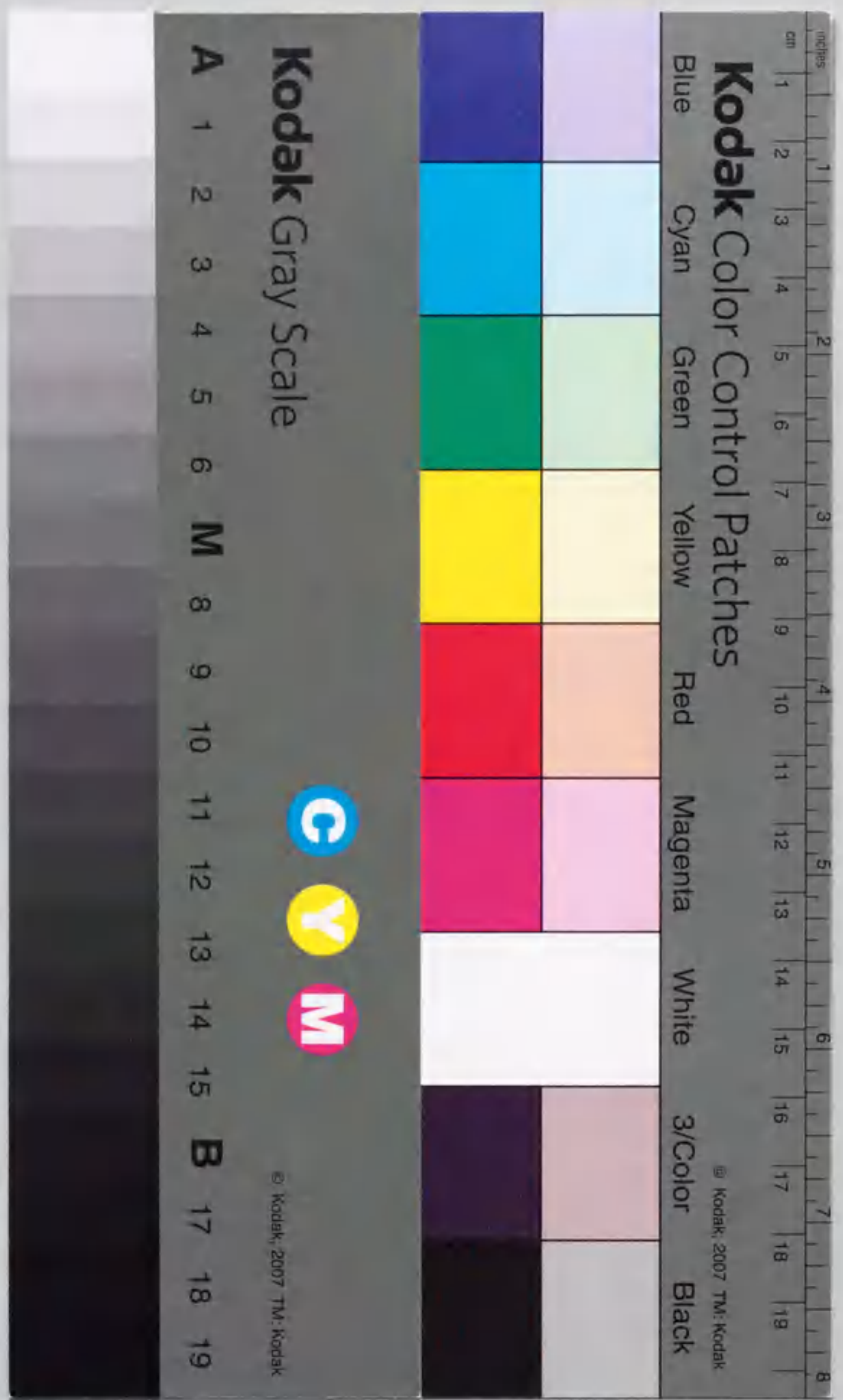


ジャガイモ塊茎主要タンパク質  
遺伝子の発現制御機構

石川 敬司





報告番号 甲第 2997 号



ジャガイモ塊茎主要タンパク質  
遺伝子の発現制御機構

石川 敦 司



## . Abbreviations

- BA, benzylaminopurine  
CA, cucurbic acid  
CAT, chloramphenicol acetyl transferase  
CDI, cathepsin D inhibitor  
GUS,  $\beta$ -glucuronidase  
HJA, dihydrojasmonic acid  
JA, jasmonic acid  
MCA, methyl cucurubate  
MJA, methyl jasmonate  
MHJA, methyl dihydrojasmonate  
MTA, methyl tuberonate  
PI-II, proteinase inhibitor II  
PKPK, potato kunitz-type proteinase inhibitor  
TA, tuberonic acid  
TAG, tuberonic acid glucoside



目次

第 1 章	序 論	1
第 2 章	ジャガイモのクニッツ型プロテアーゼ インヒビターを支配する遺伝子族 ：構造と発現の比較	
	はじめに	8
	実験材料および方法	10
	結果と考察	12
	図	18
第 3 章	ジャガイモの2つのプロテアーゼ インヒビター遺伝子の発現誘導に おけるジャスモン酸類の構造と 機能の関係	
	はじめに	34
	実験材料および方法	36
	結果	37
	考察	39
	図	41



第 4 章 タバコ培養細胞におけるジャガイモ  
カテプシン D インヒビター-大腸菌  
 $\beta$ -グルクロニダーゼ融合遺伝子の  
メチルジャスモン酸による発現誘導

はじめに	4 9
実験材料および方法	5 1
結果	5 3
考察	5 7
図	6 0

第 5 章 総合討論 7 4

要約	8 1
----	-----

文献	8 3
----	-----

謝辞	8 9
----	-----



## 第 1 章

### 序 論

生物は動物、植物、微生物を問わず、環境によく適応して生存している。動物は移動することにより厳しい環境の変化に対処できるのに対し、植物は移動できないため環境の変化に敏感に反応し、変化に対応することによって生存している。このような自然環境の変化には光、温度、乾燥、風、などの変化があり、昆虫や動物による傷害、微生物やウイルスによる感染など、植物にとってさまざまなストレスも含まれる。植物はこのような種々の環境の変化を様々な受容体を通してキャッチし、その情報を様々な機構によって植物体内であるいは細胞内で伝達することにより、生理的レベルにおいても遺伝子発現レベルにおいても種々の応答反応を起こし、植物全体として環境の変化に適応している。さらに環境の変化によって植物の生長や分化、例えば種子の発芽・花芽の形成、塊茎・塊根の形成、種子の成熟などが引き起こされている。

1970年代に開発されたDNA組換え実験技術により、1970年代後半から植物の遺伝子がクローニングされるようになり、さまざまな因子によって制御を受けている遺伝子が単離・同定されてきた。1980年代に入って、土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* の Ti プラスミドをベクターとして用いることにより<sup>(58)</sup>、双子葉植物、特にタバコやベチュニアを宿主として遺伝子導入技術が開発され、単離された遺伝子を植物に戻して、その発現や遺伝子産物の機能を個体のレベルで解析することが可能となった。この遺伝子導入植物作製の技術を用いてさまざまな遺伝子の発現調節の多くが転写レベルで行われていること、また特定の塩基配列（シスエレメント）がその制御に関わることも明らかになってきている。更に最近ではシスエレメントに結合するタンパク質因子（トランスファクター）の単離・同定も進んでいる。このような手法を用いて、植物で種々の因子によって制御されている遺伝子の発現を分子レベルで明らかにすることは発生・分化の制御機構を明らかにすることにもつながる大きな問題である。



#### 【ジャガイモ塊茎形成機構】

ジャガイモ塊茎は、花芽を形成し複雑な分化過程を経て胚乳や子葉中に同化産物を蓄積する種子とは異なり、植物体地下部の節から発生した側枝（ストロン）の先端部の肥大により形成される。塊茎形成は比較的単純な器官分化であり、その分化のメカニズムは古くから多くの研究者の研究対象とされてきた<sup>(80)</sup>が、未だ不明の点が多く残されている。

ジャガイモ植物体の地下部の茎から発生したストロンは、植物体が短日条件におかれるとその伸長生長を停止し、先端部の肥大が始まる。植物の生長は細胞の肥大と分裂によって起こるが、塊茎形成の初期の肥大は主にストロンの髓部細胞の肥大によって生じる。次に、主に内外両節部で活発な細胞分裂が始まり、肥大と分裂を繰り返すことにより塊茎は生育する。生育塊茎には地上部から送り込まれた同化産物がデンプンとなって蓄えられる。やがて頂芽や側芽は肥大部の中に陥入して休眠芽となり、塊茎形成は完了する。

この塊茎形成には数多くの環境因子や遺伝的因子が関与している。例えば、短日条件、低温、低N源が塊茎形成に適していることが分かっている。また植物ホルモンでは、ジベレリンが塊茎形成に抑制的に働くこと、サイトカイニンは細胞分裂に関わっていること、アブシジン酸は塊茎形成終了である休眠に関わっていることなどが明らかになっている。しかし、塊茎形成のきっかけである細胞肥大開始については、既知の植物ホルモンでは説明できないでいた。ところが最近、短日処理したジャガイモの葉から塊茎形成促進活性を持つ生理活性物質が単離され、その構造決定からジャスモン酸の誘導体であると同定され、ジャガイモの学名にちなんでツベロン酸(tuberonic acid)と名付けられている<sup>(54)</sup>。また、その後の研究によりジャスモン酸、メチルジャスモン酸、ククルビン酸、メチルククルビン酸も同様な活性を持つことが明らかになっている<sup>(48)</sup>。これらジャスモン酸類は細胞壁微小管の配向を乱し、細胞の放射方向の伸長・肥大を促すことにより塊茎の形成を促進すると予想されている。



#### 【ジャスモン (JA) 酸類の構造と機能】

動物細胞に存在するプロスタグランジンとロイコトリエンの前駆体である膜由来の長鎖不飽和脂肪酸 ( $C_{20}$ ) のアラキドン酸は植物細胞には存在しない。しかし、 $C_{18}$ の不飽和脂肪酸のリノール酸やリノレン酸に由来する $C_{12}$ 化合物は植物細胞中に存在し、植物の生長や環境応答において生理活性を持つことが示されている<sup>(36, 37, 41, 74, 75)</sup>。これら $C_{12}$ 化合物にはジャスモン酸 (JA)、メチルジャスモン酸 (MJA)、ククルピン酸 (CA)、ツベロン酸 (TA) などが含まれる。これら化合物の中で最も研究が進んでいるのがJAとそのメチルエステルのMJAである。

ジャスモン酸 (JA) は植物界に広く存在し、そのメチルエステルは香料として有用なため以前からその合成研究については数多くの報告がある。最近、植物に対しても種々の生理活性を有することが明らかになってきている。植物体あるいは外植体に外から供与したJA/MJAは老化促進<sup>(47, 88)</sup>、大豆の vegetative storage protein (VSP) 遺伝子<sup>(39, 56, 81, 82)</sup>とトマトとジャガイモのプロテアーゼインヒビター I と II (PI-I と PI-II) 遺伝子の発現誘導<sup>(41, 44, 45, 86)</sup>、大麦の RuBPCase (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) の LSU (large subunit) と SSU (small subunit)、さらに LHCP (light harvesting chlorophyll protein complex preteins) の翻訳阻害<sup>(68, 69)</sup>、花粉発芽の阻害<sup>(83)</sup>、トマト果実におけるエチレン合成の促進<sup>(84)</sup>、大麦のクロロフィルの分解の促進<sup>(85)</sup>、大豆のアントシアニン産生の促進<sup>(82)</sup>といった種々の生理活性に加えて、*Bryonia*の巻きひげの巻き付き運動<sup>(70)</sup>やタバコ培養細胞における細胞周期依存的な微小管の破壊<sup>(57)</sup>をも調節することが示されている。このように、JA類は様々な生理活性を発現することから植物における内在性の調節物質であると考えられている。

JAには不斉炭素が2個あるので、4種類の立体異性体が存在する。天然のJAには *cis*型の (-)-JA と *trans*型の (+)-*epi*-JA の2つが存在するが、実際に生体内で作られるのは *cis*型の (-)-JA である<sup>(36, 37, 77, 78)</sup>。ただし、CAを除くJA類は、5員環炭素のケトンの  $\alpha$  位が酸、アルカリ、熱によってエピマー化を起こすため、不安定な *cis*型より安定な *trans*型になりやすい。そのため、*cis*型の (-)-JA は *t*



*trans*型の(+)-*epi*-JAに変換してしまう。平衡実験では *trans*型が90%、*cis*型が10%の状態が存在した<sup>(78)</sup>。また *cis*型の(-)-JAの絶対配置は1R、2Rである。

植物では、JAはリノレン酸から13(S)-hydroperoxylinolenic acid、phytodienoic acid、4,5-dihydrophytydienoic acidなどのオクタデカノイド中間産物を経て合成される<sup>(35, 37, 41)</sup>。この生合成系の最初の反応を触媒するのはリボキシゲナーゼとデハイドラーゼである。このあと、 $\beta$ 酸化によりJAが合成される。植物ではJA構造類似化合物が多数同定されている。これらはJAが水酸基の付加を受けたり、還元されたりして合成されると予想されるが、JAの前駆体から直接合成される可能性も残されている<sup>(37)</sup>。ところでリノレン酸は植物の膜の主要な構成成分であるが、遊離の状態ではほとんど存在しない。このことから、JAはホスホリパーゼにより膜から遊離されたリノレン酸より合成されると考えられる。

トマトのPI-IIはその葉にJA/MJAを供与すると発現が誘導されるが<sup>(44)</sup>、JA/MJAの代わりにリノレン酸、13(S)-hydroperoxylinolenic acid、phytodienoic acidといったリノレン酸にはじまるJA合成系の中間産物を供与してもその発現が誘導された<sup>(86)</sup>。同様なことが培養細胞におけるファイトアレキシンの合成や *Bryonia*の巻きひげの巻き付け運動においても見られた<sup>(70, 71)</sup>。これらのことから、植物中のリノレン酸にはじまるJA合成系の酵素はすでに全て存在していると考えられた。

植物細胞中でJAがその活性を発現するには、外からの刺激に対してリパーゼの活性化もしくは合成が起こっていると考えられる。つまり、外から刺激が来ると、膜に存在するリパーゼの活性化によりリノレン酸が遊離されJAの合成に至ると考えられる。ただし現時点では、刺激に应答して活性化されるリパーゼ（ホスホリパーゼA<sub>2</sub>と予想される）もその刺激を受容するレセプターも同定されていない<sup>(41)</sup>。

JA合成系でリパーゼの次に働く酵素はリボキシゲナーゼ(13-lipoxygenase)である。リノレン酸がトマトのプロテアーゼインヒビター遺伝子の発現を誘導することと *Bryonia*の巻きひげの巻き付け運動を誘導することから13-lipoxygenaseは植物細胞内に構成的に存在すると考えられた<sup>(70, 86)</sup>。また傷害刺激によるVSP遺伝子の発現誘導はリボキシゲナーゼ阻害剤により阻害されたが、JA供



与により障害が回復したこと<sup>(81)</sup>もリノレン酸にはじるJAの合成系にリボキシゲナーゼが関わっていることを示している。最近、傷害刺激や病原菌による攻撃により植物細胞内のリボキシゲナーゼ活性の上昇が見られる場合が報告されている<sup>(76)</sup>。これは情報伝達物質と考えられるJAの合成を促進し、シグナルの増幅を行っていると思われる。

実際、植物に傷害刺激を与えたとき<sup>(42)</sup>と、植物細胞をエリシターで処理したとき<sup>(43, 62)</sup>、細胞内のJAとMJAの量が増加した。またエリシター処理後ではリノレン酸の量も増加していた<sup>(62)</sup>ことからリパーゼ活性の上昇も示唆された。これらの結果からJA/MJAは植物細胞が外から刺激を受けたとき、細胞内に誘導性の防御反応を引き起こすのに必要なシグナル物質と考えられる。

これらオクタデカノイド化合物を基本にした情報伝達系は動物のエイコサノイドの系と類似している。エイコサノイドは動物細胞で局所的ストレスに応答して合成されるプロスタグランジンとロイコトリエンを含むシグナル物質である。プロスタグランジンの合成に関わる酵素は動物細胞に構成的に存在していて、その合成の律速段階は前駆体となる脂肪酸の遊離段階である<sup>(74)</sup>。エイコサノイドの働きは幅広く、異なる生理活性を持つ種々の関連したシグナル物質が作られる。植物細胞でもJAに構造の類似した種々の $C_{12}$ 化合物が同定されている。これらから想像するに、植物細胞にはその生長・分化、防御反応に関わる種々のJA構造類似化合物が存在していると予想される。

