

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究者代表者

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

組換え植物中で、導入遺伝子が働かなくなるジーンサイレンシングという現象がかなり頻繁に起こることが問題になっている。また、一度不活化した遺伝子がまた働くようになる例も知られている。本研究では、ジーンサイレンシングを、外来異種遺伝子の発現を抑えるための宿主植物の自己防御ととらえ、植物の病気や傷害に対する抵抗性機構を解明するための研究の一部として解析する。これらの研究は、広義の遺伝子発現制御による植物の自己防御機構の解明につながり、応用面でもより質の高い有用組換え植物作出等に役立つものと考えられる。

これまでに、傷害により非常に早く誘導されるMAPキナーゼ遺伝子を過剰に発現する植物や、逆にジーンサイレンシングによってその発現がほとんど無くなった植物を用いて、この遺伝子が傷害情報伝達系で重要な働きをすることを明らかにしている。また、ジーンサイレンシングの一つの原因であるDNAのメチル化酵素遺伝子を用いたり、DNAのメチル化を調節する遺伝子を働かせることによって、植物の遺伝子発現等がどのように変化するかを解析している。

2. 研究実施内容

1) 植物の病・傷害等環境ストレスに対する自己防御機構の解明

TMV(タバコモザイクウイルス)に対する抵抗遺伝子N(24以下の低温で機能する)を持つタバコを主材料として、高温から低温に移すことによりウイルス増殖部位が同調的に壊死を起こす系を用いて、シグナル物質の同定、定量を行うと共に、病傷害により転写レベルで変動する遺伝子を単離し、その特性解析を行う。

過敏感細胞死(病斑形成)の機構の解明

- (1) 同調的壊死病斑誘導系で、初期に特異的に発現する遺伝子を単離し、その特性解明を行った。単離されたエチレン合成酵素遺伝子等を用いて、病斑形成のためにも、傷誘導性のPR遺伝子発現のためにもエチレンが必要であることを示した。
- (2) 病斑形成の初期にその発現が減少するAAAスーパーファミリーに属する

タバコFtsHホモログを単離した。これは、Zn活性型プロテアーゼをコードし、ATP依存的に葉緑体中のできる変性タンパク質の除去を行って葉緑体の恒常性を保持していると考えられる。今回、N遺伝子の発現に伴いこのタンパク質の量が減少することが、過敏細胞死を引き起こすことを示した。

- (3) 動物の細胞死抑制遺伝子をタバコで高発現させると、環境ストレスやウイルス感染による細胞死が抑制された。さらに、これらの植物は耐塩性、耐冷性、耐傷害性を獲得していることを発見した。イネでも同様の現象が示された。

病傷害シグナル伝達経路の解析

- (1) サリチル酸、ジャスモン酸、エチレンは防御遺伝子であるPR遺伝子発現のシグナル物質といわれる。傷や病斑形成によるこれらの誘導的堆積を経時的に解析した結果、ジャスモン酸は両者によって誘導を受けるが、サリチル酸は傷害では誘導されないこと、エチレンは病斑形成時とは異なり、傷による誘導はわずかしか受けないことが分かった。
- (2) 過敏反応で誘導され細胞間隙に分泌される、PR遺伝子発現の新規シグナル物質として、スペルミンを同定した。スペルミン処理はタバコにTMV抵抗性を誘導した。
- (3) 傷でその転写産物が数分で蓄積するMAPキナーゼ(WIPK)は、リン酸化により活性化されることによってジャスモン酸を介した傷シグナル伝達系を動かすことを示した。また、同調的壊死病斑形成系では、wipk mRNA-WIPKの活性化 - ジャスモン酸の合成 - 傷誘導型PR遺伝子の発現誘導が順番におこることを示した。
- (4) 2種の新規タバコペルオキシターゼ遺伝子を単離した、これらは、傷害、または病斑形成誘導的発現を示すが、既知のシグナル物質には応答しなかった。これは少なくとも2つの未知の病傷害シグナル伝達系が存在することを示唆する。
- (5) タバコPR遺伝子プロモーターの予想サリチル酸応答シス配列に結合するタンパク質因子を単離した。これは意外なことに、エチレンシグナル伝達系の一員であるシロイヌナズナEIN3のホモログであった。このタンパク質の最適DNA結合配列を決定したところ、これは多くの傷誘導性PR遺伝子のプロモーター領域に含まれていた。これを過剰発現させた植物は、傷誘導性PR遺伝子を恒常的に発現していた。
- (6) イネゲムノのESTに含まれる42種のペルオキシダーゼ遺伝子から21種を選び、特異プローブを用いてその発現特性を解析した。これらは発育時期、器官特異的に個性的な発現をしていた。

