

イネのセレンウム結合タンパク質遺伝子を利用した
耐病性植物の作出

澤田 和敏

推薦教官 新名 惇彦 教授
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物代謝調節学講座

平成 16 年 1 月 6 日提出

目次

序論	----	4
第一章 セレブロシドエリシターにより転写活性化される遺伝子のスクリーニング		
第一節 緒言	----	8
第二節 材料および方法	----	8
第二節 結果		
第一項 セレブロシドエリシター応答遺伝子の単離および選抜	----	11
第二項 セレブロシドエリシター応答遺伝子の二次選抜	----	13
第三項 セレブロシドエリシター応答遺伝子の相同性検索	----	13
第四項 イネいもち病菌接種時のセレブロシドエリシター応答遺伝子の発現解析	----	16
第五項 完全長 cDNA の単離と塩基配列の決定	----	23
第六項 完全長 cDNA 塩基配列によるホモロジー検索およびモチーフ検索	----	23
第二節 考察		
第一項 単離遺伝子の機能推定	----	29
第二項 RNA Differential Display (DD) 法による遺伝子スクリーニング	----	31
第一章 OsSBP の特性および病害抵抗性関連の解析		
第一節 緒言	----	33
第二節 材料および方法	----	33
第三節 結果		
第一項 OsSBP 遺伝子のゲノム解析	----	39
第二項 OsSBP 遺伝子の発現解析	----	39
第三項 OsSBP の病害抵抗性への関与		
(1) 形質転換体の作製	----	43
(2) イネいもち病に対する耐病性検定	----	45
(3) ファイトアレキシンの蓄積	----	45
(4) 防御遺伝子の発現解析	----	50
(4) 活性酸素種の蓄積	----	53

(4) 抗酸化酵素活性の測定	---- 53
(7) 抗酸化酵素遺伝子の発現解析	---- 56
(8) イネ白葉枯病に対する耐病性検定	---- 56
第四節 考察	
第一項 SBP の相同性	---- 56
第二項 OsSBP 遺伝子の転写制御	---- 59
第二項 OsSBP の病害抵抗性への関与	---- 62
第二項 OsSBP のイネ病害抵抗性における機能推定	---- 64
第一章 OsSBP 遺伝子導入によるサツマイモへの病害抵抗性付与	
第一節 緒言	---- 68
第二節 材料および方法	---- 68
第三節 結果	
第一項 OsSBP の病害抵抗性への関与	
(1) 形質転換体の作製	---- 70
(2) 黒斑病に対する耐病性検定	---- 71
(3) 活性酸素種の蓄積	---- 71
(4) 抗酸化酵素活性の測定	---- 76
(5) カタラーゼ遺伝子の発現解析	---- 76
第四節 考察	
第一項 OsSBP の病害抵抗性への関与	---- 76
第二項 OsSBP のサツマイモ病害抵抗性における機能推定	---- 80
総合考察	---- 82
謝辞	---- 84
参考文献	---- 85

序論

人類が食味や有用性を追求した作物育種を続けてきた結果、現存する栽培品種はそれらの起源である野生原種が様々な外敵から身を守るべく本来有している多くの抵抗性に関わる形質を失ってきたと考えられ、それは時として食糧不足にも発展しうる甚大な被害となってあらわれる。植物の病原体は、バクテリア、糸状菌、ウイルス、ウイロイド、ファイトプラズマ、リケッチア様微生物、線虫、原虫など数知れず存在し、植物への侵入手段も多様である。このような課題を克服すべく、我々人類は従来、品種間交雑による抵抗性遺伝子の導入を主とする抵抗性品種の作出を行ってきた。しかし抵抗性遺伝子を導入するだけでは変異病原菌レースの出現により抵抗性を失うことから、長期にわたる耐病性の維持は難しく、また交雑が前提にあるため導入に利用できる抵抗性遺伝子の数も限られる。さらに抵抗性遺伝子を導入する先の品種がもつ形質(多収性、品質等)が変化しないよう、繰り返し戻し交雑をする必要があるなど、交雑による抵抗性品種開発は多くの労力と時間が必要である。

近年、分子生物学や遺伝子工学、さらには植物組織培養学の進歩により様々な植物を対象に有用遺伝子の導入、いわゆる分子育種が行われるようになってきた。現時点では、食品安全性や環境への影響について解決すべき課題も残されているが、この技術は従来育種技術に要した労力と時間の軽減を可能にするだけでなく、交雑では導入できなかった異種生物の有用遺伝子も導入することも可能にする画期的なものである。分子育種は抵抗性品種開発にもさかんに利用されており、生産性の向上や農薬利用の低減等のメリットが期待できる。これまでに抵抗性遺伝子、PRタンパク遺伝子、抗菌ペプチド遺伝子、病原体由来の遺伝子等を導入した植物が次々に作られてきた。抵抗性遺伝子は病原菌のもつ非病原性遺伝子との相互認識「遺伝子対遺伝子説」により成立する特定の病原菌レースにきわめて強い抵抗性を示すことができる。これまでにトマトやタバコ、イネ、シロイヌナズナなどから20種以上が単離されており、タバコの抵抗性遺伝子 *N* を導入したタバコやトマトが抵抗性を示すことが報告されている(Dinesh-Kumar et al., 1995、Whitham et al., 1996)。PRタンパクは病原体の感染により特異的に発現が認められるもので、TMVに感染したTMV抵抗性タバコで発見されて以来、これまでに様々な植物から単離されておりアミノ酸配列や機能をもとに14のグループが知られている(Loon and Strien, 1999)。PRタンパク遺伝子では菌類の細胞壁成分であるキチンや β -1,3-グルカンの分解酵素のキチナーゼと β -1,3-グルカナーゼの遺伝子を導入した様々な植物の作出が知られており、抵抗性が向上することが報告されている(Brogile et al., 1991、

Jach et al., 1995)。抗菌性ペプチドではチオニンやディフェンシンなどがある。チオニンはシロイヌナズナ由来のものを過剰発現させたシロイヌナズナがフザリウム菌に対して、ディフェンシンはハツカダイコン由来のものを過剰発現させたタバコがアルタナリア菌に対してそれぞれ抵抗性を示すことが報告されている (Epple et al., 1997、Terras et al., 1995)。非植物体由来の抗菌性ペプチドではカイコのセクロピンやアタシン、T4 バクテリオファージやヒトのリゾチームなどを導入した植物でバクテリアに対する抵抗性の向上が確認されている (Ohshima et al., 1999、Mourgues et al., 1998)。病原体由来の遺伝子では主にウイルスを対象にした抵抗性植物の開発が行われきた。TMV のコートタンパク (CP) 遺伝子を導入した植物が TMV 感染に対して抵抗性を示したこと (Powell et al., 1986) にはじまり、さまざまなウイルスの CP 遺伝子を導入した植物が作られた。また移行タンパク質 (MP) 遺伝子や複製酵素 (Rp) 遺伝子を導入した植物も作出された。

イネにおける抵抗性品種の開発は、抵抗性遺伝子の利用では 1995 年に Song らが単離した白葉枯病抵抗性遺伝子の *Xa21* (Song et al., 1995、Wang et al., 1996) や Yoshimura らによる *Xa1* (Yoshimura et al., 1998)、Wang らにより単離されたいもち病抵抗性遺伝子の *Pi-b* (Wang et al., 1999) などがある。PR 遺伝子ではイネのキチナーゼ遺伝子を導入したイネがいもち病や紋枯病に抵抗性を示したとする報告 (Nishizawa et al., 1989、Datta et al., 2001) やグルカナーゼ遺伝子導入イネがいもち病に抵抗性を示したとする報告 (Nishizawa et al., 2003) がある。またウイルス由来の遺伝子では 1992 年にイネ紋葉枯ウイルスの CP 遺伝子を導入したイネがイネ紋葉枯ウイルスに対する抵抗性を向上したことが報告されている (Hayakawa et al., 1992)。その他にも、イネイエローモットルウイルスの Rp 遺伝子 (Pinto et al., 1999) やプロモモザイクウイルスの RNA (Huntley et al., 1996)、イネ萎縮ウイルスの CP 遺伝子 (Zheng, 1997) などを導入した形質転換体も作出されている。

このように様々なアプローチで抵抗性品種の分子育種が行われてきているが、それぞれに課題もある。抵抗性遺伝子を利用する場合、上述の通り特定の病原菌レースにはきわめて強い抵抗性を示すことができるが、他のレースには全く抵抗性を示すことができない。さらにこの抵抗性は植物のもつ抵抗性遺伝子と病原菌のもつ非病原性遺伝子との相互認識「遺伝子対遺伝子説」により成立するものであり、病原菌の変異により抵抗性の関係が容易に崩壊してしまうことが考えられる。PR タンパク遺伝子の場合、導入植物において期待された効果が得られないことも報告されており (Neuhaus et al., 1991)、単一の PR 遺伝子導入による防御効果には限界のあることがわかってきた。またキチンや β -1, 3-

グルカンといった成分をもつ菌類には有効であるが、細菌類やウイルスには効果がない。ウイルス由来の遺伝子の場合、導入遺伝子をもつウイルスそのもの、あるいは非常に近縁な種にのみ抵抗性を示すことや、ウイルスの進化速度が速いことからすぐに新種ウイルスを生み出してしまいう危険性があることが挙げられる。

このような課題を克服するアプローチとして注目されるものに信号伝達因子の利用がある。先に述べた抵抗性遺伝子は、菌類、バクテリア、ウイルス、線虫など多岐にわたる病原体それぞれに応じて存在することが報告されており、それらのコードするタンパク質の構造は非常に類似した機能ドメインをもつ。これは植物体内で病原体を問わず侵入を認識した後、共通の防御応答機構が働いていることが予想される。従って、これら抵抗性遺伝子群直下にある信号伝達経路を活性化することができれば、広範囲な病原体に抵抗性をもつ植物の開発が可能になることが期待できる。植物の抵抗反応の初期応答において NADPH オキシダーゼによる活性酸素種の生成が下流の一連の防御応答に重要な役割を担っていることがわかってきているが、Shimamoto らの研究グループは動物の食細胞において NADPH オキシダーゼの活性化制御に低分子量 G タンパク質である Rac が関与していることから、ヒト Rac と相同性を示す遺伝子として *OsRac1* をイネから単離した (Kawasaki et al., 1999)。活性型 *OsRac1* 遺伝子を導入したイネは恒常的に活性酸素種を生成することがわかり、イネいもち病菌やイネ白葉枯病菌に対して抵抗性を示すことが明らかになっている (Ono et al., 2001)。またヘテロ三量体 G タンパクの G 変異体は本来非親和性を示すイネいもち病菌レースに対して罹病性を示すが、活性型 *OsRac1* を遺伝子導入することで抵抗性が回復することが明らかにされ G が *OsRac1* のさらに上流の信号伝達因子である (Suharsono et al. 2002) と考えられ、今後これら因子を利用した分子育種への応用が期待される。

一方でこれまで得られた抵抗性関連遺伝子をピラミッド式に複数組み合わせることで、より広範囲の病原体に対し抵抗性を付与する試みも検討されている (Campbell et al., 2002)。実際、イネにおいて白葉枯病の抵抗性遺伝子である *Xa5*、*Xa13* および *Xa21* を多重導入したイネがそれぞれの遺伝子に対応するレース全てに抵抗性を示すことが報告されており (Singh et al., 2001)、有効な方法であると考えられる。しかしこの方法の場合、多数の有用遺伝子を導入することで多くの労力と時間が必要となること、また導入すべき有用遺伝子が限られていることや導入遺伝子の効率的な発現制御を行うための種々のプロモーターや制御遺伝子が不足している等、現時点での技術的制約は大きい。

平成 11 年度から発足した国家プロジェクト「植物利用エネルギー使用合理

「工業原料生産植物の研究開発」では、工業原料生産に関わる遺伝子とストレス耐性に関わる遺伝子を発現制御系と一体化して導入し実際に植物に機能させることを目的に、植物に多重遺伝子を簡便に連結する技術の開発、これを植物に導入するのに適した巨大ベクターの開発、マイクロアレイを用いた有用プロモーターの単離、遺伝子の高効率発現系の構築等の基礎技術開発に取り組んでいる。これらの技術が実用化すれば、抵抗性植物の分子育種においても耐病性付与効果の確認されている種々の遺伝子をピラミッド式に簡便に多重導入することで、広範囲な抵抗性を付与した植物の開発も可能になると考えられる。

エリシターは病害防御に関わる一連の遺伝子群を活性化すると考えられることから、エリシターを利用した遺伝子スクリーニングはこれまでに知られていない機能未知の有用遺伝子を単離できる可能性がある。セレブロシドエリシターはイネいもち病菌から単離された糖、脂肪酸、スフィンゴイド基からなるエリシターで、これを処理したイネでファイトアレキシンの蓄積や各種 PR 遺伝子の転写活性化、そしていもち病に対する抵抗性も高まることが報告されている (Koga et al., 1998, Umemura et al., 2000)。また最近になって OsRac1 や G といった信号伝達系に関わる因子も活性化することがわかってきており (Suharsono et al., 2002)、本エリシターがイネの一連の防御応答機構を活性化することが示唆される。

本研究ではピラミッドストラテジーに供試しうる新規の病害抵抗性関連遺伝子の獲得を目的として、まずセレブロシドエリシターをイネに処理した際に転写が活性化される遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、転写が活性化される遺伝子のうち、機能が未知の遺伝子をいくつか単離した。それらは実際にイネいもち病菌を接種した場合にも転写が活性化されることがわかった。次にそれら機能未知な遺伝子の一つであるイネセレンウム結合タンパク OsSBP (*Oryza sativa* selenium binding protein) 遺伝子について分子レベルの特徴付けを行い、続いて形質転換イネを作出し耐病性検定およびその機能推定を行った。さらに OsSBP の他作物への用途拡大を目的に OsSBP 形質転換サツマイモを作出し、耐病性向上の有無を検討した。

第一章 セレブロシドエリシターにより転写活性化される遺伝子のスクリーニング

第一節 緒言

イネいもち病菌由来のセレブロシドエリシターをイネ植物体に処理した際に転写が活性化される遺伝子のスクリーニングをディファレンシャルディスプレイ法を用いて行った。これまでに、セレブロシドエリシターを処理したイネで抗菌物質のファイトアレキシンの生成が増大することや感染特異的 (PR) タンパクをコードする遺伝子や病害抵抗性シグナル伝達に関係する遺伝子群が転写活性化されることが明らかになっており、本エリシターによる病害抵抗性関連遺伝子のスクリーニングは新規遺伝子の単離に有効と考えられる。本章ではセレブロシドエリシターで転写活性化された遺伝子の単離とその配列から機能を推定した。

第一節 材料および方法

(1) 植物

品種アキタコマチ (*Oryza sativa* L. cv. Akitakomachi) を窒素 0.6 mg/ g、リン酸 0.9 mg/ g、カリウム 0.6 mg/ g 配合した培土に播種し、人工気象室において 22℃、12 h 明 / 18℃、12 h 暗、湿度 80% の条件で栽培した。

(2) RNA の調製およびセレブロシドエリシター活性の確認

第 4 葉が完全展開したイネを用い、セレブロシドエリシター (図 1-1) を 100 µg/ ml となるよう、0.1% Tween 20 を含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に溶解したものおよび溶媒のみを噴霧処理し、処理後 2 時間目にグアニジンチオシアネート / 塩化セシウム法 (Maniatis et al. 1982) により全 RNA を抽出した。ポリ(A)⁺-RNA は Oligotex-dT30 super (Takara) を用い、メーカープロトコールに従って全 RNA から調製した。セレブロシドエリシターのエリシター活性の確認は Koga ら (1998) の方法に従い、処理後 7 日目の第 4、5、6 葉それぞれにおけるファイトアレキシンのファイトカサンおよびモミラクソンを定量することにより行った。

(3) mRNA Differential Display (DD) 法によるスクリーニング

Differential Display 法は Yoshida ら (1994) の方法に従い、RAP-PCR kit

(STRATAGENE)を用い、セレブロシドエリシターまたは溶媒処理イネの第4葉から抽出したポリ(A)⁺-RNA(100 ng)を鋳型に行った。すなわち、ポリ(A)⁺-RNA(100 ng)を70℃で10分間加熱、氷上で冷却後、first strand cDNAを50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1.25 mM 各 dNTP, RNase Inhibitor 40 ユニット, 25 μM ランダムプライマー, および moloney murine leukemia virus reverse transcriptase 20 ユニットを含む反応溶液 20 μl 中で37℃, 1時間反応させ合成した。反応液を90℃, 5分間で酵素を失活させ10分間氷冷後、cDNAを回収し200 μl の滅菌水に溶解し、この溶液2 μl を鋳型として10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 μM 各 dNTPs, 1 μM プライマー (18-mer)および Taq polymerase (Takara) 1 ユニットを含む反応液 48 μl に添加し、second strand cDNA の合成を行った。反応条件は94℃, 1分間加熱後、94℃, 1分間を1サイクル、36℃, 5分間、72℃, 5分間を1サイクル、92℃, 1分間、35℃, 1分間、72℃, 2分間を40サイクルそれぞれ行ない、その後72℃で10分間伸張反応を行なった。

反応に使用した任意のプライマー A-1 ~ A-5, B-1 ~ B-5, C-1 ~ C-5 は以下の通りである。

- A-1; 5'-AATCTAGAGCTCCTCCTC-3'
- A-2; 5'-AATCTAGAGCTCCAGCAG-3'
- A-3; 5'-AATCTAGAGCTCTCCTGG-3'
- A-4; 5'-AATCTAGAGCTCTCCAGC-3'
- A-5; 5'-AATCTAGAGCTCCCTCCA-3'
- B-1; 5'-CTTGTACGCGTGTGCGAC-3'
- B-2; 5'-CCTACACGCGTATACTCC-3'
- B-3; 5'-CATAACACGCGTATACTGG-3'
- B-4; 5'-ACGCACACGCACAGAGAG-3'
- B-5; 5'-CACACGCACACGGAAGAA-3'
- C-1; 5'-CATGTGTACGCGTGTGGG-3'
- C-2; 5'-CGTGTATACATACGTAAC-3'
- C-3; 5'-CCATGCGCATGCATGAGA-3'
- C-4; 5'-CCACACGCGCACACGGGA-3'
- C-5; 5'-CCGCACGCGCACGCAAGG-3'

PCR 増幅産物は2.0% 低融点アガロースゲル (FMC. Co.) による電気泳動で分離しエチジウムブロマイド染色後、特異的 PCR 増幅産物を含むアガロース

断片を切り出した。断片は SUPREC-01 (Takara) を用い、-80℃、20 分間凍結後、メーカープロトコールに従い特異的 PCR 産物を回収した。回収断片は TOPO TA CLONING KIT (Invitrogen) を用い、メーカープロトコールに従い PCR2.1 TOPO ベクターにサブクローニングした。

(4) セレブロシドエリシター処理による発現解析

第 5 葉が完全に展開したイネにセレブロシドエリシターを 100 µg/ml となるよう、0.1% Tween 20 を含む 20 mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.5) に溶解したものおよび溶媒のみを噴霧処理し、2, 4, 8, 12, 24 時間後にそれぞれ第 4 葉をサンプリングし、液体窒素で凍結して RNA 調製用サンプルとした。採取した葉のサンプル約 0.5 g からグアニジンチオシアネート / 塩化セシウム法 (Maniatis et al. 1982) により全 RNA を単離し、20 µg を 1% アガロース・ホルムアミドゲルで電気泳動し、HybondN⁺ メンブラン (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。ハイブリダイゼーションは 5×SSC、1% ブロッキングリジェント (Roche)、7% SDS、0.02 mg/ml サケ精子 DNA 中で 42℃、3 時間インキュベート後、新しいハイブリダイゼーション液中に煮沸急冷したプローブを 50 ng/ml の濃度になるよう加え、42℃で一晩インキュベートした。洗浄は 0.1×SSC、0.1% SDS 液中で 20 分×2 回、55℃で行なった。プローブの標識は DIG Nucleic acid Detection Kit (Roche) を用いた。シグナルの検出は GS-250 Molecular Imager (BIORAD) を用い、1-3 日間感光させた。

(5) いもち病菌接種による発現解析

イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) の接種にはアキタコマチに親和性レースの 007 (MAFF305471、農業生物資源研) および非親和性レースの 031 (MAFF305494) を用いた。Matsumoto ら (1980) の方法に従い、第 5 葉が完全に展開したイネに、 2×10^6 孢子/ml (0.1% Tween 20 水溶液) になるよう調整した親和性いもち病菌(レース 007)および非親和性いもち病菌(レース 031)をそれぞれ接種後、0、8、12、24、48 時間後にそれぞれ第 4 葉をサンプリングし、液体窒素で凍結して RNA 調製用サンプルとした。RNA の調整および発現解析は、セレブロシドエリシター処理による発現解析と同様の手順で行った。

(6) 塩基配列の決定およびホモロジー検索

塩基配列は PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いラベル後、373A DNA Sequencer (ABI) により決定した。決定した塩基配列は DNA シーケンス入力解析システム ; DNASIS-Mac version 2.0 (日立ソフト) により、

配列データの整理および解析を行なった。ホモロジー検索は DDBJ の FASTA および BLAST ソフトを、アミノ酸配列の比較は CLUSTAL W ソフトを用いた。またモチーフ検索は DBGET のモチーフ検索プログラムを、膜貫通領域の予測には SOSUI プログラムを用いた。

(7) 完全長 cDNA の単離

cDNA ライブラリーは、セレプロシドエリシター処理イネ第 5 葉より調製した 3 μ g のポリ(A)⁺-RNA を用い、Super Script Lamda System for cDNA Synthesis and Lamda cloning (Gibco BRL) により構築した。cDNA は Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) によりパッケージングした。プラークハイブリダイゼーションは 5 \times SSC、1% blocking reagent (Roche)、7% SDS、0.02 mg/ml サケ精子 DNA 中で 42、3 時間インキュベート後、新しいハイブリダイゼーション液中に煮沸急冷したプローブを 50 ng/ml の濃度になるよう加え、42 で一晩インキュベートした。洗浄は 2 \times SSC、0.1% SDS 液中で 15 分および 0.2 \times SSC、0.1% SDS 液中で 30 分をそれぞれ 2 回、室温で行なった。プローブの標識は DIG Nucleic acid Detection Kit (Roche) を用いた。シグナルの検出は GS-250 Molecular Imager (BIORAD) を用い、1 晩感光させた。

また全長 cDNA を得るために、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いてクローン No.B1 \times A2-700、C4 \times A5-750、B2 \times A5-700 の 5' 側と B2 \times A5-700 の 3' 側の塩基配列を増幅した。メーカープロトコールに従い、mRNA から cDNA を合成し、両端にアダプター配列を付加した後に内部の既知配列とアダプター配列をプライマーとした PCR により既知配列の両側の未知 cDNA 配列を増幅した。増幅された 5' 側断片と 3' 側断片をそれぞれ TOPOTA CLONING KIT (Invitrogen) を用いて PCR II TOPO ベクターにクローニングした。さらに各クローンにおいて、5' 側断片と 3' 側断片の間で重複する領域にある制限酵素サイトで切断後、DNA Ligation Kit (Takara) を用いライゲーションを行ない完全長 cDNA とした。

第三節 結果

第一項 セレプロシドエリシター応答遺伝子の単離および選抜

まずセレプロシドエリシター処理によるイネの応答が確実に行われているかどうかを確かめるために、処理後 7 日目の第 4、5、6 葉それぞれにおけるファイトアレキシンのファイトカサンおよびモミラクソンを定量することにより行

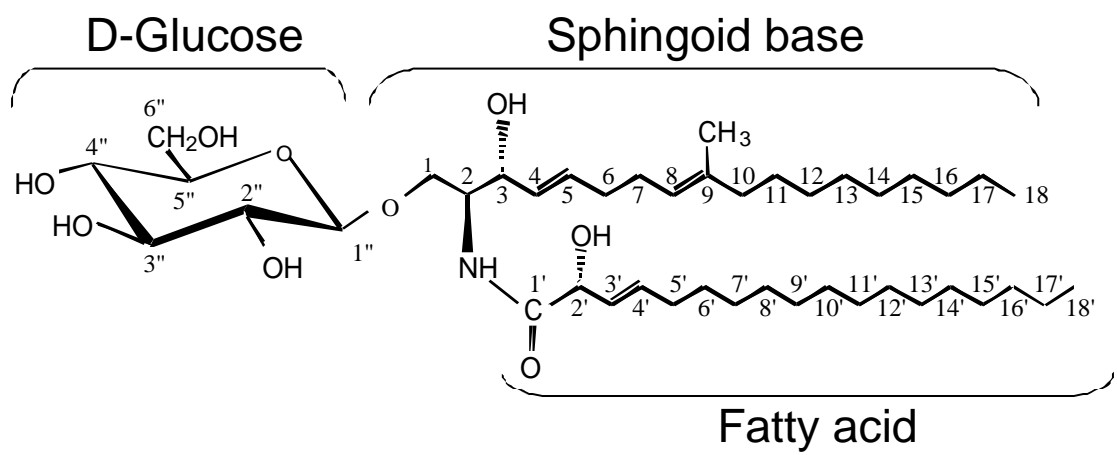


図 1-1 セレブロシドエリシターの化学構造式

った。その結果、第4葉および第5葉における抗菌物質モミラクトン量およびファイトカサン量はコントロールに比べ、有意に蓄積していることがわかった(図 1-2)。このことから、本試験におけるセレブロシドエリシター処理はイネの一連の病害応答を活性化させていると考えられた。またファイトアレキシンの蓄積量は第5葉よりも第4葉で多く認められたことから、第4葉を用いてエリシター応答遺伝子の単離を行った。15種類のプライマーによる225通りの組み合わせで実施したスクリーニングの結果、セレブロシドエリシターにตอบสนองし転写が活性化するcDNA断片を合計43個得た。これらを電気泳動により分離した様子の代表的な例を図 1-3 に示す。

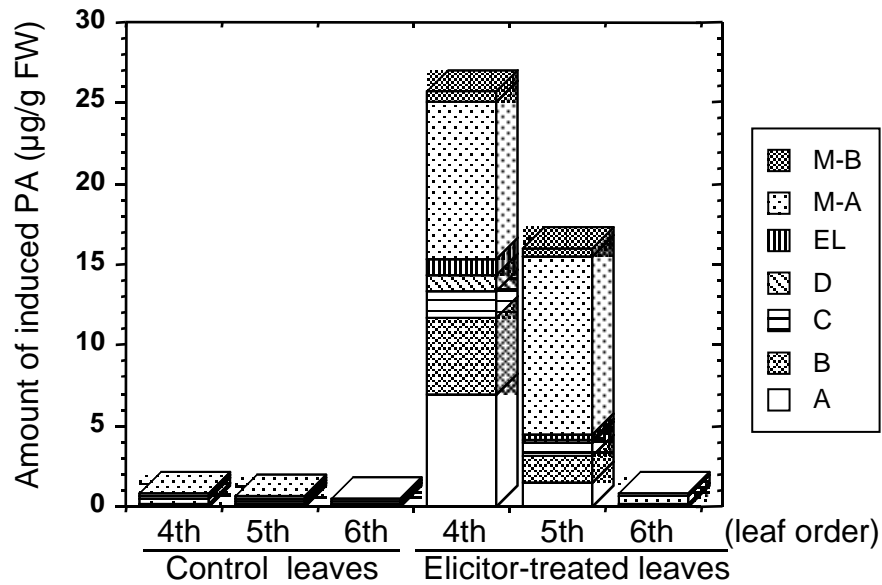
第二項 セレブロシドエリシター応答遺伝子の二次選抜

これら43種のcDNA断片が再現性良くセレブロシドエリシターにより転写活性化されることを確かめるために、ノザン解析によりエリシター処理後のmRNAの蓄積を経時的に調べた。その結果、5種のcDNA断片が再現性良くエリシター処理にตอบสนองして発現パターンを示すことがわかった(図 1-4)。これらのcDNA断片を、スクリーニングで用いたプライマー番号および増幅断片の分子量から便宜上B1×A2-700、B2×A5-700、C4×A5-750、C4×A5-800、B2×A1-650とした。B1×A2-700はエリシター処理後2-4時間目にmRNAの蓄積が始まり、観察した24時間目まで続いた。B2×A5-700もエリシター処理後2-4時間目にmRNAの蓄積が始まり、観察した24時間目で最大の蓄積が認められた。C4×A5-750はエリシター処理後4-8時間目にmRNAの蓄積が始まり、観察した24時間目まで続いた。C4×A5-800はエリシター処理後2時間目からmRNAの蓄積が始まり、4時間目に蓄積量のピークを迎え、8時間目まで転写が認められた。B2×A1-650はエリシター処理後4-8時間目から観察した24時間目まで転写の活性化が認められた。

第三項 セレブロシドエリシター応答遺伝子の相同性検索

ノザン解析において、セレブロシドエリシター処理に特異的に転写活性化を示すものとして絞り込んだ5種類のcDNA断片について、その塩基配列を決定し、WWWサーバー上のBLASTプログラムによるホモロジー検索を行った(表 1-1)。その結果、B1×A2-700はシロイヌナズナのセレニウム結合タンパク質ホモログやヒトやマウスで単離されているセレニウム結合タンパク質をコードする遺伝子(Bansal et al. 1990、Pumford et al. 1992)と相同性をもつこと

