

377.51
ON

酸性 *PR-1* 遺伝子の制御因子群に関する研究

Studies on regulatory factors involved in
acidic *PR-1* gene expression.

横浜国立大学附属図書館



11468122

学籍番号

01TA015

氏名

小野 祥子

Name

ONO, Sachiko

責任指導教官

平塚 和之 教授

修了年月日

2004年3月25日

目次

<u>1. 緒言</u>	---	5
<u>2. 材料と方法</u>	---	10
<u>3. 病害応答シグナルの転写制御解析における一過的発現系の構築</u>	---	23
3-1. 序論	---	24
3-2. 結果	---	26
3-2-1. 一過的発現解析系による <i>PR-1a::Fluc⁺</i> のサリチル酸による発現誘導	---	26
3-2-2. サリチル酸による <i>PR-1a</i> 発現誘導パターン	---	26
3-2-3. CaMV 35S プロモーターの <i>as-1</i> シスエレメントに対するサリチル酸の作用の検出	---	26
3-3. 考察	---	32
<u>4. 一過的発現解析系を用いたエフェクターによる <i>PR-1a</i> 発現誘導解析</u>	---	34
4-1. 序論	---	35
4-2. 結果	---	38
4-2-1. <i>PR-1a::Fluc⁺</i> の AtNPR1 同時導入による発現誘導	---	38
4-2-2. AtNPR1-AD 同時導入による発現誘導	---	38
4-2-3. <i>PR-1a</i> プロモーターの AtNPR1、AtNPR1-AD 応答領域の探索	---	39
4-3. 考察	---	45
4-3-1. タバコ <i>PR-1a</i> はシロイヌナズナ <i>NPR1</i> によって誘導される	---	45

4-3-2. GAL4AD を融合した AtNPR1 は <i>PR-1a</i> 発現誘導を促進させる	---	46
4-3-3. AtNPR1、AtNPR1-AD は <i>PR-1a</i> プロモーターの <i>as-1-like</i> エレメントに作用する	---	46
<u>5. 一過的発現解析系を用いた TGA 因子の転写活性解析</u>	---	49
5-1. 序論	---	50
5-2. 結果	---	53
5-2-1. 一過的発現解析系によるタバコ TGA1a の転写活性の解析	---	53
5-2-2. 一過的発現解析系による <i>PR-1a::Fluc⁺</i> の TGA 同時導入による 発現パターン解析	---	54
5-3. 考察	---	60
<u>6. タバコ <i>PR-1a</i> プロモーターのタバコとシロイヌナズナにおける 発現解析</u>	---	63
6-1. 序論	---	64
6-2. 結果	---	67
6-2-1. <i>PR-1a::Fluc⁺</i> 形質転換タバコにおける <i>PR-1a</i> 誘導パターン解析	---	67
6-2-2. BY-2 細胞を用いた一過的発現解析系による比較	---	67
6-2-3. シロイヌナズナを用いた一過的発現解析系による比較	---	67
6-2-4. <i>PR-1a::Fluc⁺</i> 形質転換シロイヌナズナにおける <i>PR-1a</i> 誘導 パターンの解析	---	68
6-3. 考察	---	73
<u>7. <i>PR-1a::Fluc⁺</i> 導入シロイヌナズナを用いた新規な病害応答性 変異体のスクリーニング</u>	---	74

<u>7-1. 序論</u>	---75
<u>7-2. 結果</u>	---76
<u>7-3. 考察</u>	---80
8. <u>形質転換植物を用いた <i>NPRI</i> の解析</u>	---81
<u>8-1. 序論</u>	---82
<u>8-2. 結果</u>	---83
<u>8-3. 考察</u>	---86
9. <u>総括</u>	---87
10. <u>謝辞</u>	---90
11. <u>参考文献</u>	---91
<u>英文要旨</u>	

1. 緒言

植物の病原に対する抵抗性には、感染細胞やその周辺細胞での局所的な抵抗反応と、植物体全身で誘導される病原に非特異的な抵抗性がある。局所的応答では、病原とそれに対して抵抗性を示す植物に特異的な関係がある。抵抗性を示す植物では、抵抗 (*R*) 遺伝子産物が病原由来の非病原性 (*avirulence*; *avr*) 遺伝子産物を特異的に認識し、感染細胞内で数時間以内に、急激な活性酸素の蓄積 (オキシダティブバースト)、抗菌物質の合成などの様々な防御応答を誘導し、さらに感染細胞は自発的細胞死を引き起こす。これらの応答を過敏感反応 (*Hypersensitive reaction*; *HR*) という。HR は感染細胞が病原と共に死ぬことで病原の増殖を防ぐ抵抗性反応であり、同時に HR を起こした細胞から植物体全身へ病原の侵入を知らせるシグナルが伝達され、植物体全身での抵抗性誘導を促すと考えられている。しかし一方で、HR を誘導せずに病原に対する抵抗性が誘導されるシロイヌナズナ変異体 *dnd1* が報告されていることから、抵抗性誘導には HR を介さない制御機構も存在すると考えられる (Yu et al., 1998)。さらに、灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) など、HR を誘導し細胞死を起こしている組織に感染・増殖する病原もあり、HR 誘導によって必ずしも全ての病原に対する抵抗性が獲得されるわけではない (Govrin and Levine, 2000)。

植物体全身で誘導される全身獲得抵抗性 (*Systemic acquired resistance*; *SAR*) は、病原に非特異的な抵抗反応であり、二次感染への備えの役割も担っている。SAR 誘導の制御機構については近年研究が進んでいるが、その詳細は必ずしも明らかにはされていない。SAR 誘導機構が解明されれば、安全性の高い病害防除薬剤の開発や病害に強い植物の作出など、植物保護による生産性向上に寄与することが期待される。これまでに、タバコやシロイヌナズナで最も研究が進んでおり、多くの知見が得られている。

SAR 誘導シグナルが活性化されると、SAR 関連遺伝子と呼ばれる様々なグループの遺伝子の発現が誘導される。SAR 関連遺伝子の一群である酸性 *PR* (*Pathogenesis-related*) 遺伝子群は、SAR 誘導下で発現が誘導されることから、SAR 応答の指標としてよく用いられる。酸性 *PR* 遺伝子の幾つかは抗菌活性を有するタンパク質をコードすることから、それらの酸性 *PR* タンパク質は病原に対して直接作用すると考えられる (Uknes et al., 1992)。

SAR 遺伝子発現の開始時には、サリチル酸の蓄積が感染部位周辺だけでなく植物体全身におこる (Ryals et al., 1996)。また、サリチル酸やその類似化合物である INA (2,6-dichloroisonicotinic acid)、BTH (benzo(1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester) の外的処理によっても SAR が誘導される。サリチル酸を蓄積で

きない植物体では SAR 誘導が欠失することから、サリチル酸は SAR 誘導に関わるセカンドメッセンジャーとして機能していると考えられている (Gaffney et al., 1993)。シロイヌナズナの酸性 PR 遺伝子である PR-1、や、BGL2 (PR-2)、PR-5 遺伝子はサリチル酸によって発現が高く誘導されるが、サリチル酸合成が欠失すると発現が誘導されないことから、サリチル酸は酸性 PR 遺伝子の上流に位置し、SAR シグナルを活性化すると考えられている。しかし、サリチル酸を介さない SAR 誘導シグナルの存在を示唆する報告もあることから (Nawrath and Metraux, 1999; McDowell et al., 2000)、SAR 誘導機構には幾つかのシグナル経路が存在し、それらは複雑なネットワークを形成していると考えられる (図 1)。

一方、病原感染によって、病害抵抗性シグナルだけでなく傷害抵抗性を誘導するシグナル伝達系路も活性化されることがわかっている (Bowling et al., 1997; Clarke et al., 1998; Pieterse and van Loon, 1999)。傷害応答シグナルとしてはジャスモン酸やエチレン依存的シグナルが知られており、病害抵抗性と同様に局所的応答だけでなく、全身でも抵抗性が誘導される。HR 応答の際に細胞内伝達物質として働くカルシウムイオンや活性酸素種は、病害抵抗性だけでなく様々な応答シグナルの伝達物質でもあり、傷害応答シグナル活性化の際にも増加するという報告もある。このことから、HR 応答の際にジャスモン酸依存的シグナルも活性化すると考えられる (Bowler and Fluhr, 2000)。さらにタバコでは、サリチル酸によってジャスモン酸が誘導する塩基性 PR 遺伝子の発現が抑制され、また逆にジャスモン酸によってサリチル酸が誘導する酸性 PR 遺伝子の発現が抑制されることから、サリチル酸依存的シグナルとジャスモン酸が活性化するシグナルは互いに拮抗的に作用し合うことが示唆されている (Sano et al., 1996; Niki et al., 1998)。シロイヌナズナでも、サリチル酸感受性やシュードモナス菌 (*Pseudomonas syringae*) への抵抗性が弱い変異 *eds4* とサリチル酸蓄積が低下した変異 *pad4* の二重変異体では、ジャスモン酸が活性化する遺伝子の発現レベルが上昇したという報告がある (Gupta et al., 2000)。しかし、数種の病原体に対しては、ジャスモン酸/エチレンによって抵抗性が誘導され、ジャスモン酸/エチレン依存的シグナルを欠失させると抵抗性も失われるという知見もある (Thomma et al., 1998; Thomma et al., 1999)。このことから、病原特異的にサリチル酸依存的シグナルとジャスモン酸/エチレン依存的シグナルが応答している可能性も考えられる。脱リン酸化がサリチル酸シグナルを、リン酸化がジャスモン酸シグナルを活性化するという報告もある (Raz and Fluhr, 1993; Conrath et al., 1997)。傷害応答シグナルと傷害応答シグナルの関係はいまだ明らかになっていない部分が多いが、拮抗的作用と相乗的作用の両方が存在すると考えられている。

植物が全身で誘導する抵抗性には SAR の他に induced systemic resistance (ISR)

がある（図 1）。ISR は、病害を引き起こさない共生菌等が根に感染することによって誘導され、SAR と同様に病原非特異的抵抗性を示すようになる現象である（van Loon et al., 1998）。ISR は様々な植物で報告されており、シロイヌナズナではシュードモナスなどのバクテリアだけでなく、べと病菌（*Peronospora parasitica*）にも抵抗性を示すことが分かっている（Pieterse et al., 1996; Pieterse et al., 1998）。ISR シグナルとサリチル酸依存的シグナルがシュードモナス菌に対する抵抗性において相乗的効果を示したという報告もある（van Wees et al., 2000）。シロイヌナズナでは、ISR は SAR とは全く異なる経路で誘導されることが知られている。ジャスモン酸／エチレンシグナル関連因子である JAR1 や ETR1 の欠失によって阻害されることからジャスモン酸／エチレンシグナルを必要とすると考えられるが、一方で後述のサリチル酸シグナル関連因子である *NPR1*（nonexpresser of PR genes）／*NIM1*（for noninducible immunity）（以降 *NPR1* とする）も必要とすることが判明している（Pieterse et al., 1998）。シロイヌナズナでは、サリチル酸シグナルとジャスモン酸／エチレンシグナル両方に関与し、酸性 *PR-1* と障害応答遺伝子である *PDF1.2* の両方の発現誘導を活性化する *SSI1* が単離されており、ISR シグナルとの関連が示唆されている（Shah et al., 1999; Nandi et al., 2003）。

感染を受けた細胞から送られる SAR 誘導シグナル物質は、維管束などを通して全身に送られると考えられるが、詳細は明らかではない。他には、サリチル酸のメチルエステル体であるメチルサリチル酸が、空気中に放出されて全身にシグナルを伝えるという報告がある（Shulaev et al., 1997）。

SAR 関連因子として代表的なものは、酸性 *PR-1* の発現を促進する *NPR1* であり、シロイヌナズナ、トマト、タバコで単離されている。そのなかで最も研究されているのは最初に単離されたシロイヌナズナ *NPR1* (*AtNPR1*) である。*AtNPR1* 遺伝子は、酸性 *PR* 発現が欠失して病害抵抗性が著しく低下した変異体（Cao et al., 1994）の原因遺伝子として同定された（Cao et al., 1997; Ryals et al., 1997）。*AtNPR1* を過剰発現させたシロイヌナズナ植物体で酸性 *PR* 遺伝子の発現や病原への抵抗性が上昇したことから、*AtNPR1* は SAR 誘導シグナルに促進的に働く因子であると考えられている（Cao et al., 1998）。また、*AtNPR1* はタンパク質の相互作用部位を持ち、DNA 結合部位を持たないことから、何らかの因子を介して *PR* の発現を誘導すると考えられる（Cao et al., 1997; Ryals et al., 1997; Glazebrook et al., 2001）。

しかし、*npr1* 変異はシュードモナス菌に対する抵抗性は著しく低下させるが、べと病菌に対してはシュードモナス菌ほど抵抗性の低下は観察されない（Cao et al., 1997）。さらに、サリチル酸を過剰に蓄積し *PR* 遺伝子群の恒常的発現や

シュードモナス菌やべと病菌への抵抗性促進を示す *cpr* 変異と *npr1* との二重変異体では、*npr1* 変異によってシュードモナス菌への抵抗性は低下したが、べと病菌への抵抗性は影響を受けない。また、これらの植物体はジャスモン酸/エチレン依存的に発現する *PDF1.2* や *Thi2.1* を恒常的に発現する (Bowling et al., 1997; Clarke et al., 1998)。これらのことから、AtNPR1 を介さない SAR 誘導シグナルが存在し、そのシグナルにはジャスモン酸シグナルも関与することが示唆される (Clarke et al., 2000; Rairdan et al., 2001)。

最近の報告で、AtNPR1 がジャスモン酸/エチレンシグナルを抑制するはたらきがあることが示された (Spoel et al., 2003)。従って、AtNPR1 は SAR におけるサリチル酸シグナルとジャスモン酸/エチレンシグナルの拮抗的作用に関与する主要な因子であると考えられている。また、前述のとおり ISR シグナルにも必要とされることから (Pieterse et al., 1998)、AtNPR1 は SAR シグナルのクロストークに重要な役割を担っている因子であることが示唆される。

これらの状況をふまえ、本研究は、酸性 PR 発現に関与する因子の機能解析を行い、病原感染によって誘導されるサリチル酸を介した SAR シグナルの制御機構を解明することを目的とした。しかし、シグナル制御に関連する遺伝子は、その変異が表現形として現れにくいため、変異形質を指標とした方法では機能解析は困難である。そこで、発光によって遺伝子発現を検出できるホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Fluc) をレポーター遺伝子として、タバコ由来 PR 遺伝子のひとつである *PR-1a* 遺伝子のプロモーター領域の下流に連結させたレポータープラスミド (*PR-1a::Fluc⁺*) を構築し、*PR-1a* の発現誘導のトランス因子の作用について解析した。ホタルルシフェラーゼはその基質であるルシフェリンを酸化し可視光を発する酸化酵素のひとつとして、近年植物でもレポーターとして頻繁に使われるようになっている。この反応は特異性が高く、他種生物のルシフェリンでさえこの反応の基質となり得ない。これまでに、*PR-1a::Fluc⁺* 形質転換植物でのサリチル酸や BTH、INA など薬剤処理による SAR シグナルの誘導を、Fluc 活性として組織特異的にまた経過時間毎に観察することに成功している (Watakabe et al, submitted)。

本研究では複数の因子同時導入が可能な遺伝子銃を用いた一過的発現解析系を開発し、シロイヌナズナ由来の病害応答因子 AtNPR1 がタバコ細胞内でタバコ *PR-1a* の転写活性化に関与することを明らかにした (Ono et al., 2004)。さらに、一過的発現解析系で得られた結果をもとに形質転換体を作製し、内在性 *PR-1* 発現誘導レベルが上昇した植物体を得た。また、*PR-1a::Fluc⁺* レポーターは、タバコだけでなくシロイヌナズナでも SAR 誘導薬剤による発現誘導が高感度に検出されることから、本研究では *PR-1a::Fluc⁺* 形質転換シロイヌナズナを用いた新規変異体探索についても検討を行った。

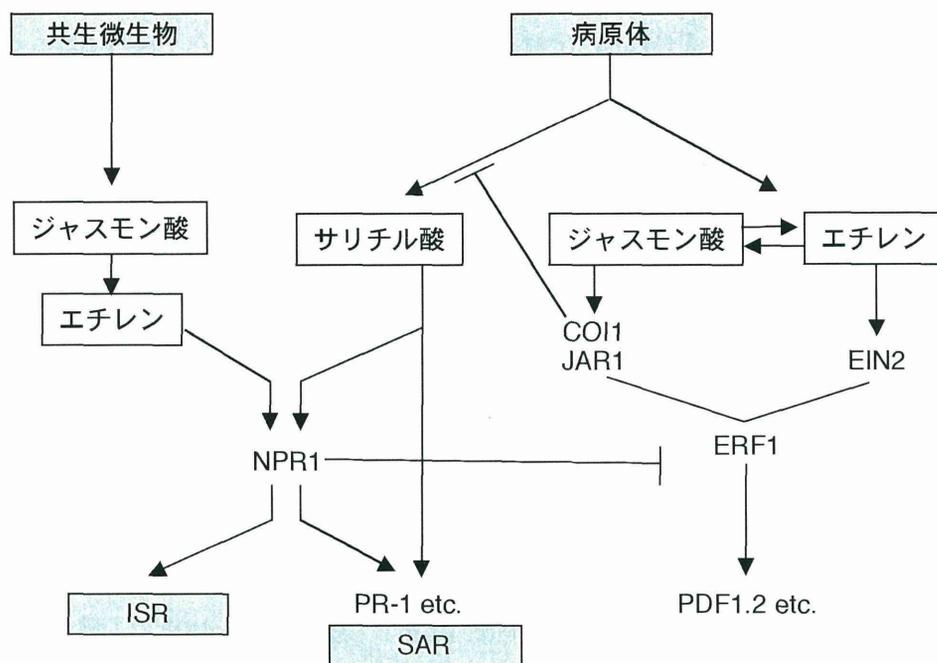


図1. シロイヌナズナにおける病害抵抗性に関与するシグナル伝達経路の概要
 病害抵抗シグナルには複数の経路が関与し、それらは複雑なネットワークを形成している。サリチル酸やジャスモン酸、エチレンが誘導するシグナルが重要な役割を担っていると考えられる。また、病原体ではないリゾバクテリアの感染によっても抵抗性が誘導されることが分かっている。近年、この抵抗性のシグナル伝達経路にもジャスモン酸、エチレン、サリチル酸が関与することが示唆されている。

(Pieterse et al., 1998; Glazebrook, 2001; Kunkel and Brooks, 2002)

2. 材料と方法

植物種

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)

タバコ BY-2 培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L.cv. Bright Yellow 2)

タバコ (*Nicotiana tabacum* SR-1)

菌株

大腸菌

DH5 α : *supE44*, $\Delta lacU169(\phi 80lacZ \Delta M15)$, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*,
gyrA96, *Thi-1*, *relA1*

XL1-Blue MRF^r : *hsdR17*, *supE44*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *relA1*, *lac/F^r* [*proAB⁺*,
lacI^a, *lacZ \Delta M15::Tn10(tet^r)*]

アグロバクテリウム : *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(Str^r)

培地

LB : 1% Bacto Trypton (Difco)、0.5% Yeast Extract、1% NaCl

LB-amp : LB + 50 μ g/ml アンピシリン

LB 寒天培地 : LB + 寒天 1.5%

NT(pH5.7) : 4.3g/l MS 塩 (日本製薬(株)) のムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類)、500mg/l MES、1mg/l チアミン、100mg/l ミオイノシトール、180mg/l KH₂PO₄、10mM 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、3%スクロース

MS(pH5.7) : 4.3g/l MS 塩、3%スクロース、1%MS ビタミン溶液(50mg ニコチン、10mg チアミン、50mg ピリドキシン、200mg グリシン、10g ミオイノシトール)

MSKC : MS(pH5.7) + 50mg/l カナマイシン、250mg/l カルベニシリン

大腸菌の形質転換

塩化ルビジウム法 (Hanahan, 1983) で作製したコンピテントセルを氷水中で解凍後、DNA 溶液を加え、氷水中で 30 分間静置した。41°C で 45 秒間置き、直ちに氷水中に戻した。3 分間氷水中で静置した後、LB 培地をコンピテントセルの 10 倍量加え、37°C で 60 分間培養した。その後、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に広げ、37°C で一晩培養した。

プラスミドの少量調製

大腸菌コンピテントセルからのプラスミド調製は Molecular Cloning (Sambrook and Russell, 1989) のボイル法を改変して行った。抗生物質を含む LB 培地で 1 晩培養した培養液 1ml を遠心分離 (15000rpm, 1 分間, 4 °C) により集菌した。この菌体を 180 μ l の STET (8% sucrose, 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 50mM EDTA, 5% Triton X-100) に懸濁し、10 μ g/ μ l リゾチームを 10 μ l 加え穏やかに混ぜ、室温で 2 分間静置した。これを沸騰水で 45 秒間煮沸した後、すばやく氷水中に移し、遠心分離 (15000rpm, 15 分間, 4°C) 後、沈殿を除去し、200 μ l のイソプロパノールを加え、遠心分離 (15000 rpm, 30 分間, 4°C) 後、上清を除去し 70% エタノールを 1ml 加えて沈殿を洗浄した。遠心分離 (15000rpm, 15 分間, 4°C) 後、上清を除去し風乾後 20 μ l の TE (10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA) 緩衝液 (10 μ g/ml RNaseA 入り) に溶解した。

プラスミドの大量調製

プラスミド精製キット (QIAGEN) を用い、添付のマニュアルに従って行った。

プラスミドコンストラクト

pBI221

CaMV35S プロモーターとその下流の β -glucuronidase (GUS) 遺伝子、NOS terminator を *Hind* III/*Eco*R I サイトで pUC19 にクローニングしたもの。

35S::Rluc

pBI221 の 35S プロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (Renilla luciferase; Rluc) を連結したもの (Matsuo et al., 2001)。

35M::Rluc

35S::Rluc の 35S プロモーターの *as-1* エlement に変異を導入したもの。site-directed mutagenesis 法 (TOYOBO) を用いた。CaMV35S プロモーターの *as-1* エlement を欠失させたインバース PCR 用プライマー *as-1-M1/as-1-M2* (表 1) をデザインし、T4 Polynucleotide kinase (Takara) によって、5' 末端をリン酸化した。このプライマーを用いて KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素としたインバース PCR を行い、PCR 反応液に半量の DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara) の ligation sol. を加えてセルフライゲーションさせた (16°C, 2 時間)。これをエタノール沈殿後 H₂O に再溶解し、*Dpn* I 処理 (20 μ l 容量, 37°C, 1 時間) してメチル化して

いる鋳型プラスミドを除去した。

35M::hRluc

35M プロモーターの下流に、Rluc のタンパク結合部位を欠失させた hRluc 遺伝子を連結したものの。

35M::GUS (35M::Rluc の 35M プロモーターを *Pst* I/*Bam*HI で切り出し、pBI221 の *Pst* I/*Bam*HI サイトに挿入) の 35M プロモーターを *Pst* I/*Bam*HI で切り出し、35S::hRluc (phRL-null ベクターの改良型 hRluc (Promega) を *Nhe* I/*Xba* I で切り出し pBI221 のサイトに挿入したもの) の *Pst* I/*Bam*HI サイトに挿入した。

35S::Fluc⁺

pBI221 の CaMV35S プロモーターの下流に液胞移行シグナルを欠失させたホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Firefly luciferase; Fluc⁺) を連結したものの (Matsuo et al., 2001)。

PR-1a::Fluc⁺

タバコ *PR-1a* プロモーターの下流に Fluc⁺ を連結したものの。

タバコ BY-2 培養細胞から抽出したゲノム (Murray and Thompson, 1980) を鋳型として、制限酵素 *Hind* III サイトを付加した 5' プライマー-PRF (表 1) と *Bsp*HI サイトを付加した 3' プライマー-PRF3 (表 1) を用い、KOD DNA polymerase

(TOYOBO) を反応酵素とした PCR 法によって *PR-1a* プロモーター領域、約 1580bp を増幅した。この断片を *Bsp*HI で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し続いて *Hind* III で切断し、pBluescript SKII+ (Stratagene) の *Hind* III / *Eco*R V サイトに挿入した。増幅した BY-2 培養細胞由来 *PR-1a* プロモーター配列は Big-dye terminator kit (Perkin Elmer) によるシーケンスによって確認した (DDBJ 登録番号 AB086949) (図 2)。35S::Fluc⁺ を *Hind* III / *Nco* I サイトで切断し、そこに *Hind* III / *Bsp*HI で切り出した *PR-1a* プロモーター断片を挿入した。

PR-1::Fluc⁺

シロイヌナズナ *PR-1* プロモーターの下流に Fluc⁺ を連結したものの

Pst I サイトを付加した 5'-プライマー-AtPR1pro6 (表 1) と *Nco* I サイトを付加した 3'-プライマー-AtPR1pro1 (表 1) を用い、KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素とした PCR 法にて、シロイヌナズナゲノムから *PR-1* プロモーター領域 1293bp を増幅した。35S::Fluc⁺ を *Hind* III で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑

末端化し、続いて *Nco* I で切断した。そこに *Pst* I で切断後 T7DNA ポリメラーゼで平滑末端化し、続いて *Nco* I で切断した *PR-1* プロモーター断片を挿入した。

$\Delta aslmPR-1a::Fluc^+$

PR-1a::Fluc⁺ の *PR-1a* プロモーターの *as-1-like* エlement に変異を導入したもの。site-directed mutagenesis 法 (TOYOBO) を用いた。*PR-1a* プロモーターの *as-1-like* エlement を欠失させたインバース PCR 用プライマー *aslmF primer/aslmR primer* (表 1) をデザインし、T4 Polynucleotide kinase (Takara) によって、5' 末端をリン酸化した。このプライマーを用いて KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素としたインバース PCR を行い、PCR 反応液に半量の DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara) の ligation sol. を加えてセルフライゲーションさせた (16°C, 2 時間)。これをエタノール沈殿後 H₂O に再溶解し、*Dpn* I 処理 (20 μ l 容量, 37°C, 1 時間) してメチル化している鋳型プラスミドを除去した。

$\Delta 1PR-1a::Fluc^+$

PR-1a::Fluc⁺ の *PR-1a* プロモーター 1573bp の上流 634bp を欠失させたもの。*PR-1a::Fluc⁺* を *Hind* III/*Xho* I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、セルフライゲーションさせた。

$\Delta 2PR-1a::Fluc^+$

PR-1a::Fluc⁺ の *PR-1a* プロモーター 1573bp の上流 1259bp を欠失させたもの。*PR-1a::Fluc⁺* を *Hind* III/*Acc* I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、セルフライゲーションさせた。

$\Delta 3PR-1a::Fluc^+$

PR-1a::Fluc⁺ の *PR-1a* プロモーター 1573bp の上流 1521bp を欠失させたもの。*PR-1a::Fluc⁺* を *Hind* III/*Sty* I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、セルフライゲーションさせた。

35M::TGA1a

タバコ TGA1a の cDNA 断片を 35M プロモーターの下流に連結したもの。*Bam*HI サイトを付加した 5'TGA1a primer (表 1) と *Sac* I サイトを付加した 3'TGA1a primer (表 1) を用い、KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素とした PCR 法により、タバコ cDNA から TGA1a 断片を増幅して *Bam*HI/*Sac* I で切断し、35M::GUS の *Bam*HI/*Sac* I サイトに挿入した。

35M::TGA2.1

タバコ TGA2.1 の cDNA 断片を 35M プロモーターの下流に連結したもの。
*Bam*HI サイトを付加した 5'TGA2.1 primer(表 1)と *Eco*R V を付加した 3'TGA2.1 primer (表 1) を用い、KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素とした PCR 法により、タバコ cDNA から TGA2.1 の cDNA 断片を増幅した。35M::GUS を *Sac* I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、続いて *Bam*HI で切断した。そこに *Bam*HI/*Eco*R V で切断した TGA2.1cDNA 断片を挿入した。

35M::TGA2.2

タバコ TGA2.2 の cDNA 断片を 35M プロモーターの下流に連結したもの。
*Bam*HI サイトを付加した 5'TGA2.2 primer (表 1) と *Sac* I サイトを付加した 3'TGA2.2 primer (表 1) を用い、KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素とした PCR 法により、タバコ cDNA から TGA2.2 の cDNA 断片を増幅し、35M::GUS の *Bam*HI/*Sac* I サイトに挿入した。

