

2. 感染特異的 (PR) タンパク質遺伝子の発現調節

大橋祐子 農林水産省農業生物資源研究所

PR タンパク質が発見されてから、すでに 20 年経った。タバコモザイクウイルス (TMV) に感染したタバコ葉に生じた病斑の周辺に特異的に誘導されるこれらのタンパク質は、植物の生体防御においてどのような役割を担っているのだろうか。最近、PR タンパク質に興味を持つ研究者が急速に増えてきたとはいえ、まだその誘導機構や機能についても不明な点が多い。

筆者らはこれらの PR タンパク質のうち、特に分子量の小さい酸性 PR-1 タンパク質に焦点を絞りその遺伝子発現制御に興味を持って仕事を進めてきた。本稿では、筆者らの実験結果を含めて PR タンパク質全般について概説したい。

ウイルス感染と植物の抵抗性反応

植物のウイルスに対する抵抗性反応は、①ウイルスが宿主植物にまったく侵入できない場合、②侵入したウイルスの増殖が局在化し、ウイルスがその侵入部位近傍に閉じ込められる場合、③ウイルスは全身に広がるが病状が軽い場合、の 3 種に大別できる。②の型の抵抗性は、病原菌の攻撃に対して植物が能動的に抵抗し、あらゆる手段を用いてしたたかに生き残り、子孫を保とうとするものであり、宿主が侵入者に挑む熾烈な戦いそのものである。その一例がサムスン NN タバコとタバコモザイクウイルス (TMV) の組み合わせに観察される。この場合、ウイルス感染細胞は過敏反応により積極的に自滅死し、その結果感染部位に局部病斑が形成されウイルスは病斑内またはその近傍に閉じ込められるため、植物体の全身には拡がらない。また、局部病斑形成後しばらくすると病斑の隣接健全部や同じ植物体の未感染上葉がウイルスの再接種に対して抵抗性を獲得するようになる。このような抵抗性の獲得に伴って、健全葉組織では見当らなかった新たなタンパク質群が多量に合成されてくることが電気泳動的に見いだされ、感染特異的 (pathogenesis-related 略して PR) タンパク質と総称される

ようになった⁽¹⁾。

PR タンパク質の誘導

前述のように、PR タンパク質は TMV 感染によってタバコ葉に生じた壊死病斑周辺に誘導される。病斑部 (図 1) を含む葉組織を pH 2.8 の緩衝液中で磨砕し、その可溶性画分を非変性条件下で電気泳動させると、図 2 に示すように健全葉には検出されなかった新たなタンパク質のバンドが見いだされる。易動度の大きいバンドから順番に PR-1a, 1b, 1c, 2, N, O, P, Q, R, S と名付けられているが、これらのタンパク質は局部病斑が肉眼的に観察される TMV 接種 2 日後に認められはじめ、その後の病斑の拡大に伴い蓄積し続ける。やがて未感染上葉にも全身的な誘導抵抗性が認められるようになり、同時に PR タンパク質も検出されるようになる。

筆者らは、動物で用いられるインターフェロン誘起剤処理が植物におけるウイルス抵抗性を誘導する可能性を調べているうち、サリチル酸とその誘導体が健全タバコ葉に多量の PR-1 タンパク質を効率的に誘導することを見いだした⁽²⁾。サリチル酸による誘導はサムスン NN

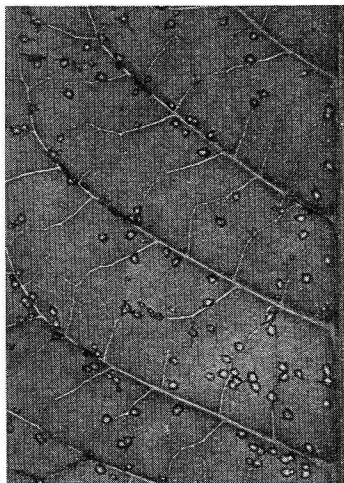


図 1 ■ TMV 感染によりサムスン NN タバコ葉に生じた局部病斑
TMV 接種後、22°C に 6 日間おいたもの。

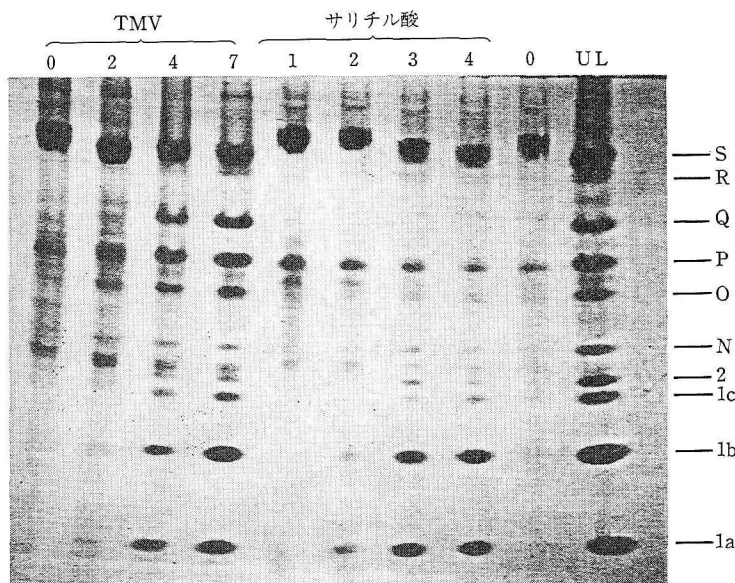


図 2 ■サムスン NN タバコ葉に誘導された PR タンパク質
 左より TMV 接種 0, 2, 4, 7 日後, およびサリチル酸処理 1, 2, 3, 4 日後のタバコ葉から抽出された可溶性タンパク質の非変性電気泳動図. 右のレーン UL は下葉に TMV 接種して 2 週間後の未感染上葉, ○は健全葉.

タバコの場合, 3 種の PR-1 タンパク質と GRP (後述) で顕著であるが, 他種 PR タンパク質ではあまり顕著ではない. 誘導される PR-1 タンパク質量はサリチル酸濃度に依存し, 処理 1~2 日後に検出され, 時間とともに増加していく (図 2).

PR-1 タンパク質は一般的なストレスによっても誘導されることが抗体を用いた微量定量法によって明らかになった. 切断傷害, 水ストレスなどによる誘導量は生重 1g 当たり $0.5 \sim 5 \mu\text{g}$ と, サリチル酸処理や TMV 感染による誘導量に比べ 1/10 ~ 1/100 であるが, サリチル酸処理と同様の時間経過をとって合成されてくる. 面白いことに, このストレスによる PR-1 タンパク質の誘導は温度依存性であり, 20°C では起こるが 30°C では阻害される点が, 高温でも進行するサリチル酸誘導とは異なる⁽³⁾.

脱分化細胞系であるカルスや懸濁培養細胞においても PR-1 タンパク質は誘導可能なのだろうか. 筆者らは, 対数増殖期のほぼ終止期にサリチル酸またはオーキシンを培地に添加すると, タバコ懸濁培養細胞が多量の PR-1 タンパク質を合成し始めることを見いだした (図 3). 根頭ガン腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感染によりタバコ茎部に形成されるクラウンゴール中にもやはり PR-1 タンパク質がかなりの量検出される⁽⁵⁾. クラウンゴール形成の原因はこの細菌の持つ Ti プラスミド中に含まれるオーキシンの合成酵素遺伝子が植物の染色体中に組み込まれて発現するためと考えられているので, PR-1 タンパク質の誘導は内在性または外在性植物ホルモンによって制御されている可能性も考えられる.

