

新 制
農
747

高等植物におけるショ糖合成能力の 遺伝子工学的強化に関する研究

坂 本 正 弘

1997

高等植物におけるショ糖合成能力の
遺伝子工学的強化に関する研究

坂 本 正 弘

1997

目次

高等植物におけるショ糖合成能力の 遺伝子工学的強化に関する研究

序章	はじめに	1
第1章	光合成に関与する遺伝子 ～ <i>Lhcb2</i> 遺伝子を中心に～	
1.1	はじめに	3
1.2	実験材料および実験方法	5
1.2.1	実験材料	5
1.2.2	ゲノミックライブラリー	5
1.2.3	DNA塩基配列の決定法	6
1.2.4	植物細胞への遺伝子導入	6
1.2.4a	アグロバクテリウムによる タバコ細胞への遺伝子導入	6
1.2.4b	エレクトロポレーション法による イネ細胞への遺伝子導入	6
1.2.5	GUS活性	7
1.3	実験結果	7
1.3.1	<i>Lhcb2</i> 遺伝子の構造	7
1.3.2	<i>Lhcb2</i> 遺伝子の転写開始点	9
1.3.3	5'-領域の構造的特徴	9
1.3.4	<i>Lhcb2</i> 遺伝子のプロモーター活性	12
1.3.4a	形質転換タバコでの結果	12
1.3.4b	形質転換イネでの結果	16
1.3.5	光による遺伝子発現および器官特異性	19
1.4	考察	24
1.5	要約	27

第2章 糖の合成に関与する遺伝子 ～SPS遺伝子を中心に～

2.1	はじめに	29
2.2	実験材料および実験方法	32
2.2.1	実験材料	32
2.2.2	DNAの抽出法	32
2.2.3	RFLPマッピング	32
2.2.4	エレクトロポレーション法による遺伝子導入	33
2.2.5	SPS活性の測定（アントロン法）	33
2.2.5a	植物葉からの酵素の粗抽出	33
2.2.5b	酵素活性の測定	34
2.2.5c	酵素活性の算出	34
2.2.6	ウエスタン解析	35
2.2.6a	タンパク質の抽出	35
2.2.6b	プローブ	35
2.2.7	シヨ糖濃度およびデンプン濃度	35
2.3	実験結果	35
2.3.1	ゲノミックライブラリーのスクリーニング	35
2.3.2	SPS遺伝子のコピー数および座乗する染色体	36
2.3.3	SPS遺伝子の構造	36
2.3.4	他の植物のSPS遺伝子との比較	41
2.3.5	SPS遺伝子の5'-領域について	41
2.3.6	SPS遺伝子の発現について	44
2.3.7	光誘導型ベクター-pLHC-SPSの構築および遺伝子導入	44
2.3.8	形質転換植物のSPS活性	47
2.3.9	高SPS活性をもつ形質転換体の解析	49
2.4	考察	49
2.5	要約	57

第3章 エネルギー産生に関与する遺伝子 ～ミトコンドリア*atpb* 遺伝子～

3.1 はじめに	59
3.2 実験材料および実験方法	61
3.2.1 実験材料	61
3.2.2 イネcDNAライブラリー	61
3.2.3 トマトゲノミックライブラリー	61
3.2.4 スクリーニング	62
3.2.5 塩基配列の決定法	62
3.3 実験結果	62
3.3.1 <i>atpb</i> 遺伝子の構造～イネおよびトマト～	62
3.3.2 生物に普遍的な <i>atpb</i> 遺伝子	67
3.3.3 <i>atpb</i> 遺伝子の発現について	67
3.4 考察	74
3.5 要約	76
第4章 結語と今後の展望	77
謝 辞	79
引用文献	81
出願特許一覧	89

略号一覧

本論文においては、以下の略号を用いた。

ATPase	adenosine triphosphatase ATP合成酵素
atpb	ATP合成酵素 β サブユニット遺伝子
cDNA	相補DNA
GUS	β -glucuronidase
HPT	hygromycin phosphotransferase
Lhcb2	集光性クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子 (タイプI)
LRE	light-responsive element : 光感应性要素
mRNA	メッセンジャー (伝令) RNA
NPT II	neomycin phosphotransferase
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription PCR
SPS	シヨ糖リン酸合成酵素

序章 はじめに

人類はその誕生以来、地球上に繁栄する多くの植物を利用し生活してきた。すなわち、毎日の食生活を潤す食糧、住居のための建築用材、衣類などに使われる繊維、植物に含まれる生理活性物質を利用した薬剤など、さまざまな分野において生活に欠かせないものとして利用してきた。とくに日々日常生活において意識するとしなやかにかかわらず、植物の産生する酸素の恩恵によって人類はその生命活動を維持してきたといっても過言ではない。

このように人類は、衣食住のあらゆる場面において植物を利用するための努力をしてきた。食糧としての植物に対しては、収量・品質の改良/向上をめざすために栽培技術の検討とともに、品種改良を目的として育種をおこなってきた。また、バイオマス資源としての植物については有効利用を図るための研究が盛んにおこなわれてきている。近年の著しい進展をとげた遺伝子組換え技術によって、さまざまな観点から植物の機能にかかわる遺伝子がクローニングされ、遺伝子の構造、発現様式、機能が解析されてきている。その結果、植物が本来もっていない遺伝形質を付与し、あるいは大幅に機能を改変して新しい品種が創出され、すでに実用化されたものもある（たとえば日もちのするトマトや害虫に強いワタなど）。

本論文においては、食糧生産物として、またバイオマス生産物としての植物の生産性に関与する遺伝子について検討した。すなわち、植物を植物たらしめている光合成に関係する遺伝子を中心に取上げた。光合成に関与する遺伝子は、空気中の二酸化炭素を有機酸に固定する反応を触媒する酵素であるリブローズ-1、5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) をはじめとして多数の遺伝子がクローニング、解析されている（マツ； Yamamoto et al. 1988、エンドウ； Timko et al. 1985、Fluhr et al. 1986、ダイズ； Berry-Lowe et al. 1982、ペチュニア； Dean et al. 1985、Turner et al. 1986、コムギ； Broglie et al. 1983、トマト； Pichersky et al. 1986、Sugita et al. 1987、タバコ； Mazur and Chui 1985）。また、光合成の反応の場である葉緑体には独自のDNAが存在しており、その全塩基配列もいくつかの植物において明らかとなっている（タバコ； Shinozaki et al. 1986、イネ； Hiratsuka et al. 1989など）。

第1章では、これら光合成遺伝子の中で光を吸収して光エネルギーを反応中心へ伝える集光性クロロフィルa/b結合タンパク質の遺伝子 (*Lhcb2*) について検討

した。通常、高等植物には4種類のクロロフィル-タンパク質複合体が存在しているが、ここで取り上げる複合体は集光性クロロフィル-タンパク質複合体Ⅱ (LHCⅡ) と呼ばれ、葉緑体中のほとんどのクロロフィル b と、40~60%のクロロフィル a を結合している。主として吸収した光エネルギーを光化学系Ⅱへ伝達する。*Lhcb2*遺伝子の構造とプロモーター領域の特徴、さらにはこのプロモーターの下流にモニター遺伝子を接続して*Lhcb2*遺伝子のプロモーターの強さ、ならびに遺伝子の発現部位について検討した。また、光合成遺伝子の特徴でもある光誘導についても検討をおこなった。

第2章では、光合成によって産生される炭酸同化産物の分配を制御すると考えられるショ糖リン酸合成酵素 (SPS) の遺伝子について検討した。植物の光合成は日中でもっとも日射量が多い午後2時頃になると効率が低下する現象が知られている (光合成の昼寝現象)。これには、いくつかの原因が考えられているが、その中の一つとして、午後2時頃までの光合成活動によって生産されたデンプンが葉緑体内に蓄積されて光合成を抑制しているという説がある。葉緑体内で二酸化炭素が固定されて炭酸同化産物としてデンプンを合成するのではなく、トリオースリン酸の段階で細胞質へ排出させてショ糖合成に振り分けることができれば、光合成の昼寝現象もなくなり活発に二酸化炭素の吸収をおこなうのではないかと考えられる。

炭酸同化産物をデンプンではなくショ糖に振り分けるには、炭酸同化産物の分配を司ると言われているショ糖リン酸合成酵素を制御することがひとつの可能性として考えられる。分配を制御し、光合成を昼寝から目覚めさせ活発に活動させることは、ソース器官の強化につながり、ひいてはシンク器官の充実をもたらすと予想される。ソース器官の強化によって、近年地球環境の悪化の一因と言われる二酸化炭素をより効率良く吸収し、さらにシンク器官の充実、すなわち貯蔵組織である種子の充実 (収量の増大) や、二次肥大成長の増加が望める。

第3章では、ミトコンドリアのATP合成酵素の β サブユニットの遺伝子 (*atpb*) について検討した。ミトコンドリアは真核生物の細胞内小器官として、物質の酸化によるエネルギーを利用してATPを合成する酸化的リン酸化を主な役割としている。したがって、ATP合成酵素はミトコンドリアの中心的な役割をはたしており、その中でも β サブユニットは活性中心として重要である。このような観点から、*atpb*遺伝子について若干の検討をおこなった。

第1章 光合成に関与する遺伝子～Lhcb2遺伝子を中心に～

1.1 はじめに

植物は太陽の光を利用して大気中の二酸化炭素から多くの有機物を合成している。植物における光合成の場は葉緑体であり、植物細胞1個あたり数十個存在するといわれている。葉緑体は二重膜をもった構造になっており、内側の構造はチラコイド膜が多数重なったグラナから形成されている。チラコイド膜には4つの基本単位からなる顆粒が存在しており（図1-1）、光化学系ⅠとⅡもこのチラコイド膜上にある。

集光性クロロフィル-タンパク質複合体Ⅱ（LHCⅡ）は、光化学系Ⅱに接してチラコイド膜に存在しており、光エネルギーを光化学系Ⅱへ伝達している（図1-1、総説としてはThornber 1986、Anderson 1986、Glazer and Melis 1987など）。このLHCⅡでクロロフィル_aと_bを結合しているタンパク質は、チラコイド膜における主要タンパク質であり核DNAにコードされている（Schmidt et al. 1981、Terao et al. 1988、Buetow et al. 1988）。細胞質で転写・翻訳されたタンパク質はトランジットペプチドによって葉緑体へ輸送され、そこでトランジットペプチドを切り落として成熟タンパク質となる（Schmidt and Mishkind 1986）。

LHCⅡ遺伝子の発現は、光が照射されているときに限定され、暗所で生育させた植物では認められないことが明らかにされている（Apel and Kloppstech 1978、Cuming and Bennett 1981、Broglie et al. 1981、Mathis and Burkey 1987）。光によって活性化されたLHCPⅡ遺伝子の発現は、少なくともフィトクロームの仲介によるものであり転写レベルでの制御を受けている（Tobin and Silverthorne 1985）。

また、LHCPⅡ遺伝子は器官特異的に発現する。すなわち、LHCPⅡ遺伝子のmRNAは根においては認められなかった（エンドウ；Thompson et al. 1983、トマト；Piechulla et al. 1986）。しかしながら、これらのLHCPⅡ遺伝子に関する報告は大多数が双子葉植物の遺伝子に関するものであり、イネをはじめとする穀物の大半が属する単子葉植物についての報告はコムギ（Lamppa et al. 1985）など、ごく限られたものを除き詳細に研究されていない。

イネのLHCPⅡ遺伝子のcDNAについては、その一次構造によってタイプⅠとタイプⅡの2タイプに分類できることが明らかにされた（Matsuoka 1990）。こ

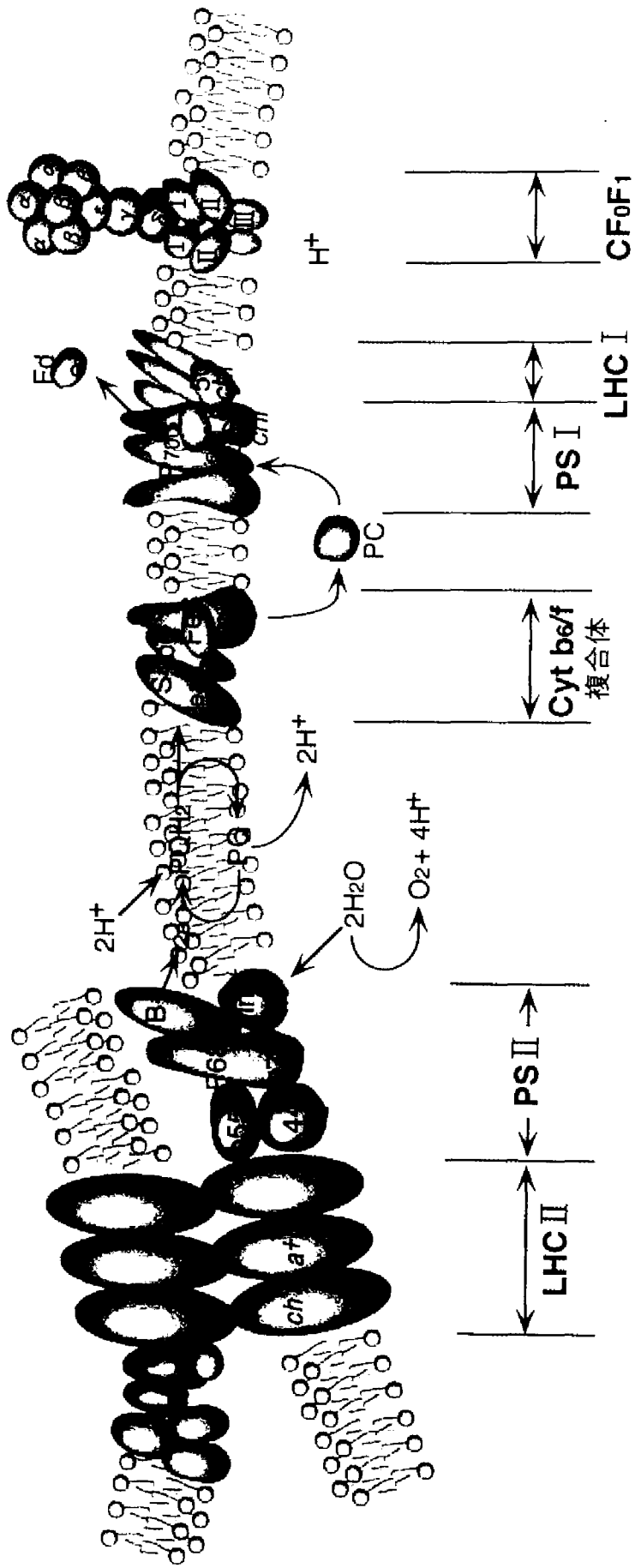


図1-1 葉緑体のチラコイド膜の構造

れはすでに報告のある他の植物の場合と同じである（総説としては、Beutow et al. 1988）。タイプⅠ遺伝子はゲノム中で少なくとも2コピー存在し、タイプⅡ遺伝子も同程度か、やや少ないコピー数で存在するのではないかと考えられている（Matsuoka 1990）。トマトのタイプⅡ遺伝子もゲノム中では2コピー存在することが明らかとなっている（Pichersky et al. 1987）。

本章では、イネの集光性クロロフィルa/b結合タンパク質のタイプⅠ遺伝子（*Lhcb2*）について検討した。すなわち、*Lhcb2*遺伝子の構造とプロモーター領域の特徴、さらにはこのプロモーターの下流にモニター遺伝子であるGUS遺伝子を接続し、タバコとイネに遺伝子導入をおこない、得られた形質転換植物を解析することにより*Lhcb2*遺伝子のプロモーターの強さ、ならびに遺伝子の発現部位について検討する。さらに光合成遺伝子の特徴でもある光誘導についても解析をおこなう。

すなわち、*Lhcb2*遺伝子のプロモーターが遺伝子レベルでの品種改良をおこなう分子育種にとって、導入遺伝子を発現させるプロモーターとして必要となる次の条件を満たすものであるのか、検討をおこなった。

- ①強力である
- ②発現部位が限定できる
- ③人為的に発現が誘導可能である

1.2 実験材料および実験方法

1.2.1 植物

イネ：*Oryza sativa*（日本晴）はパーミキュライト上に播種し、30℃で発芽後2～3週間経過した黄化芽生えをゲノムDNA抽出用とした。

タバコ：*Nicotiana tabacum*は温室内で成育させ、形質転換用に葉を切除して使用した。

1.2.2 ゲノミックライブラリー

イネのゲノミックライブラリーは次の手順によって作成した（Matsuoka et al.

1988、Rogers et al. 1985)。

- ①イネの黄化芽生えを細かく裁断し、液体窒素中で粉碎する。
- ②バッファーで抽出して、遠心して残渣を除く。
- ③フェノール/クロロホルムで除タンパクしたのち、エタノール沈殿によりDNAを得る。
- ④得られたゲノムDNAを制限酵素Sau3A Iで部分分解したのち、10~40%のショ糖密度勾配遠心をおこなう。
- ⑤10kbp以上のDNA断片を λ EMBL3にクローニングし、インビトロパッケージングする。

1.2.3 DNA塩基配列の決定

クローニングしたDNAの塩基配列の決定はSangerらの方法に準じておこなった (Sanger et al. 1977)。

1.2.4 植物細胞への遺伝子導入

1.2.4a アグロバクテリウムによるタバコ細胞への遺伝子導入

タバコ細胞への遺伝子導入は、Horschらの方法に従いリーフディスク法によっておこなった (Horsch et al. 1985)。すなわち、温室で生育させたタバコの葉を切除・滅菌ののち、バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムの培養液に懸濁させ感染させた。懸濁後、アグロバクテリウムをよくふき取り、カーベニシリン (250 μ g/ml) を添加した培地上で培養をおこなった。

1.2.4b エレクトロポレーション法によるイネ細胞への遺伝子導入

イネ細胞への遺伝子導入は、Tadaらの方法に従いエレクトロポレーション法によっておこなった (Tada et al. 1990)。すなわち、継代培養4日目の培養細胞からプロトプラストを単離精製し、エレクトロポレーション用バッファーに懸濁した。これに精製したプラスミドDNA (最終濃度20 μ g/ml) およびモニターとなるハイグロマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドp35S-HPT (最終濃度10 μ g/ml) を添加し、氷上にて10分間放置したのち、減衰波パルスを印可した。さらに室温で20分間放置し、バッファーを培地と交換し培養をおこなった。

1.2.5 GUS活性分析

GUS活性の測定はJeffersonらの方法 (Jefferson et al. 1987) に従った。すなわち、植物体の抽出液に基質となる4-methyl umbelliferyl glucuronide (4-MUG) を加え、37°C 1時間反応させたのち4-methyl umbelliferon (4-MU) の生成量を蛍光測定し、抽出液中のタンパク質量からGUS活性を算出した。また、組織化学的方法は次のようにおこなった。組織切片を1 mMの5-bromo-4-chloro-3-indlyl- β -D-glucuronide (X-Glc) 溶液に4~10時間浸漬して染色したのち、エタノールでクロロフィルを除去してから観察した。抽出液中のタンパク質量はBio-Rad社のプロテイン・アッセイキットを用いた。

1.3 実験結果

1.3.1 *Lhcb2*遺伝子の構造

ゲノミックライブラリーからポジティブクローンを数個得たが、その中で完全長をもつと思われたクローン λ LHC2120について、その全塩基配列を決定した (図 1-2)。 λ LHC2120は798bpのリーディングフレームをもち、265アミノ酸残基をコードする。このクローンの塩基配列は先に決定された集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質LHCP IIのタイプ I 遺伝子 (*Lhcb2*, Matsuoka 1990) であることが判明した。すでに、この*Lhcb2*遺伝子は核ゲノム中ではごく少数の遺伝子ファミリーであることが知られている (Matsuoka 1990)。

今回クローニングしたイネのLHCP IIタイプ I 遺伝子にはイントロンは存在していない。これはすでに報告されている他の植物のタイプ I 遺伝子と同様である (Buetow et al. 1988)。

*Lhcb2*は転写・翻訳されたのち細胞質から葉緑体へ輸送される。そのときに行き先を決定するものがトランジット・ペプチドであるが、イネの*Lhcb2*遺伝子から予想されるアミノ酸配列から、はじめの31残基がトランジット・ペプチドであると推定される (Keegstra et al. 1989)。

図1-2 イネ*Lhcb2*遺伝子の全塩基配列

イネの*Lhcb2*遺伝子の全塩基配列を示す。枠で囲んだ領域がアミノ酸をコードしている部分。下線はpolyA付加配列。転写開始点を+1としている。

```

-805 * * * * * -741
      agatctagacatcacttctgattgggattaaggtaatgagccctatctgatgtcagtgaggattg
      * * * * * -671
tttacagtaccgcagcaaacactgacgtatgggtctggaccatattgttagccaccgctactgcatcagc
      * * * * * -601
agtattgcagagaatttgcacagcagctactgcatcagcagattacagatgggggtgcacaaagccggg
      * * * * * -531
tcagtttacccaactaccttccctccttaactataacttatattcaatttatgtctctcgaaaatagat
      * * * * * -461
atgaacatacttttttaaaaaataactacatattgtgaatttggatccttacctttacatttgagtt
      * * * * * -391
atgacgaacaactttatcgattatataaaagaaggatgacttcttatccaacaaatcctatagtaatg
      * * * * * -321
tcttttaactttcagtgactaacatataaacatcaaacgagtcctatataaggataatctacgaag
      * * * * * -251
aattgtcatcccacatttttacactgccactatcagttaaaactgaaaaccagctcaccccaagctccc
      * * * * * -181
aagaatcttcgagaaactataaactccgccgaaaatctcggacaaaccgcggctcacacgcctccac
      * * * * * -111
gcacccaaacccccaccctagaatatcctctccttggccaccgcgcgcacatcagcctcccaatctcc
      * * * * * -41
ccgccccacgcgagcgcgaatcgcgagcgcctttagatttcccaagataaggactcgatccccctca
      * * * * * +1 * * * * * 30
cttccgcgctatttaactcccgccatctccaaactccCAACTCACACTCGCTCGCTCATCGCCATCT
      * * * * * * * * * * 100
CTCTCAGCTCTCACAGCTCACTGCATCA ATGGCCGCGGCCACCATGGCGCTCTCTCCCCGGTGATGGC
      * * * * * M A A A T M A L S S P V M A
CCGCGCGCGCGCGCTCGACCTCCTCCGCGCTCTTCGGCGAGGCGCGGATCACCATGCGCAAGACCGCGCG
R A A P S T S S A L F G E A R I T M R K T A A
AAGCCCAAGCCGCGCGCGTCTCGGGGAGCCCGTGGTACGGCGCCGACCGGTCCTCTACCTCGGCCCCG
K P K P A A S S G S P W Y G A D R V L Y L G P L
TCTCCGGCGAGCCGCGAGCTACCTCACCGGCGAGTTCGGGGCGACTACGGGTGGGACCCGCGGGGCT
S G E P P S Y L T G E F P G D Y G W D T A G L
CTCCGCGACCCGGAGACGTTCCGCAAGAACCGGGAGCTGGAGGTGATCCACTCCCGGTGGGCGATGCTG
S A D P E T F A K N R E L E V I H S R W A M L
GGCGCGCTCGGCTGCGTCTTCCGGAGCTCCTCGCCGGAACGGCGTCAAGTTCGGCGAGGCGCGTGGT
G A L G C V F P E L L A R N G V K F G E A V W F
TCAAGGGCGGCTCGCAGATCTTACGCGAGGGCGGGCTCGACTACCTCGGCAACCCGAGCCTGATCCACGC
K A G S Q I F S E G G L D Y L G N P S L I H A
GCAGAGCATECTCGCCATCTGGGCGGTGCAGGTGGTGTCTATGGGCGCGTGCAGGGGTACCGCATCGCC
Q S I L A I W A V Q V V L M G A V E G Y R I A
GGCGGGCGGCTCGGCGAGGTGCTCGACCCGCTTACCCCGGGCGGCTTCGACCCGCTCGGCCTCGCCG
G G P L G E V V D P L Y P G G A F D P L G L A D
ATGACCCCGAGGCGTTCGCGGAGCTCAAGGTGAAGGAGATCAAGAAAGGCCCGCTCGCCATGTTCTCCAT
D P E A F A E L K V K E I K K G R L A M F S M
GTTCCGCTTCTCGTCCAGGCCATCGTCACCGGCAAGGGCCCCCTCGAGAACCTCGCCGACCACCTCGCC
F G F F V Q A I V T G K G P L E N L A D H L A
GACCCCGTCAACAACAACGCTGGGCGTACGCCACCAACTTCTCCCCGGAAGTGA AGTGGGGGACCGT
D P V N N N A W A Y A T N F V P G K # * * * * * 940
AGCTTAGCAGTGGTTAATTGTGGTGGATGGATTTGTGGCCAGCGAGTTCGTTGTCTTTGGGTTGGGGAA
      * * * * * * * * * * 1010
GATGGGTTTAGTGGCAGGATGATGATCGAGTTGGTGTGTACTACTAAGAAGATGAAGAAGAAGATG
      * * * * * * * * * * 1080
ATGTTTTTGAATAATGATTTTATTCGTTTCCaactaatggcttaggtacttatccgtgggttattct
      * * * * * * * * * * 1150
gattagcggatttctcatctctattagatcggaacaaatactccctcgatcccaaatataaccatttc
      * * * * * * * * * * 1220
tggctatgtatagtgtaaatgttagtctaaattgtttatattgtggcatggaaggattaattagtctt
      * * * * * * * * * * 1271
taaatctacgtatacaatagattgggtcgaatctacgaagataatggatcc

