared from roots and suspension-cultured cells of soybean (*Glycine max* and *G. soja*) using a fluorescent  $Ca^{2+}$  indicator, Fura-PE3. NodBj-V (C18:1, MeFuc), which is a major component of Nod factors produced by *Bradyrhizobium japonicum*, induces transient

elevation of cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] in the cells of soybean within a few minutes. This effect is specific to soybean cells and was not observed in the tobacco BY-2 cells. Furthermore, NodBj-V without MeFuc did not induce any cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] elevation in soybean cells. Exclusion of Ca<sup>2+</sup> from the medium, as well as pre-treatment of the cells with an external Ca<sup>2+</sup> chelator or with a plasma membrane voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor, suppressed the Nod factor-dependent cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] elevation. These results indicate that transient Ca<sup>2+</sup> influx from extracellular fluid is one of the earliest responses of soybean cells to NodBj-V (C18:1, MeFuc) in a host-specific manner.

Ezura H, Y. Yuhashi, T. Yasuta and K. Minamisawa: Effect of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. *Plant Breeding* 119: 75-79, 2000.

The effect of ethylene on gene transfer mediated by an *Agrobacterium tumefaciens* harbouring a binary vector with the  $\beta$ -glucuronidase (*uid A*) gene was investigated in melon, *Cucumis melo* L. Explants excised from melon cotyledons produced ethylene, the production of which was increased by the addition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC, 20 or 200  $\mu$  M), and inhibited by the addition of aminoethoxyvinylglycine (AVG, 10  $\mu$  M). *Agrobacterium* inoculation of explants increased ethylene production, while application of AVG during inoculation reduced it. After 4 days of co-cultivation with *Agrobacterium*, gene transfer in the explants was assayed by transient *uid A* expression. Application of ACC to the co-cultivation medium reduced *Agrobacterium*-mediated gene transfer to explants and that of AVG increased it. These results suggest that ethylene affects the *A. tumefaciens*-mediated gene transfer to the explants excised from melon cotyledons, and the efficiency of *Agrobacterium*-mediated gene transfer can be improved by inhibiting ethylene production from the explants.

Yagi, K., T. Matsumoto, T. Chujo, H. Nojiri, T. Omori, K. Minamisawa, M. Nishiyama and H. Yamane: Isolation and characterization of low-indole-3-acetic acid-producing mutants from *Bradyrhizobium elkanii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1359-1364, 2000.

We isolated 11 low-indole-3-acetic acid (IAA)-producing mutants of *Bradyrhizobium elkanii* by Tn5 mutagenesis. The amount of IAA produced by each mutant was 2.2-13.6% of that of the wild-type. It was found by resting cell reactions that the biosynthetic step to convert indole-3-pyruvic acid to indole-3-acetaldehyde was blocked in all the mutants.

Constancio, A. and M. Kubota, K. Minamisawa and S. Akao: Analysis of the *Bradyrhizobium nod* gene-inducers from soybean super/hypernodulating mutants. *Soil. Microorganisms* 54:81-86, 2000.

In the soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis, the initial stage of nodule formation is triggered by the release of the bacterial *nod* gene-inducing isoflavonoids from soybean plant. Analysis of the isoflavonoid contents in the seeds and root extracts of 12-day-old uninoculated soybean cultivars and their super/hypernodulating mutant using HPLC revealed that isoflavonoids daidzein, genistein, and coumestrol were present in the roots but only daidzein and genistein could be detected in the seeds. Moreover, all the super/hypernodulating soybean mutants showed lower isoflavonoid contents in the seeds and roots than their parent cultivars. These results suggest that in all the parent cultivars the genes which are probably responsible for controlling the isoflavonoid production are both affected during mutation despite the differences in the mutagen used and background of the seed materials.

Ono Y., H. Mitsui, T. Sato and K. Minamisawa : Two RpoH homologs responsible for the expression of heat shock protein genes in *Sinorhizobium meliloti*, *Mol. Gen. Genet.* 264:902-912,2001.

We identified two *rpoH*-related genes encoding sigma32-like proteins from *Sinorhizobium meliloti*, a nitrogen-fixing root-nodule symbiont of alfalfa. The genes, *rpoH1* and *rpoH2*, are functionally similar to *rpoH* of *Escherichia coli* because they partially complemented an *E. coli rpoH* null mutant. We obtained evidence indicating that these genes are involved in the heat shock response in *S. meliloti*. Following an increase in temperature, synthesis of several possible heat shock proteins (Hsps) was induced in cultures of wild-type cells: the most prominent were 66- and 60-kDa proteins, both of which are suggested to represent GroEL species. The other Hsps could be divided into two groups based on differences in synthesis kinetics: synthesis of the first group peaked 5-10 min, and expression of the other group 30 min, after temperature upshift. In the *rpoH1* mutant, inducible synthesis of the former group was markedly reduced, whereas that of the latter group was not affected. Synthesis of both the 66- and 60-kDa proteins was partially reduced. While no appreciable effect was observed in the *rpoH2* single mutant, the *rpoH2* mutation had a synergistic effect on the 60-kDa protein in the *rpoH1* background. The results indicate that two distinct mechanisms are involved in the heat shock response of *S. meliloti*: one requires the *rpoH1* function, while *rpoH2* can substitute in part for the *rpoH1* function. Moreover, the *rpoH1* mutant and *rpoH1 rpoH2* double mutant exhibited Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup> and Nod<sup>-</sup> phenotypes, respectively, on alfalfa.

Minamisawa K. and H. Mitsui: Genetic ecology of soybean bradyrhizobia. *In*: Bollag J-M, Stotzky G (eds) *Soil Biochemistry* (vol. 10).(ISBN: 0-8247-8834-6) Marcel Dekker Inc., New York, pp 349-377, 2000.

Recent progress of molecular biology enable us to understand phylogenetic relationships of soil bacteria, their molecular mechanisms of environmental adaptation, plant-microbe interactions and bacterial genomics. If the knowledge is integrated together with traditional ecology of soil bacteria, a new interdisciplinary area, genetic ecology of soil bacteria, could be established. It is very challenging and perhaps may afford perspectives for fundamental questions in soil microbiology such as diversity, endemism, adaptation, function and interactions of soil bacteria. Moreover, this is important in light of the urgency to change agricultural practices and to remove xenobiotic compounds in soil. Soybean bradyrhizobia are gram-negative soil bacteria that have the ability to form root nodules on soybeans and to fix atmospheric nitrogen. Soybean bradyrhizobia are one of fascinating target for genetic autecology of soil bacteria in terms of autochthonous features in soil, symbiotic interactions with legumes, and advanced knowledge of ecology, physiology and genetics. They have not only two life styles; free-living and symbiotic, but also polyphasic biochemical traits, which may affects soil microbes and plants. In addition, diversity and endemism have been studied due to practical applications of soybean production. The aim of this chapter is to present an overview of the phylogeny , ecology, genetics, symbiotic associations, and biochemical features of soybean bradyrhizobia, and to raise perspectives for microbial ecology of soybean bradyrhizobia. Hopefully this chapter will throw a new light upon the establishment of genetic ecology of bacterial communities in soil.

I. Introduction

II. Phylogeny of soybean bradyrhizobia

III. Ecology of soybean bradyrhizobia

IV. Outline of a symbiotic association between bradyrhizobia and host plants

V. Biochemical characteristics relevant to the ecology and association of  
brayrhizobia with plants

VI. Genetics and genomics of soybean bradyrhizobia

VII. Transfer of the symbiotic regions

VIII. Concluding remarks

南澤 究：共生のプロセスを刻む遺伝子。ビジュアル科学講座、地球の生命6、食う食われる生物たち。(ISBN: 4-88322-629-8 C1040) 三友社出版、pp. 28-35, 2000.

生物共生の意味、根粒菌とマメ科植物の共生系の仕組み、共生細菌の進化についての考え方などを、一般読者に分かりやすく多数の写真やイラストを入れて解説した。

- 1) 共生って何だろう
- 2) マメ科植物と根粒菌はどのように共生しているのだろうか
- 3) どうやって共生するのだろうか：化学物質によるパートナー間の交信
- 4) 根粒菌はまだ進化するのだろうか：根粒菌進化のスナップショット
- 5) 何が共生を進化させているのだろうか：共生の進化の駆動力
- 6) ファージはどんな役割をしているのか：進化を促進するプラスミドファージ

遊橋健一、南澤 究：根粒菌・非マメ科植物窒素固定エンドファイトの利用と資材化、微生物の資材化：研究の最前線、鈴木孝仁・他 編、(ISBN: 4-88171-092-3) ソフトサイエンス社、東京、pp. 30-46, 2000.

マメ科植物と共生窒素固定を行う根粒菌および非マメ科植物窒素固定エンドファイトについて研究の現状を紹介し、微生物接種資材としての可能性、問題点、課題について解説した。

- 1) 生物的窒素固定を利用する意味
- 2) 根粒菌接種資材の変遷
- 3) 優良根粒菌株の選抜とその接種効果
- 4) 接種菌と土着菌の競合
- 5) 競合問題の解決のための接種菌の育種の方向
- 6) 非マメ科植物の「共生」窒素固定のポテンシャル
- 7) 窒素固定エンドファイトとは何か
- 8) 窒素固定エンドファイトの課題と育種の方向
- 9) 根粒菌接種資材および内生窒素固定菌の利用の課題

[遺伝生態情報システム研究分野]

Akada, J. K., M. Shirai, H. Takeuchi, M. Tsuda, and T. Nakazawa: Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol. Microbiol.* 36: 1071-1084, 2000.

We investigated the transcription of the urease gene cluster *ureABIEFGH* in *Helicobacter pylori* to determine the regulation of gene expression of the highly produced enzyme urease. Northern blot hybridization analysis demonstrated that cells of the wild-type strain grown in an ordinary broth had transcripts of *ureAB*, *ureABI*, *ureI*, *ureIE'* and *ure'FGH*, but cells of a *ureI*-disrupted mutant had only the *ureAB* transcript. When the wild-type cells were exposed to pH 8 for 30 min, very little mRNA was detected. However, when exposed to pH 6, a large amount of the *ureIE''* transcript, which was longer than the *ureIE'* transcript, together with the additional transcripts *ureABIEFGH* and *ure'EFGH* were detected. Rifampicin addition experiments demonstrated that urease mRNAs, and the *ureIE'* transcripts in particular, are more stable at pH 5.5 than at pH 7. In accord with these results, urease activity in the crude cell extract of the pH 5.5 culture was twice as much as that of the pH 7 culture, although the amounts of UreA and UreB detected by immunoblot analysis were similar. The transcription start point of *ureI* was identified by primer extension using a *ureA* promoter-deleted mutant, and a consensus sequence of RpoD-RNA polymerase was found in the *ureI* promoter. The 3' end of the *ureIE''* mRNA, determined using S1 nuclease mapping, revealed that the transcript is able to cover the majority of the *ureE* open reading frame (ORF) that might be sufficient for UreE activity. Based on the above results, we conclude that the urease gene cluster of *H. pylori* consists of two operons, *ureAB* and *ureIEFGH*, and that primary transcripts of the latter as well as the read-through transcript, *ureABIEFGH*, are cleaved to produce several species of mRNA. It has been suggested that the *ureIEFGH* operon is regulated post-transcriptionally by mRNA decay in response to environmental pH. We are tempted to speculate that the *ureE''* transcript present in acidic pH may contribute to produce an active product that can proceed the nickel incorporation to the active centre, the final step of urease biosynthesis.

Glatz, Z., M. V. Marini, M. Wimmerova, J. Damborsky, and Y. Nagata: Determination of haloalkane dehalogenase activity by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatography A* 895: 219-225, 2000.

A new sensitive method has been developed for the determination of haloalkane dehalogenase activity. The enzymatic reactions were carried out directly in thermostatted autosampler vials and the formation of product - bromide or chloride ions - was monitored by sequential capillary zone electrophoresis runs. The determinations were performed in a 75  $\mu$ m fused-silica capillary using 5 mM chromate, 0.5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide (pH 8.4) as a background electrolyte, separation voltage 15 kV (negative polarity) and indirect detection at sample wavelength 315 nm, reference wavelength 375 nm for brominated and chlorinated substrates, respectively 0.1 M  $\beta$ -alanine - HCl (pH 3.50) as a background electrolyte, separation voltage 18 kV (negative polarity) and direct detection at 200 nm for brominated substrates. The temperature of capillary was in both cases 25  $^{\circ}$ C. The method is rapid, can be automated, and requires only small amount of enzyme preparation and substrate.

Ohtsubo, Y., Y. Nagata, K. Kimbara, M. Takagi, and A. Ohta: Expression of the *bph* genes involved in biphenyl/PCB degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 induced by the biphenyl degradation intermediate, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid. *Gene* 256: 223-228, 2000.

The *bph* genes involved in PCB/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 are clustered as *bphEGFA1A2A3BCDA4R*. The *bph* genes are inducibly expressed in the presence of biphenyl. In order to understand the induction more fully, the inducer of *bph* gene expression was investigated. To identify the inducer molecule, we constructed four deletion mutants of the structural genes and analyzed the inducibility of the *bphE* gene in each mutant strain. In the wild-type cell and the *bphD* deletion mutant, the level of the *bphE* transcript were enhanced in the presence of biphenyl. On the other hand, in the *bphA*, *bphB*, and *bphC* deletion mutants, level of the *bphE* transcript were not enhanced in the presence of biphenyl. These results demonstrated that the series of reactions catalyzed by biphenyl dioxygenase (BphA), dihydrodiol dehydrogenase (BphB), and 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase (BphC) are necessary to convert biphenyl to the inducer. It is known that these reactions convert biphenyl to 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA), and it was found that the expression of the *bph* genes was induced by purified HOPDA. These results clearly indicate that HOPDA is the inducer of the *bph* genes in KKS102.

Marek, J., J. Vevodova, I. K. Smatanova, Y. Nagata, L. A. Svensson, J. Newman, M. Takagi, and J. Damborsky: Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry* 39: 14082-14086, 2000.

The haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (LinB) is the enzyme involved in the degradation of important environmental pollutant  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. The enzyme hydrolyses a broad range of halogenated cyclic and aliphatic compounds. Here, we present the 1.58 Å crystal structure of LinB and 2.0 Å structure of LinB with 1,3-propanediol, a product of debromination of 1,3-dibromopropane, in the active site of the enzyme. The enzyme is  $\alpha/\beta$  hydrolase and contains a catalytic triad (Asp108, His272 and Glu132) in the lipase-like topological arrangement previously proposed from mutagenesis experiments. The LinB structure was compared with the structures of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and from *Rhodococcus* sp. and the structural features involved in the adaptation towards xenobiotic substrates were identified. The arrangement and composition of the  $\alpha$ -helices in the cap domain results in the differences in the size and shape of the active-site cavity and the entrance tunnel. This is the major determinant of the substrate specificity of the this haloalkane dehalogenase.

Trantirek, L., K. Hynkova, Y. Nagata, A. G. Murzin, A. Ansorgova, V. Sklenar, and J. Damborsky: Reaction mechanism and stereochemistry of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase LinA. *J. Biol. Chem.* in press, 2001.

$\gamma$ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase (LinA) catalyses the initial steps in the biotransformation of the important insecticide  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH) by the soil bacterium *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Stereochemical analysis of the reaction products formed during conversion of  $\gamma$ -HCH by LinA was investigated by GC-MS, NMR, CD and molecular modeling. The NMR spectra of 1,3,4,5,6-pentachlorocyclohexene (PCCH) produced from  $\gamma$ -HCH using either enzymatic dehydrochlorination or alkaline dehydrochlorination were compared and found to be identical. Both enantiomers present in the racemate of synthetic  $\gamma$ -PCCH were converted by LinA, each at a different rate. 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB) was detected as the only product of the biotransformation

of biosynthetic  $\gamma$ -PCCH. 1,2,4-TCB and 1,2,3-TCB were identified as the dehydrochlorination products of racemic  $\gamma$ -PCCH.  $\delta$ -PCCH was detected as the only product of dehydrochlorination of  $\delta$ -HCH. LinA requires the presence of a 1,2-biaxial HCl pair on a substrate molecule. LinA enantiotopologically differentiates two 1,2-biaxial HCl pairs present on  $\gamma$ -HCH and gives rise to a single PCCH enantiomer 1,3(R),4(S),5(S),6(R)-PCCH. Furthermore, LinA enantiomerically differentiates 1,3(S),4(R),5(R),6(S)-PCCH and 1,3(R),4(S),5(S),6(R)-PCCH. The proposed mechanism of enzymatic biotransformation of  $\gamma$ -HCH to 1,2,4-TCB by LinA consists of two 1,2-*anti* conformationally dependent dehydrochlorinations followed by 1,4-*anti* dehydrochlorination.

Marvanova, S., Y. Nagata, M. Wimmerova, J. Sykorova, K. Hynkova and J. Damborsky. Biochemical characterization of broad-specificity enzymes using multivariate experimental design and a colorimetric microplate assay: characterization of the haloalkane dehalogenase mutants. *J. Microbiol. Methods* in press, 2001.

The pH indicator dye-based colorimetric method and multivariate experimental design were used for the systematic biochemical characterization of the broad-specificity enzymes haloalkane dehalogenases. Halogenated compounds for characterization of the enzymes were selected using Principal Component Analysis. The substrates were characterised by 24 physico-chemical and structural descriptors. Thirty-four substrates were selected for testing out of 194 halogenated compounds. Relative activities determined using the optimised colorimetric microplate assay were validated against the catalytic constants determined by gas chromatography. The applicability of the assay was tested with F151L, F154L and F169L mutants of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

永田裕二: 可能性を秘めた細菌におけるペリプラズム酵素系 - 新しく見出された Sec 非依存の新規分泌経路-, *化学と生物* 38: 214-216, 2000.

グラム陰性細菌は、外膜と内膜の二つの膜に挟まれたペプチドグリカン層を含むペリプラズム空間という比較的複雑な細胞表層構造を持つ。ペリプラズムは外部環境と細胞内との緩衝域として重要である。すなわち、外部環境の変化に真っ先に対応し、その性質を変える。ペリプラズムには比較的複雑な物質の分解代謝の初期過程に関与する酵素群が蓄積されており、多様な代謝系を有するグラム陰性細菌のペリプラズム蛋白質を分析すれば、応用的に有用な新規の酵素が同定できる可能性もある。また、ペリプラズム酵素系はそれ自体が有用酵素資源としてまだまだ可能性を秘めているばかりでなく、これらの蛋白質の局在化機構を解析することにより、グラム陰性細菌を宿主とした新たな有用蛋白質の分泌生産系の確立も期待できる。さらに、ペリプラズム酵素系の反応特性が明らかになれば、ペリプラズム空間を物質変換の場として利用することも可能となるだろう。

永田裕二: 環境を汚染する有機塩素系農薬  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane の微生物代謝系の解明, *日本農芸化学会誌* 74: 1247-1257, 2000.

人類は化学工業を発達させ、様々な化合物を生み出し利用してきたが、その多くはそれまで自然界に存在しなかった非天然化合物であり、環境中の物質循環に組み込まれにくいと考えられる。実際、いくつかの化合物は環境中に蓄積し、特に人類を始め生態系に有害な影響を与える場合には深刻な環境問題を引き起こしている。本研究においては、環境を汚染する人為起源難分解性物質として  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane に注目し、その分解代謝系のほぼ全容を分子生物学的レベルで明らかにした。

Kawano, S., S. Todokoro, R. Terauchi, and Y. Ishiguri: Naturalised populations of *Arabidopsis thaliana* in Japan: micro-satellite polymorphisms and differentiations in life history traits. *Plant Evolution in Man-Made Habitats. Proc. VII Symp. IOPB, Amsterdam, 91-116, 1998.*

Microsatellite polymorphisms of *Arabidopsis thaliana* were surveyed for 29 loci using 12 Japanese natural populations as material. All the individuals examined were homozygous at all the microsatellite loci. No intra-population polymorphism was detected in three selected populations when eight loci were studied, although a considerable among-population variation was noted. Genetic relationships among the populations, as revealed in the neighbor-joining (NJ) trees, do not necessarily correspond to their geographic relationships. Phenotypic plasticity in response to day length and chilling treatment in 11 natural populations of *Arabidopsis thaliana* in Japan, was also examined in connection with genetic variation revealed by microsatellite markers. Pre-flowering traits, such as days to flowering and some other life history traits, showed similar patterns of plasticity of life history traits were in agreement with the genetic variations revealed by microsatellite markers. Genetic variation, and morphological and life history traits among the populations do not simply correspond to their geographic locations. This fact may reflect their different origins or different times of introduction into the Islands of Japan.

Imura, Y., S. Iguchi, K. Toyoda, Y. Ichinose, T. Shiraishi, and T. Yamada: Importance of AC-rich element on pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1 promoter for expression induced by nonpathogenic attack. *J. Gen. Plant Pathol.* 66: 123-127, 2000.

Regulatory elements in the promoter of phenylalanine ammonia-lyase gene 1 of pea (*PSPAL1*) in response to nonpathogenic attack were identified by *in vivo* footprinting analysis. The footprints determined AC-rich sequences, Box-I and Box-II, that were conserved at similar positions in the phenylpropanoid gene promoters from several plants. To reveal the functions of the AC-rich sequence in nonpathogen-responsiveness, we constructed Box-I-deletion *PSPAL1* promoter (*dB-1*) with GUS reporter gene and transformed it into tobacco plant. The *dB-1* had reduced basal expression and a complete loss of nonpathogen-responsiveness. These results indicate the essentiality of Box-I for *PSPAL1* activation induced by nonpathogenic attack.

Imura, Y., H. Seki, Toyoda, Y. Ichinose, T. Shiraishi, and T. Yamada: Contrary operations of Box-I element of pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1 promoter for organ-specific expression. *Plant Physiol. Biochem.* in press, 2001.

Expression of genes (*PSPAL*) encoding phenylalanine ammonia-lyase from pea (*Pisum sativum* L.) is regulated in response to various environmental stimuli and during plant development. We examined the *cis*-regulatory elements in *PSPAL1* promoter for organ-specific expression by determining the sequences specifically associated with nuclear proteins on its promoter in each organ of pea. *In vivo* dimethyl sulfate (DMS) footprinting analysis showed putative protein bindings on AC-rich sequences including Box-I in particular in roots and stems in which *PSPAL*-mRNA were highly accumulated. Potential role of the AC-rich element was investigated by fusing *PSPAL1* promoter deleted with Box-I to the reporter gene  $\beta$ -glucuronidase (GUS) and transforming the construct into tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). GUS activity controlled under Box-I-deletion promoter was significantly reduced in roots and leaves, whereas drastically increased in stems as compared with the activity by wild-type of *PSPAL1* promoter. Histochemical GUS staining indicated the activity was elevated in vascular tissues of stem by deleting Box-I. These results suggest that Box-I in *PSPAL1* contributes to a positive regulation in root and leaf, but might also function as a negative regulator in stem, especially in xylem tissue.

〔客員研究分野〕

百町満朗：土壤伝染性植物病原菌の生物防除に関する研究，日本植物病理学会報 55， pp.57-59， 2000

百町満朗・橋本靖：土の菌類の働き，「新・土の微生物（6）：生態的にみた土の菌類」（日本土壤微生物学会編），博友社， pp.127-153， 2000

5-1. はじめに

5-2. 自然環境での土の菌類の働き

自然環境と人為環境の菌類の役割の違い

自然環境での分解菌としての役割

自然環境での寄生菌としての役割

自然環境での共生菌としての役割

菌根共生

アーバスキュラー菌根菌

外生菌根菌

その他の共生菌

5-3. 人為環境での土の菌類の働き

人為環境での分解菌としての役割

人為環境での分解菌としての役割

人為環境での共生菌としての役割

5-4. おわりに

H. Suga, T. Hasegawa, H. Mitsui, K. Kageyama and M. Hyakumachi: Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. Mycol. Res. 104: 1175-1183, 2000

Nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA gene (rDNA-ITS) was obtained for strains belonging to 10 special forms (f. spp.) of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* (teleomorph *Haematonectria haematococca*). Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the rDNA-ITS region showed that most clusters were composed of strains belonging to the same special form. *F. solani* f. sp. *eumartii* and f. sp. *phaseoli* were excluded from the cluster composed of all other special forms. In order to use the molecular data to identify each special form, several restriction enzymes specific for each special form were selected from the mapping data. The digestion pattern of the rDNA-ITS region with these restriction enzymes was able to distinguish *F. solani* f. spp. *phaseoli*, *cucurbitae* race 1, *batatas*, *piperis*, *eumartii*, and *xanthoxyli*. Although f. spp. *mori*, *robiniae* and *pisi*, were not differentiated by restriction analysis, they were separated in the phylogenetic tree.

H. Suga, K. Oyabu, M. Ito, K. Kageyama and M. Hyakumachi: Detection of intron-like sequences in the small subunit rDNA 3' region of *Fusarium solani*. Mycol. Res. 104: 782-787, 2000

PCR amplification revealed length polymorphism of the 3' region of the SSU rDNA gene among special forms of *Fusarium solani*. These length polymorphisms were found within each of *F. solani* f. sp. *phaseoli*, f. sp. *batatas*, and f. sp.

*piperis*. Nucleotide sequence analysis in this region detected intron-like sequences ranging in size from 408 to 439 bp and one 12 bp. The six 408 to 439 bp intron-like sequences were classified into types I-1 and I-2. The sequence similarity was high within I-1 or I-2 type sequences (84.8% and 81.1 to 92.8%, respectively) compared to that between I-1 and I-2 type sequences (45.7 to 48.5%). Both I-1 and I-2 type sequences had a specific insertion point in the SSU rDNA 3' region. I-1 type sequences had the characteristics of group I introns: (1) a U at the 5' splice site of the exon, (2) a G at the 3' splice site of the intron, and (3) they contained the conserved sequence elements P, Q, R, and S. I-2 type sequences had characteristics (1) and (2), but they did not have any characteristic (3). The 12 bp intron-like sequence was identical to the part of the 5' end of I-2 type sequences, and its insertion point was the end of I-2 type sequences. The presence or absence of these intron-like sequences caused the length polymorphism of the SSU rDNA 3' region of *F. solani*.

