

クロマツのクロロフィル *a/b* 結合  
タンパク質遺伝子の構造と発現調節

小島 克己

クロマツのクロロフィル a/b 結合  
タンパク質遺伝子の構造と発現調節

Structure and expression of the pine (*Pinus thunbergii* Parl.)  
chlorophyll a/b-binding protein gene.

小 島 克 己

## 目 次

	ページ
I 光合成系遺伝子の発現制御に関する研究の流れ	1
II クロマツのクロロフィル <u>a</u> / <u>b</u> 結合タンパク質遺伝子の構造と発現	11
1. はじめに	11
2. 材料と方法	13
植物材料	
クロマツの核DNAの抽出	
DNAライブラリーの作成	
<u>c a b</u> 遺伝子のスクリーニング	
<u>c a b</u> 遺伝子の塩基配列の決定	
<u>c a b</u> 遺伝子の塩基配列, アミノ酸配列の比較	
クロマツのRNAの抽出	
ノーザン・ハイブリダイゼーション実験	
プライマー・エクステンション実験	
S1マッピング実験	
3. 結果と考察	18
クロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の単離	
クロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の塩基配列	
他植物の <u>c a b</u> 遺伝子との比較	
分子進化学的解析によるクロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の位置づけ	
暗所芽生えと明所芽生えでのクロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の発現量	
クロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の転写開始点	
プロモーター領域の構造	
III クロマツのクロロフィル <u>a</u> / <u>b</u> 結合タンパク質遺伝子のタバコ	28
形質転換体での発現	
1. はじめに	28
2. 材料と方法	30
形質転換ベクターの作成	
タバコの形質転換	
形質転換カルスのスクリーニング	
タバコ形質転換体の育成	
GUS活性の定量	
GUS活性の組織化学的検出	
ノーザン・ハイブリダイゼーション実験	
3. 結果と考察	35
クロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の形質転換タバコ内での発現	
タバコ形質転換体の子葉でのクロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の暗所発現	
タバコ形質転換体の成葉でのクロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の暗所制御	
タバコ形質転換体でのクロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の器官特異的発現制御	
タバコ形質転換体でのクロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の組織特異的発現制御	
IV クロマツ <u>c a b</u> 遺伝子の発現制御機構	41

謝 辭	4 5
引用文献	4 6
表	5 4
図	6 0



## I 光合成系遺伝子の発現制御に関する研究の流れ

針葉樹は、その芽生えが暗黒下でも緑化するという、被子植物とは異なる現象をしめす。被子植物の場合、緑色色素であるクロロフィルの生合成経路には光を必要とする段階があり、暗黒下ではクロロフィルは蓄積しない。また被子植物の暗所芽生えの色素体はエチオプラストとして存在する。これに対し針葉樹の暗所芽生えの子葉では、色素体が葉緑体へと発達しており、クロロフィルの蓄積だけでなく、葉緑体を構成する諸要素の生産がおこなわれている。したがって針葉樹では、その諸要素の一部である光合成系のタンパク質遺伝子の発現が暗黒下で起こっていると考えられる。

植物の分子生物学は、光合成系遺伝子の光発現制御の研究を中心に発展してきた。それは光合成が植物を特徴づけるものであり、光は植物の育成にとって重要な環境からのシグナルであるからだ。その中でもリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットの遺伝子 (rbcS) とクロロフィル a/b 結合タンパク質の遺伝子 (cab) の光発現制御に関する研究が精力的におこなわれ、これらの遺伝子をモデルとした転写レベルでの光発現制御機構が解明されようとしている。

本研究は、針葉樹における光と緑化の関係の特殊性を利用し、cab 遺伝子の光発現制御機構を解明することを目的とする。

第 I 章では cab 遺伝子の光発現制御および針葉樹の暗黒下でのクロロフィル合成に関するこれまでの研究をレビューし、本研究の目的と意義を述べる。

### < cab 遺伝子の光発現制御 >

葉緑体のチラコイド膜に存在する光化学系 I, II の複合体はそれぞれ光捕集のための補助色素複合体を持っている。光化学系 II の場合、集光性クロロフィル a

／bタンパク複合体(LHC II)がその役割を果たしている(Thornber 1986, Anderson 1986, Glazer and Melis 1987). LHC IIはクロロフィルa, bとアポタンパク質からなり、チラコイド膜上の主要な要素である(Thornber 1986). c a b遺伝子はこのアポタンパク質であるクロロフィルa／b結合タンパク質(CABタンパク質)をコードする. またCABタンパク質はグラナのスタッキングの役割も果たすと考えられている(Mullet 1983).

c a b遺伝子は核DNAにコードされており、そのコピー数はハプロイドゲノムあたり数コピーから十数コピーといわれている(Buetow *et al.* 1988, Chitnis and Thornber 1988). CABポリペプチドは、細胞質でトランジットペプチドを含む前駆体として翻訳される. この前駆体は、葉緑体に輸送され、葉緑体の包膜を通過する際にトランジットペプチド部分が切断され、成熟タンパク質となる(Schmidt and Mishkind 1986). CABタンパク質は親水性部分と疎水性部分とで構成され、3カ所の疎水性部分がチラコイド膜内に入り、末端と疎水性部分に挟まれた親水性部分を膜外に出した状態で結合する(Kohorn *et al.* 1986, Kohorn and Tobin 1987).

被子植物では、CABタンパク質の蓄積は緑色組織でのみ観察され、黄化組織では蓄積はみられない. これはc a b遺伝子の発現が光照射によって誘導され、主として転写レベルでその制御がおこなわれていることによる. この際に働く光受容体はフィトクロームである(Tobin and Silverthorne 1985, Kuhlmeier *et al.* 1987). しかしフィトクロームからのシグナルがどのように伝えられて遺伝子の発現調節をおこなっているのかはいまだに明らかになっていない.

フィトクロームにより転写レベルでの光発現制御がおこなわれる遺伝子はc a b遺伝子の他にもいくつか知られている. r b cS遺伝子はN.-H. Chuaのグループなどにより精力的に研究がおこなわれている(Dean *et al.* 1989, Gilmartin *et al.* 1990). 光によって発現が抑制される遺伝子としては、フィト

クローム自身の遺伝子 (p h y) (Lissemore and Quail 1988, Kay et al. 1989) やプロトクロロフィリド・レダクターゼの遺伝子 (Batschauer and Apel 1984, Wörsinger et al. 1988) などが知られている。

光照射から遺伝子の転写制御が開始されるまでの時間は遺伝子によって異なり、p h y 遺伝子は 5 分以内に転写が抑制され、c a b 遺伝子は転写の誘導までに 30 分のタイムラグがあることが明らかになっている (Lissemore and Quail 1988)。また c a b 遺伝子と r b c S 遺伝子の発現誘導に必要な赤色光の強さが違うことがわかっている (Kaufman et al. 1984, Kaufman et al. 1985)。これらのことから、フィトクロームから遺伝子の発現制御までのシグナルの伝達系の一部が遺伝子により異なっていると考えられる。

このフィトクロームから遺伝子の発現制御までのシグナルの伝達系に葉緑体が関与している証拠がいくつかしめされている。カロチノイドが欠如している変異体や除草剤 (norflurazon) を用いて、葉緑体に光酸化による傷害を与えたときに、c a b 遺伝子や r b c S 遺伝子の発現は阻害される (Mayfield and Taylor 1984, Batschauer et al. 1986, Mayfield and Taylor 1987, Burgess and Taylor 1988)。また葉緑体の転写活性を薬剤 (tagetitoxin) により阻害すると c a b 遺伝子や r b c S 遺伝子の発現が阻害される (Rapp and Mullet 1991)。これらのことから葉緑体から生じる何らかのシグナルが c a b 遺伝子や r b c S 遺伝子の転写制御に関与していると考えられている (Mohr 1988, Taylor 1989)。

ポリペプチドをコードする構造遺伝子領域の 5' 上流域はプロモーターと呼ばれ、遺伝子の転写制御に関与する (RNA ポリメラーゼの結合領域をプロモーターということがあるが、ここでは RNA ポリメラーゼの結合領域を含め、遺伝子の転写制御に関与する 5' 上流域を広く指してプロモーターという)。双子葉植物の根頭癌腫病菌、アグロバクテリウム (Agrobacterium tumefaciens) の Ti プラスミドを利用した植物の形質転換系が確立したことにより、個々の遺伝子のプ

ロモーター領域の解析が可能になった。タバコ形質転換体を用いた実験で、エンドウ (*Pisum sativum*) の *c a b* 遺伝子 (A B 8 0) は、遺伝子のプロモーター領域にある 247 bp (転写開始点から -100 ~ -347) の塩基配列中に光発現制御、組織特異的発現制御に関わる領域が存在することが明らかになった (Simpson *et al.* 1986a)。コムギ (*Triticum aestivum*) の *c a b-1* 遺伝子は同様に 268 bp (転写開始点から -89 ~ -357) に光発現制御に関わる領域が存在する (Nagy *et al.* 1987)。タバコ (*Nicotiana plumbaginifolia*) の *c a b-E* 遺伝子の場合、転写開始点から -186 から -396 bp の領域に光発現誘導に関与する領域があるが、これより上流の 2 カ所にも光発現誘導、さらに 1 カ所には光発現抑制に関与する領域がある (Castresana *et al.* 1988)。

現在のところ光合成系遺伝子のプロモーターによる転写制御は、他の真核生物遺伝子と同様に、プロモーターの特定の塩基配列 (シス・エレメント) に、特異的な転写制御因子 (トランス・ファクター) が結合することによりおこなわれると考えられている (Kuhlmeier *et al.* 1987, Gilmartin *et al.* 1990, Thompson and White 1991, 篠崎 1991)。トランス・ファクターの同定は *r b c S* 遺伝子で進んでおり、いくつかのトランス・ファクターはすでに c D N A がクローニングされている (Gilmartin *et al.* 1990)。しかし遺伝子の光発現制御の中心的役割を果たすと証明されたトランス・ファクターはなく、今後は *in vitro* での転写制御の実験を中心に、光発現制御機構の解明がおこなわれてゆくと思われる。

#### <暗黒下でのクロロフィルの生合成>

クロロフィルの生合成の反応系には光を必要とするステップがあり、被子植物は暗黒下で発芽させた芽生えにはクロロフィルがみられない、しかし以下に示すように針葉樹の芽生えは暗黒下で緑化することが古くから知られている。

針葉樹とそれより下等な植物のなかには暗黒下で緑化するものがあることは、

Sachs によって 1859 年にすでに指摘されている。Burgerstein (1900) は針葉樹類 (Coniferopsida) 26 属 76 種について暗黒下での子葉の緑化をしらべたが、Larix をのぞいてすべて緑化すること確かめている。その後、針葉樹の暗所の子葉に明らかにクロロフィルの蓄積があることがしめされた (Bogorad 1950, Bogdanović 1973)。

暗所で緑化している針葉樹の子葉の色素体は、被子植物の明所下での葉緑体と暗所下でのエチオプラストの中間的な形態をしめすものに発達している。プロラメラボディは残存しているが、そこからチラコイド膜が展開しており、グラナのスタッキングがみられる (Kawamatsu 1967, Nikolić and Bogdanović 1972, Michel-Wolwertz and Bronchart 1974)。ドイツウヒ (Picea abies) の暗所子葉の葉緑体には光化学系 I、II の粒子がともに存在していることが確認された (Oku and Tomita 1976)。

針葉樹類のほかにはコケ類 (Bryophytina)、シダ類 (Pteropsida) でも暗黒下での緑化の現象が観察されている (Bittner 1905, Stahl 1909, Benecke and Jost 1924)。したがって被子植物類は暗黒下でのクロロフィル合成機構を抑制する方向に進化してきたと考えられる。この点に注目し、形態的に針葉樹類と被子植物類の中間に位置付けられるマオウ類 (Chlamidospermopsida) の芽生えを材料に、暗黒下での緑化を調べた例がある。Ephedra altissima は暗黒下でも光がある場合と同じ程度まで緑化し (Burgerstein 1900)、同様に Ephedra twediana は暗黒下でもクロロフィルが合成される (Laudi and Medeghini-Bonatti 1973)。これに対し Welwitschia mirabilis と Gnetum montana ではクロロフィルが合成されない (Laudi and Medeghini-Bonatti 1973)。Ephedra は針葉樹類に近い形態的特徴を多くもっており、Welwitschia と Gnetum は逆に被子植物類に近いとされている。

しかし暗黒下でのクロロフィルの合成機構がない、あるいは抑えられている種



群が下等植物にも存在する。維管束植物のうち古くに系統が分化したイワヒバ類 (Glossopsida) では Selaginella, Isoetes が暗黒下でクロロフィルを合成する (Stahl 1909) が、同様に古くに分化したトクサ類 (Sphenopsida) の Equisetum は合成しない (Benecke and Jost 1924)。

また針葉樹類と同じ裸子植物である、ソテツ類 (Cycadopsida) の Cycas や Zamia, イチョウ (Ginkgo biloba) は、暗黒下ではクロロフィルが合成されない (Burgerstein 1900)。針葉樹類でも暗黒下でクロロフィルを合成しないものがある。Larix は暗黒下で発芽させた場合、一次胚乳 (primary endosperm, female gametophyte) が子葉から離れていない初期の段階では緑化しているが、子葉が展開するとクロロフィルがなくなってしまう。この時の色素体を観察すると、大きなプロラメラボディがあり、グラナの発達が見られず、典型的なエチオプラストの構造をしめしている (Laudi and Medeghini-Bonatti 1975)。

クロロフィルの生合成経路のうち、プロトクロロフィリドの還元によりクロロフィリドが生成する過程で光が必要である。この過程は  $\text{NADPH}$  を基質とするレダクターゼ (NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase, EC 1.6.99.1) による反応である (Castelfranco and Beale 1981)。欧州アカマツ (Pinus sylvestris) (Selstam and Widell 1986) や Pinus pinea (Ou et al. 1990) の暗所芽生えの子葉には被子植物と同じ光依存性の  $\text{NADPH}$ -プロトクロロフィリド・レダクターゼが存在する。暗所でのクロロフィルの生合成経路では、明所での光依存性のプロトクロロフィリド・レダクターゼによる反応系と異なる反応系を利用しており、針葉樹は2つの反応系を使い分けられていると考えられる。

#### <本研究の目的と概要>

他の針葉樹と同じくクロマツ (Pinus thunbergii) の芽生えの子葉も暗所で緑化する (Yamamoto et al. 1991, Mukai et al. 1991) (図1)。播種から2週間



後の芽生えでは、暗所の子葉は明所の1/3程度のクロロフィルの蓄積がある。この暗所の子葉では色素体が葉緑体へと発達する途上にあり、プロラメラボディは残存するが、グラナのスタッキングもみられる(Hirose and Yamamoto 未発表)。

このクロマツの暗所芽生えの子葉からCABタンパク質のcDNAがクローニングされている(Yamamoto *et al.* 1988)。このcDNAを用いたノーザンハイブリダイゼーションにより、暗所芽生えでも明所芽生えとほぼ同程度のCABタンパク質のmRNAの蓄積があることがしめされた(Yamamoto *et al.* 1991)。

この暗所芽生えではCABタンパク質、RuBisCOの小サブユニット、大サブユニットの蓄積が認められる(Yamamoto *et al.* 1991, Mukai *et al.* 1991)。

このようにクロマツでは他の針葉樹と同様に、暗黒下でも子葉が緑化し、光合成系の遺伝子の発現がおこっている。本研究は、クロマツのcab遺伝子の暗黒下での発現機構を明らかにし、被子植物と比較することによりcab遺伝子の光発現制御機構を解明することを目的とする。

第II章ではクロマツcab遺伝子の構造について解析した。遺伝子の発現制御に関しては遺伝子の上流域にあるプロモーターが重要な役割を果たす。まずプロモーターの構造を明らかにするためにクロマツcab遺伝子のクローニングをおこなった。クロマツのゲノミックライブラリーをスクリーニングして得たクローンのうち、4クローンの塩基配列を決定した。被子植物のcab遺伝子には、イントロンがなく長い前駆体をコードするタイプIと、イントロンを1つもち、短い前駆体をコードするタイプIIの2つのタイプがあることがわかっている。塩基配列を決定したうちの1クローン(cab-6)は、塩基配列のホモロジーおよびイントロンを1つもつことからタイプIIの遺伝子であることがわかった。これは針葉樹のcab遺伝子の構造が明らかになった最初の例である。

ほかの3クローン(cab-1, cab-3, cab-4)の構造遺伝子領域

の配列は c a b-6 の配列と非常にホモロジーが高いが、c a b-6 と同じ位置にはイントロンが存在しない。また C 末端のアミノ酸 19 残基の部分で、これら 3 遺伝子と c a b-6 とのホモロジーが非常に低く、またそのままのフレームでは適当な翻訳終<sup>止</sup>コドンが見つからない。これら 3 クローンはこれまでに報告されている c a b 遺伝子とは異なるものであることがわかった。

構造遺伝子領域のすべての塩基配列がわかっている c a b-6 遺伝子を材料にして分子進化学的解析をおこなったところ、被子植物と裸子植物の分岐以前に c a b 遺伝子内でのタイプ I とタイプ II の分化がおこっていることがわかった。被子植物ではタイプ I, II とともに光発現制御を受けることから、それぞれのタイプの遺伝子が、被子植物と裸子植物の分岐後に光発現制御機構を獲得してきたと考えられる。

クロマツ c a b 遺伝子の明・暗所芽生えでの転写産物の蓄積量を調べたところ、c a b-6 遺伝子については明・暗所の芽生えの子葉とともに mRNA の蓄積が認められ、暗所子葉での発現レベルは非常に高かった。クロマツは、暗所芽生えの子葉において明所と同程度の c a b 遺伝子の mRNA の蓄積を持つが、この結果より c a b-6 遺伝子は暗所でも発現するクロマツ c a b 遺伝子の特性を有していることがわかった。また c a b-1, 3, 4 遺伝子の発現は明・暗所の子葉でともにみられなかった。

クロマツの c a b 遺伝子はすべて暗所で発現するのか、あるいは特定の遺伝子が暗所で発現し、残りの遺伝子の発現は光誘導されるのかは、すべての c a b 遺伝子をクローニングすることができなかったため、わからなかった。しかし少なくとも c a b-6 遺伝子は暗所で強く発現することが明らかになり、c a b-6 遺伝子を用いて、クロマツ c a b 遺伝子の暗所発現の機構を探ることができる。

第 III 章ではクロマツ c a b-6 遺伝子の形質転換タバコ内での発現について解析した。被子植物の c a b 遺伝子の転写制御は、プロモーターが主としてその役

制を担っていると考えられる。クロマツの c a b 遺伝子についても同様のプロモーターによる転写制御が考えられる。プロモーターによる遺伝子の転写制御機構を明らかにするために、クロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子をつないだキメラ遺伝子をタバコに導入し、レポーター遺伝子の発現をモニターすることによって調べた。被子植物であるタバコでは、タバコ自身の c a b 遺伝子は光照射により発現が誘導される。しかしクロマツの c a b-6 遺伝子のプロモーターは、黄化したタバコの子葉においても遺伝子の発現を誘導した。つまり細胞側の環境にかかわらず、クロマツの c a b-6 遺伝子のプロモーターは暗黒下での遺伝子の発現を誘導することがわかった。

クロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターのタバコ形質転換体内での器官別の発現制御様式を調べると、葉や茎で特異的に発現を誘導し、根や花では発現を誘導しないことがわかった。これは被子植物 c a b 遺伝子の発現制御様式と同じであり、クロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターは被子植物の細胞内においても器官特異的な発現をしめすことがわかった。単子葉類と双子葉類の間でも器官特異的な発現制御機構が共通であることを考え合わせると、器官特異的な発現制御機構が高等植物の間で保存されていると考えられる。クロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターがタバコ形質転換体内で器官特異的な発現制御をしめし、しかも葉緑体の発達していない暗黒下の黄化子葉でも発現を誘導することから、光発現制御と組織特異的な発現制御に関与する細胞側の因子は別のものであると考えられる。

第IV章では本研究によって得られた結果をもとに、c a b 遺伝子の光発現制御機構について考察した。被子植物の c a b 遺伝子の光発現制御は、暗黒下で抑制的に働く細胞側の転写制御因子と遺伝子のプロモーターの相互作用によっておこなわれており、クロマツの c a b-6 遺伝子のプロモーターにはこの転写制御因子と相互作用をしめす領域が存在しないため、暗黒下で発現が抑制されないと推定した。

本研究は、裸子植物の遺伝子が被子植物に組み込まれ、その発現が確認された最初の例である。形質転換体での発現レベルは、もとの植物内での発現レベルに比べ、低くなる例が多いが、クロマツ c a b-6 遺伝子は形質転換タバコ内でも非常に強い発現をしめた。この結果は、c a b 遺伝子の発現に関与する装置の共通性が非常に高いことをしめしている。本研究により、クロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターは、暗黒下でも光照射下と同レベルの強い発現を誘導し、しかも葉などの器官で特異的に発現を誘導することが明らかになった。遺伝子導入による植物の育種をおこなう際に、特異的な発現制御をおこなうプロモーターとしてクロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターが有用であることがわかった。

## II クロマツのクロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子の構造と発現

### 1. はじめに

光化学系IIの集光性クロロフィル・タンパク質複合体は、チラコイド膜上の主要な要素であり、光合成の反応中心に光エネルギーを伝えるための光受容体としての機能 (Thornber 1986, Anderson 1986, Glazer and Melis 1987) とグラナ構造をささえる機能 (Mullet 1983) を持っている。この複合体を構成しているポリペプチドがクロロフィル a/b 結合タンパク質で、この遺伝子 (c a b) は細胞核ゲノムに多重遺伝子族としてコードされている (Coruzii *et al.* 1983, Dunsmuir *et al.* 1983, Karlin-Neumann *et al.* 1985, Pichersky *et al.* 1985)。被子植物では c a b 遺伝子は緑色組織でのみ発現し、黄化組織では c a b 遺伝子の mRNA はほとんどみられない (Apel and Kloppstech 1978, Karlin-Neumann *et al.* 1988)。また c a b 遺伝子の光発現はフィトクロームによって制御される (Apel 1979, Tobin 1981)。

クロマツの芽生えの子葉は暗所で緑化する。この暗所子葉では c a b 遺伝子が発現し、その mRNA の蓄積は明所子葉と同程度である (Yamamoto *et al.* 1991)。クロマツ c a b 遺伝子の構造と発現の特異性を明らかにするため、本章では、以下の手順でクロマツの c a b 遺伝子を単離し、その構造を明らかにした。

クロマツの種子胚からDNAを抽出し、これを材料にDNAライブラリーを作成した。DNAライブラリーをクロマツ c a b 遺伝子の cDNA クローンでスクリーニングし、いくつかのクローンを得た。このうちの4クローンの塩基配列を決定した。

また個々の c a b 遺伝子の暗黒下での発現を、暗所子葉から抽出したRNAを

用いたノーザン・ハイブリダイゼーション，トランスクリプト・マッピングにより解析した．さらにその塩基配列やアミノ酸配列を用いて分子進化学的解析をおこない，クロマツ c a b 遺伝子の位置づけをおこなった．

その結果，単離された遺伝子のうちの1つ (c a b - 6) が暗所の子葉で発現することが確認できた．クロマツ c a b 遺伝子は全体としては暗黒下で発現するが，個々の遺伝子の発現はこれまでわからなかった．本研究の結果から少なくとも c a b - 6 遺伝子は暗黒下での発現をしめすことが明らかとなり，クロマツ c a b 遺伝子の暗黒下での発現機構を解析する材料として c a b - 6 遺伝子を用いることができることがわかった．



## 2. 材料と方法

### <植物材料>

材料のクロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) の種子は、茨城県林業試験場クロマツ精英樹採種圃の多賀1号より採取した。DNA抽出には、0.7%の寒天シャーレ上で一晚吸水させた種子を用いた。RNA抽出には、0.7%寒天上で、25℃、暗黒下または蛍光灯下 (400-700 nm で  $190 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ) で発芽させた14日目の芽生えの子葉を用いた。

### <クロマツの核DNAの抽出>

DNAライブラリー作成のための核DNAの抽出は以下のとおりおこなった。吸水させたクロマツ種子から胚を取り出し、液体窒素で凍結させた。これをホモジナイザー (Polytron, Kinematica) によって、0.3 M ショ糖、5 mM 塩化マグネシウム、0.1 M N,N-diethyldithiocarbamate ナトリウム塩を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で破砕した。破砕液をミラクロス (Calbiochem) で濾過して細胞片を取り除き、濾液を  $12,000 \times g$ , 20分間遠心分離して細胞核を沈澱させた。沈澱した細胞核を 1.5% lauryl sarcosine ナトリウム塩、20 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。細胞核が溶解した懸濁液を塩化セシウムによって比重 1.57 に調整し、臭化エチジウム (最終濃度  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え、日立 RP65 ロータで 56,000 rpm, 18時間遠心分離しDNAを精製した。

### <DNAライブラリーの作成>

核DNAを制限酵素 Sau3A で部分分解し、ショ糖密度勾配遠心により分画した。アガロースゲル電気泳動によって確認した 9 ~ 23 kbp (bp: base pair, 塩基

対)のDNAが含まれる画分をライブラリー作成に用いた。λファージの1つであるEMBL3の SmaI サイトにDNA断片を組み込み、ファージのパッケージングをおこなったのち、大腸菌 (P2392) に感染させ、DNAライブラリーを作成した。

また、これとは別のDNAライブラリーも作成した。核DNAを制限酵素 EcoRI で完全分解し、ショ糖密度勾配遠心により分画した。各画分の一部をアガロースゲル上で電気泳動し、これをニトロセルロース・メンブレンにブロットイングし、クロマツの *c a b* 遺伝子の c DNA クローン、pPDLHC2176 (Yamamoto *et al.*, 1988) のインサートをプローブとしたサザン・ハイブリダイゼーションをおこなった。これによってシグナルのあらわれた 3 - 6 kbp の画分をライブラリー作成に用いた。λファージの1つである λgt10 にDNA断片をライゲーションし、ファージのパッケージングをおこなったのち、大腸菌 (*C600*hfr<sup>-</sup>) に感染させ、DNAライブラリーを作成した。

#### < *c a b* 遺伝子のスクリーニング >

DNAライブラリーの大腸菌をLBプレート (10 g/L Bacto-tryptone, 5 g/L Bacto-yeast extract, 5 g/L NaCl, 15 g/L Bacto-agar, pH 7.5) 上に展開してブランクを形成させ、これをニトロセルロース・メンブレンにうつしとり、pPDLHC2176 のインサートをプローブとしたハイブリダイゼーションをおこなって、DNAライブラリーをスクリーニングした。

#### < *c a b* 遺伝子の塩基配列の決定 >

*c a b* 遺伝子を含むλファージのクローンのインサートを、プラスミドベクターの Bluescript KS M13<sup>+</sup> および SK M13<sup>+</sup> に再クローニングした。それぞれのクローンについて、エクソヌクレアーゼⅢを用いてディレーションをおこない、

オーバーラップした部分をもつものをクローニングした (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). 各ディレクションクローンを dideoxy chain-termination 法 (Sanger 1981) により, DNA シークエンサー (370A, Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した.

