

ナス科植物における病害ストレス  
応答性因子の探索とその機能解析

竹本大吾



①  
報告番号 B 第 4563 号

ナス科植物における病害ストレス  
応答性因子の探索とその機能解析

竹本大吾

2000

### Abbreviations

BPB	: bromophenol blue
BSA	: bovine serum albumin
BNHS	: biotin N hydroxysuccinimide ester
cAMP	: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
CBB	: coomassie brilliant blue
CCD	: chilled charge-coupled device
CMD	: carboxymethylated dextran
CTAB	: cetyltrimethylammonium bromide
DEPC	: diethylpyrocarbonate
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNase I	: deoxyribonuclease I
DTT	: dithiothreitol
EDC	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	: ethyleneglycol bis(2-aminoethyl ether)tetraacetic acid
EIG	: elicitor-inducible gene
EILP	: elicitor-inducible LRR protein
GTPase	: guanosine 5'-triphosphatase
HEPES	: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HRP	: horseradish peroxidase
HWC	: hyphal wall components
Ig	: immunoglobulin
IPTG	: isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-thiogalactoside
LRR	: leucine-rich repeat
MeJA	: methyl jasmonate
MOPS	: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
NADPH	: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NHS	: N-hydroxysuccinimide
NTA	: nitrilo-triacetic acid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: superoxide anion
ORF	: open reading frame



PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PAL	: phenylalanine ammonia-lyase
PBS	: phosphate-buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PI-II	: proteinase inhibitor II
PMSF	: phenylmethanesulfonyl fluoride
PR protein	: pathogenesis-related protein
PVDF	: polyvinylidene difluoride
PVP	: polyvinylpyrrolidone
RACE	: rapid amplification of cDNA ends
SA	: salicylic acid
SAR	: systemic acquired resistance
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SOD	: superoxide dismutase
TAME	: Na-p-tosyl-L-arginine methyl
TBS	: tris buffered saline
Tris	: 2-N-tris (hydroxymethyl) aminomethane



## 目次

第一章	緒論.....	1
第二章	ジャガイモ細胞における原形質凝集反応と凝集反応阻害のおよぼす 種々の誘導抵抗反応への影響	
I.	緒言.....	8
II.	材料と方法	
1.	供試植物.....	11
2.	供試菌.....	11
3.	菌体壁成分エリシターの調製.....	11
4.	ジャガイモ塊茎からのプロトプラストの調製.....	12
5.	ジャガイモ塊茎とプロトプラストの HWC および阻害剤処理....	13
6.	ジャガイモ塊茎の活性酸素生成の測定.....	13
7.	ジャガイモ塊茎のタンパク質試料の調製.....	14
8.	SDS-PAGE およびウエスタン解析.....	14
9.	ジャガイモ塊茎からの全 RNA 抽出.....	15
10.	ノーザンハイブリダイゼーション.....	16
III.	結果	
1.	エリシター処理ジャガイモプロトプラストの原形質凝集反応とサ イトカラシン D 処理の影響.....	17
2.	ジャガイモ塊茎の活性酸素生成におよぼす凝集反応阻害の影響 .....	18
3.	ジャガイモ塊茎のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子発 現誘導におよぼす凝集反応阻害の影響.....	18
4.	ジャガイモ塊茎の PR タンパク質蓄積におよぼす凝集反応阻害の 影 響.....	21
5.	ジャガイモ塊茎の過敏感細胞死におよぼす凝集反応阻害の影響 .....	21
IV.	考察.....	25



### 第三章 ジャガイモ懸濁培養細胞におけるアクチン結合タンパク質の精製

I. 緒言.....	30
II. 材料と方法.....	
1. 供試植物.....	31
2. ジャガイモ懸濁培養細胞の調製.....	31
3. ジャガイモ懸濁培養細胞の HWC および阻害剤処理.....	32
4. 原形質凝集反応率の測定.....	32
5. DNase I 阻害法によるアクチンの定量.....	32
6. ジャガイモ懸濁培養細胞のアクチンおよびアクチン関連タンパク質の部分精製.....	33
7. SDS-PAGE およびウエスタン解析.....	35
8. G-アクチン画分と F-アクチン画分の分画.....	37
9. アクチン結合能の解析.....	37
10. タンパク質の N 末端アミノ酸配列の決定.....	39
III. 結果.....	
1. ジャガイモ懸濁培養細胞の HWC に対する反応性.....	39
2. ジャガイモ懸濁培養細胞の原形質凝集反応におよぼすサイトカリン D の影響.....	41
3. ジャガイモ懸濁培養細胞のアクチン結合タンパク質の精製.....	41
4. 塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質のアクチン結合能の解析.....	46
IV. 考察.....	52

### 第四章 ディファレンシャルディスプレイ法によるタバコ植物の病害ストレス誘導性遺伝子の単離と発現解析

I. 緒言.....	58
II. 材料と方法.....	
1. 供試植物.....	59
2. 供試菌.....	60
3. タバコ葉へのエリシター処理、傷処理および細菌接種.....	60
4. タバコ葉からのタンパク質試料の調製.....	60
5. SDS-PAGE およびウエスタン解析.....	61



6. タバコ葉からの全 RNA の抽出.....	61
7. ディファレンシャルディスプレイ法.....	62
8. RT-PCR.....	63
9. ノーザンハイブリダイゼーション.....	63
10. cDNA ライブラリーの作製とスクリーニング.....	65
11. タバコ葉からのゲノム DNA の抽出.....	67
12. インパース PCR.....	68
13. サザンハイブリダイゼーション.....	70
14. 塩基配列の決定とデータベース解析.....	70
III. 結果	
1. HWC 処理タバコ葉における誘導抵抗反応の観察.....	71
2. ディファレンシャルディスプレイ法によるエリシター誘導性遺伝子のスクリーニング.....	71
3. HWC 処理タバコにおけるエリシター誘導性遺伝子の発現.....	74
4. D44-12 と D51-12 遺伝子の全長 cDNA の単離.....	77
5. D51-12 遺伝子の塩基配列の解析.....	77
6. ゲノミックサザン解析による CYP82E1 遺伝子相同配列の検出..	80
7. CYP82E1 遺伝子の各種エリシター処理および非病原細菌接種による発現誘導.....	81
8. 非病原細菌および病原細菌接種による CYP82E1 遺伝子の発現誘導.....	84
9. D44-12 遺伝子の塩基配列の解析.....	86
10. タバコ植物の EILP 遺伝子相同遺伝子の検出.....	90
11. EILP 遺伝子の各種エリシター処理および非病原細菌接種による発現誘導.....	90
12. EILP 遺伝子の非病原細菌および病原細菌接種による発現誘導の比較.....	92
IV. 考察	
1. 病害ストレス誘導性遺伝子のスクリーニング.....	92
2. CYP82E1 遺伝子.....	96
3. EILP 遺伝子.....	100



第五章	ディファレンシャルハイブリダイゼーション法によるタバコ植物の 病害ストレス誘導性遺伝子の単離と発現解析	
I.	緒言.....	103
II.	材料と方法	
	1. タバコ葉へのエリシター処理、傷処理および細菌接種.....	104
	2. タバコ葉からの全 RNA の抽出.....	104
	3. ディファレンシャルハイブリダイゼーション法.....	104
	4. ノーザンハイブリダイゼーション.....	105
III.	結果	
	1. ディファレンシャルハイブリダイゼーション法によるエリシター 誘導性遺伝子のスクリーニング.....	106
	2. エリシター誘導性遺伝子の塩基配列決定および発現解析.....	109
IV.	考察	
	1. ディファレンシャルハイブリダイゼーション法.....	124
	2. エリシター誘導性遺伝子.....	126
第六章	サブトラクション法によるタバコ植物の病害ストレス誘導性遺伝子 の単離と発現解析	
I.	緒言.....	132
II.	材料と方法	
	1. タバコ葉へのエリシター処理、傷処理および細菌接種.....	133
	2. タバコ葉からの全 RNA の抽出.....	133
	3. サブトラクション法によるタバコのエリシター誘導性遺伝子 cDNA ライブラリーの作製.....	133
	4. ノーザンハイブリダイゼーション.....	135
III.	結果	
	1. サブトラクション法によるエリシター誘導性遺伝子のクローニン グ.....	136
	2. エリシター誘導性遺伝子の発現解析および塩基配列の決定.....	136
IV.	考察	
	1. サブトラクション法による病害ストレス誘導性遺伝子の単離 .....	162



2. 病害ストレス誘導性遺伝子群.....	163
3. 病害ストレス誘導性遺伝子群の発現パターンの比較.....	169
第七章 エリシター誘導性 LRR レセプター様タンパク質 (EILP) 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコの表現形質の解析	
I. 緒言.....	173
II. 材料と方法	
1. タバコ葉の細菌接種.....	174
2. タバコ葉からの全 RNA の抽出.....	174
3. 形質転換タバコ植物の作出.....	175
4. 抗体の作製.....	179
5. SDS-PAGE およびウエスタン解析.....	181
6. ノーザンハイブリダイゼーション.....	181
7. RT-PCR.....	181
III. 結果	
1. EILP 遺伝子を過剰発現したタバコ植物の作出.....	181
2. 35S-EILP 形質転換タバコ T1 植物における EILP 遺伝子の発現と EILP タンパク質の蓄積.....	182
3. ダイズ斑点細菌病菌を接種した 35S-EILP 形質転換タバコ T1 植物における PR タンパク質の蓄積量の変動.....	184
4. 35S-EILP 形質転換タバコ T2 植物の種子発芽率の比較.....	184
5. 35S-EILP 形質転換タバコ T2 植物の生育と EILP 遺伝子の発現.....	184
6. 35S-EILP 形質転換タバコ T2 植物における PR タンパク質の蓄積.....	187
7. 35S-EILP 形質転換タバコ T2 植物における各種エリシター誘導性遺伝子の発現.....	192
8. タバコ野火病菌に対する 35S-EILP 形質転換タバコ T2 植物の抵抗性.....	195
IV. 考察.....	200
1. 35S-EILP 形質転換タバコ T1 植物の表現形質.....	201
2. 35S-EILP 形質転換タバコ T2 植物の表現形質.....	202
3. 35S-EILP 形質転換タバコ植物のタバコ野火病菌に対する抵抗	



性.....	205
第八章 総合考察.....	208
引用文献.....	221
摘要.....	248
謝辞	
報文目録	
参考文献目録	



## 第一章 緒論

植物は自然環境において常に多くの微生物と接しているため、自らを維持するためにはそれらすべての微生物に対して抵抗性でなくてはならない。一方、微生物は、ある特定の植物の抵抗反応を凌駕する能力を発達させることにより病原菌と成り得る。従って、植物は微生物との関係において抵抗性であることが原則であり、罹病性であることは例外である。植物と微生物の宿主-寄生者という関係はそれらが地球上に発生した当初から存在したと考えられる。両者は、植物による抵抗性獲得と病原菌によるその打破という過程を繰り返し、共に各々の抵抗性と病原性を進化させた。このような背景から、植物の抵抗性あるいは病原菌の病原性を決定する因子は植物-病原菌の組み合わせにより様々である。その中の多くの場合、両者のせめぎ合いは植物の病原菌認識機構の発達と病原菌の認識回避という点に集約されたと考えられる。

### 植物の異物認識と抵抗性の誘導

病原菌が宿主植物への感染を成立させるためには、宿主体表面への付着、胞子の発芽、宿主組織内への侵入、宿主内部での定着および増殖という過程を経る必要がある。宿主植物はこれらの過程に対する抵抗反応を機能させることにより菌の感染を抑制している。まず植物は、表皮や細胞壁などの障壁や先在性の抗菌物質による静的抵抗性により多くの非病原菌から自らを守っている。この静的抵抗性が打破された場合、活性酸素生成系の活性化 (Doke 1983)、後述の原形質凝集反応 (Tomiyama 1956, Gross et al. 1993)、パピラの形成や膜壁のリグニン化 (Vance and Sherwood 1977)、



過敏細胞死 (Tomiyama 1967)、ファイトアレキシンの合成と蓄積 (Cruickshank and Perrin 1968)、PR タンパク質 (Pathogenesis-related protein) の誘導蓄積 (van Loon and van Kammen 1970) といった誘導性の抵抗反応を植物は発動し、病原菌との関係を非親和性に行っている。植物はこれら一連の抵抗反応を誘導する能力を本来持っているが、病原菌の存在を認識できない場合、抵抗反応が誘導されずに罹病性となる。

植物の抵抗性誘導を引き起こす物質が植物病原菌の菌体あるいは孢子発芽液に存在し、エリシターと総称される (Keen 1975)。これまでに報告されたエリシターの多くは、植物が抵抗性であるか罹病性であるかに関わらず一様に抵抗反応誘導活性を示す非特異的エリシターである。非特異的エリシターとして、糸状菌細胞壁の主成分である多糖 (Ayres et al. 1976, Anderson 1980)、細胞壁や培養濾液に存在するポリペプチドや糖タンパク質 (Cruickshank and Perrin 1968, Keenan et al. 1985)、菌細胞壁に結合した脂肪酸 (Bostock et al. 1981) などがある。感染現場においては、植物がある特定の病原菌の侵入に対して抵抗性を誘導するにも関わらず、これらの菌が有するエリシターには宿主特異的活性は見られない。エリシターの二重誘導説 (Frank and Paxton 1971)、特異的サプレッサー説 (Doke 1975, Shiraishi et al. 1978) など諸説はあるが、植物の感染応答誘導の特異性を決定する機構についての統一的な見解は得られていない。エリシターとの結合活性を指標に、菌を認識する植物細胞のレセプターの単離を試みた報告もある。Yoshikawa ら (1983) は  $^{14}\text{C}$  でラベルした  $\beta$ -グルカンエリシターがダイズ膜画分と結合することを示し、さらに Umemoto ら (1997) は  $\beta$ -グルカンエリシターのレセプター候補として、 $\beta$ -グルカン結合タンパク質を精製し、その遺伝子 (GEBP) のクローニングに成功した。しかし、様々な植物で非特異的エリシター結合タンパク質の存在が報告されているにも関わらず、現在までに遺



伝子の単離に成功したのは GEBP の 1 例だけである。各種エリシター結合タンパク質遺伝子の単離および植物による非特異的エリシター分子認識機構の解明が待たれる。

Flor (1971) はアマトさび病菌 (*Melampsora lini*) の相互作用の遺伝学的研究に基づいて、病原菌が非病原性遺伝子を持ち、宿主植物がそれに対応する抵抗性遺伝子を持つときにのみ植物の抵抗性が誘導されるという遺伝子対遺伝子説を提唱した。さらに Gabriel と Rolfe (1990) は、遺伝子対遺伝子関係の分子機構を特異的エリシターと特異的レセプターのモデルにより説明した。近年、遺伝学的方法やトランスポゾンタギング法を用いて、宿主特異性を決定するような植物の抵抗性遺伝子が相次いで単離された (Staskawicz et al. 1995, Bent 1996)。これらの遺伝子は様々な植物種から単離されたにも関わらず、その遺伝子産物はタンパク質-タンパク質相互作用に関わるロイシンリッチリピート (LRR) 領域、ヌクレオチド結合部位、膜貫通領域、プロテインキナーゼ領域などのレセプター様の構造を共通して持つことより、エリシターに対するレセプターである可能性が高いと考えられている (Staskawicz et al. 1995, Bent 1996)。一方、非病原性遺伝子もこれまでに多数単離されている。そのうち Avr9 など *Cladosporium fulvum* の非病原性遺伝子産物が特異的エリシター活性を持つことや (de Wit and Spikman 1982)、*Pseudomonas syringae* の AvrB, AvrPpt2, AvrPto (Tang et al. 1996, Scofield et al. 1996)、*Xanthomonas campestris* の AvrBs3 (van den Ackerveken et al. 1996) などを植物細胞内で発現させた際に特異的エリシター活性を示すことが報告されており、これらの結果は特異的レセプター・特異的エリシターモデルを支持する例である。



### 植物の感染応答における細胞内情報伝達

種々の植物と病原菌の系において、植物細胞による菌の認識後に様々な細胞内情報伝達系が活性化されることが報告されている。例えば、NADPH 依存活性酸素生成 (Doke 1985, Doke and Miura 1995)、タンパク質のリン酸化と脱リン酸化 (Dietrich et al. 1990, Suzuki and Shinshi 1995, Zhang and Klessig 1997, Katou et al. 1999)、cAMP 濃度の上昇 (Kurosaki et al. 1993)、細胞質遊離カルシウム濃度の増加 (Knight et al. 1991)、GTP 結合タンパク質の GTPase 活性の上昇 (Kawakita and Doke 1994)、ホスホリパーゼ C の活性化とイノシトール三リン酸・ジアシルグリセロール量の増加 (Kurosaki et al. 1987)、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性化 (Doke and Nishimura 1988, Kawakita et al. 1993, Senda et al. 1996)、サリチル酸量の増加 (Malamy et al. 1990) などが挙げられる。特にサリチル酸は病害抵抗性誘導に重要な情報伝達系因子として認知されている。例えば、サリチル酸を不活性型カテコールに加水分解する酵素であるサリチル酸ヒドロキシラーゼ (nahG) 遺伝子を発現させたタバコは各種病原菌に対して感受性になることが Gaffney ら (1993) によって報告されている。これら情報伝達系因子の相互の繋がりは未だ明確ではなく、その下流に存在すると予想される *de novo* の遺伝子発現、抵抗性発現に関与する酵素の活性化などとの関連性もほとんど分かっていない。また、抵抗性に関与する各遺伝子の発現に至る情報伝達経路がどの程度共通であるのかも明らかではない。

### 感染応答における原形質凝集反応と細胞骨格系

病原菌の攻撃を認識した植物細胞は、攻撃を受けた部位に原形質と各種オルガネラを凝集する反応である原形質凝集反応を誘導する (Tomiyama 1956, Kitazawa et al.



1973)。原形質凝集反応は、ジャガイモと *Phytophthora infestans* の系、オオムギと *Erysiphe pisi* の系、パセリと *P. infestans* の系、アマと *M. lini* の系など様々な植物と非病原菌あるいは非親和性菌の組み合わせで観察されることより、植物が共通して誘導する病害ストレス応答であると考えられる (Tomiyama 1956, Kunoh et al. 1985, Gross et al. 1993, Kobayashi et al. 1994)。原形質凝集反応を示す植物細胞では、凝集部位で細胞骨格系タンパク質であるアクチン繊維の再構築が認められる (Gross et al. 1993, Kobayashi et al. 1994)。アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンを植物細胞に処理すると病害ストレスにより誘導される原形質凝集反応が抑制されること、植物細胞における原形質流動、オルガネラ輸送、細胞分裂といった様々な動的な反応をアクチン繊維が司っていることより、原形質凝集反応はアクチン繊維をはじめとする細胞骨格系が担っていると類推される (Gross et al. 1993, Kobayashi et al. 1997)。さらにサイトカラシン処理により原形質凝集反応を抑えると、過敏感反応の抑制や非病原菌の感染率の増加といった植物の抵抗性が低下することが報告されており、原形質凝集反応が植物の抵抗性誘導に必要であることが示されている (Tu 1978, Tomiyama et al. 1982, Hazen and Bushnell 1983, Kobayashi et al. 1997)。しかし、原形質凝集反応が植物の病害抵抗性の発動においてどのような役割を果たしているかを調べた報告はこれまでにほとんどない。そこで原形質凝集反応の抵抗性における役割を調べるために、第二章ではエリシター処理ジャガイモ塊茎で誘導される各種抵抗反応におよぼす原形質凝集反応阻害の影響について調べた。さらに第三章では、原形質凝集反応において細胞骨格系と相互作用する分子の単離を目的としてアクチン結合タンパク質の精製を試みた。



### 病害ストレス応答性遺伝子

植物における動的抵抗性の発動に伴い、数多くの遺伝子の発現が誘導されることが知られている。WRKY 転写制御因子 (Rushton et al. 1996)、P-Box 結合因子 (BPF-1) (da Costa et al. 1993) といった転写制御因子遺伝子群、グリシンリッチタンパク質、ヒドロキシプロリンリッチタンパク質 (Showalter 1993) といった細胞壁の強化に関わるタンパク質遺伝子群、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) (Lois et al. 1989, Yoshioka et al. 1995)、トランス桂皮酸 4-水酸化酵素 (C4H) (Mizutani et al. 1993)、カルコン合成酵素 (CHS) (Welle and Grisebach 1989)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 還元酵素 (HMGR) (Nelson et al. 1994)、5-エピアリストロキン合成酵素 (EAS) (Facchini and Chappell 1992) などのファイトアレキシンやリグニンといった二次代謝産物の合成に携わる酵素遺伝子群、キチナーゼ (Payne et al. 1990a)、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ (Shinshi et al. 1988, Beerhues and Kombrink 1994)、プロテイナーゼインヒビター (Johnson et al. 1989)、ペルオキシダーゼ (Cricqui et al. 1992) をはじめとする PR タンパク質遺伝子群などが、病害ストレス応答性遺伝子として報告されている (Hammond-Kosack and Jones 1996)。これら病害ストレス誘導性遺伝子発現の時間や部位は各々の遺伝子により様々であるので、病害ストレス誘導性遺伝子の発現を司る情報伝達系が複数存在し、誘導性遺伝子はそれら複数の情報伝達系を介した情報の制御のもとに発現していると考えられる (Hahlbrock et al. 1995)。例えば二次代謝系酵素の遺伝子群は、病害ストレスを直接受けた細胞とその近隣の細胞において比較的早い時間に一過的な発現が誘導されるのに対し、PR タンパク質遺伝子群は、直接ストレスを受けた細胞に加えて、植物体全体において比較的遅い時間に持続的に誘導される (Stintzi et al. 1993)。植物が抵抗性を獲得するためには、これら多数の遺伝子が発現し、



その遺伝子産物が協調的に働くことが必要であると考えられる。そこで第四章から第六章ではタバコの病害ストレス誘導性遺伝子群の単離を試み、次にそれら遺伝子の病傷害ストレスに対する発現パターンを調べることにより、病害ストレスを受けたタバコ植物において種々の抵抗反応が誘導される様相を概観した。さらに第七章では、単離した病害ストレス誘導性遺伝子群のうち、エリシター誘導性 LRR レセプター様タンパク質 (EILP) 遺伝子に着目し、EILP 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコ植物の作出とその表現形質の解析を行い、EILP の機能、EILP が司る情報伝達系、抵抗性植物作出に向けた EILP 遺伝子の応用の可能性などについて考察した。



## 第二章 ジャガイモ細胞における原形質凝集反応と凝集反応阻害がおよぼす種々の誘導抵抗反応への影響

### 1. 緒言

病原菌の侵入を受けた植物細胞では、原形質流動の急激な変化、細胞質基質や各種オルガネラの病原菌侵入地点への移動という現象、いわゆる原形質凝集反応が誘導される (Tomiyama 1956, Kitazawa et al. 1973)。この現象は様々な植物と病原菌の組み合わせで観察されることより、植物の病害抵抗性発動時の普遍的な現象であると考えられる (Kunoh et al. 1985, Kobayashi et al. 1994, Gross et al. 1993)。

ジャガイモ植物にジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* の非親和性菌を接種すると原形質凝集反応が迅速に誘導されるのに対し、親和性菌を接種した場合には誘導が遅く、また凝集反応の継続時間も短いことが報告されている (Tomiyama 1956, Kitazawa et al. 1973)。一方、Kobayashi ら (1997) はオオムギ子葉鞘と非病原菌である *Erysiphe pisi* の系を用い、原形質の凝集反応を抑制すると *E. pisi* の植物への侵入行動が認められることより、凝集反応が非宿主抵抗性の発現に必要であることを示している。これらの報告は、原形質凝集反応が宿主抵抗性と非宿主抵抗性のどちらにおいても重要な役割を担っていることを示している。しかし、植物の抵抗反応において、原形質凝集反応が病原菌の認識とそれに続く情報伝達という感染応答の誘導に関与しているのか、あるいは凝集反応自体が病原菌の侵入抵抗性に関与しているのかは明らかではない。

原形質凝集反応に伴い、細胞骨格系の配向変化や凝集部位への局在化が見られる。タバコ培養細胞と *P. infestans* の系の一例を Figure 1 に示す。Gross ら (1993) は、パ



A



B

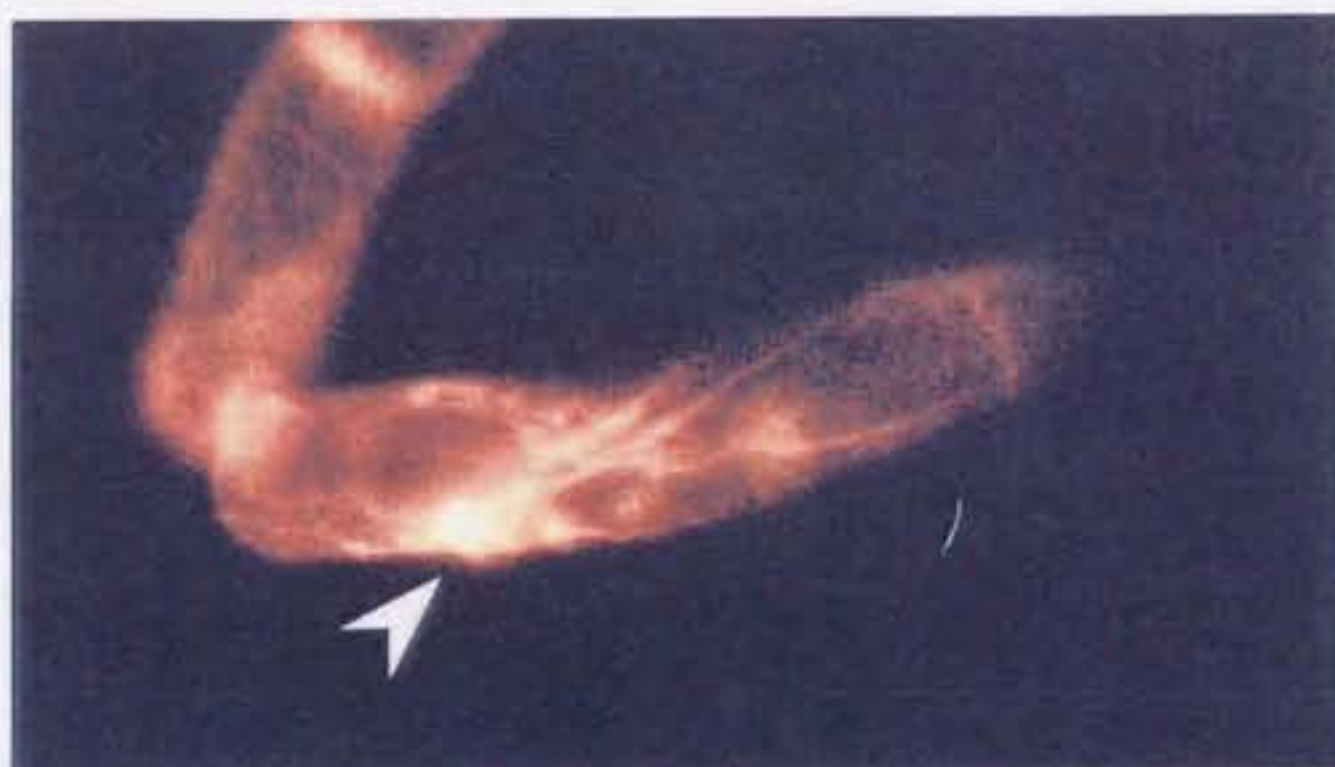


Fig. 1 Localization of actin filament network in cultured tobacco cell infected with *Phytophthora infestans*. A) Light microscopic observation of tobacco cell infected with *P. infestans*. B) Fluorescence image of the same cell, demonstrating that actin filaments polymerize around the infection site (arrowhead). Actin filaments were detected with rhodamine-conjugated phalloidin. cy; cystospore, g; germ tube.



セリの培養細胞と *P. infestans* の系において、菌の侵入により引き起こされる植物細胞の核の菌感染部位への移動がアクチン重合阻害剤サイトカラシン D の処理により抑えられることを報告し、凝集反応におけるアクチン繊維の重要性を示している。また、Kobayashi ら (1994) は、アマとアマさび病菌 *Melampsora lini* の非親和性菌の系でアクチン繊維や微小管の配向の変化が起こることを観察している。これらの報告と、アクチン繊維が原形質流動やオルガネラの細胞内での移動といった動的な反応を担っているということを考え合わせると、アクチン繊維の動的な運動により植物細胞の細胞質が菌の攻撃部位へ輸送されることが考えられる。

過敏感反応の誘導にアクチン重合反応が必要であることは古くから報告されている (Tu 1978, Tomiyama et al. 1982, Hazen and Bushnell 1983)。Tomiyama ら (1982) は、ジャガイモとジャガイモ疫病菌 *P. infestans* の系を用いて、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B の処理が原形質凝集反応を抑制し、同時に過敏感反応を遅延させることを報告している。さらに Furuse ら (1999) は、ジャガイモとジャガイモ疫病菌菌体壁成分 (HWC) エリシターの系を用いて、エリシター処理により誘導されるジャガイモのファイトアレキシン蓄積量がサイトカラシン処理により減少することを示している。これらの報告は、原形質凝集反応が抵抗反応の誘導に必要であることを示している。しかし、原形質凝集反応が実際にどのような感染応答に関与しているかを調べた報告例はまだ少なく、原形質凝集反応の病害抵抗性における役割については不明な点が多い。

そこで本章では、ジャガイモ塊茎と *P. infestans* の系を用いて原形質凝集反応の観察を行い、さらに細胞骨格系のアクチンに着目し、アクチン重合阻害剤による凝集反応への影響について調べた。また原形質凝集反応を阻害した場合の種々の誘導抵



抗反応への影響について調べ、原形質凝集反応の病害抵抗性における役割について考察した。

## II. 材料と方法

### 1. 供試植物

ジャガイモ植物として、*Solanum tuberosum* L.と *S. demissum* L.の種間雑種であり真性抵抗性遺伝子  $R_1$  を有する品種リシリを使用した。ジャガイモ植物は農林水産省北海道農業試験場の圃場で栽培し、10月に収穫した塊茎を4°Cにて保存し供試した。

### 2. 供試菌

菌体壁成分 (HWC) エリシター調製に用いる菌として、名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座植物病理学研究室で保存されているジャガイモ疫病菌 (*P. infestans* (Mont.) De Bary) race 1.2.3.4 を使用した。

### 3. 菌体壁成分エリシターの調製

Doke と Tomiyama (1980) の方法に従い、菌体壁成分 (HWC) エリシターを以下のように調製した。*P. infestans* をライムギ培地 30 ml の入った 100 ml 容三角フラスコ中で2週間静置培養した。回収した菌体を水道水で洗浄した後、水分を吸引濾過により除去し、-80°Cで凍結保存した。凍結菌体を乳鉢中で摩砕し、菌体重の5倍量の 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に懸濁した。この懸濁液をソニケーター (HEAT SYSTEM w-225R)を用いて出力 45 W で5分間超音波処理した後、14,000 x g で30分



間遠心分離した。得られた沈澱を先と等量の 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に懸濁し、再び先と同条件で超音波処理、遠心分離を行った。ここで得た沈澱をはじめの菌体重と等量の 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.8) に懸濁した。この懸濁液を上記と同様の条件で超音波処理した後、120 °C で 20 分間オートクレーブ処理し、先と同条件で遠心分離し上清を回収した。一方、沈澱は再び 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.8) に懸濁し、超音波処理およびオートクレーブ処理した後、遠心分離した。得られた上清を先の上清と合わせ、透析チューブ (排除限界分子量 12,000) を用い、水に対して 4 °C で 24 時間透析した。透析後の溶液に等量のジエチルエーテルを分液ロートを用いて混合し、静置した。水層を凍結乾燥し、得られた乾燥標品を HWC として以下の実験に用いた。HWC の使用に際しては水に懸濁し、ソニケーターを用いて出力 45 W で 3 分間超音波処理した。

#### 4. ジャガイモ塊茎からのプロトプラストの調製

Doke と Tomiyama (1980) の方法に従い、以下の方法でジャガイモ塊茎よりプロトプラストを調製した。ジャガイモ塊茎ディスク (直径 16 mm、厚さ 1 mm) を滅菌水で洗浄した後、酵素処理液 [2 % (w/v) セルラーゼオノズカ (ヤクルト)、0.2 % (w/v) ペクトリアーゼ Y-23 (セイシン)、0.05 % (w/v) カタラーゼ (Sigma)、50 µg/ml SOD、0.5 M マンニトール、1 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、5 mM MOPS-KOH (pH 7.2)] に浸漬し、23 °C で 5 時間浸とうした。組織残渣を径 70 µm のメッシュで濾過して除き、濾液を 0.5 M サッカロースに重層し 10 分間静置した。マンニトール溶液層の下層のプロトプラストを回収し、洗浄液 [5 mM MOPS-KOH (pH 7.2)、0.5 M マンニトール、1 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化カリ