Y. Hashimoto and M. Hyakumachi: Effects of isolates of ectomycorrhizal fungi and endophytic *Mycelium radicans atrovirens* that were dominant in soil from disturbed sites on growth of *Betula platyphylla* var. *japonica* seedlings. Ecol. Res. 16: 117-125, 2001

Effects of ectomycorrhizal fungi and endophytic *Mycelium radicans atrovirens* Melim (MRA) on growth of *Betula platyphylla* var. *japonica* seedlings were investigated under aseptic culture conditions. Three isolates of ectomycorrhizal fungi and two isolates of MRA were used. One MRA isolate was *Phylocephala fortinii*. Previous field work revealed that these isolates were dominant on the roots of *B. platyphylla* var. *japonica* seedlings grown in a mineral subsoil that had been exposed by the removal of surface soil. After 100-day incubation, the growth of the seedlings was significantly enhanced by the colonization of these ectomycorrhizal fungal isolates as compared with uninoculated seedlings. In contrast, the growth of seedlings was retarded by the colonization of the MRA isolates. The growth of seedlings that were co-inoculated with ectomycorrhizal fungi and MRA was similar to that of uninoculated seedlings in most cases. These results suggest that ectomycorrhizal fungi have a beneficial effect on the growth of *B. platyphylla* var. *japonica* seedlings and that they suppress the deleterious effect of MRA. Thus, these ectomycorrhizal fungi probably have an important role in establishing *B. platyphylla* var. *japonica* seedlings during the initial stage of revegetation following site disturbance by the removal of surface soil.

C. Matsumoto, K. Kageyama, H. Suga and M. Hyakumachi: Intraspecific DNA polymorphisms of *Phtyium irregulare*. Mycol. Res. 104: 1333-1441, 2000

Forty-seven isolates of *P. irregulare* from different hosts and of geographic origins were compared from molecular, morphological and physiological viewpoints. They were divided into four groups (I-IV) based on ITS-RFLP analysis and RAPD analysis. Groups I and II included 32 and eight isolates, respectively, collected from diverse hosts and geographic origins, and groups III and IV comprised seven isolates derived from sugar beet and sugar beet field soil. Group I had smaller oogonia and oospores than did the other three groups. In groups I and II, a significantly higher percentage of the oogonia produced multiple projections compared to groups III and IV which occasionally produced one projection. The growth rate of the four groups was similar at 5-30 °C. at 33°, many isolates of group I grew rapidly but most of the isolates of other groups grew slowly, and at 35°, the former grew but the latter did not. In phylogenetic analysis based on sequence of the ITS region, four groups of *P. irregulare* were included in one cluster with *P. sylvaticum*, groups I-II and III-IV clustered more tightly in the same branch, respectively. The genetic divergence

between I-II and III-IV was higher than between each group (I-II and III-IV) and *P. sylvaticum*, indicating that groups I-II and III-IV may represent two different species.

C. B. Pascual, T. Toda, A. D. Raymondo and M. Hyakumachi: Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathol.* 49: 108-118, 2000

*Rhizoctonia*-diseased specimens were collected from various host species growing in or near maize fields in different geographic regions of the Philippines. A greater range of host species, with varying types of disease symptoms, was found in Mindanao than in Luzon. Fifty-two isolates belonged to anastomosis group AG1-IA and caused banded leaf and sheath blight in maize (*Zea mays*), but they showed considerable variation in virulence. The most and least virulent isolates recovered from maize were both collected from Mindanao. Isolates from necrotic spots/foliar blight of durian and coffee, which were collected from the same region, showed the lowest lesion heights. UPGMA-SAHN clustering analysis from RAPD fingerprint data of 30 haplotypes of *R. solani* AG1-IA isolates from the Philippines and Japan resolved seven groups of AG1-IA at the 75% similarity level. Variation among isolates from upland crops seemed to be partially correlated with geographical origin and virulence. In the case of paddy rice isolates from Japan and Philippines, some were closely related, with over 75% similarity, suggesting a common origin. In PCR-RFLP analysis of the rDNA internal transcribed spacer region, no polymorphism was observed among the AG1-IA isolates but they were differentiated from subgroups AG1-IB and AG1-IC using the endonucleases *EcoRI*, *MboI* and *HinfI*.

O. Salazar, M. C. Julian, M. Hyakumachi and V. Rubio: Phylogenetic grouping of cultural types of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia* 92: 505-509, 2000

The complete ITS sequence (ITS1-5.8S-ITS2) of 28 isolates of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 has been determined, aligned and processed for phylogenetic reconstruction using maximum parsimony, showing the division of AG 2-2 into three cultural types (AG 2-2 IIIB, AG 2-2 IV and AG 2-2 LP).

T. Toda, M. Hyakumachi and D. K. Arora: Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. *Microbiol. Res.* 154: 247-258, 1999.

The genetic relatedness among 41 isolates of *Rhizoctonia solani* belonging to 11 AGs was assessed based on the fragment pattern analysis obtained by the amplification of genomic DNA by 3 RAPD primers (P14, R28 and RC09), ERIC (ERIC1R-1/ERIC2) and REP (REP1R-1/REP2-1) gene sequenced. Based on the banding patterns of PCR-amplified products, seven putative groups among the 41 isolates were recognized. RAPD-PCR generated multiple distinct products showing considerable variability among the isolates of different AG types. Isolates originated from the same geographical origin or host plants were not always genetically related. Amplification with ERIC and REP elements enabled detection of AGs/subgroup-conserved and isolate-polymorphic variants, respectively. Though pattern types generated by ERIC and REP in general, were distinctly variable among different subgroups, less variable fingerprint patterns were produced within the isolates of each subgroup.

## (2) その他の刊行物

### ■遺伝子多様性研究部門

#### 〔遺伝子環境応答研究分野〕

宮寄 厚：外国研究所訪問記-スペインセビーリャに滞在して-  
遺伝生態研究センター通信 NS No.7, 7-9, 2000.

#### 〔遺伝子機能制御分野〕

亀谷寿昭：交雑による変異拡大、pp. 84-101., 栄養繁殖植物の育種法と大量増殖法、pp. 255-262, 植物育種学 第3版 (日向ら共著) 文永堂 (2000)

#### 〔遺伝子適応生態研究分野〕

Takahashi, H., N. Fujii, M. Kamada, A. Higashitani, Y. Yamazaki, A. Kobayashi, M. Takano, S. Yamazaki, T. Sakata, H. Mizuno, Y. Kaneko, T. Murata, S. Kamigaichi, S. Aizawa, I. Yoshizaki, T. Shimazu, and K. Fukui: Gravimorphogenesis of Cucurbitaceae plants: development of peg cells and graviperception mechanism in cucumber seedlings. Biological Sciences in Space 14: 64-74 (2000)

高橋秀幸, 後藤英司, 谷晃, 北宅義昭, 斉藤高弘, 東谷篤志：微小重力下における植物の生活環に関する研究とそのための微小重力場植物実験装置の開発。東北大学遺伝生態研究センター (2000) ISBN 4-9900572-3-6

### ■環境変動遺伝生態研究部門

#### 〔臨界環境遺伝生態研究分野〕

熊谷 忠：紫外線誘導 DNA 損傷とその修復能力からみたイネの紫外線防御機構に関する研究。平成10年度科学研究費(基盤研究(A)(2))研究成果報告書、pp.1-92, 平成12年3月。

つぎの章から構成されている。1) 研究の背景、研究成果のまとめと当面の課題、2) 研究組織と研究経費、3) 研究発表、4) イネの生育、葉齢の進行にともなう紫外線 UVB 誘導 CPD 生成能力およびその光修復能力の変動、5) 生育時の光環境とイネの葉内シクロブタン型ミリミジンダイマー (CPD) の動態、6) イネの紫外線耐性機構—UVB 誘導 DNA 損傷とその修復能力からの解析。

熊谷 忠：紫外線 UVB および高濃度 CO<sub>2</sub> 大気環境が植物の生育に及ぼす影響に関する研究。Toyota Technical Review, 50: pp94, 2000.

紫外線 UVB および CO<sub>2</sub> 大気濃度の増大がイネの生育に及ぼす影響に関する圃場試験の主な研究成果を

紹介する。1) イネの UVB 感受性は DNA 損傷の一つである CPD を光のエネルギーを利用して修復する光回復酵素の活性と密接な関係にある。2) 自然で生育している植物ではいつでも DNA の損傷 (DNA レベルでの突然変異) が起こっていることが判明した。3) 数年間にわたる圃場試験の結果、UVB の増大は分げつ、乾物重などを抑制したが、この効果は低温、日射量によって左右されることがわかった。障害の現れ方は天候の変化を受けた生育段階によって変わったが、天候の変化に関係なく UVB の付加は米粒を小型化した。4) UVB による米粒の小型化は高濃度 CO<sub>2</sub> 大気により顕在化した。このように、UVB および CO<sub>2</sub> 大気濃度の増大はイネの生育・収量に負の影響を及ぼすこと、植物の UVB 感受性の評価を CPD 光回復酵素活性に基づいて行うことの妥当性、光回復酵素を利用した新しい UVB 耐性植物の作出の可能性を見出した。

福田善通、佐藤雅志、森田敏、長峰司、田村克徳、矢野裕之、八木忠之：密陽 23 号/アキヒカリの R I 系統群を用いた乾燥ストレスにより生じる巻き葉に関する QTL 解析. 北陸作物学会報 35 : 47-49. 2000.

#### 〔地圏環境遺伝生態研究分野〕

Minamisawa, K., T. Yasuta, K. Yuhashi, N. Ichikawa, H. Ezura and N. Nukui: The role of rhizobitoxine in nodulation by *Bradyrhizobium elkanii*. In Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Edited by F.O. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates and W. E. Newton. (ISBN 0-7923-6233-0) Kluwer, Dordrecht /Boston /London.p. 422-423, 2000.

Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, Y. Sato, H. Mistui and K. Minamisawa: Diversity of putative endophytic bacteria isolated from wild and traditionally cultivated rice. In Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Edited by F.O. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates and W. E. Newton. (ISBN 0-7923-6233-0) Kluwer, Dordrecht/ Boston/ London.p. 345, 2000.

Yuhashi, K, N. Ichikawa, H. Ezura, T. Yasuta, N. Nukui, S. Akao and K. Minamisawa: Rhizobitoxine production of *Bradyrhizobium elkanii* enhances siratro nodule formation. In Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Edited by F.O. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates and W. E. Newton. (ISBN 0-7923-6233-0) Kluwer, Dordrecht/ Boston/ London.p. 345, 2000.

Minamisawa, K, M. Itakura, R. Sameshima, T. Isawa, K. Yuhashi, M Tsuda and H. Mitsui: Interspecies transfer of nodulation genes from *Bradyrhizobium japonicum* HRS strains to *B. elkanii*. In Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Edited by F.O. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates and W. E. Newton. (ISBN 0-7923-6233-0) Kluwer, Dordrecht/ Boston/ London.p. 291, 2000.

南澤 究：土壤細菌の遺伝生態研究の現状－ダイズ根粒菌の実例をまじえて－、土と微生物、54:121-127, 2000.

柴田大輔、間藤 徹、菊池尚志、南澤 究：ゲノム科学と 21 世紀の植物栄養学の展望、日本土壌肥科学雑誌、71:751-754, 2000.

(3) 学会などでの口頭発表、展示発表

■ 遺伝子多様性研究部門

〔遺伝子機能制御分野〕

- Kameya, T.: Overcoming breeding barriers by means of plant biotechnology. Cooperation Program between Japan and Korea in Biotechnology by JSPS. (March 18, Anseong National University, Korea)
- Kanno, A., Saedler, H., Theissen, G. : B-class floral homeotic genes in Liliaceae plant. 第44回基生研コンファレンス (2000年3月21日-23日、基生研)
- Kanno, A., Saedler, H., Theissen, G. : Isolation and characterization of B-function genes from lily. 日本植物生理学会2000年度年会 (2000年3月27日-29日、椙山女学園大学)
- 朴珍姫、菅野明、亀谷壽昭：食用アスパラガスの花器官形成に関わるクラス B 遺伝子群の単離及び発現解析。日本育種学会第98回講演会 (2000年9月25日-26日、弘前大学)
- 石川優一、菅野明、亀谷壽昭：5-メチルトリプトファン耐性イネにおけるアントラニル酸合成酵素遺伝子の発現解析。日本育種学会第98回講演会 (2000年9月25日-26日、弘前大学)
- Ishikawa, Y., Kisaka, H., Kisaka, M., Lee, H.-Y., Kanno, A., Kameya, T. : Molecular basis of 5-methyltryptophan resistant rice. 4th International Rice Genetics Symposium (October 22-27, 2000, Los Banos, Philippines)
- Kanno, A. : Floral homeotic genes in Liliaceae plants. 韓日国際学術シンポジウム (2000年11月17日、韓国公州大学校)
- 菅野明、Saedler, H., Theissen, G. : チューリップの STMADS11-like 遺伝子の単離と発現解析。日本植物生理学会2001年度年会 (2001年3月23日-26日、九州産業大学)

〔遺伝子適応生態研究分野〕

- 高橋秀幸、藤井伸治、鎌田源司：キュウリの重力応答におけるオーキシンを介する転写制御機構の解析。第16回宇宙利用シンポジウム (2000年1月10-11日、相模原)
- Chen, L., A. Higashitani, S. Komatsu, and H. Takahashi: Gibberellin response for first internode elongation of a tolerant wheat to deep-seeding. 11<sup>th</sup> NIAR/COE International Symposium (January 10-11, 2000, Tsukuba).
- 東谷篤志、阪田 忠、高橋秀幸：オオムギを用いた生殖生長過程における遺伝子発現の全体像の解析の試み。日本植物生理学会2000年度年会 (2000年3月27-29日、名古屋)
- 山崎聖司、藤井伸治、松浦誠司、高橋秀幸：キュウリの性表現型とエチレンレセプター様遺伝子発現のエチレン誘導性の関係。日本植物生理学会2000年度年会 (2000年3月27-29日、名古屋)。
- 陳 磊、東谷篤志、小松節子、高橋秀幸：コムギの深播き耐性における第一節間の伸長成

- 長のためのジベレリン応答. 日本植物生理学会 2000 年度年会 (2000 年 3 月 27-29 日, 名古屋)
- 西澤武明, 菅 洋, 高橋秀幸: コムギの第一節間伸長に対するジベレリンと加里の相互作用. 第 209 回日本作物学会 (2000 年 4 月 7-8 日, 東京)
- Takahashi, H.: Spaceflight experiments for the study of gravimorphogenesis and hydrotropism in cucumber seedlings. Plenary lecture at the Second Balkan Botanical Congress (May 14-15, 2000, Istanbul)
- 高橋秀幸, 水野英俊, 鎌田源司, 藤井伸治, 東谷篤志, 相澤幸子, 上垣内茂樹, 向井千秋, 嶋津徹: 微小重力下における根の水分屈性. 日本根研究会第 13 回根研究集会 (2000 年 6 月 3 日, 金谷)
- Takahashi, H.: Spaceflight experiment for the study of gravimorphogenesis in cucumber seedlings: a role of auxin in the gravity's negative control of peg formation. 33<sup>rd</sup> COSPAR Scientific Assembly (July 16-23, 2000, Warsaw)
- 東谷篤志: チェックポイント制御機構による発がん防御の分子解明 (モデル生物・線虫を用いた基礎的研究) 発がん防御の基礎的研究 (2000 年 7 月 27-29 日, 札幌)
- Takanami, T., A. Mori, H. Takahashi, and A. Higashitani: Hyper-resistance of meiotic cells to radiation due to a strong expression of a single *recA*-like gene in *Caenorhabditis elegans*. 第 2 回 *C. elegans* 日本集会 (2000 年 8 月 1-3 日, 東京)
- Mori, A., T. Takanami, H. Takahashi, and A. Higashitani: Studies on protein kinases involved in gametogenesis. 第 2 回 *C. elegans* 日本集会 (2000 年 8 月 1-3 日, 東京)
- Aoki, H., and A. Higashitani: Characterization of *Ce-atl-1*, an *ATM*-like gene from *Caenorhabditis elegans*. 第 1 回 文部省特定領域研究「がん」6 領域 若手研究者ワークショップ (2000 年 8 月 31 日-9 月 3 日, 掛川)
- 鎌田源司, 阪田忠, 藤井伸治, 東谷篤志, 高橋秀幸: 重力によって制御されるウリ科植物のペグ形成とオーキシン輸送. 日本宇宙生物科学会第 14 回大会 (2000 年 10 月 19-20 日, 福島)
- 阪田 忠, 安彦真文, 東谷篤志, 高橋秀幸: 宇宙環境下における穀物生産実現に向けての研究-植物生殖成長に対する環境ストレスの影響の分子生物学的研究-. 日本宇宙生物科学会第 14 回大会 (2000 年 10 月 19-20 日, 福島)
- 高橋信行, 高橋秀幸: シロイヌナズナを用いた水分屈性実験系の確立. 日本宇宙生物科学会第 14 回大会 (2000 年 10 月 19-20 日, 福島)
- 高橋秀幸: 宇宙実験による植物の重力形態形成と水分屈性の研究 (日本宇宙生物科学会学会賞受賞講演). 日本宇宙生物科学会第 14 回大会 (2000 年 10 月 19-20 日, 福島)
- 東谷篤志, 高浪タカ子, 青木秀年, 森 亮之, 笹川洋平, 高橋秀幸: 線虫を用いた有性生殖サイクルの分子機構と放射線傷害に対する防御機構. 日本宇宙生物科学会第 14 回大会 (2000 年 10 月 19-20 日, 福島)
- 藤井伸治, 鎌田源司, 高橋秀幸: キュウリ芽ばえの重力形態形成における光の影響. 日本宇宙生物科学会第 14 回大会 (2000 年 10 月 19-20 日, 福島)
- Takahashi, H., Higashitani, A., Fujii, N., Kamada, M., Mizuno, H., Takahashi, N.: Spaceflight

- experiment for the study of gravimorphogenesis and hydrotropism in cucumber seedlings. Korean · Japan Joint Symposium of Molecular Plant Development (November 17, 2000, Korea)
- Higashitani, A., T.Sakata, M. Abiko, and H. Takahashi: Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. Korean · Japan Joint Symposium of Molecular Plant Development (November 17, 2000, Korea)
- Yamasaki, S., N. Fujii, S. Matsuura, and H. Takahashi: Andromonoecious cucumber plants for the study of the interaction between sex-controlling M locus and ethylene responses. Korean-Japan Joint Symposium of Molecular plant development (November 17, 2000, Korea)
- Higashitani, A., H. Aoki, A. Mori, Y. Sasagawa, T. Takanami, and H. Takahashi: *C. elegans* *Chk2*-like gene is essential for meiosis but dispensable for DNA repair. 第3回 ATM/PKD 研究会 (2000年11月22日, 千葉)
- 高橋秀幸, 水野英俊, 高橋信行, 鎌田源司, 藤井伸治. 根の屈性と植物ホルモン. 日本根研究会第6回 JSRR シンポジウム (2000年11月25日, 名古屋)
- 高橋信行, 高橋秀幸: シロイヌナズナの根の水分屈性実験系. 日本根研究会第14回根研究集会 (2000年11月25-26日, 名古屋)
- Aoki, H., T. Takanami, H. Takahashi, and A. Higashitani: Characterization of *Ce-atl-1*, an *ATM*-like gene from *Caenorhabditis elegans*. COE-IGE International Symposium (December 4-6, 2000, Sendai)
- Takanami, T., A. Mori, H. Takahashi, and A. Higashitani: Hyper-resistance of meiotic cells to radiation, but not UV, due to a strong expression of a single *recA*-like gene in *Caenorhabditis elegans*. COE-IGE International Symposium (December 4-6, 2000, Sendai)
- 東谷篤志, 高浪タカ子, 青木秀年, 森 亮之, 笹川洋平, 高橋秀幸: 減数分裂期の相同染色体間遺伝子組換えとその制御機構—モデル生物 *C. elegans* を用いた解析—. 第14回 ワークショップ「遺伝子組換えとその制御」 (2000年12月11-12日, 神戸)
- 高浪タカ子, 高橋秀幸, 東谷篤志: 減数分裂細胞における放射線高抵抗性と相同的遺伝子組換え酵素発現. 第23回 日本分子生物学会年会 (2000年12月13-16日, 神戸)
- 東谷篤志, 高浪タカ子, 青木秀年, 森 亮之, 笹川洋平, 高橋秀幸: 線虫を用いた減数分裂過程の分子解明. 第23回 日本分子生物学会年会ワークショップ (2000年12月13-16日, 神戸)
- 高橋秀幸, 高橋信行, 水野英俊, 藤井伸治: 微小重力下における根の水分屈性研究のための実験系. 第17回宇宙利用シンポジウム (2001年1月15日-16日, 相模原)
- 藤井伸治, 鎌田源司, 高橋秀幸: キュウリを用いた重力応答におけるオーキシンを介する転写制御機構の解析. 第17回宇宙利用シンポジウム (2001年1月15日-16日, 相模原)
- 鎌田源司, 藤井伸治, 東谷篤志, 高橋秀幸: 重力によって制御されるウリ科植物のペグ形成とオーキシン輸送キャリア遺伝子の発現. 日本植物生理学会 2001年度年会 (2001年3月23-26日, 福岡)
- 高橋信行, 後藤伸治, 岡田清孝, 高橋秀幸: アラビドプシスを用いた根の水分屈性実験系と各種突然変異体の水分屈性. 日本植物生理学会 2001年度年会 (2001年3月23-26日,

福岡)

藤井伸治, 鎌田源司, 高橋秀幸: 光によるキュウリのペグ形成の抑制. 日本植物生理学会 2001 年度年会 (2001 年 3 月 23-26 日, 福岡)

山崎聖司, 藤井伸治, 松浦誠司, 高橋秀幸: 雄性両性同株型キュウリにおける M ローカスとエチレンによる性表現の制御. 日本植物生理学会 2001 年度年会 (2001 年 3 月 23-26 日, 福岡).

## ■環境変動遺伝生態研究部門

### 〔臨界環境遺伝生態研究分野〕

熊谷 忠: イネの DNA 損傷—光回復酵素誘導の光調節. 木原生物学研究所セミナー「植物の光信号伝達の解明」(1 月 28 日-29 日, 横浜)

熊谷 忠, 山口弘子, 成日慶, 日出間純: イネ (*Oryza sativa* L.) の紫外線 UVB 誘導 DNA 損傷の光修復誘導の光調節. 日本植物生理学会 2000 年度年会 (3 月 27 日-29 日, 名古屋)

日出間純, 竹内敦子, 山口琢也, 熊谷 忠: 紫外線 UVB がイネの葉緑体タンパク質 (Rubisco, LHCII) の合成と分解に及ぼす影響について. 日本植物生理学会 2000 年度年会 (3 月 27 日-29 日, 名古屋)

小原実広, 梶浦真, 佐藤雅志, 山谷知行: 日本型、インド型、ジャワ型イネの穎果における NADH 依存性グルタミン酸合成酵素含量及び活性の挙動とそのタンパク質含量に関する QTL 解析. 日本植物生理学会 2000 年度年会 (2000 年 3 月 27-29 日, 名古屋)

小原実広, 佐藤雅志, 山谷知行: イネ着生葉の一生におけるサイトゾル型グルタミン合成酵素の活性調節に関わる翻訳後修飾の可能性. 日本土壌肥料学会 2000 年度大会 (2000 年 4 月 2-4 日, 東京)

福田善通, 小林創平, 常松浩史, L. A. Ebron, 加藤浩, 梅本貴之, 森田敏, 佐藤雅志, 山谷知行, 長峰司, 福山利範: 分子マーカーを用いた遺伝・育種学的研究 19. 異なる地域における出穂性に関する QTL 反応. 日本育種学会第 97 回講演会 (2000 年 4 月 2,3 日, つくば)

佐藤雅志, 西岡きよ, 東海林比呂子, 南澤究, 中村郁郎, 福田善通, 石井尊生, 佐藤洋一郎: ミャンマー、カンボジアで収集した野生イネからのエンドフィテック窒素固定細菌の検出. 日本育種学会第 97 回講演会 (2000 年 4 月 2,3 日, つくば)

高木亜美子, 一谷勝之, 福田善通, 尾形武文, 佐藤雅志, 田浦悟, 佐藤宗治: イネの再生力に関する QTL 解析. 日本育種学会第 97 回講演会 (2000 年 4 月 2,3 日, つくば)

上田忠正, 佐藤雅志, 矢野昌裕: イネ戻し交雑後代系統を用いた UV-B 感受性に関する QTL のマッピング. 日本育種学会第 97 回講演会 (2000 年 4 月 2,3 日, つくば)

佐藤洋一郎, 佐藤雅志, 中村郁郎, 福田善通, 石井尊生, H. Urairong: 花の咲かない野生イネ. 日本育種学会第 97 回講演会 (2000 年 4 月 2,3 日, つくば)

福田善通, 上埜喜八, 佐藤雅志, 常松浩史: QTL 解析を用いたイネの発芽に関する研究. 日本作物学会第 209 回講演会 (2000 年 4 月 7,8 日, 東京)

- 熊谷 忠：UVB による DNA 損傷の誘発と光回復酵素。基礎生物学研究所・共同利用研究会「植物の光センシング」（6月9日－10日、岡崎）
- 日出間純：イネの紫外線防御機構。第39回ガンマフィールド・シンポジウム「ストレス耐性と突然変異」（7月12日－13日、水戸）
- 佐藤雅志, 佐藤洋一郎, S. Chitrakon, 島本義也: インドシナにおける稲遺伝資源の収集-17年間のまとめ。日本育種学会第98回講演会（2000年9月25,26日、弘前）
- 佐藤洋一郎, S. Chitrakon, 福田善通, 石井尊生, 中村郁郎, J.M.Schiller, 佐藤雅志, 島本義也, 宍戸理恵子, 上埜喜八: タイおよびラオスにおける野生イネ自生地保全の試み。日本育種学会第98回講演会（2000年9月25,26日、弘前）
- 羽田 厚：イネの紫外線 B(UVB)感受性に関する研究－アントシアニンの役割についての検討－。日本植物学会第64回大会（9月29日－10月1日、静岡）
- 竹内敦子、日出間純、山口琢也、熊谷 忠：イネの Rubisco・LHCII タンパク質の合成と分解に及ぼす紫外線 B(UVB)効果の違いについて。日本植物学会第64回大会（9月29日－10月1日、静岡）
- 熊谷 忠、姜 恵淑、日出間純、佐藤雅志：付加 UVB がイネの生育・収量に及ぼす影響－5年間の圃場試験成績。日本植物学会第64回大会（9月29日－10月1日、静岡）
- Sato T., Y. Fukuta, M. Yano and T. Kumagai Mapping: quantitative trait loci associated with tolerance to enhanced ultraviolet-B radiation in rice. The 4th IRGS (2000年10月22－27日, Laguna, Philippines)
- Obara M., Y. Fukuta, M. Yano, T. Yamaya and T. Sato: QTL analysis for discoloration of flag leaves during ripening period in rice. The 4th IRGS (2000年10月22－27日, Laguna, Philippines)
- Fukuta Y., K. Kobayashi, H. Tsunematsu, L.A.Ebron, H. Kato, T. Umemoto, S.Morita, T. Sato, T. Yamaya, H. Nemoto and H. Maeda: QTL's reaction of heading date in the different sites from tropical to temperate region. The 4th IRGS (2000年10月22－27日, Laguna, Philippines)
- Hidema J.: Cyclobutane pyrimidine dimer photorepair deficiency in UV-sensitive rice results from a functionally altered photolyase. International Symposium 'Plant and Ultraviolet-B radiation' (Dec.4-6, Sendai)
- Kumagai T., J.Hidema, H-S.Kang and T.Sato: Effects of supplemental UV-B radiation on the growth and yield of two cultivars of Japanese lowland rice (*Oryza sativa* L.) under the field in a cool-growing region of Japan. International Symposium 'Plant and Ultraviolet-B radiation' (Dec.4-6, Sendai)
- Sato T., Y.Fukuda, M.Yano and T.Kumagai: QTLs associated with tolerance to enhanced UV-B radiation in rice. International Symposium 'Plant and Ultraviolet-B radiation' (Dec.4-6, Sendai)
- Hada H., J.Hidema, T.Sato, M.Maekawa and T.Kumagai: Sensitivity of an anthocyanin accumulated near isogenic line of rice to UV-B radiation. International Symposium 'Plant and Ultraviolet-B radiation' (Dec.4-6, Sendai)
- Takeuchi A., T.Yamaguchi, J.Hidema and T.Kumagai: UVB radiation and protein turnover of rubisco and LHCII in rice leaves. International Symposium 'Plant and Ultraviolet-B radiation' (Dec.4-6, Sendai)