#### < c a b 遺伝子の塩基配列, アミノ酸配列の比較 >

塩基配列のデータは, パーソナルコンピュータ上で遺伝子解析用ソフトウェア (GENETYX, ソフトウェア開発) を用いて解析した. アミノ酸配列の比較およびクラスター分析は BASIC 上のプログラムを作成しておこなった.

#### < クロマツの RNA の抽出 >

ノーザン・ハイブリダイゼーションおよびトランスクリプト・マッピングの材料となる RNA を, クロマツの発芽 2 週間目の芽生えの子葉から以下の方法で抽出した. 子葉を液体窒素存在下で乳鉢と乳棒を用いて磨砕し, 植物片を抽出緩衝液 (0.1 M Tris-HCl pH 9.0, 1 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 1 % アスコルビン酸ナトリウム, 5 % メルカプトエタノール) に懸濁し, これと等量のフェノール/クロロホルム混液 (0.1 M Tris-HCl pH 9.0 飽和フェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1) を加え, よく混和したのち遠心分離して水層を回収した. さらにフェノール抽出を数回繰り返し, タンパク質を取り除いた.

回収した水層を 5.7 M 塩化セシウム溶液 (比重 1.40) に重層し, Beckman TLA-100.2 ローターで, 436,000 × g, 18 時間遠心分離し, DNA, 低分子 RNA, タンパク質をのぞき, 全 RNA を得た.

オリゴ (dT) カラム・クロマトグラフィー法で, 全 RNA よりポリ (A)<sup>+</sup> RNA を精製した (Maniatis *et al.*, 1982).

#### <ノーザン・ハイブリダイゼーション実験>

クロマツ c a b 遺伝子の明・暗所子葉での発現を調べるため、c a b 遺伝子の mRNA の蓄積量をノーザン・ハイブリダイゼーションによって調べた。

全 RNA をホルマリン・アガロースゲル電気泳動によって分画し、ナイロン・メンブレン (Gene Screen Plus, Dupont) に移した (Fourney *et al.* 1988)。ブレ・ハイブリダイゼーションの後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP でラベルした DNA プローブとハイブリダイズさせた (Maniatis *et al.* 1982)。ナイロン・メンブレンを  $2 \times \text{SSC}$  ( $\text{SSC}: 0.3 \text{ M NaCl}, 0.03 \text{ M}$  クエン酸ナトリウム,  $2 \times : 2$  倍濃度) /  $0.1 \%$  SDS 溶液中で、5 分間室温で 2 回、さらに  $0.1 \times \text{SSC}$  /  $0.1 \%$  SDS 溶液中で、20 分間  $42^\circ\text{C}$  で 2 回洗浄し、オートラジオグラフィーによってハイブリダイズしたプローブを検出した。

#### <プライマー・エクステンション実験>

プライマー・エクステンション法は、遺伝子の一部の配列 (プライマー) を mRNA とハイブリダイズさせ、逆転写酵素でプライマーを伸長させ、生じたフラグメントの長さから mRNA の長さ、すなわち転写開始点を知る方法である。プライマーを過剰量入れることにより、対応する mRNA の相対量をもとめることもこの方法で可能である。

Matsuoka and Minami (1989) の方法によって、プライマーエクステンション実験をおこなった。クロマツ c a b-6 遺伝子の翻訳開始コドンのすぐ上流の 18 残基のオリゴヌクレオチドを DNA シンセサイザー (380B, Applied Biosystems) で合成し、この 5' 末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (MEGALABEL, 宝酒造) によって  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP でラベルし、プライマーとした。

80 % ホルムアミドの存在下で、プライマー ( $1 \text{ pmol}, 9 \times 10^6 \text{ cpm}$ ) とポリ

(A)  $^3$ RNA (20  $\mu$ g) を42  $^{\circ}$ C, 4時間ハイブリダイズさせ後, 10 ユニットの逆転写酵素 (M-MuL V Reverse Transcriptase, Pharmacia) で42  $^{\circ}$ C, 1時間, プライマー伸長反応をおこなった. 反応停止後, 7 M 尿素を含む 8 % ポリアクリルアミドゲルで伸長反応産物を分画し, オートラジオグラフィーをおこなった.

#### < S1 マッピング実験 >

S1 マッピング法は, 転写開始点付近を含む遺伝子の一部の配列を mRNA とハイブリダイズさせ, S1 ヌクレアーゼで相補的でない部分の DNA を消化し, 生じたフラグメントの長さから mRNA の長さ, すなわち転写開始点を知る方法である. プライマー・エクステンション実験と同様, 対応する mRNA の相対量をもとめることもこの方法で可能である.

Lamppa *et al.* (1985a) の方法によって S1 マッピング実験をおこなった. 制限酵素によって切り出した DNA 断片の 5' 末端をアルカリフォスファターゼ (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, 宝酒造) により脱リン酸化し, T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (MEGALABEL, 宝酒造) によって [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP でラベルした. ラベルされた断片 (0.5 pmol,  $2 \times 10^6$  cpm) を 0.5 mM NaCl, 1 mM EDTA, 70 % ホルムアミドを含む 40 mM PIPES 緩衝液 (pH 6.8) 70  $\mu$ l 中で, 全 RNA (50  $\mu$ g) と42  $^{\circ}$ C, 16時間ハイブリダイズさせた. この反応液に 1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.25 mM NaCl, 250  $\mu$ g/ml サケ精子 DNA を含む 280  $\mu$ l の 30 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.6) を加え, S1 ヌクレアーゼ (340 units/ml, 宝酒造) で 37  $^{\circ}$ C, 30分間反応させた. 反応停止後, 7 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミドゲルで反応産物を分画し, オートラジオグラフィーをおこなった.



### 3. 結果と考察

#### <クロマツ c a b 遺伝子の単離>

クロマツの種子胚から 23 kbp 以上の十分に大きい分子量の核 DNA が単離された (図 2)。これを制限酵素 Sau3A で部分分解し、ショ糖密度勾配遠心によって分画した 9 - 23 kbp の DNA 分子を含む画分を DNA ライブラリーの作成に用いた。

λファージの EMBL 3 をベクターとして、 $1.3 \times 10^5$  ファージの DNA ライブラリーを得た。これをクロマツ c a b 遺伝子の c DNA クローン, pPDLHC2176 (Yamamoto *et al.* 1988) をプローブにしてスクリーニングしたところ、これと相補的な配列をもつクローンは単離できなかった。ロブロー・パイン (*Pinus taeda*) およびモントレー・パイン (*Pinus radiata*) の半数体あたりの DNA 量が 11.0 pg ときわめて大きく (Neale and Williams 1990)、おそらくクロマツもゲノムサイズが大きいと推測され、このためポジティブなクローンを得る確率が低いと考えられる。よってライブラリーの作成方法をかえて、ポジティブなクローンを得る確率をより高めることにした。

上記と同じクロマツの核 DNA を、制限酵素 EcoRI で完全分解し、ショ糖密度勾配遠心により沈降速度にしたがって、いくつかの画分にわけた。それぞれの画分の一部をアガロース電気泳動によって分離し、前述の pPDLHC2176 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。この結果、3 - 6 kbp の画分に pPDLHC2176 と相補的な DNA 分子を多く含むことがわかった。この画分を用いて λファージの λgt10 をベクターとして、 $1.0 \times 10^5$  ファージのライブラリーを得た。これを前述と同様に pPDLHC2176 をプローブにしてスクリーニングしたところ、15 個のポジティブなクローンを得た。



<クロマツ c a b 遺伝子の塩基配列>

単離された15クローンのうち4つ (c a b-1, c a b-3, c a b-4, c a b-6) について塩基配列を決定した (図3: c a b-1, 図4: c a b-3, 図5: c a b-4, 図6: c a b-6). これらの配列をクロマツの c a b 遺伝子の cDNA クローン, pPDLHC2176 の配列と比較すると, 非常にホモロジーの高い部分がある (図7). pPDLHC2176 の配列を参考にしてアミノ酸配列への翻訳を試みると, c a b-6 は翻訳開始点から 150 残基目の G から 271 残基目の G までの 122 bp のイントロンを含むことがわかる (図6). c a b-1, c a b-3, c a b-4 はこの位置にイントロンはない (図3, 4, 5).

塩基配列を決定していない11クローンについて, 制限酵素地図, 5' 上流域の非構造遺伝子領域を用いたサザン・ハイブリダイゼーションなどにより, c a b-1, 3, 4, 6 と同じクローンがあるかどうかを調べた (データにしまさず). この結果 c a b-1 と同じ遺伝子と同定されたものが4クローン, c a b-3 と同じ遺伝子と同定されたものが1クローンあった. ほかの6クローンはこの4遺伝子とは異なるものであった.

種子植物の光化学系IIの c a b 遺伝子にはタイプIとタイプIIの2つのタイプがある. タイプIはイントロンがなく長い前駆体をコードするが, タイプIIはイントロンを1つもち, 短い前駆体をコードする (Buetow *et al.*, 1988, Chitnis and Thornber 1988). c a b-6 はイントロンを1つもつことからタイプIIの遺伝子であると考えられる. c a b-6 はアミノ酸配列に翻訳すると 266 残基をコードしており, 推定分子量は 28.7 kDa である.

c a b-1, c a b-3, c a b-4 は翻訳開始点から下流の配列が互いによく似ており, c a b-6 と同じ位置にはイントロンが存在しない (図7). ところがこれら3遺伝子の構造遺伝子領域の配列は pPDLHC2176 や c a b-6 の配列と非常にホモロジーが高く, この点だけをみればタイプIIの遺伝子であるといえ

る。また、3' 下流側、C末端のアミノ酸 19 残基の部分で、これら3遺伝子と pPDLHC2176 や c a b-6 とのホモロジーが非常に低く、またそのままのフレームでは適当な翻訳終始コドンが見つからない。ホモロジーのなくなる部分にイントロン開始点の共通配列の"GT"がみられ、3遺伝子ともここでイントロンが始まっている可能性がある。すでに知られている c a b 遺伝子にはこの部分にイントロンが挿入されているものはなく、いままで知られていないタイプの c a b 遺伝子である可能性がある。この部分から3' 下流 348 bp に EcoRI の認識部位があり、これより下流側はクローニングできなかった。この部分がイントロンであることを証明し、これら3遺伝子が新しいタイプの c a b 遺伝子であることを明らかにするには、アミノ酸 19 残基に相当する部分のクローニングが必要である。

#### <他植物の c a b 遺伝子との比較>

被子植物のタイプIとタイプIIの c a b 遺伝子は、イントロンの存在だけでなく、トランジット・ペプチドと成熟タンパク質のN末端側の配列にも違いがある。アミノ酸配列に置き換えて比べてみると、明らかに種を越えたタイプ間の違いがみられる(図8)。クロマツの c a b 遺伝子の構造を他の植物の c a b 遺伝子の構造と比較すると、タイプIIの c a b 遺伝子と非常に高いホモロジーをしめすことがわかる(図8)。クロマツ c a b-6 遺伝子は被子植物のタイプIIの c a b 遺伝子と同じ位置にイントロンをもつことから明らかにタイプII遺伝子である。クロマツ c a b-1, 3, 4 遺伝子も被子植物のタイプII遺伝子とホモロジーが高い。

クロマツと同じマツ属の欧州アカマツ (Pinus sylvestris) について3つの cDNA の構造が報告され、このうちの1つがタイプII遺伝子とされている(Jansson and Gustafsson 1990)。これは不完全鎖長の cDNA 配列からの推定

でイントロンの存在が明らかでないが、クロマツの c a b-6 の構造にきわめて似ている (図 8)。

＜分子進化学的解析によるクロマツ c a b 遺伝子の位置づけ＞

c a b 遺伝子は、多くの種でその塩基配列が明らかになっている。そのため塩基配列の類似度を用いて分子進化学的解析をおこなうことが可能である。ここでは系統樹を用いた解析をおこなうが、これは c a b 遺伝子の関係をしめす遺伝子系統樹で、必ずしも種の系統的關係をあらわしてはいない。

まず構造遺伝子領域が完全に明らかになっている c a b 遺伝子の DNA 配列あるいはその mRNA の cDNA 配列を比較した。タイプ I と II、種子植物と下等植物の c a b 遺伝子間では、N 末端部分 (5' 側上流部分) のホモロジーが低く、また挿入、欠失により長さに違いがあり、そのままでは類似度の計算ができなかった。そこで適宜ブランクを挿入し配列の長さをそろえてアラインメントをおこなったが、この際に塩基配列では操作が煩雑になりアラインメントが困難であるので、翻訳されたアミノ酸配列をもちいて比較をおこなった (図 9)。アミノ酸配列相互の置換率を計算し、クラスター分析をおこなうための非類似度行列を作成した (表 1)。クラスター分析の方法は、系統樹の各枝での進化速度が一定であると仮定する、もっとも単純な非加重結合法 (UPGMA, Unweighted Pair Grouping Method of Analysis) (根井 1990) を用いた。

得られた c a b 遺伝子の系統樹を図 10 にしめす。藻類の c a b 遺伝子とそれ以外のコケ、シダ、種子植物の c a b 遺伝子とが最初に別々の枝に分岐している (アミノ酸置換率 35.7%)。つぎにイントロンをもつ遺伝子 (コケ、シダの遺伝子および種子植物のタイプ II 遺伝子) とイントロンをもたない遺伝子 (種子植物のタイプ I 遺伝子) とが分岐している (置換率 27.0%)。これは種子植物でのタイプ I とタイプ II との分岐が、単子葉類と双子葉類あるいは裸子植物と被子植物

との分岐よりも前におこっていることをしめしており (Matsuoka 1990), タイプ I・II が並列に存在し独自に進化していることがわかった。コケ、シダの c a b 遺伝子はタイプ I よりもタイプ II のクラスターに近いが、これらの種がこれとは別にタイプ I の遺伝子を持つかどうかは明らかになっていない。

タイプ I のクラスターをみると裸子植物と被子植物の遺伝子間で大きな違いがあり (置換率 23.3 %), 互いの分岐が明らかであるが、タイプ II のクラスター内では遺伝子間の差異は少なく (クロマツと Lemna で置換率 12.0 %), 分岐がはっきりしていない。これはタイプ I とタイプ II に分化してからの分子進化の過程が異なっていることを示唆している。

またタイプ I, II とともに単子葉類、双子葉類の遺伝子ごとにクラスターはできておらず、種の系統的關係とは異なった系統樹になっている。そこで塩基置換率をもとにしても同じ結果が得られるかどうかをタイプ II の c a b 遺伝子だけを対象に検討した。タイプ II 相互では挿入、欠失の頻度が少なく、塩基置換率を計算することができる。塩基置換率は GENETYX の解析プログラム, “核酸のキャップを考慮したホモロジー” を用いてもとめた。アミノ酸置換率をもちいて UPGMA による分析をおこなった場合、双子葉類 (トマト, ペチュニア, エンドウ) の遺伝子は 1 つのクラスターをつくるが、単子葉類 (Lemna, イネ) の遺伝子はクラスターをつくらない (図 11 b)。ところが塩基置換率をもちいて同様の分析をおこなった場合、単子葉類の遺伝子もクラスターをつくる (図 11 a)。この場合クロマツの c a b 遺伝子 (c a b-6) は双子葉類よりも単子葉類の遺伝子に近い。塩基置換率を用いた場合、双子葉類と単子葉類の分岐後にクロマツが分岐したことになるが、種の系統的關係をある程度反映した遺伝子系統樹が得られた。アミノ酸置換率を用いた場合と塩基置換率を用いた場合での結果の違いは、アミノ酸翻訳に影響を及ぼさないサイレントな塩基置換の発生率に起因すると考えられる。

＜暗所芽生えと明所芽生えでのクロマツ c a b 遺伝子の発現量＞

クロマツ c a b 遺伝子は全体では暗所芽生えで強く発現しているが、個々の c a b 遺伝子がすべて暗所芽生えで発現するかどうかはわかっていない。そこで c a b - 1, 3, 4, 6 遺伝子の暗所芽生えでの発現をノーザン・ハイブリダイゼーション実験によって調べた。図 1 2 の制限酵素地図上にしめすように、各遺伝子のホモロジーが低い 5' 側の部分 (c a b - 1 : HindIII - HincII fragment 251 bp, c a b - 3 : HindIII - HincII fragment 717 bp, c a b - 4 : HindIII - HindIII fragment 662 bp, c a b - 6 : PstI - HindIII fragment 442 bp) をそれぞれの遺伝子に特異的なプローブとして用いた。それぞれのプローブは互いにハイブリダイズしないことはたしかめている（データにしめさず）。対照としてクロマツ c a b 遺伝子の cDNA クローン, pPDLHC2176 をプローブとして c a b 遺伝子の mRNA の全量を調べた。

暗所で発芽させた 1 4 日目の芽生えの子葉では、明所で生育させた子葉の 50 % 程度の c a b 遺伝子の mRNA の蓄積があった（図 1 3 : レーン 1, 2, 表 3）。c a b - 1, 3, 4 遺伝子の特異的プローブを用いて同じ全 RNA とのノーザン・ハイブリダイゼーション実験をおこなった結果、明所・暗所ともにこれらの遺伝子に対応する mRNA の蓄積はみられなかった（図 1 3 : レーン 3-8）。

c a b - 6 遺伝子については明・暗所ともに mRNA の蓄積が認められ、明所に対する暗所の mRNA の割合が約 80 % であった（図 1 3 : レーン 9, 10, 表 3）。

クロマツは、暗所芽生えの子葉において明所と同程度の c a b 遺伝子の mRNA の蓄積を持つ（Yamamoto *et al.*, 1991）。ノーザン・ハイブリダイゼーション実験の結果より c a b - 6 遺伝子は暗所でも発現するクロマツ c a b 遺伝子の特性を有していることがわかる。c a b - 1, 3, 4 遺伝子は明・暗所の子葉で発現しておらず、3' 下流部分の翻訳フレームが組めないことを考え合わせると、



偽遺伝子である可能性が高い。

S1 マッピング法は mRNA の転写開始点を決定する方法として用いられているが、ノーザン・ハイブリダイゼーション法と同様に mRNA 量を定量的にとらえることが可能である。ノーザン・ハイブリダイゼーション実験に用いたプローブと同じフラグメントの 5' 末端側を [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP でラベルし、mRNA とハイブリダイズさせ、S1 スクレアーゼで RNA-DNA ハイブリッドのできていない部分の DNA を消化した。S1 スクレアーゼは 1 本鎖 DNA を切断する酵素で、1 塩基の配列の違いでも認識して切断する。よって生じたフラグメントは RNA とまったく配列がおなじことになる。このためノーザン・ハイブリダイゼーション法よりも厳密なホモロジーが識別できる。このフラグメントをシーケンス用のゲルで分離して、長さを測り、転写開始点を推定した。

この結果、c a b-1, 3, 4 遺伝子は S1 スクレアーゼに消化されずに残ったフラグメントがなく、やはり発現していないことがわかった (図 14: レーン 1-6)。c a b-6 遺伝子の場合には明・暗所の子葉の RNA でともにバンドがあらわれた (図 14: レーン 7,8)。しかしバンドは単一でなく、さまざまな長さのフラグメントが生じた。

泳動時間を変えてもう一度 c a b-6 遺伝子について S1 マッピングをおこない、フラグメントの長さを正確にもとめた (図 15)。もっとも長いフラグメントは 102 ヌクレオチドで、90, 85 ヌクレオチドを中心にシグナルの強いフラグメントがある。さまざまな長さのフラグメントが生じた理由として、ヘテロな個体の集団から RNA を抽出したために、微少な塩基配列の変異が c a b-6 遺伝子の RNA に存在していることが考えられる。

明・暗でのシグナルの比はどのバンドでもほぼ同じで、明所に対し暗所は約 50% であった (表 3)。c a b-6 遺伝子の mRNA は暗所でも蓄積していることがわかる。なお転写開始点の推定は次節でおこなう。



プライマー・エクステンション法も転写開始点を決定する方法であるが、S1マッピング法と同様にmRNAの蓄積量を定量することができる。クロマツ c a b-6 遺伝子の翻訳開始コドンのすぐ上流の18残基のオリゴヌクレオチドの5'末端を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP でラベルし、プライマーとした。これをmRNAとハイブリダイズさせ、逆転写酵素でプライマーを伸長させ、生じたフラグメントの長さから転写開始点を推定した。プライマー・エクステンション実験には、ノーザン・ハイブリダイゼーション実験、S1マッピング実験と同じ全RNAから精製したポリ(A)<sup>+</sup>RNAを用いた。この結果、明・暗所ともに68、69ヌクレオチドの伸長したフラグメントが生じた(図16)。シグナルの強さはどちらも暗所が明所の64%である(表3)。ポリ(A)<sup>+</sup>RNA当りでもc a b-6遺伝子の暗所での蓄積が明所の半分強と非常に大きいことが確認された。

以上のノーザン・ハイブリダイゼーション、S1マッピング、プライマー・エクステンションの各実験により、c a b-6遺伝子は暗所でも強く発現することがわかった。c a b-6遺伝子は転写量も多く、暗所で発芽・生育した芽生えでも強く発現するというクロマツ c a b 遺伝子群の特性をしめす代表的な遺伝子であることが証明された。