病原菌感染による PR タンパク質

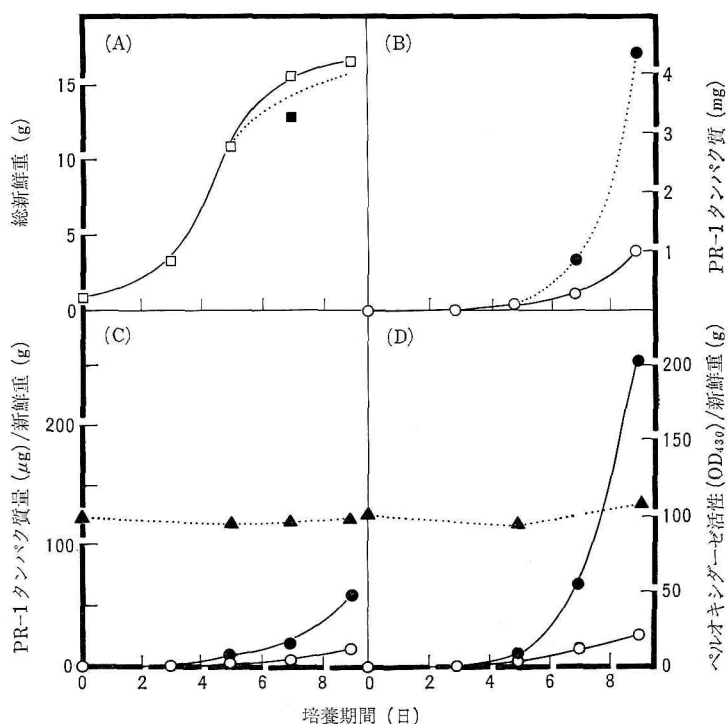


図 3 ■タバコ懸濁培養細胞 BY-2 における PR-1 タンパク質の誘導と細胞外への分泌⁽⁴⁾
 植え継ぎ 5 日後の BY-2 細胞に最終濃度が $25 \mu\text{M}$ になるようにサリチル酸を添加した. (A) 細胞増殖曲線, □: 対照, ■: サリチル酸処理, (B) フラスコ当たりの PR-1 タンパク質量, ○: 対照, ●: サリチル酸処理, (C), (D) 細胞内の (○) または細胞外へ分泌される (●) PR-1 タンパク質, (C) 対照実験, (D) サリチル酸処理. ▲: 対照として測定したペルオキシダーゼ活性.

表 1 ■ 種々の植物に誘導される PR タンパク質⁽⁶⁾

植物	誘導処理	検出された PR タンパク質の数
<i>Petroselinum crispum</i> [せり科 オランダゼリ属]	エリシター, 黄化	4
<i>Apium graveolens</i> [せり科 マツバゼリ属]	ウイルス感染	1
<i>Chenopodium quinoa</i> [あかざ科 アカザ属]	ウイルス感染	10
<i>Citrus medica</i> [みかん科 ミカン属]	ウイルス感染	2~3
<i>Cucumis sativus</i> [うり科 キュウリ属]	ウイルス, ウィロイド, 糸状菌, 細菌感染, 原形質分離, 銅塩, ポリアクリル酸処理	2~3
<i>Gomphrena globosa</i> [ひゆ科 センニチコウ属]	ウイルス感染, 黄化	5
<i>Gynura aurantiaca</i> [きく科 サンシチソウ属]	ウィロイド, 黄化, 銀塩処理	2~3
<i>Lycopersicon esculentum</i> [なす科 トマト属]	ウイルス, ウィロイド, 糸状菌感染, 黄化, エテフォン, ポリアクリル酸, 塩化水銀, 銀塩処理	2~10
<i>Nicotiana debneyi</i> [なす科 タバコ属]	ウイルス感染	1
<i>Nicotiana glutinosa</i> [なす科 タバコ属]	ウイルス感染	1
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> [なす科 タバコ属]	カルス	2~3
<i>Nicotiana rustica</i> [なす科 タバコ属]	ウイルス感染	1
<i>Nicotiana sylvestris</i> [なす科 タバコ属]	ウイルス感染	3
<i>Nicotiana tabacum</i> [なす科 タバコ属]	ウイルス, 糸状菌, 細菌感染, カルス, 原形質分離, ポリアクリル酸, 安息香酸誘導体, エテフォン, オーキニン類, サイトカイニン類, ACC, 金属塩などの処理	9~23
<i>Nicotiana tomentosiformis</i> [なす科 タバコ属]	ウイルス感染	1
<i>Petunia axillaris</i> [なす科 ツクバネアサガオ属]	ウイルス感染	4
<i>Solanum demissum</i> [なす科 ナス属]	ウィロイド感染	1
<i>Solanum tuberosum</i> [なす科 ナス属]	ウィロイド感染	2
<i>Phaseolus vulgaris</i> [まめ科 インゲンマメ属]	ウイルス, 糸状菌感染, 黄化, 傷害, サリチル酸・水銀塩処理	4~8
<i>Phaseolus sinensis</i> [まめ科 ササゲ属]	ウイルス感染, 傷害, サリチル酸処理	2

の誘導は、感染部が過敏反応を起こして壊死斑ができるような場合には必ず起こり、ウイルスのみならずウィロイド、細菌、糸状菌感染によっても引き起こされる。

また、誘導剤としてはサリチル酸などの安息香酸誘導体のみならず、種々の金属塩処理も効果がある。表 1 は今までに報告された PR タンパク質誘導例を集約したものである⁽⁶⁾。8 科 13 属にわたる広範な植物に、種々の処理によって誘導されているのがわかる。この他にも最近、単子葉植物であるトウモロコシや大麦、イネにおいてその存在が認められており、同種のタンパク質は植物界に広く存在し、病斑形成を含むある種のストレスによって誘導されるものと思われる。

PR タンパク質の特性と局在性

タバコ PR タンパク質はつい最近まで酸性タンパク質と定義されていた。それは非変性条件下、pH 8.9 での電気泳動によって TMV 感染により新たに誘導されてくる健全葉には検出できないタンパク質が対象とされていたからである。しかしこれらの cDNA クローニングが行なわれ、ゲノミッククローンの単離とその構造解析が進むに従って、酸性 PR タンパク質と構造の類似した塩基性 PR タンパク質の存在が遺伝子レベルで証明されるようになった。また、タンパク質レベルでも単離

表 2 ■ サムスン NN タバコの PR タンパク質の特性⁽⁶⁾

成分	分子量(kd)	等電点	免疫学的相関 (グループ)	機能
1a	15	4.0	1	不明
1b	15	4.4	1	〃
1c	15	4.5	1	〃
2	31	4.1	2	β-1, 3-グルカナーゼ
N	33	4.6	2	〃
O	35	4.7	2	〃
P	27	4.5	3	キチナーゼ
Q	28	4.8	3	〃
R	13, 15	6.0~6.5	2	不明
S	21 23*	5.2	1	不明

* 文献 9) による

精製を通してその実体が明らかになってきた。これら塩基性タンパク質に関しては後述することとして、まず最初に表 2 にサムスン NN タバコ葉に誘導される酸性 PR タンパク質の特性をまとめて示す。PR-2, N, O が β-1, 3-グルカナーゼ活性を、また PR-P, Q がキチナーゼ活性を持つことが明らかになったのはここ 1, 2 年のことである。これらの酸性 PR タンパク質はサリチル酸によって誘導される場合も、TMV 感染によって生成する場合にも、細胞内で合成されたのち、細胞外へ分泌される。