#### 【ジャガイモ塊茎主要タンパク質】

塊茎形成過程を生化学的にみると、二つの大きな変化がある。一つは多量のデンプンの蓄積であり、もう一つは新しいタンパク質群の蓄積である。これら塊茎主要タンパク質群には40KDaのバタチン(patatin)、16KDaのプロテアーゼインヒビターII (PI-II)の他に20-から24-KDaの数種のポリペプチドを含む複合タンパク質が含まれ、これら限られた数種の主要タンパク質によって塊茎全可溶性タンパク質の70%から80%が占められている<sup>(87)</sup>。これらタンパク質はジャガイモの生長段階において、塊茎形成時に協調して蓄積する。

バタチンは塊茎の全可溶性タンパク質の約40%を占め、その発現量の多さから貯蔵タンパク質と考えられている。しかし、他の多くの植物貯蔵タンパク質と



は異なり、エステラーゼ（リピッドアシルヒドロラーゼ）活性を持つことが示されている<sup>(87)</sup>。さらにパタチンは液胞に局在することもわかっており<sup>(87)</sup>、これは加水分解活性を持つことと対応していると考えられる。このパタチンの酵素活性の生理的役割は推測の域を出ないが、その脂質加水分解活性は休眠から栄養生長への変換のときに働くと想像される。また、微生物の侵入に対する防御反応として機能しているかも知れない。つまり、この脂質加水分解酵素は普段は液胞に局在しているため機能できないが、傷害や微生物の侵入により機能可能になると考えられる。

パタチンは塊茎において多量に蓄積している他に、根においても微量ながら（塊茎の百分の一程度）存在している。塊茎形成は常にパタチン遺伝子の発現を伴うと考えられるが、その逆は真ではなく、塊茎以外の組織でのパタチン遺伝子の発現がいくつか知られている。ジャガイモ植物体からそのシンク器官である塊茎とストロンを取り去ると、パタチンが葉-葉柄や茎で蓄積ようになる<sup>(22, 87)</sup>。さらに、高濃度のショ糖（約10%）を含む寒天培地で生育させると、その葉にパタチンの蓄積が見られる<sup>(25, 33, 87)</sup>。これらの例では、パタチンの蓄積は、塊茎形成や組織肥大とは独立している。

パタチン遺伝子はジャガイモのハプロイドゲノム当たり10から18コピー存在し、多重遺伝子族を形成している<sup>(87)</sup>。パタチン遺伝子は数種のパタチンcDNAの塩基配列の比較より、5'非翻訳領域に22塩基が存在する（クラスII）か否（クラスI）かによって、2つのグループに分けられており、クラスI遺伝子が塊茎特異的な発現を示すのに対して、クラスII遺伝子は塊茎の他に根でも弱く発現している。塊茎におけるクラスII遺伝子の発現はクラスI遺伝子に比べてかなり低い。

植物の貯蔵器官である種子や塊茎には普通大量のプロテアーゼインヒビターが存在している。これらのプロテアーゼインヒビター活性のほとんどは、微生物や昆虫のプロテアーゼに対して働くが、植物自身のプロテアーゼに対して働くことは非常に希であることがわかっている<sup>(26, 89)</sup>。つまりこれらのプロテアーゼインヒビターは植物の微生物や昆虫に対する防御反応に関わっていると考えられている。

プロテアーゼインヒビターII（PI-II）はジャガイモ塊茎の全可溶性タンパク



質のうち約5%を占めるセリンプロテアーゼインヒビターである<sup>(87)</sup>。その発現は発生過程によって、また環境因子によって影響を受ける。傷害を受けていない植物体ではその発現は塊茎と若い花芽に限られる。しかし、葉が機械的な損傷や微生物や昆虫による攻撃によって傷害を受けると、地上部の器官においてプロテアーゼインヒビター I (PI-I) とともにその蓄積が誘導される。この誘導は傷害を受けた部位 (局所的応答反応) にとどまらず傷害を受けなかった遠く離れた部位 (システミックな応答反応) にまで及ぶ<sup>(26, 41)</sup>。このことは誘導因子または傷害ホルモンが、傷害によって放出され、瞬時に植物体の他の部位に運ばれ、これらプロテアーゼインヒビター遺伝子の発現を誘導すると考えられている<sup>(41, 87)</sup>。PI-II をコードする cDNA や遺伝子の構造決定から、このタンパク質もパタチンと同様にシグナルペプチドを持つ前駆体として合成され、これにより ER に入った後、液胞へ運ばれて蓄積すると考えられている<sup>(53, 87)</sup>。

一方、20-から24-KDaの数種のポリペプチドからなる複合タンパク質についてはほとんど解析がなされていなかった<sup>(28)</sup>。

#### 【本研究の意義と目的】

これら塊茎主要タンパク質遺伝子の発現は、イモの形成・肥大の過程で特異的に活性化されるものと推定される。

本研究は、イモ主要タンパク質のうち、20-から24-KDaの数種のポリペプチドからなる複合タンパク質を支配する遺伝子族の発現制御を分子レベルで解析することにより、植物核遺伝子の分化に伴う器官特異的発現制御機構、ひいてはイモの形成・肥大の制御を分子レベルで理解することを目指したものである。

本研究ではまず20-から24-KDaのイモ主要複合タンパク質を支配する遺伝子の単離から始め、それらが構成する遺伝子 (ジャガイモのクニッツ型プロテアーゼインヒビター: PKPI) 族について詳細に解析した (第2章)。次に、ジャガイモの葉におけるPKPI-Aグループに属するCDI遺伝子とPI-II遺伝子のJA類による発現誘導について解析し (第3章)、さらにタバコ培養細胞を用いて、PKPI-A遺伝子群に属するgCDI-A1遺伝子のJA類による発現誘導の解析を行った (第4章)。



## 第2章

### ジャガイモのクニッツ型プロテアーゼインヒビターを支配する遺伝子族 ：構造と発現の比較

#### はじめに

ジャガイモの塊茎は地下部の節から発生した側枝（ストロン）の先端部の肥大により形成される。この肥大に伴って塊茎には多量のデンプンと共に数種の塊茎主要タンパク質の蓄積が見られる。塊茎主要タンパク質は塊茎以外の器官においてはほとんど存在しないことから、これらを支配する遺伝子の発現は器官特異的な制御を受けていると考えられる。しかし、塊茎主要タンパク質を支配する遺伝子の中にはその発現が厳密には塊茎特異的ではないものが知られている。例えば、塊茎に最も多く存在するパタチンのクラス1遺伝子は、外から高濃度のショ糖や代謝可能な糖を与えると地上部においてその発現が誘導される<sup>(25, 33, 87)</sup>。また葉に傷害を与えると塊茎主要タンパク質のプロテアーゼインヒビターI（PI-I）遺伝子とプロテアーゼインヒビターII（PI-II）遺伝子の発現が誘導される<sup>(23, 26, 31, 41, 87)</sup>。これら塊茎主要タンパク質の人為的発現制御機構を解析することは、ひいては植物体における塊茎形成機構の解明につながると思われる。

これらパタチン、PI-I、PI-IIに加えてジャガイモ塊茎には20KDaから24KDaの数種のポリペプチドからなる複合タンパク質が存在し<sup>(2, 3, 22, 29)</sup>、クニッツ型プロテアーゼインヒビターと相同性を示す20KDaのタンパク質をコードしうるcDNAも同定されている<sup>(28)</sup>。塊茎に存在する22-, 23-, 24-KDaのタンパク質は異なる電荷や分子質量を持つアイソフォームで、それらは免疫学的に類似して、類似のN-末構造を持つ<sup>(29)</sup>。最近の研究から、20-から24-KDaの複合タン



パク質には様々なクニッツ型プロテアーゼインヒビターが含まれることが明らかになっている。これらにはカテプシンDインヒビター<sup>(14, 24)</sup>、サブチリシンインヒビター<sup>(32)</sup>さらにはトリプシンかつ/またはキモトリプシンインヒビターが含まれる<sup>(30, 32)</sup>。これらのことから、ジャガイモにはクニッツ型トリプシンインヒビターと相同性を示す20-から24-KDaよりなる複合タンパク質を支配する遺伝子族が存在すると考えられる。しかしながら、今日までジャガイモのクニッツ型トリプシンインヒビター(PKPI)遺伝子族についての詳細な構造と発現についての研究はなされていなかった。

今回の研究では、PKPI族に含まれる3つのcDNAと2つのゲノミッククローンを新たに単離した。また20-から24-KDaよりなる複合タンパク質のうち18のポリペプチドのN-末のアミノ酸を10個決定した。これらクローン化された遺伝子の構造とN-末の配列を既に報告されている遺伝子のそれらと比較したところ、20-から24-KDaの複合タンパク質を支配するPKPI遺伝子族は少なくとも3つのグループに分類されることが明らかになり、それらをA-, B-, C-グループと呼ぶことにした。PKPI-Aグループ遺伝子とPKPI-Bグループ遺伝子はどちらも塊茎で強く発現していたが、その他の器官における発現は両者では異なっていた。



## 実験材料および方法

### 1. 植物材料

ジャガイモ植物体は名古屋大学農学部付属農場で栽培された男爵 (*Solanum tuberosum* cv. Danshaku) を用いた。葉-葉柄は剃刀で植物体より切り取った。3つから5つの葉-葉柄植物片をまとめてショ糖あるいはメチルジャスモン酸溶液につけた。処理は20°C、暗所で24時間行った。

### 2. 核酸の調製とハイブリダイゼーション解析

DNAは村上らの方法<sup>(17)</sup>に従い調製した。全RNAとpoly(A)<sup>+</sup>-RNAは中村らの方法<sup>(18)</sup>に従い調製した。サザンブロットハイブリダイゼーションは、DNAサンプルを制限酵素で消化したあと、アガロースゲル電気泳動で分離し、Zeta-Probe膜 (Bio-Rad, Richmond, CA) にブロッティングした。ノーザンブロットハイブリダイゼーションは、RNAサンプルをホルムアミドで変性させたのち、Zeta-Probe膜にブロッティングした。ブロッティング、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションの条件はそれぞれマニュアルに従った。

### 3. cDNAライブラリーとゲノミックライブラリーの構築とスクリーニング

ジャガイモ塊茎より調製したpoly(A)<sup>+</sup>-RNAを用いてpUC8上に構築した発現cDNAライブラリーを塊茎主要タンパク質の全可溶性タンパク質に対する抗体で中村らの方法<sup>(18)</sup>に従い免疫学的にスクリーニングした。また、λgt11上にジャガイモ塊茎より調製したpoly(A)<sup>+</sup>-RNAを用いてcDNAライブラリーを構築し、<sup>32</sup>PでラベルしたDNA断片でスクリーニングした。得られた陽性クローンのインサートはλgt11の順向きプライマーと逆向きプライマー (宝酒造) を用いたPCRにより増幅した。

ジャガイモのゲノムDNAは*Sau3A*1で部分消化し、14から18Kbに相当する断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、それを用いてλEMBL3ベクター上にゲノミックライブラリーを構築した。もう一つのゲノミックライブラリーはジャガイ



モゲノムDNAを *EcoRI* で完全消化したのち、3から5Kbの断片を分離し、それを用いて  $\lambda$ gt11上にゲノミックライブラリーを構築した。これらのゲノミックライブラリーは  $^{32}\text{P}$  でラベルしたDNA断片を用いてスクリーニングを行った。陽性クローンのインサートDNAは制限酵素で切断後分離し、pUC119かBluescript KS (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローンした。

#### 4. シークエンスとプライマーエクステンションによる解析

インサートDNAをエキソヌクレアーゼIIIとエキソヌクレアーゼVIIで処理して段階的欠失行い、ダイデオキシ法により塩基配列を決定した。プライマーエクステンションによる解析は、 $^{32}\text{P}$  を用いてT4キナーゼでエンドラベルした17bpのオリゴヌクレオチド (5'-GATTCACCTGGGTAGGTT-3'; gCDI-A1遺伝子のコーディング領域のN-末付近の配列の相補鎖に相当) 0.02pmolを10 $\mu$ gのジャガイモ塊茎から調製したpoly(A)<sup>+</sup>-RNAとハイブリダイズさせ、常法<sup>(13)</sup>に従って逆転写酵素 (Rous associated virus 2由来、宝酒造) を用いて伸長反応を行った。

#### 5. PKPIタンパク質の調製とN-末アミノ酸配列の決定

ジャガイモ塊茎を冷却した緩衝液 (50mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 1% sodium ascorbate, 0.5M sucrose; 2ml/fresh weight(g)) 中でホモゲナイズした。2重のミラクロス (Calbiochem, La Jolla, CA) でろ過したあと100,000xgで1時間遠心した。その上清を50mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTAで平衡化したセファデクスG-25に通した。タンパク質を含む素通り画分を10mM Tris-HCl(pH7.5)で平衡化したエコノバックSカラム (Bio-Rad, Richmond, CA) に通した。カラムを洗浄したあと吸着している20-から24-KDaのタンパク質を10mM Tris-HCl(pH7.5)中で、KCl濃度を0から500mMまで段階的に上げて溶出した。それぞれの画分のタンパク質はSDS-PAGEで分離したあとProt Blott膜 (Applied Biosystems, Foster City, CA) に転写した。クーマシーブリリアントブルーでタンパク質を可視化したあとそのバンドに相当する膜を切り取り、プロテインシーケンサー (model 470A/120A; Applied Biosystems, Foster City, CA) でN-末の10個のアミノ酸残基の配列を決定した。



## 結果と考察

### 1. cDNAクローンとゲノミッククローンの単離

ジャガイモ塊茎より調製したpoly(A)<sup>+</sup>-RNAを用いて作成したcDNAライブラリー<sup>(18)</sup>を、塊茎の全可溶性タンパク質に対して作成した抗体でスクリーニングを行った。抗体と強く反応したクローンについてその塊茎特異的発現を茎、成熟葉、塊茎の3種のRNAを用いて解析した。塊茎でのみ強く発現しているクローンのうちpKEN14-28は0.9Kbのインサートを含んでいた(Fig. 2-1)。これは221アミノ酸残基からなるタンパク質をコード可能で、大豆のクニツツ型トリプシンインヒビター<sup>(1, 10)</sup>とサツマイモの塊根主要タンパク質のスボラミン<sup>(6)</sup>と相同性を示した(Fig. 2-2)。

λEMBL3上に構築したゲノミックライブラリーをpKEN14-28のインサート部分をプローブとしてスクリーニングした。陽性クローンのうち一つが221アミノ酸残基をコード可能なオープンリーディングフレームを持っていた(Fig. 2-2)。それはpKEN14-28とアミノ酸レベルで80%の相同性を示した(Fig. 2-3)。この遺伝子、gCDI-A1の転写される領域の塩基配列はイントロンで中断されることなく、pKEN14-28の塩基配列と比べて、いろいろな部位に塩基置換や欠失、挿入が起こっていた(Fig. 2-1)。大豆のクニツツ型トリプシンインヒビター<sup>(1)</sup>とサツマイモのスボラミン<sup>(7)</sup>の遺伝子もまたイントロンを含んでいない。

ジャガイモのゲノムDNAをEcoR1、BglII、HindIIIで切断後、ラベルしたgCDI-A1とpKEN14-28の断片を用いて、きつい条件下でサザンハイブリダイゼーションを行った。この条件では両方の断片は互いにハイブリダイズできない。それぞれのプローブはいくつかのDNA断片とハイブリダイズしたが、そのパターンはgCDI-A1とpKEN14-28とは異なっていた(Fig. 2-4)。このことからジャガイモのゲノムDNAにはgCDI-A1とpKEN14-28の双方にそれぞれ相同な遺伝子が複数存在することが明らかとなった。それぞれの遺伝子に代表されるジャガイモのクニツツ型トリプシンインヒビター(PKPI)遺伝子族のグループをAグループとBグループとした。