A



B

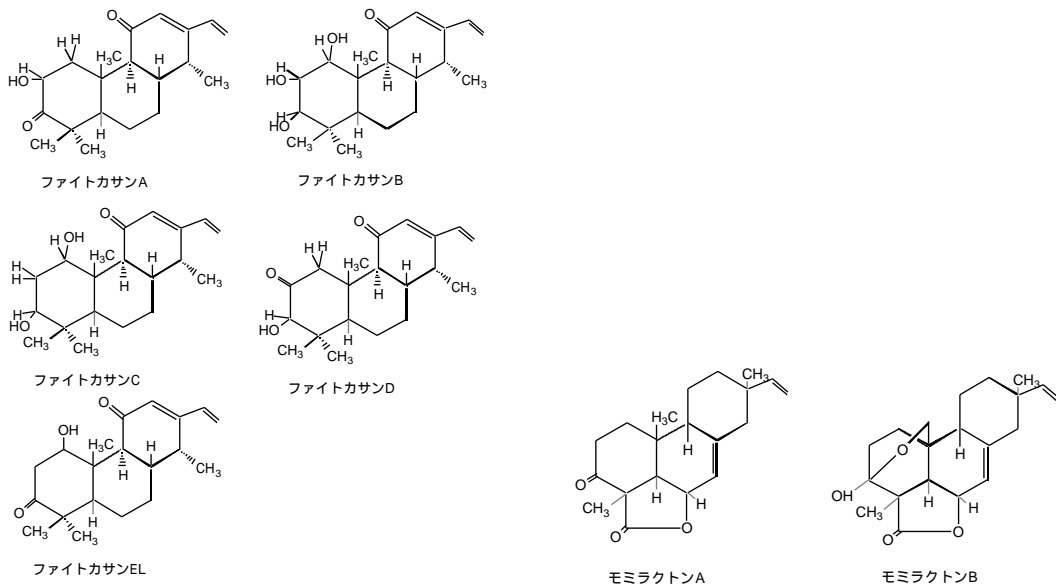


図 1-2 セレブロシドエリシター処理によるイネ葉における各種ファイトアレキシンの蓄積

(A)第4葉が完全展開時点にセレブロシドエリシターを噴霧処理した。M-B, モミラクトン A ; M-B, モミラクトン B ; EL, ファイトカサン EL ; D, ファイトカサン D ; C, ファイトカサン C ; B, ファイトカサン B ; A, ファイトカサン A
 (B) ファイトカサン A, B, C, D, EL およびモミラクトン A、B の化学構造式。

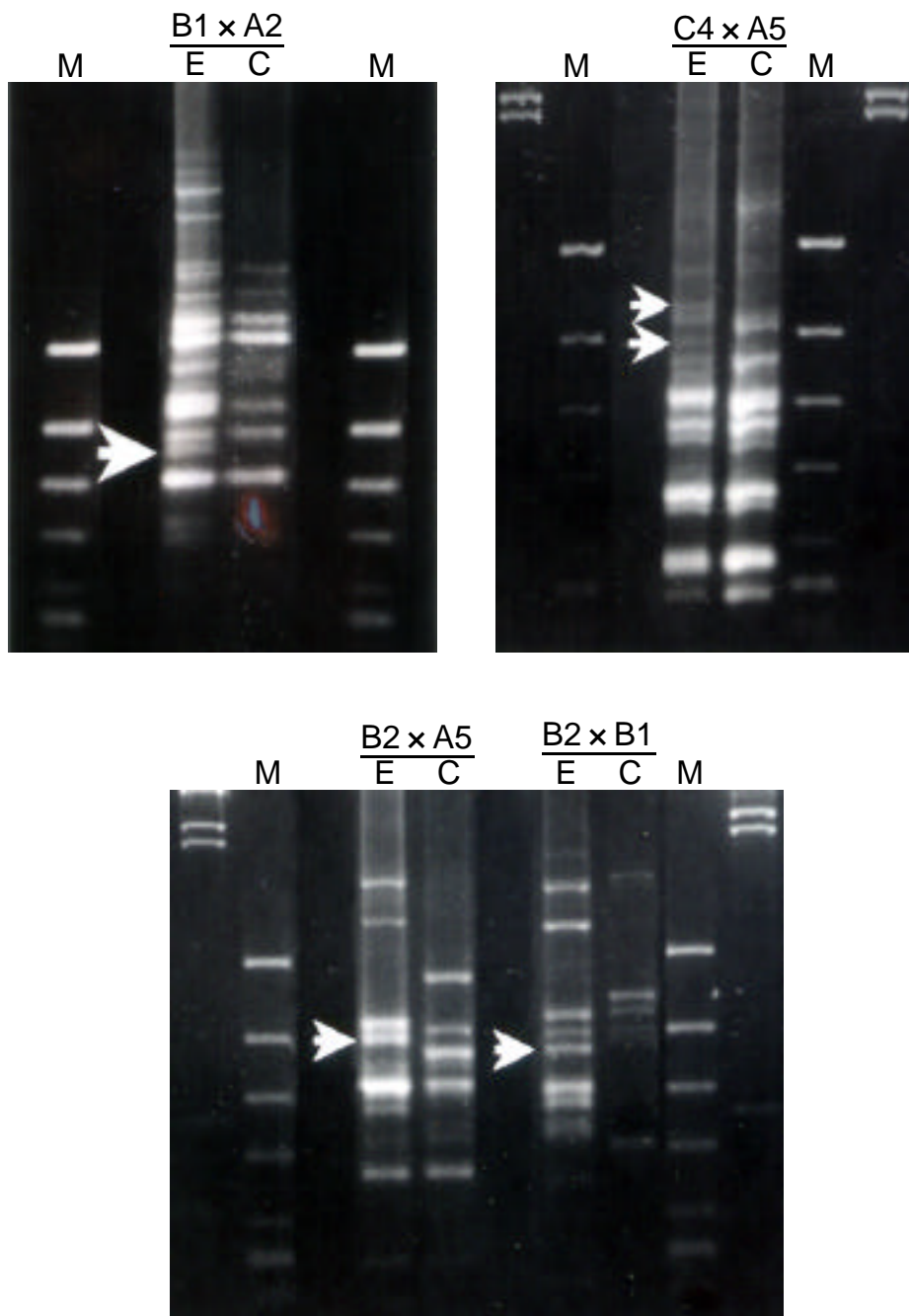


図 1-3 セレブロシドエリシター処理で発現の変化する遺伝子のディファレンシャルディスプレイによる同定
PCR 産物の電気泳動の一例。矢印はエリシター処理で再現性良く出現したバンド(一部)を示す。E, セレブロシドエリシター処理 ;C, 無処理。A2, A5, B1, B2, C4 はそれぞれ用いたプライマーを示す。

がわかった。B2×B1-650 は種々の植物で報告のある β -1,3-エンドグルカナーゼや β -1,3-エンドグルコシダーゼをコードする遺伝子と類似することがわかった。特にイネの putative β -1,3-エンドグルカナーゼと最も相同性が高く、98% マッチを示した (図 1-5)。C4×A5-800 はシロイヌナズナの T20H2.2 と最も相同性が高く (図 1-6A) また C 末端において Gly-Arg の繰り返しがみられる特徴的な配列をもつことがわかった (図 1-6B)。またその他に種々の植物で報告されている glycine rich protein と類似することもわかり、特にイネの glycine rich protein と 52% を示した。B2×A5-700 はイネの glucose-6-phosphate/ phosphate-translocator と、C4×A5-750 はシロイヌナズナの kinase-like protein とそれぞれ相同性を示した。

第四項 イネいもち病菌接種時のセレブロシドエリシター応答遺伝子の 発現解析

セレブロシドエリシター処理に应答する 5 種の cDNA 断片のうち、相同性検索で β -1,3-エンドグルカナーゼと相同性が高かった B2×B1-650 および種々の植物で報告されている glycine rich protein と類似する C4×A5-800 を除いた新規遺伝子と思われる 3 種のクローンについて、各々非親和性いもち病菌 (レース 031) および親和性いもち病菌 (レース 007) を接種したイネにおける経時的発現様式をノザン解析により調べた。またこの際、いもち病菌の感染が成立していることを確認するために、いもち病菌接種イネの一部の表現型を経過観察した。その結果、接種後 8 日目において親和性レース 007 接種イネで病斑が認められ、病斑数は第 5 葉で 5 個体の平均 2.6 個/葉、第 4 葉で 5 個体の平均 5.0 個/葉であった。また非親和性レース 031 接種イネでは過敏反応に特有の褐点が認められ、特に第 4 葉で多くの褐点を観察した (図 1-7)。以上のことから、いもち病菌のイネへの感染は成立したものと考え、以降の発現解析を行った (図 1-8)。B1×A2-700 は非親和性レース 031 および親和性レース 007 の両方に対し应答発現することが認められたが、031 接種では 12-24 時間目から転写が活性化するのに対し、007 接種では 24-48 時間目から転写の活性化が認められた。C4×A5-750 も非親和性レース 031 および親和性レース 007 の両方に対し应答発現することが認められたが、非親和性レース接種時でより速やかな転写の活性化が見られ、接種後 8 時間目に既に mRNA の蓄積を観察したのに対し、親和性レース接種では 24 時間目ではじめて転写の活性化が認められた。一方、B2×A5-700 は非親和性レース接種時には少なくとも観察した 48 時間目までに mRNA の蓄積は殆ど認められなかったが、親和性レース接種で

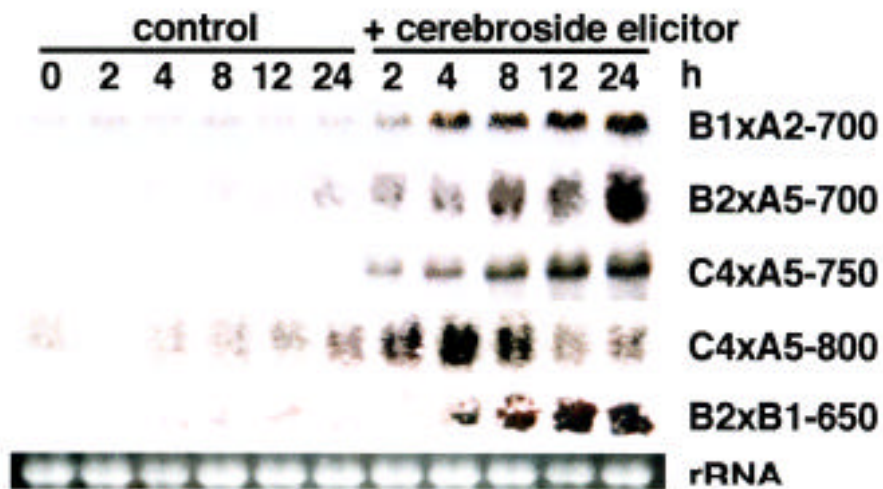


図 1-4 セレブロシドエリシター処理で単離した遺伝子の発現解析

第 4 葉が完全展開した時点でセレブロシドエリシターを噴霧処理し、各時間の葉から全 RNA を回収し各遺伝子の発現量を調べた。

表 1-1 セレブロシドエリシター処理により転写活性化される遺伝子

Clone	Acc. No.	Length (bp)	Match (%)	id.	BLAST score	Sequence homology	Data base match (Acc. No.)
B1xA2-700	AB059401	1737	74		623	probable selenium binding protein	Arabidopsis (E71401)
C4xA5-750	AB060276	2807	32		284	kinase-like protein	Arabidopsis (AL163817-6)
B2xA5-700	AB060277	1646	54		323	glucose-6-phosphate/ phosphate-translocator	rice (AC037425-15)
B2xB1-650	AB060278	723	98		300	putative β -1, 3-glucanase	rice (AP003794-20)
C4xA5-800	AB060279	889	51		119	T20H2.2 protein	Arabidopsis (H86335)

B1 × A2-700、C4 × A5-750、B2 × A5-700 は完全長 cDNA の配列（後述）をもとに検索した結果を示す。

```

B2 x B1-650:   4 VCDPNTNLSYDNMLYAQIDAVYAAMKAMGHTD I GVR I SETGWPSKGDEDEAGATVENAAA 63
: .....
OsG lucanase: 231 VRDPNTNLSYDNMLYAQIDAVYAAMKAMGHTD I GVR I SETGWPSKGDEDEAGATVENAAA 290

B2 x B1-650:   64 YGNLMQR IAMNQGTPLKPNVPI DVFVFALFNEDMKPGPTSERNYGLFYPNGSPVYA INT 123
: .....
OsG lucanase: 291 YGNLMQR IAMNQGTPLKPNVPI DVFVFALFNEDMKPGPTSERNYGLFYPNGSPVYA INT 350

B2 x B1-650:  124 GAGGVSGRTGPFDPYSAQMFSSASRLAMTSG 154
: .....
OsG lucanase: 351 GAGGVSGRTGPFDPYSAQMFSSASRLAVPSG 381

```

図 1-5 B2 x B1-650 とイネ putative β -1,3-glucanase とのアミノ酸配列の比較
保存されているアミノ酸は : で示した。

A

```

C4xA5-800 1  ----TRAHGRMRNYISYGMSLLEENGHDEIVIKAMGRAINKTVMVVELIKRKIGGLHQI 55
AtT20H2.2 241 ENEIRITSMGRARNYITYAMALLQENKSNEVIFKAMGRAINKSVTIVELIKRRIPGLHQI 300
      : ** **:* *:*:* *:::*****:* :*****:* *****
C4xA5-800 56  TSTESIDITDTWEPLLEGLLPLETTWHVSMIAITLSKKALDTLSPGYQPPIPAEEVRPAF 115
AtT20H2.2 301  TSIGSTDI TDTWEPT EELQTIETTRHVSMITITLSKEQLNTSSVGYQCPPIEMVKPLA 360
** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C4xA5-800 116  DYEHEESFPTNRGRGRGGRRRGRGRAMS----NGPPAYDYGEWEWEEG-----DYY 162
AtT20H2.2 361  EIDYEGQDGS PRGRGGRRRGRGRGRGRGRGRGNGPANVEYDDGGRGRGGRGNGYVNNEY 420
: : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C4xA5-800 163  NYRGRGRG-----RFRGRGRGRGGYGGRRGGYG-----YDY 197
AtT20H2.2 421  DDGGRGRGGSGYVNNEYNDGGM EQDRSYGRGRGRGGGRGRGGYNGPPPPYEA 480
: ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C4xA5-800 198  GYGGRDYEDQGEYFEEDYPPP-GRGRGRRRGGPGPFRGSRPWAWSILR---- 251
AtT20H2.2 481  QQDGGDYGNVAPPADHGYDPPPQGRGRGRGGGRGGGRGGFNRNSNGAPIQAAA 538
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

B

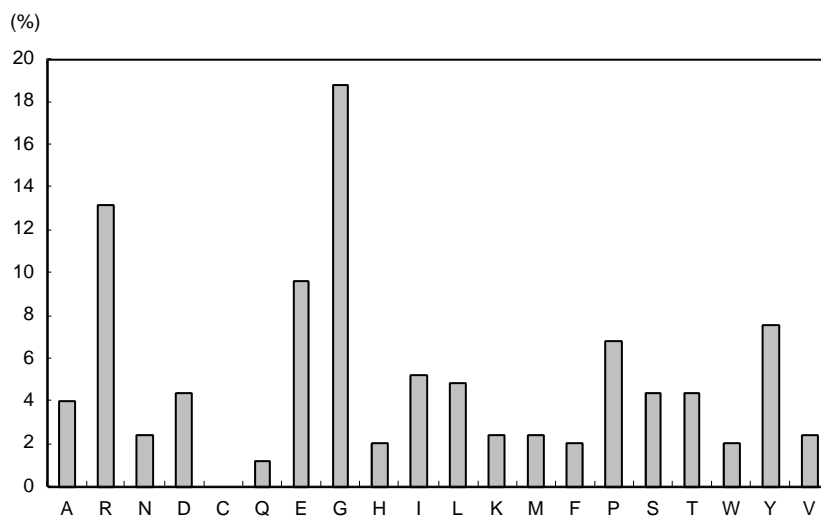


図 1-6 C4 x A5-800 配列

(A) シロイヌナズナ T20H2.2 とのアミノ酸配列の比較。保存されているアミノ酸は*で、類似アミノ酸を:で示した。囲みは Gly-Arg の繰り返しからなる領域を示す。(B) 増幅領域から予測される各アミノ酸の割合

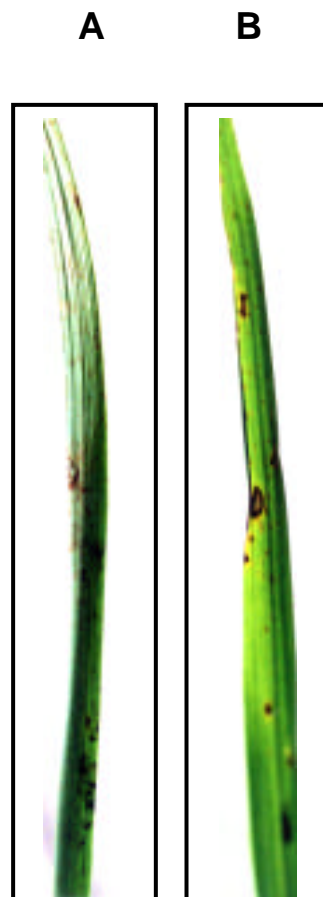


図 1-7 イネいもち病菌を噴霧接種したイネ葉
接種後 8 日目の第 4 葉の表現型を示す。(A) 非亲和性レース 031 接種葉、
(B) 亲和性レース 007 接種葉

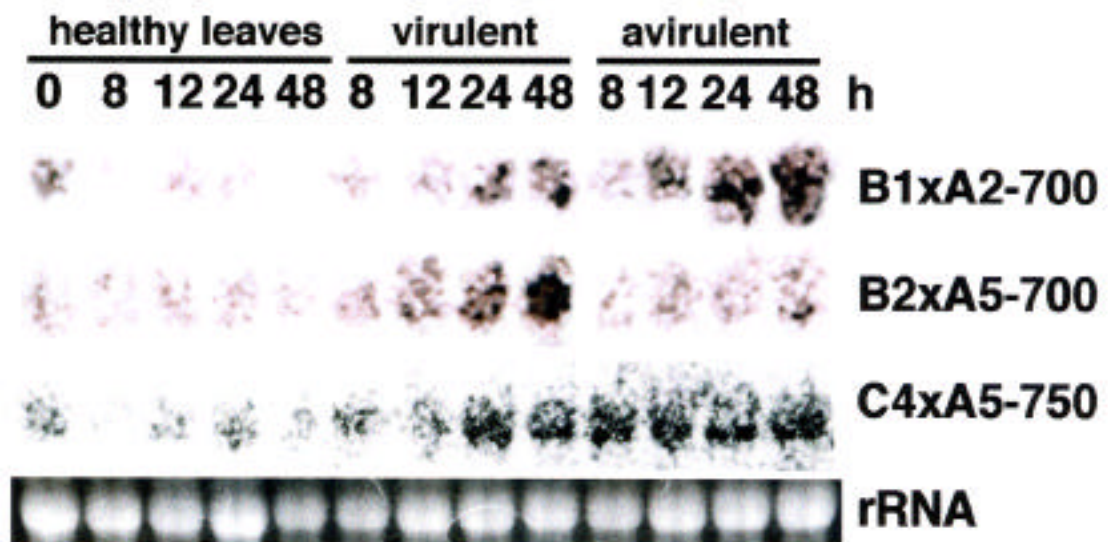


図 1-8 セレブロシドエリシター処理で単離した遺伝子の発現解析
 親和性レースおよび非親和性レース接種後、各時間の葉から全 RNA
 を回収し各遺伝子の発現量を調べた。

は 12-24 時間目から転写活性化が認められ、48 時間目で最大の mRNA の蓄積を観察した。

第五項 完全長 cDNA の単離と塩基配列の決定

セレブロシドエリシターおよびいもち病菌に対する発現応答の結果から特異的発現を示した 3 種類の増幅断片、B1 × A2-700、C4 × A5-750、B2 × A5-700 の完全長 cDNA を単離し、塩基配列を決定した。B1 × A2-700 は 1371bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を含む全長 1737bp の塩基配列を決定した。この ORF から推定されるアミノ酸配列は 457 残基であった (図 1-9)。B2 × A5-700 は ORF1074bp (354 残基) を含む全長 1659bp の塩基配列を決定した (図 1-10)。C4 × A5-750 は ORF2142bp (714 残基) を含む全長 2927bp の塩基配列を決定した (図 1-11)。

第六項 完全長 cDNA 塩基配列によるホモロジー検索およびモチーフ検索

決定した 3 種 cDNA から推定されるアミノ酸配列をもとに WWW サーバー上の FASTA プログラムによるホモロジー検索および DBGET プログラムによるモチーフ検索を行ない、それぞれの遺伝子がもつ機能を推定した。B1 × A2-700 はシロイヌナズナ、ヒト、マウス等のセレニウム結合タンパク (Acc. No. はそれぞれ E71401、P17563 および Q13228) やマウスのアセトアミノフェン結合タンパク (Q63836) と高い相同性を示した (図 1-12)。また N-糖鎖の付加シグナルと考えられる配列やチトクロム C ファミリーのヘム結合が予想される配列の存在が示唆された。B2 × A5-700 はイネの glucos-6-phosphate/ phosphate-translocator (AC037425-15) と相同性を示した。また C 末にマイクロボディターゲティングシグナル配列の存在が予想された (図 1-10)。さらに WWW サーバー上の膜タンパク質予測ソフト SOSUI システムによる解析の結果、8 箇所膜貫通領域からなる膜タンパク質である可能性が強いこともわかった (図 1-13)。C4 × A5-750 は部分的な領域においてシロイヌナズナで報告されている kinase-like protein (AL163817-6) と相同性を示したが、配列からの解析では機能を推定しうる特徴的なモチーフは見つからなかった。

1	ATGGAGAAGGGCCCGAGGGAGAAGCTCCTCTACGTCACCTGCGTCTACAACGGTACTGGA	60
1	M E K G P R E K L L Y V T C V Y N G T G	20
61	ATTAACAAGCCGGATTACCTGGGTACGGTGGACGTGGACCCCAATTC CCTACATACTCC	120
21	I N K P D Y L G T V D V D P N S P T Y S	40
121	CAAGTGATCCACAGGCTCCCAGTCACCCATGTCGGCGATGAGCTGCATCACTCTGGATGG	180
41	Q V I H R L P V T H V G D E L H H S G W	60
181	AACGCTTGCAAGTTCTTGCCATGGTGATCCATCGGCTAGCCGCCGTTTCTTGATTCTGCCT	240
61	N A C S S C H G D P S A S R R F L I L P	80
241	TCGTTGCTGTCTGGCCGTGTATGTCGTTGACACGCTGAAGGACCCAAAGGCGCCTGCC	300
81	S L L S G R V Y V V D T L K D P R A P A	100
301	TTGCATAAGGTGGTCGAGGCTGAGGACATTGCTGAGAAGACAGGGCTTGGATTTCTCAT	360
101	L H K V V E A E D I A E K T G L G F P H	120
361	ACATCTCATTGCCTGGCATCTGGGAGATAATGATTTCTTGCCCTGGGGATAAGGAGGGA	420
121	T S H C L A S G E I M I S C L G D K E G	140
421	AATGCTGCTGGCAATGGCTTCTCTGCTGATTCTGAATCAATGTCAAAGGACGTTGG	480
141	N A A G N G F L L L D S E F N V K G R W	160
481	GAAAAGCCAGGTCACAGCCCCTGTTTGGCTATGATTATTGGTATCAACCTCGTCACAAG	540
161	E K P G H S P L F G Y D Y W Y Q P R H K	180
541	ACAATGATCAGTTCATCATGGGAGCACCTGCAGCTTTCAGGACTGGTTTTGATCTTCAG	600
181	T M I S S S W G A P A A F R T G F D L Q	200
601	CATGTGCAGGATGGTCTCTATGGAAGACATCTGCACGTGTATGACTGGCCTGGTGGTGAG	660
201	H V Q D G L Y G R H L H V Y D W P G G E	220
661	CTCAAGCAGACACTAGATTTAGGCAGTACAGGTCTTCTCCACTTGAGGTGAGGTTTTTA	720
221	L K Q T L D L G S T G L L P L E V R F L	240
721	CATGATCCATCAAAGGATACTGGGTATGTGGGCTGTGCTCTGACAAGCAACATGGTCAGA	780
241	H D P S K D T G Y V G C A L T S N M V R	260
781	TTTTTCAAGACTGCAGATGGATCATGGAGCCATGAGGTTGCTATATCTATAAAACCATTG	840
261	F F K T A D G S W S H E V A I S I K P L	280
841	AAAGTGGCAACTGGATTCTGCTGAAATGCCAGGACTGATAACTGATTTTGTATCTCT	900
281	K V R N W I L P E M P G L I T D F V I S	300
901	CTGGATGATCGCTATCTCTACTTGGTCAACTGGCTTATGGTGATATCAGGCAGTACAAC	960
301	L D D R Y L Y L V N W L H G D I R Q Y N	320
961	ATCGAGGACCTGCGAAGCCTGTGTGGCTGGACAAGTATGGGCAGGAGGCCTTCTTCAA	1020
321	I E D P A K P V L A G Q V W A G G L L Q	340
1021	AAGGGCAGTGAGGTTGTGTATGTAAGTGGGATGACAAAGAAGAGCAGTACAGTGTGCC	1080
341	K G S E V V Y V T E D D K E E Q Y S V P	360
1081	CAGGTCAAGGGTCATCGACTTAGAGGTGGGCCACAGATGATTCAGCTGAGCCTGGATGG	1140
361	Q V K G H R L R G G P Q M I Q L S L D G	380
1141	AAGAGGATATATGTGACCAACTCTCTTTTTCAGCCGATGGGACGAGCAGTTCTATGGCCAA	1200
381	K R I Y V T N S L F S R W D E Q F Y G Q	400
1201	GATCTTGTCAAGAAGGGCTCCACATGTTGCAGATCGACGTCGACACTGAGAAAGGAGGA	1260
401	D L V K K G S H M L Q I D V D T E K G G	420
1261	CTATCGATCAACCTAACTTCTTTGTAGATTTTGGTGTGAGCCAGAGGGTCCCTCCTTG	1320
421	L S I N P N F F V D F G A E P E G P S L	440
1321	GCCCATGAGATGAGATATCCTGGTGGAGATTGCACCTCTGATATATGGATATAA	1374
441	A H E M R Y P G G D C T S D I W I *	458

図 1-9 B1×A2-700 の塩基配列および予測されるアミノ酸配列
コードしていると予測されるアミノ酸配列は 457 残基。

1	ATGGGTGTCGGCGGGGAGAAGTTCAGCTGGGGACGGTGGGGGGCTGAGCCTCTCCGTG	60
1	M G V G G E K F Q L G T V G A L S L S V	20
61	GTGTCATCCGTCTCCATTGTCATCTGCAACAAGGCGCTCATGAGCTCCCTCGGCTTCAAC	120
21	V S S V S I V I C N K A L M S S L G F N	40
121	TTTGCCACTACCTTGACGAGTTGGCATCTTCTTGTACATTTTGCTCCCTCCATGTAGCA	180
41	F A T T L T S W H L L V T F C S L H V A	60
181	TTATGGATGAAGTTCCTCGAGCACAAAGCCTTTCGACTCGAGAACTGTCATGGGATTTGGA	240
61	L W M K F F E H K P F D S R T V M G F G	80
241	GTGCTCAATGGCATCTCCATTGGCCCTCCTCAACTTGAGTCTTGGTTTTAATTCTGTTGGA	300
81	V L N G I S I G L L N L S L G F N S V G	100
301	TTTTACCAGATGACAAAGCTGGCTATCATCCCATGCACTGTTATTTTGGAGACTCTTTTC	360
101	F Y Q M T K L A I I P C T V I L E T L F	120
361	TTCAGGAAGAAGTTCAGCCGGAGTATCCAAGTGTCCCTTCAGTGCTCCTCTTTGGTGTG	420
121	F R K K F S R S I Q L S L S V L L F G V	140
421	GGTGTGCAACAGTGACTGATCTGCAACTCAATGCTGTGGGATCCGTATTGTCCTCGCTG	480
141	G V A T V T D L Q L N A V G S V L S S L	160
481	GCAATTATTACAACCTGCATCGCGCAAATTATGACAAACTATCCAGAAGAAGTTC AAG	540
161	A I I T T C I A Q I M T N T I Q K K F K	180
541	GTTTCTTCAACCAATTATTATACCAATCTTGGCCCTATCAATCACTGACCCCTTCTCTT	600
181	V S S T Q L L Y Q S C P Y Q S L T L F L	200
601	ATTGGTCCATTCCTTGATGGATTTTTGACTAACCAAAATGTATTTGCATTGACTACACA	660
201	I G P F L D G F L T N Q N V F A F D Y T	220
661	TCCCAAGTTGTGTTTTTCATTGTATTATCGTGCTTGATATCTGTCTCAGTGAACCTCAGC	720
221	S Q V V F F I V L S C L I S V S V N F S	240
721	ACTTTCCTTGTGATCGGAAAGACTTCTCCTGTCACTTACCAAGTCTGGGCCATCTTAAA	780
241	T F L V I G K T S P V T Y Q V L G H L K	260
781	ACATGCCTAGTACTGATTTTTGGTTATGTTTTGCTTCATGACCCACTTAGCTGGAGAAAC	840
261	T C L V L I F G Y V L L H D P L S W R N	280
841	ATACTCGGCATCCTAATTGCAGTAGTTGGAATGGTCTTATACTCATACTTCTGCACATTG	900
281	I L G I L I A V V G M V L Y S Y F C T L	300
901	GAGGGCCAGCAAAAAACGCCGAAGTCTCCCCACAACAGGCGAAAGAAGGCGATTCCGGCT	960
301	E G Q Q K N A E V S P Q Q A K E G D S A	320
961	CCTTTGATCTCAGACTCTCTGAGCAAAGTTGAGAATGGAGGTGGAGTGGTTGATGATGAG	1020
321	P L I S D S L S K V E N G G G V V D D E	340
1021	CCTCTCAAGGTACCGATGTGGAGCTCAAAGTACTCAAGGGCGTGA	1065
341	P L K V P M W S S K Y <u>S R A</u> *	355

図 1-10 B2×A5-700 の塩基配列および予測されるアミノ酸配列
コードしていると予測されるアミノ酸配列は 354 残基。—はマイクロボディ
ターゲティングシグナルを示す。