35M::GAL4DBD-AD

GAL4 の DNA 結合部位 (DBD) と転写活性化部位 (AD) の融合タンパク質コード領域を 35M プロモーターの下流に連結したもの。
pMA424 から GAL4 のコード領域を *Hind* III で切り出して T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、35M-E9 カセットベクター (Qin et al., 1994) の *Sal* I サイトに挿入した。

35M::GAL4DBD

GAL4 の DNA 結合部位を 35M プロモーターの下流に連結したもの。
pMA424 から GAL4 のコード領域を *Hind* III と *Cla* I で切り出して T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、35M-E9 カセットベクターの *Sal* I サイトに挿入した。

35M::DBD-TGA1a ;

GAL4DNA 結合部位(DBD)の C 末端に TGA1a 全長を融合させた発現領域を 35M プロモーターの下流に連結したもの。
pKT1A を *Eco*R I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、さらに *Bam*HI で切断して TGA1a のコード領域を切り出した。それを pBluescriptSK にサブクローンした GAL4DBD-AD の *Cla* I サイト (T7DNA ポリメラーゼで平滑

末端化)に挿入した。さらにそれを *Bam*HI で切り出し、35M-E9 カセットベクターの *Bgl*II サイトに挿入した。

35S::AtNPR1

シロイヌナズナ *NPR1* 遺伝子を pBI221 の 35S プロモーターの下流に連結したものの。

*Bam*HI サイトを付加したプライマーAtNPR1-5' (表 1) と *Eco*R I サイトを付加したプライマーAtNPR1-3' (表 1) を用い、KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素とした PCR 法により、シロイヌナズナの cDNA からシロイヌナズナ *NPR1* (AtNPR1) cDNA 断片を増幅した。pBI221 プラスミドを *Sac* I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、続いて *Bam*HI で切断した。そこに *Eco*R I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、続いて *Bam*HI で切断した AtNPR1 の cDNA 断片を挿入した。

35S::*npr1-1*

シロイヌナズナ *NPR1* の機能を失った変異 *npr1-1* を pBI221 の 35S プロモーターの下流に連結したものの。

site-directed mutagenesis 法 (TOYOBO) を用いた。AtNPR1 のアンキリンリピートに変異を導入したインバース PCR 用プライマー、n1-1 F primer/n1-1 R primer (表 1) をデザインし (Cao et al., 1997)、T4 Polynucleotide kinase (Takara) によって、5'末端をリン酸化した。このプライマーを用いて KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素としたインバース PCR を行い、PCR 反応液に半量の DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara) の ligation sol.を加えてセルフライゲーションさせた (16°C, 2 時間)。これをエタノール沈殿後 H₂O に再溶解し、*Dpn* I 処理 (20 μl 容量, 37°C, 1 時間) してメチル化している鋳型プラスミドを除去した。

35S::AtNPR1-AD

35S::AtNPR1 の *NPR1* の C 末端側に GAL4 の転写活性化部位 (AD) を連結し、*NPR1* と GAL4AD の融合タンパク質を発現させるようにしたものの。

*Bam*HI を付加したプライマーAtNPR1-5' (表 1) と *Sal* I サイトを付加したプライマーNPR1 3'-*Sal* (表 1) を用い、KOD-Plus (TOYOBO) を反応酵素とした PCR 法により、35S::AtNPR1 プラスミドを鋳型として AtNPR1 の cDNA 断片を増幅した。35S::GAL4AD (pBI221) を *Xba* I で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、続いて *Sal* I で切断した。そこに *Bam*HI で切断後 T7DNA ポリメラーゼによって平滑末端化し、続いて *Sal* I で切断した AtNPR1 の cDNA 断

片を、GAL4AD の N 末端側に in-frame になるように挿入した。

タバコ BY-2 培養細胞の継代培養

300ml のフラスコに NT 培地を 100ml 入れ、定常期に達した継代 5～7 日目の BY-2 細胞を 2ml 植え継ぎ、振盪培養（125rpm, 28℃）した。

パーティクルガンによる遺伝子導入

パーティクルガンは PDS-1000/He System（BIO RAD）を用いた。

(1) マイクロキャリア（金粒子）の作製

60mg の金粒子をエッペンドルフチューブに入れ、1ml の 70 %エタノールを入れて 3 分間ボルテックスして、15 分間静置した。遠心分離（15000 rpm, 1 分間）して上清を捨て、1ml の滅菌水を加えて 1 分間ボルテックスして、1 分間静置した後、遠心分離（15000rpm, 5 秒）した。この操作を 2 回繰り返して上清を捨てた後、1ml の 50%グリセロール液又は滅菌水に懸濁させマイクロキャリア液とした。

(2) DNA の金粒子への吸着

マイクロキャリア液をボルテックスでよく懸濁してから 25 μ l をエッペンドルフチューブに入れ、2 μ l のサンプル DNA (1 μ g/ μ l)、2 μ l の内部標準 DNA (1 μ g/ μ l)、25 μ l の 2.5M 塩化カルシウム、10 μ l の 0.1M スペルミジンを加え、1 分間ボルテックスした後、氷水中で 1 分間静置した。遠心分離（12000rpm, 1 分間）して上清を除いた後、100 μ l の 70%エタノールで 1 回、100%エタノールで 1 回洗浄し、35 μ l の 100%エタノールに懸濁した。十分に懸濁させながら 8 μ l ずつマイクロキャリアにのせ風乾した。

(3) サンプルの調整

タバコ BY-2 培養細胞は、直径 5cm のシャーレに継代 5～7 日目の細胞を約 1ml 拡げて水分を除去したものをサンプルとして用いた。シロイヌナズナはロゼッタ葉を用いた。

(4) パーティクルガンによる遺伝子導入

パーティクルガンの装置に、ラプチャーディスク、マイクロキャリア、ストップングスクリーンをセットし、以下の条件で打ち込みを行った。

マクロキャリアー移動距離 1.5cm
真空度 28inches Hg
ヘリウム圧 1100psi
標的距離 9.5cm

ルシフェラーゼ活性の測定

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。

(1)ルシフェラーゼの抽出

パーティクルガン法によりプラスミドを打ち込んだ試料に NT 培地を加え、 $150\mu\text{M}$ サリチル酸を最終濃度 $30\mu\text{M}$ になるように添加し、1ml 容量で室温、20～22 時間静置培養した。遠心分離した後 NT 培地を取り除き、 $200\mu\text{l}$ の Passive Lysis Buffer を加え、氷冷しながらホモジェナイザーを用いて 10 秒間すり潰した。遠心分離 ($12,000\text{ rpm}$, 1 分間, 4°C) の後、上清を粗酵素液として使用した。

(2)ルシフェラーゼ活性の測定

$8\mu\text{l}$ の粗酵素液を遮光した試験管に分注し、 $40\mu\text{l}$ の Luciferase Assay Reagent II (LAR II) を加え、ピペッティングによって混合しルミノメーター (Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 (Promega)) でホタルルシフェラーゼ活性を定量した。引き続き同じ試験管に $40\mu\text{l}$ の Stop&Glo Reagent を加え LB9501 Autolumat により内部標準として用いたウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

形質転換植物を用いたルシフェラーゼ活性測定

ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子による形質転換植物のルシフェラーゼ活性の測定には、ARGUS-50/VIM システム (浜松ホトニクス株式会社) の CCD カメラを用いた。形質転換植物は 0.1mM ルシフェリン水溶液をスプレーして測定を行った。

シロイヌナズナ種子の EMS 処理

蒸留水 90ml とエチルメタンスルホン酸 (Ethyl methanesulfonate: EMS) $300\mu\text{l}$ を

300ml の三角フラスコに入れてふたをし、フラスコ内の液体を静かに回転させて EMS を溶解させた。蒸留水で数回洗った M0 種子 200mg を 10ml の蒸留水に懸濁し、EMS 水溶液に移して約 16 時間ドラフト内のシェーカーで静かに振とうした。EMS 水溶液を取り除き、種子を蒸留水に懸濁し、50ml 容の遠沈管で遠心 (500rpm, 1 分間, 室温) して種子を集め、上清を除く。40ml の蒸留水に懸濁して 5 分間振とうし、遠心して上清を除く。これを 3 回くり返す。再び 40ml の蒸留水に懸濁して 30 分間静かに振とうし、遠心して上清を除く。これを 3 回くり返す。最後に 40ml の蒸留水に懸濁して 1 時間静かに振とうし、遠心して上清を除き、500ml の 0.1% 寒天溶液中に懸濁した。100ml ずつ分注し、10ml ピペットで 20cm×50cm のプランター 5 台に散布した。

シロイヌナズナ形質転換

連続照明下で、22℃で約 3 週間育てたシロイヌナズナを用いた。形質転換はアグロバクテリウム法を用いた。形質転換アグロバクテリウムを、200ml の適当な抗生物質を含む LB 培地で 28℃、約 18 時間 (OD600 が 1.2~1.5) 振とう培養した。培養液を集菌し、OD600 が 0.8 になるように浸潤用懸濁培地 (1/2×MS, 1/2×(0.5%) Gamborg B5 ビタミン溶液(1g チアミン, 100mg ピリドキシン, 100mg ニコチン, 10g ミオイノシトール), 5% スクロース, 0.5g/l MES, 使用直前に 1μg/μl ベンジルアミノプリン DMSO 溶液を 10μl/l(終濃度 0.044μM), 0.02% silwet L-77 を加える) に懸濁した (約 2/3 希釈)。500ml 入りビーカーに入れたアグロバクテリウム懸濁液に、シロイヌナズナを鉢を逆さにして浸した。鉢の土が軽くなるまで乾燥させ、その後少量の水を与えた。約 2~4 週間で成熟・乾燥してきた種子を回収した。

タバコ形質転換

プラントコーンで無菌的に生育したタバコを用いた。形質転換アグロバクテリウムは適当な抗生物質を含む LB 培地で 28℃、約 2 日間振とう培養した。タバコの中位葉を滅菌したピンセットとメスを用いて約 1cm 片に切断し、アグロバクテリウム培養液に浸しながら葉の表面にメスで傷をつけ、タバコ再生培地 (MS+ 2mg/l ベンジルアミノプリン, 0.075mg/l 3-インドール酢酸) 寒天培地に移した。葉を培地に接触させ、28℃で 3~4 日間置いた。次に葉をタバコ再生培地+KC (タバコ再生培地+ 50mg/l カナマイシン, 250mg/l カルベニシリン) 寒天培地に移し、葉を培地に接触させた。28℃で 3~4 週間のうちにカルスが生長し、

シュートが発生した。カルスを除いてよく生長したシュートを MSKC 寒天培地に移した。形質転換体の根は約 1~2 週間で生長した。根や茎、葉が生長したものを MSKC プラントコーンに継代し、十分に生育させたのち土に移した。次の T2 世代を発現解析などに用いた。

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法

タバコやシロイヌナズナロゼッタから葉を採取し、RNeasy Plant Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出したのち、DNase I にて混入したゲノミック DNA を分解処理した。吸光度計で濃度を測定し、200ng の全 RNA を RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 (Takara) による RT-PCR に用いた。Oligo dT Adapter Primer をプライマーとして 42°C30 分間逆転写反応を行い、99°C5 分間処理して逆転写酵素を不活性化後 5°Cに置いた。このように合成した 1st strand cDNA を鋳型として遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応条件は、熱変性 94°C 30 秒間、対合 60°C30 秒間、伸長反応 72°C30 秒間を 1 サイクルとして 25~30 サイクルとした。PCR 反応産物は 1%アガロースゲルにて電気泳動した。続いて増幅した DNA 断片を Hybond N+ (Amersham Bioscience) へ転写し、AlkPhos Direct (Amersham Bioscience) により、添付のプロトコールに従って DNA ゲルブロット解析を行った。プローブは、AtNPR1 プローブは 35S::AtNPR1 (pBI221) プラスミドを鋳型として AtNPR1-5' / AtNPR1-3' (表 1) を用いて PCR 法によって AtNPR1cDNA の全長を増幅、精製した。

RNA ブロット法

タバコは本葉 5、6 枚以上を展開した植物から上、中位葉を採取し、シロイヌナズナはロゼッタ葉 10 枚以上を採取し、液体窒素によって急速凍結した。採取した葉から、ATA (aurin tricarboxylic acid) 法を用いて total RNA を精製した。液体窒素中で葉を破碎し、抽出バッファー (50mM Tris-HCl(pH8.0), 300mMNaCl, 5mM EDTA, 2mM aurin tricarboxylic acid, 2% SDS) を加えてよく懸濁した。2M KCl (終濃度 0.37M) を加え、水中に 30 分間静置した。12,000rpm、15 分間 4°Cで遠心後、上清に 8M LiCl を 2mM 加え、一晚水中に静置した。12,000rpm、15 分間 4°Cで遠心し沈澱を蒸留水に溶解した。フェノール/クロロフォルム処理後、エタノール沈澱によって RNA を回収した。吸光度計を用いて濃度を測定し、20 μ g を RNA ブロットングに用いた。変性アガロースゲル (1 \times MOPS, 18%ホルムアルデヒド, 1% agarose) を用いて電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染

色液 (50mM NaOH, 1 μ g EtBr) に浸し 25 分間振とう培養し、ゲル中和・脱染色液 (200mM CH₃COONa (pH4.0)) に浸し、30 分間振とうした。UV トランスイルミネーターで写真撮影し rRNA 量を確認した後、メンブレンブロッティングを行った。ブロッティングはブロッティングバッファー (0.03M NaOH) を用いて、Hybond N+ナイロンメンブレン (Amersham Bioscience) に 3 時間トランスファーした。ハイブリダイゼーションは AlkPhos Direct (Amersham Bioscience) を用い、付属のプロトコールに従って行った。プローブの調整は、*PR-1a* プローブはタバコゲノムを鋳型として PR-1a プライマーセット PR1a5 / PR1a3 (表 1) を用いて PCR 法で増幅、精製した。*AtPR1* プローブは、シロイヌナズナゲノム鋳型として PR-1 プライマーセット AtPR1-5 / AtPR1-3 (表 1) を用いて PCR 法で増幅、精製した。

用いたプライマーの配列

表 1

PRF	GGGAAGCTTAAGGACTAAGATATACGAGG
PRF3	GGGTCATGACTATAGGAGAAATGTTGTAT
PR1a5	CGTCTAGATGGGATTTGTTCTCTTTTCAACA
PR1a3	CGGGATCCGTATGGACTTTCGCCTCTATAATTAC
AtPR1-5	TCTCTAGATGAATTTTACTGGCTATTCTCGATTTTAAATC
AtPR1-3	TCGAGCTCTAGTATGGCTTCTCGTTCACATAATTC
5' TGA2.2 primer	GGGGATCCATGGCTGATATCAGTCCTAGTACA
3' TGA2.2 primer	GAGAGCTCTTATTCCCGGGGGCGAGCAA
5' TGA2.1 primer	GAGGATCCATGGCTAGTAAGATTGGTACAGCAGGCA
3' TGA2.1 primer	GTGATATCTCATACTAACTGCTCTCGTGGTCTGGCA
NPR1 3'-Sal	GGGTCGACCCCGACGACGATGAGAGAGTTT
5' TGA 1a primer	CAGGATCCATGGGTATATGCGATCCGATCCAT
3' TGA 1a primer	CTGTGCGACTTAGGTAGGCTCACGTAGACGAGT
as-1-M1	ACTGGTGTAAGGGATGATGCACAATCCCAC
as-1 M2	GGAGATATTACATCAATCCAATTGCTTTGA
AtPR1pro1	CAGCTGCAGGTAATAATATCCTATGGTGTC
AtPR1pro6	ACGCCATGGATTTTGGGGTTCGTAAACATC
AtNPR1-5'	CCGGATCCATGGACACCACCATTGATGGATTC
AtNPR1-3'	CCGAATTCTCACCGACGACGATGAGAGAGTTTAC
asLm primer(F)	AGATCTCGGCCATGTTCAAGTTTTCCACAA
asLm primer(R)	CGATCTCGTTAAATAACTATCAAATTTGGAC
npr1-1 F primer	GGGATATACGGTGCTTTATGTTGCT
npr1-1 R primer	CTCGGATTCCTATGGTTGACATCGG

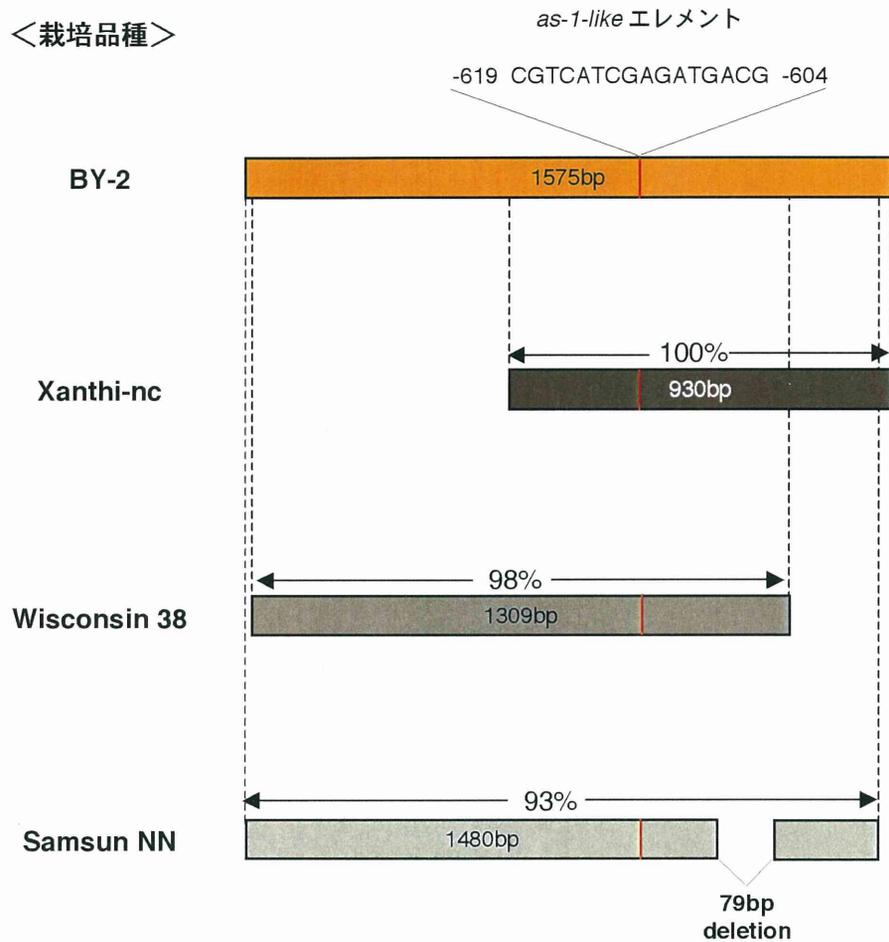


図2. 栽培品種ごとのタバコ*PR-1a*プロモーターの比較

BY-2: 本研究でタバコBY-2培養細胞から単離したプロモーター配列。

*as-1-like*エレメント: サリチル酸シグナルの応答配列。

(Cornelissen et al., 1987; Payne, 1988; Gruner and Pfitzner, 1994)

**3. 病害応答シグナルの転写制御解析における
一過的発現系の構築**

3-1. 序論

SAR 誘導機構は複雑なネットワークを形成すると考えられるため、SAR 関連因子の機能を解析するためには、シグナル物質による影響だけでなく SAR 関連遺伝子など複数の因子の相互作用を検出する必要がある。しかし、アグロインフェクション法を用いた遺伝子導入による形質転換では、複数の因子を同時に導入することが極めて困難であり、形質転換体同士の交配などが必要になるため、解析に時間がかかってしまう (図 3A)。また、形質転換体では複数の遺伝子を導入した場合、各々の遺伝子の発現レベルを調節できないという問題もある。

一方、遺伝子銃による遺伝子導入は、アグロインフェクション法とは異なり、複数のプラスミドの同時導入が可能であり (図 3B)、導入遺伝子がゲノムに挿入されないため、発現レベルもプロモーターの種類に依存する。そこで本研究では、複数の因子による発現制御解析を行うため、遺伝子銃を用いた一過的発現解析系の構築を試みた。則ち、SAR の指標である *PR* 遺伝子プロモーターにホタルルシフェラーゼ (*Fluc*) 遺伝子を連結した高感度レポーター (*PR-1a::Fluc⁺*) をタバコ BY-2 培養細胞に遺伝子銃によって導入し、SAR 誘導剤による一過的な発現誘導を、*Fluc* 活性上昇として検出する実験系を構築した。さらにこの系を応用して SAR 誘導に関与する因子の解析を行うために、SAR 誘導剤処理だけでなく SAR 関連因子を発現するプラスミドの同時導入を行い、*PR* 遺伝子の発現誘導解析を試みた。

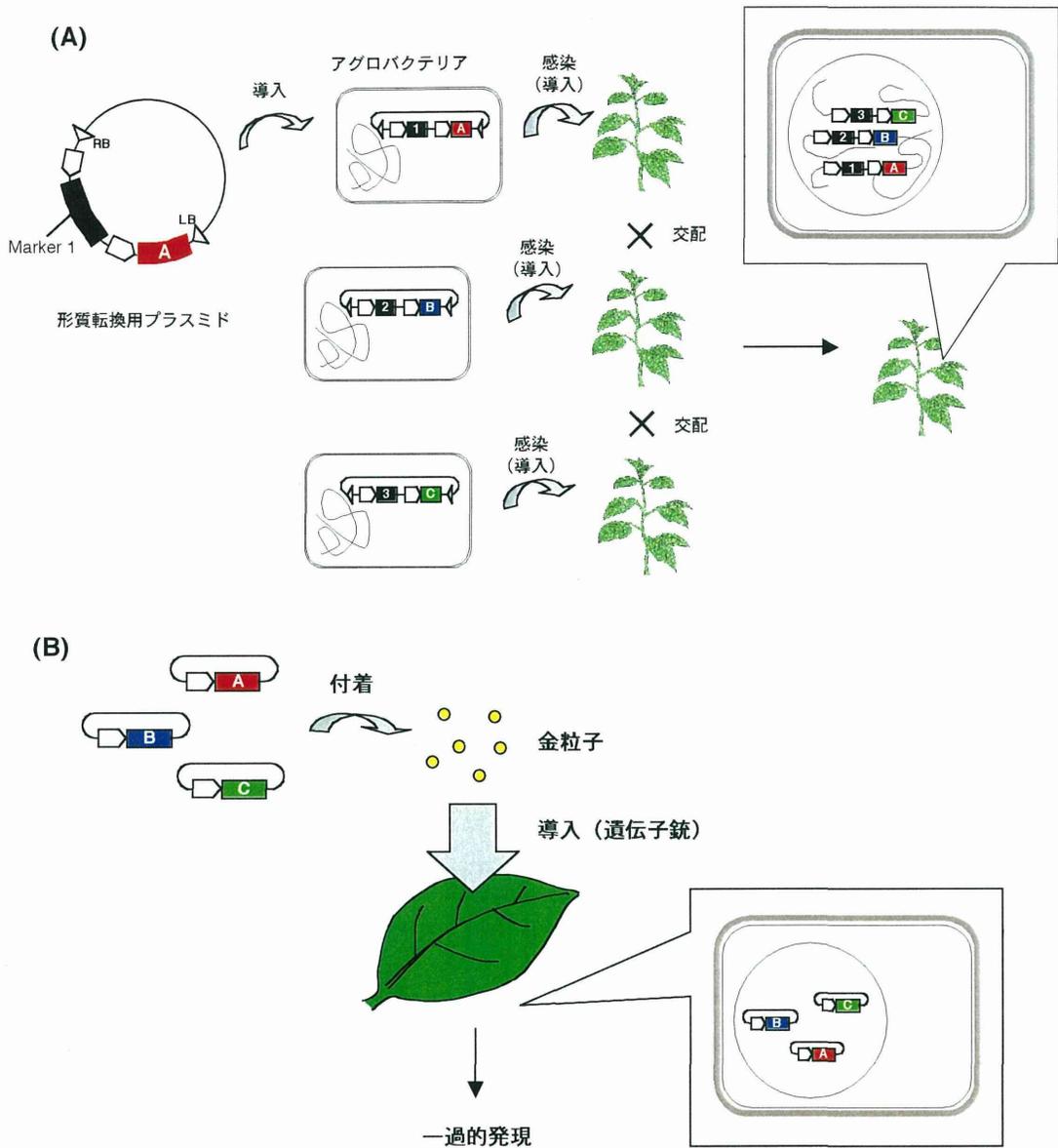


図3. 複数の因子の機能を解析する場合の問題点

(A) アグロバクテリウム法による形質転換植物の作成過程。複数の遺伝子を導入する場合、一つの遺伝子形質転換体を作成し、それらを交配させる。各々の段階で約一ヶ月を必要とし、形質転換体の選定にも時間がかかる。また各遺伝子の発現レベルを制御できない。

(B) 本研究で用いた、遺伝子銃による一過的遺伝子導入。因子間の転写相互作用解析は一過的発現でも可能である。金粒子に因子発現プラスミドを付着させ、遺伝子銃によって組織に打ち込むだけで、容易に細胞内に導入される。解析に要する時間は一日。

3-2. 結果

3-2-1. 一過的発現解析系による *PR-1a::Fluc*⁺ のサリチル酸による発現誘導

遺伝子銃を用いてタバコ BY-2 培養細胞にプラスミドを導入し、一過的発現解析によって SAR 誘導が検出可能であるか調査した。タバコ *PR-1a* プロモーターを改変型ホタルルシフェラーゼ (*Fluc*⁺) 遺伝子と連結した *PR-1a::Fluc*⁺ をレポータープラスミドとして用い、*PR-1a* プロモーターの活性誘導を *Fluc* レポーター活性として検出し、SAR 誘導の指標とした (図 4A)。遺伝子銃の遺伝子導入効率の内部標準としてウミシイタケルシフェラーゼ (*Rluc*) を構成的に発現させるプラスミド (*35S::Rluc*) を用い (図 4A)、レポータープラスミド *PR-1a::Fluc*⁺ と共に BY-2 細胞に導入した。これにサリチル酸溶液を添加し、室温で静置培養したのち 20~22 時間後に *Fluc/Rluc* の相対活性を算出し、この値を *PR-1a* プロモーター活性とした。レポーター活性の測定方法には *Fluc* 活性と *Rluc* 活性を一つのサンプルから検出する Dual luciferase reporter assay system (DLRA) を用いた (図 4B)。図 5B に示したように *PR-1a::Fluc*⁺ を導入した BY-2 細胞では対照区として処理した蒸留水と 4HBA (4-hydroxybenzoic acid) と比較して、サリチル酸存在下での *Fluc/Rluc* 相対活性が約 2 倍に増大している様子が観察された。4HBA はサリチル酸の類似体であるが、*PR-1a* 発現を誘導しない化合物である。一方、*35S::Fluc*⁺ を導入した場合には恒常的に高い *Fluc* 活性が検出され、サリチル酸による発現誘導は起らない。

3-2-2. サリチル酸による *PR-1a* 発現誘導パターン

この一過的発現解析系における、サリチル酸による *PR-1a* 発現パターンを解析するため、*PR-1a::Fluc*⁺ 発現をサリチル酸濃度別に、また経時的に調べた。*PR-1a* 発現誘導の濃度依存性が検出されるのは 10~50 μ M のサリチル酸を処理した場合であった (図 6A)。100 μ M 以上の濃度ではレポーター活性は検出されなかった。

サリチル酸処理による *PR-1a::Fluc*⁺ 発現誘導の経時変化は、サリチル酸処理後 12 時間後から発現上昇率が高くなり、18~24 時間後に発現が最高に達する (図 6B)。ただし、18 時間後では、誘導レベルに変動があったため (データ省略)、完全に誘導が最高に達するのは 20~24 時間後の間であると考えられる。このアッセイ系における BY-2 細胞内での *PR-1a::Fluc*⁺ 発現誘導の検出は 20~22 時間後が至適であると判断された。

3-2-3. CaMV 35S プロモーターの *as-1* シスエレメントに対するサリチル酸の作用

の検出

Qin (1994) らは、サリチル酸が CaMV35S プロモーターに含まれる *as-1* シスエレメントに作用し、転写を活性化することを報告している。そこで本研究でも、35S プロモーターのサリチル酸による誘導の有無を検証した。35S プロモーターの *as-1* エレメントを変異させたプロモーター（以降 35M とする）を Rluc の上流に連結したプラスミド(図 7A)を用い、サリチル酸処理による相対活性を 35S::Rluc と比較した。遺伝子銃による遺伝子導入の内部標準には 35M::Fluc⁺を用いた。35S::Rluc を導入した BY-2 細胞ではサリチル酸によってわずかに Rluc 活性の上昇が検出されたが、35M::Rluc では観察されなかった (図 7B)。