#### <クロマツ c a b 遺伝子の転写開始点>

前節のS1マッピング(図15)およびプライマー・エクステンション(図16)の実験により、c a b-6遺伝子の転写開始点の推定をおこなうことができる。S1マッピング実験では様々な長さのフラグメントが生じたが、最長のフラグメントは102ヌクレオチドで(図15)、これは翻訳開始コドン(ATG)から数えて-68 bpにあたる(図17)。プライマー・エクステンション実験では68と69ヌクレオチドのフラグメントが生じた(図16)。これはそのままATGコドンから-68、69 bpにあたる(図17)。この2つの実験結果よ

り、c a b-6 遺伝子の転写開始点は A T G コドンより -6 8 bp の A 残基であると推定される。

転写開始点付近の塩基配列は T T C A G A A T A (最初の A が転写開始点) である (図 17)。真核生物遺伝子 (20 種) の転写開始点の共通配列は P y P y C A P y P y P y P y (A が転写開始点, P y はピリミジン塩基) であり (Corden *et al.*, 1980), 植物 c a b 遺伝子の共通配列は A T C A C C A (2 番目の A が転写開始点) であるが (Joshi 1987), ともに共通性の高いのは C A の配列 (A が転写開始点) だけである。c a b-6 の場合も C A の配列であり, この A 残基が転写開始点であるとして間違いないと考える。

#### <プロモーター領域の構造>

c a b-6 のプロモーター部分の配列を図 17 にしめす。転写開始点の 5' 側上流の, 翻訳開始コドンの A T G より数えて -100 bp に T A T A ボックスがある。これは真核生物遺伝子の転写に必要なファクターの結合領域で, 真核生物遺伝子に普遍的に存在する。また T A T A ボックスと同様に転写に関する基本的な制御をおこなう C A A T ボックスが -154 bp に存在する。

c a b-6 とその他の c a b-1, 3, 4 遺伝子のプロモーター領域を比較してみると, ホモロジーがまったくないことがわかる (図 7)。c a b-1, 3, 4 遺伝子は翻訳開始点から下流の全域で相互に 98 % の非常に高いホモロジーをしめすが, プロモーター領域ではホモロジーがないことから, 明らかに別種の遺伝子である。これら 3 遺伝子のプロモーター部分にはそれぞれ T A T A ボックス, C A A T ボックス様の配列が存在している (図 7)。

被子植物の r b c S, c a b などの光誘導型遺伝子を材料に, 転写制御に関するプロモーター領域のいくつかの配列が明らかになっている。このうち G T -1 ボックス (Green *et al.*, 1987), G ボックス (Giuliano *et al.*, 1988), 3 A

F-1ボックス (Lam *et al.*, 1990), GCボックス (Castresana *et al.*, 1988)の共通配列にホモロジーのある配列はクロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーター領域 (転写開始コドンより -2150 bp まで) には存在しなかった。GAT Aボックス (Castresana *et al.*, 1988) も c a b, r b c S 遺伝子の転写制御に関与すると考えられているが (Gilmartin *et al.*, 1990), この共通配列は GAT A と短く, c a b-6 のプロモーター領域, 翻訳開始コドンから -126, -169 bp にも見いだされる (図 17)。また AT-1 ボックス (共通配列: AATATTTT AAT) (Datta and Cashmore 1989) にホモロジーのある配列も, AT の比率が高い -700 から -1100 bp の領域に見いだされる (図 17)。

しかし転写制御に関与するいずれの共通配列についても, 異なる遺伝子間で 100 % のホモロジーをしめしているわけではなく, ホモロジーだけで転写制御に関与する領域を同定することはできない。このため次章で, c a b-6 遺伝子のプロモーター領域を利用し, クロマツ c a b 遺伝子の光による転写制御に関する解析をおこなった。

### Ⅲ クロマツのクロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子のタバコ形質転換体での発現

#### 1. はじめに

被子植物では、c a b 遺伝子の発現が光照射によって誘導され、主として転写レベルでその制御がおこなわれている (Tobin and Silverthorne 1985)。アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) の *Ti* プラスミドを利用した植物の形質転換系を用いて c a b 遺伝子の転写制御に関与するプロモーター領域の解析がおこなわれ、エンドウ (*Pisum sativum*) の *AB80* 遺伝子 (Simpson *et al.* 1986a)、コムギ (*Triticum aestivum*) の c a b-1 遺伝子 (Nagy *et al.* 1987)、タバコ (*Nicotiana plumbaginifolia*) の c a b-E 遺伝子 (Castresana *et al.* 1988) のプロモーターには光発現制御に関わる領域が存在することが明らかになった。

クロマツの c a b 遺伝子が被子植物の c a b 遺伝子と異なり、暗所の子葉において発現する理由として、2つの可能性が考えられる。1つは光制御に関与する領域がクロマツの c a b 遺伝子のプロモーターに存在せず、常に光の制御を受けずに発現するという可能性である。もう1つは、クロマツの暗所子葉ではクロロフィル合成、葉緑体の発達がみられることから、細胞の環境が被子植物の明所の子葉と同じ条件になっており、プロモーターの機能に違いがないにも関わらず、クロマツの c a b 遺伝子は暗所の子葉で発現するという可能性である。

本章ではクロマツ c a b 遺伝子の暗所発現の機構を明らかにするため、アグロバクテリウムによる植物の形質転換系を用いてタバコにクロマツの c a b 遺伝子を導入し、クロマツ c a b 遺伝子の発現を調べた。タバコの芽生えは暗黒下で黄

化し、c a b 遺伝子も光で発現が誘導され暗黒下では発現しない (Nagy et al. 1986)。このような、被子植物の c a b 遺伝子が発現しないような細胞の環境下におけるクロマツの c a b 遺伝子の発現を調べることで、前述の 2 つの可能性を検討した。

クロマツの c a b - 6 遺伝子からプロモーター部分を取り出し、レポーター遺伝子と連結させたキメラ遺伝子をバイナリー・ベクター法によりタバコに導入した。レポーター遺伝子を用いるのはクロマツ c a b - 6 遺伝子とタバコ自身の c a b 遺伝子の発現を区別するためであり、植物自身にはほとんど活性がない酵素などの遺伝子がレポーター遺伝子として用いられている。本研究では GUS ( $\beta$ -Glucuronidase) 遺伝子を用いた。

この結果、クロマツの c a b - 6 遺伝子のプロモーターは黄化したタバコの子葉細胞内でも発現を誘導することがわかった。また暗所に 2 日間おいてタバコ自身の c a b 遺伝子が発現していない状態にあるタバコの成葉中でも、クロマツ c a b - 6 遺伝子は構成的に発現していることがわかった。この結果はクロマツ c a b - 6 遺伝子のプロモーターに光発現制御に関与する領域が欠如しているために暗黒下での発現が起こることをしめしている。

またクロマツ c a b - 6 遺伝子のプロモーターはタバコ形質転換体内でも葉や茎などの器官で発現を誘導し、花や根などでは発現を誘導しないことがわかった。これは被子植物と裸子植物の間でも c a b 遺伝子の器官特異的発現制御機構の共通性が高いことを示唆している。



## 2. 材料と方法

### <形質転換ベクターの作成>

タバコの形質転換は、*Agrobacterium tumefaciens* - Ti プラスミドの形質転換系を用いたバイナリー・ベクター法によっておこなった。遺伝子の発現を調べるためのレポーター遺伝子として GUS ( $\beta$ -Glucuronidase) 遺伝子および形質転換体のスクリーニングのためのカナマイシン耐性遺伝子 (Nos プロモーター + NPTII 遺伝子 + Nos ターミネーター) をもつ pBI101 (Clonthech) を形質転換ベクターとして用いた (Jefferson *et al.*, 1987)。

形質転換ベクター pBIcab6 の作成手順のうち、クロマト c a b - 6 遺伝子のプロモーターのクローニングの手順を図 18 にしめす。c a b - 6 遺伝子の翻訳開始点付近に適当な制限酵素の認識サイトがなかったため、PCR (Polymerase chain reaction) 法により制限酵素 BamHI の認識サイトを導入した。ATG コドンから -288 bp 目の、制限酵素 EcoRV の認識サイトを含むプライマー (GCT TATTTTAAAGTGATATC, アンダーラインが EcoRV サイト) と ATG コドンの直前 -20 から -1 bp に BamHI サイトをつけたプライマー (TTC TC GTCGTCACGTTTCA CCGGATCCGG, アンダーラインが BamHI サイト) を DNA 合成機 (380B, Applied Biosystems) で合成し、PCR 法によって 330 bp のフラグメントを作った。これを EcoRV および BamHI で切断し、Bluescript KS M13<sup>+</sup> ベクターの EcoRV, BamHI サイトにクローニングした。次いでこれに ATG コドンから -1772 bp の HindIII サイトから -288 bp の EcoRV サイトまでのフラグメントをつないだ。PCR 法で合成した部分に誤りがないことをシーケンシングにより確認した。このようにして c a b - 6 のプロモーター (-1772 bp から -1 bp) を Bluescript KS M13<sup>+</sup> クローニングした。このプロモーターを HindIII と BamHI で切り出し、pBI101 の GUS 遺伝子の上流に導入

し、c a b-6 プロモーター+GUS のキメラ遺伝子をもつ形質転換ベクター、pBIcab6 をつくった (図19)。

ポジティブ・コントロールとして、光の制御を受けないカリフラワー・モザイク・ウィルスの35SプロモーターとGUSのキメラ遺伝子をもつ形質転換ベクター、pBI121を用いた(Clontech) (図19)。またネガティブ・コントロールとして、前述のプロモーターのないGUS遺伝子をもつ形質転換ベクター、pBI101を用いた (図19)。

#### <タバコの形質転換>

DNAの転移に関与する遺伝子をもったヘルパー・プラスミド pRK2013を用いたトリペアレンシャル・メイティング法により、pBIcab6 と pBI121 をそれぞれ、T-DNA領域が欠失したTiプラスミド (pAL4404) を持つアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404) に導入した (Bevan 1984)。

pBIcab6あるいはpBI121が導入されたアグロバクテリウムをカナマイシンによりスクリーニングし、いくつかのクローンを単離した。このクローンからプラスミドDNAを抽出し、GUS遺伝子部分をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより導入を確認した (図20)。

タバコの形質転換はリーフディスク法によりおこなった (Draper *et al.* 1988)。タバコ (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) のリーフディスクをアグロバクテリウムの菌液と共存培養し、植物ホルモンとしてBAP (6-benzylamino purine) を 1 mg/ml, NAA (Alpha-naphthalene acetic acid) を 0.1 mg/ml 含むMS培地 (Murashige and Skoog 1962) に置いてアグロバクテリウムを感染させた。1週間後にリーフディスクをカナマイシンの選択培地 (上記の培地にカナマイシン硫酸塩 (100 µg/ml), クラフォラン (500 µg/ml) を加えたもの) におき、形質転換されたカルスを選抜した。この培地の植物ホルモンはシュートの分化に適

した濃度条件になっている。培地を1週間おきに換えながら、シュートを分化させた。生じたシュートを順次ホルモンフリーのMS培地（カナマイシン硫酸塩 100  $\mu\text{g/ml}$  を含む）に移して発根を誘導し、植物体を再生させた。

#### <タバコ形質転換体の育成>

再生した個体をパーミキュライトのポットに植え、インキュベーター内で順化させた。これを形質転換第1世代という意味でT1世代とする。インキュベーター内の環境条件は、16時間日長、光強度 250  $\mu\text{mol/m}^2/\text{sec}$  (400 - 700 nm)、気温 28 - 25  $^{\circ}\text{C}$  変温である。すべての個体について、順化後、葉が5~6枚展開した時点で成熟葉の一部を切り取り、GUS活性を定量して相対的な発現の強さを調べた。

葉が5~6枚展開したT1世代の個体を、短日条件（10時間日長）にうつし、花芽分化を誘導した。開花後、導入遺伝子の器官特異的発現様式を調べるために、一部の個体を器官別のGUS活性の定量に用いた。

T1世代の自家受粉により形質転換第2世代（T2世代）の種子を得た。このときに一部不稔の個体があった。

暗黒下の黄化組織における c a b-6 プロモーターの発現様式を調べるために次のような実験をおこなった。T2世代の種子を次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌処理した後、シャーレの1/2 MS寒天培地に蒔き、暗所で1週間発芽させた。これを安全光下で子葉、胚軸、幼根別に採取したもの、これをインキュベーターに移し光を一定時間あてたのちに採取したものをそれぞれ30個体以上をまとめてGUS活性を定量した。

#### <GUS活性の定量>

各組織を 100 mg あたり 1 ml の抽出緩衝液（50 mM リン酸ナトリウム、pH

7.0, 10 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % lauryl sarcosine ナトリウム塩, 10 mM メルカプトエタノール) 中で磨砕し, 10000 × g で10分間遠心分離して, 上清をGUS活性の定量まで -80 °C で保存した。

GUSの活性は, 4-methyl umbelliferyl glucuronide (MUG) の分解によって生じる 4-methyl umbelliferone (4-MU) の蛍光発色により定量した (Jefferson *et al.*, 1987)。1 mM のMUGを含む抽出緩衝液 0.2 ml に, 抽出液 5  $\mu$ l を加え, 37 °C で30分間反応させ, 0.2 M 炭酸ナトリウムを 0.8 ml 加えて反応を停止させた。この反応液の 365 nm の励起光に対する 455 nm の蛍光を蛍光分光光度計で測定し, 生成した4-MUをもとめた。抽出液のタンパク質量をブラッドフォード法 (Bradford 1976) により定量し, 1 mg タンパク質あたり, 反応時間1分間あたりの生成された4-MU量でGUSの活性をあらわした。

#### < GUS活性の組織化学的検出 >

高さ30 cm程度に成長したT2世代の一部の個体をGUSの組織化学的検出のための材料とした。

組織の切片あるいは組織そのままを, 1 mM の X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide) を基質として含む 50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中に浸し, 1晩, 37 °C で反応をおこない, GUS活性の分布を組織化学的に調べた (Jefferson *et al.*, 1987)。緑色組織の場合には脱色のため, 70 % エタノールでクロロフィルを除いた。

#### < ノーザン・ハイブリダイゼーション実験 >

上記の順化時と同じ環境条件下で高さ30 cm程度に成長したT2世代の個体をポットごと暗室に移し, 2日後 (48時間後) に葉を採取し, 液体窒素で凍結

させた。同じ個体を24時間連続光下に置き、葉を採取し、液体窒素で凍結させた。これらの葉からRNAを抽出した。このRNAを用いてノーザン・ハイブリダイゼーション実験をおこなった。

ノーザンハイブリダイゼーション実験は前章と同じ方法でおこなった。プローブはGUSの構造遺伝子領域(pB1221 (clonthech)のBamHI-EcoRI断片)とナシ(長十郎)のc a b 遺伝子のcDNAクローン, pCholHC5144 (Kano-Murakami et al., 未発表)を用いた。



### 3. 結果と考察

#### <クロマツ c a b 遺伝子のタバコ形質転換体内での発現>

これまでに針葉樹（裸子植物）の遺伝子が被子植物に導入された例はなく、まず針葉樹のプロモーターが被子植物であるタバコの細胞内で機能することを確認する必要がある。培養ビン内で発根させた形質転換当代（T1世代）の葉を1枚ずつ取り、GUS活性を定量した。その結果、多くの個体でGUS活性がみられた（データにしめさず）。よって、タバコの細胞内でもクロマツ c a b - 6 遺伝子のプロモーターが機能していることがわかった。

つぎにこの再生した植物体をポットに植えて順化させたのち、通常的环境制御条件下で育てたタバコ形質転換体を用い、成熟葉のGUS活性を定量した。この結果、タバコ形質転換体34個体中、強いGUS活性（2.0 nmol 4MU/ min/ mg protein 以上）のみられたもの22個体、弱いGUS活性（2.0 nmol 4MU/ min/ mg protein 未満）のみられたもの12個体であった（表4）。35S-GUSの形質転換体は成熟葉で0.5 nmol 4MU/ min/ mg protein 以下のGUS活性であったので（表4）、多くの形質転換体の成熟葉で c a b - 6 のプロモーターは強く発現を誘導していることがわかった。

この実験は、針葉樹のプロモーターが被子植物であるタバコの細胞内でも遺伝子の発現を誘導することをしめした最初の例である。

#### <タバコ形質転換体の子葉でのクロマツ c a b 遺伝子の暗所発現>

c a b - 6 遺伝子はクロマツの暗所芽生えの子葉でも発現していた（図13, 14, 15）。c a b - 6 遺伝子は、被子植物（タバコ）の細胞内において、タバコ自身の c a b 遺伝子と同じように暗黒下で発現が抑制されるのかどうかを、c a b - GUSのタバコ形質転換体のT2世代の芽生えを用いて調べた。

c a b - G U S 形質転換体の 1 週間目の暗所芽生えと暗所芽生えに 2 4 時間光照射した芽生えの G U S 活性を定量し比較した (表 5) . 対照として, 3 5 S - G U S 形質転換体の芽生えを用いた. カリフラワー・モザイク・ウィルスの 3 5 S プロモーターは光とは関係なく構成的に発現を誘導するプロモーターである.

c a b - G U S の形質転換体の種子中では 30-150 pmol 4MU/ min/ mg protein の G U S 活性が確認できるが, 1 週間暗所で発芽させた芽生えの黄化子葉では 270-1700 pmol 4MU/ min/ mg protein と G U S の活性が明らかに増加している. また黄化している芽生えに光をあてるとすぐに子葉は緑色に変化し始め, 2 4 時間で緑色になるが, この時の子葉の G U S 活性は 600-1700 pmol 4MU/ min/ mg protein であり, 光照射による明らかな発現の誘導はおこっていない. 対照とした 3 5 S - G U S 形質転換体の黄化した子葉での G U S 活性は 550 pmol 4MU/ min/ mg protein で, これと比べてみると c a b - G U S 形質転換体の暗所子葉での G U S の発現量は非常に高いといえる.

光による発現の誘導を確認するため, 光照射中の G U S 活性の時間的変化をしらべた (図 2 6) . 光照射後に徐々に G U S 活性が増加するものがある (No. 5, 7) . しかし多くは一定の増加傾向をしめさず, G U S 活性が減少する場合もみられる. よってタバコ形質転換体においてクロマツ c a b - 6 遺伝子のプロモーターは, 光照射による明らかな発現の誘導をしめさないといえる.

以上の結果から, クロマツの c a b - 6 遺伝子のプロモーターはタバコの黄化した子葉細胞内でも発現を誘導すること, また光照射による明らかな発現誘導はしめさないことがわかった. そのプロモーターの活性はカリフラワー・モザイク・ウィルスの 3 5 S プロモーターと同程度かそれよりも強い. よってクロマツ c a b 遺伝子の暗黒下での発現は, 暗黒下で緑化するクロマツ子葉細胞の特殊性ではなく, 遺伝子のプロモーターの特殊性に起因すると考えられる.

＜タバコ形質転換体の成葉でのクロマト c a b 遺伝子の暗所発現＞

前節の実験は芽生えの子葉を用いたものであるが、成葉での c a b-6 遺伝子のプロモーターの暗所発現についても検討した。光照射下で展開した成葉の場合、黄化組織とは異なり、すでに葉緑体が発達した組織が対象となる。被子植物の場合、光照射下から暗黒下に植物を移すと、c a b 遺伝子の発現は抑制される。予備実験では、2日間暗所にタバコを置くとタバコ自身の c a b 遺伝子の mRNA が消失した。この状態でクロマトの c a b-6 遺伝子のプロモーターが発現を誘導しているかどうかを調べた。c a b-GUS の形質転換体の成葉ではすでに GUS の蓄積が生じているので、GUS 遺伝子の構造遺伝子領域をプローブに用いたノーザン・ハイブリダイゼーションをおこない、GUS の mRNA レベルの蓄積量から発現を調べた（図 27）。このときにタバコ自身の c a b 遺伝子の発現が抑制されていることを、ナシの C A B C D N A クローン（pCholHC5144, Kano-Murakami et al. 未発表）をプローブにして同時に確かめた。対照としてプロモーターのない GUS（pBI101）、35S-GUS（pBI121）の形質転換体を用いた。

2日間の暗黒条件によって、タバコ自身の c a b 遺伝子の mRNA の蓄積はなくなった（図 27 a：レーン 1,3,5,7,9,11（D））。光を24時間照射するとまた c a b 遺伝子の mRNA の発現が誘導される（図 27 a：レーン 2,4,6,8,10,12（L））。これに対し、c a b-GUS の形質転換体での GUS 遺伝子の発現は2日間の暗黒条件では抑制されない（図 27 b：レーン 7,9,11（D））。それだけでなく全 RNA あたりの発現量では24時間の光照射後（図 27 b：レーン 8,10,12（L））よりも多くなっている。この現象は35S-GUS の形質転換体の場合にもみられる（図 27 b：レーン 3,5（D）と 4,6（L））。これは RNA の転写が光照射により活性化し、導入遺伝子の転写が相対的に低下したためと考えられる。

タバコ形質転換体の成葉で、クロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターは暗黒下での遺伝子の発現を誘導した。これは被子植物であるタバコ自身の c a b 遺伝子の光発現制御様式とは明らかに異なることがわかった。

<タバコ形質転換体でのクロマツ c a b 遺伝子の器官特異的発現制御>

被子植物の c a b 遺伝子の発現は、葉などの光合成器官に限定されている (Lamppa *et al.* 1985b, Piechulla *et al.* 1986)。この器官特異的発現様式は異種植物のタバコに導入されても保持される (Lamppa *et al.* 1985b, Simpson *et al.* 1986b)。これまでの結果から、クロマツの c a b-6 遺伝子は暗所発現に關しタバコの細胞側の影響を受けないことが明らかになった。ここではクロマツの c a b-6 遺伝子がタバコ形質転換体内において器官特異的に遺伝子の発現を制御するかどうかを調べた。

環境条件制御下で生育、開花させた c a b-GUS 形質転換体の各器官 (葉、莖、根、花) について GUS 活性を定量した (表 6)。このときに対照として 35S-GUS の形質転換体についても同様の解析をおこなった。c a b-GUS の形質転換体では、葉で 42-83 nmol 4MU/ min/ mg protein と強い GUS 活性がみられ、莖でも 33 nmol 4MU/ min/ mg protein と強い活性がみられた。これに対し根では 3.0 nmol 4MU/ min/ mg protein、花では 1.3 nmol 4MU/ min/ mg protein と GUS 活性が低かった。35S-GUS の形質転換体では、葉に比べて莖、根、花で高い GUS 活性をしめしているが、これは 35S のプロモーターも発現制御の器官特異性を持っているためと考えられる (Benfey *et al.* 1989)。35S-GUS の形質転換体と比較すると、c a b-GUS の形質転換体は葉で 4-6 倍の活性を持っており、c a b-6 のプロモーターはタバコの葉の細胞内で非常に強いプロモーターとして機能していることがわかる。葉位 (葉齢) との関係についてみると、古い葉ほど GUS 活性が高いが、これは 35S-GUS の

形質転換体でもみられた。GUSの蓄積のために活性が高くなっている可能性も考えられる。

c a b-GUS形質転換体のGUS活性の器官特異性は芽生えでもしめされ、胚軸、幼根ともに子葉の10分の1以下にGUS活性が抑制されていた(表5)。

以上の結果は、c a b-6遺伝子のプロモーターがタバコ形質転換体内でも遺伝子の器官特異的な発現を制御していることをしめしている。

#### <タバコ形質転換体でのクロマト c a b 遺伝子の組織特異的発現制御>

前節では c a b-6 遺伝子のプロモーターによるタバコ形質転換体内での発現制御の器官特異性を明らかにした。ここでは発現部位をより詳細に調べるために、GUS活性の組織化学的検出を試みた(図21, 22, 23, 24, 25)。前節の実験と同様に環境制御条件下で生育させた形質転換タバコを材料に用いた。

GUS活性のある部位は青く見える。c a b-GUS形質転換体ではGUS活性が葉肉細胞で顕著にみられ、表皮細胞では活性がみられなかった(図21a)。柵状組織、海綿状組織の別なく発現しており、前節でしめした葉での強い発現を裏付けている。35S-GUSの形質転換体でも同様のGUS活性がみられたが(図21b)、プロモーターのないGUSの形質転換体ではGUS活性がまったくみられなかった(図21c)。

c a b-GUS形質転換体の葉柄では、維管束でのGUS活性が顕著であった(図22a)。また茎でも葉跡と思われる維管束の木部の一部でGUS活性がみられた(図23a)。この維管束での発現は、葉原基を起源とする細胞における分化途上での発現をあらわすものと考えることができる。また茎の皮層細胞でも活性がみられ(図24a)、葉緑体の存在との関係も示唆される。

これに対し根ではc a b-GUS形質転換体のGUS活性がみられず、c a b-6遺伝子のプロモーターは根では発現を誘導しないことをしめしている(図2



5) .