```

1 ATGACAC CAA CCGTCTCTATGCGTTT GCG CAGCAGAGGCGCAGT TAA GCG CAGCTAGCATGAA TGG CTTTCCGAGGAGTGGCG TGA GCGAGCGCCAGCGAGTTA CCG GGA 118
1 H T P T V L H E F G Q Q R Q I K R G V D E H A F R G H A S A A P R G V A E 37
111 GACGCTT GCG CAGTCCAGGAGCGCGCG GCG CAGCGCCGCTTCTGGT TTAGCT CCGAGGACTCT TCG GCG CCGCAGCGCAGTGCAT CAG CCGTAAACGCGAGCGGCT TCG ATG 328
37 T V D E S E O A R A O S P V A V D S E D S S A P R G K K C I S L H S D O F D 74
221 TCAGCGC GAA GAT TTT CCGTCCAGC CAA AAT TGT CCT CCT CCGCG AAG AAG AAG CAGTCTCCGAGAGG GAT CCGCAGCAGAGCTT GATTT CCG TCCGAGTCTCTCTGAG AAG CCG 326
74 V K R E I F V P A E N E S S E R A H L R K R F R T E L D S V R N L L K K P 110
291 GATTTTG CTG TCCCTGTCCCTGTGAT AAG ACT CCGCGCGCTCTG CTC CTC GACTGCGCC TCGAG GTR AAGAGCGGAGCAGCAGT GAT AAG CAGTGTGCTCGTGGT GCG AAG GGG 448
111 E F A V P V P V R R A P A L S S S A A P R G K K S O R B H H V Y R G A K G 147
441 CCCTTTC TTT CCGTACGCGCCCGAGC TGA GCGTTCGAGC GGT TGT TGA CTO AGCATCGGAT TTT AAG CAGTCC GAT TGT TGT CCG AAGAGCT GAT AACTGCA AAT GTA 328
147 R F L P T K P A P E A S T V L T E D A I F K Q C D A I L K K L N T Q K E 164
551 GTRACAT ATT GAGCTCCCGG TTAGGCTG TTAGGCTG AATATT CCA GAT TAT TTT CAGATCAT CAG GAGAGCCGATGGATCTTG GATCTATCGAGATAGCTT GAC TCT 658
257 H K H P E S R M A T I E K K L R S I A T E R H H V E V D A A D S K K A E T 224
661 GGTTCCT AAG CAGTCCATCTG AATTT GAA GCGATGTAGCGCT GAC CTT TTC AATGCG CAGTAA CTT ACPATCC CCGTGGCAT GTA BTGAT GAT TATAGCAT TGA ACT 778
221 D S V T S P S E F A R A D V A L T F S H A M T V N P R B H V V H D V A I Q L 257
771 AAGAGAG ATG TTT GATTCAGATGCGAG CAG AAT TGAAGAGAGC TGG CTT CAGTTCGCGAGAG GCG CAGCTCCAGGT TACAG GCG TCGTCTAAGAGCAGCGAG AAT CTC 858
257 H K H P E S R M A T I E K K L R S I A T E R H H V E V D A A D S K K A E T 224
881 CCCTGT GAA CTCGAGTGGGTATC AAG CAG GCTGTGAGGCGCA AAG CAG TCTGTTAGAGCGAC AAG CTC TGTAGAGCCAGAA TGA CATTGAGGAGAGAGAA TGA TTT 958
294 P P Y G C S E Y S T E C V R P T E S Y A P T E S Y K P K A T F E E K E S F 328
991 CCGACT GAT TCGCATCTT TGTCTGAG GAT CCGAGCGTACTT GAA GAT CATTGATTT TGTTC AGC AAT CAGTTCAGAGAGC AAG GATGAGCTT GGTGAT TGG AAG GAT 1188
331 G H G L R S L S E D P E Y P S H I I D L L D G C I D H N T D Q L Q D Q E I 367
1181 AAGAGT GAT ATCAGTCTCTGAG TGA TGA CCACTACT AT TCGAT TGA AAGAGCTGTTCAGAG TAT TTCAGAGAGAGAGCGA GAG CCGAGCGCAGAGTCTAG CTT 1218
387 E I D I H A Y S D D L L F E L E E H V D E V L G E R E Q S O Q A K S E P 404
1211 CTGAGAT GA GCGTCTATGATATCTG GCG TTAGCGAGTCTCT GAA AAT CCGTCCAGAG TGG TGA TCGAGT TGAAGAGAGT GAG AAT TTT GCGGATGCA TCG CCT 1328
484 S E N E A A N Y S B L S H S S T A P C K G G O P Y E E D V D I C B N A S P 448
1321 ATATT GAT AAGAA AAGTGA CAGAGCA TCC TAA AATGTGTGT AGCCAGATG TTC CAGCAGTGC TCT GATCTCT TCCAGCG ATTTGAG TCGAGCG TCGAG 1428
441 I L I E D A H R R P N E C G S P S S S S S S D S G S S S S D S E S G S D S 477
1431 TGAAG GAGACAA GAGAGAG TGGTAGCG CAGGAGAG CAGAGAG GAGTAAAGCAT CTGAGC AATCTGATGCA GAGAGAA AAGATGAT GTTATAG TCCAGTGGAGCGA 1548
477 E S E D E K O G S P B K P K O S K A S E Q L V E O E K S D V I S P V D A 514
1541 TCGT CCACTGA TGA TGG TGG AGCTCGT GAGGAGCA TAAAGAGT CAGAGCTCGC CAGAGCG GAGAGAT CAGAGCC CAGAGCG AAGTCTCC CAGAGAG CTCCTA 1658
514 I R P A D D V E L R E Q D N E S K P A P E G G H S K P D A Q V S P D K L L 358
1651 AAGAG CAGCTTC TTAGAGAT CATTATG C TGA TGA TGGTAAAG GAGAGAGCAT TCT CAGCC AGGTOGA CAGAGCA GAGAGAG CCGAGAG CTCAGAA GAGAG 1758
351 R T A P L R S A Y A D V I V K A Q Q I L S D D D D K Q E E L E K L Q K E E 397
1751 GAGAG CAGGCTG TTAGC TGA AGGAGATG CAGCTATG GAGAG TCG AAGAGCTGAG CAGAGCT GAGAGCAG GGTAAAC GAGAGCTT GAGAGGCA GAGAGCTC CCGAG 1878
587 K A R R L L A E G H A R A N E A R A R A E A E R E A K K R D L E R E K A R Q 624
1871 CCGT CAGAGAT GAGAGCA CCGTGA AATCA TGA CAGCTCC ATCTAAGCAT TTAGAGAT CCGTGA AAGCGAGC AAGAGAT TAT TGA GTTCTGTT GATAG 1988
824 R L Q E E E P T Y E I H D H L H L K D L E H L O T A T T E H I V S S V D E 888
1981 ACTAG TCGAGC AATCCAG GATGAGAT GCGCAGTT TCTCTCT GAGTGAAGCA TCCATG GAGAGCT GAGAGCTT CATTAGAG CAGATAG GAGAGAG GAGAG 2098
884 T S P E S B D D O R P S F L P O S O R P L E O L O L F N K A D E E E E E 897
2091 AATGCTAGCTGT CTCGCGAG CACTAAG ATCGAGAG GAGAGAG GATCACTAGT 2146
897 D F S C V P S T K D R E E E E I N Y 716

```

図 1-11 C4×A5-750 の塩基配列および予測されるアミノ酸配列コードしていると予測されるアミノ酸配列は 714 残基。

```

Os SBP              -----MEKGPREKLLVYTCVYNGTGINKPDYLG
A.thaliana SBP     MATETVLATAVSNKSGKCGCKSGPGYATPLAAMAGPREKLYVTALYSGTGRDKPDYLAT
Mouse SBP          -----MATKCTKCGPGYSTPLEAMKGPREEIVYLPCLYRNTGTEAPDYLAT
Mouse ABP          -----MATKCTKCGPGYSTPLEAMKGPREEIVYLPCLYRNTGTEAPDYLAT
Human SBP          -----MATKCGNCGPGYSTPLEAMKGPREEIVYLPCLYRNTGTEAPDYLAT
                    *****
                    :*: :*: :*: :*: :*

Os SBP              VDVPNSPTYSQVHRLPVTHVGDDELHHSWGNACSSCHGDPASARRFLILPSLLSGRVVY
A.thaliana SBP     VDVPSSPTFSSVHRLKMPYIGDELHHTGWNSSCHGDASADRRYLVLPGILSGRIYA
Mouse SBP          VDVPKSPQYSQVHRLPMPYLKDELHHSWNTCSSCFGdstksrnlILPGLISSRIYV
Mouse ABP          VDVPKSPQYSQVHRLPMPYLKDELHHSWNTCSSCFGdstksrnlILPGLMSSRIYV
Human SBP          VDVPKSPQYQCVHRLPMPNLKDELHHSWNTYSSCFGdstksrnlVLPGLISSRIYV
                    *****
                    :*: :*: :*: :*: :*

Os SBP              VDTLKDPRAPALHKVVEAEDI AEKTGLGFPHTSHCLASGEIMISCLGDKEGNAAGNGFLL
A.thaliana         IDTKTDPKAPSLYKVVPEKEIAEKTGLAFPHSHCLASGDMLVSLGDKEGNAKNGFLL
Mouse SBP          VDVGSEPRAPKLHKVIEASEIQAKCNVSSLHTSHCLASGEVMVSTLGDLDQNGKGSFVLL
Mouse ABP          VDVGSEPRAPKLHKVIEASEIQAKCNVSNHTSHCLASGEVMVNTLGDLDQNGKGSFVLL
Human SBP          VDVGSEPGPQKLHKVIEPKDIHAKCELAHLHTSHCLASGEVMISSLGDVKGNGKGSFVLL
                    :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*

Os SBP              LDSEFNVKGRWEKPGHSPFLGYDYWYQPRHKTMISSSWGAPAAFRTGFDLQHVQDGLYGR
A.thaliana SBP     LDSEFNVKSRWDPKPGHPLFGYDFWYQPRFKTMISTSWGAPKAFSKGFNLQHVADGLYGS
Mouse SBP          DGETFEVKGTWEKPGDAAPMGYDFWYQPRHNVMVSTEWAAAPNVFKDGFNPAHVEAGLYGS
Mouse ABP          DGETFEVKGTWEKPGGASPMGYDFWYQPRHNVMVSTEWAAAPNVFKDGFNPAHVEAGLYGS
Human SBP          DGETFEVKGTWERPGGAAPLGYDFWYQPRHNVMI STEWAAAPNVLRDGFNPADVEAGLYGS
                    :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*

Os SBP              HLHVVYDWPGGELKQTLDLGSLPLLEVRFLHDPKSDTGYVGCALTSNMVRFKTKADGSW
A.thaliana SBP     HLHIYQWPEGEMKQIT-YWVFWVMWLQIRFLHDPKSDTGYVGSALSSNMRFFKNSDDTWTW
Mouse SBP          RIFVWDWQRHEI IQTL-QMTDGLIPLEIRFLHDP SATQGFVGCASAPNIQRFYKNAEGTW
Mouse ABP          RIFVWDWQRHEI IQTL-QMTDGLIPLEIRFLHDP SATQGFVGCALSSNIQRFYKNEEGTW
Human SBP          HLYVWDWQRHEI VQTL-SLKDGLIPLEIRFLHNP SATQGFVGCASAPNIQRFYKTREGTW
                    :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*

Os SBP              SHEVAISIKPLKVRNWILPEMPGLITDFVLSLDDRYLYLVNWLHGDIRQYNI EDPAKPVL
A.thaliana SBP     SHEA-----IENWILPEMPGLITDFLISLDDRFFYFVNWLHGDIRQYNI EDPKNPVL
Mouse SBP          SVEKVIQVPSKVKVWMLPGVPLITDILLSLDDRFLYFSNWLHGDIRQYDISNPQKPRL
Mouse ABP          SVEKVIQVPSKVKVWMLPEMPGLITDILLSLDDRFLYFSNWLHGDIRQYDISNPQKPRL
Human SBP          SVEKVIQVPPKVKVWMLPGVPLITDILLSLDDRFLYFSNWLHGLDRQYDISDPQRPRL
                    :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*

Os SBP              AGQVWAGLLQKQSEVYVTEDDKEEQYSVPQVKGHRLRGPQMQLSLDGKRIYVTNSL
A.thaliana SBP     TGQIWVGGLLQKQSPYKAVGEDNTYQFDVPQIKGKSLRAGPQMQLSLDGKRLYATNSL
Mouse SBP          AGQIFLGGSVIRGGSVQVLEDELTCQPEPLVVKGKRIPGGPQMQLSLDGKRLYATTSL
Mouse ABP          TGQIFLGGSVIRGGSVQVLEDELTCQPEPLVVKGKRIPGGPQMQLSLDGKRLYATTSL
Human SBP          TGQLFLGGSVKGGPQVLEDELKSQPEPLVVKGKRIVAGGPQMQLSLDGKRLYITTSL
                    :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*

Os SBP              FSRWDEQFYGQDLVKKGSHMLQIDVDTEKGLSINPNFFVDFGAEPGPSLAHEMRYPGG
A.thaliana SBP     FSAWDRQFY-PEIMEKSHIIQIDVDTDKGGLTLNPFDFVDFGDEPDGPALAHMRYPGG
Mouse SBP          YSAWDRQFY-PDLIREGSMMLQIDVDTVNGGLKLNPNFLVDFGKEPLGALAHMRYPGG
Mouse ABP          YSDWDRQFY-PDLIREGSMMLQIDVDTVNGGLKLNPNFLVDFGKEPLGALAHMRYPGG
Human SBP          YSAWDRQFY-PDLIREGSMMLQIDVDTVNGGLKLNPNFLVDFGKEPLGALAHMRYPGG
                    :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*