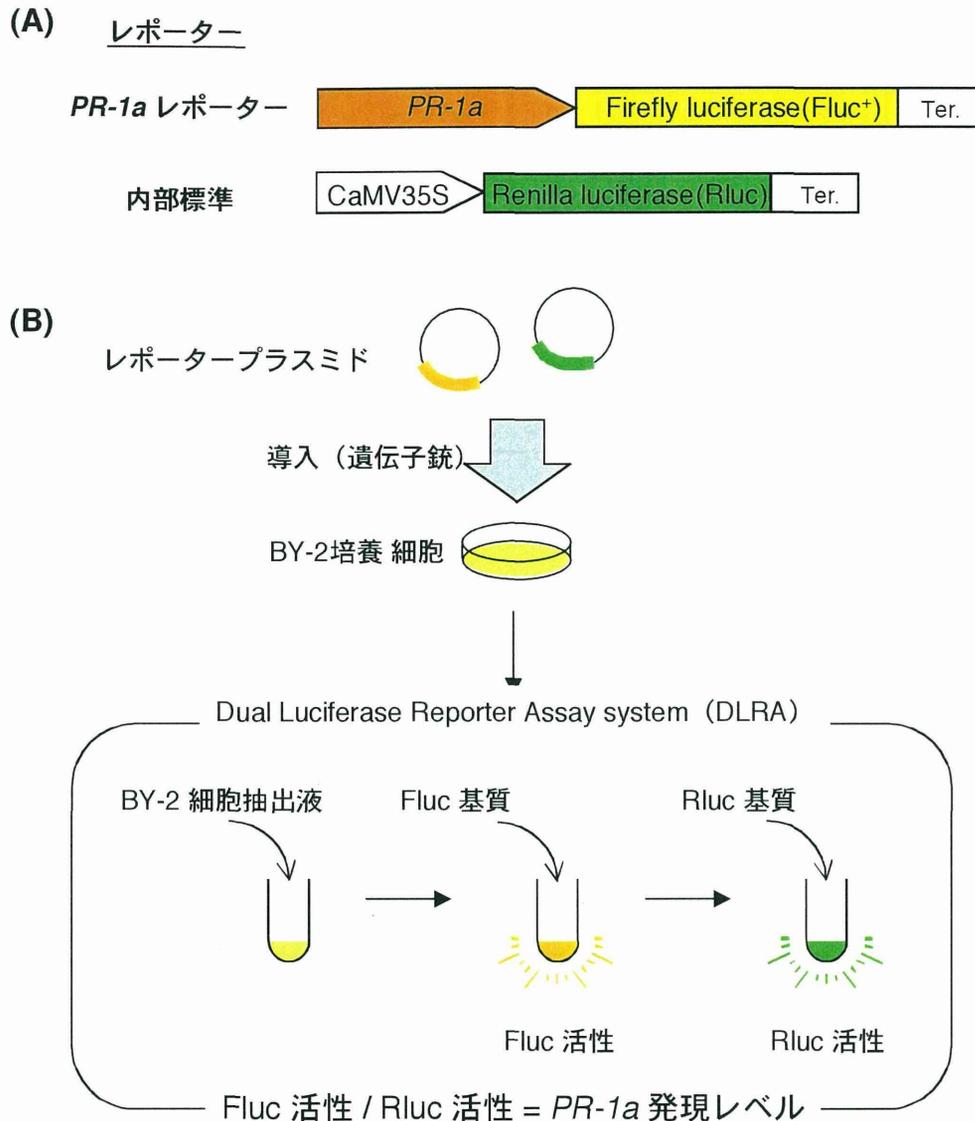
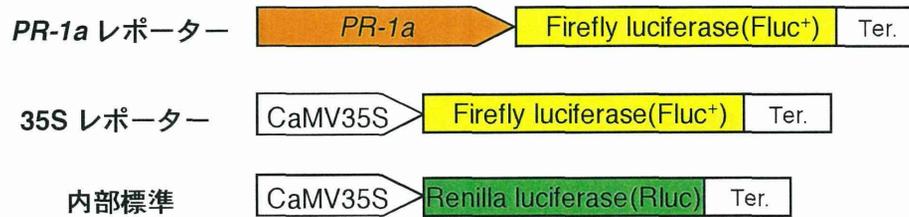


図 4. 本研究で用いた一過的発現解析系

- (A) 用いたレポーター遺伝子の構造。PR-1aレポーター；タバコPR-1a遺伝子プロモーターにホタルルシフェラーゼ (Fluc⁺) 発光遺伝子をレポーターとして連結した。内部標準；遺伝子銃による導入効率の内部標準。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35S恒常発現プロモーターにウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) 発光遺伝子を連結した。
- (B) 実験操作手順。遺伝子銃によってレポータープラスミドをタバコBY-2細胞に導入し、Dual Luciferase Reporter Assay system (DLRA) を用いてレポーター活性を測定した。Fluc/Rluc相対活性がPR-1a発現量を示す。

(A) レポーター



(B)

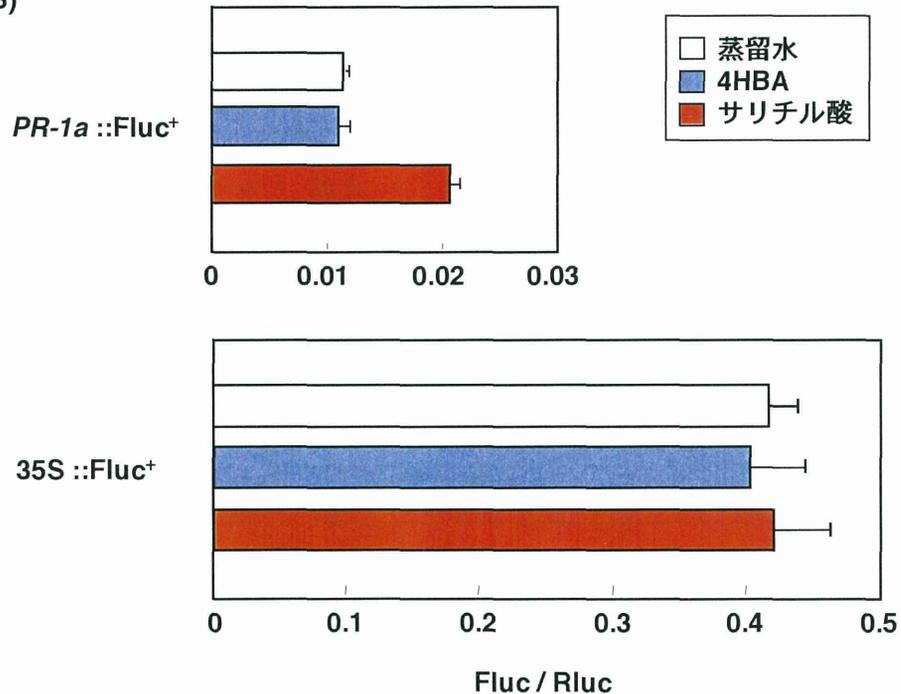


図5. *PR-1a*のサリチル酸処理による発現誘導の検出

- (A) 用いたレポーター遺伝子の構造。 *PR-1a*レポーター、内部標準；図4と同じ。35Sレポーター；病害応答に関与しない遺伝子のレポーター。恒常的発現を示すCaMV35SプロモーターにFluc⁺遺伝子を連結した。
- (B) 一過的発現解析系による *PR-1a*発現誘導の検出。(A)のコンストラクトを遺伝子銃を用いて5~6日間培養したタバコBY-2細胞に遺伝子導入した。導入後蒸留水または30 μ Mサリチル酸/4HBAを処理し、22時間室温で静置培養した。Fluc、Rluc活性はDLRAによって測定した。

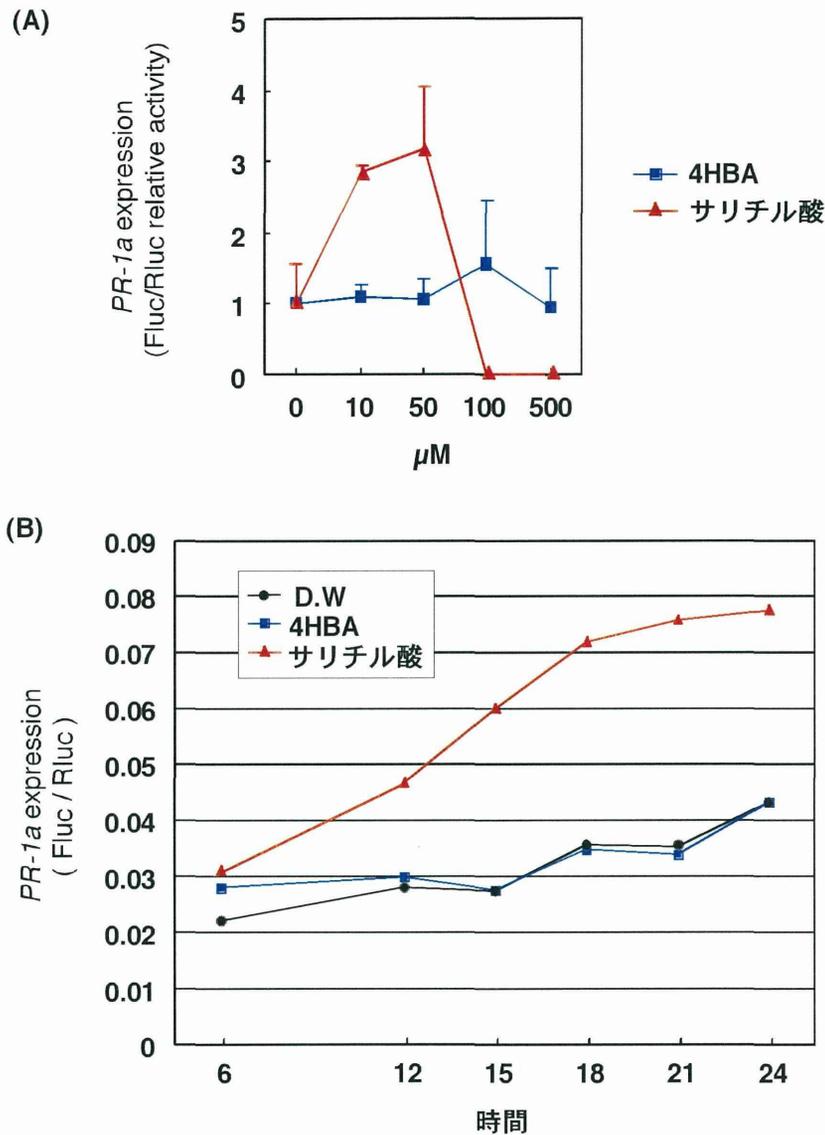


図 6. *PR-1a* のサリチル酸処理による発現誘導の検出

- (A) サリチル酸濃度別 (0、10、50、100、500 μM) 処理による *PR-1a::Fluc*⁺ 発現誘導レベルの比較。0 μM 4HBA 処理区の Fluc/Rluc 活性値を 1 とした。*PR-1a* レポーター、内部標準 (図 4) を遺伝子銃を用いて 5~6 日間培養したタバコ BY-2 細胞に遺伝子導入した。
- (B) サリチル酸処理 (30 μM) による発現誘導の経時変化。導入後蒸留水またはサリチル酸/4HBA を処理し、22 時間室温で静置培養した。Fluc、Rluc 活性は DLRA によって測定した。

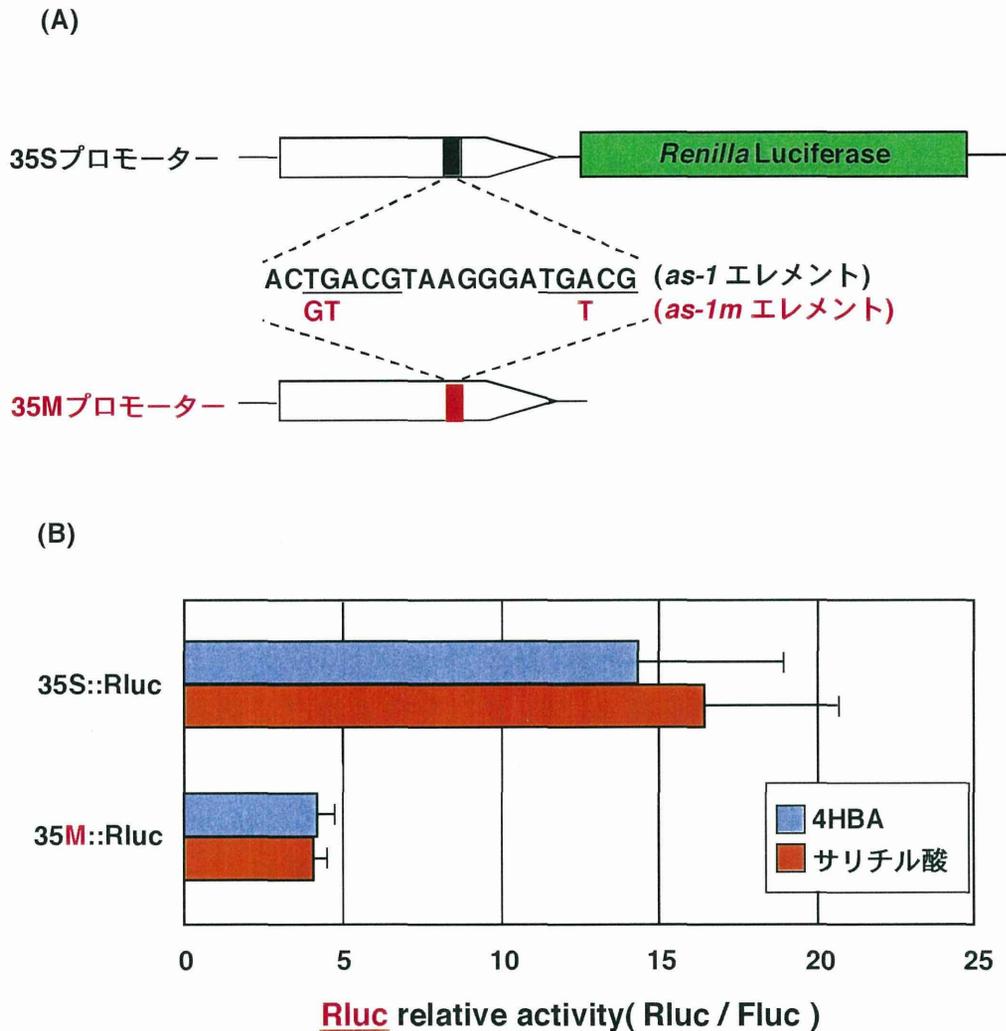


図 7. CaMV35Sプロモーターの*as-1*エレメントへのサリチル酸の作用

(A) CaMV35Sプロモーターの*as-1*エレメントに変異導入した35Mプロモーター。

(B) 一過的発現解析系。サリチル酸による35Sプロモーター活性化の検出。

(A) のコンストラクトを遺伝子銃を用いて5~6日間培養したタバコBY-2細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入内部標準として35M::Fluc+を同時導入した。導入後30 μ Mサリチル酸/4HBAを処理し、22時間室温で静置培養した。Fluc、Rluc活性はDLRAを用いて測定した。

3-3. 考察

本研究はルシフェラーゼをレポーターとした遺伝子銃による一過的発現解析系により、これまでに報告されたサリチル酸の外的処理による *PR-1a* 発現の高感度検出に成功した。

PR-1a 発現誘導のサリチル酸の至適濃度は、本研究では 10~50 μ M という結果が得られ (図 6A)、既報のタンパク発現解析の結果と一致した (Xie et al., 1998)。タバコ葉の場合は、1~5mM のサリチル酸が *PR-1a* 発現誘導の至適濃度であるが、タバコ培養細胞の場合は、サリチル酸が細胞内に浸透しやすいために葉と比べて非常に低い濃度で誘導される。また本研究で得られた結果では、100 μ M 以上の高濃度のサリチル酸を処理すると (図 6A) レポーター活性自体が低下するものが現れた (データ省略)。これは BY-2 細胞に高濃度薬剤によるストレスがかかったためであると考えられた。ただし、50 μ M 処理でも、Fluc、Rluc 絶対活性ともに低下する場合があります、データに変動が現れた (図 6A, エラーバー)。そのため、BY-2 細胞での一過的発現解析系における *PR-1a::Fluc*⁺ 発現誘導の解析に適したサリチル酸の濃度を 30 μ M とした。

図 6B のサリチル酸による *PR-1a* 発現誘導の経時変化は過去の報告に一致するものであった (Friedrich et al., 1996; Horvath and Chua, 1996)。サリチル酸処理と同様の作用を及ぼす BTH (benzo(1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester) をタバコに処理した場合のタバコ *PR-1a* の発現誘導の RNA ブロットによる解析では、処理後 12 時間で発現が検出され始め、その後さらに発現が上昇していく (Friedrich et al., 1996)。本研究の実験系は、一過的発現であるため 24 時間以降の発現パターンは解析できないが、薬剤処理による誘導の時期は一致した。また本研究で得られた結果では、サリチル酸による誘導時の *PR-1a* 発現は非誘導時の約 1.5~2 倍であり、過去の RNA ブロット法などによる内在性 *PR-1a* 発現誘導解析の結果よりも低い誘導レベルになった。この誘導レベルの違いは、遺伝子銃による一過的発現解析系であることが原因と考えられた。遺伝子銃による遺伝子導入は細胞を傷つけるため、この際に誘導される傷害シグナルによってサリチル酸シグナルが抑制され、*PR-1a* 発現誘導レベルが低くなっている可能性がある。また、サリチル酸未処理区での *PR-1a* 発現量が高かった。これも遺伝子銃を用いた手法による可能性がある。つまり、形質転換体などでは通常 1 コピーのコンストラクトが細胞に導入されるが、本実験系では金粒子に付着したプラスミドが染色体外 DNA として多数導入されることで、転写因子との相互作用が多少異なる可能性も考えられた。

この一過的発現解析系により、既報の CaMV35S プロモーターへのサリチル酸

の作用 (Qin et al., 1994) も検出された (図 7)。これまでの一過的発現解析では 35S::Rluc を内部標準に用いていたが (図 5, 6)、*PR-1a* プロモーター活性のサリチル酸による誘導は検出された。従ってサリチル酸による 35S プロモーター活性化は *PR-1a* プロモーター活性化の検出を妨害する程ではなかったと考えられる。ただし、内部標準が僅かでも発現を誘導されることは、発現誘導解析において障害となるので、35S プロモーターは遺伝子導入の内部標準としては用いない方が良いと考えられた。以降の解析には 35S プロモーターの *as-1* エlement に変異を導入した 35M プロモーター (図 7A) を用いることにした。

これらの実験結果は、この一過的発現解析系が病害応答シグナルの発現解析に有効であることを示すものである。

4. 一過的発現解析系を用いたエフェクターによる
PR-1a 発現誘導解析

4-1. 序論

病害抵抗性反応において、サリチル酸シグナルでは NPR1 を介して PR 遺伝子の発現が誘導されると考えられている。一方、ジャスモン酸/エチレンシグナルは傷害によっても誘導され、サリチル酸シグナルとジャスモン酸/エチレンシグナルは互いに拮抗的作用を及ぼすことが知られている。(Harms et al., 1998; Niki et al., 1998; Guputa et al., 2000)。

NPR1 はトマトやイネ、タバコなどでも相同遺伝子が単離されているが、シロイヌナズナで最も研究が進んでいる。シロイヌナズナ NPR1 (AtNPR1) はタンパク質相互作用部位として知られるアンキリンリピートと BTB/POZ (*broad-complex*, *tramtrack*, and *bric-a-brac/poxvirus*, *zinc finger*) 部位を持ち、DNA 結合部位は持たないことから (Cao et al., 1997; Ryals et al., 1997; Glazebrook et al., 2001)、他のタンパク質に作用して SAR シグナルを活性化していると考えられた。その後、AtNPR1 は、サリチル酸シグナルにおいて PR 遺伝子発現を誘導する転写因子と結合することが yeast two-hybrid 法によって示された。(Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000)。さらに、AtNPR1 がサリチル酸シグナル存在下で *PR-1* プロモーターへの転写因子の集合と結合を促進することが報告された (Despres et al., 2000; Johnson et al., 2003)。これらのことから、AtNPR1 は転写因子を活性化させ、*PR-1* 発現誘導を促進する因子であると考えられている。

AtNPR1 が作用するのはサリチル酸シグナルだけではないことが最近の研究によって示されている。AtNPR1 はジャスモン酸/エチレンシグナルを抑制すること、サリチル酸による PR 遺伝子発現には AtNPR1 の核移行が必要だが (Kinkema et al., 2000) ジャスモン酸/エチレンシグナルの抑制には必要ないことが報告されている (Spoel et al., 2003)。これらの知見から、AtNPR1 は核内ではサリチル酸によって誘導されるシグナルの活性化に関与し、細胞質ではサリチル酸シグナルに拮抗的なジャスモン酸/エチレンシグナルを抑制するという、シグナルクロストークに関与する因子であることが考えられる。さらに、シロイヌナズナでは、induced systemic resistance (ISR) はジャスモン酸/エチレンシグナルを必要とするが、一方で AtNPR1 も必要とする (Pieterse et al., 1998)。これらのことから、AtNPR1 がサリチル酸シグナルだけでなくジャスモン酸/エチレンシグナル、ISR シグナルにも主要な制御因子として機能し、病害抵抗性誘導全体において重要な役割を担っていることが示唆される。この AtNPR1 がタバコ細胞でシロイヌナズナ細胞と同様に働き、*PR-1a* 発現を誘導するかを、本研究で構築した一過的発現解析系を用いて確かめることにした。

本研究は AtNPR1 によるタバコ *PR-1a* 発現誘導の促進を解析するという、異種

間による実験系を用いた。過去の例では、35S::AtNPR1 を導入した形質転換シロイヌナズナでは内在性の遺伝子を過剰発現させたことによって、多数の株が相同配列に依存した遺伝子共抑制を起こしたという報告がある (Cao et al., 1998; Friedrich et al., 2001)。この他に、シロイヌナズナ TGA 因子をシロイヌナズナで過剰発現させた場合でも得られた形質転換体のうち約 80% が遺伝子共抑制を起こしたと報告されている (Pontier et al., 2002)。そのため Pontier らはタバコをシロイヌナズナ TGA の導入宿主として用いている (Pontier et al., 2002)。この例だけでなく、内在性の遺伝子を高発現させると遺伝子共抑制が起りやすいということはよく知られている。これらのことを考慮すると、タバコの *NPR1-like* 遺伝子をタバコの中で過剰発現させれば、病害抵抗性が向上する株は得られるかも知れないが、遺伝子共抑制がおこる可能性が高い。異なる種に由来する AtNPR1 を過剰発現させたタバコならばその可能性が低くなり、応用展開を考慮した場合にも、むしろ運用上の利点となる。そこで、本研究では AtNPR1 のタバコにおける病害応答シグナルへの作用を、一過的発現解析系を用いて明らかにすることを試みた。

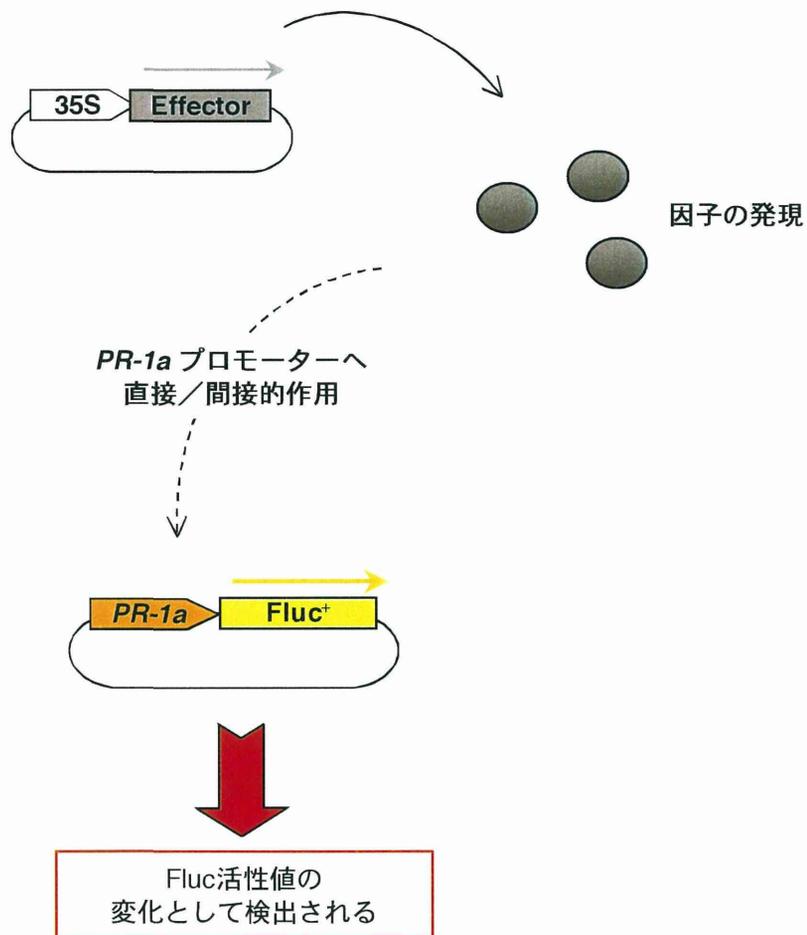


図 8. *PR-1a*プロモーターへ関与する任意のエフェクター発現プラスミドを一過的発現解析系において同時導入した場合のエフェクターの作用予想図
*PR-1a*レポーターと同時導入されたエフェクタープラスミドから発現した因子が*PR-1a*発現に関与する因子であれば、*PR-1a*プロモーターに作用し、Fluc活性の変化として検出される。

4-2. 結果

4-2-1. *PR-1a::Fluc*⁺の AtNPR1 同時導入による発現誘導

前章で示した通り、遺伝子銃による一過的遺伝子導入では複数のプラスミドの同時導入が可能である。本研究の解析系を用いれば、例えば任意の因子発現プラスミドを *PR-1a::Fluc*⁺ と同時導入・発現させれば、*PR-1a* 発現誘導に関与する因子である場合、Fluc 活性の変化として検出され、容易に *PR-1a* 関連因子の探索を行うことができると考えた (図 8)。本研究で用いた一過的発現解析系の有用性を確かめるため、シロイヌナズナ NPR1 (AtNPR1) を恒常発現プロモーターCaMV35S に連結したプラスミド (35S::*AtNPR1*) を作製し、遺伝子銃を用いて *PR-1a::Fluc*⁺ と共に BY-2 細胞に同時導入した (図 9A)。その結果、35S::*AtNPR1* 同時導入ではサリチル酸存在下・非存在下ともに、対照区に比べて約 2~3 倍の *PR-1a* プロモーター活性誘導を示した (図 9C)。AtNPR1 のタンパク質相互作用部位と考えられるアンキリンリピートが変異した *npr1-1* 変異体 (図 9B) シロイヌナズナでは病害抵抗性の著しい低下と *PR* 遺伝子発現の欠失がおこる (Cao et al., 1997; Cao et al., 1994)。 *npr1-1* 遺伝子産物を発現するプラスミド (35S::*npr1-1*) を同時導入した場合には、対照区と同じ発現レベルであった (図 9C)。ただし、35S::*npr1-1* 同時導入ではサリチル酸による誘導が対照区よりも低い傾向にあった (図 9C)。

4-2-2. AtNPR1-AD 同時導入による発現誘導

これまでの知見から、AtNPR1 は *PR-1* プロモーターに結合する転写因子と相互作用することがわかっている (Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000)。従って、AtNPR1 は転写活性化に直接、あるいはそのすぐ近くで働いていると考えられる。しかし、AtNPR1 が転写制御因子に含まれ、直接プロモーターを活性化しているかどうかは、はっきりした知見が得られていない。