ジャガイモ塊茎入gt11 cDNAライブラリーをgCDI-A1をプローブにして弱い条件でスクリーニングした。この条件ではPKPI-Bグループもハイブリダイズする。陽性クローンの中から12個選んで5'側からシーケンスした。その結果この12個のcDNAはPKPI-Aと-Bに相当する2つのグループにクラス分けされた(データ省略)。PKPI-Aグループに属するcDNAのpA1の全鎖長の塩基配列を決定し、gCDI-A1のそれと比べると、塩基配列レベルで98%の相同性を示した。PKPI-Bグループに属するcDNA、pF4の場合はpKEN14-28と比較して98%の相同性を示した(Fig. 2-1と3)。PKPI-Bグループに属するゲノミッククローンを単離するために、我々は入gt11ゲノミックライブラリーをpF4をプローブとしてスクリーニングを行った。得られたゲノミッククローンgCDI-B1の転写領域の塩基配列からこの遺伝子はイントロンを含まないことが明らかになった。またpKEN14-28とpF4とは塩基配列レベルでそれぞれ91%と93%の相同性を示した(Fig. 2-1と2-3)。本研究と平行して、クニッツ型トリプシンインヒビターと相同性を示すいくつかのcDNAとゲノミッククローンがジャガイモから単離された<sup>(4, 12, 27)</sup>。Fig. 2-1と2-2では、これらクニッツ型トリプシンインヒビターの塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列をそれぞれ並べて示している。cDNAクローンのAP1<sup>(27)</sup>とp749<sup>(4)</sup> PKPI-Aグループに、ゲノミッククローンのPIGEN1<sup>(12)</sup>はPKPI-Bグループに属することがわかった(Fig. 2-1と2-3)。Fig. 2-1で示しているように、PKPI遺伝子族のうちAグループとBグループをそれぞれ特徴づける3から13bpよりなる欠失や挿入が両グループの遺伝子の転写領域に存在した。また、ある遺伝子にはその遺伝子特異的な欠失や挿入が見られた(Fig. 2-1)。PKPI-Aグループ内での塩基配列の相同性は92から98%であった。また、PKPI-Bグループ内でのそれは91から98%であった(Fig. 2-3)。PKPI-AグループとPKPI-Bグループ間での塩基配列の相同性は76から81%であった。ただ、我々が比較したcDNA、ゲノミッククローンは全てが同じ品種から取られたものではないので、これら品種の差に由来する構造的差異があるかも知れない。また、ジャガイモは四倍体なので倍数性に起因する差異もあるかも知れない。

これらPKPI-AグループとPKPI-Bグループに加えて、クニッツ型トリプシンインヒビターと相同性を示すcDNAクローンp34021とpT1が既に単離されている(Fig. 2-2)<sup>(28, 34)</sup>。p34021とpT1の塩基配列は互いに91%の相同性を示し、PKPI-Aグ



ループとPKPI-Bグループとはそれぞれ51%と53%の相同性を示した。この論文ではこの二つのクローンはPKPI-Cグループに属するとした。

## 2. PKPI遺伝子族に支配されるタンパク質

PKPI-A, -B, -Cグループの遺伝子はジャガイモ塊茎の20-から24-KDaのタンパク質のアイソフォームを支配していると考えられる。これらのタンパク質をクロマトグラフィーで分画し、それらをSDS-PAGEで分離し、18個のポリペプチドについてそのN-末の10アミノ酸残基を決定した (Fig. 2-5)。これら決定したアミノ酸配列の多くは同一、もしくは互いに類似したもので、3つのグループに分類された (Fig. 2-5)。これらはPKPI-A, -B, -Cグループに対応していた (Fig. 2-5)。ゲル上の全てのポリペプチドについてそのN-末のアミノ酸残基を決定したわけではないが、この20-から24-KDaの複合タンパク質に属する個々のアイソフォームはPKPIの3つのグループのどれかに属すると思われる。

PKPI-AグループのN-末のアミノ酸残基の配列は特に4, 6, 9番目の配列において異質性を示した (Fig. 2-5)。これらのポリペプチドはエコノパックSカラムから異なるKCl濃度で溶出され、SDS-PAGEにおいて21.9から24.0KDaの範囲で異なる分子質量を示した。PKPI-Aグループの遺伝子から推定されるアミノ酸配列はジャガイモカテプシンDインヒビター<sup>(14, 24)</sup>のそれと90%以上の相同性を示した。PKPI-Aタンパク質のうち、3つは成熟タンパク質のN-末付近にアスパラギン結合型オリゴ糖の付加可能なアミノ酸配列 (Asn-Ser-Ser) が存在した (Fig. 2-2)。このような糖鎖の付加が実際に起こっているか否かはわからないが、PKPIタンパク質のSDS-PAGE上での分子質量の異質性の原因の一つかも知れない。

PKPI-Bグループのタンパク質は20-から24-KDaのタンパク質のうち少量しか存在せず、決定したN-末のアミノ酸配列はどれも同じで、SDS-PAGE上での分子質量は20.3KDaであった (Fig. 2-5)。しかしながら、PKPI-Bグループのプロープを用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果、数本のバンドが検出されたこと (Fig. 2-4)、またPKPI-Bグループの遺伝子から推定されるアミノ酸配列間でも異質性が見られたこと (Fig. 2-2と2-3) から、PKPI-Bタンパク質は数種のアイソフォームを含んでいると考えられる。また、PKPI-Bタンパク



質のN-末アミノ酸配列はジャガイモのトリプシン特異的クニッツ型インヒビター (PKI-1)<sup>(32)</sup>と同じであった。

Fig. 2-5で最も多く存在したポリペプチドは、そのN-末アミノ酸配列からPKPI-Cグループに属すると考えられた。SDS-PAGEから、それらの分子質量は20.4-, 21.4-, 21.9-, 23.0-, 24.0-KDaであった。PKPI-Cタンパク質の多くのN-末アミノ酸配列は同じで、このうち最初の六つのアミノ酸配列はSuhらが報告した

22-, 23-, 24-KDaのジャガイモ塊茎に存在するタンパク質のN-末アミノ酸配列<sup>(29)</sup>と同じであった。これら22-, 23-, 24-KDaタンパク質のうち、22KDaタンパク質はトリプシンとキモトリプシン双方に対して強いインヒビター活性を示し、24KDaタンパク質はトリプシンに対してのみ強いインヒビター活性を示した<sup>(30)</sup>。また、PKPI-Cタンパク質のN-末アミノ酸配列はサブチリシン特異的なジャガイモのクニッツ型プロテアーゼインヒビター (PKI-2)のそれ<sup>(32)</sup>と同じであった。PKPI-Cタンパク質のうち、分子質量20.4KDa (Fig. 2-5)のN-末アミノ酸配列はその他のPKPI-Cタンパク質とは若干異なっていた。PKPI-Cグループ遺伝子はその塩基配列とN-末アミノ酸配列から考えて、さらに分類できるようである。現在のところ二つのPKPI-Cグループに属するcDNA<sup>(28, 34)</sup>が報告されていて、互いに98%の相同性を示す。またどちらもPKPI-Cタンパク質のうち主要なタンパク質を支配している (Fig. 2-2)。

以上のことから、ジャガイモのゲノムにはそれぞれ基質特異性の異なる数種類のクニッツ型プロテアーゼインヒビターを支配する遺伝子族が存在していることがわかった。

### 3. PKPIタンパク質前駆体の構造

PKPI遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列と、PKPI成熟タンパク質のN-末アミノ酸配列から、PKPI-A, PKPI-B, PKPI-Cタンパク質の前駆体にはそれぞれそれぞれ31, 28, 42アミノ酸残基からなるエクストラペプチドが存在することがわかった (Fig. 2-2)。サツマイモのスボラミンAはクニッツ型トリプシンインヒビターと相同性を示し<sup>(17)</sup>、液胞に蓄積する<sup>(15)</sup>が、そのN-末に37個のアミノ酸残基からなるエクストラペプチドを持った前駆体として合成される (Fig. 2-2)。形質転換タバコ培養細胞においては、スボラミンAの前駆



体は23番目のSerと24番目のArgの間で切断され、液胞へ輸送されたのち残りのプロペプチドが切断される<sup>(15, 21)</sup>。スボラミン前駆体のN-末に存在するプロペプチドは液胞への輸送に必要であり<sup>(16)</sup>、そこにはAsn-Pro-Ile-Xxx-Leu-Proの配列が存在する。この配列はスボラミンのアイソフォームとその他の植物の液胞に蓄積するタンパク質の前駆体にも存在した。このことから、この配列が液胞への輸送シグナルとして働いていると考えられる<sup>(20)</sup>。

PKPIタンパク質前駆体のN-末エクストラペプチドのC末部分にもこの配列が存在する (Fig. 2-2) ことから、この部分が液胞輸送シグナルとして働き、PKPIタンパク質も液胞に蓄積すると考えられる。実際、20-から24-KDaの一群のタンパク質は塊茎より単離した液胞画分に濃縮され (松岡 私信)、PKPI-Bグループに属するpKEN14-28のcDNAを形質転換タバコ培養細胞において発現させると、前駆体のN-末22アミノ酸残基がシグナルペプチドとして働き、残りの6アミノ酸残基 (<sup>23</sup>Ser-Lys-Asn-Pro-Ile-Asn<sup>28</sup>) が液胞へ輸送されたのち切断された (松岡 未発表データ)。pKEN14-28 cDNAにコードされる前駆体ポリペプチドのシグナル配列の切断部位であるPhe-Thr-Ser配列はPKPIタンパク質の前駆体においても保存されていた。このことから、PKPI-AとPKPI-Cタンパク質の前駆体のシグナル配列の切断もこの部位で起こり、その結果これら前駆体タンパク質はそのN-末に9個と16個のアミノ酸残基を持つと考えられる。

#### 4. PKPI-AとPKPI-B遺伝子の構造

gCDI-A1遺伝子の転写開始点をプライマー伸長法とS1マッピングによって決定した。プライマー伸長法により、転写産物の5'末端は翻訳開始点から上流40ヌクレオチドとなった。S1マッピングからは翻訳開始点から上流36と40ヌクレオチドとなった (データ省略)。そこで翻訳開始点上流40ヌクレオチドを転写開始点とし、+1とした (Fig. 2-1と2-6)。転写開始点上流-30から-24にはTATAボックス配列TATAAATが存在した (Fig. 2-6)。

gCDI-A1遺伝子の5'非翻訳領域は40bpで、gCDI-B1遺伝子のそれと比較すると数カ所において挿入や欠失が見られた (Fig. 2-1と2-6)。しかしながら、5'非翻訳領域の構造の違いは遺伝子特異的というよりはグループ特異的であった (Fig. 2-1と2-6)。3'非翻訳領域の塩基配列もまたPKPI-AとPKPI-Bグループと



では異なっていた。しかし、3'ポリ(A)付加サイト直前の塩基配列はPKPI-AとPKPI-B両グループで保存されていて、その配列中にはポリ(A)付加シグナルAATAAAがポリ(A)配列の13あるいは20bp上流に存在した (Fig. 2-1)。

#### 5. PKPI-AとPKPI-B遺伝子の発現

普通の栽培植物体の茎、成熟葉、根ではPKPI-AとPKPI-B遺伝子の発現はほとんど見られない (Fig. 2-7)。しかし、PKPI-A遺伝子はPKPI-B遺伝子とは異なり、若い葉と花芽においても発現していた (Fig. 2-7)。このことから両グループの遺伝子は異なる発現調節を受けていることがわかった。サツマイモのスポラミン遺伝子とジャガイモのパタチン遺伝子は外から高濃度のショ糖を供与するとその発現が誘導される<sup>(8, 19, 25, 33)</sup>。しかし、PKPI-AとPKPI-B両遺伝子の発現はパタチン遺伝子の発現が誘導される条件で誘導されず、パタチン遺伝子の場合とは異なる発現調節を受けていることが明らかになった (Fig. 2-8)。Hannapelらは<sup>(2, 5)</sup>、ジャガイモの葉植物片をショ糖で11日から21日間処理すると、PKPI mRNAが蓄積することを報告しているが、この相違は処理日数の違いによるものと思われる (Fig. 2-8では3日間処理)。PKPI-A遺伝子の発現はジャガイモの葉に傷害刺激を与えたときとメチルジャスモン酸を供与したときに誘導された (Fig. 2-8)。同様な結果が他からも報告されている<sup>(9, 30)</sup>。しかし、傷害刺激、メチルジャスモン酸処理どちらもPKPI-B遺伝子の発現は誘導しなかった (Fig. 2-8)。このことからPKPI-A遺伝子とPKPI-B遺伝子は異なる発現調節を受けていると考えられる。PKPI-C遺伝子もまた傷害刺激によってその発現が誘導された<sup>(30)</sup>。

gCDI-A1遺伝子とgCDI-B1遺伝子の5'上流域の塩基配列を比較すると、両遺伝子間で保存されている配列は転写開始点から上流72bpまでで、それより上流では全く異なっていた。gCDI-A1遺伝子とgCDI-B1遺伝子間の発現の違いは転写開始点上流72bpより上流の配列によるものと考えられる。



+100  
1 : ACAAGTCACAAGCAATCAATTAATACACAAATAAAAT-----CAATATGATGAAGTGTATTTTCTTATGCTATGTTTGTTCCTATTTTG  
2 : CAATAATACACAAATAAAAT-----CAATATGATGAAGTGTATTTTCTTATGCTATGTTTGTTCCTATTTTG  
3 : CCACAAATAAAAT-----CAATATGATGAAGTGTATTTTGTATGTTTGTGTTTGTTCCTATTTTG  
4 : ATGATGAAGTGTATTTTGTATGTTTGTGTTTGTTCCTATTTTG  
5 : ACAA---ACAAGC-----AATACACAAATAAAATAGTAGCTTAAACAA---CTCAAGTGTATTTTGTATGTTTGTGTTTGTTCCTATTTTG  
6 : ACAA---ACAAGC-----AATACACAAATAAAATAGTAGCTTAAACAA---CTCAAGTGTATTTTGTATGTTTGTGTTTGTTCCTATTTTG  
7 : ACAA---ACAAGC-----AATACACAAATAAAATAGTAGCTTAAACAA---CTCAAGTGTATTTTGTATGTTTGTGTTTGTTCCTATTTTG  
8 : ATAAATAGTAGCTTAAACAA---CTCAAGTGTATTTTGTATGTTTGTGTTTGTTCCTATTTTG

+200  
1 : GTGTTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCCCATCAACCTACCCAGTGAATCTCCTGTACCTAAGCCGGTACTTGACACAAATGGTAAAAACTGAATC  
2 : GTGTTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCCCATCAACCTACCCAGTGAATCTCCTGTACCTAAGCCGGTACTTGACACAGATGGTAAAAACTGAATC  
3 : GTGTTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCTCATTGACCTACCCAGTGAATCTCCTGTACCTAAGCCGGTACTTGACACAAATGGTAAAAACTGAATC  
4 : GTATTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCCCATCAACCTACCCAGTGAATCTCCTGTACCTAAGCCGGTACTTGATACAAATGGTAAAAACTGAATC  
5 : GTGTTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCCCATTAACCTACCTAGTGTATGCTACT-----CCAGTACTTGACGTAACTGGTAAAGAACTTGATC  
6 : GTGTTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCCCATTAACCTACCTAGTGTATGCTACT-----CCAGTACTTGACGTAACTGGTAAAGAACTTGATC  
7 : GTGTTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCCCATTAACCTACCTAGTGTATGCTACT-----CCAGTACTTGACGTAACTGGTAAAGAACTTGATC  
8 : GTGTTTTCATCAACTTTCACCTTCCCAAAATCCCATTAACCTACCTAGTGTATGCTACT-----CCAGTACTTGACGTAACTGGTAAAGAACTTGATC

+300  
1 : CTAATTCGAGTTATCGCATTATTTCCACATTTTGGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG  
2 : CTAATTCGAGTTATCGCATTATTTCCACATTTTGGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG  
3 : CTGATTCGAGTTATCGCATTATTTCCATTTGGTAGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG  
4 : CTAATTCGAGTTATCGCATTATTTCCACATTTTGGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG  
5 : CTCGTTTGAGTTATCGTATTATTTCCACTTTTGGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG  
6 : CTCGTTTGAGTTATCGTATTATTTCCACTTTTGGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG  
7 : CTCGTTTGAGTTATCGTATTATTTCCACTTTTGGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG  
8 : CTCGTTTGAGTTATCGTATTATTTCCACTTTTGGGGTGCCTTAGGTGGTGTATACCTAGGAAAGTCCCAAAATCAGATGCCCTTGTCCAGATGG