図 4 には PR-1a の抗体を用いたプロテイン A-金コ

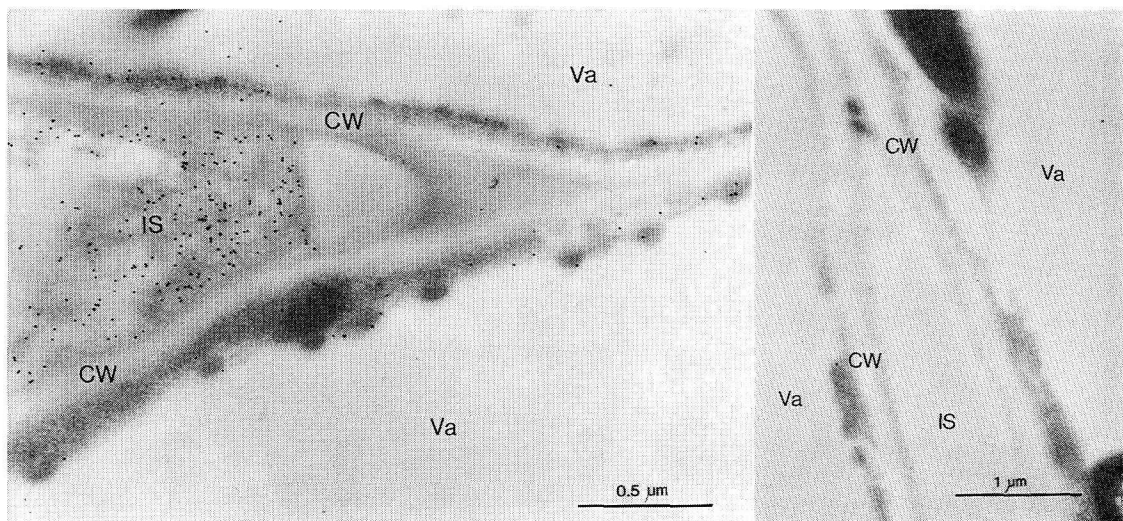


図4 ■ タバコ葉組織における誘導された PR-1 タンパク質の局在性⁽⁷⁾

左：サリチル酸処理後5日のタバコ葉片，右：水処理対照葉．超薄切片を PR-1a 抗体で処理後，プロテインA-金コロイドと反応させた．PR-1 タンパク質の存在部位に 16nm の金粒子が見える．Ch：クロロプラスト，CW：細胞壁，IS：細胞間隙，Va：液胞．

ロイド法によって，サリチル酸処理5日目のタバコ葉の細胞間隙に PR-1 タンパク質が多量に堆積している様子が示されている⁽⁷⁾．細胞外への PR-1 タンパク質の分泌については，図3に示したように，懸濁培養細胞で誘導された大部分が培地中に放出されることから明らかである⁽⁴⁾．また，PR-1 タンパク質の cDNA クローンの構造解析により推定された 30 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドが，試験管内翻訳実験でプロセッシングを受けることから確認されている⁽⁸⁾．

PR-2, N, O が β -1,3-グルカナーゼ活性を持つことは先に述べたが，これらと免疫学的関連を持つ塩基性 β -1,3-グルカナーゼが 33 kd の分子量のタンパク質として発見された．面白いことに，PR-O とこの塩基性タンパク質の酵素活性は，PR-N や PR-2 に比べてそれぞれ 50 倍，250 倍高い．また PR-P と PR-Q はキチナーゼ活性を持つが，タバコ塩基性キチナーゼと免疫学的に相関があり，両タイプはタンパク質の一次構造上 65% の相同性を持っている．試験管内の実験では塩基性キチナーゼは酸性キチナーゼの 6 倍もの酵素活性を持っているという．そしてタバコ中では全体のキチナーゼ活性の 32% が酸性キチナーゼ由来で 68% が塩基性キチナーゼ由来のものである⁽⁹⁾．塩基性 β -1,3-グルカナーゼとキチナーゼの局在性に関しては，インゲンマメを用いた実験で両者とも液胞に蓄積すると報告されている．

PR-1a, 1b, 1c は分子量 15 kd の免疫学的にも非常によく似た 138 個のアミノ酸からなる酸性タンパク質で，タンパク質の一次構造上，互いに 90% 以上の相同

性を持つ．最近これらと 67% の相同性を持つ 173 個のアミノ酸を持つ塩基性タンパク質群の存在が cDNA クローンの解析の結果から明らかになった⁽⁹⁾．しかし，PR-1 タンパク質グループは免疫学的には PR-S と近いことがわかっているものの，その機能については不明である．これらの酸性 PR-1 タンパク質は RNA，糖，脂質は含まず，調べられた 25 種の酵素活性を有していなかった．塩基性 PR-1 タンパク質についてはサムスン NN タバコのサザン分析の結果，ハプロイドゲノム当たり 8 遺伝子が存在するらしいことが明らかになっている⁽⁹⁾，そのうちのいくつが活性な遺伝子なのか，また組織，細胞内の局在性の詳細などについてはまだ報告はないようである．しかし最近，PR-1 タンパク質の抗体を用いると液胞中の顆粒状構造体中に抗原が検出されるという情報もあり，それが塩基性 PR-1 タンパク質である可能性もある．

PR-R や PR-S には塩基性の相同タンパク質は見つかっていない．PR-R の機能は PR-1 同様に未だ不明だが，PR-S はモル比にして蔗糖の 100 万倍甘いといわれる甘味タンパク質タウマチンとアミノ酸配列で 65% の相同性を持っている⁽¹¹⁾．もっとも PR-S 自身には甘味性はない．最近 PR-S は，昆虫の α -アミラーゼ活性阻害作用と仔ウシのトリプシン阻害活性を持つトウモロコシの機能性タンパク質とも相同性が高いことが判明した⁽¹²⁾．一般に，プロテインアゼインヒビターは液胞に局在化するが，タウマチンもまた液胞に堆積することが知られている．細胞外に分泌される PR-S と相同性を持

つ上記の機能性タンパク質が液胞に局在するという事実は何を意味するのだろうか。PR-S はまた、塩ストレス耐性タバコ細胞に蓄積するオスモチンともアミノ酸配列上の相同性を持つらしい。前述のように、免疫学的にはPR-S は酸性 PR-1 と相関があるから、これら一連のタンパク質 (PR-1, PR-S, オスモチン, α -アミラーゼ/トリプシンインヒビター, タウマチン) はその一次構造上互いによく似たグループにまとめられることになる。タウマチンを除きこれらはすべてストレス誘導性であり、PR-1, PR-S についても、同じグループ内の機能性タンパク質と類似の機能を持つ可能性も示唆される。

PR タンパク質遺伝子の発現制御

1. タバコ酸性 PR-1 タンパク質遺伝子

PR タンパク質の誘導が病害抵抗性に関与する可能性があり、興味ある対象であるため、タバコ PR-1 タンパク質の cDNA クローニングが複数のグループによって相次いで行なわれた。その構造解析の結果、PR-1a, 1b, 1c はすべて 30 個のアミノ酸からなる分泌シグナルを持ち、成熟タンパク質としてはアミノ酸配列でそれぞれ 90% の相同性を持つ 138 個のアミノ酸からなる互いによく似たタンパク質であることが明らかになった⁽⁶⁾。これらのタンパク質は、分子量はほぼ同じであるが、アミノ酸組成がやや異なるため、非変性下の電気泳動では図 2 に示すように判別可能である。これらは二次構造上もよく似ており、トマトの塩基性 PR タンパク質 P 14

