

タバコモザイクウイルス感染による
過敏反応の情報伝達

植田 浩一
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物細胞工学講座
(佐野 浩 教授)

平成18年 1月30日提出

目次

題名 1

序論 3

第 1 章

「N 因子による p50 の認識機構の解析」

はじめに 6

材料と方法 7

結果 11

考察 24

第 2 章

「N 因子から始まる情報伝達経路の解析」

はじめに 26

材料と方法 28

結果 37

考察 59

総括 67

謝辞 69

参考文献 70

序論

植物は一度根を下ろしてしまふと、二度と生活の場を変える事が出来ない。そのため、環境ストレスに対してその場で敏感に応答し、適応しなければならない。そのため、植物は様々な環境応答システムを発達させてきた。しかし、動物の様に移動出来ず、免疫機構も持たない植物の環境応答システムにはいまだに不明な点が多い。

環境ストレスの中でも病害は深刻なストレスである。植物が病原菌に感染すると、病原菌によるダメージを受けるだけでなく、病気を治すために生育に必要なエネルギーを費やす。このため病害は作物にとって、収穫量の大幅な減少を招く問題になっている。そのため、植物がどのように病原菌から身を守る抵抗性を発揮しているのかを研究する事は、研究上の知的好奇心を満たすだけでなく、食料増産にも繋がる重要な課題である。

植物は感染した病原菌に対して様々な抵抗性を発揮して、その場で迅速に病原菌を排除しようとする。この植物による抵抗性は、病原菌によってそれぞれ違っている。その中でも植物にとって重大な病害を及ぼす特定の病原菌に対して、植物は特異的な抵抗性を発達させてきた。特定の病原菌に感染した植物は、感染部において病原菌を自らの細胞内に封じ込めたまま積極的に細胞死を起こし、病原菌を限られた範囲に封じ込める事によりそれ以上の蔓延を防ぐ。この病原菌に対する細胞死を起こす一連の応答を過敏反応 (Hypersensitive Response : HR)と呼ぶ。一般的に HR は次の様な現象を伴う。①細胞膜上の NADPH 酸化酵素の働きによって産出された O_2^- からの H_2O_2 の生産、②細胞内への Ca^{2+} の流入、③細胞外への Cl^- , K^+ の流出、④MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) の活性化、⑤防御関連遺伝子の発現誘導である (Greenberg, 1997)。これらの現象から最終的に感染部位を中心とした細胞死に至る。HR とは、動きの少ない植物の環境に対する最も動的で積極的な反応の一つである。

HR を起こすには、宿主植物の持つ抵抗性遺伝子産物 (Resistance gene :R) と、R に合致する病原菌の持つ非病原性遺伝子産物 (Avirulence gene :Avr) がともに存在する事が必要である (Jones and Jones, 1996; Hammond-Kosack and Jones, 1997; Lauge and De Wit, 1998)。この R と Avr によって抵抗性が決定する機構を gene-for-gene 説と言い (Flor, 1942, 1971)、R と Avr のどちらかが欠けても HR は起こらない (図 1)。R には、NBS/LRR タイプ、タンパク質キナーゼ (Kin) タイプ、膜貫通

領域 (Transmembrane :TM)/LRR タイプ、Kin/TM/LRR タイプ、Kin/TM タイプの大きく 5 つのクラスがあり、TM を持つものは細胞膜上に、TM を持たないものは細胞質に存在している (Dangl and Jones, 2001)(図 2)。これに対して病原菌の持つ Avr は特定のタイプがなく、ウィルスの外殻タンパク質やバクテリアの注入タンパク質等、様々なタンパク質である。タバコとタバコモザイクウイルス (TMV) の場合、タバコの NBS/LRR タイプのタンパク質である N 因子が R、TMV の RNA 複製酵素中のヘリカーゼドメイン (p50) が Avr である。一般に R は病原菌の Avr を直接、または間接的に認識するレセプターで、R による Avr の認識が HR を引き起こすトリガーになっている (Keen, 1992; Morel and Dangle, 1997)。gene-for-gene 説の提唱によって、多くの宿主植物と植物に感染する病原菌から R と Avr が同定単離され、HR の情報伝達経路の解析にも光が当てられてきた (Kunkel and Brooks, 2002; Martin *et al.*, 2003; Sinapidou *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004a; Trognitz and Trognitz, 2005; Peart *et al.*, 2005)。しかし、R による Avr の認識機構が明らかになった例は、いまだに少ない。直接相互作用して認識する例は、イネの Pi-ta/Avr-Pita や、トマトの Pto/AvrPto、間接的に認識する例は、シロイヌナズナの RIN4 が RPS2/AvrRpt2 を仲介する事が報告されている程度に留まっている (Jia *et al.*, 2000; Sessa *et al.*, 1998; Mackey *et al.*, 2002)。また、タバコ植物において、認識後に起こる HR の情報伝達に必要な遺伝子として *Rar1*、*SGT1*、*EDS1* などが報告されている (Liu *et al.*, 2002)。しかし、それらの因子と N 因子による p50 の認識から始まる HR の関係や、HR の情報伝達の初発段階である R の直下で働く情報伝達因子等の知見もいまだに少ない。

本研究は、タバコ植物を用いてタバコモザイクウイルス感染によって始まる過敏感反応の情報伝達機構の全体像を解明する為に、2 つの目標を立てて行ったものである。第一は、R による Avr の認識機構を明らかにする「N 因子による p50 の認識機構の解析」、第二は、R と Avr の認識によって引き起こされる HR の情報伝達経路を明らかにする「N 因子から始まる HR の情報伝達経路の解析」である。

病原菌	宿主植物	
	R	r
Avr	抵抗性	罹病
avr	罹病	罹病

図 1. “gene-for-gene” モデル

Flor が提唱した gene-for-gene 説のモデルは、植物の持つ R (抵抗遺伝子産物) と病原菌の持つ Avr (非病原性遺伝子産物) が正しい組合せの時に抵抗性を発揮する。しかし、植物が病原菌の Avr に合致する R を持たない (r/Avr, R/avr, r/avr) 場合は、抵抗性を発揮出来ずに罹病となる。

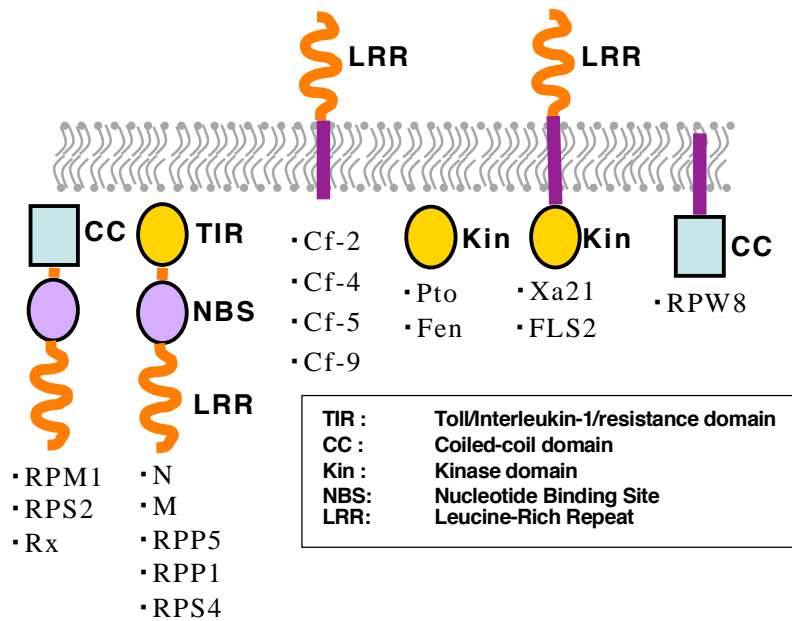


図 2. 抵抗性遺伝子産物 (R) の種類

植物の持つ様々な R を系統別に簡略なモデル図で示した。図左より、N 末端が CC, TIR の NBS/LRR タイプ、TM/LRR タイプ、Kin タイプ、Kin/TM/LRR タイプ、CC/TM タイプである。図中灰色は細胞膜を示し、その上下で細胞外、内を示している。また、それぞれのモデル図の下に代表的な R の名称を列挙した。

第 1 章

「N 因子による p50 の認識機構の解析」

はじめに

gene-for-gene 説が提唱されてから長い事経ち、これまでに多くの R とそれに対応する Avr が同定されてきた (Lauge and De Wit, 1998)。しかし、分子レベルでの R と Avr の相互作用解析は、いまだにわずかな数の R 遺伝子産物に関してしか報告がない。特に、R が Avr を直接認識している機構の例は少ない。例えば、トマトの Pto や、イネの Pi-ta がある。Pto は Kinase で (Martin *et al.*, 1993)、その酵素活性は Pto に対応する病原菌の Avr である、AvrPto と物理的に相互作用する事で活性化される (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Sessa *et al.*, 1998)。Pi-ta は、細胞質に存在する NBS/LRR タイプの R 遺伝子産物であり (Grant *et al.*, 1995)、病原菌側の AvrPi-ta と直接相互作用する事で抵抗性を発揮する (Jia *et al.*, 2000)。

タバコは N 因子と呼ばれる約 131 kDa の大きさの R がある (Whitham *et al.*, 1994)。N 因子は N 末側から、Toll interleukin-1 レセプター様領域 (Toll Interleukin-1 Receptor : TIR)、ヌクレオチド結合領域 (Nucleotide Binding Site : NBS)、ロイシン繰返し領域 (Leucine Rich Repeat : LRR) の 3 つのドメイン構造をとっている。この N 因子が何らかの形で Tobacco Mosaic Virus (TMV) 側の因子と相互作用する事で、局所的な細胞死を起こす HR を引き起こしている (Hammond-Kosack and Jones, 1997)。TMV 側の因子である Avr タンパク質は、TMV の約 126 kDa の大きさの複製酵素中にある約 50kDa の大きさのヘリカーゼドメイン (p50) である (Padgett and Beachy, 1993)。TMV の感染が無くても、この p50 のみによって N 因子を持つタバコに HR を起こす事ができる (Abbink *et al.*, 1998; Erickson *et al.*, 1999b)。しかし、N 因子が p50 を直接認識しているのか、またはシロイヌナズナの RIN4 (Mackey *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003; Axtell and Steskawicz, 2003) の様に別の因子を介して間接的認識をしているのかは明らかになっていなかった。本研究の第 1 章では、以下の 3 点を明らかにしたものである。① N 因子が p50 を直接結合する事で認識していること。② p50 の認識と HR の開始には、N 因子が ATP との複合体を形成し、分子構造を取ること。③ p50 と相互作用することで N 因子の ATP 加水分解が促進されることである。

材料と方法

植物材料

タバコ植物 (*Nicotiana tabacum*)で、N 因子を持つ系統(cv. Xanthi nc)と N 因子を持たない系統 (Samusun nn)を 23°C、14 時間・明期、10 時間・暗期の光条件下の温室で育てた。

アグロインフィルトレーション

アグロバクテリウム (EHA105)に目的のプラスミドを形質転換した株を LB 培地中で 28°C、2 日間培養した。この菌液を誘導培地 (AB salts, 2 mM phosphate, 1% glucose, 20 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid monohydrate (MES), 100 µM acetosyringone)で 28°C、16 時間培養した。この培養液を遠心 (14,000 rpm、1 min)し、ペレットを 10 mM MES (pH5.5), 10 mM MgSO₄に再懸濁した。この懸濁液を 1 ml プラスティックシリンジで 100 µl ずつ、タバコ成葉に注入した。この成葉を 22°C、16 時間・明期で 3 日間培養した (Yang *et al.*, 2000)。

コンストラクトの構築

TMV 感染したタバコ葉より得られた cDNA を鋳型鎖として、PCR 法によって増幅した。N 因子全長、TIR、NBS、LRR、TIR/NBS、NBS/LRR それぞれの DNA 鎖を、それぞれ 5'側に制限酵素切断部位を付けたプライマーを用いて増幅した。それぞれ *NheI/XhoI*、*EcoRI/PstI*、*EcoRI/XhoI* をセットとして作成した。増幅した断片はそれぞれ制限酵素で切断し、アグロインフィルトレーション用の pIG121-Hm (中村研三氏より分譲)、酵母 two-hybrid 法用の pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA)、タンパク質発現用の pGEX4T-3 (Amersham, Uppsala, Sweden)にクローニングした。植物中での一過的発現系ベクターはカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターで動くものである。p50 も同様に、制限酵素切断部位 *XhoI/NheI*、*NcoI/XhoI*、*NheI/NcoI* をそれぞれ付加したプライマーを作成し、TMV を感染させたタバコ葉 cDNA から増幅した。増幅した断片をそれぞれの制限酵素で処理して得られた断片を、アグロインフィルトレーション用の pTA7002、酵母 two-hybrid 法用の pGADT7 (Clontech)、タンパク質発現用の pRSET-C (Invitrogen)へクローニングした。NBS^{K222N}、p50^{P149L}、p50^{K11N} のアミノ酸置換変異体は、オーバーラップ PCR 法によって作成した (Horton *et al.*, 1989, 1990)。全てのコンストラクトは表 1.を参照のこと。

酵母 two-hybrid 法

酵母 two-hybrid 法は MATCHMAKER GAL4 システム (Clontech, Palo Alto, CA) に従った。N 因子側のそれぞれのドメインを pGBKT7 に組込んだコンストラクト、p50、p50^{P149L} を pGADT7 に組込んだコンストラクトをそれぞれ酵母 Y109 株 (Clontech) に形質転換した (Table 1)。形質転換酵母をトリプトファン、ロイシン、ヒスチジンを除いた SD 寒天培地 (SD-WLH)、または、20 mM の 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) (Clontech) を添加した SD-WLH 寒天培地で生育した。結合活性は β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

β -ガラクトシダーゼ活性測定 (ONPG 法)

SD 培地 (SD-WLH) 2ml に、シングルコロニーを入れ、30°C で一晩～2 日間培養した。培養液に YPDA 培地 4ml を加え、30°C で 7～8 時間振盪培養した。遠心 (14,000 rpm、2 min) し、上清を除いた。Z-Buffer (21.5 g/l Na₂HPO₄ · 12H₂O, 4.86 g/l Na₂PO₄ · 2H₂O, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l MgSO₄ · 7H₂O) 1.5 ml に懸濁し、遠心 (14,000 rpm、2 min) し、上清を除き、Z-Buffer 300 μ l に再懸濁し、100 μ l を新しいチューブに移し、液体窒素に浸し、凍らせた。37°C で 10-15 min 静置し、Z-Buffer 700 μ l/ β -merucaptoethanol 1.68 μ l を加え、ONPG/Z-Buffer (ニトロフェニルガラクトシドを 4 mg/ml) 160 μ l 加え、30°C で 0.5-3 時間インキュベートした。1N Na₂CO₃ 400 μ l を加え、遠心 (14,000 rpm、10 min) し、OD₄₂₀ を測定した。

タンパク質発現、Pull-down 試験

NBS/LRR、TIR、LRR、変異 NBS/LRR (NBS^{K222N}/LRR) をそれぞれ pGEX4T-3 にクローニングする事で、タグとして GST を付加した。構築したコンストラクトを大腸菌 (*E. coli*) 株 BL21 (DE3) 株に形質転換した。この形質転換株を 0.5 mM IPTG を添加した LB 培地で 4 時間培養しタンパク質発現を誘導し、glutathione Sepharose 4B カラム (MicroSpin GST Purification Module, Amersham Pharmacia Biotech) で精製した。p50、p50^{P149L}、p50^{K11N}、TIR/NBS、変異 TIR/NBS (TIR/NBS^{K222N}) も同様に pRSET-C にクローニングする事で、タグとして His6 を付加した。構築したコンストラクトを大腸菌 (*E. coli*) 株 BL21 (DE3) 株に形質転換した。この形質転換株を 0.5 mM IPTG を添加した LB 培地で 4 時間培養しタンパク質発現を誘導し、Ni-NTA agar で精製した。精製

したそれぞれの発現タンパク質は SDS-polyacrilamaide ゲルで電気泳動し、CBB 染色、および抗 GST 抗体又は抗 His 抗体を用いたウェスタンブロッティング法を用いて確認した。Pull-down 試験は、1996 年に報告されている方法を改変して行なった (Swaffield and Johnston, 1996)。0.5 μ g の GST 融合 NBS/LRR、TIR、LRR、NBS^{K222L}/LRR を吸着した glutathione SepharoseTM4B カラムに、精製した His-融合 p50、p50^{P149L}、p50^{K11N}、TIR/NBS、TIR/NBS^{K222N} をそれぞれ 0.5 mg 加え、4°C、1.5 時間インキュベートした。PBS バッファー (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) で 3 回洗浄した後、50 mM Tris-HCl, pH 8 に溶かした 10 mM 還元型グルタチオンで GST 融合タンパク質を溶出した。溶出したフラクションを 7.5% polyacrylamide-SDS ゲルで電気泳動し、抗 His 抗体 (Santa Cruz BioRad, Hercules, CA) を 1 次抗体として、HRP 融合抗ウサギ抗体 (BioRad, Hercules, CA) を 2 次抗体として用いたウェスタンブロッティング法によって検出した。

ATP 結合試験

In vitro での ATP 結合試験は、5 μ g の精製した GST 融合 NBS/LRR タンパク質、GST 融合 NBS^{K222L}/LRR タンパク質を 20 mM HEPES-KOH pH 7, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 mM MgCl₂ を含むバッファー中で 5 μ M の [α -³²P]ATP (特異活性, 5.5 GBq/mmol) または [γ -³²P]ATP (特異活性, 5.5 GBq/mmol) (New England Nuclear, Ma) と 30°C、30 min 反応させた。反応液を 7.5 % の native-polyacrylamide ゲルで泳動し、X 線フィルム (BioMax film, Kodak) で検出した。

ATP 加水分解活性測定

ATP 加水分解活性測定は 1981 年に報告されている文献に基づいた (Perlin and Spanswick, 1981)。75 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM MgCl₂ 3 mM ATP、10 pmol の GST 融合タンパク質を含むそれぞれの反応液を、30°C で 5、10、15、30、60、90min でそれぞれサンプリングした。氷上で 50 μ l の検出溶液 (0.42% ammonium molybdate in 1 N H₂SO₄:10% ascorbate 5:1 [v/v] ratio) を加え、25°C で 30 min インキュベートした。反応液を 820nm の波長で吸光度を測定した。加水分解によって解離したリン酸基の量を、無水リン酸カリウムを用いた標準直線から算出した。5 μ M [α -³²P]ATP (特異活性, 5.5 GBq/mmol) 又は [γ -³²P]ATP (特異活性, 5.5 GBq/mmol) を加えた 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol を含む反応液に