```

1.3.2 *Lhcb2*遺伝子の転写開始点

イネ*Lhcb2*遺伝子の転写開始点をプライマーエクステンション法によって決定した。翻訳開始のATGの一つ上流のC残基から、反対ストランドの17残基をプライマーとして合成した(5'-GATGCAGTGAGCTGTGA-3')。反応生成物をM13の塩基配列のシーケンスと比較して、その塩基数が58残基であることが判明した(図 1-3)。したがって*Lhcb2*遺伝子の転写開始点は翻訳開始点であるATGの上流59残基であることが明らかとなった。

転写開始点の前後の塩基配列(CCCAAC)は、他の植物のLHCP II 遺伝子の転写開始点領域と相同性が高い(図 1-3, Lammpa et al. 1985, Kohorn et al. 1986)。しかしながら、転写開始点自身はC残基であり、他の植物の多くがA残基であるのと異なっておりきわめてまれなケースに属する(Joshi 1987)。

1.3.3 5'-領域の構造的特徴

植物を含め、真核生物の遺伝子の多くは、その5'-領域にTATAボックスやCAATボックスといわれる特徴的な配列を有している。イネの*Lhcb2*遺伝子の転写開始点から30bp上流に典型的なTATAボックスが、92bp上流にはCAATボックスが存在していることがわかった。

GrobとStüberは光合成関連の遺伝子を中心にこれらの遺伝子の5'-領域に光感性要素(LRE: Light-responsive element)が存在することを指摘した(Grob and Stüber 1987)。LREのコンセンサス配列はAAGATAAGGである。この要素がイネ*Lhcb2*遺伝子のどこに存在するか検索したところ、転写開始点上流64bpから56bpにかけて存在することがわかった。*Lhcb2*遺伝子上流にLREが存在することは、*Lhcb2*遺伝子がフィトクロームを介して光によってその発現を制御されていることを示唆するものである。

*Lhcb2*遺伝子上流域に、さらに別の制御領域が存在しないか、イネ*Lhcb2*遺伝子の5'-上流域と同じく単子葉植物であるコムギとトウモロコシの*Lhcb2*遺伝子5'-上流域と比較した。コムギとは5'-上流域ばかりでなくトランジットペプチド領域においても相同性が認められなかった。これに対してトウモロコシ*Lhcb2*遺伝子との比較では、トランジットペプチド領域も含め、TATAボックスやCAATボックスなどの5'-上流域まで相同性が認められた。さらに、上流域にも相同性があっ

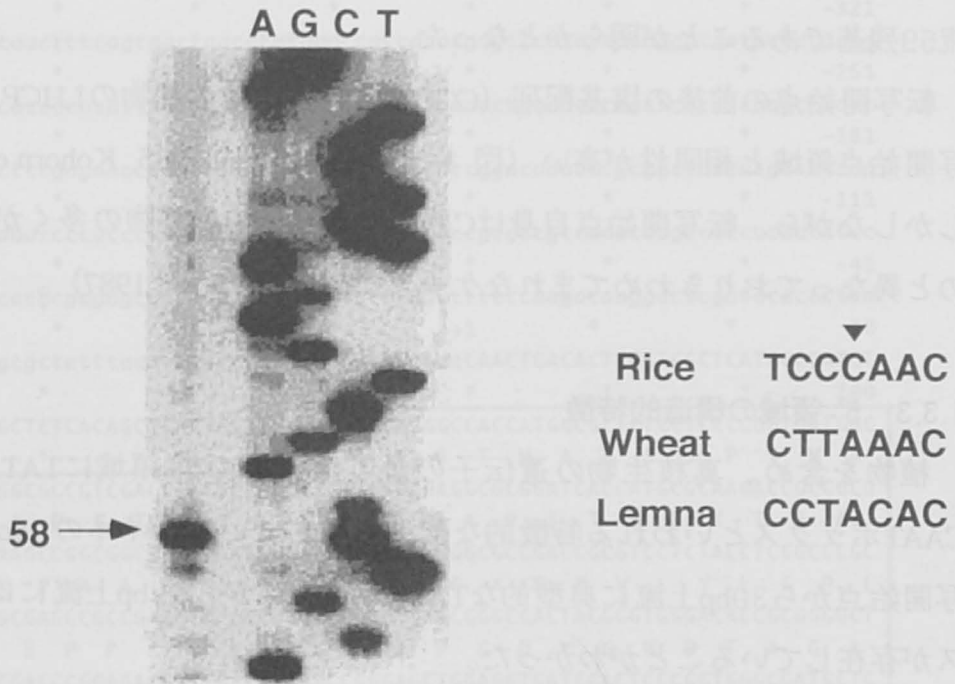


図 1-3 プライマーエクステンション法による転写開始点の解析

合成したDNAを³²Pでラベルし、プライマーとしてpoly(A)⁺RNAにハイブリダイズさせて逆転写酵素で伸長させた。M13のmp18をサイズマーカーとして使用した。左側の数字は伸長産物の大きさを示している。

右側に示した塩基配列は、他の植物との転写開始点 (▼) との比較を表している。


```

Rice   TTATAAACTC CGCCGAAAAATCTC GGACAAACCCGCGGCTCACACGCCTCCACGCACCGCCGCG
      * * ***** ** * ** * ***** * * **
Maize  CACCTAGCGA CGCCGCAAAAT-TC ACCGCGAGGGGCACCGGGCACGGCAAAAACAAAAGCTGCC

Rice   CAAACCCACCCCTAGAATATC-----CT-----CTCCT-- TGGCCACCGCGCCGCCACATCA
      * ***** ** *** ***** **
Maize  GCCCGGCGCGGTGAGAATATCTGGCGACTGGCGGAGACCTGG TGGCCAGCGCGCGGCCACATCA

Rice   GCCTCCCAATC TCCCCGCCCA-CGCGCGAGC G CCAAT CGCGA-GCGCCTTTAGATTTCCC
      *** ** ** * * * * * * * * * * ***** ** * ** * ** * * * * *
Maize  GCCACCC-ATC CGCCACCTCACCTCCGGCGA G CCAAT GGCAACTCGTCTTAAGATTCCAC
      -92 -90

Rice   AAGATAAGG ACTCGATCCCC CCTCACTTCCCG CGC TATTTA AACTCCCGGCCATCTCC---
      ***** ** ***** * * * * * * * * * * ***** * *
Maize  GAGATAAGG ACCCGATCGCC -----GGCGA CGC TATTTA GCCAGGTGCGCCCCCACGGT
      -65 -62 -30 -34

Rice   AACTCCCACTCACACTCGCTCGCTC-ATCGCCATCTCTCTCA-GCTCTCACAGCTCA-CTGCATCA
      * **** ** ** * * * * * * * * * * ** ***** ** * * *
Maize  AACTCCACCA-----GCGGCATCTATAGCAACCGGTCCAACACTTTAC-GCTCAGCTTCAGCA

START
Rice   ATGGCCGCGCC
      ***** ** **
Maize  ATGGCTGCCTCC

```

図 1-4 イネとトウモロコシの*Lhcb2*遺伝子の5'-領域の比較

TATAボックス、CAATボックスとLREは太線で囲んだ。その他の相同性の高い領域を実線（相同性高い）、点線（やや低い）で囲んだ。翻訳開始部位はSTARTで示した。

たので、両者の塩基配列を比較した（図 1-4）。

イネとトウモロコシの*Lhcb2*遺伝子の5'上流域の塩基配列を比較してみると、TATA、CAATボックスばかりでなく、LREやその他の領域でも相同性が高い部分が存在することが明らかとなった。通常、遺伝子の5'領域はLREなどの遺伝子発現のための制御領域を除いては相同性はない。したがって、イネとトウモロコシの*Lhcb2*遺伝子5'領域に存在する相同配列は*Lhcb2*遺伝子の発現の制御に関与している可能性が高いと推測できる。

フィトクロームの制御を受ける植物の遺伝子の5'領域については、GATAボックスなどのコンセンサス配列が知られている（Castresana et al. 1987, Manzana and Gruissem 1988, Gidoni et al. 1989）。このGATAボックスは、タバコの細胞核から抽出されたいくつかのタンパク因子や、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター領域に結合することが知られているASF-2因子とも相互作用を起こすことが知られている（Lam and Chua 1989）。

1.3.4 *Lhcb2*遺伝子のプロモーター活性

1.3.4a 形質転換タバコでの結果

イネの*Lhcb2*遺伝子のプロモーター活性を検討するために、図 1-5に示したベクターpLHC-GUS/Nを構築した。このベクターをアグロバクテリウムのバイナリーベクター形質転換系でタバコ細胞に導入し、形質転換個体を再生させた。得られた形質転換個体の各組織でのGUS活性を検討した。表 1-1には葉、茎、葉柄、根の各組織におけるGUS活性を測定した結果を示した。形質転換個体によってGUS活性に差はあるが、総合してみると葉でのGUS活性がもっとも高く、次に茎と花卉での活性が同程度で、根でのGUS活性がもっとも低い結果となっている。この結果はイネの*Lhcb2*遺伝子のプロモーターがタバコ植物体の中で器官特異的に発現することを示している。このことから、*Lhcb2*遺伝子の発現様式が単子葉植物でも双子葉植物でも類似の制御を受けていると推測される。

植物の組織切片を染色してみた結果を図 1-6に示す。葉においてもっとも強い染色が認められた（図 1-6A）。葉の各組織では、海綿状組織と柵状細胞で強い発色が認められ、主脈では若干弱い発色が認められている。エンドウのLHCP遺伝子のプロモーター下によりタバコ細胞でGUS遺伝子を発現させたところ、表

表 1-1 形質転換タバコにおけるGUS活性
GUS activity (pmole 4MU/min./mg protein)

植物体	植物器官			
	葉	茎	花弁	根
16	344.5	239.7	287.5	75.0
17	108.6	23.5	25.0	96.1
18	519.6	276.7	271.0	149.5
25	431.7	191.1	162.9	122.0
27	353.4	258.9	275.5	99.5

イネ*Lhcb2* 遺伝子のプロモーター制御によるGUS活性を、異なる5種類の形質転換タバコで調べた。

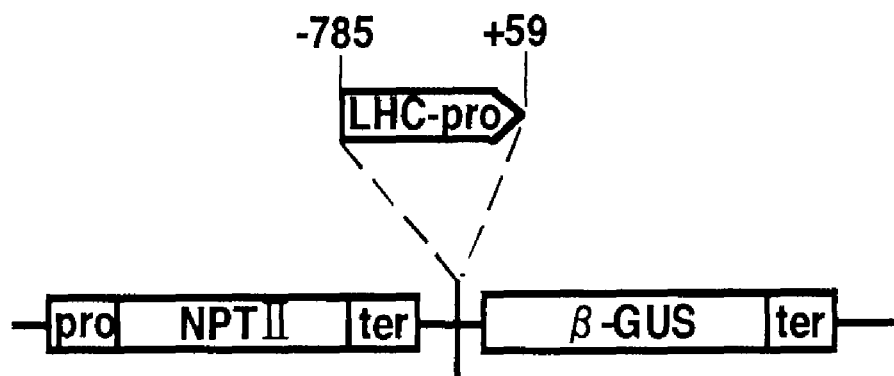


図 1-5 ベクター pLHC-GUS/N の構築

Lhcb2 遺伝子の 5'-領域である -785 から +59bp までを PCR によって増幅し、バイナリーベクター系のプラスミドである pBI101 (Jefferson et al.1987) に導入した。

NPT II はネオマイシン耐性遺伝子である neomycin phosphotransferase II の遺伝子を、pro はプロモーター、ter はターミネーターを示す。

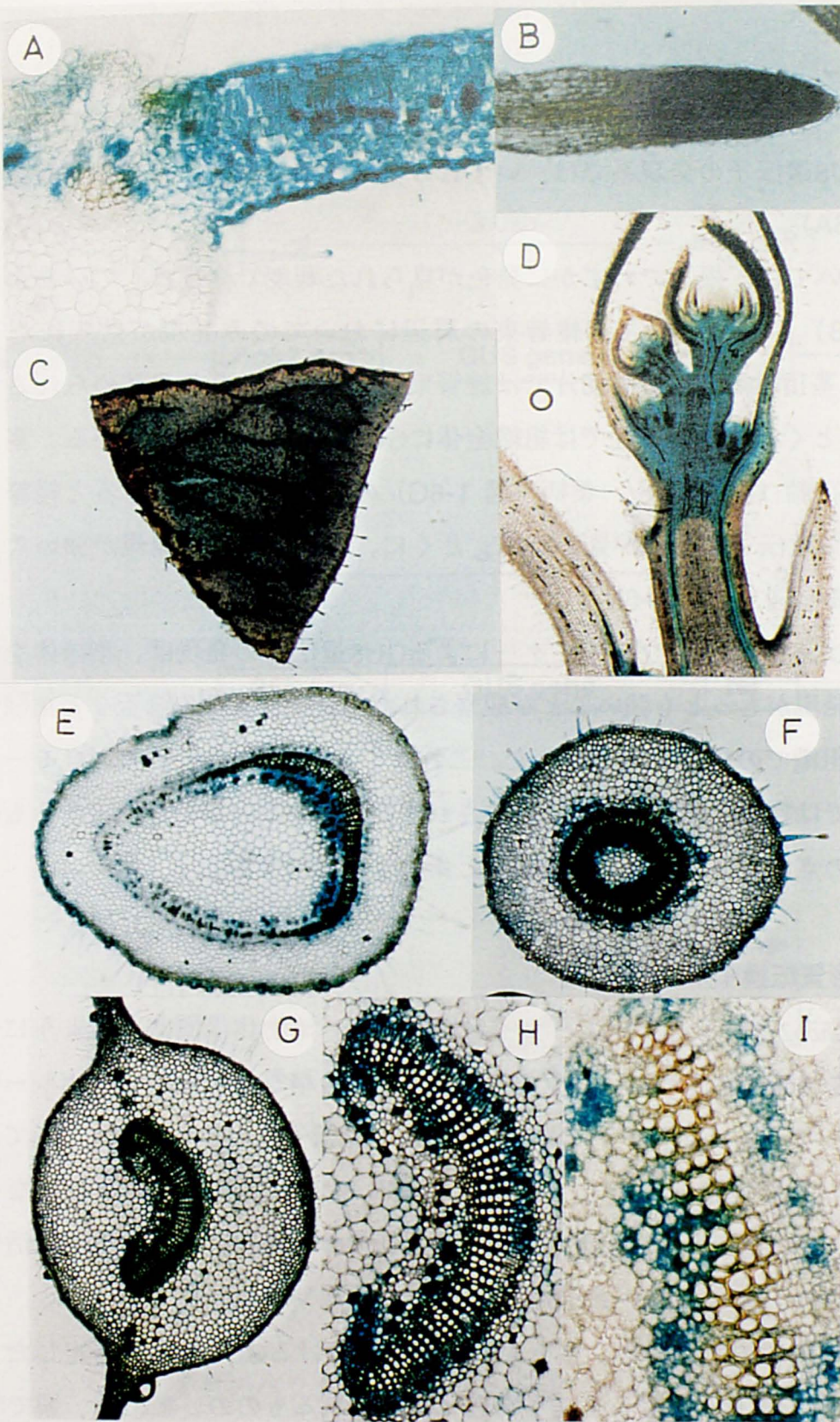


図1-6 形質転換タバコ各組織におけるGUS活性の分布
 A: 葉の横断切片、B: 芽生えの根、C: 花弁、D: 茎頂の縦方向切片
 E: 茎の横断切片、F: 花軸の横断切片、G: 葉柄の横断切片
 H、I: Gの拡大図

皮細胞での発現は認められなかったが (Simpson et al. 1986)、イネのプロモーターによるGUS遺伝子の発現系では、いずれの表皮細胞においても発色が観察された (図1-6A)。

根においては、根端でわずかに発色が見られた程度で発現はしていなかった (図 1-6B)。花卉では主に維管束の周辺においてのみ発現が見られた (図 1-6C)。茎頂組織の縦方向切片では維管束において強い発色が認められる (図 1-6D)。とくに生長点付近では組織全体にGUS遺伝子が発現している。茎 (図 1-6E)、花軸 (図 1-6F)、葉柄 (図 1-6G) の横断切片を観察すると維管束周辺でのGUS遺伝子の発現が見られる。とくに、篩管近辺での発現が強いことが観察される (図 1-6E~1-6I)。

イネの*Lhcb2*遺伝子のプロモーターによるGUS遺伝子の発現は、葉緑体を含む組織での発現がもっとも強いことが観察されたが、茎や葉柄の篩管など葉緑体を含まない組織での発現も認められた。これはイネの*Lhcb2*遺伝子のプロモーターがタバコでは完全に葉緑体組織に限定されて働いていないことを示唆するものである。この点については、次節の結果とあわせて比較する。

1.3.4b 形質転換イネでの結果

イネの*Lhcb2*遺伝子のプロモーターが本来のイネ植物体中ではどのように発現するのかを検定するために、ベクターpLHC-GUSを構築しエレクトロポレーション法によってイネプロトプラストに導入した。遺伝子導入のモニターとしてハイグロマイシン耐性遺伝子をもつベクターp35S-GUSと共形質転換をおこなった (図 1-7)。培養し得られたカルスから形質転換体を再生させ、そのGUS活性および発現部位を調べた。

得られた形質転換体の葉、茎、穎および根におけるGUS活性を測定した (表 1-2)。形質転換個体によって若干の差は認められるものの、葉、茎、穎でGUSがかなり強く発現していることがわかる。これに対して根においてはGUS活性は低く、対照と比較するといくらか活性は強いが、葉などの器官と比較するときわめて低い。CaMV35SプロモーターでGUS遺伝子発現させた形質転換個体では、いずれの組織においてもほぼ同等のGUS活性を示した。またCaMV35Sプロモーターの場合のGUS活性値と、*Lhcb2*プロモーターのGUS活性値の場合とを比較す

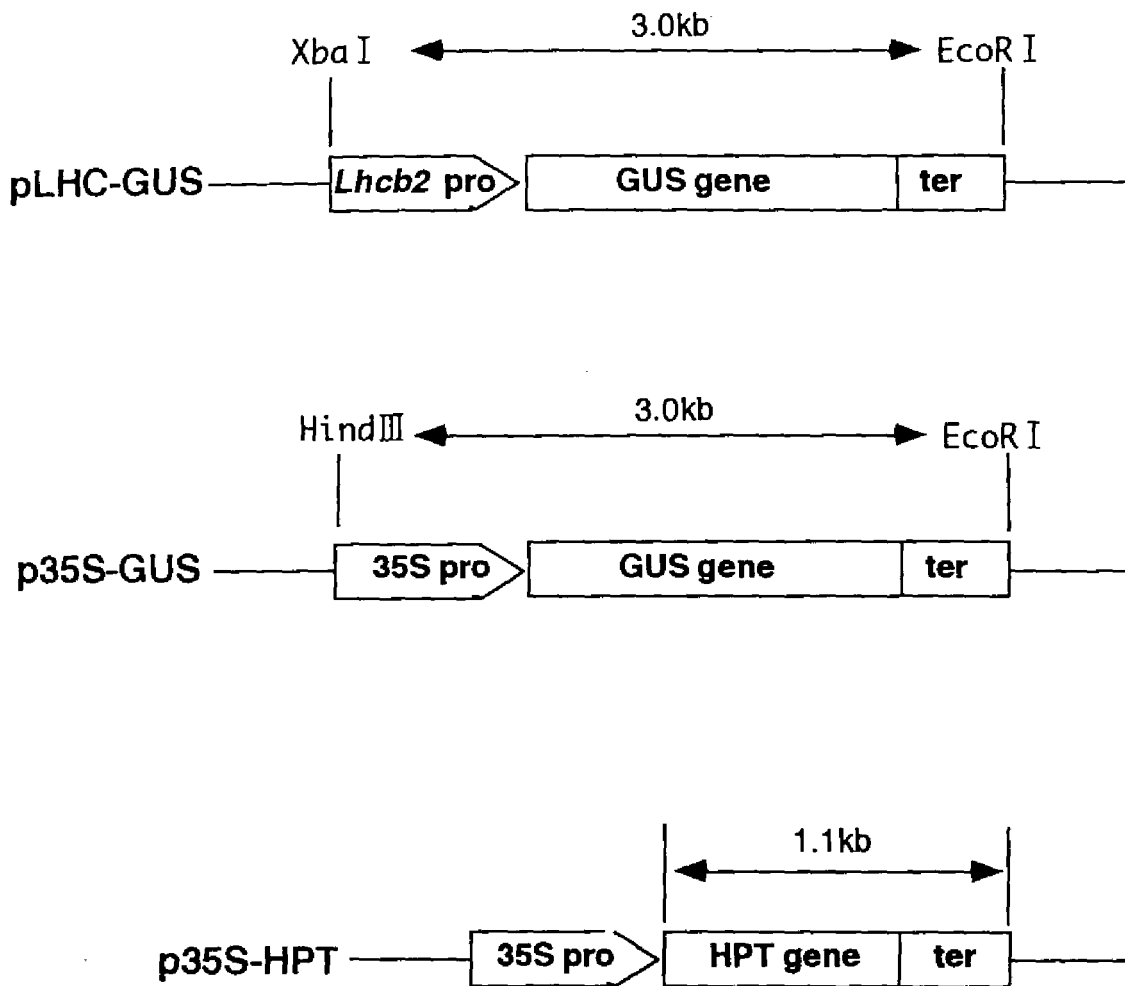


図 1-7 各ベクターの構造

いずれのベクターもプラスミドpUC19上に構築している。HPTはハイグロマイシン耐性遺伝子であるhygromycinphosphotransferase IIの遺伝子を、proはプロモーター、terはターミネーターを示す。35SはCaMVの35Sプロモーター。

表 1-2 形質転換イネにおけるGUS活性

GUS activity (pmple 4MU / min. / mg protein)

植物体	植物器官			
	葉	莖	穎	根
control	62	153	73	39
LH1	68780			
LH2	516			
LH3	42420			
LH4	32140			
LH6	67180	45550	79980	780
LH11	55900	31930	67260	250
LG13	6010	3290	12040	2040

各値は 3 サンプルの平均値

control : 非形質転換体

LH1-11 : pLHC-GUSによる形質転換体

LG13 : p35S-GUSによる形質転換体

ると*Lhcb2*プロモーターの方が数倍～10倍も強いことがわかる。

形質転換体の各組織をX-Glcで染色したところ、*Lhcb2*プロモーターの場合では、根を除くいずれの組織においても青く染色された（図 1-8 a, b, e, g, i）。これは葉緑素を形成している器官にGUS遺伝子が発現していることを示しているものである。これに対してCaMV35Sプロモーターで導入した形質転換体では、GUS遺伝子は根を含めていずれの器官でも発現している（図 1-8 c, d, f, h, j）。とくに、葉の切片組織を染色した場合（図 1-8i, j）には、*Lhcb2*プロモーターでは、クロロフィルをもつ葉肉細胞で強く発現しているのが認められるのに対して、CaMV35Sプロモーターの場合では、葉肉細胞に加えて維管束でも発現しているのが認められる。また、葯を潰して観察したところでは、*Lhcb2*プロモーターでは維管束が青く染色されないのに対して、35Sプロモーターでは維管束がはっきりと青く染色されている（図 1-8e, f）。これらの結果からもCaMV35Sプロモーターが組織非特異的に発現するプロモーターであることが証明される。

さらに、形質転換個体の自殖種子でのGUSの発現を観察した。pLHC-GUSでの形質転換個体は基質を4時間吸収させた状態で幼根においてかすかにGUS活性が認められる（青く染色される）だけであり、終夜放置した状態でも変化はなかった。4日経過すると胚で明らかに活性が認められた（図 1-9）。これに対して、p35S-GUSでの形質転換体から得られた自殖種子では4時間の段階ですでに胚乳全体が青く染色され、4日経過した段階でも糊粉層やその他の組織でもすべてにおいてGUS活性があることがわかった。この結果からも*Lhcb2*遺伝子のプロモーターによってGUS遺伝子が器官特異的に発現していることがわかる。

1.3.5 光による遺伝子発現および器官特異性

GUS活性が光によって誘導されるか、pLHC-GUSとp35S-GUSでそれぞれ形質転換した植物体から得た自殖種子を用いて実験をおこなった。すなわち、それぞれの自殖種子を25℃、暗所で発芽・生育させた（14日間）。この後、光を照射し照射後のGUS活性の変化を追跡した（図 1-10）。光照射5時間後からGUS活性が上昇し、8時間で最大に達した。p35S-GUSの場合には、光による誘導は認められなかった。