ウム、1 mM 塩化マグネシウム] に懸濁した。この洗浄操作をさらに 2 度繰り返し、ジャガイモ塊茎プロトプラストを得た。

#### 5. ジャガイモ塊茎とプロトプラストの HWC および阻害剤処理

ジャガイモ塊茎ディスク（直径 16 mm、厚さ 2 mm）を作製し、4 °C の蒸留水で洗浄後、加湿したチャンバー内で 20 °C の暗所で 18 時間の加齢を行った。塊茎表面に水処理し、さらに同条件で 2 時間加齢した。加齢後塊茎表面の水分を除去し、ディスク 1 枚につき 1 mg/ml HWC と 20  $\mu$ M サイトカラシン D 120  $\mu$ l を処理した。処理後、一定時間後に液体窒素によりディスクを凍結し、ノーザン解析およびウエスタン解析に供試した。阻害剤の対照として、サイトカラシン D の溶媒である 0.25 % エタノールを用いた。プロトプラストの HWC および阻害剤処理の場合は、プロトプラスト懸濁液に 1 mg/ml HWC と 20  $\mu$ M サイトカラシン D（ともに終濃度）を加え原形質凝集反応を観察した。

#### 6. ジャガイモ塊茎の活性酸素生成の測定

ジャガイモ塊茎組織表面における活性酸素種の生成量は、ルミノールを介した化学発光として検出した。各種処理後のジャガイモ塊茎ディスクの切断表面にルミノール液 [2.5 mM ルミノール、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)] を塗布した。ルミノール発光を CCD カメラで撮影し、発光画像解析装置 (ARGUS-50、浜松ホトニクス) で一定面積あたりの光子量を一定時間測定し、活性酸素種の生成量とした。



## 7. ジャガイモ塊茎のタンパク質試料の調製

ジャガイモ塊茎ディスクを液体窒素中で乳鉢と乳棒により摩砕した。ディスク1枚より得られた粉末をタンパク質抽出緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM メルカプトエタノール、0.5 M ソルビトール、1 mM アスコルビン酸ナトリウム、0.5 % Triton-X 100、1 mM PMSF、0.2 % Polyclar SB-100] 500  $\mu$ l に懸濁し、16,000 x g、15 分間、4°C の遠心分離により得られた上清をジャガイモ塊茎タンパク質試料としてウエスタン解析に供試した。試料のタンパク質濃度の測定は、Bradford (1976) の方法によるタンパク質定量キット (BIO-RAD) を用いて行った。検量線は BSA を用いて作成した。

## 8. SDS-PAGE およびウエスタン解析

SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に準じて行った。タンパク質試料を試料溶解液 [2 % SDS、5 % 2-メルカプトエタノール、0.1 % BPB、10 % グリセロール、50 mM Tris-HCl (pH 8.5)] に溶解し、95 °C で2分間処理した。試料を氷冷した後、遠心分離により不溶物を除去し上清を電気泳動に用いた。泳動後のゲルは、ゲル染色液 [0.1 % CBB R-250、50 % メタノール、7 % 酢酸] 中で30分振とうした後、脱色液 [25 % メタノール、7 % 酢酸] 中で1晩振とうした。

ウエスタン解析は、Towbin ら (1979) の方法に従って行った。電気泳動後のゲル、濾紙、ニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell) をそれぞれ転写用緩衝液 [0.1 M Tris、0.192 M グリシン、5 % メタノール] に浸した後、セミドライプロッター (ATTO) のステージに置き、2 mA/cm<sup>2</sup> の定電流で60分間通電することによりゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を5 % スキムミルク



クを含む TBS-T [ Tris-HCl (pH 7.6)、137 mM 塩化ナトリウム、0.1 % Tween 20 ] 中で 1 時間振とうし、ブロッキングを行った。次にこの膜を TBS-T 中で 15 分間の洗浄を 1 回、5 分間の洗浄を 2 回行った後、一次抗体を含む TBS-T 中で 1 時間振とうした。膜を TBS-T で洗浄後、二次抗体を含む TBS-T 中で 30 分間振とうした。再び膜を TBS-T 中で洗浄後、ECL 検出キット (Amersham) を用いて Hyper Film (Amersham) 上にシグナルの検出を行った。用いた一次抗体と二次抗体およびそれらの希釈率を以下に示す。

#### 一次抗体

PR-2 検出用：抗タバコ PR-N 抗血清 (1,000 倍希釈) (Niki et al. 1998)

PR-3 検出用：抗タバコ PR-P 抗血清 (1,000 倍希釈) (Yamakawa et al. 1998)

PR-5 検出用：抗タバコ PR-S 抗血清 (1,000 倍希釈) (Yamakawa et al. 1998)

#### 二次抗体

抗ウサギ Ig 抗体 (5,000 倍希釈) (Amersham)

### 9. ジャガイモ塊茎からの全 RNA 抽出

ジャガイモ塊茎からの全 RNA 抽出は single-step 法をもとに行った (Chomczynski and Sacchi 1987)。ジャガイモ塊茎ディスクを液体窒素中で乳鉢と乳棒により摩砕し、ディスク 3 枚分の塊茎粉末を Tris 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) 5 ml に懸濁し、抽出緩衝液 [ 100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、100 mM 塩化ナトリウム、10 % SDS ] 5 ml と 2-メルカプトエタノール 1 ml を加えてよく攪拌した後、10 分間静置し、6,000 x g で 20 分間遠心分離した。上清にイソプロパノール 5 ml と



5 M 塩化ナトリウム 400  $\mu$ l を加え、攪拌した後 -20 °C で 1 時間静置し、6,000 x g で 20 分間遠心分離した。得られた沈澱にグアニジウム緩衝液 [4 M グアニジンチオシアン塩酸、25 M 酢酸ナトリウム (pH 7.0)、0.5 % N-ラウリルサルコシン] 5 ml を加えて溶解し、さらに水飽和フェノール 5 ml、2 M 酢酸ナトリウム (pH 7.0) 500  $\mu$ l、クロホルム/イソアミルアルコール (49/1) 1 ml を加えて攪拌した後、6,000 x g で 20 分間遠心分離した。得られた上清にイソプロパノール 5 ml を加えて攪拌し、-20 °C で 1 時間静置した後 6,000 x g で 20 分間遠心分離した。沈澱をグアニジウム緩衝液 300  $\mu$ l に溶解し、-20 °C で 1 時間静置した後 2,300 x g で 15 分間遠心分離した。得られた沈澱に 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 300  $\mu$ l を加え、2,300 x g で 15 分遠心分離し、沈澱を洗浄した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、さらに 70 % エタノールで洗浄し、減圧乾燥した後、適量の TE で溶解した。得られた全 RNA をノーザンハイブリダイゼーションに用いた。

#### 10. ノーザンハイブリダイゼーション

ノーザンハイブリダイゼーションは Maniatis ら (1982) の方法に従った。10  $\mu$ g 全 RNA 溶液を試料緩衝液 [ホルムアミド / ホルムアルデヒド / 10 x MOPS / 50 % グリセロール (0.1 mg/ml BPB 含有) (25/8/5/5, v/v)] 8  $\mu$ l に溶解し、65 °C で 15 分間変性処理をした後、氷上で 5 分間静置し、ホルムアルデヒドを含む 1.2 % アガロースゲル [1.2 % アガロース、1 x MOPS、17 % ホルムアルデヒド] 中で電気泳動により分画した。分画した RNA は 50 mM 水酸化ナトリウムを用いたキャピラリー法により Hybond-N<sup>+</sup> ナイロン膜 (Amersham) に転写し、2 x SSPE [20 x SSPE; 3 M 塩化ナトリウム、173 mM リン酸ナトリウム、25 mM EDTA] 中で軽く振とうした後、80 °C で



30 分の熱処理により膜に固定した。 $^{32}\text{P}$  標識プローブは、ランダムプライミング法 (Feinberg and Vogelstein 1983) に基づく Megaprime DNA labeling kit (Amersham) により  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (111 TBq/mmol, ICN Biochemicals) を用いて作製した。RNA を固定したナイロン膜は、ハイブリダイゼーション溶液 [5 x SSPE、50 % ホルムアミド、5 x デンハルト溶液 (Sambrook et al. 1989)、1 % SDS、100  $\mu\text{g/ml}$  熱変性サケ精子 DNA] 中、42 °C、2 時間の条件でプレハイブリダイゼーションを行った後、100 °C で 5 分間の熱変性をした  $^{32}\text{P}$  標識プローブを加え、42 °C 下で 16 時間以上のハイブリダイゼーションを行った。このナイロン膜を 0.2 % SDS を含む 1 x SSPE 中で室温で 15 分間の洗浄を 2 回し、さらに 0.1 % SDS を含む 0.1 x SSPE 中で 65 °C で 5 分間の洗浄を行った。オートラジオグラフィーは増感紙 Lighting Plus (Dupont) を用いて -80 °C 下で行い、X 線フィルム (OMAT-AR, Kodak) にシグナルを検出した。

### III. 結果

#### 1. エリシター処理ジャガイモプロトプラストの原形質凝集反応とサイトカラシン D 処理の影響

ジャガイモ塊茎より調製したプロトプラストにジャガイモ疫病菌由来の菌体壁 (HWC) エリシターを処理すると、プロトプラスト原形質の流動性が変化し、細胞の一部に原形質の局在化が起こることが知られている (Doke and Tomiyama 1980)。そこで細胞の原形質流動を司ると考えられる細胞骨格系の一つであるアクチン繊維に着目し、原形質凝集反応との関わりについて調べた。

ジャガイモプロトプラストに 1 mg/ml HWC を処理したところ、処理後約 10 分か



ら原形質の凝集反応が観察された (Fig. 2, HWC)。一方、アクチンの重合反応阻害剤であるサイトカラシン D ( $20\ \mu\text{M}$ ) を HWC と同時に処理すると、HWC 処理による凝集反応が著しく抑制された (Fig. 2, HWC+Cyt. D)。また、未処理区およびサイトカラシン D 単独処理区では凝集反応はほとんど認められなかった (Fig. 2, Cont., Cyt. D)。この結果より、HWC 処理によりジャガイモ塊茎細胞の原形質凝集反応が誘導されること、原形質凝集反応にはアクチンの重合反応が必要であることが示された。そこでサイトカラシン D を原形質凝集反応の阻害剤として以下の実験に用いた。

## 2. ジャガイモ塊茎の活性酸素生成におよぼす凝集反応阻害の影響

ジャガイモ塊茎ディスクに HWC を処理すると、抵抗反応の一つとして一過的な活性酸素種の生成が認められる (Doke 1985)。この活性酸素生成におよぼす原形質凝集反応の阻害の影響について調べた。ジャガイモ塊茎ディスクに  $1\ \text{mg/ml}$  HWC を処理したところ、処理後 60 分まで活性酸素生成量の経時的な増加が認められ、その後減少した (Fig. 3)。また HWC と  $20\ \mu\text{M}$  サイトカラシン D を同時に処理した場合にも HWC 単独処理区と同様の活性酸素生成変動を示した (Fig. 3)。一方、未処理区およびサイトカラシン D 単独処理区では活性酸素生成量の増加は全く認められなかった。

## 3. ジャガイモ塊茎のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子発現誘導におよぼす凝集反応阻害の影響

HWC 処理ジャガイモ塊茎では、フェニルプロパノイド代謝系の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) の一過的な活性上昇と mRNA の蓄積が起こることが知られている (Yoshioka et al. 1995)。そこでジャガイモ塊茎組織における



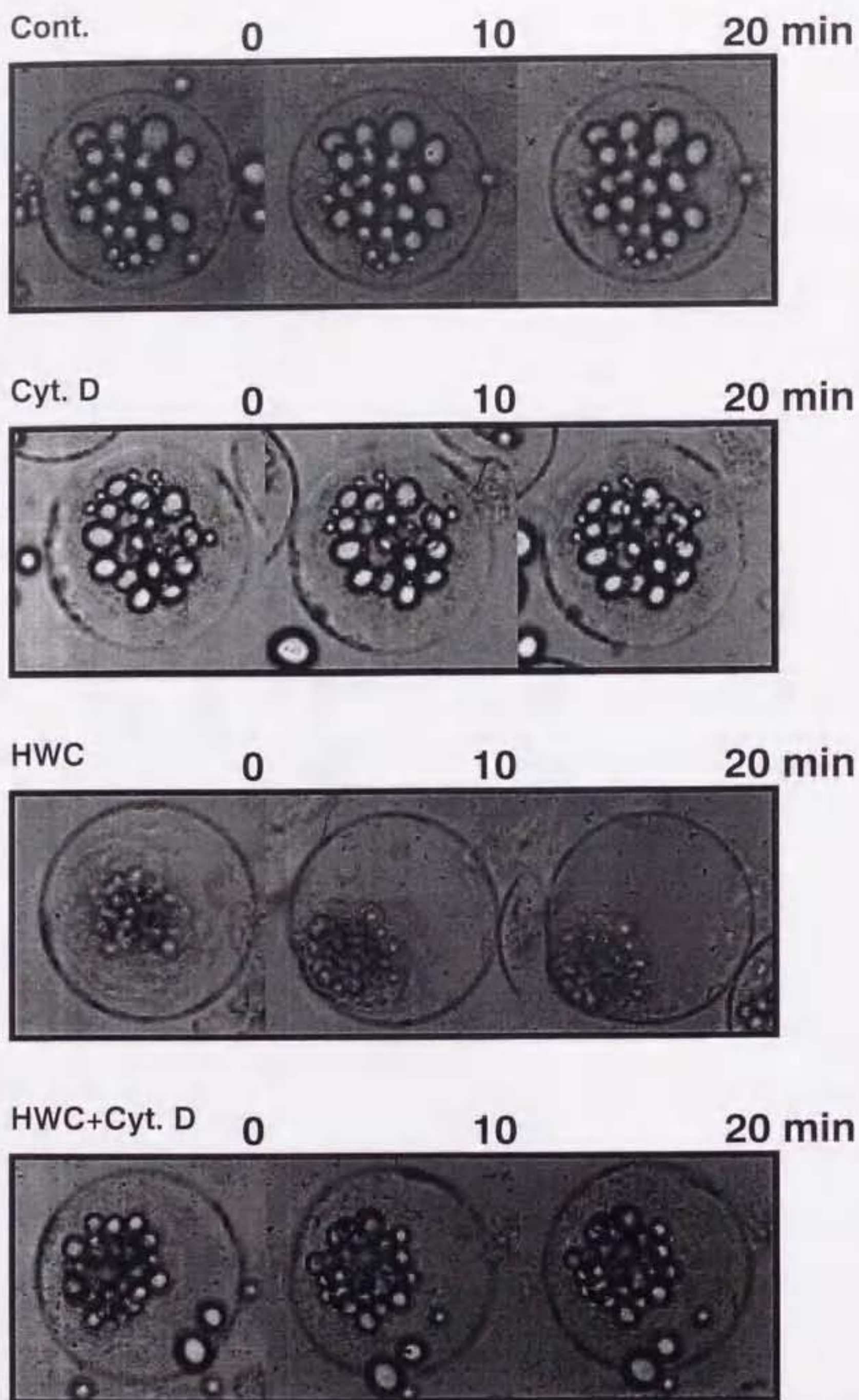


Fig. 2 Typical response of potato protoplasts treated with HWC and effect of cytochalasin D on this response. Potato protoplasts prepared from tuber were treated with water (Cont.), 20  $\mu$ M cytochalasin D (Cyt. D), 1 mg/ml HWC (HWC) or 1 mg/ml HWC and 20  $\mu$ M cytochalasin D (HWC+Cyt. D) and photographed immediately (0 min), 10 min and 20 min after treatment.



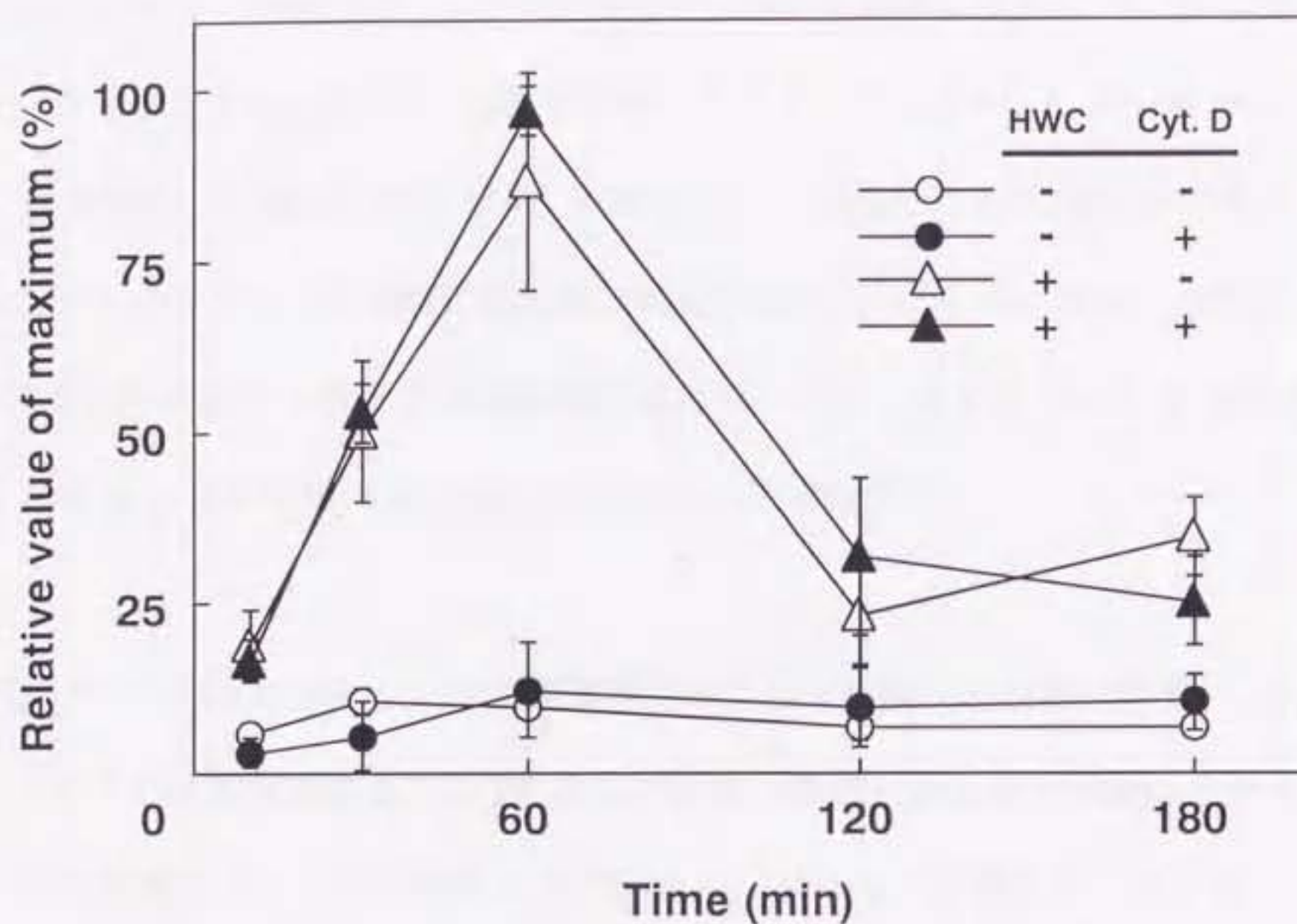


Fig. 3 Effect of cytochalasin D on luminol mediated chemiluminescence of potato tuber discs caused by HWC treatment. Potato tuber discs were aged for 20 hr at 20 °C and treated with water (open circle), 20  $\mu$ M cytochalasin D (closed circle), 1 mg/ml HWC (open triangle) or 1 mg/ml HWC and 20  $\mu$ M cytochalasin D (closed triangle). The discs were treated with 1 mM luminol at indicated time point and chemiluminescence was counted using an image processor ARGUS-50. Each value represents the average of eight discs and the vertical line indicates the standard error.



PAL 遺伝子発現におよぼす HWC とサイトカラシン D の影響をノーザン解析により調べた。ジャガイモ塊茎ディスクに 1 mg/ml HWC を処理したところ、処理後 1 時間をピークとした PAL 遺伝子の発現が認められた。一方、HWC と 20  $\mu$ M サイトカラシン D を同時に処理した場合 HWC 単独処理区と同程度の PAL 遺伝子の発現が認められたが、そのピークは HWC 処理後 2 時間であった (Fig. 4)。なお、水処理区でも 1 時間をピークとする若干の発現誘導が認められた。サイトカラシン D 単独処理区では PAL 遺伝子の発現は全く認められなかった (Fig. 4)。

#### 4. ジャガイモ塊茎の PR タンパク質蓄積におよぼす凝集反応阻害の影響

ジャガイモ塊茎組織における PR タンパク質の蓄積におよぼす HWC とサイトカラシン D の影響をウエスタン解析により調べた。ジャガイモ塊茎ディスクに 1 mg/ml HWC を処理したところ、処理後 18 時間 (PR-2、PR-3) あるいは 24 時間 (PR-5) から PR タンパク質の蓄積が認められた (Fig. 5)。一方、HWC と 20  $\mu$ M サイトカラシン D を同時に処理した場合 HWC 単独処理区と同様の蓄積パターンを示したが、その蓄積量は減少した (Fig. 5)。一方、水処理区およびサイトカラシン D 単独処理区では、PR タンパク質の蓄積はほとんど認められなかった (Fig. 5)。

#### 5. ジャガイモ塊茎の過敏感細胞死におよぼす凝集反応阻害の影響

HWC 処理ジャガイモ塊茎の過敏感細胞死におよぼす凝集反応阻害の影響を調べた。ジャガイモプロトプラストに 1 mg/ml HWC を処理したところ、処理後 1 日以内にジャガイモ塊茎表面の褐変が観察された (Fig. 6)。一方、サイトカラシン D (20  $\mu$ M) と HWC を同時に処理すると、HWC 処理により起こる褐変が著しく抑制された (Fig.



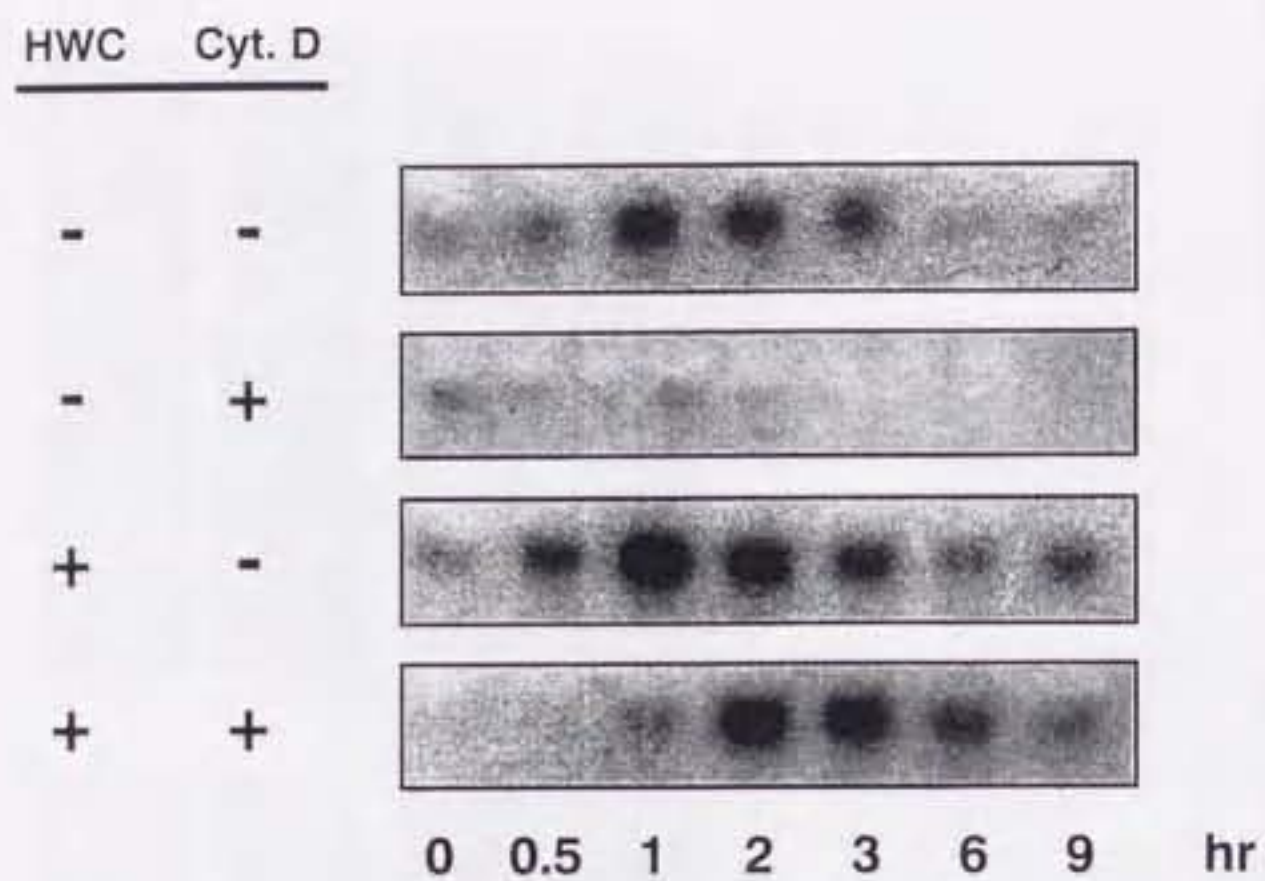


Fig. 4 Effect of cytochalasin D on accumulation of PAL mRNA in potato tuber discs treated with HWC. Potato tuber discs were treated as described in the legend of Figure 3. Total RNAs were prepared from the discs at indicated time points and 10  $\mu$ g of total RNA was loaded in each lane. RNA gel blot was hybridized with a cDNA for a conserved region of PAL (Joos and Hahlbrock 1992). Results shown are representative of two separate experiments.



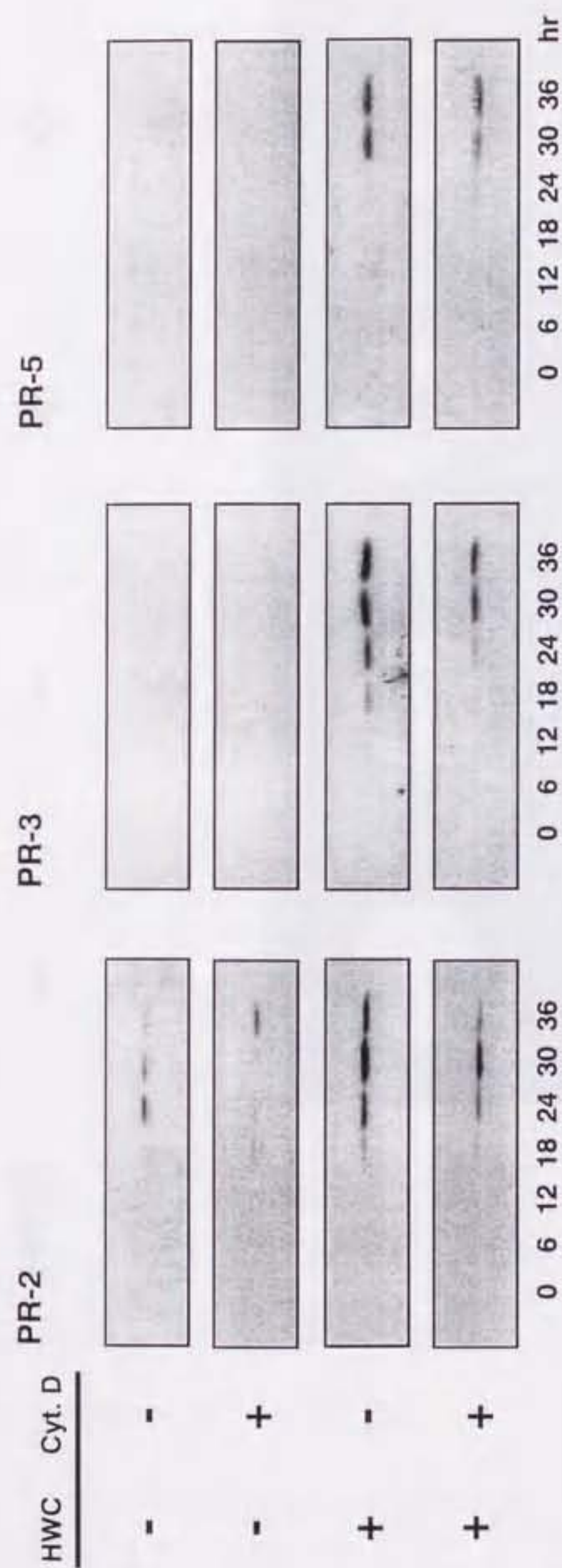


Fig. 5 Effect of cytochalasin D on accumulation of PR-2 (left), PR-3 (middle) and PR-5 (right) in potato tuber discs treated with HWC. Potato tuber discs were treated as described in the legend of Figure 3. Protein samples were prepared from the discs at indicated time points, electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel and immunoblotted using antiserum against tobacco PR-N (left), PR-P (middle) and PR-S (right) to detect PR-2, PR-3 and PR-5, respectively. The detection was carried out using peroxidase-conjugated anti-rabbit Ig and ECL detection kit. Results shown are representative of two separate experiments.



HWC	-	-	+	+
Cyt. D	-	+	-	+

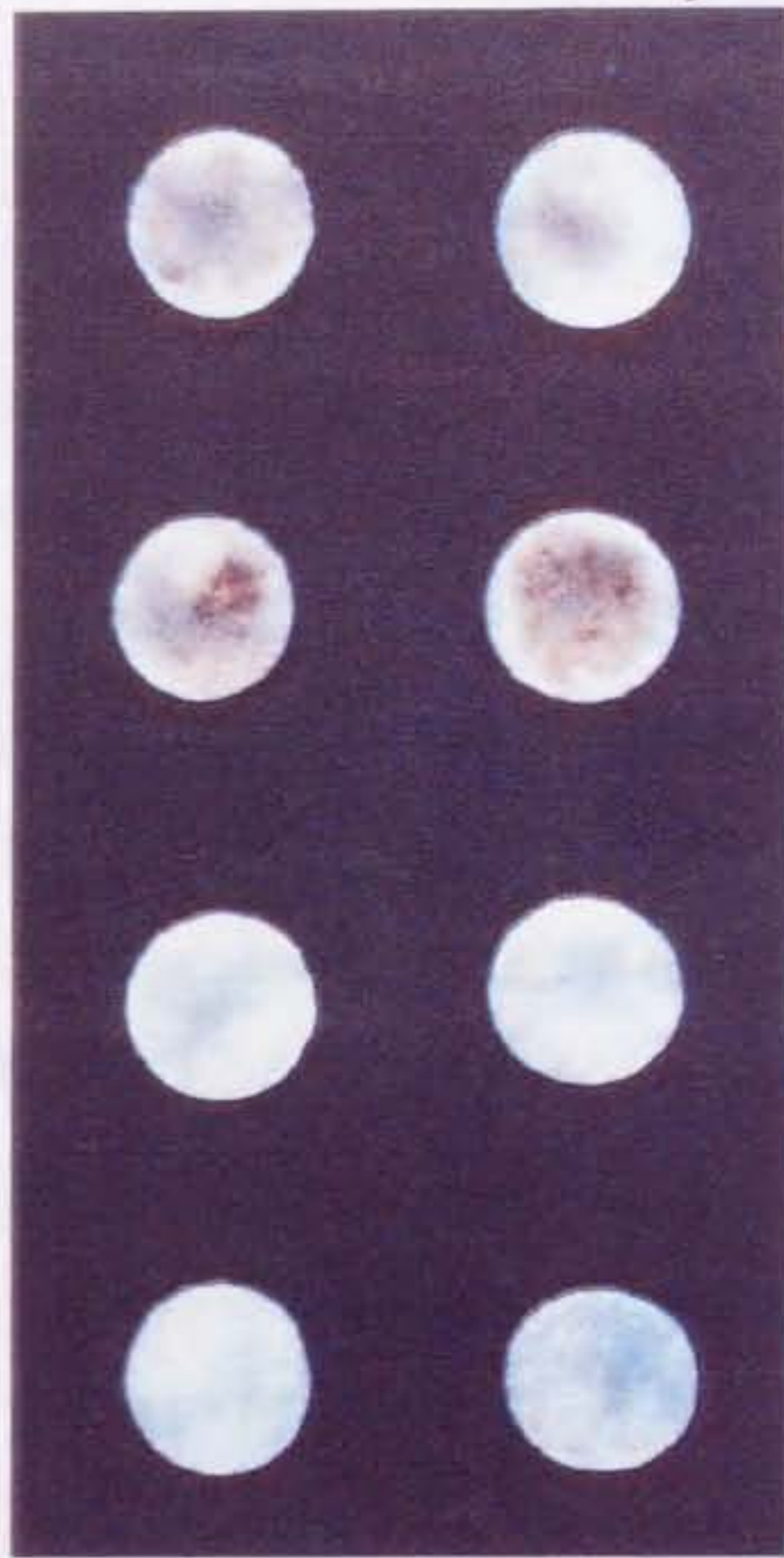


Fig. 6 Effect of cytochalasin D on hypersensitive cell death in potato tuber discs treated with HWC. Potato tuber discs were treated as described in the legend of Figure 3 and photographed 24 hr after treatment.



