

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究代表者

大橋 祐子

(農業生物資源研究所 上席研究官)

「遺伝子の不活化・活性化を通じた植物の生体制御」

1. 研究実施の概要

導入遺伝子の不活化が組換え植物の中で頻繁に起こることが問題になっている。この現象は、異物の侵入に対する植物の自己防御機構の一つと考えられる。我々は、遺伝子の発現が、DNA のメチル化等による転写レベルと、転写後のレベルでどのように制御されているかに注目して実験を行っており、最終的には、導入遺伝子および内在性遺伝子発現の人為的制御を目指す。これらの研究は、分子遺伝学的手法によって、また、病傷害ストレスに対する植物の自己防御の機構を解析する研究の中に取り込んで行われた。

2. 研究実施内容

1) 遺伝子の不活化と自己防御

傷情報伝達系の解析

傷より急速にその転写産物が蓄積する MAP キナーゼ遺伝子(wipk)を導入した組換えタバコの解析を進めた。今回、導入 wipk 遺伝子を構成的に発現している組換えタバコの中で、健全葉でも、傷応答反応と同様な現象が起こっている植物を複数選抜した。これらの植物中では、傷を付けなくとも、傷害に伴って誘導される遺伝子が発現し、傷害によって誘導されるジャスモン酸のレベルが高まっている。これらの植物中では、恒常的に WIPK のリン酸化が起こっていることから、WIPK がリン酸化による活性化を受けることにより、傷シグナル伝達系が働き、ジャスモン酸が合成され、さらに傷応答性遺伝子の発現が誘導されるものと考えられた。内在性 wipk がサイレンシングを起こした植物における実験結果と併せて考えると、WIPK は、傷シグナル伝達系のスイッチを入れる鍵酵素として機能していることを示唆する。これは植物ではじめて、情報伝達系の活性化に MAPK のリン酸が寄与することを示したものである。また、この WIPK の恒常的リン酸化は、幼若期には認められるが、成熟期になると認められなくなり、生育時期特異的に制御されているものと考えられる。

植物における細胞死の機構解析

動物のアポトーシス抑制遺伝子（ヒト由来の *bcl-xL* 遺伝子、線虫由来の *ced-9* 遺伝子）を植物で過剰発現させると、その発現量に依存して、紫外線照射やパラコート（活性酸素発生型除草剤）処理による細胞死に対して抵抗性を獲得することが明らかになった。また、TMV 感染によって引き起こされるプログラム細胞死（病斑形成）をも抑制する。これらの結果は、動物の細胞死抑制遺伝子が植物でも機能することを示す。植物では、これら細胞死関連遺伝子のホモログは未だに単離されておらず、同様の細胞死の機構が植物でも存在するものかどうか興味深い。

2) 遺伝子の不活化機構の分子遺伝学的解析

アラビドプシスの DNA メチル化突然変異体を用いた解析

植物や脊椎動物のゲノム DNA では同じ塩基配列の反復が多数観察される。これらの反復配列は、一般に、メチル化されて発現が抑制されている。この現象は一般に、重複配列のサイレンシングと呼ばれる。特に、形質転換植物を作出する際にこの現象が問題となる。サイレンシングを解除する突然変異体であり、DNA 低メチル化突然変異体である *ddm1* は、DNA メチル化の変化に伴って他の植物遺伝子の発現を変化させることにより、種々の発生異常を引き起こす。現在、これらの発生異常を直接引き起こした遺伝子を複数個クローニングし、サイレンシング現象の機構と生物学的意味を分子レベルで理解し、利用しようとしている。

3) DNA のメチル化による遺伝子発現の制御

DNA メチルトランスフェラーゼ (MT) 遺伝子を単離し、これらの遺伝子の特性を明らかにする実験を行っている。さらに、本遺伝子を導入した形質転換体で、MT 活性を高めたり、低めたりした系統を作り、これらを利用して、内在性遺伝子の不活性化・活性化の機構を解析している。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○Seo, S., Sano, H., Ohashi, Y. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11, 289-298, (1999).

○ Ito, N., Seo, S., Ohtsubo, N., Nakagawa, H., Ohashi, Y. Involvement of proteasome ubiquitin system in wound-signaling in tobacco plants. *Plant Cell Physiol.*, 40, 355-360, (1999).

○Seo, S., Ohashi, Y. Mitogen-activated protein kinases and wound stress. *MAP kinases in plant signal transduction.* p.53-63, 1999, Springer, Berlin.

○Ohshima, M., Mitsuhashi, I., Okamoto, M., Sawano, S., Nishiyama, K., Kaku, H., Natori, S., Ohashi, Y. Enhanced resistance to bacterial diseases in transgenic

- tobacco leaf overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. J. Biochem. 125, 431-435 (1999)
- Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M., Ohashi, Y. Spermine is a salicylate independent endogenous inducer of both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. Plant Physiol. 118, 1213-1222 (1998).
- Okamoto, M., Oshima, M., Natori, S., Ohashi, Y. Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants. Plant Cell Physiol. 39, 457-463 (1998).
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi, Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. Plant Cell Physiol. 39, 500-507 (1998).
- 大橋祐子 情報伝達物質としてのサリチル酸、細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ
10, 植物ホルモンによるシグナル伝達、p.199-202, (1998)
- 大橋祐子 作物に対する耐病性遺伝子の導入 農業環境を守る微生物利用技術 p.59-74、農林水産情報協会、1998.4.
- 大橋祐子 遺伝子組換えによる病害抵抗性作物育種の展望 関東東山病害虫研究会年報 45, 1-5 (1998)
- 平賀勸・伊藤浩之・大橋祐子 形質転換植物を用いたイネ傷害誘導性ペルオキシダーゼの特性と機能の解析 植物の化学調節 33, 131-136, 1998.
- 光原一朗・大島正弘・大橋祐子 抗菌性ペプチド遺伝子導入植物における細菌病および糸状菌病抵抗性 化学と生物 37, 205-209, 1999.
- 他6件