「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

導入遺伝子の不活性化すなわちジーンサイレンシングが、遺伝子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。また、一度不活化された遺伝子が再活性化する例も知られている。本研究では、遺伝子の不活化を外来異種遺伝子の発現を抑えるための植物の自己防御の一つの形としてとらえ、植物の病気や傷害に対する自己防御機構解明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貢献するとともに、導入遺伝子や内在性の遺伝子発現の人為的制御法開発にもつながることから、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。

2. 研究実施内容

病・傷害情報伝達系の解析

傷により数分でその転写産物が蓄積するMAPキナーゼ遺伝子(wipk)を過剰発現させた若い組換えタバコ植物では、導入wipk遺伝子は構成的に強く発現し、傷を付けなくても、傷シグナル物質であるジャスモン酸や傷誘導性遺伝子発現のレベルが、傷をつけた時のように高まっていた。これらの植物中では、WIPKのキナーゼ活性が傷害を受けた直後と同程度に増加していた。このキナーゼ活性の恒常的増大は若い組換え植物では観察されたが、成熟植物ではもはや起こらなかった。別タイプの組換えタバコでは、内在性のwipk遺伝子の発現が傷を付けても起こらなくなっていたが、この植物では、傷によるジャスモン酸の誘導や傷誘導性の遺伝子発現が阻害されていた。これらの結果は、傷情報伝達系は、WIPKが活性化され、未知の標的因子をリン酸化することによりその引き金が引かれることを示している。

あらたな感染防御応答を誘導するシグナル物質として、スペルミンを同定した。スペルミンは過敏感細胞死を起こしたタバコ葉の細胞間隙液から検出され、病原体感染や傷害によって誘導される防御タンパク質遺伝子群の発現を誘導した。また、タバコ葉をスペルミン処理するとウイルス抵抗性が増大した。

過敏感細胞死や傷によって特異的に誘導される2種の新規のタバコペルオキシ

ダーゼ遺伝子を単離した。前者は、既知の病害シグナル物質によって誘導されず、後者は既知の傷シグナル物質による誘導を受けないことから、未知の病害および傷情報伝達系の存在が示唆された。

高等植物ではポリアミン合成に関しオルニチン脱炭酸酵素のほかアルギニン脱炭酸酵素が重要であることが示唆されている。今回、後者の誘導後の分解がプロテアソーム阻害剤で阻害されることを明らかにした。また、傷害シグナル伝達経路の誘導にもプロテアソームが関与していることを示した。

導入遺伝子不活化の機構解析

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を高発現させたタバコをモデル植物として、導入遺伝子不活化の様相を、高感度カメラを用いて解析した。幼若期では強く発現していても、成熟するにつれ発現が抑えられる個体が多く、そのような植物では、導入遺伝子の転写産物、翻訳産物がともに1/100以下にまで減少しているが、核のrun-on解析では転写速度に差がないことから、転写後の不活化によるものと考えられた。

動物のアポトーシス抑制遺伝子 *bcl-xL* や *ced-9* を植物で過剰発現させると、その発現量に比例して、UV、パラコート処理などに対する耐性が増大した。これらの植物では、病原体感染による過敏細胞死も抑えられることが分かった。加齢による細胞死を阻害するp35導入植物でも同様な現象が観察されることから、植物にも動物の細胞死関連遺伝子と似た機能を持つ遺伝子が働いている可能性がある。これらの植物でも導入遺伝子の不活化が頻繁に起こるが、DNAメチル化阻害剤処理によりその不活化が一過的に解除された。

遺伝子の不活性化の分子遺伝学的解析

サイレンシング解除突然変異体であり、DNA低メチル化突然変異体である *ddm1* は、トランスポゾンの抑制を解除するとともに、他の遺伝子座にエピジェネティックな変化を誘導することにより、種々の発生異常を引き起こす。遺伝子不活化の生物学的意味を理解するために、これらの遺伝子で何が起きているかを分子レベルで知るべく、発生異常を直接引き起こした遺伝子座の同定と、その構造及び発現解析を行っている。*ddm1* 突然変異の誘導する開花時期遅延形質は、優性形質として遺伝する。Koornneefらとの共同研究の結果、この優性形質はホメオボックス遺伝子 *FWA* の対立形質であることがわかった。低メチル化に伴って *FWA* 遺伝子上流の反復配列から転写が起これ、その発現過剰によって表現型が誘導されたことがわかった。トランスポゾン等の反復配列の抑制は、ゲノムの構造維持だけでなく、隣接する植物遺伝子の正常な発現にも重要と考えられる。一方、*BONSAI*, *CLAM*, *WAVY-SEPAL* と呼ばれる形質は劣性の遺伝をする。多くの場合、DNAのメチル化は遺伝子発現の抑制を伴っているため、低メチル化が遺伝子