6)。また、未処理区およびサイトカラシン D 処理区では、褐変化はほとんど認められなかった (Fig. 6)。

#### IV. 考察

抵抗反応誘導の初期に観察される現象のひとつに、菌の侵入部位へ植物細胞の原形質が局在化するという原形質凝集反応がある。Tomiyama ら (1982) は、*P. infestans* の感染で誘導されるジャガイモ植物の原形質凝集反応がアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B の処理により抑制され、過敏感反応が遅延することを示し、原形質凝集反応が速やかな抵抗反応の発現に必要であることを報告した。過敏感反応にアクチン重合反応が必要であることは古くから報告されている (Tu 1978, Hazen and Bushnell 1983) が、実際にどのような抵抗反応に関与しているかについて詳しいことはまだ何も分かっていない。そこで本章では、HWC 処理ジャガイモ塊茎にアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D を同時に処理し、種々の抵抗反応におよぼす凝集反応阻害の影響について調べた。

ジャガイモプロトプラストに HWC を処理したところ、処理後約 10 分から原形質凝集反応が観察され、20  $\mu$ M サイトカラシン D を HWC と同時に処理すると、HWC 処理による凝集反応が著しく抑制された (Fig. 2)。この結果より、以前の報告 (Gross et al. 1993, Kobayashi et al. 1997) と同様に、原形質凝集反応にはアクチン繊維の重合反応が必要であることが示された。また 20  $\mu$ M サイトカラシン D がジャガイモ塊茎細胞の原形質凝集反応を効率よく阻害することが示された。

ジャガイモ塊茎に *P. infestans* 非親和性レースを接種すると活性酸素が急速に生成



される (Doke 1983)。この誘導抵抗反応時の活性酸素生成現象は様々な植物と病原体の系で見られ、病害抵抗性における一般的な初期反応として知られている (Hammond-Kosack et al. 1996)。活性酸素種の生成は、殺菌作用 (Peng and Kuc 1992)、細胞壁タンパク質の架橋化 (Bradley et al. 1992, Brisson et al. 1994)、サリチル酸合成経路の活性化 (Leon et al. 1995) といった種々の抵抗反応に関与することが報告されている。この活性酸素生成におよぼす原形質凝集反応の阻害の影響について調べたところ、HWC 処理ジャガイモ塊茎において誘導される処理後 1 時間をピークとする活性酸素生成は、サイトカラシン D による阻害を受けなかった (Fig. 3)。この結果より、活性酸素生成には原形質凝集反応を必要としないことが示された。Doke (1985) は細胞分画により  $O_2^-$  生成活性が原形質膜画分にあることを示している。原形質凝集反応は原形質成分を局在化させる反応であり、原形質膜上で起こる活性酸素の生成反応とは直接関係がないと予想される。

ジャガイモ塊茎組織に非親和性ジャガイモ疫病菌を接種すると、リグニン様物質が沈積することが知られている (Friend 1981)。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) はリグニンの合成系であるフェニルプロパノイド代謝系の鍵酵素であり、非親和性菌接種や HWC 処理により転写レベルでの活性化が起こることが知られている (Yoshioka et al. 1995)。そこでジャガイモ塊茎組織における PAL 遺伝子発現におよぼす HWC とサイトカラシン D の影響をノーザン解析により調べた。その結果、HWC 処理ジャガイモ塊茎で PAL 遺伝子発現のピークが処理後 1 時間で認められたのに対し、サイトカラシン D を同時に処理した場合そのピークは 2 時間であった (Fig. 4)。PAL 遺伝子の発現のピークは活性酸素生成と同時期であるにも関わらず、PAL 遺伝子の発現のみが原形質凝集反応阻害の影響を受けて遅延した。この結果は、原



形質凝集反応による原形質の局在化が阻害されて、核での PAL 遺伝子の発現を促す細胞内情報伝達が迅速に行われず、遺伝子発現が遅延したためであると予想される。

さらに感染応答後期（12 時間以降）に誘導される抵抗反応におよぼす原形質凝集反応阻害の影響について調べた。PR タンパク質は、タバコモザイクウイルスに感染し壊死病斑のできたタバコ葉から発見されたタンパク質群の総称である (van Loon and van Kammen 1970)。後に多くの植物と病原菌の系で感染応答時の PR タンパク質の発現誘導が確認され、植物が普遍的にもつ感染誘導タンパク質と考えられている (Stintzi et al. 1993)。またそのうちのいくつかは様々な病原糸状菌に対して生育阻害活性を持つことが報告されており、抗菌性タンパク質として認知されている (Woloshuk et al. 1991, Sela-Buurlage et al. 1993, Ponstein et al. 1994, Niderman et al. 1995)。この PR タンパク質の蓄積におよぼす原形質凝集反応阻害の影響をウエスタン解析により調べた。その結果、ジャガイモ塊茎ディスクに HWC を処理したところ、処理後 18-24 時間から PR タンパク質の蓄積が認められたが、HWC とサイトカラシン D を同時に処理した場合、その蓄積量が減少した (Fig. 5)。PR タンパク質の蓄積は転写レベルで制御されていることが知られており (Bol and Linthorst 1990)、遺伝子発現が効率よく行われるためには核を含む原形質の局在化が必要であると予想される。PAL 遺伝子の発現が感染ストレスを受けた細胞とそのごく近隣の細胞で早い時間（1 時間）に起こるのに対し、PR タンパク質の蓄積は病害ストレスを受けた細胞だけでなく植物体全体で遅い時間（24 時間）に誘導される (Ryals et al. 1996)。本実験に用いた塊茎においても、HWC に直接接触した細胞に加え、離れた細胞でも PR タンパク質が蓄積したと考えられる。サイトカラシン D 処理による PR タンパク質蓄積量の減少は、塊茎ディスク全体の細胞に対して反応する細胞の占める割合が減少したために起こ



った可能性が考えられた。

次に HWC 処理ジャガイモ塊茎の過敏感細胞死におよぼす凝集反応阻害の影響を調べた。処理後 1 日以内にジャガイモ塊茎表面の褐変が観察されたが、サイトカラシン D を同時に処理すると褐変が抑制された (Fig. 6)。植物は非親和性菌の侵入を認識すると感染部位において急速な細胞死を引き起こし、病原菌の増殖を抑える。この過敏感細胞死が誘導される機構はまだほとんど分かっていないが、近年の研究では植物の過敏感細胞死が動物で見られるアポトーシスと同様のプロセスを経て起きていることが報告されている (Levine et al. 1996, Ryerson and Heath 1996)。また、タバコモザイクウイルス (TMV) を感染させたタバコにおいてアポトーシス様の核 DNA の断片化やヌクレアーゼ活性の上昇が報告されている (Mittler et al. 1995, Mittler and Lam 1995)。ジャガイモの系では未だこのような報告例はないが、もし同様の変化が起こるとすれば、細胞死も細胞内情報伝達を介して核を含む細胞全体で起こる反応であり、原形質凝集反応が細胞死発動の効率化を担っている可能性が考えられる。

植物細胞において、細胞骨格系は原形質流動、細胞分裂、オルガネラや物質の輸送などの動的反応に携わっている。このような植物細胞での細胞骨格の役割を考えると、原形質凝集反応は菌の感染部位への物質の輸送であると考えられる。宿主植物細胞は、原形質物質を菌の感染部位へ局在化させることにより、遺伝子発現を伴う一連の抵抗反応の効率を高め、その結果、菌の侵入の障壁となるような物質や抗菌性物質の生産を効果的に行うと予想される。このように、原形質凝集反応は多くの抵抗反応誘導の礎となる極めて重要な反応であると考えられる。しかし、原形質凝集反応を制御する物質や凝集反応により輸送される物質の解明など、原形質凝集



反応の分子レベルでの研究はほとんど行われていない。そこで第三章ではアクチンと相互作用するタンパク質に着目し、その探索と部分精製を行った。



### 第三章 ジャガイモ懸濁培養細胞におけるアクチン結合タンパク質の精製

#### 1. 緒言

第二章では、アクチン重合反応を伴った原形質凝集反応が、PAL 遺伝子の発現、PR タンパク質の蓄積、過敏感細胞死の効率的な誘導に必要であることを示した。しかし、植物が病害ストレスを認識した後に原形質凝集反応を発動する細胞骨格制御タンパク質や、実際の凝集反応時に細胞骨格と相互作用して感染部位に移行するタンパク質など、原形質凝集反応に関与する分子を調べた報告は全くなされていない。

アクチン繊維の持つ細胞運動や形態形成といった動的機能は、結合するタンパク質により制御されている。アクチン制御タンパク質は、アメーバ、酵母、哺乳動物などで数多く見つかっている。特に哺乳動物では、古くから筋肉の運動制御機構の研究を通して、重合阻害因子、末端因子、架橋因子、モジュレーター因子といった各種制御タンパク質が明らかにされている（丸山 1986）。また、アクチン結合タンパク質の制御にカルシウムイオンやイノシトールリン脂質が関与することより、情報伝達系の鍵となるタンパク質がこれらの物質を介して間接的にアクチン繊維を制御している可能性が考えられる（丸山 1986）。

一方、植物での細胞骨格系制御の研究は、アクチン結合活性を持つタンパク質であるプロフィリンとアクチン脱重合因子 (ADF) についての 2 例しかなく、アクチン繊維の制御機構や情報伝達系への関与に関する解析もまだ緒についたばかりである (Clarke et al. 1998, Volkmann and Baluska 1999)。近年、TMV が宿主の細胞間を移行する際に、移行タンパク質 (P30) を介してアクチン繊維上に結合し、プラズモデスマータを通して移行することが示された (McLean et al. 1995)。この現象は、植物が本



来持っているプラズモデスマータを介した選択的な物質輸送能を TMV が利用していると考えられている (Zambryski 1995)。以上の動植物の研究例を考え合わせると、アクチン繊維は物質輸送と情報伝達の両方の機能を担っている可能性がある。

そこで本章では、原形質凝集反応の制御やその機能に関与する分子の実体を捉えることを目的とし、アクチン結合タンパク質に着目した。まず、DNase I アフィニティークロマトグラフィーを用いてアクチン結合タンパク質の探索とその精製を試みた。次に、精製タンパク質の同定とアクチン結合活性の解析を行い、それらの原形質凝集反応における役割について考察した。

## II. 材料と方法

### 1. 供試植物

ジャガイモ植物として、*Solanum tuberosum* L. と *S. demissum* L. の種間雑種であり真性抵抗性遺伝子  $R_1$  を持つ品種リシリを使用した。この塊茎組織を用いてカルスを誘導し、懸濁培養細胞の調製に用いた。

### 2. ジャガイモ懸濁培養細胞の調製

ジャガイモ懸濁培養細胞は以下のように調製した。ジャガイモ塊茎組織をカルス誘導寒天培地 [0.7% 寒天、2 mg/ml 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、0.1 mg/ml カイネチンを含む Murashige-Skoog 培地 (pH 6.0)] 上に置き、カルスを誘導した。液体培地 [2 mg/ml 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、0.1 mg/ml カイネチンを含む Murashige-Skoog 培地 (pH 6.0)] 30 ml の入った 100 ml 容の三角フラスコに誘導したカルスを移



し、23 °C の明所で 100 回転/分の速度で振とう培養した。分散増殖した懸濁培養細胞は 7 日周期で上記の条件下で継代培養した。

### 3. ジャガイモ懸濁培養細胞の HWC および阻害剤処理

ジャガイモ懸濁培養細胞 40  $\mu$ l (約 60 細胞) に 25  $\mu$ M サイトカラシン D 10  $\mu$ l (終濃度 5  $\mu$ M) を加え 5 分間静置した。この細胞懸濁液に 1 mg/ml HWC 50  $\mu$ l (終濃度 0.5 mg/ml) を加え、原形質凝集反応率を経時的に測定した。阻害剤の対照として、サイトカラシン D の溶媒である 0.25 % エタノールを用いた。また HWC の対照として、HWC を懸濁した 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) を用いた。

### 4. 原形質凝集反応率の測定

ジャガイモ懸濁培養細胞 50 個について原形質凝集反応の有無を検鏡し、全細胞数に占める原形質凝集反応の観察された細胞数の割合を原形質凝集反応率とした。

$$\text{原形質凝集反応率 (\%)} = \frac{\text{原形質凝集反応が観察された細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

### 5. DNase I 阻害法によるアクチンの定量

DNase I 阻害法を用いたアクチンの定量を Blikstad ら (1978) の方法に従い、以下のように行った。DNase I 溶液 [ 0.2 mg/ml DNase I (Boehringer Mannheim)、0.2 mM 塩化カルシウム、5 mM イミダゾール-HCl (pH 7.0) ] 4  $\mu$ l および試料 20  $\mu$ l を石英セル中で混合し、DNA 溶液 [ 40  $\mu$ g/ml DNA (仔ウシ胸腺由来、Sigma)、2 mM 塩化マグネ



シウム、1 mM 塩化カルシウム、10 mM イミダゾール-HCl (pH 7.0) ] 500  $\mu$ l を加え、直ちに A<sub>260</sub> の吸光度変化を測定した。反応の初速度より DNase I の活性を求め、次式より各試料の DNase I の阻害率を算出した。検量線はニワトリ由来アクチン (Sigma) を用いて作成した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\text{試料添加時の DNase I 活性}}{\text{溶媒添加時の DNase I 活性}} \times 100$$

#### 6. ジャガイモ懸濁培養細胞のアクチンおよびアクチン関連タンパク質の部分精製

植え継ぎ後 7 日間培養したジャガイモ懸濁培養細胞をアクチンおよびアクチン関連タンパク質の精製のための材料として使用した。本実験では以下の緩衝液を用いた。

緩衝液 A : 20 mM イミダゾール-HCl (pH 7.5)、5 mM メタ重亜硫酸カリウム、5 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM PMSF、10 mM TAME、1  $\mu$ g/ml ロイペプチン、1 mM ATP、20 mM ピロリン酸ナトリウム

緩衝液 1 : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.44 M ソルビトール、0.5 mM 塩化カルシウム

緩衝液 2 : 20 mM イミダゾール-HCl (pH 7.5)、0.4 M ソルビトール、2.5 mM メタ重亜硫酸カリウム、1 mM DTT、1 mM PMSF、0.2 mM ATP、10 mM ピロリン酸ナトリウム、0.1 mM 塩化カルシウム

緩衝液 3 : 0.1 mM 塩化カルシウム、32 mg/ml PVP を含む緩衝液 A

緩衝液 4 : 0.1 mM 塩化カルシウムを含む緩衝液 A



緩衝液 5 : 2 mM 塩化カルシウムを含む緩衝液 A

緩衝液 6 : 2 mM 塩化カルシウム、1M 塩化カリウムを含む緩衝液 A

緩衝液 7 : 0.1 mM 塩化カルシウム、3 M 塩酸グアニジンを含む緩衝液 A

#### 1) ジャガイモ懸濁培養細胞の凍結乾燥粉末の調製

7日間培養したジャガイモ懸濁培養細胞を濾過して培地を除き、細胞を水で十分に洗浄した後に緩衝液 1 に懸濁した。懸濁液を室温で 15 分間静置した後、濾過して緩衝液 1 を除き、再び緩衝液 2 に懸濁した。懸濁液を 4 °C で 10 分間静置した後、濾過して緩衝液 2 を除き、凍結乾燥した。得られた凍結乾燥粉末を -20 °C で保存し、以下の実験に用いた。

#### 2) DNase I アフィニティーゲルの作成

DNase I アフィニティーゲルの作成は以下のように行った。DNase I (Boehringer Mannheim) 20 mg を 0.1 M MOPS-KOH (pH 7.5) 1 ml に溶解し、透析チューブ (排除限界分子量 10,000) に入れ、0.1 M MOPS-KOH (pH 7.5) 1 l 中で約 12 時間透析を行った。また、affigel-10 (BIO-RAD) 2 ml を水で十分に洗浄した後、0.1 M MOPS-KOH (pH 7.5) に懸濁した。この affigel-10 に透析後の DNase I を加え、4 °C で約 12 時間振とうした。ゲル懸濁液に 1 M エタノールアミン 0.2 ml (0.1 ml/ml affigel-10) を加え、1 時間振とうしてブロッキング処理を行い、緩衝液 4 で洗浄後、同緩衝液に懸濁した。

#### 3) アクチンおよびアクチン関連タンパク質の部分精製

ジャガイモ懸濁培養細胞の凍結乾燥粉末 10 g を緩衝液 3 (200 ml) 中でワーリング



ブレンダーを用いて摩砕し、2枚重ねたナイロンメッシュにより残渣を除去した。摩砕液のpHをHClでpH 7.5に調整した後、18,000 x gで15分間遠心分離した。得られた上清に先に作成したDNase I アフィニティーゲルを加えて1時間振とうし、ガラスカラム（内径 3.5 cm x 長さ 4.5 cm）に充填した。ゲルを緩衝液 4 (10 ml) で3回、緩衝液 5 (5 ml) で2回、緩衝液 6 (10 ml) で1回洗浄した後、緩衝液 7 (10 ml) で試料を溶出した。得られた試料を透析チューブ（排除限界分子量 10,000）に入れ、1,000倍容の20 mM イミダゾール-HCl (pH 7.5) に対して12時間透析処理を行った。処理後の試料を凍結乾燥し、得られた標品を -20 °C に保存した。以上の操作はすべて 4 °C で行った。精製過程を Figure 7 に示す。

#### 7. SDS-PAGE およびウエスタン解析

SDS-PAGE およびウエスタン解析は第二章 II-8 の項に準じて行った。本章で用いた一次抗体と二次抗体およびそれらの希釈率を以下に示す。

##### アクチン検出用

一次抗体：抗アクチン抗体 (Sigma) (1,000 倍希釈)

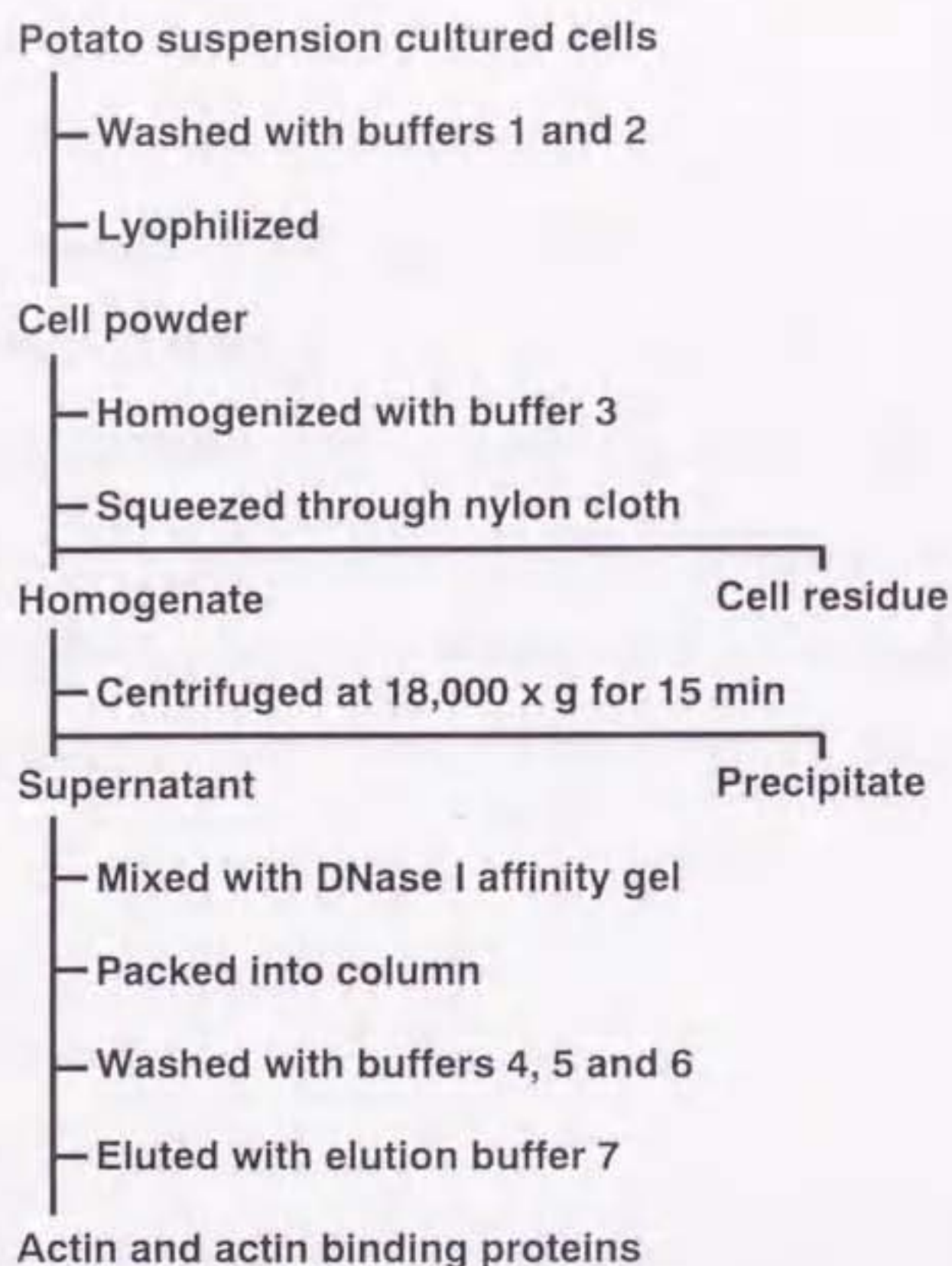
二次抗体：抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) (2,000 倍希釈)

##### キチナーゼ検出用

一次抗体：抗カボチャ塩基性キチナーゼ抗血清 (1,000 倍希釈) (Esaka et al. 1994)

二次抗体：抗ウサギ IgG 抗体 (2,000 倍希釈)





**Buffer A :** 20 mM imidazole-HCl (pH 7.5), 5 mM potassium metabisulfite, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 mM TAME, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM ATP and 20 mM sodium pyrophosphate

**Buffer 1 :** 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.44 M sorbitol and 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$

**Buffer 2 :** 10 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.4 M sorbitol, 2.5 mM potassium metabisulfite, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.2 mM ATP, 10 mM sodium pyrophosphate and 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$

**Buffer 3 :** Buffer A containing 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  and 32 mg/ml PVP

**Buffer 4 :** Buffer A containing 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$

**Buffer 5 :** Buffer A containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$

**Buffer 6 :** Buffer A containing 1 M KCl and 2 mM  $\text{CaCl}_2$

**Buffer 7 :** Buffer A containing 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  and 3 M guanidine hydrochloride

Fig. 7 Procedure of the purification for actin and actin binding protein(s).



## 8. G-アクチン画分とF-アクチン画分の分画

ジャガイモ懸濁培養細胞（生体重 10 g）を緩衝液 3 (200 ml) 中でワーリングブレンダーを用いて摩砕し、2 枚重ねたナイロンメッシュにより残渣を除去した。摩砕液の pH を HCl で pH 7.5 に調整した後、18,000 x g で 15 分間遠心分離した。得られた上清を再び 87,000 x g で 1 時間遠心分離し、上清画分と沈澱画分に分けた。両画分を DNase I 阻害法に供試し、G-アクチンが上清に、F-アクチンが沈澱にそれぞれ分画されていることを確認したので、上清と沈澱をそれぞれ G-アクチン画分と F-アクチン画分とした。

## 9. アクチン結合能の解析

### 1) ウェストウェスタン解析

ジャガイモ懸濁培養細胞の摩砕液もしくは DNase I アフィニティークロマトグラフィーにより部分精製したタンパク質を、ウェスタン解析の項で示した方法と同様の方法で PVDF 膜に転写した。この膜を 10  $\mu$ g/ml アクチンを含む TBS-T 中で 1 時間振とうした。TBS-T 中で 15 分間の膜の洗浄を 1 回、5 分間の洗浄を 2 回行った後、抗アクチン抗体（1,000 倍希釈）を含む TBS-T 中で 1 時間振とうした。膜を TBS-T で洗浄した後、抗ウサギ IgG 抗体（2,000 倍希釈）を含む TBS-T 中で 1 時間振とうした。再び膜を TBS-T で洗浄後、ECL 検出キットおよび Hyper Film を用いてシグナルの検出を行った。

### 2) ファーウェスタン解析

アクチンのビオチン化を以下のように行った。アクチン 500  $\mu$ g を 100 mM HEPES-



NaOH (pH 8.5) 1.25 ml に溶解し、25 mg/ml BNHS (Vector Laboratories Inc.) 5  $\mu$ l を加え 2 時間静置した。10 mg/ml グリシン 50  $\mu$ l を加えてアクチンのビオチン化反応を止めた後、モルカット (排除限界分子量 10,000, Millipore) により未反応のビオチンを除去した。得られたビオチン化アクチンをファウエスタン解析に用いた。G-アクチン画分および F-アクチン画分をウエスタン解析の項で示した方法と同様に PVDF 膜に転写した。この膜を 10  $\mu$ g/ml ビオチン化アクチンを含む TBS-T 中で 1 時間振とうした。膜を TBS-T で洗浄後、HRP 標識されたストレプトアビジン (Vector Laboratories Inc.) (1,000 倍希釈) を含む TBS-T 中で 1 時間振とうした。再び膜を TBS-T で洗浄後、ECL 検出キットおよび Hyper Film を用いてシグナルの検出を行った。

### 3) 光バイオセンサーを用いた解析

光バイオセンサー IAsys (Fisons Applied Sensor Technology) を用いてアクチン結合活性を測定した (Yeung et al, 1995)。リガンドとしてニワトリアクチンを用いた。まず、測定キュベット底部表面のカルボキシルメチル基を持つデキストラン (CMD) へのリガンドの結合を以下のように行った。キュベットを PBS-T [150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)] で洗浄した後、キュベットに EDC と NHS を加え、CMD のカルボキシル基を活性化した。10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) をキュベットに加えた後、さらに 25  $\mu$ g/ml のアクチンを加え、アクチンを CMD に結合させた。キュベットを PBS-T で洗浄した後、エタノールアミン (pH 8.5) を加えアクチン未結合の活性化部位のブロッキングを行った。アクチンを結合させたキュベットは水で満たし、4 °C で保存した。

試料とアクチンとの結合活性は以下のように測定した。測定する試料を 0.1 mM 塩



化カルシウムを含む 20 mM イミダゾール-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。測定前にアクチン結合キュベットを PBS-T で洗浄し、次にイミダゾール緩衝液に置換して測定のベースラインを得た。イミダゾール緩衝液を取り除いた後、キュベットに試料を加え測定を開始した。リガンド結合キュベット底部に存在する分子の質量変化をレーザー光とその検出装置により経時的に測定し、質量の増加をアクチンと試料の結合量とした。

#### 10. タンパク質の N 末端アミノ酸配列の決定

アミノ酸配列の決定は Matsudaira (1987) の方法に準じて行った。試料タンパク質を SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜に電氣的に転写した。転写されたタンパク質を CBB で染色して目的とするタンパク質のバンドを切り取り、全自動ペプチドシーケンサー (モデル 476 A, Applied Biosystems) により N 末端アミノ酸配列を決定した。

### III. 結果

#### 1. ジャガイモ懸濁培養細胞の HWC に対する反応性

本章で用いたジャガイモ懸濁培養細胞の HWC に対する反応性について検討を行った。植え継ぎ後 5 日間培養した懸濁培養細胞を 0.5 mg/ml HWC で処理し、検鏡により経時的に原形質凝集反応率を計測した。HWC 処理区においては時間の経過に伴い原形質凝集反応を示す細胞数は増加し、処理 1 時間後には約 80 % の細胞が反応した (Fig. 8 A)。一方、対照の水処理区では細胞の原形質凝集反応はほとんど起こら



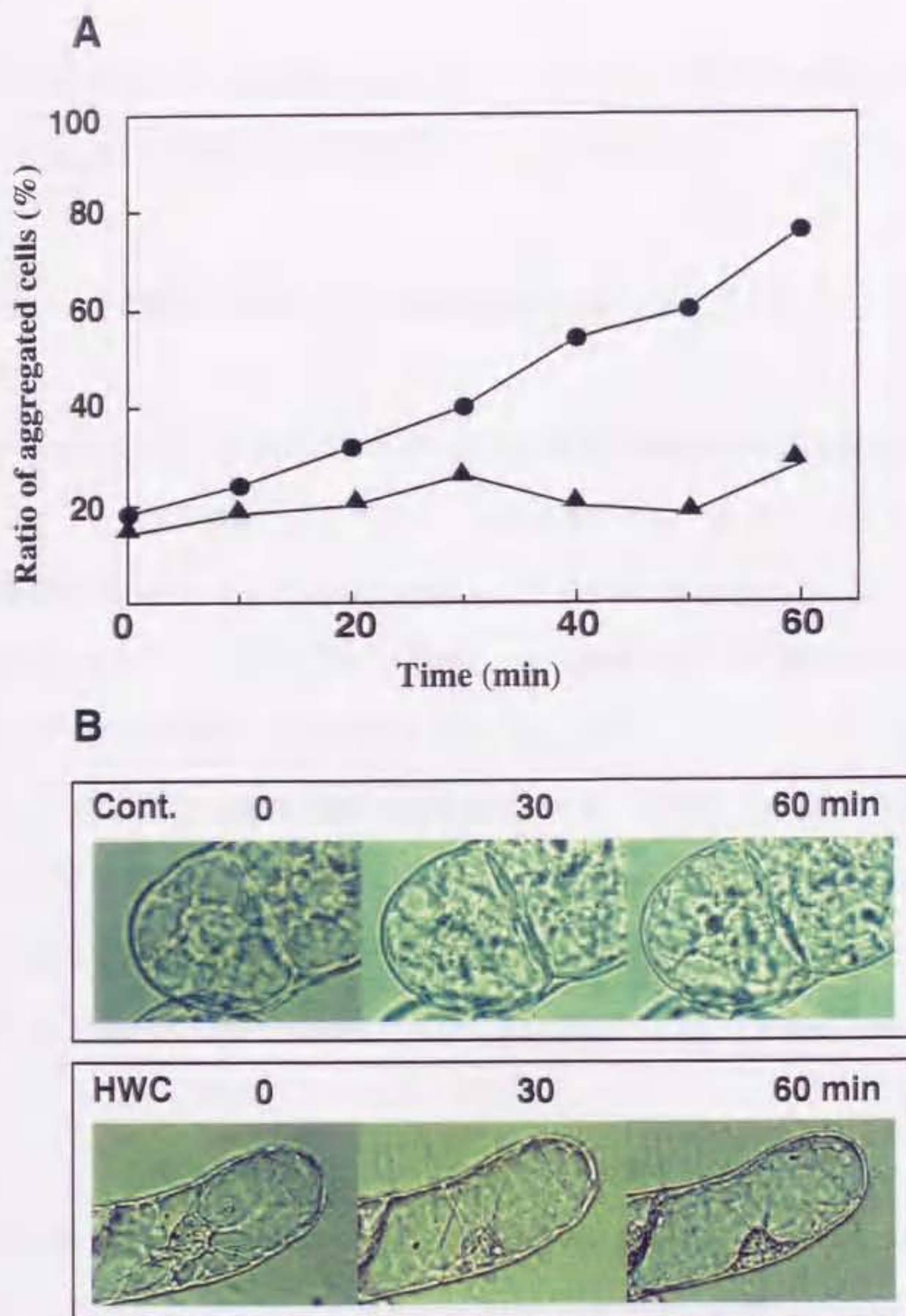


Fig. 8 Cytoplasmic aggregation of suspension cultured potato cell in response to HWC. A) Suspension-cultured cells were treated with 0.5 mg/ml HWC in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (circle) or in the 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (triangle) as a control. At indicated times, the number of cells in which cytoplasmic aggregation had occurred was determined for a total of 50 cells and the percentage was calculated. Results are representative of results of three separate experiments. B) Potato cells treated with 0.5 mg/ml HWC in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (lower panel) or 10 mM Tris-HCl buffer (upper panel) were photographed under the light microscope.