Kumagai J., H.Kato, T.Miyazaki, J.Hidema and T.Kumagai: Differences in the sensitivity to UVB radiation of two cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) based on observation of long-lived radicals.  
Kihara J. and T.Kumagai: Novel genes induced by UVB radiation in rice brown spot fungus *Bipolaris oryzae*. International Symposium 'Plant and Ultraviolet-B radiation' (Dec.4-6, Sendai)

〔地圏環境遺伝生態研究分野〕

三井久幸, 佐藤俊文, 尾野由紀江, 南澤 究: 根粒菌の共生窒素固定に必須な *rpoH* 相同遺伝子の解析. 農芸化学会 (2000年3月31日-4月2日, 東京)

鮫島玲子, 伊沢 剛, 三井久幸, 南澤 究: 挿入配列によるダイズ根粒菌のゲノム再編成と環境適応. 日本土壌肥料学会 (2000年4月2日-4日, 東京)

安田 剛, 遊橋健一, 貫井憲之, 江面 浩, 南澤 究: 根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* の生産するリゾビトキシンの根粒形成における役割と生合成遺伝子の解明. 日本土壌肥料学会 (2000年4月2日-4日, 東京)

貫井憲之, 江面 浩, 遊橋健一, 安田 剛, 南澤 究: マメ科植物のエチレン感受性と根粒形成. 日本土壌肥料学会 (2000年4月2日-4日, 東京)

鈴木 永, 宮木太郎, Adel Elbeltagy, 西岡きよ, 東海林比呂子, 佐藤雅志, 佐藤洋一郎, 浜田徹, 南澤 究: 野生イネ及び栽培イネ在来品種の地上部に内生する窒素固定細菌. 日本土壌肥料学会 (2000年4月2日-4日, 東京)

南澤 究: 土壌細菌の遺伝生態研究の現状. 日本土壌微生物学会 2000年度大会 (2000年5月25日-27日, 秋田)

Adel Elbeltagy, 西岡きよ, 鈴木 永, 宮木太郎, 遊橋健一, 佐藤雅志, 三井久幸, 南澤 究: Endophytic colonization in rice of diazotrophic *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice. 日本土壌微生物学会 2000年度大会 (2000年5月25日-27日, 秋田)

Mitsui, H.: Two genes encoding  $\sigma$  32-like proteins involved in the heat shock response and symbiotic nitrogen fixation in rhizobium. 2000 Meeting on Molecular Genetics of Bacteria & Phages (August 22 - 27, 2000, Cold Spring Harbor Laboratory, USA)

Minamisawa, K.: Endophytic colonization and nitrogen fixation in rice by *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice: Workshop on the development of nitrogen fixing symbionts and mycorrhizae under Program of Large Scale Cooperation (LIPI-JSPS/DOST/ NRCT /) (October 11-15, 2000, Bali-Lombok)

Mitsui, H., T. Sato, Y. Ono and K. Minamisawa: Two genes encoding sigma 32-like proteins involved in the heat shock response and symbiotic nitrogen fixation in rhizobia. Workshop on the development of nitrogen fixing symbionts and mycorrhizae under Program of Large Scale Cooperation (LIPI-JSPS/DOST/ NRCT /) (October 11-15, 2000, Bali-Lombok)

安田 剛, 江面 浩, 遊橋健一, 南澤 究: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* のリゾビトキシンの遺伝子及び生合成系の解明. 植物微生物研究会 (2000年11月1日-3日, 仙台)

岡崎 伸, 江面 浩, 遊橋健一, 南澤 究: *Bradyrhizobium elkanii* の生産する Rhizobitoxine の根粒形成促進効果. 植物微生物研究会 (2000年11月1日-3日, 仙台)

- 佐藤俊文, 三井久幸, 南澤 究 : Two rhizobial genes encoding sigma 32-like proteins involved in the heat shock response and symbiotic nitrogen fixation. 植物微生物研究会 (2000年11月1日-3日, 仙台)
- 貫井憲之, 江面浩, 遊橋健一, 南澤 究 : 異種エチレンレセプター遺伝子を導入したミヤコグサ形質転換体における根粒形成. 植物微生物研究会 (2000年11月1日-3日, 仙台)
- Adel Elbeltagy, 西岡きよ, 佐藤雅志, 鈴木 永, 遊橋健一, 葉 續, 三井久幸, 南澤 究 : Endophytic colonization and nitrogen fixation in rice by *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice. 植物微生物研究会 (2000年11月1日-3日, 仙台)
- 三井久幸, 佐藤俊文, 南澤 究 : 根粒菌の共生窒素固定に関与する *rpoH* 遺伝子の発現と機能. 第16回日本微生物生態学会 (2000年11月12日-15日, 茨城)
- 板倉 学, 葉 續, 三井久幸, 南澤 究 : ミヤコグサ根粒菌は VBNC (viable but nonculturable) になるか. 第16回日本微生物生態学会 (2000年11月12日-15日, 茨城)
- 南澤 究, 西岡きよ, 宮木太郎, 遊橋健一, 佐藤雅志 : 野生イネ科植物から分離される窒素固定嫌気共生系. 第16回日本微生物生態学会 (2000年11月12日-15日, 茨城)
- 鈴木 永, A. Elbeltagy, 西岡きよ, 葉 續, 佐藤雅志, 南澤 究 : 野生イネから分離された *Herbaspirillum* 属窒素固定細菌のコロナイズと窒素固定活性. 第16回日本微生物生態学会 (2000年11月12日-15日, 茨城)
- Minamisawa, K., A. Elbeltagy, K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye and H. Mitsui : Endophytic colonization and nitrogen fixation in rice by *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice. 10th Conference on Microbiology (November 12-14, 2000, Cairo)
- 南澤 究 : ミヤコグサ根粒菌の網羅的な遺伝子発現解析を目指して. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「マメ科のモデル植物ミヤコグサを用いた分子細胞生物学」(2000年11月16日-17日, 大阪)
- Minamisawa, K., A. Elbeltagy, K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, K. Yuhashi and H. Mitsui : Endophytic colonization and nitrogen fixation in rice by *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice. 8th International symposium on nitrogen fixation with non-legumes (December 3-7, 2000, Sydney)
- 三井久幸, 佐藤俊文, 南澤 究 : 根粒菌 *rpoH* 変異の共生窒素固定に及ぼす影響. 第23回日本分子生物学会 (2000年12月13日-16日, 神戸)

#### 〔遺伝生態情報システム研究分野〕

- 津田雅孝, 源河浩之: トルエン分解トランスポゾン Tn4651 の部位特異的組換え系. 日本農芸化学会 2000年度大会 (2000年3月31日-4月2日, 東京)
- 小川直人, 原奈穂, 津田雅孝, 宮下清貴: 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸分解菌 *Alcaligenes* sp. CSV90 株のクロロカテコール分解遺伝子群の構造と発現の解析. 日本農芸化学会 2000年度大会 (2000年3月31日-4月2日, 東京)
- 永田裕二: 環境を汚染する有機塩素系農薬 $\gamma$ -HCH の微生物代謝系の解明. 日本農芸化学会 2000年度大会 (2000年3月31日-4月2日, 東京)

- 永田裕二, 森亮樹, J. Damborsky, Alexey G. Murzin, 高木正道, 太田明德: *Sphingomonas paucimobilis* UT26 由来の $\gamma$ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase (LinA)の立体構造予測と活性中心アミノ酸残基の同定. 日本農芸化学会 2000 年度大会 (2000 年 3 月 31 日-4 月 2 日, 東京)
- 宮内啓介, 足立雄悟, 永田裕二, 高木正道, 太田明德:  $\gamma$ -HCH 分解菌 *Sphingomonas paucimobilis* の *linD*, *linE* 遺伝子の周辺領域の解析. 日本農芸化学会 2000 年度大会 (2000 年 3 月 31 日-4 月 2 日, 東京)
- 大坪嘉行, 永田裕二, 志村稔, 金原和秀, 高木正道, 太田明德: *Pseudomonas* sp. KKS102 の PCB/biphenyl 分解遺伝子群の発現制御に関する研究. 日本農芸化学会 2000 年度大会 (2000 年 3 月 31 日-4 月 2 日, 東京)
- 角田徹, 飯田敏也, 永田裕二, 高木正道, 太田明德: 酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン資化に関わる遺伝子 *YIPEX10* の取得と解析. 日本農芸化学会 2000 年度大会 (2000 年 3 月 31 日-4 月 2 日, 東京)
- 山神撰, 飯田敏也, 永田裕二, 高木正道, 太田明德: 酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン資化に関与するアセトアセチル-CoA チオラーゼ遺伝子のクローニングと解析. 日本農芸化学会 2000 年度大会 (2000 年 3 月 31 日-4 月 2 日, 東京)
- 澤田宏之, 津田雅孝, 鈴木文彦, 畔上耕児: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* の *argK*-*tox* cluster からの転移領域の検出. 平成 12 年度日本植物病理学会大会 (2000 年 4 月 2-4 日, 岡山)
- 津田雅孝: 広宿主域伝達性薬剤耐性プラスミド R388 の構造. 第 73 回日本細菌学会総会 (2000 年 5 月 29-31 日, 札幌)
- 永田裕二: 環境を汚染する有機塩素系農薬 $\gamma$ -HCH の微生物代謝系の解明. 日本農芸化学会 2000 年度東北支部会 (2000 年 7 月 8 日, 弘前)
- Ogawa, N., N. Hara, M. Tsuda, and K. Miyashita: The structure and *in vivo* expression of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative genes from *Alcaligenes* sp. CSV90. Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology (July 9-13, 2000, Kyoto)
- Nagata, Y., K. Miyauchi, and M. Takagi: The Unique degradation pathway of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology (July 9-13, 2000, Kyoto)
- Nagata, Y., K. Miyauchi, and M. Takagi: The Unique degradation pathway of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Biotechnology 2000 (September 3-8, 2000, Berlin, Germany)
- Damborsky, J., K. Hynkova, I. Smatanova, J. Marek, M. Wimmerova, M. Kutý, J. Kmunicek, M. Bohac, M. Prokop, J. Koca, and Y. Nagata: Computer-assisted engineering of haloalkane dehalogenases. Biotechnology 2000 (September 3-8, 2000, Berlin, Germany)
- 石栗義雄, 工藤洋, 河野昭一: 制御環境下における生活史形質の発現に関するタネツケバナ植物の種間比較. 日本植物学会第 64 回大会 (2000 年 9 月 29 日-10 月 1 日, 静岡)
- 宮内啓介, 李行錫, 福田雅夫, 永田裕二: *Sphingomonas paucimobilis* UT26 の $\gamma$ -HCH 分解下流経路 (hydroquinone pathway) とその制御因子の解析. 環境バイオテクノロジー学会第 1

1 回シンポジウム (2000 年 11 月 7 日, 東京)

井村喜之, 永田裕二, 源河浩之, 小松春伸, 津田雅孝: セバシア菌 *Burkholderia cepacia* のゲノム構造. 第 23 回日本分子生物学会年会 (2000 年 12 月 13-16 日, 神戸)

源河浩之, 井村善之, 永田裕二, 津田雅孝: トルエン分解トランスポゾン Tn4651 の部位特異的組換え系とその分布. 第 23 回日本分子生物学会年会 (2000 年 12 月 13-16 日, 神戸)

澤田宏之, 津田雅孝, 鈴木文彦, 畔上耕児, 斎藤成也: 植物病原性 *Pseudomonas syringae* 群細菌における ornithine carbamoyltransferase (OCTase) 遺伝子の動態: 水平移動とゲノム再編成. 微生物ゲノム研究のフロンティア第 3 回ワークショップ (2001 年 2 月 6-7 日, 木更津)

源河浩之, 津田雅孝: トルエン分解トランスポゾン Tn4651 の部位特異的解離系. 日本農芸化学会 2001 年度大会 (2001 年 3 月 24-27 日, 京都)

小川直人, 原奈穂, 津田雅孝, 長谷部亮, 宮下清貴: 2,4-D 分解菌 *Alcaligenes* sp. CSV90 株の調節因子 TfdS による *tfdA*, *tfdC* プロモーターの発現制御. 日本農芸化学会 2001 年度大会 (2001 年 3 月 24-27 日, 京都)

永田裕二, L. Trantirek, K. Hynkova, A. G. Murzin, A. Ansorgova, V. Sklenar, J. Damborsky: *Sphingomonas paucimobilis* UT26 由来の  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane dehydrogenase (LinA) の反応機構に関する研究. 日本農芸化学会 2001 年度大会 (2001 年 3 月 24-27 日, 京都)

李行錫, 福田良一, 永田裕二, 高木正道, 太田明德: 酵母を用いた内分泌攪乱物質の検出系の構築. 日本農芸化学会 2001 年度大会 (2001 年 3 月 24-27 日, 京都)

### 3 COEの形成に係る中核的研究機関支援プログラム

(1) 平成12年度研究高度化推進経費 ―― 計画書 ――

研究テーマ等	複合環境下における生物種の遺伝生態学的解析			年次計画	
				単年度	
研究分野	生物多様化機構	関連する分野	育種学, 生理学, 生態学, 分子生物学, 遺伝学		
研究の概要等	<p>来世紀には大規模な地球の環境変動が予想されており、それに伴う食糧・環境問題の深刻化を回避するために、複合環境や生物間相互作用を視野に入れた新たな遺伝生態研究の必要がある。植物は陸上に上がってから、多数の微生物や環境ストレスにさらされながら進化し、その過程で、微生物との共生・寄生関係、生殖形式、ストレス応答の多様化が生じてきた。</p> <p>本研究では、共生微生物・生殖様式・環境ストレス応答の多様化およびその分子機構を解明し、これら生物の環境変動に対する反応の変化をゲノム及び微細構造レベルで解明する。また、大規模な地球環境の変動を克服するためのゲノムレベルの基盤研究も開始する。</p>				
実施組織	所 属 ・ 官 職	氏 名	専 門 分 野	研究の役割分担	
	遺伝子機能制御研究分野 教授	亀 谷 壽 昭	植物育種学	環境ストレス耐性作物の作出	
	遺伝子適応生態研究分野 教授	高 橋 秀 幸	植物生理学	植物の環境ストレス応答	
	地圏環境遺伝生態研究分野 教授	南 澤 究	微生物生態学	共生微生物の多様性	
	遺伝生態情報システム研究分野 教授	津 田 雅 孝	微生物学	遺伝子情報の解析	
	遺伝子適応生態研究分野 助教授	東 谷 篤 志	分子生物学	減数分裂の分子制御	
	臨界環境遺伝生態研究分野 助教授	佐 藤 雅 志	植物生態遺伝学	生物の紫外線耐性機構	
	遺伝子環境応答研究分野 助手	宮 崎 厚	分子生物学	糸状菌の配偶子形成	
	遺伝子適応生態研究分野 助手	藤 井 伸 治	植物分子遺伝学	植物ホルモンの分子研究	
臨界環境遺伝生態研究分野 助手	日出間 純	環境植物生理学	植物の紫外線耐性機構		
本研究の特色 意義及び期待 される成果等	<p>本研究の特色は、乾燥、湿度、紫外線などの物理的環境因子のみでなく、微生物の共生・寄生といった生物環境因子や遺伝的多様化を生み出す生殖過程などに焦点を当て、本センターの研究者が保持するユニークな生物遺伝子資源を用いて分子レベルで遂行する点にある。</p> <p>本研究により、生物間相互作用や環境ストレス因子が生物の多様化にゲノムレベルでどのように関わっているかが明らかになり、また、大規模な地球環境変動下における生物の多様化を予測する道が開かれる。</p>				
研究テーマ等 の決定方法	<p>本センターの各研究部門担当者から重点共同研究の公募を行い、提出された申請書を基にCOEプロジェクト推進委員会で、複合環境や生物間相互作用を視野に入れた新たな遺伝生態研究という方針に基づき、研究テーマ・組織を決定した。</p>				

## (2) 平成12年度非常勤研究員

所 属	氏 名	任 用 期 間	研 究 課 題
遺伝子機能制御研究分野	落 合 利 紀	平成12年 5 月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	植物の性の分化に関する研究
遺伝子適応生態研究分野	陳 磊	平成12年 4 月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	ストレス耐性コムギの分子機構の解明に関する研究
地圏環境遺伝生態研究分野	齋 藤 明 広	平成12年 4 月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	根粒菌における共生遺伝子発現機構の解析
遺伝生態情報システム研究分野	井 村 善 之	平成12年 4 月 1 日 } 平成13年 1 月 3 日	生物間における情報伝達機構の解析

## (3) 平成12年度外国人招へい研究員

所 属	氏 名	任 用 期 間	研 究 課 題
臨界環境遺伝生態研究分野	孫 伝 清	平成12年 5 月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	紫外線に耐性なイネ遺伝資源の探索と紫外線耐性機構に関する分子遺伝学的研究

## (4) 平成12年度研究支援推進員

所 属	氏 名	任 用 期 間	職 務 内 容
遺伝子環境応答研究分野	千 葉 あけ美	平成12年 4 月 1 日 } 平成12年10月31日 平成12年12月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ヒゲカビの全系統の保存事業の補助</li> <li>・ヒゲカビ及びミズタマカビの突然変異株の作出</li> <li>・電子顕微鏡観察の実験補助</li> <li>・キチン合成酵素遺伝子のコンピュータ解析</li> <li>・データ処理のためのCG</li> </ul>
臨界環境遺伝生態研究分野	山 口 弘 子	平成12年 4 月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	<ul style="list-style-type: none"> <li>・紫外線UVBが植物・菌類の生育に及ぼす影響の解析</li> <li>・DNAの分離精製及びDNA損傷量の解析</li> <li>・実験器具類の維持・管理</li> </ul>
地圏環境遺伝生態研究分野	西 岡 き よ	平成12年 4 月 1 日 } 平成12年 9 月 29 日 平成12年12月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	<ul style="list-style-type: none"> <li>・根粒菌の分離、保存・配布</li> <li>・イネエンドファイトの分離・同定・保存・窒素固定能の探索</li> <li>・微生物からのDNA抽出とPCR分析</li> </ul>
	東海林 比呂子	平成12年 4 月 1 日 } 平成13年 3 月 31 日	<ul style="list-style-type: none"> <li>・微生物データベース作成とデータ処理</li> <li>・微生物培地の作成・DNAシークエンスの前処理及び系統樹の作成</li> </ul>

— Plant and Ultraviolet-B Radiation —

December 4 , 2000

Opening Address : Tadashi KUMAGAI (Institute of Genetic Ecology, Tohoku University)

O-1 Lars Olof BJORN (Institute of Plant Physiology, Lund University, Lund): Effects of Enhanced UV-B Radiation on Plants: An Overview.

Session 1: Change and Monitoring of Ultraviolet-B Radiation

O- 2 Nobuo MUNAKATA (Radiobiology Division, National Cancer Center Research, Tokyo): Biomonitoring of Genotoxic Solar-UV Radiation in Asia and Europe.

O- 3 Michiaki OKANO (Forest Environment Division, Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba): Measurement and Estimation of Irradiant UV-B in Alpine zone.

Session 2: Ecological Aspects

O-4 Michiaki OKANO (Forest Environment Division, Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba): Effects of Enhanced UV-B Radiation on Forest Vegetation.

O-5 Carlos BALLARE (Agricultural Plant Physiology and Ecology Research Institute, University of Buenos Aires, Buenos Aires): Responses to Solar ultraviolet-B Radiation in a Natural Ecosystem of Tierra del Fuego (Southern Argentina).

O-6 Joseph SULLIVAN (Department of Natural Research Sciences and Landscape Architecture, University of Maryland, Maryland): Response of Plants to Increased Levels of UV-B and Atmospheric CO<sub>2</sub> Enrichment.

O-7 Pirjo Huovinen (Department of Biological and Environmental Science, University of Jyväskylä): Underwater exposure and responses of algae to UV-B radiation

December 5, 2000

Session 3: Physiological and Biochemical Aspects

O-8 Yuichi HONDA (Faculty of Life and Environment Science, Shimane University, Matsue): UV-B Radiation Decreases Disease Resistance and Red Light Enhanced It in Certain Combinations of Plant and Pathogen.

O-9 Noriaki KONDO (Graduate School of Science, Tokyo University, Tokyo): Physiological Responses of Cucumber Seedlings to UV-B Irradiation.

O-10 Eva Hideg (Biological Research Center, Hungary): Detecting ROS in Plants under UV-B Stress.

Session 4: Regulation of Gene Expression and Molecular Effects

O-11 Ann Stapleton (Department of Biological and Environmental Sciences, University of Tennessee) : Genetic Dissection of Ultraviolet Radiation Responses in *Zea Mays*

O-12 Ake STRID (Department of Chemistry, Gotenburg University, Gotenburg): Towards the Understanding of Global Gene Regulation by UV-B.

O-13 Brian JORDAN (Institute of Food, Nutrition and Human Health, Massey University, Palmerston North): UV-B Stress Induced Changes in Gene Expression: The Role of Signal Transduction Pathways.

December 6, 2000

### Session 5: DNA Injuries and Photorepair I

O14 Alfred BATSCHAUER (Fachbereich Biologie / Botanik, Phillips-University Marburg, Marburg): *Arabidopsis* Class II DNA Photolyase: Chromophore Composition and Over-expression in plants.

O-15 Mugumi HADA (Institute of Advanced Energy, Kyoto University): DNA Photolyases in Higher Plants.

O-16 Akira YASUI (Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai): DNA Photolyases and CRY Proteins.

### Session 6: DNA Injuries and Photorepair II

O-17 Jun HIDEMA (Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai): Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photorepair Deficiency in UV-sensitive Rice Results from a Functionally Altered Photolyase.

O-18 Kazuo YAMAMOTO (Graduate School of Science, Tohoku University, Sendai): Photorepair of 6-4 Photoproducts in *Arabidopsis thaliana*.

O-19 Betsy SUTHERLAND (Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton New York): Molecular and Biological Strategies for Coping with Environmental Stress.

### Concluding Remarks

John SUTHERLAND (Biology Department of Science, Brookhaven National Laboratory, Upton New York)

### Closing Address

Kazuo YAMAMOTO (Graduate School of Science, Tohoku University)

P-1 Masaji Ono<sup>1</sup>, Yoshiaki Komoriya<sup>1</sup>, Yasumi Fujinami<sup>2</sup>, Masayuki Takada<sup>2</sup> and Kouichi Tashiro<sup>2</sup>: <sup>1</sup>Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Studies; <sup>2</sup>Center for Global Environmental Research, Institute for Environmental Studies: Inter-institutional UV monitoring network in Japan.

P-2 Ulf Johanson<sup>1</sup>, Terry V. Callaghan<sup>2</sup>, Mats Sponesson<sup>2</sup> and Lars Olof<sup>1</sup>: <sup>1</sup>Department of Plant Physiology, Lund University, Box 117, SE-22100 Lund, Sweden; <sup>2</sup>Abisco Scientific Research Station, SE-981 07 Abisco, Sweden and Department of Plant Ecology, Ecology Building, SE-223 62 Lund, Sweden: Responses of arctic plants to enhanced UV-B radiation and increased temperature in a two-year field experiment in Svalbard

P-3 Tadashi Kumagai, Jun Hidema, Hye-Sook Kang and Tadashi Sato: Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan: Effects of supplemental UV-B radiation on the growth and yield of two cultivars of Japanese lowland rice (*Oryza sativa* L.) under the field in a cool rice-growing region of Japan.

P-4 Jun Tian and Joe Sullivan: Department of Natural Resource Sciences and Landscape Architecture, University of Maryland, College Park, MD 20742: Field studies on the effects of UV-B radiation on leaf anatomy and morphology of *Liquidambar styraciflua* and *Pinus taeda*.

P-5 Shengbo Shi and Xinquan Zhao: Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese

Academy of Sciences, 59 Xi-Guan Avenue, Xining, Qinghai, 810002, People's Republic of China: Research of enhanced UV-B radiation on alpine meadow ecosystem and adaptation of alpine plants.

P-6 Hee-Kyoung Kang<sup>1</sup>, Gong-Young Bae<sup>2</sup>: <sup>1</sup>Department of Biological Science, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan; <sup>2</sup>Department of Environmental Horticulture, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea: Combined effects of UV-B radiation and CO<sub>2</sub> enhancement on *Cucumis sativus* L.

P-7 T.Sato<sup>1</sup>, Y.Fukuda<sup>2</sup>, M.Yano<sup>3</sup> and T.Kumagai<sup>1</sup>: <sup>1</sup>Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan; <sup>2</sup>Plant Breeding, Genetics and Biochemistry Division, International Rice Research Institute, MCPO Box 3127, 1271 Makati City, Philippines; <sup>3</sup>Rice Genome Research Program, National Institute of Agrobiological Resources, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba 390-8602, Japan: QTLs associated with tolerance to enhanced UV-B radiation in rice

P-8 Alenka Gaberscik<sup>1,2</sup>, Meta Voncina<sup>2</sup>, Tadeja Trost<sup>2</sup>, Mateja Germ<sup>1</sup>, Zdenka Mazej<sup>1</sup> and Lars Olof Bjorn<sup>3</sup>: <sup>1</sup>National Institute of Biology, Vecna pot 111, Ljubljana, Slovenia, <sup>2</sup>Department of Biology, Biotechnical faculty, Vecna pot 111, Ljubljana, Slovenia, <sup>3</sup>Department of Plant Physiology, Lund University, Box 117, Se-22100 Lund, Sweden: Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with enhanced UV-B radiation.