Os SBP              DCTSDIWI
A.thaliana SBP     DCTSDIWI
Mouse SBP          DCSSDIWI
Mouse ABP          DCSSDIWI
Human SBP          DCSSDIWI
                    :* :* :* :* :* :*

```

図 1-12 B1×A2-700 とセレンウム結合タンパク (SBP) アセトアミノフェン結合タンパク (ABP) とのアミノ酸配列の比較 全ての生物種で保存されているアミノ酸は*で、類似アミノ酸を:で示した。—は N-糖鎖の付加シグナルを、-はチトクロム C ヘム結合サイトを示す。

SOSUI Result

A Average of hydrophobicity : 0.640961

This amino acid sequence is of a MEMBRANE PROTEIN
which have 8 transmembrane helices.

No.	N terminal	transmembrane region	C terminal	type	length
1	9	QLGTVGALSLSVSSVSIVICNK	31	PRIMARY	23
2	40	NFATTLTSHLLVTFCSLHVALW	62	SECONDARY	23
3	100	GFYQMTKLAIIIPCTVILETLFF	121	SECONDARY	22
4	127	RSIQLSLSVLLFGVGVATVTDLQ	149	SECONDARY	23
5	154	GSVLSSLAIIITTCIAQIMNTIQ	176	SECONDARY	23
6	180	KVSSTQLLYQSCPYSLSLTLFLIG	202	SECONDARY	23
7	226	FIVLSCLISVSNFSTFLVIGKT	248	PRIMARY	23
8	268	GYVLLHDPLSWRNILGILIAVVG	290	PRIMARY	23

B

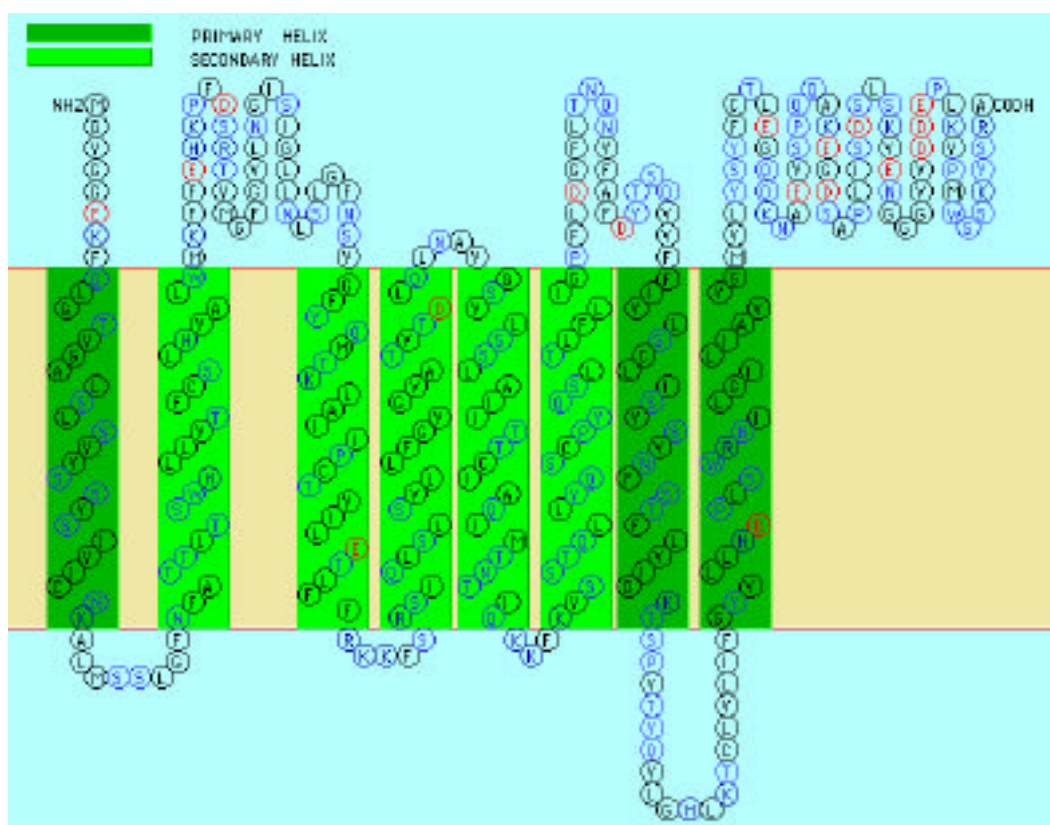


図 1-13 B2 × A5-700 疎水性プロット

膜タンパク質解析ソフト SOSUI システム (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/menu0.html>) を用いた。(A) 膜貫通領域の構成アミノ酸配列、(B) 予測される膜貫通領域の膜面に対するアミノ酸残基の分布

第四節 考察

第一項 単離遺伝子の機能推定

1. B1×A2-700

B1×A2-700 はエリシターを処理して 2-4 時間後から発現応答し (図 1-4) 実際にはイネいもち病菌接種の場合にも非親和性菌接種で 12-24 時間目から、親和性菌接種で 24-48 時間目から応答することがわかった (図 1-8)。親和性菌接種時よりも非親和性菌接種時において速やかに転写が活性化されることから、本遺伝子が何らかの形で病害抵抗性に関わっていることが期待できる。相同性検索では、シロイヌナズナやヒト、マウス、ラットで報告されているセレニウム結合タンパク質をコードする遺伝子 (Bansal et al. 1990、Pumford et al. 1992、Sani et al., 1988) やマウスのアセトアミノフェン結合タンパク質をコードする遺伝子 (Bartolone et al. 1992、Lanfear et al. 1993) と高い相同性を示した。セレニウム結合タンパク質 (SBP) 遺伝子は EST も含めると、これまでに 10 数種の動物、植物、バクテリアから存在が報告されており、広く生物種に保存された重要な機能を有するタンパク質であることが予想される (図 1-12)。SBP はヒトやマウスで最初に報告されたが、肝臓で特異的に発現しセレン元素やアセトアミノフェンに結合するタンパク質として見いだされたことから臨床学的に生体異物であるセレン元素やアセトアミノフェンが大量に蓄積して生じる発癌を抑制する解毒作用に関係する可能性が示唆されたが (Pumford et al. 1992) 分子生物学的な機能解明はまったくなされていない。またウシの SBP がエキソサイトーシスやエンドサイトーシスなどの細胞内小胞輸送を制御している低分子量 G タンパク質 Rab の制御下でゴルジ体内のタンパク質輸送に関与しているとの報告もあり、SBP が複数の生理的役割をもつことが示唆されている (Porat et al., 2000)。一方、植物ではヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) において、アブシジン酸を処理すると SBP が転写活性化することが報告されている (Machuka et al. 1999)。また最近では、マメ科ミヤコグサで根粒菌が根に感染する際に根において特異的に転写が活性化されることが報告され、植物では環境ストレスに対する何らかの役割を担うことが予想される。

2. B2×A5-700

B2×A5-700 はセレブロシドエリシターを処理後 2-4 時間目にはすでに転写が活性化された (図 1-4)。イネいもち病菌を接種した場合には非親和性菌接種時には少なくとも 48 時間目までは転写活性化がみとめられなかったが、親

和性菌接種後 12-24 時間目から応答することがわかった(図 1-8)。イネいもち病菌に対する応答において、親和性菌接種に対して特異的に転写が活性化されることは当該遺伝子の特徴である。植物において、感染特異的遺伝子(PR 遺伝子)に代表される病害抵抗性関連遺伝子は親和性菌接種時の場合、非親和性菌接種時に比べその認識が出来なかったり、あるいは遅延することにより発現応答しなかったり遅延することが知られているが、B2×A5-700 は全く反対の発現応答パターンを示した。また B2×A5-700 は相同性検索からイネの glucose-6-phosphate/ phosphate-translocator (OsGPT) をコードする遺伝子と相同性を示した。一般に GPT はプラスチドにおける生合成系やエネルギー生成への炭素源の輸送に関係しているといわれていること(Kammerer et al. 1998)さらには B2×A5-700 の予測されるアミノ酸配列にマイクロボディターゲットシグナルが認められること(図 1-10)から、B2×A5-700 は色素体への炭素源の輸送を担っている可能性が考えられる。最近になって、Jiang らはイネの未成熟種子の cDNA ライブラリーから OsGPT 遺伝子を単離しており、OsGPT が葉緑体以外の色素体にグルコース 6-リン酸を輸送していることを示唆している(Jiang et al., 2003)。したがって、B2×A5-700 はイネの病害抵抗性メカニズムにおいて直接的な役割というより病原菌の感染に対して未感染の器官の成長を促進させるような二次的な役割を担っていると考えるのが妥当かもしれない。

3. B2×B1-650

B2×B1-650 はセレブロシドエリシター処理後 4-8 時間目には発現応答し(図 1-4) また相同性検索ではイネやシロイヌナズナの putative β -1,3-エンドグルカナーゼをコードする遺伝子と高い相同性を示した(表 1-1、図 1-5)。 β -1,3-グルカナーゼは PR-2 タイプに分類される PR タンパクで、糸状菌の細胞壁構成成分のグルカンを加水分解する酵素タンパクとして知られており、Nishizawa ら(2003)は実際に本遺伝子を過剰発現させたイネを作出しイネいもち病菌に対して抵抗性を示すことを報告している。同様に糸状菌の細胞壁成分のキチンを加水分解する PR タンパクのキチナーゼもセレブロシドエリシターにより誘導されることが明らかになっており(Umemura et al., 2000) 今回のスクリーニングで B2×B1-650 が単離されたことは妥当であるといえる。

4. C4×A5-800

C4×A5-800 はセレブロシドエリシターを処理後 2-4 時間目に発現応答した(図 1-4)。また相同性検索ではシロイヌナズナの T20H2.2 をコードする遺伝子と最も相同性が高かったが(表 1-1、図 1-6) イネやトウモロコシの glycine rich

protein (GRP) と類似した (Lei and Wu, 1991)。C4 × A5-800 の部分塩基配列から推定されるアミノ酸配列の C 末端には Gly-Arg の繰り返しからなる特徴的な配列が存在し、3 箇所 (127-140 残基、165-194 残基、221-241 残基) で大きな繰り返し領域が認められた (図 1-6A)。250 残基中に含まれるグリシンは 47 残基で、全体の 18.8% を占め、アルギニンの含有量も 13.2% とグリシンに次いで多かった (図 1-6B)。これまでに T20H2.2 の機能は明らかになっていないが、GRP は構造タンパク質として一般に維管束組織に局在することが知られており、傷害や病原菌の感染に応答して発現し、木部を再形成し傷跡の修復や病害抵抗に参与するものと考えられている (Didierjean et al. 1992、Keller 1993)。トマトで報告されている GRP にはアルギニンに富むものも存在し、(Gly)₂₋₆-Arg の繰り返し配列をもつ (Showalter et al. 1991)。これは C4 × A5-800 部分アミノ酸配列で認められた Gly-Arg の繰り返し配列と類似しており、C4 × A5-800 遺伝子のコードするタンパク質も GRP の一つとしてイネの防御応答に関わっているのかもしれない。

5. C4 × A5-750

C4 × A5-750 は セレブロシドエリシター処理後 4-8 時間目で発現応答し (図 1-4) 実際にイネいもち病菌接種の場合にも、非親和性菌接種で 8 時間目から、親和性菌接種で 24 時間目から応答することがわかった (図 1-8)。親和性菌接種時よりも非親和性菌接種時において速やかに転写が活性化されることから、本遺伝子は B1 × A2-700 同様、何らかの形で病害抵抗性に関わっていることが期待できるが、決定した配列情報による解析ではイネやシロイヌナズナの kinase-like protein と相同性を示すのみで、その他には特徴的なモチーフ等の情報が得られなかった。今後は過剰発現体や発現抑制体を用いた解析によって病害防御との関連説明が期待される。

第二項 mRNA Differential Display (DD) 法による遺伝子スクリーニング

Differential Display 法 (DD 法) は様々なストレス応答遺伝子のスクリーニング方法の一つとして使用されており、多数のサンプルを同時に比較することができること、必要とする RNA 量が少なく済むこと、稀少転写産物も検出可能なことなどからその有用性が報告されている (紀藤ら 1995、Wilkinson et al. 1995、吉川ら 1996、Zhang et al. 1996、Hermsmeier et al. 1998)。本スクリーニングを開始した当時の研究設備の制約から、本研究では DD 法の改変法で RAP 法 (RNA arbitrarily Differential Display method) と呼ばれる方法を選択した

(Yoshida et al. 1994、築瀬ら 1996)。DD 法では転写産物の逆転写反応の際、オリゴ dT プライマーを用いるので cDNA の 3' 領域が増幅されてくることが多く翻訳領域の情報はあまり得られないのに対し、RAP 法では任意のプライマーで逆転写を行うため cDNA の増幅領域に偏りがなく翻訳情報が得られる確率が高いと考えられる。スクリーニングを開始した 1995 年当初はシロイヌナズナやイネは勿論のこと、大規模な生物のゲノム解析途上であり十分な配列情報が得られない可能性もあることから、RAP 法による解析を選択した。一方で、用いたプライマーの数やアガロースゲル電気泳動による増幅産物の解析等技術的に不十分な面も否めず、セレプロシドエリシターで転写活性化される遺伝子を網羅的にスクリーニングしたとは考えにくい。したがって今後新たに有用遺伝子の網羅的な単離を試みる場合にはより解像度の高いスクリーニング方法の選択が望ましい。

次章では防御応答との関連が示唆されるセレニウム結合タンパク質をコードすると思われる B1 × A2-700 遺伝子 (以後、*Oryza sativa* selenium binding protein homologue をコードする遺伝子として *OsSBP* とする) の形質転換イネを作出し、病害抵抗性との関係を解析する。

第二章 OsSBP の特性および病害抵抗性関連の解析

第一節 緒言

第一章でイネいもち病菌由来のセレブロシドエリシターを処理した際に転写が活性化される遺伝子をスクリーニングした。その一つ、*Oryza sativa* selenium binding protein をコードする遺伝子 (*OsSBP*)はセレブロシドエリシター処理だけでなく、非親和性および親和性イネいもち病菌を接種した場合にも転写の活性化が認められた (Sawada and Iwata, 2002)。SBP は動物において腫瘍形成の抑制や生体異物の解毒に関与するとするいくつかの報告 (Bansal et al., 1990, Bartolone et al., 1992, Pumford et al., 1992, Lanfear et al., 1993) や、植物においてアブシジン酸を処理したヒメツリガネゴケで転写が活性化されること (Machuka et al., 1999)、ミヤコグサの根に形成された根粒において転写産物の特異的な蓄積が認められること (Flemetakis et al., 2002) が報告されており、耐病性、ストレス応答、微生物応答に関与している可能性が考えられる。

本章ではイネにおける *OsSBP* の役割を理解するために、まず分子レベルでの特徴付け、すなわち推定されるアミノ酸配列によるモチーフ解析、ゲノムコピー数の確認、器官特異的発現解析および各種ホルモンおよび薬剤処理による発現解析を行い、次に *OsSBP* 遺伝子を恒常発現した形質転換イネを作成し、イネいもち病菌およびイネ白葉枯病菌の接種による耐病性検定を行い病害抵抗性との関連を調べた。さらに *OsSBP* の病害抵抗性における機能を推定するための解析も行った。

第二節 材料および方法

(1) 植物

品種キンマゼ (*Oryza sativa* L. cv. Kinmaze) を培土に播種し、人工気象室において 30°C、16 h 明 / 24 h 暗、8 h 暗で栽培した。培養細胞はキンマゼ種子を 2,4-D (2 mg/l)、100×KM ビタミン(10 ml/l)、シヨ糖(30 g/l)および寒天 (8 g/l) を含む MS 培地上に置床することで得たカルスを MS 液体培地に移し、30、90 rpm で振とう培養した。

(2) アミノ酸配列の整列

推定される *OsSBP* アミノ酸配列を DDBJ データベースで検索した各種生物

種の SBP ホモログを WWW サーバー上の CLUSTAL W プログラムにより、整理、比較した。

(3) サザン解析

キンマゼ葉から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により抽出したゲノム DNA 5 µg を制限酵素 *Xba* I および *Hind* III で 37 °C、一晩処理後、0.8 % アガロースゲルで電気泳動 (20 mV、14 時間) し、Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech) にプロッティングした。プローブは完全長 *OsSBP* cDNA を使用し、[⁻³²P] dCTP でラベルしたものをを用いた。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション溶液 (0.25 M NaCl、1% BSA、1 mM EDTA pH8.0、0.25 M Church buffer、7% SDS) (Church and Gilbert 1984) を用いて、65 °C で 20 分プレハイブリダイゼーションしたのち、RI でラベルしたプローブをハイブリダイゼーション溶液に加え 65 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを適量の洗浄液 (2 × SSC、0.1% SDS および 1 × SSC、0.1% SDS) で 65 °C、各 15 分間振とうにより洗浄した。メンブレンのシグナルを GM カウンターおよびイメージアナライザー (Fujifilm、BAS2500) で確認し、オートラジオグラフィで検出した。

(4) ノザン解析

イネ各組織を液体窒素の入った乳鉢の中で十分に破碎し、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて回収した。10 µg の全 RNA を 6 % フォルムアルデヒドを含む 1.0% アガロースゲルにより 50 V で 2 時間展開し、Hybond-N⁺ nylon membranes (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。プローブは完全長 *OsSBP* cDNA を使用し、DNA プローブは [⁻³²P] dCTP で、またリボプローブは [⁻³²P] dUTP でラベルした。ハイブリダイゼーション条件はサザンハイブリダイゼーションと同条件で行った。

(5) タンパク質の精製および抗体作製・精製

OsSBP 遺伝子を His タグ融合タンパク質発現用ベクターである pET-32 (a) (Novagen) に導入し、*OsSBP* タンパク質を 1 mM IPTG により大腸菌内で発現誘導させた後、大腸菌を回収し sampling buffer (1 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O、1 mM NaH₂PO₄ · H₂O、50 mM NaCl、10 mM Imidazole (pH7.4)) に懸濁した。超音波処理 (BRANSON) で大腸菌を破碎し、3,000 rpm、15 分間遠心後、上清を回収した。Ni-NTA カラム (QIAGEN) によりタンパク質を精製し回収した各画分を SDS-PAGE で確認後、*OsSBP* タンパク質を含む画分を集めた。抗体は

OsSBP タンパク質 3 mg を用い、ウサギを免疫し全採血により血清を回収し、常法に従って精製した (QIAGEN)。

(6) ウェスタン解析

タンパク質の抽出は葉を SDS 緩衝液中で破砕したものを 80 °C で 5 分間加熱後、15,000 rpm、4 °C、3 分間遠心した上清を回収した。7.5%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレン (ATTO) に転写後、ECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech) により検出した。

(7) 各種ホルモンおよび薬剤処理

各種ホルモンおよび薬剤の処理は Lee ら (2001) および Mitter and Zilinskas (1992) の方法に従った。播種後 2 週間目のイネ実生に対し、それぞれ 0.1 mM ジャスモン酸 (JA) (Wako)、1.5 mM サリチル酸 (SA) (Wako)、0.1 mM アブシジン酸 (ABA) (Wako) および 1 μM パラコートになるよう調整した 0.1 % Tween 20 水溶液を噴霧処理し、0、3、6、9、24、48、72 時間目にサンプリングした。

(8) OsSBP cDNA 発現ベクターの構築

OsSBP 遺伝子を恒常発現させたイネを作製するためのベクターを構築した。カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターをもつイネ発現ベクター pMSH2 を制限酵素で切断後、Bacterial alkaline phosphatase (Takara) 処理を行ない、5' 末端を脱リン酸化したのち、目的の cDNA 断片を DNA Ligation Kit (Takara) でつなぎ、完全長 cDNA を含む発現ベクターを構築した。

(9) 宿主植物の OsSBP cDNA 発現ベクターによる形質転換

宿主植物にはイネ品種キンマゼ (*Oryza sativa* cv. Kinmaze) を用いた。(8) で構築したベクターをアグロバクテリウム法 (Hiei et al., 1984) によりキンマゼカルスに導入し形質転換植物体を作製した。アグロバクテリウム EHA101 株の凍結けん濁液 40 μl を氷上で融解した後、1-2 μl の各発現ベクター溶液 (10 ng/μl) を加え軽く混和して 5 分間氷上静置した。これを 0.2 cm のキューベットに移し、2.5 kV、25 μFD、200 Ω の条件に設定したジーンパルサーコンプリートエレクトロポレーションシステム (BIORAD) にてアグロバクテリウムにベクターを導入した。これに 1 ml の LB 液体培地 (0.5% YEAST EXTRACT、1% BACTO PEPTONE、0.5% NaCl、pH7.2) を加え、28 °C、205 rpm で 1 時間振とう培養後、50 μg/ml カナマイシン、50 μg/ml ハイグロマイシンを含む LB ブ

レートに 150 μ l 塗布し、28℃ で一晩形質転換体アグロバクテリウムを培養した。これら各形質転換体アグロバクテリウムを O.D 600=0.2 となるよう 10 mg/l アセトシリンゴンを含む MS2D 液体培地に懸濁した。MS2D 培地で 30℃、3 週間およびナースセル存在下で 30℃、3 日間培養したキンマゼカルスを上記けん濁液に 3 分間浸漬後、10 mg/l アセトシリンゴンを含む MS2D 培地に置床、22℃、暗黒下で 3 日間培養した。500 mg/l クラフォランを含む滅菌水にて除去後、500 mg/l クラフォラン、50 mg/l ハイグロマイシンを含む MS2D 培地に置床、30℃、明所で 4 週間培養した。選抜カルスは 50 mg/l ハイグロマイシンを含む R2R 培地に移し、30℃、明所で 4 週間培養後、インドール酢酸、トランスゼアチンを含む R2R 培地に移し、30℃ 明所で再分化するまで培養した。

(10) イネいもち病に対する抵抗性検定

イネいもち病菌は、キンマゼに対して親和性であるレース 007 (MAFF305471) および非親和性レース 031 (MAFF305494) を用いた。イネいもち病菌は常法によりオートミール培地 (30 g/l オートミール、5 g/l ショ糖、16 g/l アガー) 上に植え、22℃ で 7-10 日間培養し、菌糸が培地上に十分に広がった後、菌糸を掻き取り、さらに青色光ランプで 3 日間培養することで分生胞子の形成を誘導した。接種はパンチ接種法 (Kawasaki et al., 1999) および噴霧接種法を用いた。パンチ接種はパンチ穴の径を 2.0 mm に調整した移植パンチ (Fujiwara Co.) で完全展開葉の中間部 2 箇所を傷を付け、分生胞子を形成した培地表面約 2 mm 角を傷面に付着させ、セロハンテープにより固定・保湿した。接種後 7 日目および 14 日目に病斑の伸展を観察した。また噴霧接種はイネいもち病菌を 2×10^6 分生胞子/ml となるように 0.05% Tween 20 水溶液で調整し、イネに噴霧した。接種後のイネは 24℃、24 時間、暗所にて静置後、通常の栽培条件に戻した。

(11) イネ白葉枯病に対する抵抗性検定

Kauffman ら (1973) の方法に従い、 1×10^8 cfu/ml に調整した親和性レース I(R) (リファンピシン耐性) の細胞懸濁液に浸したハサミでイネ葉の先端約 2 cm を切断し、イネ白葉枯病菌を接種した。白葉枯病菌は固体培地 (10 g/l ショ糖、17 g/l 寒天、10 g/l ペプトン、1 g/l sodium glutamate) 上に植え、30℃ で 2-3 日間培養したものをを用いた。接種 14 日後にイネ白葉枯病菌の感染によって形成された病斑長を測定した。また同様の方法で接種したイネを Yoshimura ら (1998) の方法に従い、イネ白葉枯病菌 I(R) を接種した 9 日目の葉を細かく粉碎し滅菌水に懸濁したものをリファンピシン入り白葉枯病菌用培地に塗布し、

30 で3日間培養後、コロニー数を計測した。

(12) 防御遺伝子の発現解析

形質転換体における防御遺伝子の発現解析は、ノザン解析により行った。プローブにはイネにおいて抵抗性誘導時に転写が活性化されることが報告されている Probenazole-inducible gene (*PBZI*)および Pathogenesis-related protein 1 gene (*PR1*)を用いた。*PBZI* は Midoh and Iwata (1996)の配列を、*PR1* はアクセッション No. U89895 で登録されているイネ *PR1* の配列をもとに下記の PCR プライマーを作成した (Invitrogen)。

PR-1 プライマー配列：

5'-ATGGAGGTATCCAAGCTGGC-3'/5'-TTAGTAAGGCCTCTGTCCGA-3'

PBZI プライマー配列：

5'-CAGTGGTCAGTAGAGTGATC-3'/5'-CTGGATAGAGGCAGTATTCC-3'

キンマゼゲノムより PCR 反応により増幅し塩基配列を確認後、プローブとして用いた。ノザンハイブリダイゼーションは(4)ノザン解析に準じて行った。

(13) ファイトアレキシンの定量

ファイトアレキシンの定量は、茨城大学農学部児玉研究室にてモミラクトン A の蓄積を測定した。モミラクトン A の抽出は、100 mg のサンプル葉に対し 3.5 ml の 70% メタノールにて熱抽出後、5 ml の飽和食塩水を加え水層とした。得られた水層を酢酸エチルで3回抽出し、酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。これを 1.5 ml のヘキサンに溶解し、シリカゲルカートリッジ (Waters・Sep-Pak Light Silica cartridge) へ注入し、3.5 ml の溶出溶媒 (ヘキサン：酢酸エチル= 2:1) の溶媒系で溶出した。この溶出画分を乾固し 1 ml のメタノールに溶解し、モミラクトン A の分析に供した。分析は以下の条件で高速液体クロマトグラフィーを行い、同定は LC / MS / MS のデータおよび保持時間によった。高速液体クロマトグラフィー：SERIES 1100 (Hewlett Packard)、カラム：Inertsil ODS-2 (GL science)、溶出溶媒：0.1%ギ酸を含む 75% アセトニトリル、流速：0.5 ml/ min、質量分析計：API 300 (PESCIEX)、MS-MS を用いた Atmospheric Pressure Ionization モードにて使用した。State files の設定は[Negative Mode]：NEB=11, CUR=9, CAD=3 IS=-3800, TEM=425, OR=-25, RNG=-375, QO=10, IQ1=11 ST=15, RO1=12, IQ2=40, RO2=30, IQ3=60, RO3=43, DF=100, CHM=1900. Quad 1: 10 (0.05), 100 (0.11), 1000 (0.473), 10000 (0.875).

Quad 2: 10 (0.006), 100 (0.040), 1000 (0.060), 10000 (0.080) とした。

(14) 過酸化水素の測定

キンマゼ野生型および *OsSBP* 形質転換イネの種子から得たカルスを 20 ml の R2S 液体培地 (Ohira et al. 1973) で 30 日、継代培養した。培地中の過酸化水素濃度は Takahashi ら (1999) の方法に従って測定した。0.4 g の培養細胞を R2S 培地中で 30 日、2 時間振とうし、フォスファターゼ阻害剤であるカリクリン A (Wako) を終濃度 1 μ M となるよう培地中に添加した。培養液 100 μ l を 1 ml の xylenol orange buffer (0.25 mM FeSO_4 、0.25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、25 mM H_2SO_4 、12.5 μ M xylenol orange、10 mM sorbitol) に加え、560 nm の波長を測定した。NADPH オキシダーゼの阻害剤である DPI (SIGMA) は終濃度が 20 μ M になるようカリクリン A 添加の 30 分前に培地中に加えた。

(15) 抗酸化酵素活性の測定

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の測定は Miyagawa ら (2000) の方法に従った。キンマゼ野生型および *OsSBP* 形質転換体の培養細胞約 0.4 g を液体窒素で冷却した乳鉢でよく摩砕し、さらに 5 mM アスコルビン酸 (AsA)、20% ソルビトールを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 2 ml を加え粉状になるまですりつぶした。氷上で融解し、この破碎液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し遠心分離 (15,000 rpm, 4 分間、10 分間) 後、得られた上清を粗酵素液とした。この粗酵素液 10-20 μ l を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)、0.1 mM 過酸化水素、0.4 mM AsA を含む総量 1 ml の反応系で 37 $^{\circ}$ C、1 分間における AsA の減少を 290 nm の吸光度変化で測定した。酵素反応は過酸化水素の添加で開始した。AsA のモル吸光係数は $290=2.8 \text{ mM/cm}$ とした。カタラーゼ活性の測定は、培養細胞約 0.4 g を液体窒素で冷却した乳鉢でよく摩砕し、さらに 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 2 ml を加え粉状になるまですりつぶした。氷上で融解し、この破碎液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し遠心分離 (15,000 rpm, 4 分間、10 分間) 後、得られた上清を粗酵素液とした。この粗酵素液 10-20 μ l を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)、10 mM 過酸化水素を含む総量 1 ml の反応系で 25 $^{\circ}$ C、1 分間における過酸化水素の減少を 240 nm の吸光度変化で測定した。酵素反応は過酸化水素の添加で開始し、過酸化水素のモル吸光係数は $240=0.0394 \text{ mM/cm}$ とした。

(16) 抗酸化酵素遺伝子の発現解析

形質転換体における抗酸化酵素遺伝子の発現解析は、ノザン解析により行っ

た。カタラーゼ遺伝子の発現解析は、タバコにおいて糸状菌エリシター処理およびタバコモザイクウイルス接種により転写が抑制されるクラス I タイプのカタラーゼ *Cat 1* 遺伝子 (Dorey et al., 1998) と相同性の最も高いイネカタラーゼ *CatB* 遺伝子 (Chen et al., 1997) をプローブに選び、アクセッション No. D26484 で登録されている配列をもとに下記の PCR プライマーを作成した (Invitrogen)。

CatB プライマー配列：

5'-GCAGTGTGATGCGTCCCTTG-3' / 5'-AGCACCCACTGTATCAGTCT-3'

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) 遺伝子の発現解析は、細胞質型 APX 遺伝子をプローブに選び、アクセッション No. D45423 で登録されている配列をもとに下記の PCR プライマーを作成した (Invitrogen)。

APX プライマー配列：

5'-ATGGCTAAGAACTACCCCGT-3' / 5'-TGATCACTCAAGCCCATCTG-3'

キンマゼゲノムより PCR 反応により増幅し塩基配列を確認後、プローブとして用いた。ノザンハイブリダイゼーションは (4) ノザン解析に準じて行った。

第三節 結果

第一項 OsSBP 遺伝子のゲノム解析

