

# 植物における外来遺伝子発現システムの構築を考えたプロモーター解析 ——植物分子育種や植物代謝工学の発展に向けて

吉田和哉・浅尾浩史・庄司 猛・新名淳彦

(1995年9月22日受理)

植物分子生物学の進歩によって、植物の育種や二次代謝産物生産に遺伝子組換え技術を導入することが可能となった。しかし、遺伝子組換えの歴史が長い微生物に比べると、遺伝子導入による植物の形質転換は、発展途上である。21世紀を目前に環境破壊や食糧不足が懸念される中、植物の持つ能力が注目されている。今後は、有用な機能を実際の場面で利用できる植物の作出が急務であろう。本稿では、植物へ導入する遺伝子を効率よく発現させるシステムの構築に利用可能なプロモーターについて、最近のデータを紹介する。

## 1. はじめに

植物遺伝子工学技術の急速な進歩によって、様々なトランスジェニック植物が作られるようになった。植物体への遺伝子導入は、植物を分子生物学的に解析するために必要不可欠な実験手法として用いられているが、農学や工学を対象とした応用分野においても有用な技術として期待されている。

有用植物の育種は、これまで主として交雑に頼ってきたが、遺伝子導入による分子育種技術の発達によって、より幅の広い育種を行うことが可能となる。実際、防御遺伝子を導入することによる耐病性植物やアンチセンスRNAによって目的遺伝子の翻訳を抑制した植物などの作出が盛んに行われている。すでに米国では、ポリガラクトクトロナーゼ遺伝子に対するアンチセンスRNAによって日持ちを良くすることに成功したトランスジェニックトマトが一般のスーパーで販売されている。さらに、

地球規模で議論されている環境破壊や食糧不足の問題解決に貢献するような植物を分子育種する試みも活発になってきた。日本国内でトランスジェニック種物を栽培するためには、安全性の確認に重点を置いた認可を必要とするが、やがてトランスジェニック植物を一般の田畑や山林で栽培する時代が訪れるであろう。しかし、トランスジェニック植物の作出技術にも改善すべき課題が多く残されている。その1つは、導入遺伝子を効率よく発現させるシステムの整備である。ベクターとプロモーターを基本とした発現システムは、できれば目的に応じて選択できる方が合理的である。また野外での栽培を前提に考えるなら、用いるプロモーターの発現様式や機構が明らかにされていることが望ましい。

本稿では、植物における効率の良い遺伝子発現システムを考えるために、有用プロモーターの単離、および発現制御機構の解析から得られた知見を紹介する。

## 2. 傷害による発現誘導系

遺伝子導入技術を用いた有用植物の分子育種として研究が盛んに行われているものに耐病性植物の作出がある。実際に防御遺伝子を発現させることによって病気に対する抵抗性の高いトランスジェニック植物が作出されており、インゲンマメのキチナーゼ遺伝子を導入した苗立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 抵抗性タバコ<sup>1)</sup>、イネのキチナーゼ遺伝子<sup>2)</sup>を導入したウドンコ病菌 (*Sphaerotheca humuli*) 抵抗性タバコ<sup>3)</sup>とイチゴ<sup>4)</sup>、イネのキチナーゼ遺伝子とアルファルファのグルカナナーゼ遺伝子を導入した白星病菌 (*Cercospora nicotianae*) 抵抗性タバコ<sup>5)</sup>などの報告がある。防御遺伝子を発現させるためのプロモーターとしては、一般にカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター<sup>6)</sup>の様な構成的発現を示すプロモーターが用いられている。しかし、高生産された防御遺伝子産物が植物体に及ぼす影響や病原菌が傷害を受けた部位から感染することを考えると、防御遺伝子が傷

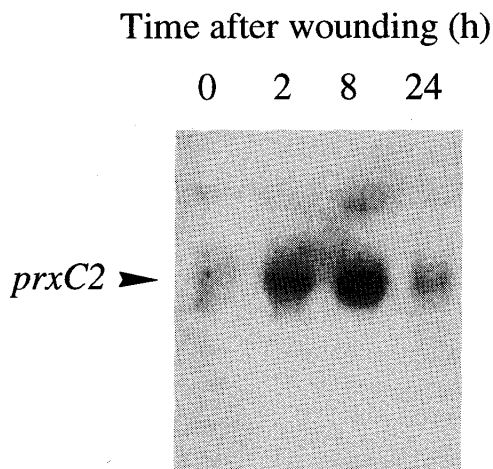
Kazuya YOSHIDA, Hiroshi ASAO, Takeshi SHOJI, Atsuhiko SHINMYO

Promoter Analysis for Construction of the Expression System for Foreign Gene in Plants.