+400  
1 : CGTATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCT-----ACAAATATCTTTGAAGATCAACTA  
2 : CGTATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCT-----ACAAATATCTTTGAAGATCAACTA  
3 : CGTATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCTGGAG-----TATATTTGAAGATCAACTA  
4 : CGTATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCTGGAG-----CAAAATATCTTTGAAGATCAACTA  
5 : TGTATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCTGGAG-----CAAAATATCTTTGAAGATCAACTA  
6 : CATATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCTGGAG-----TAGTCAATTTGGACAAGTATCTTTGAAGATCAACTA  
7 : CATATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCTGGAG-----TAGTCAATTTGGACAAGTATCTTTGAAGATCAACTA  
8 : CATATTCGGTTACAATTCGGATGTTGGACCTAGCGGTACACCCGTTAGATTTCATTCTTTATCTGGAG-----TAGTCAATTTGGACAAGTATCTTTGAAGATCAACTA

+500  
1 : CTTAACATACAATTCATATTTCCAACAGTGAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG  
2 : CTTAACATACAATTCATATTTCCAACAGTGAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG  
3 : CTCACATACAATTCATATTTCCAACAGTGAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG  
4 : CTTAACATACAATTCATATTTCCAACAGTGAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG  
5 : CTCACATACAATTCATATTTCCAACAGTGAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG  
6 : CTCACATACAATTTGCTATTTCAACATCGAAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG  
7 : CTCACATACAATTTGCTATTTCAACATCGAAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG  
8 : CTCACATACAATTTGCTATTTCAACATCGAAATTTGTGTGTAGTTATACAATTTGGAAGTCCGAAATCTAAATACACATCTATGGACTATGTTGTGG

+600  
1 : AGACGGGAGGAACCATAGGGAAGCAGATAGCAGCTATTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC  
2 : AGACGGGAGGAACCATAGGGAAGCAGATAGCAGCTATTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC  
3 : AGACGGGAGGAACCATAGGGAAGCAGATAGCAGCTATTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC  
4 : AGACGGGAGGAACCATAGGGAAGCAGATAGCAGCTATTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC  
5 : AGACTGGAGGAACCATAGGTCAAGCAGATAGCAGTGGTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC  
6 : AGACTGGAGGAACCATAGGTCAAGCAGATAGCAGTGGTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC  
7 : AGACTGGAGGAACCATAGGTCAAGCAGATAGCAGTGGTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC  
8 : AGACTGGAGGAACCATAGGTCAAGCAGATAGCAGTGGTTCAAGATTGTTAAATCATCAAAATTTGGTTACAACCTATTGTTATGCCCTATTACTCGGCC

+700  
1 : CCTATTGTTTGTCCATTTTGTGCTGATGATGACTTCTGTGCAAAAGTGGGTGTAGTTATTCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT  
2 : CCTATTGTTTGTCCATTTTGTGCTGATGATGACTTCTGTGCAAAAGTGGGTGTAGTTATTCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT  
3 : CCTATTGTTTGTCCATTTTGTGCTGATGATGACTTCTGTGCAAAAGTGGGTGTAGTTATTCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT  
4 : -CATTTCCTTGTCCATTTTGTGCTGATGATGACTTCTGTGCAAAAGTGGGTGTAGTTATTCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT  
5 : -TGTCCATTTTCTCTGATGATCAATTCGTTTAAAGTTGGTGTAGTTACCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT  
6 : AATGAGT---TGTCCATTTTCTCTGATGATCAATTCGTTTAAAGTTGGTGTAGTTACCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT  
7 : AATGAGT---TGTCCATTTTCTCTGATGATCAATTCGTTTAAAGTTGGTGTAGTTACCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT  
8 : AATGAGT---TGTCCATTTTCTCTGATGATCAATTCGTTTAAAGTTGGTGTAGTTACCAAAATGGAAAAGCGCTTTGGCTCTTGTCAACGAAAT

+800  
1 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG  
2 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG  
3 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG  
4 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG  
5 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG  
6 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG  
7 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG  
8 : CCTCTGAGTCTTATTCAGGAAGTCTAGTAACAAATAATGCCCTGAGCTAGACTATACTA---TGTTTAGCCTGCCCTGCTGGCTAGCTACTA---TG

+890  
1 : TTATGTTATGTTGTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT  
2 : TTATGTTATGTTGTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT (A) n  
3 : TTATGTTATGTTGTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT (A) n  
4 : TTATGTT---GTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT (A) n  
5 : TTATGTTGTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT (A) n  
6 : TTATGTTGTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT (A) n  
7 : TTATGTTGTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT (A) n  
8 : TTATGTTGTAATAAATCAACCTGCTAAGGTATATCTATATATTTAGCATGGCTTTCTTAAATTTGCTTTTCTTATCATTT (A) n



Fig. 2-1. Comparison of the nucleotide sequences of the transcribed regions of eight members of the PKPI-A and PKPI-B multigene family from potato. The following sequences were aligned by introducing gaps to maximize sequence homology: 1, gCDI-A1 (genomic; this study); 2, pA1 (cDNA; this study); 3, p749 (cDNA; Hannapel, 1993); 4, API (cDNA; Strukelj et al., 1990); 5, gCDI-B1 (genomic; this study); 6, PIGEN1 (genomic; Maganja et al., 1992); 7, pKEN14-28 (cDNA; this study); 8, pF4 (cDNA; this study). Spaces included to maximize alignment are indicated by dashes. Initiation codons and termination codons of the open reading frame are indicated by boxes. Nucleotides conserved in all of the eight sequences are underlined and polyadenylation signals are shaded.



1 : MMKCLEFELCICLF-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
2 : MMKCLEFELCICLF-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
3 : MMKCLEFELCICLF-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
4 : MMKCLEFELCICLF-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
5 : MMKCLEFELCICLV-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
6 : MMKCLEFELCICLV-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
7 : MMKCLEFELCICLV-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
8 : MMKCLEFELCICLV-----PILVSSSTFTSQNPINLS-----ESPVPKPVLDITNGKKLNPNSSYRIISTFWGALGGDVYLG-KSPNSDAPCPDGV--ERYN  
9 : MKSINILSFLLSSTLSLVAFASETSNPILVITTCCHDDDLVLPEVYDODGNPLRIGERYIINNPLGA--GAVYLY--NIGNLQCPNAVLOHMSI  
10 : MKAFLLALFLLSLYL-----LPNPAHSHRNPRLRITTHEPA--SSETPVLDINGDEVRAAGNYMWSAIWAGAGGGLRLAHLDTMS--KQASDVIVSPND  
11 : MKSTIFFALFLFCAPT--TSYLPISAIA-----DFVLNNEGPNLENGCTYYILSDI-TAFGG-IRAAPTG--NERCPLTVVQSRNE

1 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----TINFEDQNLNIQENIPTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
2 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----TINFEDQNLNIQENIPTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
3 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----GANIFEDQNLNIQENIPTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
4 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----GGIFEDQNLNIQENIPTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
5 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----SHFGPHIFEGELNIQEDISTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
6 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----SHFGPHIFEGELNIQEDISTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
7 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----SHFGPHIFEGELNIQEDISTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
8 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----SHFGPHIFEGELNIQEDISTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
9 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----SHFGPHIFEGELNIQEDISTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
10 : SDVGPSTGTPVRFIPLS-----SHFGPHIFEGELNIQEDISTVKICV-SYTIWKV-GN-LNTHLWTMLLETGGTIGKADSSYEKIVKS-----SKFGYNLLY  
11 : LDKGIG--TISSPYRIRFIAEGHPLSIKFDSE--AVIMLCVGIPTMSVVEDLPEGP-AVKIGENKDAMGD---WFR-LRVSDDEFNN---YKLVF

1 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (221/189)  
2 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (221/189)  
3 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (221/189)  
4 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (221/189)  
5 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (220/188)  
6 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (213/185)  
7 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (217/189)  
8 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (221/193)  
9 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (221/193)  
10 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (222/180)  
11 : CPITRPPIVCPFCRDDDECAKVGVI--QNGKRRLALV--NENPLDVLF--QEV (252/215)



Fig. 2-2. Comparison of amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences. The following sequences were aligned by introducing gaps to maximize sequence homology: PKPI-A group: 1, gCDI-A1 (this study); 2, pA1 (this study); 3, p749 (Hannapel, 1993); 4, API (Strukelj et al., 1990). PKPI-B group: 5, gCDI-B1 (this study); 6, PIGEN1 (Maganja et al., 1992); 7, pKEN14-28 (this study); 8, pF4 (this study). PKPI-C group: 9, p34021 (Suh et al., 1990; Stiekema et al., 1988). Sporamin A from sweet potato: 10, pIMO23 (Hattori et al., 1985). Kunitz-type trypsin inhibitor from soybean: 11, pSTI9-2 (Hoffman et al., 1984). Numbers in parentheses indicate the total number of amino acid residues in the precursor and in the mature protein. Amino acid residues conserved in more than eight sequences are shadowed. The N-terminal 10-amino-acid sequences of the various 20- to 24-kDa tuber proteins (see Fig. 5) are indicated by thickly outlined boxes. Arrowheads indicate the sites of cleavage of signal peptides in transformed tobacco cells (see text). The Phe-Thr-Ser sequence conserved at the potential site of cleavage of the signal peptide of the precursor to PKPI protein is indicated by a box with broken outline. The Asn-Pro-Ile-Xxx-Leu-Pro motifs conserved in the N-terminal parts of the proforms of precursors, which encode vacuolar-sorting information, are indicated by a thinly outlined box. The potential site of N-glycosylation, Asn-Ser-Ser, in the PKPI-A proteins is indicated by a line above the sequence.



		Amino acid sequence homology										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PKPI-A	1		99	93	89	72	75	74	74	32	28	25
	2	98		93	89	72	75	74	74	32	28	25
	3	92	92		90	73	76	75	75	31	30	24
	4	92	93	92		74	74	74	74	31	30	23
PKPI-B	5	78	78	76	78		88	90	90	33	32	25
	6	81	81	79	80	92		98	98	32	29	21
	7	80	80	80	81	91	96		99	32	30	22
	8	80	80	78	80	93	98	98		32	28	22
PKPI-C	9	51	51	52	51	52	52	53	52		28	19
Sporamin	10	49	49	48	49	50	48	47	48	48		24
KTI	11	49	50	50	50	50	49	50	50	49	48	
		Nucleotide sequence homology										







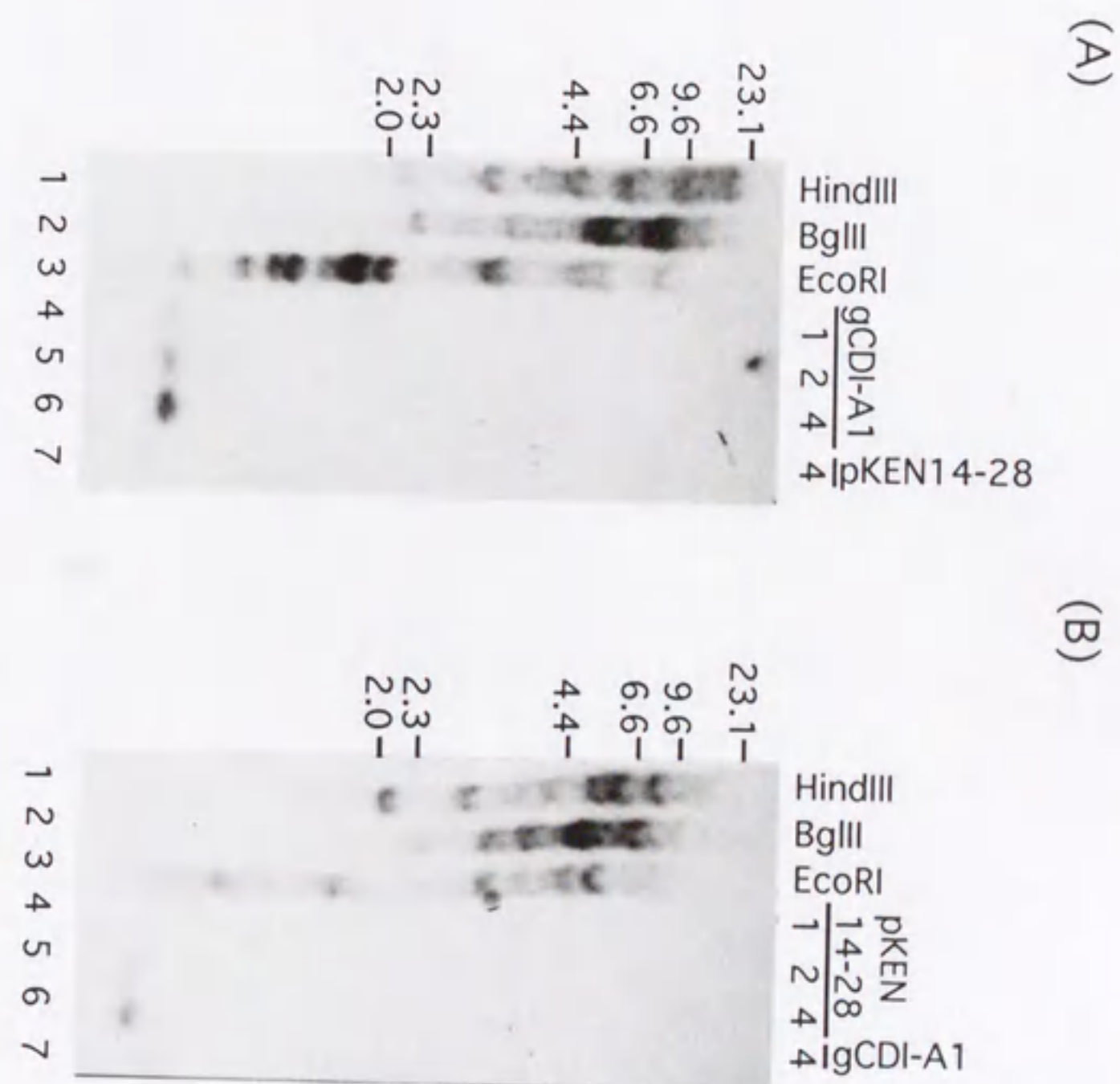
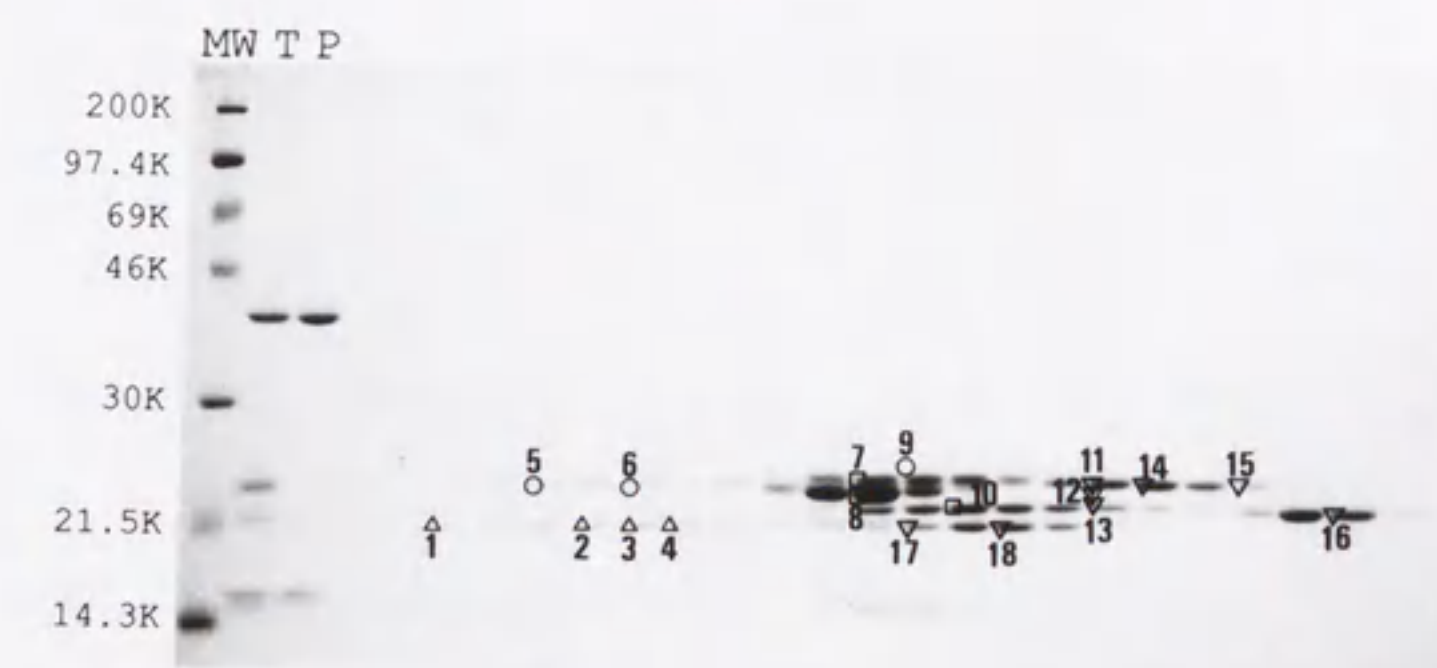




Fig. 2-4. Southern blot hybridization of total DNA from potato. Twenty micrograms of total DNA were digested to completion with *Eco*RI, *Bgl*II, or *Hind*III, fractionated on a 0.5% agarose gel and blotted onto Zeta-Probe membranes. Membranes were hybridized with a <sup>32</sup>P-labelled DNA fragment from gCDI-A1 (A) or pKEN14-28 (B). Under the conditions used, these two fragments did not cross-hybridize with each other. gCDI-A1 and pKEN14-28 DNA, equivalent to one (1), two (2) and four (4) copies per genome, were included on gels as copy-number standards. The numbers on the left side of the panel show sizes in kb.