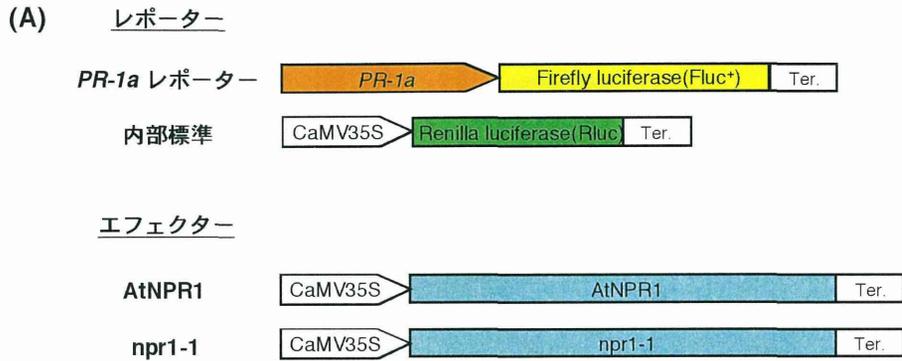
図 10A に示したように、病害応答システムにおいて、AtNPR1 は転写因子と結合し、転写因子は活性化されて *PR-1* プロモーターに結合して転写を誘導すると考えられている。プロモーターに結合してプロモーターを活性化する因子は複合体を形成していると考えられるが、AtNPR1 の作用機作は必ずしも明らかではない。出芽酵母 GAL4 の転写活性化部位 (AD) は DNA 結合因子と融合すると転写活性化能を与え、転写因子と融合すると転写活性を促進することが分かっている (Triezenberg, 1995)。本研究では、AtNPR1 と GAL4AD の融合タンパク質を作製し、GAL4AD 融合によって *PR-1a* 発現レベルが促進されるかを調べることにした。もし AtNPR1 に GAL4AD を付加した融合タンパク質で発現誘導レベル

が促進されれば、プロモーターを直接活性化する因子複合体に含まれている可能性が高い (図 10B)。

これまでの研究で、AtNPR1 の C 末端に GFP を付加した融合タンパク質は AtNPR1 の機能を損なわず、細胞内局在も同じであることを示したものがある (Kinkema et al., 2000)。そこで GAL4AD も同様に AtNPR1 の C 末端に付加した。AtNPR1-AD 融合タンパク質を過剰発現するプラスミド (35S::AtNPR1-AD) を作製し (図 11A)、一過的発現解析系によって *PR-1a*::Fluc⁺発現誘導を調べた。その結果、AtNPR1-AD を同時発現させた BY-2 細胞では、AtNPR1 を同時導入した場合の 2 倍以上、対照区の約 5~6 倍の *PR-1a* 発現誘導を示した (図 11B)。

4-2-3. *PR-1a* プロモーターの AtNPR1、AtNPR1-AD 応答領域の探索

PR-1a プロモーターには *as-1* 相同エレメントである *as-1-like* エレメントが存在する (Qin et al., 1994)。*as-1* と *as-1-like* の配列を図 12 に示した。サリチル酸シグナルによる *PR-1a* 発現誘導には、*PR-1a* プロモーターに含まれる *as-1-like* エレメントが必要であることが示されている (Strompen et al., 1998)。そこで、本研究で用いた一過的発現解析系で観察された AtNPR1 による *PR-1a* 発現誘導も *as-1-like* エレメントを介したものであるか調べた。*PR-1a* プロモーターを段階的に欠失させたレポータープラスミドと *as-1-like* エレメントに変異を導入したレポータープラスミド (図 13A) を用いて AtNPR1、AtNPR1-AD 応答性を解析した。その結果、*as-1-like* エレメントが欠失、または変異すると AtNPR1、AtNPR1-AD 応答性は失われた。また、*as-1-like* エレメントより上流 (-1575~-932) の領域が欠失すると AtNPR1 による誘導は残るが GAL4AD による誘導促進は失われた (図 13B)。



(B) NPR1 (265) KHVSNVHKALDSDDIELVKL LLKEDHTNLDDA (297)
 npr1-1 (265) **P** (297)

(298) ALHFAVAYCNVKTATDLLKLDLADVNH **RN** (326)
 (298) **G** (326)

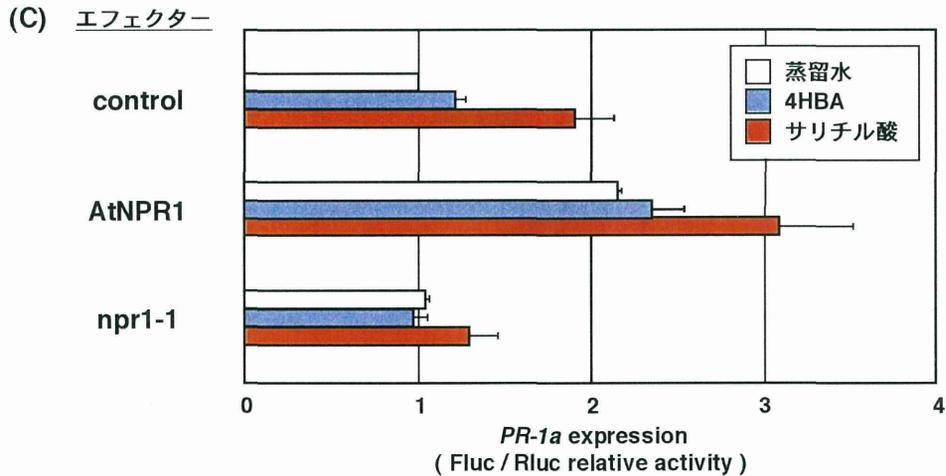


図9. シロイヌナズナNPR1によるタバコ*PR-1a*の発現誘導

(A) 用いたレポータープラスミドとエフェクター遺伝子の構造。レポーター；
 図4と同じ。AtNPR1；シロイヌナズナNPR1遺伝子断片をCaMV35Sプロモーターの下流に連結。npr1-1；NPR1の変異遺伝子npr1-1をCaMV35Sプロモーターの下流に連結。

(B) npr1-1のアンキリンリピート領域のアミノ酸置換と配列。

(C) 一過的発現解析系による*PR-1a*発現誘導の検出。(A)のコンストラクトを遺伝子銃を用いて5~6日間培養したタバコBY-2細胞に遺伝子導入した。導入後蒸留水または30 μ Mサリチル酸/4HBAを処理し、22時間室温で静置培養した。Fluc、Rluc活性はDLRAを用いて測定した。

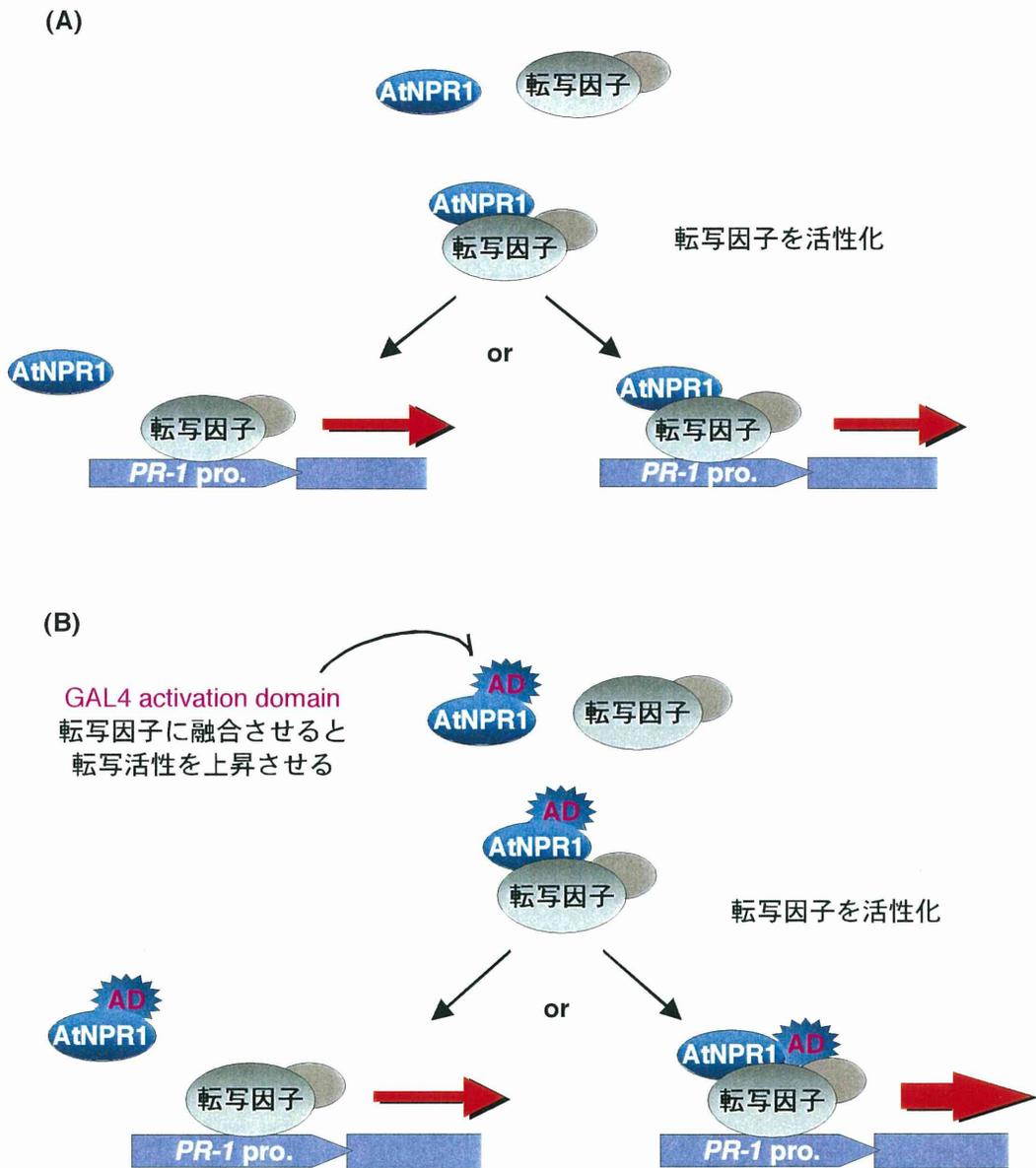


図10. シロイヌナズナNPR1は転写活性化に直接関わるか？

- (A) AtNPR1のPR-1プロモーター活性化における2通りの作用予想図。AtNPR1は転写因子と結合するがPR-1a転写開始複合体に含まれるかは明らかではない。
- (B) AtNPR1-AD融合タンパク質を発現させた場合のPR-1発現誘導への影響。AtNPR1がPR-1a転写開始複合体に含まれるならば、ADがPR-1a発現を促進する。

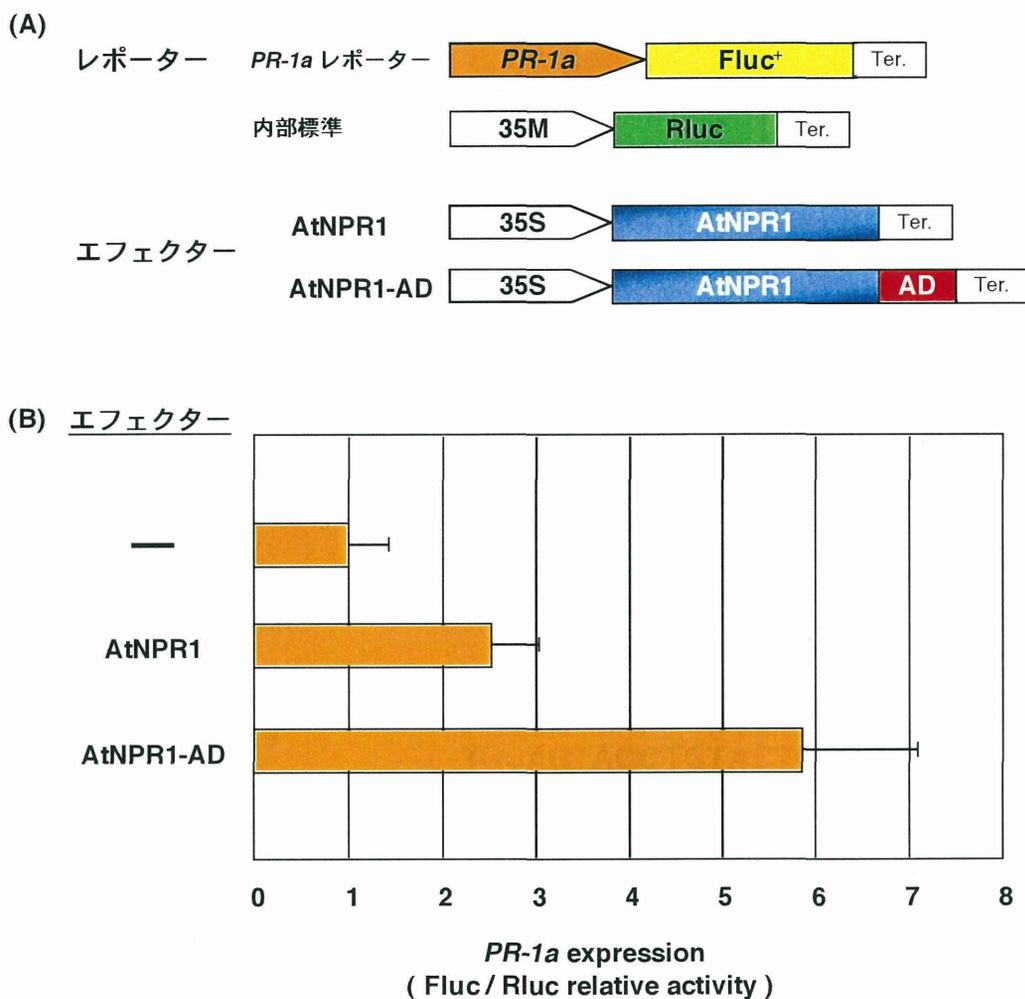


図11. *AtNPR1-AD*によるタバコ*PR-1a*の発現誘導の促進

- (A) 用いたレポーター遺伝子とエフェクター遺伝子の構造。*PR-1a*レポーター；図4と同じ。内部標準；35Sプロモーターの*as-1*エレメントに変異を導入した35Mの下流に*Rluc*遺伝子を連結した(図7)。*AtNPR1*；図9と同じ。*AtNPR1-AD*；*AtNPR1*のC末端にGAL4遺伝子の転写活性化ドメイン(AD)を連結した、融合タンパク質発現プラスミド。
- (B) 一過的発現解析系による*PR-1a*発現誘導の検出。(A)のコンストラクトを遺伝子銃を用いてタバコBY-2細胞に遺伝子導入した。導入後22時間室温で静置培養し、Fluc、Rluc活性をDLRAを用いて測定した。

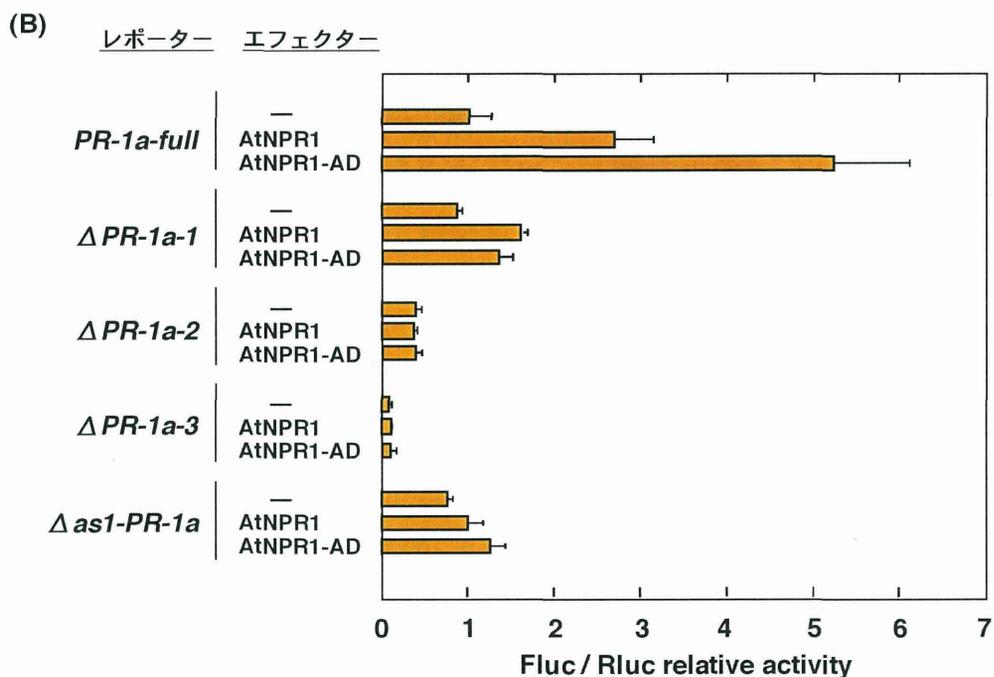
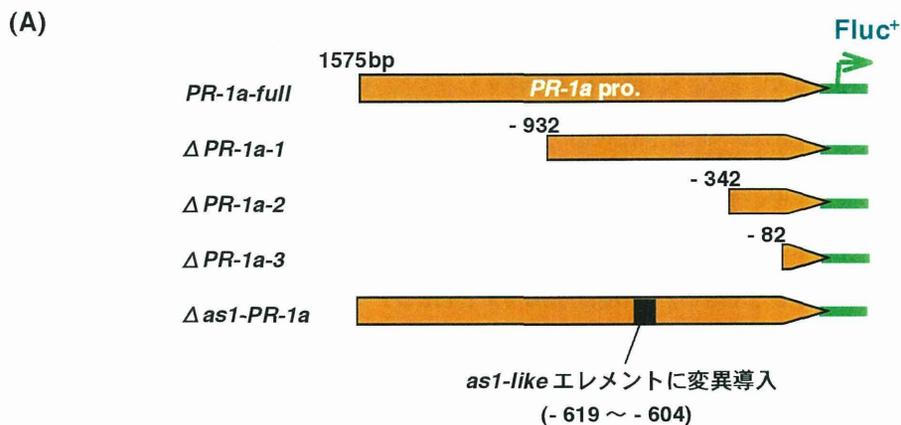


図13. 欠失、*as1-like*変異PR-1aプロモーターのサリチル酸、エフェクターへの応答

(A) PR-1aレポーターに用いた、欠失・*as1-like*エレメント変異PR-1aプロモーターの構造。

(B) 一過的発現解析系。AtNPR1、AtNPR1-ADをエフェクターとした場合の欠失・*as1-like*エレメント変異PR-1aプロモーターの応答性の解析。(A)のレポーターとエフェクターを遺伝子銃を用いて5~6日間培養したタバコBY-2細胞に遺伝子導入した。導入後、22時間室温で静置培養し、DLRAを用いてFluc、Rluc活性を測定した。レポーター活性を測定した。内部標準、エフェクター；図11と同じ。

4-3. 考察

4-3-1. タバコ *PR-1a* はシロイヌナズナ *NPR1* によって誘導される

本研究で用いた一過的発現解析系による解析で、35S::*AtNPR1* を同時導入した BY-2 細胞では *PR-1a::Fluc*⁺ の発現誘導レベルが促進したことから (図 9C)、シロイヌナズナ *NPR1* (*AtNPR1*) がタバコの病害応答シグナル伝達系で機能することが示された。*AtNPR1* を異種植物で発現させた例としては、単子葉植物であるイネに 35S::*AtNPR1* を導入した形質転換体を作製した研究があり、病害抵抗性がわずかに向上していることを報告しているものの、SAR 誘導や内在遺伝子発現誘導の解析は行われていない (Chern et al., 2001)。また今回得られた結果は、タバコとシロイヌナズナが非常によく似た病害応答遺伝子発現システムを備えていることを示唆する。最近になってタバコでも *NPR1-like* 遺伝子が単離されている (Liu et al., 2002)。その他にも、シロイヌナズナ TGA 因子がタバコで機能することが示されている (Pontier et al., 2002)。これらの知見も、シロイヌナズナとタバコの病害応答性の類似性を示唆するものである (図 14)。

AtNPR1 はサリチル酸や病原感染などによる病害応答シグナルが伝達されない場合は不活性型オリゴマーとして細胞質に存在し、シグナルが伝達されると活性化モノマーとなって核内に移行し、*PR* 遺伝子の発現を誘導するという報告がある (Mou and Dong, 2003)。また、35S::*AtNPR1* を導入したシロイヌナズナの解析では、この形質転換体は病害抵抗性が向上するが、病害応答シグナル非存在下では野生型と同様、*PR* 遺伝子の発現は誘導されない (Cao et al., 1998)。一方、本研究で用いた一過的発現解析系では、35S::*AtNPR1* 同時導入によって、サリチル酸無処理でも *PR-1a::Fluc*⁺ の発現が上昇した (図 9C)。これは遺伝子銃を用いていることが原因であると推測される。一般に形質転換体の細胞内では 1 コピーのコンストラクトがゲノムに導入されるのに対し、遺伝子銃では一度に大量の遺伝子が染色体外 DNA として導入されるため、*AtNPR1* が過剰に発現し、サリチル酸無処理でも *PR-1a::Fluc*⁺ の発現上昇が見られたものと推察された。また、培養細胞は常に傷害ストレスを受けていることや、遺伝子銃による遺伝子導入は傷害ストレスであることも考慮すると、おそらく培養細胞では植物体とは異なり、サリチル酸未処理の場合でも *PR-1a::Fluc*⁺ 発現が誘導されやすいのであろう。

一方、*AtNPR1* の変異体である *npr1-1* タンパクをエフェクターとして *PR-1a::Fluc*⁺ と同時発現させた場合では、サリチル酸処理による *PR-1a* 発現誘導はエフェクターなしの場合よりも若干低くなった (図 9C)。これは変異型 *NPR1* を細胞内で過剰発現させたことによる trans dominant-negative 効果が現れたと推察された。

4-3-2. GAL4AD を融合した AtNPR1 は *PR-1a* 発現誘導を促進させる

AtNPR1 と GAL4AD の融合遺伝子 (AtNPR1-AD) は AtNPR1 よりも高い *PR-1a* プロモーター発現誘導を示した (図 11B)。GAL4 タンパク質による転写活性の促進は、基本転写因子複合体と GAL4 の AD 部位が相互作用することによっておこる (図 15A)。本実験でも、AtNPR1 による *PR-1a* 発現誘導が GAL4AD を付加することによって著しく上昇したことから、AtNPR1 が *as-1-like* エlementに転写制御因子を介して結合し、転写活性化に直接関与することが示唆される (図 15(B,C))。またさらに、今回の一過的発現解析系で AtNPR1-AD 同時導入によって *PR-1a* 発現レベルが上昇したことから、AtNPR1-AD を発現する形質転換植物はより高い病害抵抗性を示すことが期待される。

4-3-3. AtNPR1、AtNPR1-AD は *PR-1a* プロモーターの *as-1-like* エlementに作用する

PR-1a プロモーターの欠失、変異によって AtNPR1、AtNPR1-AD による発現誘導が失われたことから (図 13B)、*as-1-like* エlementが AtNPR1、AtNPR1-AD 応答領域であることが強く示唆された。*as-1-like* エlementがタバコやシロイヌナズナの *PR-1* プロモーターのサリチル酸シグナル応答に必要であるという知見から (Lebel et al., 1998)、今回得られた結果は AtNPR1 がタバコの病害応答シグナルによって *PR-1a* 発現誘導を促進していることを示したのものである。また、*as-1-like* エlementより上流 (-1575~-932) 領域が失われると、AtNPR1-AD による誘導促進が AtNPR1 と同程度まで低下することから、この部位にも GAL4AD の作用を促進させる部位が存在する可能性がある。あるいは、-1575~-932 領域を含む完全長のプロモーターは、-932 まで欠失させたプロモーターよりも安定な転写開始複合体を形成できるため、AtNPR1-AD の作用が強く現れている可能性も考えられる。以上が本研究で得られた知見であるが、不明な点が多く残されており、今後のさらに詳しい研究による作用機作解明が期待される。

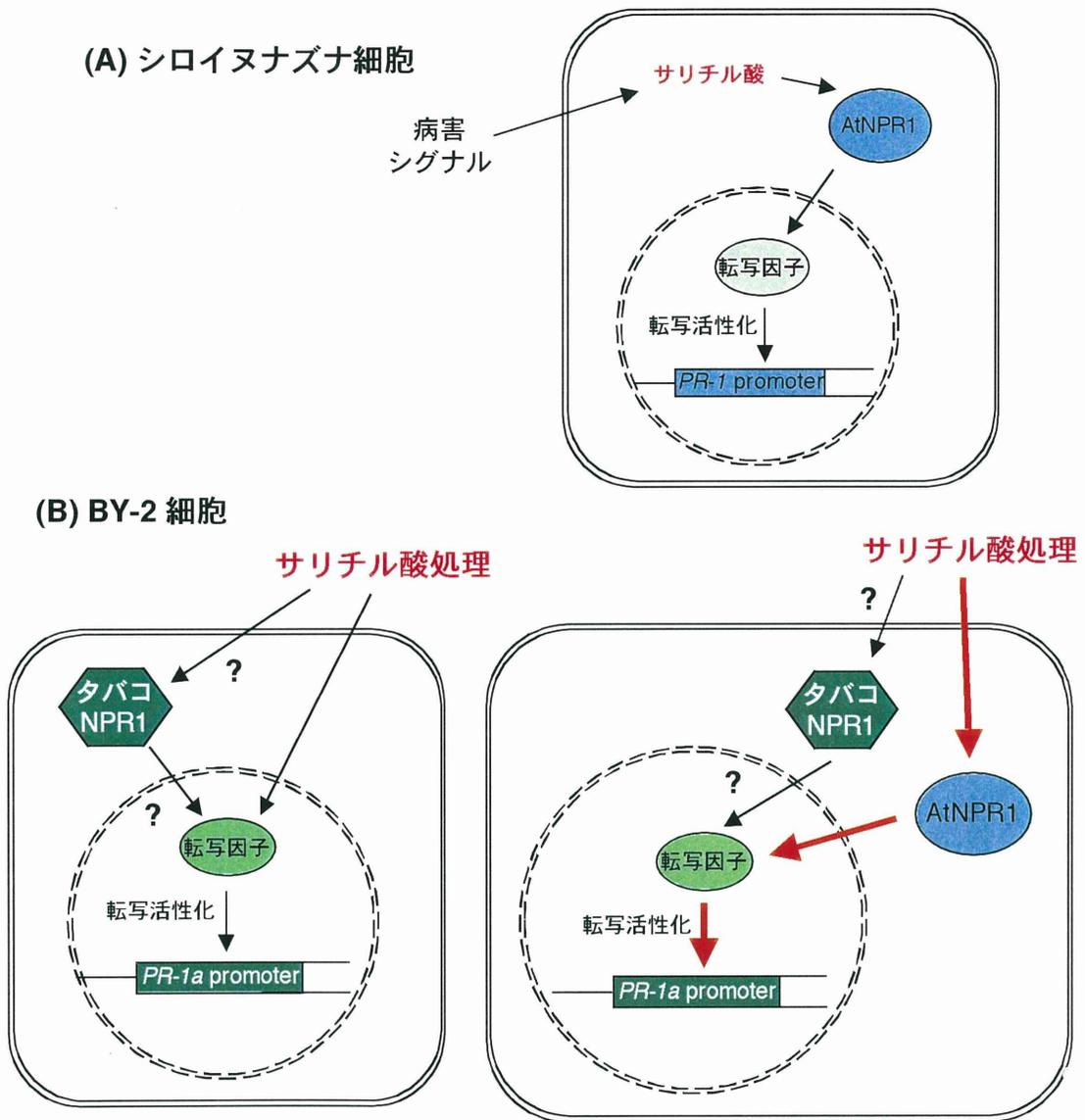


図14. タバコ細胞でシロイヌナズナNPR1 (AtNPR1) がタバコPR-1aの発現誘導を促進する

(A) シロイヌナズナ細胞でのAtNPR1の機能。病害シグナルによって細胞内にサリチル酸が蓄積し、サリチル酸シグナルにおいてAtNPR1が活性化されて転写因子を活性化し、転写因子がPR-1プロモーターを活性化してPR-1発現が誘導されると考えられている。

(B) 本実験系でタバコ培養細胞でシロイヌナズナNPR1を一過的に発現させた場合の作用。PR-1a発現誘導が促進されたことから、AtNPR1がタバコ細胞において転写因子を介してPR-1a発現に影響を及ぼしたと考えられる。タバコとシロイヌナズナにおける病害応答機構の類似性が示唆される。