GST 融合タンパク質をそれぞれ加え、室温で 30 min 反応させた。反応液をペーパークロマトグラフ用紙 (Whatmann 3MM) にスポットし、0.5 M lithium chloride/0.5 M formic acid を 1:1[v/v] で混合した展開液で展開した。展開した用紙を乾燥させ、X 線フィルムに観光させて検出した。

結果

アグロインフィルトレーションによる HR の誘導

N 因子を持つタバコ成葉に p50 を組込んだアグロバクテリウムをインフィルトレートした。その結果、インフィルトレートした部位において3日後から HR が確認出来た (図 3A,B)。これに対して、N 因子を持たないタバコの成葉に p50 を組込んだアグロバクテリウムをインフィルトレートした部位では HR が観察出来なかった (図 3C,D)。これらの事は、タバコと TMV の実験系において N 因子を介した HR に Avr として p50 タンパク質のみが必要である事を強く示唆した。また HR を起こさせない TMV である Ob 株の持つ p50 と同じ様に、p50 の 149 番目のアミノ酸をプロリンからアラニンに変異させたタンパク質 (p50^{P149L}) を同様にインフィルトレートした (図 3C,D)。その結果、N 因子を持つタバコ葉でも HR を起こせなくなった事から、N 因子が直接 p50 を認識している事を示唆した。これらの結果を受け、N 因子と p50 が植物内で相互作用している分子メカニズムに焦点を当てて以降の実験を行った。

酵母 two-hybrid 法による相互作用試験

本研究で用いた酵母のレポーター遺伝子試験では、相互作用をするヒスチジン合成酵素 *HIS3* と、*lacZ* を発現する。そこで、N 因子と p50 を組込んだ酵母細胞を用いて生育試験を行った。その結果、両因子を組込んだ酵母のみがヒスチジン合成阻害剤である 3-AT を 20mM 添加した SD 寒天培地 (SD-WLH) での生育が確認出来た (図 4A 中央)。また、β-ガラクトシダーゼ活性を定量したところ、N 因子と p50 を共に組込んだ酵母で、どちらか一方のみを組込んだ酵母に対して約 10 倍近く高い活性が認められた (図 4A 右)。また、HR を誘導する事が出来なかった p50^{P149L} と N 因子を組込んだ酵母では、3-AT を添加した SD 培地での生育、β-ガラクトシダーゼ活性共に検出出来なかった。これらの事から、N 因子と p50 が直接結合する事で認識している事が示唆された。なお、酵母でのタンパク質発現は、それぞれのタンパク質にタグとして付加している HA、Myc に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングによって確認した (図 4B)。

N 因子の NBS/LRR が p50 と結合必要である

図 3,4 より、N 因子と p50 が直接相互作用する事が示唆された。そ

ここで、N 因子の持つ 3 つのドメイン TIR、NBS、LRR のどのドメインが必要であるかを明らかにする為に、それぞれドメインを pGBKT7 に組み込み、p50-pGADT7 と共に酵母に形質転換した。その結果、TIR、NBS、LRR ドメイン単独では相互作用しなかった (図 5A)。同様の試験を TIR/NBS、NBS/LRR ドメインの組み合わせで行なったところ、NBS/LRR を組込んだ場合にのみ相互作用が検出された (図 5A)。この NBS/LRR との相互作用は p50^{P149L} を用いると完全に消失した。これらの結果は *in vitro* の実験系である Pull-down 試験でも同様に、p50 が NBS/LRR タンパク質とのみ相互作用している結果を得た (図 5B)。また、p50^{P149L} は NBS/LRR と相互作用しなかった (図 5B)。なお、Pull-down 試験で用いた N 因子側の GST 融合タンパク質、p50、p50^{P149L} の His 融合タンパク質はそれぞれ抗 GST 抗体、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって発現の確認を行なった (図 4C)。

ATP の必要性

N 因子の NBS に変異が入る事で TMV に対する抵抗性が無くなり、HR を起こせなくなる事がこれまでに報告されている (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000)。その変異はいずれも ATP 結合、加水分解活性のある P-loop と呼ばれる領域である (van der Biezen and Jones, 1998; Tameling *et al.* 2002) (図 6A)。そこで、NBS の P-loop にある 222 番目のアミノ酸をリジンからアスパラギンに変異させた変異 NBS (NBS^{K222N}) を作成し、N 因子に組み込み HR を誘導出来るか試験した。N 因子を持たないタバコ成葉に変異を入れた N 因子 (N^{K222N}) と p50 を共にアグロインフィルトレーション法によって一過的に発現させた。その結果、変異の無い N 因子を発現させた場合は HR が誘導されたが、N^{K222N} を発現させた場合は HR が誘導されなかった (図 6B)。この HR の消失が、変異によって N 因子と p50 が相互作用出来なくなった為かどうかを明らかにする為に Pull-down 試験によって確かめた。その結果、NBS^{K222N}/LRR は p50 と相互作用出来なくなっていた (図 6C)。この事は、N 因子と p50 の相互作用と HR 誘導に N 因子の ATP 結合能が必要である事を示唆している。

ATP 結合、加水分解試験

これまでの結果から、NBS ドメインと ATP の結合が p50 との相互作用に重要である事が明らかとなった。ATP は通常 2 つの異なった反応で利用される。1 つはエネルギー供給源としての ATP 加水分解酵素の

基質、もう 1 つはリン酸化のためのリン酸基供与体である。そこで、まず ATP が NBS/LRR に安定的に結合しているのかどうかを明らかにするために $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ または $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて結合試験を行った。NBS/LRR を $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ または $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と反応させ、native-PAGE し、ゲルを X 線フィルムで検出した。その結果、 $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ または $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を反応させたどちらの場合からもシグナルが検出出来た (図 5A)。しかし、NBS^{K222N}/LRR と反応させた場合には、シグナルが検出出来なかった (図 7A)。これらの結果は、NBS ドメインが ATP と結合している事を明らかに示した。しかし、 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ との結合は、ADP に加水分解しきれなかった ATP との結合を検出している可能性を否定出来ない。そこで、ATP 加水分解活性を直接測定する事にした (図 7B)。発現させた NBS/LRR を用いて、ATP と MgCl₂ を含む反応液で反応させると加水分解活性が検出された (図 7B)。この事は、NBS/LRR は AAA や、その他の多くの ATP 加水分解酵素と同様にマグネシウムイオンに依存的なタイプの酵素活性を示した (Sugimoto *et al.*, 2004)。これに対して、NBS^{K222N}/LRR は ATP 加水分解活性が検出出来なかった (図 7B)。また、直接 ATP 加水分解を検出するために、ペーパークロマトグラフィーを用いた。NBS/LRR または NBS^{K222N}/LRR を $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ または $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とそれぞれ反応させ、その反応液をスポットし展開液によって展開し、X 線フィルムによってシグナルを検出した (図 7C)。ATP 加水分解によって生じた $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ADP}$ を NBS/LRR と反応させる事で検出出来た。しかし、NBS^{K222N}/LRR との反応液からは検出出来なかった (図 7C, 上段)。 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を基質として用いた場合に、NBS/LRR はモノマーのリン酸基を放出している事が検出出来た。しかし、NBS^{K222N}/LRR を用いた場合からは検出出来なかった (図 7C, 下段)。

p50 によって ATP の加水分解は促進される

p50 との結合に ATP の加水分解が必要であるかどうかを確かめるために、ATP $[\gamma\text{S}]$ と ADP $[\beta\text{S}]$ を用いた。ATP $[\gamma\text{S}]$ と ADP $[\beta\text{S}]$ は共に NBS/LRR には結合出来るが、分解はされない ATP、ADP である。これらを反応させた NBS/LRR と p50 の相互作用試験を行った (図 8A)。その結果、ATP $[\gamma\text{S}]$ と反応させ、ATP 結合 NBS/LRR は p50 と相互作用し、その結合は図 5B で示した結果と同程度であった。これは大腸菌で発現させたタンパク質が、すでに大腸菌内の ATP と反応しているからであると考えられる。これに対して、ADP $[\beta\text{S}]$ と反応させた NBS/LRR はコントロール、ATP $[\gamma\text{S}]$ と反応させた NBS/LRR と比べ、約 3 分の 1 程度の相

相互作用であった。この事は、p50 との結合には NBS/LRR の ATP との結合が必要であり、ATP の加水分解は必要でない事を示している。次に、NBS/LRR の ATP 加水分解と p50 との相互作用の関係を解析するために、p50 がある場合と無い場合の NBS/LRR の ATPase 活性を測定する事にした。この解析にあたり、アミノ酸置換を行なった p50 を構築した。これは、ヘリカーゼである p50 は元々 ATPase 活性があるためである。構築した ATPase 活性の無い p50 (p50^{K11N}) は NBS/LRR との相互作用活性に変化が無かった (図 8B)。NBS/LRR の ATPase 活性を p50 と相互作用しなかった場合、p50、p50^{K11N} と相互作用した場合で経時的に測定し、それぞれから p50、p50^{K11N} の ATPase 活性を差し引いた。その結果、p50 と相互作用しなかった場合に対して、p50 もしくは p50^{K11N} と相互作用した場合に、約 1.4 倍程度の活性の上昇が見られた (図 8C)。

N 因子の分子内結合

これまでの結果より、N 因子は ATP と結合している状態で p50 との相互作用を行い、ATP の加水分解がその相互作用に関わっている事が明らかとなった。この事は ATP によって構造変化を起こす事がタンパク質-タンパク質間の相互作用に必要である事を示唆している。ATP によるタンパク質の構造変化とは例えば分子内又は分子間相互作用である (Mizushima *et al.*, 2002)。この可能性を解析するために、酵母 two-hybrid 法を用いて N 因子の様々なドメイン間での相互作用試験を行った。その結果、LRR ドメインが TIR/NBS と相互作用することが示唆された (図 9A)。その他のドメイン同士の組み合わせではポジティブな相互作用が確認出来なかった。また、発現タンパク質を用いた Pull-down 試験でも同様に相互作用する結果が得られた (図 9B)。しかしながら、NBS ドメイン内にある P-loop に変異を入れ、ATP と相互作用出来なくなった発現タンパク質 (TIR/NBS^{K222N}) では相互作用が検出出来なかった (図 9B)。では、N 因子内の分子内相互作用に p50 は関与するのであろうか。そこで、N 因子内の TIR/NBS と LRR を相互作用させた上で p50 と相互作用させる Pull-down 試験を行った。その結果、p50 も TIR/NBS のシグナルも検出出来なくなった (図 9C)。この結果は、N 因子内の分子内又は分子間相互作用が p50 によって解除される事を示している。これらの事は、N 因子が ATP に依存した分子内相互作用によって特異的な構造をとっており、p50 との結合によって ATP が分解されると、その構造が変化する事を示唆している。

表 1. 本研究で用いたタンパク質

表記	アミノ酸数	名称・注釈
TIR/NBS/LRR	1-1144	全長 N 因子
TIR	1-171	TIR ドメイン
NBS	172-447	NBS ドメイン
NBS ^{K222N}	172-447	NBS ドメインの K ²²² を N に変異したもの
LRR	448-1144	LRR ドメイン
TIR/NBS	1-447	TIR と NBS ドメイン
NBS/LRR	172-1144	NBS と LRR ドメイン
p50	1-445	TMV の複製酵素のヘリカーゼドメイン
p50 ^{P149L}	1-445	p50 の P ¹⁴⁹ を L に変異したもの
p50 ^{K11N}	1-445	p50 の K ¹¹ を N に変異したもの

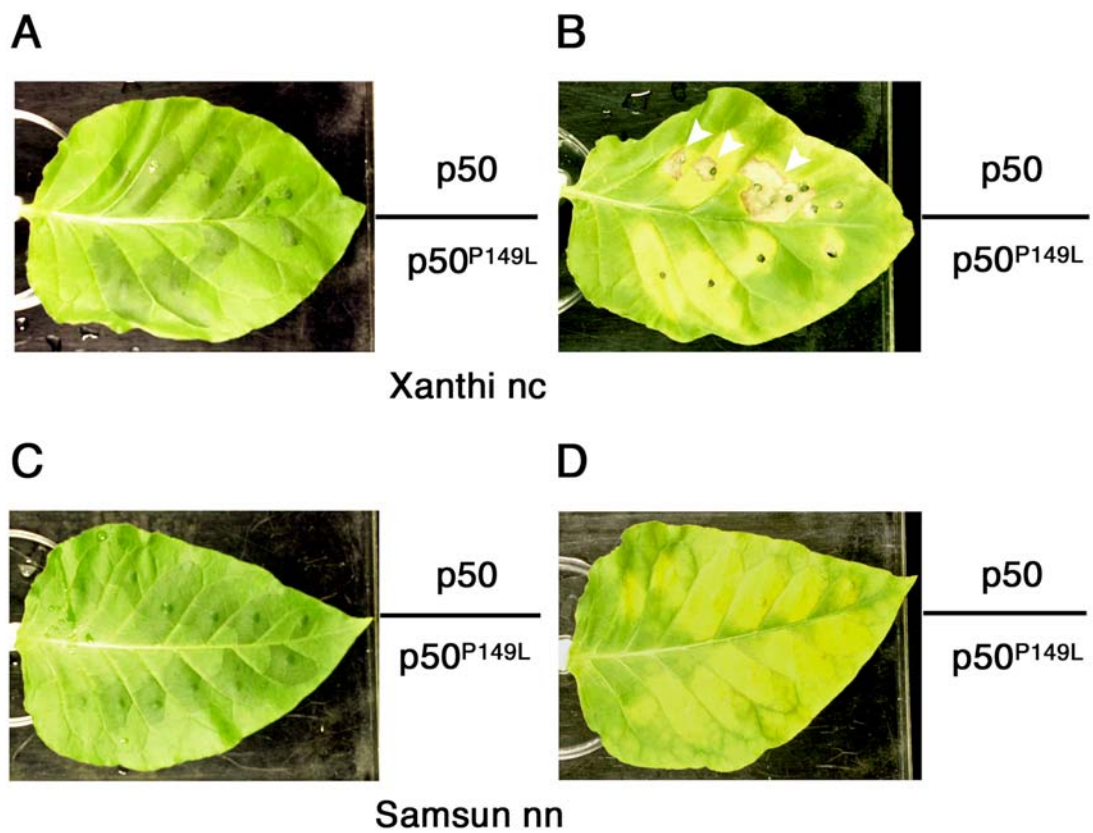


図 3. HR の誘導

p50、p50^{P149L}をアグロインフィルトレーション法によって一過的に発現させ、HRを誘導した。N因子を持つ Xanthi nc (A, B)、N因子を持たない Samsun nn (C, D)より上から3番目以降の健全葉を採取した。健全葉に対して p50 を組込んだアグロバクテリウム (葉の上半分)、p50^{P149L} を組込んだアグロバクテリウム (葉の下半分)を約 100 μ l ずつインフィルトレートした。インフィルトレートして0日目 (A, C)と3日目 (B, D)の写真。HRを起こしている部分を矢印で示した(B)。

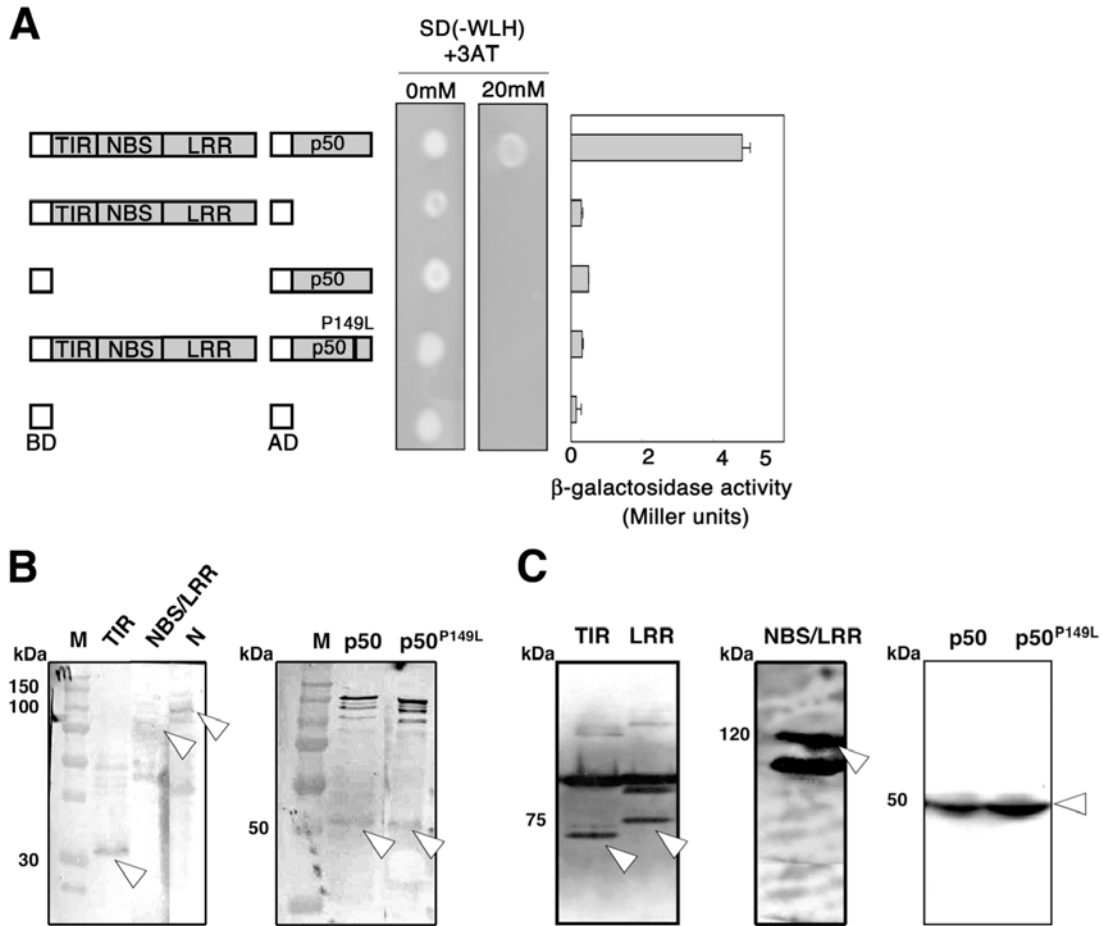


図 4. N 因子と p50 の相互作用

A. 酵母 two-hybrid 法。 酵母 AH109 株に BD-N、AD-p50、AD-p50^{P149L} のコンストラクトを組み合わせて、組込んだ (図左側)。形質転換体を 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) を 0 mM 又は 20 mM 添加した、トリプトファン、ロイシン、ヒスチジンを抜いた SD 培地 (SD-WLH) 上で生育した (図中央)。それぞれの形質転換体の β-ガラクトシダーゼ活性を、o-nitriphenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) を基質として Miller units を用いて測定した (図右グラフ)。