Band No.	MW(K)	AA Sequence	Group
5	23.5	E S P L P I <sup>o/r</sup> V <sup>l/r</sup> D	PKPI-A
6	23.5	E S P L P X P V Y D	
7b	24	E S P X P K X V Y D	
8a	23	E S P P P D X X X D	
9	24.4	E <sup>s/r</sup> P V P <sup>r/r</sup> P V L D	
10b	21.9	E S P V P X P V L D	PKPI-B
		<b>E S P - P - - V - D</b>	
1	20.3	L P X D A T P V L D	
2	20.3	L P S D A T P V L D	
3	20.3	L P S D A T P V L D	
4	20.3	L P S D A T P V L D	PKPI-C
		<b>L P S D A T P V L D</b>	
7a	24	L V L P E V Y D Q D	
8a	23	L V L P E V Y D Q D	
10a	21.9	L V L P E V Y D Q D	
11	23.7	L V L P E V Y D Q D	
12	23.5	L V L P E V Y D Q D	
13	21.9	L V X P E V Y D Q D	
14	23.7	L <sup>v/r</sup> P E V Y D Q D	
15	23.7	L V L P E V Y D Q D	
16	21.4	L V L P E V Y D Q D	
17	20.4	L S E P X V Y D Q D	
18	20.4	L <sup>v/r</sup> E P I V Y D Q D	
		<b>L - - P - V Y D Q D</b>	



Fig. 2-5. Separation of proteins of 20- to 24-kDa by chromatography on an Econopack S column and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and determination of the N-terminal amino acid sequences. (Upper panel) Total soluble proteins from potato tubers were applied to an Econopack S column and the 20- to 24-kDa proteins that absorbed to the column were eluted by a gradient of KCl. Proteins in eluted fractions were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto membrane, and stained with Coomassie Brilliant Blue. MM, molecular mass standards in kDa; T, total soluble proteins applied to the column; F, flow through fraction from the column. (Lower panel) The N-terminal amino acid sequences of the polypeptides in the bands indicated by numbers in the upper panel were determined for 10 amino acid residues. Amino acid residues are indicated by one-letter abbreviations. X represent those residues that could not be identified. The consensus sequences for the proteins in the PKPI-A, -B, and -C groups are indicated by bold letters. In the upper panel, polypeptide bands that gave the N-terminal amino acid sequences of PKPI-A, -B, and -C are indicated by open circles, upward triangles, and downward triangles, respectively. Polypeptide bands marked with open squares gave major and minor amino-acid-derivatives in each cycle, from which two potential sequences, a and b, were derived.



-200

1 : CCATATAAAGTACATTAGTCAATAATAATAATCAAGATATGAAGAAGTTGGGATAAATAAATAACTTATTGAAATTCGGAATTGCCACA  
2 : GAATTCCTCTAAATTGGA-AAAGTGCACACAACTGAGAGGAAGA-AAATGAATAATATT-GATAAGCAAT-----TTATTAAATT---GAATGACC---

-150

-100

-50

1 : AAGAAATAATATTCTT-GGTAAAGATTAGAGTATTATTAATTGAA-TGAGTAGCTACTCGGACCACTACATGTTTAAACATGGCAGGAATATGAGT  
2 : ---ATTAAAGTAATTACGGGT--AGTAACA-ACCACAATAA-GGAAGT--CTAG-----T-CATTTTTAATACATGGCAAGGAATATGAGA

+1

1 : GTGTTATCACTCTATAAATAGAGGGCTTCATTAGTCTAGAGACACAGTC-----ACAAGCAATCAATATACACAAATAAAT-----CAATATGATG  
2 : GTGTGATGAGTCTATAAATAGAGGGCTTCATTAGTGTAGAG---GAGTCACAAACAAGC-----AATACACAAATAAATAGTAGCTTAACAA---GATG



Fig. 2-6. Comparison of the nucleotide sequences of the 5'-upstream regions of gCDI-A1 and gCDI-B1. The site of initiation of transcription of gCDI-A1 is indicated by an arrowhead and numbered +1. The two sequences were aligned to show maximum similarities by incorporating gaps, and nucleotide residues conserved between the two sequences are underlined. A potential TATA-box is shadowed and the initiation codon is boxed.



Fig. 1. Localization of the PKPI-A and PKPI-B in the tubers, roots, stems, mature leaves, young leaves and flower buds of the potato. The tubers were cut into 1 cm thick slices and the slices were stained with 0.1% toluidine blue. The roots, stems, mature leaves, young leaves and flower buds were stained with 0.1% toluidine blue. The tubers were stained with 0.1% toluidine blue. The roots, stems, mature leaves, young leaves and flower buds were stained with 0.1% toluidine blue. The tubers were stained with 0.1% toluidine blue. The roots, stems, mature leaves, young leaves and flower buds were stained with 0.1% toluidine blue.

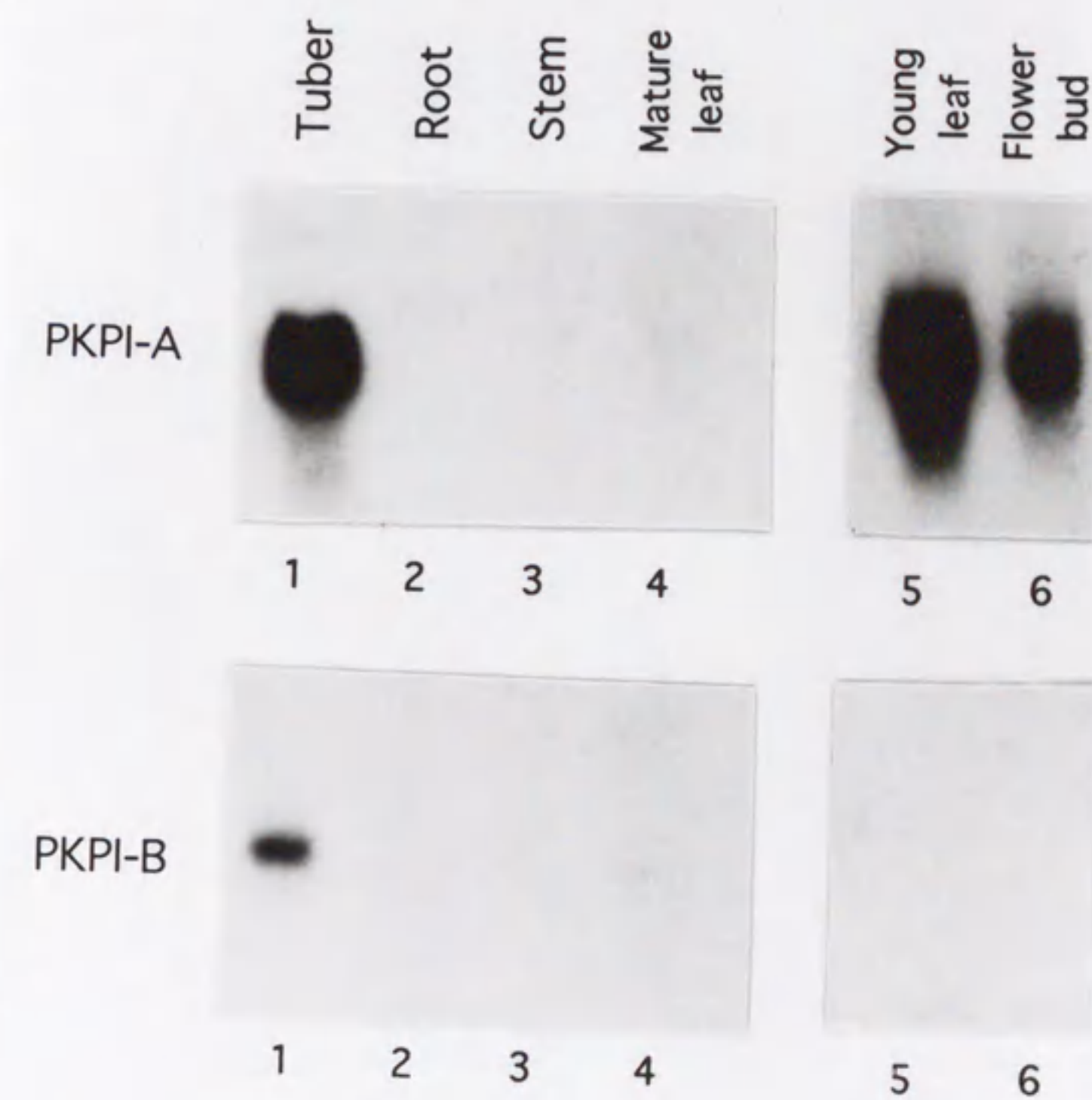




Fig. 2-7. Northern blot hybridization of PKPI-A and -B mRNAs. Total RNA from the following organs of mature potato plants was hybridized with the  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA fragment of gCDI-A1 (PKPI-A) or pKEN14-28 (PKPI-B) under conditions such that these two fragments did not cross-hybridize with each other. 1, Tuber; 2, root; 3, stem; 4, mature leaf; 5, young leaf; 6, flower bud. Autoradiograms of lanes 5 and 6 were exposed for three times as long as those of lanes 1 to 4.



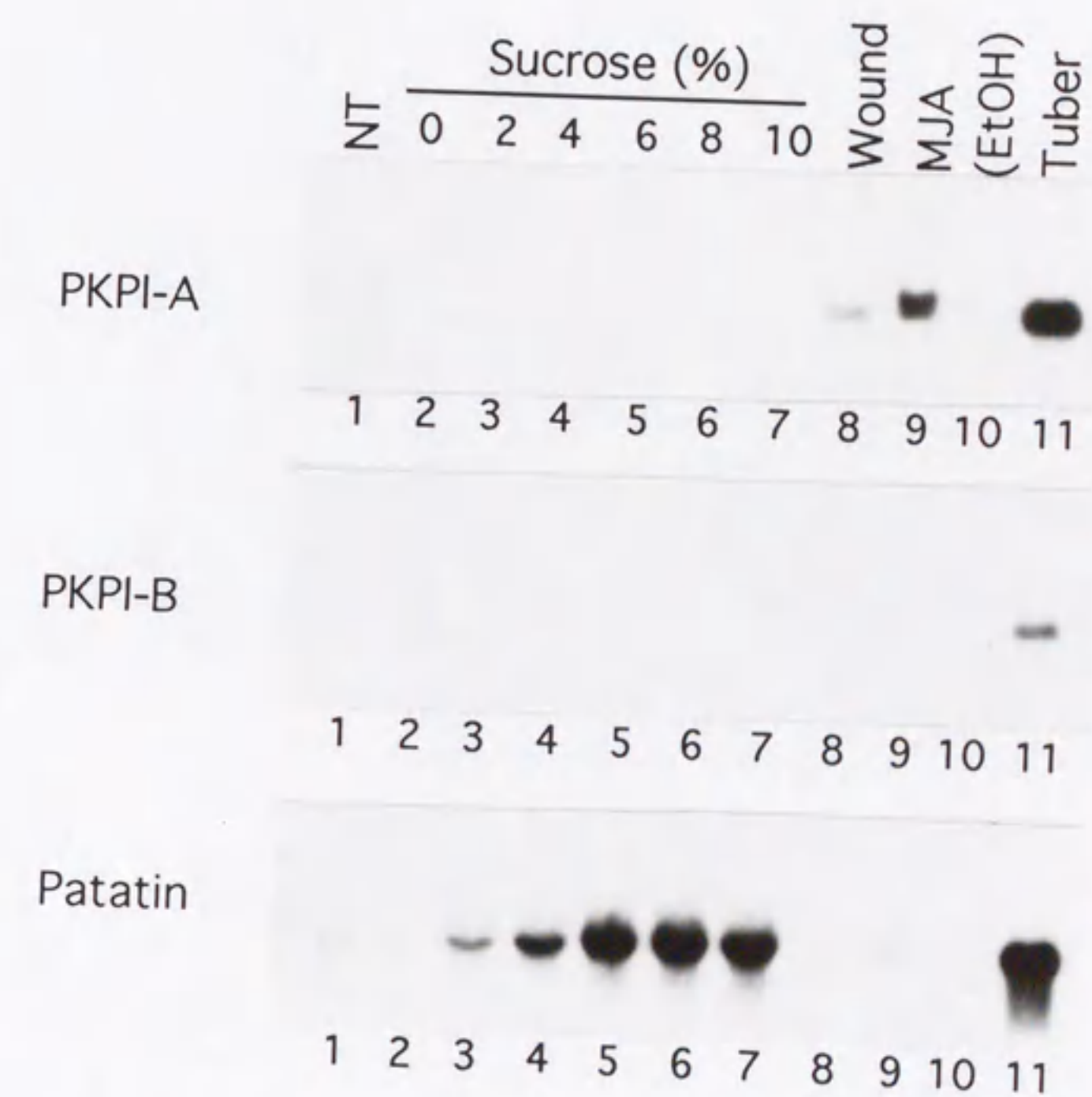




Fig. 2-8. Accumulation of PKPI-A and -B mRNAs in mature leaves of potato. Lane 1, NT, non-treated leaves; lanes 2 to 7, leaf-petiole cuttings of potato were treated with sucrose at the concentrations (w/v%) indicated above the panel for 3 days; lane 8, leaves were mechanically wounded and RNA was isolated from the wounded leaves; lanes 9 and 10, leaf-petiole cuttings were treated with methyl jasmonate (MJA) at 50  $\mu$ M in 0.05% ethanol (lane 9) or with 0.05% ethanol alone (lane 10); lane 11, total RNA from the tuber. Membranes were hybridized with the  $^{32}$ P-labeled DNA fragment of gCDI-A1 (PKPI-A) or pKEN14-28 (PKPI-B) as probes specific for PKPI-A and -B mRNAs, respectively. The membrane exposed to the PKPI-B probe was freed of the probe and rehybridized with patatin cDNA (Patatin).