OsSBP をこれまで報告されている他の生物種の SBP とアミノ酸配列を比較すると、植物だけでなくバクテリア、線虫、ショウジョウバエ、ラット、マウス、ヒトに至るまで全長にわたり非常に相同性の高いことがわかった (図 2-1)。さらにバクテリアを除く他の生物種に共通して、cys-x-x-cys で表されるレドックス活性中心が保存されていることがわかった。また his-x-x-his や his-x-asp で表される金属結合ドメインも保存されていることがわかった。また WWW サーバー上のプログラム PSORT による検索の結果、細胞内局在に關与するシグナルペプチドは認められなかった。OsSBP 全長 cDNA をプローブに用いて 4 種類の制限酵素によるサザン解析を行った結果、イネ品種キンマゼにおいてシングルコピーであることが予想された (図 2-2)。また RiceBLAST による検索では第一染色体に位置することがわかった。

第二項 OsSBP 遺伝子の発現解析

<i>O. sativa</i>	-----MAAANGAACCGGATGPGYATPLEAMEKGPREKLLVYVCTGVNGTINKPDLGTVDPVNSPTYSQVIRHLPVTHVDELHHSWNA-----HGDPSPAS-----RRFLILP	80
<i>M. sativa</i>	--MGTVLQHAVVSEKVNQCGCKSGPGYASPLEA.S.....T.I.I.A.A.....E.....A.L.....K.....PY.....T.....S.....Q.....V.....	112
<i>L. japonica</i>	--MATVLDHGVVNEKKSVN-GCKSGPGYASPIES.S.....S.I.I.A.A.....E.....A.....S.....K.....PY.....T.....S.....E.....A.....	111
<i>G. max</i>	-----VMNQRNIMHDCPKTGGPGYSPPLAA.S.....K.T.....AI.S.....RD...F.A.....S.....K.....PYL.....F.....S.....Y.....V.....Y.....	102
<i>A. thaliana</i>	MATETEVPAPVTVSNGSGKCGCKYGGPYATPLAA.S.....S.I.I.A.A.....T.....D.....A.....S.....S.....S.....MPF.....S.....A.VD.....Y.V.....	114
<i>R. norvegicus</i>	-----MATKTKCGPGYATPLEA.K.....EIV.LP.I.RN.TEA.....A.....K.....H.....MP.LK.....T.....F.....STK.....DK.....	97
<i>M. musculus</i>	-----MATKTKCGPGYATPLEA.K.....EIV.LP.I.RN.TEA.....A.....K.....Q.....MPYLK.....T.....F.....STK.....NK.....	97
<i>H. sapiens</i>	-----MATKCGNCGPGYSTPLEA.K.....EIV.LP.I.RN.TEA.....A.....K.....Q.C.....MPNLK.....T.....F.....STK.....TK.V.....	97
<i>D. melanogaster</i>	-----RS.....TVT.QPNLDEPHG.....S.....E.....C.IV..TFTNRK.....YYVDES.KTVPK.DR.V.....	85
<i>C. elegans</i>	-----MSPNGLKCHGGPGYASPADAIK.....EV.F.....APNAAD.....AIF.....N.E.D.FC.....S.VD.P.I.....V.T.....DK.TEK.....SH.V.....	97
<i>S. tokodaii</i>	-----MAIVPFKRDPFTFYSPSKMA.K.A.P.D.A.A.L.T.....RA.FIADV.N.K.E.....KIV.KVELPYIN.....F.....ALCPNGKP--NIE.....V.....	101
<i>P. aerophilum</i>	-----MAKLPDPTFYPTPRDA.R.A.P.DIA.AAL.V.....V.A..F.AV.....K.....GK..YK.DLPYI.....F.....AYCPNAKP--FLE..Y.V.....	99
<i>O. sativa</i>	SLLSGRVVVDLTKDPRAPALHKVVEAEDI AEKTLGFPHTSHCLASGEIMI SCLGDKEGNAAGNGLLLDSEFNVKGRIEKPGLFYGDDYVYQPRHKTIMSSWGAPAFRTGFDLQ	200
<i>M. sativa</i>	GIV.....I.I.KTN.....S.....P.....ST.....AY.....L.....D.....E.....F.....N.....T.....K.LQ.....N.....	232
<i>L. japonica</i>	.V.I.I.I.KTN..S.S.....DPA..IQ.....AY.....L.....D.....E.....D.....F.....N.....T.....TK.....	231
<i>G. max</i>	.V.I.I.RSN..S.S.....P.....IS.....AYA.....DV.....F.....D.....S.....H.....L.....S.....F.....Q.....STK..N.....	222
<i>A. thaliana</i>	.I.I.I.AI..KEN..S.Y.Y.DPKE..D.....A.....A.....T.....LV.....E.....K.....D.....I.N.....Y.....F.....T.....K.SK..N.....	234
<i>R. norvegicus</i>	.I.I.S.I.....VGSE.....K.....I.PNE.HA.CN..NL.....V.....S.....PQ..GK.GFV..DGET.E.....T.....GEAPM.....F.....NI.V.TE.A..NV.KD..NPA	217
<i>M. musculus</i>	G.I.S.I.....VGSE.....K.....I..SE.OA.CNVSSL.....V.V.T.....LQ..GK.SFV..DGET.E.....T.....DAAPM.....F.....NV.V.TE.A..NV.KD..NPA	217
<i>H. sapiens</i>	.I.S.I.....VGSE.....K.....I.PK..HA.CE.A.L.....V.....S.....VK..GK.GFV..DGET.E.....T.....R..GAAPL.....F.....NV..TE.A..NVL.D..NPA	217
<i>D. melanogaster</i>	.N.DF.I.L.VVT..K.EIV.TIDG..VLKSHNVTA..T.....N.N.....VM..A.Y.K..D.I.F..D.CI.T.T.GOKKA.C.....F.....YFDV.V.E.....NKW.R.WKNV	205
<i>C. elegans</i>	C.N.D.I.I.II.VENERK--IYLEHTI EPSKLSHLN.S.....D.N.....T.....EAN.TPS..FL..DGKT.EP..T.PADEKTV.P.N.F.....RNW..TE.S.NHIKK..NPA	217
<i>S. tokodaii</i>	G.R.S.I.I.II.KPN..E.KII..I.P.EVKKVS.YSRL..V..GPDAYI.SALGNEEG.EGP.GILM.DHYS.EPL.K..IDRQDQYLA..F.WNLNPELV..E.AV.NTIED.LK.E	221
<i>P. aerophilum</i>	A.R.S.I.I.II.KP.K.R..VA.I..P.VAVGR..YTKY..V..GPDAYI.SALG.PDREGP.GI..DHD.T.EPI...VYRGPQY.A..F.WNLPSGV..T.E.TV.RC.EE..S.E	219
<i>O. sativa</i>	HVQDG-LYGRHLHYVDIPGELKQTLDLGSGT-LLPLEVRFLHDPKDTGYVGCALT---SNMVRFFKTADGWSHVEVAISIKP-----LKVNRWII LPEMPGLI LDFVILSDDRYLYL	308
<i>M. sativa</i>	.A.....S.....I.....DK.....I.....A.....F.....S.....I.....Q.....N.....IV..VE.....Q.....F.....F.....	340
<i>L. japonica</i>	.A.....TCIQLAR...R.....N.....I.....A.....F.....S.....S.....I.....Q.....L.....PV.....Q.....L.....F.....F.....	339
<i>G. max</i>	.S.....TCIQLAW...R.....ES..V.....F.....S.....LRPR.E.....V.....Q.....L.....F.....F.....	330
<i>A. thaliana</i>	.A.....S.....I.....LI..P.....I.....F.....S.....I.....NS.ET.....V.....V.....E.....L.....F.....F.....	342
<i>R. norvegicus</i>	.EA.....S.I..W..QRH.II..QMKDG--I.I.I.....DATQ.F.....S.....IQ..Y.NEG.T..V.KV.QVPS----K.KG.M.....ILL.....F.F.....	324
<i>M. musculus</i>	.EA.....SRIF.W..QRH.II..QMTDG--I.I.I.....ATQ.F.....S.....IQ..Y.N.E.T..V.KV.QVPS----K.KG.M.....ILL.....F.F.....	324
<i>H. sapiens</i>	D.EA.....S.Y..W..QRH.IV..S.KDG--I.I.I.....N.DAAQ.F.....S.....TIQ..Y.NEG.T..V.KV.QVP----K.KG.L.....ILL.....F.F.....	324
<i>D. melanogaster</i>	DLE.MSQ..CR.NF.K.STOT.Y..I..D..IT..I.....N.K.AE.F.....N---AKVPH.K.KS.SDEFEAKKVIDI.G--KLVDTGSGVAED.G.M.S.II.....F.V.....	317
<i>C. elegans</i>	.GE.....NSV.IFE.DSKKYL..I..POPLGA.....E.TSEHAF.....G---GIF.IHPVEEN.TT.AATLVAFIP--S.K.VSG.A.....A.....IL..M..F..V.....	328
<i>S. tokodaii</i>	.LK.--R..NR.I.FW.LRKRRIHS.T..EEN.RMA..L.P.....T.LM.FINIMVSLKDL.SSIWLWFYE..K.NA.KV.E.PAEPLEGN.PEILKPKFAV.P.V..ID.....KF...	338
<i>P. aerophilum</i>	CLKE..A..NK..W.LAKRRHLAYI...QEH.RMV..V.P.....T.LM.F.NVV.NTKDL.SSIWLWFYE..K.QA.RV.D.EAQPFEGP.PPVLDKPKM.V.P.V..ID.....F.V.....	337
<i>O. sativa</i>	VNWLHGD I RQYNI EDPAKPVLAGOVWAGLLQKGE-VVVYTEDDKEEQYSPVQKGRHLRGGPQMIQLSLDGKRIYVTNSLFSRWIDEQFYGDVLKKGSHMLQIDVTEKGGLSIINPNF	427
<i>M. sativa</i>VKN.K.T.....I.....P..A.KD.GETW.SD..EIQ.KK.....L.....A.....K.....PK..EQ..I.....N.....K.....	458
<i>L. japonica</i>LKN..T..L.V..I.....P..AAIG..G.TW.SD..EIQ.QK.....T.....L.....A.....K.....PG..E.....I.....K.....	457
<i>G. max</i>KN..T..V.DYF..P-I.AI..GNTW.SD..DIO.NK.SA.....V.....A.....K.....PE..E.....N.....K.....	448
<i>A. thaliana</i>KN..T..I.V.....P..KA.G..GNTF.FE.....I..KS.....L.A.....A.....R.....PEIME.....I.....T.....D.....	460
<i>R. norvegicus</i>	S.....D.SN.K..R.T..IFL..SIV..GS..QVLEDEQELC.PEPLV..K.VP.....L.....T..Y.A..K.....PN.IRE..V.....AN.....KL.....	442
<i>M. musculus</i>	S.....D.SN.Q..R.....IFL..SIVR.GS..QVLEDEQELC.PEPLV..K.IP.....L.A.T..Y.A..K.....P..IRE..M.....VN.....KL.....	442
<i>H. sapiens</i>	S.....L..D.S..QR.R.T..LFL..SIV..GP..QVLEDEELKS.PEPLV..K.VA.....L.I.T..Y.A..K.....P..IRE..V..V.....V.....KL.....	442
<i>D. melanogaster</i>	NC.R..V..D.T..EN.K.R.T..LFL..AICSDLPN.IVKEDKELK.RPPARY..R.E.....L.....SS..Y.P..K.....PKM.SQ.G.IVL..VN..I.L.ED.	436
<i>C. elegans</i>	SC.....D.S..L.VK.NS..YI..SVHTE.N---KVLEG.KPIEALY..RKIE.....L.....T..YK..D..PEH..S.AT.V.VNI.P.S.KME..RD.	443
<i>S. tokodaii</i>	SL.GI.EV..D.SN.F..T.K.KL..IFHRADH-----PA..K.T.A..LEI.R..R.V.....Y.T..N..PEG.KGMVKNLANPS-----E.DKE.	436
<i>P. aerophilum</i>	SL.GL.EL..D.TN.HQ.R..R.KI..YHREPH-----PS.AEAT.A.....SV.R..R.V.I.....Y.S.NN..PG..RGMVKNVNPNE-----ELEKE.	434
<i>O. sativa</i>	FVDFGAEPGSPSLAHEMRYPGGDCTSDIWI ---- 457	
<i>M. sativa</i>D..... 488	
<i>L. japonica</i>D..A..... 487	
<i>G. max</i>G..A..... 478	
<i>A. thaliana</i>D..D..... 489	
<i>R. norvegicus</i>	L.....K..L..A.....L.....S..... 472	
<i>M. musculus</i>	L.....K..L..A.....L.....S..... 472	
<i>H. sapiens</i>	L.....K..L..A.....L.....S..... 472	
<i>D. melanogaster</i>	L.....AN..Y.....P.....LANDA 470	
<i>C. elegans</i>	LI.....KIEG..Y..... 473	
<i>S. tokodaii</i>EARS.QVRLS..AS..SYCYP-- 463	
<i>P. aerophilum</i>RAR..QVRLW..AST.SFCYP-- 461	

図 2-1 OsSBP と他生物種の SBP とのアミノ酸配列の比較

赤の囲みはレドックス活性中心と推定される領域を、青の囲みは金属結合ドメインと推定される領域を示す。

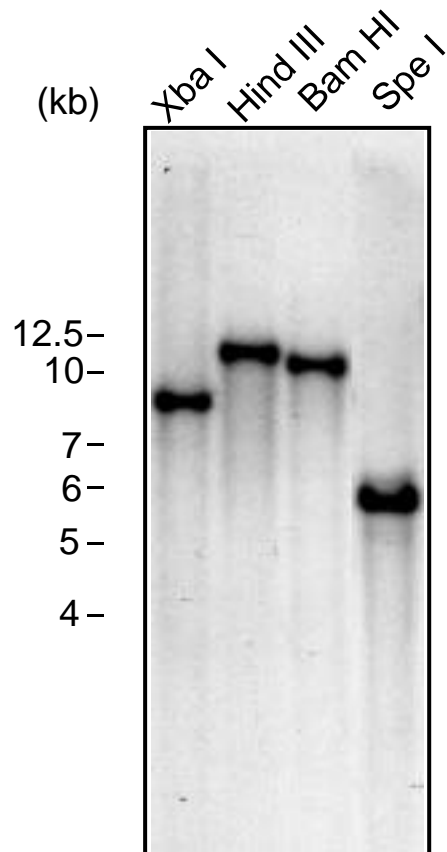


図 2-2 *OsSBP* のゲノムサザン解析

キンマゼ葉からゲノム DNA を回収し、各制限酵素で処理し *OsSBP* cDNA の全長配列をプローブに用いた。

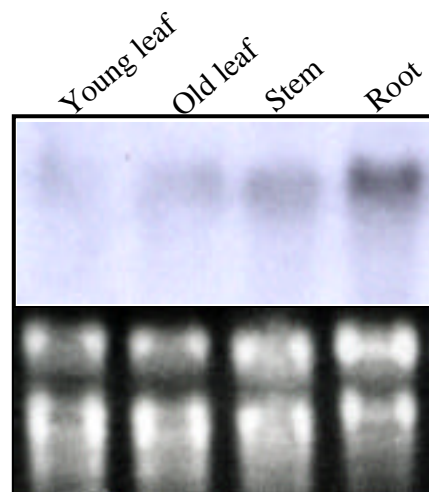


図 2-3 *OsSBP* の器官特異的発現

キンマゼ各器官より全 RNA を回収し、*OsSBP* の発現量を調べた。
 Young leaf ; 播種後 2 週間目の葉、Old leaf ; 播種後 3 ヶ月目の葉、
 Stem ; 播種後 2 週間目の茎、Root ; 播種後 2 週間目の根を示す。
OsSBP cDNA 全長配列をプローブに用いた。

これまで動物や植物において、*SBP* は器官特異的に発現していることが報告されている。そこで *OsSBP* のイネにおける根、茎、葉における器官特異的な発現を調べるため、ノザン解析を行った。材料として播種後2週間目の葉、茎、根および播種後3ヶ月目の葉を用いた。その結果、*OsSBP* は根において強く発現していることがわかり、茎でわずかな発現を認め、葉では殆ど発現が認められなかった(図2-3)。

次に *OsSBP* の植物の病害抵抗性シグナル伝達物質に対する応答の有無を確認するため、JA および SA 処理時の発現様式を経時的に調べた。その結果、*OsSBP* は JA 処理後、少なくとも3時間目から発現を示し、9時間目には一時的に発現量が低下したが、再び24時間目でピークを示し、72時間目でほぼ転写物が消失することがわかった(図2-4A)。SA を処理した場合も、JA 処理時とほぼ同様の経時変化をたどり処理後3時間目から72時間目まで転写が活性化されることがわかった(図2-4B)。続いて Machuka ら(1999) がヒメツリガネゴケに植物に酸化ストレスを誘発する ABA を処理した際に *SBP* が転写活性化されると報告していることから、イネにおける *OsSBP* の ABA に対する応答を調べた。その結果、*OsSBP* はヒメツリガネゴケ同様に ABA 処理により転写が活性化され、処理後6時間目から9時間目にかけて発現することがわかった(図2-4C)。そこで ABA 同様に酸化ストレスを誘発する除草剤のパラコートに対する発現応答の有無も調べた。その結果、*OsSBP* はパラコート処理後3時間目から転写が活性化され、観察した72時間目まで継続して発現することがわかった(図2-4D)。

第三項 *OsSBP* の病害抵抗性への関与

(1) 形質転換体の作製

OsSBP の病害抵抗性への関与を調べるため、図2-5A, B に示した発現ベクターを野生型であるキンマゼに導入し、恒常的に *OsSBP* をセンスおよびアンチセンスに発現させたセンス導入体、およびアンチセンス導入体を作製した。センス導入体は植物体に再生したものが9系統(SBP-S1, S2, S3, S4, S5, S6, S8, S15, S16)、 T_1 種子由来の培養細胞が3系統(SBP-S1C, S3C, S15C)得られた。アンチセンス導入体は植物体に再生したものが4系統(SBP-A1, A3, A9, A10)および T_1 種子由来の培養細胞が2系統(SBP-A3C, A10C)得られた。植物体に再生した形質転換体からゲノム DNA を抽出しゲノムサザン解析を行った。制限酵素 *Xba* I 処理で内在性 *OsSBP* 遺伝子に相当すると思われるバンド(約10 kb)

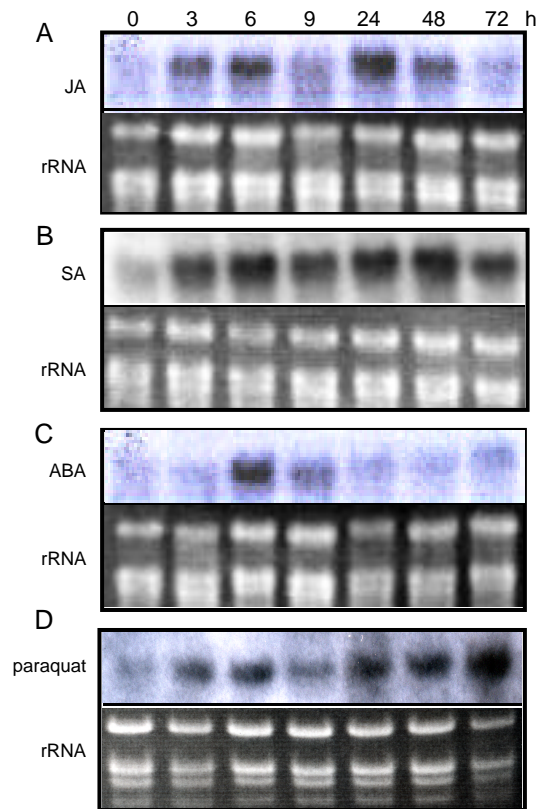


図 2-4 *OsSBP* の各種ホルモン、薬剤に対する発現応答
 キンマゼに (A) ジヤスモン酸 (0.1 mM) (B) サリチル酸 (1.5 mM) (C)
 アブシジン酸 (0.1 mM) (D) パラコート (1 μ M) を処理後、各時間の葉か
 らトータル RNA を回収し *OsSBP* の発現量を調べた。*OsSBP* cDNA 全長配列
 をプローブに用いた。

に加え、予想される導入 *OsSBP* 断片約 2.0 kb のバンドが全ての系統において確認された(図 2-5C)。また *Hind* III による切断で得られたバンドパターンか

ら、各系統における導入コピー数は 1—4 コピー程度であることが予想された (data not shown)。これらの形質転換体から全 RNA を回収し *OsSBP* の転写量を調べたところ、センス導入体は植物体で 4 系統 (SBP-S1, S5, S15, S16)、培養細胞で 2 系統 (SBP-S1C, S15C) が野生型に比べ多量の mRNA が蓄積していることがわかった(図 2-6A)。またセンス導入体の植物体 5 系統 (SBP-S2, S3, S4, S6, S8) および培養細胞 1 系統 (SBP-S3C) は野生型とほぼ同等あるいはそれ以下の mRNA しか蓄積していないことがわかった。一方、アンチセンス導入体では植物体および培養細胞のいずれの系統も野生型に比べ有意に発現が抑制されていることを確認した(図 2-6B)。以上のことから、過剰発現体として SBP-S1 および S15 を、発現抑制体として SBP-A3 および SBP-A10 を以降の耐病性検定に用いることとした。これら形質転換体について *OsSBP* のタンパク質量をウエスタン解析により調べた結果、過剰発現体では野生型より有意に翻訳量の増大が認められ、逆に発現抑制体では野生型より翻訳量が抑制されていることを確認した(図 2-6E)。また全ての形質転換体の生育は実験に用いた栽培条件において野生型と違いは見られなかった (data not shown)。

(2) イネいもち病に対する耐病性検定

過剰発現体 2 系統 (SBP-S1, SBP-S15) および発現抑制体 2 系統 (SBP-A3, SBP-A10) について、イネいもち病菌親和性レース 007 を接種し、*OsSBP* が抵抗性に関与しているか検討した。形質転換体当代を用い、1 系統あたり 4 個体ずつ計 6 回の独立した接種実験を行った。その結果、野生型キンマゼで著しい病斑の形成を認めたのに対し、過剰発現体の 2 系統はいずれも野生型に比べ病斑の進展が抑制される傾向にあり、いわゆる止まり型の病斑を示した(図 2-7A)。一方、発現抑制体の 2 系統は野生型に比べわずかに罹病の程度が大きいことがわかり、病斑の形状も進展型を示す傾向にあった(図 2-7A)。接種後 14 日目の各系統の病斑径を測定したところ、SBP-S1 と SBP-S15 の病斑長は野生型のほぼ半分程度であることがわかった(図 2-7B)。またこの表現型が後代にも維持されているか調べるため、T1 世代の SBP-S1 と SBP-S15 においても親和性レースをパンチ接種したところ、いずれの系統も野生型に比べ病斑形成を抑制する傾向を示し、後代でも抵抗性を確認した(図 2-7C)。

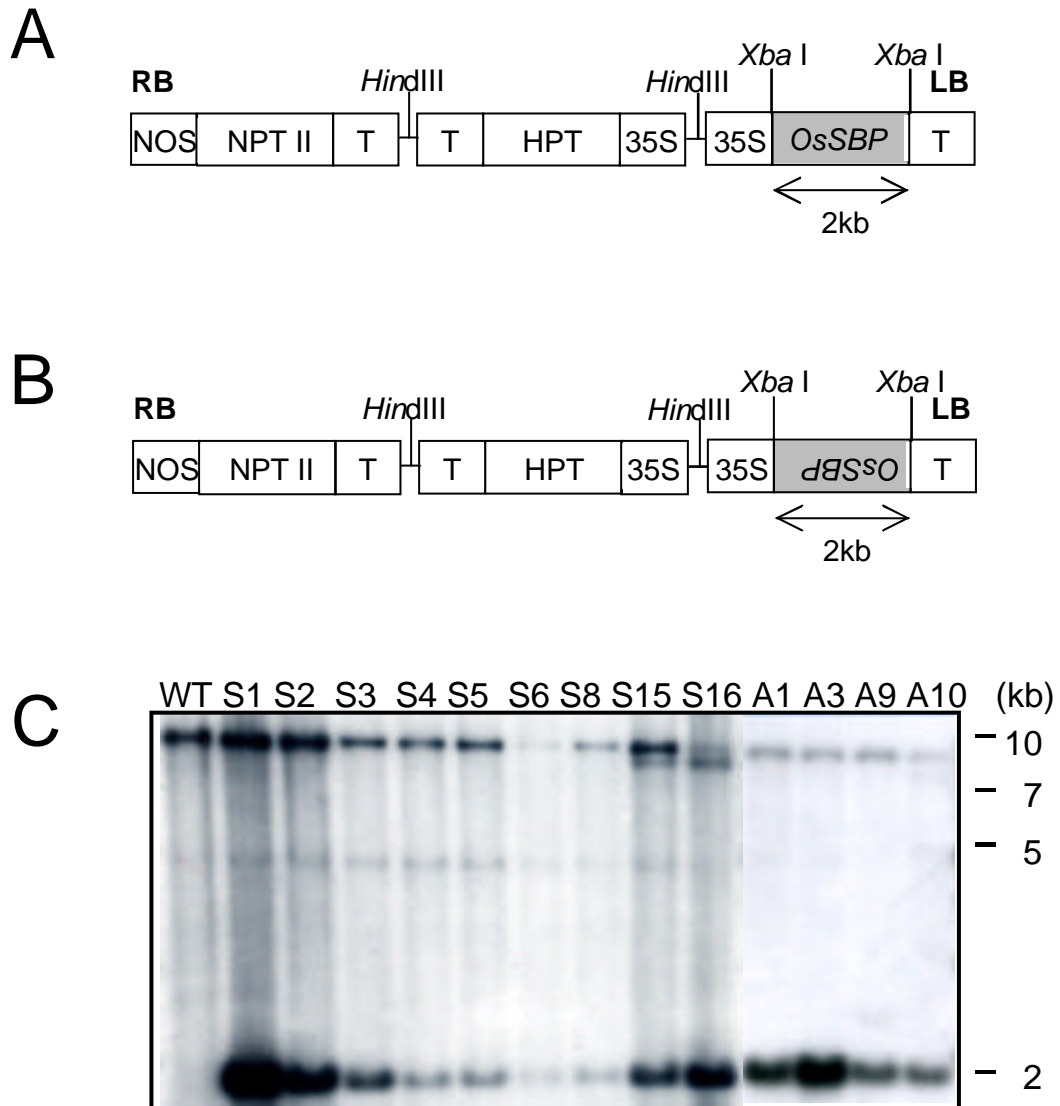


図 2-5 作成した発現ベクターおよび形質転換体における *OsSBP* の解析
 (A) pMSH2-センス *OsSBP* バイナリーベクター (B) pMSH2-アンチセンス *OsSBP* バイナリーベクター (C) *OsSBP* 形質転換イネのサザン解析 センス導入体を S1—S16 で、アンチセンス導入体を A1—A10 で示す。*OsSBP* cDNA 全長配列をプローブに用いた。

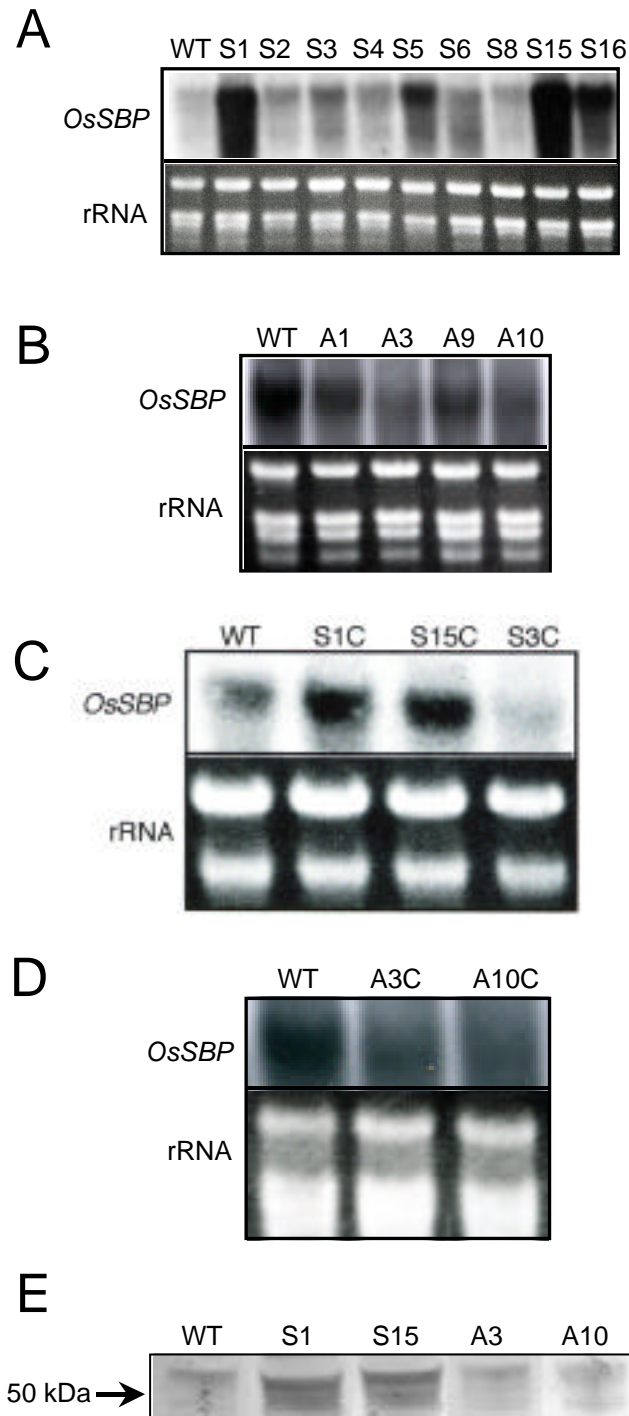


図 2-6 形質転換体における *OsSBP* の解析

(A) *OsSBP* センス導入植物体のノザン解析 (B) *OsSBP* アンチセンス導入植物体のノザン解析 (C) *OsSBP* センス導入培養細胞のノザン解析 (D) *OsSBP* アンチセンス導入培養細胞のノザン解析 (E) 抗 *OsSBP* 抗体を用いたウエスタン解析 (植物体)

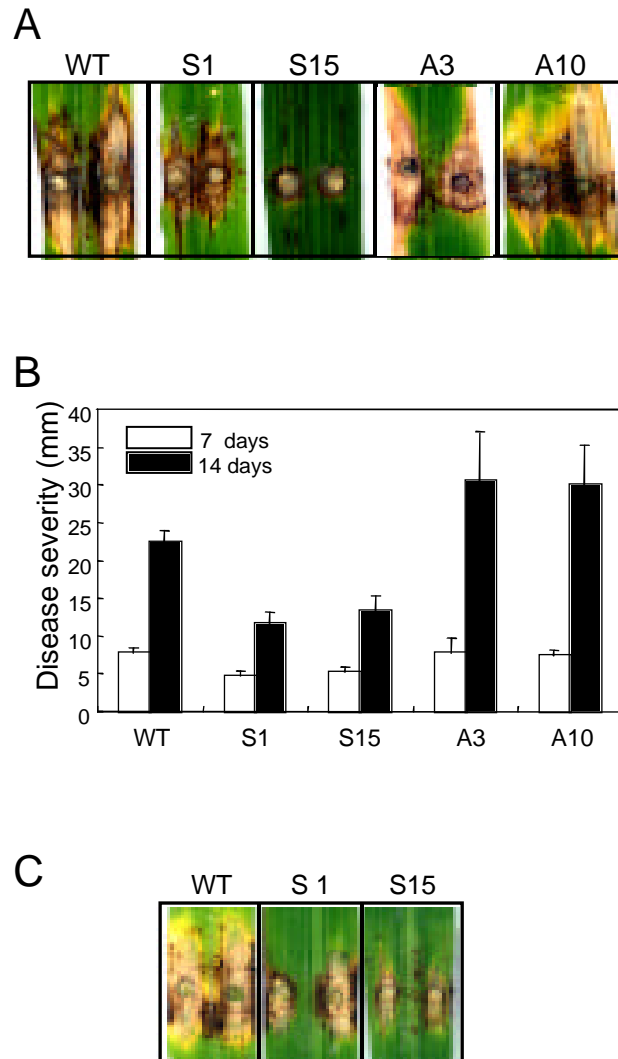


図 2-7 いもち病菌親和性レース 007 に対する *OsSBP* 形質転換体の反応
 親和性レース 007 を接種し、14 日目の病斑を観察した。(A) T_0 過剰発現体 2
 系統 (S1, S15) および T_0 発現抑制体 2 系統 (A3, A10) の表現型 (B) T_0 過
 剰発現体 2 系統 (S1, S15) および T_0 発現抑制体 2 系統 (A3, A10) の病斑長 試
 験は独立に 4 回行い、合計 8-20 個体を用いた。エラーバーは標準偏差を示
 す。(C) T_1 過剰発現体の表現型

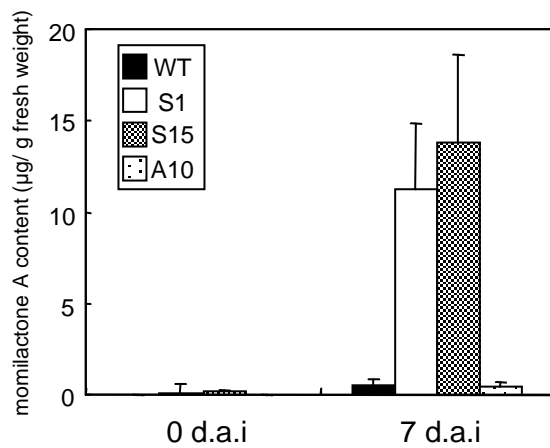


図 2-8 いもち病菌親和性レース 007 接種時の *OsSBP* 形質転換体におけるモミラクトン A の蓄積

播種後 3 週間目の実生にいもち病菌親和性レース 007 を接種後、0 日目 (0 d.a.i) および 7 日目 (7 d.a.i) の葉におけるモミラクトン A の蓄積量を比較した。試験は独立に 2 回行い、合計 6 個体用いた。エラーバーは標準偏差を示す。S1, S15 は過剰発現体、A10 は発現抑制体を示す。

(3) ファイトアレキシンの蓄積

ファイトアレキシンは抗菌活性を示す低分子化合物であり、植物が抵抗反応時に感染部位において速やかに生成、蓄積される (Smith, 1996)。形質転換体におけるファイトアレキシンの生成に変化が認められるかを調べるため、イネの主要なファイトアレキシンであるモミラクトン A の蓄積を調べた。モミラクトン A は非親和性のいもち病菌を接種時に速やかに生成され、いもち病菌分生孢子の発芽管生育の阻害作用をもつことがわかっている (Cartwright, 1977)。図 2-8 に示すとおり、無処理の状態では野生型および発現抑制体ではモミラクトン A は検出限界以下であった。また過剰発現体でもほとんど蓄積が認められなかった。一方、親和性レース接種後、野生型および発現抑制体でわずかにモミラクトン A の蓄積を認めたのに対し、SBP-S1 および SBP-S15 はそれぞれ $11.2 \pm 3.6 \mu\text{g/g}$ (means \pm S.D)、 $13.8 \pm 4.8 \mu\text{g/g}$ と有意な蓄積を示し、野生型の 20-25 倍であった。

(4) 防御遺伝子の発現解析

過剰発現体 2 系統 (SBP-S1 および SBP-S15) がイネいもち病菌親和性レース接種において病斑の進展を抑制する傾向を示したことから、これら形質転換体における内在性の防御遺伝子の発現を調べ、野生型との比較を行った。イネいもち病菌親和性レースおよび非親和性レースを噴霧接種後、24、48、72 時間目の葉から全 RNA を回収し、防御遺伝子である感染特異的遺伝子の *PBZI* および *PR1* の発現を調べた (図 2-9)。その結果、*PBZI* および *PR1* の転写活性化は野生型の場合、非親和性レース接種時で 48 時間目からであるのに対し、親和性レース接種の場合では 72 時間目からであった。一方、SBP-S1 および SBP-S15 における *PBZI* および *PR1* は野生型に比べ、非親和性レース接種で 24 時間、親和性レース接種で 24-48 時間も早く転写が活性化されることがわかった。また発現抑制体の SBP-A10 は野生型と大きな違いはみられなかった。この間の野生型における内在性の *OsSBP* は非親和性レース接種後 48 時間目に一過的に転写活性化が認められたのに対し、親和性レース接種では 72 時間目まで mRNA の蓄積量は殆ど増加しなかった。SBP-A10 では非親和性レース、親和性レースともに接種後 72 時間目まで *OsSBP* の転写はほとんど認められなかった。

次に JA に対する応答にも違いが認められるかを調べた。播種後 21 日目の野生型および *OsSBP* 形質転換体に 0、0.1、1、10、100 μM の JA を散布処理し、

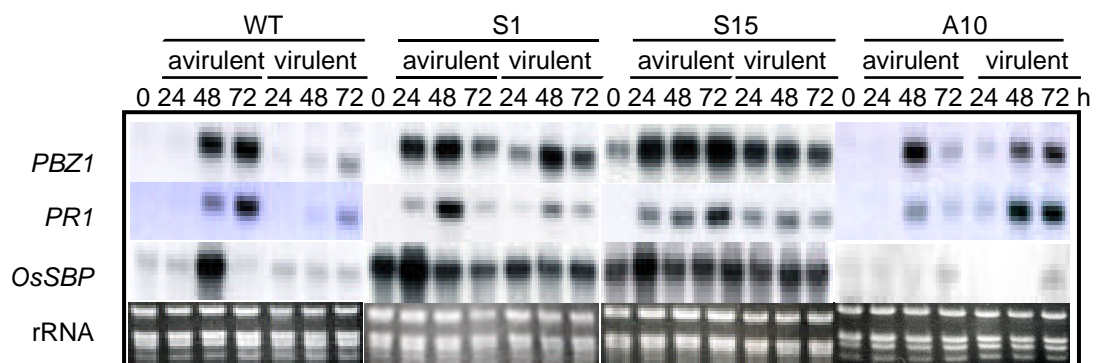


図 2-9 いもち病菌接種時の *OsSBP* 形質転換体における防御遺伝子の発現解析

播種後 3 週間目の実生にいもち病菌親和性レース 007 および非親和性レース 031 を接種後、各時間の葉から全 RNA を回収し *PBZ1* および *PR1* の発現量を調べた。またその間の *OsSBP* の発現量も調べた。プローブは *PBZ1* 遺伝子および *PR1* 遺伝子の部分配列を、*OsSBP* は cDNA 全長配列を用いた。S1, S15 は過剰発現体、A10 は発現抑制体を示す。

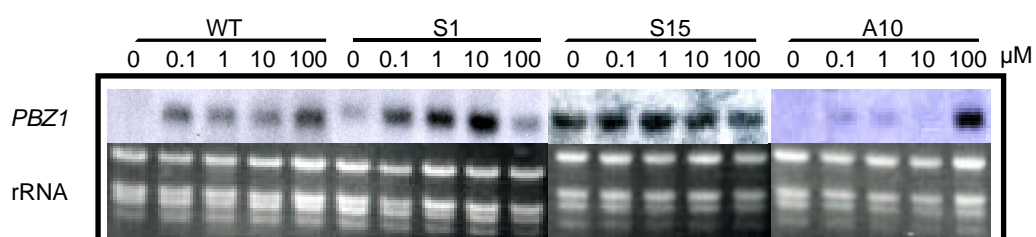


図 2-10 ジャスモン酸処理時の *OsSBP* 形質転換体における防御遺伝子の発現解析

播種後 3 週間目の実生に各濃度のジャスモン酸 (0, 0.1, 1, 10, 100 μM) を噴霧処理後、24 時間目の葉からトータル RNA を回収し *PBZ1* の発現量を調べた。プローブは *PBZ1* 遺伝子の部分配列を用いた。S1, S15 は過剰発現体、A10 は発現抑制体を示す。

24 時間目のそれぞれにおける *PBZ1* の発現を調べた (図 2-10)。その結果、野生型では 0.1 μM から *PBZ1* 遺伝子の転写活性化は認められるが、転写量が増大するのは 100 μM であったのに対し、過剰発現体の SBP-S1 および SBP-S15 では 0.1 μM から強く転写の活性化が認められた。一方、発現抑制体の SBP-A10 では 10 μM まで *PBZ1* の転写は認められず、100 μM ではじめて転写を確認した。

(5) 活性酸素種の蓄積

近年、NADPH オキシダーゼにより生成される活性酸素種が、植物の病害抵抗性において重要な役割をもつことが明らかになり、PR 遺伝子の発現やファイトアレキシンの生成など多くの病害応答を活性化することが報告されている (Hammond-Kosack and Jones, 1996)。また NADPH オキシダーゼの活性はそれ自身のリン酸化/脱リン酸化反応により制御されることがわかっている (Low et al., 1996)。OsSBP 過剰発現体の培養細胞 (SBP-S1C、SBP-S15C) を作製し、OsSBP の活性酸素種生成に及ぼす影響の有無を調べた。イネの培養細胞において、プロテインフォスファターゼ 1 の阻害剤であるカリクリン A (CA) は NADPH オキシダーゼに依存した活性酸素種の生成を誘導することが報告されている (Kuchitsu et al., 1995) ことから、CA 処理時の野生型、過剰発現体および発現抑制体の培養細胞が生成する過酸化水素の生成量を調べた。その結果、CA 処理前では野生型、過剰発現体および発現抑制体はともに過酸化水素の生成は認められなかったが、CA 処理後、野生型は経時的に過酸化水素を生成した (図 2-11A)。一方、SBP-S1C と SBP-S15C は野生型同様、CA 処理後経時的に過酸化水素を生成したが、処理後 2 時間目から観察を終えた 4 時間目まで野生型に比べ有意に高い過酸化水素の生成がみられた。発現抑制体の SBP-A3C と A10C は野生型と比べて有意な違いは見られなかった (図 2-11A)。また NADPH オキシダーゼの阻害剤である DPI を前処理することで、過酸化水素の生成量は大きく減少したことから、CA 処理で観察された過酸化水素の生成は NADPH オキシダーゼに依存していると考えられた (図 2-11B)。

(6) 抗酸化酵素活性の測定

OsSBP 過剰発現体の培養細胞にみられた CA 処理時の過酸化水素の蓄積が過酸化水素の消去に働く抗酸化酵素活性の低下に因るものなのかを調べるために、主要な抗酸化酵素である細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) と

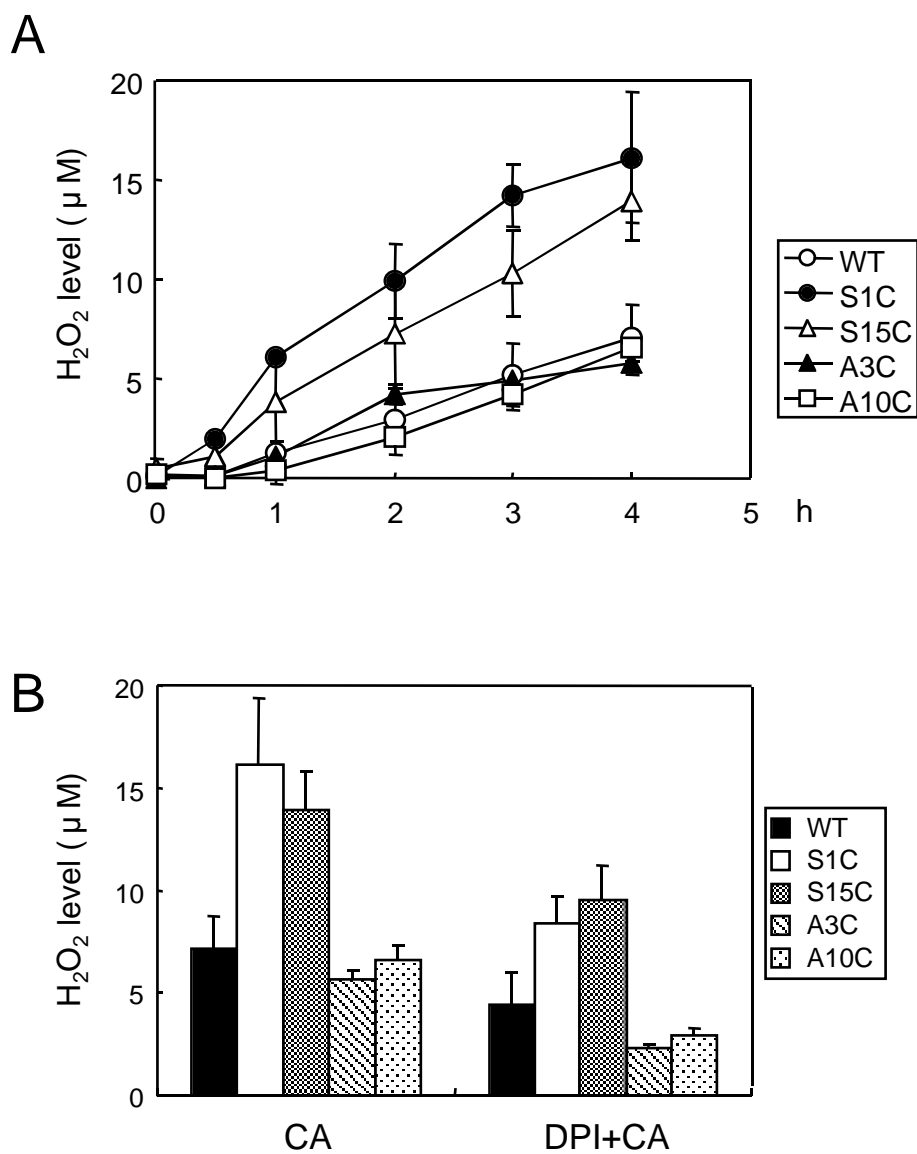


図 2-11 カリクリン A による *OsSBP* 形質転換培養細胞の活性酸素生成
 (A) カリクリン A 処理による過酸化水素生成の経時的変化 (B) カリクリン A 処理後 4 時間目の過酸化水素生成量。DPI はカリクリン A 処理 30 分前に培地中に添加した。S1C および S15C は過剰発現体、A3C および A10C は発現抑制体を示す。実験はそれぞれ独立に 5 回行った。エラーバーは標準偏差を示す。

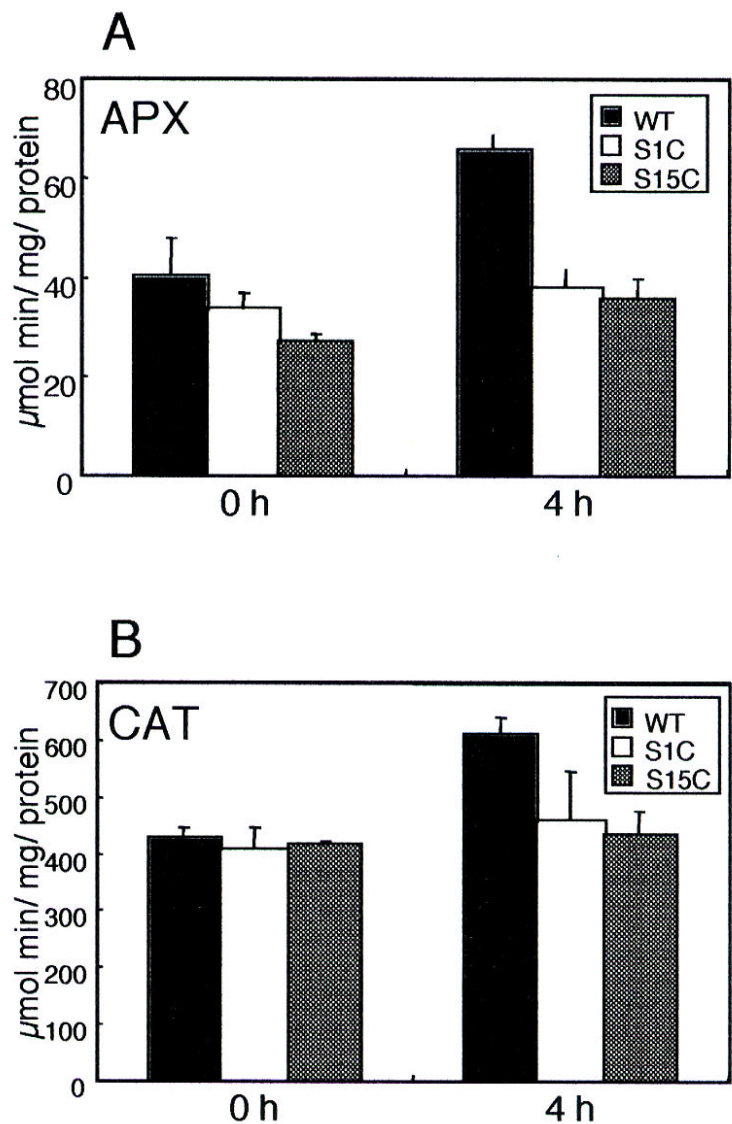


図 2-12 カリクリン A 処理時における *OsSBP* 過剰発現体の APX 及び CAT 活性

(A) カリクリン A 処理前および処理後 4 時間目の APX 活性 (B) カリクリン A 処理前および処理後 4 時間目の CAT 活性。S1C および S15C は過剰発現体を示す。実験はそれぞれ独立に 5 回行った。エラーバーは標準偏差を示す。