B. 酵母発現タンパク質の確認。 酵母 two-hybrid 法に用いた酵母からタンパク質を抽出した。Myc タグ融合 TIR (TIR)、NBS/LRR (NBS/LRR)、N 因子全長 (N) タンパク質、および HA タグ融合 p50 (p50)、p50^{P149L} (p50^{P149L}) タンパク質を SDS-PAGE によって分離し、それぞれ抗 Myc、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって検出した。矢印は発現タンパク質を示している。

C. 大腸菌発現タンパク質の確認。 pull-down 試験に用いる GST 融合 TIR (TIR)、LRR (LRR)、NBS/LRR (NBS/LRR) タンパク質、His タグを付加した p50 (p50)、p50^{P149L} (p50^{P149L}) タンパク質を、それぞれ大腸菌 (DH5α、BL21DE3 株) で発現させた。この発現タンパク質を精製した後、SDS-PAGE によって分離し、それぞれ抗 GST、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって検出した。矢印は発現タンパク質を示している。

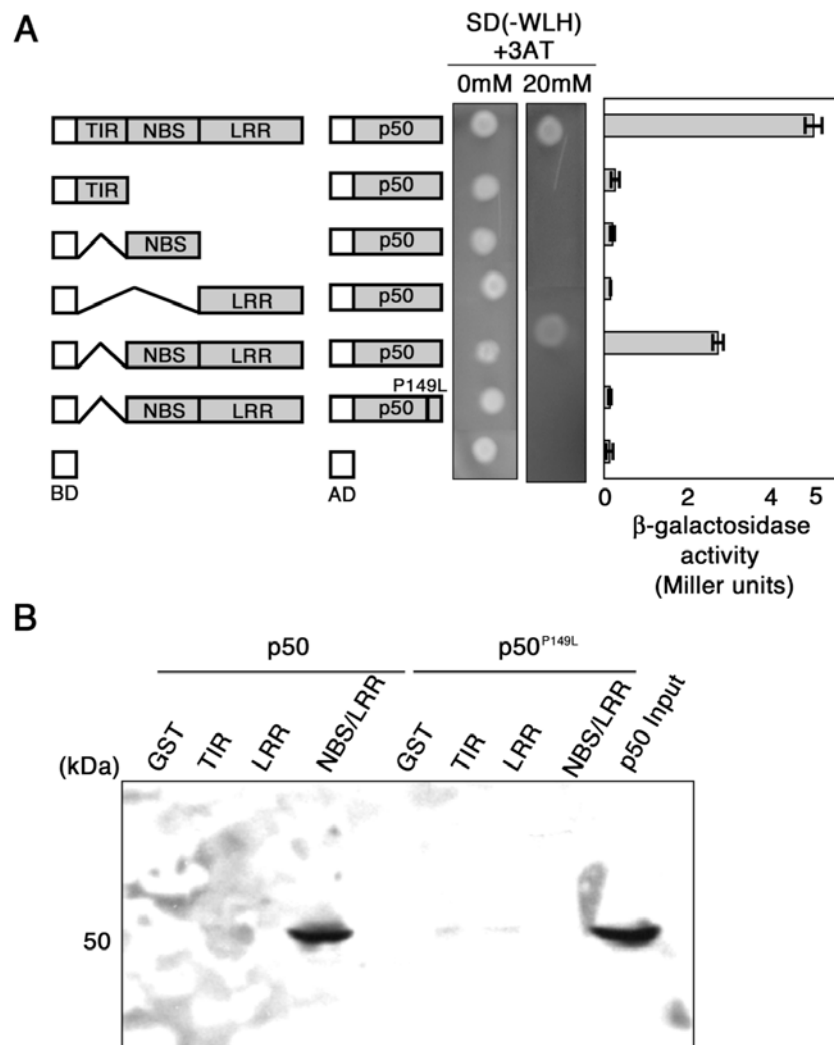


図 5. どのドメインが相互作用に必要なか

A. 酵母 two-hybrid 法。酵母 AH109 株に BD に N 因子のドメインを組込んだコンストラクトと AD-p50、または AD-p50^{P149L} を組込んだ (図左側)。形質転換酵母を 3-AT を添加した SD-WLH 培地で生育試験を行った (図中央)。それぞれの形質転換体のβ-ガラクトシダーゼ活性を、ONPG を基質として Miller units を用いて測定した (図右グラフ)。

B. Pull-down 試験。GST 融合 NBS/LRR (NBS/LRR)、TIR (TIR)、LRR (LRR) タンパク質、および His タグを付加した p50 (p50)、p50^{P149L} (p50^{P149L}) タンパク質を大腸菌で発現させ、pull-down 試験を行った。GST 融合タンパク質を glutathion-Sepharose カラムに吸着させ、His タグを付加した p50 (左半分) と p50^{P149L} (右半分) と反応させた。コントロールとして GST のみ (GST) のタンパク質を用いた。反応の後、還元型グルタチオンを用いて溶出した。得られたタンパク質溶液を SDS-PAGE によって分離し、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって p50、p50^{P149L} を検出した。

A

N
↓

172- QISSKLCIKISLSYLQNIIVGIDTHLEKIESLLEIGINGVR IMGIWGMGGVGKTTIAR
P-loop (Kinase-1a)

AIFDTLLGRMDSYQFDGACFLKDIKENKRMHSLQNALLSELLREKANYNNEEDG

KHQMASRL RSKKVLIVLDDID NKDHYLEYLAGDLDFGNGS RIITTRDKHL IEKN
Kinase-2 Kinase-3a

DIIYE VTALPDHESIQLFKQHAF GKEVPNENF EKLSLEVNYAKGLPLALKVWGSL
Motif 4 Motif 3 HD motif

LHNLRLTEWKSATIEHMKNNSSYSGIIDK LKISYDGL EPKQEMFLDIACFLRG-447
Motif 2

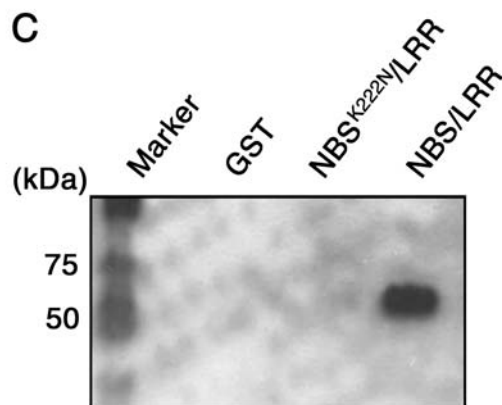
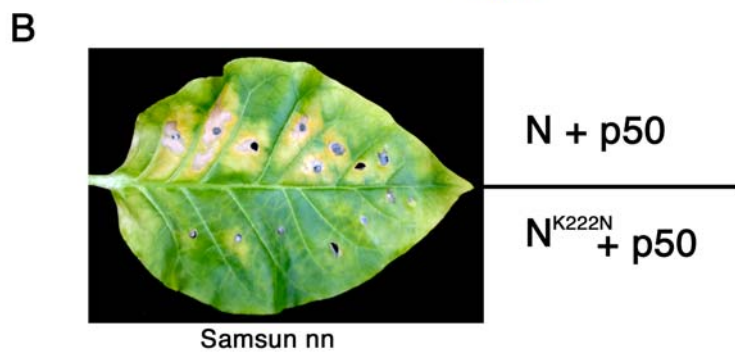


図 6. 変異 N 因子の影響

A. NBS ドメインのアミノ酸配列。 P-loop 内の 222 番目のリジン (K) をアスパラギン (N) に置換した。下線を引いた保存された領域に関しては本文中に詳しく記している。

B. 変異 N 因子の HR への影響。 N 因子を持たない Samsun nn より健全葉を採取し、p50 と N 因子 (N + p50)、または変異 N 因子 (N^{K222N}) (p50 + N^{K222N}) をアグロインフィルトレートした。写真はインフィルトレート後 3 日目。

C. 変異 NBS/LRR と p50 の相互作用試験。 GST 融合 NBS/LRR (NBS/LRR)、NBS^{K222N}/LRR (NBS^{K222N}/LRR) と His タグを付加した p50 を用いて pull-down 試験を行った。コントロールとして GST のみ (GST) を用いた。結合したタンパク質の検出には抗 His 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行なった。

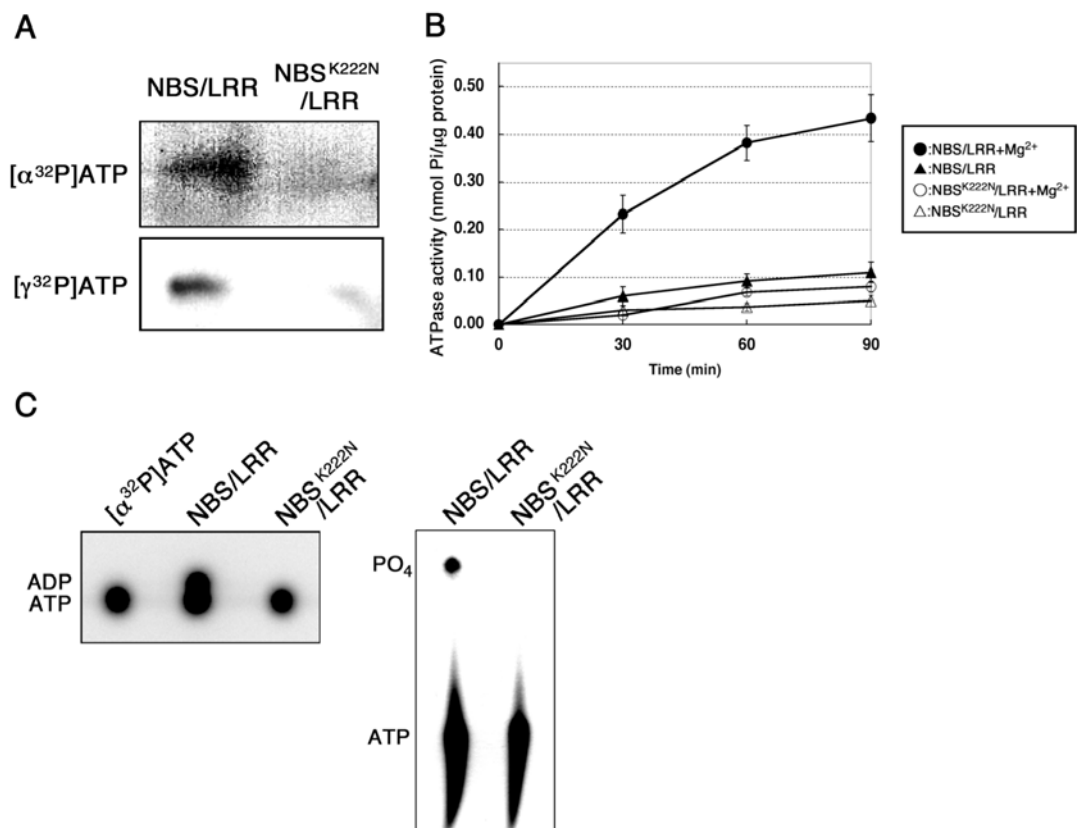


図 7. ATP の結合と加水分解

A. *In vitro* ATP 結合試験。 GST 融合 NBS/LRR (NBS/LRR)、NBS^{K222N}/LRR (NBS^{K222N}/LRR) タンパク質を [α³²P]ATP (図上側)、[γ³²P]ATP (図下側) と 30°C、30 min 反応させた。反応後 native-PAGE し、シグナルを検出した。

B. *In vitro* ATP 加水分解試験。 NBS/LRR タンパク質を 3 mM の Mg²⁺ を含む (●)、含まない (○)、NBS^{K222N}/LRR タンパク質を Mg²⁺ を含む (▲)、含まない (△) 場合での ATP 加水分解試験を行った。

C. ATP 加水分解産物の検出。 NBS/LRR、NBS^{K222N}/LRR の ATPase 活性によって生じた分解産物を薄層クロマトグラフィーで展開溶液 (0.5 M 蟻酸/0.5 M 塩化リチウム (1:1)) で展開し、シグナルを検出した。

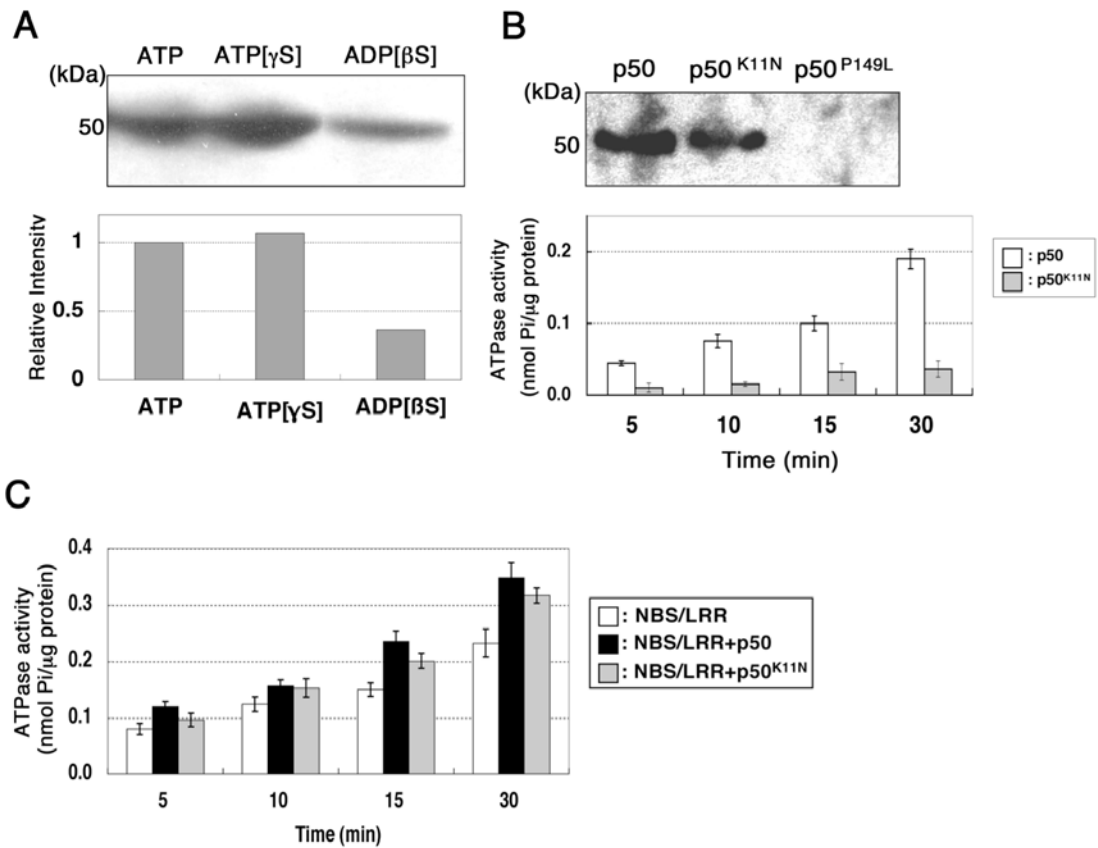


図 8. ATPase 活性の p50 による促進

A. ATP、ADP の影響。 NBS/LRR と p50 を ATP (図左側)、ATP[γS] (図中央)、ADP[βS] (図右側) 存在化で相互作用させ、pull-down 試験によってその結合を検出した (図上側)。Pull-down 試験のシグナルを、デンストメーターを用いて数値化した (図下側)。

B. p50^{K11N} の作製。 His タグを付加した p50、p50^{K11N}、p50^{P149L} タンパク質を発現させ、GST 融合 NBS/LRR タンパク質を用いた pull-down 試験によって相互作用を調べた (図上側)。p50 (白色) と p50^{K11N} (灰色) の ATPase 活性を、経時的に測定した (図下側グラフ)。

C. NBS/LRR の経時的な ATPase 活性測定。 NBS/LRR 単独 (白色)、NBS/LRR と p50 (黒色)、NBS/LRR と p50^{K11N} (灰色) の経時的な ATPase 活性を測定した。それぞれ得られた測定値から p50、p50^{K11N} の ATPase 活性を引いた。

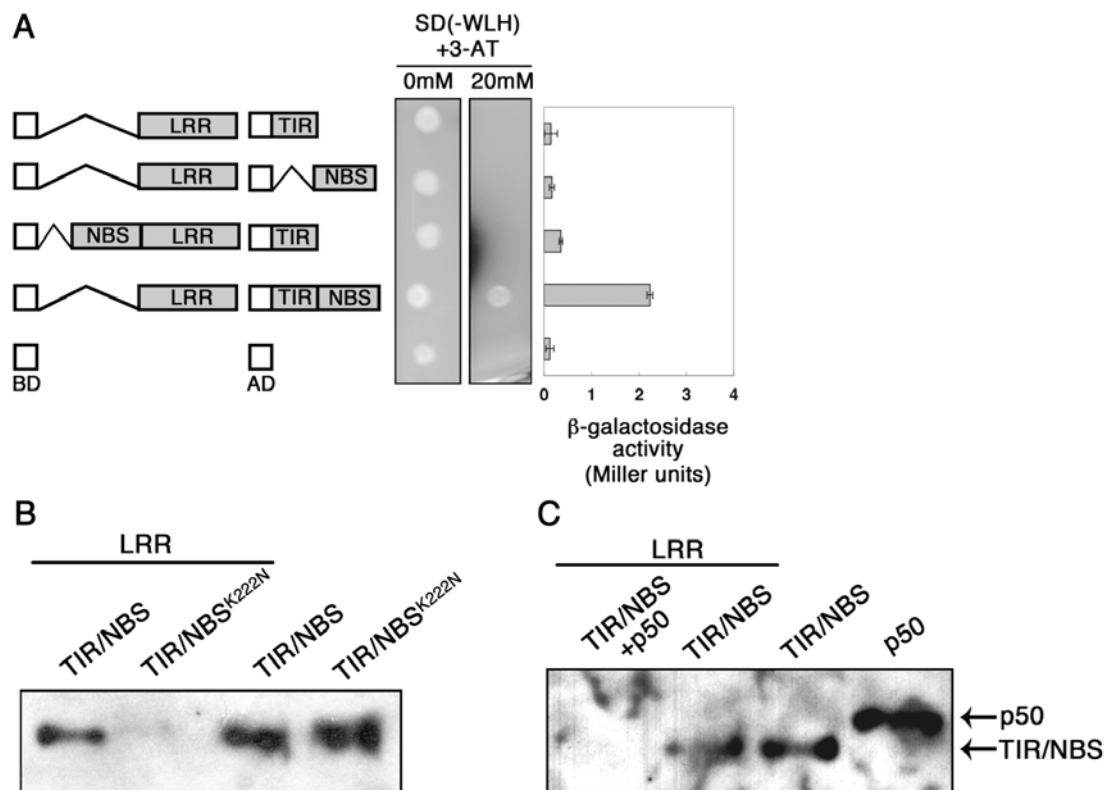


図 9. 分子内相互作用

A. 酵母 two-hybrid 法。 N 因子の様々なドメインのコンストラクトを BD、AD に組込んだコンストラクトを作製し、酵母 AH109 株に組込んだ (図左側)。形質転換酵母の 3-AT を用いた生育を行なった (図中央)。また形質転換酵母のβ-ガラクトシダーゼ活性を、ONPG を基質として Miller units で測定した (図右グラフ)。