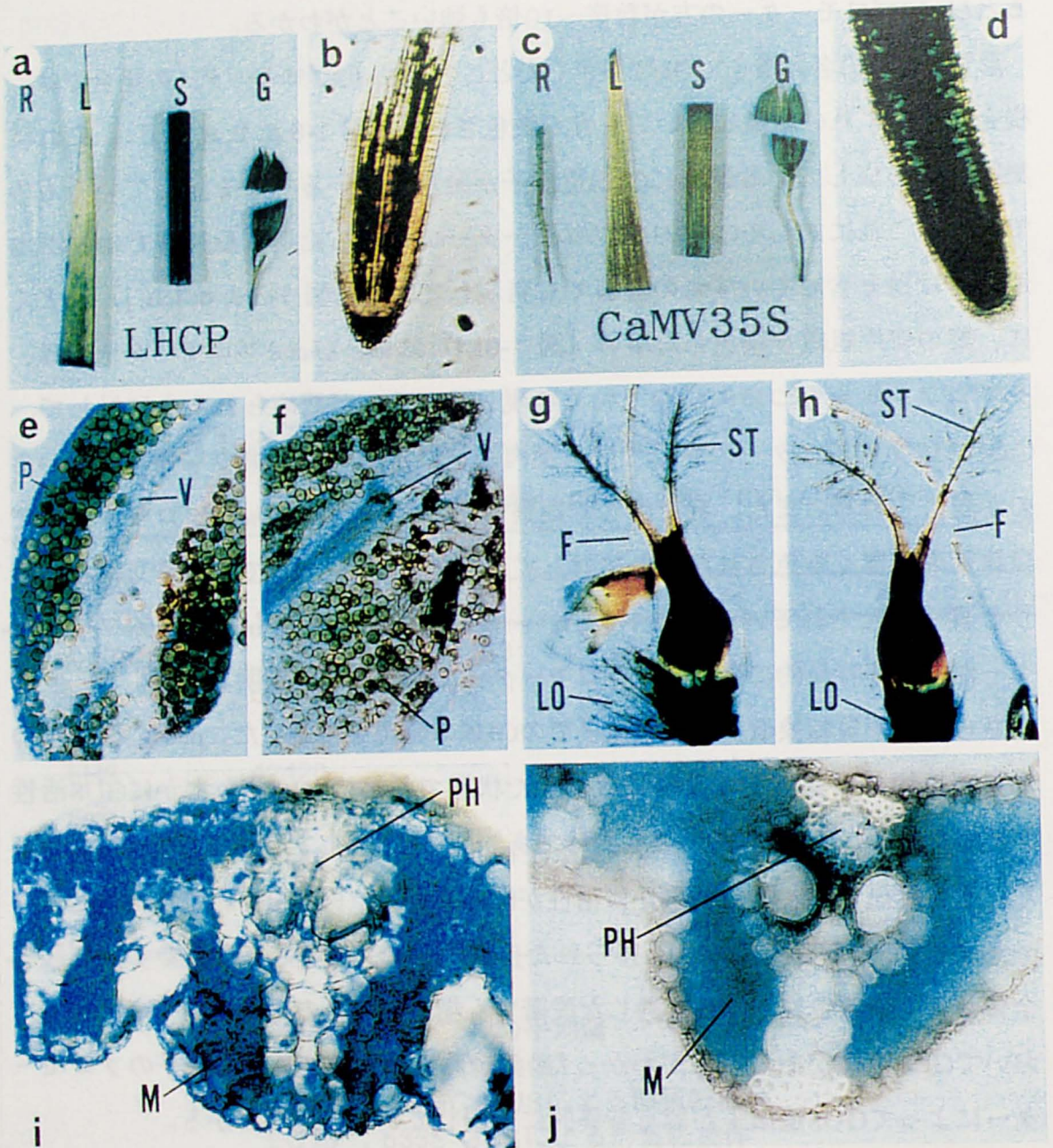


図 1-8 形質転換イネの各組織におけるGUS活性の分布

a, b, e, g, i : pLHC-GUSによる形質転換個体LH10

c, d, f, h, j : p35S-GUSによる形質転換個体でのGUS活性の分布

a, c : 左からR/根、L/葉、S/茎、G/穎 b, d : 根の拡大図

e, f : つぶした葯、P/花粉、V/維管束

g, h : 胚珠、ST/柱頭、LO/鱗被、F/花糸

i, j : 葉の横断切片、PH/篩管、M/葉肉細胞

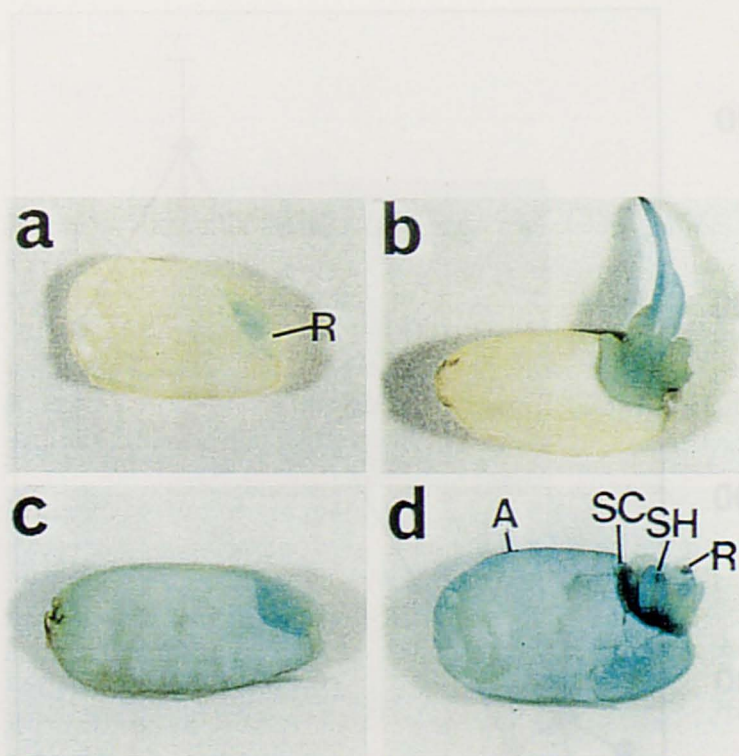


図 1-9 形質転換個体からの自殖種子でのGUS活性

a, b : pLHC-GUSによる形質転換個体種子

c, d : p35S-GUSによる形質転換個体種子

X-Glc吸収後 a, c は 4 時間、b, d は 4 日

A/糊粉層、SC/胚盤、SH/苗条、R/幼根

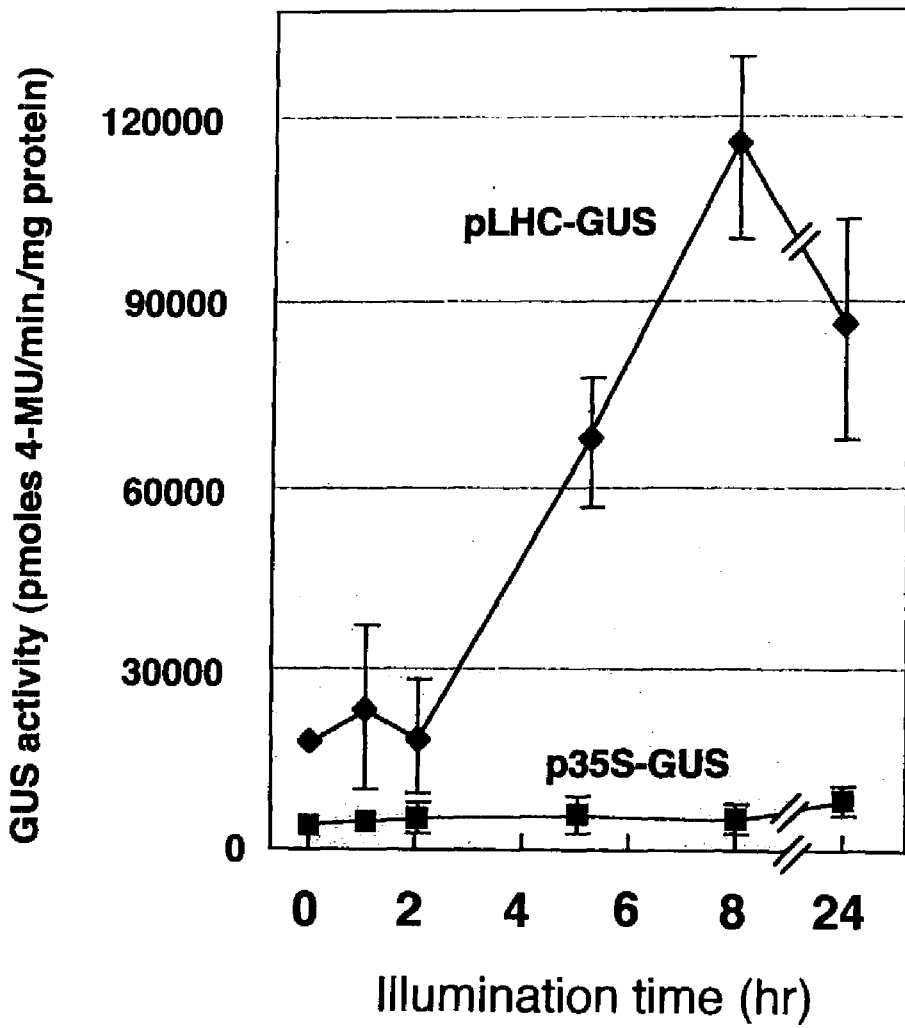
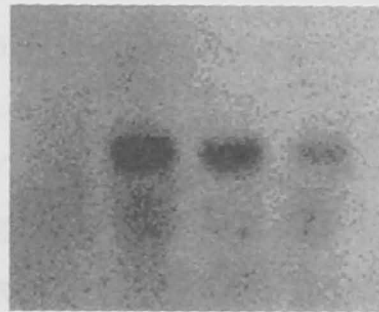


図 1-10 光照射によるGUS活性の誘導

形質転換イネの黄化芽生え（暗所で14日間生育）に光を照射し、各時間ごとにGUS活性を測定した。形質転換は各プラスミドによっておこなった。



1 2 3 4

図 1-11 光照射後のGUS遺伝子mRNAの発現

1, 2 : pLHC-GUSを導入した形質転換イネ

3, 4 : p35S-GUSを導入した形質転換イネ

1, 3 は光照射直後

2, 4 は光照射5時間経過後 の各mRNA10 μ gを
GUS遺伝子をプローブとして検出した。

一方、GUS遺伝子のmRNAの発現量をノーザンハイブリダイゼーションによって調べた。pLHC-GUSで形質転換した芽生えの光照射5時間後ではGUS遺伝子のmRNAが蓄積されるのに対して、p35S-GUSでは変化が認められなかった。このことから、*Lhcb2*遺伝子のプロモーターでは光によってGUS遺伝子の発現が誘導され、mRNA量が増加するとともにGUS活性も上昇することが判明した。このことは、黄化芽生えを使った光照射実験で、光照射後10分からmRNAの蓄積が始まり、約5時間で蓄積量が最大に達するのが観察されたMatsuoka (1990)の結果と一致している。

1.4 考察

イネの集光性クロロフィル*a/b*結合タンパク質タイプIの遺伝子 (*Lhcb2*) をクローニングし、その全構造を明らかにした。他の植物の*Lhcb2*遺伝子と同様にイントロンをもたない構造であることがわかった。遺伝子の転写開始点を決定したところ、転写開始点付近の配列は他の植物の配列と相同性があった。しかし転写開始点自体はC残基であり、他の植物ではほとんどの場合A残基であることからイネの*Lhcb2*遺伝子の転写開始点はきわめてまれなケースである、と考えられる。

プロモーター領域を含む5'領域を、同じ単子葉植物であるトウモロコシとコムギとで比較した。コムギとはランジットペプチド領域を含めほとんど相同性がなかった。一方、トウモロコシとはランジットペプチドの一部も含め、CAATボックスやCAATボックスの周辺での相同性がきわめて高かった。また、フィトクローム感応性要素 (LRE) 周辺での相同性も高く、さらにその上流域でも相同性が認められた。通常、遺伝子の5'領域はGC含量は低くなり、プロモーターといわれるコンセンサス配列以外での相同性はほとんど認められない。イネとトウモロコシの5'領域に認められる相同領域は、*Lhcb2*遺伝子の発現に参与する制御因子である可能性が考えられる。

フィトクロームによって発現の制御を受ける遺伝子の5'領域にはGATAモチーフがあることが知られている (Castresana et al. 1987, Manzara and Gruissem 1988, Gidoni et al. 1989)。このGATA配列は、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーターと結合する因子としてタバコ葉の細胞核から抽出されるタン

パク質であるASF-2因子と相互作用することがわかっている (Lam and Chua 1989)。タバコをはじめとする双子葉植物やCaMVでは、このGATAモチーフは2塩基をはさんで繰り返し構造をとっている。これに対し、イネでは繰り返しはない。もともと双子葉植物に感染するウイルスであるCaMVが進化の過程で双子葉植物と同じ遺伝子発現機構を獲得したと考えられる。単子葉植物であるイネの場合には、GATAモチーフはLREに重複する形で存在しており双子葉植物のGATAモチーフと同じ機能を有するという証明は未だなされていない。しかしながら、イネとトウモロコシではLREを含む領域での相同性が非常に高いことから、双子葉植物の場合とはまた別に*Lhcb2*遺伝子のcis-actingエレメントとして独自に働いている可能性が十分に考えられる。

イネ*Lhcb2*遺伝子のプロモーター特性を調べるために、*Lhcb2*遺伝子プロモーター下流にGUS遺伝子を接続しタバコ (heterologous system) およびイネ (homologous system) へ導入し、それぞれ形質転換個体を得た。タバコでは葉におけるGUS活性がもっとも高く、茎と花卉がほぼ同じくらいのGUS活性を示し、根のGUS活性がもっとも低かった。この結果は、イネの*Lhcb2*遺伝子のプロモーターを含む5'-領域が、タバコでは器官特異性にしたがって遺伝子発現をおこなっているようにみえる。類似の例としては、コムギの*Lhcb2*遺伝子のプロモーターでも認められている (Nagy et al. 1987)。これらの例からも、単子葉植物遺伝子のプロモーターでも双子葉植物で同じように器官特異的に働くことが認められるが、その発現量については後述するhomologous systemであるイネの場合と比較すると低い。

組織化学的にタバコとイネの形質転換植物でのGUS遺伝子の発現を比較してみると、イネとタバコではまったく同じ発現様式をとっているわけではないと思われる。すなわち、タバコにおけるGUS遺伝子の発現が光合成に直接関係のない通導組織である篩管の周辺でも認められることから明らかである。タバコにおいてはクロロフィルの存在する葉の組織でもっともGUS遺伝子の発現が認められるが、必ずしもクロロフィルの存在する組織だけではない。同じ双子葉植物のポテトのST-LS1遺伝子 (Stockhaus et al. 1989) や、タバコの*rbcS*遺伝子 (Jefferson et al. 1987) のプロモーター制御下では、GUS遺伝子はクロロフィルの存在する組織だけで発現しているのと対照的である。

イネ*Lhcb2*遺伝子のプロモーター領域のもとでGUS遺伝子を発現させた場合、イネの細胞組織の中での発現はhomologous systemであるので、本来イネがもっている*Lhcb2*遺伝子と同様の発現制御を受けると考えられる。したがって、組織化学的にみてもGUS遺伝子の発現している場所で本来の*Lhcb2*遺伝子が発現していると考えることができる。

pLHC-GUSで形質転換したイネでは、葉、茎、穎で青く染色されたが、根はまったく染色されていなかった。これに対してp35S-GUSの場合では、いずれの組織においても青く染色され、GUS遺伝子の発現に器官特異性が認められない。とくに対照的であるのは、葉および葍での維管束周辺細胞でのGUSの発現であり、発現していないpLHC-GUSと強く発現しているp35S-GUSとは好対照である(図 1-8e, f, i, j)。

*Lhcb2*遺伝子は光によって発現が誘導されることが証明された(図 1-10, 11)。*Lhcb2*のmRNAの蓄積は、光照射後数分から始まり5時間で最大に達するとの報告もあり(Matsuoka 1990)、光に対する応答は敏感であると考えられた。

以上の結果から、*Lhcb2*遺伝子のプロモーターは、CaMV35Sプロモーターの数倍強力であり、発現部位もクロロフィルを有する細胞に限定され、かつ光によって発現誘導がかかることが明らかとなった。このような遺伝子プロモーターは植物の育種・品種改良を遺伝子レベルでおこなっていく上で、きわめて有効なプロモーターであると考えられる。

1.5 要約

光合成において吸収した光エネルギーを光化学系Ⅱへ伝達する集光性クロロフィルa/b結合タンパク質のタイプⅠ遺伝子 (*Lhcb2*) をクローニングし、その一次構造を決定した。イントロンをもたず、予想されるアミノ酸は265残基であるが、このうちはじめの31残基が葉緑体へ移行するために必要なトランジットペプチドであると推定された。プロモーター領域には真核生物細胞に典型的なTATA配列、CAAT配列があり、CAAT配列のさらに上流にはフィトクローム感応性要素 (LRE) が認められた。

この*Lhcb2*遺伝子のプロモーター領域をGUS遺伝子に接続し、タバコおよびイネへ遺伝子導入をおこない、それぞれ形質転換体を得た。各組織におけるGUS活性は葉や茎などで強く、根では弱かった。このことは組織化学的に染色した結果、さらに明確となった。すなわち、*Lhcb2*プロモーター下で発現したGUS遺伝子はクロロフィルの存在する組織で発現しており、これと対照的にCaMV35Sプロモーター下で発現したGUS遺伝子はあらゆる組織で発現していた。したがって、*Lhcb2*遺伝子はクロロフィルの存在する組織に特異的に発現する遺伝子であることが明らかとなった。

暗所発芽させたイネの芽生えに光を照射したときのGUS活性の推移を調べたところ、光照射時間の経過とともにGUS活性が上昇することが判明した。これに対しCaMV35Sプロモーターの場合では光による誘導は起こらなかった。このことは、mRNAの蓄積を調べた結果とも一致していた。*Lhcb2*プロモーターが光によって誘導されることが確認できた。

*Lhcb2*遺伝子のプロモーターはイネにおいてはCaMV35Sプロモーターの5~10倍発現量が多く、光によって遺伝子発現の誘導がかけられることから、とくにイネの分子育種においては有効なプロモーターである。

第2章 糖の合成に関与する遺伝子 ～SPS遺伝子を中心に～

2.1 はじめに

植物は大気中の二酸化炭素を取り込み、太陽光を利用して光合成をおこなうことによって炭素を固定する。葉緑体に取り込まれた二酸化炭素はリブローズ二リン酸カルボキシラーゼによって固定されたのち、葉緑体内でデンプンへ合成されるか、または葉緑体から細胞質へ排出されショ糖に合成される。ショ糖合成は葉の成長と強く関連しており、いわゆる光合成の場であるソース器官としての葉で合成されたショ糖は篩管を転流することによって蓄積あるいは消費の場であるシンク器官（種子や根、生長点など）へと運ばれる。したがって、光合成の効率にはソース器官の能力が大きく関与しているが、シンクの能力およびソースからシンクへの転流能力も大きくかかわってくる。

これらのことから、植物の生産性に深くかかわるという意味においては、固定した炭素をシンク器官へ運ぶための第1歩となるショ糖合成が重要となってくる。光合成の効率を高めるためには光合成の結果としての炭酸同化産物を葉緑体内でデンプンとして蓄積させるのではなく、葉緑体外の細胞質へ排出させショ糖合成の出発物質となるよう炭酸同化産物の分配を制御することがカギとなる。すなわち、光合成によってデンプンが葉緑体内に蓄積すると光合成効率が低下することが知られているからである。葉の細胞質におけるショ糖合成の律速酵素であり、なおかつ炭酸同化産物の分配に関し、その制御をおこなっていると考えられている酵素がショ糖リン酸合成酵素である。

ショ糖リン酸合成酵素 (sucrose phosphate synthase, SPSと略) は細胞質でのショ糖合成に関するキーエンザイムであると同時に、光合成によって生成された炭酸同化産物の分配に関与すると考えられている (Stitt and Quick 1989)。また、SPSの活性がソース器官としての能力に比例するとして、SPSが植物生長の制御要因となっているとする考え方もある (Rocher et al. 1989)。従来、ショ糖合成はショ糖合成酵素が担っていると考えられてきたが、1955年LeloirのグループによってSPSがショ糖合成の重要な酵素であると発見された (Leloir and Cardini 1955)。

葉緑体内でカルビン・ベンソン回路を経て合成され細胞質へ排出されたトリオースリン酸はアルドラーゼ作用を受けフルクトース・1,6-二リン酸 (Fru1,6P2) に

なり、ついでフルクトース-1,6-二リン酸酸化酵素 (FBPase) によってフルクトース-6-リン酸へ、さらにイソメラーゼ反応によってグルコース-6-リン酸 (Glc6P) へ転換される。

Glc6Pはホスホグルコムターゼ作用によりグルコース-1-リン酸 (Glc1P) に転換され、さらにUDPグルコースピロホスホリラーゼの作用によってUDPグルコースに変換される。SPSはこのUDP-GlcとFru6Pを結合し、シヨ糖リン酸を合成する酵素である。生成されたシヨ糖リン酸はさらにシヨ糖ホスファターゼの作用によってシヨ糖となる (図 2-1)。

SPSの酵素的諸性質についてはトウモロコシとハウレンソウのSPSについて研究がおこなわれている。まずハウレンソウでSPSが精製され、ついでトウモロコシでもSPSの精製に成功している (Salvucci et al. 1989, Bruneau et al. 1991)。SPSは2または4個のサブユニットからなる分子量約120kdのタンパク質であり、リン酸化によってその酵素活性を制御されていると考えられている。最近、ハウレンソウSPSにおいてリン酸化部位が特定された (McMichael et al. 1993)。

SPSは植物によってリン酸および光に対する反応が異なることが知られており、現在までのところ3つのグループに分けられると考えられている (Huber et al. 1989)。すなわち、

- ①光によって活性化され、 V_{max} も上昇するグループ
- ②光によって活性化されるが V_{max} には影響のないグループ
- ③基本的に明暗条件によってSPS活性に変動が認められないグループ

である。

このうち、①のグループはトウモロコシやオオムギなどの単子葉植物が含まれ、②のグループはハウレンソウやサトウダイコンが含まれ、③グループにはタバコ、ソラマメなどの植物が含まれる。

暗条件下においてマンノースやグルコサミンなどを添加すると明条件下での場合と同じようにSPS活性を上昇させることができることが知られているが、これは上記①と②のグループにのみ観察される現象であり、③のグループでは認められない。このグループには光によってリン酸の修飾を受けるような機構が存在しないと考えられている。

イネは単子葉植物であるが、どのグループに属するかはっきりしていない。暗

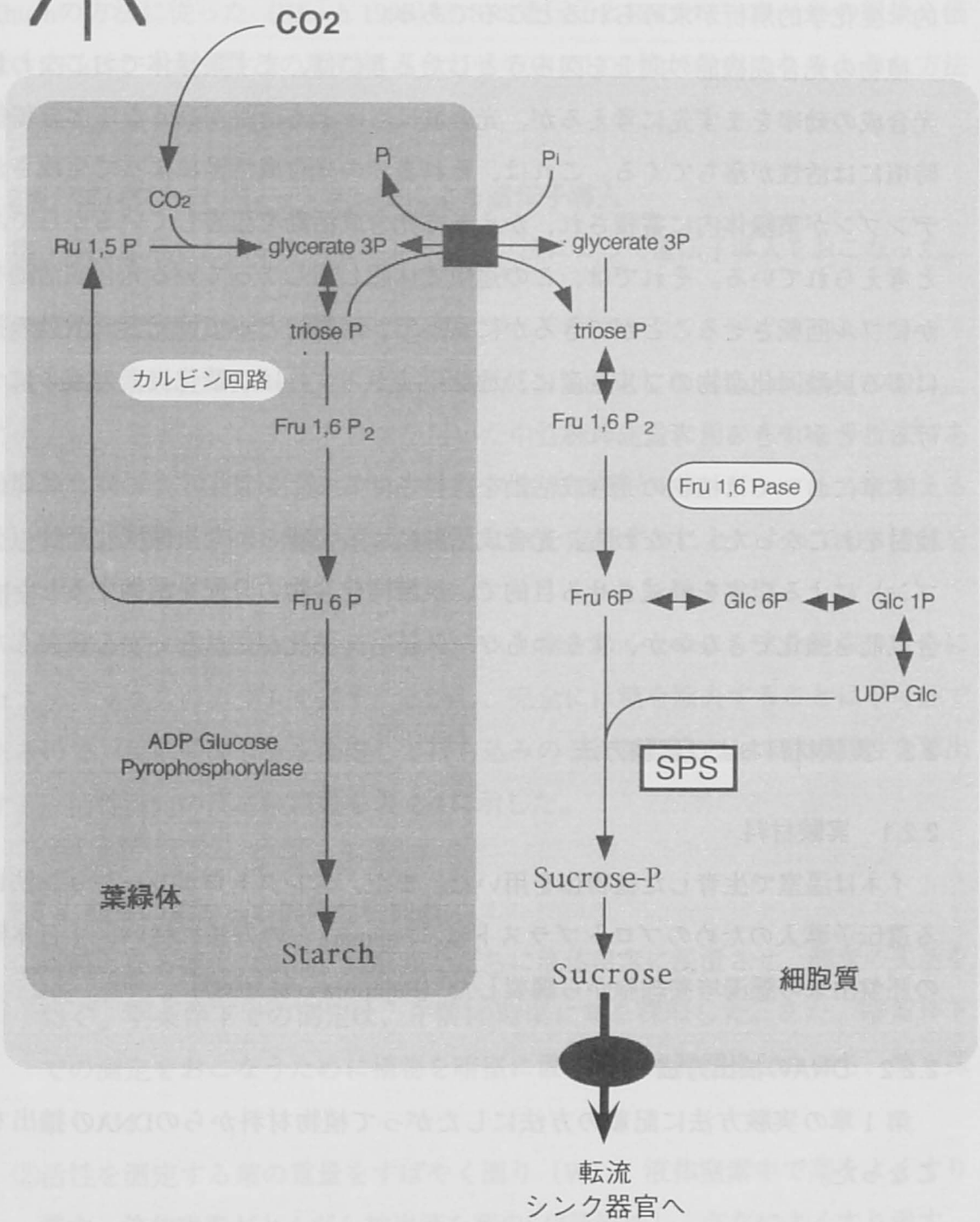
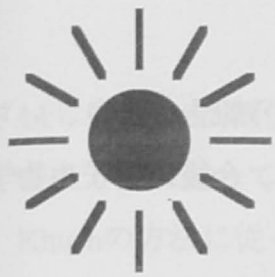


図 2-1 葉肉細胞におけるショ糖・デンプン合成

条件下でマンノース添加してもSPS活性に影響がない、という報告もあり、いちがいにイネのSPSが第1グループに属するとはいいきれない。今後の分子生物学的・生化学的解析が求められるところである。