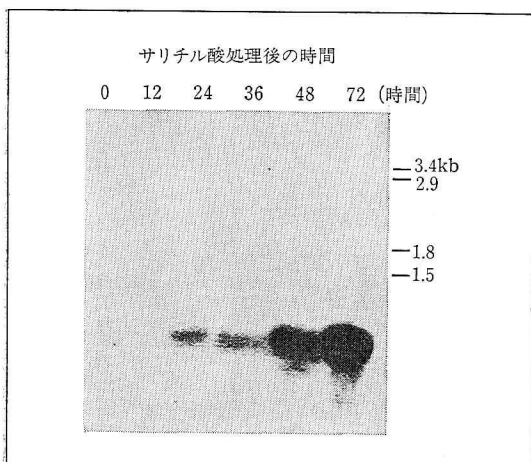


図 5 ■ サリチル酸処理による PR-1 タンパク質遺伝子の転写誘導⁽⁸⁾

サリチル酸処理後、経時的にサムスン NN タバコ葉から抽出したポリ A RNA 画分を電気泳動させた後、³²P ラベルした PR-1a cDNA とハイブリダイズさせ、オートラジオグラフィをとった。

ともアミノ酸配列上 60% の相同性を持つ。また、二次構造上、C 末端に β -シートを含む疎水性の 2 つの部位にはさまれた α -ヘリックスを持つ親水性部位のある点でも共通性がある⁽¹³⁾。機能上、これらの共通の構造部位が重要であることを示唆しているのかもしれない。

PR-1 タンパク質の誘導が遺伝子の転写レベルで制御されていることが、PR-1a の cDNA を用いたノーザンの分析結果明らかにされた。図 5 に示すように、PR-1 タンパク質誘導 (図 2 参照) にやや先立って、その mRNA の合成が始まることわかる⁽⁸⁾。

タバコ核ゲノム中での PR-1、遺伝子の存在様式を知るために、サムスン NN タバコの核 DNA を Eco RI で切断し、PR-1a cDNA をプローブにしてサザン分析を行なったところ、図 6 に示すように少なくとも 7 本のバンドが検出された⁽¹³⁾。それぞれのバンドをクローニングしその塩基配列を調べることにより、かなりの不活性な PR-1 遺伝子が存在すること、またタバコハプロイドゲノム当たり、活性な PR-1a, 1b, 1c 遺伝子はそれぞれ 1 コピー存在することが推定できた⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ (図 6 参照)。活性な 3 個の PR-1 遺伝子の構造を解析した結果、いずれもタンパク質コード領域の -29 bp に転写開始点を持つこと、またそこからさらに約 -30 bp 上流に TATA ボックスがあり、その後後に 3 種の反復配列と 1 種の逆反復配列が存在することがわかった。また面白いことに、ダイズの熱ショックタンパク質 HSP70 遺伝子の持つ配列 HSE と 64% の相同性を持つ因子が、TATA ボックスの 5' 上流に見いだされた。さらに上流についてもみると、転写開始点の約 150 bp 上流までは

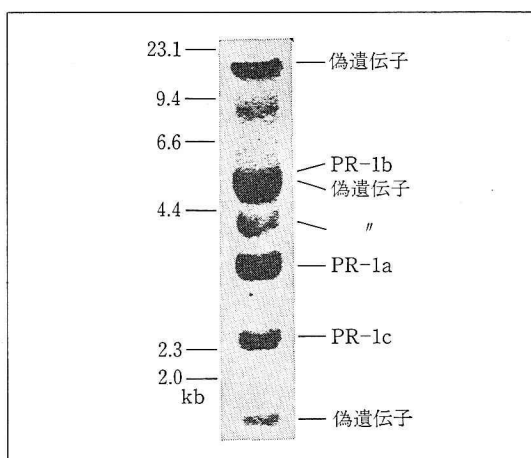


図 6 ■ サムスン NN タバコにおける PR-1 遺伝子のサザン分析⁽¹³⁾

サムスン NN タバコの核 DNA を Eco RI で切断した後、PR-1a cDNA をプローブとしてサザン分析を行なった。

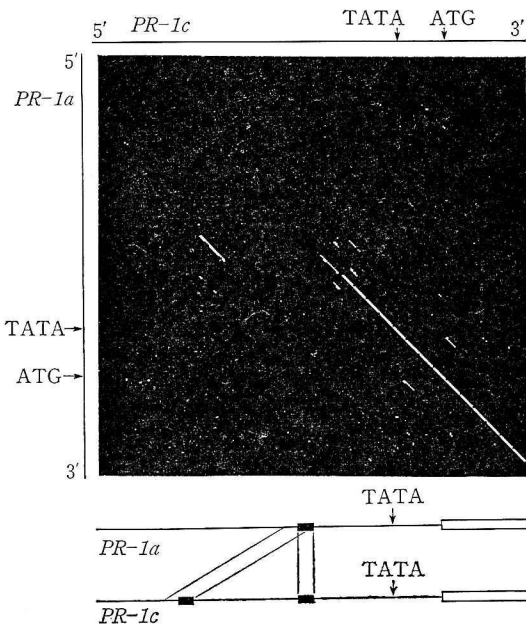


図 7 ■ *PR-1a* 遺伝子と *PR-1b* 遺伝子のハルプロット法による構造比較⁽¹⁶⁾

17塩基対中12塩基対が相同性を持つ領域に点が打たれる。したがって、相同性の高い領域には直線が引かれることになる。

3遺伝子とも高い相同性を維持しているが、その上流に *PR-1c* のみに数十塩基の挿入があり、再び 26 bp の相同性を持つ領域が存在したあと、さらに上流ではまた相同性が乱れていた⁽¹⁶⁾ (図 7)。3遺伝子ともに、図 2 に示したように TMV 感染でもサリチル酸処理によっても誘導されるため、これらの遺伝子の発現制御に関しては 3 種に共通に存在する配列が重要と考えられる。すなわち、*PR-1a* および *PR-1b* については転写開始点より -180 bp 上流までが 3 種の *PR-1* 遺伝子について共通な領域なので、遺伝子構造の比較からいえば、*PR-1a* および *PR-1b* 遺伝子の 5' 上流 0.2 kb 弱の DNA 断片中に転写に必要なシス因子が存在することが示唆される。

タバコプロトプラストを用いた解析

PR-1 遺伝子の発現制御機構を解析するため、*PR-1a* 遺伝子の 5' 上流域を段階的に削り込み、これに細菌の β -グルクロニダーゼの構造遺伝子 (*GUS*) をレポーター遺伝子として融合させて種々のキメラ遺伝子を作製した。これをタバコ葉肉プロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入し、キメラ遺伝子の発現の様相を、*GUS* 活性を指標にして解析した (図 8)。

図 9 に示すように、単離されたタバコ細胞の中でタバコ *PR-1* 遺伝子は誘導剤であるサリチル酸の添加なしでも、ある程度発現するが (これはプロトプラスト調製

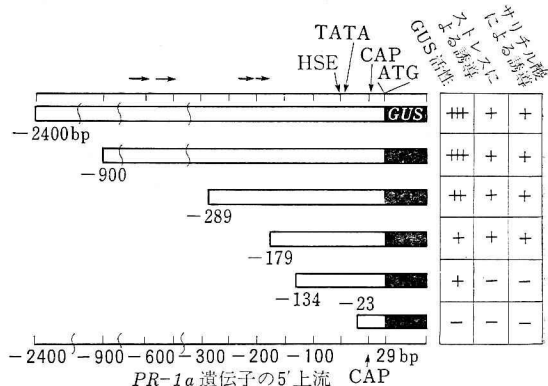


図 8 ■ サリチル酸やストレスによる *PR-1a* 遺伝子の発現誘導⁽¹⁸⁾

PR-1a 遺伝子の 5' 上流域を段階的に削り込み、これと *GUS* 遺伝子との融合遺伝子を作製し、エレクトロポレーション法によってタバコ葉肉プロトプラストに導入した。培養 1 日および 2 日後にプロトプラスト中の *GUS* 活性を測定した。ストレス誘導+：2 日後の *GUS* 活性が 1 日後を上回ったもの。