B. Pull-down 試験。 LRR ドメインと TIR/NBS ドメインが相互作用する事を GST 融合 LRR タンパク質、His タグを付加した TIR/NBS (TIR/NBS)、TIR/NBS^{K222N} (TIR/NBS^{K222N}) タンパク質を発現し、pull-down 試験によって相互作用を調べた。

C. p50 の分子内相互作用への影響。 LRR ドメインと TIR/NBS ドメインを相互作用させておき、そこに p50 を加え反応させた (TIR/NBS + p50)。p50 を加えなかった (TIR/NBS)。反応後、抗 His 抗体によって相互作用したタンパク質を検出した。コントロールとして TIR/NBS のみ (TIR/NBS input)、p50 のみ (p50 input) を用いた。

考察

p50 との相互作用

TMV の中でも OM 株は特に抵抗性遺伝子産物を持たないタバコに対して重大な病兆を示し、抵抗性遺伝子産物である N 因子を持つタバコではその病兆が観察されず、宿主特異的な抵抗性である HR が観察される。一方、TMV の Ob 株では N 因子を持つタバコに対しても病兆を発揮する (Padgett and Beachy, 1993)。この 2 つの TMV 株は、いくつかのアミノ酸が置換されている事が報告されている。Ob 株では、Avr である p50 をコードするヘリカーゼドメインの 149 番目のプロリンがロイシンに変化していた (Abbink, *et al.*, 2001)。このアミノ酸置換による変異が p50 の構造変化を引き起こし、N 因子による認識を逃れていると考えた (Padgett *et al.*, 1997)。これらの事は、N 因子と p50 が相互作用し、HR を誘導している事を示唆しているが、その相互作用が直接か間接的かは明らかになっていなかった。本研究の第 1 章では、どのように病原菌を認識しているのかを明らかにした。まず、アグロインフイルトレーション法によって p50 が HR を起こす事に必要な最小単位であり、変異を入れた p50 (p50^{P149L}) では HR が起こらない事を示した。それに引き続き、この 2 つの因子が相互作用している事を酵母 two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、N 因子が p50 と直接相互作用し、p50^{P149L} とは相互作用しない事が示唆された。

N 因子は TIR, NBS, LRR の 3 つのドメインを持っている。この中でも LRR ドメインはタンパク質-タンパク質相互作用として知られている。これまでに LRR ドメイン単独で HR の情報伝達因子である、SGT1 や HSP90 等と相互作用する事が報告されている (Liu *et al.*, 2002, 2004b)。しかしながら、LRR ドメイン単独では p50 と相互作用しない事が本研究から明らかとなった。NBS 単独では p50 との相互作用は認められなかったが、NBS/LRR では p50 との相互作用が認められた。このとき p50^{P149L} は NBS/LRR と相互作用しなかった。つまり、NBS と LRR のドメインのコンビネーションが必要である事が明らかとなった。しかし、TIR、NBS のコンビネーションでは p50 と相互作用しなかった。N 因子は TMV 感染後に選択的なスプライシングを受け、LRR ドメインを欠失した TIR/NBS ドメインのみのタンパク質が誘導的に発現する (Denesh-Kumar and Baker, 2000)。このことは、TIR/NBS が p50 と相互作用せず、NBS/LRR が p50 と相互作用する事を支持している。これらの事から、p50 との結合には N 因子の NBS ドメインが含まれている事が必要であり、その NBS ドメインが隣接する LRR ドメインをポ

ジティブに、または TIR ドメインをネガティブに制御していると考えられる。

ATP の役割

NBS ドメインは P-loop (kinase-1a)、Kinase-2、Kinase-3a、Motif 2、Motif 3、Motif 4、そして HD Motif がある (ven der Biezen and Jones, 1998; Tameling *et al.* 2002)。この中で特に P-loop は、多くの生物種で保存されている ATP 結合、加水分解活性を持つ領域である (Rivas *et al.*, 1997; Meyers *et al.*, 1999)。この P-loop 領域に変異が入ると ATP 結合活性が失われる事が知られている (Mizushima *et al.*, 1998; Hishida *et al.*, 1999)。また、タバコの N 因子、シロイヌナズナの RPS2、RPM1 など多くの植物種の R 遺伝子産物は NBS ドメインを持っており、その中の P-loop や、Kinase-2 に変異が入ると病原菌に対する抵抗性が失われる事が知られている (Denesh-Kumar *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2000; Tornero *et al.*, 2002)。これらの事から ATP 結合、または加水分解能が Avr である p50 との結合に関わっていると考えた。そこで、この考えを証明するために P-loop 領域の 222 番目のアミノ酸であるリジンをアルギニンに変化させ、ATP 結合活性を失った N 因子 (N^{K222N}) を作製した。N 因子を持たないタバコ (Samsun nn) に、この N^{K222N} と p50 をアグロバクテリウムによってコインフィルトレーションしても、HR は起こらなかった。この結果からでは、相互作用が出来なくなったために HR を起こさなくなったのか、ATP 結合に変異が起こったため情報伝達が出来なくなり HR が起こらなかったのか分からなかった。そこで NBS^{K222N}/LRR を発現し、*in vitro* の実験系でも確認したところ、 NBS^{K222N}/LRR は p50 と相互作用しなかった。これらの事から、p50 との相互作用に ATP が重要な役割を果たしている事が支持された。NBS ドメインによる ATP の加水分解が、HR の情報伝達に関わっている事が考えられたため、その加水分解活性を測定した。その結果、p50 と相互作用した場合に活性が上昇している事が明らかとなった。しかし、ヘリカーゼドメインである p50 も ATP 加水分解活性があるため、N 因子の加水分解活性が上昇したのか、p50 の活性が上昇したのか分からなかった。そこで、ATP 加水分解能を欠失させた p50 ($p50^{K11N}$) を作製した。この ATP 加水分解能は HR と関係ない事が知られている (Erickson *et al.*, 1999b)。実際に $p50^{K11N}$ は NBS/LRR と相互作用した。この $p50^{K11N}$ を用いて相互作用した場合の ATP 加水分解活性を測定したところ、変異を入れていない p50 の場合と同様に上昇していた。これらの事から、HR には NBS

ドメインの ATP 加水分解活性が必要である事が明らかとなった。つまり、N 因子は ATP と結合し、p50 と相互作用する事によって ATP の加水分解活性が促進される。では、ATP の加水分解は HR にどのような役割を果たしているのだろうか？N 因子が TIR/NBS ドメインと LRR ドメインで分子内、分子間同士での相互作用している事が明らかとなった。また、この相互作用が ATP に依存している事、p50 によって解除される事も明らかとなった。これらの事から、N 因子は ATP と結合することで強く分子内構造をとっており、p50 と結合する事で ATP を加水分解し、分子内構造が変化することで下流に情報を伝達している可能性が示唆された。

タンパク質装置

タンパク質装置とは、ATP の結合、加水分解を行う事でタンパク質の構造、活性が変化し、隣接するタンパク質に影響を及ぼす事で情報伝達等、一連の働きを行う事を言う (Alberts *et al.*, 2004)。例えば、ヒトの Apaf-1、線虫の CED-4 などのアポトーシスを起こすときの情報伝達因子 (Chinnaiyan, 1999; Aravid *et al.*, 1999)は、植物と同様の NBS ドメイン (NB-ARC)を持っており (Inohara *et al.*, 2005)、アポトーシスを起こす情報を受け取ると ATP と結合し、ADP に加水分解する事でその分子内構造を変化させ Apaf-1 は caspase-9 と、CED-4 は CED-3 と相互作用し、アポトーシスを誘導できるようになる (Hu *et al.*, 1999; Jaroszwski *et al.* 2000; Kim *et al.*, 2005)。また、これらの因子の NBS ドメインにも P-loop 領域が存在しており、この領域に変異を入れる事でアポトーシスの情報伝達が阻害され細胞死が起こらなくなる事が CED-4 の研究によって報告されている (Chinnaiyan, *et al.*, 1997)。更に、P-loop の構造は ATP との結合に重要であるだけでなく、その結合によって隣接するドメインの分子構造を決定する事にも重要である (Ogura *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001)。これらの事から、P-loop を持ち、細胞死に関わる N 因子も、Apaf-1 等と同様の機構によってその機能を果たしていると考えられる。また、他の植物の多くの R も N 因子と同じ NBS ドメインを持つことから(図 2)、同様の機構で構造変化や情報伝達を行なっている可能性がある。本研究は、植物に於いて ATP を利用した R と Avr の相互作用を初めて示したものである。

第 2 章 「N 因子から始まる情報伝達経路の探索」 はじめに

第 1 章より R である N 因子が、Avr である p50 を認識する機構を明らかにした。そこで次に生じる疑問は、N 因子が p50 を認識した情報を何に、どのように伝達しているか？である。このことを明らかにするために、本研究の第 2 章では遺伝子レベル、タンパク質レベルでの 2 通りの情報伝達機構の解析を行なった。

第一に、N 因子から始まる HR を同調して起こすことの出来る実験系を確立し、N 因子を介した HR のメカニズムを解明することを目的とした。これまでに、HR を同調した実験系は植物体では作成されているが、培養細胞では、まだ報告されていない (Erickson *et al.*, 1999a)。

植物体の実験系では、TMV の感染操作時に傷を付けること、HR を同調させるには温度シフトをしなければならないこと、TMV の増殖など、N 因子と p50 以外の情報伝達系が働くこと等、複合的な情報伝達の影響を受けている。また、細胞死を起こしている細胞特異的に発現する遺伝子、タンパク質等のサンプルを集める事にも適していない。それは、以下の理由が挙げられる。①植物体では感染した部位が視覚的に認識出来るまでに時間が掛かり、どこに感染したか、どれだけ感染したかが細胞死を確認するまで分からない。②視認出来た時はすでに細胞死が起こりきった時であるため、遺伝子、タンパク質等は分解されている。③サンプリングする際に、細胞死を起こしている細胞と、その周りの健全な細胞を分離することが物理的に難しい。④TMV 感染量が実験毎に変化するため、同等のサンプルを得ることが難しい。以上のことから、これまでに報告されている HR 特異的に発現する遺伝子群の中には、細胞死を起こす細胞特異的な遺伝子と共に、細胞死を起こす細胞の周辺で生き延びる細胞が二次感染を防ぐために発現している遺伝子も含まれていると考えられる。

こう言った欠点を克服するためには、以下の点が求められる。

1. 感染操作による影響や、p50 以外のタンパク質の影響が除去された、単純な実験系として研究を進められること。
2. 細胞死を同調して起こして、時間的、質的に同等のサンプルを得ることが容易であること。

3. ほぼ全ての細胞で細胞死を起こさせ、細胞死を起こす細胞特異的な現象 (遺伝子やタンパク質の発現、単離)を解析出来ること。

このような観点から、本研究では次の様な培養細胞の実験系を構築した。Avrである p50 を、グルココルチコイドの 1 つであるデキサメタゾン (DEX)によって誘導的に発現出来るベクター (pTA7002)に組込んだ (Aoyama and Chua, 1997; McNellis *et al.*, 1998; Ouwerkerk *et al.*, 2001)。つまり、DEX 処理を行なうことで、過敏反応を誘導する実験系である。

この構築した実験系を用いて、マイクロアレイ解析を行なった。その結果、発現の上昇する遺伝子、抑制される遺伝子が得られた。この実験系において、発現が上昇する遺伝子を、N 因子の下流を制御し HR の誘導に必要な遺伝子。抑制する遺伝子を、細胞死を起こしている細胞の周辺で発現する二次感染を防ぐ一般的な抵抗性遺伝子と特徴づけた。これによって、これまでタバコで病害応答遺伝子と単離同定されてきている遺伝子 *NtPRp23* (Akiyama *et al.*, 2005)や、*Hfi22* (Desvoyes *et al.*, 2002)を、更に上記の 2 つに特徴付けし直した。

第二に、直接 N 因子と相互作用するタバコ側の因子を探索することを目標とした。第 1 章より、p50 と相互作用する部位が N 因子の NBS/LRR であること、p50 との相互作用によって N 因子内の分子構造が変化することが明らかとなった。これらのことから、p50 と相互作用した N 因子が分子構造を解き、TIR ドメインが次の情報伝達因子と相互作用している事が考えられる。これまでに、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインである LRR ドメインと相互作用するタンパク質は、HSP90 や SGT1 が報告されている (Liu *et al.*, 2002, 2004b)。しかし、TIR ドメインと相互作用するタンパク質の報告は無い。

そこで、TIR と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法を用いてタバコの cDNA ライブラリーからスクリーニングを行なった。また同時に、N 因子全長と相互作用するタンパク質のスクリーニングも行なった。TIR と N 因子全長で同じタンパク質が同定されれば、その結果がより確実なものと判断出来ると考えた。スクリーニングの結果得られたポジティブクローンを β -ガラクトシダーゼ活性測定、Pull-down 試験によって確認した。

材料と方法

・マイクロアレイ

タバコ培養細胞

形質転換タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) の葉切片を改変 LS 固定培地上、30°C、常明期条件下で培養し、2 週間後にカルスを得た。このカルスを改変 LS 液体培地に移し、30°C、常明期、200 rpm で培養し、懸濁培養細胞を得た。

コンストラクトの構築

p50 を、制限酵素切断部位の *XhoI/NheI*、および C 末端側に Flag タグを付加したプライマーを作成し、TMV を感染させたタバコ葉 cDNA から増幅した。増幅した断片をそれぞれの制限酵素で処理して得られた断片を pTA7002 ベクターにクローニングした。pTA7002 は、グルココルチコイドの 1 種であるデキサメタゾン (DEX) によって発現が誘導されるベクターである。全てのコンストラクトは表 1 を参照のこと。

アグロバクテリウムへの形質転換

アグロバクテリウム (EHA105) のコンピテントセル 100 μ l を氷上で溶かし、目的のプラスミドを約 500 ng 加えた。氷上で 15-30 分間静置し、液体窒素に入れ凍結した。37°C で 15 min 加温し、溶解した後、LB 液体培地を 800 μ l 加えた。28°C で 2 時間振盪培養した後、LB 固体培地に拡げた。28°C、暗所で 2 日間静置培養した。得られたシングルコロニーを、形質転換アグロバクテリウムとして以下の実験に用いた。

タバコ形質転換体の作成

無菌培養したタバコ植物体の葉から、約 1 cm 平方のリーフディスクを切り出した。このリーフディスクを形質転換アグロバクテリウム溶液 20 ml に 1 分間浸した。キムタオルで水気を取った後、Shooting 培地-1 に静置した。25°C で 2 日間アグロバクテリウムと共存培養した後、Shooting 培地-2 に移した。シュートが出て来るまで 25°C、16 時間明期で培養した。シュートが十分に育った段階で、シュートを切り取り、Rooting 培地に移し、25°C、16 時間明期で培養した。

Shooting 培地-1 ; MS 培地用混合塩類 (4.6 g/l)、1000×B5 ビタミン (1 ml/l)、3%スクロース、NAA (0.1 mg/l)、BA (1 mg/l)、pH 5.6-5.8、0.9 % 寒天

Shooting 培地-2 ; Shooting 培地-1、Cefotaxim (500 µg/ml)、Hygromycin (300 µg/ml)

Rooting 培地 ; MS 培地用混合塩類 (4.6 g/l)、1000×B5 ビタミン (1 ml/l)、3 %スクロース、pH 5.6-5.8、0.9 % 寒天、Hygromycin (300 µg/ml)

DEX 処理

デキサメタゾン (DEX)を 30 mM になる様に 99 %エタノールに溶解した。この 30 mM DEXストック溶液を終濃度 30 µMになるように 25 µl を懸濁培養細胞溶液 25 ml に添加し、28°C、250 rpm で適時培養し、サンプリングした (10、12、18、24 hr)。

植物体への処理は、DEX ストック溶液 5 µl、0.5 µl の Tween20 を蒸留水 5 ml に溶解した。この溶液を葉にスプレーを用いて噴霧した。

エバンスブルー染色

DEX 処理をし、経時的にサンプリングした 10 mg (生重量)の形質転換培養細胞に対して、0.05 %になる様にエバンスブルー溶液を添加し、15 min 反応させた。反応後、遠心 (14000 rpm、1 min)し、改変 LS 液体培地で洗浄を 3 回行なった。洗浄後、顕微鏡下で細胞死を起し、青色に染色した細胞数を数えた。

過酸化水素の発生測定

過酸化水素の発生を測定するために化学発光試験を行なった。DEX 処理後、経時的にサンプリングした懸濁培養細胞を遠心 (3000 rpm、5 min)し、上清である培地 40 µl に、60 µl のルミノール溶液 (125 µM ルミノール、62.5 mM Tris-HCl (pH8.0))を加え、1 min 室温で反応させ、直ちにルミノメーター (Lumat LB 9507)で 30 秒間測定した。

懸濁培養細胞からのタンパク質抽出

DEX 処理後経時的にサンプリングした懸濁培養細胞 1 ml をチューブに移し、遠心 (5000 rpm、2 min)した。上清を除き、抽出液 (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 200 mM DTT, 20 % glycerol)を沈殿と頭領加え、磨砕した。遠心 (14000 rpm、5 min、4°C)し、上清を回収し試料と

した。

ウェスタンブロッティング

抽出したタンパク質溶液 100 ml に 20 ml の 6×サンプルバッファー (3 M Tris-HCl (pH 6.8), 12% SDS, β -mercaptoethanol 3.6 μ l/ml, 600 μ l/ml glycerol, 1 % BPB 数滴) を添加し、混合した後、95 °C で 5 min 加熱処理したものを試料として SDS-PAGE を行なった。ゲルからメンブレンへ転写し、ブロッキング溶液 (0.05 g/ml スキムミルク, 0.1 ml/ml 10× PBS, 0.5 μ l/ml Tween20) に室温で 1 時間浸した。3 回 PBS-T (137 mM NaCl, 8.10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 0.5 μ l/ml Tween20) で洗浄 (10 min 浸す) した後、抗 Flag 抗体溶液と室温で 1 時間反応させた。3 回 PBS-T で洗浄した後、2 次抗体溶液と室温で 1 時間反応させた。3 回 PBS-T で洗浄した後、ECL 検出試薬を使用して、X 線フィルムに露光した。