カタラーゼ (CAT) について CA 処理前後の活性を調べた。その結果、野生型培養細胞は CA を処理することで処理前に比べ APX および CAT の酵素活性が上昇することがわかった (図 2-12A、12B)。一方、過剰発現体の SBP-S1C と SBP-S15C は CA の処理前後で両酵素の活性に有意な変化は認められなかった。

(7) 抗酸化酵素遺伝子の発現解析

タバコではタバコモザイクウイルスの感染に応答した CAT の活性抑制は転写レベルの制御 (Dorey et al., 1998) であることが報告されていることから、*OsSBP* 過剰発現体でみられた CAT 活性の低下も CAT 遺伝子の mRNA 蓄積量に因るものかを確かめるために、過剰発現体の植物体および培養細胞の通常状態における CAT 遺伝子の転写量を調べた。その結果、植物体および培養細胞のいずれも野生型でみられる CAT 遺伝子の mRNA 量より有意に減少していることがわかった (図 2-13A、13B)。また APX 遺伝子についても野生型と過剰発現体の転写量を調べたが、植物体および培養細胞のいずれも両者に違いはみられなかった (図 2-13A、13B)。

(8) イネ白葉枯病に対する耐病性検定

さらに *OsSBP* がイネの病害抵抗性において一般的な役割をもつのかを確認するために、過剰発現体 2 系統についてイネ白葉枯病菌親和性レースの接種試験を行った。接種後 14 日目において、野生型は感染部位から葉の基部に向かって著しい乾燥を示す典型的なしおれが認められたが、過剰発現体の SBP-S1 および SBP-S15 では感染部位周辺近くで黄変するのみで、病斑形成が抑制されているように観察された (図 2-14A)。接種後 14 日目の病斑長も、野生型に比べ過剰発現体の 2 系統は有意に病斑形成の抑制が認められた (図 2-14B)。さらにこのときの接種葉中に含まれる白葉枯病菌の cfu を計測したところ、野生型で約 10^6 cfu / leaf であったのに対し、過剰発現体 2 系統は約 10^4 cfu / leaf で菌数も低下していることがわかり、*OsSBP* 過剰発現体は白葉枯病菌に対しても耐病性を付与しうる可能性が示唆された (図 2-14C)。

第四節 考察

第一項 SBP の相同性

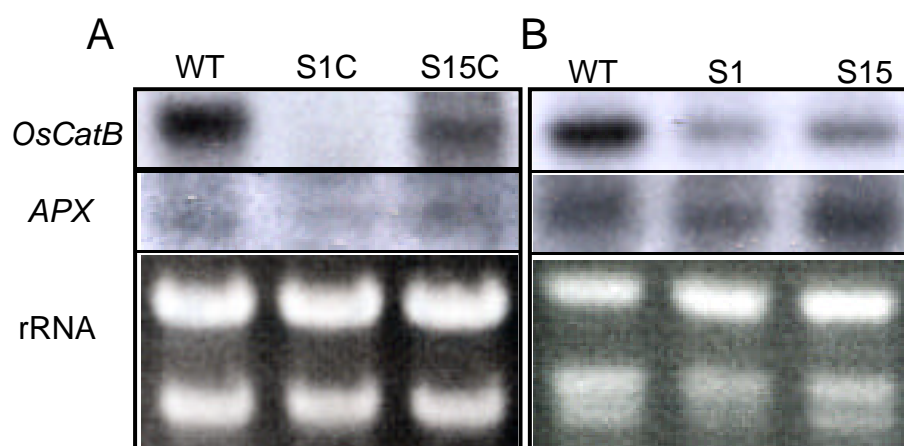


図 2-13 *OsSBP* 過剰発現体の *APX* 及び *CAT* の発現解析

(A) 培養細胞 (B) 植物体

プローブは *OsCatB* 遺伝子および *APX* 遺伝子の部分配列を用いた。S1C および S15C は過剰発現培養細胞、S1 および S15 は過剰発現植物体を示す。

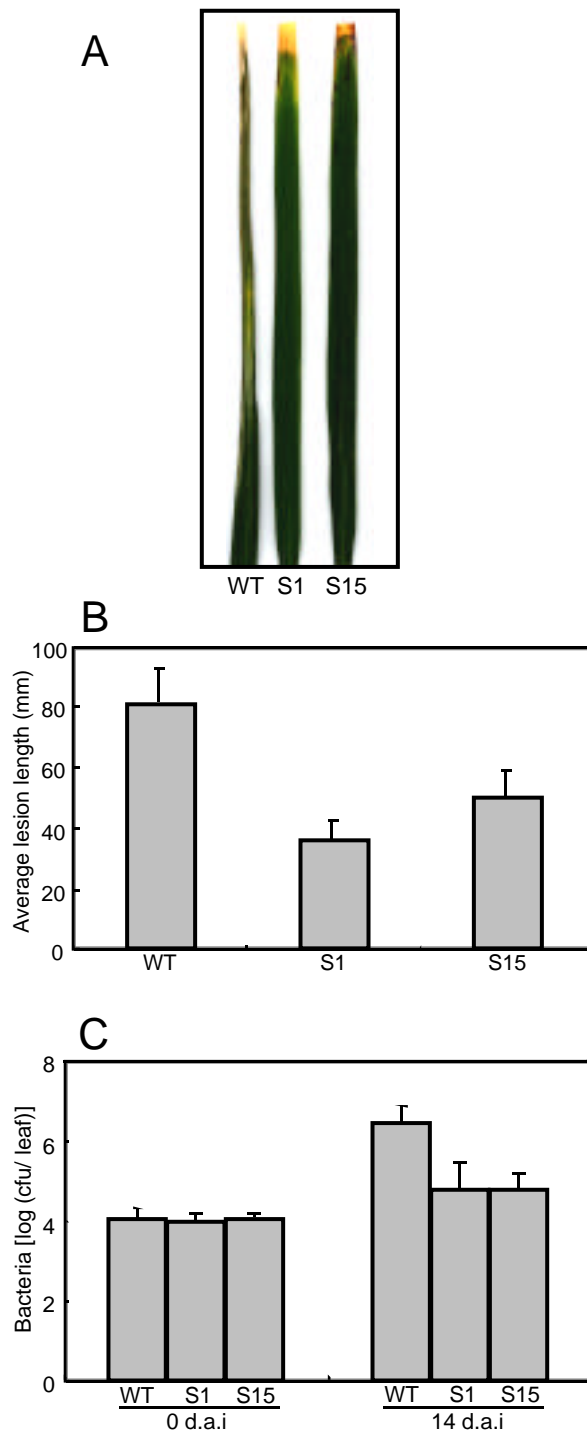


図 2-14 *OsSBP* 過剰発現体における白葉枯病菌親和性レースに対する反応
 過剰発現体 2 系統 (S1 および S15) に親和性レースを接種し、14 日目の
 病斑を観察した。(A) 表現型 (B) 病斑長 (C) 葉中の白葉枯病菌コロニ
 ー数 試験は独立に 2 回行い、合計 8 個体を用いた。エラーバーは標準偏
 差を示す。

SBP 遺伝子は最初、マウスの肝臓より単離され (Bansal et al., 1989) その後の解析で腫瘍形成の抑制や生体異物の解毒に関与する可能性があるとして報告された (Bansal et al., 1990, Pumford et al., 1992) が、SBP の直接的な機能についてはいまだ不明であり、その分子機構はほとんど解明されていない。近年、植物においてもヒメツリガネゴケ、ミヤコグサ、ダイズ、シロイヌナズナ等で SBP 遺伝子の存在が報告されている。ヒメツリガネゴケではアブシジン酸処理で転写が活性化されること (Machuka et al., 1999) や、ミヤコグサでは根粒菌の感染に反応して転写が活性化されること (Fletmetakis et al., 2002) が報告されているが、その生理学的機能については不明である。今回単離した OsSBP をこれまで報告されている SBP と比較した結果、N 末端から C 末端まで全長にわたりよく保存されていた (図 2-1)。このように SBP はバクテリア、線虫、昆虫、動物、植物にいたるまで高く保存されていることから、細胞の生存、生命維持に重要な役割を担っていることが考えられる。バクテリアを除く SBP 全てには cys-x-x-cys で表されるレドックス活性中心が保存されている。レドックス活性中心はチオレドキン、thiol protein disulfide oxidoreductase (TPDO)、protein disulfide isomerase (PDI)、マウスの小胞体タンパク (Erp72)、Human lipoamide dehydrogenase (HLPD)、formate dehydrogenase (FD)、selenoprotein W 等のレドックスタンパクに見られるモチーフであるが (Jamba et al., 1996) これらのレドックスタンパクはこのレドックス活性中心に存在する 2 つのシステイン残基のチオール基により、ターゲットとなるタンパクのもつジスルフィド結合を還元することで該タンパクを活性化させ (図 2-15)、動物では細胞分裂、DNA 転写調節、免疫応答、胚発生、ラジカル消去等、植物では光合成 (Jacquot et al., 1997)、種子の発芽 (Besse et al., 1996)、受精 (Bower et al., 1996) 等種々の生理メカニズムを制御すると考えられている。今回イネから単離した OsSBP にも cys-x-x-cys 配列が保存されており、機能の類似性が示唆される。

第二項 OsSBP 遺伝子の転写制御

植物における SBP 遺伝子発現の器官特異性はミヤコグサやシロイヌナズナで調べられている (Fletmetakis et al., 2002)。ミヤコグサでは花、根で比較的強く発現しているが、茎ではわずかに発現する程度で葉では殆どないことが報告されている。またシロイヌナズナでは根、花、葉の発現は比較的弱いですが、茎では殆ど発現しないことが報告されている。OsSBP のイネにおける器官別発現は根で比較的強く、茎で弱く、葉で殆ど認められず (図 2-3)、ミヤコグサやシロイヌナズナで見られるパターンと比較的類似した結果であった。

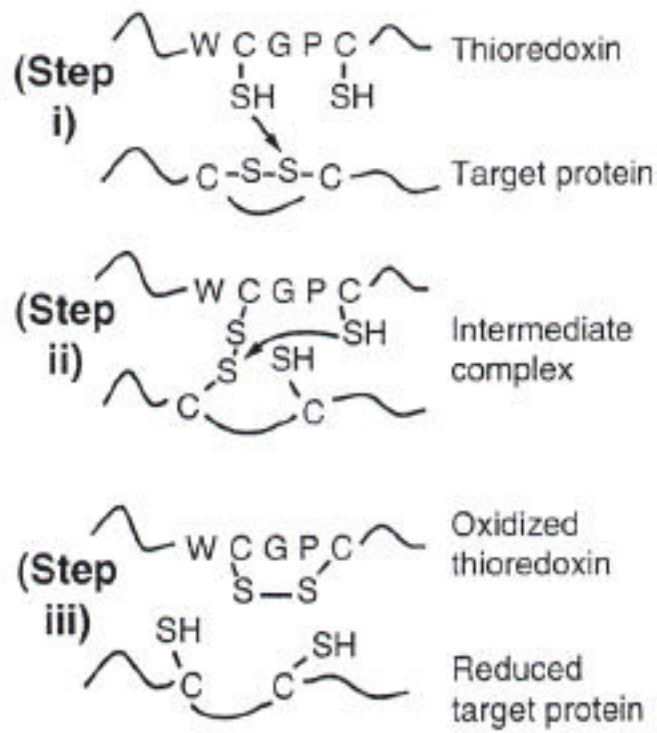


図 2-15 チオレドキシンのターゲットタンパク質に対するレドックスメカニズムのスキーム
Mittler (2002) より抜粋

第一章で *OsSBP* はイネいもち病菌由来のセレブロシドエリシター処理やイネいもち病菌接種によって転写が活性化されることを述べた(図 1-4、1-6)が、植物の病害抵抗性シグナル伝達物質である SA や JA 処理にも応答して転写が活性化されることがわかった(図 2-4A、4B)。その発現パターンは 2 つのピークを示した。この理由は現時点で明らかではなく今後の解析が必要であるが、最初のピークは SA および JA 処理に直接応答したもので、2 つめのピークは SA、JA 処理により細胞内で生成したシグナル物質に対する応答を意味するのかもしれない。また JA においては、形質転換体を用いた解析で過剰発現体が野生型より低濃度の JA に対して応答し、防御遺伝子の *PBZ1* の発現が誘導されることがわかり(図 2-10) *OsSBP* が JA を介した防御系に関与していることが示唆された。JA は近年病原菌、特に糸状菌に対する防御応答に重要であることが報告されており(Dong, 1998、Reymond and Farmer, 1998) JA の認識あるいは生合成が出来なくなった突然変異株のシロイヌナズナは病原菌に対して防御応答ができなくなることが知られている(Penninckx et al., 1996、Thomma et al., 1998、Vijayan et al., 1998、Xie et al., 1998)。またイネにおいて JA はファイトアレキシン合成や全身獲得抵抗性(SAR)のシグナルである可能性が示唆されている(Tamogami et al., 1997、Schweizer et al., 1998)。一方、SA は多くの植物において SAR のシグナルとして働き、PR 遺伝子群の転写を活性化することが知られているが、イネにおける内在性の SA 濃度は他の植物に比べ非常に高く(Raskin et al., 1990) 病原菌の接種前後でそのレベルに殆ど差がないこと(Silverman et al., 1995)が知られている。一方で SA レベルの高いイネ品種ほどイネいもち病菌に抵抗性を示す傾向にあること(Silverman et al., 1995)や SA をイネに処理することで過酸化水素の生成を誘導することも報告されており(Ganesan and Thomas, 2001) SA がイネの防御応答シグナルであるか否かは明らかではない。またヒメツリガネゴケの *SBP* 遺伝子は ABA を処理すると転写が活性化されることが報告されている(Machuka et al., 1999)が、*OsSBP* も ABA 処理により転写が活性化されることがわかった(図 2-4C)。ABA は凍結、低温、乾燥ストレス応答において中心的な役割をもつ植物ホルモンであるが、近年 ABA は過酸化水素の生成を促進することが明らかになり(Guan et al., 2000、Pei et al., 2000) スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)(Sakamoto et al., 1995) グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)(Machuka et al., 1999) グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)(Machuka et al., 1999) カタラーゼ(CAT)(Williamson and Scandalios, 1992、Anderson et al., 1994、Guan and Scandalios, 1998、Guan et al., 2000)といった抗酸化酵素の転写活性化や SOD、CAT、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)、グルタチオンリダクターゼ(GR)の酵素活

性化に関係していることが報告されている (Anderson et al., 1994、 Prasad et al., 1994、 Bueno et al., 1998、 Gong et al., 1998、 Bellire et al., 2000、 Jiang and Zhang, 2001)。さらに *OsSBP* は除草剤であるパラコート処理でも転写活性化されることがわかった (図 2-4D)。パラコートは活性酸素種であるスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot -}$) を発生し、光合成系 I および II にダメージを与えることで植物を枯死させるが、これも SOD の転写活性化を誘導することが知られている (Meyer et al., 1999、 Elmayan and Vaucheret, 1996)。

以上のことから、*OsSBP* はこれまで報告されている植物種の SBP 遺伝子と類似性を保ちながら、さらに病害防御応答あるいは酸化ストレス応答に何らかの役割を担っていることが考えられた。

第三項 *OsSBP* の病害抵抗性への関与

OsSBP は病害防御応答あるいは酸化ストレス応答に関与していることが示唆されることから、*OsSBP* の形質転換体を作製し病害抵抗性への関与を調べた。*OsSBP* を過剰発現させた SBP-S1 および SBP-S15 に親和性いもち病菌を接種した場合、野生型に比べ有意な病斑進展の抑制がみられた (図 2-7A、7B)。一方、発現抑制体である SBP-A3 および SBP-A10 は野生型に比べわずかながら病斑の進展を促進する傾向にあった (図 2-7A、7B)。これらのことから、形質転換体のいもち病抵抗性は *OsSBP* の発現量に依存していることが考えられる。いもち病菌の接種試験で観察した表現型は、病原菌がもつ非病原性遺伝子と植物側の抵抗性遺伝子の相互作用で起こる真性抵抗性の表現型とは異なることから、*OsSBP* は basal level の抵抗性向上に関与していることが考えられた。また親和性イネ白葉枯病菌の接種試験においても *OsSBP* 過剰発現体は野生型に比べ有意に病斑進展の抑制および葉中での白葉枯病菌の増殖抑制がみられた (図 2-14) ことから、*OsSBP* がイネいもち病菌に特異的な応答を示すのではなく、より広範囲にイネの病害応答に関与していることが考えられる。

いもち病菌親和性レース接種後の SBP-S1 および SBP-S15 におけるファイトアレキシン (モミラクトン A) の蓄積量は野生型の 20-25 倍であった。ファイトアレキシンは抗菌活性をもつ低分子化合物で、抵抗性反応において速やかに感染部位で生成され (Smith, 1996)、モミラクトン A はイネのファイトアレキシンの主要な一種としていもち病菌の分生胞子の発芽管生育を阻害することが知られている (Cartwright et al., 1977)。この 50% 有効濃度は 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である (Cartwright et al., 1977) が、今回 SBP-S1 および SBP-S15 でみられたモミラクトン A の蓄積量 (10-15 $\mu\text{g}/\text{g FW}$) は、いもち病菌の生育阻害に十分であると

考えられる。一方、発現抑制体の SBP-A10 におけるモミラクトン A の蓄積量は野生型と有意な差は認められなかった (図 2-8)。またいもち病菌接種後にモミラクトン A の蓄積がみられた過剰発現体 2 系統は接種前には野生型、発現抑制体と同様、殆ど蓄積がみられなかった。親和性イネいもち病菌に対して抵抗性を獲得した細胞死変異体の *cdr* 変異体や活性酸素種を生成する NADPH オキシダーゼの活性調節因子である *OsRac1* の活性型を過剰発現させたイネは病原菌の感染に関係なく過剰量のモミラクトン A (野生型比; *cdr* 変異体で 70-300 倍、*OsRac1* 過剰発現体で 16-160 倍) を蓄積することが報告されている (Takahashi et al., 1999、Ono et al., 2001) が、これらと比較して *OsSBP* 過剰発現体でみられたモミラクトン A の蓄積様式は異なった。これらのことから、過剰発現体は *OsSBP* の発現量に関係なく通常状態ではファイトアレキシン生成の誘導はなく、いもち病菌接種に起因する病害応答シグナルの発生に伴ってファイトアレキシン生成を増強していると考えられた。

防御遺伝子の発現解析から、*PBZ1* および *PR1* の 2 つの PR 遺伝子もいもち病菌接種に応答して野生型よりも早く転写の活性化がおこり、転写量も増大していることがわかった (図 2-9)。SBP-S1 および SBP-S15 とともに親和性レース接種時にみられた PR 遺伝子の転写量は非親和性レース接種時の転写量程ではなかった。しかし親和性レース接種時の *PBZ1*、*PR1* の mRNA の蓄積開始時間および蓄積量は野生型に非親和性レースを接種した場合のそれとほぼ一致することから、過剰発現体において親和性レース接種に対する PR 遺伝子の発現応答は抵抗性を向上させるのに十分であることが考えられる。また野生型における非親和性レース接種時の *PBZ1* および *PR1* の転写活性化は接種後 48 時間目からみられたが、このとき *OsSBP* も一過的に転写が活性化されていた (図 2-9)。一方、親和性レース接種時では *PBZ1* および *PR1* は接種後 72 時間目に mRNA の弱い蓄積を認めたが、*OsSBP* の転写レベルの上昇は認められなかった (図 2-9)。このことから、PR 遺伝子の転写活性化には *OsSBP* の発現が関係していることが考えられる。*PBZ1* および *PR1* の 2 つの PR 遺伝子の転写量もファイトアレキシンのモミラクトン A の蓄積と同様、通常状態では *OsSBP* の発現量に関係なく野生型と違いはみられなかったことから、*OsSBP* 自身が病害応答シグナルの伝達に直接関係するものではなく、病原菌の感染により発生したシグナルに応答し、これを増幅することに関与していることが示唆される。

近年、NADPH オキシダーゼにより生成される活性酸素種が、植物の病害抵抗性において重要な役割をもつことがいわれており、PR 遺伝子の発現やファイトアレキシンの生成を活性化することが報告されている (Takahashi et al., 1999、Ono et al., 2001)。培養細胞系を用いた NADPH オキシダーゼの脱リン酸

化阻害剤の CA 添加実験から、SBP-S1C および SBP-S15C は野生型に比べ有意な過酸化水素量の増大がみられた (図 2-11A)。また NADPH オキシダーゼの阻害剤である DPI を前処理することによって CA 添加による過酸化水素生成量が減少した (図 2-11B) ことから、*OsSBP* 過剰発現体は NADPH オキシダーゼ由来の過酸化水素量を増加させていると考えられ、*OsSBP* 過剰発現体でみられたいもち病菌接種時におけるファイトアレキシン生成の促進や PR 遺伝子の転写活性化が過剰発現体で生成される活性酸素種量の増大に起因するものと考えられた。

植物は病原菌の感染により NADPH オキシダーゼによる活性酸素種の生成を行うのと並行して、SA の存在下で活性酸素種を消去する抗酸化酵素である CAT や APX の活性を一時的に低下させていることが最近の研究で明らかになってきている (Chen et al., 1993, Durner and Klessig, 1995)。これら APX 遺伝子や CAT 遺伝子のアンチセンスを導入した形質転換タバコは野生型が認識できない低濃度の病原細菌の感染を認識し、過敏感細胞死を誘導することが報告されている (Takahashi et al., 1997, Chamnongpol et al., 1998, Mittler et al., 1999)。*OsSBP* 過剰発現体で増大した活性酸素種も同様の機構で生じたのかを調べるため、主要な活性酸素種消去酵素である APX と CAT の酵素活性を測定したところ、CA 処理後の両酵素活性は野生型に比べ有意に低下しており、また過剰発現体における酵素活性は CA 処理前後で APX、CAT とともに殆ど違いがない (図 2-12) ことから *OsSBP* の過剰発現がこれらの酵素活性の抑制に関与していることが考えられる。特に CAT の過酸化水素に対する親和性は APX のそれに比べ非常に高く、APX が活性酸素種量の微調整に働くのに対し、CAT は細胞内に生成した過剰量の活性酸素種の消去に関与していることが示唆されている (Mittler, 2002) ことから、*OsSBP* 過剰発現体でみられた活性酸素種の増大は CAT 活性の低下によるところが大きいと推測できる。病原菌感染に応答した APX および CAT の活性抑制はタバコにおいてそれぞれ調べられており、タバコモザイクウイルスの接種により APX は転写後の制御 (Mittler et al., 1998)、CAT は転写の制御 (Dorey et al., 1998) を受けることが報告されている。*OsSBP* 過剰発現体における CAT の mRNA 蓄積量は培養細胞および植物体のいずれにおいても野生型と比べ有意に減少していることから (図 2-13)、タバコ同様、mRNA の転写抑制により CAT の酵素活性の上昇が抑えられていると考えられる。また APX の転写レベルには違いが認められなかったことも Mittler らの報告と一致しており、タバコ APX 同様に転写後の調節を受けている可能性もあり、今後の解析が期待される。

第四項 OsSBP のイネ病害抵抗性における機能推定

これまで論じてきたように、OsSBP は病原体の感染に伴って誘導され、抗酸化酵素の APX や CAT の酵素活性を低下させることを通じて NADPH オキシダーゼが生成した活性酸素種を細胞内に蓄積し、ファイトアレキシンの生成や PR 遺伝子の転写活性化に貢献していることが考えられる。では、OsSBP はどのような機能により抗酸化酵素活性の低下に関与しているのだろうか。OsSBP が SA や JA を処理することで転写活性化されることは既に述べたが、SA や JA の働きの一つとして CAT や APX の活性を阻害することが知られている。Klessig らはタバコにおいて SA 存在下の CAT および APX の活性が低下することを報告しており (Chen and Klessig, 1993、Durner and Klessig, 1995) パセリの培養細胞にエリシターを処理する際にメチルジャスモン酸 (MJ) を前処理しておくことで過酸化水素の生成量が増大すること (Kauss et al., 1994) や MJ を処理したタバコはタバコモザイクウイルス接種時と同様に APX の転写後の調節を受け、その結果活性酸素種の蓄積が増大することが報告されている (Mittler et al., 1998)。シロイヌナズナの NPR1 (nonexpressor of PR genes) 遺伝子は SAR の誘導に重要な働きをもつことが示唆されているが、npr1 変異体のシロイヌナズナは SA による PR 遺伝子の発現および SAR の誘導ができない。この NPR1 遺伝子は動物の転写因子である NF- κ B の抑制因子 I κ B と相同性を示し、転写調節に働いていることが示唆されている (Cao et al., 1997、Ryals et al., 1997)。NF- κ B は相同性の高い遺伝子ファミリーからなり、免疫・炎症応答関連遺伝子の制御 (Storz et al., 1999、Baldwin et al., 1998)、アポトーシス (Beg et al., 1995)、ボディプラン (Kaneage et al., 1998、Bushdid et al., 1998) 等に関与することが知られている。通常は I κ B と結合しており細胞質内にとどまっているが、I κ B がリン酸化を受けユビキチン化されるとプロテアソームで分解され、その結果 NF- κ B は核に移行する (DiDonato et al., 1997、Zandi et al., 1997)。その際に NF- κ B の DNA 結合力がチオレドキシニンによる酸化還元反応で制御されることが明らかになっている (Okamoto et al., 1992、Hayashi et al., 1993)。最近になって、NPR1 は通常自身もつシステイン残基によるジスルフィド結合でオリゴマーを形成しているのが SA 濃度の上昇による細胞内レッドクスの変化でモノマーとなり核へ移行することが明らかになり、そしてモノマー型 NPR1 の増加に伴い PR1 遺伝子の転写が活性化されることが明らかにされ (Mou et al., 2003)、SA と一連の防御応答の間を埋める因子として注目されている。この NPR1 遺伝子を過剰発現させたイネ形質転換体は白葉枯病に耐性を示すことや酵母の two-hybrid スクリーニングによりイネにもシロイヌナズナでみつかった

NPR1 と結合する転写因子の TGA ファミリーのホモログが存在することが明らかになり、イネにおいてもシロイヌナズナと共通の耐病性シグナル伝達機構の存在が示唆されている (Chern et al., 2001)。さらに最近になって NPR1 が結合する転写因子の TGA1 は通常ジスルフィド結合をもつ酸化型を示すが、SA 濃度の上昇で還元型となり NPR1 と結合し、シスエレメントへの結合力が高まることが明らかになり (Despres et al., 2003)、病害応答シグナル伝達において細胞内のレドックス状態およびレドックスタンパク質の重要性が注目されている。OsSBP は SA および JA 処理に応答して転写が活性化されること (図 2-4)、レドックス活性中心をもつこと (図 2-1)、さらに過剰発現体は病原体の感染に伴う APX や CAT の活性上昇を抑える (図 2-12) から、病原体の感染に応答し NPR1 のような防御応答に関わる転写調節タンパク質を活性化し CAT でみられた抗酸化酵素遺伝子の転写調節に関与すると考えれば非常に興味深い。現時点で OsSBP の機能推定は早計であるが、図 2-16 で示す作業仮説のもと、今後レドックス活性中心部位特異的変異体の解析や OsSBP のターゲットタンパク質の有無を調べることで、OsSBP の機能を明確にすることが期待される。

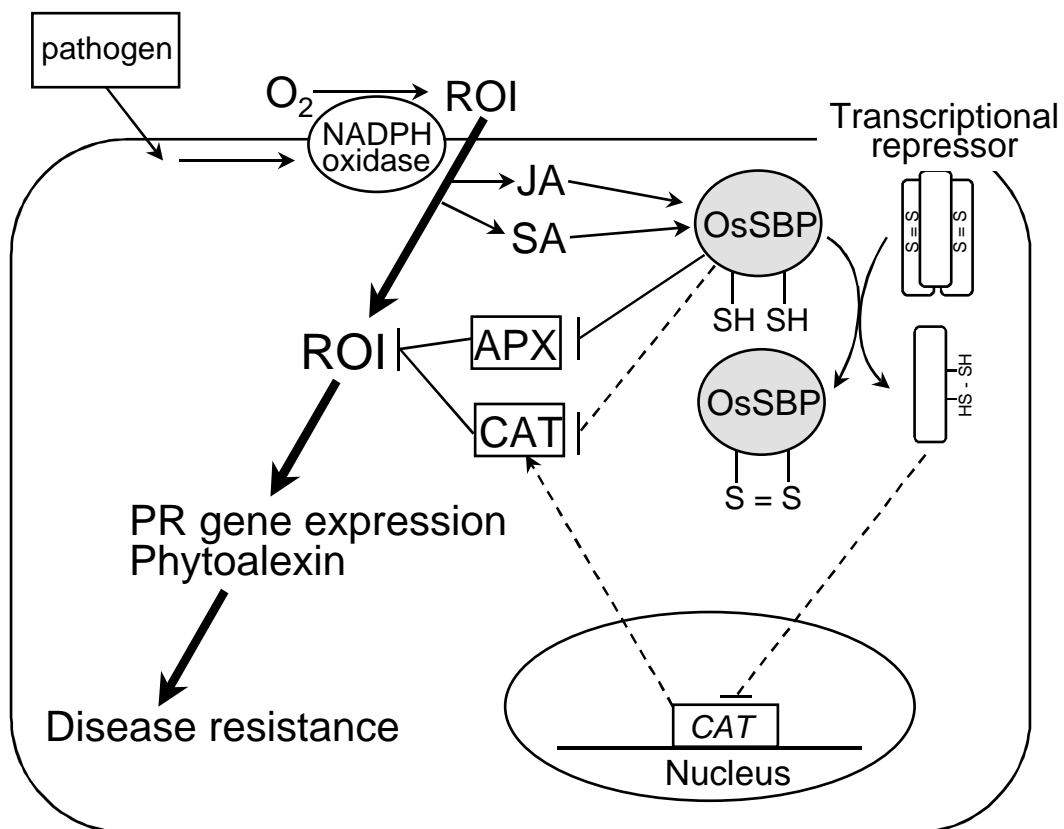


図 2-16 耐病性における OsSBP 機能の作業仮説

OsSBP は病原体の感染により転写・翻訳され、NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素種を消去する抗酸化酵素の転写を抑制する、あるいは直接酵素活性を抑制すると思われる。結果的に活性酸素種量の増大に寄与し、強まったシグナルが下流の防御応答の誘導を引き起こすと思われる。

第三章 OsSBP 遺伝子導入によるサツマイモへの病害抵抗性付与

第一節 緒言

これまで行ってきた OsSBP のイネ病害抵抗性における機能解析の結果から、OsSBP は抗酸化酵素の CAT や APX の酵素活性の低下に寄与することで NADPH オキシダーゼが生成した活性酸素種を細胞内に蓄積し、ファイトアレキシンの生成や PR 遺伝子の転写を活性化しイネの防御応答を高めることがわかった (Sawada et al., 2003、Sawada et al., 2004)。このことから OsSBP はイネに限らず他の植物においても同様の働きを担う可能性が示唆される。もし OsSBP が他作物にも耐病性を付与することが明らかになれば、その用途は大きく広がる。サツマイモ (*Ipomoea batatas*) はデンプン原料、アルコール飲料、色素原料等様々な工業原料として用途のある有用作物であり、また国家プロジェクト「植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産植物の研究開発」における対象作物の一つに指定されている。サツマイモは既に再分化系および形質転換系が確立されている一方で、サツマイモの遺伝子単離とその解析は作物としての重要性を考えれば、サツマイモおよびその近縁野生種 (*Ipomoea trifida*) を含めても遅れているのが現状である (中村ら 2001)。サツマイモの病原体はウイルス、糸状菌、バクテリア、線虫等が知られているが、分子育種による病害抵抗性サツマイモの作出例は少なく、帯状粗皮病の原因ウイルスであるサツマイモ斑紋モザイクウイルス (SPFMV) の外被タンパク質遺伝子を形質転換したサツマイモが抵抗性を示したという報告がある程度である。そこで本章では OsSBP をサツマイモに導入し、サツマイモの重要病害である糸状菌の黒斑病菌 (*Ceratostyxis fimbriata*) 接種に対する病害抵抗性の向上がみられるか調べることとした。

第二節 材料および方法

(1) 植物

品種高系 14 号 (*Ipomoea batatas* L. cv. Kokei 14) の茎を培土に植え、人工気象室において 26℃、16 h 明 / 8 h 暗で栽培した。培養細胞は高系 14 号の機器の外植片を 0.5 mg/l 2, 4-D、5 mg/l ABA、3,000 mg/l yeast extract、0.2% グランガムを含む LS 培地 (Otani and Shimada, 1988) 上に置床することで得たカルスを LS 液体培地に移し、26℃、90 rpm で振とう培養した。

(2) OsSBP cDNA 発現ベクターの形質転換

Otani ら (1998) の方法に従った。胚形成能のあるカルスは 4-フルオロフェノキシ酢酸 (4FA、1mg/ l) を含む LS 培地上で生育するときに出現する頂芽分裂組織より誘導し、26、暗所で培養した。イネ形質転換に用いた発現ベクター pMSH2-OsSBP (図 3-1A) で形質転換したアグロバクテリウム EHA101 株を 50 µg/ ml カナマイシン、50 µg/ ml ハイグロマイシンを含む LB プレート上で 27 で 2 日間培養し、出現したコロニーを 10 mg/ l アセトシリンゴン、1 mg/ l 4FA を含む LS 液体培地に接種し、27、暗黒下で 1 時間振とう培養したものに上記カルスを 2 分間浸漬した。取り出したカルスを 1 mg/ l 4FA、10 mg/ l アセトシリンゴン、3% スクロースおよび 0.32% ゲランガムを含む LS 培地にて 22、暗黒下で 3 日間共存培養した。500 mg/ l カルベニシリンを含む滅菌水にてカルスを 3 回洗浄後、1 mg/ l 4FA、25 mg/ l ハイグロマイシン、500 mg/ l カルベニシリン、3% スクロースおよび 0.32% ゲランガムを含む LS 培地にて 26、暗黒下で 2 週間培養した。2 週間ごとに継代培養を繰り返した後、60 日後にカルスを 4 mg/ l アブシジン酸、1 mg/ l ジベレリン酸、25 mg/ l ハイグロマイシン、500 mg/ l カルベニシリン、3% スクロースおよび 0.32% ゲランガムを含む LS 培地に移し、21 日間培養した。出現した体細胞胚より植物体を再生させるため、0.05 mg/ l ジベレリン酸、25 mg/ l ハイグロマイシン、500 mg/ l カルベニシリン、3% スクロースおよび 0.32% ゲランガムを含む培地上に移植し、26、16 h 明 / 8 h 暗で再分化するまで培養した。形質転換体の作出は石川県立農業短期大学島田研究室で実施した。

(3) サザン解析

高系 14 号の葉および培養細胞から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により抽出したゲノム DNA 5 µg を用い、第二章の材料及び方法「(3) サザン解析」に準じて行った。

(4) ノザン解析

高系 14 号の葉から Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により抽出したトータル RNA 10 µg を用い、第二章の材料及び方法「(4) ノザン解析」に準じて行った。

(5) 黒斑病菌に対する抵抗性検定

黒斑病菌 (IFO030501、生物遺伝資源センター) はポテトデキストロース寒

天培地 (Difco) で 26 ℃、14 日間培養し菌糸が十分に広がった後、寒天培地表面を切り出して 0.01% Tween 20 水溶液に懸濁し 1×10^5 分生孢子/ml となるよう調整した。接種は葉柄部分で切断したサツマイモ葉の葉柄を黒斑病菌懸濁液に 30 秒間浸すこととした。葉柄の部分を水分を含んだ脱脂綿で覆い、26 ℃で 5 日間インキュベートした。5 日後、黒斑病菌の感染によって葉色の変化 (黄化) した面積を葉全体に対する面積比として算出した。接種は各系統から任意の 2 個体を選び、各個体 4 葉ずつ検定に供試した。試験は独立に 5 回行った。

(6) 過酸化水素の測定

高系 14 号野生型および *OsSBP* 過剰発現サツマイモから得たカルスを 40 ml の LS 液体培地で 26 ℃、継代培養した。培地中の過酸化水素濃度の測定は第二章の材料及び方法「(12) 過酸化水素の測定」に準じて行った。

(7) 抗酸化酵素の測定

抗酸化酵素活性の測定は高系 14 号および *OsSBP* 過剰発現サツマイモの培養細胞 0.4 g を用い、第二章の材料及び方法「(13) 抗酸化酵素の測定」に準じて行った。

(8) カタラーゼ遺伝子の発現解析

形質転換体におけるカタラーゼ遺伝子の発現解析はノザン解析により行った。プローブには Sakajo ら (1987) 報告分のサツマイモカタラーゼの配列をもとに下記のプライマーを作成した (Invitrogen)。

Cat プライマー配列：

5'-ATGCTGCTTCCGGTTAATGCC-3' / 5'-TTACATCGTCGGTCTTATGT-3'

高系 14 号ゲノムより PCR 反応により増幅し塩基配列を確認後、プローブとして用いた。ノザンハイブリダイゼーションはノザン解析に準じて行った。

第三節 結果

第一項 *OsSBP* のサツマイモ病害抵抗性への関与

(1) 形質転換体の作製

OsSBP のサツマイモへの病害抵抗性付与を調べるため、図 3-1A に示した発現ベクターを野生型高系 14 号に導入したセンス導入体を作製した。遺伝子導