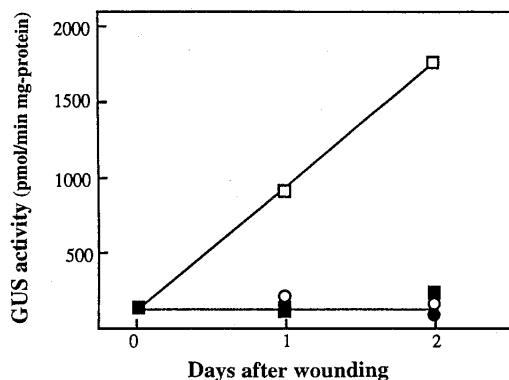
奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

(〒630-01 奈良県生駒市高山町 8916-5)

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-01, Japan

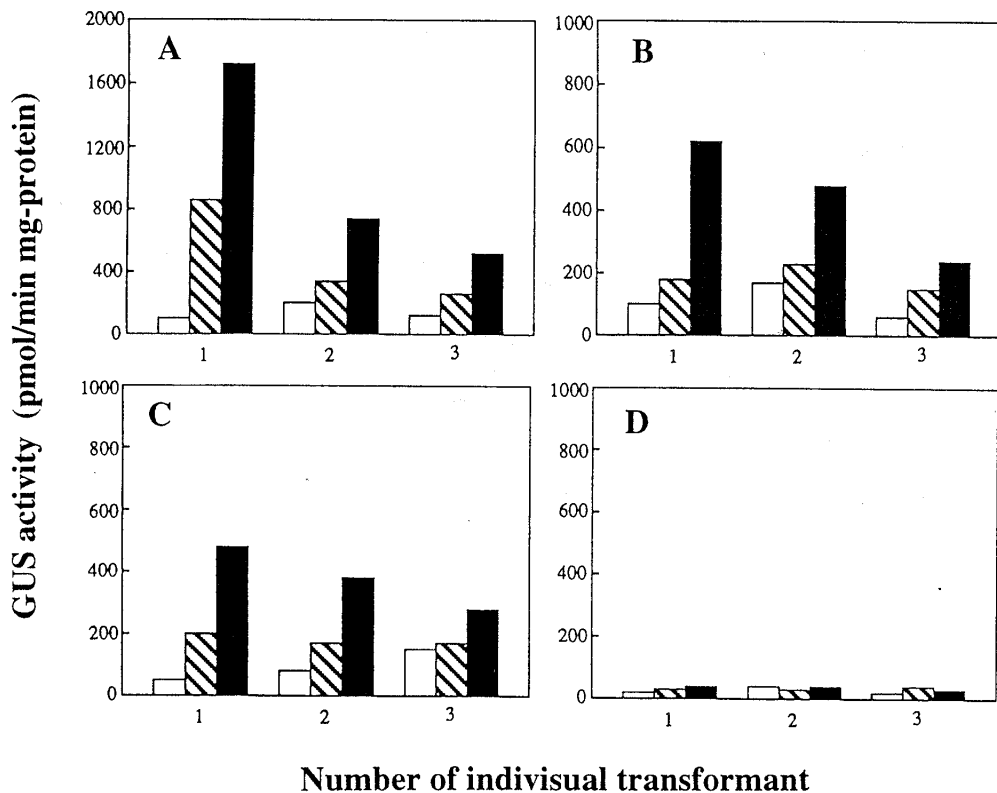


**Fig. 1** Time course of expression of *prxC2* mRNA in horseradish after wounding. Total RNA was extracted from leaf pieces which were incubated in the phosphate buffer, blotted and hybridized with  $^{32}$ P-labeled DNA probe of the exon 4 region of *prxC2* gene.



**Fig. 2** Induction of GUS activity by wounding in transgenic tobacco containing the *prx* promoter-GUS chimeric gene.

Leaves of tobacco were cut into pieces and incubated in the phosphate buffer. The relative GUS activities of 5 independent transgenic tobacco plants with *prxC1a*-GUS (○), *prxC1b*-GUS (●), *prxC2*-GUS (□) and CaMV35S-GUS (■) were assayed.



**Fig. 3** Effect of 5' deletions on the wound-induced expression of the *prxC2* promoter-GUS chimeric genes in transgenic tobacco leaves.

Panels A, B, C, D show the relative GUS activity in transgenic tobacco plants harboring 1035 bp (from ATG codon) promoter-, 529 bp promoter-, 307 bp promoter- and 99 bp promoter-GUS chimeric gene, respectively. Leaf discs of tobacco were incubated in the phosphate buffer for 1 day (□), 2 days (▨) and 3 days (■) after wounding.