RNA 抽出

Hot フェノール法に準じて行なった。DEX 処理後経時的にサンプリングした試料を液体窒素で凍結し、十分に磨砕した。磨砕した試料に 90°C に加温した抽出バッファー (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 1 % SDS): 酸性フェノール (1:1) を試料と等量加えた。よく混和した後、CIA (クロロホルム: イソアミルアルコール) (24:1) を混合溶液と等量加えよく攪拌し、遠心 (14000 rpm、15 min) した。上清を新しいチューブに移し、上清と等量の CIA (24:1) を加えよく攪拌した。遠心 (14000 rpm、10 min) した後、上清を新しいチューブに移し、上清の 1/3 量の 8 M LiCl を加え、混和し、静置した。遠心 (14000 rpm、15 min) し、上清を除き、2 M LiCl で 1 回、70 % エタノールで 2 回洗浄し、乾燥させた後、DEPC 水に溶解した。

mRNA 精製

GenElute mRNA Miniprep Kit (SIGUMA) を用いた。全 RNA に RNase-free 水を加え、総量を 250 μ l にした。250 μ l の 2×Binding Solution、15 μ l のオリゴ(dT)ビーズを加え、良く混和した。70°C で 3 min、室温で 10 min 静置し、ビーズに mRNA を吸着させた後、遠心 (14000 rpm、2 min) し、上清を除いた。500 μ l の Wash Solution でビーズを懸濁し、スピнкаラムで遠心 (14000 rpm、2 min) した。500 μ l の Wash Solution で洗浄し、スピнкаラムを新しいチューブに乗せ、70°C に加温した。

Elution Buffer を 50 μ l 添加し、70°C で 5 min 静置した。遠心 (14000 rpm、2 min) し、mRNA を回収した。

標識・精製

LabelStar Array Kit (QIAGEN) を用いた。1 μ g の mRNA に RNase-Free 水を総量 18 μ l になるように調整し、2 μ l の Denaturation Solution Plus を加え、良く攪拌した。65°C で 5 min 反応させた後、氷上で急冷し、RNA を変性させた。30 μ l の標識 dCTP (Cyanine3-dCTP、または Cyanine5-dCTP) (Amersham Biosciences) を含む Mixture を加え、37°C で 2 時間反応させた。2 μ l の Stop Solution LS を添加し、反応を止めた。比較するサンプルの Cy3 と Cy5 で標識した cDNA を一つにまとめ、520 μ l の Buffer PB を加え、混和し、MinElue スピнкаラムにのせた。遠心 (14000 rpm、1 min) し、750 μ l の Buffer LS で洗浄 (14000 rpm、1 min) した。更に 750 μ l の Buffer PE で洗浄 (14000 rpm、1 min) し、遠心 (14000 rpm、1 min) で完全に乾かした後、10 μ l の Buffer EB を添加し、1 min 静置した後、遠心 (14000 rpm、1 min) で溶出した。溶出の行程を 6 回繰り返した。

Mixture ;	10 \times Buffer RT	5.0 μ l
	dNTP Mix C	5.0 μ l
	標識 dCTP (1mM)	1.0 μ l
	オリゴ(dT)プライマー (20 μ M)	5.0 μ l
	RNase inhibitor (40units/ μ l)	0.5 μ l
	RNase Free 水	11.0 μ l
	<u>LabelStar Reverse Transcriptase</u>	<u>2.5 μl</u>
	Total	30.0 μ l

ハイブリダイゼーション

60 μ l の標識 cDNA に 60 μ l の Microarray Hybridization buffer (Amersham Biosciences)、120 μ l のホルムアミド、2 μ l の Buffer EB を添加し、よく混和した。95°C で 2 min 加熱し、変性させた後、氷上で 5 min 急冷した。遠心 (14000 rpm、1 min) を 2 回行い、上清をプローブ溶液として回収した。マイクロアレイスライド (Lucidea reflective slide) (Amersham Biosciences) を UV クロスリンカー (1000 nm) で処理した後、AUTOMATED SLIDE PROCESSOR (Amersham Biosciences) にセットした。プレハイブリダイゼーションの後、プローブ溶液 200 μ l を注

入し、ハイブリダイゼーションを行なった。洗浄の後、FLA8000 (FUJIFILM)を用いて発光を読み取った。

解析

Array VISION™ version 6.0 (Amersham Biosciences)を用いて解析した。シグナル強度が2倍以上の差があったものをピックアップし、遺伝子配列をBLAST検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)により同定した。

ノーザンハイブリダイゼーション

20 µg の抽出した RNA を 1.2%(w/v)ホルムアミド入り MOPS アガロースゲルで電気泳動した。ナイロンメンブレン (Hybond™-N+, Amersham)に 20×SSC で転写し、UV クロスリンカー (700nm)(RPN 2501, Amersham)で固定させた。このメンブレンとそれぞれのプローブと 42°C で 16 時間ハイブリダイゼーションした。プローブは BcaBEST Labeling Kit (TaKaRa)を用いて[α-³²P]dCTP でラベルした。ハイブリダイゼーション後、2×SSC, 0.1% SDS、0.5×SSC, 0.1% SDS、0.1×SSC, 0.1% SDS でそれぞれ 65°C、15 min ずつ洗浄した。洗浄の後、X 線フィルムに-80°C、16 時間露光させ、シグナルを検出した。

RT-PCR

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 を用いた。下記に示す反応液を調整した。

MgCl ₂	2 µl
10× RT buffer	1 µl
RNase Free dH ₂ O	3.75 µl
dNTP Mixture	1 µl
RNase inhibitor	0.25 µl
AMV Reverse Transcriptase XL	0.5 µl
Oligo dT-Adaptor Primer	0.5 µl
total RNA	500 ng
<hr/>	
total	10 µl

この反応液を混合し、50°C 30 min、99°C 5 min、5°C 5min 行ない、逆転写反応させた。この反応液に次に示す反応液を加えた。

5 × PCR buffer	10 μl
dH ₂ O	28.75 μl
<i>TaKaRa Ex Taq</i> [®] HS	0.25 μl
標的遺伝子上流 Primer	0.5 μl
標的遺伝子下流 Primer	0.5 μl
<hr/>	
total	40 μl/sample

調整した反応液をサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムで増幅した。

94°C	2 min	} 25 cycle
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	1 min	
25°C	5 min	

反応終了後 1 % アガロースゲルで電気泳動し反応物を確認した。

・酵母 two-hybrid 法によるライブラリースクリーニング

コンストラクトの構築

TMV 感染したタバコ葉より得られた cDNA を鋳型鎖として、PCR 法によって増幅した。N 因子全長、TIR それぞれの DNA 鎖の 5' 側に制限酵素切断部位を付けたプライマーを用いて増幅した。それぞれ *EcoRI/PstI* をセットとして作成した。増幅した断片はそれぞれ制限酵素で切断し、pGBKT7 (Clontech) にクローニングした。傷処理(0、0.5、1、3、6 hr)をしたタバコ葉からそれぞれ全 RNA を抽出し混合し、mRNA に精製した。得られた mRNA をオリゴ(dT)プライマー、MMLV 逆転写酵素を用いて逆転写 PCR を行なった。得られた一本鎖 cDNA を LD-PCR によって増幅し二本鎖 cDNA を得た。得られた cDNA を電気泳動し、約 0.5-1 kbp の大きさの断片をゲルから抽出し、pGADT7-RecT に導入した。

酵母への形質転換

N 因子全長、TIR を組込んだ pGBKT7 を酵母 Y187 株に、cDNA ライブラリーを組込んだ pGADT7 を酵母 AH109 株に、以下の方法で形質転換した。YPDA 固体培地から得たシングルコロニーを、50 ml の YPDA 液体中で 30°C、一晚培養した。OD₆₀₀ が 0.4-0.5 の時点で遠心(2000rpm、5 分間)し、上清を除いた。3 ml の 1×TE/LiAc を加えよく攪拌した後、14000 rpm で Flash し、上清を捨て、600 μl の 1×TE/LiAc に再懸濁し、酵母コンピテントセルを得た。このコンピテントセル 50 μl に熱処理をしたキャリアーDNA を 5 μl、PEG/LiAc 溶液を 500 μl、ベクターを 1 μl 加えよく攪拌した。30°C で 30 min 培養した後、20 μl の DMSO を加え、よく攪拌した。42°C で 15 min 培養した後、14000 rpm で flash し、上清を取り除いた。1 ml の 0.9 % NaCl を加えピペティングで再懸濁させた。pGBKT7 を組込んだ酵母はトリプトファンを抜いた SD 培地 (SD-W) に拡げた。このプレートを 30°C で 2 日間培養し、得られたシングルコロニーを形質転換酵母として用いた。pGADT7 を組込んだ酵母はロイシンを抜いた SD 培地 (SD-L) に拡げた。これらのプレートを 30°C で 2 日間培養し、得られたそれぞれのプレート上のコロニー群を 5 ml の凍結用培地 (25 % グリセロールを含む YPD 培地) に溶かし込み、細胞数を計測した後、1 ml (1.2×10^9 cells/ml) ずつに分注し、-80°C で保存した。

交配

45 ml の 2×YPDA 液体培地に 5 ml の pGBKT7 ベクターを組込んだ酵母 Y187 株、1 ml のライブラリーを組込んだ酵母 AH109 株 (1.2×10^9 cells/ml) を入れ 30°C、50 rpm で 24 時間振盪培養し、交配した。培養後集菌 (1000×g、10 min) し、50 ml の 0.5×YPDA 液体培地で 2 回洗浄した。10 ml の 0.5×YPDA 液体培地に懸濁しトリプトファン、ロイシン、ヒスチジン、アラニンを抜いた SD 培地 (SD-WLHA) に拡げ、30°C、2 日間培養した。

β-ガラクトシダーゼ活性試験 (フィルター試験)

生育してきたコロニーを新しい SD-WLHA 培地にスポットし、30°C、2 日間培養した。滅菌した濾紙を生育したコロニーに被せ、コロニーを転写した。転写した濾紙を液体窒素に 30 秒浸し室温で解凍した。X-gal 反応液に浸した濾紙の上に転写した濾紙を置き、30 min 置きに 5 回 (30, 60, 90, 120, 150 min) 観察し、青色に染色したコロニーを選抜した。

酵母からのプラスミド抽出

選抜したコロニーを 2 ml の YPDA 液体培地で 30°C、250 rpm、2 日間培養した。集菌 (14000 rpm、5 min) した後、50 μl の YPDA 液体培地に再懸濁した。10 μl の Lyticase 溶液を加え、よく攪拌した後、37°C、250 rpm、1 時間反応させた。反応液に 10 μl の 20% SDS を加え、1 min 攪拌した。サンプルを -20°C で凍結し、室温で解凍した後、再度よく攪拌したものをフェノール:クロロホルム法を用いてプラスミドを回収した。

シーケンス解析

得られた酵母プラスミドを大腸菌コンピテントセル (DH5α) に形質転換し、コロニー PCR によって導入が確認出来た菌株から再度プラスミドを抽出し、精製したものをシーケンス解析した。プライマーは 3'AD プライマーを用いた。

タンパク質発現・Pull-down 試験

TIR ドメインを pGEX4T-3 ベクターにクローニングし、ライブラリースクリーニングより得られた遺伝子を pRSET-C にクローニングし

た。構築したコンストラクトをそれぞれ大腸菌株 DH5 α 、BL21(DE3) に形質転換し、IPTG (終濃度 40 $\mu\text{g/ml}$) でタンパク質発現を誘導した。発現したタンパク質を抽出し、SDS-PAGE を行なった後、抗 GST 抗体、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロッティング法で確認した。詳しくは、第 1 章を参照のこと。

結果

実験系の構築

アグロインフィルトレーション法による HR の誘導確認

構築したコンストラクトをアグロバクテリウムに形質転換し、アグロインフィルトレーション法によって一過的に導入した。導入した部位に対して DEX 処理を行ない p50 の発現を誘導させた。その結果、3 日後に HR と思われる褐変化が観察された (図 10)。

形質転換植物の作成

図 10 より構築したコンストラクトが DEX によって発現を誘導的にコントロール出来る事が確認出来た。そこで、タバコ植物体ヘリーフディスク法を用いて pTA7002-p50 を導入した形質転換植物を作成した。その結果、形質転換体と思われる個体が 8 個体得られた (図 11A)。これらの形質転換体から DNA を抽出し、導入遺伝子の PCR 法による確認を行なった。8 個体中 4 個体が形質転換体であると確認された (図 11B)。これらの個体を改変 LS 固体培地上でカルス化させ、改変 LS 液体培地で振盪培養することで懸濁培養細胞にした (図 11C)。次にこれらの懸濁培養細胞に DEX 処理を行ない、実験系の評価を行った。

HR を誘導する実験系の評価

構築した実験系が、実際に DEX によって p50 の発現を誘導し、細胞死を引き起こすのかを以下の 4 つの方法で確認した。①エバンスブルー染色による経時的な細胞死を起こした細胞の計数。②HR が起こっている指標とされる H_2O_2 の発生量の測定。③HR の指標とされる DNA の断片化の観察。④p50 の発現量のウェスタンブロッティングによる確認。

① : DEX を野生型の懸濁培養細胞、形質転換懸濁培養細胞に処理し、経時的にサンプリングした。サンプリングした細胞にエバンスブルー溶液を処理し、光学顕微鏡下で観察した。エバンスブルーは死んだ細胞内に入り込むため、青色に染色した細胞 (細胞死を起こした細胞) と染色していない細胞 (生きている細胞) の数を計数し (図 12A-I)、割合を求めた (図 12J)。その結果、DEX 処理後 10 時間から細胞死が起こり始め、24 時間で約 80% の細胞が細胞死を起こしていた。

- ②：①の結果より細胞死を起こすタイムコースを踏まえて、DEX 処理後 0、12、24 時間にサンプリングした。このサンプルの培地中に含まれる H_2O_2 の量を、ルミノメーターを用いて測定した。その結果、①の結果と同様に、12 時間から H_2O_2 が発生し始め、24 時間で最大で発生し始めた 12 時間に対して約 7 倍まで発生が上昇した (図 13)。
- ③：植物の HR は動物のアポトーシスと形体が類似している事から、アポトーシスや HR の指標とされている DNA の断片化 (Levine *et al.*, 1996; Mittler *et al.*, 1997) を観察した。DEX 処理後 18 時間後のサンプルから DNA を抽出し、RNase で処理した後、電気泳動し、そのシグナルを検出した。その結果、断片化らしきものは観察されたが、はっきりとした断片化は確認出来なかった (図 14)。
- ④：実際に DEX 処理によって p50 が誘導されている事を、p50 にタグとして付加した Flag に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行なう事で確認した。その結果、①,②の結果を反映する様に、DEX 処理後 10 時間から p50 の発現が始まっている事が確認出来た (図 15)。

マイクロアレイ解析

実験系の評価の結果を踏まえ、DEX 処理後 10、12、18 時間のサンプルをマイクロアレイ解析に用いた。また、Cy3 と Cy5 のラベル効率が違う事から、野生型 2 ラインと形質転換体 2 ラインを組み合わせ、Cy3 と Cy5 を入れ替え、3 回繰り返した試験を行った (図 16)。得られたシグナルデータは Cy3、Cy5 の総シグナル強度を揃え、3 回のデータを平均化し、各サンプリングした時間ごとに比較した。その結果、DEX 処理後 10 時間では発現が 2 倍以上上昇した遺伝子が 280、1/2 以下に減少した遺伝子が 227 得られた。病害で上昇するとこれまでに報告されていたものの中では 18 個が上昇し、18 個が減少していた (図 17A)。同様に DEX 処理後 12 時間では、上昇した遺伝子が 455、減少した遺伝子が 318 得られた。その内、病害で上昇するとこれまでに報告されていたものの中では 33 個が上昇し、16 個が減少していた (図 17B)。DEX 処理後 18 時間では、上昇した遺伝子が 337、減少した遺伝子が 279 得られた。その内、病害で上昇するとこれまでに報告されていたものの中では 38 個が上昇し、10 個が減少していた (図 17C)。また、病害関連遺伝子の上昇した遺伝子、減少した遺伝子のリストは表 2 を参照。

マイクロアレイ結果の確認

マイクロアレイ解析から、HR時に発現が変化する遺伝子を同定した。そのマイクロアレイデータの確認を行なうために、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRを行なった。DEX処理後12、18時間で発現が上昇した遺伝子から *NtTMK1*、*Ascorbate peroxidase (APX)*、*PR-Q*、*NtWRKY1*、*NtPRp23*、コントロールとして *p50* を選択し、確認した (図 18)。その結果、マイクロアレイの結果と同様に発現が上昇していた。しかし、DEX処理後10時間では発現の上昇が見られなかった *NtTMK1* の発現が10時間から観察された。また、マイクロアレイ解析では、DEX処理後12時間で約3倍の発現上昇が見られた *APX* が、ノーザンハイブリダイゼーションではそれ以上の発現上昇が観察された (図 18A)。*NtPRp23*、スプライシング因子である *NtSC35* (後述)、*p50* いずれの遺伝子も発現の上昇が RT-PCR で確認出来た (図 18B)。

酵母 two-hybrid 法によるライブラリースクリーニング

スクリーニング、クローンの同定

N 因子の TIR ドメイン、および N 因子全長と相互作用するタンパク質を同定するために酵母 two-hybrid 法を用いて、タバコの cDNA ライブラリーのスクリーニングを行なった。重複を含む 1.2×10^9 cells/ml のライブラリーを用いた。4 つのアミノ酸の非存在下で生育したものを選抜した。その結果、TIR ドメイン単独から 609 個、N 因子全長から 330 個のクローンが得られた。次に、その中で β -ガラクトシダーゼ活性試験 (フィルター試験) でも早い時間に青色に染色したコロニーを更に選抜した (図 19)。その結果、TIR ドメイン単独から 22 個、N 因子全長から 18 個のクローンに絞れた。これらのコロニーからプラスミド (pGADT7-cDNA) を単離し、シークエンス反応を行ない、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を元に BLAST 検索を行なった。その結果、TIR ドメインから 9 個、N 因子全長から 4 個が同定出来た。その中で TIR ドメインからはトマトの SNF1 様タンパク質 (SUCROSE NONFERMENTING1)、CIP3 (CONSTANS interacting protein 3)、タバコの NtGapA (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A)、RubisCO (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)、NtGA2 (GTP binding protein α) が同定出来た (表 3)。N 因子全長からはリボゾーム、OsARD1 (acireductone dioxygenase) が同定出来た。また、TIR ドメイン、N 因子全長から同一のクローンが 2 種類単離された。しかし、これらは mRNA の配列しか登録されていないものであったため、ORF を探索し、予測されるアミノ酸配列から、更に BLAST 検索を行なった。その結果、1 つはシロイヌナズナのスプライシング因子 atSC35 等と相同性が高かった (以後、この因子の事を仮に NtSC35 と呼ぶ)。またもう 1 つは、トマトやシロイヌナズナ、イネの CLB1 (Calcium-dependent lipid-binding 1) と相同性が高かった (表 3)。