P-9 Atsushi Tanaka<sup>1</sup>, Ayako Sakamoto<sup>1</sup>, Yasuhito Ishigaki<sup>2</sup>, Osamu Nikaido<sup>2</sup>, Sun Guakin<sup>1</sup>, Yoshihiro Hase<sup>1</sup>, Naoya Shikazono<sup>1</sup>, Shigemitsu Tano<sup>1</sup> and Hiroshi Watanabe<sup>1</sup>: Department of Radiation Research for Environment and Resources, Japan Atomic Energy Research Institute, Watanuki-machi 1233, Takasaki, Gunma, 370-1292, Japan; <sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Kanazawa University, Takaramachi 13-1, Kanazawa, 920-0934, Japan: UV-B-resistant mutation induced by ion beams in *Arabidopsis thaliana*.

P-10 Linda Pope and Joe Sullivan: Department of Natural Resource Sciences and Landscape Architecture, University of Maryland, College Park, MD 20742: Diurnal patterns of DNA damage in two soybean cultivars with contrasting phenolic chemistry.

P-11 Hiroshi Hada<sup>1</sup>, Jun Hidema<sup>1</sup>, Tadashi Sato<sup>1</sup>, Masashi Maekawa<sup>2</sup> and Tadashi Kumagai<sup>1</sup>: <sup>1</sup>Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan; <sup>2</sup>Research Institute for Bioresources, Okayama University, Okayama, Japan: Sensitivity of an anthocyanin accumulated near isogenic line of rice to UVB radiation.

P-12 Hitomi Taira and Satoru Taguchi: Soka University, 1-236 Tangi-Cho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan: Effects of UVR on UV absorbing compounds and photosynthetic pigments of marine dinoflagellate, *Scrippsiella sweeneyae* Balech.

P-13 Kumi Yoshida<sup>1</sup>, Mihoko Mori<sup>1</sup>, Osamu Nikaido<sup>2</sup> and Tadao Kondo<sup>3</sup>: <sup>1</sup>Graduate School of Human Informatics, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan; <sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa 920-0934, Japan; <sup>3</sup>Chemical Instrument Center, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8602, Japan: UV-B protection effect of polyacylated anthocyanin.

P-14 Kouki Watanabe<sup>1</sup>, Takeshi Shimizu<sup>1</sup>, Mineo Senda<sup>2</sup>, Ryuji Ishikawa<sup>1</sup>, Takeo Harada<sup>1</sup>, Minoru Niizeki<sup>1</sup> and Shinji Akada<sup>2</sup>: <sup>1</sup>Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University; <sup>2</sup>Gene Research Center, Hirosaki University: A subfamily of soybean MYB29 showing UV-B responsive expression.

- P-15 Takako Takanami, Akiyuki Mori, Hideyuki Takahashi and Atsushi Higashitani: Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai 980-8577, Japan: Hyper-resistance of meiotic cells to radiation, but not UV, due to a strong expression of a single recA-like gene in *Caenorhabditis elegans*.
- P-16 Hidetoshi Aoki, Takako Takanami, Hideyuki Takahashi and Atsushi Higashitani: Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai 980-8577, Japan: Characterization of Ce-atl-1, an ATM-like gene from *Caenorhabditis elegans*.
- P-17 H. Ikehata and T. Ono: Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Seiryomachi 2-1, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan: In vivo analysis of UV-induced mutation with transgenic mouse.
- P-18 Atsuko Takeuchi, Takuya Yamaguchi, Jub Hidema and Tadashi Kumagai: Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan: UVB radiation and protein turnover of rubisco and LHCII in rice leaves.
- P-19 Takahiro Fujibe<sup>1</sup>, Yuichi Takeuchi<sup>2</sup>, Kotaro T. Yamamoto<sup>1</sup>: <sup>1</sup>Division of Biological Science, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Sapporo, 060-0810 Japan: <sup>2</sup>Department of Bioscience and Technology, School of Engineering, Hokkaido Tokai University, Sapporo, 005-8601 Japan: Effects of sucrose in growth medium on UV-B-Induced Damages in *Arabidopsis* leaves.
- P-20 Lars Olof Björn and Ting Wang: Department of Plant Physiology, Lund University, Box 117, SE-221 00 Lund, Sweden: UV-B dependent and UV-B independent vitamin D formation in plants and lichens.
- P-21 Susanne Widell, Ting Wang, and Lars Olof Björn: Department of Plant Physiology, Lund University, Box 117, SE-221 00 Lund, Sweden: Ultraviolet-induced absorbance changes in isolated plasmalemma membranes from tomato leaves.
- P-22 John R Gittins<sup>1</sup> and Åke Strid<sup>1,2</sup>: <sup>1</sup>Department of Chemistry, Unit of Biochemistry and Biophysics, Göteborg University, P.O. Box 462, S-405 30 Göteborg, Sweden; <sup>2</sup>Department of Natural Sciences, Units of Chemistry, Biology and Environmental Sciences, Örebro University, S-70182 Örebro, Sweden : Analysis of a stress responsive promoter from *Pisum sativum*.
- P-23 Won Yong Song, Jun Gyo In, Yong Pyo Lim<sup>1</sup> and Kwan Sam Choi: Division of Applied Biology & Chemistry, <sup>1</sup>Division of Plant Resources, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea: Cloning and characterization of UVB-inducible CHS gene from cell suspension culture system in *Vitis vinifera* L.
- P-24 Jun Kumagai<sup>1</sup>, Hiromi Katoh<sup>1</sup>, Tetsuo Miyazaki<sup>1</sup>, Jun Hidema<sup>2</sup> and Tadashi Kumagai<sup>2</sup>: <sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-Cho Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan: <sup>2</sup>Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan: Differences in the sensitivity to UVB radiation of two cultivars of rice (*Oryza Sativa* L.) based on observation of long-lived radicals.
- P-25 Shinya Takahashi<sup>1</sup>, Nobuyoshi Nakajima<sup>2</sup> and Noriaki Kondo<sup>1</sup>: <sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan: <sup>2</sup> Biotechnology Research Team, Division of Regional Environment, National Institute for Environment Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, 305-0053 Japan: Expression and physiological significance of photolyase in cucumber

plant.

P-26 Shaoshan Li, Markus Paulsson and Lars Olof Björn: Department of Plant Physiology, Lund University, Box 117, SE-221 00 Lund, Sweden: Temperature-dependent formation and photorepair of DNA damage induced by UV-B radiation in suspension-cultured tobacco cells.

P-27 Masashi Tanaka, Satoshi Nakajima and Kazuo Yamamoto: Biological Institute, Graduate School of Science, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan: Effects of Photoreactivation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers and Pyrimidine (6-4) Pyrimidone Photoproducts on Ultraviolet Mutagenesis in SOS-Induced Repair Deficient *Escherichia coli*.

P-28 Takashi Watanabe, Tatsuo Nunoshiba, Masakado Kawata and Kazuo Yamamoto: Biological Institute, Graduate School of Science, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan : Effect of the Flanking Base on the 7,8-Dihydro-8-oxoguanine-Induced Base Substitution.

P-29 Junichi Kihara<sup>1</sup> and Tadashi Kumagai<sup>2</sup>: <sup>1</sup>Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Matsue 690-8504, Japan; <sup>2</sup>Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan: Novel genes induced by UVB radiation in rice brown spot fungus *Bipolaris oryzae*.

P-30 <sup>1</sup>Tadashi Ueda, <sup>2</sup>Tadashi Sato and <sup>1</sup>Masahiro Yano: <sup>1</sup>National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba 305-8602, Japan; <sup>2</sup>Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan: Toward the map-based cloning of QTL for UVB sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.).

P-31 Hiroshi Ishida, Amane Makino and Tadahiko Mae: Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai 981-8555, Japan: The large subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase is broken down at Gly-329 by reactive oxygen species in the lysates of wheat chloroplasts.



## 第3章 共同研究等



## 1 平成 12 年度ワークショップ報告

### ワークショップ「遺伝情報のダイナミズムとその分子機構」を終えて

東北大学遺伝生態研究センター 津田 雅孝

平成 12 年 9 月 21-22 日の 2 日間、東北大学遺伝生態研究センター会議室で「遺伝情報のダイナミズムとその分子機構」というタイトルでワークショップを開催いたしました。

この 10 年ほどの間に、各種生物の遺伝学的及び分子生物学的解析、そしてゲノム解析が格段に進み、その速度が今後飛躍的に加速することは確実です。現在までに得られた研究成果はすでに膨大なものになっていますが、細胞や個体をシステムとして捉えて、遺伝子のレベルから様々な生物現象を包括的に追求することが可能になってきました。その結果として、各生物が持つ遺伝情報は細胞内での構造的な可塑性と細胞間や個体間での水平伝播を従来想定されていたよりも頻繁におこなっていることが推定されています。また、環境変動やある生物単位が出すシグナルに対して他の生物が遺伝子の包括的な発現制御を通じて応答・適応する遺伝情報の機能的ダイナミズムも明らかになりつつあります。

このような状況を鑑み、本ワークショップでは、遺伝情報の構造的ダイナミズムと機能的ダイナミズムの双方に関しての話題提供を企画しました。ゲノムサイエンスの世界では多様な形質遺伝子が細胞内での重複後に機能分化したり種を越えて水平伝播してきたと情報学的観点から提示されていますが、このような提示に対する実験的証拠は希薄です。一方、本センターではすでに 30 回近くワークショップが開催されてきましたが、環境保全・浄化に有用な細菌や医学的に重要な細菌が取り上げられたことがほとんどありませんでした。そこで、本ワークショップではこれら細菌の持つ形質遺伝子の動態とこれら動態を規定している分子機構に焦点を当てました。具体的なテーマのひとつは、広範な環境細菌種が持つ難分解性化合物分解遺伝子の動態、特に再編成現象や多様化、水平伝播、そして当該遺伝子の拡散・流布や進化の機構と自然生態系での挙動です。他のテーマは、病原細菌を対象にして、病原性関連形質をコードしているファージやプラスミドなどの細胞間を渡り歩くことのできる可動遺伝因子や病原大腸菌のゲノム構造です。

一方、遺伝情報の機能的ダイナミズムについては、主として植物に焦点を当てました。ウイルスや植物病原細菌の植物への感染は、双方にとっての劇的な環境変動であると捉えることができます。そこで、このような「環境変動」時に、植物と病原体のそれぞれが示す包括的な応答と、このような応答を司るシグナル伝達の分子機構に関する遺伝子レベルからの研究に注目しました。動物病原微生物や動物側の防御の研究に比べると、植物病原微生物の病原因子やこれら因子に対する植物側の防御の分子機構の研究はたいへん遅れていましたが、最近の植物遺伝子の発現制御ネットワークの研究の飛躍的進展に伴い、急速に進んでいます。本センターでのワー

ワークショップで植物病原微生物を取り上げましたのは10年以上も前のことでしたので、今回の遺伝情報の機能的ダイナミズムに関しては、植物病原微生物の病原因子とこれら因子に対する植物側の防御を取り上げました。以上の内容を通じて、様々な生物種の環境適応や進化に対する遺伝情報のダイナミズムの役割を理解し、さらに、自然生態系での遺伝情報のダイナミズム把握の糸口を見出そうと意図いたしました。

生命科学諸分野での遺伝子レベルからの研究では、研究者自身の対象としている生物現象のみではなく、一見関連性のない他の生物現象の研究をも熟知しておくことが、研究者自身の研究進展のブレークスルーに繋がるが多くなりつつあります。「遺伝生態」という学際的な研究領域の確立と進展を目指している私共にはこのような基本姿勢がひととき重要であると認識いたしております。本ワークショップでは、環境微生物学、医学細菌学、微生物生態学、植物病理学、植物生理学、植物育種学等の多方面の専門家にご講演をいただき、通常の学会では決してできない経験ができ、この経験を私共の今後の研究に積極的に取り入れていきたいと考えております。

ご多忙中にもかかわらず、ワークショップの意図をご理解いただき、御講演を御快諾していただきました先生方、ワークショップでの司会を引き受けていただきました本センターの塩月明先生、そしてワークショップの準備を担当していただきました本センター共同利用掛の皆様のお厚情に、この場を持ちまして御礼申し上げます。また、ワークショップには、遠方からの方々も含め、予想以上の学内外の方々に参加していただき、たいへん恐縮いたしております。なお、話題を提供していただいた各先生方のご講演内容は本年3月にIGEシリーズ29として刊行予定です。

## 2 平成 12 年度重点共同研究報告

平成 12 年度 遺伝生態研究センター重点共同研究および中核的研究機関支援プログラム

### 「遺伝的多様性を獲得するための配偶子形成における生物分子機構」 (最終報告)

研究代表者	東北大・遺生研	高橋 秀幸
研究組織	岩手大・農	渡辺 正夫
	東京大・分生研	土本 卓
	愛知淑徳大	堀田 康雄
	大阪教育大	鈴木 剛
	農水省・農研セ	川岸万紀子
	東北大・遺生研	宮寄 厚
	東北大・遺生研	塩月(菅野)明
	東北大・遺生研	東谷 篤志
	東北大・遺生研	藤井 伸治

はじめに

生物が多様な環境に適応し進化してきた過程は、それぞれの生物が独自の遺伝的多様性を獲得してきた結果であり、また、その遺伝的多様性の獲得機構は生殖過程にもっとも顕著に見られる。有性生殖を行う生物は、その生殖細胞形成時に減数分裂を行い、配偶子の接合により遺伝的多様性を高めている。また減数分裂の過程では、倍加した姉妹染色体間での遺伝子組換えが高頻度に生じ、子孫の遺伝的多様性はさらに高まる。また幾つかの植物では、自分の花粉と受粉することを避けるため、まさしく遺伝的多様性を獲得するために自家不和合性という現象や、雌雄花の性分化が生じることが知られている。

一方で、生殖細胞形成の過程は、体細胞組織の形成過程に比べ、様々な環境ストレスによって、著しく影響を受け、生殖不全（不稔）となることが多くの生物種で知られている。そこで、本重点研究では、このような生物の巧みな遺伝的多様性の獲得機構を分子のレベルで理解するとともに、地球環境の変動が種の維持におよぼす影響についても明らかにすることを究極の目標として、平成 10 年度から 12 年度の 3 年間、延べ 11 の研究グループでの全国共同重点研究を展開した。また本重点研究の一環として、10 年度には「生物の生殖と遺伝的多様性」、11 年度には「Perspective of Plant Research in Space」と題するワークショップを開催することができた。そして、本年度の成果は以下の通りである。

これら共同研究をすすめる上で、御援助、御協力いただいた共同研究者ならびに関係諸氏に深くお礼申し上げますとともに、なかでも 3 年間を通して、外部研究評価委員会をお引き受けいただきました東北大学大学院農学研究科の西尾剛先生、国立遺伝学研究所の倉田のり先生には、心から御礼申し上げます。また、本プロジェクトの研究分担者としてのみならず、研究者間の連絡、ワークショップの企画、成果のまとめにおいても多大な協力をいただきました本センターの東谷篤志先生に感謝します。

## 平成 12 年度 研究成果概要

### 1. 減数分裂過程の制御機構ならびに花粉形成時の高温障害

#### — 線虫とオオムギを用いた研究 —

東谷 篤志・青木 秀年・高浪 タカ子・阪田 忠・森 亮之・

笹川 洋平・安彦 真文・高橋 秀幸 (東北大・遺伝生態研究センター)

遺伝的多様性の獲得メカニズムと環境ストレスの生殖細胞形成に及ぼす影響を理解することを究極の目標として、私たちは、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) やオオムギを材料に用い、減数分裂過程での遺伝子組換え機構とその制御系、ならびに生殖細胞形成に対する高温ストレスならびに放射線、紫外線の影響について研究を行った。

まず線虫において、相同的遺伝子組換えに関わる大腸菌 *recA* 様遺伝子は、1種類しか見出せず (*Ce-rdh-1* : *C. elegans rad51, dmc1/lim15 homolog 1* と命名)、本遺伝子の発現を RNA interference 法で抑制した結果、正常な減数分裂ディアキネシス期への移行が妨げられ、染色体がランダムに絡まった状態となり、減数分裂が完了できないこと、ならびに放射線に高感受性となることを明らかにした。また、線虫の減数分裂パキテン期の核は、放射線に大変強い抵抗性を示し、その抵抗性は相同染色体間遺伝子組換えに関わる *Ce-rdh-1* などの酵素群の高い活性に起因することを明らかにした。また、ヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子 *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated gene*) と相同的な線虫遺伝子 *Ce-atl-1* (*C. elegans ATM/ATR like 1*) が、体細胞分裂ならびに減数分裂時の染色体の維持・安定性に重要な役割をすること、および蛋白質リン酸化酵素をコードする *Ce-chk-2* が、減数分裂期の相同染色体間の対合の制御に必須な遺伝子であることを見出した。

次に、オオムギの生殖成長過程における穎花の分化初期の時期は、高温に最も感受性が高く、5日間の高温処理 (30℃昼温/25℃夜温) を行うことで、その後の花粉形成が完全に進行しなくなる生殖障害を見出した。そこで、本系を用い、コントロールと比較することで高温障害時に発現誘導される遺伝子群について、SAGE (serial analysis of gene expression) 法により解析を行った。その結果、穎花の分化初期の高温処理により花粉形成が完全に阻害された際、遺伝子発現が誘導される数種類の遺伝子の tag 配列を明らかにした。

### 2. 高等植物における生殖器官関連遺伝子の機能解析

渡辺 正夫・遠藤 誠 (岩手大・農) 研究協力者 (松原 均・伊東 明子

・高田 美信・二宮 知恵・柿崎 智博 : 岩手大・農)

高等植物の生殖器官特異的遺伝子とそれ以降に起きる生殖過程における機能を網羅的に解析することを目的としている。生殖過程における受粉反応系のモデルとしてアブラナ科植物の自家不和合性反応を解析し、また、生殖器官特異的遺伝子を大量に単離するために、DNA マイクロアレイによる発現解析を行った。

アブラナ科植物の自家不和合性 : アブラナ科植物の *Brassica campestris* を材料に、S 遺伝子座上の自家不和合性認識物質について、解析してきた。昨年度までの研究において、SP11 が花粉側の S

遺伝子であることを奈良先端大と共同して明らかにし、SRK が柱頭側の S 遺伝子であることを採種研と共同して明らかにした。また、花粉側 S 因子である SP11 に関して、14 の新規 SP11 対立遺伝子を単離・解析し、柱頭側の SLG, SRK に比べてきわめて変異していた。さらに、SP11 が柱頭側の SRK と共進化していることも明らかにした。

ミヤコグサ生殖器官特異的遺伝子の大量解析：ミヤコグサ生殖器官 DNA マイクロアレイ解析によって開花直前の葯において特異的なシグナルを示すクローンが 76 クローン見出された。これら 76 クローンについて、遺伝子の相同性から整理すると、約半数が相同性が見られない遺伝子であった。さらに、すでに葯特異的遺伝子として他植物で同定されているペクチンメチルエステラーゼ遺伝子、ポリガラクトクロナーゼ遺伝子、アスコールビン酸オキシダーゼなどが、ミヤコグサにおいても葯特異的に発現していることを確認した。このことから、DNA マイクロアレイが微小な器官特異的遺伝子を同定する上で有効であることを明らかにした。

### 3. キュウリの花の雌雄性分化におけるエチレンの分子作用機構の解明：雄性両性同株型キュウリにおける M ローカスとエチレンによる性表現の制御

山崎 聖司・藤井 伸治・高橋 秀幸（東北大・遺伝生態研究センター）

雌雄同株植物であるウリ科植物の花の性表現は、植物ホルモンの一つであるエチレンによって変化することが知られている。つまり、エチレン処理により雌性化が促進され、逆にエチレン阻害剤処理により雄性化が促進される。本研究では、ウリ科植物の花の性分化におけるエチレンの役割、およびその作用機構を分子レベルで明らかにする目的で、キュウリを用いて実験を行い、現在までに以下の成果を得ている。

キュウリの花の性表現は、遺伝的に *F* および *M* ローカスによって制御されている。すなわち、これらのローカスの優劣の組み合わせによって、雌性型 (*M-F*)、混性型 (*M-ff*) および雄性両性同株型 (*mfff*) の異なる性表現型品種が生み出される。また、一般に雌性型キュウリは、混性型キュウリに比べて多くのエチレンを発生することが知られている。本研究において、雄性両性同株型キュウリの茎頂におけるエチレン発生量と *CS-ACS2* 遺伝子の発現量は、ともに混性型キュウリと同程度であり、且つ、雌性型キュウリに比べて低いことが明らかになった。また、エチレンは、雌性型キュウリでは雄蕊の発育を抑制するものの、雄性両性同株型キュウリでは抑制しないことが明らかになった。さらに、*CS-ETR2*, *CS-ERS* および *CS-ACS2* 遺伝子発現は、雌性型キュウリと混性型キュウリの茎頂ではエチレン誘導性を示すが、雄性両性同株型キュウリの茎頂ではエチレン誘導性を示さないことが明らかになった。また、低濃度のエチレン存在下での胚軸の伸長阻害は、混性型キュウリや雌性型キュウリに比べて雄性両性同株型キュウリで小さいことが明らかになった。これらの結果は、雄性両性同株型キュウリでのエチレン応答性は、混性型キュウリや雌性型キュウリに比べて低下していることを示している。このことは、キュウリにおいて、エチレンシグナルが *M* ローカスの産物を介して雄蕊の発育を抑制することを示した初めての結果である。以上のことから、雄性両性同株型キュウリは、花の性決定時の *M* ローカスの機能を解析する上で、興味深い品種であることが示された。

#### 4. 食用アスパラガスの性決定機構の解析

—BAC ライブラリーの作成および花器官決定遺伝子の単離解析—

菅野 明 (東北大・遺伝生態研究センター)・鈴木 剛 (大阪教育大)

食用アスパラガスは雌雄異株植物で、1対の性染色体(雌XX型・雄XY型)により性が決定されている。本研究では、食用アスパラガスの性分化機構を明らかにするために花器官決定遺伝子の単離解析を行うとともにマップベースドクローニングによる性決定遺伝子単離の一環として BAC ライブラリーの作成を試みた。

花器官決定遺伝子は、雌蕊及び雄蕊の器官形成に関与するクラス B(DEF-like、GLO-like 遺伝子)及びクラス C (AG-like 遺伝子)に属する遺伝子を食用アスパラガスから単離した。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、これらの遺伝子は花特異的に発現していた。現在 in situ ハイブリダイゼーションを行っている。

一方アスパラガス BAC ライブラリーの作製では、食用アスパラガスの播種後 3-4 週間の芽生えから核を単離し、高分子量 DNA を含むゲルプラグを作製した。非消化及び HindIII 完全消化の DNA をパルスフィールド電気泳動し、量と質ともに条件を満たしていることを確認した。150kb ほどの断片が多く含まれるような HindIII の部分消化条件を検討したところ、2-8Units/ul で 37°C1 時間処理が適当だと考えられた。今後は、最適条件で部分消化後、BAC ベクターへのライゲーションを試みる。

#### 5. ペチュニアの生殖器官形成に関与する遺伝子群の解析

土本 卓 (東大・分子細胞生物学研究所)

ペチュニアの花の器官形成に関する分子機構を解明することを目的として、ペチュニアの花のホメオティック遺伝子とそのホモログの産物間の相互作用の解明、class A タイプ遺伝子 *PhCLF1* の単離同定、および class C 遺伝子 *pMADS3* と異種植物の class C 遺伝子との作用の違いの解明を目標とした研究を行っている。

本年度は、酵母の two-hybrid 系により、ペチュニア class B 遺伝子の 2 種類のパラログの産物が、class B 遺伝子の場合とは異なった遺伝子産物と相互作用をすることを明らかにした。また、シロイヌナズナの *CURLY LEAF* 遺伝子のペチュニアオルソログ、*PhCLF1*、の全 cDNA 配列を決定し、*PhCLF1* が alternative splicing により転写後調節を受けていることを示唆する結果を得た。一方、タバコとキンギョソウの class C 遺伝子、*NAG1* と *PLE*、を CaMV 35S プロモーターを用いて発現させた形質転換ペチュニアを作成したが、*35S::pMADS3* ペチュニアと同様の花卉上部から葯への変化を示し、これらのホメオティックな作用が *pMADS3* と同じであることが示唆された。

#### 6. 減数分裂時遺伝子組み換えの分子機構と植物の多様化

堀田 康雄 (愛知淑徳大)

ユリ花粉母細胞の減数第一分裂前期から単離した、18 個の cDNAs の遺伝子とそのプロモーターの構造決定と特性を解析してきた。このうち、*LIM15* に関してシロイヌナズナから相同遺伝子 *ArLIM15* を単離して、プロモーター領域の解析を完了した。Hsp 相同遺伝子である *LIM10* と *LIM18* についても

プロモーター解析を完了した。Lim15 は、ユリでは未確認である他の蛋白質分子と協力して組み換えの初期反応を制御し、Hsp 蛋白質はその構造を修飾する可能性があるため、これらの遺伝子を pBR121 に組み込み、体細胞や組み換えが低下しているユリ花粉母細胞に導入して、染色体対合とキアズマ形成への影響を調査している。これらの遺伝子導入が成功すれば、花粉の遺伝的多様性を制御する道が開ける。さらに体細胞の核に導入し発現が可能となれば、体細胞の多様性の誘導も可能になる。

減数分裂特異的に発現する遺伝子群の他に、特異的ではないが発現が増加する転移や修復など組み換えにも関与する遺伝子を見つけてきているが、この中より Lim15 蛋白質と Two-hybrid 形成法などで関連を示す遺伝子を選択している。高頻度で組み換えをおこす減数分裂前期の遺伝子の多重導入とそれに依る *in vivo* 遺伝子の活性化が、花粉形成過程の各段階での遺伝子発現に及ぼす効果を細胞学的と分子生物学的方法からの解析に入っている。

## 7. イネの生殖器官に発現する遺伝子群の同定と解析

川岸 万紀子（農水省・農業研究センター）

生殖生長過程の制御機構を分子レベルで解明することを目的として、イネを材料に、関連遺伝子の網羅的な探索を試みている。この探索は、生長期の生殖器官において特異的に発現する、あるいは、他生物のホモログ遺伝子が生殖過程において機能をもつ、のいずれかの条件を満たすものを対象としている。今年度は、前者に関しては、減数分裂期にあたる未成熟のイネ蒴を収集し、cDNA ライブラリーを構築した。現在、ライブラリー中の cDNA クローンをランダムに選択・単離し、塩基配列解析を行うとともに、*in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を進めている。後者に関しては、酵母減数分裂制御因子 Me12 に類似した *OML1* 遺伝子、蛋白質核輸送に関わる因子 Ran のイネホモログ *OsRan1* 遺伝子を同定した。一方、得られた遺伝子の機能解析も開始した。*OsRan1* 遺伝子については、正常型分子の機能を抑制するドミナントネガティブ変異型遺伝子を導入した形質転換体の作出に成功した。この形質転換体は、カルスでは正常に生育するのに対し、植物体の器官分化や発達には著しい障害を示した。器官分化における詳細な解析を行うために、野生型及び変異型 *OsRan1* をシロイヌナズナに導入したところ、変異型の場合のみ、花成早化の表現型が観察された。この結果は、花成に関与する因子が、核輸送の段階で制御されている可能性を示唆しており、興味深い。