植物の光合成機能の向上を図ろうとしたときには、まず葉緑体でおこなわれる光合成の効率をまず先に考えるが、光合成はもっとも活性が高くなるべき午後2時頃には活性が落ちてくる。これは、それまでの光合成活動によって生成されたデンプンが葉緑体内に蓄積され、かえって光合成活動を阻害しているからであると考えられている。それでは、この途中で休憩してしまっている光合成活動をいかにフル回転させることができるかによって、植物にとっては光合成活動の持続による炭酸同化産物のフル生産に、地球環境からすれば二酸化炭素の減少につなげることができると考えられる。

本章においては植物の光合成活動を維持させることを目指すために、基礎的な検討をおこなった。すなわち、光合成活動によって得られた炭酸同化産物（デンプン）による阻害を軽減させる目的で、炭酸同化産物の分配を制御するしショ糖合成能を強化できないか、すなわちソース器官の強化が図れないかを検討した。

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 実験材料

イネは温室で生育した植物体を用いた。また、エレクトロポレーション法による遺伝子導入のためのプロトプラストは、Fujimuraらの方法に従い、「日本晴」の胚盤由来の懸濁培養細胞から調製した（Fujimura et al. 1985）。

2.2.2 DNAの抽出方法

第1章の実験方法に記載の方法にしたがって植物材料からのDNAの抽出をおこなった。

2.2.3 RFLPマッピング

クローニングしたSPS遺伝子の染色体上の位置を決めるために、インディカ型イネの'Kasalath'（母系）とジャポニカ型イネの'FL134'（父系）の交配によって得られた144個の独立したF₂個体を用いてハイブリダイゼーションをおこなった。SPS遺伝子の3'-領域の0.8kbのDNA断片（エクソン10にあるSal I 部位とエクソン

11にあるSac I 部位の間) をプローブとして用いた。リンケージ解析はKishimotoらの方法に従っておこなった (Kishimoto et al. 1994)。また、染色体の命名法はKhushの方法に従った (Khush 1990)。SPS遺伝子とRFLPマーカーとの組換え価は、RFLPマーカー群との順列組み合わせの中でLOD値が最大になるような方法で評価をおこなった (Saito et al. 1991)。

2.2.4 エレクトロポレーション法による遺伝子導入

第1章で記載したエレクトロポレーション法によって遺伝子導入をおこなった。

2.2.5 SPS活性の測定 (アントロン法)

SPSの酵素活性はHuberらの方法にしたがって測定した (Huber et al. 1989)。この方法は基本的にはアントロンを用いた中性糖の定量に用いられる分析法であり、植物体から得た抽出液にフルクトース・6-リン酸とUDP-グルコースを加えることによってショ糖リン酸を合成させ、これを定量することによってSPS活性を測定する。

したがって、植物体からの持ち込みのショ糖を除くために、また脱塩のためにセファデックスのカラムを通す。しかし、完全には糖を除去することは不可能であるので、反応時間0分を測定して持ち込みのショ糖を除去して酵素活性を算出する。活性測定の反応液組成を表2-1に示した。

2.2.5 a 植物の葉からの酵素の粗抽出

- ①材料となる植物の葉は、採取後ただちに液体窒素に浸漬させ、酵素の失活を防ぐ。明条件下での測定は、午前10時頃に葉を採取した。また、暗条件下での測定をおこなうために植物を暗室に置き、1時間経過したのち、葉を採取した。
- ②活性を測定する葉の重量をすばやく測り (W)、液体窒素中で葉をよくすり潰す。液体窒素がとんだら抽出液を葉の5倍量添加し、さらによくすり潰す。
- ③抽出液をガーゼで濾過、遠心後、抽出液を添加し②の量に合わせる。
- ④セファデックスG-25を緩衝液で平衡化したカラム、あるいはPD-10カラム (ファルマシア社) に葉の抽出液を注入する。

表 2-1 SPS活性測定条件

V _{max} (mM)		V _{limiting} (mM)
10	UDP-Glc	10
10	Fru-6-P	3
40	Glc-6-P	12
15	MgCl ₂	15
2.5	DTT	2.5
	Phosphate buffer	10
25 °C 20 min.		

⑤カラム上の液がすべて落ちたところでカラム平衡化液を等量加え、滴下する液をチューブに集め、活性測定まで氷上にて保存する（粗抽出液）。

2.2.5 b 酵素活性の測定

SPSの酵素活性はアントロン法によって求めた。すなわち、反応時間 0 分と反応時間 20 分のそれぞれの反応液に0.15%アントロン液を添加し、40℃で20分間反応させたのち、620nmの吸光度を測定した。

2.2.5 c 酵素活性の算出

SPSの酵素活性は以下のように算出した。

①反応時間20分の吸光度A₂₀から反応時間0分の吸光度A₀を引く。

$$: A_{20} - A_0$$

②既知のシヨ糖濃度で作成した検量線から、①の値をシヨ糖濃度に換算する。

$$: N (\mu M)$$

③全抽出液はV_{ml}とすると、この抽出液中には

$$N \times (V/1000) \quad (\mu \text{mole})$$

のシヨ糖が生成されることになる。

④③の値を1時間あたり、試料重量1gあたりに換算すればSPSの酵素活性が算出できる。したがって、

$$(N \times (V/1000) \times (60/20)) / W \quad (\mu \text{mole/g/hr})$$

が求めるSPSの酵素活性である。

2.2.6 ウェスタンブロット解析

2.2.6 a タンパク質の抽出

2.2.5 a に記述した植物の葉からの酵素の粗抽出法と同様にして抽出した。

2.2.6 b プローブ

ウェスタンブロット解析には、ハウレンソウSPSのリン酸化部位を含む領域の合成ペプチドから作成した抗体をプローブとして用いた (Weiner 1995)。

2.2.7 ショ糖濃度およびデンプン濃度の定量

葉を粗抽出し、ベーリンガー・マンハイム社のFキットによってショ糖およびデンプン濃度を定量した。

2.3 実験結果

2.3.1 ゲノミックライブラリーのスクリーニング

SPS遺伝子をクローニングするために、すでに報告のあるトウモロコシSPScDNAの塩基配列 (Worrell et al. 1991) をもとにPCR用プライマーを2組作成した (それぞれの組は、cDNAの中央部分と3'側の後半部分に当たる)。イネゲノミックDNAを鋳型としてPCRをおこなった結果、中央部分のプライマーを使用した場合には0.7kbのDNA断片 (fSPD28) が、また後半部分のプライマーを使用した場合には1.3kbのDNA断片 (fSPK24) が得られた。それぞれの塩基配列を調べたところ、トウモロコシSPSのcDNAときわめて相同性が高かった。そこで、これらのDNA断片がイネSPS遺伝子由来の断片であると断定し、ゲノミックライブラリーのスクリーニングに使用した。スクリーニングの結果、 8×10^5 個の独立したクローンからひとつの陽性クローン λ SPS6192を得た。いくつかの制限酵素で切断し、サブクローニングしたのち塩基配列を調べたところトウモロコシSPScDNAときわめて相同性が高かったことから、イネSPS遺伝子を含むクローンであると断定した。

2.3.2 SPS遺伝子のコピー数および座乗する染色体

スクリーニングに使用したISPD28をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションをおこなった。図 2-2に示すように、いずれの制限酵素でイネゲノミックDNAを切断したときにも、ハイブリダイズするDNA断片はひとつしか観察できなかった。このことは、イネSPS遺伝子はゲノム中では一つないしはきわめて少ないコピー数しかもたないことを示唆している。図 2-2に認められる断片の大きさは、 λ SPS6192から予想される断片の大きさとほぼ一致していた。また、ここには示さないがISPK24をプローブにしたときにも同様な結果が得られている。このことから、イネゲノム中ではSPS遺伝子はシングルコピーで存在することが示唆された。

次にSPS遺伝子がどの染色体に座乗しているか検討した。インディカイネである'Kasalath'とジャボニカイネである'FL134'を制限酵素EcoRVでそれぞれ切断し、SPS遺伝子の一部(0.8kb)をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションをおこなった。リンケージ解析をおこなった結果、SPS遺伝子(XgrSps-1)は第1染色体のRFLPマーカーであるXNpb113とXNpb350とからそれぞれ 2.0 ± 0.9 cM、 3.6 ± 1.2 cMの距離に存在することが判明した(図 2-3)。SPS遺伝子の座上位置はアルドラーゼ遺伝子の座上位置(XcrAld-2)と2.7cMの距離で密接にリンクしていることがわかった。

2.3.3 SPS遺伝子の構造

SPS遺伝子のエクソン/イントロンの境界をcDNAライブラリーから得られたcDNAとRT-PCRによって決定した。ほとんどのエクソン/イントロンの境界はこの方法で決定できたが、転写開始点を含む5'末端領域を含むcDNAは得られなかった。そのため、エクソン1のイントロンとの境界は、トウモロコシcDNAとの比較によって決定した。図 2-4にクローン λ SPS6192を含むイネSPS遺伝子の構造を示す。

イネSPS遺伝子は11個のイントロンによって分断された12個のエクソンから構成されている。しかしながら、トウモロコシSPScDNAと比較することによって、エクソン1に15個のグリシン残基をコードする配列が挿入されていることが明らかとなった(図 2-5)。この付加配列はGCリッチな配列であり、なおか

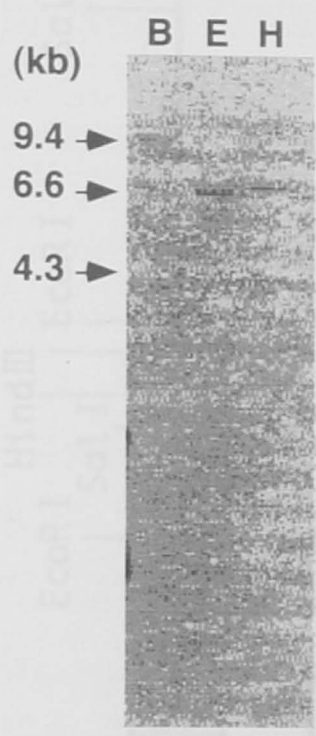


図 2-2 イネSPS遺伝子のサザンブロット解析

レーンB, E, HはそれぞれイネゲノムDNAを制限酵素 BamH I、HindIII、EcoR I で切断した。左側の数字は DNAのサイズマーカー。プローブは、本文中に記載の fSPD28を使用した。

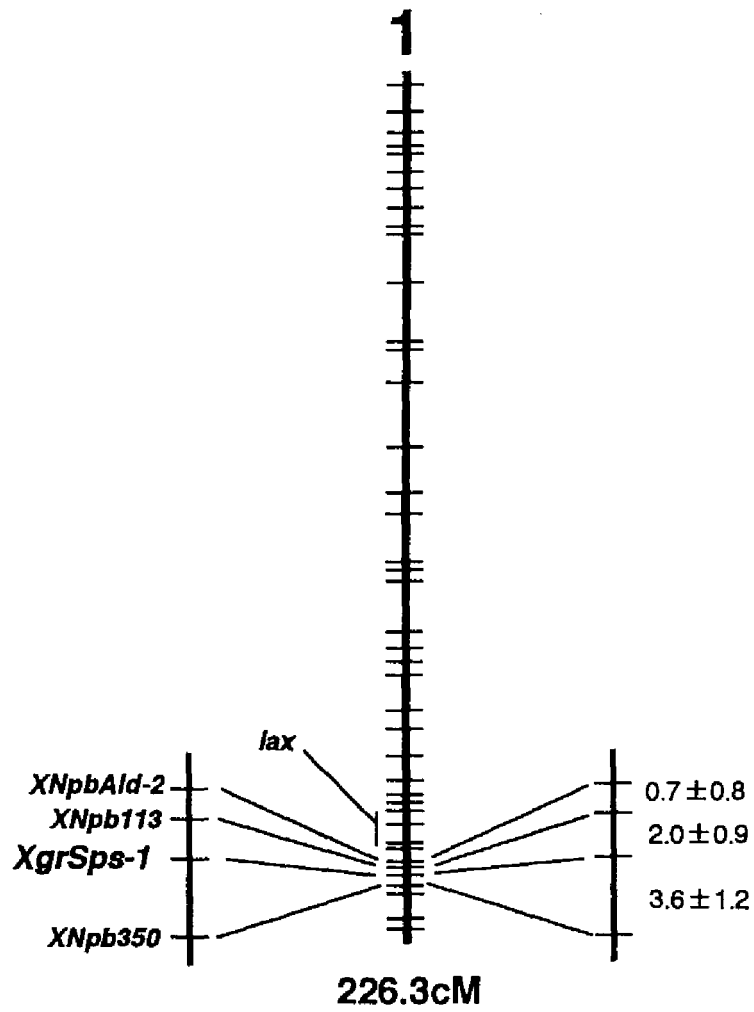


図 2-3 イネ第 1 染色体の連鎖地図

イネの第 1 染色体におけるSPS遺伝子と連鎖する他の RFLPマーカーの位置を示す。総合的な距離を下に示した。*lax*は地図上における遺伝標識。

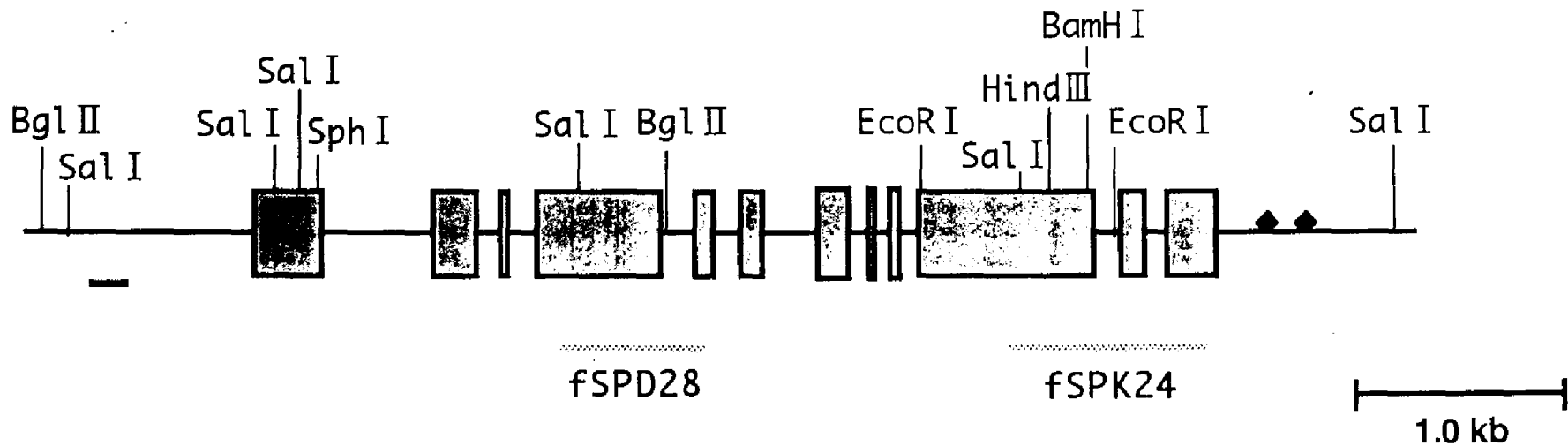


図 2-4 イネSPS遺伝子の物理地図

SPS遺伝子と周辺領域の物理地図を示す。ボックスはエクソンを示す。
各制限酵素の認識部位を上、また大きさの尺度を右に示した。
—は、予想されるプロモーター領域を、◆はpolyA部位を示す。
fSPD28とfSPK24はPCRによって得られたDNA断片の位置を示す。

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
CACAAATATACGTGCAATATATATTTAAGTCTATTTTTATAAGGATTTTACTACTCTACGTTATTTGTTAATGTGCTTA
      90     100     110     120     130     140     150     160
GTCAATAGACAGCGTAGAGATAAAGATAAGTGAGCATACGTTATGTTECTTATGACGCTACCAACACACCTAGATCTAAG
      170     180     190     200     210     220     230     240
ATTCAAATCCTAAATTTAATACGGGTGTTTGCACTTATGAGTAATTATTCTTTTAAATAATAGGTGACGTCCCGTCGACA
      250     260     270     280     290     300     310     320
ACGTAAGCATAACGAGTCTGTACTCTATTCTAAAATAAAAGTAGACAACGTAAGAAAATTATTTAAGTGGTAGATGTA
      330     340     350     360     370     380     390     400
CTACTCGATATGTTTGTCCAATTTATAAAGTGATCATAGTAGTAATATGTGCATGTGTGCATATATACGTGTGTTTTTTT
      410     420     430     440     450     460     470     480
TAAAGATAATGGACCGTGTGTTTTTGAACGTTATAATAGTGTTTTGGGAAAATAATIAGATAATAAAGCGAAGTTTGT
      490     500     510     520     530     540     550     560
TGAGAAAACGAGTGAATTACCAATGCCTTAATTTGGTACTGCAAGTACTACATTGGGATAACAAATTAGAGATCGACGA
      570     580     590     600     610     620     630     640
AAAGCGGAATATCCTTTTTATTTGGCCCTGACGGATATCTTTCAGTTTGTAAACCACCGGATGACGCACGGACGGCTCGG
      650     660     670     680     690     700     710     720
ATCATCCCAGAAAGATCAACCGCGGGGCGAGGACGAGACCACCGTGGGCCCATGGCCCCACCGACTTACACAATCTCTCC
      730     740     750     760     770     780     790     800
CACTGCCATGCGGGCCCANACCGCAACAGTCCAGNCCAGAGAGCCCCGAACTCCNCCAAACCGGGGGGGCCACACCT
      810     820     830     840     850     860     870     880
GCCACGTGTCAACCGCGCGCTCCCTCTCATCCTCTCTCTCCTCGTCCAGTGCTTCTCTTCTCTCTCGCAACCGAA
      890     900     910     920     930     940     950     960
CGCTAGAAAGCGCGCTCCACCAAGCCACGGACTCCTAATTCTCTCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
GATACGTGGTACGTGACGCTTTGCCCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
      1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
CATTAGCAAACCTCGCGATTCTCTCTCTCGATCGAACAGGGGTAGGGAAGCGATTAAACGGCGATCGATCGATCGATGC
      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
AAGTGATCGCGCTCGGTTGATCCAGGAATTGGAGAGCATCGGCTGATCGAGAGATGGCGGGGAACGAGTGGATCAATGGC
M A G N E W I N G
-----
      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
TACCTGGAGGCGATCTGGACAGCGGCGGCGCGGGGGGGGGAGGTGGAGGCGGCGGAGGAGGTGGTGGTGGAGGTGGAGG
Y L E A I L D S G G A A G G Q G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G
-----
      1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350    1360
TGGCGGTGGAGGTGGAGGGGGAGGGGAGTCCACCGACGACGGGGACGACGAGCCCGGTGGCCCGCACA
G G G Q G G G G G G V D P S S P T T G T T S P R G P H M
-----
      1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
TGAACTTCAATCCGACGCACTACTTCTGGAGGAGGTGGTGAAGGGCGTCCGACGAGCGACCTCCACCGGACGTGGATC
N F N P T H Y F V E E V V K G V D E S D L H R T W I
-----
      1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520
AAGGTCGTGCCACCCGCAACGCCCGCGAGCGGAGCACCCGCTCGAGAACATGTGCTGGCGCATCTGGCACCTCGCGAG
K V V A T R N A R E R S T R L E N M C W R I W H L A R
-----
      1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
AAAGAAGAAGCAGGCATGCATCGATCTCTCCCTGTCTTTTTCTTTCTTTCTCGTTCATGGTTGATTTAATTTAGTTTC
K K K Q

```

図 2-5 SPS遺伝子のエクソン1と5'-領域の塩基配列

予想されるTATA-、CAAT-ボックスを二重下線で、GATA-モチーフやG-ボックスに類似の配列を波線下線で示した。枠で囲んだ領域がエクソン1で、点線枠がグリシリッチな付加配列である。→線はダイレトリリピートを示す。

つその両端はBrethnachとChambonによって提唱された真核生物のイントロンの"GT····AG"ルールにしたがっている (Breathnach and Chambon 1981)。さらに、この付加配列はダイレクトリビート (直列反復配列) 構造をとっており、何らかの形で挿入された配列であると推測された。

2.3.4 他の植物のSPS遺伝子との比較

SPS遺伝子のコーディング領域は3255bpからなり、1084残基のアミノ酸から構成されている。コーディング領域での塩基配列は、同じ単子葉植物であるトウモロコシ (Worrell et al. 1991) とは非常に高い相同性 (82%) を示したが、双子葉植物であるホウレンソウ (Klein et al. 1993, Sonnewald et al. 1993) やジャガイモ (Sonnewald 1993) とは低かった (いずれも58%)。予想されるアミノ酸についても同じ傾向であり、トウモロコシとは非常に相同性が高く (84%)、これに比較するとホウレンソウ (52%)、ジャガイモ (54%) は相同性が低くなっている (図 2-6)。

SalvucciとKleinはホウレンソウSPSにおけるUDPグルコースの結合部位を特定している (Salvucci and Klein 1993)。イネのSPSにおいてもこの領域は完全に保存されている。また、SPSはリン酸化によってその酵素活性を制御されることが知られているが (Huber and Huber 1991)、キナーゼによって受けるリン酸化部位は数カ所あり、その中でも活性に強くかかわっているリン酸化部位が明らかとなっている (McMichael et al. 1993)。このリン酸化部位は158番目のセリン残基であり、この周囲にはカルシウム依存セリン・スレオニン・タイプのプロテイン・キナーゼの認識部位 (RXXS) が存在する。

2.3.5 SPS遺伝子の5'-領域について

SPS遺伝子の5'-領域には図 2-5に示すように、ATリッチな配列が存在しているがプロモーター配列のコンセンサスとなるような配列が見あたらない。開始コドンの750bp上流にはGC配列に富んだ領域が存在している。この領域にはGボックス (Giuliano et al. 1988) に類似の配列CACGTGが認められる。この配列は光に反応する領域と考えられており、光感応性要素 (LRE) 中のGATAモチーフとも呼ばれる領域とも類似している。このエレメントは第1章で記載した集光性クロ

Rice MAGNEWINGYLEAILDSGGAAGGGggggggggggggggggGGGGGVPSSPTTGTTSRPHMNF
 MaizeHTSSR.A-----G-----.....G..R..K-AA...A....
 SpinachD.....V...-Q.ID-----AST.KTSTA.PSLLLRE...--H.
 PotatoD...S.....V.P--.LD-----DK---KSSLLLRE...--R.

Rice NPTHYFVEEVVKGVDSDLHRTWIKVVATRNRARERSTRLENMCWRIWHLARKKKQLELEGILRIS
 Maize ..S.....Q...
 Spinach S.SR.....IS.F..T...S.VRAAS..SPQ..N.....L.....N.....I.G.EA..LA
 Potato S..R.....IT.F..T...S..RAQ...SPQR.NN...M.....N...Q.....G..A.WMA

Rice ARRKEQEQVRRRETSDELAEFLFEGEKADTVGELAQQDTPMKKKFQRNFS-ELTVSWSDENKEKKL
 MaizeS....G..I...PVE.T-.....-D..L...D.....
 Spinach K.HV.R.RG...TA.MS...S...RG...ADMLFASEST.GRMR.IS.V.MMDN.ANTF.....
 Potato K..Q.RG.....AVA.MS...S....G.I.ADMSSHGESTRGRLP.IS.V.TMEA.VSQQRG...

Rice YIVLISLHGLVRGDNMELGRSDTGQVQYVVELARALAMMPGVYRVDLFTROVSSPEVDWSYGE
 MaizeV.....E.....MS.....D.....
 Spinach .V.....I..E.....GS.....L.....A.G.....
 PotatoI..E.....GS.....L.....

Rice PTEMLTS--GSTDGEGSGESAGAYIVRIPCGRDKYLRKEALWPYLQEFVDGALAHILNMSKALG
 MaizeCA--.N...M..G.....K.....
 SpinachS.RNSENST.QL...S...I...F..K...VA..L...IP.....S..KQ...V..
 Potato ...-APISTDGLMTEM...S...I...F..E..IP..Q...IP.....N..IQ...V..

Rice EQVSNGLVLPYVIHGHYADAGDVAALLSGALNVPMVLTGHSLGRNKLEQIMKQGRMSKEEMDST
 MaizeRP.....LL.....I...
 Spinach ..I.G.LP.W.ASV.....S.....F.....D..D.LL...L.R..V.A.
 Potato ..I.S.YP.W.VA.....S.....LF.....D...LLA...K..D.IN..

Rice YKIMRRIEGEELALDAAELVITSTRQEIDEQWGLYDGFVKLEKVLRARARRGVSCHGRFMPRMV
 MaizeS.....Y.....
 SpinachA...C...S.....E...Q..H...V..RK...M.....A
 PotatoA...T...S.....R.....PI..RK...IK.N...Y.....A

Rice VIPPGMDFSSVVVPEDTS-DGD---DGKDFEIASPRSLPPIWAEVSRFWTNPBKPMILALSRPDP
 MaizeN...H..IDG...VKD.IVGL.G...K.M.....M..L.....
 Spinach K....E.NH-IA...A.M.T.I--...--HKESNANPD.V..S.IM..FS.GR.....A....
 PotatoE.HH-I..HEG.M..ET--E.--S.DGKT-PD.....IM..FS..R.....A....

Rice KKNITTLVKAFGECRPLRELANLILSMGTRDDIDGMSAGNASVLTTVLKLIDKYDLYGSAVFPKY
 MaizeT.I..N....D.....H
 Spinach ...L.....T.II.N....E..TTSS...ISI.....Q..Y..H
 Potato ...L.....D...T.I..N..N..E..ST.SAL.LSI..M.....Q..Y..H

Rice HKQSDVPEIYRLTGKMKGVFINPALVEPFLTLIEAAAHGLPIVGTKNGGPVDIKNALNGLLVD
 Maize .N.A.....AA.....A.....T.....
 SpinachD...AA.T.....FI.....Y.....A.....IGV.D...I.
 PotatoD...AA.T.....FI.....Y..M.A.....HRV.D.....