入体は植物体に再生したものが 10 系統 (SBP-S1, S3, S6, S7, S8, S10, S12, S17, S19, S20) 当代の葉由来の培養細胞が 4 系統 (SBP-S3C, S7C, S12C, S17C) 得られた。植物体に再生した各系統からゲノム DNA を抽出しゲノムサザン解析を行った。制限酵素 *Xba* I 処理で切断が予想される導入 *OsSBP* 断片約 2.0 kb のバンドが全ての系統において確認された (図 3-1B)。また *Hind* III による切断で得られたバンドパターンから、各系統における導入コピー数は 2-6 コピー程度であると推定された (図 3-1B)。これらのセンス導入体から全 RNA を回収し *OsSBP* の転写量を調べたところ、植物体 2 系統 (SBP-S7, S17) で過剰量の mRNA の蓄積を確認した (図 3-2A)。また 5 系統 (SBP-S3, S6, S8, S10, S12) で過剰量ではないが *OsSBP* の mRNA の蓄積を認め、2 系統 (SBP-S19, S20) で殆ど mRNA の蓄積は認められなかった。植物体で過剰量の mRNA を確認した SBP-S7 および S17 由来の培養細胞 (SBP-S7C, S17C) も *OsSBP* の過剰発現を認め、植物体で mRNA の蓄積量が少なかった SBP-S3 および S12 由来の培養細胞 (SBP-S3C, S12C) は転写量が少なかった (図 3-2B)。尚、SBP-S1 は栽培途中で枯死したため、以降の解析には供試できなかった。他の全ての形質転換体は実験に用いた栽培条件において野生型と比べ、生育に違いは認められなかった (data not shown)。

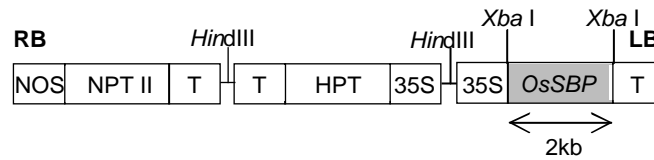
(2) 黒斑病に対する耐病性検定

OsSBP 遺伝子導入サツマイモ 9 系統についてサツマイモ黒斑病菌を接種し、*OsSBP* のサツマイモ抵抗性への関与を調べた。その結果、野生型高系 14 号は接種した葉柄基部から葉縁に向かって黄化していく著しい病徴が認められたのに対し、*OsSBP* の過剰発現を確認した 2 系統 (SBP-S7, SBP-S17) は明らかに病徴の進展を抑制する傾向が認められ (図 3-3)、病斑面積も有意に小さかった (図 3-4)。一方 *OsSBP* の mRNA 蓄積が殆どなかった 2 系統 (SBP-S19, S20) は野生型と同程度の病徴を示し (図 3-3)、病斑面積の測定でも野生型と同程度であった (図 3-4)。また過剰量ではないが *OsSBP* の転写蓄積があった 5 系統 (SBP-S3, S6, S8, S10, S12) のうち、SBP-S6, S8, S12 の 3 系統は野生型と同程度の病徴を示し、また SBP-S3 および S10 の病徴面積は野生型よりやや小さく SBP-S7, S17 と SBP-S19, 20 の中間の表現型を示すことがわかった (図 3-3, 3-4)。

(3) 活性酸素種の蓄積

イネにおいて耐病性を示した *OsSBP* 過剰発現体の培養細胞は CA 処理によ

A



B

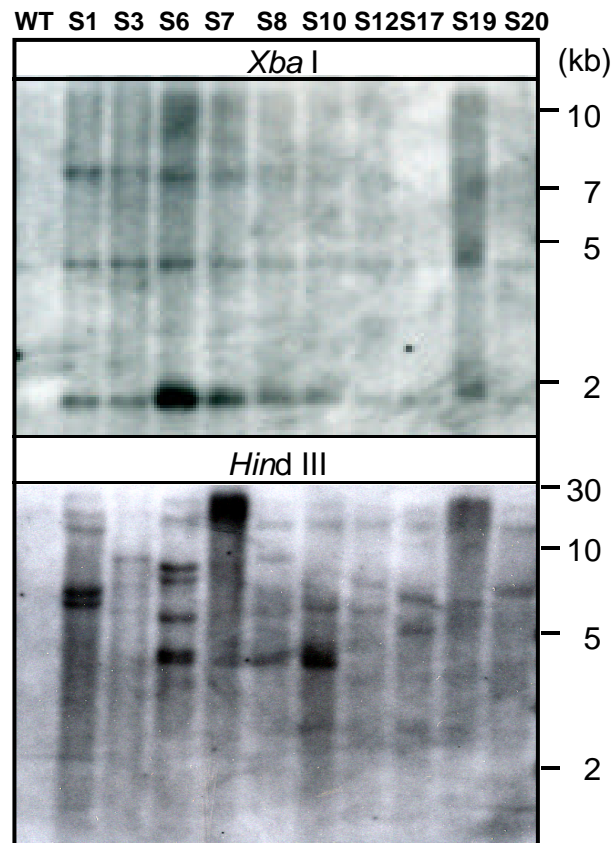
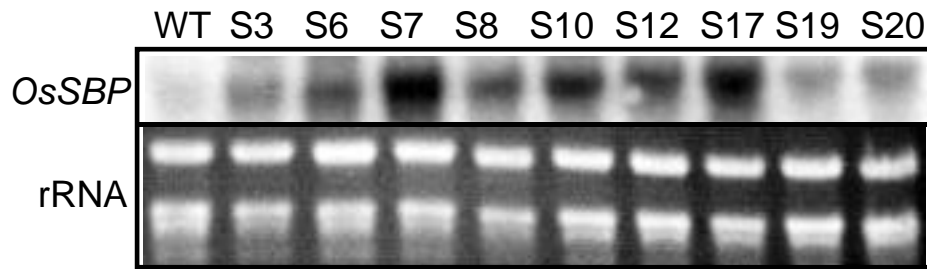


図 3-1 作成ベクターおよびセンス導入植物体における *OsSBP* の解析
 (A) pMSH2-センス *OsSBP* バイナリーベクター (B) *OsSBP* センス導入体のサザン解析 (*Xba* I および *Hind* III 切断によるパターン) S1—S20 はセンス導入体の各系統を示す。*OsSBP* cDNA 全長配列をプローブに用いた。

A



B

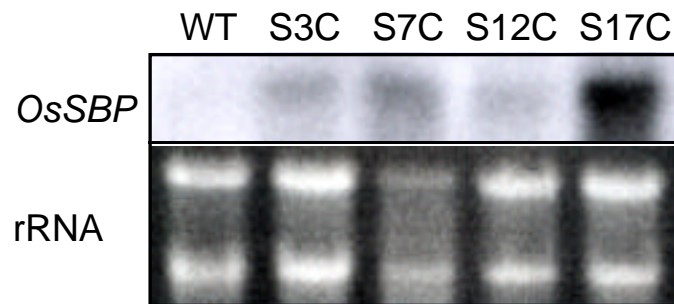


図 3-2 *OsSBP* センス導入体におけるノザン解析

OsSBP センス導入植物体のノザン解析 (B) *OsSBP* センス導入
培養細胞のノザン解析

植物体および培養細胞より抽出した全 RNA を供試した。S1—S20 および
S3C—S17C はセンス導入体の各系統を示す。*OsSBP* cDNA 全長配列をプ
ローブに用いた。

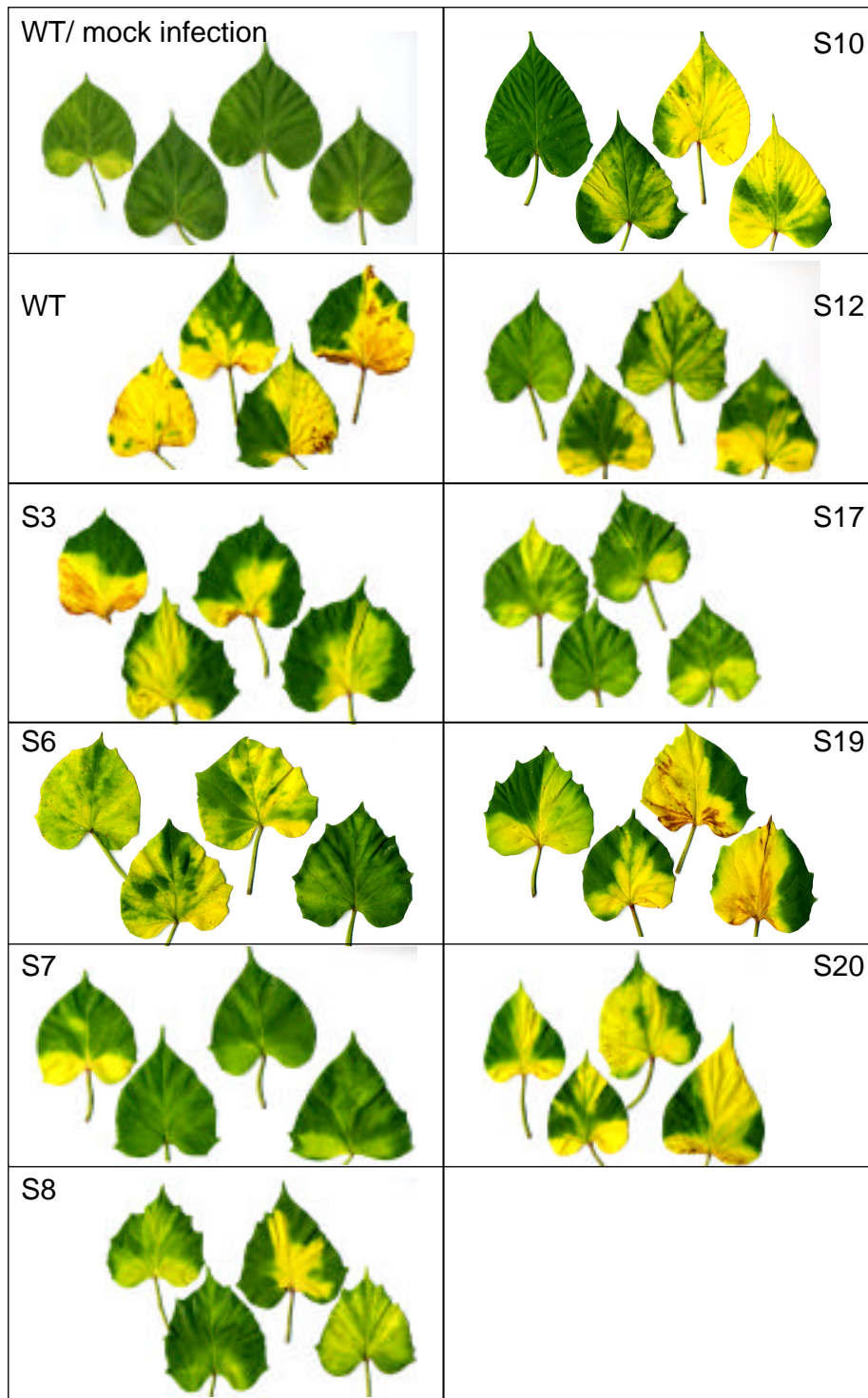


図 3-3 黒斑病菌接種に対する *OsSBP* センス導入体の表現型
 接種後 5 日目の病徴を観察した。mock infection は 0.01% Tween 20
 水溶液のみを処理した。S1—S20 はセンス導入体の各系統を示す。

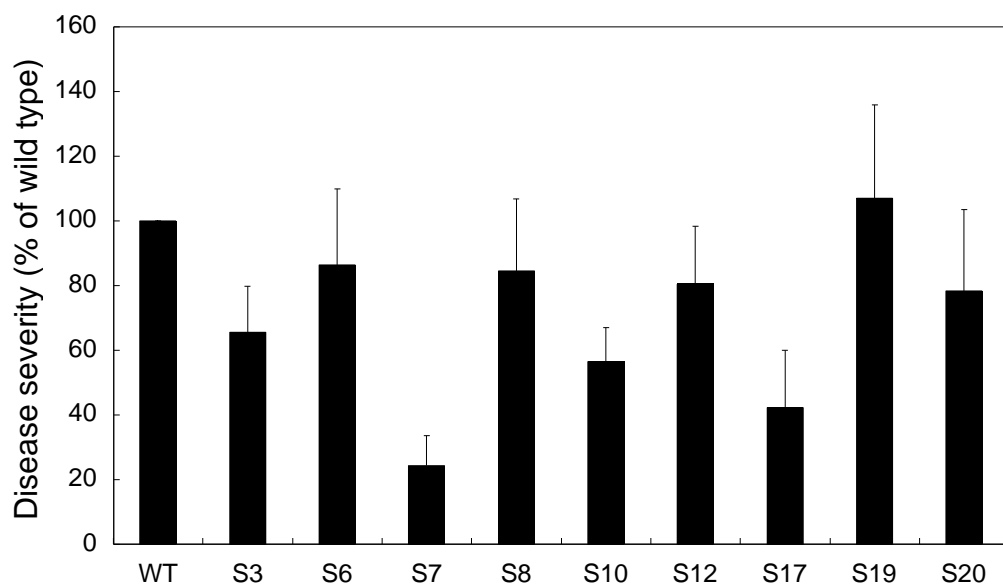


図 3-4 黒斑病菌接種時の *OsSBP* センス導入体の発病度合い
 接種後 5 日目の全葉面積における病斑面積を算出し、野生型の病徴を
 100 とした時の割合で表した。試験は独立に 5 回実施した。エラーバー
 は標準誤差を示す。S1—S20 はセンス導入体の各系統を示す。

り過酸化水素の生成量が増大することから、同様のことが *OsSBP* 過剰発現サツマイモにも認められるか調べた。耐病性の向上が顕著であった SBP-S7C および S17C と野生型培養細胞についてイネと同じ 1 μM の CA を場合、4 時間目までの培地中に放出される過酸化水素量は野生型および過剰発現体ともに経時的な増加は認められず、また野生型と過剰発現体の間にも顕著な違いはみられなかった (図 3-5A)。さらに 5 μM の CA 処理でも過酸化水素の増加は殆どみられず野生型と過剰発現体にも差異は認められなかった (図 3-5B)。

(4) 抗酸化酵素活性の測定

イネにおいて耐病性を示した *OsSBP* 過剰発現体の培養細胞は CA 処理後の抗酸化酵素である APX および CAT の酵素活性が野生型に比べ有意に低下していたことから、同様のことが *OsSBP* 形質転換サツマイモにも認められるかを調べた。耐病性の向上が顕著であった SBP-S7C および SBP-S17C と野生型培養細胞について、CA 処理前および処理後 4 時間目のそれぞれの酵素活性を調べた結果、野生型の APX および CAT は CA 処理前後においてイネにみられたような酵素活性の上昇は認められなかった (図 3-6A, 6B)。また SBP-S7C および SBP-S17C も CA 処理前後で両酵素活性にほとんど変化はなく、野生型との比較においても顕著な違いはみられなかった (図 3-6A, 6B)。

(5) カタラーゼ遺伝子の発現解析

イネにおいて耐病性を示した *OsSBP* 過剰発現体は CAT 遺伝子の mRNA 蓄積量が野生型に比べ減少していたことから、同様のことが *OsSBP* 形質転換サツマイモにも認められるかを調べた。耐病性の向上が顕著であった SBP-S7 および S17、病徴が野生型と同程度であった SBP-S6 および S19 の植物体の通常状態における CAT 遺伝子の転写量を調べた結果、SBP-S7 および S17 は *OsSBP* 過剰発現イネの場合と同様に野生型でみられる CAT 遺伝子の mRNA 量より減少していることがわかった (図 3-7)。一方、SBP-S6 および S19 の CAT 遺伝子の転写量は野生型に比べ有意な減少は認められなかった (図 3-7)。

第四節 考察

第一項 *OsSBP* の病害抵抗性への関与

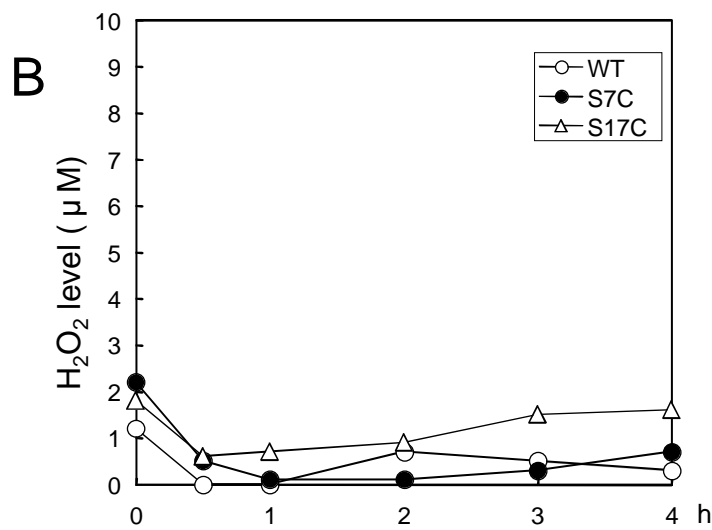
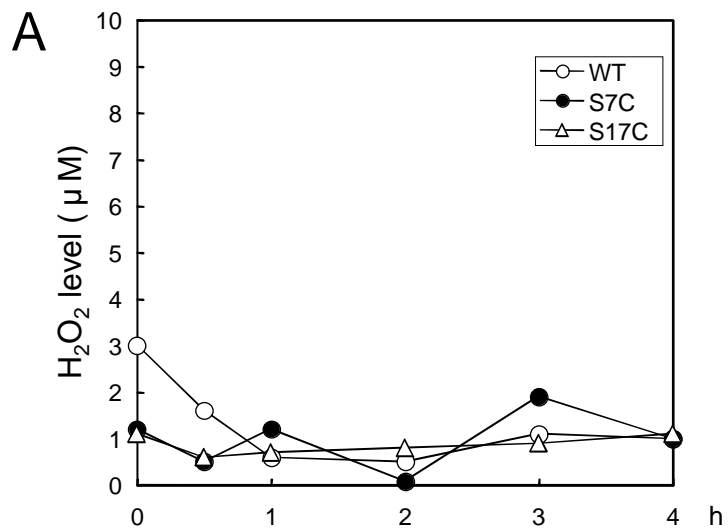


図 3-5 カリクリン A 処理時による *OsSBP* 過剰発現培養細胞の活性酸素生成

(A) 1 μM カリクリン A 処理による過酸化水素生成の経時的変化 (B) 5 μM カリクリン A 処理による過酸化水素生成の経時的変化。S7C および S17C は過剰発現体を示す。

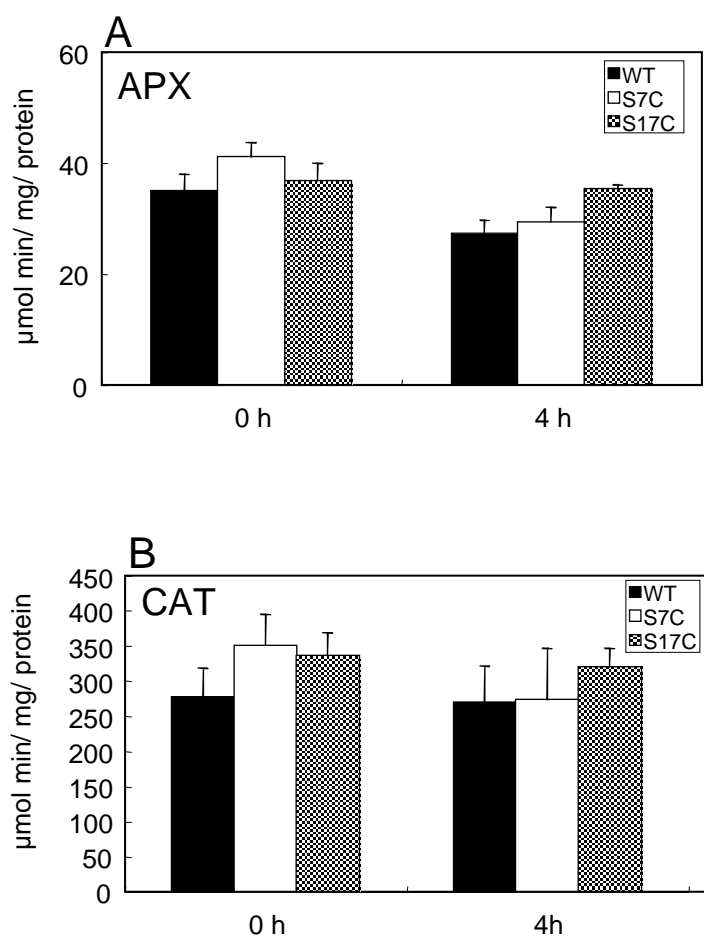


図 3-6 カリクリン A 処理時における OsSBP 過剰発現培養細胞の APX 及び CAT 活性

(A) カリクリン A 処理前および処理後 4 時間目の APX 活性 (B) カリクリン A 処理前および処理後 4 時間目の CAT 活性。実験はそれぞれ独立に 3 回行った。エラーバーは標準偏差を示す。S7C および S17C は過剰発現体を示す。

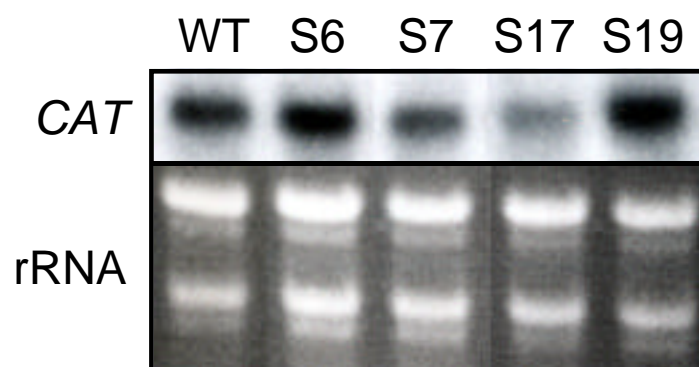


図 3-7 *OsSBP* センス導入体の CAT 遺伝子の発現解析
植物体から抽出した全 RNA を用いた。S6—S19 はセンス
導入体を示す。プローブは CAT 遺伝子の部分配列を用いた。

OsSBP 遺伝子を導入したサツマイモに黒斑病菌を接種した場合、*OsSBP* の mRNA が過剰量確認された SBP-S7 および S17 は野生型に比べ有意に病徴進展の抑制がみられた (図 3-3, 4)。また *OsSBP* の転写量が SBP-S7, S17 程ではなかった系統 (SBP-S3, S6, S8, S10, S12) は野生型よりやや病徴が軽減される程度か野生型とほぼ同程度を示したことから、イネ形質転換体でみられた耐病性向上と同様、黒斑病抵抗性は *OsSBP* の発現量に依存していると考えられる。黒斑病は塊茎における重要病害であることから、今回実施した葉柄切断面に黒斑病を接種する方法が塊茎における病害抑制を反映しているかが問題となるが、葉柄接種法と塊茎接種法の相関性を調べたところ、両者は相関することが報告されており (Tanaka et al., 2003) 本研究で明らかになった *OsSBP* のサツマイモへの耐病性付与の知見はサツマイモ塊茎の病害防除にも適用できると考えられる。

第二項 OsSBP のサツマイモ病害抵抗性における機能推定

OsSBP はサツマイモにおいてもイネと同様の働きにより黒斑病抵抗性を向上させるのであろうか。黒斑病菌には宿主植物の品種に対応したレースは見いだされておらず、種のレベルで各種の菌株が存在し、黒斑病菌に対するサツマイモの抵抗性あるいは罹病性は各種菌株のレベルで成り立つと言われている。従って、サツマイモはサツマイモ菌株に対して多少とも親和的關係にあり、サツマイモと黒斑病菌の場合真性抵抗性遺伝子のような単一の遺伝子によって抵抗性が決定されるのではなく、ファイトアレキシンの生成蓄積や PR タンパク質の産生など複数の抵抗性関連遺伝子の総和により抵抗性が決定されることが考えられている (川北ら、2001)。サツマイモのファイトアレキシンとしてはイポメアマロン (Ipomoeamaron) が有名である (久保田ら 1952)。イポメアマロンは黒斑病菌の感染部位で生成される苦味成分として分離されたことから、黒斑病抵抗性の指標として有用であると考えられる。またサツマイモの PR 遺伝子が単離されたという報告は現在までになく、ストレス応答遺伝子としてイポメリン (Ipomoelin) 遺伝子が報告されている程度である (Imanishi et al., 1997) が、イポメリンは JA 処理や傷害により転写が活性化されることが明らかになっていることから (Jih et al., 2003) 病害応答にも関わる可能性が示唆され耐病性応答の指標になりうるかもしれない。しかしながら、本研究ではこれらの抵抗性関連物質や遺伝子を指標とした耐病性向上の確認実験は行っておらず、OsSBP がこれらの生成や転写活性化に関与しているか否かは今後の解析が待

たれる。サツマイモの培養細胞系で CA 処理時における過酸化水素の生成量を調べたが、野生型および過剰発現体ともに処理後 4 時間目まで過酸化水素の培地中への蓄積は認められなかった (図 3-5)。また CA 以外にもプロテインフォスファターゼ阻害剤である cantharidin 処理も試みたが、CA 同様、過酸化水素の生成は見られなかった (data not shown)。サツマイモと CA については葉にショ糖処理することで転写が活性化される β -アミラーゼ遺伝子や貯蔵タンパク質遺伝子であるスポラミン遺伝子が CA を前処理することで転写されなくなるという報告があり (Takeda et al., 1994)、CA がサツマイモでも脱リン酸化酵素 1 および 2A に作用することが明らかにされている。今回行った培養細胞系での CA 処理では Takeda らの処理濃度 (2 μ M) よりも高い 5 μ M でも過酸化水素の蓄積は認められず (図 3-5B)、原因は明らかでないが用いた培養細胞が脱分化直後のものであったため、何らかのストレスを受け正常な生理状態でなかったためかもしれない。CA 処理により活性酸素生成が認められなかったことは、野生型と形質転換体において CA 処理後の APX 活性と CAT 活性に違いがみられなかった結果 (図 3-6) と一致する。従って、培養細胞系での CA 処理による解析からはサツマイモにおける OsSBP がイネと同様に機能しているか否かは明確にできなかった。しかしながら、少なくとも過剰発現植物体における CAT 遺伝子の転写量は野生型に比べて明らかに低下しており (図 3-7)、イネで認められた結果と一致することから OsSBP がサツマイモにおいても同様に抗酸化酵素活性の抑制を通じ耐病性向上に関与している可能性は残された。

以上、今後は OsSBP のより詳細な機能解析が必要であるが、OsSBP を遺伝子導入した形質転換サツマイモは黒斑病に対して耐病性が向上することから、OsSBP はイネのみならず他の植物にも耐病性を付与しうることが示唆され、有用作物の分子育種への応用にも役立つものと結論する。

総合考察

本研究はイネいもち病菌から単離された、ファイトアレキシンの蓄積や各種 PR 遺伝子の転写活性化を誘導することが知られているセレブロシドエリシターを利用し、新規のイネ病害抵抗性関連遺伝子を単離し、その機能解析および有用性を検討することを目的とした。

第一章ではエリシター処理により転写が活性化される遺伝子のうち機能未知の遺伝子をいくつか単離したが、それらは実際にイネいもち病菌を接種した場合にも転写が活性化されることがわかった。そのうちの一つであるイネセレンウム結合タンパク質をコードすると思われる遺伝子 *OsSBP* (*Oryza sativa* selenium binding protein) はバクテリア、線虫、昆虫、動物、植物から相同遺伝子が報告されており、動物において腫瘍形成の抑制や生体異物の解毒に関与するという報告や、植物においてはアブシジン酸を処理したヒメツリガネゴケで転写が活性化されることやミヤコグサの根に形成された根粒で転写活性化が認められるとの報告があり、機能は未知だが耐病性、ストレス応答、微生物応答等の広く生物種に保存された重要な機能を有する遺伝子であると考えられた。そこで第二章では *OsSBP* を恒常発現させた形質転換イネを作成し、イネいもち病菌およびイネ白葉枯病菌に対する耐病性検定を行い病害抵抗性との関連を調べた。その結果、過剰発現体に親和性いもち病菌を接種した場合、野生型に比べ有意な病徴進展の抑制がみられた。また親和性イネ白葉枯病菌の接種においても過剰発現体は野生型に比べ有意に病徴進展を抑制し、葉中の白葉枯病菌増殖抑制もみられ、*OsSBP* がイネいもち病菌だけでなく、より広範囲にイネの病害抵抗性に関与していることが示唆された。

OsSBP の機能を推定するため、イネいもち病菌親和性レース接種後のファイトアレキシン (モミラクトン A) の蓄積を調べたところ、過剰発現体は野生型の 20-25 倍量の蓄積があった。また防御遺伝子の発現解析から、*PBZI* および *PR1* の 2 つの PR 遺伝子もいもち病菌接種に応答して野生型よりも早く転写活性化がおこり、転写量も増大していることがわかった。NADPH オキシダーゼにより生成される活性酸素種が PR 遺伝子の発現やファイトアレキシン生成を活性化することから、培養細胞系を用い NADPH オキシダーゼ脱リン酸化阻害剤のカリクリン A (CA) 添加時に培地中に放出される過酸化水素を調べたところ、過剰発現体は野生型に比べ有意な過酸化水素量の増大がみられた。このことから *OsSBP* 過剰発現体でみられたいもち病菌接種時のファイトアレキシン生成促進や PR 遺伝子の転写活性化は活性酸素種量の増大に起因するものと考えられた。植物は病原菌の感染により活性酸素種の生成と並行して活性酸

素種を消去する抗酸化酵素の活性を一時的に低下させることから、過剰発現体でみられた活性酸素種の増大も同様の機構に因るものかを調べるため、主要な活性酸素種消去酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) とカタラーゼ (CAT) の酵素活性を測定した。その結果、CA 処理後の両酵素活性は野生型に比べ有意に低下しており、過剰発現体の APX および CAT の酵素活性は CA 処理前後で殆ど違いがないことが明らかになった。

さらに第三章では *OsSBP* がイネ以外の植物でも同様の機能を示すかを調べるため、*OsSBP* 形質転換サツマイモを作成し、重要病害の黒斑病菌に対する耐病性検定を行った。その結果、*OsSBP* の過剰発現が認められた複数の系統で野生型に比べ病徴進展の遅延を観察した。また過剰発現体の CAT 遺伝子の転写量は野生型に比べ低下していることが明らかとなり、*OsSBP* はイネ以外の植物でも抗酸化酵素活性の抑制を通じ耐病性向上に関与することが示唆された。

以上のことから、*OsSBP* は植物全般に病害抵抗性を付与しうることを示す有用な遺伝子であると考えられ、本研究成果は植物分子育種の基礎および応用に貢献するものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科新名惇彦教授に謹んで感謝申し上げます。本研究に適切な御助言、御指導を頂きました奈良先端大島本功教授ならびに川崎努助教授に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行する機会を与えて下さいました出光興産株式会社小野勝弘元取締役常務ならびに竹内尚武中央研究所長に心より御礼申し上げます。本研究の出発となったセレブロシドエリクターによる遺伝子スクリーニングを支持していただきました株式会社明治製菓岩田道顕博士に心より御礼申し上げます。白葉枯病菌の分譲ならびに接種試験のご指導を快くお引き受け下さいました吉村智美博士に深く感謝いたします。ファイトアレキシンの定量を快くお引き受け下さいました茨城大学児玉治教授ならびに長谷川守文博士に深く感謝いたします。抗酸化酵素活性の測定法をご教授頂きました近畿大学重岡成教授ならびに藪田行哲博士に深く感謝いたします。また形質転換サツマイモを作製していただいた石川県立農業短期大学島田多喜子教授ならびに大谷基泰助教授に深く感謝いたします。形質転換イネ作製の技術的指導を頂きました奈良先端大延原美香氏に御礼申し上げます。さらに実験を補佐して頂いた奈良先端大集中研究室徳田玲奈氏ならびに亀山淳子氏に心より感謝申し上げます。研究の方向性を討論して頂きました奈良先端大 Wong Hann Ling 氏ならびに終始叱咤激励を頂きました出光興産株式会社盛満耕造環境バイオ研究室長および鈴木源土主任研究員はじめ研究室の皆様心より御礼申し上げます。また日々の研究遂行に明るい環境を提供して下さった瀧田英司博士はじめ奈良先端大集中研究室の皆様ならびに植物代謝調節学講座の皆様心から感謝致します。そして本研究に対し終始有益な御助言と温かいご配慮を賜りました奈良先端大 吉田和哉助教授ならびに河内孝之助教授に心より御礼申し上げます。

最後に日々の生活の拠り所である父母兄ならびに妻子に心から感謝します。

参考文献

- Anderson, M. D., Prasad, T. K., Martin, B. A., and Stewart, C. R (1994). Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. *Plant Physiol.* 105, 331-339.
- Baldwin, J. A. S. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-683.
- Bansal, M. P., Oborn, C. J., Danielson, K. G., and Medina, D. (1989). Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* 10, 541-546.
- Bansal, M. P., Tapas, M. J. S., Richard G. C., Ratna, M., and Daniel, M. (1990). DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention. *Carcinogenesis* 11, 2071-2073
- Bartolone, J. B., Raymond B. B., Bulera, S. J., Bruno, M. Y., Nishanian, E. V., Cohen, S. D., and Khairallah, E. A. (1992). Purification, Antibody Production, and Partial Amino Acid Sequence of the 58-kDa Acetaminophen-Binding Liver Proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 113, 19-29
- Beat, K. (1993). Structural Cell Wall Proteins. *Plant Physiol.* 101, 1127-1130
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 376, 167-169.
- Bellaire, B. A., Carmody, J., Braud, J., Gossett, D. R., Banks, S. W., Lucas, M. C., and Fowler, T. E. (2000). Involvement of abscisic acid-dependent and -independent pathways in the upregulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. *Free Radic Res.* 33, 531-545.
- Besse, I., Wong, J. H., Kobrehel, K., and Buchanan, B. B. (1996). Thiocalcin: A thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 93, 3169-3175.

Bower, M. S., Matias, D. D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S. J., and Gring, D. R. (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a brassica S locus receptor kinase. *Plant Cell* 8, 1641-1650.

Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savoure, A., Verbruggen, N., Montagu, M. V., and Inze, D. (1998). Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci.* 138, 27-34.

Bushdid, P. B., Brantley, D. M., Yull, F. E., Blaeuer, G. L., Hoffman, L. H., Niswander, L., and Kerr, L. D. (1998). Inhibition of NF- κ B activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature* 392, 615-618.

Cartwright, D., Langcake, P., Pryce, D. P., Leworthy, D. P., and Ride, J. P. (1977). Chemical activation of host defense mechanisms as a basis for crop protection. *Nature* 267, 511-513.

Chambell, M. A., Fitzgerald, H. A., and Ronald, P. C. (2002). Engineering pathogen resistance in crop plants. *Transgenic Research* 11, 599-613.

Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883-1886.

Chen, Z., Iyer, S., Caplan, A., Klessig, D. F., and Fan, B. (1997). Differential Accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* 114, 193-201.

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

Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1991-1995.

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.

Datta, K., Tu, J., Oliva, N., Ona, I. I., Velazhahan, R., Mew, T. W., Muthukrishnan, S., and Datta, K. (2001). Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci.* 160, 405-414.

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.

DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388, 548-554.

Dieter, H., Mazarei, M., and Baum, T. J. (1998). Differential Display Analysis of the Early Compatible Interaction Between Soybean and the Soybean Cyst Nematode. *Mol. Plant-Microbe Interact* 11, 1258-1263

Dinesh-Kumar, S. P., Whitham, S., Choi, D., Hehl, R., and Corr, C. (1995). Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Its possible role in the TMV-*N*-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4175-4180.

Dorey, S., Baillieul, F., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffman, S. (1998). Tobacco class I and II catalases are differentially expressed during elicitor-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 1102-1109.

Durner, J., and Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 92, 11312-11316.

Elmayan, T., and Vaucheret, H. (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced posttranscriptionally. *Plant J.* 9, 787-797.

Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316-323.

Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509-520.

Flemetakis, E., Agalou, A., Kavroulakis, N., Dimou, M., Martsikovskaya, A., Slater, A., Spaink, H. P., Roussis, A., Katinakis, P. (2002). *Lotus japonicus* gene *Ljsbp* is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian selenium-binding proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 313-322.

Ganesan, V., and Thomas, G. (2001). Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. *Plant Science* 160, 1095-1106.

Gong, M., Li, Y. J., and Chen, S. Z. (1998). Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *J. Plant Physiol.* 153, 488-496.

Guan, L. and Scandalios, J. G. (1998). Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. *Physiol. Plant* 104, 413-422.

Guan, J., Zhao, J.G. and Scandalios, J. G. (2000). *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J.* 22, 87-95.

Gulesserian, T., Engidawork, E., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2001). Antioxidant

proteins in fetal brain: superoxide dismutase-1 (SOD-1) protein is not overexpressed in fetal Down syndrome. *J. Neural Transm.* 61, 71-84.

Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. G., Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791 (1996).

Hayakawa, T., Zhu, Y., Itoh, K., Kimura, Y., Izawa, T., Shimamoto, K., and Toriyama, S. (1992). Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9865-9869.

Hayashi, T., Ueno, Y., and Okamoto, T. (1993). Identification of a new serine kinase that activates NF- κ B by direct phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 268, 11380-11388.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-282

Imanishi, S., Nakamura, K. K., Matsuoka, K., Morikami, A., and Nakamura, K. (1997). A major jasmonate-inducible protein of sweet potato, ipomoelin, is an ABA-independent wound-inducible protein. *Plant Cell Physiol.* 38, 643-652.

Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., and Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109.