害部位でのみ発現するようなシステムが有効であると考えられる。傷害で誘導されるプロモーターは、これまでに数多く単離されており、発現制御機構に関する報告も見られる。当研究室でも、西洋ワサビの C2 ペルオキシダーゼ遺伝子 (*prxC2*) とキュウリのアスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子 (*Aso1*) を対象に解析を行っている。

ペルオキシダーゼは、一般的に過酸化水素を一方の基質とした酸化反応を触媒する酵素で、動植物から微生物まで広く存在している。またペルオキシダーゼは、多様なアイソザイム、アイソフォームが存在することが知られている。植物では、過酸化水素の除去<sup>7)</sup>、有毒還元物質の酸化<sup>7)</sup>、インドール酢酸の酸化<sup>8)</sup>、リグニンの生合成<sup>9)</sup>などに関与している。傷害とペルオキシダーゼの関係調べた実験によると、西洋ワサビの根、茎、葉の各器官の細胞壁画分で傷害によるペルオキシダーゼ活性の上昇が認められた。当研究室では、西洋ワサビから *prxC1a*, *prxC1b*, *prxC2*, *prxC3* の 4 種のペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子を単離しており<sup>10,11)</sup>、各 DNA 断片をプローブとしたノザン解析を行った結果、*prxC2* 遺伝子の発現が傷害によって誘導されていることが判明した (Fig. 1)。そこで、*prxC2* 遺伝子の全長プロモーターと考えられる 1035 bp の DNA 断片にレポーター遺伝子である  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を連結し、モデル植物であるタバコへ導入した<sup>12)</sup>。得られた形質転換タバコの葉に傷害を与えると、GUS 活性の上昇が見られた (Fig. 2)。さらに、欠失プロモーター解析を行い、傷害に応答するシス領域を、翻訳開始点の上流 -307 ~ -99 bp までに限定した (Fig. 3)。このシス領域には、CACGTG をコアとする G-box 様配列が存在している。G-box 様配列は、光で制御される遺伝子<sup>13,14)</sup>、アブシジン酸で誘導される遺伝子<sup>15)</sup>、ストレスで誘導される遺伝子<sup>16)</sup>などの 5' 上流制御領域に存在し、この配列に転写因子が結合することが知られている<sup>17-19)</sup>。そこで、*prxC2* 遺伝子の制御シス領域の DNA 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイを行い、この領域に特異的に結合するタバコ核タンパク質因子 (TFHP-1) の存在を確認した (Fig. 4)。常法に従い、タバコの cDNA 発現型ライブラリーを作製し、G-box 様配列を含む DNA 断片をプローブとしたサウスウエスタン法によるスクリーニングを行い、TFHP-1 をコードすると考えられる cDNA を単離した<sup>20)</sup>。さらに、TFHP-1 の機能を明らかにするために、*TFHP-1* 遺伝子に対するアンチセンス RNA 遺伝子を *prxC2*-GUS 融合遺伝子を持つタバコで発現させた。その結果、アンチ *TFHP-1* RNA は、*prxC2* プロモーターの発現活性を減少させたが<sup>20)</sup>、傷害

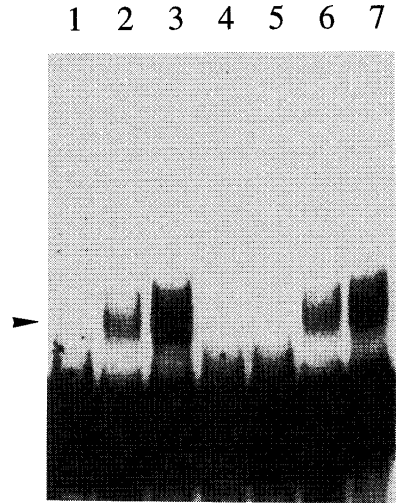
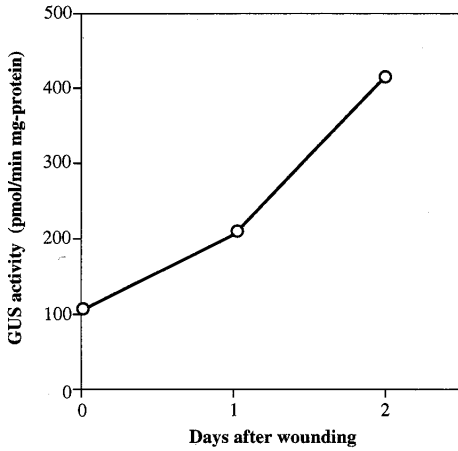


Fig. 4 Interaction of nuclear factors with the 5'-upstream region of *prxC2*.