これらの結果から、クロマツ c a b - 6 遺伝子も被子植物と同様の発現の器官特異性をもっており、タバコの形質転換体内においても機能することがわかった。異種の植物間での形質転換実験の結果、双子葉類の遺伝子を双子葉類に導入した場合 (Simpson *et al.* 1986b), 単子葉類の遺伝子を双子葉類に導入した場合 (Lamppa *et al.* 1985b), 単子葉類の遺伝子を単子葉類に導入した場合 (Tada *et al.* 1991) のいずれも c a b 遺伝子の器官・組織特異的発現様式は保持されることがわかっている。本実験の結果をあわせると、おそらく c a b 遺伝子の組織特異的な発現調節機構は種子植物間で共通のものであると考えられる。

#### IV クロマツ c a b 遺伝子の発現制御機構

植物の分子生物学的研究は、微生物、動物の分子生物学的研究に遅れをとってきたが、植物細胞の特徴である分化全能性を利用した植物の形質転換系が確立したことから、近年急速に研究成果の蓄積が進んでいる。しかし樹木とくに針葉樹の分子生物学的研究はまだ緒についたばかりである。本研究により針葉樹の c a b 遺伝子の構造がはじめて明らかになった。また本研究は、裸子植物の遺伝子が被子植物に組み込まれ、その発現が確認された最初の例である。

針葉樹の c a b 遺伝子の c D N A の塩基配列は、クロマツ (Yamamoto *et al.* 1988) のほかに欧州アカマツ (Jansson and Gustafsson 1990) でも明らかになっているが、発現制御に関しては報告されていない。またダグラス・ファー (*Pseudotsuga menziesii*) の場合は、塩基配列は明らかになっていないが、c a b 遺伝子の m R N A の暗所芽生えで蓄積量が明所の約 3 0 % であることがわかっている (Alosi *et al.* 1990)。クロマツの暗所芽生えの場合は明所芽生えの半分 (表 3) あるいは同量 (Yamamoto *et al.* 1991) の c a b 遺伝子の m R N A の蓄積がある。暗黒下では被子植物の c a b 遺伝子の発現はほとんど認められず (Tobin and Silverthorne 1985)、暗黒下での非常に高いレベルでの発現は針葉樹の c a b 遺伝子の特徴であると考えられる。

c a b 遺伝子は多重遺伝子族を構成しており、個々の遺伝子の発現様式はそれぞれ異なっている可能性がある。本研究ではクロマツのすべての c a b 遺伝子をクローニングすることができなかったため、個々の遺伝子の発現様式のちがいを検討することができなかった。しかし少なくとも c a b - 6 遺伝子は暗所芽生えで強く発現することをしめした (表 3)。クロマツの c a b 遺伝子の発現は他の遺伝子と同様に、遺伝子の 5' 上流域の塩基配列 (プロモーター) によって主と

して制御されると考えられる。クローニングしたクロマツ c a b-6 遺伝子は、発現制御の解析をおこなう上で十分な長さ (2 kbp) のプロモーター領域を含んでいた。この c a b-6 遺伝子を用いて、クロマツの c a b 遺伝子の暗黒下での発現機構を明らかにした。

第1章で述べたように、クロマツの c a b 遺伝子が被子植物の c a b 遺伝子と異なり、暗所の子葉において発現する理由として、2つの可能性が考えられる。1つは光制御に関与する領域がクロマツの c a b 遺伝子のプロモーターに存在せず、常に光の制御を受けずに発現するという可能性である。もう1つは、クロマツの暗所子葉ではクロロフィル合成、葉緑体の発達がみられることから、細胞の環境が被子植物の明所の子葉と同じ条件になっており、プロモーターの機能に違いがないにも関わらず、クロマツの c a b 遺伝子は暗所の子葉で発現するという可能性である。

後者の可能性は、第1章で述べたように、針葉樹では暗黒下でクロロフィル合成と葉緑体の発達がおこなうことから推測した。被子植物では葉緑体に傷害を与えたときに c a b 遺伝子の発現が阻害されることから、葉緑体から細胞核へ遺伝子の転写制御に関与するシグナルが伝達されていると考えられている (Mohr 1988, Taylor 1989)。クロマツでは、暗黒下で発達した葉緑体から細胞核へ、光とは関係なくこのシグナルが伝達されているという可能性が考えられる。

しかし形質転換実験の結果、クロマツの c a b-6 遺伝子のプロモーターは暗黒下の黄化したタバコの子葉でも発現を誘導することが明らかになった (表5)。タバコ自身の c a b 遺伝子は黄化組織では発現しないことから、被子植物の c a b 遺伝子の発現にとっては抑制的に働くような細胞側の環境であっても、クロマツの c a b-6 遺伝子は発現をしめすことがわかった。また暗所に2日間おいてタバコ自身の c a b 遺伝子が発現していない状態にある形質転換体の成葉中でも、クロマツ c a b-6 遺伝子は構成的に発現していることがわかった (図2

7) . これらの結果は、クロマツ c a b - 6 遺伝子のプロモーターは、光発現制御に関与する領域をもたないために、暗黒下においても発現を誘導することを示唆している。

第 I 章で述べたように、被子植物の光合成系遺伝子の光発現制御は、細胞側の転写制御因子 (トランス・ファクター) とプロモーター領域に存在する特定塩基配列 (シス・エレメント) との相互作用によっておこなわれていると考えられている。しかしその光発現制御の機構は明らかになっていない。一つの仮説として、暗黒下では存在しないかあるいはシス・エレメントと相互作用をもたないトランス・ファクターが、光照射時にシス・エレメントと相互作用をおこし遺伝子の発現を誘導するというモデルが考えられる。しかしこのモデルではトランス・ファクターとの相互作用のない暗黒下のタバコ葉中で、クロマツ c a b - 6 遺伝子のプロモーターが遺伝子の発現を誘導する現象を説明することができない。

本研究の結果から、クロマツの c a b - 6 遺伝子のプロモーターには被子植物の光制御に関与するトランス・ファクターとの相互作用をしめすシス・エレメントが存在しないために暗黒下での遺伝子の発現が誘導されると考えられる。したがって被子植物の c a b 遺伝子では、前述のモデルとは逆に、暗黒下ではトランス・ファクターとシス・エレメントとの相互作用により遺伝子の発現が抑制され、光照射によりこの相互作用がなくなり発現が誘導される、という機構によって光発現制御がおこなわれていると考えることができる。

クロマツ c a b - 6 遺伝子のプロモーターはタバコ形質転換体内でも葉や茎といった器官で発現を誘導し、花や根などでは発現を誘導しないことがわかった (表 5, 6, 図 2 1 - 2 5) . これは c a b - 6 遺伝子のプロモーターがタバコの形質転換体内でも器官特異的な遺伝子の発現を制御していることをしめしている。単子葉類の c a b 遺伝子を双子葉類に導入した場合でもこの器官特異的な発現制御がおこること (Lamppa *et al.* 1985b, Sakamoto *et al.* 1991) と本研究の

結果をあわせると、c a b遺伝子の器官特異的な発現制御機構は種子植物間で共通のものであると考えられる。

形質転換体での発現レベルは、もとの植物内での発現レベルに比べ、低くなる例が多い (Willmitzer 1988)。またパーティクルガンを用いた一時的な発現であるが、Picea glauca の胚に導入された被子植物のプロモーターは、カリフラワー・モザイク・ウィルスの 35S プロモーターに比べ、発現が弱い (Ellis et al. 1991)。しかしクロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターは形質転換タバコ内でも非常に強く発現を誘導する (表 4, 5, 6)。この結果は、種子植物における c a b 遺伝子の発現に関与する装置の共通性が非常に高いことをしめしている。

近年、植物分子生物学の研究の進展をうけて、その成果を植物の育種に応用しようとする試みがなされている (山谷 1990)。遺伝子導入によって植物の育種をおこなおうとする場合、遺伝子の発現を制御するプロモーターは重要な役割を担う。現在のところ、カリフラワー・モザイク・ウィルスの 35S プロモーターなどの恒常的な発現を誘導するプロモーターが多く使われているが、今後は導入する遺伝子の機能に応じてプロモーターを使い分け、発現を制御することになるだろう。本研究の結果、クロマツ c a b-6 遺伝子のプロモーターは、暗黒下でも光照射下と同レベルの強い発現を誘導し、しかも葉などの器官で特異的に発現を誘導することが明らかになった。このプロモーターは遺伝子導入による植物の育種のための有用な材料となるだろう。



## 謝 辞

本研究は東京大学農学部造林学研究室 佐々木恵彦教授の御指導のもとに開始され、農林水産省森林総合研究所 遺伝子発現研究室長 山本直樹博士との共同研究によりおこなわれたものである。両先生には研究の遂行にあたって常に貴重な御助言と暖かい励ましをいただき、また論文の作成に当たって御校閲と御批判を賜った。ここに心よりのお礼を申し上げます。

またこの研究に対して深いご理解を頂き、しばしば有益な御助言と暖かい励ましをいただいた森林総合研究所の小谷圭司博士、篠原健司博士、向井譲氏、いろいろな面で御支援をいただいた造林学研究室のみなさまにあつくお礼申し上げます。

なお本論文の作成に当たって図表の作成を手伝っていただいたトヨタ自動車の早乙女理氏（東京大学農学部造林学研究室 研究生）に心からの感謝の意を表します。

#### 引用文献

- Alosi MC, Neale DB, Kinlaw CS (1990) Expression of cab genes in Douglas-fir is not strongly regulated by light. *Plant Physiol* 93, 829-832.
- Anderson JM (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Ann Rev Plant Physiol* 37, 93-136.
- Apel K (1979) Phytochrome-induced appearance of mRNA activity for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (*Hordeum vulgare*). *Eur J Biochem* 97, 183-188.
- Apel K, Kloppstech K (1978) The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). *Eur J Biochem* 85, 581-588.
- Batschauer A, Apel K (1984) An inverse control by phytochrome of the expression of two nuclear genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Eur J Biochem* 143, 593-597.
- Batschauer A, Mo'singer, Kreuz K, Dorr I, Apel K (1986) The implication of a plastid-driven factor in the transcriptional control of nuclear genes encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur J Biochem* 154, 625-634.
- Benecke W and Jost L (1924) *Pflanzenphysiologie*. G. Fischer, Jena.
- Benfey PN, Chua N-H (1989) Regulated genes in transgenic plant. *Science* 244, 174-181.
- Benfey PN, Ren L, Chua N-H (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J* 8, 2195-2202.
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl Acids Res* 12, 8711-8721.
- Bittner R (1905) *Oesterreichische Botanische Zeitschrift*. Quoted by Kirk JTO and Tilney-Bassett RAE, 1967.
- Bogdanovic M (1973) Chlorophyll formation in the dark I. Chlorophyll in pine seedlings. *Physiol Plant* 29, 17-18.
- Bogorad L (1950) Factors associated with the synthesis of chlorophyll in the dark in seedlings of *Pinus jeffreyi*. *Bot Gaz* 111, 221-241.
- Buetow DE, Chen H, Erdo's G, Yi LSH (1988) Regulation and expression of the multigene family coding light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins of photosystem II. *Photosynthesis Res* 18, 61-97.
- Burgerstein A (1900) Ueber das Verhalten der Gymnospermen-Keimlinge im Lichte und im Dunkeln. *Ber Dtsch Bot Ges* 18, 168-184.
- Burgess DG, Taylor WC (1988) The chloroplast affects the transcription of a nuclear gene family. *Mol Gen Genet* 214, 89-96.
- Cashmore AR (1984) Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a

chlorophyll a/b-binding polypeptide. Proc Natl Acad Sci USA 81:2960-2964.

Castelfranco PA, Beale SI (1981) Chlorophyll biosynthesis. In Hatch MD, Boardman NK (eds.), The Biochemistry of Plants vol. 8 Photosynthesis. Academic Press, NY, U.S.A., 375-421.

Castresana C, Garcia-Luque I, Alonso E, Malik VS, Cashmore AR (1988) Both positive and negative regulatory elements mediate expression of a photoregulated CAB gene from *Nicotiana plumbaginifolia*. EMBO J 7, 1929-1936.

Castresana C, Staneloni 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.

Chitnis PR, Thornber JP (1988) The major light-harvesting complex of Photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. Photosynthesis Res 16, 41-63.

Chitnis PR, Morishige DT, Nechushtai R, Thornber JP (1988) Assembly of the barley light-harvesting chlorophyll a/b proteins in barley etioclroplasts involves processing of the precursor on thylakoids. Plant Mol Biol 11, 95-107.

Corden J, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kedingner C, Chambon P (1980) Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. Science 209, 1406-1414.

Coruzzi G, Broglie R, Cashmore A, Chua N-H (1983) Nucleotide Sequence of two pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and the major chlorophyll a/b-binding thylakoid polypeptide. J Biol Chem 258, 1399-1402.

Datta N, Cashmore AR (1989) Binding of a pea nuclear protein to promoters of certain photoregulated genes is modulated by phosphorylation. Plant Cell 1, 1069-1077.

Dean C, Pichersky E, Dunsmuir P (1989) Structure, evolution, and regulation of RbcS genes in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40, 415-439.

Draper J, Scott R, Hamil J (1988) Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. In Draper J, Scott R, Armitage P (eds.) Plant genetic transformation and gene expression. Blackwell Scientific Publications, Oxford UK, 69-160.

Dunsmuir P (1985) The petunia chlorophyll a/b binding protein genes: a comparison of Cab genes from different gene families. Nucl Acids Res 13, 2503-2518.

Dunsmuir P, Smith SM, Bedbrook J (1983) The major chlorophyll a/b binding protein of petunia is composed of several polypeptides encoded by a number of distinct nuclear genes. J Mol Appl Genet 2, 285-300.

Ellis DD, McCabe D, Russell D, McCown BH (1991) Expression of inducible angiosperm promoters in a gymnosperm, *Picea glauca* (white spruce). Plant Mol

Biol 17, 19-27.

Falconet D, White MJ, Fristensky BW, Dobres MS, Thompson WF (1991) Nucleotide sequence of Cab-215, a type II gene encoding a photosystem II chlorophyll a/b-binding protein in *Pisum*. *Plant Mol Biol* 17, 135-139.

Fourney RM, Miyakoshi J, Day RS, Patero MC (1988) Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10-1, 5-7.

Gilmartin PM, Sarokin L, Chua N-H (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* 2, 369-378.

Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7089-7093.

Glazer N, Melis A (1987) Photochemical reaction centers: structure, organization, and function. *Ann Rev Plant Physiol* 38, 11-45.

Green PJ, Kay SA, Chua N-H (1987) Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J* 6, 2543-2549.

Ikeuchi M, Hirano A, Inoue Y (1991) Correspondence of apoproteins of light-harvesting chlorophyll a/b complexes associated with photosystem I to cab genes: evidence for a novel type IV apoprotein. *Plant Cell Physiol* 32, 103-112.

Imbault P, Wittmer C, Johanningmeier U, Jacobs JD, Howell SH (1988) Structure of the *Chlamydomonas reinhardtii* *cab1-1* gene encoding a chlorophyll-a/b-binding protein. *Gene* 73, 397-407.

Jansson S, Gustafsson P (1990) Type II and type I genes for the chlorophyll a/b-binding protein in the gymnosperm *Pinus sylvestris* (Scots pine): cDNA cloning and sequence analysis. *Plant Mol Biol* 14, 287-296.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS gene fusions: beta-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. *Nucl Acids Res* 15, 6643-6653.

Karlin-Neumann GA, Kohorn BD, Thornber JP, Tobin EM (1985) A chlorophyll a/b-protein encoded by a gene containing an intron with characteristics of a transposable element. *J Mol Appl Genet* 3, 45-61.

Karlin-Neumann GA, Sun L, Tobin EM (1988) Expression of light-harvesting chlorophyll a/b-protein genes is phytochrome-regulated in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant Physiol* 88, 1323-1331.

Kaufman LS, Briggs WR, Thompson WF (1985) Phytochrome control of specific mRNA levels in developing pea buds. *Plant Physiol* 78, 388-393.

Kaufman LS, Thompson WF, Briggs WR (1984) Different red light requirements for

phytochrome-induced accumulation of cab RNA and rbcS RNA. Science 226, 1447-1449.

Kawamatu S (1967) Electron microscopic observations of plastids in seedlings of *Pinus densiflora*. Bot Mag Tokyo 80, 233-240.

Kay SA, Keith B, Shinozaki K, Chye M-L, Chua N-H (1989) The rice phytochrome gene: structure, autoregulated expression, and binding of GT-1 to a conserved site in the 5' upstream region. Plant Cell 1, 351-360.

Kirk JTO, Tilney-Bassett RAE (1967) The plastids. Freeman and Company, London, UK.

Kohorn BD, Tobin EM (1987) Amino acid charge distribution influences the assembly of apoprotein into light-harvesting complex II. J Biol Chem 262, 12897-12899.

Kohrn BD, Harel E, Chitnis PR, Thornber JP, Tobin EM (1986) Functional and mutational analysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of thylakoid membranes. J Cell Biol 102, 972-981.

Kuhlemeier C, Green PJ, Chua N-H (1987) Regulation of gene expression in higher plants. Ann Rev Plant Physiol 38, 221-57.

Lam E, Kano-Murakami Y, Gilmartin P, Niner B, Chua N-H (1990) A metal-dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter. Plant Cell 2, 857-866.

Lamppa GK, Morelli G, Chua N-H (1985) Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. Mol Cell Biol 5, 1370-1378.

Lamppa G, Nagy F, Chua N-H (1985) Light-regulated and organ-specific expression of a wheat Cab gene in transgenic tobacco. Nature 316, 750-752.

Larouche L, Tremblay C, Simard C, Bellemare G (1991) Characterization of a cDNA encoding a PSII-associated chlorophyll a/b-binding protein (CAB) from *Chlamydomonas moewusii* fitting into neither type I nor type II. Curr Genet 19, 285-288.

Laudi G, Medeghini-Bonatti P (1973) Ultrastructure of chloroplasts of some Chlamidospermae (*Ephedra twediana*, *Gnetum montana*, *Welwitschia mirabilis*). Caryologia 26, 107-114.

Laudi G, Medeghini-Bonatti P (1975) Ultrastructures of plastids in embryos of *Picea excelsa* L. and *Larix decidua* L. during germination in darkness. Caryologia 28, 133-147.

Leutwiler LS, Meyerowitz EM, Tobin EM (1986) Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll a/b binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. Nucl Acids Res 14, 4051-4064.

Lissemore JL, Quail PH (1988) Rapid transcription by phytochrome of the genes for phytochrome and chlorophyll a/b-binding protein in *Avena sativa*. Mol Cell Biol 8, 4840-4850.



Long Z, Wang S-Y, Nelson N (1989) Cloning and nucleotide sequence analysis of genes coding for the major chlorophyll-binding protein of the moss *Physcomitrella patens* and the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Gene* 76, 299-312.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, U.S.A.

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.

Matsuoka M, Minami E (1989) Complete structure of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur J Biochem* 181, 593-598.

Mayfield SP, Taylor WC (1984) Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) mRNA. *Eur J Biochem* 144, 79-84.

Mayfield SP, Taylor WC (1987) Chloroplast photooxidation inhibits the expression of a set of nuclear genes. *Mol Gen Genet* 208, 309-314.

Michel-Wolwertz MR, Bronchart (1974) Formation of prolamellar bodies without correlative accumulation of protochlorophyllide or chlorophyllide in pine cotyledons. *Plant Sci Lett* 2, 45-54.

Mohr H (1988) Control of plant development: signals from without - signals from within. *Bot Mag Tokyo* 101, 79-101.

Mo'singer E, Batschauer A, Apel K, Schafer E, Briggs WR (1988) Phytochrome regulation of greening in barley. *Plant Physiol* 86, 706-710.

Mukai Y, Yamamoto N, Koshiba T (1991) Light-independent and tissue-specific accumulation of light-harvesting chlorophyll a/b binding protein and ribulose biphosphate carboxylase in dark-grown pine seedling. *Plant Cell Physiol* 32, 1303-1306.

Mullet JE (1983) The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J Biol Chem* 258, 9841-9848.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.

Nagy F, Boutry M, Hsu M-Y, Wong M, Chua N-H (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.

Nagy F, Kay SA, Boutry M, Hsu M-Y, Chua N-H (1986) Phytochrome-controlled expression of a wheat Cab gene in transgenic tobacco seedlings. *EMBO J* 5, 1119-1124.

Neale DB, Williams CG (1990) Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. *Can J*

For Res 21, 545-554.

根井正利 (1990) 分子進化遺伝学. 培風館, 東京.

Nikolic' D, Bogdanovic' M (1972) Plastid differentiation and chlorophyll synthesis in cotyledons of black pine seedlings grown in the dark. *Protoplasma* 75, 205-213.

Oku T, Tomita G (1976) Photoactivation of oxygen-evolving system in dark-grown spruce seedlings. *Physiol Plant* 38, 181-185.

Ou K, Packer N, Adamson H (1990) Immunodetection and photostability of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in *Pinus pinea* L.. *Photosynthesis Res* 23, 89-94.

Pichersky E, Bernatzky R, Tanksley SD, Breidenbach RB, Kausch AP, Cashmore AR (1985) Molecular characterization and genetic mapping of two clusters of genes encoding chlorophyll a/b-binding proteins in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Gene* 40, 247-258.

Pichersky E, Hoffman NE, Malik VS, Bernatzky R, Tanksley SD, Szabo L, Cashmore AR (1987) The tomato Cab-4 and Cab-5 genes encode a second type of CAB polypeptides localized in Photosystem II. *Plant Mol Biol* 9, 109-120.

Pichersky E, Soltis D, Soltis P (1990) Defective chlorophyll a/b-binding protein genes in the genome of a homosporous fern. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 195-199.

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.

Rapp JC, Mullet JE (1991) Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. *Plant Mol Biol* 17, 813-823.

Sachs J (1859) Ueber das Vorhandensein eines farblosen Chlorophyllchromogens in Pflanzentheilen. *Lotos* 9, 6-14. Quoted by Burgerstein A, 1900.

Sakamoto M, Sanada Y, Tagiri A, Marukami T, Ohashi Y, Matsuoka M (1991) Structure and characterization of a gene for light-harvesting Chl a/b binding protein from rice. *Plant Cell Physiol* 32, 385-393.

Sanger F (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214, 1205-1210.

Schmidt GW, Mishkind ML (1986) The transport of proteins into chloroplasts. *Ann Rev Biochem* 55, 879-912.

Selstam E, Widell A (1986) Characterization of prolamellar bodies, from dark-grown seedling of Scots pine, containing light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase. *Physiol Plant* 67, 345-352.

篠崎一雄 (1991) 光による植物遺伝子の転写制御. 蛋白質 核酸 酵素 36, 115-127.

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.

Simpson J, Van Montagu M, Herrera-Estrella L (1986) Photosynthesis-associated gene families: differences in response to tissue-specific and environmental factors. *Science* 233, 34-38.

Stahl E (1909) *Zur Biologie des Chlorophylls*. G.Fischer, Jena. Quoted by Kirk JTO and Tilney-Bassett RAE, 1967.

Stayton MM, Black M, Bedbrook J, Dunsmuir P (1986) A novel chlorophyll a/b binding (Cab) protein gene from petunia which encodes the lower molecular weight Cab precursor protein. *Nucl Acids Res* 14, 9781-9796.