### 第3章

#### ジャガイモの2つのプロテアーゼインヒビター遺伝子の 発現誘導におけるジャスモン酸類の構造と機能の関係

##### はじめに

ジャスモン酸 (JA, 3-oxo-2-[(Z)-2-pentenyl]-1-cyclopentaneacetic acid) は植物界に広く存在し、動物のプロスタグランジンと類似した構造を持ち、C<sub>18</sub>の不飽和脂肪酸からリボキシゲナーゼを介して合成される<sup>(35, 36, 37)</sup>。ジャスモン酸 (JA) に加えてメチルジャスモン酸 (MJA) やその他のJA構造類似化合物も様々な植物種から単離されており、これら化合物を総称してジャスモン酸類と呼ぶ<sup>(36, 37)</sup>。外からJAを植物体に与えると様々な生理的影響を及ぼすことがわかっている。それらは成長阻害、老化促進、気孔開度の阻害そしてジャガイモ塊茎形成の促進などである<sup>(36, 37)</sup>。JAとMJAはまた、特異的なタンパク質の合成を誘導する<sup>(38-40)</sup>。これらには貯蔵タンパク質やストレス—あるいは傷害刺激によってその発現が誘導されるタンパク質も含まれる<sup>(36, 41)</sup>。葉に傷害刺激を与えたとき、または培養細胞をエリシターで処理したときに細胞内のJAとMJAの量が速やかに上昇することがわかっており<sup>(42, 43, 44, 62)</sup>、JAとMJAは生体防御関連遺伝子の発現誘導に至るシグナル伝達系において生体内のメディエーターとして働いていると考えられる<sup>(41-45)</sup>。

JA類による遺伝子の発現誘導はJA特異的なレセプターによって仲介されていると考えられる。成長阻害<sup>(37, 46)</sup>、老化促進<sup>(47, 88)</sup>、ジャガイモ塊茎形成の促進<sup>(48)</sup>に必要なJAの構造は種々のJA構造類似化合物を用いた実験から明らかになっているが、植物遺伝子の発現誘導におけるJA類の構造と機能の関係は全く不明であった。ジャガイモのカテブシンDインヒビター (CDI) 遺伝子とプロ



テアーゼインヒビター II (PI-II) 遺伝子はどちらも JA 処理で葉においてその発現が誘導されることが明らかになっていた<sup>(44, 50, 51)</sup>ので、種々の JA 構造類似化合物を用いて CDI 遺伝子と PI-II 遺伝子の発現誘導活性を調べた。この結果から、CDI 遺伝子と PI-II 遺伝子の発現誘導に必要な JA 類の構造は、JA 類が持つ成長阻害、老化促進、塊茎形成促進に必要な構造とは異なっていることが明らかになった。



## 実験材料および方法

### 1. 化合物

全ての化合物<sup>(48)</sup>は日本ゼオン(株)と日本タバコ(株)から分与していただいた。これらは全て合成化合物のラセミ体でシクロペンタン環に対して *cis*型と *trans*型との混合物である。JAとその構造類似化合物はTween20に溶かしたのち、断らない限り、最終濃度が50  $\mu$ Mになるように水で希釈して用いた。

### 2. 植物材料

ジャガイモ植物体は名古屋大学農学部附属農場で栽培された男爵 (*Solanum tuberosum* cv. Danshaku) か、16時間明/25°C、8時間暗/20°Cの条件で温室で栽培したものを用いた。葉-葉柄は剃刀で植物体より切り取った。3つから5つの葉-葉柄植物片をまとめてJA類の溶液につけた。処理は断らない限り、20°C、暗所で24時間行った。植物片の葉は処理後すぐに液体窒素で凍らせて抽出まで-80°Cで保存した。

### 3. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

ホルムアミドで変性させたRNAを用いたノーザンブロットをZeta-Probe膜 (Bio-Rad) に用意した。ハイブリダイゼーションに用いたプローブは次のとおりである。CDI mRNAに対してはゲノミッククローン gCDI-A1<sup>(51)</sup>の断片を用いた。

PI-II mRNAに対しては、ジャガイモ塊茎のRNAを鋳型にしたPCRによりPI-IIのコーディング領域を含む断片を増幅し、シーケンスでその塩基配列<sup>(53)</sup>を確認したのちプローブとして用いた。DNA断片はオリゴラベリングキット (Amersham) により<sup>32</sup>Pでラベルした。ハイブリダイゼーションのあと、膜はオートラジオグラフィーに用いるか、CDI mRNAとPI-II mRNAに相当するバンドの放射能活性をradioanalytical imaging system (Ambis Systems) で測定した。



## 結果

### 1. ジャガイモの葉におけるCDI mRNAとPI-II mRNAのメチルジャスモン酸 (MJA) による蓄積誘導

数種の異なる濃度のメチルジャスモン酸 (MJA) で24時間処理したジャガイモの葉-葉柄植物片の葉から全RNAを抽出し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによりCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積量を調べた。MJAによるCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導は5 $\mu$ M以上の濃度のとき見られた (Fig. 3-1)。つぎに50 $\mu$ MのMJAで植物片を0, 3, 6, 9, 12, 19, 24時間処理したのち、CDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積量を調べたところ、CDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積パターンは類似していた (Fig. 3-2)。どちらのmRNAも2から3時間のラグのあと蓄積し始め、19時間後にはプラトーに達した。

### 2. ジャスモン酸 (JA) 構造類似化合物によるCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導

種々のJA構造類似化合物 (Fig. 3-3) によるCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導を調べた。これら化合物のほとんどは植物界に存在し、既に塊茎形成促進活性については調べられている<sup>(48)</sup>。ジャガイモの葉-葉柄植物片を様々なJA構造類似化合物水溶液 (50 $\mu$ M) で24時間処理し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによりCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積量を調べた。この実験ではポジティブコントロールとしてJA処理を行い、そのときの蓄積量を100として、その他の化合物による蓄積量を相対的に表した。それぞれの化合物について3から5回の実験を行い、その平均値を示した (Fig. 3-4)。

それぞれのJA構造類似化合物によるCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積は互いに類似していた (Fig. 3-4)。JAとMJAが最も高い蓄積誘導活性を示した。MJAはJAに比べるといくらか低い活性を示した。ククルビン酸 (CA) とメチルククルビン酸 (MCA) (これらはJAとMJAのシクロペンタン環のC-3位のケトンが水酸基に置換されている) はJAに比べて低い活性を示した。ジハイドロジャスモン酸



(HJA)とそのメチルエステルであるメチルジハイドロジャスモン酸(MHJA)はほとんど活性を示さなかったことから、JAのシクロペンタン環のC-2位のn-pentenyl基の二重結合がその活性に必要であることがわかった。ツベロン酸グリコシド(TAG)はジャガイモの葉から単離された塊茎形成促進活性を持つ化合物である<sup>(54)</sup>。TAG、ツベロン酸(TA)、メチルツベロン酸(MTA)これら化合物はどれも高い塊茎形成促進活性を示した<sup>(48)</sup>が、CDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導活性はほとんど示さなかった。このことから、シクロペンタン環のC-2位の-2'-pentenyl基もその活性に必要なことが明らかになった。シクロペンタン環のC-1位のアセチル基を取り除いた化合物(Fig. 3-3 化合物 12)、このアセチル基をエタノールに還元した化合物(Fig. 3-3 化合物 7)はほとんど活性を持たなかった。以上のことから、シクロペンタン環のC-1位のアセチル基も、そのメチルエステルも含めて、JAとMJAによるCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導に必要なことが明らかになった。



## 考察

MJA処理によるCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導は同じような濃度依存性を示し (Fig. 3-1)、同じようなタイムコースを示した (Fig. 3-2)。また、種々のJA構造類似化合物によるCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導活性も類似していた (Fig. 3-4)。これらの結果からCDI遺伝子とPI-II遺伝子はジャガイモの葉において同様な機構によってその発現が制御されていると考えられた<sup>(50)</sup>。ところで、JAとMJAはどちらも同様な高い活性を示したことから、MJAは生体内で加水分解を受け、JAとなり活性を発現していると考えられた<sup>(44)</sup>。

塊茎形成促進活性の測定ではCA, MCA, TA, MTA, TAGは $10^{-6}$ から $10^{-5}$ Mの濃度で、どれもJAとMJAと同等の活性を示した<sup>(48)</sup>。これとは対照的にCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導活性は、CA, MCAはJA, MJAに比べて低く、TA, MTA, TAGはほとんど活性を持たなかった (Fig. 3-4)。このことからJA構造類似化合物のCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導に必要な構造は、それらの塊茎形成促進に必要な構造と異なることがわかった。これらプロテアーゼインヒビター遺伝子のJA類による葉での発現誘導と、それらの塊茎での構成的な発現との関連は今のところ不明である。

アベナ葉片を用いた種々のJA構造類似化合物による老化促進活性ではMJAが最も高い活性を示し、 $10^{-6}$ から $10^{-5}$ Mの濃度で老化を促進した<sup>(47, 88)</sup>。JAはMJAよりかなり活性が低く、CAはほとんど活性を持たなかった。また、塊茎形成促進活性の場合とは異なり、MHJAがMJAと同等の高い活性を持っていた。イネ幼苗伸長抑制活性を種々のJA構造類似化合物を用いて調べると、老化促進の場合と類似していた<sup>(46)</sup>。TAとMTAは老化促進と成長阻害活性は示さない<sup>(37)</sup>。JA構造類似化合物のCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導における構造と活性の関係は老化促進のそれと類似していたが、強い老化促進活性を持つMHJAはCDI mRNAとPI-II mRNAの蓄積誘導活性を持っていなかった (Fig. 3-4)。

つまり、JA類の傷害刺激から遺伝子発現に至る情報を仲介する働きと、生長と分化を制御している働きは、それぞれの活性発現に必要な構造が異なること



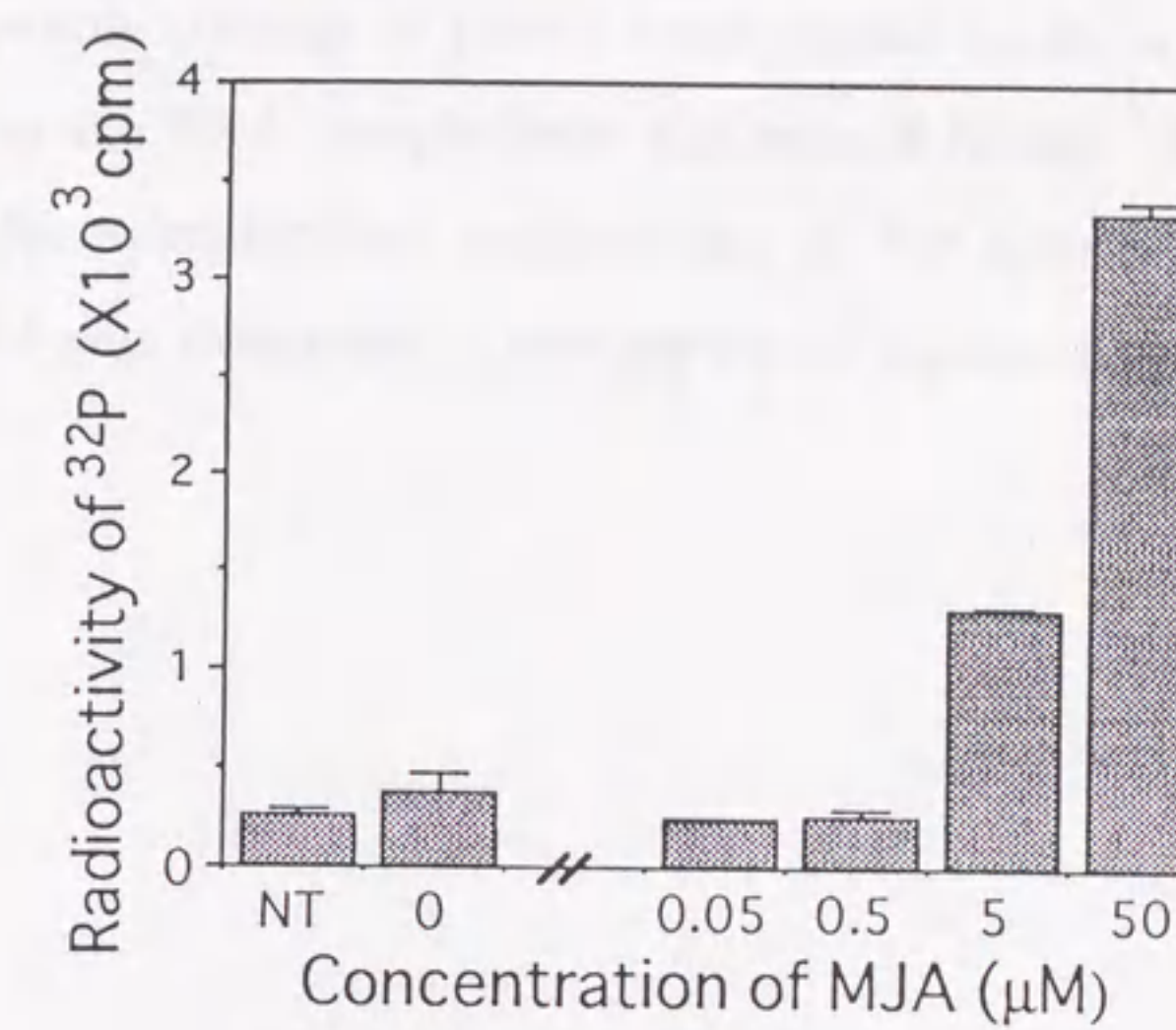
から、互いに独立した分子機構によって制御されていると考えられる。しかし、上で述べたJA類による生長と分化に対する影響はいろいろな異なる植物種で、また異なる処理期間で調べられてきたので、生体内での変換<sup>(55)</sup>を考えたさらなる解析が望まれる。