Pull-down 試験による確認

得られた cDNA の中から以下の 3 クローンを選んで確認の実験を行なった。TIR ドメインと相互作用し、最も早い時間で β -ガラクトシダーゼ活性を示したクローンから同定された SNF1 様タンパク質 (以後、この因子を NtSnRK1 (SNF1-related kinase 1) と呼ぶ)。TIR ドメインと N 因子全長と相互作用した同一のクローンから同定された NtSC35 およ

び CLB1。これらの遺伝子の全長 cDNA は単離されていないため、酵母 two-hybrid 法で相互作用した領域のタンパク質 (約 20kDa) を大腸菌で発現させ、Pull-down 試験によって相互作用の確認を行なった。その結果、NtSnRK1、NtSC35、CLB1 は酵母 two-hybrid と同様に、TIR と相互作用する事が明らかとなった (図 20)。GST 融合 TIR、His 融合 NtSnRK1、NtSC35、CLB1 はそれぞれ抗 GST 抗体、抗 His 抗体によって発現の確認を行なった。

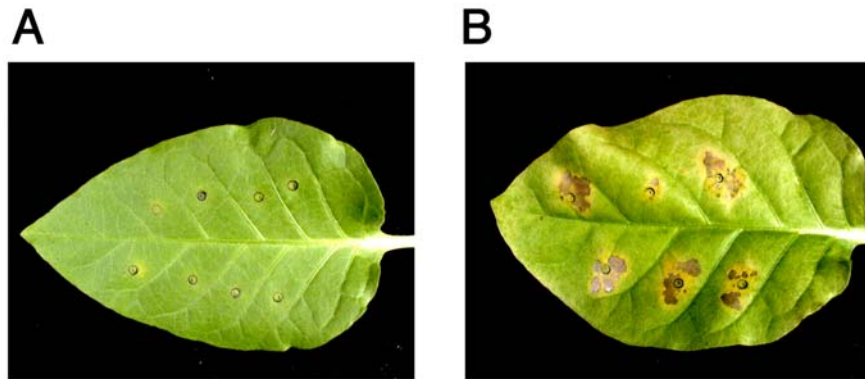


図 10. アグロインフィルトレーションによる確認

DEX で発現が誘導出来る pTA7002 ベクターに p50 を組込んだコンストラクトを作製した。このコンストラクトをアグロインフィルトレーション法によって一過的に発現させた。

A. アグロインフィルトレーション後 2 日目の写真。

B. インフィルトレーション後 2 日経過したものに DEX (30 μM) を噴霧処理し、3 日経過した写真。

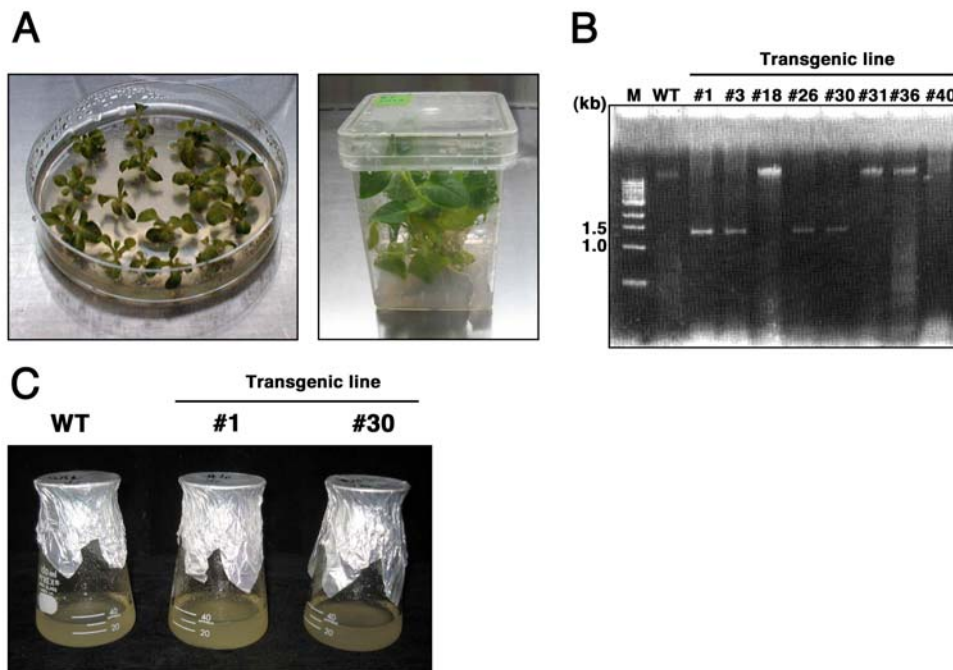


図 11. 作製した形質転換体

A. 形質転換体。p50 のコンストラクトを組込んだアグロバクテリウムをリーフディスクに感染し、出芽したシュートを Rooting 培地に静置した (図左側)。得られたシュートを更に培養しカルチャーボックスに移し、継代培養した (図右側)。

B. 導入遺伝子の確認。A 右図程度まで生育した植物体 8 個体の葉から DNA を抽出し、pTA7002-p50 の有無を PCR によって確認した。p50 は約 1.3 kb。

C. 懸濁培養細胞。B で導入遺伝子の確認がとれた個体、および野生型個体から葉切片を作り、改変 LS 固体培地上に 2 週間静置した。発生したカルスを改変 LS 液体培地で振盪培養し、懸濁培養細胞を得た (左から野生型、形質転換体 #1、#30)。

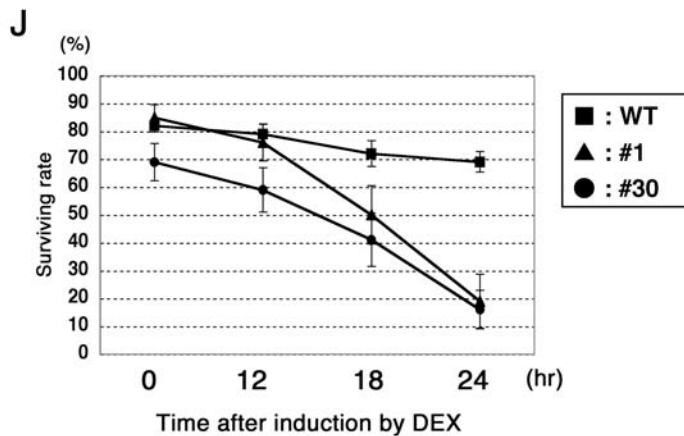
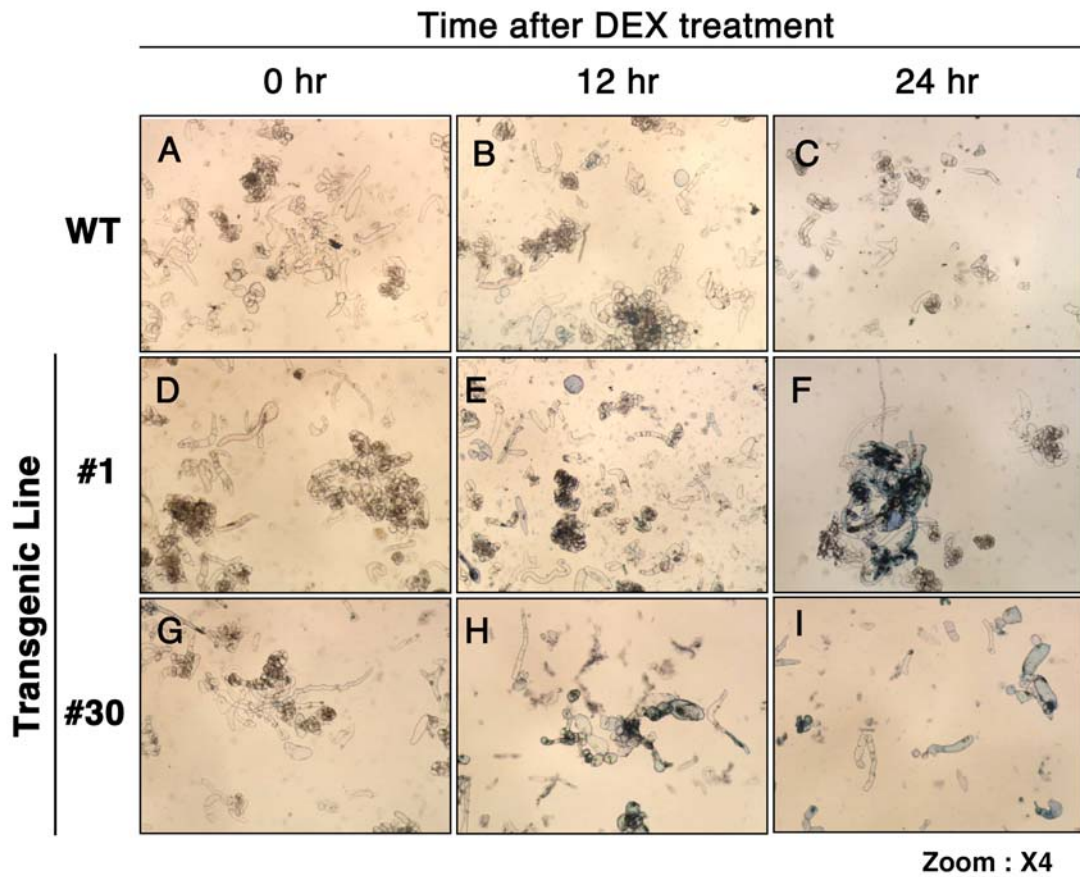


図 12. DEX 処理による細胞死の計測

作製した培養細胞液に DEX (30 μ M) を添加し、経時的にサンプリングし、エバンスブルー染色法によって、細胞死を起こしている細胞の数を計測した。DEX 処理後 0 (A, D, G) 時間、12 (B, E, H) 時間後、24 (C, F, I) 時間後の顕微鏡写真。野生型 (WT) ではほとんど細胞死が起こっていない (A, B, C)。形質転換体 #1 (D, E, F)、#30 (G, H, I)。0, 12, 18, 24 時間後の結果をグラフ化した (J)。縦軸は生存率、横軸は DEX 処理後の時間を示している。各サンプルを独立に 3 回サンプリングし、測定した。

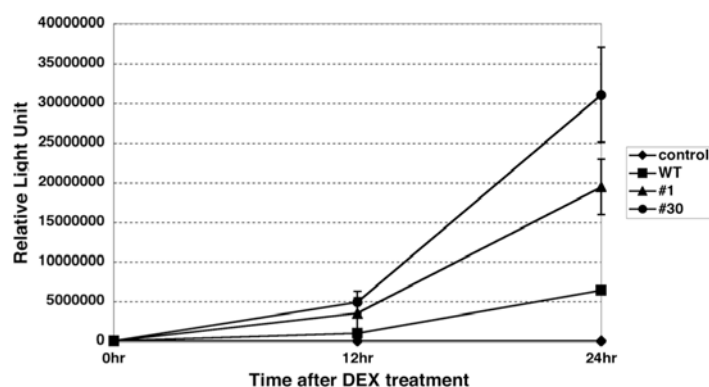


図 13. H₂O₂ の測定

DEX 処理後 0, 12, 24 時間後にサンプリングし、懸濁培養細胞の培養液中の H₂O₂ を測定した。コントロールとして改変 LS 培地を用いた (◆)。野生型 (■)、形質転換体 #1 (▲)、#30 (●)。縦軸はルミノメーターによる H₂O₂ 発生量の計測値 (相対値)、横軸は DEX 処理後の時間を示している。なお、各サンプルを独立に 3 回サンプリングし、測定した。

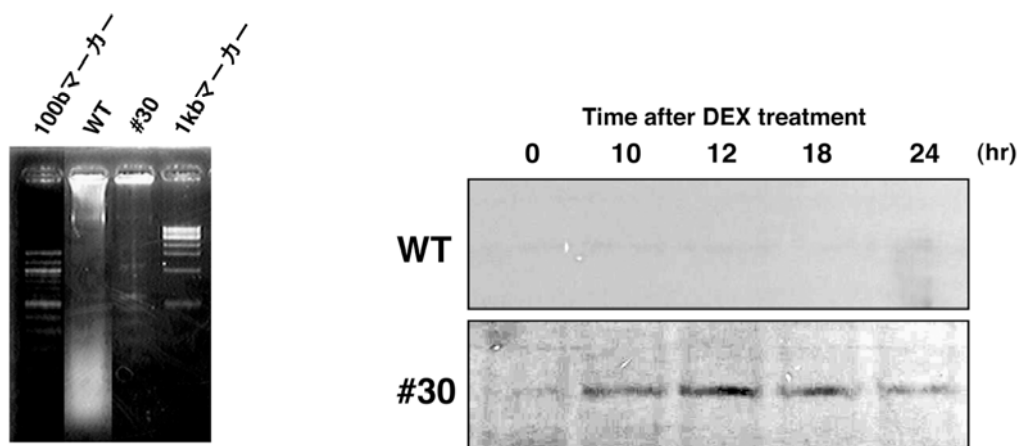


図 12. ラダー

DEX 処理後 18 時間のサンプルから DNA を抽出し、RNase 処理をした後、電気泳動し観察した。左から 100bp DNA マーカー、野生型 (WT)、形質転換体 (#30)、1kb DNA マーカー。

図 13. p50 の発現確認

DEX 処理後に p50 が発現している事を、p50 に付加した Flag タグの抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって確認した。野生型 (WT)、形質転換体 (#30) から、DEX 処理後 10, 12, 18, 24 時間にサンプリングした。

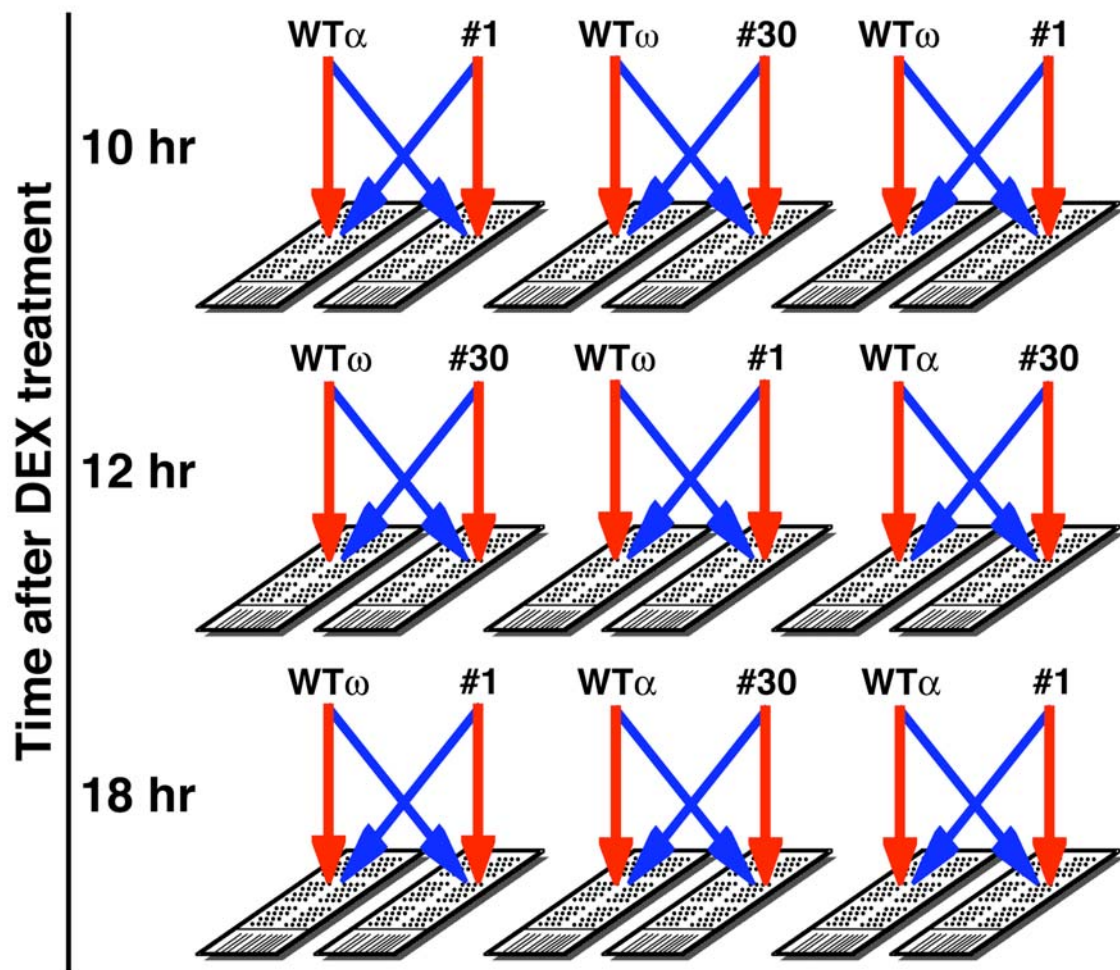


図 16. 実験説明

それぞれ野生株 2 系統と形質転換体 2 系統を組み合わせ、Cy3 (赤矢印)、Cy5 (青矢印) でラベルした cDNA のシグナルを標準化し、発現の変化を測定した。この試行を再現性確認のため、それぞれの時間に対して 3 回ずつ試行した。サンプリングした時間は DEX 処理後 10、12、18 時間である。