# 「遺伝情報のダイナミズム」

(中間報告)

研究代表者	東北大・遺生研	津田 雅孝
研究組織	東北大・院農	江原 淑夫
	九大・院生資環	古川 謙介
	宮崎医大	林 哲也
	東北大・遺生研	永田 裕二
	群馬大・医	谷本 弘一
	東大・院農生	中園 幹生
	農水省・生物研	南 栄一

## 1. はじめに

自然環境においては、遺伝情報は従来考えられていた以上に細胞内での構造的な可塑性と種間での水平伝達をも含めた頻繁な交換を示すと想定され、このような遺伝情報の構造的ダイナミズムが進化的祖先を共通にする遺伝子の広範な拡散・流布とともに環境変動に対する迅速で柔軟な適応・進化に大きく寄与している。一方、環境変動やある生物単位が出すシグナルによって、他の生物は遺伝情報の包括的な発現制御により応答している遺伝情報の機能的ダイナミズムが存在する。本研究では、環境細菌が持つ難分解性化合物分解遺伝子群と病原細菌が持つ病原性関連遺伝子群の構造的可塑性と、可動性、水平伝播を記載するとともに、これらの現象を規定する分子機構の解明をめざしている。また、大規模な環境変動時や植物病原体の植物感染時に植物個体及び細胞が示す包括的な応答とこのような生物反応に至るシグナル伝達系の分子機構を追求することで、遺伝情報の機能的ダイナミズムの研究を実施している。

## 2. 研究経過と研究成果

$\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH)分解細菌が有する $\gamma$ -HCH 分解遺伝子群は、比較的最近、細胞内外の遺伝的再編成化現象を経て構成されたことが示唆され、*linA* 遺伝子産物の $\gamma$ -HCH dehydrochlorinase は、他に報告例のないタイプの脱塩化水素酵素であり、反応機構・起源が全く不明であった。コンピューター解析による立体構造予測や部位指定変異導入実験などにより、LinA はある種の脱水酵素から脱塩化水素酵素に進化してきた可能性が示唆された。一方、*linA* 遺伝子周辺領域の解析により、*linA* は単独で $\gamma$ -HCH 分解菌に水平伝播された遺伝子である可能性が高いことが示され、また、現段階では機能していないが、 $\gamma$ -HCH 分解代謝系酵素活性のポテンシャルをもつ蛋白質をコードする領域が *linA* 近傍に存在することも判明した。

*Pseudomonas putida* KF715 株染色体由来でピフェニル/サリチル酸代謝をコードする新規な接合型分解系トランスポゾン *bph-sal* エLEMENTはそのサイズが 90 kb と大きく、高頻度に他の土壌細菌へ接合伝達した。KF715 株のゲノムライブラリーを作製し、このELEMENTを含む複数のコスミドクローンの解析から、ピフェニル代謝をコードする遺伝子群 12 kb、サリチル酸代謝をコードする遺伝子群 6 kb を特定した。この両遺伝子クラスター間は約 10 kb であった。*bph* 遺伝子群の上流約 40 kb の塩基配列を決定したところ、このELEMENTの可動化に関与すると考えられるインテグラーゼの遺伝子が存在した。また、複数の挿入配列(IS)や繰り返し配列やグループIIイントロンの存在が認められた。

トルエン分解遺伝子群を担う 56 kb の Tn3 型トランスポゾン Tn4651 の転移反応の後半過程で、同一分子上の 2 コピーの *res* 間での部位特異的解離には、*res* に隣接する *tnpS* と *tnpT* の両遺伝子産物を必要とする。1 コピーずつの *res* を保持する 2 種のプラスミドを用いた実験から、TnpS は 2 つの *res* 間で部位特異的組込み反応をも触媒することを見出し、本反応に TnpT は関与しなかった。また、ナフタレン分解遺伝子群を担う 37.5 kb の Tn3 型トランスポゾン Tn4655 の部位特異的解離系の解離酵素 TnpR は部位特異的インテグラーゼファミリーに典型的なアミノ酸配列を持つとともに部位特異的組込み能をも有していることが判明した。一方、土壌ならびに海洋由来の 77 の細菌株のうち 33 の菌株は Tn4651 の転移関連遺伝子と相同領域を保持することが示唆された。

種々の病原性大腸菌の遺伝的多様性をゲノム生物学的な観点から解明するために、病原性大腸菌 O157 堺株の全ゲノム配列を決定し、非病原性大腸菌 K-12 のゲノム配列と比較した結果、大腸菌ゲノムの基本骨格と考えられる 4.1 Mb の配列を見出すとともに、O157 に特異的に存在する 1.4 Mb もの配列を同定した。この菌株特異的配列は様々なサイズの断片として染色体上に散在し、その多くは外来性であることが判明した。これらの知見から、各種大腸菌の全ゲノムを共通のプライマーセットを用いた PCR 法 (whole genome PCR scanning 法) によってシステマティックに解析できると考え、大腸菌ゲノムを全ゲノムレベルで解析できるプライマーを 560 組を作成後、由来の異なる 10 株の O157 について、その解析を試みた。完全な解析はまだ終了していないが、菌株間には予想以上にゲノムの多様性が存在し、本法によって菌株特異的な配列の存在部位が容易に同定できることが確認できた。

腸球菌由来の接合伝達性プラスミド pMG1 が腸球菌間での接合伝達時において受容菌側で働く遺伝子の同定と機能の解明をめざした。このためにまず、接合伝達時に供与菌内で発現制御されるプラスミド遺伝子を検索したところ、プラスミド遺伝子 75ORF4 が正常な受容菌との接合伝達時に発現抑制されることを見出した。本遺伝子の発現様式を指標とし、熱処理と抗生物質処理によって殺菌した受容菌が供与菌の持つ接合伝達性プラスミドの伝達を開始させることができるか調べたところ、接合伝達を起こさせるためには受容菌は生きている必要があることがわかった。一方、プラスミドの伝達頻度が低下した受容菌の突然変異株を単離した。そのうちの

幾株では接合伝達において、供与菌内のプラスミド遺伝子 75ORF4 の発現抑制をおこなった。この知見から、プラスミドの接合伝達に必要な受容菌遺伝子の存在が示唆された。

ウイルスに感染した植物はモザイク症や過敏感反応による壊死病斑を形成するが、その病変の原因となるウイルス側因子と対応する植物側因子の同定と、両者の相互反応の機構を分子レベルで解明するために、キュウリモザイクウイルス(CMV)とそれに全身感染するタバコおよび過敏感死するササゲを用いた実験をした。タバコにおけるモザイク病徴の強弱は CMV の外被タンパク質の 129 番目のアミノ酸により決定される。すなわち Pro であれば黄色モザイクが、Ser であれば緑色モザイクとなる。またこれに対応する植物側因子としてはタバコバーレー種の二重劣性遺伝子 *yb1* と *yb2* が関わっている。CMV の外被タンパク質に特異的に結合する宿主タンパク質を酵母の two hybrid 法で検討した結果、その1つが CaMK グループのセリノトレオニンキナーゼである SNF1 関連のものであることが推定された。ササゲの過敏感死にはウイルスの複製酵素の1つである 2a タンパク質の 631 番目のアミノ酸により決定される。さらにこれに対応する植物側遺伝子 *Cry* の同定を進めている。

イネ細胞においてはエリシター→タンパク質リン酸化→細胞質酸性化→EL2、EL3 等の酸応答性遺伝子発現という経路が推定されている。新規エリシター応答性遺伝子 *OsSc-1* はこの経路で発現が誘導されるが、EL5、*OsSc-2*、*Clone5* は細胞質酸性化非依存性であった。これらのうち *OsSc-2* は過酸化水素処理により発現が誘導された。*OsSc-1*, 2 は動物の STAT と同様のドメイン構造をもった転写因子、また *Clone5* は動物の補体と類似の構造を有するものであった。イネ植物体は根で認識したエリシターシグナルを別の物質に転換して緑葉等の上部器官にシステミックに伝達し、器官、細胞特異的な遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。

遺伝子の中には、本来の役割のほかに、ある生物種が環境の変動等に適応・進化するために独自に獲得した役割を併せ持つ場合があり、その 1 例がイネ科植物のアルデヒド脱水素酵素(*Aldh2*)遺伝子である。イネ科の中で、トウモロコシの *Aldh2* 遺伝子は細胞質雄性不稔の稔性回復遺伝子 *rf2* として機能している。一方、イネの *Aldh2* は冠水抵抗性に関与しており役割が植物種によって異なる。冠水条件下におけるイネ科植物 *Aldh2* の発現様式を調査した。冠水抵抗性の高いイネやタイヌビエでは冠水処理によって *Aldh2* の発現が誘導されたが、抵抗性の低いトウモロコシやオオムギでは *Aldh2* の発現が逆に抑制され、イネ科植物の冠水抵抗性と *Aldh2* の発現様式との間に相関があることが明らかになった。またイネ、オオムギ、ソルガムなどのイネ科植物の *Aldh2* cDNA クローンの一次配列を決定した。さらにイネ *Aldh2* 遺伝子の染色体上の座乗位置を決定したところ、トウモロコシの場合とは異なり、既知のイネ稔性回復遺伝子の座乗位置とは一致しなかった。

### 3. まとめ

遺伝情報の構造的ダイナミズムに関しては細菌を対象にし、また、機能的ダイナ

リズムに関しては高等植物を対象にして多面的な研究を各々展開し、平素は異なる学会に所属する関係上、お互いに緊密な情報交換ができない本研究参加者各人が相互理解を深めることができた。ゲノム生物学的観点からの遺伝情報の構造的ダイナミズムは、情報学的観点からの指摘が中心であり、本重点共同研究参加メンバーの今後の着実な研究の進展により、自然生態系での遺伝情報のダイナミズムの実体とその分子機構の解明が深遠化される予定である。一方、機能的ダイナミズムに関連する研究では、共同研究参加者に医学部在籍者が含まれていることもあり、動物の場合との共通性や植物での独自性が提示が可能になると期待できる。このような状況を踏まえ、来年度はさらなる密接な連携のもとに遺伝情報のダイナミズムの研究に取り組む予定である。なお、本重点共同研究の一環として、平成12年9月に本センターにおいて「遺伝情報のダイナミズムとその分子機構」を開催した。

### 3 平成 12 年度一般共同研究報告

#### 酵母クリプトコックス・ネオフォルマンスの キチン合成酵素と多様性に関する研究

千葉大・真菌センター 山口正視, 竹尾漢治  
東北大・遺生研 宮寄 厚, 大瀧 保

##### 1. はじめに

真菌類は糸状細胞や酵母細胞,あるいは条件によってそれらの形態を変換(二形性)して成長・増殖している。形態の規定やその保持,また二形性には細胞壁の合成や変化が関わっていると考えられている。細胞壁を構成するキチンフィブリルは菌類によってその存在量はかなり異なっているが,菌類に特徴的な成分である。キチン合成を担うキチン合成酵素(CHS)遺伝子は,これまでサッカロミセス,アスペルギルス,カンジダなどで,その種類や役割について多くの知見がある。本研究は,医学的に重要な担子菌類酵母クリプトコックス・ネオフォルマンズにおけるCHSの役割をその多様性との関連から解明することを目的とした。

##### 2. 研究経過

クリプトコックス・ネオフォルマンズ(Cn)IFM5844株,接合型 $\alpha$ よりPCRで増幅クローニングした3つのクローン(各々クラスII,IV,V)について,ネットワークデータベースを利用して,ホモロジー検索やCnのCHS遺伝子に関する情報を解析した。

また,ゲノムにおける存在状況を調べるために,サザン解析を行った。プローブは単離した3クローン(各々クラスII,IV,V)をジゴキシゲニンでラベルして作成した。28°Cの液体培養で対数増殖期にあるNIH由来の標準株IFM5844( $\alpha$ )とIFM5845(a),鳩糞から分離されたIFM5860(a/ $\alpha$ ),そしてタイのAIDS患者より分離されたIFM47847( $\alpha$ )よりSDS-フェノール法でゲノムDNAを単離し,*EcoRI*または*HindIII*で消化して0.8%アガロースゲルで分離して,ナイロンメンブレンに転写した。65°Cでハイブリダイゼーションを行い,標準プロトコールに従って洗浄,検出操作を行った。

##### 3. 研究結果

FASTAを用いたホモロジー解析を行った。CnIFM5844からクローニングされた各クラス(II,IV,V)において,IIおよびVでは,同じく担子菌の*Ustilago maydis*のCHS

遺伝子と相同性が高い(80-90%)ことをはじめ、子囊菌、接合菌の CHS 遺伝子とも相同性が高かった。しかし、IV では CnH99 株や *Ustilago maydis* とのあいだでも相同性は 72%にとどまった。なお、本研究で用いた PCR システムやプライマーからは、IFM5844 株を用いたクラス IV/V の増幅による 38 クローンから各クラス 1 クローンづつのみが単離された。プライマー配列を調べたところ、本研究で用いたプライマーは H99 株由来 CHS 遺伝子と相同な遺伝子を増幅できない可能性がわかった。このことは、Cn にはクラス IV の CHS 遺伝子が複数個存在する可能性を示唆する。また、マルチジーンファミリーを形成する遺伝子群への PCR によるアプローチの限界も示している。

各株から抽出したゲノム DNA を *Hind*III で消化してサザン解析に用いた (図 1)。ハプロイド株 (IFM5844( $\alpha$ ), IFM5845(a), IFM47847( $\alpha$ )) では明瞭な 1 本のバンドが検出されたので、クラス II の CHS 遺伝子はゲノム中に 1 コピー存在することが明らかになった。ディプロイド株 (IFM5860(a /  $\alpha$ )) では大きさの異なる 2 本のバンドが検出され、由来の異なる接合型ゲノムどうしの 2 倍体化が示された。IFM5844( $\alpha$ ) と IFM5845(a) は同じ両親から由来しており同一位置のバンドを示したが、IFM47847( $\alpha$ ) では異なる位置にバンドが検出された。このことは、株間にゲノム多様性があることを示唆している。なお、以上の結果はクラス IV および V の CHS 遺伝子においても同様であった。

#### 4. まとめ

データベースを用いた解析から、各クラスの CHS 遺伝子内で相同性の違いがみられた。また、少なくともクラス IV においては複数の遺伝子の存在が示唆された。ゲノミックサザン解析から、各 CHS 遺伝子はゲノムに 1 コピー存在すること、株間でゲノム多様性がみられること、が明らかとなった。

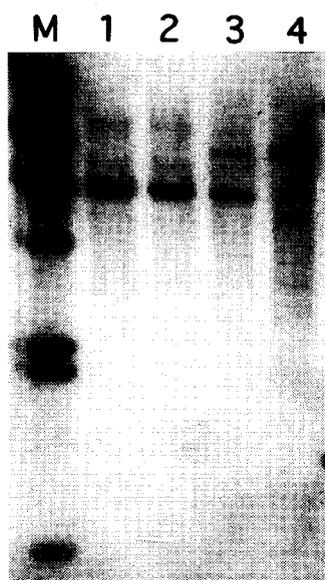


図 1. クリプトコックス・ネオフォルマンス(Cn)のゲノミックサザン解析。

レーン 1 : IFM5844( $\alpha$ ); レーン 2 : IFM5845(a);

レーン 3 : IFM5860( $\alpha$  / a ); レーン 4 : IFM47847( $\alpha$ )。 *Hind*III で消化した DNA に対し、Cn クラス II の DIG プローブでハイブリダイゼーションした。M は  $\lambda$  DNA の *Hind*III 消化した断片。

## アブラナ科植物におけるキメラと細胞融合によって誘導された細胞質 雄性不稔系統における葉緑体ゲノム変異の制御メカニズム

農工大・院農学研究科 平田 豊  
東北大・遺生研 亀谷 壽昭  
東北大・遺生研 菅野 明

### 1. 本研究の背景と目的

植物の接木やキメラを用いた生理や繁殖に関する研究は古来より多く存在する。しかし、育種や形態形成に関する研究は現在に至るまで極めて少ない。また、遺伝子操作による育種の実用化が未だ容易でない現状では、従来の諸方法と発想の異なる新たな研究の創成が求められている。

筆者らは、従来よりトウガラシやナス科植物などの接木雑種研究のメカニズム解明をすすめるとともに、これをさらに植物細胞・組織間の遺伝的相互作用として一般化し、育種へ応用していくために基礎的研究を続けてきた。本セミナーでは主として、現在進めているアブラナ科種属間キメラを中心にキメラの育種利用の可能性について検討したい。

約10年ほど前より、アブラナ属植物を用い、人為キメラの作成とその形態形成に関する規則性、細胞組織間相互作用等を調べ、さらに育種利用をめざしてキメラに由来する種子世代の遺伝的変異を追跡してきた。

その結果、種々の形態的変異とともに細胞質雄性不稔、アントシアニン発現、葉緑素の欠失などの変異を得ることができた。これらのうち、細胞質雄性不稔はそれに関連すると思われるミトコンドリアや葉緑体ゲノム構造解析の結果、それら細胞質ゲノムのダイナミックな調節が行われていることがわかってきた。しかも、それが亀谷らが作成した属間細胞融合で生じた現象と極めて一致する内容であることもわかってきた。

従って、この間一貫して、これらの諸結果を赤キャベツとダイコンとの非対称融合により得られた細胞質雄性不稔雑種 (Kameya et al., 1993; Kanno et al., 1997) と比較検討しながら、ミトコンドリア遺伝子の解析を進めてきた (Kita et al., 1997; Hirata et al., 1998)。

これら細胞質両ゲノムの変異が双方とも細胞質雄性不稔と平行した現象であることなどから、細胞質ゲノム分子種を共通に増減するメカニズムの存在が想定される。この点の解明を行うことも育種利用の長期的目標から重要である。

## 2. 研究の内容

### 材料

本研究の遺伝子解析には、すでに亀谷ら（1989）によって作成されたダイコン品種“聖護院”（*Raphanus sativus* L.）と赤キャベツ品種“ルビーボール”（*Brassica oleracea*）との細胞融合によって作成されたキャベツ型細胞質雄性不稔系統（Kanno et al., 1997）、キャベツとコマツナとのキメラにコマツナを戻し交雑した後代に得られた*B. campestris*型細胞質雄性不稔系統（CMS コマツナ）及びオグラ型細胞質を持つダイコン品種“MS源助”を用いた。

### 全DNAの抽出とPCRおよびサザン解析

全DNAを3gの成熟葉よりHonda&Hiraiの方法（1990）に従って抽出した。PCRは各サンプル100ng相当、dNTP100mM、プライマー濃度0.4uM、1.5mMの塩化マグネシウムを含むバッファーおよび0.5uのTaq polymeraseを用い、それぞれの既知の遺伝子より適切なプライマーを構築し、変性を94℃で1分、アニーリングを60℃2分、伸長反応を72℃3分で30サイクルおよび20~40サイクルで増幅を行った。なお、オグラ型ダイコンの指標遺伝子とされているorf138の両ばさみプライマーとして‘5側5’-GTCGTTATCGACCTCGCAAG-3’と3’側5’-AGCAATTGGGTTCCAAAGCAT-3’を用いた。サザン分析用の全DNAはCTAB法で抽出し、それをDIGキットマニュアルに従って制限酵素で制限し、1.0%のアガロースゲルで電気泳動により分析した後、サザン分析した。16個のミトコンドリア遺伝子およびイネの葉緑体ゲノム全領域をカバーするクローンをプローブとして用いた。これらそれぞれ起源の異なる2つのCMS系統のオルガネラ遺伝子解析を行い、双方のデータの比較検討を詳細に行った。

## 3. 研究結果

既知の16個の遺伝子領域において、これら2つの細胞質雄性不稔個体のミトコンドリア遺伝子とダイコン品種“MS源助”のオグラ型細胞質雄性不稔系統の16個の遺伝子とが一致していることが明らかとなった。すなわち、これら2つのCMS系統はダイコンのオグラ細胞質を何らかの形で獲得したことになる。ところが、さらに2つのCMS系統の両親をより詳細に調べると、通常はサザン分析でとらえられない程度に極めてわずかしが含まれていないorf138がPCRの増幅サイクルを増やすと増幅され、その増幅産物の塩基配列は完全にorf138と同一であることが分かった。ただし、これら細胞融合由来の雄性不稔系統は調べた16のミトコンドリア遺伝子のうち、細胞融合に用いた両親である聖護院ダイコ

ンとは7つ、ルビーボールとは9つの遺伝子で異なっており、rp12/rps19遺伝子以外の11個はこの雄性不稔系統とルビーボール型細胞質雄性不稔系統とは同一であった。

以上の諸結果から、キメラと細胞融合雑種形成の過程で本来はわずかししか持っていない、元々ハクサイやキャベツに含まれるオグラ型ミトコンドリアサブゲノムが何らかの制御調節の変化により、雄性不稔型細胞質遺伝子を持つゲノム分子がドミナント型となり、それらと平行して雄性不稔が発現するに至ったということは明らかである。

こうした、ヘテロプラズミックなミトコンドリアゲノム分子の増減による新ゲノム分子の出現は本研究以外にもすでに、種々の方法で得られている。

(sakai & Imamura, 1993 ; 木下ら, 1992 ; Sakamoto, 1996 ; Namai, 1987; amagishi, 1993)。その制御メカニズムの解明はミトコンドリア遺伝子とその発現の制御、特に育種における雄性不稔利用に大きな意味を持つものと考えられる。

また、イネ葉緑体B3クローン (Hirai et al, 1985) をプローブにサザン分析を行うと、この領域についてもこの細胞融合による雄性不稔は“MS源助”の不稔ダイコン系統およびキメラ由来のコマツナ型雄性不稔系統と同じパターンを示し、両親とは異なる葉緑体遺伝子断片を持っていた。さらに、葉緑体の他の領域をプローブとして用いても同様であった。以上のことは、細胞質ゲノムの可変性メカニズムを解明していく上で極めて重要である。

#### 4. これまでの結果の総まとめ

これらの結果は、キメラ形成と細胞融合という異なる2つの過程で得られた細胞質雄性不稔変異が、それを誘導、制御していると思われるミトコンドリアゲノムのみならず葉緑体ゲノムに存在するヘテロプラズミ分子の何らかの未知のメカニズムで調節されている量的変動に伴って現れた変異であると考えられる。この調節機構を解明することにより、細胞質ゲノムの目的意識的変異を誘導することが可能になると期待される。また、このダイコン型CMS指標遺伝子orf138やそれを含むゲノムの起源を明らかにすることも有用遺伝資源の利用から必要な課題と考えられる。現在この系統分化についても検討中である。

さらに、これらの特徴有る材料から、直接ゲノミックライブラリーを構築して、上記の現象を分子構造上からも証明することが不可欠であり、ライブラリー構築へと進みつつある。

## 参考文献

- Bellaoui, M., Martin-Canadell, Pelletier G. and Budar F. 1998. Low-copy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. *Mol. Gen. Genet.*, 257:177-185.
- Hirata, Y., Y. Takeda, T. Noguchi and T. Motegi and M. Kita, 1997. Induction of male sterility from artificial interspecific chimera between *Brassica campestris* and *B. oleracea*. *Proc. ISHS Symp. on Brassicas Tenth Crucifer Genetics Workshop*, 225.
- Kameya T., Kanzaki H., Toki S., Abe T., 1989. Transfer of radish (*Raphanus sativus* L.) chloroplasts into cabbage (*Brassica oleracea* L.) by protoplast fusion. *Jpn J. Genet* 64:27-34.
- Kanno, H., Kanazaki, H. and Kameya, T. 1997. Detailed analyses of chloroplast and mitochondrial DNAs from the hybrid plant generated by asymmetric protoplast fusion between radish and cabbage. *Plant Cell Reports*, 16:479-484.
- Kita, M., Takeda, Motegi Y., Hirata, Y. and Noguchi T., 1998. Unique transformation system using plant chimera by in vitro grafting. *Proc. 8th SABRAO Genral Congr.*, 369-370.
- Kinoshita, T. 1992. *Molecular Mechanism of Flowering and Fruiting*. pp.107-139, Shujun-sha, Tokyo.
- Namai, H. 1987. Inducing cytogenetical alterations by means of interspecific and intergeneric hybridization in Brassica crops. *Gamma Field Symposia No. 26*, 41-89.
- Sakai T., Imamura J. 1992. Alteration of mitochondrial genomes containing *atpA* genes in the sexual progeny of cybrids between *Raphanus sativus* cms line and *Brassica napus* cv. Westar. *Theor Appl Genet* 84:923-929.
- Sakai T, Imamura J. 1993. Evidence for a mitochondrial sub-genome containing radish *atpA* in a *Brassica napus* cybrid. *Plant Sci* 90:95-103.
- Shirzadegan, M., J.D. Palmer, M. Christey and E.D. Earle, 1991. Patterns of mitochondrial DNA in *Brassica campestris* cultures cells. *Plant Mol. Biol.*, 16:21-37.
- Yamagishi, H., 1996. Cytoplasmic male sterility in Cruciferous crops. *Bull. Inst. Natl. Land Utilization Develop. Kyoto Sangyou Univ.*, No. 14, 127-137. (in Japanese)
- Yamagishi, H. and T. Terachi, 1996. Molecular and biological in the Cruciferae. III. Distribution of *our*-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. *Theore. Appl. Genet.*, 93:325-332.