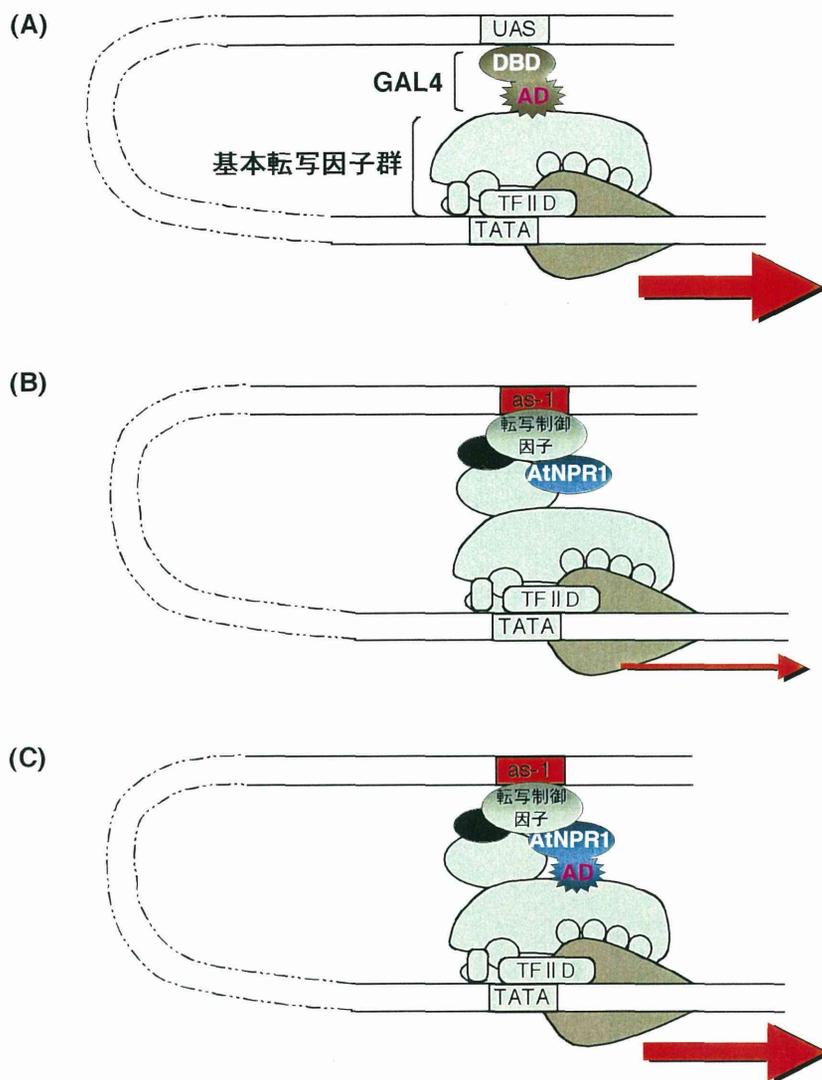


図15. AtNPR1 は転写制御複合体に含まれる

(A) GAL4タンパク質の転写制御モデル。DNA結合ドメイン (DBD) でプロモーター上のUAS配列に結合したGAL4は転写活性化ドメイン (AD) で基本転写因子群を介して転写を活性化する。UAS: GAL4タンパク質結合配列。

(B) *as-1-like*エレメント結合タンパク質による転写活性化モデル。AtNPR1が転写制御因子と共に*as-1-like*エレメント (*as-1*) に結合する場合。

(C) AtNPR1-ADを発現させた場合の*as-1-like*エレメントによる転写活性化モデル。AtNPR1が転写制御因子と共に*as-1-like*エレメント (*as-1*) に結合する場合、転写制御因子に結合したAtNPR1-ADが基本転写因子群に作用し、転写活性が促進される。矢印の太さは転写量を示す。

5. 一過的発現解析系を用いた TGA 因子の転写活性解析

5-1. 序論

病害応答シグナルで *PR* 遺伝子のプロモーターを活性化する転写因子は TGA 因子群であると考えられている。TGA 因子は真核生物で普遍的に存在する転写因子の一種であり (Vogt et al., 1987; Lin and Green, 1988; Ziff, 1990; Engelberg et al., 1994)、TGACG 配列を認識してプロモーターを活性化する (Lin and Green, 1988; Struhl, 1988)。また、様々な環境応答シグナルで活性化されることが知られている (Lin and Green, 1988; Struhl, 1988; Ziff, 1990; Engelberg et al., 1994)。植物でも相同因子がいくつか単離され (Tabata et al., 1989)、特にシロイヌナズナとタバコで解析が進んでいる。植物 TGA は他の真核生物の転写因子 TGA と同様に塩基性ロイジンジッパー (bZIP) 領域を持ち、相同性も高い。転写活性化能を示唆する報告もあるが (Niggeweg et al., 2000a)、病害応答シグナルにおける転写活性は必ずしも明らかではない。

最初に単離された TGA 因子はタバコ由来 TGA1a であり、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の *as-1* エlementに結合する因子として単離された (Katagiri et al., 1989; Lam et al., 1989)。酵母細胞内、動植物の *in vitro* 転写系、植物細胞内の転写解析で、TGA1a が *as-1* エlementを介して転写を活性化することが報告されている (Katagiri, et al., 1990; Yamazaki et al., 1990; Neuhaus et al., 1994; Niggeweg et al., 2000a)。また 35S プロモーターの *as-1* エlementは全身獲得抵抗性の誘導物質であるサリチル酸に応答して発現を誘導することから (Qin et al., 1994)、TGA1a も防御応答シグナルの転写活性化に関与するのではないかと考えられていた。後になって、*PR* 遺伝子プロモーターに存在する *as-1* と相同な *as-1-like* エlementがサリチル酸による発現誘導に必要であり、さらに TGA1a が *as-1-like* エlementにも結合することがゲルシフトアッセイによって示されたことから (Strompen et al., 1998)、TGA1a は *PR* 遺伝子の転写制御因子としてサリチル酸シグナルに関与すると考えられるようになった (図 16)。

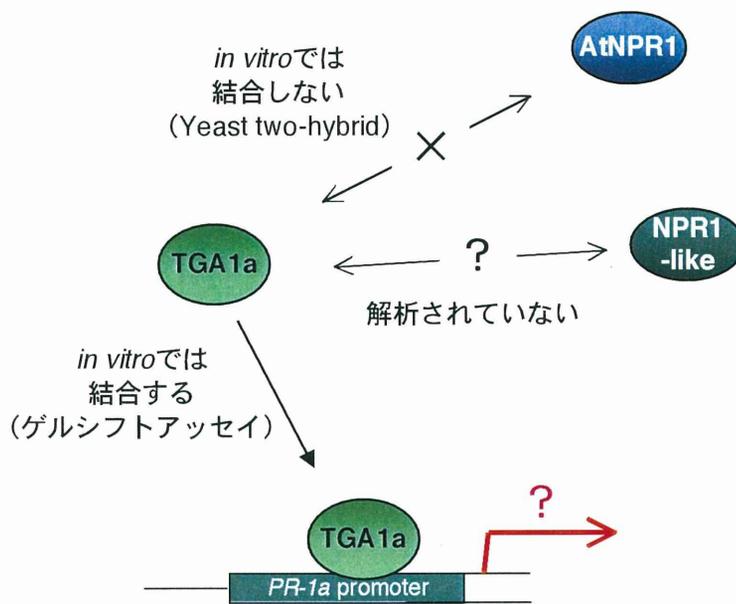
シロイヌナズナでは現在 10 種類の TGA 因子が単離されている (Pontier et al., 2001; Jakoby et al., 2002)。そのうち幾つかは *PR-1* プロモーターに含まれる *as-1-like* エlementに結合することがゲルシフトアッセイによって示されている (Pontier et al., 2002)。このことから、TGA 因子は病害応答シグナルにおいて、*PR* 遺伝子の発現を直接誘導する因子であると考えられている。また、シロイヌナズナ TGA 因子のいくつかは AtNPR1 と結合活性があることが yeast two-hybrid 法で示されている (Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000)。さらにサリチル酸 / AtNPR1 シグナルが *PR-1* プロモーターの *as-1-like* エlementへの TGA 因子の集合と結合を促進するという報告もある (Despres et al., 2000; Johnson et al., 2003)。

以上の知見から、シロイヌナズナでは TGA 因子は NPR1 となんらかの相互作用をすると考えられ、TGA 因子は病害応答シグナルにおいて NPR1 と *PR-1* プロモーターの間をつなげる因子であると考えられている。

タバコでは現在 4 種類の TGA 因子が単離されており (Katagiri et al., 1989; Niggeweg et al., 2000a)、そのうち TGA1a は *PR-1a* プロモーターに含まれる *as-1-like* エlement に (Strompen et al., 1998)、TGA2.1、TGA2.2 は *as-1* エlement に結合することがゲルシフトアッセイによって確認されている (Niggeweg et al., 2000a)。また、TGA1a はサリチル酸によるその結合活性の促進が報告されている (Jupin and Chua, 1996; Stange et al., 1997)。さらに、シロイヌナズナ NPR1 と結合するものもあることが yeast two-hybrid 法で示されている (Niggeweg et al., 2000b)。最近になってタバコ NPR1-like 因子が単離されていることから (Liu et al., 2002)、タバコ TGA 因子もシロイヌナズナと同様に、病害応答性の転写制御において NPR1 と *PR* 遺伝子プロモーターの間で働いている可能性が高い。

本研究では TGA 因子の *PR* 遺伝子発現における機能に関する新たな知見を得る目的で、一過的発現解析系を用い、タバコ TGA 因子群各々の病害応答シグナルにおける転写活性化能を、タバコ培養細胞内で解析することを試みた。

<タバコ>



in vivo でのPR-1aプロモーターやNPR1(-like)との相互作用、SARシグナルにおける転写活性化の解析はまだ行われていない

図16. タバコTGA1aについてこれまでに得られている知見

タバコTGA1aは、PR-1aプロモーターのas1-likeエレメントに結合することがゲルシフトアッセイによって示され、病害応答シグナル存在下ではないが、転写活性化能が植物、酵母、動物細胞内で検出されている。

(Katagiri et al., 1990; Neuhaus et al., 1994; Strompen et al., 1998; Niggeweg et al., 2000a)

5-2. 結果

5-2-1. 一過的発現解析系によるタバコ TGA1a の転写活性の解析

これまでの一過的発現解析によって、シロイヌナズナ NPR1 がタバコ細胞内でタバコ *PR-1a* 発現誘導を促進することを示した (図 9C)。また AtNPR1 が転写活性化に直接作用することを示唆する結果が得られた (図 11B)。 *in vitro* では幾つかのシロイヌナズナ TGA 因子とタバコ TGA 因子は AtNPR1 に結合活性を有することが報告されている。また、TGA 因子が *PR-1* の転写を活性化することが示唆されている。そこで本研究では、最初に単離され転写活性化能も報告されているタバコ TGA1a が、AtNPR1 が関与する病害応答シグナルにおいて転写活性化因子として機能するかを調べた。

図 17 に実験系の模式図を示した。転写活性解析のレポーターとして、GAL4 の DNA 結合部位 (DBD) が結合する UAS プロモーター配列に Fluc 遺伝子を連結したプラスミド (UAS::Fluc⁺) を用い、エフェクターとして GAL4DBD を TGA1a の N 末端に連結した融合タンパク質を発現するプラスミド (35M::DBD-TGA1a) を構築した (図 17A)。GAL4DBD-AD 発現プラスミドをエフェクターとした場合、DBD で UAS 配列に結合し、AD 部位で転写が活性化され、Fluc 活性が検出される (図 17B(a))。GAL4DBD のみを発現するプラスミド (35M::GAL4DBD) をエフェクターとした場合、UAS 配列に結合するが、転写は活性化されない (図 17B(b))。35M::DBD-TGA1a をエフェクターとした場合、TGA1a に転写活性化能がある場合のみ、Fluc 活性が誘導される (図 17B(c))。

エフェクターと UAS::Fluc⁺を BY-2 細胞に遺伝子銃を用いて同時導入し、サリチル酸処理による発現誘導レベルの変化を調べた (図 19)。さらに第二のエフェクターとして、シロイヌナズナ NPR1 (AtNPR1) 発現プラスミド (35S::AtNPR1)、AtNPR1 と GAL4 転写活性化部位 (AD) の融合タンパク質を発現するプラスミド (35S::AtNPR1-AD)、AtNPR1 の機能を欠失した変異 *npr1-1* を発現するプラスミド (35S::*npr1-1*) を、35M::GAL4DBD/35M::DBD-TGA1a エフェクター (図 17A) と共に、それぞれ同時導入した (図 18A)。AtNPR1 や AtNPR1-AD が TGA1a の転写活性化能に関与する場合、Fluc 活性の変化として検出されると考えられる (図 18B)。図 19 に示したように、エフェクターが 35M::DBD-TGA1a のみの場合よりも、35S::AtNPR1 を同時導入した方が、高い発現を示した。さらに、35S::AtNPR1-AD を同時導入した BY-2 細胞では、35S::AtNPR1 を同時導入した場合よりもさらに高い転写活性が検出された。35S::*npr1-1* を同時導入した BY-2 細胞では DBD-TGA1a のみの場合と同程度の発現レベルを示した。AtNPR1、AtNPR1-AD が TGA1a ではなく GAL4DBD に作用している可能性もあるので、

GAL4DBD のみを発現するプラスミド (35M::GAL4DBD) を用いて同様の実験を行った結果、UAS::Fluc⁺の発現は、AtNPR1、AtNPR1-AD の同時導入による発現レベルの上昇は検出されなかった。このことから、AtNPR1、AtNPR1-AD は TGA1a に作用して、UAS::Fluc⁺に対する転写活性能を促進させたと考えられる。しかし、どの場合でも、この実験ではサリチル酸処理による転写活性の上昇は検出されなかった。

5-2-2. 一過的発現解析系による *PR-1a*::Fluc⁺の TGA 同時導入による発現パターン解析

PR-1a 発現誘導にそれぞれのタバコ TGA 因子がどのように作用するかは、必ずしも明らかではない。最近では、GAL4DBD 融合タンパクを用いた解析で、酵母細胞内で TGA1a と TGA2.2 に転写活性化能があることが報告されている (Niggeweg et al., 2000a)。しかし、病害応答シグナルにおいて *PR-1a* に対する転写活性化能をタバコ細胞内で解析した例はない。

本研究では一過的発現解析系を用いて、TGA1a、TGA2.1、TGA2.2 による *PR-1a* 発現レベル変化の検出を試みた。3 つの TGA 因子の構造を図 20 に示した。配列の相同性から、TGA1a は Class I、TGA2.1 と TGA2.2 は Class II に分類される。bZIP 部位は 3 種類の TGA で高度に保存されているが、C 末端側は、同じ Class II である TGA2.1 と TGA2.2 では相同性が高いが、Class I に属する TGA1a との相同性は低い。N 末端側は、3 種類の TGA 因子で配列の長さなどが様々である。*PR-1a*::Fluc⁺と同時に TGA 因子発現プラスミド 35M::TGA1a、35M::TGA2.1、35M::TGA2.2 をそれぞれ BY-2 細胞に導入し、一過的発現解析を行った。図 21 に示したように、TGA1a や TGA2.2 を同時導入した BY-2 細胞では *PR-1a*::Fluc⁺ の発現上昇が検出された。TGA2.2 を同時導入した BY-2 細胞では AtNPR1 を同時導入した場合よりも高い発現の促進が起っている。一方、TGA2.1 を同時導入した場合には *PR-1a*::Fluc⁺発現は上昇しない。さらに、TGA エフェクターに加えて AtNPR1 エフェクターを同時導入した場合には、TGA1a と AtNPR1 の同時導入では *PR-1a* 発現は TGA1a のみと比べると発現レベルは促進されず、特に TGA2.2 と AtNPR1 の同時導入では、AtNPR1 が TGA2.2 による *PR-1a* 発現誘導に対して抑制的に働いているように見える。一方、TGA2.1 と AtNPR1 を同時導入すると、*PR-1a* 発現は著しく上昇した。

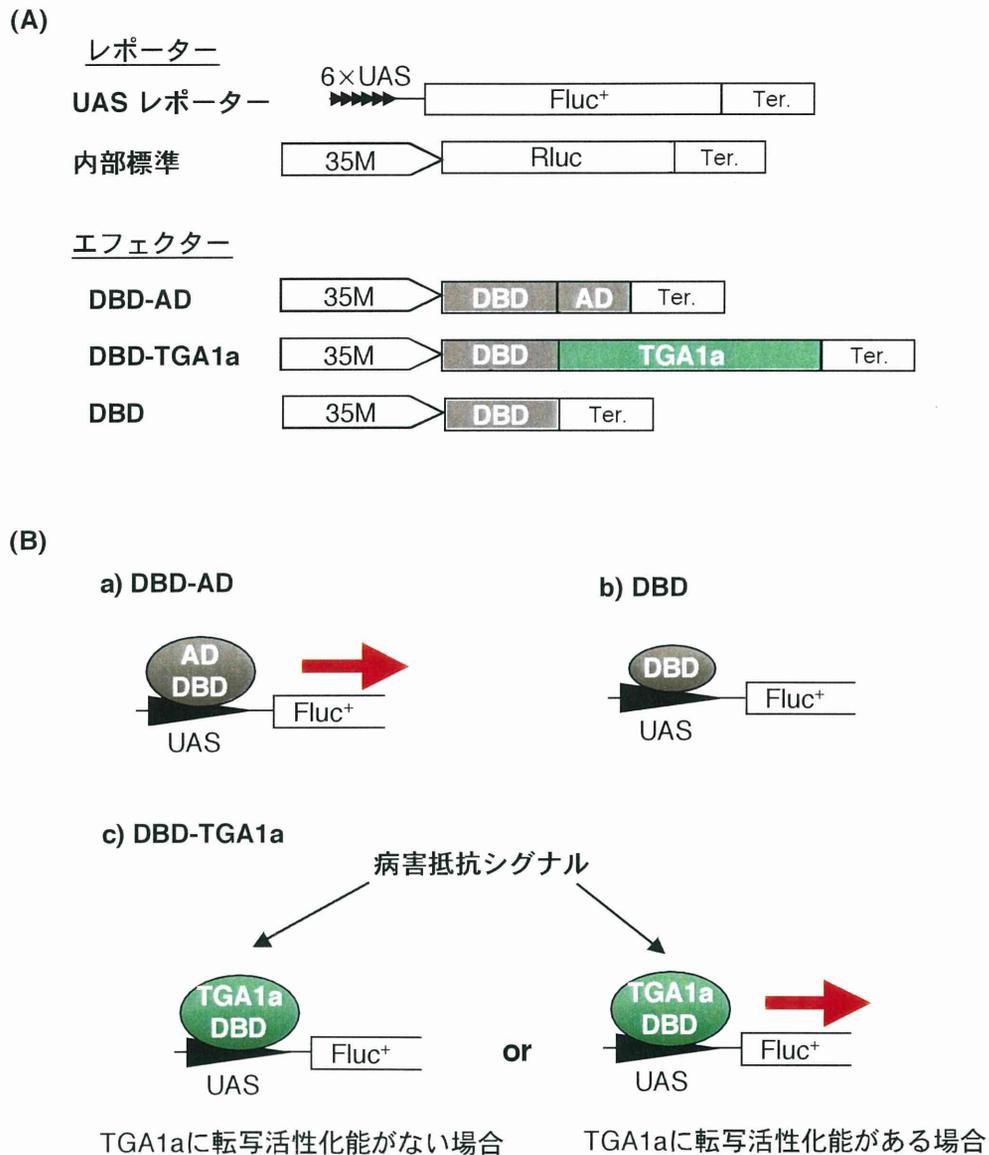


図17. タバコTGA1aの転写活性化能にAtNPR1、AtNPR1-ADは影響を与えるか
 (A) UASレポーター； GAL4DBDの結合配列であるUASを6コピー列ねた配列に Fluc⁺を連結した。内部標準； 図11と同じ。 DBD-AD； GAL4のDBDとADの融合タンパク質発現プラスミド。 DBD-TGA1a； GAL4DBDのC末端にTGA1aを連結した、融合タンパク質を発現するプラスミド。 DBD； GAL4のDBDだけを発現するプラスミド。
 (B) DBD-TGA1a融合タンパク質に転写活性化能がある場合のみ、Fluc活性が上昇する。赤い矢印は転写を示す。

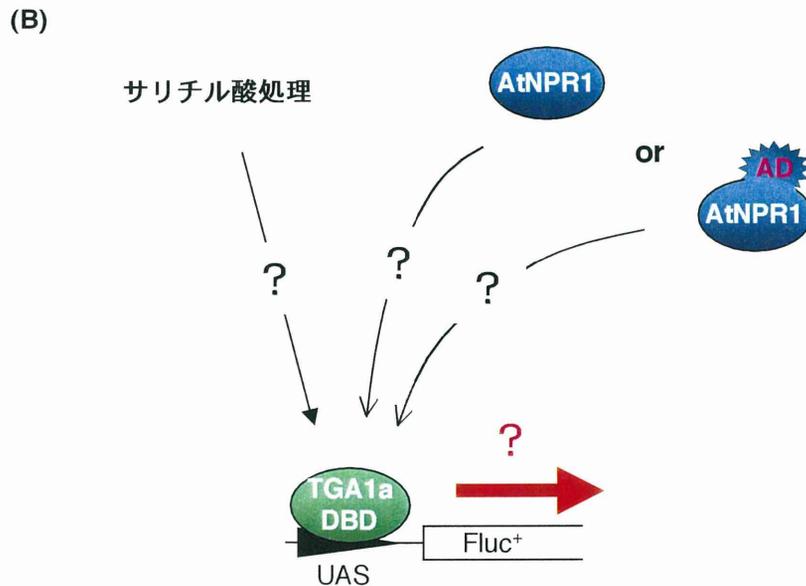
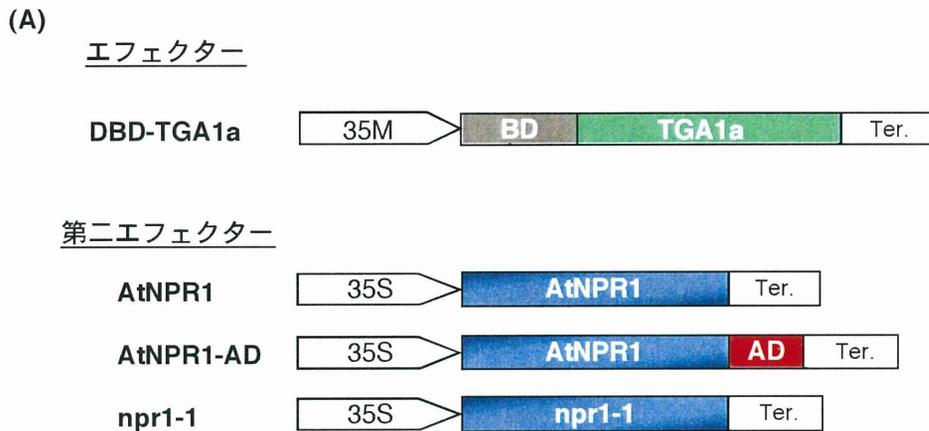


図18. タバコTGA1aの転写活性化能にAtNPR1、AtNPR1-ADは影響を与えるか
(A) エフェクターと第二エフェクターの構造図。DBD-TGA1a；図17と同じ。
 AtNPR1；図9と同じ。AtNPR1-AD；図11のAtNPR1-ADと同じ。npr1-1；
 図9と同じ。
(B) UASレポーターとDBD-TGA1aエフェクターに加えて、第二のエフェク
 ターとしてAtNPR1、AtNPR1-ADエフェクターを同時導入させた場合。
 AtNPR1、AtNPR1-ADがDBD-TGA1aの転写活性化能に影響を与えるなら
 Fluc活性変化として検出される。

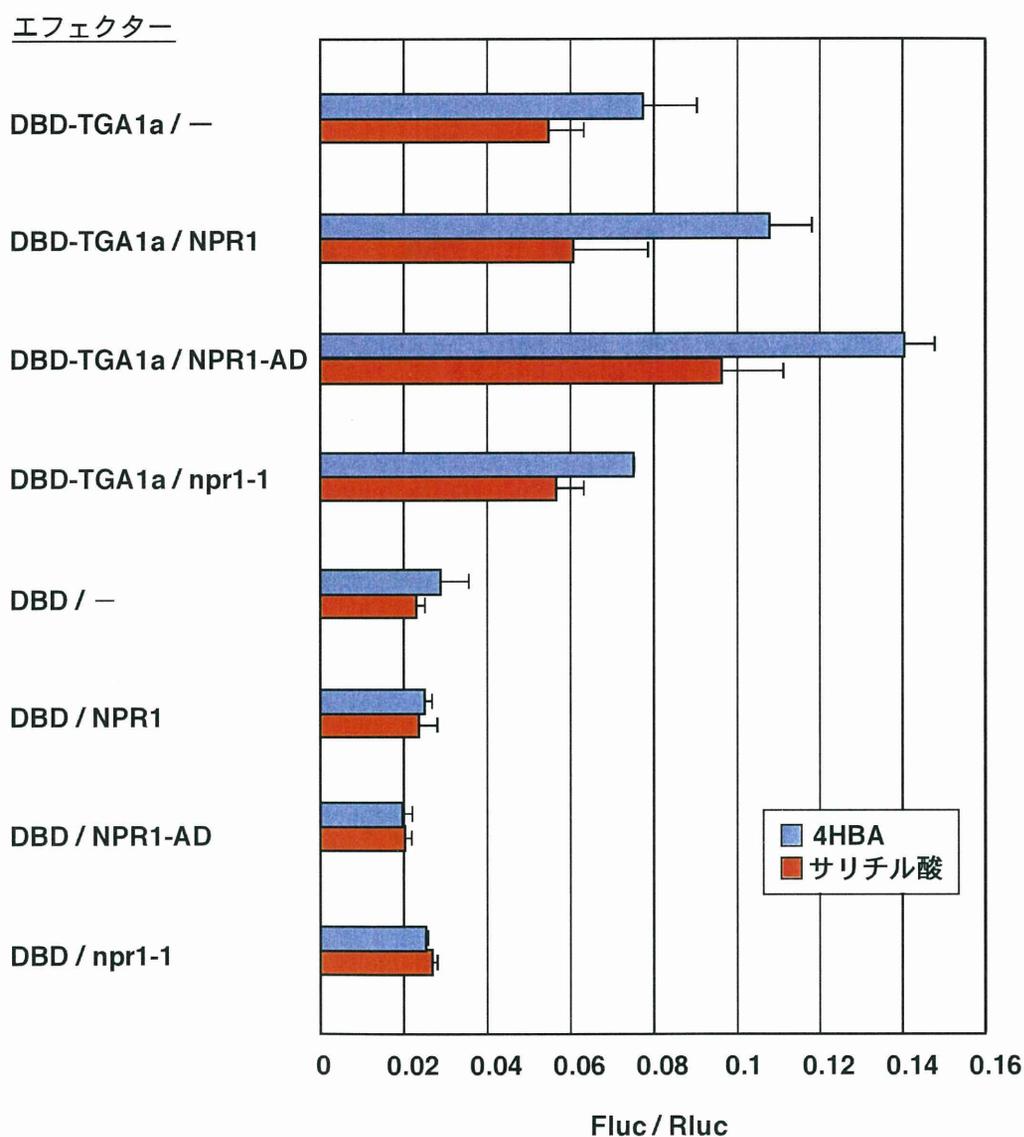


図19. 一過的発現解析系によるDBD-TGA1a融合タンパク質の転写活性化能の解析

サリチル酸処理による転写活性化能の変化とAtNPR1、AtNPR1-ADエフェクターの影響。図17、18のコンストラクトを遺伝子銃を用いて5~6日間培養したタバコBY-2細胞に遺伝子導入した。導入後30 μ Mサリチル酸/4HBAを処理し、22時間室温で静置培養後、DLRAを用いてレポーター活性を測定した。

