

「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)

「遺伝子の不活性化・活性化を通した植物の生体制御」

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、一度その発現を抑えられた遺伝子がまた働くようになる例も分かってきた。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の一種としてとらえ、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位置づけて解析する。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、植物の傷害でその転写や活性化が素早く誘導されるMAPキナーゼが、傷害シグナル伝達系で重要な働きをすることを、恒常的にこの酵素の活性が起こっている植物や、傷害を受けてもその活性化が起こらない植物を用いて明らかにした。本年度は転写後の遺伝子の不活性化が分裂組織で解除されることを発見した。また、ジーンサイレンシングの一つの原因であるDNAのメチル化を行う酵素を用いたり、DNAの低メチル化を支配する遺伝子を用いて、植物の遺伝子発現がどのように変化するかの解析を行い、新たな知見を得ている。今後、さらにその機構を植物の自己防御との関係で解析する予定である。

2. 研究実施内容

1)-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(生物研・大橋グループ)

「研究目的」

植物に特有の病原体感染に対する抵抗性である過敏感細胞死(HR)の系を用いて、植物の病気や傷害に対する自己防御の機構を、特定の遺伝子を不活化したり、活性化させた組換え植物を作出して解析する。最終的には、これらの研究でその特性が明らかになった有用遺伝子を用いて、病傷害に抵抗性を示す植物の作出することを目的とする。

「方法」

TMV(タバコモザイクウイルス)に対する抵抗性遺伝子*N*(温度感受性)を有するタバコ植物を材料とし、同調的に過敏感細胞死を誘導する過程で、遺伝子レベル、タンパク質レベルでどのような種類が変動を受け、細胞死やその後誘導される抵抗性に寄与しているかを調べる。

「結論」

同調的細胞死の過程で、カルモジュリン(*CaM*)遺伝子の転写がきわめて初期に誘導される。そこでタバコから13種の *CaM* 遺伝子を単離し、その発現特性を調べたところ、3タイプに大別された。各タイプについて特異抗体を作成しタンパク質量の変化を調べたところ、「HR で増えるが傷害では減少」、「傷害では増えるが HR では減少」、「前2者の中間」であることが分かった。これらの真の標的酵素は不明であるが、*in vitro* では、前者はNO合成酵素を、次者はNADキナーゼを活性化し、後者はその中間の特性を示した。これらの結果は、植物細胞は外界からのストレスに特異的にそれぞれのタイプの *CaM* タンパク質量を変化させることにより、抵抗性を誘導している可能性が示された。動物が一種の *CaM* しか持たないことを考えると、植物では *CaM* 系が一つの免疫代替機構として働いているものとも考えられる。

熱タンパク質 90 遺伝子(恒常的発現を示すタイプ)の転写が HR に先だって特異的に減少することが明らかになった。葉緑体に局在する FtsH プロテアーゼ(既報)と同様にその量を減少させることにより、HR 誘導に貢献している可能性がある。

受容体型プロテインキナーゼ遺伝子の転写誘導が温度シフトによる HR 誘導直後に起こることが分かった。この遺伝子の発現は、TMV 感染に関係なく 30℃から 20℃への温度シフト1-2時間後に観察された。この遺伝子が TMV 抵抗性遺伝子 *N* の上流で働き、HR を制御している可能性が示された。

傷害シグナル伝達に重要な働きをする MAP キナーゼ(WIPK)を活性化させる新規低分子化合物を単離・同定した。これはラブダン型のジテルペンで、ナノモルレベルでこの MAP キナーゼを活性化した。

1)-2 形質転換植物における導入遺伝子の不活化・再活化機構の解析(生物研・大橋グループ) 「研究目的」

遺伝子の不活化は、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知られている。この機構を調べ、一度導入した外来遺伝子の不活化を防ぐ方法を開発する。