機能の喪失を誘導するのは直感的に理解しにくい。この分子機構を知るため、現在、CLAMとBONSAIについて、ポジショナルクローニングを進めている。

DNAメチル化による遺伝子発現の制御

クラミドモナス葉緑体DNAは栄養繁殖中にはメチル化されておらず、配偶子形成に伴って雌型でのみ強くメチル化される。葉緑体遺伝子の母性遺伝とこのようなDNAメチル化の相関を調べるために、DNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子を単離し、ノックアウト組換え株の作製を目指した。本年度はDNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子の断片を得た。本遺伝子はゲノムハプロイドあたり2コピーが含まれ、配偶子では強く発現していた。

タバコ、およびドウモロコシのDNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離・解析を行った。トウモロコシでは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DNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現が逆相関を示した。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。

酒造米ヤマダニシキの芽生えを5-アザシチジンというメチル化阻害剤で処理し、矮性株を得た。現在、3系統に絞って形質の検定を行っている。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Hiraga, S., Ito, H., Sasaki, K., Yamakawa, H., Mitsuhashi, I., Toshima, H., Matsui, H., Honma, M. and Ohashi, Y. (2000). 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.

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

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

Nakano, Y., Steward, N., Kusano, T., and Sano, H. (2000). A tobacco NtMET1 cDNA encoding a DNA methyltransferase: Molecular characterization and abnormal phenotypes of antisense transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 448-457.

Kimura, S., Ueda, T., Hatanaka, M., Takenouchi, M., Hashimoto, J. and Sakaguchi, K. (2000). Plant homologue of flap endonuclease-1: molecular cloning, characterization, and evidence of expression in meristematic tissues. *Plant Mol. Biol.* 42, 415-427.

Hirochika, H., Okamoto, H., and Kakutani, T. (2000). Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell* 12:357-369

Yanagawa, Y., Ohashi, A., Murakami, Y., Saeki, Y., Yokosawa, H., Tanaka, K., Hashimoto, J., Sato, T. and Nakagawa, H. (1999). Purification and characterization of

the 26S proteasome from rice (*Oryza sativa*) cells. *Plant Science* 149: , 33-41.

Hiraga, S., Ito, H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhashi, I., Matsui, H., Honma, M. and Ohashi, Y. (1999). An HR-Induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate and ethephon. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:210-216.

Hiraga, S., Ito, H., Matsui, H., Honma, M. and Ohashi, Y. (1999). cDNA sequences for two novel tobacco peroxidase isoenzymes. *Plant Physiol.* 120: 1205-1207.

Kakutani, T., Munakata, K., Richards, E. and Hirochika, H. (1999). Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 151: 831-838.

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

Mitsuhashi, I., Malik, K. A. Miura, M., and Ohashi, Y. (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-xL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.* 9: 775-778.

Ohshima, M., Mitsuhashi, I., Okamoto, M., Sawano, S., Nishiyama, K., Kaku, H., Natori, S. and Ohashi, Y. (1999). Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *J. Biochem.* 125: 431-435.

Ohtsubo, N., Mitsuhashi, I., Koga, M., Seo, S. and Ohashi, Y. (1999). Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* 40: 808-817.

Seo, S., Sano, H. and Ohashi, Y. (1999). Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11: 289-98.

Seo, S. and Ohashi, Y. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinases and Wound Stress. *Results and Problems in Cell Differentiation* vol. 27 -MAP Kinases in Plant Signal Transduction- p53-63.

Yanagawa, Y., Ohashi, A., Murakami, Y., Saeki, Y., Yokosawa, H., Tanaka, K., Hashimoto, J., Sato, T. and Nakagawa, H. (1999). Purification and characterization of the 26S proteasome from cultured rice (*Oryza sativa*) cells. *Plant Science* 149: 33-41.

光原一朗, 三浦正幸, 大橋祐子 (1999). 細胞死抑制機構は動物と植物で保存されているか? -Bcl-xL/Ced-9による植物の細胞死抑制-. *細胞工学* 18: 1280-1283.

佐野浩, 原光二郎 (1999). 傷害応答にかかわる遺伝子の発現調節. *蛋白質 核酸 酵素* Vol.44 No.15 p2353-2359.

瀬尾茂美, 大橋祐子 (1999). 植物の細胞死と耐病性. 研究ジャーナル 22:21-26

大橋祐子 (1999). 傷害に対する応答概説. 蛋白質 核酸 酵素 Vol.44 No.15
p2345-2346

瀬尾茂美, 伊藤直子, 大橋祐子 (1999). 傷害応答におけるシグナル伝達. 蛋白質
核酸 酵素 Vol.44 No.15 p2347-2352

大橋祐子 (1999). 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 家の光協会 p59-73