A

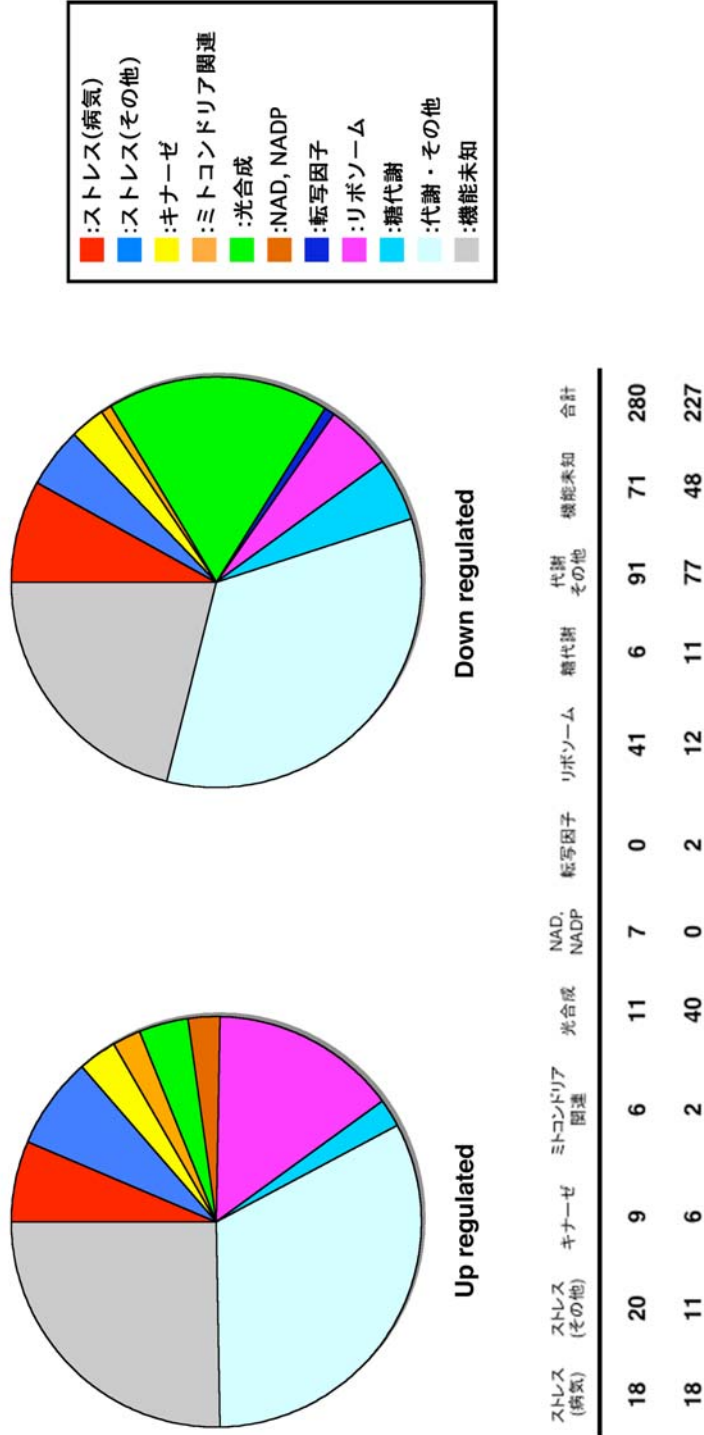


図 17. マイクロアレイ結果

A. DEX 処理後 10 時間。HR の誘導によって発現が促進(左)、抑制(右)されていた遺伝子の割合を示した。また、その遺伝子数も示した(下表)。

B

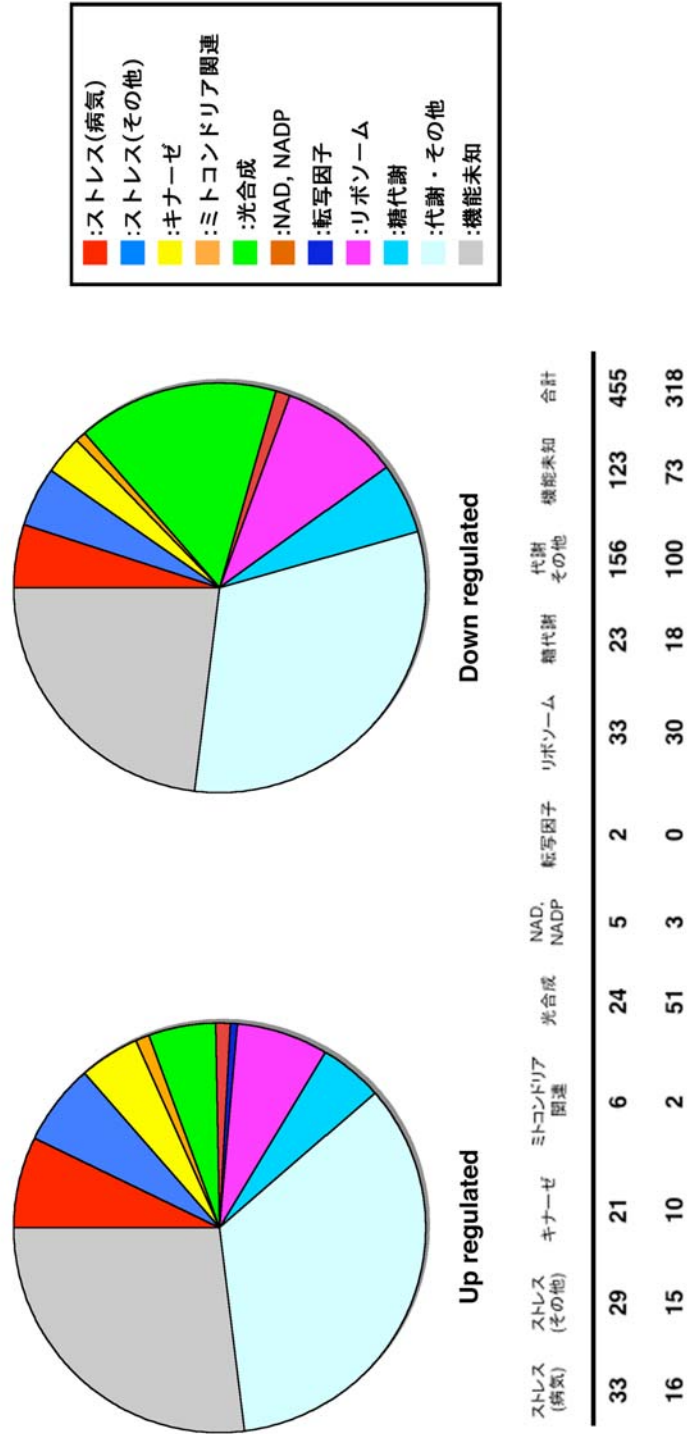


図 17. マイクロアレイ結果

B. DEX 処理後 12 時間。HR の誘導によって発現が促進(左)、抑制(右)されていた遺伝子の割合を示した。また、その遺伝子数も示した(下表)。

C

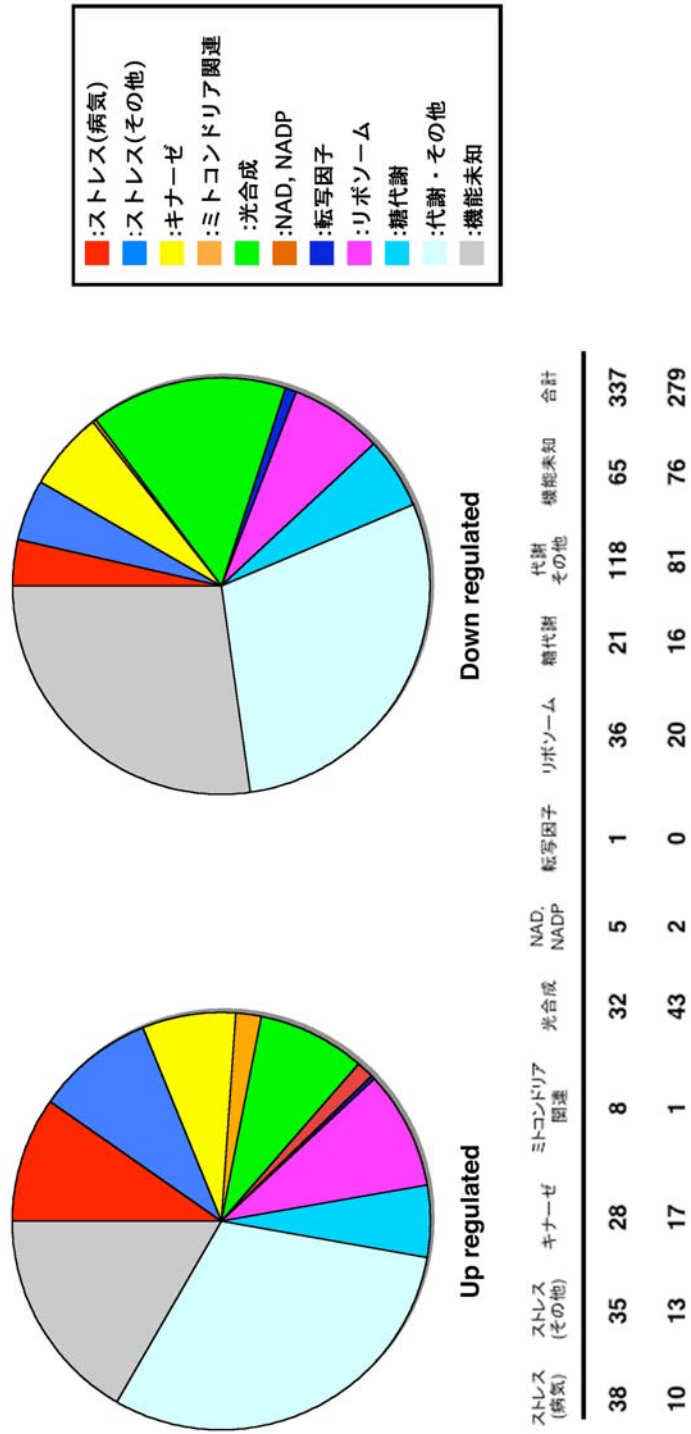


図 17. マイクロアレイ結果

C. DEX 処理後 18 時間。HR の誘導によって発現が促進(左)、抑制(右)されていた遺伝子の割合を示した。また、その遺伝子数も示した(下表)。

表 2-1. マイクロアレイ解析で発現が変化した遺伝子リスト

DEX 処理後 10 時間で上昇した遺伝子

遺伝子名	
病害応答遺伝子	catalase (<i>N. tabacum</i>) cytochrome c oxidase (<i>S. tuberosum</i>) CYP71D21 (cytochrome P450) (<i>N. tabacum</i>) ELI3 (<i>L. esculentum</i>) heat shock cognate protein (<i>S. commersonii</i>) hsc-2 mRNA for heat shock protein cognate 70 (<i>L. esculentum</i>) NtPRp23 (<i>N. tabacum</i>) patatin-like protein 1 (PAT1) (<i>N. tabacum</i>) peroxidase (<i>N. tabacum</i>) prohibitin 1-like protein (<i>B. napus</i>) putative ascorbate peroxidase (TL29) (<i>L. esculentum</i>) S-adenosylmethionine decarboxylase (<i>N. tabacum</i>) putative VAMP protein SEC22 (<i>A. thaliana</i>) SKP1-like protein (<i>N. clelandii</i>) spermidine synthase (<i>P. x hybrida</i>) zinc finger protein LSD1 (<i>B. oleracea</i>) 等 (計 18)
その他 主立った遺伝子	alcohol NADP+ oxidoreductase (<i>S. tuberosum</i>) cystein kinase (<i>S. tuberosum</i>) cytosolic aconitase (<i>N. tabacum</i>) elongation factor-1 (<i>N. tabacum</i>) fructose-1,6-bisphosphate aldolase (<i>L. esculentum</i>) fructokinase (<i>A. thaliana</i>) NADP oxidase (<i>A. thaliana</i>) ran binding protein-1 (<i>L. esculentum</i>) S-adenosylmethionine decarboxylase (<i>N. tabacum</i>) Sn-2 (<i>C. annuum</i>) snak-in-2 (<i>S. tuberosum</i>) translationally controlled tumor protein (<i>N. tubacum</i>) ubiquitin-conjugating enzyme (E2) (<i>N. tabacum</i>) その他 (計 280)

表 2-2. マイクロアレイ解析で発現が変化した遺伝子リスト

DEX 処理後 10 時間で減少した遺伝子

遺伝子名	
病害応答遺伝子	callose synthase 1 catalytic subunit (<i>A. thaliana</i>) class1 chitinase (<i>P. sativum</i>) homeodomain protein Hfi22 (<i>N. tabacum</i>) NtWRKY1 (<i>N. tabacum</i>) POTATP1 (<i>S. tuberosum</i>) putative AIM1 protein (<i>A. thaliana</i>) salicylic acid binding catalase (<i>N. tabacum</i>) SE39b (thaumatin like protein) (<i>N. tabacum</i>) snakin-1 (<i>S. tuberosum</i>) thionin like protein (<i>N. tabacum</i>) WRKY6 (<i>N. tabacum</i>) WRKY12 (<i>N. tabacum</i>) 等 (計 18)
その他 主立った遺伝子	FtsH protease (<i>L. esculentum</i>) GDP dissociation inhibitor (<i>N. tabacum</i>) GTP-binding protein Rab6 (<i>O. sativa</i>) glycolate oxidase (<i>L. esculentum</i>) light-harvesting chlorophyll a/ b binding protein (<i>N. tabacum</i>) NySS41 (<i>N. sylvestris</i>) photosystem I subunit III precursor (<i>N. tabacum</i>) その他 (計 227)

表 2-3. マイクロアレイ解析で発現が変化した遺伝子リスト

DEX 処理後 12 時間で上昇した遺伝子

遺伝子名	
病害応答遺伝子	ascorbate peroxidase (<i>N. tabacum</i>) avrRpt2-induced protein 2-related (<i>N. tabacum</i>) Bax inhibitor (<i>N. tabacum</i>) catalase (<i>N. tabacum</i>) catechol <i>o</i> -methyltransferase (<i>N. tabacum</i>) cytochrome c oxidase (<i>Solanum tuberosum</i>) cytochrome c1 precursor (<i>S. tuberosum</i>) GTPbinding protein (<i>A. thariana</i>) heat shock protein cognate 70 (<i>L. esculentum</i>) mitogen-activated protein kinase (<i>S. tuberosum</i>) NtEIG-E80 (<i>N. tabacum</i>) NtPRp23 (<i>N. tabacum</i>) NtTMK1 (LRR type receptor-like kinase) (<i>N. tabacum</i>) NtWRKY1 (<i>N. tabacum</i>) peroxidase (<i>N. tabacum</i>) phenylalanine ammonia-lyase (<i>P. sativum</i>) prohibitin 1-like protein (<i>B. napus</i>) SKP1 (<i>N. benthamiana</i>) TMV response-related gene product (<i>N. tabacum</i>) Tsi1 (<i>N. tabacum</i>) 等 (計 33)
その他 主立った遺伝子	14-3-3 family protein (<i>L. esculentum</i>) AAA-type ATPase (<i>A. thaliana</i>) AI-induced protein (<i>N. tabacum</i>) CaMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) (<i>N. tabacum</i>) cellulose synthase-1 (<i>Z. mays</i>) cytochrom P450 (<i>A. thariana</i>) delta TIP (<i>N. glauca</i>) G protein beta subunit (<i>N. plumbaginifolia</i>) Myb-like protein (<i>N. tabacum</i>) NtCDPK1 (<i>N. tabacum</i>) NtRab11a gene product (<i>N. tabacum</i>) pleiotropic drug resistance like protein (<i>N. tabacum</i>) PR-Q (chitinase) (<i>N. tabacum</i>) pyruvate kinase (<i>N. tabacum</i>) senescence-associated protein (<i>P. sativum</i>) serin/threonine kinase (<i>O. sativa</i>) splicing factor SC35 (<i>A. thaliana</i>) その他 (計 455)

表 2-4. マイクロアレイ解析で発現が変化した遺伝子リスト

DEX 処理後 12 時間で減少した遺伝子

遺伝子名	
病害応答遺伝子	Class1 chitinase (<i>Pisum sativum</i>) DnaK-type molecular shaperone (<i>A. thaliana</i>) ELI3 (<i>L. esculentum</i>) hypersensitive-induced response protein (<i>P. sativum</i>) POTATP1 (<i>Solanum tuberosum</i>) putative AIM1 protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>) Salicylic acid binding catalase (<i>Nicotiana tabacum</i>) SE39b (thaumatin like protein) (<i>Nicotiana tabacum</i>) Snakin-1 (<i>Solanum tuberosum</i>) WRKY6 (<i>Nicotiana tabacum</i>) WRKY12 (<i>Nicotiana tabacum</i>) YUP8H12_14 (putative peroxidase) (<i>A. thaliana</i>) 等 (計 16)
その他 主立った遺伝子	chloroplast ribosomal protein L4 (<i>N. tabacum</i>) ferredoxin-NADP(+) reductase (<i>N. tabacum</i>) FtsH protease (<i>L. esculentum</i>) glycolate oxidase (<i>L. esculentum</i>) light-harvesting chlorophyll a/ b binding protein (<i>N. tabacum</i>) NySS41 (<i>N. sylvestris</i>) Osmotin (<i>N. tabacum</i>) photosystem I subunit III precursor (<i>N. tabacum</i>) photosystem I reaction centersubunit X psaK (<i>N. tabacum</i>) pyruvate dehydrogenase kinase 1 (<i>O. sativa</i>) ribulose biphosphate carboxylase (<i>N. tabacum</i>) SPY protein (<i>L. esculentum</i>) TKRP125 (<i>N. tabacum</i>) その他 (計 318)

表 2-5. マイクロアレイ解析で発現が変化した遺伝子リスト

DEX 処理後 18 時間で上昇した遺伝子

遺伝子名	
病害応答遺伝子	abscisic acid-induced-like protein (<i>A. thaliana</i>) ascorbate peroxidase (<i>N. tabacum</i>) ascorbate free radical reductase (<i>N. tabacum</i>) catalase (<i>N. tabacum</i>) catechol <i>o</i> -methyltransferase (<i>N. tabacum</i>) cellulose synthase (<i>N. tabacum</i>) DnaJ-like protein (<i>L. esculentum</i>) elicitor responsible protein (<i>N. tabacum</i>) glutathione peroxidase (<i>G. hirsutum</i>) heat shock protein cognate 70 (<i>L. esculentum</i>) mitogen-activated protein kinase (<i>S. tuberosum</i>) mitochondrial ATPase beta subunit (<i>N. sylvestris</i>) NtTMK1 (LRR type receptor-like kinase) (<i>N. tabacum</i>) NtWRKY1 (<i>N. tabacum</i>) peroxidase ATP19a (<i>A. thaliana</i>) phenylalanine ammonia-lyase (<i>P. sativum</i>) PLC2 (<i>N. tabacum</i>) prohibitin 1-like protein (<i>B. napus</i>) receptor-like kinase Xa21-binding protein 3 (<i>O. sativa</i>) spermidine synthase (<i>P. x hybrida</i>) thionine (<i>N. tabacum</i>) WRKY2 (<i>N. tabacum</i>) 等 (計 38)
その他 主立った遺伝子	14-3-3 family protein (<i>L. esculentum</i>) AAA-type ATPase (<i>A. thaliana</i>) acidic chitinase III (<i>N. tabacum</i>) C1C-Nt1 (<i>N. tabacum</i>) calcium exchanger (CAX1) (<i>A. thaliana</i>) cellulose synthase-1 (<i>Z. mays</i>) cytochrom P450 (<i>A. thaliana</i>) ERF1 (ethylene responsive transcriptionfactor 1) (<i>N. tabacum</i>) forever young oxidoreductase (<i>N. tabacum</i>) glutathione S-transferase (<i>N. tabacum</i>) lipoic acid synthase LIP1 (<i>A. thaliana</i>) Osmotin (<i>N. tabacum</i>) PR-Q (chitinase) (<i>N. tabacum</i>) proteinase inhibitor precursor (<i>N. tabacum</i>) putative splicing factor (<i>C. arietinum</i>) RNA binding protein 45 (<i>N. plumbaginifolia</i>) senescence-associated protein (<i>P. sativum</i>) splicing factor SC35 (<i>A. thaliana</i>) zinc finger protein LSD1 (<i>B. oleracea</i>) その他 (計 337)