この実験から明らかになったことは、JA類による植物遺伝子の発現制御機構に関わるJA結合タンパク質やJAのレセプターの研究に役立つと考えられる。





(A) CDI mRNA



(B) PI-II mRNA

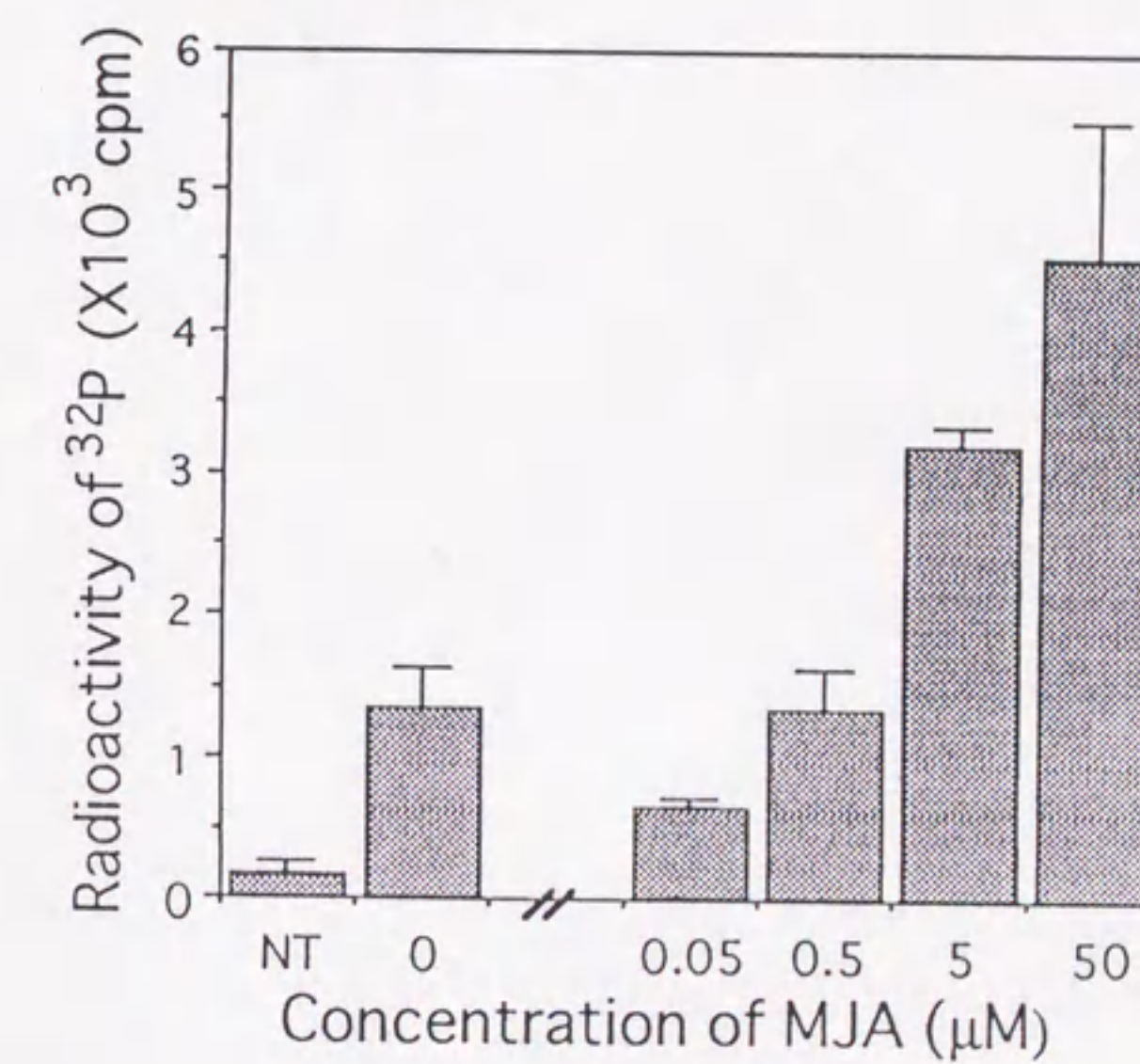






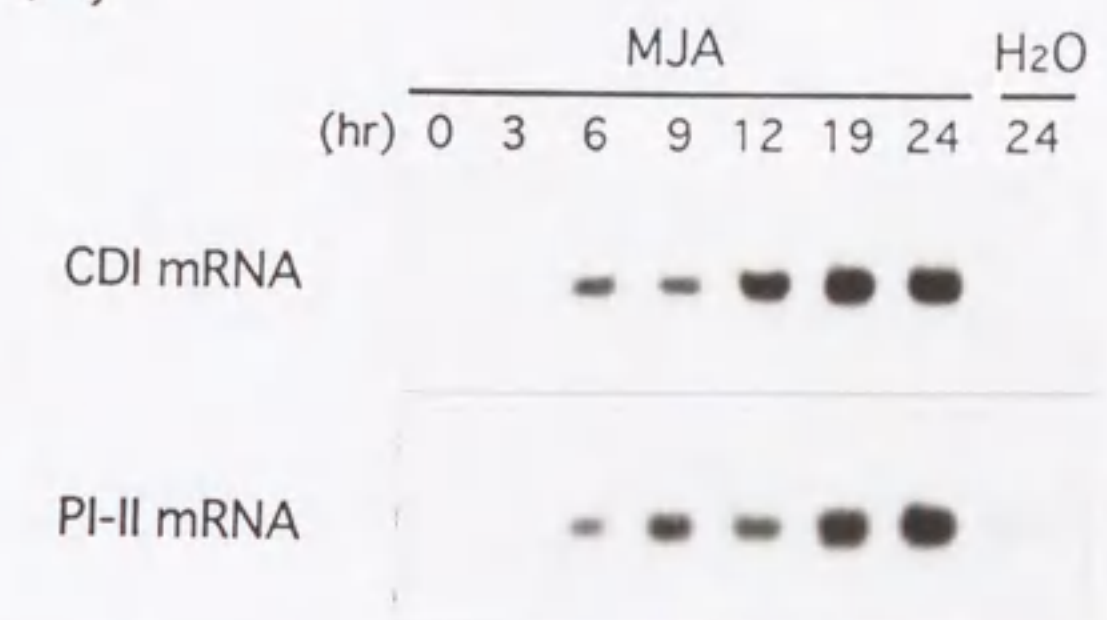
Fig. 3-1. Accumulation of CDI mRNA (A) and PI-II mRNA (B) in Leaves of Potato after the Treatment with Various Concentrations of MJA.

Leaf-petiole cuttings of potato were treated for 24 hr. Lane NT indicates the RNA sample from non-treated leaves. After northern blot hybridization, radioactivity of  $^{32}\text{P}$  hybridized to mRNA band was measured in two separated experiments.





(A)



(B)

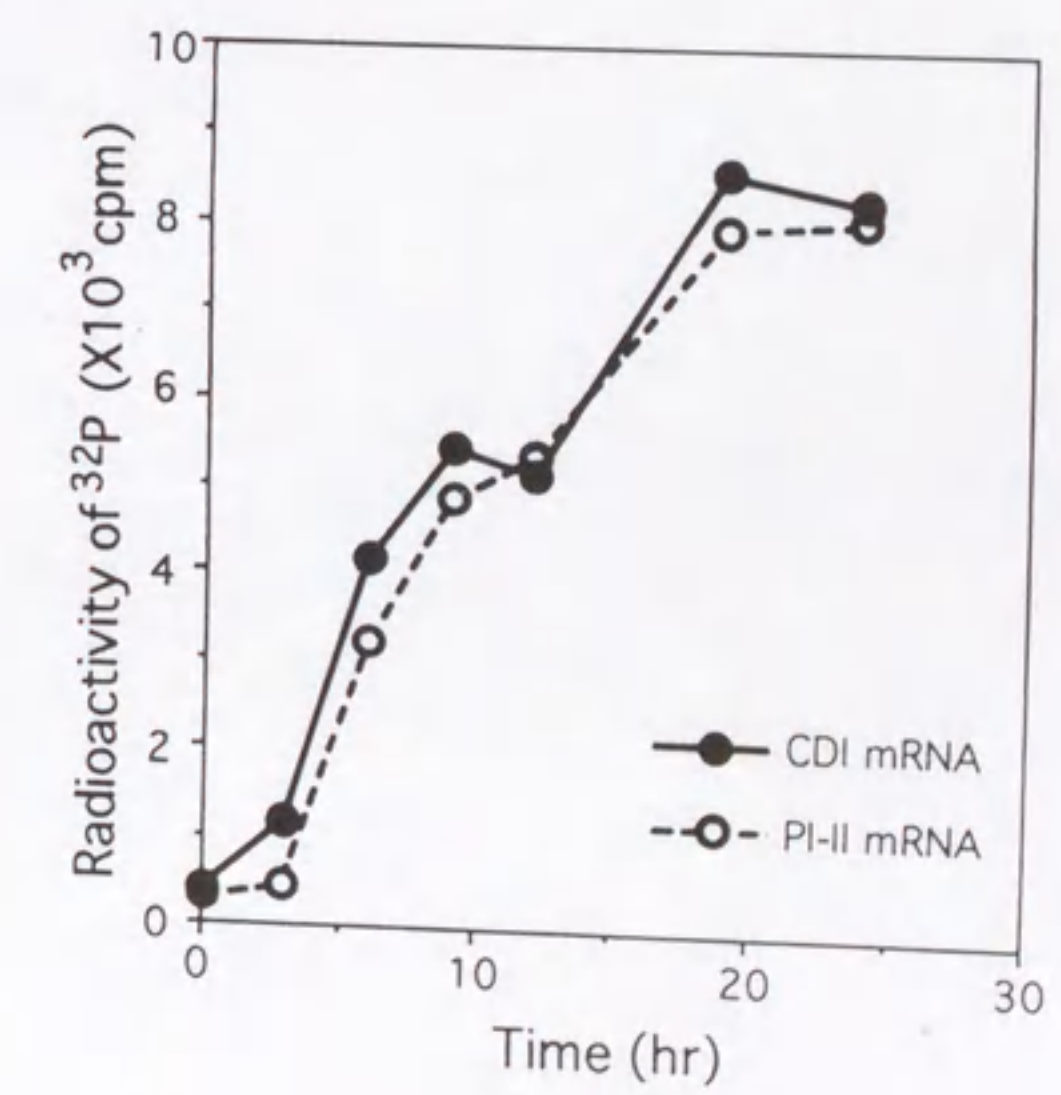


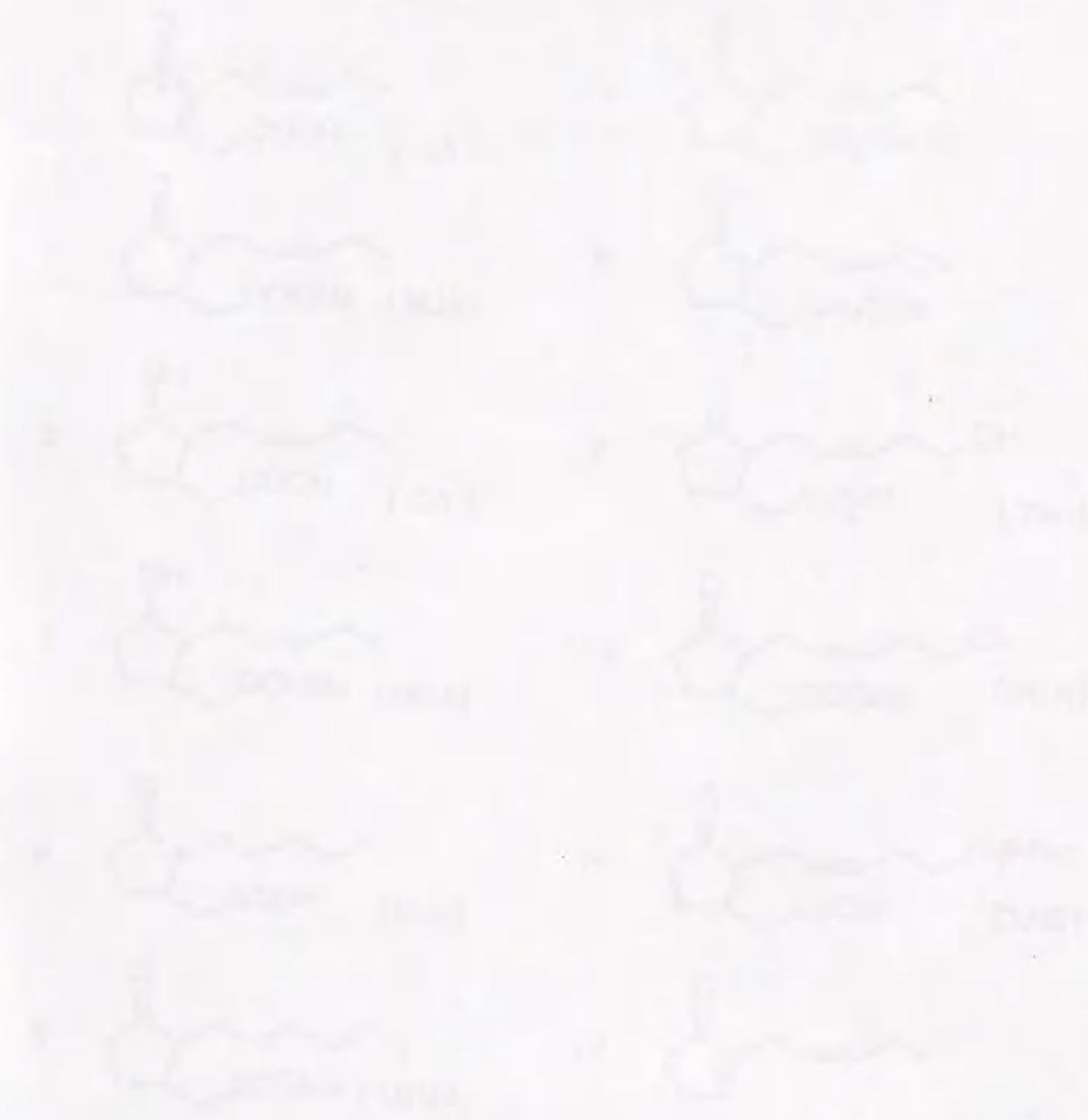


Fig. 3-2. Course of Accumulation of CDI and PI-II mRNAs in Leaves of Potato after the Treatment with MJA.

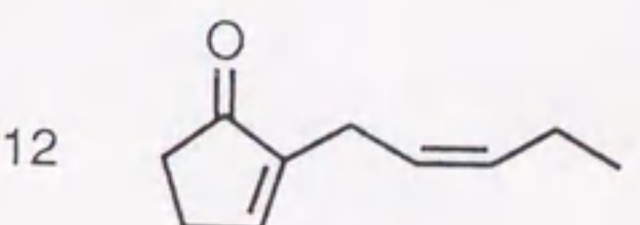
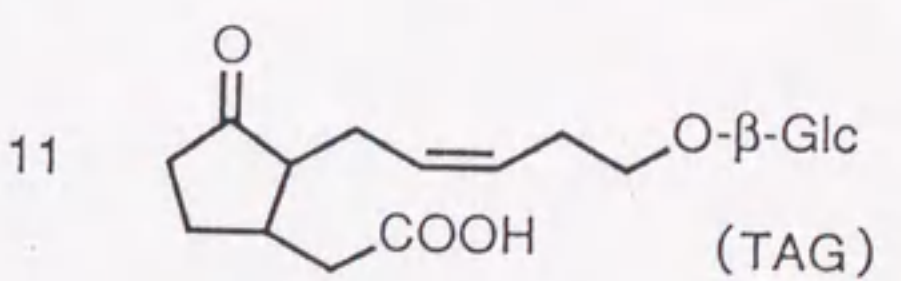
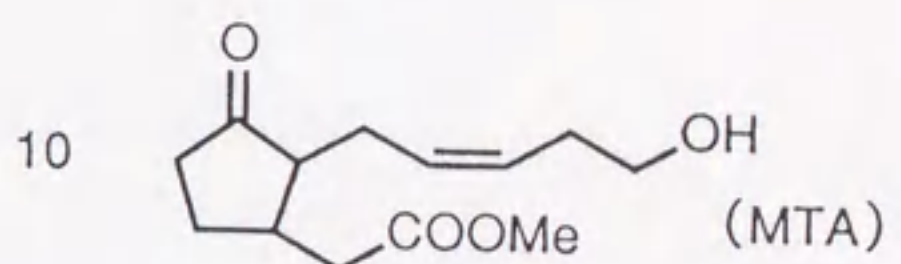
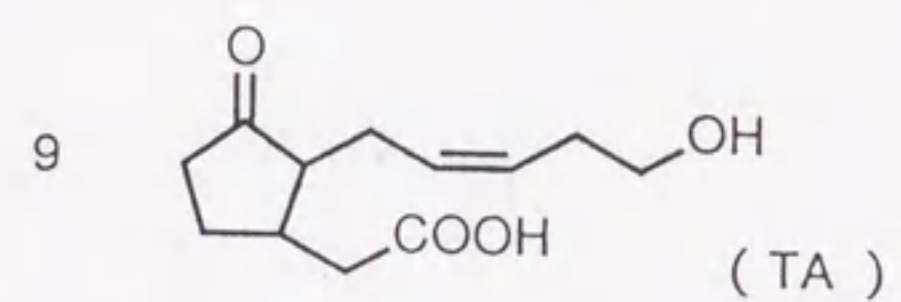
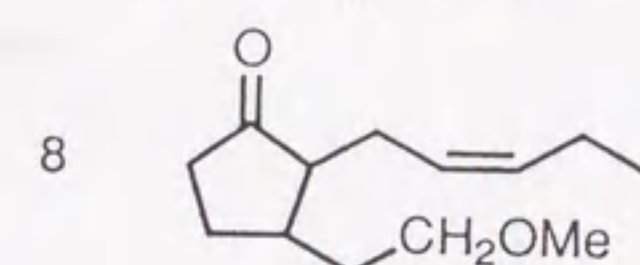
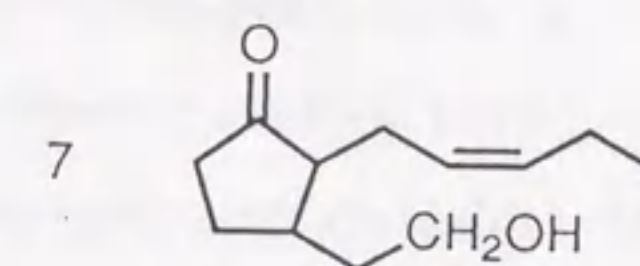
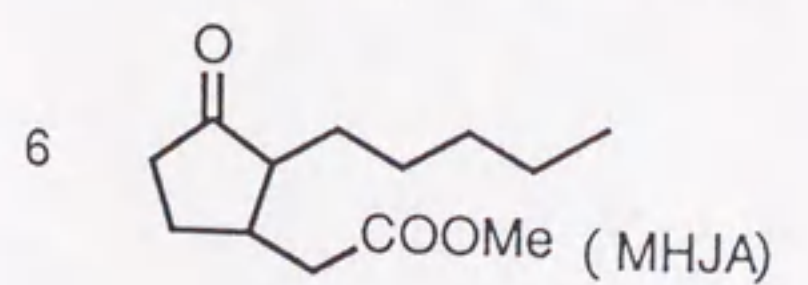
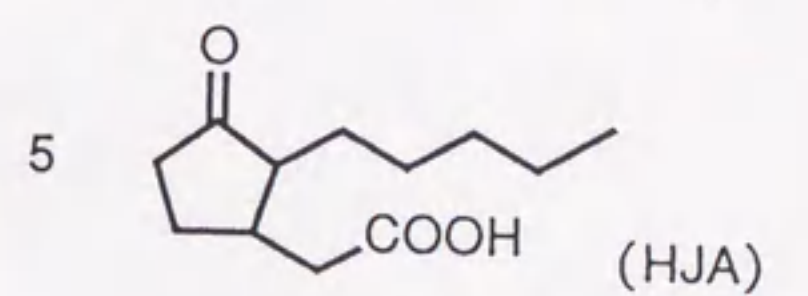
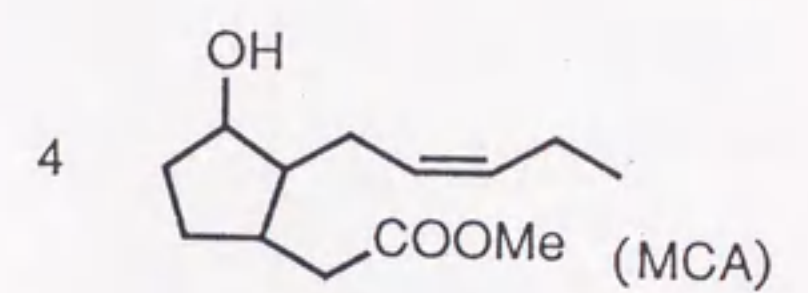
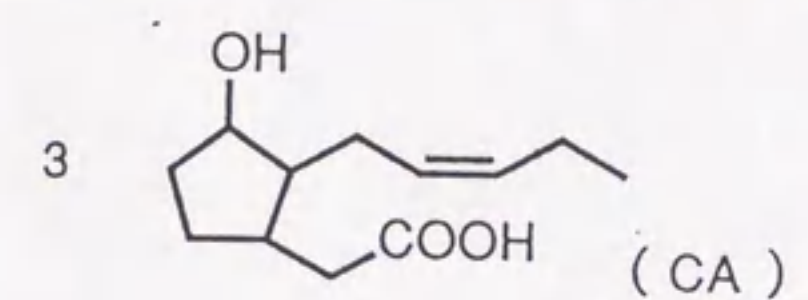
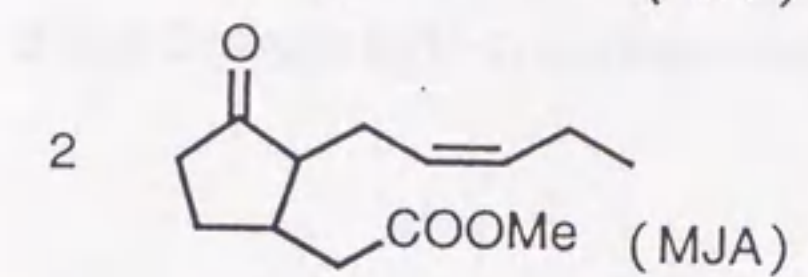
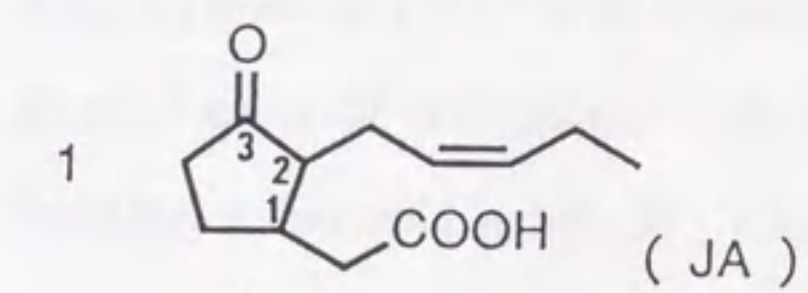
Leaf-petiole cuttings of potato were treated with 50  $\mu$ M MJA.