```

Rice      PHDQHAIADALLKLVADKNLWQECRKNGLRNIQLYSWPEHCRTYLTRIAGCRIRNPRWLMOTPAD
Maize     ....N.....R.....H.....V....L.....K.....
Spinach   ....KS.....H..TK..Q...K..H.F.....KN..S.....KP.Q.N.QR-IDEG
Potato    ....Q.....Q..AK..A...K..H.F.....K...S.....KP.Q...RSIDDD

Rice      AAAEEEEALEDSLMDVQDLSLRL--SIDGER-GSSMN--DAPSSDPQDSV-QRIMNKIKRSSPAD
Maize     .G.D...F....-..A..L.....-.....K--..L.TN.PLWF....Q.-.K...N..Q..ALP
Spinach   SENSdTDSAG...R.I.....N.KL.L.A..TEG-G.SF.DSLDSEEANAKRK.E.AVAKL.KSM
Potato    DENS.TDSPS...R.IH....N.RF.L...KNDNKE.-A.NTLDPEVRRS--KLENAVLSL.KGA

Rice      TDG-AKIPAEAAATATSGAMNKYPLLRRRRRLFVIAVDCYGDD-GSASKRMLQVIQEVFRAVRSD
Maize     P-----SMSSV..EG.GST.....Q.-.R...K.....
Spinach   D-----K.QVDVG-NL.F.AI...KCI...L...VTSDLLQVIKT..S---I.GEQ
Potato    LKSTSKSWSSDK.DQNPAG-A.G.F.AI...HI.....ASSGL.GSVKK-....E..EKE

Rice      SQMSRISGFALSTGMPLPETLKLQLGKIPPTDFDALICGSGSEVYYPSTAQCVDAGGRLRPDQD
Maize     ...FK...T...A...S...Q.....A.....G..N.M..E.K....
Spinach   RPT-GSI..I...S.T.S.VDS..DS.DL..A...F..N...L.....-DYSESPFV.--...
Potato    RAE-GSI..I.A.SFN.S.VQSF.LSEGMM.....Y..N..GDL...S-FHSEQNPFV-V.LY

Rice      YLLHINHRWSHDGAKQTIAKLA-----HDG--SGTNVEPDVESCNPFCVSFFIKDPNKVRTIDEMR
Maize     ..M..S.....R.....MGA---Q...--..DA..Q..A.S.A...A.L....Q..K.V....
Spinach   .YS..DY..DDE.LWK.LV.W.ASVNEKK.ENAP.I..A..T.STT..YA.KVN.FTLA.PAK.L.
Potato    .HS..EY..GGE.LRK.LVRW.ASIIDKN.ENGDIH.VE.EDNSADY.YT.KVCK.GT..PSK.L.

Rice      ERVRMRGLRCHLMYCRNATRLQVVPLLASRSQALRYLFVRWGLSVGNMYLIVGEHGDTDHEEMLSG
Maize     ..L.....I.....S.....V.....T.....L.....
Spinach   KMM.IQA...AI..Q.G...N.I.V.....M...VELS.FVVF...S...Y.GL.G.
Potato    KVM.IQA...AV..Q.GS..N.I.V.....L...MDL.KLVVF...S...Y.GLIG.