サクラ枝寄生菌 *Pezicula corticola*(盤菌綱ビョウタケ目)の  
培地上における光形態形成

弘前大農学生命 原田 幸雄, 弘前大・院農 大木 保善  
東北大・遺生研 大瀧 保・宮寄 厚

### 1 はじめに

本菌は、子のう菌亜門、盤菌綱に属し主に樹木に枝枯れを引き起こす菌である。培養において、光刺激に非常に敏感で、BL-B（近紫外光）を照射すると短期間に子のう盤（有性世代）と分生子殻（無性世代）を形成する特徴をもっている。これは有性生殖と無性生殖のプロセスを解明する上で極めて有効な性質で、光による形態形成制御の研究に適している。

### 2 研究経過

本菌の光に対する反応を解析する上で、形態変化をステージごとに分けることが重要であると考えた。そのため、菌叢表面の走査電子顕微鏡（SEM）観察やパラフィン包埋切片の光学顕微鏡観察によって、形態変化をステージごとに分け、模式化を行った。

本菌は、BL-B 連続照射約 2 週間で成熟した子のう盤が形成される。そこで、どのステージまでの光照射が必要であるかを最終的な子のう盤形成の有無で調査した。また予備的であるが、白色光、青色光、赤色光を照射し、形態形成に関わる光質の影響を調査した。

### 3 研究結果

BL-B 照射前の菌叢は、茶褐色、平坦で少量の気中菌糸が観察される。BL-B を照射することにより菌叢の色が暗緑色へと変化してくる。菌叢を SEM で観察したところ、BL-B 照射前（図 1,①）とは明らかに違い、細かい菌糸の隆起が観察された（図 1,②）。続いて、菌糸が隆起しはじめて分生子殻の原基が形成される。BL-B 照射開始から約 2~3 日の間に分生子と小型分生子の形成が分生子殻の中で見られる（図 1,③④⑤）。小型分生子は、受精に関与するとの報告があるが、本菌での役割はまだ解明されていない。続いて、分生子殻より分生子の放出が肉眼で観察される（図,1⑥）。そのころになると、分生子殻内に子のう盤原基が形成されているのが、ミクロトーム切片の観察によって分かった。その後、その原基が肥大しながら分生子殻を押し開いて隆起してくる（図 1,⑦）。そして、開盤して完全な子のう盤へと発達した（図 1,⑧⑨）。これを基に、子のう盤形成過程の模式図を製作した（図 1）。

本菌は、BL-B 連続照射が最低 72 時間以上照射されると、分生子殻の形成を経て、子のう盤が形成されることが分かった。分生子殻で形態形成がストップするというのではなく、一旦変化が始まると通常は子のう盤形成まで進行する。

BL-B 以外の光質試験では、白色蛍光灯下で気中菌糸が発達したものの子のう盤形成にはいたらなかった。青色光や赤色光下では一定部分へ菌糸が集合して、菌叢に小隆起がみられた。しかし、いずれの場合でも成熟子のう盤の形成は見られなかった。

#### 4 まとめ

今回、形態形成のプロセスを模式化することができ、また、BL-B（近紫外光）の照射時間の違いによる子のう盤形成の有無も解析することができた。しかし、BL-B がどのステージまで影響するのかを確定することはできなかった。照射日数と形態変化の日数を併せて考えると、分生子殻の形成に光が必要であるが、子のう盤形成期には、直接光が関与していない可能性もある。それは、子のう盤原基が分生子殻内で形成されること、また子のう盤が菌叢表面に現れる前に光照射を停止しても子のう盤が形成されるからである。

青色光および赤色光の照射では、菌叢の色に違いがあるものの共に菌糸の隆起が見られた。これがどのような器官なのか、あるいはある種の奇形現象なのか、解明するには至らなかった。今回の研究では、本菌の光形態形成のパターンをある程度知ることができた。しかし、全貌を解明するには至らなかった。これは、光照射に対する菌の反応時間がヒゲカビなどに比べ比較的長いことや、やや大形の子実体である子のう盤の形態形成プロセスの複雑なことが原因だと考えられる。

本菌の光に対する影響の解析は、始まったばかりでまだまだ未知の分野である。今後、遺伝子解析を行う上で光に反応しない変異体の作出が重要になると考える。また、同じ *Pezicula* 属でも種や菌株が違うことで光に対する反応が異なることも明らかになった。このような菌株との比較も行いながら解析を進め、さらに自然の環境要因との関連性も考えて研究を進めていきたいと思う。

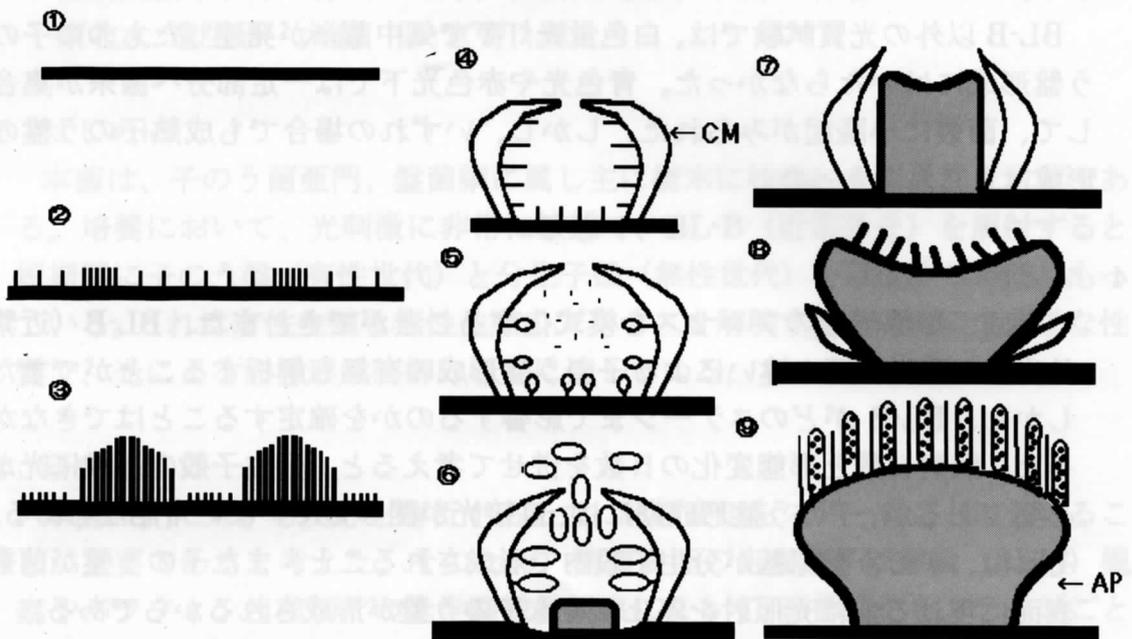


図1 *Pezizula corticola* の形態形成模式図 (菌叢の断面)

CM : 分生子殻 AP : 子のう盤

(①~③は電顕、④~⑨は光顕観察による)

表1 BL-B 照射時間と子のう盤形成数との関係

BL-B 照射時間	12h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
子のう盤形成数	-	-	-	±	+	++	++
分生子殻形成数	無	無	無	有	有	有	有

- 形成なし, ± 0~数個, + 10~50個, ++ 50個以上/シャーレ

# Lea遺伝子の機能解析と乾燥耐性植物の開発

岩手大・農 高畑 義人  
東北大・遺生研 亀谷 壽昭

## 1 はじめに

植物の大部分の組織は乾燥ストレスに対し耐性を持たないが、種子や花粉はほとんどの植物で乾燥耐性を持つ唯一の器官とよく、水分含量10%前後に乾燥させても生存能力を保持している。この乾燥耐性を植物の他の器官で発現することが出来れば浸透圧ストレス耐性の植物を作ることが期待される。現在、種子の発育後期で発現している *Lea* 遺伝子が乾燥耐性に係わっていることが推察されているが、その機能と種子が持つ乾燥耐性の機構は不明のままである。本研究は、この種子の乾燥耐性に関与していると推察されている *Lea* 遺伝子に着目し、形質転換等により乾燥耐性の機能解析と乾燥耐性植物の作出を試みるものである。

## 2 研究経過

ナタネの花粉由来不定胚を ABA で処理した乾燥耐性胚から単離した *Lea* 遺伝子 *Me-LeaN4* を恒常的発現プロモーターにつないだキメラ遺伝子3種類を作成し (35S::ME-LeaN4、MAT::ME-LeaN4、MAT::ME-LeaN4アンチセンス)、タバコに導入した。T1世代を用い、導入遺伝子の遺伝、遺伝子発現及び乾燥耐性や塩耐性の獲得を調査し、*Lea* 遺伝子の乾燥ストレスへの関与等を調査した。また、*Lea* 遺伝子のプロモーターの解析を行うために、ナタネのゲノムライブラリーからプロモーター領域の単離と塩基配列決定を行い、レポーター遺伝子である *GUS* 伝子をつないだコンストラクト (pLea : GUS) を作成後タバコに形質転換し、各種ストレス下での発現誘導を調査した。

## 3 研究成果

3種類のコンストラクトを導入した形質転換タバコ T1 種子を用い、導入遺伝子の遺伝についてカナマイシン耐性を指標として調査した。調査した 22 個体のうち、13 個体は3 : 1、5 個体は 15 : 1 の分離比に適合し、それぞれ1および2 遺伝子が導入されていることが明らかとなった。残りの4 個体についてはどちらの分離比にも適合しなかった。カナマイシン耐性を示した個体は PCR で *Me-LeaN4* 遺伝子の導入を確認した。RT-PCR で遺伝子発現を見たところ、センス遺伝子を導入した個体のみ mRNA

の発現が見られた。形質転換体の乾燥耐性を順化後灌水を停止する方法で調査したが、形質転換体は明瞭な耐性を示さなかった。また、0、0.5、1.0%のNaCl濃度区を設け、水耕で耐塩性を調査した。0.5%処理区は、いずれの系統も0%区と同じかそれよりも良い成長を示したが、1.0%区で系統間に差が見られ、非形質転換体及びアンチセンス *Lea* 遺伝子導入個体は生育が阻害されたが、センス *Lea* 遺伝子導入個体は0%区とほぼ同じ生育を示した。

pLea::GUS のコンストラクトを導入したタバコから誘導したカルスを用い、ABA 及び種々のストレス条件 (NaCl、ソルビトール、乾燥、低温) による GUS 発現の誘導の有無を調査した。その結果、ほとんどの処理区で発現誘導が見られ、ABA (0-100  $\mu$ M)、NaCl (0.1-5.0%) 及びソルビトール (100-600mM) 処理では、処理濃度が高いほど高い発現が誘導され、また乾燥処理でも発現が見られた。しかし、4℃の低温処理では発現誘導が見られなかった。

#### 4 まとめ

種子の乾燥耐性に関与していることが推察されている *Lea* 遺伝子の機能を解明する目的で、ナタネの花粉由来胚から単離した *Lea* 遺伝子 *Me-LeaN4* を導入した形質転換タバコ T1 植物を用いて、浸透圧ストレス耐性を調査した。乾燥耐性に関しては十分な証拠は得られなかったが、NaCl に関してはある程度の耐性の付与が示唆された。今後、さらに世代を進め、遺伝子のホモ化をはかり、その安定性について検討していきたい。一方、アンチセンス遺伝子導入で種子の乾燥耐性消失を期待したが、恒常的発現プロモーターを使用したせい、乾燥耐性の消失は見られなかった。種子特異的プロモーターを使うことで研究を継続して行きたい。*Lea* 遺伝子のプロモーターの発現誘導解析では、ABA や様々なストレス処理で発現が誘導されることが明らかとなった。現在、プロモーター配列に見られる ABA responsive element に突然変異を入れたプロモーターを用い、発現解析を行っており、発現誘導領域を明らかにしていきたい。

# 黄緑藻、フシナシミドロ属の分子系統学的位置の解明

甲南大・理・生物 本多 大輔  
東北大・遺生研 大瀧 保  
東北大・遺生研 片岡 博尚

## 1 はじめに

1980年代から急速に発達した分子系統学的解析によって、真核生物の一大系統群である黄色植物界の系統も調査されてきた。主に海域に生息し多細胞化によって大型化した褐藻類が、淡水域に限定して生息する単細胞や群体性の黄緑藻類と姉妹群の関係になることが示唆されたことは、その中でも重要な成果と言える。実はこのことは黄緑藻類フシナシミドロ属 (*Vaucheria*) と褐藻類の両者の精子に類似の形態が見られることから示唆されていた関係であった。しかしながら、このように従来から注目されていたフシナシミドロ属の褐藻／黄緑藻グループ内の系統学的位置については明確になったとは言い切れない。これまでに示されている18S リボソーム小サブユニットRNA遺伝子(18S rDNA)を解析して得られた分子系統樹から、フシナシミドロ属は黄緑藻と褐藻の中間的な系統関係を示す一方で、他の褐藻類や黄緑藻類に比べ、3から4倍も多く塩基置換が蓄積し、進化速度が著しく速くなっていることが観察されている。このような場合には正確な系統関係を推定することが困難になることが知られている。そこで本研究では、フシナシミドロ属の *Vaucheria terrestris* sensu Gotz (= *V. frigida*) と *V. dichotoma* の18S rDNA配列決定を新たに行い、進化速度の不定性を考慮した解析及び検定を行って、フシナシミドロ属の分子系統学的位置を解明することを目的とした。

## 2 研究経過

黄色植物界に関しては、1992年にBhattacharyaらが主な高次分類群を含む18S rDNAに基づく系統樹を示して以来、報告が相次いでいる。またフシナシミドロ属生物及び他の黄緑藻に関しては1997年のPotterらの報告に詳しい。フシナシミドロ属で18S rDNAの配列が決定されているものは、前述のPotterらの報告による *Vaucheria bursata* だけに過ぎないが、フシナシミドロ属の系統的位置の不明確性が示されている。

## 3 研究成果

現時点までに *Vaucheria terrestris* sensu Götz の18S rDNAの全長約1800塩基のうち、1082塩基配列の決定を終えている。*V. dichotoma* については、全ゲノム抽出

は終わっているが、多糖質などの除去が不十分で、塩基配列決定には至っていない。

アラインメントにはClustal W, 系統解析にはPAUP version 4.0を用いた。アラインメント後, 1つでもギャップの入ったサイトは解析から除いた。外群として黄色植物の黄金色藻から *Ochromonas danica* を解析に加えた。

図1に示したように, *V. terrestris* sensu Gotzは, 同じフシナシミドロ属の *V. bursata*と単系統群を形成し, これは統計的支持を示す高いブートストラップ値(100%)によって強く支持された。黄緑藻類全体の中で, フシナシミドロ属の系統群は最初に分岐し, 黄緑藻と褐藻の中間的な部分に位置するというこれまでの知見と同じであった。

図2は図1で示した結果を基にOTUsを8つに絞り, フシナシミドロ属の系統的な位置について, 最尤法を用いて詳細な解析を行って再検討を行った結果である。上位4位までの系統樹は最尤樹(図2-A)との尤度差が標準偏差内に収まっており棄却できない(表1)。しかも, 4位の系統樹(図2-B)はフシナシミドロ属が他の黄緑藻が分岐した後に分岐するという, これまでの知見とは全く異なった系統樹であった。OTUsを8つに絞った方の解析で用いた最尤法は, 分子進化速度の一定性が乏しい時でも正解を導き出すことが多いことがシミュレーションでも示されており, フシナシミドロ属の位置についての再検討の必要性を示している。

#### 4 まとめ

以上のことから, フシナシミドロ属は単系統性を示し, 自然分類群であることが示された。しかし, フシナシミドロ属の黄緑藻類の中での系統的な位置づけに関しては, 疑問が残るという結果を得ることができた。本研究ではフシナシミドロ属のデータを1つ増やしたに過ぎないが, 今後データを増やすことで, より精度の高い解析が実現できる可能性がある。また, アルゴリズムとコンピューターの能力の進歩によって, 多いOTUsを用いた解析も可能になりかけている。今後は, 分子系統の情報を増やすと共に, それをどのように評価することが適当であるかについて, 形態, 生理などの知見を増やすことも重要と思われる。

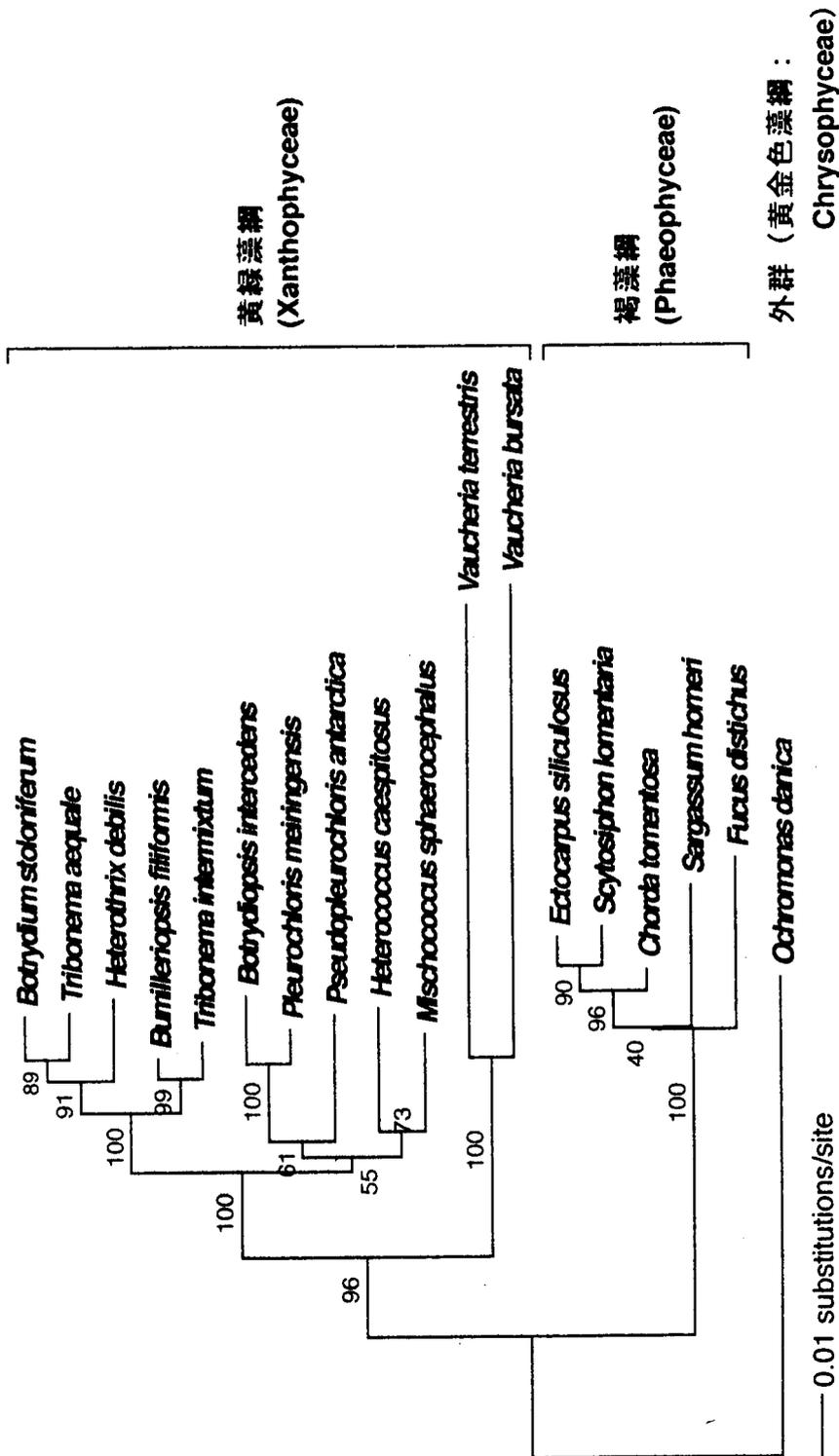


図1 現時点で18S rDNAが登録されているすべての黄緑藻類11 OTUsと今回配列決定を行った*Vaucheria terrestris*, 褐藻類5 OTUs, 外群として黄金色藻から1 OTUの分子系統樹。ギャップを除いた982塩基についてHKY85モデルを適用して距離行列を求め、これを近隣結合法を用いて系統関係を推定したものである。各分岐に示した数字はブートストラップ確率のパーセント値。*Vaucheria terrestris* は正確には*Vaucheria terrestris sensu Goetz*である。

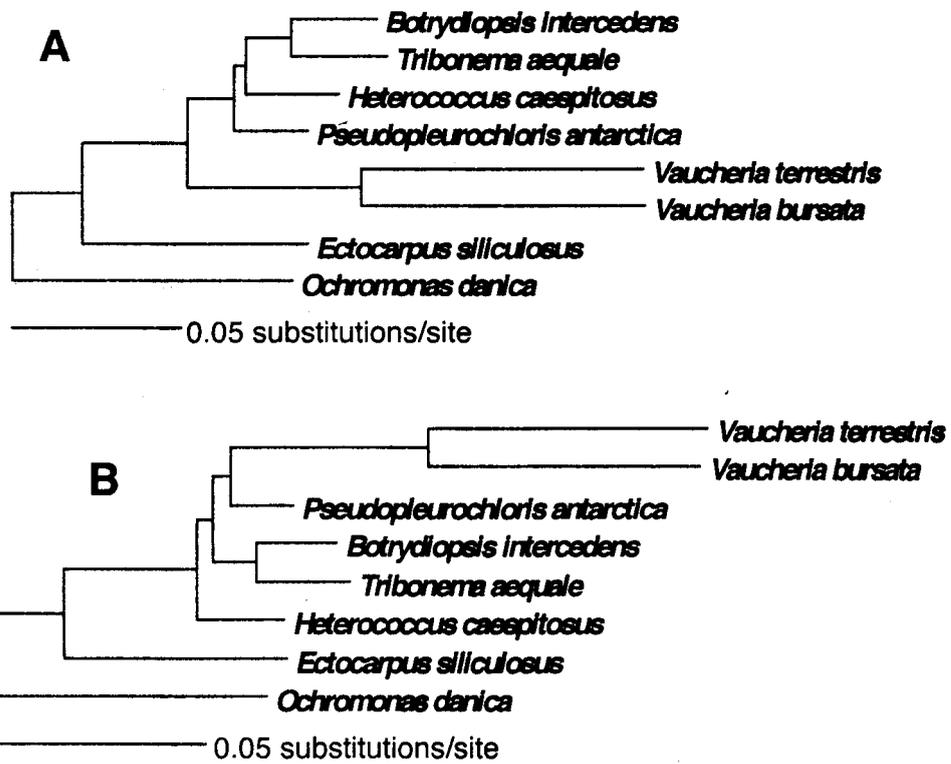


図2 選択された8 OTUsにおける最尤系統樹(A)と4番目の尤度の系統樹(B)。最尤推定した transition / transversion = 1.2の値を採用したHKY85モデルを用いて、8 OTUsから考えられるすべての系統樹それぞれについて尤度を求めて比較した。

表1 8 OTUsに含まれるすべての系統樹のうち、上位9位までの系統樹の尤度 (-ln L)、系統樹間の尤度差 (Diff -ln L)、標準偏差 (s.d.(diff))。

Tree	-ln L	Diff -ln L	s.d.(diff)	s.d.の範囲内
1	3866.67906	(best)		
2	3866.71799	0.03893	4.37296	yes
3	3867.20245	0.52339	4.25580	yes
4	3874.34184	7.66278	8.46316	yes
5	3875.00608	8.32701	7.77636	no
6	3875.28353	8.60447	7.69716	no
7	3875.29810	8.61904	6.88902	no
8	3875.69633	9.01727	8.06611	no
9	3876.05531	9.37625	8.45960	no

# イネの UVB ストレスと長寿命ラジカルとの関係

名古屋大・院工 宮崎哲郎  
名古屋大・院工 熊谷 純  
東北大・遺生研 熊谷 忠

## 1 はじめに

地球のオゾン層破壊に伴い、我が国の主要作物であるイネに対する紫外線 (UVB) の影響は重要な問題になる。熊谷 (忠) と日出間は、イネの近縁種であるササニシキと農林 1 号との間に紫外線照射において著しい差があることを発見した。前者は紫外線に対して強い抵抗性があるが、後者の抵抗性は弱い。両品種間のこの差の原因については、未だ説明されたとはいえない。

## 2 研究経過

宮崎と熊谷 (純) は、電子スピン共鳴測定 (ESR) により動物細胞を放射線照射すると長寿命の有機ラジカルが生成し、これが突然変異やガンを誘発することを見出した。平成 10-11 年に宮崎・熊谷 (純) は熊谷 (忠) および日出間と遺伝生態研究センター重点共同研究を行った。ササニシキと農林 1 号との紫外線抵抗性の差がイネの葉の中に存在する長寿命ラジカルの差として現れることを見出した。この研究結果は J. Radiat. Res. (1999) に掲載された。本年度は長寿命ラジカルの視点から、イネの紫外線影響の機構および両品種間の差異の解明を試みた。

## 3 研究結果

図 1 は、ササニシキの第 3 葉が完全展開した後の葉の ESR スペクトルである。(A) は広い磁場の範囲で測定した。6 本のスペクトルは金属 Mn に

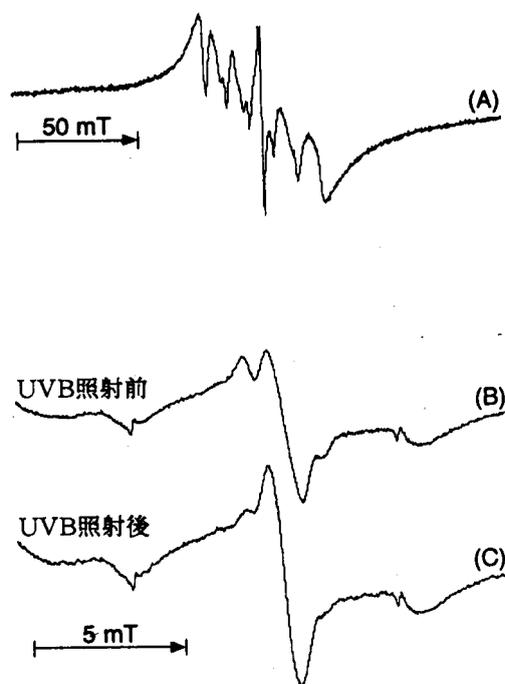


図 1. ササニシキの葉の ESR スペクトル

よる。中央のスペクトルは金属 Mn のスペクトルに重なって光合成に参与するラジカルである。(B) は、磁場の範囲を狭くとり、光合成ラジカルを中心にして測定した。光合成ラジカルは中央に現れる 1 本線 (P<sub>700</sub> カチオンラジカル) とその外側に現れるチロシンラジカルの 2 種類から成っている。(C) は切り取った葉に UVB を照射した後のスペクトルである。光合成ラジカルは減少し、代わりに新しく長寿命の有機ラジカルが生成する。

図 2 は、第 3 葉が完全展開した後、さらに 4 日間と 10 日間、可視光照射下で生育させた時のササニシキ (Ssa.) と農林 1 号 (Nri.) における光合成ラジカルと金属 Mn の量の変化を示す。放置により光合成ラジカルは減少すると共に Mn の量が増加する。これは放置により葉が枯れ始めると光合成システム全体が壊れ、Mn が放出されることを示す。

図 3 は、第 3 葉が完全展開した後、さらに 4 日間と 10 日間、可視光および UVB 照射下で生育させた時のラジカル (光合成ラジカルと有機ラジカルの和) および Mn の量の変化を示す。放置により、ササニシキ、農林 1 号共に Mn が増加し光合成システムが壊れることがわかる。しかしラジカルの方は 10 日目でも増加している。10 日目のラジカルは、有機ラジカルの増加が主なものである。興味深いことは、有機ラジカルの生成が、紫外線に弱い農林 1 号の方が抵抗性の強いササニシキよりも大きいことである。このことが両品種間の紫外線抵抗性の差異に関連しているものと思われる。