ず、時間が経過しても反応率に変化が見られなかった。HWC 処理区および未処理区における細胞の経時的な変化の典型例を Figure 8 B に示す。

## 2. ジャガイモ懸濁培養細胞の原形質凝集反応におよぼすサイトカラシン D の影響

HWC 処理により引き起こされるジャガイモ懸濁培養細胞の原形質凝集反応におよぼすアクチン重合阻害剤サイトカラシン D の影響について調べた。ジャガイモ懸濁培養細胞を  $5\mu\text{M}$  サイトカラシン D あるいはその溶媒である 0.25 % エタノールで 5 分間処理した後、 $0.5\text{ mg/ml}$  HWC で処理し、原形質凝集反応率を経時的に計測した。その結果、HWC 処理区で原形質凝集反応が認められたのに対し、サイトカラシン D と HWC の処理区では凝集反応が抑制された。なお、対照区である緩衝液処理区では原形質凝集反応はほとんど認められなかった (Fig. 9)。これらの結果より、ジャガイモ懸濁培養細胞においてもアクチン繊維の重合反応を介した原形質凝集反応が誘導されると判断し、アクチン結合タンパク質精製の材料として以降の実験に用いた。

## 3. ジャガイモ懸濁培養細胞のアクチン結合タンパク質の精製

アクチンと特異的に結合することが知られる DNase I のアフィニティークロマトグラフィーを行い、ジャガイモ懸濁培養細胞のアクチンおよびアクチン結合タンパク質の部分精製を行った。精製は、Mackawa ら (1984)、Villanueva ら (1990) および Andersland ら (1992) の方法を参考に幾つかの変更を加えて行った。ジャガイモ懸濁培養細胞を濾過して培地を除き、水で十分に洗浄した後、ATP、ピロリン酸ナトリウム、カルシウムイオンなどのアクチン繊維を安定化するための試薬を含む緩衝液



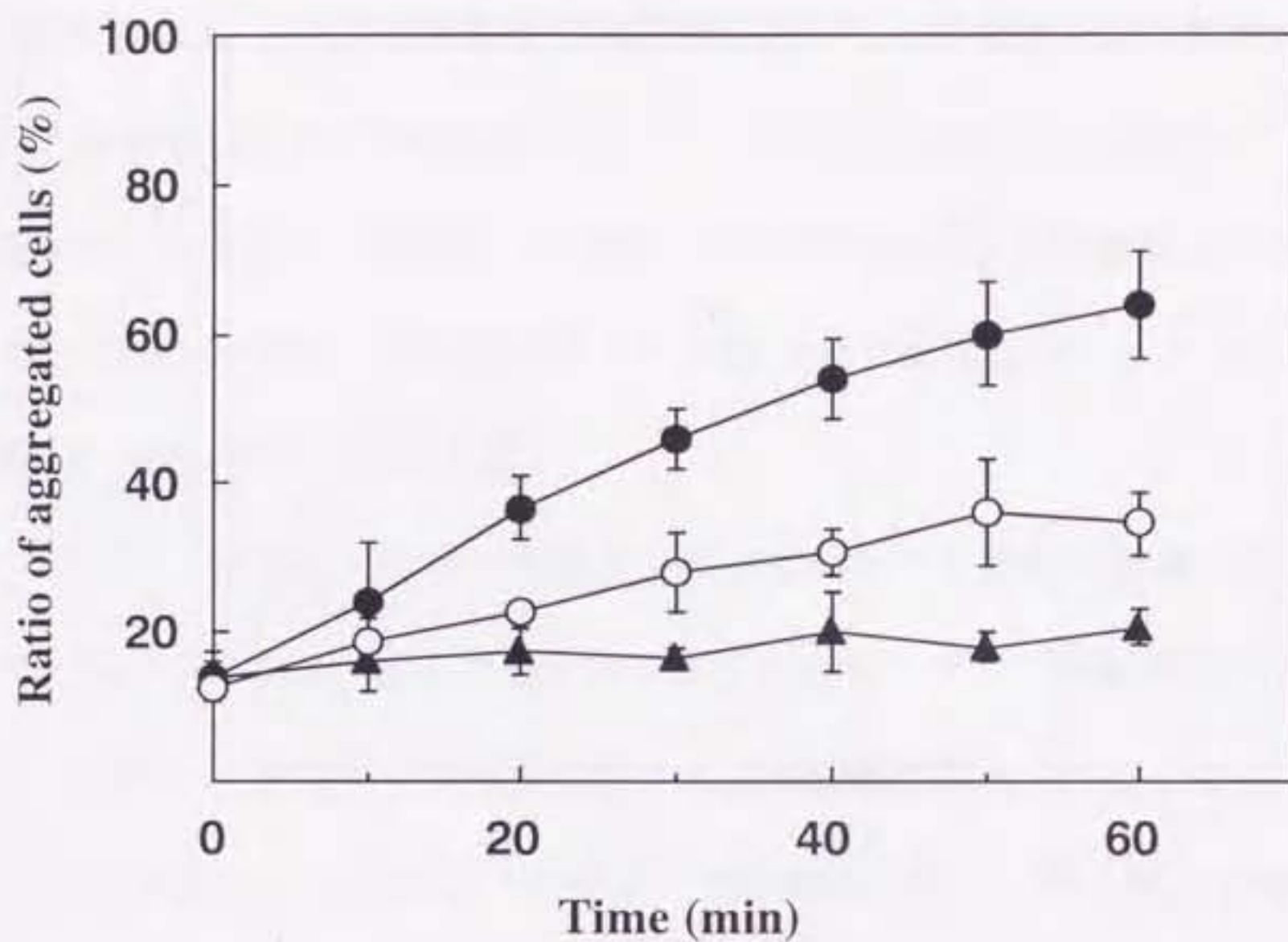


Fig. 9 Effect of cytochalasin D on cytoplasmic aggregation of suspension cultured potato cells upon treatment with HWC. Cells were pretreated with 5  $\mu$ M cytochalasin D in ethanol (open circle) or with 0.25% ethanol (closed circle and triangle) for 5 min and then they were treated with 0.5 mg/ml HWC in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (open and closed circles) or with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) as a control (closed triangle). At indicated times, the number of cells in which cytoplasmic aggregation had occurred was determined for a total of 50 cells and the percentage was calculated. Results shown are means of triplicate determinations  $\pm$ SD and are representative of results of three separate experiments.



に懸濁し、凍結乾燥した。これをワーリングブレンダーを用いて摩砕し、ナイロンメッシュにより残渣を除去した。摩砕液の pH を HCl で pH 7.5 に調整した後、18,000 x g で 15 分間遠心分離した。得られた上清に先に作成した DNase I アフィニティゲルを加えて振とうし、ガラスカラムに充填した。ゲルを種々の緩衝液で洗浄した後、塩酸グアニジンを含む緩衝液で試料を溶出した。溶出液を透析後凍結乾燥し、得られた標品を -20 °C で保存した。アフィニティカラムより溶出したタンパク質を電気泳動したところ、43 kDa、32 kDa、22 kDa の各バンドが検出された (Fig. 10 A, Lane 3)。これらのうち、43 kDa のタンパク質の分子量はニワトリアクチンの分子量と一致した (Fig. 10 A, Lanes 1, 3)。

次に 43 kDa、32 kDa、22 kDa の各タンパク質のアミノ酸配列を調べた。43 kDa のタンパク質については、シークエンサーによる分析でアミノ酸配列が得られず、試料タンパク質の N 末端がブロックされている可能性が考えられた。そこで Cleveland ら (1977) の方法により試料をプロテアーゼで部分分解し、得られた 2 種のペプチド断片のアミノ酸配列を調べた。その結果、両ペプチドの N 末端アミノ酸配列は、既にクローニングされているジャガイモのアクチン遺伝子より予想されるアミノ酸配列の 171-184 番目および 96-110 番目の配列とそれぞれ一致した (Fig. 11 A) (Drouin and Dover 1990)。この結果とタンパク質の分子量の結果とを合わせ、43 kDa のタンパク質はジャガイモアクチンであると判断した。32 kDa タンパク質の N 末端アミノ酸配列を調べたところ、アミノ酸が特定できなかった 3 番目と 12 番目のアミノ酸残基を除き、ジャガイモの塩基性キチナーゼ遺伝子より予想される成熟型タンパク質の N 末端アミノ酸配列と一致した (Fig. 11 B) (Beerhues and Kombrink 1994)。また、22 kDa タンパク質の N 末端アミノ酸配列はジャガイモのオスモチン様タンパク質遺伝子よ



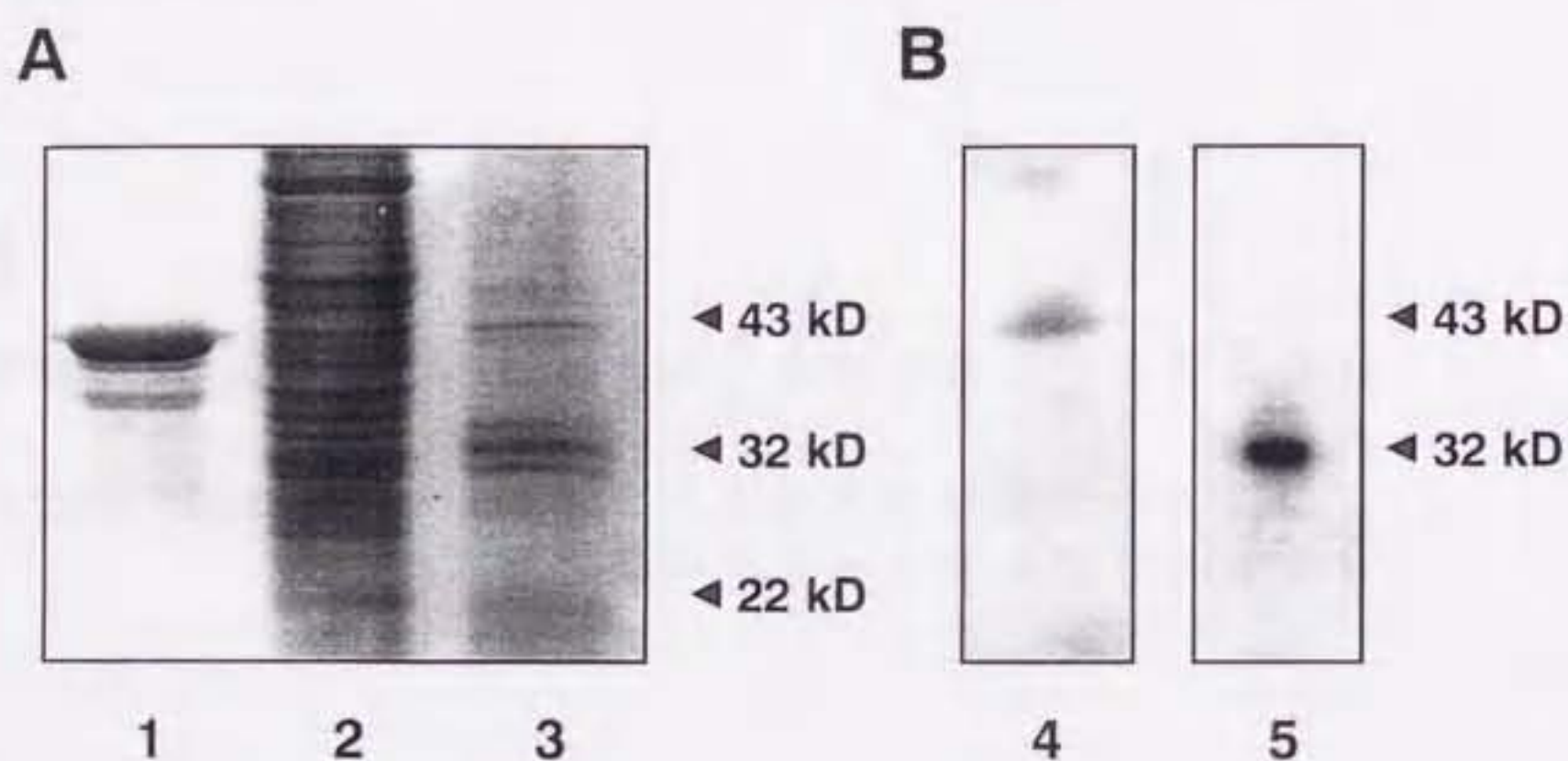


Fig. 10 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting of proteins after affinity chromatography on immobilized DNase I. A) Chicken actin (lane 1), a homogenate of suspension cultured potato cells (lane 2), and a sample of protein after affinity chromatography (lane 3) were loaded on an SDS-polyacrylamide gel (12.5 %) and subjected to electrophoresis. The gel was stained with CBB. B) Protein samples after affinity chromatography were subjected to electrophoresis on an SDS-polyacrylamide gel and immunoblotted with actin-specific antibodies raised in rabbit (lane 4) or with antiserum against type I chitinase from pumpkin raised in rabbit (lane 5). Detection was carried out with antibodies against rabbit IgG and an ECL detection kit.



# A

43 kDa-3	Y A L P H A I L X L D L A G
Potato actin	<sup>171</sup> Y A L P H A I L R L D L A G <sup>184</sup>
43 kDa-5	L R V A P E E H P V L L T E A
Potato actin	<sup>96</sup> L R V A P E E H P V L L T E A <sup>110</sup>

# B

32 kDa protein	E Q X G <sup>S</sup> Q A G G A <sup>L</sup> X A S G L
Potato chitinase	<sup>1</sup> E Q C G S Q A G G A L C A S G L <sup>17</sup>
	E Q C G K Q A G G A R C A A G L

# C

22 kDa protein	A T I E V R N N X P Y T V W A A S T P I G
Potato osmotin	<sup>1</sup> A T I E V R N N C P Y T V W A A S T P I G <sup>21</sup>

Fig. 11 Comparison of partial amino acid sequences of potato actin and the 43 kDa protein (A), of amino-terminal amino acid sequences of potato basic chitinase and the 32 kDa protein (B) and of potato osmotin-like protein and the 22 kDa protein (C). The partial sequences of the 43 kDa, the 32 kDa and the 22 kDa proteins are aligned with those of potato actin (Drouin and Dover 1990), basic chitinase (Beerhues and Kombrink 1994) and osmotin-like protein (Zhu et al. 1995), respectively.



り予想される成熟型タンパク質のアミノ酸配列と9番目を除いて一致した (Fig. 11 C) (Zhu et al. 1995)。既に報告されている塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質の分子量は、それぞれ約 32 kDa と 22 kDa であることより、DNase I アフィニティークロマトグラフィーにより得られた 32 kDa と 22 kDa の両タンパク質は塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質であると結論した。さらに DNase I アフィニティークロマトグラフィー後の部分精製タンパク質標品をウエスタン解析したところ、アクチン抗体とカボチャ塩基性キチナーゼ抗血清によりそれぞれ 42 kDa と 32 kDa のバンドが特異的に検出され、両タンパク質がアクチンと塩基性キチナーゼであることがさらに示された (Fig. 10 B Lanes 4, 5)。

#### 4. 塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質のアクチン結合能の解析

塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質がアクチン結合能を持つかどうかを調べるため、以下に示す3種類の方法により解析を行った。

##### 1) ウエストウエスタン解析

アクチンとその抗体を用いたウエストウエスタン解析の模式図を Figure 12 B に示す。ジャガイモ懸濁培養細胞の全タンパク質を電気泳動した後、PVDF 膜にブロットした (Fig. 12 B-1)。まずこの PVDF 膜にアクチンを処理してアクチン結合能を持つタンパク質に結合させた (Fig. 12 B-2)。次にこの膜にアクチン抗体 (Fig. 12 B-3) とペルオキシダーゼ標識した二次抗体 (Fig. 12 B-4) を処理し、アクチン結合タンパク質を検出した。ウエストウエスタン解析の結果、アクチン、塩基性キチナーゼ、オスモチン様タンパク質の各分子量に相当する 43 kDa、32 kDa、22 kDa のバンドが検



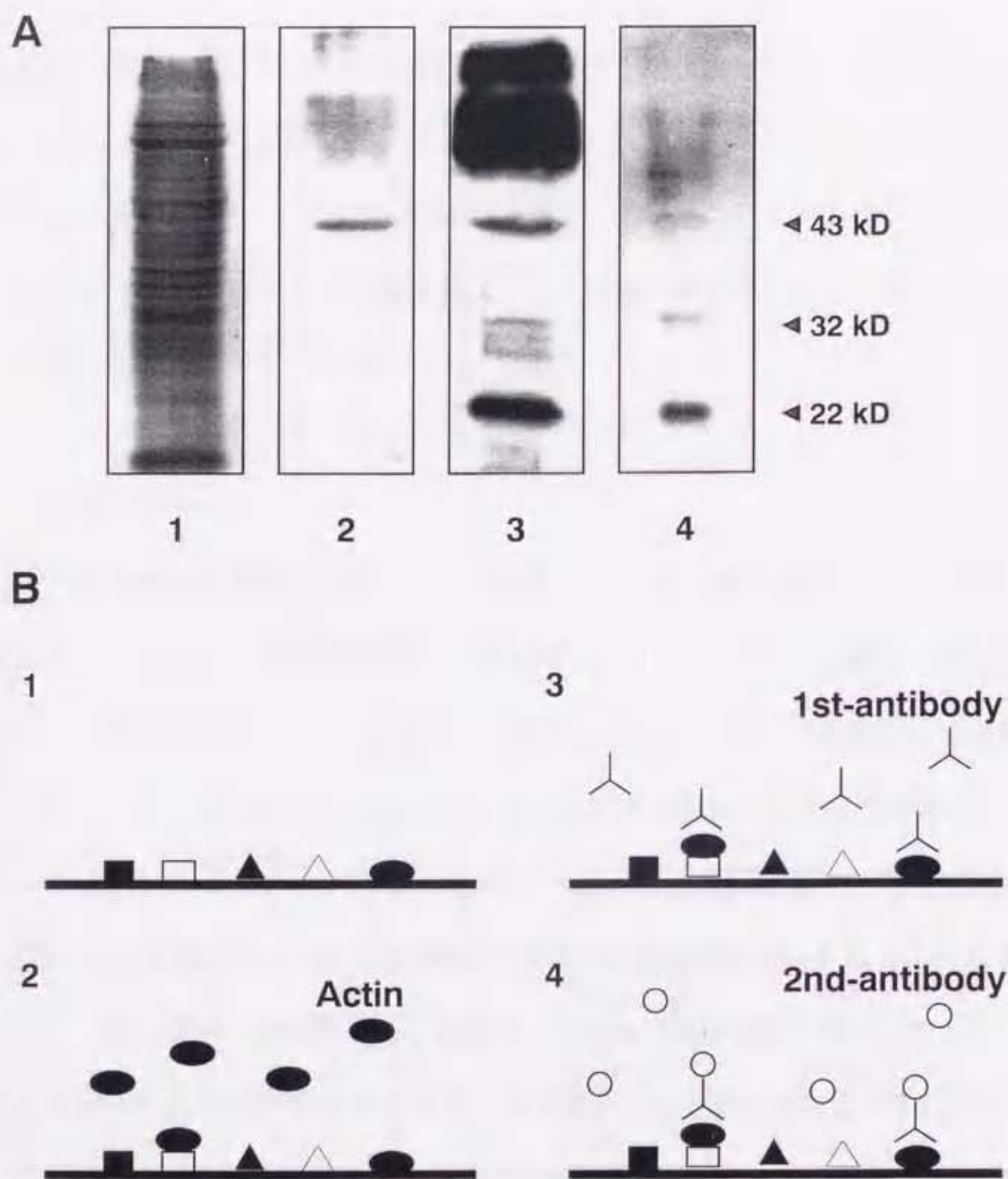


Fig. 12 A) Actin-binding analysis of a homogenate prepared from potato cells in suspension culture and proteins eluted from the DNase I affinity column using actin and actin-specific antibodies (West-western analysis). Lane 1, SDS-PAGE (10%) of the homogenate after staining with CBB; lane 2, blot of the homogenate without treatment with chicken actin; lane 3, blot of the homogenate after treatment with chicken actin; lane 4, blot of the sample after affinity chromatography and treatment with chicken actin. Detection was carried out with actin-specific antibodies raised in rabbit, second antibodies against rabbit IgG and an ECL detection kit. B) Scheme of West-western analysis. 1, Protein samples were blotted to PVDF membrane. 2, The membrane was treated with chicken actin. 3, The membrane was treated with actin-specific antibody. 4, The membrane was treated with peroxidase-conjugated second antibody.



出され、さらに高分子量に相当する部位に強いシグナルが検出された (Fig. 12 A Lane 3)。一方、Figure 12 B-2 の過程でアクチン処理を行わなかった対照実験では、43 kDa のバンドのみが検出された (Fig. 12 A Lane 2)。また、アフィニティークロマトグラフィーにより部分精製したタンパク質試料について同様の解析を行ったところ、43 kDa、32 kDa、22 kDa のバンドが検出された (Fig. 12 A Lane 4)。

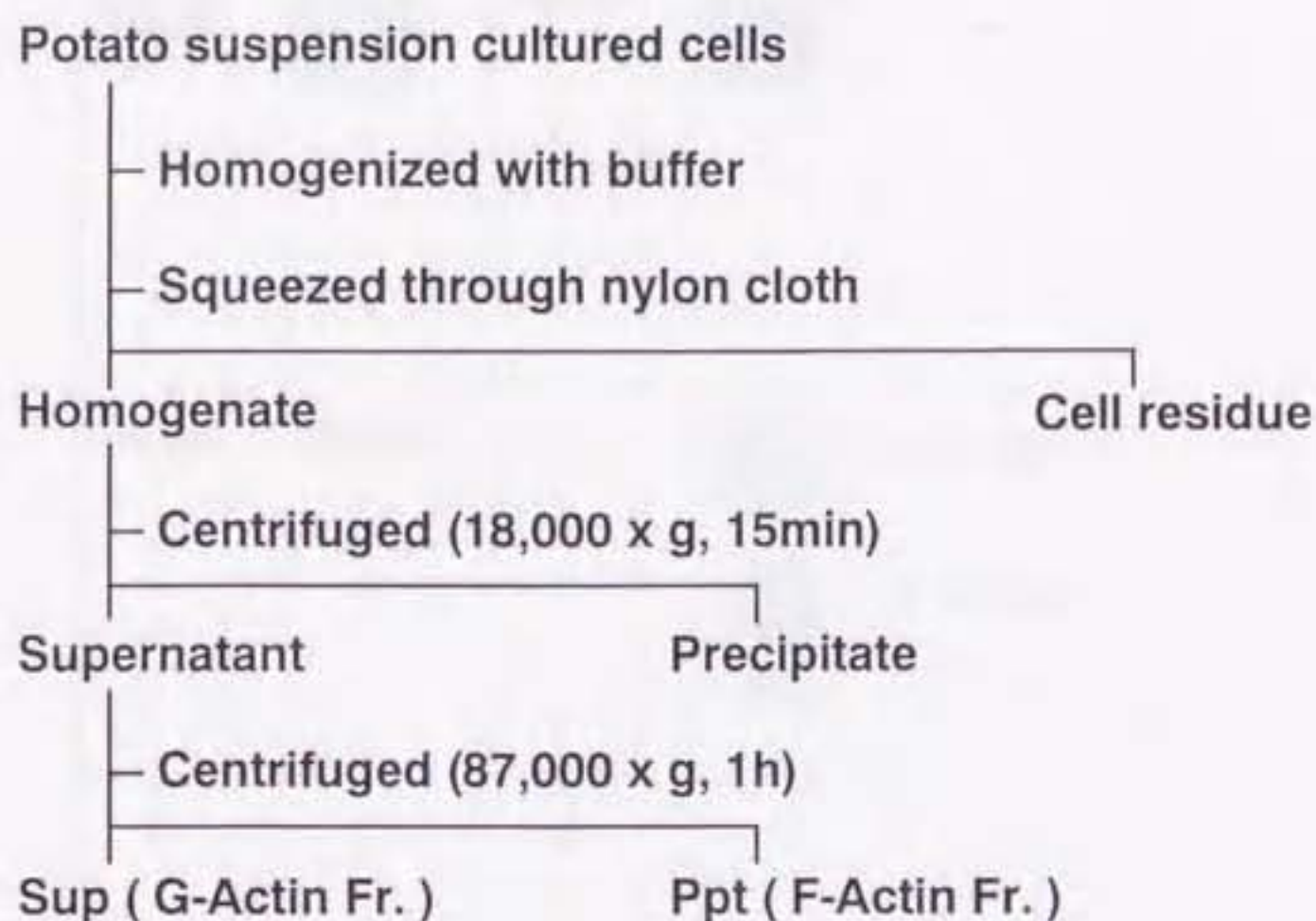
## 2) ファーウエスタン解析

まずジャガイモ懸濁培養細胞の粗タンパク質を G-アクチン画分と F-アクチン画分とに分画した。ジャガイモ懸濁培養細胞の摩砕液を 18,000 x g で遠心分離して細胞残渣を除去し、この上清を 87,000 x g で再度遠心分離した。上清および沈澱画分を調製後直ちに DNase I 阻害法に供試したところ、上清画分に DNase I 阻害活性が見られ G-アクチンが含まれることが示された (Fig. 13 a) のに対し、沈澱画分には阻害活性が見られなかった (Fig. 13 c)。さらに調製 15 分後に両画分の DNase I 阻害活性を調べたところ、上清と沈澱の両画分ともに同程度の DNase I 阻害活性が認められ、沈澱画分にも上清画分とほぼ等量の G-アクチンが含まれることが示された (Fig. 13 b, d)。従って、調製 5 分後の沈澱画分で DNase I 阻害活性が認められなかったのは沈澱画分中のアクチンが F-アクチンの状態で存在したためであると考えられた。この結果より、87,000 x g での遠心分離により粗タンパク質中の G-アクチンと F-アクチンが分画されたと判断し、上清を G-アクチン画分、沈澱を F-アクチン画分とした。

次に G-アクチン画分と F-アクチン画分についてビオチン化アクチンを用いたファーウエスタン解析を行った。ファーウエスタン解析の模式図を Fig. 14 B に示す。G-アクチン画分あるいは F-アクチン画分を電気泳動した後、PVDF 膜にブロットした



**A**



**B**

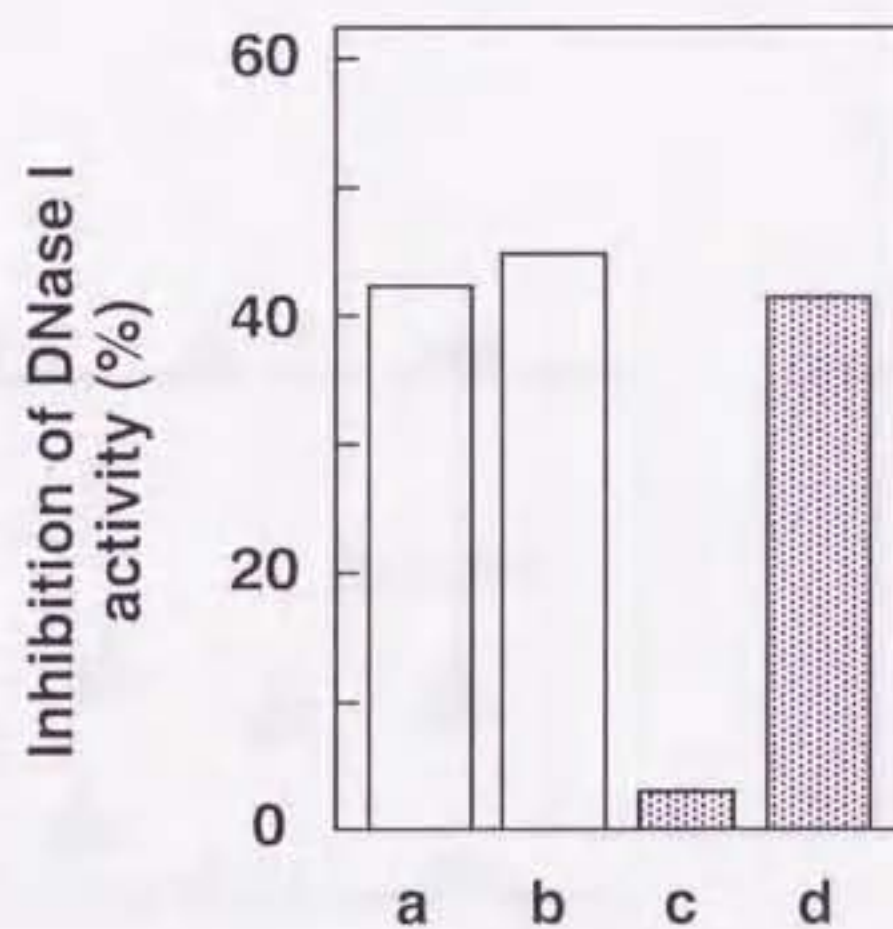


Fig. 13 A) Preparation of G-actin and F-actin fractions. B) Inhibition of DNase I activity by supernatant and pellet fractions from a homogenate of suspension-cultured potato cells. A homogenate prepared from suspension-cultured potato cells was centrifuged at 87,000 x g for 1 hr and the resultant pellet was suspended in homogenizing buffer. An equal volume of supernatant (lanes a and b) and of the suspension of pellet (lanes c and d) was subjected to the DNase I inhibition assay 5 min (lanes a and c) and 15 min (lanes b and d) after centrifugation. Results are representative of results of three experiments.



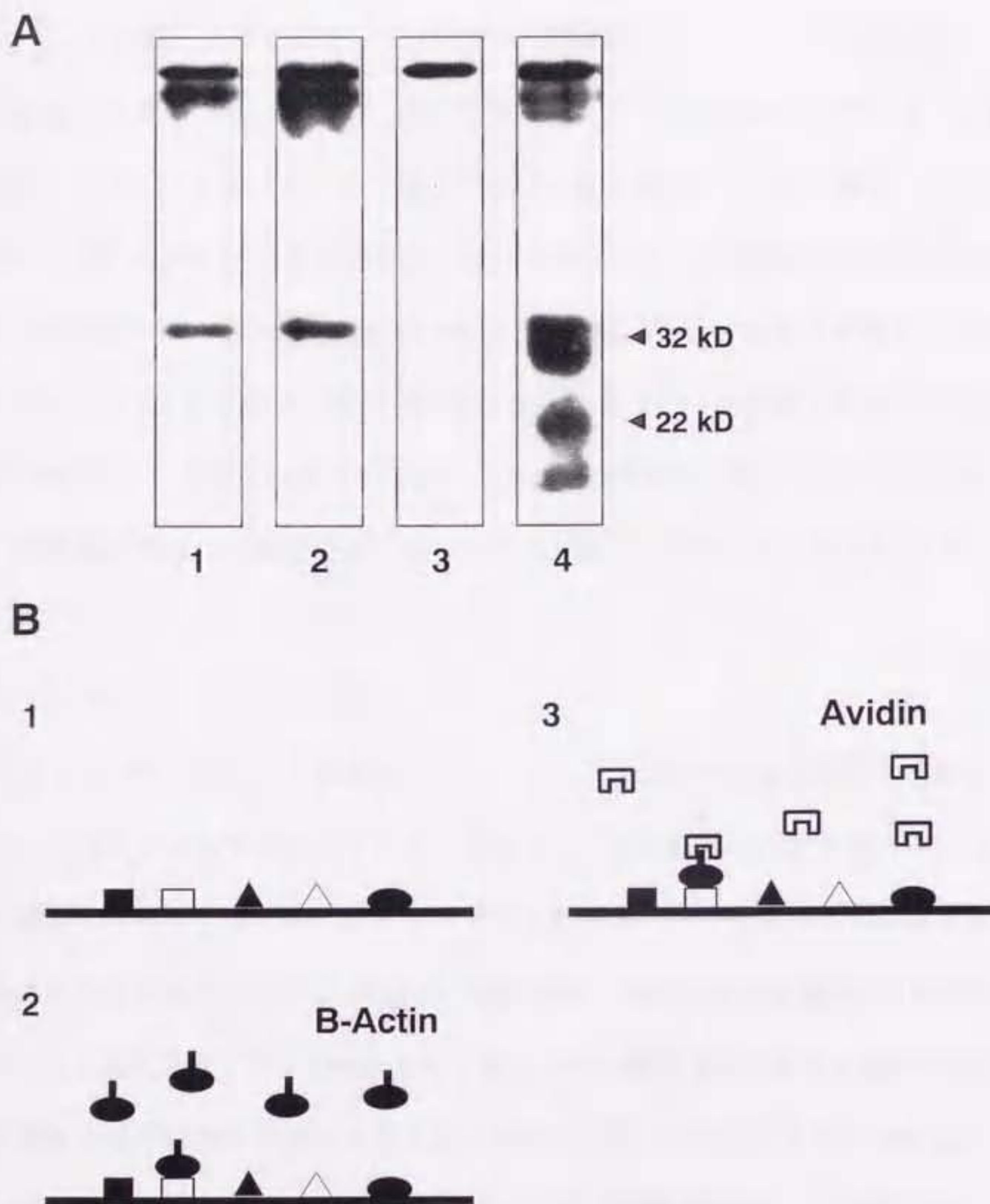


Fig. 14 A) Actin-binding analysis of the supernatant and pellet fractions using biotinylated chicken actin (Far-western analysis). The supernatant (lanes 1 and 2) and the suspension of the pellet (lanes 3 and 4) described above were fractionated by SDS-PAGE (10%) and then proteins were transferred to a PVDF membrane. Membranes were treated with (lanes 2 and 4) or without (lanes 1 and 3) biotinylated chicken actin. Detection was performed with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin and the ECL detection kit. B) Scheme of Far-western analysis. 1, Protein samples were blotted to PVDF membrane. 2, The membrane was treated with biotinylated chicken actin. 3, The membrane was treated with peroxidase-conjugated streptavidin.