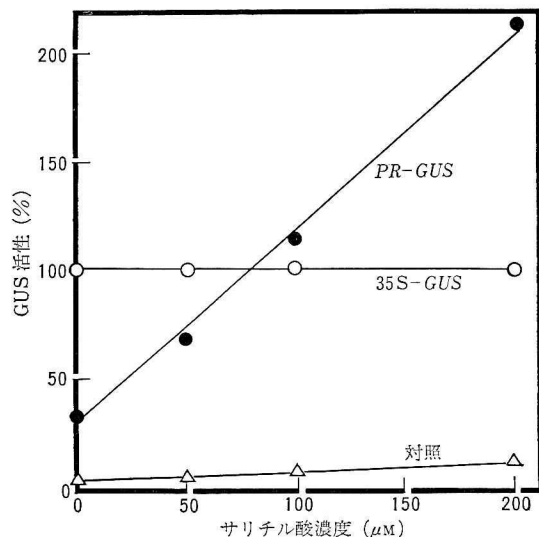


図 9 ■ サリチル酸による *PR-1a* 遺伝子発現の誘導⁽¹⁷⁾ タバコ葉肉プロトプラストにエレクトロポレーション法により *PR* (2.4 kb)-*GUS* または 35S-*GUS* 融合遺伝子を含むプラスミドを、指示されたサリチル酸濃度下で導入し、20 時間の培養後に *GUS* 活性を測定した。対照は *GUS* 構造遺伝子のみを含むプラスミドを用いた場合。

時にかかるストレスが誘因になっていると考えられる)、サリチル酸を処理するとその濃度に比例して *GUS* 活性が増加する。一方、恒常的発現を示すプロモーターとしてカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S の 0.8 kb DNA を用いた場合には、サリチル酸による誘導はまったくかからない。また、*PR-1* プロモーターを用いると培養時間に比例して *GUS* 活性が増加する傾向があるが (これはプロトプラスト調製時や培養中のストレス

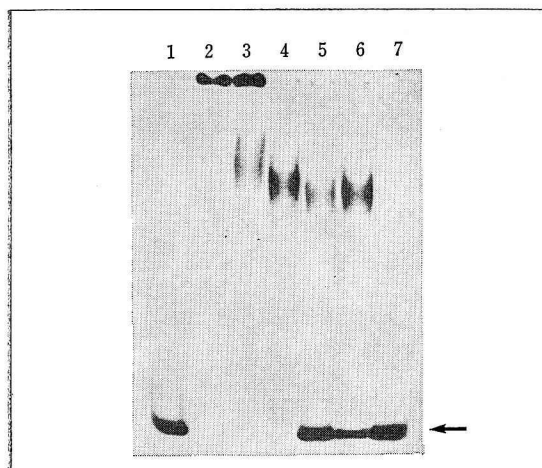


図 10 ■ゲルシフト分析による *PR-1a* 遺伝子発現制御因子の解析⁽¹⁸⁾

PR-1a 遺伝子の DNA 断片 (-134~+29) をプローブとし、本遺伝子が発現していないサムスン NN タバコの核抽出タンパク質 (2.5 μg) と混合してゲルシフト分析を行なった。1 および 7: プローブのみ, 2, 3, 4, 5: poly dI·dC をそれぞれ 0, 0.5 μg, 1 μg, 2.5 μg, 5 μg 添加した。矢印はフリーのプローブの位置を示す。

が刺激となって *PR-1* 遺伝子発現が誘導されているためと考えている), 35S プロモーターでは培養約 1 日後に発現が最大になったあと徐々に活性は低下していく。

この遺伝子発現解析系を用いて、段階的に 5' 上流域を欠失させた *PR-1a* プロモーターとの *GUS* 融合遺伝子の活性を調べ模式化して図 8 に示した。5' 上流を削り込むと *GUS* 活性は徐々に低下し、TATA ボックスを消失させたところで 0 となる。これに対し、ストレスまたはサリチル酸による誘導は -179 bp まで削り込んだところまで認められるが、-134 bp まで消失させるともはやなくなる。この 179 bp 領域は上述のように活性な 3 種の *PR-1* 遺伝子に共通に保存されている 5' 領域とよく一致している。このことは、ストレス、サリチル酸に応答する シス因子がこの領域、すなわち -179~ -134 bp に存在することを示唆する。

最近、筆者らは同じ系を用いて -134 bp よりも下流に少しずつ削り込みを進めると、一度最低になった *GUS* 活性が再び上昇する領域があることを見いだした。このことは、この領域の少し上流に *PR-1* 遺伝子の転写を負に制御するシス因子が存在することを意味する⁽¹⁷⁾。また、ゲルシフト解析により、やはり転写抑制に関与する複数の領域の存在が示唆された。すなわち、*PR-1* 遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしていると思われる 5' 上流域の DNA 断片をプローブとし、この遺伝子が発現していない条件下の核から抽出したタンパク質と混合

して電気泳動を行なうと移動度の遅いバンドが確認された (図 10)。このシフトは、*PR-1* 遺伝子が発現している条件下では認められなくなる。種々のプローブを用いた実験から、この負の制御に関係すると推測される因子は TATA ボックスの 5' 上流域と、3 種の *PR-1* 遺伝子の共通保存領域の 5' 上流側の計 2 個所に結合する可能性が示唆されている⁽¹⁸⁾。

トランスジェニックタバコを用いた解析

次に、トランスジェニックタバコを用いて *PR-1a* 遺伝子の発現制御の解析を試みた結果を示す。植物への外来遺伝子の導入にはアグロバクテリウム感染法を用いた。まず、段階的に *PR-1a* 遺伝子の 5' 上流側から削り込んできた DNA 断片を *GUS* 遺伝子と融合させ、得られた融合遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子を保持したバイナリーベクターに組み込んだ。これをアグロバクテリウム感染を介してタバコ葉片に導入し、カナマイシン耐性によって選抜を行ないつつ植物体を再生させた。この選抜を厳密に行なった実験区では、カナマイシン耐性植物の 7 割以上に導入キメラ遺伝子の存在が確認でき、そのすべての植物において導入遺伝子の発現が認められた。*PR-1a* 遺伝子の 5' 上流領域 2.4 kb を含む *GUS* 融合遺伝子を導入したタバコでは、無処理の状態でもある程度の *GUS* 活性が認められたが、切断ストレスを与えて 2 日後にはその数倍に、また切断とともに誘導剤であるサリチル酸を処理するとさらにその数倍に *GUS* 活性が誘導された。対照として CaMV の 35S プロモーターを用いた場合には、切断ストレスなどによる *GUS* 活性の誘導は認められなかった (図 11)。

実験に用いられたタバコは、もともと *PR-1* 遺伝子を有しているわけだが、この内在性の *PR-1* 遺伝子と、外から *GUS* 融合遺伝子として新たに導入された *PR-1* プロモーターは同様な発現様式を示すのであろうか。これを明らかにするために、サリチル酸処理によって誘導される *PR-1* タンパク質を免疫学的に定量してみた。図 11 に点線の棒グラフで示すように、トランスジェニックタバコであるなしにかかわらず、この薬剤処理によって *PR-1* タンパク質量は増加する。またよく観察すると、PR/*GUS* 植物のうち、サリチル酸処理によって高い *GUS* 活性が誘導される個体ほど、*PR-1* タンパク質も多量に合成されてくるようである。この他のいくつかの実験結果からも、この実験系では、導入された *PR-1* 遺伝子は、内在的な本遺伝子同様の発現制御を受けることが明らかであるから、この系は *PR-1* 遺伝子発現調