(A) Autoradiographs of northern blot membranes. (B)

Radioactivity of  $^{32}$ P hybridized to the mRNA band.









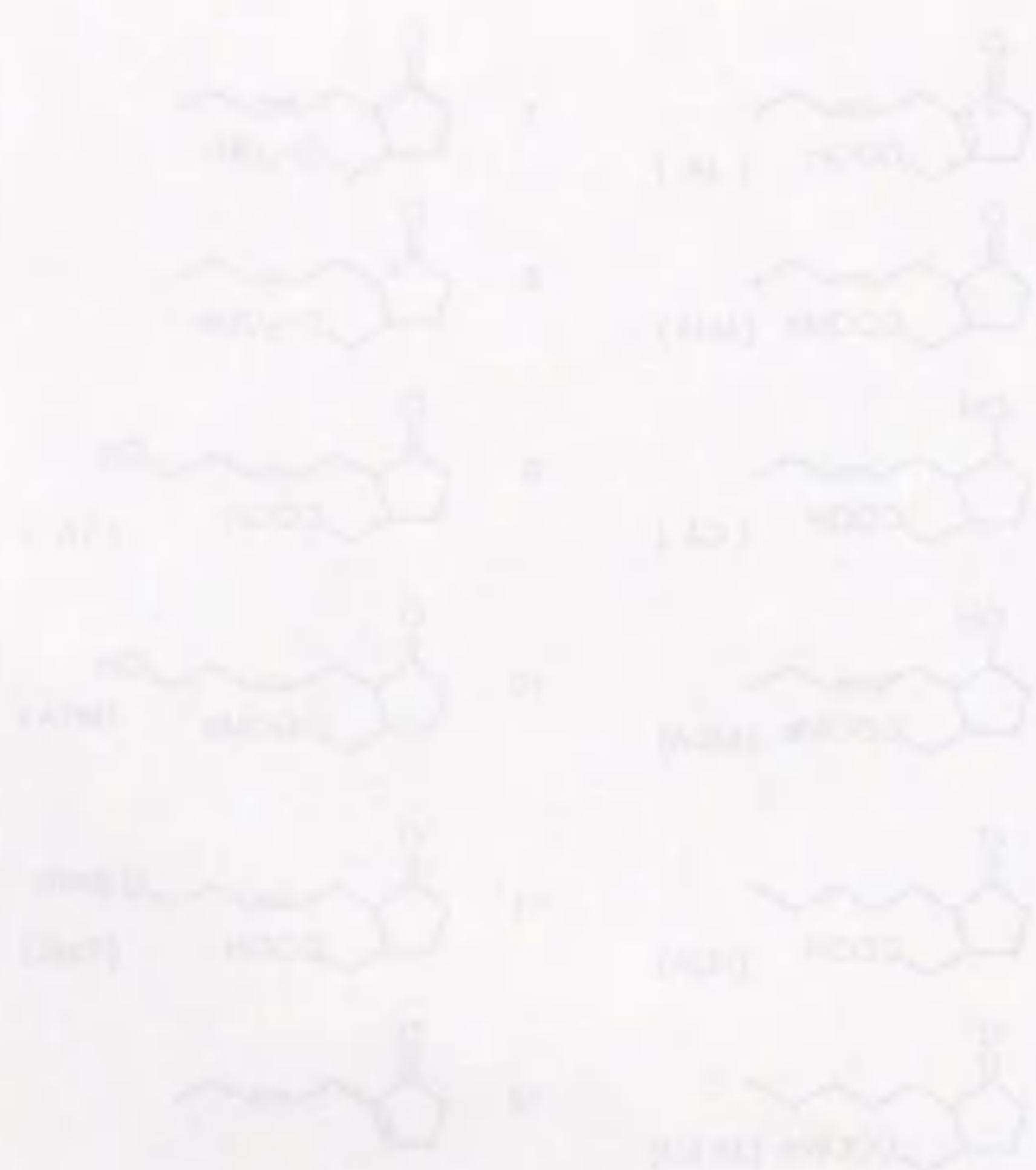
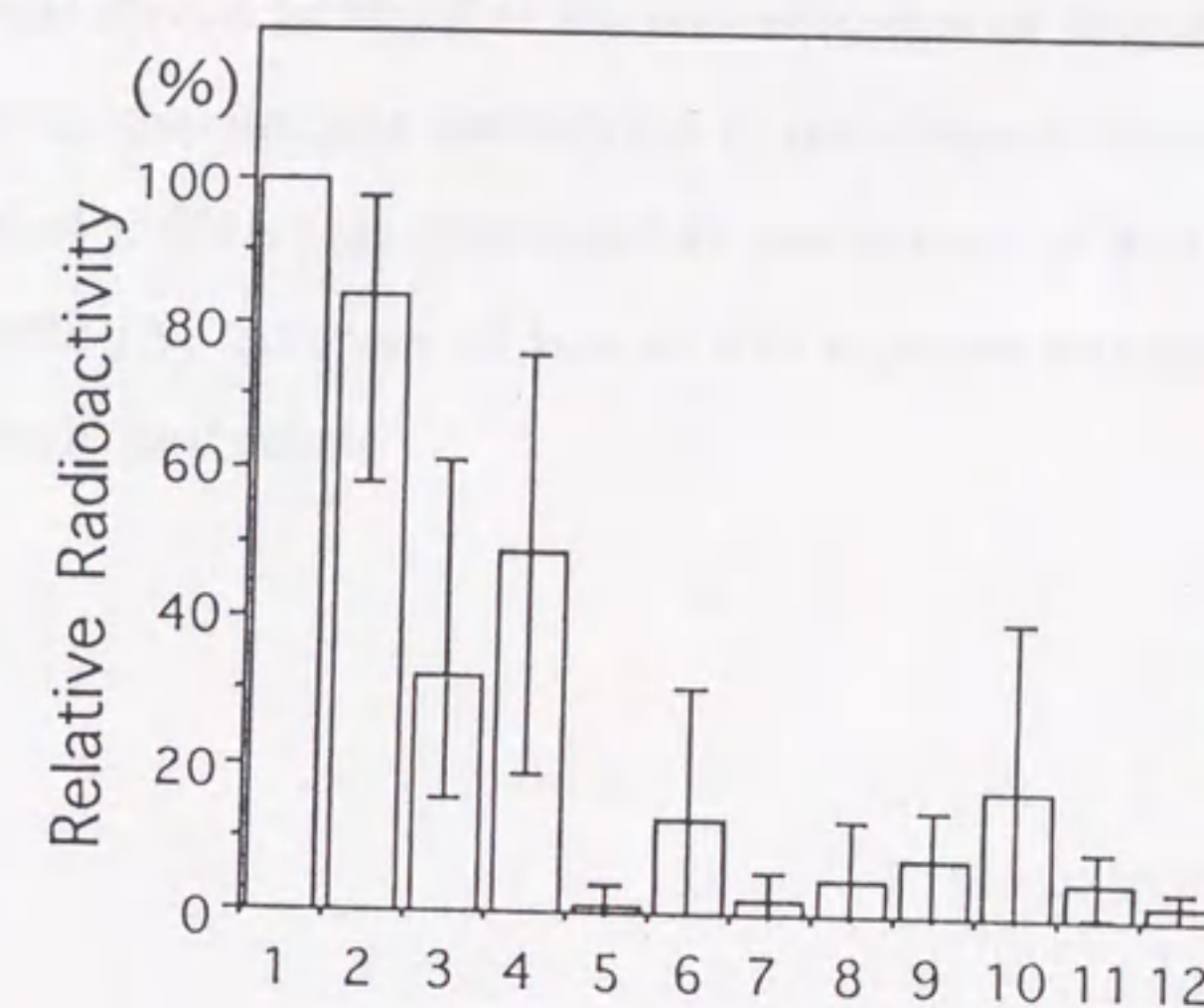


Fig. 3-3. Chemical structures of JA and Its Related Compounds Used in This Paper.

1, JA (jasmonic acid); 2, MJA (methyl jasmonic acid); 3, CA (cucurbic acid); 4, MCA (methyl cucurbic acid); 5, HJA (dihydrojasmonic acid); 6, MHJA (methyl dihydrojasmonic acid); 7, 3-(2-hydroxyethyl)-2-[(*z*)-2-pentenyl]-1-cyclopentanone; 8, methyl ester of compound 7; 9, TA (tuberonic acid); 10, MTA (methyl tuberonic acid); 11, TAG (tuberonic acid glucoside); 12, 2-[(*z*)-2-pentenyl]-2-cyclopenten-1-one.



(A) CDI mRNA



(B) PI-II mRNA

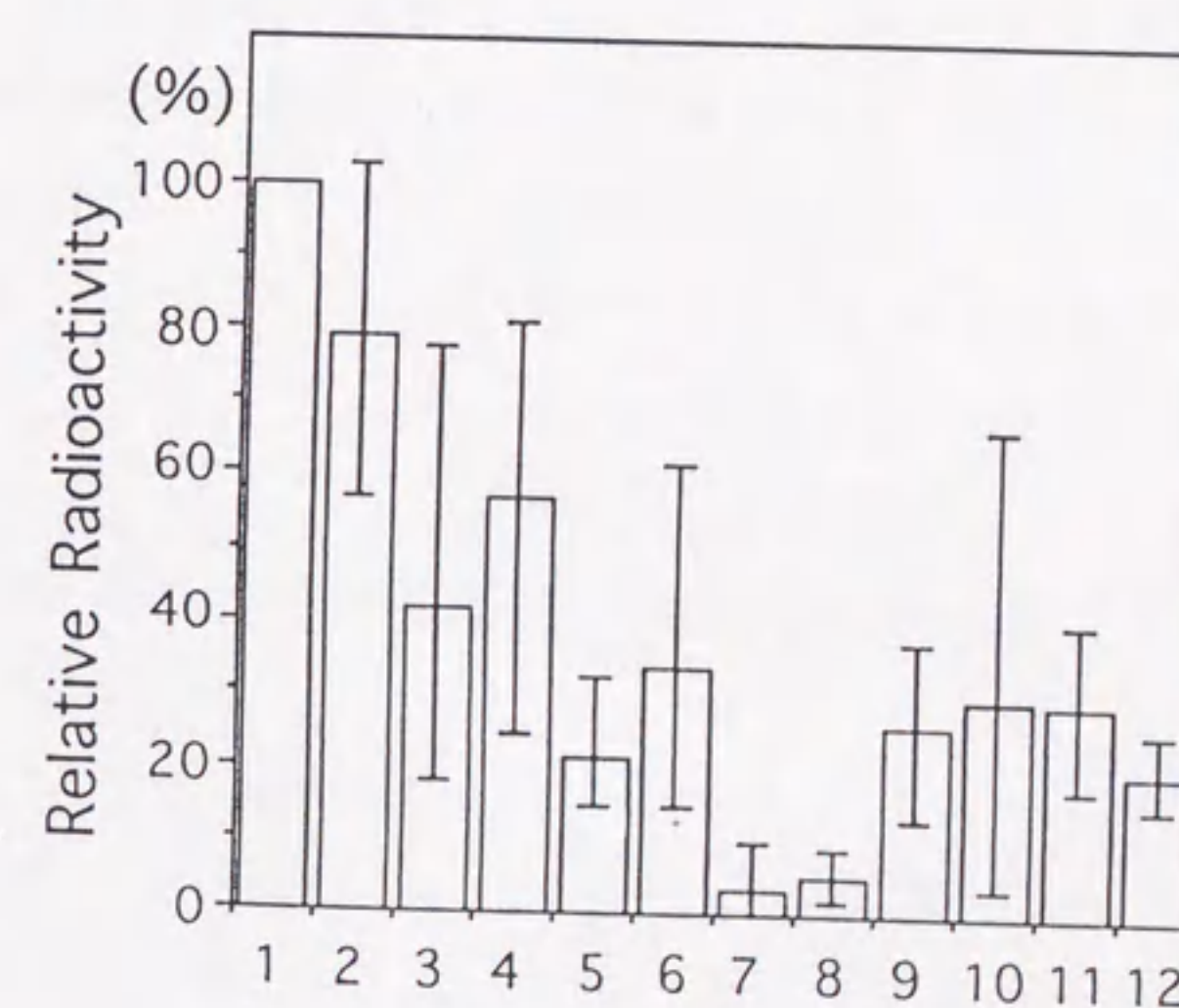






Fig. 3-4. Accumulation of CDI and PI-II mRNAs in Leaves of Potato after the Treatment with Various JA-Related Compounds.

Leaf-petiole cuttings of potato were treated with various compounds shown in Fig. 3 at the concentration of 50  $\mu$ M for 24 hr. Numbers on the abscissa correspond to compounds listed in Fig. 3. The level of mRNA was expressed as percentage of that in leaves treated with JA. Average of two to five separate experiments are shown with deviations.