(Fig. 14 B-1)。この膜にまずビオチン化アクチンを処理してアクチン結合能を持つタンパク質に結合させた (Fig. 14 B-2)。次にペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン処理し (Fig. 14 B-3)、アクチン結合タンパク質を検出した。この結果、G-アクチン画分では、Figure 14 B-2 の過程でビオチン化アクチンを処理した場合 (Fig. 14 A Lane 1) も処理しない場合 (Fig. 14 A Lane 2) も同様に 32 kDa と高分子量のバンドが認められた。一方、F-アクチン画分ではビオチン化アクチンを処理した場合に約 32 kDa と 22 kDa のバンドおよび高分子量のバンドが検出された (Fig. 14 A Lane 4) のに対し、未処理の場合には高分子量のバンドのみが検出された (Fig. 14 A Lane 3)。

### 3) 光学バイオセンサーを用いた解析

光学バイオセンサーを用いて塩基性キチナーゼのアクチンへの結合活性の有無を検討した。リガンドとして用いるアクチンをキュベットの底部に固定させた後、アクチンの固定化を確認するためにまずアクチンとの特異的結合能をもつ DNase I を用いて結合活性の検討を行った。50 ng/ $\mu$ l、100 ng/ $\mu$ l、200 ng/ $\mu$ l の各濃度の DNase I をキュベットに加えたところ、DNase I のリガンドへの結合を示す数値の増加が見られ、この数値の増加は濃度依存的であった。対照として DNase I にかえて 200 ng/ $\mu$ l の BSA を用いたところ、結合は全く見られなかった (結果未掲載)。この結果より、光学バイオセンサーを用いたアクチン結合活性の測定が可能であると判断した。キュベットにジャガイモ懸濁培養細胞の抽出タンパク質を加えたところ、アクチンとの結合を示す数値の増加が認められ、懸濁培養細胞中にアクチン結合タンパク質が存在することが示された。

次にこれらのアクチン結合タンパク質中にキチナーゼが含まれるかどうかを以下



の方法で調べた。光学バイオセンサーを用いた解析の模式図を Figure 15 B に、結合量の変動の一例を Figure 15 A に示す。キュベットにジャガイモ懸濁培養細胞タンパク質を加えることにより、アクチンへの結合を示す結合量の増加が認められ (Fig. 15 A-1, B-1)、洗浄後 (Fig. 15 A-2)、キチナーゼ抗血清の添加により結合量の増加が認められた (Fig. 15 A-3, B-2)。種々の希釈率のキチナーゼ抗血清を加えたところ、抗血清の濃度に依存した結合活性の上昇が認められ (Fig. 15 C-1, 2, 3)、ジャガイモ懸濁培養細胞のアクチン結合タンパク質の中にキチナーゼが含まれていることが示された。一方、対照実験として Figure 13 A-3 および B-2 の段階でキチナーゼ抗体にかえてウサギ血清を用いたところ、結合活性の上昇は見られなかった (Fig. 15 C-4)。

#### IV. 考察

本章では、原形質凝集反応を誘導するアクチン繊維の制御機構および原形質凝集反応の抵抗性における役割について調べるため、凝集反応に関与する分子の実体を捉えることを目的として実験を行った。

第二章では、ジャガイモプロトプラストと HWC エリシターの系が感染応答解析のモデル系として有用であることを示した。しかし、本章の実験の目的であるタンパク質の精製にはデンプン含量の多い塊茎は適切ではない。そこでデンプン含量の少ない懸濁培養細胞を用いて、まずジャガイモ懸濁培養細胞における原形質凝集反応の観察を行い、モデル系としての有効性を確認した。懸濁培養細胞を HWC で処理し、検鏡により経時的に原形質凝集反応率を計測したところ、対照の水処理区では変化はほとんど見られなかったのに対し、HWC 処理区においては有意に原形質



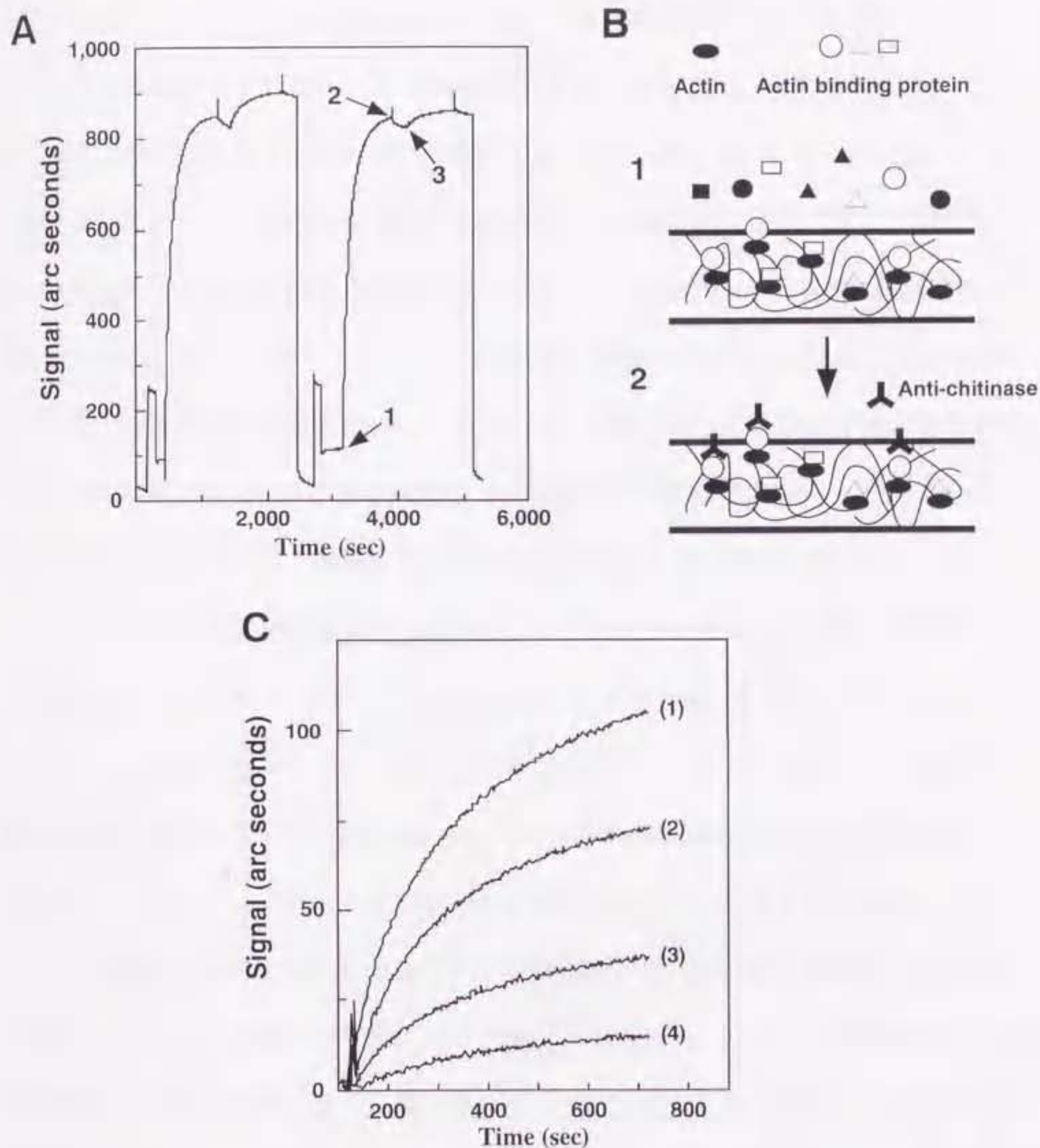


Fig. 15 A) Typical results of the binding assay of chitinase to actin in the biomolecular interaction assay system. Arrows indicate : 1, addition of 0.2 mg/ml protein samples from suspension-cultured potato cells ; 2, removal of the protein sample and washing with imidazole buffer ; and 3, addition of the antiserum against chitinase. B) Scheme of actin binding analysis using optical biosensor. 1, addition of protein samples from suspension-cultured potato cells. 2, treatment with antiserum against chitinase. C) Detection of binding of chitinase to actin at various concentrations of antiserum against chitinase. Antiserum against chitinase diluted to 1/10,000 (1), 1/15,000 (2) and 1/20,000 (3) or rabbit serum without immunization diluted 1/10,000 (4) was applied to the cuvette which had been added 0.2 mg/ml protein samples indicating 3 in (A). The binding reaction was monitored as the change in intensity of the signal (arc seconds). The results are a representative of results of three separate experiments.



凝集反応が誘導された (Fig. 8)。またジャガイモ懸濁培養細胞の原形質凝集反応はアクチン重合阻害剤サイトカラシン D の前処理により抑制され、原形質凝集反応にアクチンの重合反応が重要であることが改めて示された (Fig. 9)。これらの結果は、第二章で示したプロトプラストと HWC の系における凝集反応に比べ、反応の開始までに時間を要する傾向が認められた (Figs. 2, 8)。この理由として、懸濁培養細胞が細胞壁を持つこと、プロトプラストが1細胞ずつ分離しているのに対して懸濁培養細胞の場合は複数の細胞が固まっていることなどが挙げられる。懸濁培養細胞においても HWC によりアクチン重合反応を介した原形質凝集反応が認められたことより、アクチン結合タンパク質精製の材料として適当であると判断した。

そこでジャガイモ懸濁培養細胞を材料とし、アクチン結合タンパク質の探索とその精製を試みた。DNase I がアクチンと特異的に結合することを利用した DNase I アフィニティークロマトグラフィーは、アクチンおよびアクチン結合タンパク質の精製に以前から用いられており (Hosoya et al. 1982, Maekawa et al. 1984)、本実験でも適用した。アフィニティークラムより溶出した部分精製タンパク質を電気泳動したところ、43 kDa、32 kDa、22 kDa の各バンドが検出された (Fig. 10)。43 kDa、32 kDa、22 kDa の各タンパク質は、分子量、アミノ酸配列 (Fig. 11)、ウエスタン解析 (Fig. 10) の結果より、それぞれアクチン、塩基性キチナーゼ、オスモチン様タンパク質であると同定した。32 kDa 付近に認められた複数のバンドはアミノ酸配列の解析の結果、塩基性キチナーゼであることが示され、部分精製した塩基性キチナーゼが分子量の異なる幾つかのアイソフォームを含む可能性が考えられた。

今回アクチン結合タンパク質の精製に用いた DNase I アフィニティークロマトグラフィーはリガンドである DNase I に結合したアクチンにさらに結合したタンパク



質を精製する方法である。そのため、得られたタンパク質が DNase I に直接結合している可能性を否定できない。そこで塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質のアクチン結合能を複数の方法により調べた。ウエストウエスタン解析 (Fig. 12) とフーウエスタン解析 (Fig. 14) の結果、塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質がアクチン結合タンパク質として検出された。さらに、生体分子間相互作用の分析装置を用いて、塩基性キチナーゼがアクチンに結合することを示した (Fig. 15)。

塩基性キチナーゼおよびオスモチン様タンパク質は、感染応答時に発現が誘導される PR タンパク質のグループ 3 およびグループ 5 に属する。キチナーゼは病原糸状菌の細胞壁のキチンを分解する活性を持つことより、病原菌の生育を阻害すると考えられている。実際にエンドウより精製したキチナーゼが *Fusarium* や *Penicillium* をはじめとする 15 種の糸状菌に対して生育阻害活性を示すことを Mauch ら (1988) は報告している。さらに、Sela-Buurlage ら (1993) はタバコの塩基性および酸性キチナーゼの *E. solani* に対する抗菌活性を調べ、塩基性キチナーゼに特に強い抗菌活性があることを報告し、塩基性キチナーゼが抵抗反応に重要な役割を果たしている可能性を示した。一方、オスモチン様タンパク質の酵素活性についての報告はない。しかし、タバコとトマトの精製オスモチンが *Phytophthora* 属菌に対して抗菌活性を持つこと (Woloshuk et al. 1991)、オスモチンもしくはオスモチン様タンパク質を過剰発現したジャガイモでは *P. infestans* 接種により現れる病徴が抑えられたこと (Lui et al. 1994) などの報告より、オスモチン様タンパク質も抗菌タンパク質として抵抗反応へ関与していると考えられる。

今回精製した塩基性キチナーゼおよびオスモチン様タンパク質は共に塩基性 PR タンパク質であり、恒常的に発現し、感染ストレスにより蓄積が誘導され、主に液



胞に蓄積される。このような液胞に常に蓄えられている PR タンパク質の機能は未だ明確ではない。一つの可能性としてファイトアレキシンのような誘導性の抗菌物質が生産される以前の過程で、先在性の抗菌性物質として抵抗反応に関与していることが考えられる。しかし、液胞に存在するタンパク質が感染応答に際してどのように細胞表面の病原菌に作用するかは今のところ説明がつかない。

次に、ジャガイモ懸濁培養細胞の摩砕液に含まれる F-アクチンと G-アクチンを遠心分離により分画し、これらをファーウエスタン解析に供試したところ、塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質はいずれも F-アクチンを含む画分に検出された。この結果は塩基性キチナーゼとオスモチン様タンパク質が F-アクチンと共に挙動している可能性を間接的に示した。Benhamou ら (1990) は、*F. oxysporum* に感染したトマトの根におけるキチナーゼの局在性をキチナーゼ抗血清を用いて調べたところ、液胞にキチナーゼは検出されず、宿主細胞壁の菌の接触している付近に存在したことを報告している。この結果は感染応答時に液胞にあるはずの塩基性 PR タンパク質が感染現場に局在化した可能性を示しており興味深い。本実験で示した塩基性キチナーゼおよびオスモチン様タンパク質とアクチンとの結合は、菌の感染部位にアクチン繊維を介して抗菌性物質が局在するという新しい可能性を提示した。しかし、液胞に存在するタンパク質がどのように細胞礎質の細胞骨格上に移行するのかなど解決すべき課題が残された。また、今回示したアクチンと両タンパク質との結合は *in vitro* での結合活性である。両タンパク質とアクチンとの結合が実際に生理的な条件下で起こるのかどうか、またその結合がいかなる意味を持つのかを調べるためには、粗精製画分と抗体を用いた共沈実験や、塩基性キチナーゼ抗体とオスモチン抗体を用いた細胞染色による両タンパク質とアクチン繊維との分布の比較といった *in vivo*



での状態を考慮した解析がさらに必要であるとする。



#### 第四章 ディファレンシャルディスプレイ法によるタバコ植物の病害ストレス誘導性遺伝子の単離と発現解析

##### 1. 緒言

植物の病害抵抗性は、大きく静的抵抗性と動的抵抗性に分類される。静的抵抗性は、ワックスやクチン層、細胞壁構成成分といった物理的障壁や蓄積ポリフェノール物質のような非誘導性の抗菌性物質による抵抗性で、非病原微生物に対する抵抗性の中心的役割を担っていると推察される (Ride 1985)。静的抵抗性が打破された場合、植物は病原菌の感染を受けて罹病性となるか、あるいは動的抵抗性を発動することにより抵抗性となる。

植物の動的抵抗性にはパピラの形成、ファイトアレキシンの合成、抗菌性タンパク質の蓄積、過敏感細胞死などの様々な抵抗反応が寄与する (Hammond-Kosack and Jones 1996)。この動的抵抗性の発動時には、数多くの遺伝子の発現が誘導されることが知られている。これら病害ストレス誘導性遺伝子の発現する時間や部位は様々であることより、病害ストレス誘導性遺伝子の発現を司る情報伝達系は多種多様で、かつ相互に影響し合うと考えられる (Hahlbrock et al. 1995, Niki et al. 1998)。例えばリグニンやファイトアレキシンの合成に関わるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)、トランス桂皮酸 4-水酸化酵素 (C4H)、5-エピアリストロキン合成酵素 (EAS) といった二次代謝系酵素の遺伝子は、病害ストレスを直接受けた細胞とその近隣の細胞で比較的早い時間に発現が誘導される (Dixon and Paiva 1995, Lois et al. 1989, Mizutani et al. 1997, Facchini and Chappell 1992)。一方、抗菌性タンパク質として認知されているキチナーゼ、グルカナーゼといった PR タンパク質は、直接ストレスを受



けた細胞に加えて植物体全体で比較的遅い時間に誘導される (Stintzi et al. 1993)。

これまでの病害ストレス誘導性遺伝子の報告例は、特定の遺伝子に注目して研究がされている場合が多い。しかし、病害ストレスを受けた植物の誘導抵抗反応の全体像を把握するためには、特定の植物-病原菌の系で多様な誘導性遺伝子が順次発現していく様相を調べる必要がある。そこで第四章から第六章ではタバコ植物とジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) の菌体壁成分 (HWC) エリシターの系を用い、病害ストレス誘導性遺伝子の単離を試みた。本章では、まずタバコ植物と HWC の系における誘導抵抗反応の観察を行い、抵抗反応誘導のモデル系と成り得ることを確認した。そこで、本系を用いて RT-PCR をもとにしたディファレンシャルディスプレイ法 (Yoshida et al. 1994) によるエリシター誘導性遺伝子のスクリーニングを行い、2 種の病害ストレス誘導性遺伝子を得た。両遺伝子と既知の病害ストレス誘導性遺伝子の発現パターンの比較を行い、両遺伝子の予想される機能について考察した。

## II. 材料および方法

### 1. 供試植物

タバコ植物として、*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun NN (*N. tabacum* L. var Samsun に *N. glutinosa* の TMV 抵抗性遺伝子である N 遺伝子を導入) を用いた。タバコ種子をクレハソイル (呉羽化学) を入れたポリエチレンポットに播種し、25 °C の恒温室において 24 時間の明条件下で生育させた。実験には発芽後 6-8 週目の植物体の第 4-6 葉を用いた。



## 2. 供試菌

菌体壁成分 (HWC) エリシター調製に用いる菌として、名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座植物病理学研究室に保存されているジャガイモ疫病菌 (*P. infestans* (Mont.) De Bary) race 1.2.3.4 を使用した。またタバコ葉に接種する菌として、ダイズ斑点細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) 801 系統およびタバコ野火病菌 (*P. syringae* pv. *tabaci*) 274 系統を使用した。

## 3. タバコ葉へのエリシター処理、傷処理および細菌接種

タバコ葉のエリシター処理および細菌接種は以下のように行った。注射針でタバコ葉裏面に微細な傷をつけ、1-2 mg/ml HWC、0.5 mM サリチル酸、50  $\mu$ M メチルジャスモン酸あるいは  $3 \times 10^6$  c. f. u. /ml の細菌懸濁液を注射筒を用いてタバコ葉の細胞間隙に注入した。傷処理はカーボランダム (600 メッシュ) でタバコ葉表面を擦ることにより行った。切り取り葉の場合には、処理葉および接種葉を加湿したチャンバー内に置き、25  $^{\circ}$ C の恒温室において明条件下で静置した。植物体の葉に直接処理および接種した場合には、25  $^{\circ}$ C の恒温室において明条件下で静置した。処理葉および接種葉は一定時間静置した後、液体窒素により凍結し、タンパク質の抽出および全 RNA の抽出に用いた。

## 4. タバコ葉からのタンパク質試料の調製

エリシター処理タバコ葉はエッペンドルフチューブの蓋を用いてディスク状にくり抜き、液体窒素中で凍結し、タンパク質試料の調製に用いた。タバコ葉ディスク 1



枚に対しタンパク質抽出緩衝液 [ 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM メルカプトエタノール、0.5 M ソルビトール、1 mM アスコルビン酸ナトリウム、0.5 % Triton-X 100、1 mM PMSF、0.2 % Polyclar SB-100 ] 100  $\mu$ l を加えて氷上で摩砕し、16,000 x g、4 °C で15 分間の遠心分離により得られた上清をタバコ葉タンパク質試料としてウエスタン解析に供試した。

#### 5. SDS-PAGE およびウエスタン解析

SDS-PAGE およびウエスタン解析は第二章 II-8 の項に準じて行った。使用した一次抗体と二次抗体およびそれらの使用濃度は、第二章 II-8 の項に記した。

#### 6. タバコ葉からの全 RNA の抽出

タバコ葉からの全 RNA 抽出は SDS-フェノール法により行った (Ausubel et al. 1987)。タバコ葉 1 g を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて摩砕し、抽出用緩衝液 [ 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA (pH 8.0)、100 mM 塩化リチウム、1 % SDS ] 5 ml に懸濁し、1 分間攪拌した。懸濁液に Tris 飽和フェノール 5 ml を加えて1 分間攪拌した後、11,000 x g、室温で 20 分間遠心分離した。得られた上層にクロロホルム/イソアミルアルコール (24/1) 5 ml を加え、1 分間攪拌した後 11,000 x g、4 °C で 20 分間遠心分離した。上層に等量のイソプロパノールを加え、攪拌した後氷上に 1 時間静置し、11,000 x g、4 °C で 30 分間遠心分離した。得られた沈澱を TE [ 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0) ] 1 ml に溶解し、16,000 x g、4 °C で 15 分間遠心分離した。上清に 10 M 塩化リチウム 250  $\mu$ l を加え、氷上で 1 時間静置し、16,000 x g、4 °C で 15 分間遠心分離した。沈澱を TE 1 ml に溶解し、再度 10 M 塩化リチウム 250  $\mu$ l



を加え、氷上で1時間静置し、16,000 x g、4°Cで15分間遠心分離した。沈澱をTE 500  $\mu$ lに溶解し、クロロホルム/イソアミルアルコール (24/1) 166  $\mu$ lを加えて1分間攪拌した後、13,000 x g、4°Cで5分間遠心分離した。上層に1/10量の3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と2倍量のエタノールを加え、-20°Cで20分間静置した後、16,000 x g、4°Cで15分間遠心分離した。沈澱を70%エタノールで洗浄し、減圧乾燥した後、適量のTEで溶解した。得られた全RNAは、ディファレンシャルディスプレイ、ノーゼンハイブリダイゼーション、cDNAライブラリーの作製およびRT-PCRに用いた。

#### 7. ディファレンシャルディスプレイ法

RT-PCRによるディファレンシャルディスプレイ法はYoshidaら(1994)の方法をもとに幾つかの変更を加えて行った。鋳型として水処理あるいはHWC処理後0、12、36時間の各タバコ葉から抽出した全RNAを、プライマーとしてDNAオリゴマー (12) セット (A01 - 12, A21 - 32, A41 - 52, A61 - 72, A81 - 92, B01 - 12, B21 - 32, B41 - 52, B61 - 72, D01 - D12, D21 - 32, D41 - 52, Wako) を用いた。40 ng/ $\mu$ l タバコ葉全RNAと0.8 M プライマーを含むRT-PCR反応液 [1 x 反応緩衝液 (RT-PCR high-Plus- 添付)、2.5 mM Mn (OAc)<sub>2</sub>、300  $\mu$ M dNTPs、0.4 units/ $\mu$ l RNase 阻害剤、1.25 units rTth DNA ポリメラーゼ] 12.5  $\mu$ l 中で、RT-PCRを以下の条件で行った。60°Cで30分間の逆転写反応に続き、94°Cで2分間の変性を行った後、変性を94°Cで1分、アニーリングおよび伸長反応をX°Cで1分30秒という条件で40サイクルのPCRを行い、さらにX°Cで7分間の伸長反応を行った。アニーリングおよび伸長反応時の温度はプライマーの塩基配列に基づき  $X = 4 \times (C+G) + 2 \times (A+T) - 10$  (A, C, G, T; アデニン, シトシ



ン、グアニン、チミン塩基の数)の計算式により求めた。得られた RT-PCR 産物を 2% のアガロースゲル電気泳動により分画し、HWC 処理全 RNA を鋳型に用いた場合に特異的に増幅される RT-PCR 産物を GENE CLEAN II kit (BIO 101 Inc.) を用いてゲル中より抽出した。抽出した DNA 断片は TA クローニング法により pGEM-T Easy プラスミドベクター (Promega) にサブクローニングし、塩基配列の決定およびプローブの作成に用いた。

## 8. RT-PCR

水処理あるいは HWC 処理タバコ葉から抽出した全 RNA を鋳型とし、特異的プライマーを用いた RT-PCR を行った。40 ng/ $\mu$ l タバコ葉全 RNA と 0.8 M プライマーを含む RT-PCR 反応液 [1 x 反応緩衝液 (RT-PCR high-Plus- 添付)、2.5 mM Mn (OAc)<sub>2</sub>, 300  $\mu$ M dNTPs, 0.4 units/ $\mu$ l RNase 阻害剤、1.25 units rTth DNA ポリメラーゼ] 12.5  $\mu$ l 中で、RT-PCR を以下の条件で行った。60 °C で 30 分間の逆転写反応に続き 94 °C で 2 分間の変性を行った後、変性を 94 °C で 1 分、アニーリングおよび伸長反応を Y °C で 1 分 30 秒という条件で 25 サイクル (あるいは 40 サイクル) の PCR を行い、さらに Y °C で 7 分間の伸長反応を行った。本章の RT-PCR で用いたプライマーの塩基配列と、アニーリングおよび伸長反応の温度 Y °C を Table 1 に示した。

## 9. ノーザンハイブリダイゼーション

全 RNA の分画はホルムアルデヒドゲル電気泳動により行った (Ausubel et al. 1987)。アガロース 1.5 g を水 115.8 ml に溶解し、20 x MOPS [0.4 M MOPS、100 mM 酢酸ナ



Table 1 The sequence of primers for RT-PCR. A "F" designates a sense oligonucleotides and a "R" designates an antisense oligonucleotides.

Name	Sequence	Annealing Temperature
D51-Full-F	5'- ATGTATCATCTTCTTTCTCC -3'	] 50 °C ] 48 °C
D51-UTR-R	5'- GAAATTAAACTCAAAC TTT -3'	
D51-F3	5'- TTTTGTTGTTGTGATTCG -3'	
D44-F1	5'- GAGAATACAATTATTCTG -3'	] 46 °C
D44-R1	5'- CAGCTGAGAAGCAATTTG -3'	
D44-Full-F	5'- ATGATGATGGTTGGCAAATT -3'	] 50 °C ] 48 °C
D44-UTR-R	5'- AAGGATCAATCAATTCATC -3'	
D44-UTR-F	5'- TATCAGAACTTCAGATGT -3'	
CHN- $\alpha$ (F)	5'- GGATCCGAACAATGTGGTTCCCAGGC -3'	] 50 °C
CHN- $\beta$ (R)	5'- AAGCTTTTACATAGTATCGACTAAAA -3'	



トリウム、20 mM EDTA] 7.5 ml、ホルムアルデヒド 26.7 ml、アクリジンオレンジ 2.5  $\mu$ l を加え、1 % ホルムアルデヒドゲルを作製した。全 RNA 溶液 20  $\mu$ g (6  $\mu$ l) に 20 x MOPS 0.5  $\mu$ l、ホルムアルデヒド 3.5  $\mu$ l、ホルムアミド 10  $\mu$ l を加え、65 °C で 10 分間変性処理をした後、氷上で 5 分間静置した。この試料に試料緩衝液 [50 % グリセロール、1 mM EDTA、0.25 % BPB、0.25 % キシレンシアノール] 2  $\mu$ l を加え、1 % ホルムアルデヒドゲルにより分画した。分画した RNA は 10 x SSC [1.5 M 塩化ナトリウム、166 mM クエン酸ナトリウム] を用いたキャピラリー法 (Sambrook et al. 1989) により、Hybond-N<sup>+</sup> ナイロン膜に転写した後、80 °C で 30 分間の熱処理により膜に固定した。プローブのラベリング、ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィは、第二章 II-10 の項に準じて行った。塩基性 PR-3 cDNA は、Neale ら (1990) の報告をもとに構築した特異的プライマー CHN- $\alpha$  および CHN- $\beta$  (Table 1) を用いて RT-PCR (第三章 II-8 の項参照) を行うことにより得た。PCR 産物を TA クローニング法により pBluescript II KS+ プラスミドベクター (Stratagene) にサブクローニングし、プローブとして用いた。

## 10. cDNA ライブラリーの作製とスクリーニング

### 1) Poly (A)<sup>+</sup> RNA の精製

Aviv と Lader (1972) の方法に従い、HWC 処理後 12 時間のタバコ葉より抽出した全 RNA から oligo dT セルロース (type 7, Pharmacia) を用いて Poly (A)<sup>+</sup> RNA の精製を行った。全 RNA 5 mg を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁して容量を 5 ml とし、oligo dT セルロース粉末 40 mg を加え 70 °C で 5 分間静置した。懸濁液に 10 M 塩化リチウム 200  $\mu$ l を加え、室温で 2 時間振とうした後、カラム (直径 1 cm、長さ 5.5 cm)



に充填した。カラムを洗浄液 [ 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.4 mM 塩化リチウム ] 1 ml で 20 回洗浄した後、溶出液 [ 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) ] で Poly (A)<sup>+</sup> RNA 画分を溶出し、エタノール沈澱により回収した。

## 2) cDNA ライブラリーの作製

ベクタープライマー法による cDNA ライブラリーの作製は Mori ら (1991) の方法に従った。Poly (A)<sup>+</sup> RNA 5  $\mu$ l を 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁して容量を 8  $\mu$ l とし、ベクタープライマー (pBluescript II SK+, Stratagene) 1  $\mu$ l (0.7  $\mu$ g) を加えて 65 °C で 5 分間静置した後、氷冷した。この反応液に 5 x 1st strand 緩衝液 [ 250 mM Tris-HCl (pH 8.3)、375 mM 塩化カリウム、15 mM 塩化マグネシウム ] 4  $\mu$ l、0.1 M DTT 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTPs 4  $\mu$ l を加えて 42 °C で 5 分間静置した後、200 units/ $\mu$ l RTase (Superscript II) 2  $\mu$ l を加えて 42 °C で 1 時間静置した。次に反応液に 5 x 2nd strand 緩衝液 [ 250 mM Tris-HCl (pH 7.4)、20 mM 塩化マグネシウム、450 mM 塩化カリウム、250  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA ] 20  $\mu$ l、60 units / $\mu$ l RNaseH 0.5  $\mu$ l、3.5 units / $\mu$ l DNA ポリメラーゼ I 5.7  $\mu$ l、2.5 mM dNTPs 12  $\mu$ l、水 41.8  $\mu$ l を順次加え、16 °C で 2 時間処理した。反応液に 4 units / $\mu$ l T4 DNA ポリメラーゼ 0.5  $\mu$ l を加えて 16 °C で 5 分間、60 °C で 10 分間処理した後、氷冷した。この反応液 5  $\mu$ l に Ligation kit Ver. 1 (Takara) の溶液 A 40  $\mu$ l と溶液 B 5  $\mu$ l を加え、16 °C で一晩静置した。ライゲーション反応液を用いて大腸菌 XL10-Gold (Stratagene) を形質転換し、cDNA クローンのスクリーニングに用いた。

## 3) cDNA クローンのスクリーニング

コロニーハイブリダイゼーションは Grunstein と Hogness (1975) の方法に準じて行



った。形質転換した大腸菌 XL10-Gold を 100  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地上で 37°C で一晩培養し、生じたコロニーをニトロセルロース膜 (Advantec) に転写した。この膜のコロニーの転写面を上に向けて、0.1 % SDS 溶液、0.5 M 水酸化ナトリウム/1.5 M 塩化ナトリウム溶液、1.5 M 塩化ナトリウム/0.5 M Tris-HCl (pH 7.4) 溶液、2 x SSPE を含む濾紙上に各 5 分間順次置いた後、UV クロスリンカー (CL-1000, Upland) を用いて核酸を膜に固定した。このニトロセルロース膜を 1 % SDS を含む 6 x SSPE 中で 50°C、15 分間の振とうを 2 回行い、膜上の大腸菌残渣をキムワイプで拭き取った後 2 x SSPE 中で振とうし、膜に付着している大腸菌を除いた。プローブの  $^{32}$ P 標識およびハイブリダイゼーションは第二章 II-10 の項で述べた方法で行った。シグナルの検出は BAS 2000 III (Fuji firm) を用いて行った。

## 11. タバコ葉からのゲノム DNA の抽出

タバコ葉からのゲノム DNA の抽出は CTAB 法により行った (Murray and Thompson 1980)。タバコ葉 2 g を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて摩砕し、2 % CTAB 溶液 [ 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM EDTA (pH 8.0)、1.4 M 塩化ナトリウム、2 % CTAB ] 3 ml と混和し、65°C で 30 分間静置した。懸濁液に等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え、5 分間転倒混和した後、13,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離した。水層に等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え 5 分間転倒混和後、同条件で遠心分離した。回収した水層に 1.5 倍量の 1 % CTAB 溶液 [ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA (pH 8.0)、1 % CTAB ] を加え転倒混和後、室温で 1 時間静置し、8,000 x g、4°C で 10 分間遠心分離した。沈澱を 1 M 塩化セシウム 4 ml で溶解し、エタノール 8 ml を加え、-20°C で 20 分間静置した後、13,000 x g、4°C



で5分間遠心分離した。沈澱を70% エタノールで洗浄した後、TE 490  $\mu$ l で溶解した。溶液に0.5 M EDTA 5  $\mu$ l、1 mg/ml RNase A 5  $\mu$ l を加え、37°C で20分間静置した。処理液に20% ポリエチレングリコール/2.5 M 塩化ナトリウム 300  $\mu$ l を加え、氷上で1時間静置した後、16,000 x g、4°C で5分間遠心分離した。沈澱をTE 1 ml に溶解し、Tris 飽和フェノール 1 ml を加え転倒混和した後、13,000 x g、4°C で10分間遠心分離した。水層に2倍量のエタノール、1/10量の酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、-20°C に10分間静置し、16,000 x g、4°C で15分間遠心分離した。沈澱を70% エタノールで洗浄した後、減圧乾燥し、適量のTEで溶解した。得られたゲノムDNAはインバースPCRおよびサザンハイブリダイゼーションに用いた。

## 12. インバースPCR

インバースPCR法はOchmanら(1988)の方法をもとに行った。用いたプライマーの塩基配列をTable 2に示した。タバコゲノムDNA 1  $\mu$ gを制限酵素 *Apal*、*PvuII*、*Sall*、*SmaI*あるいは*XbaI*で消化し、ライゲーション液 [66 mM Tris-HCl (pH 7.6)、6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM DTT、1 mM ATP、10 units/ml T4 DNA ligase] 1 ml 中で16°C で16時間のライゲーション反応を行い、消化されたDNA断片を環状化した。環状化DNA 100 ngと1  $\mu$ M プライマー (D51-F1/R1あるいはD44-F3/R3)を含むインバースPCR反応液 [1 x LA PCR 緩衝液 II (Takara)、2.5 mM 塩化マグネシウム、250  $\mu$ M dNTPs、1 unit LA Taq Polymerase (Takara)] 20  $\mu$ l 中でPCR反応を以下の条件で行った。95°C で5分間の変性を行った後、変性を95°C で1分間、アニーリングを47°C で2分間、伸長反応を72°C で3分間という条件で30サイクルのPCRを行い、さらに47°C で10分間の伸長反応を行った。PCR産物 2.5  $\mu$ lと1  $\mu$ M プラ



Table 2 The sequence of primers for Inverse PCR. A "F" designates a sense oligonucleotides and a "R" designates an antisense oligonucleotides.