2) 形質転換物質における導入遺伝子の不活化・再活性化機構の解析

- (1) 遺伝子不活化は、核内に相同配列が重複して存在するほどその頻度が高くなることが示唆されている。このため、導入遺伝子の不活化を避けるためには、導入ベクターの中に重複配列がないことが望ましい。そこで、特許にあまり拘束されない、新規のプロモーターを含む遺伝子導入用ベクターを構築し、単子葉、および双子葉植物の形質転換に有用であることを示した。
- (2) ルシフェラーゼ遺伝子を高発現させた組換えタバコ用いて、ジーンサイレンシングの様相をCCDカメラを用いて非破壊的に解析している。後代5世代に渡って導入遺伝子の発現を追跡し、これが転写後に不活性化されるタイプのサイレンシングであることを示した。器官特異的不活化を観察している。

3) DNAメチル化による遺伝子発現の制御

- (1) 高等動植物のDNAメチル化の生理作用を総合的に理解するため、タバコおよびトウモロコシDNAメチルトランスフェラーゼ(MET)遺伝子を単離し、その特性を解析した。タバコのMET遺伝子をタバコで過剰発現させたところ、種々の形態異常が観察された。
- (2) トウモロコシ芽生えを低温処理した時、Ac/Dsトランスポゾン領域のメチル化状態とトウモロコシMET遺伝子の発現を調べたところ、逆相関を示した。DNAメチル化が自己防御系として機能することを強く示唆する。

4) 遺伝子不活化の分子遺伝学

- (1) シロイヌナズナのddml突然変異は、ゲノムDNAの低メチル化を伴い、導入遺伝子不活性化を解除する。この突然変異体を用いてメチル化の役割を解析する。

ddml突然変異はシロイヌナズナの内転スポンソンを活性化する。低メチル化に伴うトランスポソンの転写活性化と転移が観察された。重複遺伝子不活性化とゲノムDNAメチル化の働きの一つは、トランスポソンに対するゲノム構造の防御と考えられる。

- (2) この突然変異は種々の発生異常を誘発する。例えば、花器官のホメオチックは変化、開花時期の異常、茎伸長の阻害、等である。それぞれの発生異常は、交配でddml突然異常を取り除いても、他の遺伝子の支配する形質として安定に遺伝する。ddml突然変異が他の複数の遺伝子に突然変異があるいは、エピジェネティックな変化を誘導し、これがそれぞれの表現型を誘発したと解釈される。

3. 主な研究成果の(論文発表)

Seo, S., Seto, H., Yamakawa, H., and Ohashi, Y., Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Mol. PlantMicrobe Interact.*, 14, 261-264

(2001)

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T. Shimada, H., and Kakutani, T., Mobilization of transposons by a mutation. *Nature*, 411, 212-214(2001)

Fukuoka, H., Ogawa, T., Mitsuhara, I., Iwai T., Isuzugawa, K., Nishizawa, Y., Gotoh, Y., Nishizawa, Y., Tagiri, A., Ugaki, M., Oshima, M., Yano, H., Murai, N., Niwa, Y., Hibi, T., and Ohashi, Y. *Agrobacterium*-mediated

transformation of monocot and dicot plants using the NCR promoter derived from soybean chlorotic mottle virus. *Plant Cell Reports*, 19, 815-820(2000)