節の詳細な検討に充分用い得るものと筆者らは考えている⁽¹⁹⁾。PR-1a 遺伝子の 5' 上流域削り込み実験では、転写開始点上流の 180 bp 以上の DNA 断片が導入されたトランスジェニックタバコではサリチル酸処理による GUS 活性の誘導が観察されており、エレクトロポレーション法によって得られた結果とよく一致する⁽¹⁷⁾。

トランスジェニック植物は、導入遺伝子発現に関する多くの情報を提供してくれる点で貴重な実験材料である。筆者らは、PR-1 タンパク質が TMV 感染による過敏反応の結果として生じた壊死斑の周辺に誘導されることから、上述のトランスジェニックタバコに壊死斑を形成させ、その周辺での GUS 活性の誘導に関する実験を行なった。通常、サムスン NN タバコ葉では 22°C では TMV 接種 2 日後にウイルス感染部位に小さな壊死斑が肉眼的に観察されるようになり、その後徐々に壊死斑の直径が拡大していき、やがて完全に TMV が壊死斑部に閉じ込められて病斑の拡大が停止する。壊死斑形成後数日経過すると、壊死斑周辺の健全部位が、また 10 日以上経過すると同じ植物の未接種上葉の健全部位がウイルス抵抗性を獲得するとともに、PR-1 タンパク質が多量に検出されるようになる。

トランスジェニックタバコを用いて組織化学的に GUS の活性染色を行なったところ、予想したように、壊死斑の周辺や隣接健全部、また未接種上葉に GUS 活性の誘導が認められた。図 12 にその一例を示したが、壊死斑の周辺に特に強い GUS 活性が検出される。また面白いことに、上述の抵抗性を獲得した健全部では、すでにある程度の GUS 活性が誘導されているが、そこに切断傷害などのストレスを与えると、非常に早く、しかも強く応答して新たな GUS 活性誘導が引き起こされる⁽¹⁹⁾。この現象はバレイシヨ疫病菌感染などで観察され

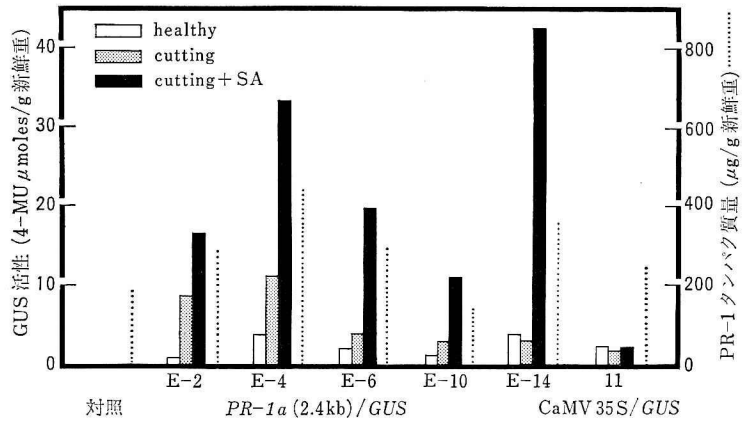


図 11 ■トランスジェニックタバコにおける PR-1a プロモーターのストレスやサリチル酸による発現の誘導⁽¹⁹⁾

SR1 タバコの葉ディスクを打ち抜いてすぐに (healthy), または 2 日間水 (cutting), またはサリチル酸溶液 (cutting+SA) 溶液上においた後、GUS 活性を測定した。対照: 対照タバコ, E-2~E-14: PR-GUS 融合遺伝子を導入したトランスジェニックタバコ。この 5 本の植物はハプロイドゲノム当たり 1 コピーの融合遺伝子導入が確認されている。11: CaMV 35S-GUS 融合遺伝子を導入したトランスジェニックタバコ。20 本以上から選ばれた平均的な GUS 活性を示す個体。点線は、サリチル酸処理によってタバコ葉に誘導された PR-1 タンパク質を免疫学的に定量したものの。

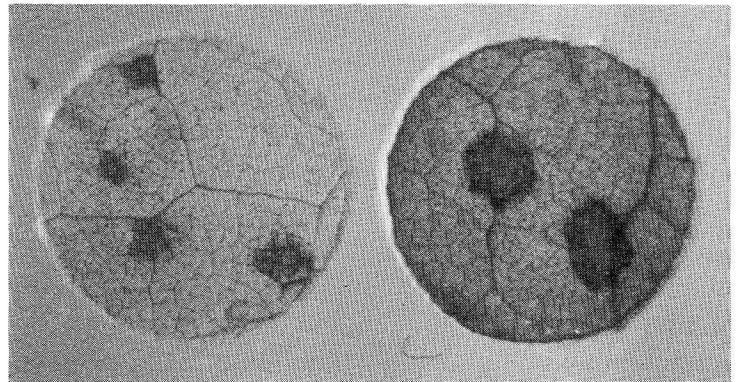
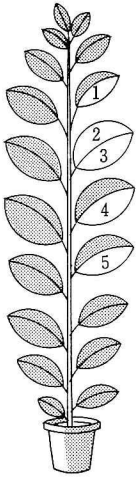


図 12 ■TMV 感染によって生じた壊死斑の周辺に発現した PR-1a-GUS 融合遺伝子⁽¹⁹⁾

PR-1a 遺伝子のプロモーター領域 (2.4 kb) と GUS 遺伝子との融合遺伝子を導入したトランスジェニックサムスン NN タバコ葉に TMV を接種した。4 日後に壊死斑を含む部分をディスク状に打ち抜き、GUS の活性染色を行なった。染色後、青色の GUS 反応生成物を識別しやすくするためエタノールでクロロフィルを除いてから撮影した。左: 対照, 右: PR-GUS 導入タバコ, 壊死斑周辺が特異的に青色に染まっているが、写真では黒枠で囲んだように見える。

ている誘導抵抗性と非常によく似た現象であり⁽²⁰⁾, 植物が各々のストレスに応答して示す積極的自己防御反応の一面と考えられる。このような病斑形成ストレスに応答するシス因子はどのような構造なのだろうか。詳細はまだ不明だが、現在までのところ筆者らは PR-1a 遺伝子の 5' 上流域 0.3 kb 以内にその情報が含まれるものと考えている⁽¹⁹⁾。

組織化学的に GUS の局在性を調べる際には、誘導剤



GUS 活性 (4-MU $\mu\text{moles/g}$ 新鮮重)

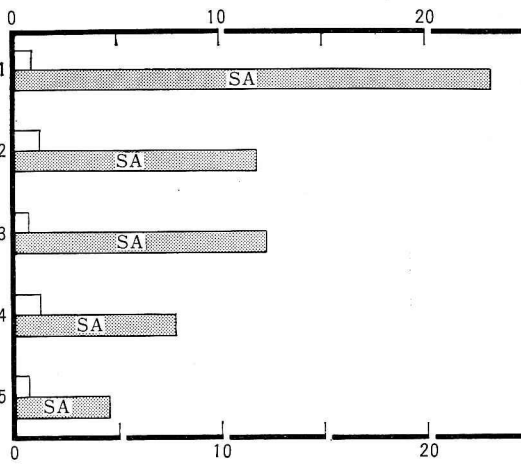


図 13 ■PR/GUS トランスジェニックタバコにおける葉序による GUS 活性誘導能の差違⁽¹⁹⁾

播種後約3カ月の成熟した PR (2.4 kb)/GUS 植物の図に指示された葉序から葉ディスクを切りとり直ちに (白い横棒), または 2mM サリチル酸を2日処理した後 (黒い横棒), 活性を測定した。