「方法」

配列に重複が無いように導入遺伝子を構築するには、特許に拘束されない多種のプロモーターが必要である。いくつかのプロモーターについて、双子葉および単子葉植物を用いてこの目的に合うかどうかの評価を行う。また、非破壊的に生体内での発現解析が可能な蛍光由来のルシフェラーゼ遺伝子導入タバコをモデル植物に用い、転写後のジーンサイレンシングの機構を解析する。

「結論」

シロイヌナズナ由来の2種のプロモーターにレポーター遺伝子を連結し、タバコに導入してその発現特性を調べたところ、植物で最も頻繁に用いられているウイルス由来の 35S プロモーターに比べて、維管束部における発現にやや差異が見られたのみで、ほとんど遜色ない恒常的活性を示した。今後、これらは実用的にも使用可能と考えられる。

ルシフェラーゼ遺伝子導入タバコ植物を用い、この遺伝子の不活化が、転写後起こること、この植物の茎頂や花の分裂組織ではこの不活化が回避されていることを明らかにした。この次世代の

芽生えでは、当初すべての個体がルシフェラーゼ活性を有していたが、生長とともにその活性がなくなった。種々の実験の結果から、次世代でこの不活化が解除されるのは、今まで言われてきたような、減数分裂や発生の段階で起こるのではなく、その前に起こる細胞分裂によって解除されるためであることが示された。

2) 植物の自己防御の解析(生物研、橋本・菊池グループ)

「研究目的」

26Sプロテアソームは細胞内で重要な役割を果たしているタンパク質分解装置であり、調節サブユニットと活性サブユニットによって構成されている。植物のストレス応答に関するプロテアソームの役割を明らかにする(橋本G)。

シロイヌナズナの酸化ストレス応答機構を解析する(菊池G)。

「方法」

各サブユニット遺伝子の転写調節を明らかにするため、調節サブユニット遺伝子の一つである *Rpn10* 遺伝子をイネに導入した形質転換体を作成し、解析する(橋本G)。

シロイヌナズナのアスコルビン酸の蓄積を生化学的に定量する方法とESRによるラジカル分子種の変化から計測する方法を用いる(菊池G)。

「結論」

Rpn10 遺伝子の mRNA が過剰に発現している複数の組換えイネを作成し、これらの個体における遺伝子発現を調べると、*Rpn10* 遺伝子のみならず、他のサブユニット遺伝子(活性サブユニットの C2)の mRNA の発現も上昇していることが分かった(橋本G)。

シロイヌナズナの代表的エコタイプ、Ler はアスコルビン酸依存度が高いタイプであり、Col はフラボノイド系活性酸素消去能依存度が高いものであることが明らかとなった。両エコタイプ間のリコンビナントインブレットラインの代表的な系統30系統を用いて、アスコルビン酸依存度等に影響を及ぼす遺伝的領域の同定を試み、染色体3番上腕にそのひとつが存在することが分かった(菊池G)。

3) DNA メチル化による遺伝子発現の制御(奈良先端大・佐野グループ)

「研究目的」

植物における DNA メチル化が遺伝子発現を制御する機構を解析する。

「方法」

クラミドモナス葉緑体遺伝子の母性遺伝と DNA メチル化、de novo メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離、環境変化に応答した DNA メチル化レベルの変動、DNA メチル化阻害剤によるイネの矮性化を行う。

「結論」

緑藻クラミドモナスより DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子 *CrMET1* の完全長 cDNA を単離した。この遺伝子は 1,350 個のアミノ酸からなる、N末端に葉緑体移行シグナルを持つこれまでの知られていないタイプのタンパク質をコードしていた。GFP 連結タンパク質を作製し、葉緑体局在を確認した。これを利用して、雄性不稔操作を行える可能性がある。

タバコより de novo メチルトランスフェラーゼ遺伝子 *NtMET3* を単離した。608 のアミノ酸からなる DRM (domain rearranged methyltransferase) であった。GFP 連結タンパク質は明らかに核に局在した。バキュロ系で発現させた酵素タンパク質のメチル化配列を検討中である。