Sullivan TD, Christensen AH, Quail PH (1989) Isolation and characterization of a maize chlorophyll a/b binding protein gene that produces high levels of mRNA in the dark. *Mol Gen Genet* 215, 431-440.

Tada Y, Sakamoto M, Matsuoka M, Fujimura T (1991) Expression of a monocot LHCP promoter in transgenic rice. *EMBO J* 10, 1803-1808.

Taylor WC (1989) Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40, 211-233.

Thompson WF, White MJ (1991). Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 423-466.

Thornber JP (1986) Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism. In Staehelin LA, Arntzen CJ (eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology New series vol.19 Photosynthesis III*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 98-142.

Tobin EM (1981) Phytochrome-mediated regulation of messenger RNAs for the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and the light-harvesting chlorophyll a/b-protein in *Lemna gibba*. *Plant Mol Biol* 1, 35-51.

Tobin EM, Silverthorne J (1985) Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 36, 569-593.

Walling LL, Chang YC, Demmin DS, Holzer FM (1988) Isolation, characterization and evolutionary relatedness of three members from the soybean multigene family encoding chlorophyll a/b binding protein. *Nucl Acids Res* 16, 10477-10492.

Willmitzer L (1988) The use of transgenic plants to study plant gene expression. *Trends Genet* 4, 13-18.

Yamamoto N, Matsuoka M, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ohashi Y (1988) Nucleotide sequence of a full length cDNA clone of light harvesting chlorophyll a/b binding protein gene from dark grown pine (*Pinus thunbergii*) seedling. *Nucl Acids Res* 16, 11829.

Yamamoto N, Mukai Y, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ohashi Y, Ozeki Y, Odani K

(1991) Light-independent expression of *cab* and *rbcS* genes in dark-grown pine seedlings. *Plant Physiol* 95, 379-383.

山谷 純 (1990) 植物分子生物学の育種への展開-3. 耐ストレス性植物の作出. In 岡田, 池田(編) 高等植物の情報発現と制御. 丸善, 東京.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

表1. c a b遺伝子のアミノ酸配列の比較によって得た非類似度行列.

番号は図9と同じ. 植物名のあとの番号は, 1がタイプI, 2がタイプIIのc a b遺伝子をあらわす. 文献は図9を参照.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. D. salina																							
2. C. reinhardtii	35.4																						
3. C. moewusii	36.6	20.0																					
4. Moss	42.8	33.6	35.8																				
5. Fern	42.4	35.1	36.2	20.4																			
6. Pine(cab-6)2	41.3	33.7	31.5	22.6	21.3																		
7. Lemna 2	43.6	33.9	32.5	23.3	22.2	12.0																	
8. Rice 2	42.2	34.1	34.1	25.7	24.9	16.5	14.8																
9. Tomato 2	43.6	36.0	35.7	24.1	21.0	13.5	13.6	13.6															
10. Petunia 2	43.6	35.7	34.6	25.2	22.5	12.0	11.3	13.2	6.8														
11. Pea 2	41.8	34.6	34.2	26.7	23.2	14.2	14.7	16.2	12.8	11.3													
12. Pine 1	40.6	36.5	35.7	25.3	23.2	24.3	27.2	27.5	26.1	27.2	28.3												
13. Scots pine 1	43.6	38.8	35.7	28.8	26.8	25.4	28.2	28.9	28.6	28.9	29.3	10.7											
14. Lemna 1	41.5	33.8	34.2	25.2	23.4	23.9	22.9	26.9	24.7	24.7	25.8	20.3	22.9										
15. Rice 1	40.9	34.8	35.2	27.0	23.8	23.9	25.5	26.9	25.8	26.6	26.9	21.0	21.8	12.7									
16. Wheat 1	44.0	38.9	38.5	29.8	26.0	27.5	28.3	31.3	28.7	29.4	30.9	22.8	26.1	14.6	15.6								
17. Barley 1	42.4	35.7	34.9	25.6	23.1	22.9	24.0	28.0	26.2	25.8	26.9	21.7	24.6	10.4	14.6	13.8							
18. Maize 1	44.0	35.1	33.0	26.6	22.1	22.1	22.6	24.1	21.9	23.0	23.0	21.0	22.9	13.4	12.4	17.8	15.6						
19. Tomato 1	42.5	34.1	34.8	26.5	22.1	22.8	24.4	27.7	24.4	24.4	26.2	19.6	23.2	9.3	13.4	13.0	9.3	12.3					
20. Petunia 1	42.8	34.1	34.1	26.3	24.1	23.2	25.4	27.2	24.6	25.4	27.6	21.4	23.9	8.6	13.4	13.4	10.4	13.7	6.7				
21. Pea 1	43.0	36.3	36.6	28.3	23.3	24.8	24.8	27.7	27.4	27.4	26.3	20.7	23.6	12.9	15.5	18.0	13.0	14.0	11.1	12.5			
22. Tobacco 1	42.9	34.6	34.9	27.3	23.8	24.9	26.1	28.7	25.7	26.8	28.7	21.0	24.3	9.0	14.6	13.1	10.4	14.2	6.0	5.2	12.2		
23. Arabidopsis1	43.5	35.6	36.9	28.3	22.3	25.9	24.9	27.1	25.3	25.3	26.0	22.7	24.9	10.8	17.0	16.4	13.8	15.6	11.9	12.6	15.4	11.6	
24. Soybean 1	43.8	36.7	35.6	26.7	21.4	23.7	23.7	26.3	25.8	25.5	26.6	19.9	22.5	9.7	16.0	17.5	14.1	13.0	12.2	11.2	11.1	12.3	12.6



表2. c a b 遺伝子の塩基配列の比較によって得た非類似度行列.

右上: アミノ酸置換率 (%)

左下: 塩基置換率 (%)

	Pine	Lemna	Rice	Tomato	Petunia	Pea
1. Pine		12.0	16.5	13.5	12.0	14.2
2. Lemna	19.5		14.8	13.6	11.3	14.7
3. Rice	22.3	15.3		13.6	13.2	16.2
4. Tomato	27.3	28.9	27.3		6.8	12.8
5. Petunia	27.3	27.3	27.6	13.3		11.3
6. Pea	26.8	27.6	28.4	21.5	19.6	

#### 参考文献

1. Pine: Pinus thunbergii (cab-6), this work.
2. Lemna: Lemna gibba (AB19), Karlin-Neumann et al. 1985.
3. Rice: Oryza sativa (cDNA), Matsuoka et al. 1990.
4. Tomato: Lycopersicon esculentum (cDNA), Pichersky et al. 1987.
5. Petunia: Petunia hybrida x Petunia axillaris (cab37), Stayton et al. 1986.
6. Pea: Pisum sativum (cab-215), Falconet et al. 1991.

表3. 明・暗所芽生えの子葉中の c a b 遺伝子の発現量.

Method	Ratio of transcript (Dark / Light)
Northern blot	
total <u>cab</u> <sup>1)</sup>	0.49
<u>cab-6</u> <sup>1)</sup>	0.81
S1 mapping <sup>2)</sup>	0.46
Primer extension <sup>3)</sup>	0.64

1) 図13

2) 図15

3) 図16

表4. cab-GUSの形質転換タバコ成葉中でのGUS活性.

左の列はGUS活性の強い個体. 右の列は活性の弱い個体.

右の列の点線の下は, 35S-GUSの形質転換体タバコ成葉中でのGUS活性.

Transgenic tobacco No.	GUS activity (nmol 4MU/ min/ mg protein)	Transgenic tobacco No.	GUS activity (nmol 4MU/ min/ mg protein)
1	7.8	2	0.6
3	7.2	4	0.6
5	2.8	9	1.3
6	2.3	10	0.2
7	4.6	11	0.8
8	2.0	12	1.1
14	6.0	18	1.0
15	3.4	24	0.2
16	3.0	30	0.2
17	4.4	32	1.9
20	16.0	37	1.2
21	7.0	41	0.1
22	20.8		
25	11.7		
26	6.1		
27	5.3	35S-GUS	0.5
31	2.9		0.2
34	3.2		0.5
35	6.4		
36	5.8		
38	13.0		
40	6.7		

表5. cab-6 遺伝子の形質転換タバコ内での暗所発現.

cab-GUSの形質転換タバコの種子(形質転換第2世代)を用いた. 暗所下で7日間発芽生育させた芽生え(D), それに24時間光照射した芽生え(L)を親の個体別に, それぞれ子葉(cotyledon), 胚軸(hypocotyl), 幼根(radicle)にわけてGUS活性を測定した. また乾燥種子(seed)のGUS活性を測定した. 対照として35S-GUSの形質転換体についても同様の測定をおこなった.

Transgenic tobacco No.	GUS activity (pmol 4MU/min/mg protein)						
	Seed	Cotyledon		Hypocotyl		Radicle	
		D	L	D	L	D	L
cab-GUS							
1	81	1425	1717	39	23	7	9
3	30	355	1365	16	15	4	14
5	30	271	812	10	9	3	10
7	108	346	1100	20	18	162	68
8	149	1702	1155	52	20	33	93
12	48	546	606	14	22	20	46
14	139	2172	1470	18	16	20	29
35S-GUS	311	554	670	1582	413	625	511

表6. *cab-6* 遺伝子の形質転換タバコ内での器官特異的発現.

*cab-GUS*, *35S-GUS* の形質転換体について各器官ごとに *GUS* 活性を定量した.

Transgenic tobacco	----- Leaf -----			Stem	Root	Flower
	devel- oping	Just fully expanded	Old			
(nmol 4MU/min/mg protein)						
cab-GUS	42.2	63.2	83.2	33.0	3.0	1.3
35S-GUS	10.2	11.9	13.4	38.7	35.1	29.5
ratio (cab-GUS/35S-GUS)	4.1	5.3	6.2	0.85	0.085	0.044



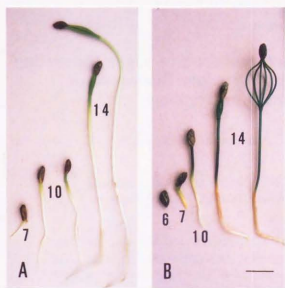


図 1. 暗黒下 (A) および光照射下 (B) で発芽させたクロマツ (*Pinus thumbergii*) の芽生え (Mukai *et al.* 1991). 図中の数字は播種後の日数, バーは 1.0 cm をあらわす.

1 2 3



図2. クロマツの全DNAのアガロースゲル電気泳動。  
レーン1: 制限酵素 *EcoRI* で切断, 2: 切断せず, 3: 分子量マーカー  
( $\lambda$  DNA/*HindIII*, 上から 23, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 kbp)。

TTTTGAGCACCTGATTAGCCTCTAAGGCTATGTACCTCTCAGATGGGCATTTTTCTTTT  
 TGTATGTTGCATGCTTGTAGCATTAGTCAACAAACATGGTCGAGGTGAGACCATGAAT  
 TTTGACATCTTTGTATATGTTTTTGTTAATAGAACTCTTCGACTTACAAAAAATAA  
 TTATTAATATGAATTTTTTAAATTTCTATTAATTTAATTATTATATATAAATACTACT  
 TGAGTCATGTTTCATACAACATTCTAAGTTTTGCTGACTCTAAGTCTTTCAATTCACACT  
 AACGAGACCATGGCAACAGCTTCAGCCATCCAGAGCTCAAGCTTCGCAAGGCCAGACCTC  
 M A T A S A I Q S S S F A G Q T L  
 CTGAGGCCCGCAGCAGAATGAGCTTGTCAAGAAGGTGGGCAGCTCGCAGGCTCGAATCAC  
 L R P Q Q N E L V K K V G T S Q A R I T  
 ATGGCAAGAACCGTCAGGAGCGCCCTGAGAGCATATGGTATGGACCTGACCGCCCAAG  
 M R R T V R S A P E S I W Y G P D R P K  
 TTCCTTAGCCCTTCTCGAACAGACGCCATCGTATCTCACCGGAGAATTCAGGGCAG  
 F L S P F S E Q T P S Y L T G E F P G D  
 TACGGGTGGGACAGCGCGGGCTCTCTGCCGATCTGAGACCTTCGCCAAAAACAGAGAG  
 Y G W D T A G L S A D P E T F A K N R E  
 CTGGAGGTGATCCACAGCAGATGGGCCATGTTGGGGCGCTGGGTTCGCTTTCCCGGAG  
 L E V I H S R W A M L G A L G C V F P E  
 CTATTGGCTAAAAACCGGTGTGAAATTTGGGGAACCATGTGGTTCAAGCGGGGTGCAG  
 L L A K T G V K F G E T M W F K A G V Q  
 ATATTCTCAGAGGGAGGCCCTCGACTACCTGGGAACCTAACCTGATCTATCGCAGGGC  
 I F T S E G G L D Y P G N P N L I Y A Q G  
 ATTCTAGCCATCTGGGCGTTACAGGTTGTCTCATGGGATTGATTGAGGGATACAGAGTT  
 I L A I W A L Q V V L M G L I E G Y R V  
 GGGGAGGAGCCCTTGGTGAGGAGCTGGACCTCTGTACCCAGGGGAGCCTTCGACCCA  
 G G G P L G E E L D P L Y P G G A F D P  
 CTGGGCTGGCCGACGACCTGGAGCGTTGCGGAGCTGAGGTTGAAGAGATTAAGAAC  
 L G L A D D L E A F A E L R V K E I K N  
 GGGCGGTGGCCATGTTCTCATGTTGCGCTTCTTCATGCAGGCAATTGTGACCGGGAAG  
 G R L A M F S M F G F F M Q A I V T G K  
 GCGCCCATTTGAAATCTCTACGACCACTTGCTTTGGTTAGGGAGATGGGAGATGTGCGG  
 G P I E N L Y D H L  
 CAAGCGTTTGACAAAAGGCATCACCAAGATTGGGCTCATGGAGAGGCTGAACTCACGC  
 CACGAACATAATAGATCTTCTGGAGAGGCTTTGAGAAACCTCGTGAGAGGCAAGTTTCA  
 GATCCCGTCCAGCCCTGCTCGGCCCTGCAGAAAGATGGTCTGTGAAGGAAAAAAGAA  
 AAGAAACAAGCAGGATGGGCTCTCTGCCCCCTTCAGATTCAAAATCACACAGATCTCA  
 GCGAAAACCACTCTGCAATGGGTACACCCCTTCAGATCTGGTGCAGAATCTCAAAAGTAAAT  
 CTGGAACGTCGATTCCGGATCC

図3. クロマツc a b - 1遺伝子の塩基配列。  
 推定されたアミノ酸配列を1文字表記で塩基配列の下にしめす。  
 CAAT, TATA のボックス配列をアンダーラインでしめす。

TAGGAAGAGCTGAGGATTTGAGGGATTTAAATGATTAATTTGGGATTCTGTTTGAGAAAAAG  
 AGTGGAGCTAGAGAGATACCTTTAGGAGAGAGTGAGAGATTGTTGGATTGAACTAAATTTG  
 GATCATGAATCCATTTTTGTATAAAATTTGTGATCTTTGAATAATTTAAAAAGTTAGCTA  
 GAGGTTAGCTAGGGGTTAGAGAGCGAGAAAGATGGTAAGGGAAGAGTGAGTAAGAGAAAAA  
 GCAGAAATGGGTGGTCCAAAACCAATAACTAGATCTTTGTAAGCAAGACTGATAGTATTTG  
 AATAGGATTGTTTTGTATCTATGTAATAATTTATTTTAAGAATACCAAAAAACAGGTTGA  
 GTATGTGAATTTGATATATCTTTGAGTGTGTATCATCCAACACTAAATGTATCGATTCTCG  
 ATTCGTATTCTGATAAATATTGTGATCTTCTGTTGAGTAACATTGATAAACTCTCGG  
 TCTTAGGGCTCACCATGGCAACAGCTTCAGCCATCCAGAGCTCAAGCTTCGCAGGGCCAGA  
                   M A T A S A I Q S S S F A G Q T  
 CCCTCTCTGAGGCGCAGCAGAATGAGCTTGTCAAGAAGGTGGGCACATCGCAGGCTCGAA  
   L L R P Q Q N E L V K K V G T S Q A R I  
 TCACCTTGGCAAGAACCGTTAGGAGCGCCCTGAGAGCATATGGTATGGACTTGACCGCC  
   T L R R T V R S A P E S I W Y G L D R P  
 CCAAGTCTCTTGGCCCCCTTCTCGGAACAGAGCCCATCGTATCTCAGCGGAGAAATTTCCAG  
   K F L G P F S E Q T P S Y L T G E F P G  
 GTGACTACGGTGGGACACGGTCGGGCTCTCTGCGGATCTGAGACCTTCGCCAAAAACA  
   D Y G W D T V G L S A D P E T F A K N R  
 GAAAGCTGGAGGTGATCCACAGCAGATGGGCCATGTTGGGGCGCTGGGTTGCGTTTTCC  
   K L E V I H S R W A M L G A L G C V F P  
 CGGAGTTGTTGGCTAAAACCTGGTGTAAATTTGGGGAACCATGTGTTTCAAGCCGAGG  
   E L L A K T G V K F G E T M W F K A E A  
 CGCAGATATTCTCAGAGGGAGGCTCGACTACCTGGGGAACCCTAACCTGATCCATGCGG  
   Q I F S E G G L D Y L G N P N L I H A Q  
 AGAGCATTCTAGCCATCTGGGCGTTACAGGTAGTGCTCATGGGATTGATTAGGGGATACA  
   S I L A I W A L Q V V L M G L I E G Y R  
 GAGTTGGGGGAGACCCCTTGGTGAGGAGCTGGACCTCTGTACCCAGGGGAGCCCTTCG  
   V G G G P L G E E L D P L Y P G G A F D  
 ACCCACTGGGCTGGCCGACGACCCGGAGGCGTTGCGGGAGCTGAAGGTGAAGAGATTA  
   P L G L A D D P E A F A E L K V K E I K  
 AGAAGGGGCGCTGGCCATGTTTCCATGTTGCGCTTCTTCTGTCAGGCAATTTGTACCG  
   N G R L A M F S M F G F F V Q A I V T G  
 GGAATGGCCCATGAAAATCTCTACGACCACTTGGTTTGTTAGGGAGATGGGAGGATG  
   N G P I E N L Y D H L  
 TCGCGCAAGCGTTTGACAAAAGGCATACCAAGATTTGGGCTCATGGAGAGGCCCTGAAC  
 CACGCCACGACATAATAGATCTTCTGGAGAGGCTTTGAGAAACCCCTCGTGAGAGGCAG  
 GTTCAGATGCCGTCCAGCCCTGCTCGGCTCTGCAGAAGATGGTGCTGTGAAGGAAAAAA  
 AAGAAAAGAAACAGGCAAGGTTGGGCTCTTGGCCCTTTCAAAATCAAAATCACACAGA  
 TCTCAGGCAAAAACCACTCTGCAATGGGTACACCCTTCAGATCTGGTGAGAAATCTCAAG  
 TAAATCTGGAACGTCGATTGGGATCCCTCTGCGCTACAGAGACTTATATTTCAAGGTA  
 ACAAATCGAAGATATTCTTCTCTCTCTTACAGCATAAAAAATAATAGCTCTTTAG

図4. クロマツ c a b - 3 遺伝子の塩基配列。

推定されたアミノ酸配列を1文字表記で塩基配列の下にします。

CAAT, TATA のボックス配列をアンダーラインでします。

AAATCAGCATTACACCATGCAAAATTTGAGCGCCAGACAAGTATTCACCAATTT  
 CAGTGCCACCAATTTAGATAGTTGATTTTCCCTAATACCAATGTAATAAGTTAGATTGA  
 TTCAAAATTTATTTTATTTAGATACATCCTAGTCATTCTGACAGGATATTTTCTGTAATTT  
 AGTTATAAATACTTCAATTTGTTGAAGTAATAGAGGTTGTTTTTTCACGAAGAACATTATT  
 GTATATTTTCTAAAGCATCACCAGATTACCAGTAATACAAAAGCTCTTTCCGGTACTTTGT  
 GTGATCTATAATCTGTAACAAAAGGGAGGATTTTAGGGCTACCATGGCAACAGCTTCAG  
 M A T A S A  
 CCATCCAGAGCTCAAGCTTCGACGGCCAGACCTCTTGAGGCCGACGAGAATGAGCTTG  
 I Q S S S F A G Q T L L R P Q Q N E L V  
 TCAAGAAGGTGGGCACGTCGACGGCTCGAATCACCATGCGAAGAACCCTCAGGAGCGCCC  
 K K V G T S Q A R I T M R R T V R S A P  
 CTGAGAGCATATGGTATGGACCTGACCGCCCCAAGTTCCTTGGCCCCCTTCTCGGAACAGA  
 E S A T I W Y G P D R P K F L G P F S E Q T  
 CGCCATCTGATCTCACGGGAGAATTTCCAGGCGACTACGGGTGGGACACGGCCGGGCTCT  
 P S Y L T G E F P G D Y G W D T A G L S  
 CTGCGGATCCTGAGACCTTCGCCAAAAACAGAGAGCTGGAGGTGATCCACAGCAGATGGG  
 A D P E T F A K N R E L E V I H S R W A  
 CCATGTTGGGGGCGCTGGGTTGCGTTTTCCGGAGCTGTTGGCTAAAAACGGGTGTGAAAT  
 M L G A L G C V F P E L L A K T G V K F  
 TTGGGGAACCATGTGTTCAAGCGCGGGCACAGATATTTCTCAGAGGGAGCGCTCGACT  
 G E T M W F K A G A Q I F S E G G L D Y  
 ACCTGGGAACCTTAACCTGATCCATGCGCAGAGCATTTTAGCCATCTGGGCGTTACAGG  
 L G N P N L I H A Q S I L A I W A L Q V  
 TTGTCTCATGGGATTGATTAAGGGATACAGAGTTGGGGAGGACCCCTTGGTGAGGAGC  
 V L M G L I K G Y R V G G G P L G E E L  
 TAGACCCCTCTGTACCCAGCGGAGCCTTCGACCCACTGGGGCTGGGCGACGACCCGGAGG  
 D P L Y P G G A F D P L G L G D D P E A  
 CGTTCCGGGAGCTGAAGGTGAAGAGATTAAGAACGGGCGGCTGGCCATGTTCTCCATGT  
 F A E L K V K E I K N G R L A M F S M F  
 TCGGCTTCTCGTGACGGCAATTGCGACCGGGAAGGGCCCATTTGAAATCTCTACGACC  
 G F F V Q A I A T G K G P I E N L Y D H  
 ACTTGGTTTGGTTAGGGAGATGGGAGGATGTGCGGCAAGCGTTTGACAAAAGGCATCACC  
 L  
 AAGATTTGGGCTCATGGAGAGGCCTGAACCTCACGCCACGCACATAATAGATCTTCTGGAG  
 AGGCTTTGAGAAACCCCTCGTGAGAGGCAGTGTTCTAGATGTCTGCCAGCCCTGCTCGGTCT  
 CTGCAGAAAGATGGTGCTGTGAAGGAAAAAAGAAAAAGAACAGGCACAGGTGGGCTCT  
 CTGCCCCCTTTTCAGATTCAATCACACAGATCTCAGGCAAAACCACTCTGCAATGGGTAC  
 ACCCTTCAGATCTGGTGACAGATCTCAAAAGTAAATCTGGAACGCTATACGGGATCCCT  
 CTGCCCTACAGAGACTTATATTTCAAGGTAACAACTCGAAGATATTTCTTCTCTCTCT  
 CTTACAGCATAAAAAATAAGCTCTTTAGTGTTCCTTCGTTTGAGAGGTGGCGCTG

図5. クロマツ c a b - 4 遺伝子の塩基配列.

推定されたアミノ酸配列を1文字表記で塩基配列の下にします.

CAAT, TATA のボックス配列をアンダーラインでしめす.