Name	Sequence
D51-F1	5'- CAGTACAACAACATATCCG -3'
D51-R1	5'- ACTAACGGAGAGAAGTTC -3'
D51-F2	5'- TACCATATTCCTAAGGGG -3'
D51-R2	5'- TGATTGACTAGCTTTCGA -3'
D44-F2	5'- GCTTTCGGGAGAGATACC -3'
D44-R2	5'- AGTTTAAGCTCCAGTCCC -3'
D44-F3	5'- TATACCACCATCACTCGG -3'
D44-R3	5'- ACTGTCAAAATTCGAGCC -3'
D87-F1	5'- CCAAGGCGAGAGTAAAGC -3'
D87-R1	5'- GGAAGACGAGATCCTGGG -3'
D87-F2	5'- CCCACTGTCCCAAACGAC -3'
D87-R3	5'- CTCGAGCTAAGATGGATG -3'



イマー (D51-F2/R2 あるいは D44-F2/R2) を含むインバース PCR 反応液 20  $\mu$ l 中でさらに同条件の PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を GENECLAN II kit (BIO 101 Inc.) を用いてゲル中より抽出した。抽出した DNA 断片は TA クローニング法により pGEM-T Easy プラスミドベクター (Promega) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。

### 13. サザンハイブリダイゼーション

タバコ葉のゲノム DNA を *Hind*III、*Eco*RV あるいは *Eco*RI で切断し、0.8 % アガロースゲル電気泳動により分画した。泳動後、ゲルを 0.25 M 塩酸中で 15 分間振とうした後、水中で 5 分間振とうした。分画した DNA は 0.4 N 水酸化ナトリウムを用いたキャピラリー法 (Sambrook et al. 1989) により Hybond-N<sup>+</sup>ナイロン膜に転写した後、80 °C で 30 分間の熱処理により膜に固定した。プローブの <sup>32</sup>P 標識、ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィーは第二章 II-10 の項で述べた方法で行った。

### 14. 塩基配列の決定とデータベース解析

塩基配列の決定は、ABI PRISM Dye Deoxy Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit あるいは ABI PRISM BigDye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いたサイクルシーケンシングにより行った。反応物の変性ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動、塩基配列の読み取りおよびデータの解析は、ABI373S DNA シーケンサーと DNA シーケンス自動解析装置 (Applied Biosystems) を用いて行った。塩基配列の結合や塩基配列のアミノ酸配列への変換な



どの解析には DNASIS (Hitachi) を用いた。得られたクローンの塩基配列および予想されるアミノ酸配列を用いた既知遺伝子との相同性検索には National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST プログラム (Altschul et al. 1990) を用いた。アミノ酸配列の整列および Neighbor-Joining 法 (Saitou and Nei 1987) による系統樹の作製には CLUSTALw プログラム (Thompson et al. 1994) を用いた。

### III. 結果

#### 1. HWC 処理タバコ葉における誘導抵抗反応の観察

本実験で用いたタバコ植物の HWC に対する反応性について検討を行った。播種後約 8 週間のタバコ葉の細胞間隙に 2 mg/ml の HWC を注入処理したところ、処理後 2 日に過敏感細胞死が観察された (Fig. 16 A)。また、HWC 処理タバコ葉における PR タンパク質の蓄積をウエスタン解析により経時的に調べたところ、PR-N は HWC 処理 30 時間後から、PR-P と PR-S は処理 18 時間後から蓄積が認められた。一方、水処理区ではこれら PR タンパク質の蓄積は全く認められなかった (Fig. 16 B)。これらの結果より、タバコと HWC の系がタバコ植物の病害ストレス抵抗性遺伝子を単離するためのモデル系に成り得ると判断した。

#### 2. ディファレンシャルディスプレイ法によるエリシター誘導性遺伝子のスクリーニング

HWC 処理後 0、12、36 時間のタバコ葉から抽出した全 RNA を鋳型にして、ディファレンシャルディスプレイ法 (Yoshida et al. 1994) によるエリシター誘導性遺伝子



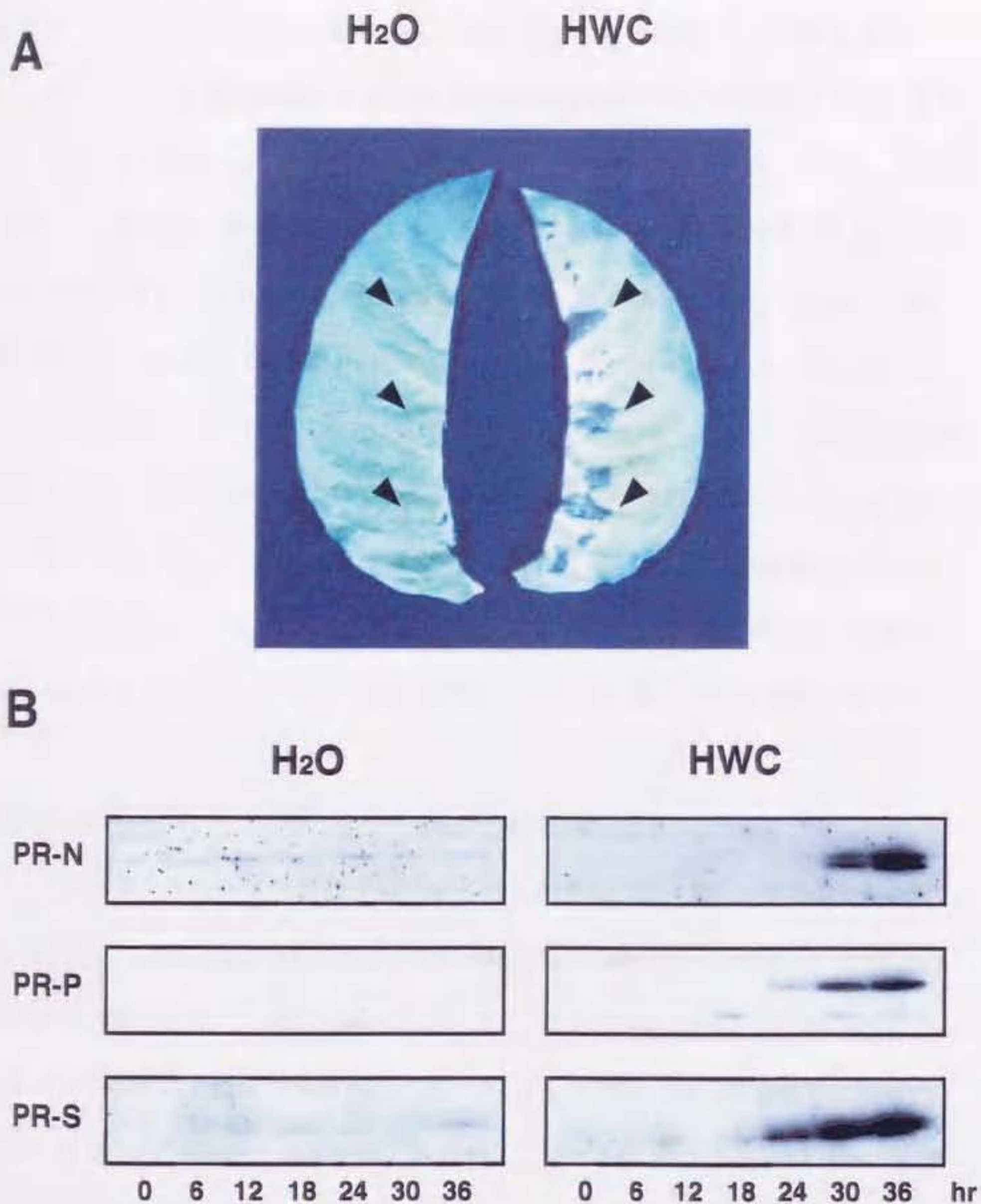


Fig. 16 A) Typical responses of tobacco leaf treated with HWC. Detached tobacco leaf was treated with water (left) or 2 mg/ml HWC (right). Arrowheads indicate treated areas. Photograph was taken 2 days after treatment. B) Accumulation of PR-N (top), PR-P (middle), and PR-S (bottom) in tobacco leaves caused by HWC treatment. Tobacco leaves were treated with water (left) or 2 mg/ml HWC (right) and protein samples were prepared from injected area at indicated times. Each 10  $\mu$ g of sample was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted using antiserum against tobacco PR-N, P or S. The detection was carried out using HRP-linked anti-rabbit Ig and ECL detection kit.



のスクリーニングを行った。12塩基のランダムプライマーを用いて RT-PCR を行い、2% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の比較を行った。Figure 17 で示したように、1種のプライマーにつき約 6-30 程度の遺伝子断片が検出され、ほとんどの断片がすべての処理区で共通して存在した。しかし、HWC 処理タバコ葉から抽出した RNA を鋳型に用いた場合にのみ検出されるバンドも認められた (Fig. 17, A83, D44, D51)。No. A01-12, A21-32, A41-52, A61-72, A81-92, B01-12, B21-32, B41-52, B61-72, D01-D12, D21-32, D41-52 の計 132 種のプライマーについて RT-PCR 産物の比較を行い、HWC 処理区において増幅の程度に変化が認められた 16 種の遺伝子断片を得た (Table 3)。これら遺伝子断片をサブクローニングし、塩基配列の決定および相同性検索を行ったところ、5 種はトランスポゾンと相同性を示した。抵抗性に関与する遺伝子を単離するという目的に照らし、他の 11 種について検討を進めた。

### 3. HWC 処理タバコにおけるエリクター誘導性遺伝子の発現

ディファレンシャルディスプレイ法により得られた 11 種の遺伝子断片について、HWC 処理タバコ葉における発現をノーザン解析により調べた。その結果、9 種については発現が検出されず、遺伝子断片 D51-12 と A87-12-3 をプローブに用いた場合にのみ HWC 処理による発現誘導が認められた (Fig. 18 A)。D51-12 遺伝子は HWC 処理後 6-12 時間で一過的な発現が認められた。一方、A87-12-3 遺伝子は HWC 処理後 1 時間で発現が誘導され、時間の経過に伴い発現量が徐々に低下した。さらにノーザン解析で発現が検出できなかった遺伝子断片の塩基配列をもとに特異的プライマーを構築し、RT-PCR により発現誘導を調べたところ、25 サイクルの RT-PCR において、D44-12 遺伝子の HWC 処理後 12-24 時間での一過的な発現が認められた (Fig.



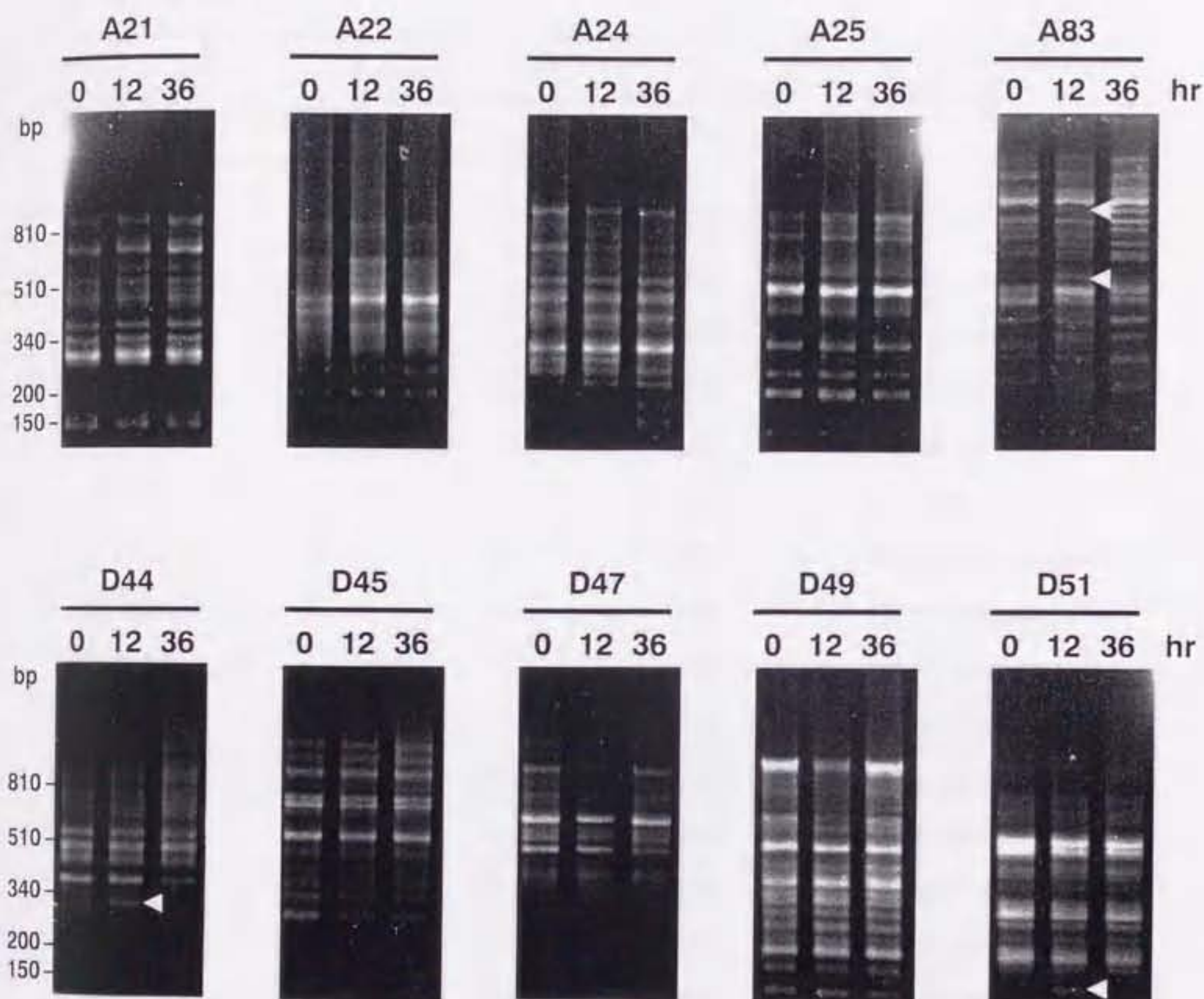


Fig. 17 Representative results of differential display. Total RNAs for template were prepared from tobacco leaves treated with HWC for 0, 12 or 36 hr. RT-PCR was performed as described in Materials and Methods using indicated primer and the products were electrophoresed on 2% agarose gel. RT-PCR products isolated as elicitor-inducible gene were showed by arrowheads.



Table 3 Summary of elicitor-inducible RT-PCR products identified by differential display.

Fragment Name	Response			Fragment Size (bp)	Homology
	0 hr	12 hr	36 hr		
A81-12	-	+	+	530	unknown
A83-12-1	-	+	++	800	transposon
A83-12-2	-	+	+	400	transposon
A83-12-3	-	+	+	300	transposon
A87-12-3	-	+	+	180	unknown
A87-36	-	-	+	170	unknown
B08-12-2	-	+	+	300	cytochrome <i>c</i> oxidase
B43-0	+	-	-	180	glutamate receptor
D44-12	-	++	+	300	LRR receptor
B61-12-1	-	+	-	1000	kinesin light chain
B61-12-2-2	-	++	++	300	chloride channel
B61-12-4	-	++	++	300	unknown
B61-12-5	-	++	++	300	transposon
D51-12	-	+	+	150	cytochrome P450
B61-12-7	-	++	++	300	heat shock protein
A83-12B	-	+	-	180	transposon



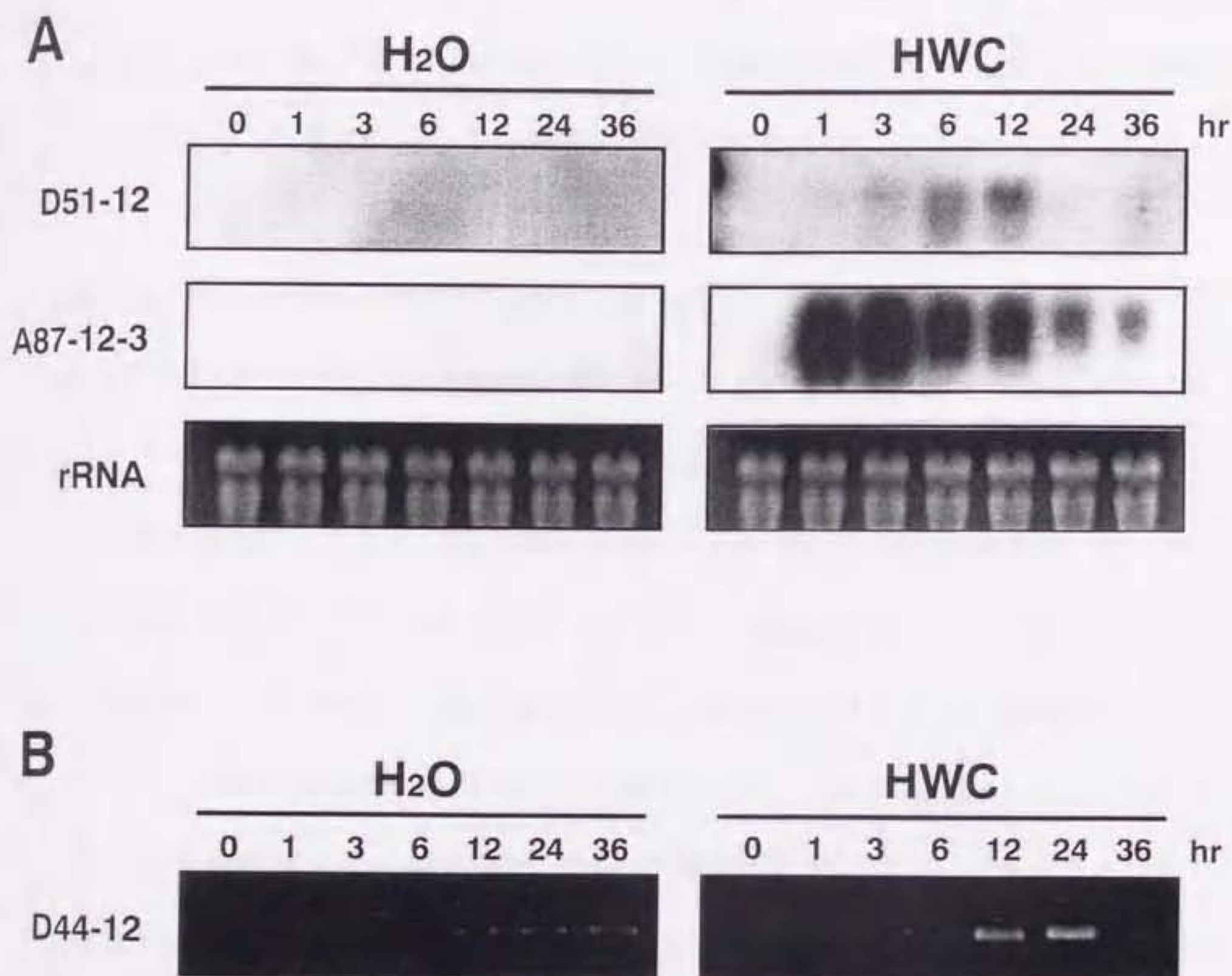


Fig. 18 Expression of elicitor-inducible genes in tobacco leaf treated with HWC. A) Northern blot analyses of mRNAs for D51-12 and A87-12-3 genes. Whole areas of tobacco leaves treated with water (H<sub>2</sub>O) or 1 mg/ml HWC were harvested at indicated times and total RNAs were extracted. Twenty  $\mu$ g of total RNAs were fractionated on a 1 % agarose gel containing formaldehyde and then transferred to a nylon membrane. The membrane was allowed to hybridize with D51-12 or A87-12-3 fragments. B) RT-PCR analysis of mRNAs for D44-12 gene. Total RNAs was prepared as described in A, and RT-PCR analysis of D44-12 gene expression was performed with specific primers derived from D44-12 fragment (D44-F1 and D44-R1).



18 B)。さらに RT-PCR のサイクル数を 40 にした場合、水処理および HWC 処理のすべての区で D44-12 遺伝子の発現が認められた (結果未掲載)。この結果より、D44-12 遺伝子は恒常的に微量に発現していることが示された。

#### 4. D44-12 と D51-12 遺伝子の全長 cDNA の単離

D51-12、A87-12-3、D44-12 の各断片をプローブとして、cDNA プラスミドライブラリーのスクリーニングを行い、各遺伝子の全長 cDNA の単離を試みた。各クローンにつき約 144,000 コロニー (約 3,000 コロニー x 48 プレート) をスクリーニングした結果、D51-12 遺伝子の部分長である D51-12-9A のみを得ることができた。そこで、D51-12-9A、A87-12-3、D44-12 の各塩基配列をもとに特異的プライマーを構築し (Table 2)、インバース PCR 法により全長 ORF の単離を試みた。その結果、D51-12-9A、D44-12 の全長 ORF を単離することができた。D44-12 遺伝子については、cDNA ライブラリーを鋳型としてライブラリーベクタープライマー (T7 primer) と D44-12 特異的プライマー (D44-F2) を用いた PCR を行い、cDNA の 3' 末端を決定した。さらに、両遺伝子の予想される 3' 末端および 5' 末端でプライマーを作製し、RT-PCR によりそれぞれの全長 cDNA を単離し、全塩基配列を決定した。一方、A87-12-3 遺伝子については、インバース PCR 法、RACE 法などにより遺伝子断片近傍の塩基配列の決定を試みたが、ゲノム断片および cDNA 断片の単離には至らなかった。

#### 5. D51-12 遺伝子の塩基配列の解析

D51-12 遺伝子の全塩基配列、予想されるアミノ酸配列および用いたプライマーの位置を Fig. 19 A に示す。本遺伝子は 1557 塩基対から成り、519 アミノ酸をコードし



D51-Full F  
 -6 tgaaaaATGATCATCTCTCTTCTCCATAGAAGCCATTGTAGGACITGTAACTTTGCCATTCTACTCTACTTGTCTATG 74  
 1 M Y H L L S P I E A I V G L V T F A F L L Y L L W 25  
 Signal-Anchor Sequence  
 75 GACAAAAAACAATCAAAAATCTTAAACCCACTGCTCCAAAAATCCAGGTGGATGGCCAGTAATCGGCCATCTCTTTT 154  
 26 T K K Q S K I L N P L P P K I P G G W P V I G H L F 51  
 Proline-rich Region  
 155 ATTCAACAACAATGGCGATGATGACCGCCATTTTCTCAAAAACTGGGAGACTTAGCTGACAAATATGGTCCCGTCTTC 234  
 52 Y F N N N G D D D R H F S Q K L G D L A D K Y G P V F 78  
 235 ACATCCCGTTAGGGTTTCGCGTTTCTTGGCGGTGAGTAGTTATGAAGCTATGAAAGAATGCTTCTCTACCAATGATAT 314  
 79 T F R L G F R R F L A V S S Y E A M K E C F S T N D I 105  
 315 CCATTTGCGGATCGGCCAGCTTTACTTTACGGAGAATACCTTTGCTATAACAATGCCATGCTTGCTGTTGCCAAATATG 394  
 106 H F A D R P A L L Y G E Y L C Y N N A M L A V A K Y 131  
 D51-R2 D51-R1  
 395 GCCCTTACTGGAATAAATCGAAGCTAGTCAATCAAGAACCTCTCTCGGTAGTGGCTCGAAAAATTCAAACATGTT 474  
 132 G P Y W K K N R K L V N Q E L L S V S R L E K F K H V 158  
 475 AGATTTTCTATAGTTCAGAAAAATATTAAACAATTGTATAATTGTGATTACCAATGGTGAAGATAAACCTTAGTGATTG 554  
 159 R F S I V Q K N I K Q L Y N C D S P M V K I N L S D W 185  
 555 GATAGATAAATTGACATTCGACATCATTTGAAAAATGGTTGTTGGGAAGACCTATAATAATGGACATGGAGAAATACTCA 634  
 186 I D K L T F D I I L K M V V G K T Y N N G H G E I L 211  
 635 AAGCAGCTTTTTCAGAAAGTTCATGGTTCAAGCTATGGAGATTGAGCTCTATGATGTTTTTACATTCATTTTTCAAGTGG 714  
 212 K A A F Q K F M V Q A M E I E L Y D V F H I P F P K W 238  
 715 TTGGATCTTACAGGAATATTAAGGCTATGAAACAACTTTCAAAGACATTGATAATATTATCCAAGGTTGGTTAGATGA 794  
 239 L D L T G N I K A M K Q T F K D I D N I I Q G W L D E 265  
 795 GCACATTAAAGAGAGAGAAACAAAGGATGTTGGAGGTGAAATGAACAAGATTATTGATGTGCTGCTTTCCAAGAGGA 874  
 266 H I K K R E T K D V G G E N E Q D F I D V L L S K R 291  
 875 GCAACGAACATCTGGCGATGGTTACTCTCATGACACCACCATCAAAGCAACAGTATTCACTTTGGTCTTGATGCAACA 954  
 292 S N E H L G D G Y S H D T T I K A T V F T L V L D A T 318  
 955 GACACACTTGCACCTTCATATAAAGTGGTAAATGGCGTTAATGATAAACAATAAGAATGTCATGAAGAAAGCACAAGAAGA 1034  
 319 D T L A L H I K W V M A L M I N N K N V M K K A Q E E 345  
 1035 GATGGACACCATTTGTTGGTAGAGATAGATGGGTAGAAGAGAATGATATCAAGAATTTGGTGTATCTTCAAGCAATTGTTA 1114  
 346 M D T I V G R D R W V E E N D I K N L V Y L Q A I V 371  
 D51-F1  
 1115 AAGAAGTATTACGATTACATCCACCTGACCTTTGTGCTACACACCTATCGTAAAAGATTGTGTGTCAATGGATAC 1194  
 372 K E V L R L H P P A P L S V Q H L S V K D C V V N G Y 398  
 D51-F2  
 1195 CATATTCTTAAGGGGACTGCACTACTTACAAATATTATGAAACTTCAACGAGACCCACAATATGGGTAGATCCTGATAC 1274  
 399 H I P K G T A L L T N I M K L Q R D P Q I W V D P D T 425  
 1275 ATTCGATCCAGAAAGATTCTTGACGACTAATGCTGCAATTGACTATCGCGGGCAGCACTATGAGTTGATCCCGTTGGAT 1354  
 426 F D P E R F L T T N A A I D Y R G Q H Y E L I P F G 451  
 1355 CAGGGAGACGAGCTTGTCCCGGATGAATTACTCATTCGAAGTGAACACCTTTCAATTGCTCATTTGATCCAGGGTTTC 1434  
 452 S G R R A C P A M N Y S L Q V E H L S I A H L I Q G F 478  
 Heme Binding Region  
 1435 AATTTTGCAACTACGACTACGAGCCCTTTGGATATGAAACAAGGCGTGGGTCTAAGTTTACCTAAGAACAGATGTTGA 1514  
 479 N F A T T T N E P L D M K Q G V G L T L P K K T D V E 505  
 D51-F3  
 1515 AGTGCTAATTACACCTCGCCTTCTCTACGCTTTATCAATATtaatatgtttgtttgttgattcgttattattgtc 1594  
 506 V L I T P R L P P T L Y Q Y 519  
 1595 ccttaagtgttttaaaaaaaagatgttttattttgtttaagattgttttagagatggttattcatctactttaatttacta 1674  
 D51-UTR-R  
 1675 ataagtgtattgtaatacataaataataaagtttgagtttaatttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1754

Fig. 19 A) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the cDNA for CYP82E1 (D51-12). The nucleotide at position 1 is the first A of the initiation codon for CYP82E1. The nucleotide sequences of the open reading frame are shown in capital letters and those of the untranslated region are shown in lower case. The arrowhead indicates the 5' end of cDNA clone D51-12-9A. The position of D51-12 fragment is underlined and mismatches at the amplification site of D51 primer (5'-CCTGTTTTTTCAC-3') are indicated by asterisks. Primers for PCR methods are shown by arrows. A putative polyadenylation signal is boxed. Conserved domains found in many cytochrome P450 families are shown by shaded boxes.



CYP82E1 1:..MYHLLSPIEAIVELVTFAPLLYLLWTK....KOSKILNPLPPKIPGGNPVIGH  
 CYP82A1 1:..MDFVLNYLNTTTIAFISLISLIFFLFR....FSKVSHTK.EPPIISCSWPLLGS  
 CYP82A4 1:..MELVLFHFLNTTTIGVSLIFLLCLFLYG..PLKVVHGSSKEAPTVGSAWPIFGH  
 CYP82B1 1:MEKPIILQLQAGILELLALICFLVYVIKVSLSLRNCNQLVKHPEEAAGSNPIVGH  
  
 CYP82E1 50:LFYFNNNGDDDRHFSQKLGDLADKYGPVETFRLGFRRLAVSSYEAMKECFSTND  
 CYP82A1 50:IPLMRNT...QTPHKTGLALVDKYGPITTIKLGATNALVLSNWEAKECFSTND  
 CYP82A4 53:LPPLIGS...KSPHKALGALAEKHGPLETIKLGAKKALVVSOWEMARECFSTND  
 CYP82B1 56:LPQLVGS...KPLFRVLGDMADKFGPIFMVRFQVYPTLVVSTWEAKECFSTND  
  
 CYP82E1 105:HFADRPALLYGEYL CYNNAMLA VAKVGPYWKKNRKL VNQELLSVSRLEKFKHVR  
 CYP82A1 101:LVVSSRPKPVAVEELMSYNQAFIGWAPYGEYWRQLRKIVTLEILSNRRLELLSHIR  
 CYP82A4 104:VAVSARPKLLVAELM CYNNAMLLVAPYGPYWRRLRKIVTLEILSSSRVEQLQDVR  
 CYP82B1 108:KFLASRPSSAASSYMTVDHAMFGFSFYGPYWRIRKISTLHLLSHRRLELLKHVP  
  
 CYP82E1 160:PSIVQKNIKQLYNCDSPMVV.....INLS.DVIDKE  
 CYP82A1 156:VSEVOTSIKELVNVSNOISSQYGLLDDTKSSSTNDPSTTDYVVPKWKFAQL  
 CYP82A4 159:VSEVONSIVELYDVWRSQKN.....E.....SDYASVELKQWFAQP  
 CYP82B1 163:HTETHNFIKSLFGIWKDHQKQQ.....OPTGRE..DRDSVMLEMSQLFGYL  
  
 CYP82E1 190:RFDIILKVVVGKTYNNGHGEILK.....AAFOKFMVQAEIELYDVF..HI  
 CYP82A1 211:RDNMVLKVVVGKRCFGDVDVENK.....EEAKRLENIRDFMRLIGTFTVGDGV  
 CYP82A4 195:RDNMVLKVVVGKRELSATATD.....EKAECVAVDEFMRLAGVFTVGDAN  
 CYP82B1 207:RLNVVLSLVVGKRVCLYHADGHLDDGEEAGQGQKLHQTITDFPKLSGVSVASDAL  
  
 CYP82E1 234:PFKWLDTLSNIRAMKQDFKIDINIHQGLDDEHIKRETKD.....VGEENE  
 CYP82A1 260:PFKWLDTLSGHEKEMKKCAKKFDVMLNEWLESHREKKGGLGSE.....DKVVPK  
 CYP82A4 242:PVLRWLDGGEYKAMKETAKELDMISEWLESHRQKRALG.....EGVDGA  
 CYP82B1 262:PALGLFDLGSCKESMKRVAKEMDFFAERMLQDKKLSLSLSSETNNKONDAGEGDG  
  
 CYP82E1 281:QDFIDVLLSKRSNEHLG..DGYSHDTTIKATVFTLVLDATDTLALHKKVMAEMI  
 CYP82A1 308:RDFMORMLLVLKDKP...IEGFDVDTTIKAHIELILGG..SDTAGTLTWAMCLLL  
 CYP82A4 288:QDFMNVMLSSLDGKT...IDGIDADTLIKSTVLTIIQAGTEASISTTIWAMCLIL  
 CYP82B1 317:DDFMVULMSILPDDDDSLFTKYSRDTVIKATSLSMVARSDDTSVSLTWALSLLL  
  
 CYP82E1 334:NNKNVMKKAQEEADTIUGRDRHVEENDIKNLVYLOAIVKEVRLRHPPAPLSVQHL  
 CYP82A1 359:KHPHVLEKLEKEELNTYIGKRCVNESDINKLVYLHAIKETRLRLYPPAPFSSPRE  
 CYP82A4 340:KNPLILEN.KAELDIQVGKRCICSDISNLVYLOAIVKETRLRLYAPGGLSSPRE  
 CYP82B1 372:NNIQVLRKAQDELDTKUGRDRHVEEKDIDNLVYLOAIVKETRLMYAPGGLSVPHK  
  
 CYP82E1 389:SVKDCVVNGYHIPKGTALLTNIKLORDPQIWDPDTEFPERFLTNA...IDY  
 CYP82A1 414:FTEDCTIGCYHIKKGTRLMNENWKIHRDPSVMPDPLEFKPESFLSTHKD...VDV  
 CYP82A4 394:FAEDCTLGCVHVKKGTRLTITNIWKIHTOPNVWSOPFEFKPDRFLTTHKD...IDV  
 CYP82B1 427:ATEDCNVGCYHIKTGTRLLVNIWKLORDPRVWSNPESEFRPERFLDNQSGTLEDF  
  
 CYP82E1 441:RGQHYELIPFGSGRRACPA MNYSLQVEHLSIAHLIDGENFATTNEPLDMKQGVG  
 CYP82A1 466:RGQNFELLPFGSGRRMCAGMSLGLHMYILANFLHSFEILNPSPESTIDVTEVLE  
 CYP82A4 446:KCHHFOLELPFGSGRRVCPGISFGLQTVHLALASFLHSFEILNPSTEPLDMTEAFG  
 CYP82B1 482:RGQHF EYIPFGSGRRMCPGVNFATLILEMTLRLQALDLSPPSSSPVDMTEGSG  
  
 CYP82E1 496:LTLPKKTQVEVLITPRLPPTLYQV.  
 CYP82A1 521:FVTTKATPLEVLVKPCLSPCKESM  
 CYP82A4 501:VNTKATPLEVLVKPCLSPCKESM  
 CYP82B1 537:LTMPKVTPLKVLITPRLPLELYDV.