Rice      LHKTVIIRGVTEKGSEQLVRSSGSYQREDVVPSESPLIAFTKGDLKADEIMRALKEVTKAASGM
Maize     .....V.....P...K.D.....T..A.Y.T.E.....KQ.S.TS...
Spinach   V.....LK.IGSNT.--NFHATRA.PM.H.M.VD..NMFQ.G.CNI-.D.SD..SKIGCLKAQKSL
Potato    .R.A..MK.LCTNA.-S.IHGNNR.PLS..L.FD..NVIQASEECSST..RCL.EKLAVLKG

```

図 2-6 SPSアミノ酸配列の比較

イネとトウモロコシ、ハウレンソウ、ポテトのSPSのDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列を比較した。すべてに共通するアミノ酸は[.]で示した。相同性をみるためにギャップ[-]を挿入している。

リン酸化される158番目のセリン (S) を~~○~~で、UDP-グルコースの結合領域を枠で囲んで示した。イネのグリシンリッチな挿入配列を[g]で示した。

ロフィル結合タンパク質の*Lhcb2*遺伝子にも認められるものである。しかしながら、SPS遺伝子のこの付近の領域には、いわゆる典型的なプロモーター配列と呼ばれるTATA-ボックスや、CAAT-ボックスと呼ばれる配列が存在していない（類似の配列は認められる）。

2.3.6 SPS遺伝子の発現について

SPS遺伝子の発現を調査するために、ノーザンハイブリダイゼーションを試みたが、SPS遺伝子の発現を確認するには至らなかった。そこで、RT-PCR法によってSPS遺伝子の発現の確認をおこなった。すなわち、発現を確認するための組織からmRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを合成し、これを鋳型としてPCRをおこなって遺伝子の発現を確認するものである。図 2-7に示したようにSPS遺伝子のエクソン10とエクソン12からPCR用プライマーを合成し、mRNAから逆転写して作成したcDNAを鋳型としてPCRをおこなった。このプライマーの組み合わせでは、ゲノミックDNAを鋳型としてPCRをおこなえば1.2kbのDNA断片が、またcDNAからでは1.0kbのDNA断片が増幅してくるはずである。図 2-7に示すようにゲノミックDNAからの増幅では1.2kbのDNA断片が、また成長した葉から抽出したmRNAをもとにしたcDNAを鋳型としたときには1.0kbのDNA断片が増幅した。しかしながら、成長葉以外の穂、未熟種子、根ではDNA断片の増幅は認められなかった。ちなみに、同じcDNAを鋳型としてホメオティック遺伝子（Matsuoka unpublished data）のプライマーでPCRをおこなうと、図 2-7に示すようにいずれの組織からのcDNAでもDNA断片の増幅が認められた。

このことから、SPS遺伝子は、成長した葉、すなわちソース器官では発現しているものの、未熟種子や登熟前の穂、根といった非光合成組織、すなわちシンク器官では発現していないことが明らかとなった。

2.3.7 光誘導型ベクターpLHC-SPSの構築および遺伝子導入

植物の葉における光合成能力増強のために、SPS遺伝子のプロモーターを*Lhcb2*遺伝子のプロモーターに転換をおこなった。SPS遺伝子のコーディング領域には制限酵素Kpn Iの切断部位がないことを利用して以下の構築をおこなった（図 2-8）。まず、SPS遺伝子の5'上流域約1 kb含むクローンpXbBに、後半部

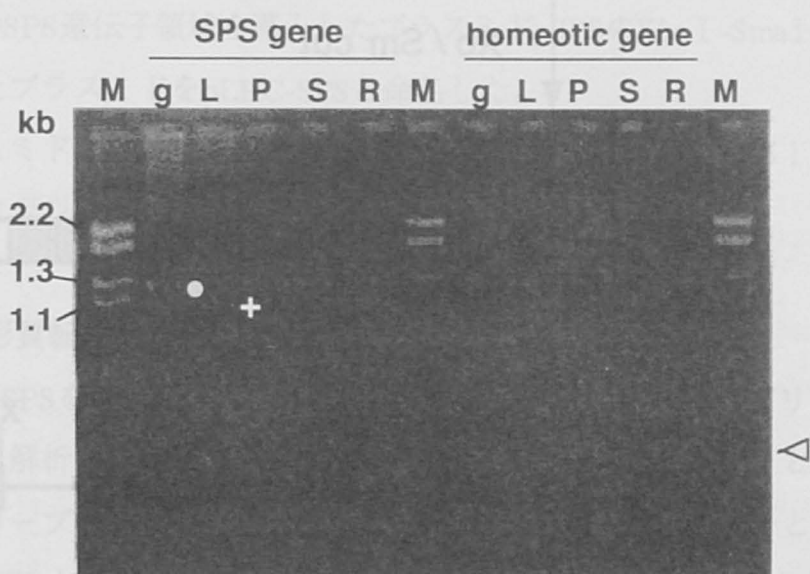
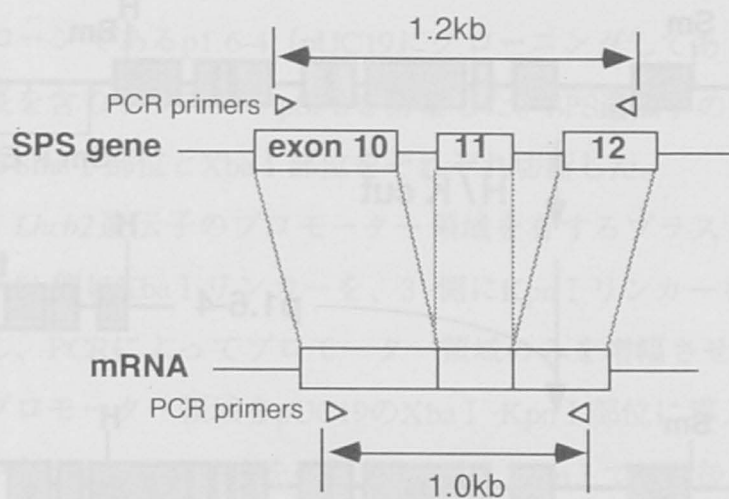


図 2-7 SPS遺伝子の発現

M: 分子量マーカー g: ゲノムDNA

L: 葉 P: 穂 (登熟前) S: 未成熟種子 R: 根

各組織からmRNAを抽出して、cDNAを作成した。このcDNAを

鋳型にしてSPS遺伝子のRT-PCRをおこなった。プライマーは

上図に示す位置であり、泳動像においては○と+でそれぞれ示した。

対照としてホメオティック遺伝子のRT-PCRをおこなった (◁)。

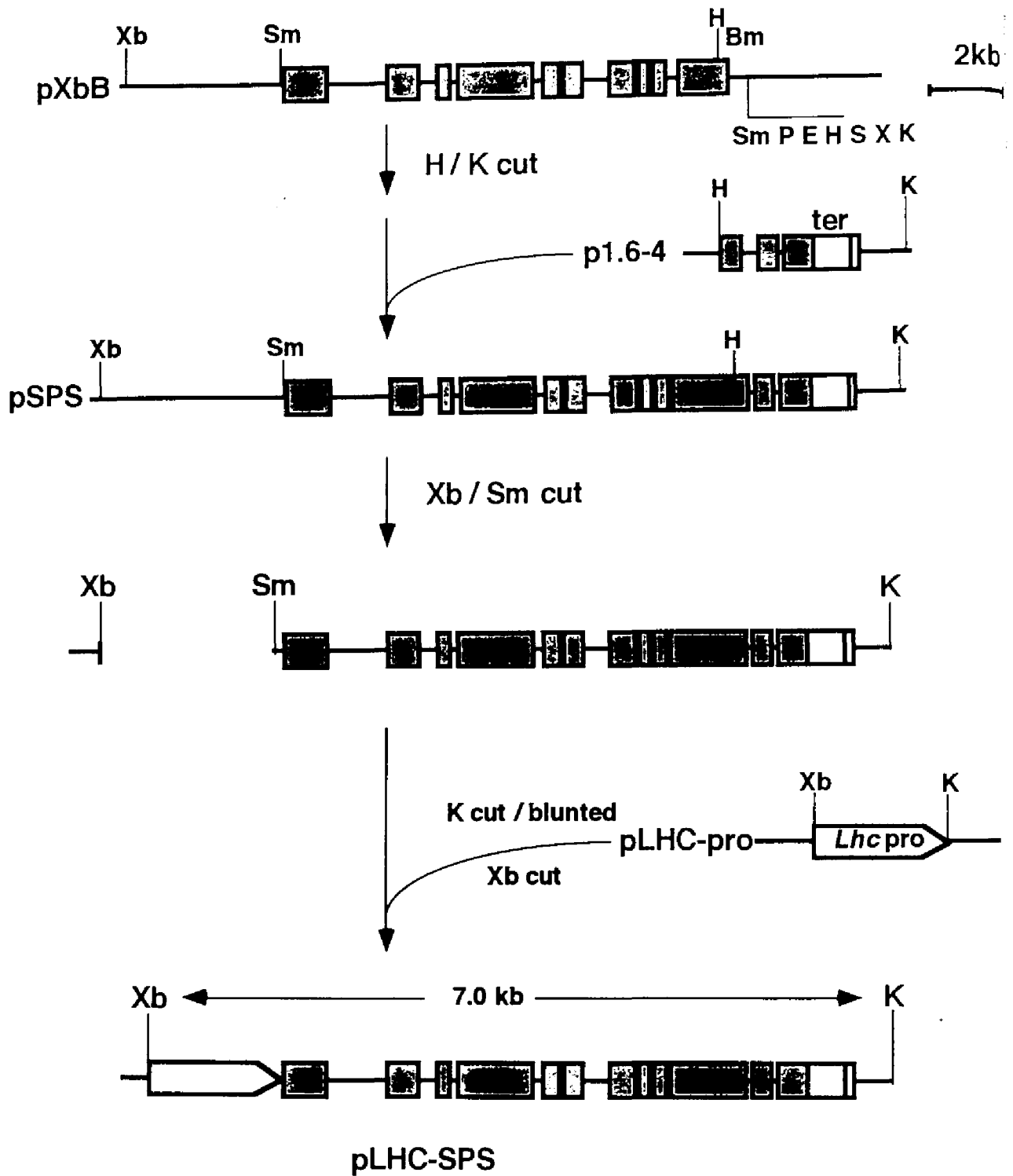


図 2-8 pLHC-SPSの構築

SPS遺伝子内にKpn I (K)部位がないことを利用してpLHC-SPSを構築した。SPS遺伝子の前半部分のクローンpXbBと後半部分のクローンであるp1.6-4を結合し、Xba I (Xb)、Sma I (S)で切断しプロモーター領域を削除し、*Lhcb2* 遺伝子のプロモーターを接続した。

分のクローンであるp1.6-4 (pUC19にクローニングしてある) を導入し、SPS遺伝子全長を含むプラスミドpSPSを構築した。SPS遺伝子の第1 ATGの約220bp上流にあるSma I 部位とXba I 部位をそれぞれ切断した。

次に、*Lhcb2*遺伝子のプロモーター領域を有するプラスミドpLHC-GUSを鋳型として、5'側にXba I リンカーを、3'側にKpn I リンカーを付加したプライマーを作成し、PCRによってプロモーター領域のみを増幅させた。増幅した*Lhcb2*遺伝子のプロモーター領域をpUC19のXba I -Kpn I 部位に導入し、塩基配列に置換や脱落が生じていないことを確認したのち、Kpn I で切断後、平滑末端に変更し、つづいてXba I で切断しプロモーター領域を含むDNA断片を得た。このDNA断片を、先のSPS遺伝子領域を導入したプラスミドpSPSのXba I -Sma I 部位へ導入し、得られたプラスミドをpLHC-SPSと命名した。

プラスミドpLHC-SPSのイネプロトプラストへの導入は、第1章で記述したエレクトロポレーション法に従っておこなった。

2.3.8 形質転換植物のSPS活性

pLHC-SPSを導入して得られた形質転換イネをサザンハイブリダイゼーションによって解析した。形質転換個体から抽出したDNAは、Xba I とKpn I で切断した。プローブは1.3kbのPCR-DNA断片fSPK24を用いた。Xba I とKpn I でイネのDNAを切断すると、本来イネのもっているSPS遺伝子にはKpn I 部位がないのでサザンプロットではXba I 切断によって10kb以上のDNA断片として認められる。これに対して、導入遺伝子はpLHC-SPS全体が導入されていれば約7 kbのハイブリダイズするDNA断片が認められるはずである (図 2-8)。

ハイブリダイゼーションの結果を図 2-9に示す。pLHC-SPS由来の7 kbの断片が明りように認められる個体と、認められない個体とが混在していることがわかる (図 2-9)。個体によってその導入の形式は異なっており、さまざまなパターンが認められた。これらの形質転換個体のうちから、プローブと強くハイブリダイズした個体 (100、108、123、143、182、183など) を選択し、SPS活性を調べた。各個体について10葉程度の枚数についてSPS活性を測定した (図 2-10)。その結果、対照となる非形質転換日本晴と比較して約5倍にも達する高いSPS活性を有する個体があることが判明した (No.183)。その他の形質転換個体につ

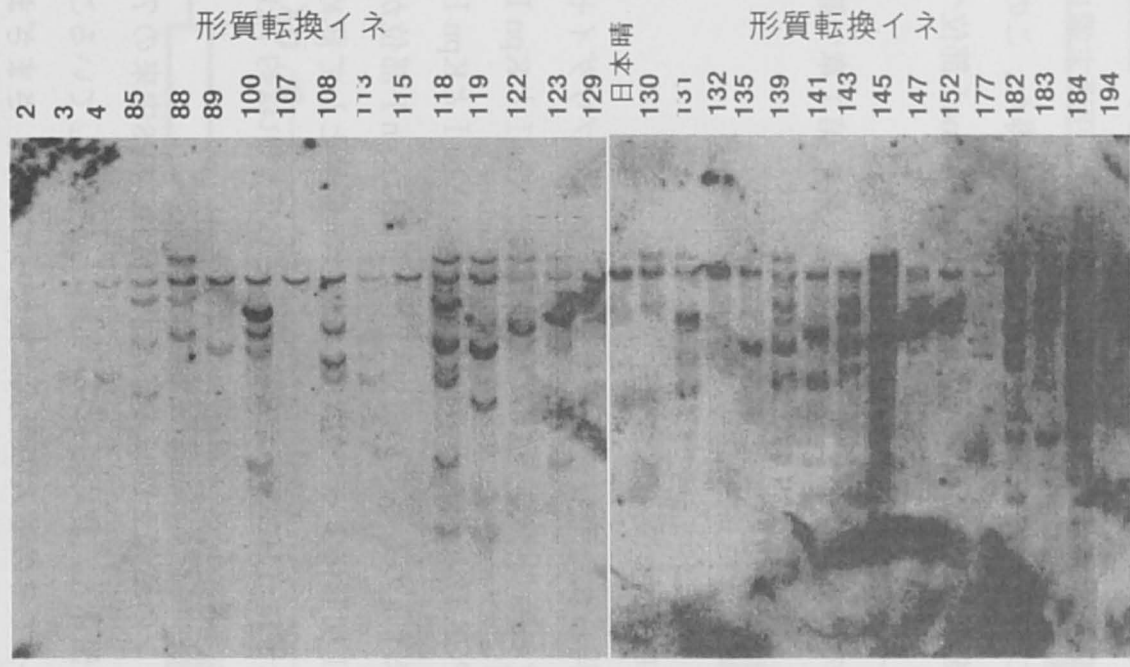


図 2-9 pLHC-SPSの形質転換イネのサザン解析

各形質転換個体からDNAを抽出し、Lhcb2プロモーターの先頭からSPS遺伝子の3'-末端まで全体（約7kb）を切り出すように制限酵素Xba I とKpn I で切断した。プローブはfSPK24を用いた。

いては非形質転換日本晴と同じか、あるいは低めのSPS活性をもつものが多かった。

また、形質転換イネにおけるSPSのタンパク質レベルでの発現量を調べた。SPS抗体をプローブとしてウエスタンブロットをおこなった結果、No.183のみ特異的にSPSの発現量が多いことが判明した（図 2-11）。この結果から、No.183の高SPS活性はSPSのタンパク量の増加によってもたらされたものであることが明らかとなった。したがって、No.183の高SPS活性は導入したpLHC-SPSによる高発現の結果であると結論付けられた。

2.3.9 高SPS活性をもつ形質転換体の解析

前節で通常のイネの約5倍高いSPS活性を有する形質転換個体が得られた。そこで、この高SPS活性を有する形質転換個体No.183についてそのショ糖合成能とデンプンの合成について調査した。晴天の日の8時、12時、15時にそれぞれ葉中におけるショ糖濃度とデンプン濃度を測定した。対照となる日本晴ではショ糖濃度はほぼ10%前後で一定であるのに対して、形質転換個体No.183は6%前後と低かった（図 2-12）。前節の高SPS活性からすると、一見矛盾するような結果となっている。これに対してデンプン濃度は、時間経過とともに上昇した（図 2-13）。日本晴に比較してNo.183は上昇傾向にあるものの、その濃度は1/5程度にしか上がっていない。ショ糖濃度とデンプン濃度の比較、および前節でのSPS活性の結果とも合わせて考察にて論じてみたい。

2.4 考察

イネSPS遺伝子をクローニングし、その全構造を明らかにした。SPS遺伝子は約6kbの大きさで、11のイントロンをもっていた。エクソン1には、イントロンに類似した構造を有する48bpにわたるダイレクトリピート構造を有する付加配列（グリシンリッチ配列）があった。この付加配列が仮にイントロンであるとしても、SPS遺伝子全体へのリーディングフレームのシフトや破壊はおこらない。この付加配列が、実際にエクソンであるのかイントロンであるのか、cDNAをクローニングすれば明らかになることであるが、GC含量が多い領域であるためか、PCR法によっても決定できなかった。

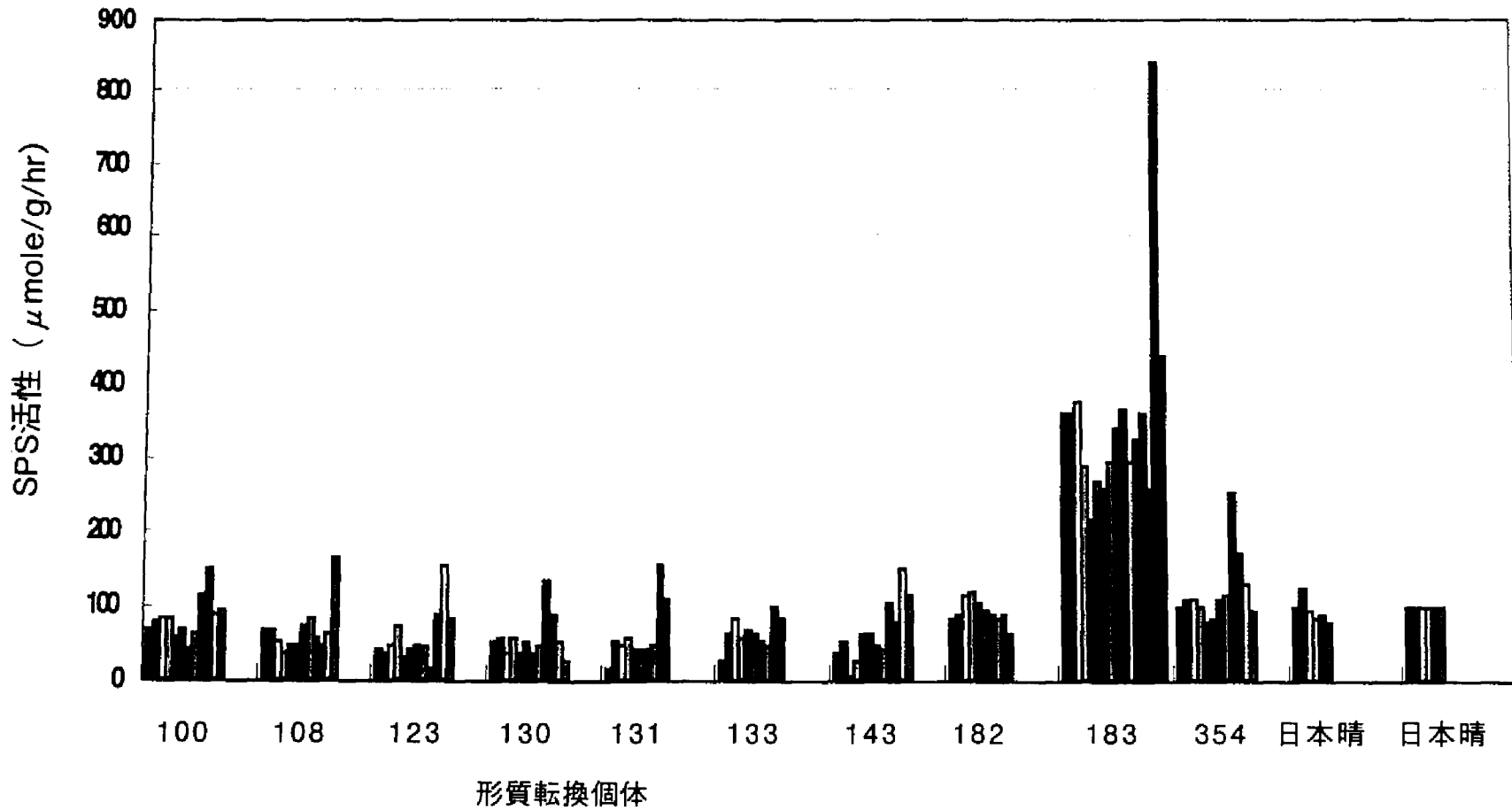


図 2-10 形質転換個体のSPS活性

形質転換イネの葉におけるSPS活性を測定した。
右側2個体は非形質転換イネである「日本晴」。

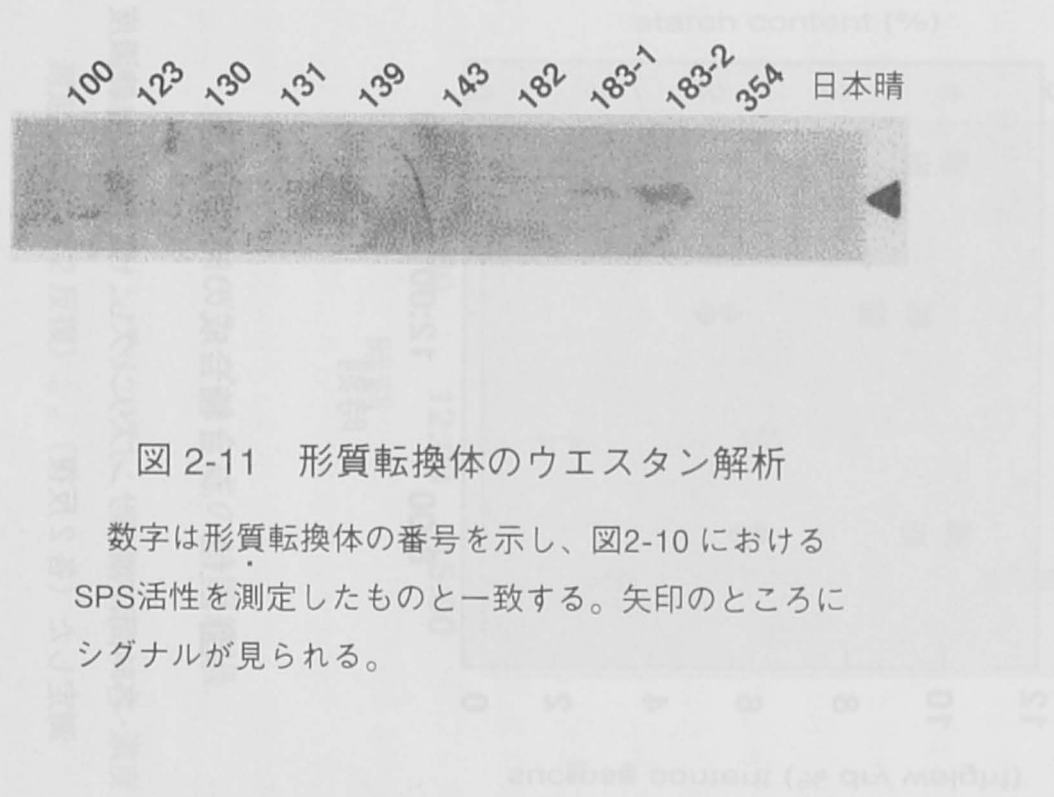


図 2-11 形質転換体のウエスタン解析

数字は形質転換体の番号を示し、図2-10 におけるSPS活性を測定したものと一致する。矢印のところにシグナルが見られる。

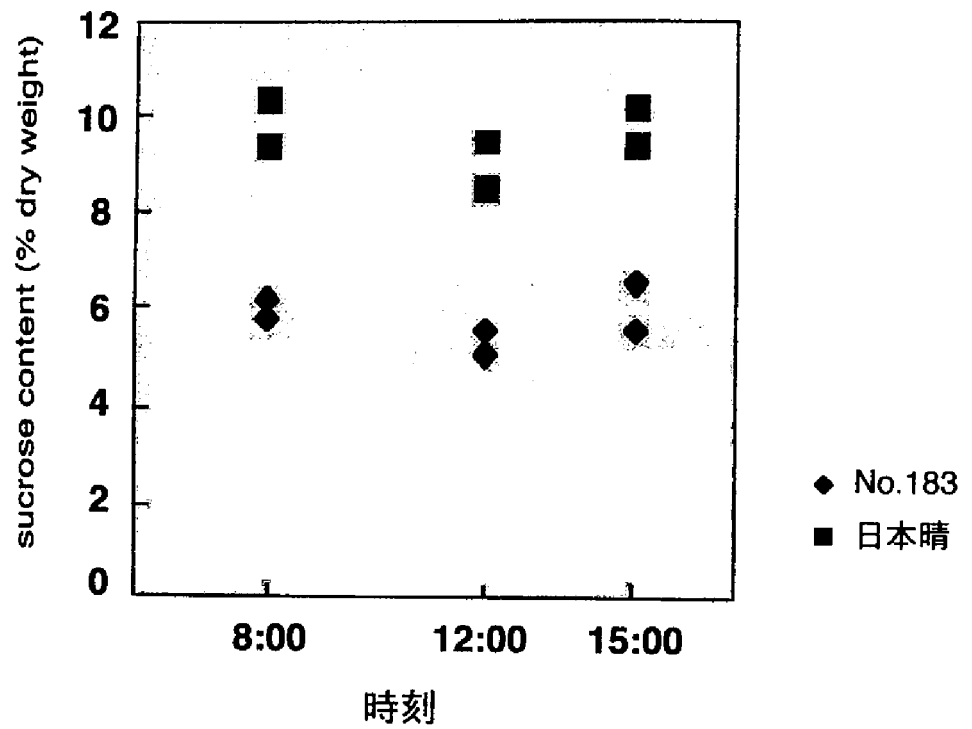


図 2-12 ショ糖合成の時間経過

各時間に葉をサンプリングし、葉中のショ糖濃度を測定した (各 2 反復)。

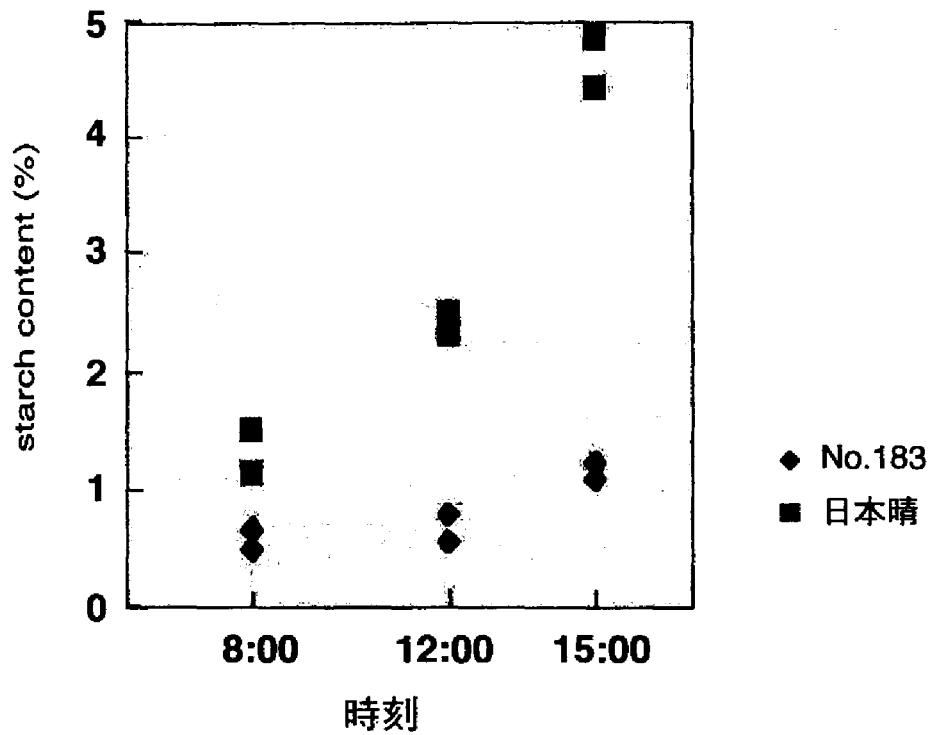


図 2-13 デンプン合成の時間経過

各時間に葉をサンプリングし、葉中のデンプン濃度を測定した（各2反復）。

すでに報告のある他の植物のSPSのcDNAと比較すると、この付加配列周辺での相同性は低い。トウモロコシにもわずかなグリシンの繰り返し配列があるが、グリシンリッチな配列をもつのはイネだけであった。グリシンリッチな配列は細胞壁に関係しているという説 (Showalter 1993) もあるが、イネのSPSにおける機能は不明である。

ノーザンハイブダイゼーションによってSPS遺伝子の発現を調べることはできなかった。このことはSPS遺伝子の発現量がきわめて少ないことを物語っている。発現量が少ないことは、SPS遺伝子のプロモーター構造に原因があると考えられる。SPS遺伝子のプロモーターにはプロモーターに特徴的なTATA配列やCAAT配列などのコンセンサス配列が欠けている。明確なプロモーター配列をもたない遺伝子としてハウスキーピング遺伝子があげられるが、SPS遺伝子がハウスキーピング的な遺伝子であるかは断定できない。RT-PCR法によってSPS遺伝子の転写産物は葉においてのみ確認された。これらの結果から、SPS遺伝子はごく弱い発現ながら、その発現はソース器官となる葉に限定されたものであることが明らかとなった。

プロモーター領域に存在するG-ボックスやGATA-モチーフなどの光感应性要素 (LRE) は、遺伝子の発現様式に関与している。第1章で述べた*Lhcb2*遺伝子のようにLREを有する遺伝子は、光照射によって発現誘導がかかる。SPS遺伝子においても光によって遺伝子発現が誘導される可能性がある。最近、ジャガイモではSPSに2つのアイソザイムが存在すると言われており、いくつか存在するSPS遺伝子のうち一つはソース器官である葉においてのみ発現し、他は恒常的に発現している可能性も指摘されている (Müller-Röber et al. 1992)。

SPSタンパク質の活性はプロテインキナーゼ/ホスファターゼによるリン酸化/脱リン酸化によって制御されている (Walker and Huber 1989、Huber and Huber 1991)。このリン酸化/脱リン酸化を受ける制御部位はホウレンソウSPSで明らかにされているが、この制御部位周辺配列はイネSPSにおいても保存されており、イネSPSもホウレンソウと同様にリン酸化/脱リン酸化による制御を受けると推測された。SPSタンパク質は一日のうちでタンパク量にほとんど変化がなく、したがってターンオーバーもきわめて少ない安定なタンパク質であると予測されている。実際、ウエスタン解析からも日本晴でのSPSタンパク質量は少なく、遺

伝子発現量が少なくても酵素活性には十分量であると考えられる。

クローニングしたSPS遺伝子のプロモーター領域にあたる5'上流域を第1章でクローニングした*Lhcb2*遺伝子のプロモーターに取り換えた。*Lhcb2*遺伝子のプロモーターは、第1章で記述したように、光によって発現が誘導され、なおかつイネにおいてはCaMV35Sプロモーターより10倍も発現量が多い。したがって、*Lhcb2*遺伝子のプロモーターによってSPS遺伝子をイネで発現させれば、本来発現量が少なくタンパク量も多くないSPSが劇的に増加し、ソース器官におけるショ糖合成能の増強につながると予測された。

プロモーターを*Lhcb2*遺伝子のプロモーターに変換したpLHC-SPSを日本晴に導入し形質転換イネを作成した。これらの形質転換個体のうちもとの日本晴と比較してSPS活性が5倍に増加した個体No.183が得られた。他の形質転換個体はNo.183ほどにはSPS活性が増加していなかった。このことは、導入した遺伝子がどのように組み込まれたか、あるいは何コピー導入されたか、すなわち導入した遺伝子が期待したとおりに発現するか、が影響していると考えられる。すなわち、ウエスタンブロットによってSPSタンパク量を検討した結果、高SPS活性株No.183を除いてはSPSタンパク量が増加している形質転換個体がないことから、導入遺伝子の発現によってできたSPSタンパクがリン酸化制御を受けて活性が増加しなかったのではなく、何らかの原因で遺伝子が発現せず、もともとSPSタンパクができていなかったことによるものであるとわかった。

WorrellらはトウモロコシのSPScDNAを光合成遺伝子の一種である*rbcS*遺伝子のプロモーター下でトマトで発現させた (Worrell et al. 1991)。この場合には、トマトにおいてはトウモロコシのSPSタンパクをリン酸化する機構が異なるので、トウモロコシのSPSはリン酸化制御を受けないとされてきた。実際に、彼らのデータからはSPS活性が上昇したことを示している。これとは対照的に、今回の実験においてはイネにイネのSPS遺伝子を導入発現させている。つまり当然ながらリン酸化の機構は同じであるので、過剰量のSPSタンパクが出現したときには、必要以上のSPS活性を抑制する方向にリン酸化機構が働くことも予測された。しかしながら、形質転換個体No.183の結果からは大量に発現したSPSタンパクのすべてをリン酸化することはできず、結果として高SPS活性をもたらしたと考えられる。他の形質転換個体では、生成されるSPS量が少なかったためか、たとえ通常

以上に過剰生産されたSPSタンパク質があったとしてもリン酸化を受けてしまったものと考えられる。

遺伝子導入によってもたらされた高SPS活性によって葉中のショ糖濃度が増加するかと期待されたが、逆に対照の日本晴のほぼ半分の濃度になっていた。一方、デンプンは日本晴においては日中の時間経過とともに光合成活動の結果として蓄積されるが、No.183においては蓄積量は日本晴のほぼ1/5程度にとどまった。この葉中におけるショ糖とデンプンの日変化の結果から、高SPS活性株のNo.183においては次の2通りの考え方ができる。すなわち、生合成されたショ糖リン酸が大量に生成されたためにショ糖に変換されないでショ糖リン酸のまま蓄積されているのか、あるいはショ糖に変換されて直ちにシンク器官に転流されたかのどちらかである。一般的にはショ糖合成においてはSPS活性が律速段階であると考えられているので、ショ糖リン酸が大量に蓄積されているとは考えにくい。すみやかにショ糖に変換されて転流したと推測される。いずれにしてもショ糖リン酸合成酵素SPSの活性を制御することによって、葉緑体中におけるショ糖/デンプンの分配を変化させることが可能であることが示された。

この結果として、植物全体について考えればSPS遺伝子の増幅によってソース器官の強化が可能となった。すなわちショ糖合成能が増強し、これにともなって二酸化炭素固定能が上がるので近年地球温暖化の原因と言われる大気中の二酸化炭素の取り込み量が増える。またそれと同時に、ソース器官からシンク器官への転流を促進し、作物においてはシンク器官での炭酸同化産物量の増加をもたらし、木本植物においては篩管を通しシンク器官への転流と同時に、二次肥大成長の増大をもたらすことに貢献できると期待される。この結果、炭酸固定能の増強をおこない、バイオマス資源としての植物の有効利用の可能性をより一層高めることができるものである。

2.5 要約

イネのショ糖リン酸合成酵素遺伝子をクローニングし、その一次構造を始めて明らかにした。イネのSPS遺伝子は第1染色体に座乗しており、約6kbの大きさと11個のイントロンによって分断されていた。第1エクソンにはグリシンリッチでダイレクトリピート構造をもつ付加配列が存在していた。SPS遺伝子にはプロモーター領域にみられるコンセンサス配列が認められなかったが、光感受性要素(LRE)があった。SPS遺伝子の発現はソース器官である葉においてのみ認められた。

クローニングしたSPS遺伝子の5'領域を*Lhcb2*遺伝子のプロモーターに変換し、イネ(日本晴)に導入した。得られた形質転換個体の中に日本晴の約5倍強いSPS活性をもつ高SPS活性株No.183があった。ウエスタン解析の結果、No.183の高SPS活性はSPSタンパク量が増加したことによるものであることが判明した。No.183のショ糖とデンプンの日変化を調べたところ、日本晴と比較してショ糖はほぼ半分の濃度であり、デンプンは約1/5であることがわかった。これらの結果は、SPS活性の増加によってショ糖/デンプンの炭酸同化産物の分配が変化したことを示すものであり、SPSを増強することによってソース器官の活性を強化し、大気中の二酸化炭素固定能を増加させる可能性が期待できることが示された。

第3章 エネルギー産生に関する遺伝子

～ミトコンドリアatpb遺伝子～

3.1 はじめに

動物や植物などの高等生物の細胞には細胞内小器官と呼ばれる組織がいくつか存在している。植物には葉緑体と呼ばれる光合成器官が存在しており、この葉緑体における炭酸固定に関して第1章、第2章で論述した。細胞内小器官として独自のDNAを有するものとして、葉緑体のほかにミトコンドリアが存在する。ミトコンドリアは、植物、動物に共通する細胞内小器官であり、その役割の重要なものとして生命活動のエネルギーとなるATPの産生があげられる。ATPは生命活動の維持にとって欠かすことのできない物質であり、ATP産生能の低下は植物の生産性の低下に結びつくものであると考えることは想像に難くない。

ミトコンドリアにおけるATPの産生は、ミトコンドリア内膜に存在するATP合成酵素であるF₁F₀ATPase（以下簡単にATPaseと略す）によっておこなわれる。ATPaseは複数のサブユニットからなる酵素であり、各サブユニットは核DNAまたはミトコンドリアDNAに分かれてコードされていることに特徴がある。ミトコンドリアATPaseの活性中心は、サブユニット α および β であると考えられている。本章で論述するATPaseの β サブユニットは植物の場合、核DNAにコードされており細胞質で転写・翻訳されたのちにミトコンドリア内へ移送され、その他のサブユニットと会合され一つの酵素系を作り上げている（図3-1）。

細胞質からミトコンドリアへのタンパク質の輸送とそのレセプターについては、Suissa and Schatz 1982、Murakami et al. 1990などに報告されている。

ミトコンドリアのエネルギー産生の欠陥によって引き起こされるのではないかと考えられる植物育種上で重要な遺伝形質として雄性不稔がある。これは雄しべに花粉ができない現象であり、交雑育種をする上で非常に重要な形質となっている（とくにイネなどのように雄しべと雌しべがきわめて近接している植物の育種において有効）。近年の分子生物学的手法による雄性不稔現象の解析では、ミトコンドリアのATP合成酵素のサブユニットの遺伝子に一部欠陥があったり、雄性不稔系に特徴的な配列をもつものなどが多く報告されている（Akagi et al. 1994、Iwabuchi et al. 1993など）。しかしながら、雄性不稔系統の植物は花をつけるまで

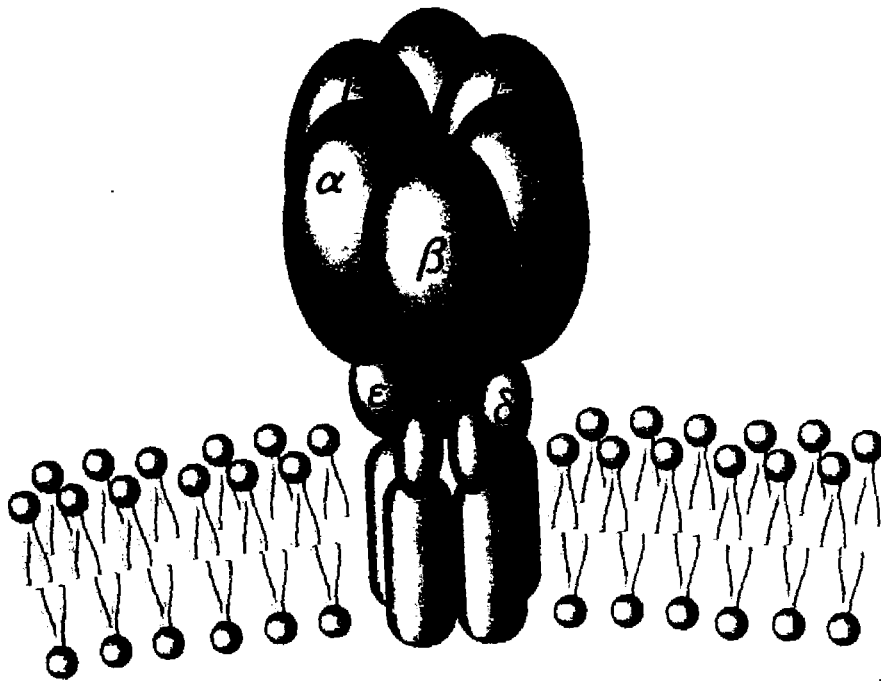


図 3-1 ミトコンドリアF₁F₀ATPase

は正常に生育しており、ATP合成酵素の欠陥によるエネルギー不足は生育の最終段階で影響すると推測される。

また、ヒトのミトコンドリアDNAに欠陥が生じた場合には、鎌状赤血球症やミトコンドリア脳筋症、慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）などの疾患を起こすことが明らかとなってきた（総説として、小沢 1989）。ヒトのミトコンドリアDNAは17kbpと小さく変異速度も核DNAの約10倍であると言われているが、植物のミトコンドリアDNAの場合には、相同領域における分子内あるいは分子間の組換えがおこるとされている（Lonsdale et al. 1988、Palmer and Schilds 1984）。細胞融合によって得られた体細胞雑種では、異なるミトコンドリアのDNA間での組換えも証明されている（Akagi et al. 1989）。さらには、葉緑体とミトコンドリア間でのDNA組換えも報告されている（Moon et al. 1987、Moon et al. 1988）。

本章では、植物の生産活動のエネルギー源となるミトコンドリアのエネルギー産生の中核であるATP合成酵素の β サブユニット遺伝子 (*atpb*) について検討した。ミトコンドリアATP合成酵素は、酸化的リン酸化をおこなう中心であり、その活性中心である β サブユニットを解析した。

3.2 実験材料および実験方法

3.2.1 植物材料

イネ：*Oryza sativa*（日本晴）は温室内で生育させた。

トマト：*Lycopersicon esculatum*（VFNT LA1221）は温室内で水耕栽培で生育させた。

3.2.2 イネcDNAライブラリー

登熟途中の未熟種子からmRNAを抽出し、Current Protocols in Molecular Biologyに記載の方法にしたがってcDNAライブラリーを作成した（Ausubel et al. 1990）。

3.2.3 トマトゲノミックライブラリー

トマトのゲノミックDNAを制限酵素Sau3A Iで部分分解し、10～40%ショ糖密度勾配で遠心したのち、15kbp以上のDNA断片を λ EMBL3へクローニングした。

インビトロパッケージングをおこない、ゲノミックライブラリーを得た (Sugita et al. 1987)。

3.2.4 スクリーニング

イネcDNAライブラリー：トウモロコシ*atpb* cDNAの塩基配列 (Rassow et al. 1990) をもとに次の2種類のプライマーを合成した。

5'-TCTTGTTTACGGGCAGATGA-3'

5'-CCTTGCAATTTTCTCAGCCT-3'

トウモロコシのゲノムDNAを鋳型としてPCRをおこない、*atpb*由来のDNA断片 (0.8kb) を得たので、これをスクリーニングのプロープとした。

トマト ゲノミックライブラリー：タバコ*atpb* cDNAの一部 (1.5kb) をプロープとしてスクリーニングをおこなった (Boutry and Chua 1985)。

3.2.5 塩基配列の決定

クローニングしたDNAの塩基配列の決定はSangerらの方法に準じておこなった (Sanger et al. 1977)。

3.3 実験結果

3.3.1 *atpb*遺伝子の構造～トマトおよびイネ～

イネ未熟種子cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、8個の陽性クローンが得られた。物理地図からするといずれも同一クローンあるいは同ファミリーの遺伝子であると判断されたので、完全長cDNAと思われたλOSAB2の塩基配列を決定した (1841bp)。しかしながら、すでに報告のあるトウモロコシcDNAと比較するとN-末端の28アミノ酸残基が欠如していた。そこで、λOSAB2をプロープにしてスクリーニングをした結果、完全長を含むクローンλOSAB14が得られた (図 3-2)。

トマトのゲノミックライブラリーをタバコ*atpb*遺伝子をプロープとしてスクリーニングした結果、4個の陽性クローンを得た。このうちサザンハイブリダイゼーションの結果から完全長を含むと思われたλLEAB81をサブクローニングし塩基配列を決定した (図 3-3)。エクソン/イントロンの境界はタバコ*atpb*遺伝子の塩

10 20 30 40 50 60 70
 GCGATCTCCCGGCCATGGCGACGCGCCGGGCCCTCTCCTCCCTCGTCCGCGCCGCTCCAGGCTCCGCGG
 M A T R R A L S S L V R A A S R L R G

80 90 100 110 120 130 140
 GGCCTCGCCCCGCCCCGCGCCCGCGGGCCGCTCCACCGACCGTCGCCATCGGGGTACCTCTTCAACCGC
 A S P A P R P R G P L H R P S P S G Y L F N R

150 160 170 180 190 200 210
 GCCGCCGCGTACGCCACGGCCGCCGCGCGGAAGGAGCGGCCCTCCCGCGCCCGCGACGGGGAAGGCCACGG
 A A A Y A T A A A A K E R P P A P A T G K A T G

220 230 240 250 260 270 280
 GTGGAGGTAAGATCACCGACGAGTTCACCGCGCCCGCGCCATTGGGCAGGTGTGCCAGGTCATCGGCGC
 G G K I T D E F T G A G A I G Q V C Q V I G A

290 300 310 320 330 340 350
 CGTCGTCGACGTGCGGTTTTGACGAGGGGCTGCCTCCCATCCTCACGGCGCTCGAGGTGCTCGACCACAAC
 V V D V R F D E G L P P I L T A L E V L D H N

360 370 380 390 400 410 420
 ATCCGCCTCGTGCTCGAGGTGGCGCAGCACCTTGGCGAGAACATGGTGCGCACCATCGCTATGGACGGGA
 I R L V L E V A Q H L G E N M V R T I A M D G T

430 440 450 460 470 480 490