GAATTCCTTACTGGGGTTGTAAAGCCTATCCTCCCTTGGCAATGATTTCTCCAAATAAA  
-2000  
CAATACATTCTAGGCAACATACAAGATCTCAAGCCCTGTTGTTCTTATTCTAGACTC  
-1900  
CAATTTTTTGCTTTATATCTTCATTTTTTAACTCCTCCTACCCCTTATATGTCATGA  
GCCTTTGGCCTTACATTTTTCTTTAATGCATGGAATCCATCTTCAACATTCCCCCTTTC  
-1800  
TGGATGGTTTAAATAGAATTGCTAGCACCCAGTTGTTGCATCCGCTTAGCCTCTCACTAT  
CAAACCTCCTCCCTTCATGGTTCTATACTCTAGATTGAAATTTGAACCTCTCCAATTCC  
-1700  
TCTACCCAGTCACCAAGCTTGGTCCCTCTCACTCGTTCGCTTTCACACCCCTCTCCCTA  
-1600  
ATCTTTGACTCTGTCATCCTATTGGAATTATCATTTCACTCCTCCTTGCCAACTCTCAT  
CAATCAATAACAATGCTCTATAGAGGTTTTGTACTTTCTGGTCCAAGTTCTAGTGGGTG  
-1500  
TGAGCCATGTTTCGCAATCTCAAGCTCAAGCAATGCAAGGCAGCAACTTGCAGATACAT  
GGAACCTAGTCACTCAATGCAAGAAGAATTGGATGCTTCTAGACATGAAGTTATGATCAA  
-1400  
AAGAAAGTTTCTATAGGACATATAGTTGGAAGAAGATGTGGGGCAATGGGTCTTAAACAT  
-1300  
GAGTAACACTCATACTAAGCAAACCTTAATATAAGCAAATATGGACATACGTTGGCAGTT  
AAAAATGATCATGGAAGATGCTTGGTTGAAAGGAGTGAAGCCCATGGGAGAAATCCTCCT  
-1200  
TTGCATCAATGCTTTGCAACGAGAAGTCAATAAAATGGCAATAAAATCTCAGTGGTTGC  
CAAAAACTGGCAAAATTTGGATTTTTTCAACACTGAAGAGGATGATGAGATCCATACCC  
-1100  
CTATCTAGGTGGACTCCCCAATAGATAAACATGTTTATGGATTTTTAGTTTAGACCTA  
-1000  
CACATAGTTGTTAAGGTTTTTATTATTGAAGCTATTTTCAGTGTTAAACTTAGTTACTC  
AGTTAAATATTTCTCTATTTTGAGATGTATTTAAAACTTTAGATATAACTACTATTATT  
-900  
CAATATACTTTCCCTAATAAATATGATTTTGAATTAACCTTAGCTAATAATGTAAGTAG  
GATAATTAATTTTTTAATAAATCAAATTAATTATCATAACCTTTATAATATTTTAACATT  
-800  
CATATTAATGAAATTTTTATTAATAATCTTTATTCTTTATTTAATTATATTCTTTCTAT

図6. クロマツ *c a b* - 6 遺伝子の塩基配列.

推定されたアミノ酸配列を1文字表記で塩基配列の下にします.  
CAAT, TATA のボックス配列およびポリ (A) のシグナル配列をアン  
ダーラインで, イントロンのスプライス部位の共通配列 (GT - AG)  
をオーバーラインでします. 配列の上の数字は, 転写開始点からの  
距離をあらわす.

TCTAATACTAAATCAAATTTTAGCATTGATGTATGCAATAATCATTATATAAACTT -700  
 TAGCATTGATATATCCAATAATCAATTTTTCCATAAATTTTATAAATAATACAT  
 TTTTATTGAGTTGTGAAGGCCGAGGAATTGCTGTATGGTCAAAAGTGGCGAACCATCAA -600  
 AAGTGGCCGGAATTTGGGCAAAACAAAATCAAGAAATCTTCTAGTAGCGGAGTGTGTAA  
 TCATGTTTTTGATAGTGGAATAGGCTCAGCACCATCAAAAACCTCTAGAGACCCAAAA -500  
 TCGTGAAGTTTGACAGTTATAACCCAGATTTACAAAATCTGTGCCATATTTATCAAAA -400  
 TCTAACTAAAATTTCCATAATTTTCAAATCAAGAAACAAAATAATTAACGCGCATCA  
 AGTTTTAAATTTCTCACTTTTCATTTTTCATTTTAAAGAGCATTATGCAATTTTCATT -300  
 TCAAAGAGCATTAAATTCACTTTCCCTTTCCCAATTTTGCATGCTTATTTTAAAGTGA  
 TATCCATGTCAAATAGAGGAACTAGAAGATTCTTGTGAGCCCGAAGTCCTATCTGGACA -200  
 AGATCTCGAAATTTGGAATTCGATGGCTAAAGATTCAAGGAAATATGGCCTTGAGATGGGA -100  
 TATTTGGGGAACCAATAGAAGGTAAGAAGGCTGGCCTTCGGTAAGGCACGACAGCACC  
 GTCCGCTATATATGCCCTTCTTACCTTATGTATCTTTCAGAATAACAGCTCATCACTCGC +1  
 ATTACCTGACTTTGGTCTGAGCATTTTTCTCGTCGCACGTTCCACATGGCAACAGCTTC  
 M A T A S  
 AGCCATCCAAAGCTCAAGCTTGGCAGGCCAGACCTCCTAAGGCCGAGCAGAATGAGCT 100  
 A I Q S S S L A G Q T L L R P Q Q N E L  
 CGTCAAGAAAGTGGGACGGCGCAGGCTCGAATCACCATGCGAAGAACCCTAAGGAGCGC 200  
 V K K V G T A Q A R I T M R R T V R S A  
 CCCCGAGAGCATTGGAATACTGCTTTGGACTCCTTTAGCACCCATTTTGAAATTTAGCT  
 P E S I W  
 ATGCAATCTTTTATATACATGGTATGTTTCATTCTGCCGTTTGAACCATGTGACCGTCGG 300  
 TCCGTCGGTTCTCGCAGGTATGGACCTGACCGCCCCAAGTACCTAGGCCCTTCTCGGAA  
 Y G P D R P K Y L G P F S E  
 GGGACGCGTCAATATCTACCGGAGAATTTCCGGCGACTACGGGTGGGACACTGCCGGC  
 G T P S Y L T G E F P G D Y G W D T A G  
 CTCTCGGCGGATCCAGAGACCTTCGAAAAACAGAGAGCTGGAGGTGATCCATGCAGAG 500  
 L S A D P E T F A K N R E L E V I H C R  
 TGGCCATGTTGGGAGCCCTCGGCTGCCCTTTCCGGAGCTGTTGGCAGAAATGGGGTG  
 W A M L G A L G C L F P E L L A K N G V

600

AAATTTGGGGAAGCTGTGTGTTCAAGCCGGGGCGCAGATATTCTCAGAGGGAGGCTT  
 K F G E A V W F K A G A Q I F S E G G L

GACTACCTGGGGAAACCCAACCTGATCCACGGCAGAGCATTCTAGCCATCTGGGCTGC  
 D Y L G N P N L I H A Q S I L A I W A C

700

CAGGTGTCTCATGGGATTGATTGAAGGATACAGAGTGGGAGGAGACCCCTTGGAGAG  
 Q V V L M G L I E G Y R V G G G P L G E

800

GGTGTGGACCTCTGTACCCAGGGGTGCCTTCGACCCACTGGGGCTGGCCGACGACCC  
 G L D P L Y P G G A F D P L G L A D D P

GAGGCTTCGCGGAGCTGAAGGTGAAGGAGATTAAGAACGGTCGGCTGGCCATGTTCTCC  
 E A F A E L K V K E I K N G R L A M F S

900

ATGTTGCGTTTCTTCGTTCAAGCAATCGTGACGGGAAGGGCCCATTTGAAATCTCTAC  
 M F G G F F V Q A I V T G K G P I E N L Y

GACCACTTGGCGGACCCGTTGCCAACAATGCCTGGGCTACGCCACCAATTCGTTCTCT  
 D H L A D P V A N N A W A Y A T N F V P

1000

GGCAAGTGAAGCTGACGAAAAATAAAGAGGCTGTGATCTGTGCATCAATCATTGACA  
 G K \*

1100

GCCTAGTGTTAATACTAATAAAATATGTTCTTTCAGCTGGATGTATTTGTTGGTGATCT  
 TCGTTAATAAAAAATTTTCTTTACGCTGGATGTATTTGTTGGTGATGTTGTATATGAGT

1200

TGAGCTCTTATAATGGTTTTTTTAAAGGATTGGGATAGTTATTTTGGCAGTAGTTTAACT  
 GATTGTTTTTTATCTCTGGAACACGAAAAATCTGGTAATATTTTGATCAATTTTGGT

1300

AGGGATTTTGTAAATTCAGGTTAAAGTTGTTAAATTTCAAGATTTTGAGTATCTCAGAT

1400

GTTTTAGTGGTGCTGAATCCATTACCACTTCAAAACACTATTTAAACACTGTTTCTAT  
 AAAATTTGTGAAATTTTTTTCCCTGGCCAACCTGGCAATTCCTCCACCTGGGTAGACTT

1500

GTCAGTTATTTTGCTACCTAGCCTCTGTAAGTGCTCACTGCCAAATTTGTGCAACCAACC  
 ACCTGAAAGTAGAGTATTGATGGTGCTAAAAACAGTGATCAATCTTTAATTAATAACCA

1600

CAAAATGTATAGTAAATCAATAATAACAACAAAACGACACAGATCTATTTTAAATACA

1700

AATTTAATGAACCTAGAGAGATCTAATTTTTTCACTTACAATTTTACTAAACAGTAA  
 AATGAATCTCAATAATTATTACATTTAAGCCCAAAAAAACTCAATAATTATTACATTT

1800

AAATTAGATATTCTGAATATGTAAGAGAATAATGTTATATTTAAATATATTAGTCTGC  
 ATATATAAGGTGTAATTAATTTATTTCCACAAATCCTGTGGCCGCTAGAACTGTACGG

1900  
 ATCCATCAAAACAGGTGCAACATGTTCAACATGACTGGCCCCAGTGTITTTTGAACCTCA  
 2000  
 AATGAAAAATTTATGTTCTGGAACATTCTGTATATATCTTTGTTACTTTTCAGCATGTTT  
 AGATTTTATTCTATGGTCATTTAGCTTCCAAGGGCAGATGATTTTTTTTATGGCTCAGA  
 2100  
 CAGTTCGTAACTTTGTTTTATGGCGGTCTGCTTTTACAACCATTTAGTGATTAGCTGA  
 AAAGTTCACCTGGCAGTCTTCTCTCTGAACTGCAGCCTTTTGTGAATAGCTGAAAAGT  
 2200  
 CATATTCCGGCAAGGAAATCTAACTTTTATGATTTTGAATGAATAACAAAAAGTAAA  
 2300  
 TTTTGCAGCCTTCTGTGAATAGCTGAAAAGTCGGGTTCAGTAAGGAAATGTAATTTTA  
 TGATTTGCAATGGAATAAGAAAAAATATTTTTTTCAGTAAAAAATTTGTAATTA  
 2400  
 AATAGTTTTATGGTTTTTAATTTCTATTAATTTTATGAAAGGTGTTGAGAGTGAGATT  
 ATATATAATTGAGTGGGTCATTTTTTATTAATATTAATATGTTTCTAAATACAATTAT  
 2500  
 TATTTTTCTATTCAAGATTAATAATCTCTAATCAAGAACTGCGTCTCTTTTTCAG  
 2600  
 AACATCTTTTTATTGTTTGGTGGAAAACAGGGGTGCCAATAAAATATTCATTTTTCC  
 TAGCTGTTTTTCAACAACAAAAATTTTACTTGGGAAATCTACAAAAAATGAAGGCC  
 2700  
 CAAGTATATCCCTATTATGCCAAAAAGAGAAAAAATAATAACCACATATTCATCAACT  
 AGTGTCACTTATCAGTTATGGAGGGATCTCGCAGTTTTTATTGGTTTCAGTTGGTGGAT  
 2800  
 CACACAGGATACAAGAGGCTTTGTGCTGGTGGAGTTCGTAGAATGCATCTTTTAGATCA  
 2900  
 ATTCCTCTTCTCCTCTTATCGGCAGTTTGAAGCAAAAAATAAACTAATATCCCGAGAT  
 GGGAGAGAAGATCAAAACCTGTTTTTGAGCAGATCATAATGTTGTATAATTTCTATCCCT  
 3000  
 AAGAAGTTGCTCTCAAGCAATCCAGAATTTAGAGTATCAGAGGAAGATTTCCAGTGGT  
 TATCTGAGAGCTTTTTTTGACGGAGTGGCTATTTTCATATCTATGAATGAAGATCAACACT  
 3100  
 TCTCTATTTATTGGAATGGTGGTAATGGTTCAACAATAAGGCCGAAGCTATGGCATTGG  
 3200  
 CGGGCTCCTTTAGCTCAACTCCTTCTAAATATTCAATCCTTCAGATATATGGGGATT  
 CCAAAACCAATAAGAACAGGGTTCAAGGAAATTATCCATTAAGAATCCTTTGTTATCTG  
 3300  
 GATGGATAAACATGATTAATGTTATGGAACAGCAAAAAGGATTACTCAATCAATCATG  
 TGGTCAGGTCGCAGAATTC

cab-1	CCTGATTAGCCTCTAAGGCTATGTACCTCTCAGATGGGCATTTTTCCTTTTGTATGTTG
cab-3	GTTAGAGAGCGAGAAGATGGTAAGGGAAGAGTGAGTAAGAGAAACGAGAAATGGGTGGT
cab-4	AGGTATTCACCACTTCAGTGCCACCAATTTAGATAGTTGATTTTCCCTAATACCAATTG
cab-6	TTATTTTAAAGTGATATCCATGTCAAATAGAGGAAATCAGAAAGATTCTGTGAGCCCGAA
cab-1	CATGCTTGTAGCATTAGTCAACAAACATGGTCGAGGTGAGACCACATGAATTTTGACATC
cab-3	CCAAAACCAATAACTAGATCTTGTAAAGCAAGACTGATAGTATTGTAATGAGGATTGTTTT
cab-4	TAATAAGTTAGATTGATTCAAATTTATTATTTTAGATACATCCTAGTCATTCTGACAGG
cab-6	GTCTATCTGGAACAAGATCTCGAAATGGAAATCGATGGCTAAAGATTCAAGGAAATATGG
cab-1	TTTGATATGTTTTTTTGTAAATAGAACTCTTCGACTTACAAAAAATTTATTATTAAT
cab-3	TGTATCTATGTAAATTTTATTTTAAAGATACCAAAACAGGGTGAGTATGTGAATTTGA
cab-4	ATATTTTCTGTAAATTAGTTATAAATACTTCAATTGTTGAAGTAATAGAGGTTGTTTTT
cab-6	CCTTGAGATGTGGATATTTGGGGAACCAATAAGAAAGTTAAGAGGCTGGCGCTTCGGATAA
cab-1	TATGAATTTTTTTAATTTCTATTAATTTAATTTATATATATAAATACTACTTGTAGTCATG
cab-3	TATATCTTTGAGTGTGTATCATCCAACATAAATGTATCGATTCTGATTCGATTCTGAT
cab-4	CACGAAGAACATTATGTTATTTTCTAAGCATCACCAGATTACCAGTAATACAAAAGC
cab-6	GGCAGACAGCACCCTCCGCTATATATGCCCTTCTTACCTTATGTATCTTTCAGAATAAC
cDNA	CGCATTACCTGACTTTGGTCTGAGCATTTTTCGTCGTCACGTTCCACC
cab-1	TTTCATACAACATCTTAAGTTTTGCTGACTCTAAGCTTTTCAATTCACACTAACGAGACC
cab-3	AAATATTGTGATCTTCCTGTTGAGTAACATTGATAAACTCTCGGTCTTAGGGCTCACC
cab-4	TCTTTCGGTACTTTGTGTATCTATAATCTGTAAACAAAAGGAGGATTTTAGGGCTCACC
cab-6	AGCTCATCTCGCATTACCTGACTTTGGTCTGAGCATTTTTCGTCGTCACGTTCCACC
cDNA	ATGGCAACAGCTTCAGCCATCCAAAGCTCAAGCTTGGCAGGCCAGACCTCTCTAAGGCCG
cab-1	ATGGCAACAGCTTCAGCCATCCAGAGCTCAAGCTTCCGAGGCCAGACCTCTCTAGGCCG
cab-3	ATGGCAACAGCTTCAGCCATCCAGAGCTCAAGCTTCCGAGGCCAGACCTCTCTAGGCCG
cab-4	ATGGCAACAGCTTCAGCCATCCAGAGCTCAAGCTTCCGAGGCCAGACCTCTCTAGGCCG
cab-6	ATGGCAACAGCTTCAGCCATCCAAAGCTCAAGCTTGGCAGGCCAGACCTCTCTAAGGCCG

図7. クロマツ *cab* 遺伝子の塩基配列の比較.

クロマツ *cab* 遺伝子の cDNA (pDLHC2176, Yamamoto *et al.* 1988) の配列を併記した. 6 段目の左端が翻訳開始コドン(ATG). 配列の上に v 印でしめしたのが *cab*-1, 3, 4 と *cab*-6 のホモロジーがなくなる部分 (4 ページ目の 2 段目). 同様に \* 印でしめしたのが *cab*-6 の終端コドン (4 ページ目の 3 段目). ----- は欠失部分. CAAT, TATA のボックス配列, ポリ(A)シグナル配列をアンダーラインでしめす.



cDNA CAGCAGAATGAGCTCGTCAAGAAAGTGGGCACGGCGAGGCTCGAATCACCATGCGAAGA  
 cab-1 CAGCAGAATGAGCTTGTCAAGAAGGTGGGCACGTCCGAGGCTCGAATCACCATGCGAAGA  
 cab-3 CAGCAGAATGAGCTTGTCAAGAAGGTGGGCACATCGCAGGCTCGAATCACCATTGCGAAGA  
 cab-4 CAGCAGAATGAGCTTGTCAAGAAGGTGGGCACGTCCGAGGCTCGAATCACCATGCGAAGA  
 cab-6 CAGCAGAATGAGCTCGTCAAGAAAGTGGGCACGGCGAGGCTCGAATCACCATGCGAAGA

cDNA ACCGTAAGGAGCGCCCCGAGAGCATTTG-----  
 cab-1 ACCGTGAGGAGCGCCCCGAGAGCATATG-----  
 cab-3 ACCGTTAGGAGCGCCCCGAGAGCATATG-----  
 cab-4 ACCGTCAGGAGCGCCCCGAGAGCATATG-----  
 cab-6 ACCGTAAGGAGCGCCCCGAGAGCATTTGGTAAACTGCTTTGGACTCCTTTAGCACCCAT

cDNA -----  
 cab-1 -----  
 cab-3 -----  
 cab-4 -----  
 cab-6 TTGAAATTAGCTATGCAATCTTTATATACATGGTATGTTCTCTGCGCTTGAAAC

cDNA -----GTATGGACCTGACCGCCCCAAGTACCTAG  
 cab-1 -----GTATGGACCTGACCGCCCCAAGTTCCTTA  
 cab-3 -----GTATGGACCTGACCGCCCCAAGTTCCTTG  
 cab-4 -----GTATGGACCTGACCGCCCCAAGTTCCTTG  
 cab-6 CATGTGACCGTCCGTCGGTCTCGCAGGTATGGACCTGACCGCCCCAAGTACCTAG

cDNA GCCCCTTCTCGGAAGGAGCGCGTCATATCTCACGGAGAAATTCACGGGACTACGGGT  
 cab-1 GCCCCTTCTCGGAACAGACGCCATCGTATCTCACGGAGAAATTCACGGGACTACGGGT  
 cab-3 GCCCCTTCTCGGAACAGACGCCATCGTATCTCACGGAGAAATTCAGGTGACTACGGGT  
 cab-4 GCCCCTTCTCGGAACAGACGCCATCGTATCTCACGGAGAAATTCACGGGACTACGGGT  
 cab-6 GCCCCTTCTCGGAAGGAGCGCGTCATATCTCACGGAGAAATTCACGGGACTACGGGT

cDNA GGGACACTGCCGCGTCTCGCGGATCCAGAGACCTTCGCAAAAAACAGAGAGCTGGAGG  
 cab-1 GGGACACGGCGGGCTCTCGCGATCCGAGACCTTCGCCAAAAACAGAGAGCTGGAGG  
 cab-3 GGGACACGGTCGGGCTCTCGCGATCCGAGACCTTCGCCAAAAACAGAAAGCTGGAGG  
 cab-4 GGGACACGGCGGGCTCTCGCGATCCGAGACCTTCGCCAAAAACAGAGAGCTGGAGG  
 cab-6 GGGACACTGCCGCGCTCTCGCGGATCCAGAGACCTTCGCAAAAAACAGAGAGCTGGAGG

図 7. 続き

cDNA	TGATCCACTGCAGATGGGCCATGTTGGGAGCGCTCGGCTGCGTTTTCCCGAGCTGTTGG
cab-1	TGATCCACAGCAGATGGGCCATGTTGGGGGCGCTGGGTTGCGTTTTCCCGAGCTATTGG
cab-3	TGATCCACAGCAGATGGGCCATGTTGGGGGCGCTGGGTTGCGTTTTCCCGAGTTGTTGG
cab-4	TGATCCACAGCAGATGGGCCATGTTGGGGGCGCTGGGTTGCGTTTTCCCGAGCTGTTGG
cab-6	TGATCCACTGCAGATGGGCCATGTTGGGAGCCTCGGCTGCGTTTTCCCGAGCTGTTGG
cDNA	CCAAAAATGGGTTGAAATTTGGGGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCCGGGGCGCAGATATTCT
cab-1	CTAAAAACCGGTGTGAAATTTGGGGAACCATGTGGTTCAAGGCCGGGGTCAGATATTCT
cab-3	CTAAAACTGGTGTGAAATTTGGGGAACCATGTGGTTCAAGGCCGAGGCGCAGATATTCT
cab-4	CTAAAAACCGGTGTGAAATTTGGGGAACCATGTGGTTCAAGGCCGGGGCAGATATTCT
cab-6	CCAAAAATGGGTTGAAATTTGGGGAAGCTGTGTGGTTCAAGGCCGGGGCGCAGATATTCT
cDNA	CAGAGGGAGGCCTTGACTACGCTGGGAACCCCAACCTGATCCACGCGCAGAGCAATTCTAG
cab-1	CAGAGGGAGGCCTTGACTACCTGGGAACCCCTAACCTGATCTATGCGCAGGGCAATTCTAG
cab-3	CAGAGGGAGGCCTTGACTACCTGGGGAACCCCTAACCTGATCCATGCCAGAGCAATTCTAG
cab-4	CAGAGGGAGGCCTTGACTACCTGGGGAACCCCTAACCTGATCCATGCCAGAGCAATTTAG
cab-6	CAGAGGGAGGCCTTGACTACCTGGGGAACCCCAACCTGATCCACGCGCAGAGCAATTCTAG
cDNA	CCATCTGGGCCTGCCAGTTGTCTCATGGGATTGATTGAAGGATACAGAGTGGGAGGAG
cab-1	CCATCTGGGCCTTACAGTTGTGCTCATGGGATTGATTGAGGATACAGAGTTGGGGGAG
cab-3	CCATCTGGGCCTTACAGTTGTGCTCATGGGATTGATTGAGGATACAGAGTTGGGGGAG
cab-4	CCATCTGGGCCTTACAGTTGTGCTCATGGGATTGATTGAAGGATACAGAGTTGGGGGAG
cab-6	CCATCTGGGCCTGCCAGTTGTCTCATGGGATTGATTGAAGGATACAGAGTGGGAGGAG
cDNA	GGACCCCTTGGAGAGGGGTTGGACCTCTGTACCAGGGGGTGCCCTTCGACCCACTG666C
cab-1	GACCCCTTGGTGAGGAGCTGGACCTCTGTACCAGGGGGAGCCTTCGACCCACTG666C
cab-3	GACCCCTTGGTGAGGAGCTGGACCTCTGTACCAGGGGGAGCCTTCGACCCACTG666C
cab-4	GACCCCTTGGTGAGGAGCTAGACCTCTGTACCAGGGGGAGCCTTCGACCCACTG666C
cab-6	GACCCCTTGGAGAGGGGTTGGACCTCTGTACCAGGGGGTGCCCTTCGACCCACTG666C
cDNA	TGGCCGACGACCCGAGGCCTGCGCGGAGCTGAAGGTGAAAGAGATTAAGAACGGTCGGC
cab-1	TGGCCGACGACCTGGAGGCGTTTCGCGAGCTGAGGCTGAAGAGATTAAGAACGGCGCGC
cab-3	TGGCCGACGACCCGAGGCGCTTCGCGGAGCTGAAGGTGAAAGAGATTAAGAACGGCGCGC
cab-4	TGGCCGACGACCCGAGGCGTTTCGCGGAGCTGAAGGTGAAAGAGATTAAGAACGGCGCGC
cab-6	TGGCCGACGACCCGAGGCCTTCGCGGAGCTGAAGGTGAAGGAGATTAAGAACGGTCGGC