Fig. 19 B) Alignment of deduced amino acid sequence of CYP82E1 with those of other cytochrome P450s. CYP82A1 (Frank et al. 1996), CYP82A4 (Schopfer and Ebel 1998) and CYP82B1 (Pauli and Kutchan 1998) are wounding inducible pea cytochrome P450, fungal elicitor inducible soybean cytochrome P450, and MeJA inducible poppy cytochrome P450, respectively. The amino acids identical to CYP82E1 are indicated as white letter on a black background, and putative heme binding domains are underlined. The sequences were aligned using the CLUSTALw program (Thompson et al. 1994).



ていた。予想される分子量は 59,748 Da であり、等電点は 8.28 であった。D51-12 断片の塩基配列と一致する塩基配列は、予想される ORF の 684-841 番目に見い出されたが (Fig. 19 A, underline)、D51 プライマーがアニーリングした両末端の塩基配列のみが異なった (Fig. 19 A, asterisks)。D51-12 遺伝子の相同性検索をしたところ、ダイズの菌体エリシター (*P. sojae* 由来) 誘導性シトクロム P450 (CYP82A4) と最も高い 41 % の相同性を示した (Schopfer and Ebel 1998) (Fig. 19 B)。その他、エンドウの傷ストレス誘導性シトクロム P450 (CYP82A1) や ケシのメチルジャスモン酸誘導性シトクロム P450 (CYP82B1) とともに 40 % 近い相同性を示した (Frank et al. 1996, Pauli and Kutchan 1998)。シトクロム P450 は、相同性が 40 % 以上の遺伝子群を同一のファミリー、55 % 以上の遺伝子群を同一のサブファミリーとして分類される (Nebert et al. 1991, Nelson and Strobel 1987)。D51-12 遺伝子は CYP82 ファミリーに属し、新しいサブファミリーの遺伝子であるので、Nelson の命名法に従い CYP82E1 と名付けた。CYP82E1 の予想される遺伝子産物には、疎水性に富む N 末端側の膜結合領域 (1-25 アミノ酸) (Sakaguchi et al. 1984)、正しいシトクロム P450 の立体構造をとるために必要とされるプロリンに富む領域 (35-41 アミノ酸) (Yamazaki et al. 1993) およびヘム鉄結合領域 ([FW]-[SGNH]-X-[GD]-X-[RHPT]-X-C-[LIVMFAP]-[GAD], 450-459 アミノ酸) (Kalb and Loper 1998) といったシトクロム P450 に特徴的な領域が含まれた (Fig. 19 A, shaded boxes)。

#### 6. ゲノミックサザン解析による CYP82E1 遺伝子相同配列の検出

タバコのゲノム DNA を制限酵素 *Hind*III, *Eco*RV あるいは *Eco*RI で切断し、CYP82E1 の cDNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、各



レーンあたり強くハイブリダイズする45本のバンドと弱くハイブリダイズするその他のバンドを検出した (Fig. 20 A)。この結果より、タバコには CYP82E1 と相同性の高い多数のシトクロム P450 が存在することが示された。従って、CYP82E1 の cDNA をプローブとして用いた場合、複数のシトクロム P450 遺伝子を検出する可能性が考えられたので、以降の実験では CYP82E1 の cDNA をプローブとしたノーザン解析に加えて CYP82E1 遺伝子の 3' 非翻訳領域の塩基配列をもとに構築したプライマー (D51-F3, D51-UTR-R) (Fig. 19 A) を用いた RT-PCR により発現量の変化の確認を行った。

#### 7. CYP82E1 遺伝子の各種エリシター処理および非病原細菌接種による発現誘導

HWC エリシター処理タバコ葉における CYP82E1 遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーションにより調べた。その結果、D51-12 断片をプローブとして用いた場合 (Fig. 18 A) と同様に、CYP82E1 遺伝子の発現は HWC 処理後 6 時間で検出され 12 時間まで増加し、24 時間にはほとんど認められなかった。一方、水処理区では CYP82E1 の発現は全く検出されなかった (Fig. 20 B)。

次に、傷処理、サリチル酸処理、メチルジャスモン酸処理、タバコに非病原菌であるダイズ斑点細菌病菌 (*P. syringae* pv. *glycinea*) 接種によるタバコ葉での CYP82E1 遺伝子の発現を調べた。その結果、傷処理、0.5 mM サリチル酸処理、50  $\mu$ M メチルジャスモン酸処理ではいずれの場合も CYP82E1 遺伝子の発現は全く認められなかった。一方、 $3 \times 10^6$  c.f.u./ml の非病原細菌接種時には、接種 6 時間後に一過的な発現が認められた (Fig. 21)。さらに、病傷害ストレスによる発現の誘導が知られている PAL (Akada-Fukasawa et al. 1996, Joos and Hahlbrock 1992)、PR-1a (Matsuoka et al. 1987) お



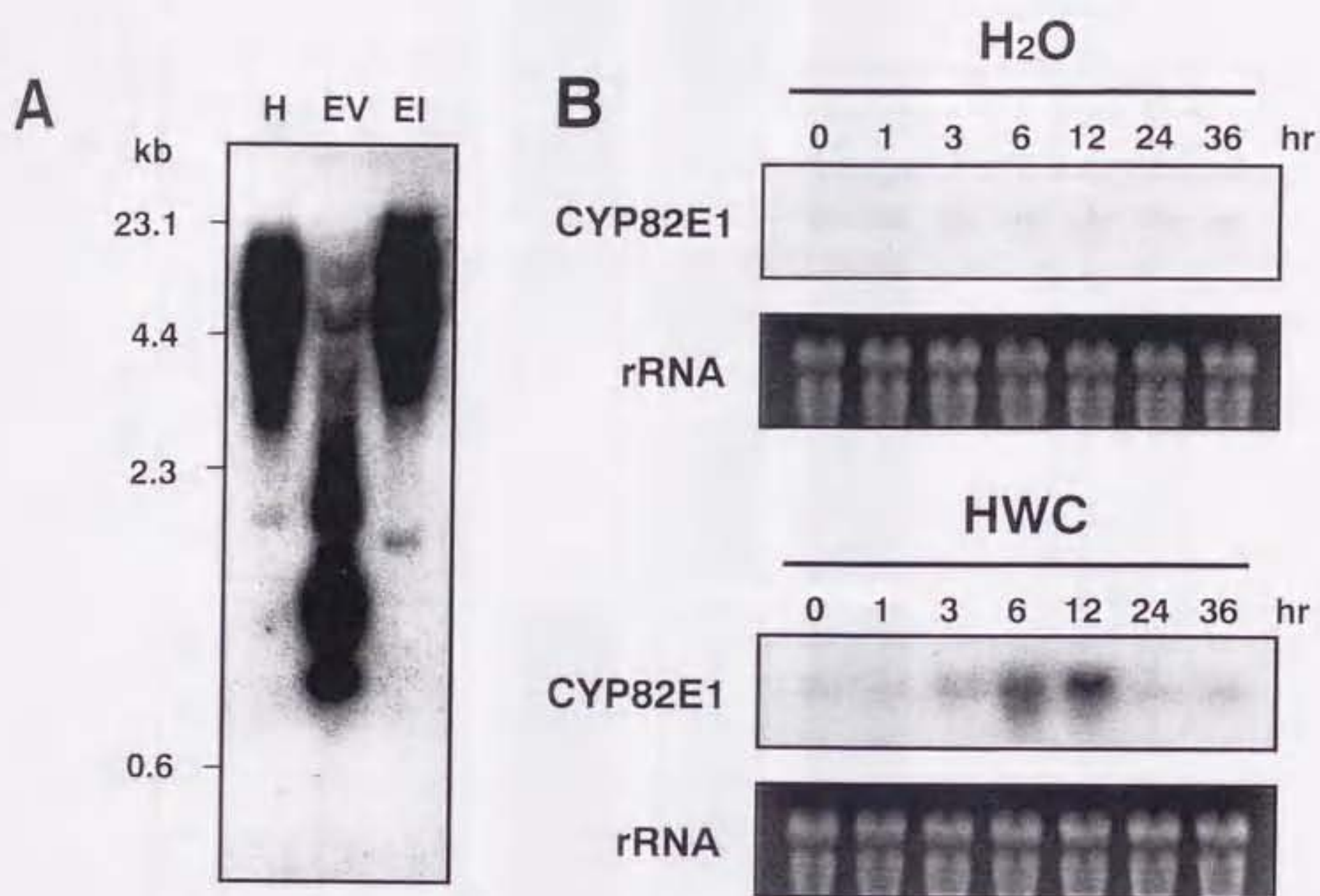


Fig. 20 A) Southern blot analysis of CYP82E1 gene in tobacco. Ten  $\mu$ g of total DNAs prepared from tobacco leaf were digested with *Hind*III (H), *Eco*RV(EV) or *Eco*RI (EI), fractionated on a 0.8 % agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The membrane was allowed to hybridize with cDNA for CYP82E1. B) Northern blot analysis of mRNAs for CYP82E1 in tobacco leaf treated with HWC. Whole areas of tobacco leaves treated with water (H<sub>2</sub>O) or 1 mg/ml HWC were harvested at indicated times and total RNAs were extracted. Twenty  $\mu$ g of total RNAs were fractionated on a 1% agarose gel containing formaldehyde and then transferred to a nylon membrane. The membrane was allowed to hybridize with cDNA for CYP82E1.



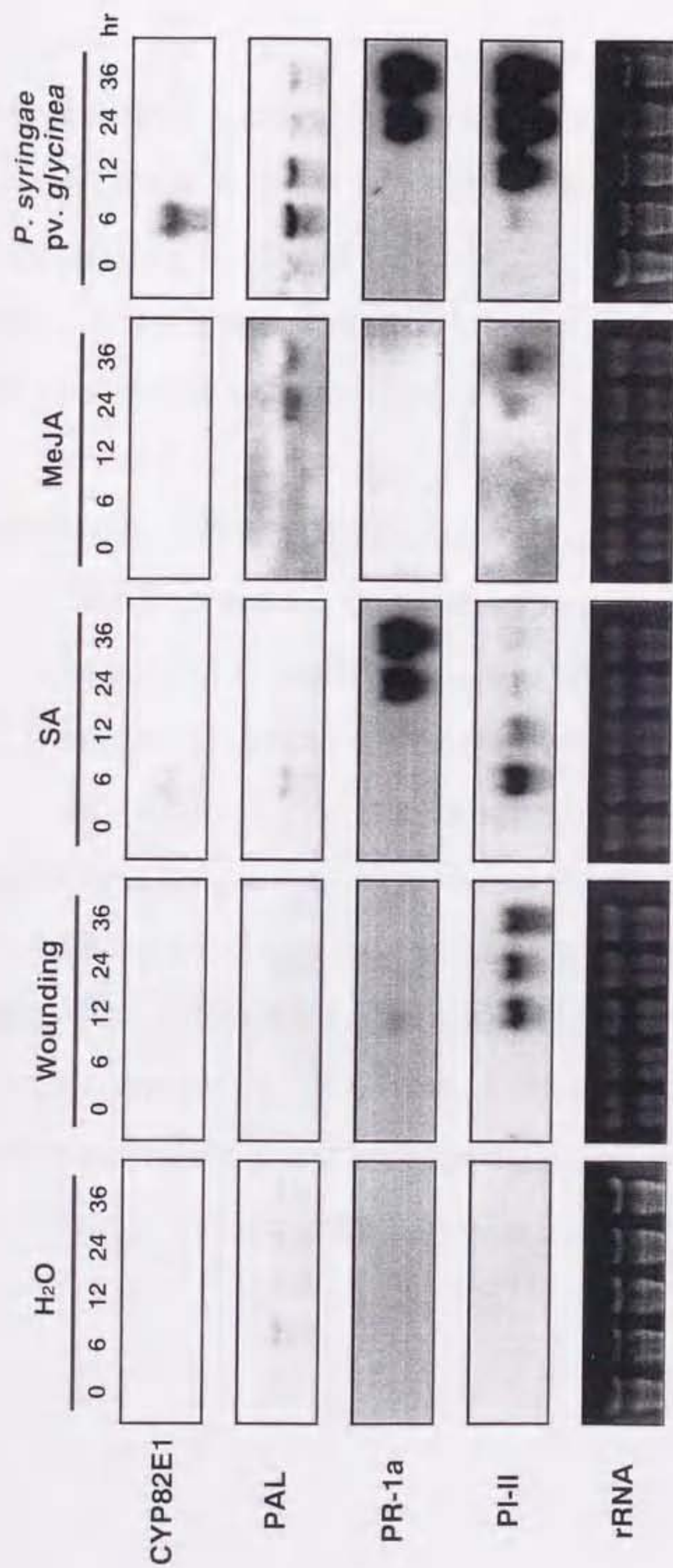


Fig. 21 Comparison of expression patterns of *CYP82E1* with those of several defense genes. Whole areas of tobacco leaves were injected with water (H<sub>2</sub>O), 0.5 mM salicylic acid (SA), 50  $\mu$ M methyl jasmonate (MeJA), or *P. syringae* *pv. glycinea* (3  $\times$  10<sup>6</sup> c.f.u./ ml) or wounded with carborundum (Wounding). They were harvested at indicated times and total RNAs were extracted. Twenty  $\mu$ g of total RNAs were fractionated on a 1 % agarose gel containing formaldehyde and then transferred to a nylon membrane. The membrane was allowed to hybridize with cDNAs for *CYP82E1*, potato *PAL* (*PAL*), and 3'-untranslated regions of *PR-1a* (*PR-1a*) and *PI-II* (*PI-II*).



よびプロテイナーゼインヒビター II (PI-II) (Balandin et al. 1995) 各遺伝子の発現を調べ、CYP82E1 遺伝子の発現との比較を行った。その結果、PAL 遺伝子の場合、メチルジャスモン酸処理では処理後 24-36 時間、非病原細菌接種では接種後 6-12 時間に一過的な発現を示した。PR-1a 遺伝子については、サリチル酸処理あるいは非病原細菌接種により 24-36 時間後に発現が認められた。PI-II 遺伝子については水処理以外のすべての処理区で発現が認められた (Fig. 21)。

#### 8. 非病原細菌および病原細菌接種による CYP82E1 遺伝子の発現誘導

タバコに非病原性であるダイズ斑点細菌病菌 (*P. syringae* pv. *glycinea*) およびタバコに病原性を示すタバコ野火病菌 (*P. syringae* pv. *tabaci*) をタバコ葉に接種し、タバコ葉の病徴発現および CYP82E1 遺伝子の発現を調べた。3 x 10<sup>6</sup> c.f.u./ml の濃度の両菌をタバコ葉に接種したところ、接種 1-2 日後にタバコ野火病菌を接種した部位で葉の微弱な黄化が認められ始め、4 日後には水浸状の病斑が認められた。一方、ダイズ斑点細菌病菌接種葉では、ほとんど変化は認められなかった (Fig. 22 A)。次に両接種葉における CYP82E1 遺伝子の発現を調べたところ、ダイズ斑点細菌病菌接種葉では接種後 12 時間をピークとする一過的な発現誘導が認められた。一方、タバコ野火病菌接種葉では接種後 24 時間で発現誘導は認められたが、ダイズ斑点細菌病菌接種葉での発現に比べると非常に微量であった (Fig. 22 B)。



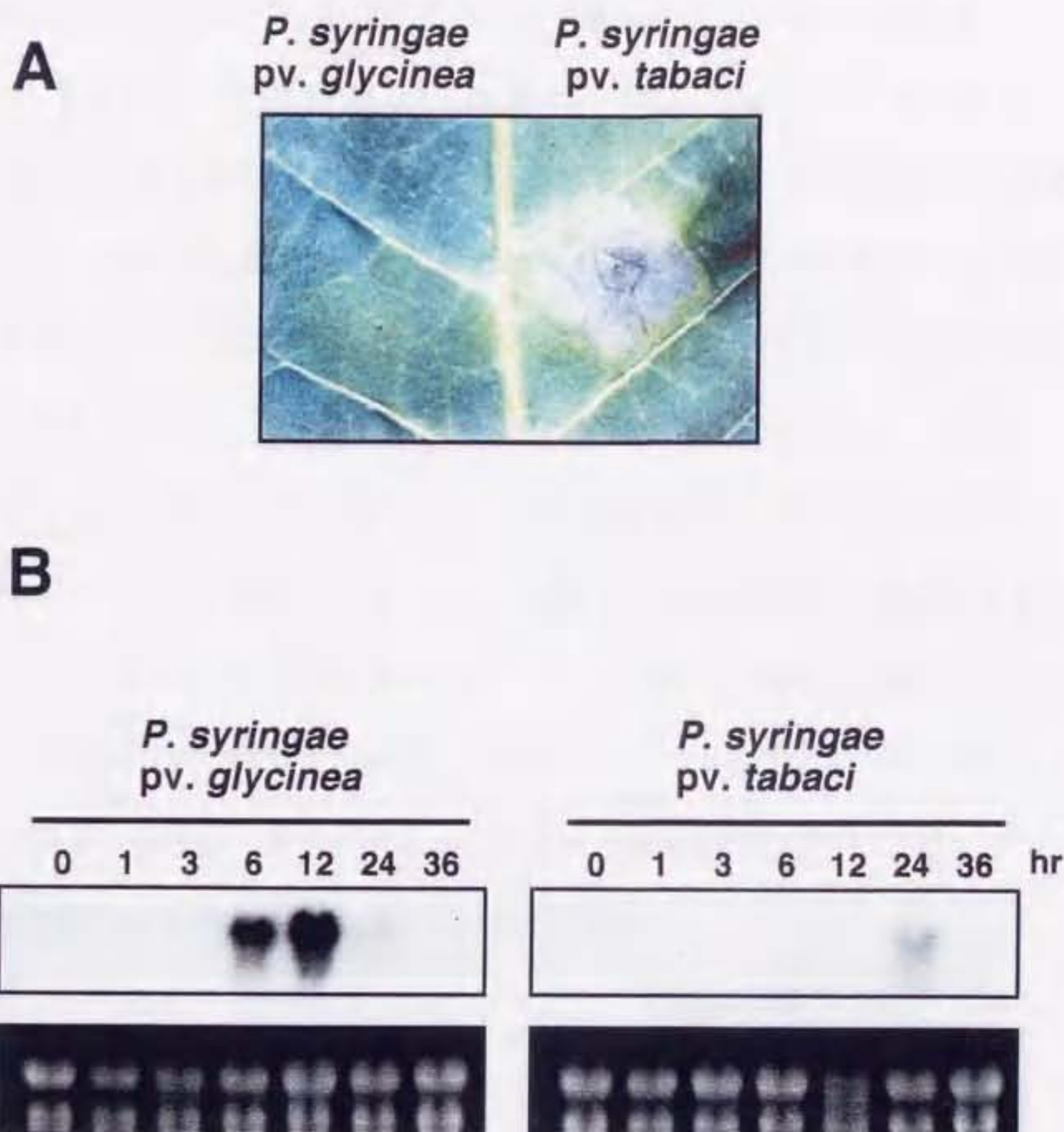


Fig. 22 A) Response of tobacco leaf inoculated with tobacco-nonpathogenic and -pathogenic *Pseudomonas syringae*. Detached tobacco leaf was infiltrated with  $3 \times 10^6$  c.f.u./ ml *P. syringae* pv. *glycinea* (left) or pv. *tabaci* (right). Photograph was taken 4 days after inoculation. B) Northern blot analysis of *CYP82E1* expression in response to nonpathogenic and pathogenic *P. syringae*. Detached tobacco leaves infiltrated with  $3 \times 10^6$  c.f.u./ ml *P. syringae* pv. *glycinea* (left) or pv. *tabaci* (right) were harvested at indicated times and total RNAs were extracted from the bacteria-infiltrated area. Twenty  $\mu$ g of total RNAs were fractionated on a 1 % agarose gel containing formaldehyde and then transferred to a nylon membrane. The membrane was allowed to hybridize with cDNA for *CYP82E1*.



#### 9. D44-12 遺伝子の塩基配列の解析

D44-12 遺伝子の全塩基配列と予想されるアミノ酸配列および用いたプライマーの位置を Fig. 23 A に示す。本遺伝子は 2786 塩基対から成り、861 アミノ酸をコードしていた。予想される分子量は 95,197 Da であり、等電点は 6.08 であった。D44-12 断片の塩基配列と一致する塩基配列は、予想される ORF の 1935-2238 番目に見い出され (Fig. 23 A, underline)、D44 プライマーがアニーリングした両末端の塩基配列が異なった (Fig. 23 A, asterisks)。D44-12 遺伝子の相同性検索をしたところ、トマト葉カビ病菌 (*Cladosporium fulvum*) に対するトマトの抵抗性遺伝子である Cf-2 遺伝子および Cf-5 遺伝子と高い相同性が見い出され、両遺伝子が持つ特徴的な構造を有した (Dixon et al. 1996, Dixon et al. 1998) (Fig. 23 B)。トマトの葉カビ病抵抗性遺伝子をはじめとする種々の病害抵抗性遺伝子が保持しているロイシンリッチリピート (LRR) レセプター様の構造を本遺伝子産物が有することから (Bent 1996)、D44-12 遺伝子を EILP (Elicitor-Inducible LRR Protein) 遺伝子と名付けた。

予想される EILP 遺伝子産物は Cf-2/Cf-5 ファミリーの遺伝子群と同様に A から G の7つのドメインに分けることができた (Fig. 23 B)。ドメイン A は疎水性に富む 25 アミノ酸残基より成るシグナルペプチドであり、これに続くドメイン B が成熟型 EILP 産物の N 末端になると予想された。ドメイン C には不完全な LRR 構造 (X-X-L-X-X-L-X-X-L-X-X-L-X-X-N-X-L-X-G-X-I-P) が 28 回繰り返し存在したが、Cf-2/5 ファミリーの遺伝子に見られる LRR の繰り返し配列に比べ、繰り返し配列間の保存性は低かった。またドメイン F には疎水性アミノ酸が多く存在し、その両端のドメイン E および G は極性アミノ酸に富むことからドメイン F は原形質膜貫通領域であると予想された。またドメイン B から E にかけて 22 カ所の糖付加部位 (N-X-[ST]) が







**A** MMMVGKLFSLHFFTLFCLFTVTFA

**B** STKEATALLKWKATLQNSNSLLVSWTPSSKACKSWY

GVVCFNGRVSKLDIPYAGVIGTLNN  
 FPFSSLPFLEYIDLSMNQLFSGSIP  
 PEIGKLTNLVYLDLSFNQISGTIP  
 PQIGSLAKLQTLHILDNHLNGSIP  
 GEIGHLRSLTELDLSINTLNGSIP  
 PSLGNLHNLSLLCLYKNNISGFIP  
 EEIGYLSSLIQDLNTNFLNGSIP  
 ASLENLHNLSLLYLYENQLSGSIP  
 DEIGQLRTLTDIRLNTNFLTGSIP  
 ASLGNLTSLSILQLEHNQLSGSIP  
 EEIGYLRTLAVLSLYTNFLNGSIP  
 ISLGNLTSLSLSLYENHLSGPI  
 SSLGNLDNLVYLYLYANQLSGPI  
**C** SELGNLKNLNYMKLHDNQLNGSIP  
 ASFGNLRNMQYLFLESNNLTGEIP  
 LSICNLMSLKVLSLGRNSLKGDIL  
 QCLINISRLQVLKIPDNNLSEEIP  
 SSICNLTSRLRILDLSRNNLKGSIPQ  
 CFGDMGGHLEVLDIHKNGISGTLP  
 TFRIGSVLRSFTLHENELEGKIP  
 RSLANCKELQVLDLGDNLNDTFP  
 MWLGTLPKLQVRLKSNKLYGSIRTS  
 KDENMFLELRIINLSYNAFTGNIPT  
 SLFQQLKAMRKIDQTVKEPTYLGKFGADIREYNYSVTVTTKGLEL  
 KLVRIILTVYIIIDLSSNRFEGHVP  
 SIMGELIALRVNLLSRNGLQGHIP  
 PSLGNLFVIESLDLSFNQLSGEIPQ  
 QIASQLTSLAVLNLSYNHLQGCIP

**D** QGPQFHTFENNSYEGNDGLRGFPISKGCGN

**E** DRVSETNNTVSTLDDQESTSEFLNDFWK

**F** ALNGYSSGCISLSLYFNTSTG

**G** KLKWLSRITewLQNRFI\*

XXLXXLXXLXXLXLXXNXLXGXIP

Fig. 23 B) Deduced primary structure of EILP protein. The sequence is divided into seven domains (A-G) to emphasize the structural similarities with Cf-2 and Cf-5 (Dixon et al. 1996, Dixon et al. 1998), as described in the text. The consensus sequence for extra-cytoplasmic LRR proteins is shown boxed and aligned below the EILP sequence and the conserved amino acids are shown in red. Hydrophobic amino acids in domain F are shown in yellow. Potential NXS/T glycosylation sequences are underlined.



# A

EILP	1	MMVVG-KLFSLLHFFTLFCCLFTVFA	25
Cf-2.2	1	MMVSRKVSSLOFFTLFYLFTVFA	26
Cf-5	1	MMVTSKVFSSLOFFTVFYLFTVFA	26

# B

EILP	26	STKEATALLKWKATLQNSNSLLVSWTPSSKACKSWY	62
Cf-2.2	27	STEEATALLKWKATFKNQNNNSFLASWIPSSNACKDWY	63
Cf-5	27	STEEATALLKWKATFKNQNNNSFLASWTSSNACKDWY	63

# D

EILP	762	QGPQFHTFENNNSYEGNDGLRGFPISKGCN	791
Cf-2.2	994	QGPQFRTFESNSYEGNDGLRGYPVSKGCGK	1023
Cf-5	850	QGPQFRTFESNSYEGNDGLRGYPVSKGCGK	879

# E

EILP	792	DRVSETNNTVSTLDDQESTSEFLNDFWK	819
Cf-2.2	1024	DPVSEKNYTVSALEDQESNSEFFNDFWK	1051
Cf-5	880	DPVSEKNYTVSALEDQESNSEFFNDFWK	907

# F

EILP	820	AALMGYGSGLCIGLSILYFMISTG	843
Cf-2.2	1052	AALMGYGSGLCIGISIIYILISTG	1075
Cf-5	908	AALMGYGSGLCIGISIIYILISTG	931

# G

EILP	844	KIKWLSRITWLNRFII-----	861
Cf-2.2	1076	NLRWLARIIEELEHKIIMQRRKKQORGQORNYRRRNNRF	1112
Cf-5	932	NLRWLARIIEELEHKIIVQRRKKQORGQORNYRRRNNRF	968

Fig. 23 C) Comparison of domains A, B, D, E, F and G for EILP with those for Cf-2.2 (Dixon et al. 1996) and Cf-5 (Dixon et al. 1998). Identical amino acids are shown in reverse. The sequences were aligned using the CLUSTALw program (Thompson et al. 1994).



あった (Fig. 23 B, underline)。Cf-2 および Cf-5 と EILP の各ドメインを比較したところ、ドメイン A から F は非常に高い相同性を示した (Fig. 23 C)。一方、構造的に細胞質に位置すると予想されるドメイン G の相同性はほとんどなかった (Fig. 23 C)。また、Cf-2/5 ファミリー遺伝子と EILP 遺伝子の塩基配列はアミノ酸の読み枠において高い相同性を示したのに対し、3' 非翻訳領域においては全く相同性がなかった。

#### 10. タバコ植物の EILP 遺伝子相同遺伝子の検出

トマトの葉カビ病菌に対する抵抗性遺伝子をはじめとし、多くのレセプター様病害抵抗性遺伝子は、多数の相同遺伝子を持つことが知られている (Bent 1996)。そこで、タバコのゲノム DNA を制限酵素 *Hind*III、*Eco*RV あるいは *Eco*RI で切断し、EILP の cDNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、タバコ植物の EILP 相同遺伝子の検出を行った。その結果、42 °C という強い条件でハイブリダイゼーションを行った場合、各レーンで強くハイブリダイズする 2-3 本のバンドと弱くハイブリダイズする多数のバンドを検出した (Fig. 24, High)。また、38 °C という弱い条件でハイブリダイゼーションを行った場合には、さらに多数の強くハイブリダイズするバンドを検出した (Fig. 24, Low)。これらの結果より、タバコには EILP と相同性を示す多くの LRR レセプター様遺伝子が存在することが示された。

#### 11. EILP 遺伝子の各種エリシター処理および非病原細菌接種による発現誘導

傷処理、サリチル酸処理、ダイズ斑点細菌病菌接種タバコ葉での EILP 遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーションにより調べた。その結果、対照の水処理区や傷処理区では、EILP 遺伝子の発現は全く誘導されなかったのに対し、0.5 mM サリチ



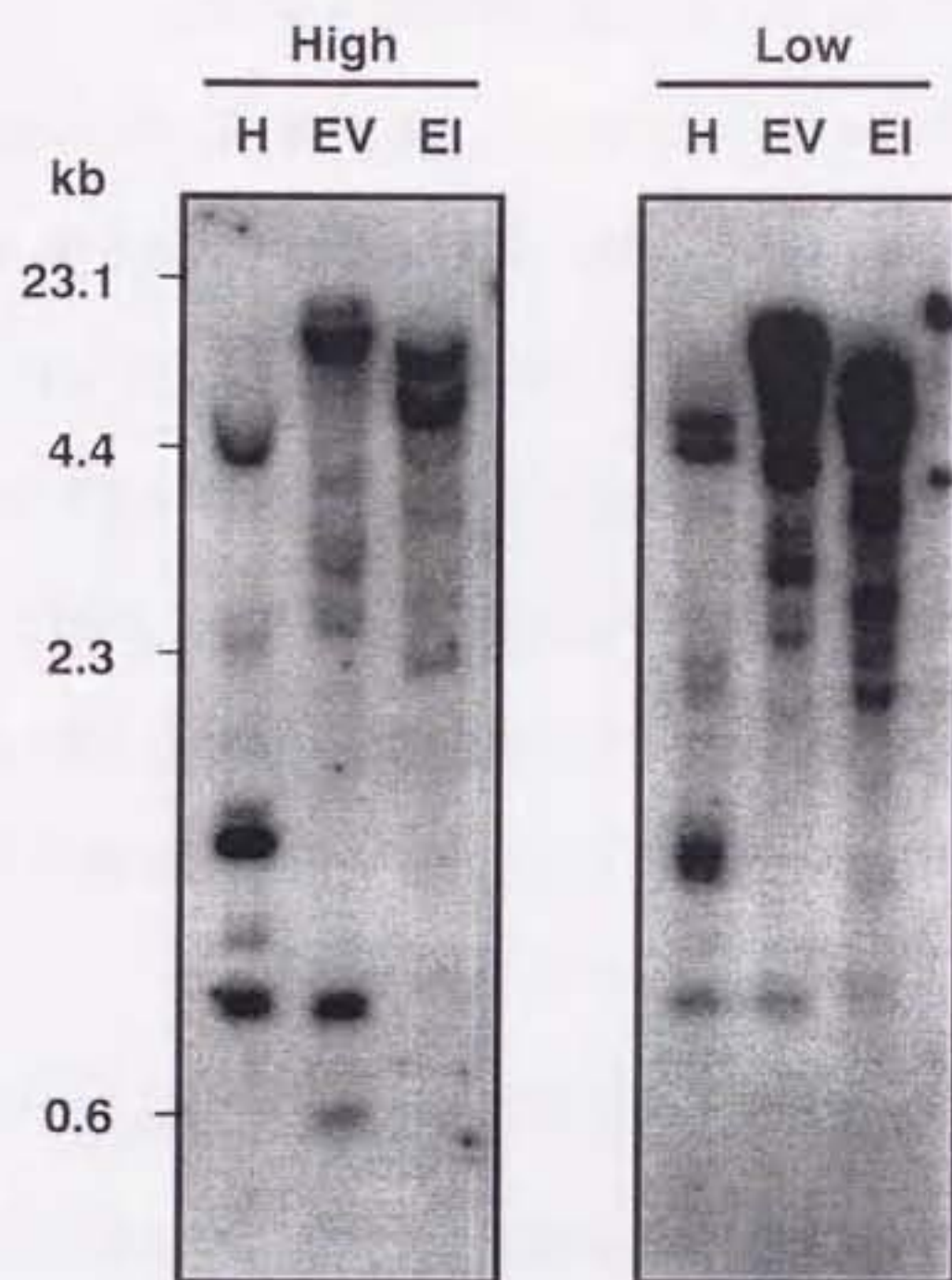


Fig. 24 Southern blot analysis of the EILP gene in tobacco. Twenty  $\mu$ g of total DNAs prepared from a tobacco leaf were digested with *Hind*III (H), *Eco*RV (EV) or *Eco*RI (EI) fractionated on a 0.8 % agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membrane was allowed to hybridize with the cDNA for EILP under low- or high-stringency condition. Sizes of DNA markers are indicated on the left.