 CTGAGGGGCTTGTCGCGGTGAGCGCGTCTCAACACCGGCTCCCCAATCACTGTTCTGTTGGCAGGGC
 E G L V R G Q R V L N T G S P I T V P V G R A

500 510 520 530 540 550 560
 CACGCTTGACGTATCATGAATGTTATTGGTGAGCCAATTGATGAGAAGGGTGACATAACAACGAACCAC
 T L G R I M N V I G E P I D E K G D I T T N H

570 580 590 600 610 620 630
 TTCCTTCCCATCCATCGTGAGGCGCCTGCTTTTGTGAGCAAGCCACAGAACAGCAAATTCTTGTTACTG
 F L P I H R E A P A F V E Q A T E Q Q I L V T G

640 650 660 670 680 690 700
 GAATTAAGGTTGTGGATCTCGTTGCGCCCTACCAAAGAGGTGGAAGATCGGTCTTTTTGGTGGTGCAGG
 I K V V D L V A P Y Q R G G K I G L F G G A G

710 720 730 740 750 760 770
 AGTCGGCAAAACTGTCCTTATTATGGAGTTGATCAACAATGTTGCTAAGGCCCATGGTGGTTTCTCTGTG
 V G K T V L I M E L I N N V A K A H G G F S V

780 790 800 810 820 830 840
 TTTGCTGGTGTGGTGAACGTACCCGTGAAGGTAATGATCTTTACAGGGAAATGATTGAAAGTGGTGTCA
 F A G V G E R T R E G N D L Y R E M I E S G V I

850 860 870 880 890 900 910
 TCAAGCTAGGTGACAAACAGAGTGAAAGCAAGTGTGCTCTTGTCTACGGGCAAATGAATGAGCCCCGGG
 K L G D K Q S E S K C A L V Y G Q M N E P P G

920 930 940 950 960 970 980
 TGCTCGTGCTCGTGTGGGTTGACCGGTTTACTGTTGCGGTTTCAATTCCTGATGCCGAAGGTCAAGAT
 A R A R V G L T G L T V A V H F R D A E G Q D

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 GTGCTTTTGTTCATTGACAACATTTTTCGTTTCACTCAGGCGAACTCTGAGGTGTCTGCTCTTCTTGGAC
 V L L F I D N I F R F T Q A N S E V S A L L G R

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GTATCCATCTGCTGTGGGATATCAACCAACTCTTGCTACTGATCTTGGAGGACTTCAAGAGCGAATTAC
 I P S A V G Y Q P T L A T D L G G L Q E R I T

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 AACTACAAAGAAGGGTTCCATTACATCTGTCCAAGCTATTTATGTGCCTGCTGATGACTTGACGGATCCT
 T T K K G S I T S V Q A I Y V P A D D L T D P

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCTCCTGCTACTACTTTTGCACATCTTGATGCTACTACTGTGTTGTACGACAGATCTCTGAGCTTGGTA
 A P A T T F A H L D A T T V L S R Q I S E L G I

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TTTACCCTGCTGTCGATCCTCTGGACTCCACATCCAGAATGCTCTCCCCCATGTTTTGGGTGAGGATCA
 Y P A V D P L D S T S R M L S P H V L G E D H

1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 CTACAACACTGCTCGTGGTGTCCAAAGGGTTCTTCAGAACTACAAGAATCTTCAGGATATTATTGCAATT
 Y N T A R G V Q R V L Q N Y K N L Q D I I A I

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 TTGGGTATGGACGAGCTCAGTGAAGATGACAGGTTGACCGTCCGTGCGCAAGGAAGATCCAGCGTTTCT
 L G M D E L S E D D R L T V R R A R K I Q R F L

1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGAGCCAGCCCTTCCATGTGGCTGAAGTTTTACGGGTGCTCCTGGGAAGTACGTGGAGCTGAAGGAGAG
 S Q P F H V A E V F T G A P G K Y V E L K E S

1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 CGTCAACAGTTTCCAGGGTGTGGATGGGAAATATGATGACCTTCCCGAGCAGTCATTCTATATGGTG
 V N S F Q G V L D G K Y D D L P E Q S F Y M V

1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GGAGGCATTGAGGAAGTCATTGCTAAAGCTGAGAAGATCGCCAAGGAGTCGGCTTCATAGATCTCTTCAT
 G G I E E V I A K A E K I A K E S A S *

TGTTGTTAAGTTCTGTACAAGTTAAATTTTGGATTCTGGCTTTCTATATGCCCGTTCTGTAGCCAGGACG
 TGATTACAAGCAGGGGTGACATCTTCAGATGAGCGATGTTTTTTGTCTTCCTTTTCTCCTTTTACCCCT
 AATAAGGAACCGCAGTGACATTGTATTGTGCTGCACAAAAGTACTCGGAACTTCGAAAGCATGTGTCCTT
 TATAATGCAGATCCATGAAGCATAGGATCAAAAAAAAAA

図3-2 イネ *atpb* cDNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列

1 GAATTCACCT GTAACCTCAC TGCTCTGTCA CTCGCATTTT CACAACC¹ ATGGCTTCTCGAA
61 GGTTCCTTCTC CTCCATGCTC CGATCATCCA TACGTCACCT TTCAACTAAA TCATCACTCA
121 CAAATTCTAT TCATCGCTCC TCCCCTGTAG GCCACCTTCT CCACCGCGCC GTAAAATACG
181 CTACCGCTGC GGCCGCGAAG GAAGCGCCGG CGCCTCAGAA GAAACCGACG ACGATTAAGG
241 GAACTGGAGG CAAGATCACC GATGAGTACA CCGGTGCCGG TGCACTTGGG AGCGTATGTC
301 AGGTGATCGG GGCTGTTGTG GATGTTCCGG TCGATGAAGG GCTACCGCCG ATTTTGACGG
361 CTTTAGAGGT GTTGGATCAT GATATTAGGG TGGTACTTGA AGTTGCTCAA CATATGGGAG
421 AAAATATGGT TAGGACTATT GCTATGGATG GAACTGAAGG GCTTGTGCGT GGTCAAAGAG
481 TCCTCAATAC TGGCTCCCCT ATTAAA² GTAA GCTTGACATT GTCATGATATTCTGTTTATA
541 TGCTGTATTT AGTGGCGCGA CCACGATTTT TAATATAAAG ATGTAAATAC GGGAGGAAAT
601 CAAAGGGATT CGATATCTAC TGTATATACA CAAGAAAATA AAATTGATCT TATATATATA
661 TAAATTTTCA ACTTCTTTCT TATCAACATG GCGTTTATTT AATTTTAGAA ATTCATATAG
721 TGCTTTTTTC TCTGAATAAT ATATGTTTTT TAGTTTGGCG TGCTCATAGT CCTTCTAAGT
781 TCTAATCTTG GTTATAAAAT GGCAG² GTGCC AGTTGGCAGG GCTACACTTGGTCGTATTAT
841 AAATGTCATT GGAGAGCCCA TTGATGAAAG GGGTGATCTAA³ GTAAGAATT TAGGCATTAG
901 CTAAAATCAT TTGTTTTCTT GTTAATGACA GTATTATGTT ATATAATGTT GCTTTGCTTT
961 TTCCAATTTT ATATTTCTGT TTCATTTGGA TGAGCCTTTA CTTTTTTATA TTGCTTTTCG
1021 TTTTTTATAT TTGCTTTATT GAGATGCTGT GGAACACAG³ AAACGGAACA TTATCTCCCA
1081 ATTCATCGTG AAGCTCCATC TTTTGTGAG CAAGCAACAG AACAGCAGAT CCTTGTGACT
1141 GGAATCAAG⁴ GTGTGTGATAC TTATTTTGTG CACTAGGAGC TGAGCACATC GCAATCTTCA
1201 TCTGTCCTCA TCTGATATAG TTTTGGTGGA AGCAAAACAG GAATAACAAA TATTTGATTA
1261 GCATGTGCAA CTTACTGAAT GTTGTGGTA GACGATAYWC AAATCANCTT GAATGCATAA
1321 ATCATATGTT GTCTACTTGG TGTGGCATCC TGTATGACTT AGCTGCTTTTGTGACAG⁴ GT
1381 GGTAGATCTA CTTGCTCCGT ATCAAAGAGG TGGAAAGATT GGACTTTTTG GTGGTGCAGG
1441 TGTTGGAAAG ACGGTGCTTA TTATGGAGCT TATTAACAAT GTTGCAAAGGCCCATG⁵ GTTT
1501 GTTATTAGTT GCACTGGGGA GTAAAAAAGA ATTTTCATGT ATTCTCATTG TTTGAGTTAA
1561 TTTAATTTTT GTATTCTCTT CTCGTCTCAG⁵ GTGGTTTCTC AGTGTTTGTCT GGTGTCGGTG
1621 AACGTAACCG GGAGGGTAAT GATTTGTACA GAGAAATGAT TGAGAGTGGT GTTATTAAGC
1681 TTGGTGAAAAGCAG⁶ GTCTCT GTAGATAACA TTTGTTTTTC AATATATAGT GCGGCACTCT
1741 TCATGCTGAT TGCATGTATA TTGTCTGCAG⁶ GGTGAAAGCA AATGTGCTCT GGTATATGGT
1801 CAAATGAATG AACCTCCTGG TGCTCGTGCT CGTGTTGGC TCACTGGGCT GACAGTTGCA
1861 GAACACTTCC GAGATGCTGA AGGGCAAGAT GTGCTCCTTT TCATTGATAA TATTTTTCGC
1921 TTCACTCA⁶ AGTGAGCTATCT TTTCAAATAC CTTAACTAGT AGTATATTTT ACTTTTTCAA
1981 TTGCTTATAT GTGGTGAAGA GATTTCTGAT TCTCGACCTC TTTCTCTGGG ACTGCTCTAG

207 GCCAACTCTG AGGTGTCTGC TTTGCTTGGT CGTATTCCCT CTGCAGTCGG TTACCAGCCA
 2101 ACTTTAGCTA CGGATCTTGG AGGGCTTCAA GAGAGGATTA CTACAACCAA GAAGGGGTCA
 2161 ATCACATCAG TCCAAGCTAT CTATGTGCCT GCTGATGACT TGA CTGATCC AGCCCCTGCT
 2221 ACCACCTTTG CTCATCTTGA TGCTACA ACT GTTTTGTCTC GGCAG GTTAGTTTCTTATAT
 2281 TGCCAATTAT GTTTCAGAAA AGCACTCCTA CCCTATTTTT ATATACAATA TCCCTTTTCT
 2341 CCTTATGCAG⁸ ATTTCTGAGC TTGGTATTTA TCCTGCTGTG GATCCTTTAG ATTCCACGTC
 2401 CCGTAGTCTC TCTCCTCATA TCCTAGGGGA AGATCATTAC AACACTGCAC GAGGTGTACA
 2461 AAAGGTTCTC CAGA ACTACA AGAATCTTCA GGATATTATC GCCATTCTGG GAATGGATGA
 2521 ATTGAGTGAA GATGACAAAT TAACTGTTGC TCGTGCCCGT AAAATTCAGA GGTTCCTGAG
 2581 TCAGCCTTTC CACGTTGCAG AAGTATTTAC TGGTGCCCT GAAAGTATG TAGAGTTGAA
 2641 AGAGAGCATC CAAAGTTTTAC⁹ GTAACCAA GGA ACTACTT TCTTACTGAG TCACGCTCAC
 2701 CTCATCTACT TCTCCTCATT GAGCAGAAAT TATTTCTGTA TATAGTTTTA AACCTTCATT
 2761 CCTCATTTGG ATTTTCATTC TGAGCAG⁹ GGTGTCCTTGACG GTAAATATGA TGACCTATCG
 2821 GAGCAATCGT TCTACCTGGT TGGGGGTATA GAAGAAGTGA TTGCTAAGGC TGAGAAGATA
 2881 GCAAAGGAGT CAGCTAGTTGAT⁹ TATTTAGC TGCAATTTCT TCTTTCTGTT TGT TTTGTTT
 2941 TTCCTACATG GATAGATAGC TCATAATAGC AGAGAGACTG AGATGCTCAC ACGGCCTTTT
 3001 ATAGTTCTTA TAAGTTAGTC TACACTAAGA ATTGATTTTC TTCTTTTCTC CTTGTAATTT
 3061 TCTGGCTGAG TTGATTGAAA TGAGTTACAG GATGTCAGAA GGTCATTGCT GTGCTTTTCC
 3121 GTGTTTCTCT TCAATACAAT GGATTAATTT GTGTTTACCT TTCCACCTGC TGAATAAGTG
 3181 CTCTTGAAAC ATCAATAATC TAATGTACGA AGCATTTGAT CCGTTGACCT GCAGGTCGAC
 3241 CCTGCAGGCA TGCAAGC

図 3-3 トマト *atpb* 遺伝子の塩基配列

トマト *atpb* 遺伝子の塩基配列を示した。枠で囲んだ領域はエクソンを示す。二重下線はポリA付加部位。

基配列を参考にして決定した (Boutry and Chua 1985)。トマト *atpb* 遺伝子は 8 個のイントロンによって分断された 9 個のエクソンから構成されていた。エクソン/イントロンの境界の配列は 5' 側のコンセンサス配列である 'A(A/G)...GT(T/A)(A/T)' と 3' 側のコンセンサス配列である 'CAG...(G/A)T' とに完全に一致した (Breathnach and Chambon 1981)。これらのクローンは、いずれもプロモーター領域が欠けていた。

また、ゲノム中でのコピー数を調べるためにトマト全DNAを制限酵素Hind IIIで切断し、タバコ *atpb* cDNA (Boutry and Chua 1985) をプローブとして用いザン解析をおこなった。その結果、図 3-4 に示すように、明らかな 4 本のポジティブバンドが検出された。得られた陽性クローンの物理地図からすると、これらのバンドはそれぞれ異なるクローンに由来すると推測されたので、トマトゲノム中には最低でも 4 個の遺伝子ファミリーをもつものと推定された。

3.3.2 生物に普遍的な *atpb* 遺伝子

ミトコンドリアATPaseの β サブユニット遺伝子は、その重要性からさまざまな生物種の遺伝子がクローニングされてきた。ここで、イネとトマトの *atpb* 遺伝子と、他の生物種の *atpb* 遺伝子を比較した。アミノ酸配列で比較すると図 3-5 のようになった。相同性は表 3-1 にまとめた。植物同士での比較では、トランジットペプチドを除いた領域では非常に相同性が高いことがわかる。さらにヒトや酵母、アカバカビとも相同性が高く、*atpb* 遺伝子が生物の種を越えて普遍的に存在する遺伝子であることがわかる。また、ミトコンドリアの *atpb* と葉緑体のATP合成酵素の β サブユニットである *atpb* とはかなり相同性があることが明らかとなった。

3.3.3 *atpb* 遺伝子の発現について

タバコの *atpb* cDNA をプローブとして、トマトの各組織から抽出した全RNAに対してノーザンブロット解析をおこなった。対照としてはトマトの *rbcS* 遺伝子 (Sugita et al. 1987) をプローブとしたノーザンブロット解析をおこなった。その結果、*atpb* 遺伝子はいずれの組織においても発現していた (図 3-6)。完熟・未熟果実や茎での発現が他の組織よりも多いようにみえる。しかしこれは、電気泳

Hind III digest

kb
23.1 ▷
9.4 ▷
6.5 ▷
4.3 ▷
2.3 ▷
2.0 ▷



図 3-4 トマト *atpb* 遺伝子のサザン解析

トマトの全DNAをHind IIIで切断した。

プローブはトマト *atpb* 遺伝子の一部を使用。

▼

Rice 1:MATRR-ALSSLVRAASR---LRGAS-P-A-PR-PRGPLHRPSPSGYLFNRAAAYATAAAA
 Tomato 1:..S..FFS.M.R-SSI.HSS-TKS.LTNSI-----H---.S..V.H.LH..VK.....
 Tobacco 1:..S..LLA.L.RQS.Q.GGG.ISR.LGNSI.KSASRASS.A..K.F.L...VQ...S...
 Maize 1:..S..-VV...L.S...---.A...-A...-...A.P....A.....SS...
 Yeast 1:.VLP.-----YT.T...---L-----LKQPNISPLLTSWK-----
 N.crassa 1:-----FK.GISAF-A-RTA---R--PSFA-AASRRAV.--AALN-L...---P.
 Human 1:.-L--GFVGRVAA.PA-SGA.--RRLTPSASLP.AQL.L.AA.TAVHPV.--D.-----
 Rice cp 1:.-L--GFVGRVAA.PA-SGA.--RRLTPSASLP.AQL.L.AA.TAVHPV.--D.-----
 Tobacco cp 1:..S..LLA.L.RQS.Q.GGG.ISR.LGNSI.KSASRASS.A..K.F.L...VQ...S...
 *

Rice 61:KERP--PAPATGKATGGGKITDEFTGAGAIGQVCQVIGAVVDVRFDEG-LPPILTALEVL
 Tomato 61:..A.APQKKP.TIKGT.....Y.....L.S.....
 Tobacco 61:-PASQPST.PKSGSEPS.....S..K.....
 Maize 61:QAA.AT.P.....
 Yeast 61:-----RCMASAAQS.PITGKVTAVI.---AIVDVH-----FE-QSE---A..N...IK
 N.crassa 61:-----LSRFASSA.-VGD.KIY.....K..TDK.....N...TQ
 Human 61:-----QTSPSPKA.-A.T.RIVA.....Q..G.....N...Q
 Rice cp 61:-----STGRIDQIIGPVLD-VTFPR.---KLPYI-----Y--NA-----VVKSRTD
 Tobacco cp 61:-----N.GRVVQIIGPVLD-VAFPF.---KMPNI-----Y--NA-----VVQGRDSV
 * *

Rice 121:DHNIRLVLEVAQHLGENMVRTIAMDGTEGLVRGQRVLNTGSPITVPVGRATLGRIMNVIG
 Tomato 121:..D..V.....M.....K.....I....
 Tobacco 121:..NQ.....I....
 Maize 121:..N.....I....
 Yeast 121:TPQ GK.....T.....EK..D..G..S.....E.....I....
 N.crassa 121:NNGQK.....S.....V..C.....AKASD..A..I..P.....I..T.
 Human 121:GRET.....ST.....K..DS.A..KI..PE.....
 Rice cp 121:GKQ.NVTC..Q.L..N.R..AV..SA.D..M..ME.ID..A.LS...G.....F..L.
 Tobacco cp 121:GQP.NVAC..Q.L..N.R..A..SA...T..ME.ID..A..S...G.....F..L.
 ** * * ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Rice 181:EPIDEKGDITTNHFLPIHREAPAFVEQATEQQILVTGIKVVDLVAPYQRGGKIGLFGGAG
 Tomato 181:.....R..LK.E.Y.....S.....L.....
 Tobacco 181:..A...R.P...D.....L.....
 Maize 181:.....K.....L.....
 Yeast 181:.....R.P.KSKLRK...ADP.S.R..S.SAE..E.....L...A.....
 N.crassa 181:D...R.P.K.DK.R...A...E...S.TAE.....L...A.....
 Human 181:.....R.P.K.KQ.A...A...E.M.MSV..E.....L...AK.....
 Rice cp 181:..V.NL.PVD.SATF...S...I.LD.KLS.FE.....L...R.....
 Tobacco cp 181:..V.NL.PVD.STTS...S...IQLD.KLS.FE...E...L...R.....
 * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Rice 241:VGKTVLIMELINNVAKAHGGFSVFAGVGERTREGNDLYREMIESGVIKLGDKQSESKCAL
Tomato 241:.....E..G.....
Tobacco 241:.....E.....
Maize 241:.....D.....
Yeast 241:.....F.Q.....I.....H..ED...N.--EG...V..
N.crassa 241:.....F.Q.....I.....Y...T.....H..Q.TS..Q.--DGD..V..
Human 241:.....Y.....H.....N.--.DAT..V..
Rice cp 241:.....I.....V...G.....TGIKVVDLLAPYRRGGKIG-.V..
Tobacco cp 241:.....I.....V...G.....M..K....N-EENIA...V..
***** * ***** ***** *** ***** ** **

Rice 301:VYQMNPPGARARVGLTGLTVAVHFRDAEQDVLLFIDNIFRFTQANSEVSALLGRIPS
Tomato 301:.....E.....
Tobacco 301:.....E.....
Maize 301:.....E.....
Yeast 301:.....A.....I.EY...E.....G.....
N.crassa 301:.....F.....A.....I.EY...E.....G.....
Human 301:.....A.....EY...Q.....G.....
Rice cp 301:.....M.....A..M.EY...VNK.....V..G.....M..
Tobacco cp 301:.....M.....A..M.EY...VNE.....V..G.....M..
* ***** ** ** * ** ***** ** ***** **

Rice 361:AVGYQPTLATDLGGLQERITTTKKSITSVQAIYVPADDLTDPA PATTF AHL DATTVLSR
Tomato 361:.....
Tobacco 361:.....
Maize 361:.....
Yeast 361:.....M.L.....V.....V.....S.S.S.....SS..
N.crassa 361:.....V.M.QM.....T.....V.....
Human 361:.....M.TM.....SL..
Rice cp 361:.....S.EM.S.....S.....I..V.....
Tobacco cp 361:.....S.EM.S.....S..E.....I..V.....
***** * ***** * ** ** * ***** * * ***** * *

Rice 421:QISELGIYPAVDPLDSTSRMLSPHVLGEDHYNTARGVQRVLQNYKNLQDIIAILGMDLS
Tomato 421:.....S....I.....K.....
Tobacco 421:.....I.....K.....
Maize 421:.....K.....
Yeast 421:G.....K...L.DAA.V.QE..DVRSK..ET..T..S.....
N.crassa 421:G.....K...DRPIV.QE..E..TR..QI..E..S.....
Human 421:A.A.....IMD.NIV.SE..DV.....KI..D..S.....
Rice cp 421:GLASK.....T..Q.RIV.NE..E..QR.KQT..R..E.....L..
Tobacco cp 421:GLAAK.....T..Q.RIV..E..E..QR.KQT..R..E.....L..
***** * * ** * ** ***** ****