Hiraga, S., Ito, H., Sasaki, K., Yamakawa, H., Mitsuhara, I., Toshima, H., Matsui, H., Honma, M., and Ohashi, Y. Wound-induced expression of a tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and coronatine. *Plant Cell Physiol*, 41, 165-170(2000)

Hiraga, S., Ito, H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhara, I., Matsui, H., Honma, M., and Ohashi, Y. An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13, 20-21(2000)

Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamura, Y., Sasaki, T., and Ohashi, Y. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Letters*, 471, 245-250(2000)

Ito, H., Hiraga, S., Tsugawa, H., Matsui, H., Honma, M., Otsuki, Y., Murakami, T., and Ohashi, Y. Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. *Plant Science*, 13, 210-216(2000)

Kodama, H., Nishiuchi, T., Seo, S., Ohashi, Y., and Iba, K. Possible involvement of protein phosphorylation in the wound-responsive expression of *Arabidopsis* plastid ω -3 fatty acid desaturase gene. *Plant Science*, 155, 153-160(2000)

Kosugi, S., and Ohashi, Y. Cloning and DNA-binding properties of a tobacco Ethylene-Insensitive3 (EIN3) homolog. *Nucleic Acids Res*, 28, 960-967(2000)

Mitsuhara, I., Matsufuru, H., Oshima, M., Kaku, H., Nakajima, Y., Murai, N., Natori, S., and Ohashi, Y. Induced expression of sarcoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13, 860-868(2000)

Seo, S., Okamoto, M., Iwai, T., Iwano, M., Fukui, K., Isogai, A., Nakajima, N., and Ohashi, Y., Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. *Plant Cell*, 12, 917-932(2000)

Kmura, S., Ishibashi, T., Hatanaka, M., Sakakibara, Y., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. Molecular cloning and characterization of a plant homologue of the origin recognition complex 1(ORC1) *Plant Science*, 158, 33-39(2000)

Steward, N., Kusano, T., and Sano, H. Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Res*, 28, 3250-2359(2000)

Nakano, Y., Koizumi, N., Kusano, T., and Sano, H. Isolation and properties of an S-adenosyl-L-methionine binding protein from the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.*, 157, 707-711(2000)

Hirochika, H., Okamoto, H., and Kakutani, T. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the ddm1 mutation. *Plant Cell*, 12, 357-69 (2000)

Okamoto, H., and Hirochika, H. Efficient insertion mutagenesis of *Arabidopsis* by tissue culture-induced activation of the tobacco retrotransposon Tto1. *Plant J.*, 23, 291-304(2000)

Nakano, Y., Steward, N., Sekine, M., Kusano, T., and Sano, H. A tobacco NtMET1 cDNA encoding a DNA methyltransferase : molecular characterization and abnormal phenotypes of transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol.*, 41, 448-57 (2000)

Ueda, T., Seo, S., Ohashi, Y., and Hashimoto, J. Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Mol. Biol.*, 649-657 (2000)

Kimura, S., Ueda, T., Hatanaka, M., Takenouchi, M., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. Plant homologue of flap endonuclease-1: molecular cloning, characterization, and evidence of expression in meristematic tissues. *Plant Mol Biol.*, 42, 415-27 (2000)

Fujibe, T., Watanabe, K., Nakajima, N., Ohashi, Y., Mitsuhashi, I., Yamamoto, K. T., and Takeuchi, Y. Accumulation of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves irradiated with UV-B. *J. Plant Res.*, 387-394(2000)

[Review, 著作など]

大橋祐子、瀬尾茂美 : 傷害に対する応答 朝倉植物生理学講座 第5巻 環境応答、pp.178-186(2001)

Ohashi, Y., Seo, S., Mitsuhashi, I., Yamakawa, H., and Ito, N. Signaling pathways for TMV-and wound-induced resistance in tobacco plants. *Delivery and*

Perception of Pathogen Signals in Plants, p.122-129(2000) Aps press.

瀬尾茂美、植物のプロスタグランジン、ジャスモン酸 - 傷害応答における役割、
生物工学会誌, 78, 195(2000)