UVB 照射による有機ラジカルの生成を証明するために、切り取った葉に UVB を照射したときの様子を図 4 にしめす。10 分以上照射すると有機ラジカ

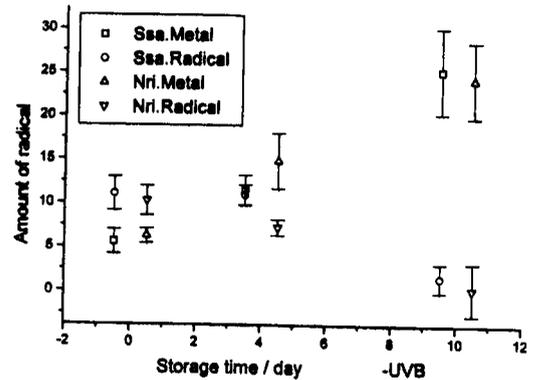


図 2. 第 3 葉が完全展開後、可視光下での放置効果

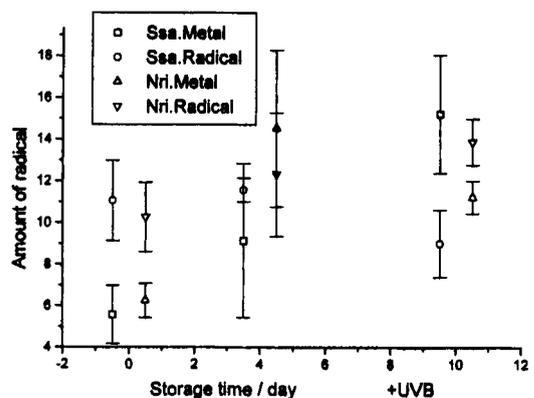


図 3. 第 3 葉が完全展開後、可視光および UVB 照射下での放置効果

ルの生成が顕著になる。しかし、Mn量はUVB照射によって変化せず、UVB照射だけでは光合成システム全体は破壊されない。

#### 4 まとめ

以上をまとめると図5のようになる。完全展開後の葉は、放置により枯れ始めると光合成システムが破壊される。放置の際、UVBも照射すると光合成システムが破壊されると共に有機ラジカルが生成する。このラジカルは、紫外線に弱い農林1号の方がササニシキよりも生成し易い。UVB照射だけでは光合成システム全体は破壊されず、有機ラジカルの生成だけが起こる。有機ラジカルがUVB抵抗性の強弱に関連していると思われる。

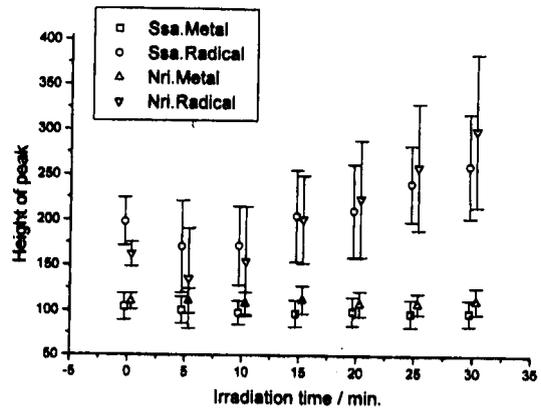


図4. 第3葉を切り取った後、UVB照射効果

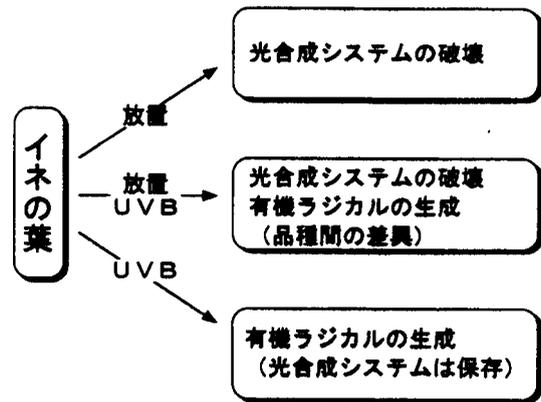


図5. イネの葉の放置効果とUVB照射効果のまとめ

# 植物の集団および種分化における形質発現と 適応機構の解析

東京都立大・理 可知直毅, 工藤 洋  
農境技研・環境生物 芝池博幸  
京大・名誉教授 河野昭一  
東北大・遺生研 石栗義雄, 津田雅孝

## 1 はじめに

本研究はこれまで遺伝生態研究センターで継続的に行われてきた「植物の集団および種分化における形質発現と適応機構の解析」に関する研究をさらに発展させたものである。本研究では、アブラナ科植物の種分化における形質発現と適応機構を明らかにするために、タネツケバナ属の種間にみられる環境による生活環制御機構の違いを実験的に明らかにし、日長および温度環境にする反応性の種間差にもとづいて、各種の発現形質と生活環境との生態学的な対応関係を検討した。さらに、アブラナ科植物の複数の形質の間にどのような関連があり、その関連が植物の生活史形質の進化にどのような影響を及ぼすかについて検討するため、ハクサンハタザオの日長反応性について研究を行った。

## 2 研究経過

(1) タネツケバナ属4種に異なる環境条件を与えて、それぞれの生活史形質の発現を検討し、種の生活環境と集団分化の機構を考察した。用いた種はタネツケバナ(富山県滑川市)、ミチタネツケバナ(仙台市)、オオバタネツケバナ(福島県広野町)、タチタネツケバナ(福島県広野町)である。検討した環境条件は!長日(16h/8h,明/暗) \*短日(8h/16h) #低温-長日(5℃/短日、30日間その後長日) \$低温-短日(5℃/短日、30日間その後短日)であり、日長処理は環境制御装置(小糸KG型)で行った。開花日は花序に最初に開花が認められた日とし、その他の形質測定は果実が成熟した時点で行った。

(2) アブラナ科植物では栄養成長の期間と、花茎が伸長して開花・結実を行う繁殖成長の時期が明確に区別され、どちらの成長をおこなうかは日長とバーナリゼーション(冬季の低温感受)によってコントロールされる。野外においては、季節変動にあわせてタイミングよく繁殖と成長を行う必要があり、日長・バーナリゼーション反応の変異は、適応度の変異に直結する。しかし、この性質を利用すると、実験的に成熟時のエイジとサイズをコントロールすることができる。私達はこのことを利用して、アブラナ科の一年生草本タネツケバナ(*Cardamine flexuosa*)の成熟時のエ

イジとサイズが繁殖に及ぼす影響を評価することに成功した。その結果、生産種子数に対して成熟サイズが正に相関するのに対して、成熟エイジが負に相関することを明らかにした。成熟エイジと生産種子数が負に相関するという事は、同じ大きさの植物でも早くそのサイズに達するものほど種子生産数が多い。一年草野外植物の研究においてはエイジの特定が難しいためにこれまで見過ごされてきたが、この関係が一般的ならば非常に重要である。そこで、タネツケバナの近縁種であるミチタネツケバナ(*C. hirsuta*)においても同様の結果が得られるかどうかを確かめるために、栽培実験をおこなった。

(3) シロイヌナズナ属植物の一種、*Arabidopsis thaliana* は、モデル植物として、特に発生遺伝学的研究において強力的に研究がすすめられている植物である。これまでの分類では日本に自生するシロイヌナズナ属植物は、*A. thaliana* 一種とされてきた。しかし、その野外における分布は人為による影響が大きいため、適応分化の野外研究の材料としては適さない。ところが、1997年にrDNA配列の研究によって、これまでヤマハタザオ属(*Arabis*)とされてきた、日本に自然分布するハクサンハタザオがシロイヌナズナ属植物であることが明らかとなった(O'Kane & Al-Shehbaz 1997, NOVON 7: 323-327)。ハクサンハタザオ(*A. gemmifera*)は、他のアブラナ科同様、春に花序を伸ばして開花する。特異的なのは、開花結実後、花序先端の頂芽が再びロゼット葉を形成し、倒伏して栄養繁殖することである。この繁殖成長と栄養成長のダイナミックな切り替えは、日長の制御を受けている可能性が高い。また、生育地における栄養繁殖と種子繁殖の相対的重要度と環境要因の地理的変化の相互作用の結果、反応性に集団間で分化が生じている可能性が高い。

### 3 研究結果

(1) タネツケバナ属は基本的にバーナリゼーションと長日の日長条件で花芽分化が顕著に促進される植物である。本研究で比較したタネツケバナ属4種において、タネツケバナとミチタネツケバナは花芽分化の遅延が見られるものの、短日条件下でも花芽分化できる、いわゆる量的長日植物である。このような性質は温暖な地域にhabitatを持つ集団は短日下の開花、すなわちagingによる花芽分化、によって周年にわたる開花が可能である。緯度が高い地域の集団は花芽分化における低温-長日要求性を選択して、短日条件下での花芽分化を抑制して、秋期にしっかりとしたロゼットを形成して越冬に耐える個体集団となる。このように、量的長日植物であることは種の集団をそのhabitatの特徴に適合させたものに分化することを容易にする。一方、オオバタネツケバナとタチタネツケバナは低温または長日条件が花芽分化に絶対的な条件である。この性質は開花結実期を春期に限定したものにして、開花期を調節

して集団を分化させることが困難であり、habitatとフェノロジーが限定的となる。

表1 主茎節数

	長 日	低温-長日	短 日	低温-短日
タネツケバナ	15.3±1.4	17.5±1.1	16.7±1.2	16.4±1.3
ミチタネツケバナ	55.9±8.8	31.2±4.3	32.9±3.9	23.8±2.6
オオバタネツケバナ	50.1±8.8	19.5±3.3	46.6±4.2	23.5±2.5
タチタネツケバナ	67.2±3.3	39.5±3.7	67.9±4.8	49.1±3.1

表1で明らかのように、ミチタネツケバナの主茎節数はタネツケバナの2~3倍も多い。花芽分化と同時に生じる主軸節の節間伸長は、最も開花が促される低温-長日条件で、タネツケバナでは8.0節から、ミチタネツケバナでは4.8節から開始する(図1)。すなわち、抽苔時にタネツケバナが約9節、ミチタネツケバナは約26節の非節間伸長節を基部に残している。このように、ミチタネツケバナは大型のロゼットを形成する性質を示し、抽苔後もその草型を維持している。大型のロゼット形成はより乾燥した環境に適合しているが、他種の被陰など競合的な環境には弱い草型である。これはミチタネツケバナが芝生や都市部の空地などオープンな環境に集団を形成するというhabitatの特性と符合する。

主軸各節からの一次分枝形成率(図1)で4種を比較した。タネツケバナでは節間伸長節からの分枝率が高く、ミチタネツケバナでは基部の非節間伸長節からの分枝が旺盛である。オオバタネツケバナは分枝形成が広い節位に分散しているが、基部からの分枝が活発である。対照的に、タチタネツケバナは分枝のほとんどが節間伸長節からであり、基部の非節間伸長節からの分枝は非常に少数である。

形成された分枝の長さは(図2)4種に共通して節間伸長節からの分枝長は短く、旺盛な分枝の成長は基部からの分枝にみられる。とりわけ、ミチタネツケバナの基部分枝の成長は著しく、タネツケバナおよびミチタネツケバナの約2倍の分枝長を示す。この草型はミチタネツケバナが開花期に多数のロゼット葉を個体基部に残し、これらが基部節からの分枝形成およびその成長に強く関わっていることを物語るものである。一方、タチタネツケバナは節間伸長節から短い分枝を多数成長させ、開花結実期の草型が直立型を呈することが示されている。

オオバタネツケバナとタチタネツケバナは山間の溪流地に近接して集団を形成している。開花に最も有利な低温-長日条件において、オオバタネツケバナの主軸節数はタチタネツケバナの約半数であり(表1)、分枝の旺盛な成長が見られない(図2)。この性質から草丈が低く抑えられ、競合的な環境への体制が低く、溪流地の

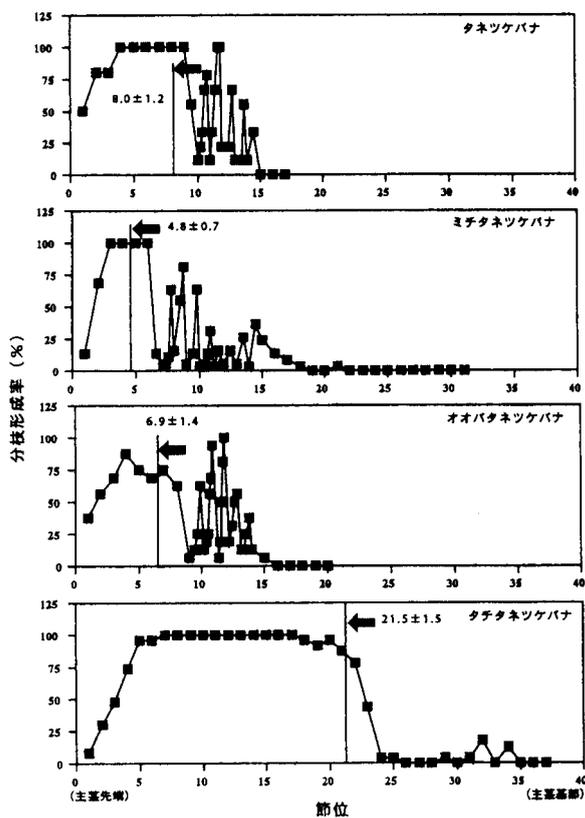


図1 低温-長日条件下における主軸節からの分枝形成率 (%)

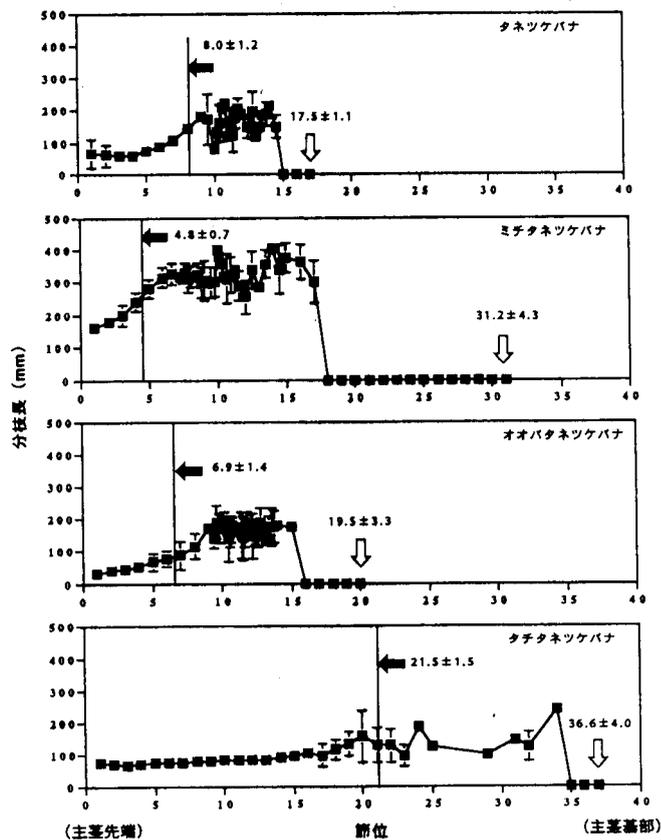


図2 低温-長日条件下における一次分枝長

水辺近くのオープンな環境に集団を形成している。対照的に、タチタネツケバナは強い節間伸長によって草丈の著しい増大が見られ、他の植物との強い競合的な環境の中で集団を形成出来る。したがってタチタネツケバナは溪流の河川敷の群落の中に集団を形成出来ている。

(2) 野外2集団より得られた種子を用いて、ファイトトロンで日長と温度を制御することによって、成熟エージをコントロールする実験をおこなっている。ミチタネツケバナは、多くの花序を成長の初期につくられる節位からの分枝上に形成するので、タネツケバナよりも強いエージの効果が検出されると予想している。この栽培実験は現在進行中であり、2月末に終了したあとデータの分析をおこなう。

(3) 宮城県奥新川の野生集団より株を採取し、日長と温度をコントロールした制御環境下(ファイトトロンを使用)での栽培実験をおこなった。その結果、短日条件下で花芽形成が抑制されること、低温長日で開花が促進される個体があることが明らかとなった。しかし、株による反応性の差異が大きく、ハクサンハタザオにお

いては、1 局所集団内においてもかなりの日長・温度反応性の変異を内包していることを示している。今後、生活史形質（開花までの日数・繁殖サイズ・種子繁殖と栄養成長への資源分配・種子生産など）における表現型可塑性の集団内・集団間変異を定量する予定である。

#### 4 まとめ

アブラナ科植物の種分化における形質発現と適応機構を明らかにするために、タネツケバナ属の種間における形質発現とその生理生態的解析、およびハクサンハタザオの日長反応性について研究を行った。

タネツケバナ属（アブラナ科）の4種について、生活環に特徴的な形質発現の種間比較を行った結果、類似した生活環境に集団を作るタネツケバナとミチタネツケバナは草型の違いから相互に住み分けが行われていることが示唆された。また、オオバタネツケバナとタチタネツケバナは、山間の溪流地という同所的なhabitatを持ちながら、それぞれの発育形質の違いから住み分けが行われていることが示唆された。また、ミチタネツケバナは、タネツケバナよりも種子生産に対してより強い負のエイジ効果を示すと予想した。さらに、日本産シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) の野生種ハクサンハタザオ (*A. gemmifera*) の野外集団における日長・バーナリゼーションに対する生活史形質の表現型可塑性（異なる環境下での反応性）の変異を定量し、生育地環境との関係を明らかにした。

## イネ光回復酵素遺伝子のクローニング

東北大・院理学研究科 山本 和生  
東北大・院理学研究科 廣内 篤久  
東北大・遺生研 熊谷 忠

### 1 はじめに

成層圏のオゾンは今々枯渇の一途を辿っており、21世紀初頭には、地上に到達する紫外線(UV-B; 290-320 nm)量が現在より20~50%上昇すると言われている。来るべき21世紀には従って、UV-Bストレスによる生物への影響が社会問題になると予言されている。太陽光に含まれる可視光線や赤外線は植物の生育には必須である。他方UV-Bを中心とする紫外線は生物に悪影響を及ぼす。UV-BはDNAに傷を作る。UV-Bによる生物影響の最大の原因は、この傷がDNA複製や遺伝子発現を阻害するからである。一方生物はUV-Bによる悪影響に対する防御系を獲得して進化してきた。その一つに光回復がある。光回復遺伝子で作る光回復酵素はフラビンタンパク質で、DNAにできたUV-B損傷を認識結合する。もしその場に400nm周辺の青色光があると、その光エネルギーを吸収し、フラビンの酸化還元反応によりDNA損傷を修復する。我々はこの仕組みの研究を永年続けており、多くの生物から光回復遺伝子をクローニングし解析を加えてきた。この経験をいかし、イネ等の有用植物の光回復遺伝子をクローニングし、それを用いて細胞内の光回復遺伝子量を増幅し、その結果酵素量も増え、紫外線耐性のイネを作ろうとするものである。大麦、小麦、などからも同様の操作でUV-B耐性品種を開発することが可能である。

本研究の全体的な目的は以下の5点である；1) イネのcDNAライブラリーから、光回復酵素遺伝子をクローニングする。2) 得られたcDNAを用いて、ゲノミック遺伝子をクローニングする。3) イネ農林1号は、光回復機能が低下しているため、太陽光の下では生育が悪く、収量も低い。そこで、アグロベクターの実験系を用いて、正常光回復遺伝子を農林1号に導入する。4) 得られた形質転換体が、太陽光の下で正常な発育をすることを実験的に明らかにする。5) 最後にイネ光回復遺伝子はUV-Bや青色光で誘導されることが知られている。この仕組みについて、分子遺伝学的な解析を加える。

## 2 研究経過

イネ光回復酵素遺伝子をクローニングするために、シロイヌナズナ及びクラミドモナス光回復遺伝子の活性中心のアミノ酸配列を基にprimerを作成した。イネcDNA及びゲノミックDNAを基質にPCR反応を行い、増幅断片をクローニングした。ANBI社の自動シーケンサーを用いて塩基配列を決め、それをもとに、アミノ酸配列を求めた。シロイヌナズナ光回復酵素のアミノ酸配列と比較し、高い相同性を示すものをイネのクローンとして確立した。同様のプライマーを用い、大麦、小麦からも光回復酵素遺伝子を含む断片をクローニングした。小麦についてはTACゲノミックライブラリーをスクリーニングし、光回復遺伝子を持つクローンを得ることが出来た。

## 3 研究結果

イネ、大麦、小麦から得られた光回復酵素遺伝子の一部のアミノ酸配列は、シロイヌナズナ光回復酵素のアミノ酸配列と高い相同性を示した。この断片をprobeとしてイネのcDNAライブラリーをスクリーニングし、全長を持つと思われるクローンをえた。同様に、小麦の断片を用いて、TACゲノミックライブラリーをスクリーニングし、光回復遺伝子を持つクローンを得ることが出来た。現在この解析をすすめているところである。

## 4 まとめ

イネ光回復遺伝子cDNAの全長、小麦光回復遺伝子の全長をクローニングすることができた。今後は、遺伝子産物の生化学的特性を明らかにするだけでなく、紫外線に強いイネや麦を作出して、新しい世紀の食糧問題や環境問題解決の一助としたい。

# エチレン非感受性マメ科植物の作出と特性解析

筑波大・農林・遺実セ 江面 浩 東北大・遺生研 南澤 究

## 1 はじめに

根粒形成に対するエチレンの影響は、いくつかのマメ科植物で報告されている。しかし、その詳細は今だ不明な点が多く残されている。そこで、本研究では根粒形成に対するエチレンの影響を最近の手法（形質転換体）を用いて明らかにする。そのために、遺伝子導入によりエチレン感受性の低下したマメ科植物（ミヤコグサとサイラトロ）を作出する。そして、その形質転換体の根粒形成特性の解析から根粒形成におけるエチレンの役割を明らかにする。

## 2 研究経過

我々は本研究に先立って、メロンから単離したエチレン受容体遺伝子（*Cm-ERS1* またはその改変遺伝子 *H70A*）を植物に導入してエチレン感受性を低下する方法を開発してきた。本研究ではこれらの手法をミヤコグサとサイラトロに活用して、何れかの遺伝子を導入した形質転換体を作成した。完全な順化個体の得られたミヤコグサ形質転換体に根粒菌を接種し、根粒形成数、形成された根粒の特徴を観察した。一方、得られた形質転換体の次代を採種し、その種子を用いてエチレン感受性の評価を行った。

## 3 研究結果

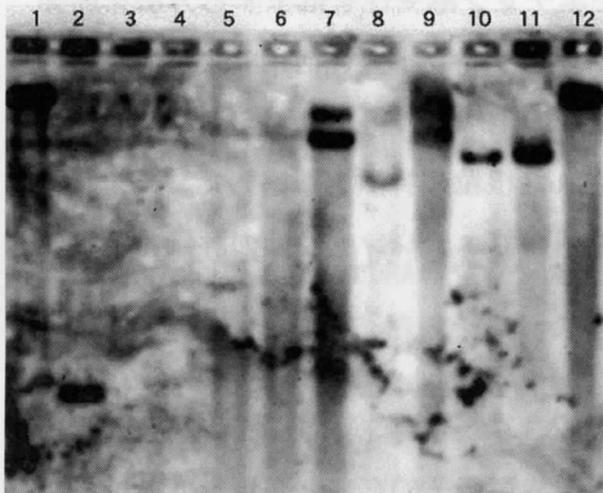
ミヤコグサについては、*Cm-ERS1* 遺伝子を導入した形質転換体 6 系統、*H70A* 遺伝子導入した形質転換体 15 系統を作成した。導入遺伝子の存在と発現をサザン解析と特異抗体を用いたウエスタン解析により確認した（図 1）。閉鎖系温室内で順化・育成して、増殖した個体に根粒菌（*Mesorhizobium loti*）の接種を行い、根粒形成状況を観察した。現在までのところ *H70A* 遺伝子を導入した形質転換体の中に根粒形成数の増加した系統（図 2）と減少した系統が見いだされた。現在これらの系統の固定化を行うとともに、得られた種子を用いて導入遺伝子、エチレン感受性および根粒形成

の関係について詳細な解析を行っている。

サイラトロについては、既に確立した培養系 (Ezura et al., 2000) を用いて *H70A* 遺伝子の導入実験を行い、形質転換カルスを獲得した。さらに、これらのカルスから多芽体を分化することができた。しかし、現在までのところ発根個体を得るには至っていない。

#### 4 まとめ

ミヤコグサについては、エチレン感受性の変化したと思われる形質転換体を作出することができた。さらに、それらの形質転換体の中から根粒形成の変化した系統を選抜することができた。サイラトロでは、形質転換カルスの選抜とそのカルスから多芽体の分化は確認できたが、再生個体の作出には至らなかった。多芽体からの植物体再生と得られた形質転換体のエチレン感受性や根粒形成の解析が今後の課題である。以上の結果得られた形質転換体を今後詳細に解析することで、根粒形成に対するエチレンの影響が一層明らかになるものと期待される。



1 Lane1 pBI121/Cm ERS1 H70A, lane2 Cm-ERS1 gene, lane3 Wild type *Lotus japonicus* and lane4-12 Transgenic *L. japonicus* lines.