The probe, <sup>32</sup>P-labeled DNA fragment corresponding to the *prxC2* promoter region (-307 to -1 from ATG codon), was incubated in the absence (lane 1) and in the presence (lane 2-7) of nuclear extracts (2  $\mu$ g of protein) from unwounded leaves (lane 2, 4 and 6) and wounded leaves (lane 3, 5 and 7). As competitor DNA, homologous unlabeled DNA fragment (lane 4 and 5) or pUC19 (lane 6 and 7) was added to the reaction mixtures.

による発現誘導を妨げなかった (未発表データ)。この結果は、TFHP-1-G-box が、*prxC2* 遺伝子発現の増強に機能していることを示唆している。シロイヌナズナの *rbCS-1A* プロモーター<sup>13)</sup>、*PRB-1b* プロモーター<sup>21)</sup>、パセリの *CHS* プロモーター<sup>22)</sup>においても、G-box 様配列がその近傍にある信号伝達シス配列と協調的に働くことで、発現量を増幅している報告がある。我々も、*prxC2* 遺伝子の 5' 上流領域の G-box 様配列近傍を対象に、傷害信号を直接受け取るシス配列の存在を調べている。

アスコルビン酸オキシダーゼは、分子状酸素を用いてアスコルビン酸を酸化し、デヒドロアスコルビン酸に変換する反応を触媒する銅タンパク質である。キュウリ、カボチャ、ズッキーニなどのウリ科植物の果実に多く存在している。アスコルビン酸オキシダーゼの植物における生理作用は明確にされていないが、植物体の生長の速い部位<sup>23)</sup>や厚角細胞などの細胞壁がよく発達した細胞<sup>24)</sup>に局在している。キュウリにおいては、果実と茎において高いアスコルビン酸オキシダーゼ活性を検出できる<sup>25)</sup>。また、キュウリの葉に傷害を与えると、細胞壁画分のア



**Fig. 5** Induction of GUS activity by wounding in transgenic tobacco containing the *AsoI-GUS* chimeric gene.

スコルビン酸オキシダーゼ活性が上昇する。当研究室では、キュウリからアスコルビン酸オキシダーゼをコードする cDNA<sup>26)</sup>、およびゲノム遺伝子 (*AsoI*)<sup>27)</sup> を単離している。先の *prxC2* 遺伝子と同様に、*AsoI* 遺伝子の全長プロモーターと考えられる 1071 bp の DNA 断片をレポーター遺伝子である *GUS* 遺伝子と連結し、モデル植物であるタバコへ導入した。形質転換植物の葉に傷害を与えると GUS 活性の著しい上昇が見られた (**Fig. 5**)。欠失プロモーター解析から、翻訳開始点の上流 -736 ~ -707 bp の領域が傷害信号の伝達に機能するシス領域であることが示唆されている。

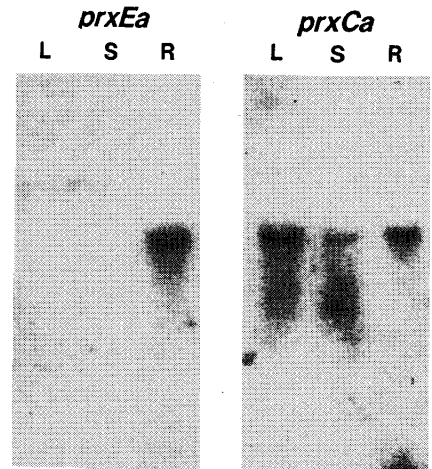
### 3. 器官・組織特異的発現

トランスジェニック植物を作出する際に、導入遺伝子を特定の器官や組織で発現させることが必要になる場合がある。果実の熟成を制御するために、ホルモンなどの生合成経路を変化させる目的で導入する遺伝子は、果実特異的な発現システムとの組み合わせが望ましい。前項でも述べたような耐病性植物の作出においても、苗立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) のような根から感染する土壌病原菌に対する防御遺伝子は、根特異的なプロモーターによって発現させることが効果的であろう。また、茎頂のような分裂組織で高発現するようなプロモーターも利用価値が高いと考えられる。種々の植物遺伝子のプロモーターの発現様式を調べてみると、ほとんどのものが何らかの器官、あるいは組織特異性を示す。むしろ、植物体の全器官や全組織で一様に発現するプロモーターはほとんど存在しないと思われる。この項では、発現が顕著な器官特異性を示す 2 つのプロモーターに関する知見を紹介する。