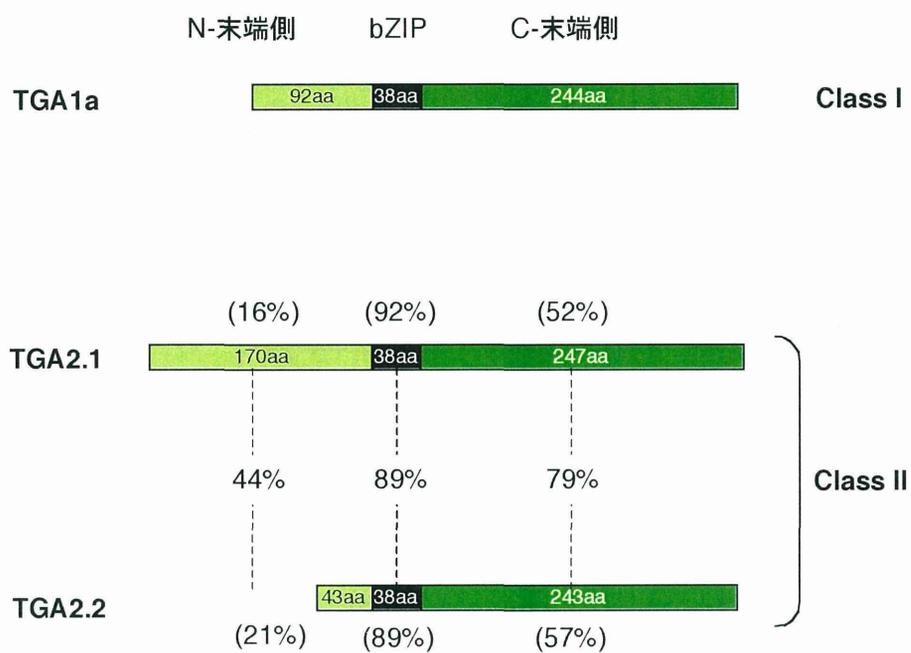


図20. 本研究で用いたタバコTGA因子の構造

括弧内のパーセンテージはTGA1aとの相同性を示す。

配列の相同性からTGA1aはclass Iに、2つのTGA2はclass IIに分けられる。

bZIP（塩基性ロイシンジッパー）領域はClassに関係なく相同性が高い。

C末端側はTGA2.1とTGA2.2は相同性が高いが、TGA1aとの相同性は低い。

N末端側は多様である。（Niggeweg et al., 2000a）

第一エフェクター

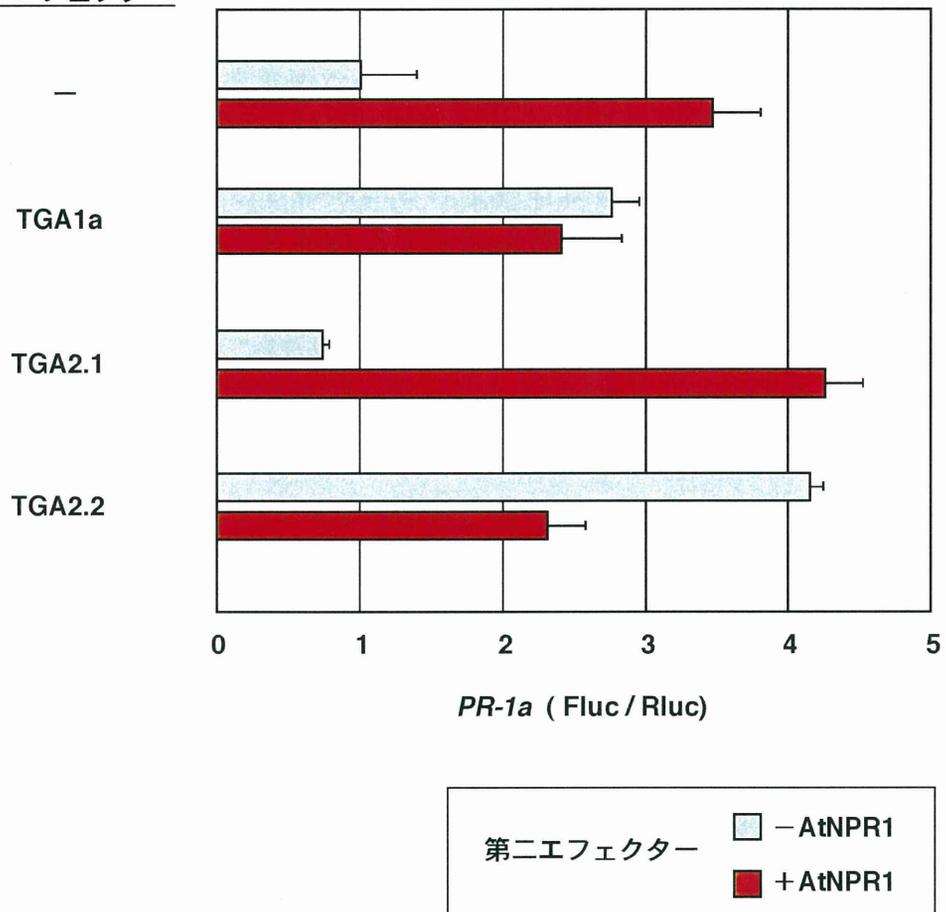


図21. 一過的発現解析系によるタバコTGA因子のPR-1a発現誘導能の解析
 TGA1a ; 35M::TGA1a、TGA2.1 ; 35M::TGA2.1、TGA2.2 ; 35M::TGA2.2、
 AtNPR1 ; 35S::AtNPR1。プラスミドコンストラクトを遺伝子銃を用いて5~6日間
 培養したタバコBY-2細胞に遺伝子導入した。導入後22時間室温で静置培養し、
 DLRAを用いてレポーター活性を測定した。エフェクターなしのPR-1a::Fluc+発現
 レベルを1とした。

5-3. 考察

本研究で用いた一過的発現解析系で得られた結果から、TGA1a は単独で *PR-1a* プロモーターを活性化する機能があるが、AtNPR1 同時発現によって転写活性化能がわずかに促進されるものの（図 19）*PR-1a* 発現レベルが上昇しないことから（図 21）、AtNPR1（またはタバコの NPR1）が直接作用する因子ではないことが示唆される。また、病害応答シグナルでは主要な因子ではない可能性が考えられる。TGA2.1 は、単独では *PR-1a* プロモーター活性化能は示さないが、AtNPR1 同時発現によって *PR-1a* 発現レベルが大幅に上昇したことから（図 21）、AtNPR1（またはタバコの NPR1）が直接作用する因子であり、病害応答シグナルにおいて *PR-1a* 発現を誘導する主要な因子である可能性がある。TGA2.2 は、単独で *PR-1a* プロモーターを活性化する機能があるが、AtNPR1 同時発現によって *PR-1a* 発現レベルが上昇せず、むしろ抑制されていることから（図 21）、病害応答シグナルに抑制的に働く因子、あるいは主要な因子ではない可能性がある。表 2 に既報の知見と本研究で得られた知見を比較した。過去の知見では、植物細胞内へのマイクロインジェクションによる解析や（Neuhaus et al., 1994）、酵母細胞内の GAL4DBD 融合因子を用いた解析によって、TGA1a の転写活性化能が検出されているが、AtNPR1 との結合活性はないとされている（Niggeweg et al., 2000a）。TGA2.1 は、転写活性化能も AtNPR1 結合活性もあるとされている（Niggeweg et al., 2000a）。TGA2.2 は、転写活性化能はないが AtNPR1 との結合活性は検出されている（Niggeweg et al., 2000a）。しかし前述した通り、これらの解析はタバコ細胞内で行われておらず、AtNPR1 との関係も結合活性のみで、転写活性化能における AtNPR1 の作用は解析されていない。シロイヌナズナ TGA1 は AtNPR1 との相互作用がないとされていたが、サリチル酸処理によって TGA1 のタンパク構造が変化し、結合活性が誘導されるという報告がされている（Despres et al., 2003）。同様の現象がタバコでもある可能性は高い。

TGA 因子は病害応答シグナルによってだけでなく、オーキシシンやストレスなど、様々なシグナルで活性化されることが報告されている（Pascuzzi, et al., 1998）。TGA 因子群の *as-1* 結合活性を欠失させた trans dominant-negative タバコの解析では、TGA 因子が病害抵抗性に抑制的にも作用し得ることが示されている（Pontier et al., 2001）。また、TGA1a が高濃度薬剤処理による Xenobiotic ストレスによっても活性化されるという報告がある（Johnson et al., 2001）。その他にシロイヌナズナでも、TGA2 が傷害応答遺伝子である *PDF1.2* のプロモーター領域に含まれる *as-1-like* エlement に結合することを示した例がある（Spoel et al., 2003）。これらのことから、TGA 因子は多様なシグナルに応答し、シグナルの種類によっ

て活性化される TGA 因子の種類が異なり、転写を活性化する遺伝子を選んでいることが示唆される。従って TGA 因子の病害応答シグナルのエフェクターとしての機能だけを検出するのは困難であると考えられる。また、Yeast two-hybrid 法を用いた解析で、TGA1a、TGA2.1、TGA2.2 は互いに異型二量体を形成し、またそれぞれが同型二量体を形成することが報告されている (Niggeweg et al., 2000a)。さらに、プロモーター領域に含まれる *as-1* エlementへの結合活性もそれぞれの TGA 因子で異なっていて、TGA2.1 は TGA2.2 と複合体を形成すると *as-1* エlementへの結合様式が変化する (Niggeweg et al., 2000b)。つまり、TGA 因子はプロモーターを活性化する際に複合体を形成すると考えられるため、それぞれの TGA 因子単独では *PR-1a* 発現を効果的に誘導することはできないのかもしれない。シグナルによって活性化する TGA 因子の種類が異なり、TGA 因子どうし、あるいはシグナル特異的に TGA 因子と相互作用する未知の因子の作用によって、異なる組み合わせで複合体を形成して働くとするなら、病害応答シグナルに特異的に関与して *PR-1a* プロモーターを活性化する TGA 因子やその他の因子の組み合わせを明らかにする必要がある。しかし、従来の変異植物体を用いた解析では多重変異体の作製に時間がかかり、実験区も膨大になる。シロイヌナズナで、NPR1 と相互作用する TGA2、TGA5、TGA6 の 3 重変異体の病害抵抗性試験を行った研究例があるが (Zhang et al., 2003)、因子の機能が重複しているなどの推測に留まり、TGA 因子の転写制御についての機能解析は行われていない。それに対して本研究が確立した実験系では、それらの因子の解析がより簡便に実施可能であると考えられる。一過的発現解析系では複数の TGA 因子同時導入が容易に行えるので、様々な TGA 因子の組み合わせでの *PR-1a* 発現制御の解析が迅速に行える。今後、一連の解析によって、病害応答シグナルで *PR-1a* プロモーターを活性化する TGA 因子の組み合わせが明らかにできると考えられる。

		過去の知見	本研究 (<i>PR-1a</i> プロモーターに対して)
TGA1a	転写活性	酵母、動植物in vitro系 植物細胞内で 有	植物細胞内で有
	AtNPR1の作用	In vitroで 結合しない	転写活性は 影響を受けない
TGA2.1	転写活性	酵母細胞内で 有	植物細胞内で無
	AtNPR1の作用	In vitroで 結合する	転写活性は 誘導された
TGA2.2	転写活性	酵母細胞内で 無	植物細胞内で有
	AtNPR1の作用	In vitroで 結合する	転写活性は 抑制された

表 2. タバコTGA因子の既報の知見と本研究で得られた知見
 本研究では一過的発現解析系を用いて、*PR-1a*転写活性化能の解析を植物細胞内で行った。また、AtNPR1がタバコTGA因子の転写活性化能に影響を与えることを示した。

6. タバコ *PR-1a* プロモーターの
タバコとシロイヌナズナにおける発現解析

6-1. 序論

PR-1 タンパク質はタバコやシロイヌナズナ以外にもイネやコムギ、オオムギ、トウモロコシなど多くの植物で単離されている。これらの PR-1 タンパク質の配列は異なる種由来でも相同性が高く（最低 35%）、約 15~17kDa 程の分子量である。PR-1 タンパク質の機能は未だ不明であるが、病原感染によって非常に高い発現が誘導される（Selitrennikoff, 2001）。シロイヌナズナやタバコでサリチル酸やその類似化合物によって主に発現が誘導される *PR-1*、*PR-2*、*PR-5* のうち、発現誘導率が最も高いのは *PR-1* であり、その発現は SAR 誘導の指標として最も信頼性がある（Uknes et al., 1992; Friedrich et al., 1996）。

本研究の一過的発現解析系でこれまで得られた結果から、*PR-1a::Fluc⁺* は様々な因子の病害応答シグナルにおける *PR-1a* 発現制御機能を検出可能であることが示された。またタバコ形質転換体でも *PR-1a::Fluc⁺* 発現誘導の過程は高感度に検出することができる（Watakabe et al., submitted）。

本研究は Fluc レポーターを用いて、病害応答性を発光活性として簡便に、効率的に解析することを目的としているが、それにはより優れた指標が必要である。そこで、最も知見が集積されており、指標としても頻繁に用いられているタバコ *PR-1a* とシロイヌナズナ *PR-1* のプロモーターの病害応答シグナルにおける発現誘導レベルを一過的発現解析系によって検出し、どちらが、病害応答性誘導の指標として優れているか比較を試みた。

図 22 にタバコ *PR-1a* プロモーターとシロイヌナズナ *PR-1* プロモーターの構造を示した。この 2 つのプロモーターは配列の相同性は低いが、存在するエレメントの種類は類似している。*as-1-like* エレメントは本研究でも解析を行った TGA 因子の結合部位である。GT-1 box は光応答シグナルの転写制御因子である GT-1 タンパク質が結合する配列である。タバコの解析で、GT-1 タンパク質の *PR-1a* プロモーター結合活性がサリチル酸や病原感染によって抑制されることから、GT-1 タンパク質は *PR-1a* 発現の抑制因子であることが示唆されている（Buchel et al., 1999）。MYB サイトに結合する MYB タンパク質は、病原感染（タバコモザイクウイルス）やサリチル酸によって発現が誘導されることから *PR-1a* 発現に促進的に働く因子であることが示唆されている（Yang and Klessig, 1996）。その他に W box 相同配列が存在する。W box は転写制御因子である WRKY タンパク質が結合する配列である。WRKY タンパク質は *PR-1* 発現に促進的に働くものと抑制的に働くものの両方が存在する（Rowland and Jones, 2001; Robatzek and Somssich, 2002）。このように、シロイヌナズナ *PR-1* とタバコ *PR-1a* プロモーターは構造上の類似性は高く、共通した転写制御を受けていると考えられる。この

2つのプロモーターのサリチル酸による発現誘導率を一過的発現解析系においてFluc活性として検出・比較を行った。

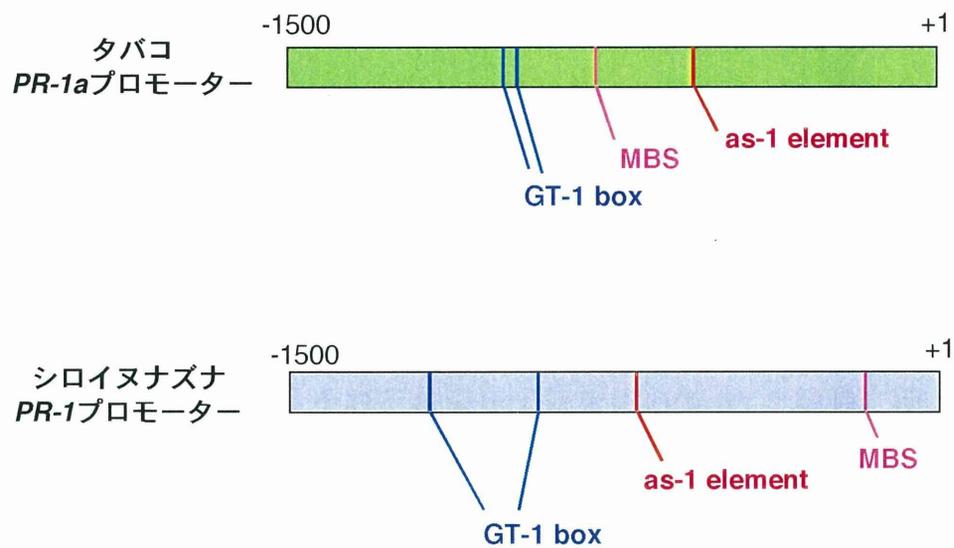


図22. タバコPR-1aプロモーターとシロイヌナズナPR-1プロモーターの比較
 as-1 element: サリチル酸応答領域as-1-likeエレメント。GT-1 box: GT-1タンパク質結合部位。多くの光応答遺伝子のプロモーター等に見られる。MBS: MYBタンパク質結合配列。

6-2. 結果

6-2-1. *PR-1a::Fluc*⁺形質転換タバコにおける *PR-1a* 誘導パターン解析

タバコの *PR-1a::Fluc*⁺形質転換体を作製し、本葉が 5~6 枚展開した植物体の中上位葉に、*PR-1a* の強力な誘導剤である BTH を処理し、高感度 CCD カメラを用いて Fluc 活性の経時変化を追った。図 23 に示したように、BTH を処理した部位で 6 時間後に Fluc 活性の誘導が起り始め、経過時間ごとに上昇し、*PR-1a* 発現部位が拡大していく様子が観察された。さらに、この *PR-1a::Fluc*⁺導入タバコにタバコ野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabacci*) を接種して Fluc 活性の経時変化を観察した (図 24)。接種後 3 日目に接種部位で Fluc 活性が上昇し始め、発現領域が拡大していく様子が観察された。これらの結果から、本研究で用いている *PR-1a::Fluc*⁺がタバコ植物において病害応答性の優れた指標であることが示された。

6-2-2. BY-2 細胞を用いた一過的発現解析系による比較

シロイヌナズナ *PR-1* とタバコ *PR-1a* の病害応答シグナルにおける発現誘導レベルを比較するための手法として、本研究で構築した一過的発現解析系を用いた。タバコ *PR-1a* プロモーターと Fluc のレポータープラスミド (*PR-1a::Fluc*⁺) と、シロイヌナズナ *PR-1* (Lebel et al., 1998) プロモーターと Fluc のレポータープラスミド (*AtPR-1::Fluc*⁺) を、それぞれ遺伝子銃を用いて BY-2 細胞に導入し、DLRA によって、サリチル酸処理による一過的発現誘導レベルを調べた。遺伝子導入の内部標準には 35M::Rluc を用いた。図 25 (A) に示したように、シロイヌナズナ *PR-1* プロモーターではサリチル酸による発現誘導はほとんど検出されないのに対し、タバコ *PR-1a* プロモーターでは約 2 倍に発現が誘導されている。

6-2-3. シロイヌナズナを用いた一過的発現解析系による比較

次に、シロイヌナズナ細胞におけるシロイヌナズナ *PR-1* プロモーターとタバコ *PR-1a* プロモーターのサリチル酸による発現誘導レベルを比較した。*PR-1a::Fluc*⁺と *AtPR-1::Fluc*⁺をそれぞれ遺伝子銃を用いてシロイヌナズナのロゼッタ葉に導入し、DLRA によって、サリチル酸による発現誘導レベルを調べた。シロイヌナズナでは Rluc の発現は非常に低く (データ省略) レポーターとして不適當であったため、遺伝子導入の内部標準には Rluc の因子結合部位をすべて欠失させた hRluc を 35M プロモーターの下流に連結したプラスミド (35M::hRluc) を用いた。その結果、図 25 (B) に示したように、シロイヌナズナ *PR-1* プロモーターではサリチル酸による発現誘導は最大でも約 1.5 倍までに留まるのに対し、

タバコ *PR-1a* プロモーターでは 2.5~3 倍の高い発現誘導を示した。

6-2-4. *PR-1a::Fluc*⁺形質転換シロイヌナズナにおける *PR-1a* 誘導パターンの解析

図 25A,B の一過的発現解析系で得られた結果から、植物病害応答性誘導の指標として優れているのは、シロイヌナズナでもタバコでも、タバコ由来 *PR-1a* プロモーターであることが示された。そこで、*PR-1a::Fluc*⁺を導入した形質転換体シロイヌナズナを作製し、病害応答性の誘導パターンを Fluc 発光活性として検出・解析を試みた。図 26 に示したように、96 穴プレートでシロイヌナズナ幼苗を生育し、サリチル酸または BTH を添加すると、処理後約 6 時間から *PR-1a::Fluc*⁺の発現が誘導されはじめ、12、24 時間後と発現量の上昇過程が発光活性の増大として現れている。一方、対照区では Fluc 活性の誘導は観察されない。さらに、サリチル酸や BTH の濃度に依存した Fluc 活性上昇が明瞭に検出された。

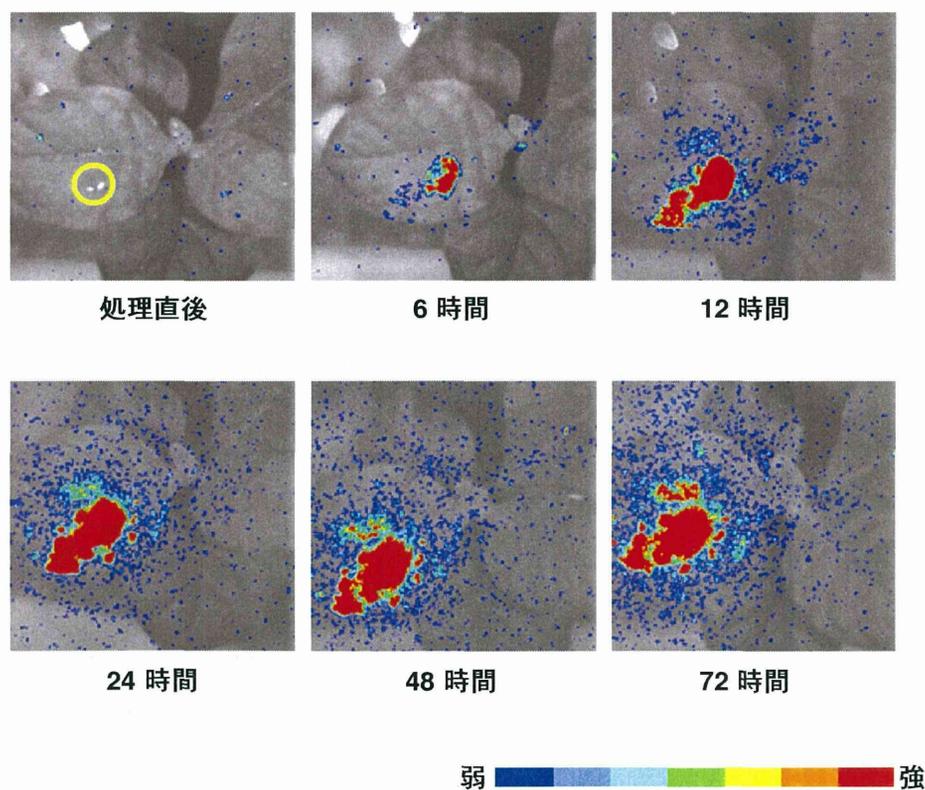


図23. タバコ*PR-1a::Fluc+*形質転換体のBTHに対するルシフェラーゼ活性の変化
 本葉が5~6枚展開した*PR-1a::Fluc+*形質転換タバコの上位葉に500 μ M BTHを数 μ l
 滴下し（黄色円部分）、*PR-1a*発現誘導の経時変化をCCDカメラを用いて連続
 観察した。

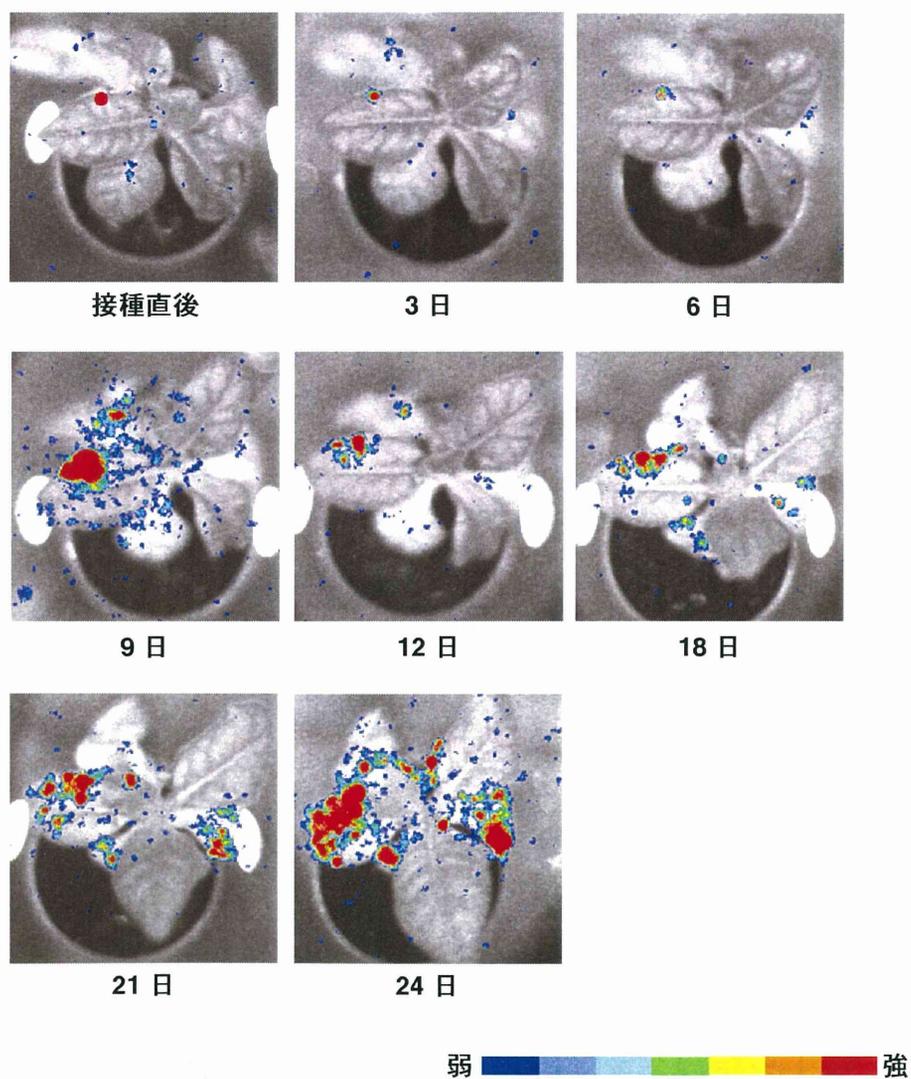
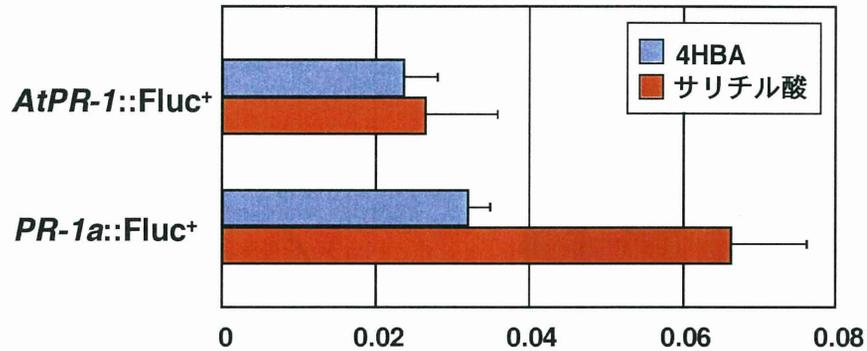


図24. タバコ野火病菌 (*Pseudomonas. syringae* pv. *tabacci*) に対するPR-1a::Fluc+形質転換タバコのルシフェラーゼ活性の変化
 本葉が5~6枚展開したPR-1a::Fluc+形質転換タバコの上位葉表面に傷をつけ、野火病菌培養液1 μ l (約 3×10^7)を滴下。PR-1a発現の経時変化をCCDカメラを用いて連続観察した。赤丸部分は接種部位。

(A) BY-2



(B) シロイヌナズナ

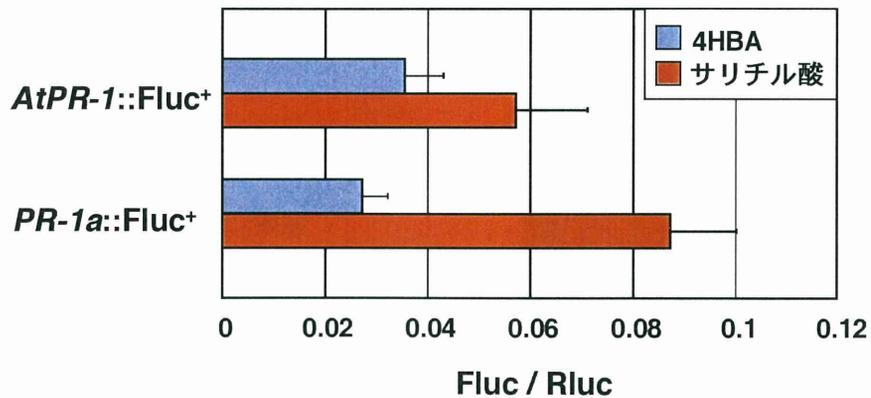


図25. タバコ*PR-1a*プロモーターとシロイヌナズナ*PR-1*プロモーターのサリチル酸シグナルによる発現誘導レベルの一過的発現解析系を用いた比較

(A) 5~6日間培養したタバコBY-2培養細胞に各種レポータープラスミドを導入し、一過的発現誘導を解析。導入後30 μ Mサリチル酸/4HBAを処理し、22時間室温で静置培養後DLRAを用いてレポーター活性を測定した。内部標準は図11と同じ。

(B) シロイヌナズナロゼッタ葉に各種レポータープラスミドを導入し、発現誘導を解析。導入後1mMサリチル酸/4HBAをスプレーし、22時間室温で静置培養した。内部標準は35M::hRluc ; 35Mプロモーターの下流に、改良型Rluc (hRluc) 遺伝子を連結したプラスミド。