メチレーションスクリーニング法によって、低温処理特異的に脱メチル化される新規遺伝子 *ZmMI1* を単離した。この遺伝子座ではヌクレオゾームのコア領域が特異的に脱メチル化されることが示された。これらの結果は、DNA メチル化のレベルは環境変化に応答して変動し、グローバルな遺伝子発現制御系として機能することを示唆する。

シロイヌナズナのゲノムより、メチルシトシン結合モチーフ (MBD) を持つタンパク質をコードする遺伝子を8個、同定した。それらの産物のうち、AtMBD5 はメチルシトシンに特異的に結合し、花など生殖器官で強く発現することが明らかになった。

DNAメチル化阻害剤によってイネ(ヤマダニシキ)の矮性株が得られた。その後世代の形質検定を岡山県農業試験場と共同で行っている。

4) 遺伝子不活性化の分子遺伝学 (国立遺伝研・角谷グループ)

「研究目的」

シロイヌナズナの *ddm1* 突然変異は、ゲノム DNA の低メチル化に伴い、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。

「方法」

シロイヌナズナの *ddm1* 突然変異体では、この後代で種々の発生異常が誘発されてくる。この発生異常の原因遺伝子を特定したり、その機構を調べることにより、メチル化の機能を調べる。

「結論」

シロイヌナズナの *ddm1* 突然変異は、ゲノム DNA の低メチル化に伴い、導入遺伝子不活性化を解除する。この突然変異は種々の発生異常を誘発する。例えば、開花時期の異常、花器官のホメオティックな変化、等である。発生異常の原因遺伝子を連鎖解析によって同定することにより、*ddm1* 突然変異下で特異的に高頻度で転移するシロイヌナズナの内在トランスポゾンを発見した。これまで提案してきたように遺伝子不活性化機構がゲノム構造の維持に働いていることが裏付けられた。

3. 研究実施体制

研究者名			担当研究項目
(1) 生物研・大橋グループ			
大橋祐子	生物研	特待研究員	遺伝子の不活性化と自己防御
(2) 生物研・橋本・菊池グループ			
橋本純治	生物研	上席研究官	植物の自己防御機構の解析
菊池尚志	同上	チーム長	
(3) 奈良先端大・佐野グループ			
佐野 浩	奈良先端大	教授	DNA メチル化による遺伝子発現制御

4. 研究成果の発表

大橋グループ(生物研)

(1) 論文発表

- Ito, N., Takabatake, R., Seo, S., Hiraga, S., Mitsuhara, I., and Ohashi, Y. (2002). Induced expression of a temperature-sensitive leucine-rich repeat receptorlike protein kinase gene by hypersensitive cell death and wounding in tobacco plant carrying the N resistance gene. *Plant Cell Physiol.*, 43(3), 266-274.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2002). Interaction of the Arabidopsis E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol*, 128(3), 833-843.
- Mitsuhara, I., Shirasawa-Seo, N., Iwai, T., Nakamura, S., Honkura, R., and Ohashi, Y. (2002). Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants. Possible mechanism for noninheritance of the silencing. *Genetics*, 160(1), 343-52.
- Shirasawa-Seo, N., Mitsuhara, I., Nakamura, S., Murakami, T., Iwai, T., Nishizawa, Y., Hibi, T., and Ohashi, Y. (2002). Constitutive promoters available for transgene expression instead of CaMV 35S RNA promoter : Arabidopsis promoters of tryptophan synthase protein β subunit and phytochrome B. *Plant Biotechnology*, 19(1), 19-26.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2002). E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen. *Plant Journal*, 29(1), 45-59.
- Sasaki, K., Hiraga, S., Ito, H., Seo, S., Matsui, H., and Ohashi, Y. (2002). A wound-inducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. *Plant Cell Physiol*, 43(1), 108-117.
- Mitsuhara, I., Nakajima, Y., Natori, S., Mitsuoka, T., and Ohashi, Y. (2001). In vitro growth inhibition of human intestinal bacteria by sarcotoxin IA, an insect bactericidal peptide. *Biotech. Lett.* 23, 569-573.
- Yamakawa, H., Mitsuhara, I., Ito, N., Seo, S., Kamada, H., and Ohashi, Y. (2001). Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur. J. of Biochem.* 268, 3916-3929.