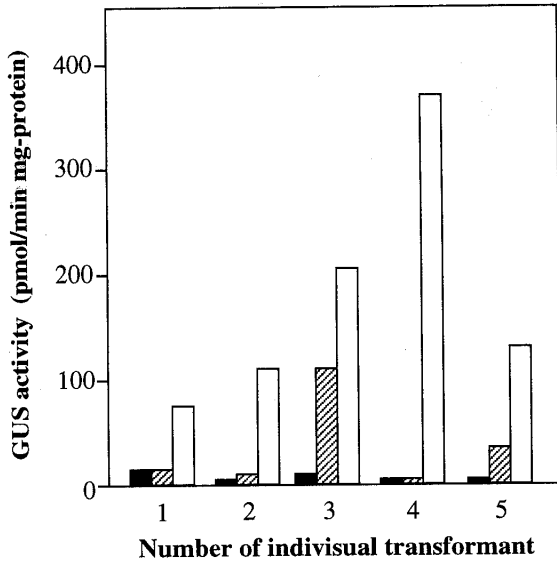
前項で傷害誘導性プロモーターとして述べた *AsoI* プ

ロモーターの発現は顕著な器官特異性を示す。*AsoI-GUS* 融合遺伝子を導入したタバコにおいて、茎で高い GUS 活性が検出された (茎:葉:根=44:1:7)<sup>27)</sup>。この結果は、キュウリにおけるアスコルビン酸オキシダーゼの活性分布に矛盾しない。欠失プロモーター解析から、翻訳開始点の上流 -642 ~ -592 bp の領域に器官特異的な発現に機能するシス配列が含まれていると考えている (未発表データ)。この領域を欠失させると、*AsoI* プロモーター発現の器官特異性が消失し、全器官で構成的に発現するようになることから、このシス領域は器官特異的サイレンサーとして働いているらしい。

次に、根特異的に発現するプロモーターを紹介する。前項にも登場したペルオキシダーゼは、一般に根に高い活性があるため、ペルオキシダーゼ遺伝子のプロモーターは根における高い発現活性を有していると考えられる。シロイヌナズナを用いて、2,3-dichlorophenol と 4-aminoantipyrine を基質としたペルオキシダーゼの比活性を調べたところ、葉:茎:根=1:2:110 であった。当研究室では、シロイヌナズナより 2 種類のペルオキシダーゼ遺伝子 (*prxCa* と *prxEa*)<sup>28)</sup>、および cDNA<sup>29)</sup> を単離しており、各 cDNA をプローブとしたノザンハイブリダイゼーションによって、*prxEa* 遺伝子が根でのみ転写されることを確認している (**Fig. 6**)。 *prxEa* プロモーターの発現様式についても、モデル植物であるタバコを宿主とした解析を行った<sup>30)</sup>。580 bp の *prxEa* 遺伝子プロモーターに *GUS* 遺伝子を連結した融合遺伝子をタ



**Fig. 6** The expression of *prxCa* and *prxEa* mRNA in leaf (L), stem (S) and root (R) of *A. thaliana*<sup>29)</sup>. Samples of 20  $\mu$ g total RNA were introduced in each lane. <sup>32</sup>P-labeled cDNA fragment of *prxCa* or *prxEa* was used as probe.



**Fig. 7** GUS activity in each organ of transgenic tobacco containing the *prxEa-GUS* chimeric gene. The GUS activities of leaf (■), stem (▨) and root (□) were assayed.

バコに導入したところ、根特異的なGUSの発現が認められた(**Fig. 7**)。

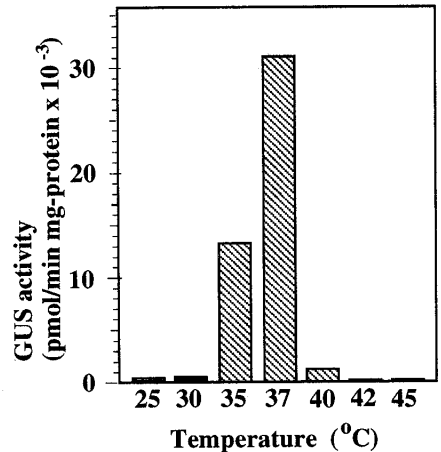
さらに当研究室では、タバコ茎頂から細胞周期を制御する遺伝子の単離を行っており、現在までに、サイクリンをコードする遺伝子を3種類単離している<sup>31)</sup>。これらの遺伝子のプロモーターは、茎頂分裂組織特異的な発現活性を有することが期待できる。