2 Lane1 Wild type *Lotus japonicus*, lane2 melon young fruit, lane3-11 Transgenic *L. japonicus* lines.



図2 *H70A* 遺伝子を導入したミヤコグサ形質転換体の根粒形成状況

図1 ミヤコグサ形質転換体における導入遺伝子の確認

1、サザン解析、2、ウエスタン解析

# キュウリ芽生えのペグ形成初期過程における微細構造の解析

埼玉大・理 金子康子

## 1 はじめに

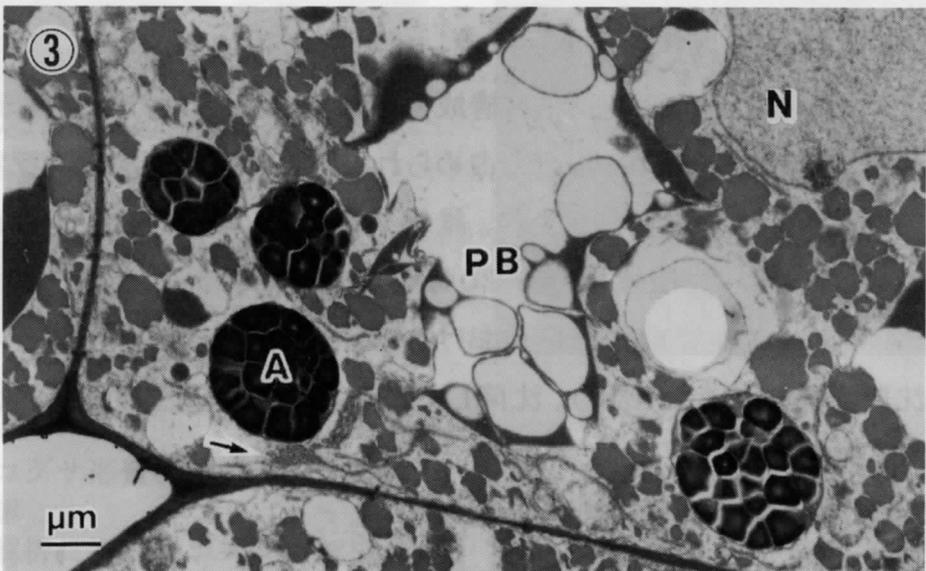
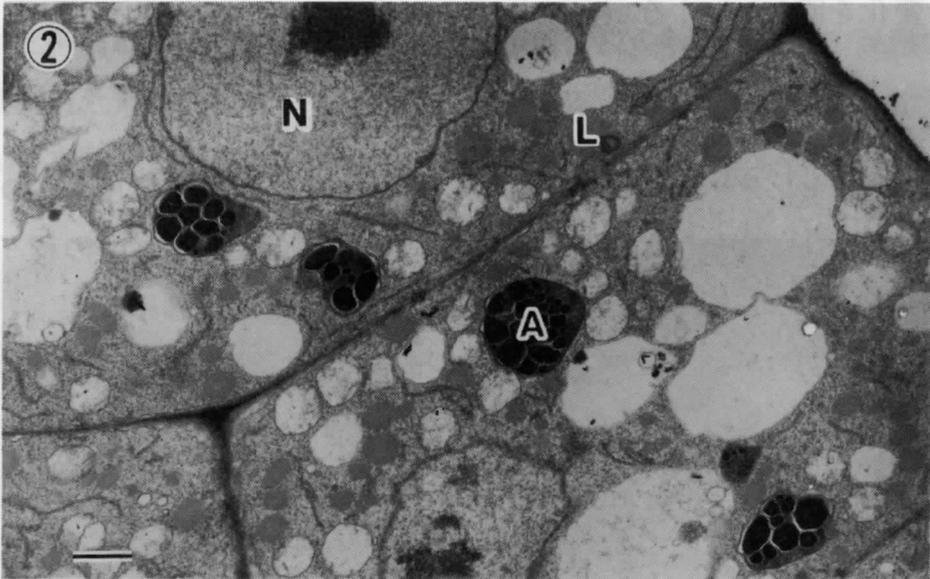
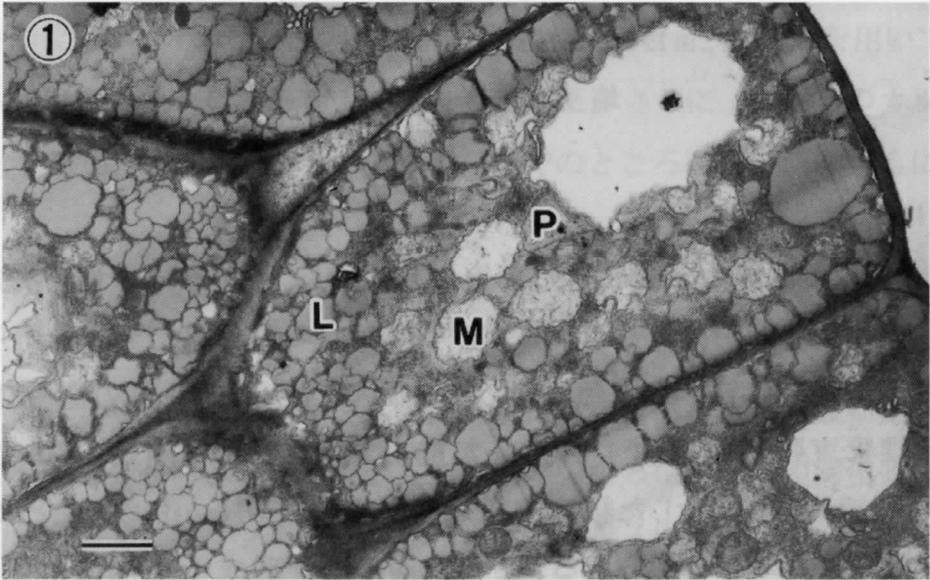
キュウリ種子中の胚軸が、吸水開始後重力を感受し、ペグ形成方向を決定し、ペグ形成を開始、または抑制する各過程における細胞内の微細構造変化を明らかにすることを目的とした。特に次の点に焦点をあてて研究を行った。1) 重力感受細胞と考えられている維管束鞘細胞のアミロプラストが重力方向に沈降を開始するまでに見られる、維管束鞘細胞を中心とした細胞内微細構造変化を明らかにすること。2) 吸水開始後、ペグ形成開始までに見られる、胚軸表層のペグ形成予定位置付近の細胞内微細構造変化を明らかにすること。

## 2 研究経過

遺伝生態研究センターにおいて、キュウリ種子を重力方向や温度などの厳密な制御下で吸水、発芽させたものを固定・観察用の試料とした。キュウリの種子はベルーイータ(親水性プラスチックフォーム)に縦置き、または横置き状態にセットし、吸水開始後ペグの発達が明らかになるまでのステージを4時間ごとに、試料の方向を保ったまま、迅速にグルタルアルデヒドで化学固定した。前固定が完了した試料は、埼玉大学においてOsO<sub>4</sub>による後固定、アセトンシリーズによる脱水、スパー樹脂包埋を経て、超薄切片を作製し、透過電子顕微鏡により観察・写真撮影を行った。

## 3 研究結果

吸水開始後12~16時間目の胚軸を構成する細胞はリポドボディ、プロテインボディなどの貯蔵物質を含む細胞内構造で占められていた。この段階で、プラスチド内にデンプンの蓄積は見られなかった(図1)。維管束鞘細胞、表層細胞ともに、デンプンの蓄積が観察されたのは、吸水開始後20時間以上経た試料であった(図2、3)。吸水開始後24時間目に維管束鞘細胞におけるデンプン粒を含むアミロプラストの重力方向への沈降が確認できた(図3)。沈降しているアミロプラストの近傍に数層に重なった小胞体が存在することもあった。



## 図の説明

図1 吸水開始後12時間目のペグ形成予定位置付近の表層細胞の透過電子顕微鏡像

(L:リポドボディ、M:ミトコンドリア、P:プラスチド)

図2 吸水開始後28時間目のペグ形成位置近くの表層細胞の透過電子顕微鏡像

(A:アミロプラスト、L:リポドボディ、N:核)

図3 吸水開始後24時間目の維管束鞘細胞の透過電子顕微鏡像

(A:アミロプラスト、L:リポドボディ、N:核、PB:プロテインボディ、矢印:小胞体)

## 4 まとめ

これまでペグ形成開始直前からペグ形成初期過程にかけての細胞内微細構造の観察から、胚軸表層細胞において細胞内構造の活発化が他の細胞より早い段階で起こること、ペグ形成予定位置付近の表層細胞に多量の小胞体の蓄積が見られることなどが明らかにされてきた。本共同研究により、今回初めて吸水後ペグ形成が開始されるまでの、極めて初期の細胞内微細構造の観察を行うことが可能となった。その結果、表層細胞、維管束鞘細胞ともにデンプン粒の蓄積はペグの形成直前になって初めて見られることなど、新たな知見を得ることができた。今後さらに詳細な細胞内微細構造変化の比較検討を行い、遺伝生態研究センターで高橋秀幸教授らにより行われている生化学的、分子生物学的実験結果も合わせて考察していくことにより、重力感受からペグの形成にいたる細胞・組織レベルの機構に関する貴重な知見を得ることが期待される。

# 環境変動に対応した根粒菌のシステムティックな遺伝子発現

鹿兒島大・理・ 内海俊樹  
東北大・遺生研 南澤 究、三井久幸

## 1. はじめに

土壌中には、多種多様な微生物がそれぞれの土壌環境に適応して生息している。なかでも根粒菌は、マメ科植物と共生し根粒を形成することにより、菌にとっては貧栄養条件の土壌中から宿主植物細胞内へと生活の場を移し、根粒の崩壊後は、増殖能を失わなかった菌は再び土壌中に帰って単生生活を送るという特徴的な生活環をもっている。特に宿主植物に感染し共生系を確立する過程では、単生生活の状態とは形態的にも生理的にも大きく異なるバクテロイドへと変化して窒素固定能を発現する。このようなダイナミックな生活環境の変化に対応して、根粒菌は自信が持つ全ての遺伝子セットの中から、必要な遺伝子セットを選び出して機能させるシステムティックな遺伝子発現系を保持していると予想される。本研究では、飢餓状態、栄養増殖状態、共生状態の異なる条件下で、どのような遺伝子が発現しているかを網羅的に把握し比較することにより、根粒菌の遺伝子発現のネットワークを明らかにすることを旨とした。

## 2. 研究経過

近年の微生物のゲノム科学の進歩は著しいが、複雑な自然界の微生物生態現象や生物間相互作用の解明に生かされて、その真価を発揮し裾野が広がっていく。ダイナミックな生活環をもつ根粒菌は、ゲノム科学のアプローチと微生物生態学を結び付けて研究展開するための格好の材料である。昨年度、かずさDNA研究所からミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) MAFF303099 株の全ゲノム配列決定された (Kaneko et al. 2000)。

そこで、本研究では、(1) ミヤコグサ根粒菌の栄養飢餓条件下の増殖特性、(2) 単生・共生状態ミヤコグサ根粒菌からの RNA 抽出条件の検討、(3) ミヤコグサ根粒菌全ゲノムをカバーするマイクロアレーの作製をミヤコグサコンソーシアム根粒菌分科会と協力して行った。

## 3. 研究結果

### (1) ミヤコグサ根粒菌の栄養飢餓条件下の増殖特性

ミヤコグサ根粒菌を  $10^8$  cells/ml 程度まで HM 培地で培養した後、培地を滅菌水及び炭素源・窒素源を除いた培地に置換した。それらを 30°C で振とうし、全菌数、生菌数、コロニー形成菌数を経時的に計測した。全菌数は光学顕微鏡による直接計数、コロニー形成菌数は HM 寒天培地上のコロニー形成数を計測した。また、生菌数は Molecular Probes 社の LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits を用いて計測した。

栄養飢餓条件下に移してから、全菌数および生菌数は  $5 \times 10^8$  cells/ml 前後でほぼ一定の値を示すが、コロニー形成菌数は1日目から低下し15日目までに全菌数の0.5%程度まで減少した(Figure)。この結果は、栄養飢餓条件下において大部分のミヤコグサ根粒菌細胞は「生きているが培養できない状態 (Viable but non-culturable; VBNC) 状態になることが示唆していた。

### (2) 単生・共生状態ミヤコグサ根粒菌からの RNA 抽出条件の検討

Ditta らの方法 (Ditta et al., 1987) を基に、次のような Hot phenol 法でミヤコグサ根粒菌体より RNA 抽出を試みた。

根粒菌を 10 ml の TY 培地で充分増えるまで培養し、これをプレカルチャーとした。プレカルチャーした菌液 300  $\mu$ l を、100 ml の TY 培地の入った坂口フラスコ (500 ml 容) に接種し、一晚振盪培養した。培養終了後、培養液を氷中にて冷却した。これに、予め冷却しておいた 100 ml extraction buffer (80 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) をすばやく注ぎ込んだ。軽く震盪した後、7000 rpm、4°C で3分間遠心し、上澄を捨てた。菌体を 1% sodium dodecyl、及び、37°C で30分 predigest した 500  $\mu$ g/ml アクチナーゼ E を加えた 50mM Tris-20mM EDTA (pH 8.0) 5ml に懸濁し、50°C で10分間インキュベートした。これに等量の 65°C に熱した phenol-chloroform を加えよく振り、3000 rpm で10分間室温で遠心し、水層を別の遠心管に移した。この操作をきれいな水層がとれるまで、2-3回繰返した。次に、この水層に二倍量の 100%EtOH を加え DNA と RNA を沈殿させ、14000 rpm、4°C で10分間遠心し上澄みを捨て、沈殿を 100%EtOH で洗浄した後、乾燥させた。この沈殿を 5 ml の 50 mM Tris-HCl-5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.8) に溶かし、これに 50  $\mu$ g/ml DNase I (RNase-free) を加え、37°C で20分間インキュベートした。DNase を失活させるためにもう一度フェノール抽出、エタノール沈殿を行った。この沈殿物を 10-1 TE buffer に溶解し、電気泳動に使用した。根粒バクテロイドからの RNA 調製は、以下のように行った。1.0 g の根粒を、冷却した乳鉢に入れ 3 ml grinding buffer を加えて穏やかに磨砕し、3層のミラクロスを通しろ過した。これに等量の 0.3 M スクロースを含む extraction buffer を加え 7000 rpm、4°C で3分間遠心し、以後の操作は培養菌の場合と同様に行った。培養菌とバクテロイドからの RNA を電気泳動したところ、いずれの RNA 標品もアレー解析のプロープとして用いることが可能であると判断された(写真A)。

### (3) ミヤコグサ根粒菌全ゲノムをカバーするマクロアレーの作製

かずさ DNA 研究所が全ゲノム配列決定 (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>) に使用した M13 ファージクローンからゲノム全体をカバーするマクロアレーを作成した。ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株は、7.04 Mb のクロモソームと 352 kb と 208 kb の二つのプラスミド (合計 7.60 Mb) を持っており、ほぼ全領域 (7.60 Mb) をカバーする 3832 個の M13 ファージクローン (1-3 kb) を選択し、PCR 法でそれぞれの DNA 断片を増幅後、イソプロパノール沈殿を行った。BPB、グリセロールの入った TE に溶解後、Biomek2000 を用いてメンブレンに 6x6 single dot を行った (写真B)。

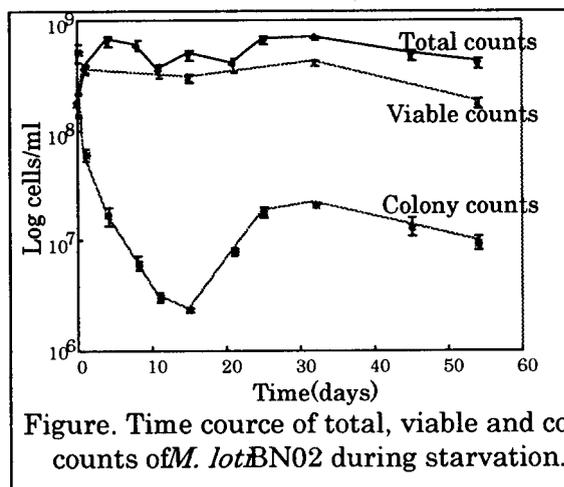
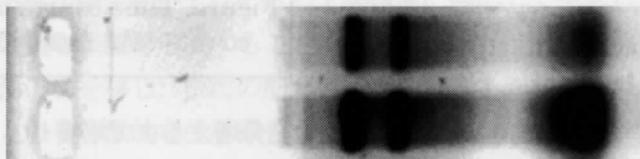


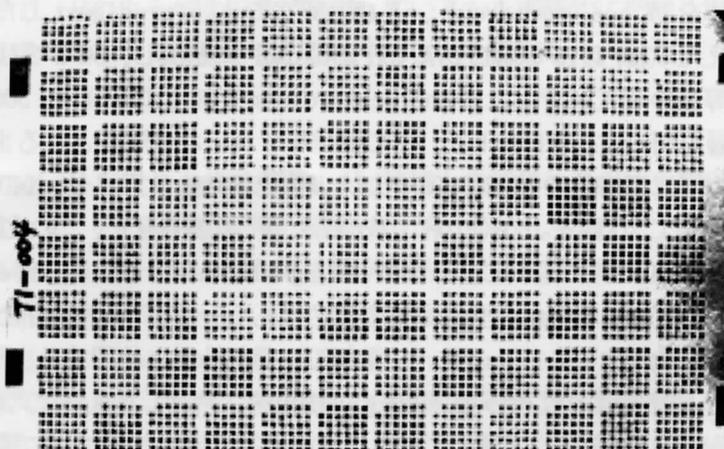
Figure. Time course of total, viable and colony counts of *M. lot* BN02 during starvation.

#### 4. まとめ

ミヤコグサ根粒菌の増殖特性の解析、RNA 抽出条件の検討、全ゲノムをカバーするマクロアレーの作製を行った本共同研究を基盤に、飢餓状態、栄養増殖状態、共生状態におけるミヤコグサ根粒菌の網羅的な遺伝子発現のネットワークを明らかにすることが可能になった。今後、対数増殖中期、定常期、栄養飢餓の細胞、フラボノイド誘導細胞、バクテロイド細胞などから RNA を抽出し、RI 標識の cDNA をプローブとして、アレー解析を行う。さらに、処理による差が見られた領域について RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行い、環境変動下における根粒菌の網羅的な遺伝子発現ネットワークの解析を目指す予定である。



写真A ミヤコグサ根粒菌の培養菌体およびバクテロイドから抽出した RNA の電気泳動



写真B ミヤコグサ根粒菌の全ゲノム領域をカバーするマクロアレー (メンブレンセット2枚の内の1枚)

#### 5. 参考文献等

Ditta, G et al. The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen-regulated. J. Bacteriol., 169: 3217-3223, 1987.

Kaneko, et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Research 7:311-338, 2000.

<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>

#### 4 平成12年度外国人（訪問者等）特別講義

Dr. Mariangela Hungria, ブラジル農牧研究公社農業微生物研究所, ブラジル, 2000年8月2日  
特別講義タイトル: Nitrogen fixation with soybean and commonbean crops in Brazil.

Professor Gary Stacey (University of Tennessee), テネシー大学, 米国, 2000年10月31日  
特別講義タイトル: Coordination of plant and bacterial geneexpression during the early stages of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*.

Professor Michael J. Sadowsky (University of Minnesota), ミネソタ大学, 米国, 2000年10月31日  
特別講義タイトル: The influence of inoculum dosag eand other physiological factors on host-controlled restriction of nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum*/soybean symbiosis.

Dr. Jiri Damborsky (Masaryk University), マサリク大学, チェコ, 2000年12月4日  
特別講義タイトル: Computer modelling in Enviromental Biotechnology.



## 第4章 教育活動



## 大学院教育

本センターの各研究分野は、東北大学大学院農学研究科に所属し、応用生命科学専攻、環境修復工学専攻等の大学院学生の教育研究を指導している。

また、本センターは、農学研究所の時代から、全学の大学院学生を対象とする「生態学合同講義」の事務局となってきた。現在では、この「生態学合同講義」は、本センター会議室で行われている。

【大学院学生一覧】

平成13年2月1日現在

分野 区分	遺 伝 子 環 境 応 答 研 究 分 野	遺 伝 子 機 能 制 御 研 究 分 野	遺 伝 子 適 応 生 態 研 究 分 野	臨 界 環 境 遺 伝 生 態 研 究 分 野	地 圏 環 境 遺 伝 生 態 研 究 分 野	遺 伝 生 態 情 報 シ ス テ ム 研 究 分 野
博士 後期 3年	高本 耕三	河内 義景	青木 秀年	羽田 厚	安田 剛 鮫島 玲子	
博士 後期 2年			山崎 聖司			
博士 後期 1年		佐伯 裕史 朴 珍姫	高浪タカ子 鎌田 源司		岡崎 伸 貫井 憲之	源河 浩之 小松 春伸
修士 2年	鄭 明淑	尹 弼勇 佐藤 敏昭 石川 優一	阪田 忠 水野 英俊 森 亮之	竹内 敦子 張 文会	鈴木 永 佐藤 俊文	大石 健朗
修士 1年		谷 なつ子 朴 炳振 稗貫 誉	安彦 真文 笹川 洋平 高橋 信行	藤野 貴奈		大堀 陽

【研究所等研究生】

丁 原 英 (臨界環境遺伝生態研究分野)

Md.Rezaul Islam (遺伝生態情報システム研究分野)



## 第5章 刊 行 物



刊行物一覧

(平成13年3月現在)

刊行物名	掲載内容	昭和63年度	平成元年度	平成2年度	平成3年度	平成4年度	平成5年度	平成6年度	平成7年度	平成8年度	平成9年度	平成10年度	平成11年度	平成12年度
I G E シリーズ (邦文) (英文No.22)	本センターで行った遺伝生態分野に関するワークショップの成果集	No.1 }	No.5 }	No.9 }	No.14 }	No.16 }	No.18 }	No.20	No.21	No.22 }	No.24	No.25 }	No.27 }	No.29
I S K シリーズ (英文)	各研究部門の主要成果に関する論文をテーマ別に収録				No.1	No.2 }	No.5 }	No.7 }	No.9	No.10 }	No.12	—	—	No.13
遺伝生態研究センター通信 (邦文)	遺伝生態領域開拓に関する意見交換と本センターの研究活動についての情報提供	No.1 }	No.5 }	No.9 }	No.13 }	No.17 }	No.21 }	No.25 }	No.29 }	No.33 }	No.36 }	No.41 NS	No.5 }	No.7 }
ニュースレター (英文)	遺伝生態分野に関する海外との交流・情報交換	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	/		
共同利用研究報告 (邦文)	本センターが行ったワークショップ及び共同利用研究の報告集	昭和63年度～平成2年度間の3年分		平成3年3月刊行	平成3年度～平成5年度間の3年分		平成6年3月刊行	平成6年度～平成9年度間の4年分			平成10年3月刊行			
自己点検・評価実施報告書 (邦文)	本センター自己点検・評価委員会による実施報告書							平成6年3月			平成8年3月			
外部評価報告書 (邦文)	本センターの組織・運営・研究内容等に関して、国内委員及び外国人委員から提出された「評価報告書」等をまとめたもの										平成8年11月刊行			

# IGEシリーズ

No. 29 遺伝情報のダイナミズムとその分子機構

平成12年9月21日・22日開催  
平成12年度ワークショップ(遺伝生態情報システム研究部門)

## 目 次

はじめに	津田 雅孝 (東北大・遺生研)
残留性農薬の分解系酵素遺伝子群とその動態	永田 裕二 (東北大・遺生研)
PCB分解細菌におけるPCB分解遺伝子の多様性と 線状プラスミド	福田 雅夫 (長岡技科大・工)
難分解性芳香族炭水化物分解遺伝子群を担う トランスポゾン	津田 雅孝 (東北大・遺生研)
ビフェニル/サリチル酸代謝遺伝子群をコードする 自己可動化因子 bphsa1 エLEMENT	古川 謙介 (九州大・院生)
微生物を用いた環境浄化—遺伝子配列より何が 解かるか?	渡辺 一哉 ((株)海洋バイオテクノ ロジー研究所)
病原性大腸菌ゲノムの多様性 —病原性大腸菌O157のゲノム解析から—	林 哲也 (信州大・医)
腸球菌プラスミドの接合伝達:mating signal と 受容菌の役割	谷本 弘一 (群馬大・医)
ブドウ球菌の二成分性白血球崩壊毒素のファージ 変換と遺伝子の獲得機構	神尾 好是 (東北大・院農)
植物病原細菌による植物への信号伝達機構	露無 慎二 (静岡大・院農)
植物防御遺伝子の発現調節機構と細菌病耐性植物の 分子育種の試み	井村 善之 (東北大・遺生研)
イネ培養細胞におけるエリシター応答の分子機構	南 栄一 (農水省・農生研)
ウィルスに対する植物の応答反応の分子機構	江原 淑夫 (東北大・院農)
イネ科植物におけるミトコンドリア型アルデヒド 脱水酵素(ALDH2)の役割	中園 幹生 (東大・院農生科)

Contents

1. Introduction
2. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*
3. Division of rhizobitoxime-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence
4. Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: A correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production
5. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics
6. Diversity and field site variation of indigenous populations of soybean bradyrhizobia in Japan by fingerprints with repeated sequences RS $\alpha$  and RS $\beta$
7. New *Bradyrhizobium japonicum* that possess high copy numbers of the repeated sequence RS $\alpha$
8. Slow-growing and oligotrophic soil bacteria phylogenetically close to *Bradyrhizobium japonicum*
9. IS1631 occurrence in *Bradyrhizobium japonicum* highly reiterated sequence-possessing strains with high copy numbers of repeated sequences RS $\alpha$  and RS $\beta$
10. Diversity of soybean bradyrhizobia
11. Determination of rhizobitoxine and dihydrorhizobitoxine in soybean plants by amino acid analyzer
12. Serinol (2-amino-1, 3-propanediol) and 3-amino-1, 2-propanediol in soybean nodules
13. Rhizobitoxine inhibition of hydrogenase synthesis in free-living *Bradyrhizobium japonicum*
14. Hydrogenase activity of soybean nodules doublely infected with *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*
15. Stimulation of hydrogenase synthesis in free-living *Bradyrhizobium japonicum* by addition of nitrate and ammonium
16. New assay for rhizobitoxine based on inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
17. Indolepyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*
18. The Involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation
19. *Bradyrhizobium elkanii* induces outer cortical root swelling in soybean
20. Preferential nodulation of *Glycine max*, *Glycine soja* and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species *japonicum* and *elkanii*
21. Nodulation and competitiveness of *gusA*-marked *Bradyrhizobium japonicum* A1017 in soybean
22. Genetic ecology of soybean bradyrhizobia

## 遺伝生態研究センター通信

NS No. 7 (2000年 5月)

細菌の3-クロロカテコールと2, 4-Dの分解遺伝子群の構造と再編成	小川直人 (農環研)
多成分流体混合系のパターン形成	寶澤光紀 (反応研)
外国研究所訪問記-スペインセビーリャに滞在して-	宮崎厚 (遺生研)

NS No. 8 (2000年. 8月)

ダイズ根粒菌の遺伝生態研究の窓を通して考えてきたこと	南澤究 (遺生研)
ワークショップ 遺伝情報のダイナミズムとその分子機構	—————
COE-国際会議 Plant and Ultraviolet-B Radiation: Effects of Increasing Ultraviolet-B Radiation on Ecosystem and Resistance of Plant to Ultraviolet-B Radiation の案内	—————
Introduction to Department of Plant Genetic and Breeding of China Agricultural University	Sun Chuanqing (China Agricultural University)

NS No. 9 (2001年. 3月)

遺生研の廃止と大学院生命科学研究科への移行	大瀧保 (遺生研)
シンポジウム「植物と微生物における光形態形成の周辺」プログラム	—————
細菌による環境汚染物質分解研究のこれまでとこれから	永田裕二 (遺生研)
植物の紫外線防御機構の解明を目指して	日出間純 (遺生研)
雌雄異株植物の性決定機構とその進化	菅野明 (遺生研)
無節藻の生物学と多核細胞研究会	片岡博尚 (遺生研)