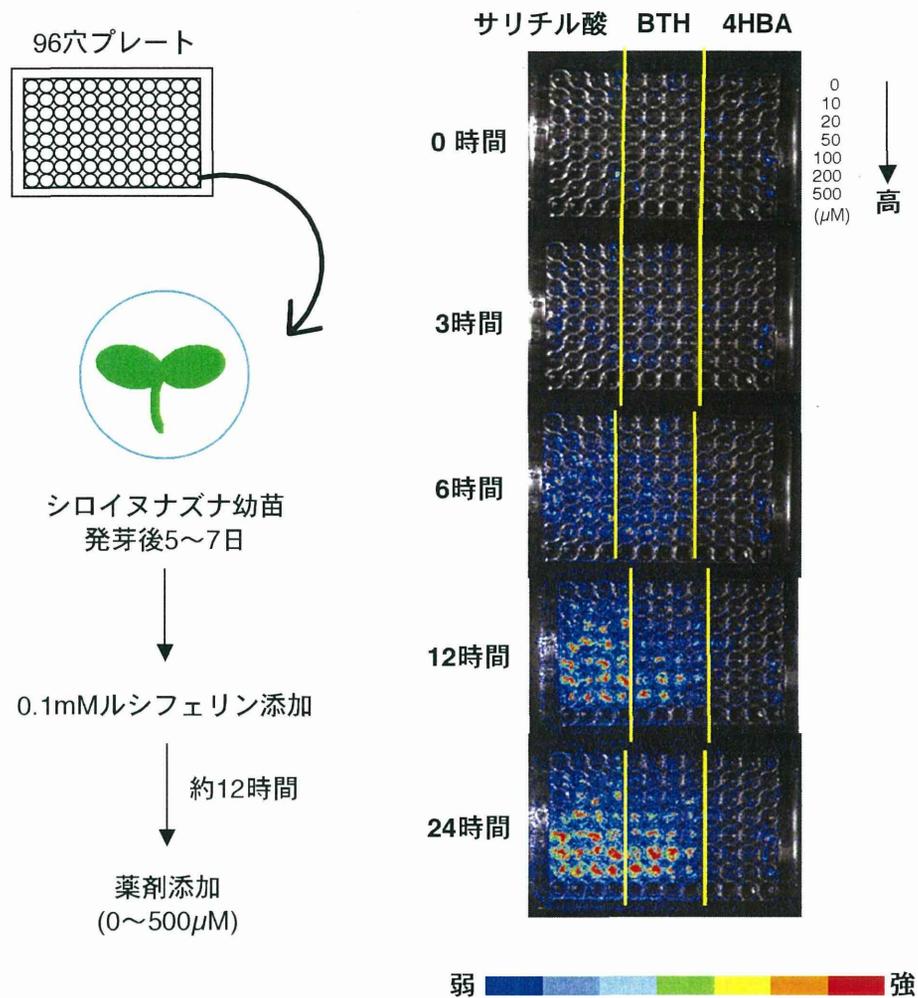


図26. シロイヌナズナPR-1a::Fluc⁺形質転換体のサリチル酸、BTHに対するルシフェラーゼ活性の変化

96穴プレートにPR-1a::Fluc⁺形質転換シロイヌナズナの種を播種し、水中で発芽後5~7日間培養。二葉の幼苗に様々な濃度のサリチル酸、BTHを添加し、PR-1a発現誘導の経時変化をCCDカメラを用いて連続観察した。

6-3. 考察

一過的発現解析系の結果より、タバコでもシロイヌナズナでも、タバコ *PR-1a* プロモーターの方が、シロイヌナズナ *PR-1* プロモーターよりも、サリチル酸処理によって高い発現誘導が検出されたことから (図 25)、タバコ *PR-1a* プロモーターの方が高いサリチル酸応答性を示すことが分かった。この結果は、過去に報告された研究と一致する内容である (Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996)。シロイヌナズナとタバコに、サリチル酸と同様の作用を及ぼす BTH を処理し、各々 *PR-1*、*PR-1a* の RNA ゲルブロット法による解析が行われた結果、シロイヌナズナ *PR-1* が 0.12mM の BTH で発現が誘導されはじめるのに対し、タバコ *PR-1a* はその 100 分の 1 の BTH 濃度ですでに発現誘導が確認されている (Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996)。

また、形質転換体の観察においても、タバコだけでなくシロイヌナズナでも *PR-1a* プロモーターの病害応答シグナルによる誘導が高感度に検出されたことから (図 23, 24, 26)、タバコ *PR-1a* プロモーターはタバコだけでなくシロイヌナズナでも病害応答性誘導の優れた指標になり得ると考えられる。本研究において我々が単離した *PR-1a* プロモーターはタバコ BY-2 培養細胞由来であり、既存の *PR-1a* プロモーターとは配列が若干異なる。栽培品種ごとの *PR-1a* プロモーターの構造を図 2 に示した。配列のわずかな差から存在するエレメントの位置に違いが生じ、*PR-1a* 発現誘導レベルに多少の差を生じていることも考えられる。

図 26 より、*PR-1a::Fluc⁺*を導入したシロイヌナズナでは、病害応答性誘導が高感度に発光活性として検出できることが示された。この形質転換体を用いれば、例えば病害応答性の新規な変異体をスクリーニングする場合に 経時変化や濃度依存性を高感度に検出可能である。これまでに、シロイヌナズナ *PR-1* プロモーターとホタルルシフェラーゼの融合遺伝子 (*AtPR-1::Fluc⁺*) 導入シロイヌナズナを用いた新規遺伝子の探索が行われているが (Maleck et al., 2002; Murray et al., 2002)、単離された変異体は恒常的に *AtPR-1* を発現する株だけである。これはシロイヌナズナ *PR-1* プロモーターの病害応答シグナルによる発現誘導率が十分に高くないことが原因である可能性がある。本研究で示したように、タバコ *PR-1a* プロモーターがシロイヌナズナ *PR-1* プロモーターよりも優れた指標であることから、*PR-1a::Fluc⁺*導入シロイヌナズナを用いた新規変異体探索では、これまでのように *Fluc* 発光活性の有無だけでなく、誘導レベルの違い・誘導の速さの違いを詳細に解析でき、これまで見落としていた新規な変異遺伝子の単離に大いに貢献すると考えられる。

**7. PR-1a::Fluc⁺導入シロイヌナズナを用いた新規な
病害応答性変異体のスクリーニング**

7-1. 序論

新規遺伝子探索の伝統的手法は、選抜が容易な形質の変異を指標として、その変異の原因遺伝子を単離するというものである。これまでに単離されてきた植物の病害応答性関連遺伝子も、抵抗性が著しく低下したのものや、恒常的に病害応答が誘導される変異株から得られたものである (Bowling et al., 1994; Cao et al., 1994; Cao et al., 1997; Ryals et al., 1997)。しかし、これまでに用いられてきた手法では、病害応答シグナルの活性レベルの制御に関与する遺伝子を単離することは難しく、スクリーニング方法は煩雑で、解析できる個体数が少ない。また同じ手法を用いていたのでは単離される遺伝子も重複してしまうことも多い。これまでも別々のグループが同じ原因遺伝子の対立遺伝子を単離した例がいくつかある (Cao et al., 1997; Ryals et al., 1997)。そのため、病害抵抗性の有無ではなく、病害抵抗性の指標となる遺伝子の発現を指標とした変異体の探索が必要となる。全身で誘導される病害抵抗性の指標として最も用いられるのは *PR* 遺伝子である。*PR* 遺伝子は様々な植物で単離されており、双子葉植物では全身で病害抵抗性が誘導された植物で発現が誘導されることが分かっている。

これまでに、シロイヌナズナ *PR-1* プロモーターとホタルルシフェラーゼの融合遺伝子 (*PR-1::Fluc⁺*) を導入した形質転換シロイヌナズナに変異を誘発し、*Fluc* レポーター活性の変化を指標とした新規遺伝子の探索が行われている (Maleck et al., 2002; Murray et al., 2002)。*Fluc* 活性は細胞に無害であるので、これまでの指標の解析方法とは違い、変異体候補である株ひとつひとつの *AiPR-1::Fluc⁺* 活性の経時変化を簡便な手順で追うことが可能である。しかし、これまで報告されてきた *AiPR-1::Fluc⁺* 導入シロイヌナズナを用いた変異体スクリーニングでは、単離・解析された変異体は恒常的に *AiPR-1* を発現誘導している株だけである。これはシロイヌナズナ *PR-1* プロモーターが病害応答シグナルによる発現誘導率が十分に高くないため、病害応答性変異の指標として適切でない可能性があると考えた。本研究のこれまでの一過的発現解析系による解析結果から、タバコ *PR-1a* プロモーターはタバコだけでなくシロイヌナズナ細胞内でも、シロイヌナズナ *PR-1* プロモーターに比べてサリチル酸などのシグナル物質による誘導率が高いことを明らかにした (図 25)。また形質転換体の解析でも、*PR-1a::Fluc⁺* がタバコだけでなくシロイヌナズナでも病害応答性の優れた指標であることを示している (図 23, 24, 26)。本研究は、*PR-1a::Fluc⁺* 形質転換シロイヌナズナを用いて病害応答性の新規変異体探索を行った。

7-2. 結果

病害応答性に関与する新規遺伝子の単離を目的として、*PR-1a::Fluc⁺*形質転換シロイヌナズナにエチルメタンスルホン酸 (Ethyl methanesulfonate: EMS) を処理して変異を誘発し、Fluc 活性を指標として新規変異体の探索を行った。図 27 に示したように、96 穴プレートに EMS 処理した *PR-1a::Fluc⁺*形質転換シロイヌナズナの M2 種子を播種し、発芽後 5~7 日目の幼苗にサリチル酸を処理し、Fluc 活性の変化を CCD カメラによって経時的に解析した。図 27 に示したように、EMS 処理していない *PR-1a::Fluc⁺*シロイヌナズナと比較して *PR-1a* 発現誘導が早い株や発現レベルの強い株を、変異体の候補として単離した。約 20000 粒の M2 種子を解析し、単離した変異体候補株を表 3 に示した。EMS 未処理の *PR-1a::Fluc⁺*シロイヌナズナはサリチル酸処理後 12 時間後に Fluc 活性が検出されはじめるのに対し、単離した EMS 処理株 (M2) は 6 時間後に Fluc 活性が上昇し始めるものもあり、12、24 時間後もより高い Fluc 発光活性が検出された。

次に、変異体候補株から得られた M3 種子を MS 寒天培地に播種し、発芽後約 14 日目の本葉が展開してきた幼苗にサリチル酸を処理し、EMS 未処理の *PR-1a::Fluc⁺*と *PR-1a* 発現誘導の経時変化の比較を行った。図 28 に示したように、変異体候補株は EMS 未処理の *PR-1a::Fluc⁺*と比べてサリチル酸処理による Fluc 活性の上昇が早く、発現レベルが高いことが示された。

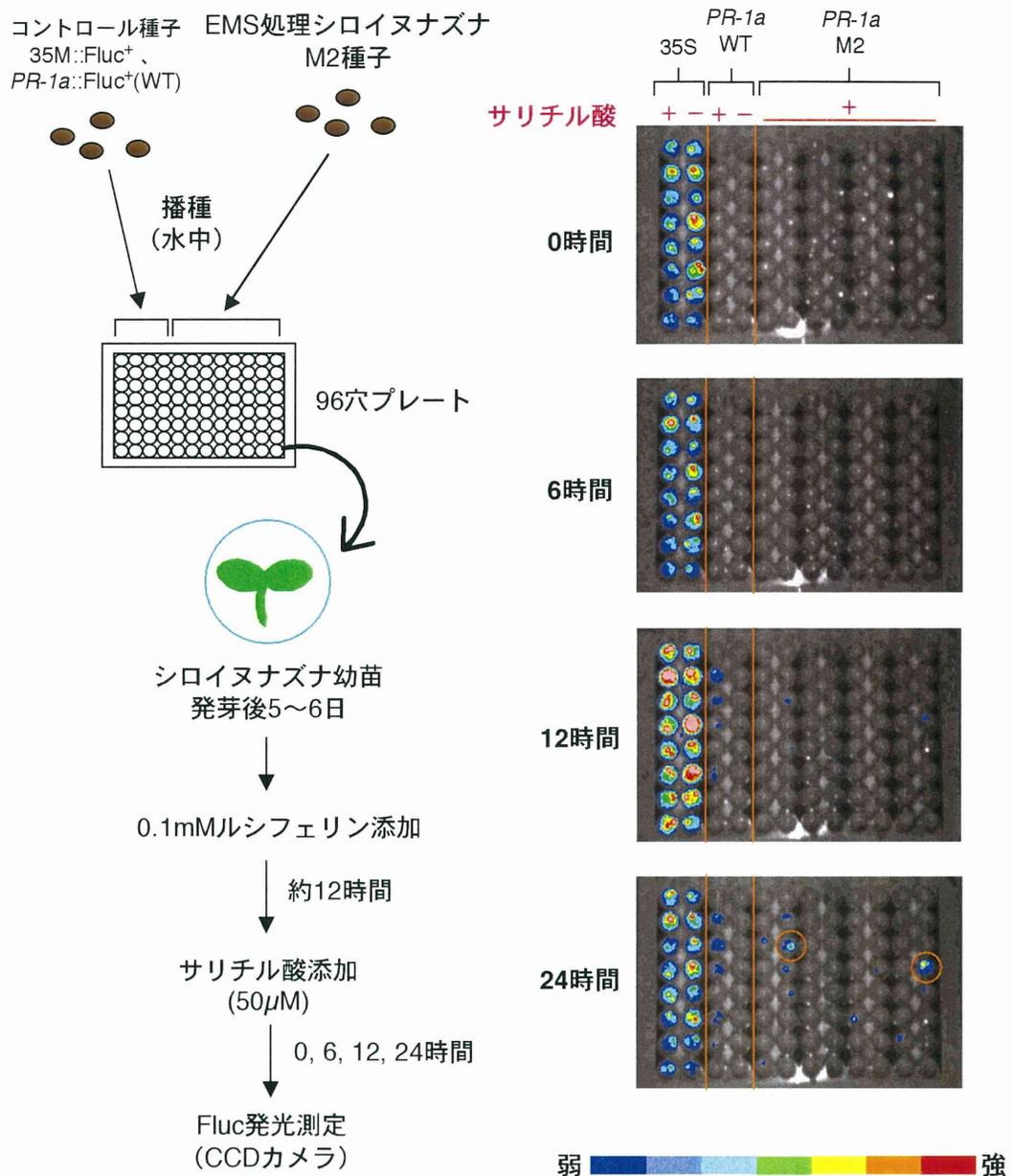


図27. 病害抵抗性の新規変異体スクリーニング方法 (M2世代)

EMS処理したPR-1a::Fluc⁺のシロイヌナズナM2種子 (PR-1a::Fluc⁺(M2)) と EMS処理していないPR-1a::Fluc⁺種子 (PR-1a::Fluc⁺(WT)) を96穴プレートに播種し、水中で5~6日間培養した。二葉の幼苗にサリチル酸処理後、EMS未処理PR-1a::Fluc⁺よりも発光活性の上昇したM2幼苗、また発光活性の上昇が早いM2幼苗 (丸で囲った幼苗) を単離した。35S: 35S::Fluc⁺、恒常発現35Sプロモーターの下流にFluc⁺を連結したシロイヌナズナ。

M2	6時間	12時間	24時間	M2	6時間	12時間	24時間
PR	NT	±	+				
P1-1C7	+	++	++	P2-25E8	NT	+	++
P1-1F6	±	+	++	P2-25H7	NT	+	++
P1-1F9	±	+	++	P2-25F7	NT	+	++
P1-1H8	±	+	+	P2-25C7	NT	+	++
P1-3D8	±	++	++	P2-26E8	±	+	+
P1-3A9	±	++	++	P3-1G8	±	±	±
P1-5A8	+	++	++	P3-3D3	NT	+	++
P1-5A7	±	++	++	P3-3C5	NT	+	++
P1-5H7	±	++	++	P3-3E9	NT	+	++
P1-5E10	±	+	++	P3-4E10	NT	+	++
P1-6A6	NT	+	++	P3-7D1	±	±+	+
P1-9H10	+	+	++	P3-12A9	±	+	+
P1-9E9	+	±	+	P3-13D11	±	+	±+
P1-13E3	±	±	++	P3-13H7	+	+	±+
P1-15F7	±	+	++	P3-14B10	±	+	±+
P1-15F9	NT	±	++	P3-14C10	±	+	±+
P2-15G3	±	++	+++	P3-14D2	±	+	±+
P2-19H10	±	+	++	P3-18G8	±	+	+
P2-22C10	NT	+	++	P3-18D4	±	+	+
P2-23E10	NT	+	++				
P2-24B8	±	±+	+				
P2-25B2	NT	+	++				

表 3. 変異体候補 (M2)

PR: EMS未処理のPR-1a::Fluc⁺シロイヌナズナ。M2: EMS処理PR-1a::Fluc⁺株。検出限界下をNTとした。±, +, ++: 発光活性強度 (± < + < ++)

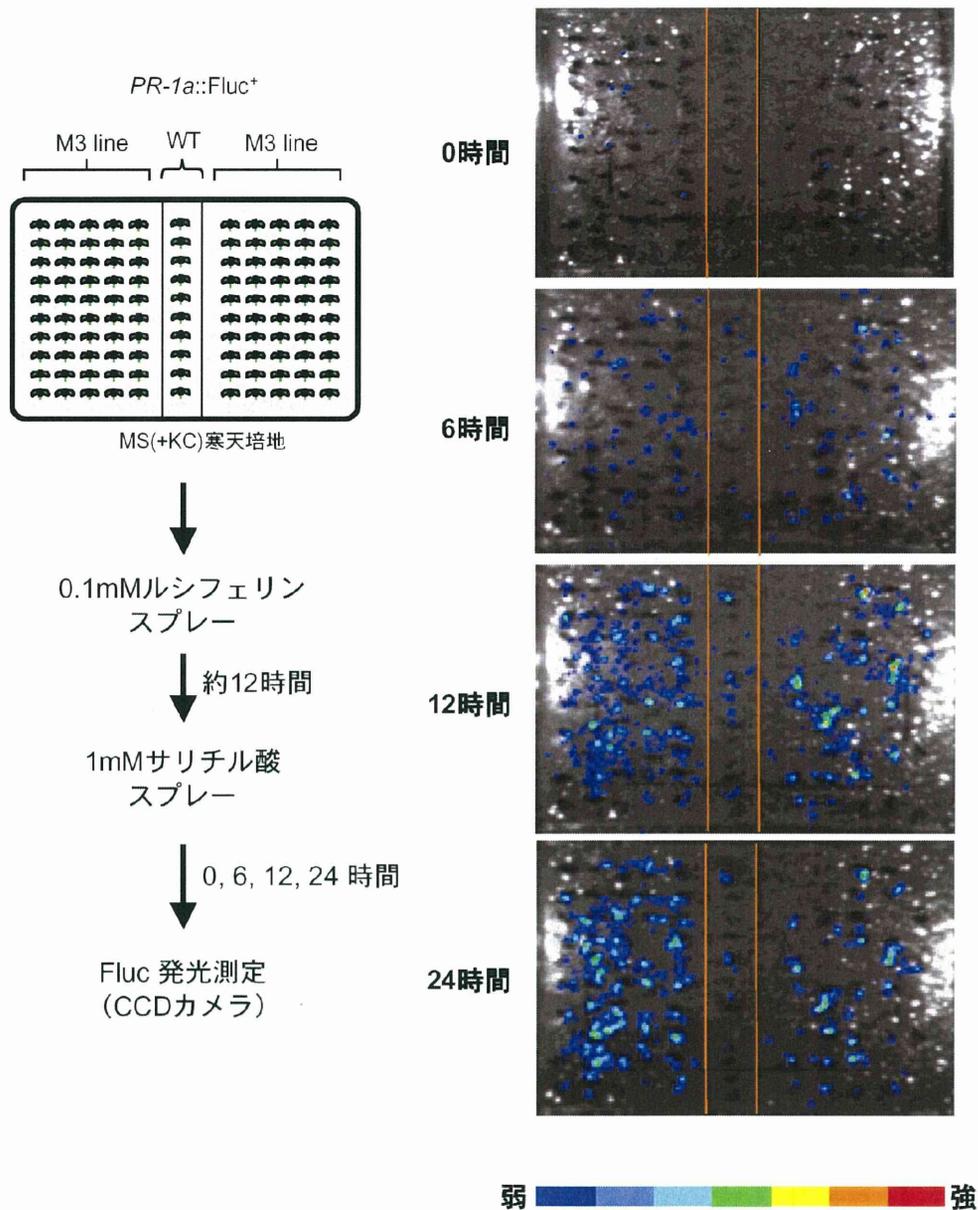


図28. 次世代の病害抵抗性の新規変異体スクリーニング方法 (M3世代)
*PR-1a::Fluc⁺*シロイヌナズナM3種子 (*PR-1a::Fluc⁺*(M3)) をMSKC寒天培地に播種し、本葉が発生してきた幼苗をスプレーによってサリチル酸処理後、*PR-1a::Fluc⁺*(WT) (図27) よりも発光活性が上昇した次世代 (M3) ライン、また発光活性の上昇が早いM3ラインを探索した。

7-3. 考察

M2、M3 の幼苗の解析では、*PR-1a::Fluc*⁺の発現誘導の経時的な変化が、高感度に検出されている。従って、本研究で行った *AtPR-1a::Fluc*⁺形質転換シロイヌナズナを用いた新規遺伝子の探索手法は、病害応答シグナルに関与し *PR* 遺伝子発現パターンに作用する因子の探索に有効な手法であると考えられる。

本研究ではこれまでに報告されている *PR-1::Fluc* シロイヌナズナを用いた変異体探索とは異なり、ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Fluc*) の液胞移行シグナルを欠失させた *Fluc*⁺遺伝子を用いている。この改良型 *Fluc*⁺は *Fluc* 遺伝子よりもさらに感度の高い *Fluc* 発光活性を検出することができ、レポーター遺伝子としてより高性能である。この点も本研究における変異体探索系が既報の実験系と比較して優れている点である。

これまでに報告されている恒常的に抵抗性を誘導する変異体はそのほとんどが形態的变化を伴う。これは、そのような変異の原因遺伝子が病害応答シグナルの比較的上流にあり、植物の生育に関連する情報伝達系にも影響を及ぼしているためであると考えられる。これらの変異体は恒常的に抵抗性を誘導するために比較的病害抵抗性は向上するが、矮性や自発的細胞死の誘導などの表現形が現れる。一方、本研究でこれまでに単離した変異体株には形態的变化の見られないものがほとんどである。これは病害応答シグナルで最終的に誘導される *PR-1a* 遺伝子の発現誘導を変異体株単離の指標に用いているため、シグナルの下流に関与する遺伝子の変異株を単離しているからであると考えられる。従って本研究で単離した変異株の原因遺伝子は、病害応答性に影響を及ぼすが形態など他の情報伝達系には影響を与えないものであることが期待される。

単離した変異株は今後病原接種試験等を行うことにより、さらに病害抵抗性についての直接的な特徴を解析することができ、遺伝子発現と耐病性の関連についての新知見が得られるものと考えられる。

8. 形質転換植物を用いた *NPR1* の解析

8-1. 序論

本研究ではこれまで、病害応答シグナルで機能する因子の簡便な解析手法として一過的発現解析系を構築し、病害関連因子の *PR-1a* 発現誘導への関与を解析してきた。一過的発現解析系で得られた知見を組織別に確認するため、また病害刺激による発現解析を行うために、特に一過的発現解析系で *PR-1a* 発現に影響を与えた *AtNPR1*、*AtNPR1-AD* を導入した植物を作製した。これらの形質転換体は病害抵抗性が向上していることが期待される。すでに *35S::AtNPR1* を導入したシロイヌナズナの解析が行われているが、内在性遺伝子を過剰発現させたために遺伝子共抑制を起こす形質転換体が多く、病害抵抗性の向上も顕著なものとは得られていない (Cao et al., 1998; Friedrich et al., 2001)。また、イネに *35S::AtNPR1* を導入した例もあるが、病害抵抗遺伝子についての解析は行われていない (Chern et al., 2001)。一方、タバコに *AtNPR1* を導入した例はない。以上の様な状況に鑑み、*35S::AtNPR1-AD* 導入シロイヌナズナと、*35S::AtNPR1*、*35S::AtNPR1-AD* 導入タバコを作製し、それぞれ内在性 *PR-1* 発現の解析を行った。

8-2. 結果

本研究で用いた一過的発現解析系から、シロイヌナズナ NPR1 (AtNPR1) と GAL4 の転写活性化部位 (4AD) の融合タンパク質発現プラスミド 35S::AtNPR1-AD と *PR-1a*::Fluc⁺を一過的発現した BY-2 細胞では、35S::AtNPR1-AD によって *PR-1a*::Fluc⁺の発現誘導が促進されるという結果が得られた (4-2、図 11)。この結果から、AtNPR1-AD を高発現させた形質転換植物では NPR1 形質転換体 (Cao et al., 1998) よりも *PR* 発現誘導レベルが促進される可能性が考えられた。そこで、35S::AtNPR1-AD を導入した形質転換シロイヌナズナを作製し、T2 世代でサリチル酸処理による内在性 *PR-1* の発現誘導を野生型と比較した。図 29 に示したように、#1-4、-8、#9、#5-1~7、#6-1~6 で *PR-1* 発現が明らかに低下した。特に、#9 と#6-2 では *PR-1* の発現はほとんど検出されなかった。一方、#7-5 では *PR-1* 発現は野生型よりも高く誘導されていると判断された。

また、35S::AtNPR1、35S::AtNPR1-AD を導入した形質転換タバコをそれぞれ作製し、T2 世代でサリチル酸処理による内在性 *PR-1a* の発現誘導を野生型と比較した。図 30 に示したように、35S::AtNPR1 形質転換体では、#1、#5 で野生型よりも高い *PR-1a* 発現誘導が検出された。また 35S::AtNPR1-AD 形質転換体でも野生型よりも高い *PR-1a* 発現が検出された。

ただし、形質転換体作製の途中の選択培地での生育段階で得られた遺伝子導入株の確率は非常に低かった (データ省略)。このことから、AtNPR1 や AtNPR1-AD の過剰発現は、アグロバクテリウムによる遺伝子導入の効率を抑制するか、タバコ細胞内での過剰発現自体が有害な作用を及ぼす可能性が考えられた。

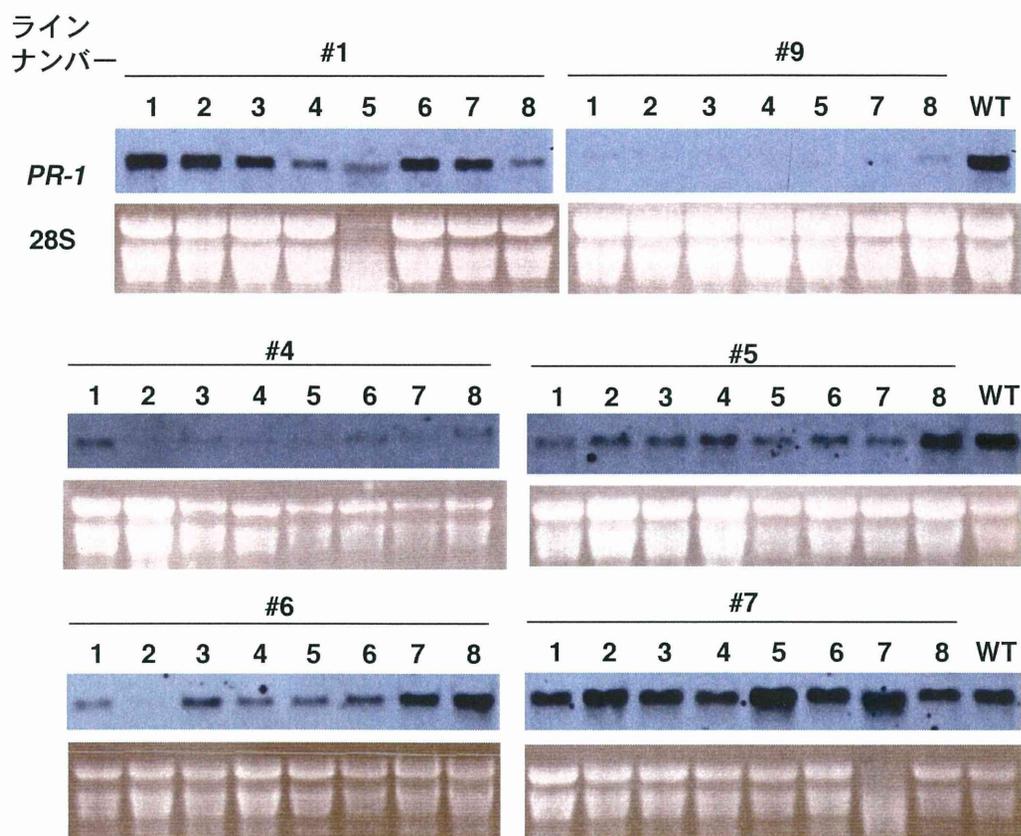


図29. 35S::*AtNPR1-4AD*形質転換シロイヌナズナのサリチル酸による*PR-1*発現誘導

35S::*AtNPR1-AD* (#1, 9, 4, 5, 6, 7) 形質転換体シロイヌナズナと野生型 (WT) のロゼッタ葉に1mMサリチル酸をスプレー処理して36時間後にRNAを抽出し、RNAゲルブロット解析を行った。プローブは*PR-1* ゲノム断片のタンパク質コード領域。