#### 4. 熱ショックによる発現誘導系

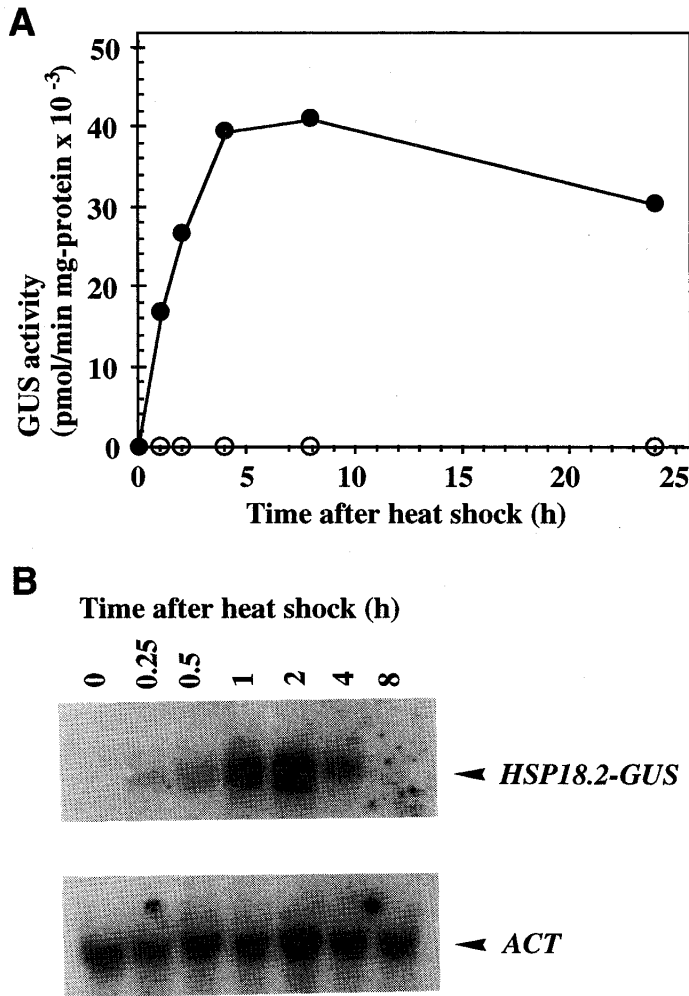
植物の細胞や組織の工学的利用を考えると、植物由来の二次代謝産物や有用酵素の生産がある。それらの培養技術に関する研究は盛んに行われており、本学会でも数多くの報告がある。このような技術をさらに発展させ、効率よく物質生産を行わせるためには、遺伝子組換え技術の利用が有効であると考えられる。導入遺伝子を発現させる系としては、大腸菌や酵母で広く用いられているような、人為的に発現を制御できる方が利用価値が高い。特に導入する遺伝子の産物が細胞の増殖に悪影響を及ぼす場合には、on-off 制御可能なプロモーターを用いることが必須となる。そこで、タバコ培養細胞(*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2)を宿主に、遺伝子発現 on-off 制御システムの構築を開始した。宿主にBY2細胞を用いたのは、植物細胞の中では増殖速度が極めて速く、培養が比較的簡単に行えるという利点を有していること、および生理的研究が最も進んでいる培養細胞であるからである。遺伝子発現の調節法としては、温度変化による制御

が簡便であると考え、熱ショックプロモーターの利用を検討した。実際に使用したプロモーターは、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来の熱ショック遺伝子 *HSP18.2* プロモーターである。*HSP18.2* 遺伝子は、分子量が18.2 kDの低分子量熱ショックタンパク質をコードしており、1989年に高橋らによってシロイヌナズナより848 bpのプロモーター領域を含んだDNA断片として単離された<sup>32)</sup>。この遺伝子は、シロイヌナズナにおいて35°Cの熱ショックによって、著しく発現が誘導される<sup>33)</sup>。一般に熱ショック遺伝子は、5'上流領域に熱ショックエレメント(HSE)と呼ばれる生物種を越えて保存された配列を持っており、このHSEが熱ショック信号を受け取るシス配列として機能する<sup>34)</sup>。*HSP18.2* 遺伝子の5'上流領域にも6個のHSEが存在している。