図 7. 続き

cDNA TGGCCATGTTCTCCATGTTTCGGTTTCTTCGTTACGGCAATCGTGACCGGGAAGGGCCCCA  
 cab-1 TGGCCATGTTCTCCATGTTTCGGCTTCTTCATGCAGGCAATTGTGACCGGGAAGGGCCCCA  
 cab-3 TGGCCATGTTCTCCATGTTTCGGCTTCTTCGTCAGGCAATTGTGACCGGGAATGGCCCCA  
 cab-4 TGGCCATGTTCTCCATGTTTCGGCTTCTTCGTCAGGCAATTGTGACCGGGAAGGGCCCCA  
 cab-6 TGGCCATGTTCTCCATGTTTCGGTTTCTTCGTTACGGCAATCGTGACCGGGAAGGGCCCCA

cDNA TTGAAAAATCTCTACGACCACTTGGCGGACCCGTTGCCAACAATGCCTGGGCCTACGCCA  
 cab-1 TTGAAAAATCTCTACGACCACTTGGTTTGGTTAGGGAGATGGGAGGATGTGCGGCAAGCGT  
 cab-3 TTGAAAAATCTCTACGACCACTTGGTTTGGTTAGGGAGATGGGAGGATGTGCGGCAAGCGT  
 cab-4 TTGAAAAATCTCTACGACCACTTGGTTTGGTTAGGGAGATGGGAGGATGTGCGGCAAGCGT  
 cab-6 TTGAAAAATCTCTACGACCACTTGGCGGACCCGTTGCCAACAATGCCTGGGCCTACGCCA

cDNA CCAATTTGTTCTCGGCAAGTGAAGGTGACGGAATAAAAGAGGCCTGTGATCTGTGCA  
 cab-1 TTGACAAAAGGCATCACCAAGATTGGGCTCATGGAGGGCCTGAATCAGCCACGCAAC  
 cab-3 TTGACAAAAGGCATCACCAAGATTGGGCTCATGGAGGGCCTGAATCAGCCACGCAAC  
 cab-4 TTGACAAAAGGCATCACCAAGATTGGGCTCATGGAGGGCCTGAATCAGCCACGCAAC  
 cab-6 CCAATTTGTTCTCGGCAAGTGAAGGTGACGGAATAAAAGAGGCCTGTGATCTGTGCA

cDNA TCAATCATTGACAGCCTTAGTGTTAATA-----AAATATGTTCTTTCAGCTGGATGTA  
 cab-1 ATAATAGATCTTCTGGAGAGGCTTTGAGAAACCTCGTGAGAGGCAGTGTTCAGATGCCG  
 cab-3 ATAATAGATCTTCTGGAGAGGCTTTGAGAAACCTCGTGAGAGGCAGTGTTCAGATGCCG  
 cab-4 ATAATAGATCTTCTGGAGAGGCTTTGAGAAACCTCGTGAGAGGCAGTGTTCAGATGTCG  
 cab-6 TCAATCATTGACAGCCTTAGTGTTAATACTAATAAAATATGTTCTTTCAGCTGGATGTA

cDNA TTGTTGGTGATCTTCGTTAATAAAATATTTCTTTT  
 cab-1 TCCAGCCCCGCTCGGCCCTGCAGAAAGATGGTGCTGTGAAGGAAAAAAGAAAAAGAAC  
 cab-3 TCCAGCCCCGCTCGGCCCTGCAGAAAGATGGTGCTGTGAAGGAAAAAAGAAAAAGAAC  
 cab-4 TCCAGCCCCGCTCGGCCCTGCAGAAAGATGGTGCTGTGAAGGAAAAAAGAAAAAGAAC  
 cab-6 TTGTTGGTGATCTTCGTTAATAAAATATTTCTTTTCAGCTGGATGTAATTGTTGGTGAT

cab-1 AAGCACAGGATGGGCTCTCTGCCCTTTTCAGATTCAAAATCACACAGATCTCAGGCAAAA  
 cab-3 AGGCACAGGTTGGGCTCTCTGCCCTTTTCAAATTCAAATCACACAGATCTCAGGCAAAA  
 cab-4 AGGCACAGGTTGGGCTCTCTGCCCTTTTCAGATTCAAAATCACACAGATCTCAGGCAAAA  
 cab-6 GTTTGTATATAGTTGAGCTCTTATAATGGTTTTTTAAGGATTGGGATAGTTATTTGG

図 7. 続き

<Transit Peptide>

*Pinus thunbergii*

1. Pine(cab-6) MATASAIQSSSLAGQTLRLPQQNELVKKVGTAAQARITM
2. Pine(cab-4) MATASAIQSSSFAGQTLRLPQQNELVKKVGTQARITM
3. Pine(cab-3) MATASAIQSSSFAGQTLRLPQQNELVKKVGTQARITL
4. Pine(cab-1) MATASAIQSSSFAGQTLRLPQQNELVKKVGTQARITM

Higher plant Type II

5. Scots pine
6. Lemna MAASAIQSSAFAGQTLKQRDELVRKVGVDGRFSM
7. Tomato MATCAIQSSAFVGAQVGSQNEFIRKVGNFEGGRITM
8. Petunia MATSAIQSSAFAGQTLKLSQNELVRKIGSPGGGRATM

Higher plant Type I

9. Pine MASCGSGRCFAAGQISSLKPHNTQLLVGAGVHGAEARVTM
10. Scots pine MATTMASCGISGRCAFAGQQLSSVKPQNNQLLVGAGVHGAEARLT
11. Lemna MAASMALSSPSLVGKAVKLAPAASEVFGEGRVSM
12. Tomato MATSMALSSSPFAGKAVKLSPSSSEITGNGRVTM
13. Petunia MAAATMALSSSPFAGKAVKLSPSSSEITGNGRATM

<Mature Protein>

- RRTVRSAPES----IWYGPDRPKYLGPFSEGTPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RRTVRSAPES----IWYGPDRPKYLGPFSEGTQPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RRTVRSAPES----IWYGLDRPKYLGPFSEGTQPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RRTVRSAPES----IWYGPDRPKYLGPFSEGTQPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA

- RRTVKAPQS----IWYGADRPKYLGPFSSEGTQPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RRTVKSAPQS----IWYGEDRPKYLGPFSSEGTQPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RRTVKSAPQS----IWYGEDRPKYLGPFSSEGTQPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA

- RKATTKKVSASASTSPWYGPDRVLYLGPFSGEPPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RKATGKKSVAASIDSPWYGPDRVLYLGPFSGEPPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RKTAGKPKPVSSGS-PWYGPDRVLYLGPFSGEAPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RKTATKAPASSGS-PWYGPDRVLYLGPFSGESPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA
- RKTVTKAPVSSGS-PWYGPDRVLYLGPFSGEAPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFA

図8. *c a b* 遺伝子のアミノ酸配列の比較。

トランジット・ペプチドと成熟タンパク質部分にわけた。その切断部位は光化学系IのC A Bタンパク質の切断部位(Ikeuti *et al.* 1991)から推定した。参考文献は以下の通り。

1. *Pinus thunbergii* (cab-6), this work.
2. *Pinus thunbergii* (cab-4), this work.
3. *Pinus thunbergii* (cab-3), this work.
4. *Pinus thunbergii* (cab-1), this work.
5. *Pinus sylvestris* (cDNA), Jansson and Gustafsson 1990.
6. *Lemna gibba* (AB19), Karlin-Neumann *et al.* 1985.
7. *Lycopersicon esculentum* (cDNA), Pichersky *et al.* 1987.
8. *Petunia hybrida* x *Petunia axillaris* (cab37), Stayton *et al.* 1986.
9. *Pinus thunbergii* (cDNA), Yamamoto *et al.* unpublished.
10. *Pinus sylvestris* (cDNA), Jansson and Gustafsson 1990.
11. *Lemna gibba* (AB30), Kohorn *et al.* 1986.
12. *Lycopersicon esculentum* (cab-3A), Pichersky *et al.* 1985.
13. *Petunia hybrida* x *Petunia axillaris* (cab91R), Dunsmuir 1985.

*Pinus thunbergii*

1. KNRELEVIHCRWAMLGALGVPELLAKNGVKFGEAVWFKAGAQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWACQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK
2. KNRELEVIHSRWAMLGALGVPELLAKTGKFGETWFKAGAQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWALQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK
3. KNRELEVIHSRWAMLGALGVPELLAKTGKFGETWFKAGAQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWALQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK
4. KNRELEVIHSRWAMLGALGVPELLAKTGKFGETWFKAGVQIFSEGGDLGPNPLIYAQQLAIWALQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK

Higher plant Type II

5. ELLVKNVGKFGAEVWFKAGAQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWACQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK
6. KNRELEVIHSRWAMLGALGVPELLAKNGVKFGEAVWFKAGAQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWATQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK
7. KNRELEVIHCRWAMLGALGVPELLAKNGVKFGEAVWFKAGSQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWACQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK
8. KNRELEVIHCRWAMLGALGVPELLAKNGVKFGEAVWFKAGSQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWAAQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGAFDPLGLADDPFAFAELKVK

Higher plant Type I

9. KNRELEVIHCRWAMLGALGVPELLARNGVKFGEAVWFKAGAQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWACQVILMGAVEGYRIAGGLPEYVTDPIYPGGSFDPLGLADDPFAFAELKVK
10. KNRELEVIHSRWAMLGALGVPELLARNGVKFGEAVWFKAGAQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWACQVILMGAVEGYRIAGGLPEYVTDPIYPGGSFDPLGLADDPFAFAELKVK
11. KNRELEVIHARWAMLGALGVPELLARNGVKFGEAVWFKAGSQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWATQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGSFDPLGLADDPFAFAELKVK
12. KNRELEVIHCRWAMLGALGVPELLARNGVKFGEAVWFKAGSQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWACQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGSFDPLGLADDPFAFAELKVK
13. KNRELEVIHCRWAMLGALGVPELLARNGVKFGEAVWFKAGSQIFSEGGDLGPNPLIHAQSILAIWACQVVLNGLIEGYRVGGGPLEGDLPLYPGGSFDPLGLADDPFAFAELKVK

*Pinus thunbergii*

1. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLYDHLADPVANNAWAYATNFYPGK
2. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIATGKGP1ENLYDHL
3. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGNGP1ENLYDHL
4. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLYDHL

Higher plant Type II

5. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLYDHLADPVANNAWAYATNFYPGK
6. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLADH1ADPVANNAWAYATNFYPGK
7. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLSDH1NDPVANNAWAYATNFYPGK
8. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLYDHVADPVANNAWAYATNFYPGK

Higher plant Type I

9. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLTDHLADPVNNAWAYATNFYPGK
10. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKGP1ENLADH1ADPVNNAWAYATNFYPGK
11. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKPLENLADH1ADPVNNAWAYATNFYPGK
12. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKPLENLADH1ADPVNNAWAYATNFYPGK
13. EIKNGRLAMFSMFGFFVQAIYTGKPLENLADH1ADPVNNAWAYATNFYPGK



1. ---MQL---STPEYVDMKNTYSNNECPAAEQELCEQGGRAGKSTKK-GAKAVSKSSSSANQFYGPDATSGWDLQHQB  
2. ---MA---PALAS-----RKALQVT-CKATGKTKAAKAAAPKS-SGVFYGPNRAKWLGPYSENA  
3. ---MAA---FALIS-----NRALTVC-VEAA-KKAAGTKQT-KAAPAKSA-GIEWYGPDRAKWLGPFTSN  
4. ---MAAA---TAMHSTALAGQSL-VKPVNELSRKVLGNVEARVTMRRTYSK---SAGSDTIWYGADRPKFLGPFSGE  
5. ---MAT---STAALTSTFSGQQL-KPVNELSRKVGAGE-ARYQMAAPKSK-----APSGSIWYGSDRPLVYLGPFSGS  
6. ---MATA---SAIQSSSLAGQTLRLRPQNELVKKVGTAQ-ARITMRR-TVR---SAPESIWYGDRPKYLGPFSGE  
7. ---MAA---SAIQSSAFAGQTL-KQRDELVRKVGYS-D-GRFSMRR-TVK---AVPQSIWYGADRPKFLGPFSEQ  
8. ---MAA---SALHQTSTFLGTA-PRRDELVRVYGDSC-GRITMRR-TVK---SAPQSIWYGDRPKYLGPFSGE  
9. ---MAT---CAIQQSAFYGVQAVG-KSQNEFIRKVGNGEGRITMRR-TVK---SAPQSIWYGEDRPKYLGPFSGE  
10. ---MAT---SAIQQSAFAGQTL-KSQNELVRKIGSFSGGRATMRR-TVK---SAPQSIWYGEDRPKYLGPFSGE  
11. ---MAT---SAIQQSAFTGKTGL-RQNEFIRKRGNGFQARFTMRR-TVK---SAPESIWYGDRPKYLGPFSGE  
12. ---MASCSSG-RCFAGGQISSLKPHNTQLLGGVAGYHGEARVTMRKATTKKYSASAST-SPWYGPDRVLYLGPFSGE  
13. MATTWASCGIGSRCAFAGQQLSSVKPQNNQLLGVGGA-HGEARLTMRKAT-GKKSVAASIDSPWYGPDRVLYLGPFSGE  
14. ---MAA---SMALSSPS---LVGKAVKLAPAASEVFGEGRVSMRK-TAGKPKPY-SSGSPWYGPDRVLYLGPFSGE  
15. ---MAAA---TVALSSP---V-MARAAPSTSSALFGEARITMRK-TAAKPKPAASSGSPWYGADRVLYLGPLSGE  
16. ---MAA---TTMSLSSSS---FAGKAVKNLP-SSALIGDARVNMRR-TAAKAKQV-SSSSPWYGS DRVLYLGPLSGE  
17. ---MAAA---TVALSSS---TFAGKAVKNLSSSEVQGDARVSMRK-TAAT-KKV--GSPWYGPDRVLYLGPLSGE  
18. ---MAA---STMAISS---T-A-MAGT-PIKVGSGEGRITMRK-TVGKPK-VAASGSPWYGPDRVLYLGPLSGE  
19. ---MAT---STMALSSS---TFAGKAVKLSPSSSEITNGRVTMRK-TATKAKP-ASSGSPWYGPDRVLYLGPLSGE  
20. ---MAAA---TVALSSPS---FAGKAVKFSPPSSSEITNGKATMRK-TYTKAKPY-SSGSPWYGPDRVLYLGPLSGE  
21. ---MASSSSSMALSSP---TLAGKQLKLPSSQEL-GAARFTMRK-SATT-KKVASSGSPWYGPDRVLYLGPLSGE  
22. ---MAA---STTALSSP---FAGKAVKLSPSSSEVTNGKVTMRK-TANKAKPY-SSGSPWYGPDRVLYLGPLSGE  
23. ---MAA---STMALSSPA---FAGKAVNLSPPAASEVLGSGRVTMRK-TVAKPKGP--SGSPWYGS DRVLYLGPLSGE  
24. ---MAAA---SSMALSSPS---LAGKAVKLGPSAPEV--GRVSMRK-TYTKQ-V-SSGSPWYGPDRVLYLGPLSGE

図9. c a b 遺伝子のアミノ酸配列のアラインメント。

構造遺伝子領域の配列が完全に明らかになっているものを対象にした。すべての配列の類似度が最大になるように、また長さをなるべく短くするように、ブランクを挿入してアラインメントをおこなった。参照文献は以下の通り。

1. *Dunaliella salina* (cDNA), Long *et al.* 1989.
2. *Chlamydomonas reinhardtii* (cab1-1), Imbault *et al.* 1988.
3. *Chlamydomonas moewusii* (cDNA), Larouche *et al.* 1991.
4. *Physcomitrella patens* (ZLAB1), Long *et al.* 1989.
5. *Polysticum munitum* (F3), Pichersky *et al.* 1990.
6. *Pinus thunbergii* (cab-6), this work.
7. *Lemna gibba* (AB19), Karlin-Neumann *et al.* 1985.
8. *Oryza sativa* (cDNA), Matsuoka *et al.* 1991.
9. *Lycopersicon esculentum* (cDNA), Pichersky *et al.* 1987.
10. *Petunia hybrida* x *Petunia axillaris* (cab37), Stayton *et al.* 1986.
11. *Pisum sativum* (cab-215), Falconet *et al.* 1991.
12. *Pinus thunbergii* (cDNA), Yamamoto *et al.* unpublished.
13. *Pinus sylvestris* (cDNA), Jansson and Gustafsson 1990.
14. *Lemna gibba* (AB30), Kohorn *et al.* 1986.
15. *Oryza sativa* (cDNA), Matsuoka *et al.* 1991.
16. *Triticum aestivum* (cab-1), Lampa *et al.* 1985a.
17. *Hordeum vulgare* (cab-2), Chitnis *et al.* 1988.
18. *Zea mays* (cab-1), Sullivan *et al.* 1989.
19. *Lycopersicon esculentum* (cab-3A), Pichersky *et al.* 1985.
20. *Petunia hybrida* x *Petunia axillaris* (cab91R), Dunsmuir 1985.
21. *Pisum sativum* (AB80), Cashmore 1984.
22. *Nicotiana plumbaginifolia* (cab-E), Castresana *et al.* 1987.
23. *Arabidopsis thaliana* (AB180), Leutwiler *et al.* 1986.
24. *Glycine max* (cab-3), Walling *et al.* 1988.

1. -PRLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFKRYRELELIHARCGLGALGMVTPELLADDEKIGKFDAAIWFKAGAAIFQDGG  
 2. TPAYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFKRYRELELIHARWAMLGALGCQTPELLA-KSGTKFGEA-VWFKAGAQIFSEGG  
 3. TPAYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFKRYRELELIHARWALLGALGILTPELLSTYAGVKFPEG-VWFKAGAQIFSEGG  
 4. TPSYLTNGEPPGDYGWDTAGLSADPETFARNRELELIHARWAMLGALGCLTPELLA-KSGVKFGEA-VWFKAGAQIFSEGG  
 5. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-KNGVKFGEA-VWFKAGSQIFAEGG  
 6. TPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-KNGVKFGEA-VWFKAGAQIFSEGG  
 7. TPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCIPELLS-KNGVKFGEA-VWFKAGAQIFSEGG  
 8. TPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFARNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLS-KNGVKFGEA-VWFKAGAQIFSEGG  
 9. TPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFARNRELELIHSRWAMLGALGCVPTEILS-KNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 10. TPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFARNRELELIHSRWAMLGALGCVPTEILS-KNGVTFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 11. IPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFARNRELELIHSRWAMLGALGCTPELLE-KNGVKFGEA-VWFKAGSQIFAEGG  
 12. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGAQIFSEGG  
 13. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGAQIFSEGG  
 14. APSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 15. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 16. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-GWFKAGSQIFSDGG  
 17. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 18. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLS-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 19. SPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 20. APSYLTGEFFPGDYGWDTAELSDPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 21. SPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFSKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLS-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 22. SPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG  
 23. SPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFARNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLA-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSDGG  
 24. PPSYLTGEFFPGDYGWDTAGLSADPETFAKNRELELIHSRWAMLGALGCVPTELLS-RNGVKFGEA-VWFKAGSQIFSEGG

1. LNYLGNPSLIHAQNIIVATLAVQVVLMLVEGYRYNG-GPAGEGLDPLYPGEAFDPLGLADDPDTFAELKVKIEKNGRLAM  
 2. LDYLGNSPLIHAQNIIVATSAYQVILMLIEGYRYNG-GPAGEGLDPLYPGESFDPLGLADDPDTFAELKVKIEKNGRLAS  
 3. LDYLGNSPALIHAQNIIVATLAVQVVLMLIEGYRYNG-GPAGEGLDPLYPGESFDPLGLADDPDTFAELKVKIEKNGRLAM  
 4. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRYAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDTFAELKVKIEKNGRLAM  
 5. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRYAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKELKNGRLAM  
 6. LDYLGNSPLIHAQSIILAIWACQVVLMLIEGYRYGG-GPLGEGLDPLYPGGAFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 7. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWATQVVLMLIEGYRYGG-GPLGEGLDPLYPGGAFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 8. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVVLMLIEGYRYGG-GPLGEGLDKLYPGGAFDPLGLADDPDTFAELKVKELKNGRLAM  
 9. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVVLMLIEGYRYGG-GPLGEGLDKLYPGGAFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 10. LDYLGNSPLIHAQSIILAIWACQVVLMLIEGYRYGG-GPLGEGLDKLYPGGAFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 11. LDYLGNSPLIHAQSIILAIWATQVVLMLIEGYRYGG-GPLGEGLDPLYPGGAFDPLGLADDPDAFAELKVKELKNGRLAM  
 12. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRIAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 13. LDYLGSPQLIHAQSIILAIWACQVILMGAIEGYRYAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 14. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWATQVVLMLIEGYRYAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 15. LDYLGNSPLIHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRIAG-GPLGEVTDPIYPGGAFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 16. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRIAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLAERPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 17. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRYAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 18. LDYLGNSPLIHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRIAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKELKNGRLAM  
 19. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRIAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 20. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRYAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 21. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWATQVILMGAVEGYRIAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKELKNGRLAM  
 22. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWACQVILMGAVEGYRYAG-EPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKIEKNGRLAM  
 23. LDYLGNSPLVHAQSIILAIWATQVILMGAVEGYRYACNGLGEADLLYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKELKNGRLAM  
 24. LDYLGNSPLIHAQSIILAIWATQVILMGAVEGYRIAG-GPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLADDPDAFAELKVKELKNGRLAM

1. FACLGFFVQAI VTGKGPIENLTDHLANPAENNAFAYATKFTP-Q- (DSCBP)
2. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLDDHLANPTVNNAFATKFTPSA- (CRCABA)
3. FSCGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPGTNNAFAATKFTPSA- (CMCAB32)
4. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATSPPGTR (PPCBP)
5. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLSDHLADPVANNAWAYATNFTPGK- (PMCABF3)
6. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLYDHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (CAB-6)
7. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHIADPVANNAWAYATNFVPGK- (LGAB19)
8. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLFDHVTDPVANNAWAYATNFVPGK- (OSLHCP2)
9. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLSDHIADPVANNAWAYATNFVPGK- (LECB4A)
10. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLYDHVADPVANNAWAYATNFVPGK- (PHCAB37)
11. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLYDHVADPVANNAWAYATNFVPG- (PSCAB215)
12. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLTDHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (PTCABB)
13. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (PSCAB11A)
14. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (LGLHCPAB)
15. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (OSLHCP1)
16. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHIADPVANNAWAYATNFVPGK- (TACAB)
17. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (HYCAB2)
18. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHIADPVANNAWAYATNFVPGN- (ZMCAB1)
19. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (LECBPB)
20. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (PECAB91R)
21. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (PSCAB80)
22. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (NPCABB)
23. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (ATLHCP1) 285 A. A.
24. FSMFGFFVQAI VTGKGPIENLADHLADPVANNAWAYATNFVPGK- (GMCAB3)

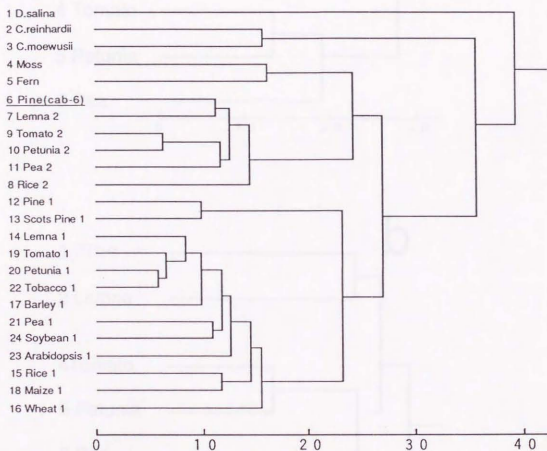


図10. *cab-6*遺伝子の遺伝子系統樹。

左の番号は図9と同じ。種名のあとの番号は、1はタイプI、2はタイプIIの *cab-6* 遺伝子をあらわす。下の目盛りはアミノ酸置換率(%)。文献は図9を参照。

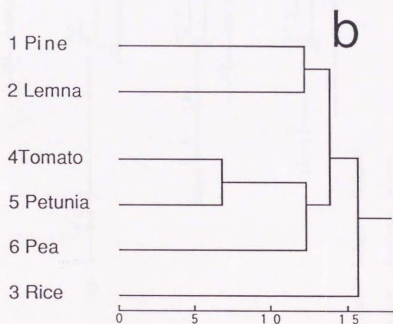
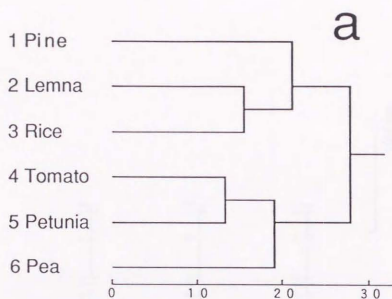


図 11. タイプ II c a b 遺伝子の遺伝子系統樹.

a は塩基置換率, b はアミノ酸置換率からもとめたもの. 下の目盛りは塩基置換率およびアミノ酸置換率 (%). *Pine* はクロマツの c a b-6 遺伝子. 文献は表 2 を参照.