[Review、著作など]

- 小杉俊一, 大橋祐子. (2001). 病害応答. *植物ゲノム機能のダイナミズム 転写因子による発現制御*, 191-204.

○ 大橋祐子. (2001). 概論. 植物ゲノム機能のダイナミズム 転写因子による発現制御, 189-190.

○ Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., and Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 42(5), 462-468.

(2) 特許出願

なし

橋本・菊池グループ(生物研)

(1) 論文発表

○ Yanagawa Y, Kimura S, Takase T, Sakaguchi K, Umeda M, Komamine A, Tanaka K, Hashimoto J, Sato T, Nakagawa H. (2002). Spatial distribution of the 26S proteasome in meristematic tissues and primordia of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*. 214, 703-7.

○ Kimura S, Uchiyama Y, Kasai N, Namekawa S, Saotome A, Ueda T, Ando T, Ishibashi T, Oshige M, Furukawa T, Yamamoto T, Hashimoto J, Sakaguchi K. (2002). A novel DNA polymerase homologous to *Escherichia coli* DNA polymerase I from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Nucleic Acids Res.*;30, 1585-92.

○ Kimura S, Suzuki T, Yanagawa Y, Yamamoto T, Nakagawa H, Tanaka I, Hashimoto J, Sakaguchi K. (2001). Characterization of plant proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and flap endonuclease-1 (FEN-1), and their distribution in mitotic and meiotic cell cycles. *Plant J.*, 28, 643-53.

○ Ishibashi, T., S. Kimura, T. Furukawa, J. Hashimoto, K. Sakaguchi (2001). Two types of replication protein A 70kDa subunit in rice, *Oryza sativa*: molecular cloning, characterization and cellular and tissue distribution. *Gene* 272, 335-43.

○ Furukawa, T., S. Kimura, T. Ishibashi, J. Hashimoto and K. Sakaguchi (2001). A plant homologue of 36kDa subunit of replication factor C: molecular cloning and characterization. *Plant Science* 161, 99-106.

(2) 特許出願

なし

佐野グループ(奈良先端大)

(1) 論文発表

○ Yap, Y.-K., Kakamu, K., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. (2002) Promoter analysis of *WIPK*, a gene encoding a tobacco MAP kinase, with reference to wounding and tobacco mosaic virus infection. *J. Plant Physiol.* 159: 77-83.

○ Nishiyama, R., Itoh, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. (2002) A chloroplast-resident DNA methyltransferase is responsible for hypermethylation of chloroplast genes in *Chlamydomonas* maternal gametes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5925-5930.

(2) 特許出願

なし

角谷グループ(国立遺伝研)

(1) 論文発表

- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. and Kakutani, T. : Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature* 411, 212-214 (2001)
- Takeda S, Sugimoto K, Kakutani T, Hirochika H.: Linear DNA intermediates of the Tto1 retrotransposon in Gag particles accumulated in stressed tobacco and Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **28**:307-17 (2001)
- Kinoshita T, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL.: Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:14156-14161. (2001)

(総説、他)

- Habu Y, Kakutani T, and Paszkowski J.: Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 215-220 (2001)
- 角谷徹仁 (2001)「シロイヌナズナ突然変異体を用いたエピジェネティクス」細胞工学 Vol.20, 363-367
- 角谷徹仁(2001)「DNA 低メチル化突然変異によるシロイヌナズナ内在トランスポゾンの活性化」植物の生長調節 Vol. 36, 178-180
- 角谷徹仁 (2001)「DNA メチル化変異によるトランスポゾンの転移誘導」細胞工学 Vol.20, 940-941

(2) 特許出願

なし