```

Rice      481:EDDRLTVRRARKIQRFLSQPFHVAEVFTGAPGKYVELKESVNSFQGVLDGKYDDLPEQSF
Tomato    481:...K...A.....IQ..H.....S....
Tobacco   481:...KM..A.....D...I.....S....
Maize     481:...K...A.....K.....
Yeast     481:.Q.K...E.....A.....I...L.R..DT.A..KA..E....NI..HA.
N.crassa  481:.A.K...E.....T..Q...IE..L.D..DTIA..KAI.A.EG....GA.
Human     481:.E.K...S.....Q.....HM..L.P...TIKG..QI.A.E..H...A.
Rice cp   481:.E....A....E.....F.....S.....G.A.TIRG..LI.S.EL.G....A.
Tobacco cp 481:.E...L.A....E.....F.....S.....G.A.TIRG..LI.S.EL.G....A.
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Rice      541:YMVGGIEEVIKAKEKI-AK-ESAS
Tomato    541:.L.....-.-.....
Tobacco   541:.....D.....-.-...A
Maize     541:.....-.-.....
Yeast     541:.....D.VR..Q.LAREPN---
N.crassa  541:....DFASAR..G...L.EL.GQA
Human     541:....P...AV...D.-L.E-.HS.
Rice cp   541:.L..N.D.AST..INLEENKLLK
Tobacco cp 541:.L..N.D.AT...MNLEMESNLK
          * * * * *

```

図 3-5 イネ, トマトの *atpb* アミノ酸配列と他の生物の *atpb* との比較

イネおよびトマトの *atpb* の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、他の生物の *atpb* のアミノ酸配列と比較した。すなわち、

- tabacco (タバコ Boutry and Chua 1985)
- maize (トウモロコシ Winning et al. 1990)
- yeast (酵母 Takeda et al. 1985)
- Neurospira crassa* (アカパンカビ Rassow et al. 1990)
- human (ヒト Ohta et al. 1988)
- rice cp (イネ葉緑体 *atpb* Hiratsuka et al. 1989)
- tabacco cp (タバコ葉緑体 *atpb* Shinozaki et al. 1986)

である。イネ *atpb* と同じアミノ酸残基は [.] で、すべてに共通するアミノ酸残基は下に * 印で表した。相同性をみるためにギャップ [-] を挿入した。▼ は、タバコで決定されたトランジットペプチド切断部位を表す。

表 3-1 ATPase β サブユニットのアミノ酸配列相同性 (%)
(出典は図 3-5の解説参照)

	Rice	Tomato	Tobacco	Maize	Yeast	<i>N.crassa</i>	Human	Rice cp	Tobacco cp
Rice	100	89	88	96					
Tomato	88	100	87	96					
Tobacco	87	85	100	90					
Maize	95	89	89	100					
Yeast	75	76	76	76	100				
<i>N.crassa</i>	69	70	72	72	80	100			
Human	78	72	79	79	74	79	100		
Rice cp	66	67	66	66	67	66	66	100	
Tobacco cp	69	69	69	69	70	68	70	88	100

斜体の数字は、トランジットペプチド領域を除いた場合の相同性

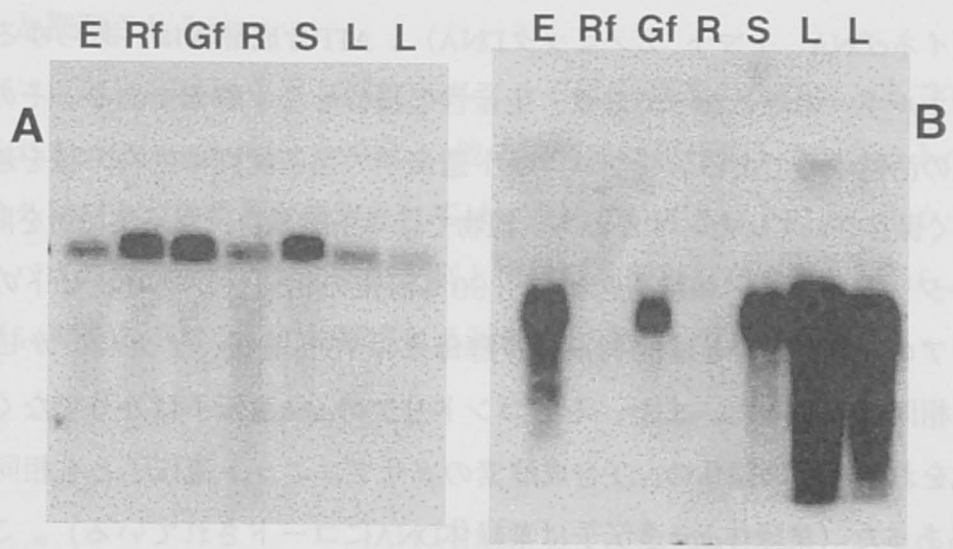


図 3-6 トマトにおける *atpb* 遺伝子の発現

E: 黄化芽生え R: 根 S: 茎 L: 葉
 Gf: 未熟果実 Rf: 完熟果実

Aは *atpb* 遺伝子をプローブに、Bは対照として *rbcS* 遺伝子をプローブとした。

動にのせたRNAを同一量にしたためであり、たとえば葉においては*rbcS*遺伝子の発現量が圧倒的に多いことから、単純に*atpB*遺伝子の発現量の比較をすることは難しい。むしろ、図 3-6の結果は、*atpB*遺伝子がいずれの組織においても発現している証拠とした方がよいと考えられる。

3.4 考察

ミトコンドリアのATP合成酵素の β サブユニットの*atpB*遺伝子をクローニングした（イネcDNA、トマトゲノミックDNA）。ATP合成酵素は、あらゆる生物の生命エネルギーの源となっており、生産性の根幹をなす酵素である。そのATP合成酵素の活性中心である β サブユニット遺伝子の塩基配列は生物の種を越えて非常によく保存されていた。すなわち、植物では単子葉植物、双子葉植物を問わず、トランジットペプチド領域を含めても90%前後の相同性があり、ヒトのミトコンドリアの*atpB*遺伝子とは80%前後、酵母とは75%前後、アカパンカビで70%前後の相同性があった。また、ミトコンドリアの*atpB*遺伝子ばかりでなく、光リン酸化をおこなう葉緑体のATP合成酵素の β サブユニット遺伝子とも相同性が60~70%あった（葉緑体*atpB*遺伝子は葉緑体DNAにコードされている）。これらの結果は、ATP合成酵素が植物ばかりでなく動物や微生物においても生命活動の維持、あるいは生命活動の結果としての生産において必要欠くべからざる酵素であることを示唆するものである。

*atpB*遺伝子の発現は、器官非特異的であり、トマトにおいては果実や、黄化芽生え、葉、根、莖のいずれにおいても発現していた。全RNAに対してノーザンプロットをおこなったので、*atpB*遺伝子の絶対的発現量について詳細はわからない。トマトの場合、ゲノム中に少なくとも4個のクローンが存在すると考えられるが（図 3-4）、それぞれのクローンが、どの器官で、いつ発現するかといった発現パターンの違いはわからない。タバコ*atpB*遺伝子も2クローンの遺伝子がクローニングされているが、詳細については検討されていない（Boutry and Chua 1985）。

ミトコンドリアタンパク質はミトコンドリアDNAにコードされているものと、核DNAにコードされているものに分かれる。*atpB*をはじめとする核コードのタン

タバコ質はトランジットペプチドの付加した形で合成され、ミトコンドリアに移送されたのちに切り落とされて成熟タバコ質となる。このトランジットペプチドを利用してミトコンドリアへ外来遺伝子のタバコ質を導入する試みもおこなわれている (Boutry et al. 1987、Chaumont et al. 1994)。トランジットペプチドは、その配列自体に相同性があるわけではない (図 3-5)。このトランジットペプチド領域においては酸性アミノ酸が少なく、セリン (S) と塩基性アミノ酸であるアルギニン (R) が多くなっている (図 3-5)。また、これらの塩基性アミノ酸と反対側に疎水性アミノ酸が配置される典型的な両親媒性の α -ヘリックス構造をとると推測される。

タバコにおいては、トランジットペプチドは54残基のチロシンまでであると決定された (Chaumont et al. 1994)。他の植物では正確にトランジットペプチドと成熟タバコとの境界が決定されてはいないが、イネ、トマト、トウモロコシではタバコの境界領域のアミノ酸配列とほぼ同じ配列を有することから、タバコと同様54残基のチロシンで切断される可能性が高いと考えられる。

3.5 要約

イネのミトコンドリアATP合成酵素の β サブユニット遺伝子 (*atpb*) のcDNA、およびトマトの*atpb*遺伝子をクローニングした。トマトの*atpb*遺伝子は、8個のイントロンによって分断された構造をもっていた。*atpb*遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列をタバコ、トウモロコシ、ヒト、酵母、アカバシカビと比較したところ、いずれも高い相同性を示した。また、イネとタバコの葉緑体*atpb*と比較しても60~70%の相同性があった。これらのことから*atpb*遺伝子は生物の種を越えてかなり高く保存されていることがわかった。

サザン解析の結果から、*atpb*遺伝子はマルチジーンファミリーを形成していることが明らかとなった。トマトでの*atpb*遺伝子の発現を調べたところ、黄化芽生え、果実、葉、茎、根のいずれの組織においても発現しており、*atpb*遺伝子が組織非特異的に発現する遺伝子であることが判明した。

第4章 結語と今後の展望

植物の光合成反応は、空気中の二酸化炭素と光エネルギーによっておこなわれている。植物に固定された炭素はやがて植物のエネルギー源となり、成長するにしたがって増えてゆく新しい細胞を構築するための材料となる。この光合成反応の効率が上がるということは、大気中の二酸化炭素から炭水化物を合成する効率が上がるということであり、バイオマス資源の増加につながるものである。また近年、大気中の二酸化炭素濃度の上昇は地球温暖化の一因といわれ、世界各国で二酸化炭素排出量の削減へ向けての努力がおこなわれているところである。

光合成効率を上げ、炭酸固定能を増強して炭酸同化産物の生産性をあげるための一手法として、光合成をはじめとした遺伝子の改良があげられる。本論文では、光合成反応の場である葉緑体中に存在する大部分のクロロフィルを結合しているタンパク質の遺伝子を利用することによって生産性の向上が図れないか基礎的検討をおこなった（第1章）。すなわち、この集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質II（LHCII）のタイプI遺伝子（*Lhcb2*）が他の光合成遺伝子と同様に光によって発現の誘導がかかり、またその発現する組織も葉緑体をもつ細胞に限定されていることを明らかにした。また従来から植物の遺伝子組換えで使用されているカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーターよりも、イネにおいては数倍～10倍高いプロモーター活性をもつことを明らかにした。これらの結果から、イネ*Lhcb2*遺伝子のプロモーターは分子育種に有効なプロモーターであり、導入遺伝子をソース器官で特異的にかつ強力に発現させるときには有力なプロモーターとなるであろう。さらに今後は分子レベルでの育種のために、さまざまな場面で使用できるプロモーターの「品揃え」が必要となる。

次に第2章では、葉緑体において固定された炭酸同化産物の分配に関与する遺伝子であるシヨ糖リン酸合成酵素（SPS）の遺伝子をクローニングし、構造を明らかにした。また、第1章で得たイネの*Lhcb2*遺伝子のプロモーターをSPS遺伝子に組み込み、その発現量を増加させる試みをおこなった。SPS活性のきわめて高い形質転換個体を得られたが、これは導入した遺伝子によって過剰量のSPSタンパク質が生産されたことによるものであることを明らかにした。これにとまなっ

てSPS活性は非形質転換体イネの5倍以上に増加した。増大したSPS活性によって葉中のショ糖濃度の上昇が起これると予想したが、逆に非形質転換体イネよりも低濃度であった。デンプン濃度はまったく上昇していないことから、生成されたショ糖は転流によってすみやかにシンク器官へと流れたと推測される。今後、高SPS活性である形質転換体の炭酸固定能力が、どのような変化し、光合成効率がどのように変わっているのか、シンク器官への影響はどのようなものであるのか、検討していかなければいけない。

植物の炭酸固定能力を増強し生産性を向上させるには、本論文で取り上げたソース器官に関連した遺伝子を改良するほかに、炭酸同化産物を受容するシンク器官の改変も重要となる。すなわち、炭酸同化産物を供給する側だけでなく、消費する側からの要求が強ければそれだけソース器官の能力も引き上げられると考えられるからである。とくにシンク器官の大きな植物、例えばジャガイモなどの大きな塊茎をつける作物や、二次肥大成長自体が大きなシンクである林木など、においてはシンク能力をさらに増強することによって炭酸固定能力をさらに増強できる可能性が高いと予想される。

第3章ではミトコンドリアのATP合成酵素の β サブユニット遺伝子 (*atpb*) について論述した。*atpb* 遺伝子は生物の種を越えて非常によく保存されている遺伝子であることが明らかとなった。酸化的リン酸化をおこない、エネルギーを供給するミトコンドリアにあるため、*Lhcb2* 遺伝子やSPS遺伝子と異なり、遺伝子発現には器官特異性はなく、いずれの器官においても発現していた。ミトコンドリアを改良するためには、改良すべきタンパク質をミトコンドリアへ移送しなければならない。そのためには、*atpb* 遺伝子がつよようなトランジットペプチドが必要となる。今後のミトコンドリア改良に有益な遺伝子であると思われる。

以上、本論文では植物の生産性に関与する遺伝子について論述してきた。とくに、植物のソース・シンク機能を向上させることは、二酸化炭素固定能を向上させ、バイオマス資源の増加とともに、大気中に増加した二酸化炭素の低減に役立つものとなるであろう。本研究が地球環境改善、バイオマス資源増加への一助となれば幸いである。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、懇切丁寧なるご指導を賜った京都大学木質科学研究所教授酒井富久美博士、ならびに有益な助言を頂いた京都大学木質科学研究所教授桑原正章博士、同教授島田幹夫博士に謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり懇切丁寧なるご指導を頂いた名古屋大学生物分子応答研究センター教授松岡信博士、名古屋大学遺伝子実験施設教授杉浦昌弘博士、同助教授杉田護博士、また、本論文を書く機会を与えていただいた三井東圧化学株式会社ライフサイエンス研究所藤村達人博士、三井業際植物バイオ研究所所長高橋正昌氏に謝意を表します。

さらに、本研究を遂行するにあたりさまざまなご教示、ご協力を頂いた三井東圧化学株式会社本社およびライフサイエンス研究所、北海道工業所の諸氏に謝意を表します。とくに共同研究者であったライフサイエンス研究所の赤木宏守博士、里澤智美さん、島田浩章博士（現 東京理科大学）には多大なるご協力を頂きました。この場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

- Akagi H, Sakamoto M, Negishi T, Fujimura T (1989) Construction of rice cybrid plants
Mol Gen Genet **215**: 501-506
- Akagi H, Sakamoto M, Shinjo C, Shimada H, Fujimura T (1994) A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Curr Genet* **25**: 52-58
- Anderson JM (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annu Rev Plant Physiol* **37**: 93-136
- Apel K, Kloppstech K (1978) The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*) Light-induced appearance of the mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Eur J Biochem* **85**: 581-588
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JD, Smith JA, Struhl K edited (1990) *Current Protocols in Molecular Biology* Wiley Interscience
- Berry-Lowe SL, McKnight TD, Shah DM, Meagher RB (1982) The nucleotide sequence, expression, and evolution of one member of a multigene family encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in soybean. *J Mol Appl Genet* **1**: 483-498
- Boutry M, Chua NH, (1985) A nuclear gene encoding the β subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J* **4**: 2159-2165
- Boutry M, Nagy F, Poulsen C, Aoyagi K, Chua NH (1987) Targeting of bacterial chloramphenicol acetyltransferase to mitochondria in transgenic plants. *Nature* **328**: 340-342
- Breathnach R, Chambon P (1981) Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**: 349-383
- Brogliè R, Bellemare G, Bartlett SG, Chua NH, Cashmore AR (1981) Cloned DNA sequences complementary to mRNAs encoding precursors to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and a chlorophyll *a/b* binding polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7304-7308
- Brogliè R, Coruzzi G, Lamppa G, Keith B, Chua NH (1983) Structural analysis of nuclear genes coding for the precursor to the small subunit of wheat ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Biotechnology* **1**: 55-61
- Bruneau JM, Worrell AC, Cambou B, Lando D, Voelker TA (1991) Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plants. *Plant Physiol* **96**: 473-478

- Buetow DE, Chen H, Erdoes G, Yi LSH (1988) Regulation and expression of the multigene family coding light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins of photosystem II. *Photosyn Res* **18**: 61-97
- Castresana C, Staeloni R, Malik VS, Cashmore AR (1987) Molecular characterization of two clusters of genes encoding the type I CAB polypeptides of PSII in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* **10**: 117-126
- Chaumont F, Filho M de CS, Thomas D, Leterme S, Boutry M (1994) Truncated presequences of mitochondrial F1-ATPase β subunit from *Nicotiana plumbaginifolia* transport CAT and GUS proteins into mitochondria of transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **24**: 631-641
- Cuming AC, Bennett J (1981) Biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. Control of messenger RNA activity by light. *Eur J Biochem* **118**: 71-80
- Dean C, Elzen PVD, Tamaki S, Dunsmuir P, Bedbrook J (1985) Differential expression of the eight genes of the petunia ribulose biphosphate carboxylase small subunit multigene family. *EMBO J* **4**: 3055-3061
- Fluhr R, Moses P, Morelli G, Coruzzi G, Chua NH (1986) Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. *EMBO J* **5**: 2063-2071
- Franzén LG, Falk G (1992) Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the β subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Mol Biol* **19**: 771-780
- Fujimura T, Sakurai M, Akagi H, Negishi T, Hirose A (1985) Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Culture Lett* **2**: 217-223
- Gidoni D, Brosio P, Bond-Nutter D, Bedbrook J, Dunsmuir P (1987) Novel cis-acting elements in petunia *cab* gene promoters. *Mol Gen Genet* **215**: 369-378
- Glazer AN, Melis A (1987) Photochemical reaction centers: structure, organization, and function. *Annu Rev Plant Physiol* **38**: 11-45
- Grob U, Stüber K (1987) Discrimination of phytochrome light-inducible from non-light-inducible plant genes. Prediction of a common light-responsive element (LRE) in phytochrome dependent light-responsive plant genes. *Nucleic Acids Res* **15**: 9957-9973
- Hiratsuka J, Shimada H, Whittier RF, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji

- Y, Sun CR, Meng BY, Li YQ, Kanno A, Nishizawa Y, Hirai A, Shinozaki K and Sugiura M (1989) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* **217**: 185-194
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231
- Huber SC, Nielsen TH, Huber JL, Pharr, DM, (1989) Variation among species in light activation of sucrose-phosphate synthase. *Plant Cell Physiol* **30**:277-285
- Huber SC, Huber JL (1991) Regulation of maize leaf sucrose phosphate synthase by protein phosphorylation. *Plant Cell Physiol* **32**:319-326
- Ishii N, Hijikata M, Osumi T, Hashimoto T (1987) Structural organization of the gene for rat enoyl-CoA hydratase:3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme. *J Bio Chem* **262**: 8144-8150
- Iwabuchi M, Kyouzuka J, Shimamoto K (1993) Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial atp6 RNA restores fertility cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J* **12**: 1437-1446
- Jeferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907
- Joshi CP (1987) An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res* **15**: 6643-6653
- Keegstra K, Olsen LJ, Theg SM (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 471-501
- Kishimoto N, Higo K, Saito A (1994) The coding sequence for rice seed catalase detects a locus different from that determined by isozyme analysis. *Theor Appl Genet* **87**: 625-626
- Klein RR, Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME (1993) Cloning and developmental expression of sucrose phosphate synthase from spinach. *Planta* **190**: 498-510
- Kohorn BM, Harel E, Chitnis PR, Thornber JP, Tobin EM (1985) Functional and mutational analysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of thylakoid membranes. *J Cell Biol* **102**: 972-981
- Khush GS (1990) Report of meetings to discuss chromosome numbering system in rice. *Rice Genet Newslett* **7**: 12-14

- Lam E, Chua NH (1989) ASF-2: A factor that binds to the Califlower Mosaic Virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *The Plant Cell* **1**: 1147-1156
- Lammpa G, Morelli G, Chua NH (1985) Structure and development regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b binding polypeptide. *Mol Cell Biol* **5**: 1370-1378
- Leloir LF, Cardini CE (1955) The biosynthesis of sucrose phosphate. *J Biol Chem* **214**:157-163
- Lonsdale DM, Brears T, Hodge TP, Neville SE, Rottmann, WH (1988) The plant mitochondrial genome homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity. *Philos Trans R Soc Lond B* **319**: 149-164
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Manzara T, Gruissem W (1988) Organization and expression of the gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. *Photosyn Res* **16**: 117-139
- Mathis JN, Burkey KO (1987) Regulation of light-harvesting chlorophyll a/b binding protein biosynthesis in greening seedlings. *Plant Physiol* **85**: 971-977
- Matsuoka M, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ozeki Y, Yamamoto N (1988) Classification and nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from rice. *Plant Cell Physiol* **29**: 1015-1022
- Matsuoka M (1990) Classification and characterization of cDNA that encodes the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein of photosystem II from rice. *Plant Cell Physiol* **31**: 519-526
- Mazur BJ, Chui CF (1985) Sequence of a genomic DNA clone for the small subunit of ribulose bis-phosphate carboxylase-oxygenase from tobacco. *Nucleic Acids Res* **13**: 2373-2386
- McMichael RW, Klein RR, Salvucci ME, Huber SC (1993) Identification of the major regulatory phosphorylation site in sucrose-phosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* **307**: 248-252
- Mizusawa S, Nishimura S, Seela F (1986) Improvement of the dideoxy chain termination methods of DNA sequencing by use of dideoxy-7-deazaguanisine triphosphate in place of dGTP. *Nucleic Acids Res* **14**: 1319-1324
- Moon E, Kao TH, Wu R (1987) Rice chloroplast DNA molecules are heterogeneous as revealed by DNA sequences of a cluster of genes. *Nucleic Acids Res* **15**: 611-630

- Moon E, Kao TH, Wu R (1988) Rice mitochondrial genome contains a rearranged chloroplast gene cluster. *Mol Gen Genet* **213**: 247-253
- Murakami H, Blobel G, Pain D (1990) Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor. *Nature* **347**: 488-491
- Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J* **11**: 1229-1238
- Nagy F, Boutry M, Hsu MY, Wong M, Chua NH (1987) The 5'-proximal region of the wheat Cab-1 gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response. *EMBO J* **6**: 2537-2542
- Ohta S, Tomura H, Matsuda K, Kagawa Y (1988) Gene structure of the human mitochondrial adenosine triphosphate synthase β subunit. *J Biol Chem* **263**: 11257-11262
- Palmer JD, Shields CR (1984) Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* **30**: 437-440
- Pichersky E, Bernatzky R, Tanksley SD, Cashmore AR (1986) Evidence for selection as a mechanism in the concerted evolution of *Lycopersicon esculentum* (tomato) genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3880-3884
- Piechulla B, Pichersky E, Cashmore AR, Gruissem W (1986) Expression of nuclear and plastid genes for photosynthesis-specific proteins during tomato fruit development and ripening. *Plant Mol Biol* **7**: 367-376
- Rassow J, Harmey MH, Muller HA, Neupert W, Tropschung M (1990) Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for the mitochondrial precursor protein of the β -subunit of F1-ATPase from *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res* **18**: 4922
- Rocher JP, Prioul JL, Leachamy A, Reyss A, Joussaume M (1989) Genetic variability in carbon fixation, sucrose-P-synthase and ADP glucose pyro-phosphorylase in maize plants of differing growth rate. *Plant Physiol* **89**:416-420
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* **5**:69-76
- Saiki RL, Gelfand DH, Stoffel S, Schafer SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis K B, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491

- Saito A, Yano M, Kishimoto N, Nakagahara M, Yoshimura A, Saito K, Kuhara S, Ukai Y, Kawase M, Nagamine T, Yoshimura S, Ideta O, Ohsawa R, Hayano Y, Iwata N, Sugiura M (1991) Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Jpn J Breed* **41**: 665-670
- Salvucci ME, Drake RR, Haley B (1989) Purification and photoaffinity labeling of sucrose phosphate synthase from Spinach Leaves. *Arch Biochem Biophys* **281**:212-218
- Salvucci ME, Klein RR (1993) Identification of the uridine-binding domain of sucrose-phosphate synthase. *Plant Physiol* **102**: 529-536
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad USA* **74**:5463-5467
- Schmidt GW, Bartlett SG, Grossman AR, Cashmore AR, Chua NH (1981) Biosynthesis pathway of two polypeptide subunits of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex. *J Cell Biol* **91**: 468-478
- Schmidt, G W and Mishkind, M L (1986) The transport of proteins into chloroplasts *Annual Rev Biochem* **55**: 879-912
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H and Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* **5**: 2043-2049
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins *Plant Cell* **5**: 9-23
- Simpson J, Schell J, Van Montagu M, Herrera-Estrella L (1986) Light-inducible and tissue-specific pea lhcp gene expression involves an upstream element combining enhancer and silencer-like properties. *Nature* **323**: 551-554
- Sonnewald U, Willmitzer L (1992) Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol* **99**: 1267-1270
- Sonnewald U, Quick WP, MacRae E, Krause KP, Stitt M (1993) Purification, cloning and expression of spinach leaf sucrose-phosphate synthase in *Escherichia coli*. *Planta* **189**: 174-181
- Sonnewald U (1993) EMBL database accession no X73477
- Sonnewald U, Lerchl J, Zrenner R, Frommer W (1994) Manipulation of sink-source relations in transgenic plants. *Plant, Cell and Environ* **17**: 649-658

- Stitt M, Quick P (1989) Phytosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. *Physiol Plant* **77**:633-641
- Stockhaus J, Schell J, Willmitzer L (1989) Correlation of the nuclear photosynthetic ST-LS1 with the presence of chloroplasts. *EMBO J* **8**: 2445-2451
- Sullivan TD, Christensen AH, Quail PH (1989) Isolation and characterization of maize chlorophyll a/b binding protein gene that produces high levels of mRNA in the dark. *Mol Gen Genet* **215**: 431-440
- Sugita M, Manzara T, Pichersky E, Cashmore A, Gruissem W (1987) Genomic organization, sequence analysis and expression of all five genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tomato. *Mol Gen Genet* **209**: 247-256
- Sussia M, Schatz G (1982) Import of proteins into mitochondria. *J Biol Chem* **257**: 13048-13055
- Tada, Y , Sakamoto, M , Fujimura, T (1990) Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants: use of electroporation buffer lacking chloride ions *Theor Appl Genet* **80**:475-480
- Tada, Y , Sakamoto, M , Matsuoka, M , Fujimura, T (1991) Expression of a monocot LHCP promoter in transgenic rice *EMBO J* **10**:1803-1808
- Takeda M, Vassarotti A, Douglas MG (1985) Nuclear genes coding the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. *J Biol Chem* **260**: 15458-16465
- Terao T, Matsuoka M, Katoh S (1988) Immunological quantification of proteins related to light-harvesting chlorophyll a/b protein complexes of the two photosystems in rice mutants totally and partially deficient in chlorophyll b. *Plant Cell Physiol* **29**: 825-834
- Thompson WF, Everett M, Polands NO, Jorgensen RA, Palmer JD (1983) Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung-bean leaves. *Planta* **158**: 487-500
- Thornber JP (1986) Biochemical characterization and structure of photosynthetic organisms In *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 19* Edited by Staehelin, L and Arntzen, C J pp 98-142 Springer-Verlag, Berlin
- Timko MP, Klausch AP, Hand JM, Cashmore AR, Herrera-Estrella L, Van den Broeck G, Van Montague M (1985) Structure and expression of nuclear genes encoding polypeptides of the photosynthetic apparatus. In: Steinback, K E, Bonitz, S , Arntzen, C J , Bogorad, L (eds) *Molecular biology of the photosynthetic apparatus* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 381-396

- Tobin EM, Silverthorne J (1985) Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **35**: 569-593
- Turner NE, Clark WG, Tabor GJ, Hironaka CM, Fraley RT, Shah DM (1986) The genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase are expressed differentially in petunia leaves. *Nucleic Acids Res* **14**: 3325-3342
- Walker JL, Huber SC (1989) Purification and preliminary characterization of sucrose-phosphate synthase using monoclonal antibodies. *Plant Physiol* **89**:518-524
- Walker JL, Huber SC (1989) Regulation of sucrose-phosphate synthase activity in spinach leaves by protein level and covalent modification. *Planta* **177**:116-120
- Weiner H (1995) Antibodies that distinguish between the Serine-158 phospho- and dephospho-form of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Plant Physiol* **108**: 219-225
- Winning BM, Bathgate B, Purdue PE, Leaver CI (1990) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the β subunit of the mitochondrial ATP synthase from *Zea mays*. *Nucleic Acids Res* **18**: 5885
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voleker TA (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* **3**:1121-1130
- Yamamoto N, Kano-Murakami Y, Matsuoka M, Ohashi Y, Tanaka Y (1988) Nucleotide sequence of a full length cDNA clone of ribulose bisphosphate carboxylase small subunit gene from green dark-grown pine (*Pinus thunbergii*) seedlings. *Nucleic Acids Res* **16**: 11829
- 小沢高将 (1989) ミトコンドリア遺伝子の変異と疾患 科学**59**: 719-727

出願特許一覧

題名：光合成関連遺伝子およびそのプロモーター

出願番号：特願平 02-075774

題名：電気穿孔法の緩衝液およびそれを利用する遺伝子導入法

出願番号：特願平 01-215050

題名：イネシヨ糖リン酸合成酵素遺伝子

出願番号：特願平 05-092520

題名：シヨ糖合成能力を増強したイネおよびその作製法

出願番号：特願平 08-060644

題名：イネミトコンドリアATPase β サブユニットのcDNA

出願番号：特願平 03-303251

題名：細胞質雄性不稔イネの検出方法

出願番号：特願平 01-278620

題名：細胞質雄性不稔イネの検出方法

出願番号：特願平 02-4496