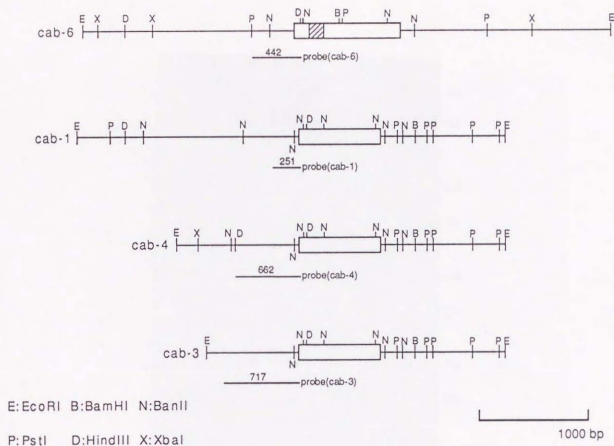


図 12. クロマト *cab* 遺伝子の制限酵素地図。  
 ボックスであらわしたのが構造遺伝子領域。cab-6 のボックス中の斜線域はイントロンをあらわす。  
 各遺伝子の下に、ノーザン・ハイブリダイゼーション、S1 マッピングで用いたプローブの位置と長さをしめす。

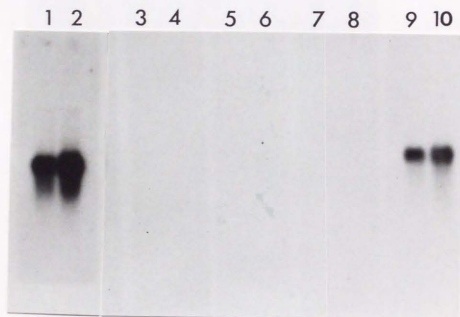


図13. クロマツ c a b 遺伝子の明・暗所子葉での発現量  
(ノーザン・ハイブリダイゼーション)。

レーン1, 3, 5, 7, 9はクロマツ暗所子葉のRNA, レーン2, 4, 6, 8, 10は明所子葉のRNA。レーン1, 2はクロマツ c a b のcDNAクローン (pPDLHC2176) をプローブとして c a b の全mRNA量をとらえた。レーン3, 4は c a b-1, レーン5, 6は c a b-3, レーン7, 8は c a b-4, レーン9, 10は c a b-6の特異的プローブを用いた (図12)。

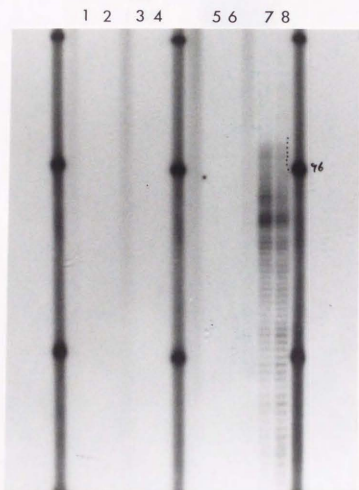


図14. クロマツ cab 遺伝子の明・暗所子葉での発現量  
(S1マッピング)。

レーン1, 3, 5, 7はクロマツ暗所子葉のRNA, レーン2, 4, 6, 8は明所子葉のRNA. レーン1, 2はcab-1, レーン3, 4はcab-3, レーン5, 6はcab-4, レーン7, 8はcab-6の特異的プロンプを用いた(図12)。

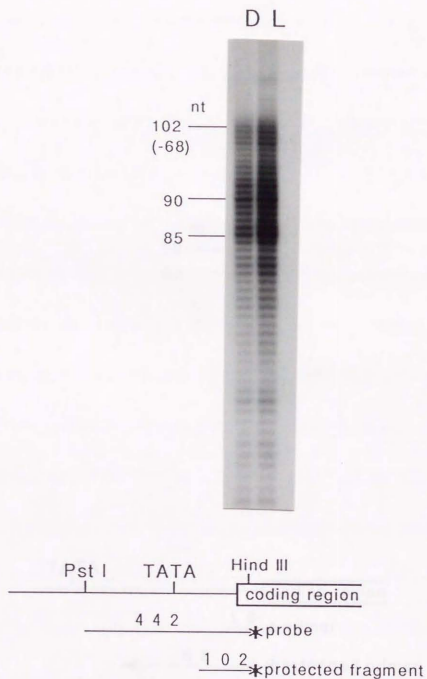


図15. クロマツ *c-ab-6* 遺伝子の明・暗所子葉での発現量および転写開始点の推定 (S1マッピング)。

Dは暗所子葉のRNA, Lは明所子葉のRNAを用いたもの。左の数字は検出された断片の長さをあらわす。カッコ内は翻訳開始点からの距離。

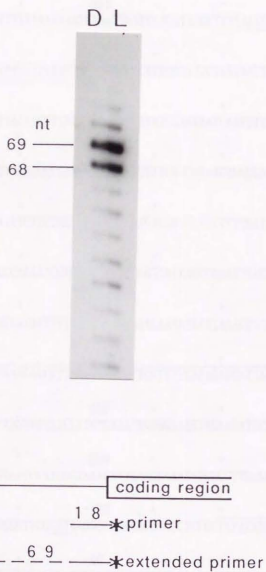


図16. クロマトc a b-6遺伝子の明・暗所子葉での発現量および転写開始点の推定（プライマー・エクステンション）.  
Dは暗所子葉のポリ（A）\*RNA, Lは明所子葉のポリ（A）\*RNAを用いたもの. 左の数字は検出された断片の長さをあらわす.



-1120        \*        \*        \*        -1080        \*        \*        \*  
 CACATAGTTGTTAAGGTTTTATTATTGAAGCTATTTTCAGTGTTAAACCTAGTTACTCAGTTAAATATTCTCTATTTT  
  
 -1040        \*        \*        \*        -1000        \*        \*        \*  
 GAGATGATTTAAAACTTTAGATATACTACTATTCAATATACCTTCCTAATAAATATGATTTTGTAAATTAACCTA  
  
 -960        \*        \*        \*        -920        \*        \*        \*  
 GCTAATAATGAAGTTAGGATAATTAATTTTTTAATAAATCAAATTAATTATCATAACCTTTATAATATTTTAAACATTCAT  
  
 -880        \*        \*        \*        -840        \*        \*        \*  
 ATTAATGAAATTTTTATAAAACTCTTATTCTTTATTTAATTATATCTTTCCATTCTAATAACTAAATCAAATTTTGT  
  
 -800        \*        \*        \*        -760        \*        \*        \*  
 CATTTTGATGTATGCAATAATCATTATAAAAACTTTAGCATTTTGATATATCCAATAATCAATTTTTCATATAATTTTAT  
  
 -720        \*        \*        \*        -680        \*        \*        \*  
 TTAATTAATTTACATTTTATTGATGTGGAAGCCGAGGAATTGCTGTATGTCAAAAGTGGCGAACCATCAAAAGTGG  
  
 -640        \*        \*        \*        -600        \*        \*        \*  
 CCGGAATTTGGGCAACAAAATCAAGAAATCTTCTAGTAGCCGAGTGTGTGAATCATGTTTTGTATGTGGAATAGGC  
  
 -560        \*        \*        \*        -520        \*        \*        \*  
 TCAGCACCATCAAAAACTCTAGAGCACCAAAATCGTGAAGTTTGACAGTTATAACCCAGATTATCAAAAAATCTGTGCC  
  
 -480        \*        \*        \*        -440        \*        \*        \*  
 ATATTTTATCAAAATCTAACTAAAATTTCCATAATTTTCAATCAAGAAACAAAATAATTAACATCGCAGCATCAAGTTT  
  
 -400        \*        \*        \*        -360        \*        \*        \*  
 AAAATCTCATTTTCATTTTTCATTTTAAAGAGCATTAATGCAATTTTCATTTTCAAGAGCATTAATTCATCTTCCCC  
  
 -320        \*        \*        \*        -280        \*        \*        \*  
 TTTCCCAATTTTGACATGCTTATTTTAAAGTGATATCCATGTCAAATAGAGGAACTAGAAGATTCTGTGAGCCCGAA  
  
 -240        \*        \*        \*        -200        \*        \*        \*  
 GTCTATCTGGACAAGATCTCGAAATTGGAATCGATGGCTAAAGATTCAAGGAAATATGGCCTTGAGATGTGGATATTG  
  
 -160        \*        \*        \*        -120        \*        \*        \*  
 GGGAACCAATAAGAAGGTAGAAGGCTGGCGTTTCGATAAGGCACGACGACCCGCTCGCTATATATGCCCTTCTTACCT  
  
 -80        \*        \*        \*        -40        \*        \*        \*  
 TATGTATCTTCAGAAATAACAGCTCATCACTCGCAATTAAGTCTGAGCATTTTTCTGCTGTCAGCTTCCAC  
  
 +1        \*        \*        \*        +30        \*        \*        \*        +60  
 ATG GCA ACA GCT TCA GCC ATC CAA AGC TCA AGC TTG GCA GGC CAG ACC CTC CTA AGG CCG

図17. クロマツcab-6遺伝子のプロモーター領域の構造と転写開始点。  
 ダイレクトリピート配列, TATA, CAAATのボックス配列をオーバーラインでしめす。  
 GATボックス (Castresana *et al.* 1988), AT-1ボックス (Datta and Cashmore  
 1989) の共通配列をアンダーラインでしめす。配列の上の数字は翻訳開始点からの距離。  
 S1マッピングで生じたフラグメントの位置を上向きの矢印で、プライマー・エクステン  
 ションで生じたフラグメントの位置を下向きの矢印でしめす。

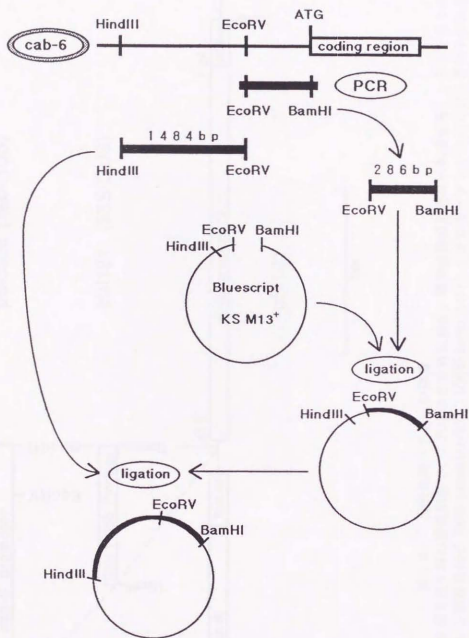


図18. クロマト *cab-6* 遺伝子のプロモーターのクローニング.  
*cab-GUS* のキメラ遺伝子を作成するため, *cab-6* 遺伝子のプロモーターをクローニングする手順をしめた. この後, クローニングした HindIII - BamHI 断片を切り出し, pB1101 のクローニングサイトに組み込んだ (図19).

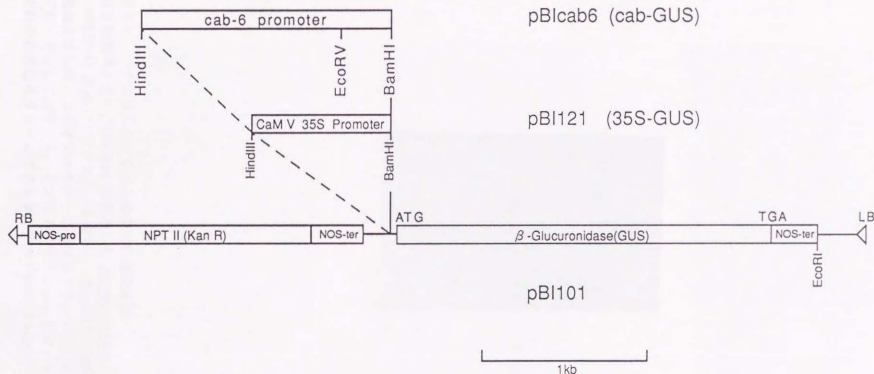


図19. 形質転換ベクターの構造

RB, LBはT-DNA領域を切り出す際の認識部位で、これにはさまれた部分が植物細胞の染色体へ転移する。pBI101のT-DNA領域上には、カナマイシン耐性遺伝子(NOS-promoter/NPT II/NOS-terminator)とプロモーターのないGUS遺伝子がある。pBI121, pBIcab6は、pBI101のGUS遺伝子の5'上流にそれぞれカリフラワー・モザイク・ウィルスの35Sプロモーター、クロマトz c a b -6遺伝子のプロモーターをつけ加えたもの。

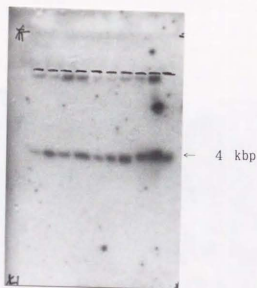


図20. アグロバクテリウムの形質転換の確認.

形質転換ベクター, pB1cab6 を導入した *Agrobacterium tumefaciense* (LBA4404) から T i プラスミドを抽出し, *Hind*III, *Bam*HI で切断した後, 電気泳動した. これをフィルターにうつしとり, GUS の構造遺伝子領域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. 各レーンはいずれも異なるクローンであるが, すべてに約 4 kbp のバンドが確認された.

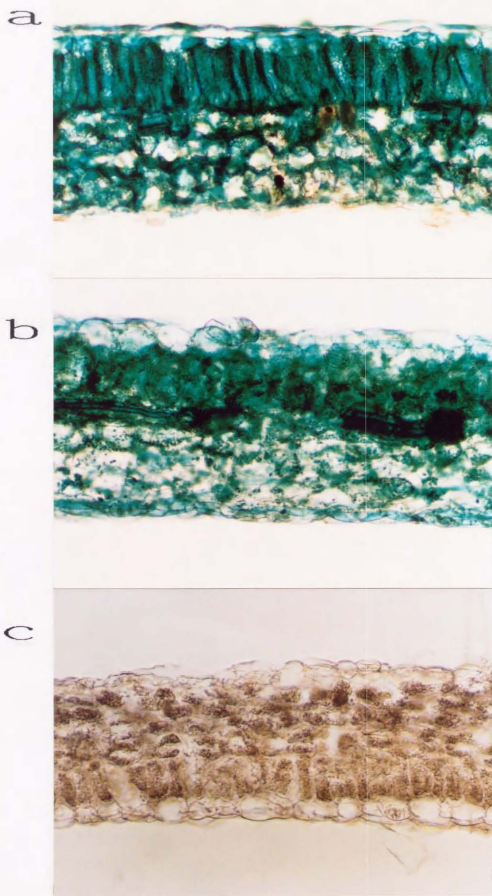


図 2.1. 形質転換タバコにおける GUS 活性の組織化学的検出 - 葉の断面 - .  
 a : cab-GUS (pB1cab6) の形質転換体, b : 35S-GUS (pB1121) の  
 形質転換体, c : プロモーターを持たない GUS のみ (pB1101) の形質転換体.



a



b



c

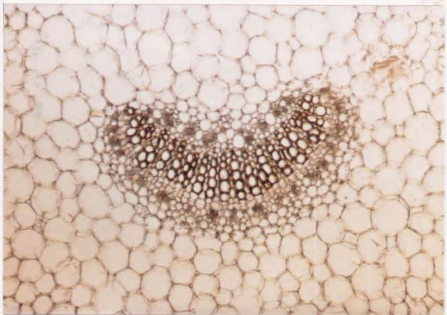
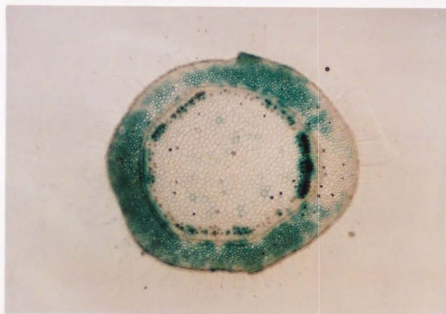


図 22. 形質転換タバコにおける GUS 活性の組織化学的検出—葉柄の断面—。  
 a : c a b - G U S (pB1cab6) の形質転換体, b : 3 5 S - G U S (pB1121) の  
 形質転換体, c : プロモーターを持たない G U S のみ (pB1101) の形質転換体。

a



b



c



図23. 形質転換タバコにおけるGUS活性の組織化学的検出—茎の断面—。  
 a : c a b - G U S (pBIcab6) の形質転換体, b : 3 5 S - G U S (pBI121) の  
 形質転換体, c : プロモーターを持たないGUSのみ (pBI101) の形質転換体.

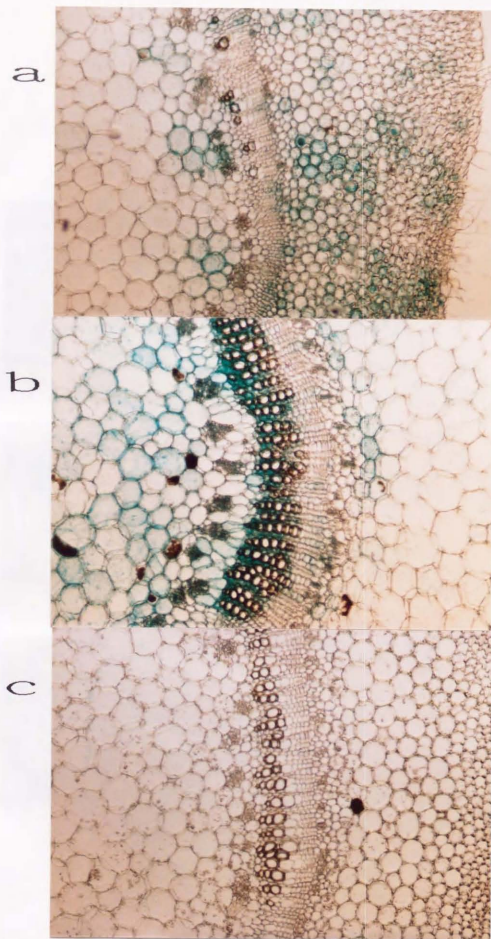


図 24. 形質転換タバコにおける GUS 活性の組織化学的検出—維管束周辺—。  
 図 23 の一部を拡大したもの。 a : cab-GUS (pBIcab6) の形質転換体、  
 b : 35S-GUS (pBI121) の形質転換体、 c : プロモーターを持たない  
 GUS のみ (pBI101) の形質転換体。

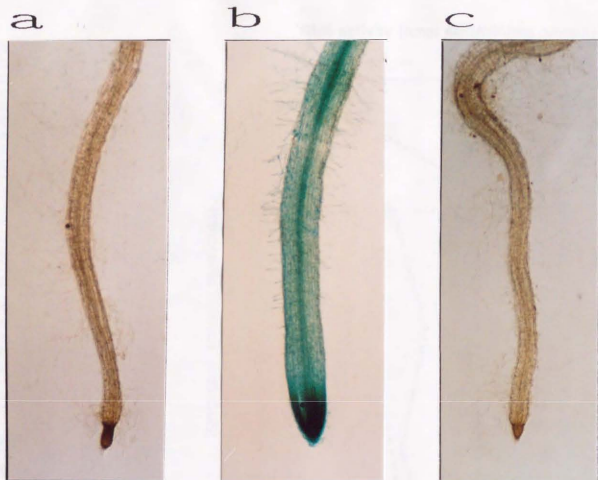


図 25. 形質転換タバコにおける GUS 活性の組織化学的検出—根—.

a : c a b - GUS (pBIcab6) の形質転換体, b : 35S - GUS (pBI121) の形質転換体, c : プロモーターを持たない GUS のみ (pBI101) の形質転換体.

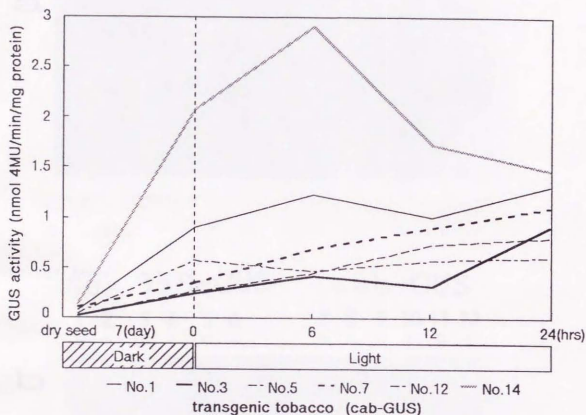


図 26. 形質転換タバコ第 2 世代の子葉における *c a b - 6* 遺伝子の発現誘導。  
*c a b - G U S* の形質転換タバコの種子 (dry seed) および暗所下で 7 日間発芽生  
 育させた芽生えの子葉 (0), それに 6, 12, 24 時間光照射した芽生えの子葉  
 の *G U S* 活性を測定した。6 個体の親 (形質転換第 1 世代) 別に調べた。



promoter less-  
GUS 35S-GUS cab-GUS

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

D L D L D L D L D L D L

a



promoter less-  
GUS 35S-GUS cab-GUS

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

D L D L D L D L D L D L

b

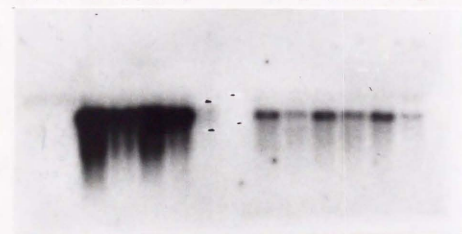


図27. 形質転換タバコの成葉におけるcab遺伝子の暗所発現。  
ノーザン・ハイブリダイゼーションにより成葉中のmRNAの蓄積を調べた。  
a: タバコのcab遺伝子の発現。cab遺伝子の構造遺伝子領域をプローブにして、タバコ内生のcab遺伝子のmRNAの発現を調べた。b: 導入遺伝子のmRNAの発現。pBI101のBamHI-EcoRI断片(GUSの構造遺伝子領域)をプローブにして、導入したGUSのmRNAの発現を調べた。  
レーン1, 2はプロモーターを持たないGUSのみ(pBI101)の形質転換体。レーン3-6は35S-GUSの形質転換体。レーン7-12はcab-GUSの形質転換体。レーン1, 3, 5, 7, 9, 11は暗黒下に2日間おいた後にRNAを抽出した(D)。レーン2, 4, 6, 8, 10, 12はそれに24時間の光照射をした後RNAを抽出した(L)。