シロイヌナズナ由来の熱ショックプロモーターが、BY2細胞中で正常に機能することを確認するために、*HSP18.2-GUS* 融合遺伝子のBY2細胞における発現様式を調べた<sup>35)</sup>。融合遺伝子は、*HSP18.2* 遺伝子の翻訳開始点から77bp下流に *GUS* 遺伝子を連結した翻訳融合型となっており、*HSP18.2* タンパク質のN末端から25アミノ酸に *GUS* タンパク質が融合したタンパク質が翻訳される。*HSP18.2-GUS* 融合遺伝子をTiプラスミドを用いて染色体に組み込ませたBY2細胞(クローンBC2)を通常培養温度である25°Cで5日間前培養し、30, 35, 37, 40, 42, 45°Cで2時間培養した後の各細胞におけるGUS活性を測定した。その結果、35, 37°C



**Fig. 8** Expression of the *HSP18.2-GUS* chimeric gene by heat shock at various temperatures. GUS activities in the cells of clone BC2 were determined after 2h culture at the various temperatures indicated.



**Fig. 9** Time course of expression of the *HSP18.2-GUS* chimeric gene in BY2 cells after heat shock at 37°C.

A. Change in GUS activity in clone BC2 cultured at 25°C (○) and 37°C (●). B. Accumulation of *GUS* transcripts during incubation of clone BC2 at 37°C. Samples of 10 μg total RNA were introduced in each lane. <sup>32</sup>P-labeled DNA fragment of *GUS* or rice actin cDNA<sup>36)</sup> was used as probe.

で2時間培養した細胞で顕著な活性上昇が検出された (Fig. 8)。この結果は、BY2細胞においても *HSP18.2* プロモーターの発現が熱ショック応答機構によって誘導されることを示している。*HSP18.2* プロモーターの発現様式をさらに詳しく知るために、BC2クローンを用いて熱ショックによる GUS 活性上昇の経時変化を調べた。その結果、Fig. 9 に示すように、熱ショックを与えてから4時間後まで、急速な活性上昇が見られ、8時間後に最大となった。さらに、*GUS* DNA をプローブとしたノザンハイブリダイゼーションによって、転写レベルでの発現様式を調べたところ、25°C の培養では検出限界以下であるが、熱ショックを与えて15分後に転写物が認められ、2時間で最大となった後に減少し、8時

間後には転写物が認められなくなった。*HSP18.2* プロモーターの発現様式の特長は、通常培養温度である25°Cで生育している細胞では、ほとんど発現しない点にあり、37°Cで2時間培養することによって発現活性を平均1,000倍上昇させることができる。この性質は、細胞にとって有害な物質を過剰生産させる際に威力を発揮すると思われる。

##### 5. おわりに

本稿では、傷害誘導性プロモーター、器官特異的プロモーター、熱ショックプロモーターの発現様式と制御機構に関する知見を紹介しながら、植物における新しい遺伝子発現システムの構築について考察した。植物で遺伝子を発現させる際に、現在は CaMV35S プロモーター

が広く用いられている。このプロモーターは、ほとんどの植物であらゆる遺伝子を高発現させることができる点ですぐれており、植物分子生物学の発展に大きく貢献してきた。今後も CaMV35S プロモーターの活躍する場面は多いと考えられるが、今後、植物の遺伝子操作技術がますます発展するにつれて、より精密な遺伝子発現システムが求められることになる。植物遺伝子の発現制御機構の解析は、植物の器官形成や代謝調節を司っている遺伝子(情報)ネットワークを理解するために重要であるが、それらの解析で得られた基礎的知見を応用に結びつけるような視点も大切であろう。本稿では、主に当研究室で解析しているプロモーターについて紹介したが、利用価値の高いプロモーターは他にも多数存在する。ここで提案した遺伝子発現システムの整備は、農学や工学といった応用分野だけでなく、植物分子生物学の発展にも大きく貢献すると考えられる。

#### 謝 辞

シロイヌナズナの *HSP18.2* 遺伝子 DNA を快く提供して頂いた北海道大学理学部の米田好文教授にこの場を借りてお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Broglie, K., I. Chat, M. Holliday, R. Cressman, P. Bidle, S. Knowlton, C. J. Mauvai, R. Broglie, 1991. *Science*, **254**: 1194-1197.
- 2) Nishizawa, Y., T. Hibi, 1991. *Plant Sci.*, **76**: 211-218.
- 3) 西澤洋子, 阿久津克己, 日比忠明, 1992. 植物防疫, **46**: 500-506.
- 4) 浅尾浩史, 1995. “育種学最近の進歩”, 日本育種学会編, 養賢堂, 印刷中.
- 5) Zhu, Q., E. A. Maher, S. Masoud, R. A. Dixon, C. J. Lamb, 1994. *Bio Technol.*, **12**: 807-812.
- 6) Benfey, P. N., N. H. Chua, 1990. *Science*, **250**: 959-966.
- 7) Gaspar, T., C. Peenel, T. Thorpe, H. Greppin, 1982. In “Peroxidase: A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants”, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- 8) Hinnman, R. L., J. Lang, 1965. *Biochem.*, **4**: 144-154.
- 9) Grisebach, H., 1981. In “The Biochemistry of Plants”, pp. 457-478, Academic Press, New York, USA.
- 10) Fujiyama, K., H. Takemura, S. Shibayama, K. Kobayashi, J. K. Choi, A. Shinmyo, M. Takano, Y. Yamada, H. Okada, 1988. *Eur. j. Biochem.*, **173**: 681-687.
- 11) Fujiyama, K., H. Takemura, A. Shinmyo, H. Okada, M. Takano, 1990. *Gene*, **89**: 163-169.
- 12) Kawaoka, A., T. Kawamoto, H. Ohta, M. Sekine, M.