や基質の組織や細胞への浸透性をできるだけ均一にする必要がある。そのためには、組織切片を作製して GUS 活性の局在性を調べるのが望ましい。筆者らは傷害ストレスあるいはサリチル酸処理による PR-1 遺伝子発現の様相を、異なった生育段階において、また異なる器官において調べるために、生のままの約 100 μm の厚さの組織切片を短時間で作製し、その GUS 活性染色を行なった。対照としてはあまり組織特異性がないといわれる CaMV 35S プロモーター (0.8 kb) との GUS 融合遺伝子を導入したタバコを用いた。35S/GUS 植物の葉身では柵状組織と維管束に強く、また海綿状組織や毛茸にもかなりの GUS 活性が検出されたが、サリチル酸による誘導は起こらなかった。一方、PR (2.4 kb)/GUS 植物でも、同じ傾向の組織特異性で GUS 活性が検出されたが、サリチル酸処理によってそれは顕著に増大し、特に柵状および海綿状組織で著しかった。若い葉柄では、維管束部、葉基部をはじめ髄柔組織にもサリチル酸による誘導が認められた。実験を行なっているうちに、このようなサリチル酸処理による GUS 活性誘導の程度は、同じ葉身を材料に用いた場合でも、植物の生育段階により、また葉序によりかなり異なることが判明した。図 13 に葉序による差を示したが、若い葉ほど、GUS 誘導能が高い⁽¹⁹⁾。

以上、PR/GUS トランスジェニックタバコを用いて GUS 活性を指標にすることにより、導入された PR-1 a 遺伝子のプロモーターの働きをつぶさに観察できた。タ

バコがもともと持っている PR-1 a 遺伝子の発現の様相はこの cDNA をプローブにした *in situ* ハイブリダイゼーション実験や、蛍光抗体などを用いた組織化学的な実験によって知ることも可能だが、いずれも複雑な手順が必要であり、定量性にも欠ける。

最近、筆者らは植物の内在性の GUS 活性を抑え、導入された GUS 活性をより正確に検出する方法を見いだしており、トランスジェニック植物と GUS レポーター遺伝子の利用は、今後、さまざまな遺伝子の発現制御機構を調べる上できわめて有効で重要な手段となるものと思われる。

2. その他のタバコ PR タンパク質遺伝子

酸性 PR-1 タンパク質以外にゲノミッククローンが単離され、その構造解析が行なわれたという報告はまだ少ない。その中で、TMV に感染したサムスン NN タバコから単離した mRNA を鋳型として cDNA を作製し、6群に分類した報告がある⁽²¹⁾。6群のうちのB群には酸性 PR-1 遺伝子が含まれるが、C群に属する cDNA を用いてゲノミッククローンを単離し活性を持つと思われる遺伝子についてその構造解析を行なったところ、それは 25% もの高率でグリシンを含む細胞壁の構成成分と推定されるタンパク質 (GRP と略称する) をコードしていることがわかった⁽²²⁾。この mRNA は PR-1 遺伝子同様にサリチル酸処理でよく誘導される。GRP 遺伝子の 5' 上流域を PR-1 と比較してみると、転写開始点の上流約 100 bp 中に 50% 強の相同性がある。両者ともに TMV 感染とサリチル酸で誘導がかかるので両者に共通の転写制御因子が存在する可能性があるが、その詳細は未だわかっていない。またその意味は不明だが、GRP 遺伝子の 5' 上流域 -500 bp から約 70 bp の領域が光合成関連酵素であるリブロースジカルボキシラーゼの小サブユニット (rbc S) と 90% 近い相同性を持つことがわかった。両遺伝子ともに 64 bp の逆反復配列を持っており、GRP の発現も光の制御を受けることから、この逆反復配列が光制御に関与する可能性が指摘されている。

遺伝子の構造解析が進んでいるもう一つの PR タン

パク質は PR-S である。これは前述のように、甘味タンパク質である タウマチンや、 トウモロコシの α -アミラーゼ/プロテアーゼインヒビターと 相同性を持ち、また免疫学的には 酸性 PR-1 タンパク質と 相関する分子量 23 kd のタンパク質である。PR-S 遺伝子の 5' 上流域を、PR-1a および GRP のそれと比較すると、転写開始点から約 100 bp 上流においてある程度の相同性がみられる。PR-S はサリチル酸では誘導されにくい点が PR-1a および GRP と異なるが、DNA の塩基配列との関係については今までのところまったくわかっていない⁽²²⁾。

PR タンパク質の機能

TMV に感染しても感染部位に壊死斑が形成されず、全身的にウイルスが広がるようなタバコ栽培種においては、PR タンパク質は誘導されない。また、同じ栽培種(たとえばサムスン NN) ならば TMV 以外のウイルス、糸状菌、細菌感染によっても、過敏反応の結果形成された壊死斑周辺に同様の PR タンパク質群が合成される。すなわち、この誘導は宿主特異的である。

このような過敏反応に伴って誘導されてくる PR タンパク質群の機能は何であろうか。進化の過程で植物が獲得してきた自己防御反応の一つと考えられているが、各々の PR タンパク質はどのような機能を分担しているのだろうか。

タバコ PR タンパク質について述べれば、その約半数がグルカナーゼまたはキチナーゼ活性を持つ加水分解酵素であり、病原菌の細胞壁を直接攻撃することによって抗菌性を示すものと考えられ、*in vitro* 系ではその効果がすでに確かめられている。GRP については、ヒドロキシプロリンを多く含む細胞壁構成糖タンパク質(HRGPs)と同様に、病原菌感染の防御壁としての細胞壁を強化する役割を担っている可能性がある。PR-S は前述のようにアミラーゼ/プロテアーゼインヒビターとその構造が似ているため、昆虫や草食動物に対する防御機能を持っているのかもしれない。しかし PR-1 グループや PR-R についてはその機能はまったくわかっていない。

PR タンパク質の機能を考える上でその局在性は重要な示唆を与えてくれる。前述のように、タバコでは酸性グルカナーゼやキチナーゼは細胞外に分泌されるが、比活性の高い塩基性相同タンパク質は細胞内の液胞中に検出される。インゲンマメでは、この2つの酵素は主に液胞内に見いだされたタンパク質の集積体中に検出され、

細胞外に分泌されるのは少量のグルカナーゼのみであり、それはミドルラメラ中に検出される⁽²²⁾。このように植物種によって局在性特性に差があるようだが、タバコの PR-1、 β -1,3-グルカナーゼ、キチナーゼについては酸性タンパク質は細胞外へ、塩基性タンパク質は細胞内にとどまり液胞中に堆積するという図式が画けそうである。PR タンパク質と同様な条件下で誘導されてくるタバコペルオキシダーゼも、やはり酸性アイソザイムは細胞外へ、塩基性のものは液胞に分別されることがわかっており、酸性、塩基性タンパク質が自己防御に関する異なった役割分担を担っているように思われる。すなわち、第一段階の自己防御機構としては、細胞外に存在するこれら酸性タンパク質が、細胞間隙に侵入してきた病原菌に直接接触しこれを攻撃し不活化させる。第二段階では過敏反応により宿主細胞が自滅し、液胞膜が破れて中に存在していた活性の高い塩基性グルカナーゼ、キチナーゼなどが細胞内外の病原菌を攻撃する⁽²³⁾。第三段階では、過敏反応によって死んだ細胞周辺の隣接健全部が、エチレンや芳香族化合物、エリシターなどのシグナルを生産し周囲の細胞や植物体全身に移行させるため、これを受けた細胞が活性化され、PR タンパク質その他の防御物質をあらかじめ生産し、やがてやってくるかもしれない侵略者の攻撃に備える。切断ストレス、昆虫などの食害を受けた場合には、これらのストレスが何らかのシグナルに変換されて植物体の他の部位に伝達され、PR タンパク質合成が活性化されるとともに、GRP による細胞壁構造の強化、PR-S による摂食昆虫に対する食害作用が起こることが考えられる。