Jacquot, J-P., Lopez-Jaramillo, J., Miginiac-Maslow, M., Lemaire, S., Cherifils, J., Chueca, A., and Lopez-George, J. (1997). Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1, 6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 401, 143-147.

Jiang, M., and Zhang, J. (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol.* 42, 1265-1273.

Jiang, H. W., Dian, W. M., Liu, F. Y., and Wu, P. (2003). Cloning and characterization

of a glucose-6-phosphate/phosphate translocator from *Oryza sativa*. *J Zhejiang Univ Sci.* 4, 331-335.

Jih, P. J., Chen, Y. C., and Jeng, S. T. (2003). Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato. *Plant Physiol.* 132, 381-389.

Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A. and Flugge, U.I. (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: The glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10, 105-117.

Kanegae, Y., Tavares, A. T., Belmonte, J. C. I., Verma, I. M. (1998). Roles of Rel/ NF- κ B transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature* 392, 611-615.

Kauffman, H. E., Reddy, A. P. K., Hsieh, S. P. V., and Marca, S. D. (1973). An improved technique for evaluation of resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Dis. Rep.* 57, 537-541.

Kauss, H., Jeblick, W., Ziegler, J., and Krabler, W. (1994). Pretreatment of Parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. *Plant Physiol.* 105, 89-94.

川北一人(2001). 病傷害に対する植物の応答と情報伝達 「ストレスの植物生化学・分子生物学」(瓜谷郁三編著) 151-191.

Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., and Shimamoto, K. (1999). The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 10922-10926 .

紀藤圭治、伊藤隆司、榊佳之 (1995). 蛍光ディファレンシャルディスプレイ(FDD)法. 細胞工学 14, 6, 86-92

Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Kikuchi, M., and

- Ogasawara, N. (1998). Cerebrosides A and C, Sphingolipid Elicitors of Hypersensitive Cell Death and Phytoalexin Accumulation in Rice Plants. *J. Biol. Chem.* 273, 31985-31991
- Kuchitsu, K., Kosaka, H., Shiga, T., and Shibuya, N. (1995). EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 188, 138-142.
- Lanfear, J., Fleming, J., Walker, M., and Harrison, P. (1993). Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14, 335-340
- Loon, L. C. V., and Strien, E. A. V. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparable analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97.
- Low, P. S., and Merida, J. R. (1996). The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant* 96, 533-542.
- Luc, D., Frendo, P., and Burkard, G. (1992). Stress responses in maize: Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol. Biol.* 18, 847-849
- Machuka, J., Bashiardes, S., Ruben, E., Spooner, K., Cuming, A., Knight, C. and Cove, D. (1999). Sequence analysis of expressed sequence tags from an ABA-treated cDNA library identified stress response genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 40, 378-387.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J (1982). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Matsumoto, K., Suzuki, Y., Mase, S., Watanabe, T. and Sekizawa, Y. (1980). On the relationship between plant hormones and rice blast resistance. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 46, 307-314.

Meyer, Y., Verdoucq, L., and Vignol, F. (1999). Plant thioredoxins and glaredoxins: Identity and its putative roles. *Trends Plant Sci.* 4, 388-394.

Midoh, N., and Iwata, M. (1997). Expression of Defense-related Genes by Probenazole or 1,2-Benzisothiazole-3(2H)-one 1,1-dioxide. *J. Pesticide Sci.* 22, 45-47

Mittler, R., Feng, X., and Cohen, M. (1998). Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10, 461-473.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.

Miyagawa, Y., Tamoi, M., and Shigeoka, S. (2000). Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 41, 311-320.

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

Mourgues, F., Brisset, M-N., and Chevreau, E. (1998). Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotech.* 16, 203-210.

中村研三 (2001). サツマイモの遺伝子組換え育種「ストレスの植物生化学・分子生物学」(瓜谷郁三編著) 265-280.

Nishizawa, Y., Saruta, M., Nakazono, K., Nishio, Z., Soma, M., Yoshida, T., Nakajima, E., and Hibi, T. (2003). Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *Gns1*. *Plant Mol. Biol.* 51, 143-152.

Neuhaus, J. M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S., and Meins, F. J. (1991). High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol. Biol.* 16, 141-151.

Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M., and Hibi, T. (1999). Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor. Appl. Genet.* 99, 383-390.

Nishizawa, Y., Saruta, M., Nakazono, K., Nishio, Z., Soma, M., Yoshida, T., Nakajima, E., and Hibi, T. (2003). Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *Gns1*. *Plant Mol. Biol.* 51, 143-152.

Ohira, K., Ojima, K., and Fujiwara, A. (1973). Studies on the nutrition of rice cell culture 1. A sample, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14, 1113-1121.

Otani, M. and Shimada, T., (1988). Callus formation and root differentiation by protoplasts from cultured cells of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *植物組織培養* 5, 26-28.

Otani, M., Shimada, T., Kimura, T., and Saito, A. (1998). Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol.* 15, 11-16.

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

Okamoto, T., Ogiwara, H., Hayashi, T., Mitsui, A., Kawabe, T., and Yodoi, J. (1992). Human thioredoxin/ adult T cell leukemia-derived factor activates the enhancer binding protein of human immunodeficiency virus type 1 by thiol redox control mechanism. *Int. Immunol.* 4, 811-819.

Ono, E., Wong, H. L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., and Shimamoto, K. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 759-764 .

- Pei, Z. M., Murata, N., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G. J., Grill, E., Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406, 731-734.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., Samblanx, G. W. D., Buchaia, A., Metraux, J. P., Manners, J. M., and Broekaert, W. F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8, 2309-2323.
- Pinto, Y. M., Kok, R. A., and Baulcombe, D. C. (1999). Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nat. Biotechnol.* 17, 702-707.
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., and Stewart, C. R. (1994). Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105, 619-627.
- Pumford, N. R., Martin, B. M., and Hinson, J. A. (1992). A Metabolite of Acetaminophen Covalently Binds To The 56 kDa Selenium Binding Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 1348-1355
- Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., and Meeuse, B. J. D. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Ann. Bot.* 66, 369-373.
- Reymond, P., and Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404-411.
- 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 B. *Plant Cell* 9, 425-439.
- Sakajo, S., Nakamura, K., and Asahi, T. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for sweet potato catalase mRNA. *Eur. J. Biochem.* 165, 437-442.

- Sakamoto, A., Okumura, T., Kaminaka, H., Sumi, K., and Tanaka, K. (1995). Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, *SodCc1* and *SodCc2*, in rice protoplasts. *FEBS Lett.* 358, 62-66.
- Sani, B. P., Woodard, J. L., Pierson, M. C., Allen, R. D., 1988. Specific binding proteins for selenium in rat tissues. *Carcinogenesis* 9, 277-284.
- Sawada, K. and Iwata, M. (2002). Isolation of blast fungal cerebroside elicitor-responsive genes in rice plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 68, 128-133.
- Sawada, K., Tokuda, L., and Shinmyo, A. (2003). Characterization of the rice blast fungal elicitor-responsive gene *OsSBP* encoding a homolog to the mammalian selenium-binding proteins. *Plant Biotechnol.* 20, 177-181.
- Sawada, K., Hasegawa, M., Tokuda, L., Kameyama, J., Kodama, O., Kohchi, T., Yoshida, K., and Shinmyo, A. (2004). Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing *OsSBP*, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.
- Schweizer, P., Buchala, A., Dudler, R., and Metraux, J-P. (1998). Induced systemic resistance in wounded rice plants. *Plant J.* 14, 475-481.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Metraux, J-P., and Raskin, I. (1995). Salicylic acid in rice biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiol.* 108, 633-639.
- Showalter, A. M., Zhou, J., Rumeau, D., Worst, S. G., and Varner, J. E. (1991). Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding. *Plant Mol. Biol.* 16, 547-565
- Singh, S., Sidhu, J. S., Huang, N., Vikal, Y., Li, Z., Brar, D. S., Dhaliwal, H. S., and Khusu, G. S. (2001). Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor. Appl.*

Genet. 102, 1011-1015.

Smith, C. J. (1996). Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* 132, 1-45.

Song, W-Y., Wang, G-L., Chen, L-L., Kim, H-S., Pi, L-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W-X., Zhu, L-H., Fauquet, C., and Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270, 1804-1806

Storz, G., Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opin. Microbiol.* 2, 188-194.

Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H., and Shimamoto, K. (2002). The heteromeric G protein β subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 13307-13312.

Takahashi, A., Kawasaki, T., Henmi, K., Shii, K., Kodama, O., Satoh, H., and Shimamoto, K. (1999). Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J.* 17, 535-545 .

Takeda, S., Mano, S., Ohto, M., and Nakamura, K. (1994). Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol.* 106, 567-574.

Tamogami, S., Rakwal, R., Kodama, O. (1997). Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* 401, 239-242.

Tanaka, T., Imaeda, T., Muramoto, N., Shimamura, T., Mitsukawa, N., Hori, E., and Hirai, M. (2003). Modification of the antimicrobial peptide gene and its application for the resistant plants (2). The 26th Annual meeting of the molecular biology society of Japan. Program and Abstracts 793.

Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester,

A., Rees, S. B., Torrekens, S., Leuven, F. V., Vanderleyden, J., Cammue B. P. A., and Broekaert, W. F. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish; their role in host defense. *Plant Cell* 7, 573-588.

Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Vogelsang, B. M-M. 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 microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15107-15111.

Umemura, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., Iwata, M., Shimura, M. and Koga, J. (2000). Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens active defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol.* 41, 676-683.

瓜谷郁三(2001). サツマイモの病傷害に伴うファイトアレキシンの生成・変換「ストレスの植物生化学・分子生物学」(瓜谷郁三編著) 87-122.

Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, A. C., Cook, J. R., and Browse, J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7209-7214.

Wang, G. L., Song, W. Y., Ruan, D. L., Sideris, S., and Ronald, P. C. (1996). The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Mol. Plant-Micorbe Interact.* 9, 850-855.

Wang, Z. X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., and Hayasaka, H. (1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.* 19, 55-64.

Whitham, S., McCormick, S., and Baker, B. (1996). The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8776-8781.

Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Conner, T. W., Klee, H. J. (1995). Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain

reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27, 1097-1108

Williamson, J. D. and Scandalios, J. G. (1992). Differential response of maize catalase to abscisic acid: *Vp1* transcriptional activator is not required for abscisic acid-regulated *Cat1* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8842-8846.

Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nietro-Rostro, M., Turner, J. G. (1998). *Col 1*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094.

築瀬澄乃、森田賢一、石井直明(1996). アガロースゲルを用いた簡便な RAP-PCR differential display 法 実験医学 14, 18, 89-92

Yoshida, K., Naito, S., and Takeda, G. (1994). cDNA cloning of regeneration-specific genes in rice by differential screening of randomly amplified cDNAs using RAPD primers. *Plant Cell Physiol.* 35, 1003-1009

吉川良恵、武田理、向井博之、日野文嗣 (1996). Differential Display 法の原理と実際. 細胞工学 15, 12, 1780-1787

Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Zi-X., Kono, I., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N., and Sasaki, T. (1998). Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 1663-1668.

Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91, 243-252.

Zhang, H., Zhang, R., and Liang, P. (1996). Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucl. Acids. Res.* 24, 2454-2455

論 文 目 録

推薦教官	新名 惇彦教授（バイオサイエンス研究科植物代謝調節学）		
氏 名	澤田 和敏	提 出	平成16年1月6日
<p>学位論文の主たる部分を公表した論文 （題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ）</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Isolation of blast fungal cerebroside elicitor-responsive genes in rice plants. <u>Sawada, K.</u> and Iwata, M. (2002). <i>J. Gen. Plant Pathol.</i> 68:128-133. 2. Characterization of the rice blast fungal elicitor-responsive gene <i>OsSBP</i> encoding a homolog to the mammalian selenium-binding proteins. <u>Sawada, K.</u>, Tokuda, L., and Shinmyo, A. (2003). <i>Plant Biotechnol.</i> 20 (2): 177-181. 3. Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing <i>OsSBP</i>, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins. <u>Sawada, K.</u>, Hasegawa, M., Tokuda, L., Kameyama, J., Kodama, O., Kohchi, T., Yoshida, K., and Shinmyo, A. (2004). <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> in press. 4. Overexpression of <i>OsSBP</i> confers enhanced resistance to <i>Ceratocystis fimbriata</i> in sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.). <u>Sawada, K.</u>, Otani, M., Kasukabe, Y., Kameyama, J., Tokuda, L., Shimada, T., Kohchi, T., Yoshida, K., and Shinmyo, A. in preparation. <p>参考論文（題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ）</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 耐病性遺伝子 澤田和敏、岩田道顕（株式会社植物防御システム研究所） H11-153146（出願番号） 2000-342262（公開番号） 2. 病害抵抗性イネ 澤田和敏（出光興産株式会社）、島本功、新名惇彦（奈良先端科学技術大学院大学） 2001-080412（出願番号） 2002-272291（公開番号） 3. 植物の生育に支障をきたす物質に対する耐性が高められた植物の製造法、澤田和敏（出光興産株式会社）、新名惇彦（奈良先端科学技術大学院大学） 2001-155444（出願番号） 2003-9690（公開番号） 4. 病害抵抗性サツマイモ 澤田和敏（出光興産株式会社）、新名惇彦（奈良先端科学技術大学院大学） 出願準備中 5. 植物の栽培方法 鳴滝昭彦、宮本人、澤田和敏（出光興産株式会社） 平 6-106169（出願番号） 平 7-289085（公開番号） 6. Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi Bahia grass(<i>Paspalum notatum</i> Flugge.) roots. Ishii, T., Narutaki, A., <u>Sawada, K.</u>, Aikawa, J., Matsumoto, I., and Kadoya, K. (1997). <i>Plant and Soil.</i> 196: 301-304. 			