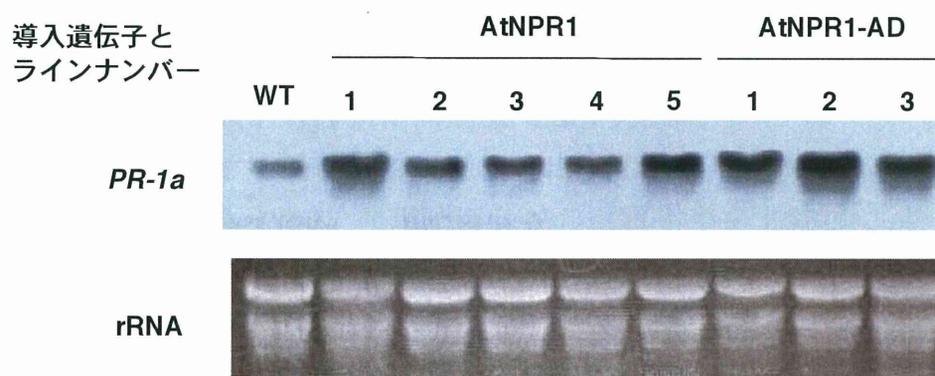


図30. 35S::AtNPR1、35S::AtNPR1-AD形質転換タバコのBTHによる*PR-1a*発現誘導

35S::AtNPR1、35S::AtNPR1-AD形質転換タバコと野生型（WT）タバコの中上位葉に500 μ M BTHをスプレーして36時間後にRNAを抽出し、RNAゲルブロット解析を行った。プローブは*PR-1a*ゲノム断片のタンパク質コード領域。

8-3. 考察

図 29 に示したように、35S::AtNPR1-AD 形質転換シロイヌナズナでは、解析したほとんどのラインで *PR-1* の発現誘導が野生型よりも抑制されているか、欠失していた。これは、AtNPR1-AD を高発現させたことによって、AtNPR1 発現に、相同配列に依存した遺伝子共抑制がおこった可能性がある。過去に解析された 35S::AtNPR1 導入シロイヌナズナでは、多くのラインで AtNPR1 高発現による遺伝子共抑制がおこり、*PR-1* 発現や病害抵抗性が低下したと報告されている (Cao et al., 1998; Friedrich et al., 2001)。本研究でも数ラインではあるが、*PR-1* 発現誘導が野生型よりも上昇した AtNPR1-AD 形質転換体も得ているので、これらのラインで病害抵抗性が向上していることが期待される。

35S::AtNPR1、35S::AtNPR1-AD 形質転換タバコは、シロイヌナズナとは異なり、内在性 *PR-1a* の発現が抑制されたラインは観察されず、*PR-1a* 発現誘導が野生型よりも上昇したラインがいくつか得られている (図 30)。これらの形質転換体で AtNPR1 が発現していることは RT-PCR によって確認している (データ省略)。シロイヌナズナで遺伝子共抑制が高頻度で起ったのに対し、タバコで起らなかったのは、過剰発現させた遺伝子が異種植物由来の遺伝子であったためであると考えられる。また内在性 *PR-1a* 発現誘導レベルは野生型と比較して 2~3 倍高かったが、これは過去に報告された 35S::AtNPR1 形質転換シロイヌナズナの野生型と比較した *PR-1* 発現誘導促進レベルと同程度である (Cao et al., 1998)。これらの *PR-1a* 発現誘導が促進したラインでは病害抵抗性が向上していることが期待される。

しかし、35S::AtNPR1、35S::AtNPR1-AD 形質転換タバコでは、遺伝子導入効率が非常に低く、また AtNPR1 発現レベルが低いものしか得られなかったことから (データ省略)、NPR1 の過剰発現がタバコに有害である可能性がある。従って、恒常発現 35S プロモーターではなく、病害応答の比較的上流に関与する遺伝子のプロモーターを用いた場合には、病害応答シグナル誘導時にのみ野生型よりも早く、適当なレベルで発現が誘導され、高い病害抵抗性を示す形質転換体を得られる可能性がある。

9. 総括

植物の全身獲得抵抗性（SAR）は、病原感染部位に限定される局所的応答とは異なり病害の種類に関係なく防御応答を示す。従って SAR の機構解明は、安全性の高い病害防除薬剤の開発や耐病性植物の作出など、植物保護による農産物の安定供給に寄与することが期待されている。

SAR 誘導機構には幾つかのシグナル経路が存在し、それらは複雑なネットワークを形成するため、SAR 因子の機能を解析するためには複数の因子の相互作用を検出する必要がある。本研究で考案した一過的発現解析系は、SAR 誘導剤や SAR 関連因子による *PR-1a* 発現制御を高感度に検出することができた。この実験系は、これまで困難であった複数の因子の発現制御相互作用を解析する上で、形質転換植物を作製するよりも迅速かつ操作が簡便であり、しかも結果が明瞭である。従って、これまで困難であった複数の因子の SAR シグナルにおける転写活性化機能や、各々の因子間の相互作用を短時間で明らかにすることができる。また、植物細胞内で発現誘導を解析しているのも、出芽酵母内の転写活性化能解析系よりも得られる情報が多い。SAR 因子のひとつ、シロイヌナズナ NPR1（AtNPR1）の *PR-1a* 発現誘導における作用機作は明らかになっていないが、本研究で用いた一過的発現解析系では、AtNPR1 が *PR-1a* プロモーターに転写制御因子を介して結合し、転写活性化に直接関与することを示唆する結果も得られている。このことから、本研究で用いた一過的発現解析系が、転写活性化の作用機作を解析する目的に有効であることが示された。

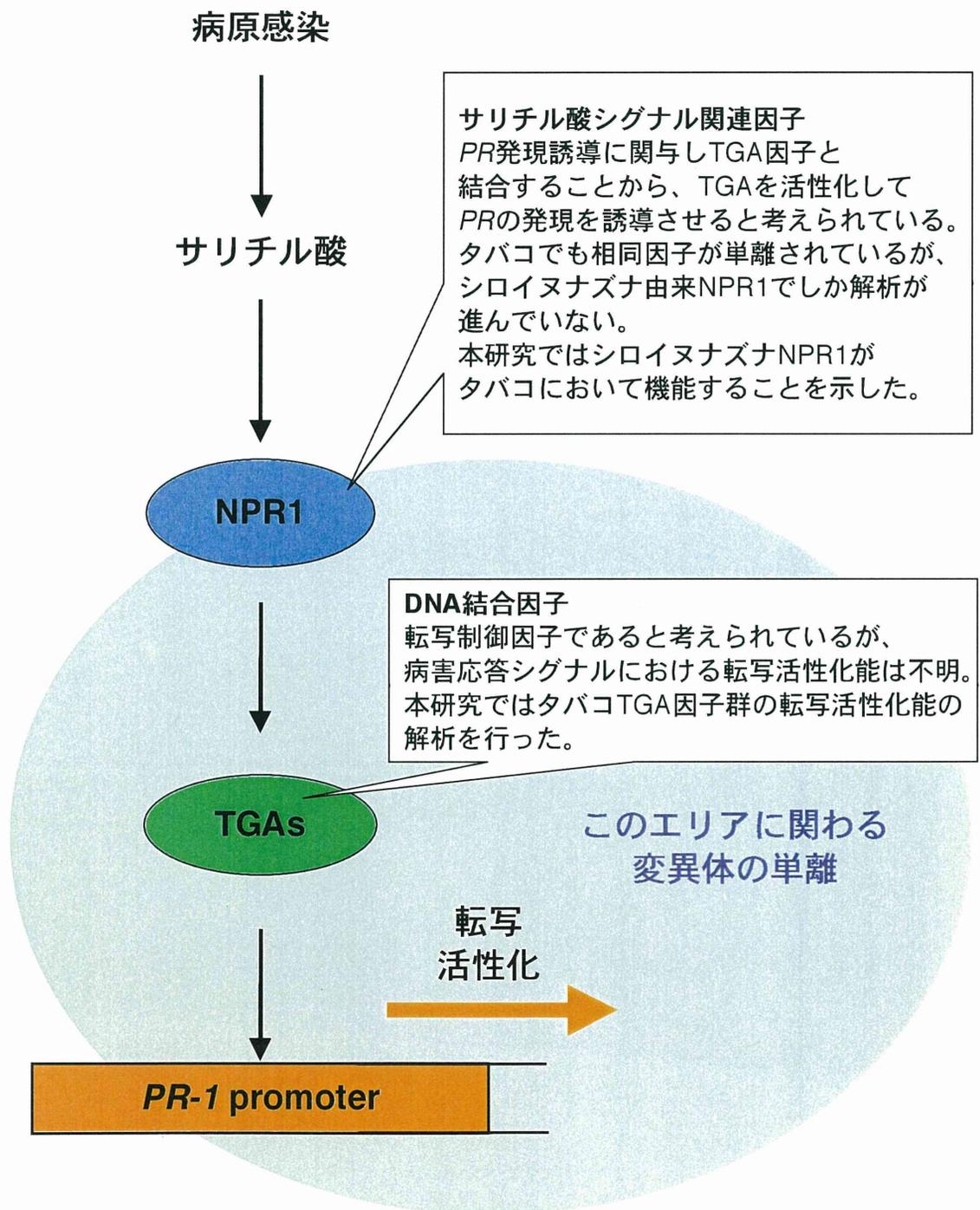
本研究では *PR-1a* プロモーターの転写活性化に関与する因子について一過的発現解析を行ったが、高い *PR-1a* 発現誘導能を示した AtNPR1、AtNPR1-AD については、さらに形質転換植物を用いた解析を行い、本研究で開発した一過的発現解析系で得られた結果についての信頼性を確認している。これらの遺伝子を導入したタバコ形質転換体では内在性 *PR-1a* 発現誘導量が増大したことから、他の一連の病害応答因子の誘導量も向上していると考えられ、従ってこの形質転換体は高い病害抵抗性を示すことが期待される。また、タバコ植物でシロイヌナズナ NPR1 が病害応答遺伝子の高発現に寄与するというこの結果は、他の植物種の病害抵抗性改善戦略にも重要な示唆を与えるものである。

さらに、*PR-1a::Fluc⁺*レポーターを導入した形質転換体では、*PR-1a* の由来であるタバコだけでなくシロイヌナズナでも、病害応答シグナルによる SAR 誘導を時空間的に追跡し、高感度に検出可能であった。近年、環境負荷の少ない農産物生産方法を要求する動きが高まっているが、例えば殺菌剤に代わる環境に負荷を与えない薬剤の探索などには大量の試験区の設定が必要であった。一方この

形質転換体を用いれば、任意薬剤処理による SAR 誘導などの大量解析が簡便に行え、かつ詳細なデータが得られることから、新規な病害抵抗誘導薬剤の探索に極めて有効であると考えられる。

本研究ではこの形質転換シロイヌナズナを用いて新規変異体の探索を行い、SAR 誘導の変異体候補を複数単離している。変異体の探索過程では *PR-1a* 発現誘導の速い株を単離していることから、本研究で得られる変異体は、既報の *PR-1* 恒常発現型のものとは異なり、病害応答シグナルの誘導レベルを調節する遺伝子の変異であることが期待される。また、得られた変異体候補株には矮性や自発的細胞死などの *PR-1a* 発現誘導量の変異以外の形質は見られない。このことから、得られた変異体候補株は病害応答シグナルの比較的下流の、*PR-1a* 発現誘導の付近で機能する因子の変異であると考えられる。このような変異体では植物細胞の基本代謝に影響を与えることなく、病害抵抗性が向上している可能性がある。

以上を要するに、本研究で開発した解析系は既存のものの弱点を補う新しい実験系であり、得られた病害応答関連因子群の新知見も合わせて、低環境負荷な農作物保護手法の開発などに貢献することが期待される。



10. 謝辞

本研究をおこなうにあたり、御指導、御鞭撻いただきました横浜国立大学環境情報学府の平塚和之教授、笹本浜子教授、鈴木匡助教授、中村達夫講師、渡壁百合子氏には、大変お世話になりました。また、審査の際貴重な御意見をいただいた上杉晴一教授に厚く御礼申し上げます。また環境遺伝子工学分野の皆様には感謝いたします。特に研究を御助力していただいた田中恒之氏、西山洋平氏に心から感謝いたします。

11. 参考文献

Bowler, C., and Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5, 241-246.

Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F., and Dong, X. (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1845-1857.

Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X. (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* 9, 1573-1584.

Buchel, A.S., Brederode, F.T., Bol, J.F., and Linthorst, H.J.M. (1999). Mutation of GT-1 binding sites in the *Pr-1a* promoter influences the level of inducible gene expression *in vivo*. *Plant Mol. Biol.* 40, 387-396.

Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, S., and Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1583-1592.

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57-63.

Cao, H., Li, X., and Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6531-6536.

Chern, M-S., Fitzgerald, H.A., Yadav, R.C., Canlas, P.E., Dong, X., and Ronald, C. (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27, 101-113.

Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X. (1998). Uncoupling *PR* gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant

Arabidopsis cpr6-1 mutant. *Plant Cell* *10*, 557-569.

Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., and Dong, X. (2000). Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *12*, 2175-2190.

Conrath, U., Silva, H., and Klessig, D.F. (1997). Protein dephosphorylation mediates salicylic acid-induced expression of *PR-1* genes in tobacco. *Plant J.* *11*, 747-757.

Cornelissen, B.J., Horowitz, J., van Kan, J.A., Goldberg, R.B., and Bol, J.F. (1987). Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the *PR-1* group. *Nucleic Acids Res.* *15*, 6799-6811.

Despres, C., DeLong, C., Glaxe, S., Liu, E., and Fobert, P.R. (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* *12*, 279-290.

Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P.R. (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* *15*, 2181-2191.

Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., Karin, M. (1994). The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* *77*, 381-90.

Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M.G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Mettraux, J-P., Kessmann, H., and Ryals, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* *10*, 61-70.

Friedrich, L., Lawton, K., Dietrich, R., Willits, M., Cade, R., and Ryals, J. (2001). NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *14*, 1114-1124.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 574-576.

Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 301-308.

Govrin, E.M., and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10, 751-757.

Gruner, R., and Pfitzner U.M. (1994). The upstream region of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* 220, 247-255.

Gupta, V., Willits, M.G., and Glazebrook, J. (2000). *Arabidopsis thaliana* EDS4 Contributes to salicylic acid(SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 508-511.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Harms, K., Ramirez, I., and Pena-Cortes, H. (1998). Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant physiol.* 118, 1057-1065.

Horvath, D.M., and Chua, N-H. (1996). Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* 31, 1061-1072.

Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Kroj, T., and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 7, 1360-1385.

Johnson, C., Glover, G., and Arias, J. (2001). Regulation of DNA binding and trans-activation by a xenobiotic stress-activated plant transcription factor. *J. Biol. Chem.* 276,

172-178.

Johnson, C., Boden, E., and Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of *trans*-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *15*, 1846-1858.

Jupin, I., and Chua, N-H. (1996). Activation of the CaMV *as-1 cis*-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a. *EMBO J.* *15*, 5679-5689.

Katagiri, F., Lam, E., and Chua, N-H. (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature* *340*, 727-730.

Katagiri, F., Yamazaki, K., Horikoshi, M., Roeder, R.G., and Chua, N-H. (1990). A plant DNA-binding protein increases the number of active preinitiation complexes in a human *in vitro* transcription system. *Genes Dev.* *4*, 1899-1909.

Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* *12*, 2339-2350.

Kunkel, B., and Brooks, D. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 325-331.

Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, R-X.F., and Chua, N-H. (1989). Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 7890-7894.

Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., and Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* *10*, 71-82.

Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., and Ward, E. (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* *16*, 223-233.

Lin, Y.S., and Green, M.R. (1988). Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3396-400.

Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-kumar, S.P. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. Plant J. 30, 415-429.

Maleck, K., Neuenschwander, U., Cade, R.M., Dietrich, R.A., Dangl, J.L., and Ryals, J.A. (2002). Isolation and characterization of broad-spectrum disease-resistant *Arabidopsis* mutant. Genetics 160, 1661-1671.

Matsuo, N., Minami, M., Maeda, T., and Hiratsuka, K. (2001). Dual luciferase assay for monitoring transient gene expression in higher plants. Plant Biotechnology 18, 71-75.

Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox change. Cell 113, 935-944.

Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic acids res. 8, 4321-4325.

Murray, S.L., Thomson, C., Chini, A., Read, N.D., and Loake, G.J. (2002). Characterization of a novel, defense-related *Arabidopsis* mutant, *cir1*, isolated by luciferase imaging. Mol. Plant-Microbe Interact. 15, 557-566.

McDowell, J.M., Cuzick, A., Can, C., Beynon, J., Dangl, J.L., and Holub, E.B. (2000). Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in *Arabidopsis* vary in functional requirements for *NDRI*, *EDS1*, *NPR1* and salicylic acid accumulation. Plant J. 22, 523-529.

Nandi, A., Kachroo, P., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., Klessig, D.F., and Shah, J. (2003). Ethylene and jasmonic acid signaling affect the NPR1-independent expression of defense genes without impacting resistance to *Pseudomonas syringae* and *Peronospora parasitica* in the *Arabidopsis ssi1* mutant. Mol. Plant-Microbe Interact. 16, 588-599.

- Nawrath, C., and Metraux, J.-P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393-1404.
- Neuhaus, G., Nuhaus-Url, G., Katagiri, F., Seipel, K., and Chua, N-H. (1994). Tissue-specific expression of *as-1* in transgenic tobacco. *Plant Cell* 6, 827-834.
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kgler, C., and Gatz, C. (2000a). Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of *as-1*-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and Auxin-inducible expression of *as-1*-containing target promoters. *J. Biol. Chem.* 275, 19897-19905.
- Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U., and Gatz, C. (2000b). Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Mol. Biol.* 42, 775-788.
- Niki, T., Mitsuhara, I., Seo, S., Ohtsubo, N., and Ohashi, Y. (1998). 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.
- Ono, S., Watakabe, Y., Hiratsuka, K. (2004). Transient assay system for the analysis of *PR-1a* gene promoter in tobacco BY-2 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* in press
- Pascuzzi, P., Hamilton, D., Bodily, K., and Arias, J. (1998). Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. *J. Biol. Chem.* 273, 26631-26637.
- Payne, G., Parks, T.D., Burkhart, W., Dincher, S., Ahl, P., Metraux, J.P., Ryals, J. (1988). Isolation of the genomic clone for pathogenesis-related protein 1a from *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. *Plant Mol. Boil.* 11, 89-94.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. and van Loon, L.C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8, 1225-1237.

- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J., and van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52-58.
- Pontier, D., Miao, Z.-H., and Lam, E. (2001). Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant J.* 27, 529-538.
- Pontier, D., Privat, I., Trifa, Y., Zhou, J.-M., Klessig, D.F., and Lam, E. (2002). Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control. *Plant J.* 32, 641-.
- Qin, X.-F., Holuigue, L., Horvath, D.M., and Chua, N-H. (1994). Immediate early transcription activation by salicylic acid via the Cauliflower Mosaic Virus *as-1* element. *Plant Cell* 6, 863-874.
- Rairdan, G.J., Donofrio, N.M., and Delaney, T.P. (2001). Salicylic acid and NIM1/NPR1-independent gene induction by incompatible *Peronospora parasitica* in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1235-1248.
- Raz, V., and Fluhr, R. (1993). Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* 5, 523-530.
- Robatzek, S., and Somssich, I.E. (2002). Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 16, 1139-1149.
- Rowland, O., and Jones, J.D.G. (2001). Unraveling regulatory networks in plant defense using microarrays. *Gen. Bio.* 2, reviews1001.1-1001.3.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., and Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.

Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.-Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., and Uknes, S. (1997). The *Arabidopsis NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell* 9, 425-439.

Sano, H., Seo, S., Koizumi, N., Niki, T., Iwamura, H., and Ohashi, Y. (1996). Regulation by cytokinin of endogenous levels of jasmonic and salicylic acid in mechanically wounded tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 37, 762-769.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Selitrennikoff, C.P. (2001). Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2883-2894.

Shah, J., Kachroo, P., and Klessig, D.F. (1999). The *Arabidopsis ssl1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11, 191-206.

Shulaev, V., Silverman, P., and Raskin, L. (1997). Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385, 718-721.

Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., van Loon, L.C., Dong, X., and Pieterse, C.M.J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760-770.

Stange, C., Ramirez, I., Gomez, I., Jordana, X., and Holuigue, L. (1997). Phosphorylation of nuclear proteins directs binding to salicylic acid-responsive elements. *Plant J.* 11, 1315-1324.

Strompen, G., Gruner, R., and Pfitzner, U.M. (1998). An *as-1*-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco.

Plant Mol. Biol. 37, 871-883.

Struhl, K. (1988). The JUN oncoprotein, a vertebrate transcription factor, activates transcription in yeast. *Nature* 332, 649-50.

Tabata, T., Takase, H., Takayama, S., Mikami, K., Nakatsuka, A., Kawata, T., Nakayama, T., Iwabuchi, M. (1989). A protein that binds to a cis-acting element of wheat histone has a leucine zipper motif. *Science* 245, 965-7.

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15107-15111.

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F.M-J., and Broekaert, W.F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 121, 1093-1102.

Trizenberg, S.J. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 190-196.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656.

van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453-483.

van Wees, S.C.M., Swart, E.A.M., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8711-8716.

Vogt, P.K., Bos, T.J., and Doolittle, R.F. (1987). Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxylterminalregion of a

protein coded for by the oncogene jun. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3316-3319.

Xie, Z., Fan, B., and Chen, Z. (1998). Induction of PR-1 proteins and potentiation of pathogen signals by salicylic acid exhibit the same dose response and structural specificity in plant cell cultures. Mol. Plant-Microbe Interact. 11, 568-571.

Yamazaki, K-I., Katagiri, F., Imaseki, H., and Chua, N-H. (1990). TGA1a, a tobacco DNA-binding protein, increases the rate of initiation in a plant *in vitro* transcription system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7035-7039.

Yang, Y., and Klessig, D.F. (1996). Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14972-14977.

Yu, I-C., Parker, J., and Bent, A.F. (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7819-7824.

Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., and Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 6523-6528.

Zhang, Y., Tessaro, M.J., Lassner, M., and Li, X. (2003). Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. Plant Cell 15, 2647-2653.

Zhou, J.-M. Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., and Klessig, D.F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. Mol. Plant-Microbe Interact. 13, 191-202.

Ziff, E.B. (1990). Transcription factors: A new family gathers at the cAMP response site. Trends Genet. 6, 69-72.

渡壁百合子, 小野祥子, 平塚和之. (2001) 形質転換植物を用いた抵抗性誘導剤

の作用機作解析. 日本農薬学会誌 26, 296-299.

Summary

Background

Plants have evolved defense strategies to protect themselves against various pathogens. They include the hypersensitive response and localized acquired resistance that restrict pathogens at the site of infection. Systemic acquired resistance (SAR), on the other hand, provides a resistance against a subsequent infection by enhancing resistance throughout the plant. SAR is effective against a broad range of pathogens and requires a signaling molecule, salicylic acid (SA).

Recent advances in related area of research have provided genetic and biochemical evidences for the complexities of pathways that control defense responses in plants, however, the precise molecular mechanisms involved in SAR are not necessarily clear. In this study, I aim to investigate the function of factors involved in SAR regulation at the level of transcriptional regulation. Activation of SAR signal by SA induces expression of *PR* (pathogenesis-related) genes some of which have been shown to encode antimicrobial peptide. For the detection of SAR gene expression induced by the SA dependent signal transduction, I chose to use tobacco *PR-1a* gene that encodes an acidic PR protein because of its strict transcriptional regulation pattern. Using firefly luciferase (Fluc) as a reporter gene, I developed a series of assay systems for the characterization of factors involved in regulated expression of *PR-1a* gene promoter.

Results and Discussion

Effects of SAR genes on PR-1 expression

For the study of factors involved in SAR, it is necessary to analyze not only the effect of singular molecule but also the interaction of factors. Assay system for the analysis of factors requires expression of multiple factors in plant cells, however, introduction and expression of multiple gene products is technically difficult due to the limitation of T-DNA mediated gene transfer system. On the other hand, transient expression system using microprojectile bombardment is a versatile system for the multiple gene transfer and expression in plant cells. In this study, in order to develop a rapid and versatile assay system suitable for the analysis of regulated expression of tobacco *PR-1a* gene, I investigated the use of transient gene expression system in tobacco BY-2 cells by microprojectile bombardment. I introduced a plasmid construct containing *PR-1a::Fluc* fusion gene into tobacco BY-2 cells by particle bombardment and investigated its SA dependent induction by monitoring luciferase activity. As a result of optimizing experimental conditions, I could carry out time-course monitoring and concentration-dependent *PR-1a* induction by SA in BY-2 cells. These results suggest that the assay system can be applicable for the analysis of factors involved in the regulated expression of SA-inducible defense related genes.

Using the transient assay system, I analyzed the effect of SAR-related regulatory factors to the *PR-1a* expression. The Arabidopsis NPR1 (AtNPR1) protein was identified as a key regulatory factor of the salicylic acid dependent signal transduction pathway that regulates the expression of a set of defense genes, and acts as a positive regulatory factor that activates *PR-1* promoter through interaction with

transcription factors. To analyze whether the AtNPR1 can function in tobacco cells, I carried out a series of experiments by introducing the *AtNPR1* and its mutant, the *npr1-1*, and observed the effect on the *PR-1a* promoter activities. Co-introduction of *AtNPR1* resulted in enhanced expression levels of tobacco *PR-1a* promoter while the *npr1-1* failed to induce the expression suggesting that the expression of the *AtNPR1* gene encoding functional AtNPR1 protein in tobacco BY-2 cells leads to an enhanced expression of SAR-related genes in heterologous system. To investigate the mode of interaction of the AtNPR1 in transcriptional regulation, I fused the yeast GAL4 transcriptional activation domain (AD) to the AtNPR1 protein and expressed in BY-2 cells. Monitoring of defense gene activation by the *PR-1a::Fluc* indicated elevated expression levels of the defense gene promoter compared to the co-expression of the AtNPR1. This result suggests that the AtNPR1 interacts directly with transcription initiation factors of the *PR-1a* promoter and activates transcription. Loss of function experiments of the *PR-1a* promoter indicated that the induction by the AtNPR1 is mediated by the *as-1-like* element within the promoter sequence.

Analysis of transgenic plants

The *PR-1a* gene of tobacco has been used as a molecular marker for the induction of defense gene expression because of its clear responsiveness in tobacco. Transient expression experiments and the analysis of transgenic plants harboring luciferase reporter gene suggested that the tobacco *PR-1a* promoter is also active and functional in Arabidopsis and exhibits better SA inducibility than the Arabidopsis *PR-1* promoter. In order to isolate mutants with altered defense gene expression, I conducted screening of mutants with transgenic Arabidopsis harboring the *PR-1a::Fluc*. Using *in vivo* imaging of luciferase bioluminescence, mutant lines with altered *PR-1a* promoter expression pattern have been isolated and characterized.

Based on the results of transient assays, I generated transgenic tobacco and Arabidopsis plants expressing AtNPR1 or AtNPR1-AD under control of the CaMV35S promoter. Analysis of the expression levels of endogenous mRNA revealed elevated induction levels of *PR-1* or *PR-1a* genes. These results indicate a possibility that the ectopic expression of AtNPR1 or AtNPR1-AD would be a general strategy for the development of transgenic plants with broad range of disease resistance.

References

- Watakabe, Y., Ono, S., and Hiratsuka, K. Characterization of agents that induce acquired resistance by transgenic plants. *Journal of Pesticide Science* (in Japanese), **26**, 296-299 (2001).
- Ono, S., Tanaka, T., Watakabe Y., and Hiratsuka, K. Transient assay system for the analysis of *PR-1a* gene promoter in tobacco BY-2 cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press (2004).