- Takano, A. Shinmyo, 1994. *Plant Cell Rep.*, **13**: 149-154.
- 13) Donald, R. G. K., A. R. Cashmore, 1990. *EMBO J.*, **9**: 1717-1726.
- 14) Shindler, U., A. R. Cashmore, 1990. *EMBO J.*, **9**: 3415-3427.
- 15) Mundy, J., K. Yamaguchi-Shinozaki, N. H. Chua, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 5939-5943.
- 16) Ferl, R. J., H. S. Nick, 1989. *Plant Mol. Biol.*, **12**: 357-366.
- 17) Menkens, A. E., A. R. Cashmore, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 2522-2526.
- 18) Shindler, U., A. E. Menkens, H. Beckmann, J. R. Ecker, A. R. Cashmore, 1992. *EMBO J.*, **11**: 1261-1273.
- 19) Tabata, T., H. Takase, S. Takayama, K. Mikami, A. Nakatsuka, T. Kawata, T. Nakayama, M. Iwabuchi, 1989. *Science*, **245**: 965-967.
- 20) Kawaoka, A., T. Kawamoto, M. Sekine, K. Yoshida, M. Takano, A. Shinmyo, 1994. *Plant J.*, **6**: 87-97.
- 21) Sessa, G., Y. Meller, R. Fluhr, 1995. *Plant Mol. Biol.*, **28**: 145-153.
- 22) Block, A., J. L. Dangl, K. Hahlbrock, P. Schulze-Lefert, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5387-5391.
- 23) Suzuki, Y., K. Ogiso, 1973. *Physiol. Plant*, **29**: 169.
- 24) Chichirico, G., M. P. Ceru, A. d'Alessandro, A. Oratore, L. Avigliano, 1989. *Plant Sci.*, **64**: 61.
- 25) Yoshida, K., T. Ito, H. Nozawa, J. Ohkawa, A. Shinmyo, 1994. *Annal. New York Acad. Sci.*, **721**: 245-247.
- 26) Ohkawa, J., N. Okada, A. Shinmyo, M. Takano, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1239-1243.
- 27) Ohkawa, J., T. Ohya, T. Ito, H. Nozawa, Y. Nishi, N. Okada, K. Yoshida, M. Takano, A. Shinmyo, 1994. *Plant Cell Rep.*, **13**: 481-488.
- 28) Intapruk, C., N. Higashimura, K. Yamamoto, N. Okada, A. Shinmyo, M. Takano, 1991. *Gene*, **98**: 237-241.
- 29) Intapruk, C., K. Yamamoto, K. Fujiyama, M. Takano, A. Shinmyo, 1993. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**: 166-172.
- 30) Intapruk, C., K. Yamamoto, M. Sekine, M. Takano, A. Shinmyo, 1994. *Plant Cell Rep.*, **13**: 123-129.
- 31) Setiady, Y. Y., M. Sekine, N. Hariguchi, T. Yamamoto, H. Kouchi, A. Shinmyo, 1995. *Plant J.*, in press.
- 32) Takahashi, T., Y. Komeda, 1989. *Mol. Gen. Genet.*, **219**: 365-372.
- 33) Takahashi, T., S. Naito, Y. Komeda, 1992. *Plant J.*, **2**: 751-761.
- 34) Nover, L. (ed), 1991. “Heat shock response”, CRC, Boca Raton, Florida, USA.
- 35) Yoshida, K., T. Kasai, M. R. C. Garcia, S. Sawada, T. Shoji, S. Shimizu, K. Yamazaki, Y. Komeda, A. Shinmyo, 1995. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
- 36) Sano, H., S. Youssefian, 1991. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 227-232.