しかし現状では、上述の仮説を実証するデータは少ない。実際に植物が病害抵抗性またはストレス耐性を発揮する場では、PR タンパク質の他に、ファイトアレキシン、細胞壁増強のための物質または酵素類、およびプロテアーゼインヒビターなどの多くの物質の合成系が活性化される。PR タンパク質の各々のメンバーも、恐らく自己防御交響曲を指揮者のタクトの下で演奏するオーケストラの一員にしかすぎないのである。PR タンパク質の機能を調べるために、PR-1a、GRP および PR-S タンパク質が植物中で恒常的に作られるように、35S プロモーターにそれぞれの構造遺伝子領域を融合させ、タバコに導入して発現させたが、これらトランスジェニックタバコはウイルス抵抗性を示さなかった⁽²⁴⁾。筆者らも同様の実験を行ない、かなりの PR-1a タンパク質を常時生産する植物を作出したが、これらは TMV に抵抗性を示さなかった。この実験からは、これらのタンバ

ク質の単独生産のみからではウイルス抵抗性が出現しないとはいえるが、それ以上のことには言及できない。すなわち、実際には、複数の因子が相加的、相乗的に働いて抵抗性が出現する可能性があるからである。事実、純化したキチナーゼと β -1,3-グルカナーゼを混合すると、単独処理ではみられなかったような多くの病原菌に対する増殖阻害が示されるという⁽²⁵⁾。

*

PR タンパク質遺伝子の発現は何によって制御されているのだろうか。ウイルス感染によって生じる壊死斑はエチレンを生産する。エチレンやその前駆体である 1-アミノシクロプロパンカルボン酸 (ACC) は PR-O, P, Q, R, S の誘導剤であるが、PR-1 や PR-2 に対してはあまり効力がない。またエチレン自身が植物体中を移動してこれらの遺伝子発現のスイッチをつけるシグナルになっているという証拠もない。では壊死斑形成時に宿主植物の細胞壁が分解されて生ずるオリゴ糖がシグナルになっているのだろうか。オリゴ糖はやはりストレス誘導性のプロテイナーゼインヒビターの遠距離シグナル伝達物質ではないかと考えられており、大変魅力的な物質だが、最近はこのタンパク質の誘導剤としてアブジン酸 (ABA) が本命ではないかとする考え方も報告されている⁽²⁶⁾。サリチル酸は PR-1,2 および N にとってはよい誘導剤だが、PR-O, P, Q, R および S にとってはもう一つ効果が少ない。もともとサリチル酸はタバコには含まれていないが、花成ホルモンの効力を持つともいわれる。実際には壊死斑周辺で合成される多彩な芳香族化合物の中でサリチル酸類似の誘導効果を持つ物質が働いている可能性もあるが、サリチル酸自身は植物体全身には容易に移動できないようである。

現在、多くのタバコ PR タンパク質遺伝子の単離とその構造解析が各国で進められている。将来、これらの遺伝子のシス領域やトランス因子に関する情報が蓄積すれば、壊死斑形成ストレスなどによって引き起こされるシグナル伝達や、これに応答する一連の遺伝子群の発現制御機構も少しずつ明らかになってこよう。PR-1a 遺伝子が負の制御を受ける可能性についても述べたが、ストレス誘導性の細胞壁局在性タンパク質エクステンシン (HRGPs) も同様の制御を受けることが示唆されている⁽²⁷⁾。これらの結果は、ストレス誘導性タンパク質遺伝子群の発現が一次元高いレベルで、共通にまたは何段階かに分けて制御されている可能性も示しており、今後の研究の発展が待たれるところである。

文献

- 1) L. C. van Loon : *Plant Mol. Biol.*, 4, 111(1985).
- 2) 下村 徹, 大橋祐子 : 関西病中研報, 26, 15(1984).
- 3) Y. Ohashi & M. Matsuoka : *Plant Cell Physiol.*, 26, 473 (1985).
- 4) Y. Ohashi & M. Matsuoka : *Plant Cell Physiol.*, 28, 573 (1987).
- 5) J. F. Antoniow, G. Ooms, R. F. White, G. J. Wullems & L. V. Vloten-Doting : *Plant Mol. Biol.*, 2, 317 (1983).
- 6) L. C. van Loon : 'Plant-Microbe Interaction', "Molecular and Genetic Perspectives", Vol.3, McGraw Hill, New York, 1989.
- 7) D. Hosokawa & Y. Ohashi : *Plant Cell Physiol.*, 29, 1035(1988).
- 8) M. Matsuoka, S. Asou & Y. Ohashi : *Plant Cell Physiol.*, 29, 1185(1988).
- 9) J. F. Bol & J. A. L. van Kan : *Microbiol. Sci.*, 5, 47 (1988).
- 10) F. Mauch & L. A. Staehelin : *Plant Cell*, 1, 447(1989).
- 11) B. J. C. Cornelissen, R. A. M. Hooft van Huijnduijnen & J. F. Bol : *Nature*, 321, 531(1986).
- 12) M. Richardson, S. Valdes-Rodriguez & A. Banco-Labra : *Nature*, 327, 432(1987).
- 13) M. Matsuoka, N. Yamamoto, Y. K. Murakami, Y. Tanaka, Y. Ozeki, H. Hirano, H. Kagawa, M. Oshima & Y. Ohashi : *Plant Physiol.*, 85, 942(1987).
- 14) B. J. C. Cornelissen, J. Horowitz, J. A. L. van Kan, R. B. Goldberg & J. F. Bol : *Nucleic Acids Res.*, 15, 6799(1987).
- 15) M. Oshima, M. Matsuoka, N. Yamamoto, Y. Tanaka, Y. Kano-Murakami, Y. Ozeki, A. Kato, N. Harada & Y. Ohashi : *FEBS Lett.*, 225, 243(1987).
- 16) M. Ohshima, M. Matsuoka & Y. Ohashi : 国際植物病理学会 (1988).
- 17) 大橋祐子, 大島正弘, 松岡 信 : 1990 年度日本植物生理学会大会.
- 18) 萩原央子, 松岡 信, 大島正弘, 渡辺 実, 細川大二郎, 大橋祐子 : 第 12 回 日本分子生物学会年会 講演要旨, p. 79 (1989).
- 19) M. Ohshima, H. Itoh, M. Matsuoka, T. Murakami & Y. Ohashi : *Plant Cell*, 2, 95(1990).
- 20) 富山宏平 : "植物の感染生理", UP Biology, 東京大学出版会, 1979.
- 21) R. A. M. Hooft van Huijnduijnen, L. C. van Loon & J. F. Bol : *EMBO J.*, 5, 2057(1986).
- 22) J. A. L. van Kan, B. J. C. Cornelissen & J. F. Bol : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1, 107(1988).
- 23) F. Mauch & L. A. Staehelin : *Plant Cell*, 1, 447(1989).
- 24) H. J. M. Linthorst, R. L. J. Meuwissen, S. Kauffmann & J. F. Bol : *Plant Cell*, 1, 285(1989).
- 25) T. Boller : XIV Int. Botanical Congress, Berlin, 1987.
- 26) D. Bowles : *Nature*, 343, 314(1990).
- 27) M. J. Holdsworth & G. G. Laties : *Planta*, 179, 17 (1989).