ル酸処理区や、 $3 \times 10^6$  c.f.u./ml の非病原細菌接種の場合には、処理あるいは接種 6 時間後から発現が認められ、24 時間後にピークに達し、36 時間後には若干減少した (Fig. 25)。また、EILP 遺伝子の 3' 非翻訳領域で構築した特異的プライマー (D44-UTR-F, -R) を用いた RT-PCR によりノーザン解析の結果を確認した (Fig. 25)。さらに、病傷害ストレスにより発現が誘導されることが知られている塩基性 PR-3 遺伝子 (Neale et al. 1990) の発現を調べ、EILP 遺伝子の発現との比較を行った。その結果、塩基性 PR-3 遺伝子の発現量は多く、サリチル酸処理区および非病原菌接種区において EILP 遺伝子の発現パターンと類似したパターンを示した (Fig. 25)。

#### 12. EILP 遺伝子の非病原細菌および病原細菌接種による発現誘導の比較

タバコに対する非病原菌であるダイズ斑点細菌病菌およびタバコに対する病原菌であるタバコ野火病菌をタバコ葉に接種し、EILP 遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーションにより調べた。 $3 \times 10^6$  c.f.u./ml の濃度の両菌をそれぞれタバコ葉に接種したところ、ダイズ斑点細菌病菌接種葉では接種後 12-24 時間をピークとする一過的な発現誘導が認められたのに対し、タバコ野火病菌接種葉では接種後 36 時間に強い発現誘導が認められた (Fig. 26)。

### IV. 考察

#### 1. 病害ストレス誘導性遺伝子のスクリーニング

病害ストレス誘導性遺伝子の単離を目的としてディファレンシャルスクリーニングを行う場合、健全植物と病原菌接種植物から調製した RNA を材料として用いると



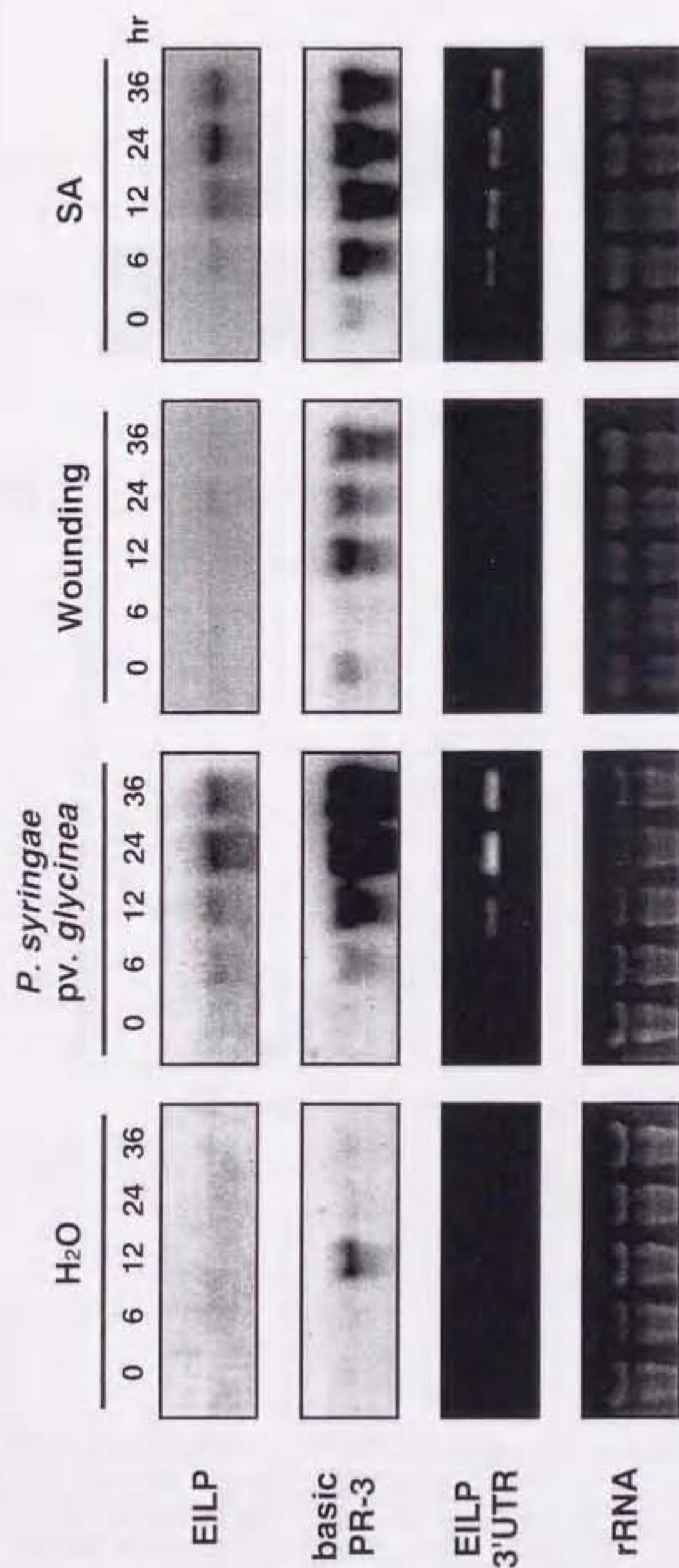


Fig. 25 The expression of the EILP and PR-protein genes induced by different types of stress. Tobacco leaves of intact plants were injected with water (H<sub>2</sub>O), or *P. syringae* pv. *glycinea* (3 x 10<sup>6</sup> c.f.u./ml), 0.5 mM salicylic acid (SA) or wounded with carborundum (Wounding). They were harvested at the indicated times and total RNAs were extracted. Twenty µg of total RNAs were fractionated on a 1% agarose gel containing formaldehyde and then transferred to a nylon membrane. The membrane was allowed to hybridize with the cDNAs for EILP or basic PR-3 (Neale et al. 1990). RT-PCR analysis of EILP expression (EILP-3'UTR) were performed with specific primers derived from the 3'-untranslated region of the EILP gene (EILP-UTR-F and EILP-UTR-R).



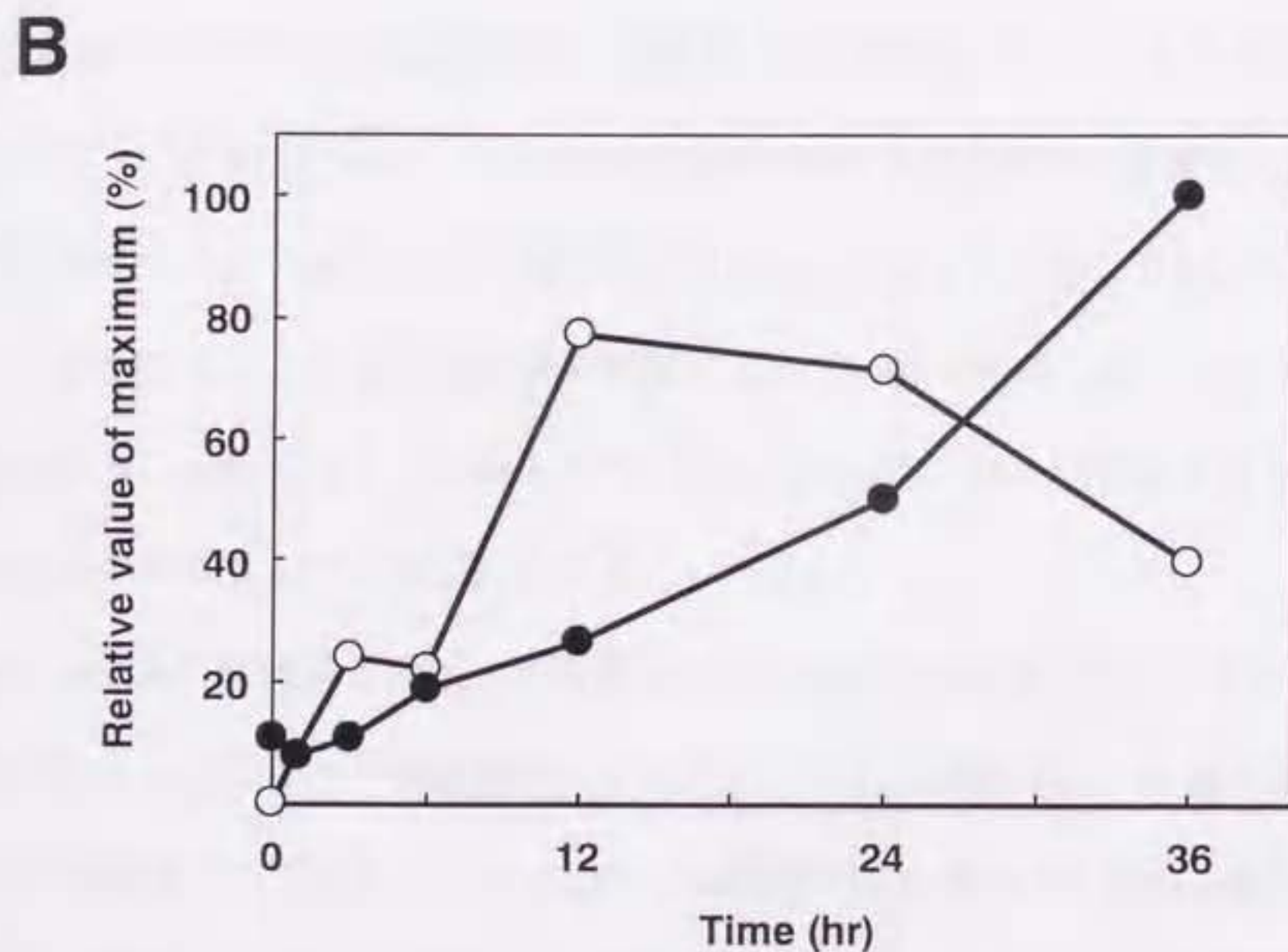
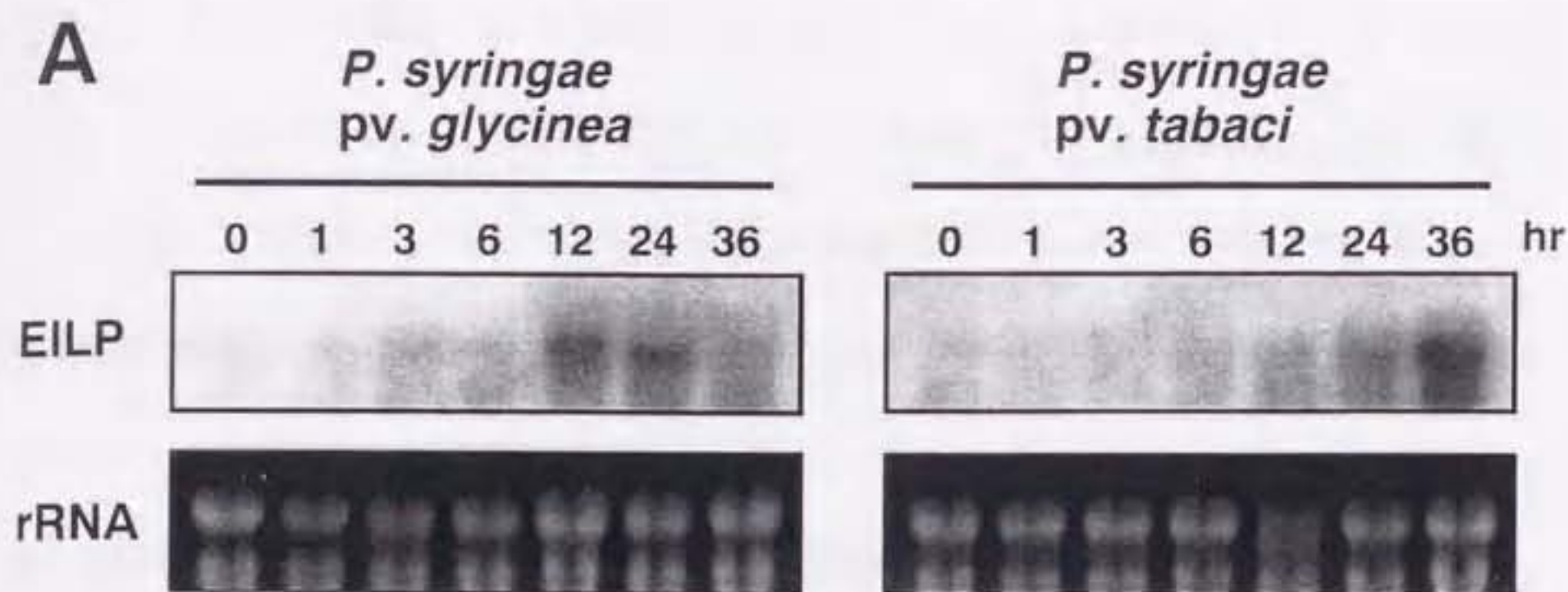


Fig. 26 Accumulation of EILP transcript in response to *P. syringae* pathovars. A) Detached tobacco leaves infiltrated with  $3 \times 10^6$  c.f.u./ml of *P. syringae* pv. *glycinea* (left) or pv. *tabaci* (right) were harvested at the indicated times. For control, rRNAs were stained with acridine orange. Other details are as described in the legend of Figure 25. B) Intensities of hybridized bands in A) obtained by densitometric scanning. The amount of EILP transcripts was normalized by the densities of rRNA stained with acridine orange and plotted relative to the highest value. Symbols indicated the relative amount of EILP transcript in tobacco leaves inoculated with *P. syringae* pv. *glycinea* (○) or pv. *tabaci* (●).



病原菌由来の遺伝子が単離される危険性がある。そこで、本章ではタバコ葉と HWC エリシターの系を用いることとし、まずはじめに本系における誘導抵抗反応を調べた。その結果、HWC 処理タバコ葉では過敏感細胞死や PR タンパク質の蓄積といった典型的な誘導抵抗反応が観察され (Fig. 16)、本系が病害ストレス誘導性遺伝子のスクリーニングに有用であることを確認した。

また、HWC 処理タバコ葉およびダイズ斑点細菌病菌接種タバコ葉において、CYP82E1 遺伝子は処理および接種後 6-12 時間に一過的な発現を示した (Figs. 20 B, 22 B)。EILP 遺伝子においても処理および接種後 12-24 時間をピークとした発現誘導が認められた (Figs. 18 B, 26 A)。このように HWC 処理タバコ葉での遺伝子発現は非病原細菌接種時のタバコ葉における遺伝子発現をよく反映しており、HWC 処理タバコ葉の系は病害ストレス誘導性遺伝子の単離に適していると判断した。そこで、第五章および第六章においてもタバコ葉と HWC の系を用いて、引き続き病害ストレス誘導性遺伝子のスクリーニングを行うこととした。

本章では HWC 処理後 0、12、36 時間のタバコ葉からディファレンシャルディスプレイ法によるエリシター誘導性遺伝子のスクリーニングを行い、16 種の遺伝子断片を得た (Table 3)。しかし、これらのうち 5 種はトランスポゾン遺伝子断片であった。タバコ植物において、エリシター処理やウイルス接種によりトランスポゾンの転写が活性化する例が報告されている (*TnT1*; Grandbastien et al. 1994, *Tto1*; Hirochika et al. 1993)。このようなストレスによるトランスポゾン転写の活性化は、植物がストレス環境に適応するための変異を誘発するために起こると考えられている (McClintock 1984)。今回、5 種のトランスポゾン断片が単離されたことより、エリシター処理タバコ葉において多種のトランスポゾン転写活性が誘導されていることが



示された。しかし、病原菌に対する抵抗性に関与する遺伝子を単離するという目的に照らし、本研究では他の 11 種について HWC 処理タバコ葉における発現誘導の有無を調べた。

11 種の遺伝子断片をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った結果、2 種 (D51-12 と A87-12-3) が HWC 処理により誘導された (Fig. 18 A)。一方、他の 9 種の発現誘導は認められなかった。ディファレンシャルディスプレイ法は RT-PCR による検出法であるため、この方法により得られた遺伝子の発現誘導はノーザンハイブリダイゼーションでは検出できない可能性が考えられる。そこで、ノーザンハイブリダイゼーションで発現が全く検出されなかった遺伝子のうち、2 種 (D44-12 と B61-12-1) について、遺伝子断片の塩基配列をもとに特異的プライマーを構築し、RT-PCR により遺伝子発現の検出を行ったところ、D44-12 遺伝子の発現誘導が認められた (Fig. 18 B)。

エリシター誘導性が確認されたこれら 3 種の遺伝子について、プラスミドライブラリーのスクリーニングとインバース PCR 法による全長遺伝子の単離を試み、D51-12 遺伝子と D44-12 遺伝子の全長 cDNA を単離することができた。一方、A87-12-3 遺伝子の場合にはインバース PCR 法による増幅が認められず、全長 cDNA の単離には至らなかった。この理由は不明だが、A87-12-3 断片にイントロンを含む領域があった可能性や、A87-12-3 断片中に PCR による塩基の読み違いがあり、構築したプライマーと A87-12-3 遺伝子の塩基配列に相違があった可能性が考えられた。

## 2. CYP82E1 遺伝子

CYP82E1 (D51-12) 遺伝子は、ダイズの菌体エリシター誘導性シトクロム P450 遺



伝子 (CYP82A4) と約 40 % の相同性を示した (Schopfer and Ebel 1998) (Fig. 19 B)。

一方、タバコで唯一報告されているシトクロム P450 (hsr515) (Czernic et al. 1996) とは 31 % の相同性しかなく、タバコの新規シトクロム P450 であると考えられた。シトクロム P450 モノオキシゲナーゼは膜結合型のヘムタンパク質であり、基質に分子状の酸素から 1 原子の酸素を付加する反応を触媒する酵素群の総称である。植物では、フェニルプロパノイド、フラボノイド、テルペノイド、アルカロイド代謝系といった二次代謝系で 50 以上のシトクロム P450 に依存した反応が知られている (Bolwell et al. 1994)。それにもかかわらず、1) 酵素活性が不安定である、2) 膜結合性である、3) 存在量が少ないといったタンパク質精製に不利な性質から、シトクロム P450 の精製とそれら遺伝子の単離はほとんど行われていなかった (Bozak et al. 1990, Mizutani et al. 1993, Song et al. 1993)。近年、シトクロム P450 遺伝子が共通して有する保存性の高いヘム鉄結合部位の配列をもとにしたプライマーを用いて、数多くのシトクロム P450 遺伝子が単離され、それらは約 30 のファミリーに分類されている (Suzuki et al. 1996, Akashi et al. 1997, Clark et al. 1997, Frank et al. 1996, Schopfer and Ebel 1998)。しかし、単離されたシトクロム P450 のうち、いかなる反応系において酸素付加反応を触媒するか判明しているのはごく一部である。植物のシトクロム P450 遺伝子の予想されるアミノ酸配列をもとに系統樹を作成すると、同じ酵素活性を持つ遺伝子がクラスターを形成することがわかる (Fig. 27)。CYP82E1 は酵素活性が明らかであるシトクロム P450 のいずれとも相同性が低く、系統樹においてもこれらとは別のクラスターを形成しており、系統樹から CYP82E1 の酵素活性とその機能を予測することは困難であった (Fig. 27)。

CYP82E1 遺伝子の発現は、非病原菌 *P. syringae* pv. *glycinea* 接種により接種後約 6-



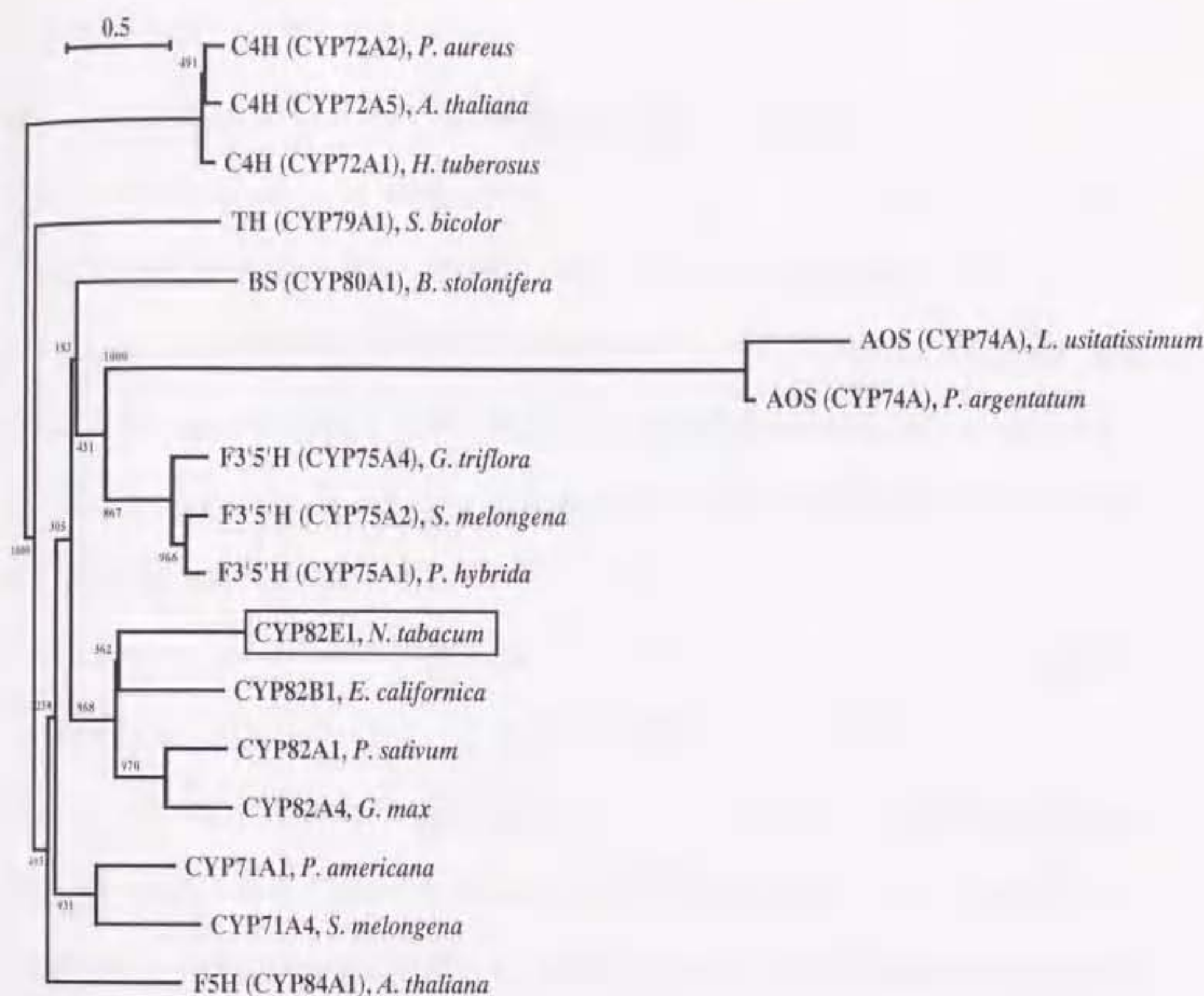


Fig. 27 Phylogenetic tree showing the relationship among the amino acid sequences of CYP82E1 and the other plant cytochrome P450s. The tree was constructed by the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) using the CLUSTALw program (Thompson et al. 1994). The number above or below each horizontal line is the frequency with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replication. Accession numbers of published sequences are as follows: *Phaseolus aureus* C4H, CYP72A2 (GenBank L07634); *Arabidopsis thaliana* C4H, CYP72A5 (GenBank U71080); *Helianthus tuberosus* C4H, CYP72A1 (GenBank Z17369); *Sorghum bicolor* TH, CYP79A1 (GenBank U32624); *Berberis stolonifera* BS, CYP80A1 (GenBank U09610); *Linum usitatissimum* AOS, CYP74A (GenBank U00428); *Parthenium argentatum* AOS, CYP74A (GenBank X78166); *Gentiana triflora* F3'5'H, CYP75A4 (GenBank D85184); *Solanum melongena* F3'5'H, CYP75A2 (Swiss-Prot P37120); *Petunia hybrida* F3'5'H CYP75A1 (GenBank Z22545); *Nicotiana tabacum* CYP82E1 (DDBJ AB015762); *Eschscholzia californica* CYP82B1 (EMBL AF014802); *Pisum sativum* CYP82A1 (GenBank U29333); *Glycine max* CYP82A4 (EMBL Y10983); *Persea americana* CYP71A1 (GenBank M32885); *S. melongena* CYP71A4 (GenBank X70981); *Arabidopsis thaliana* F5H, CYP84A1 (GenBank U38416). C4H, cinnamate-4-hydroxylase; TH, tyrosine-N-hydroxylase; BS, berbaminine synthase; AOS, allene oxide synthase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; F5H, ferulate-5-hydroxylase.



12時間で一過的に誘導される。このような比較的早い時間における一過的な発現誘導は、PAL 遺伝子をはじめとする二次代謝系の遺伝子発現誘導パターンと類似している (Fig. 21) (Mizutani et al. 1997)。しかし、PAL 遺伝子がメチルジャスモン酸の処理により誘導されるのに対し、CYP82E1 遺伝子では全く誘導が認められず、PAL 遺伝子とは違う発現制御を受けていると予想される。また、CYP82E1 遺伝子は病原菌である *P. syringae* pv. *tabaci* の接種ではほとんど発現が誘導されなかった (Fig. 22)。このことは、CYP82E1 遺伝子がタバコの細菌に対する抵抗性の決定に関与する酵素遺伝子である可能性を示唆する。

タバコのファイトアレキシンであるカプシジオールは、テルペノイド代謝系を経て合成される。このカプシジオール合成系の鍵酵素であると考えられる 5-エピアリストロキン合成酵素 (EAS) の遺伝子は既にクローニングされ、その発現制御機構が詳細に調べられている (Vogeli and Chappell 1988, Yin et al. 1997)。Yin ら (1997) は EAS 遺伝子の一つである EAS4 遺伝子の発現はエリシター処理や病原菌接種で誘導されるが、サリチル酸処理やメチルジャスモン酸処理では誘導されないことを報告している。この結果は CYP82E1 遺伝子の発現パターンと近く、CYP82E1 遺伝子の発現制御機構は EAS 遺伝子の制御機構と類似していると予想される (Fig. 21)。テルペノイド代謝系にも多くのシトクロム P450 が触媒する反応があること (Bolwell et al. 1994) を考え合わせると、CYP82E1 遺伝子はファイトアレキシン合成に関わるシトクロム P450 である可能性が考えられる。近年、PCR 法により単離された植物のシトクロム P450 遺伝子産物がファイトアレキシン合成系酵素であることが酵母の発現系を用いて相次いで証明されており (Schopfer et al. 1998, Akashi et al. 1998)、同様の方法による CYP82E1 遺伝子産物の酵素活性の測定が今後必要と思われる。



### 3. EILP 遺伝子

EILP (D44-12) 遺伝子は、トマト葉カビ病菌 (*C. fulvum*) に対するトマトの抵抗性遺伝子である Cf 遺伝子群 (Cf-2, -4, -5, -9) との間に高い相同性が見い出され、ロイジンリッチリピート (LRR) や膜貫通領域といった Cf 遺伝子の持つ構造を保持していた (Fig. 23 B) (Jones et al. 1994, Dixon et al. 1996, Thomas et al. 1997, Dixon et al. 1998)。近年、遺伝子対遺伝子関係により成立する抵抗性を決定する植物の真性抵抗性遺伝子が相次いで単離され、これらが LRR、膜貫通領域、プロテインキナーゼといったレセプター様構造を持つことより、植物の病原体認識に携わるレセプターであると考えられている (Staskawicz et al. 1995, Bent 1996)。

Cf 遺伝子を含め真性抵抗性遺伝子の多くは、同じ遺伝子座に複数の相同遺伝子を含むクラスターを形成していることが知られている (Song et al. 1997, Parniske et al. 1997, Dixon et al. 1998, Meyers et al. 1998)。これら遺伝子クラスターは、相同組み換えによる遺伝子の重複や変異を繰り返すことにより形成されたと考えられる (Song et al. 1997, Parniske et al. 1997)。EILP 遺伝子相同配列をサザン解析で調べたところ、EILP 遺伝子と相同性を示す多数の LRR レセプター様遺伝子が存在することが分かった (Fig. 24)。EILP 遺伝子群がクラスターを形成しているかどうかは不明であるが、Cf 遺伝子と同様の存在様式をとる可能性が高いと考えられた。今までに単離されている Cf 遺伝子およびその相同遺伝子は、Cf-2/5 遺伝子ファミリーと Cf-4/9 遺伝子ファミリーに分類される (Parniske et al. 1997, Dixon et al. 1998)。EILP 遺伝子と Cf-2/5 遺伝子ファミリーおよび Cf-4/9 遺伝子ファミリーの遺伝子を比較すると、EILP 遺伝子と Cf-2/5 ファミリーとの遺伝子の類縁性が明らかに高い (Fig. 23 C)。この結果は、進化の上でナス科植物がトマトとタバコに分かれる以前に、Cf-4/9 遺伝子ファミリ



ーと Cf-2/5 (EILP) 遺伝子ファミリーの祖先となる遺伝子が存在したことを意味しており、かなり古い時代から植物細胞は多様なレセプター群を持ち、病原菌の攻撃を認識する機能を発達させていた可能性が考えられる。

Cf-2/5 遺伝子群と EILP 遺伝子の間で予想されるアミノ酸配列および翻訳領域の塩基配列を比較すると高い相同性を示すが、3'非翻訳領域の塩基配列には全く相同性がない。ただし、Cf-2/5 遺伝子の場合と同様に EILP 遺伝子の 3'非翻訳領域にイントロンが存在した (Fig. 23 A) (Dixon et al. 1996, Thomas et al. 1997)。この 3'非翻訳領域のイントロンは Cf-4/9 遺伝子ファミリーにも存在する (Dixon et al. 1998, Jones et al. 1994)。Cf 遺伝子群と EILP 遺伝子に保存されている 3'非翻訳領域のイントロンがどのような意味を持つのかは不明だが、塩基配列の相同性の低さにも関わらず保存されていることより、これら遺伝子の発現制御、機能あるいは進化の上で何らかの意味を持っているのかもしれない。

EILP 遺伝子の発現は傷処理では全く誘導されなかったのに対し、サリチル酸処理および非病原細菌であるダイズ斑点細菌病菌接種では、処理あるいは接種 6 時間後から発現が認められ、24 時間後にピークに達し、36 時間後には若干減少した (Fig. 25)。EILP 遺伝子は塩基性 PR-3 遺伝子と類似した発現パターンを示し (Fig. 25) (Neale et al. 1990)、EILP 遺伝子が PR タンパク質遺伝子と同様にサリチル酸誘導性の病害ストレス応答性遺伝子であり、比較的遅い時間に発現が誘導されることが示された。

Cf 遺伝子の発現が病害ストレスにより誘導されるという報告は未だない。しかし、病原菌の接種により発現が誘導されるレセプター様タンパク質遺伝子の例がアラビドプシス (*Wak-1*, *At-RLK3*) (He et al. 1999, Czernic et al. 1999) やアブラナ科植物 (*SFR2*) (Pastuglia et al. 1997) で近年報告された。さらに、最近単離されたイネの真性



抵抗性遺伝子 *Xa-1* や *Pib* は環境ストレスで発現誘導されることが示されている (Yoshimura et al. 1998, Wang et al. 1999)。これらの報告は、植物において環境ストレスに応答したレセプター様タンパク質遺伝子の発現誘導はかなり一般的な反応であることを示している。おそらく植物細胞はレセプター遺伝子の発現を誘導することにより、ストレスに対する感受性を一時的に高め、迅速にストレス抵抗反応を誘導していると予想される。エリシター処理や細菌接種したタバコ葉でも、EILP を含む多くのレセプター様遺伝子の発現が誘導されると類推される。EILP 遺伝子の発現は傷害ストレスでは誘導されず、サリチル酸処理やダイズ斑点細菌病菌接種などの病害ストレスにより特異的に誘導された。また非病原菌であるダイズ斑点細菌病菌および病原菌であるタバコ野火病菌を接種した時のタバコ葉における EILP 遺伝子の発現を比較すると、非病原細菌接種葉でより早い応答が見られた (Fig. 26)。この結果は、EILP 遺伝子産物が環境ストレスのうち特に病害ストレスに対する感受性を高めるためのレセプターである可能性を示している。