表 2-6. マイクロアレイ解析で発現が変化した遺伝子リスト

DEX 処理後 18 時間で減少した遺伝子

遺伝子名	
病害応答遺伝子	Hfi22 (<i>N. tabacum</i>) SE39b (<i>N. tabacum</i>) SKP1 like protein (<i>L. esculentum</i>) WRKY6 (<i>A. thaliana</i>) WRKY12 (<i>T. cacao</i>) 等 (計 10)
その他 主立った遺伝子	14-3-3 protein (<i>A. thaliana</i>) alcohol NADP+ oxidoreductase (<i>S. tuberosum</i>) aquaporin-like protein (<i>P. hybrida</i>) enolase (<i>L. esculentum</i>) homeobox 1 protein (<i>L. esculentum</i>) LHCII type III (<i>L. esculentum</i>) NADH-ubiquinone oxidoreductase (<i>S. tuberosum</i>) OPDA reductase (<i>N. tabacum</i>) plastoglobule associated protein PG1 precursor (<i>P. sativum</i>) PSI-D2 (<i>N. sylvestris</i>) putative aldo/keto reductase (<i>O. sativa</i>) putative von Hippel-Lindau binding protein (<i>A. thaliana</i>) starch branching enzyme II (<i>S. tuberosum</i>) sugar transporter like protein (<i>A. thaliana</i>) TobRB7-18C protein (<i>A. thaliana</i>) その他 (計 279)

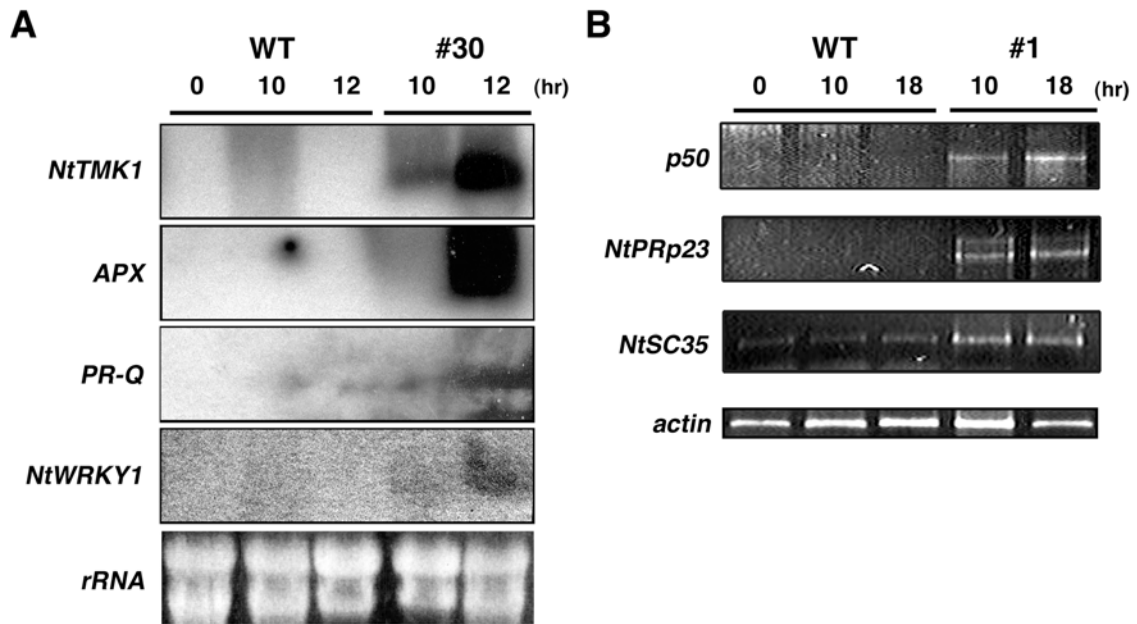


図 18. マイクロアレイ解析の確認

A. ノーザンハイブリダイゼーション。 マイクロアレイ解析の結果をノーザンハイブリダイゼーションによって確認した。DEX 処理後 12 時間で、発現の上昇が確認された遺伝子 (*NtTMK1*、*APX*、*PR-Q*、*NtWRKY1*) をプローブとして、DEX 処理後 0、10、12 時間の野生型 (WT) と形質転換体 (#30) の遺伝子発現の確認を行なった。

B. RT-PCR。 マイクロアレイ解析の結果を RT-PCR によって確認した。DEX 処理後 0、12、18 時間の野生型 (WT)、形質転換体 (#1) から RNA を抽出し、DEX 処理によって発現誘導のかかる *NtPRp23*、*NtSC35* の発現を確認した。*p50*、*actin* はコントロールである。

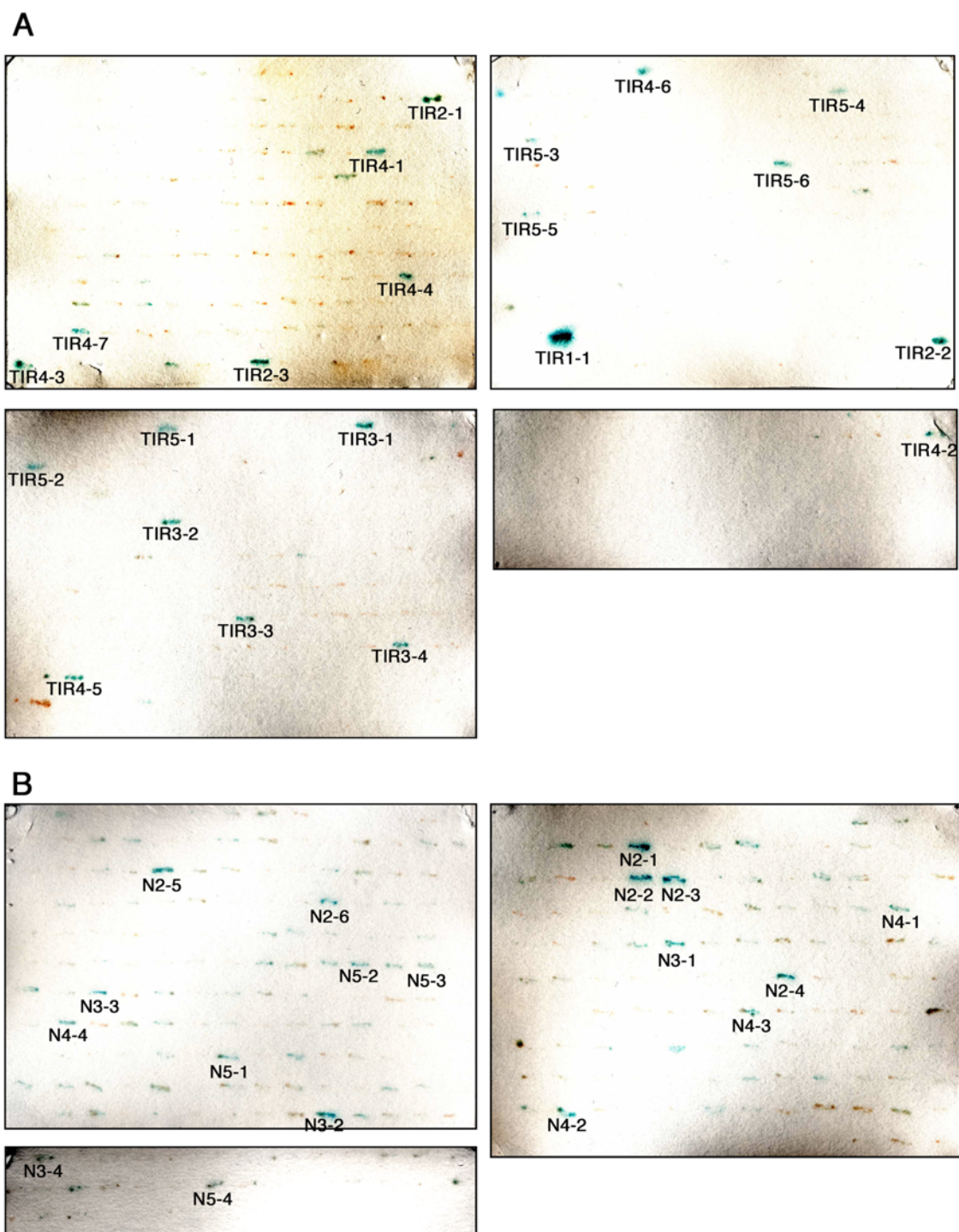


図 19. β -ガラクトシダーゼ試験

TIR ドメインと相互作用する候補 609 クローン (A)、全長 N 因子と相互作用する候補 330 クローン (B)を濾紙に転写し、 β -ガラクトシダーゼ活性のフィルター試験を行なった。試験開始から 30 min 毎に 150 min まで 5 回青色のクローンを選抜した。図中の表記は何回目を選抜したクローンであるかを示している。(例) TIR3-3 \rightarrow TIR と相互作用する候補から 90 min 後 (3 回目)に選抜したクローン

表 3. ライブラリースクリーニングより得られたクローン

酵母番号 相同性の高い遺伝子	
TIR1-1	SUCROSE NONFERMENTING 1 (SNF1) (<i>L. esculentum</i>)
TIR2-2	clone 132975F (<i>L. esculentum</i>) → atSC35
TIR3-1	clone 132649F (<i>L. esculentum</i>) → Calcium-dependent lipid-binding 1 (CLB1)
TIR3-3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (NtGapA) (<i>N. tabacum</i>)
TIR3-4	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) (<i>N. tabacum</i>)
TIR4-1	nictaRpoT1-tom (<i>N. tabacum</i>)
TIR4-4	CONSTANS interacting protein 3 (CIP3) (<i>L. esculentum</i>)
TIR4-5	GTP binding protein α (NtGA2) (<i>N. tabacum</i>)
TIR4-6	clone 132649F (<i>L. esculentum</i>) → Calcium-dependent lipid-binding 1 (CLB1)
N3-3	26S ribosomal RNA (<i>N. tabacum</i>)
N5-1	clone 132975F (<i>L. esculentum</i>) → atSC35
N5-2	acireductone dioxygenase 1 (ARD1) (<i>O. sativa</i>)
N5-4	clone 114149F (<i>L. esculentum</i>) → seed maturation-like protein

表中の太字は注目して解析した遺伝子

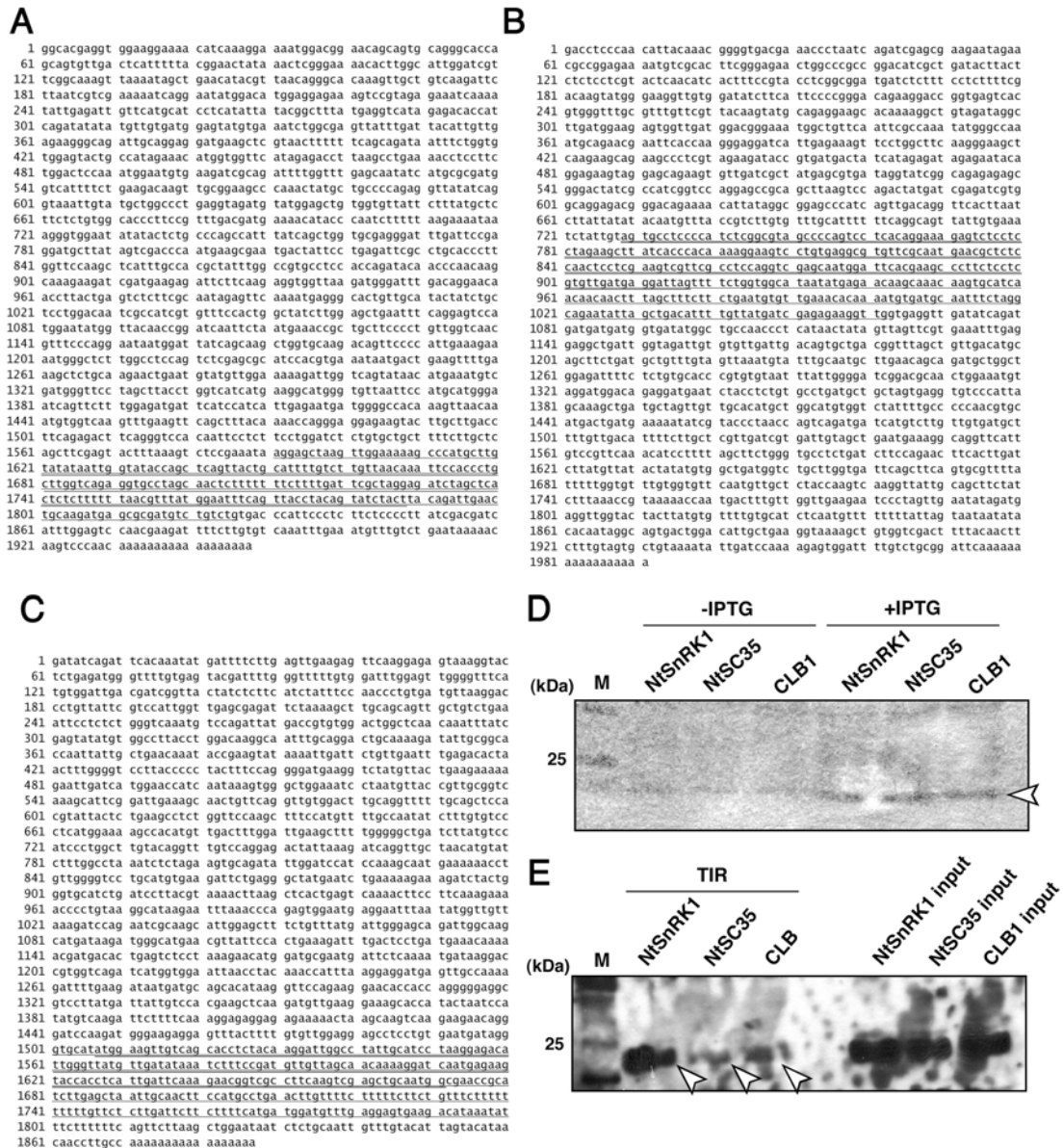


図 20. Pull-down 試験

TIR ドメインと相互作用する候補である NtSnRK1 (A)、NtSC35 (B)、CLB1 (C) の酵母 two-hybrid 法で相互作用した部位をタバコ cDNA からクローニングした。それぞれ下線部が酵母 two-hybrid 法で用いたライブラリーに含まれた領域、二重下線部がクローニングした領域。これらの領域を形質転換した大腸菌株で、His タグを付加したタンパク質を、IPTG (0.5 mM) を用いて誘導的に発現した (D)。これらのタンパク質と GST 融合 TIR タンパク質を用いて、pull-down 試験を行った (E)。抗 His 抗体を用いて相互作用を検出した。左からマーカー (M)、TIR と相互作用させた NtSnRK1、NtSC35、CLB1。右半分はそれぞれ NtSnRK1 (NtSnRK1 input)、NtSC35 (NtSC35 input)、CLB1 (CLB1 input) のみを用いたコントロール。

考察

マイクロアレイ解析

形質転換体の選択

形質転換に用いるコンストラクトが、実際に DEX によって誘導され、HR を起こす事をタバコ葉へのアグロインフィルトレーション法によって確認した。DEX 処理後 3 日後から黄化を経て、褐変化し、細胞死が確認出来た。また、DEX のみの処理を行なった結果より、30 μM の濃度でも植物に対して影響が無い事を確認した。構築したコンストラクトをタバコ植物体に形質転換した。当初、最終的に培養細胞で実験を行なう事から、BY2 への形質転換を行なっていた。pTA7002-p50 を導入した BY2 を作製し、導入遺伝子の発現確認も行なった。次に、BY2 は N 因子を持たないため、35S プロモーターで発現する N 因子の導入も行なった。しかし、N 因子の形質転換効率が著しく悪いこと、N 因子自体のプロモーターを単離していないこと等から、BY2 による実験系の構築は中断した。そこで、N 因子を持つ植物体に p50 を導入した形質転換植物体を作製し、培養細胞を構築する事にした。培養細胞は分化している実際の植物体で起こっている現象を忠実に再現しているとは限らないが、これにより培養細胞だけでなく植物体での解析も行なえる様になった。

細胞死の時間割

構築した実験系に DEX 処理を行ない、細胞死が起こる時間を観察した。サンプリング時間を設定するにあたり、以下の事を考慮に入れた。①植物体を用いた実験系で、DEX 処理による導入遺伝子の発現誘導が 1 日後から始まるとされ (Aoyama and Chua, 1997)、実際に細胞死の現象が 2 日後から観察されたこと。②温度シフトを用いた TMV 感染試験で細胞死が温度シフト後 12 時間から観察されること (Sano *et al.*, 1994)。③培養細胞を用いている事から、植物体よりも DEX 溶液が容易に浸透すると考えられること。以上からサンプリング時間を DEX 処理後 12 時間から始めることにした。その結果、細胞死は 12 時間後から徐々に起こり始め、処理後 24 時間で 80% の細胞が細胞死を起こした。この結果を支持する様に、DEX 処理後 12 時間から HR の指標とされる H_2O_2 の発現が観察された。DEX 処理後 10 時間から p50 が発現している事が確認出来た事は、12 時間後から細胞死が起こり始めている事を

裏付けている。DEX 処理後 12 時間のサンプルを用いて DNA の断片化を観察しようとしたが、はっきりとした断片化は確認出来なかった。これは、植物細胞がアポトーシス様細胞死を起こす際の、液胞の崩壊によって放出した液胞の DNase が断片化した DNA をさらに分解してしまうことが考えられる (Hatsugai *et al.*, 2004)。また、これまでの培養細胞を用いた実験系と同等かそれ以上の効率で細胞死を誘導出来た事から、非常に有用な実験系が構築出来たと考えられる。そこで、マイクロアレイによる、N 因子下流特異的な遺伝子を探索するにあたり、サンプリング時間を決めた。DEX 処理後 12 時間から細胞死が始まり、18 時間で細胞死を起こす細胞の割合が上昇する事から、HR の誘導に揺らぎがあると考えられた。12 時間の段階で HR による細胞死を起こした細胞が、周辺の細胞に働きかけ、別の情報伝達を起こしているとも限らない。この事は、DEX 処理から時間が経てば経つほど生じてくると考えられた。また、N 因子が p50 を認識した後すぐに起こる HR の初期の情報伝達に興味があった事から、サンプリング時間を p50 が発現し始める 10 時間、細胞死が起こり始める 12 時間、多くの細胞で細胞死が起こっている 18 時間の 3 点に設定した。

マイクロアレイ解析

DEX 処理後 10、12、18 時間のサンプルから抽出し、標識した cDNA を約 4100 種類の独立した遺伝子を 11520 箇所 (内 1640 箇所は水、 λ DNA 等のコントロール) スポットしたアレイスライドとハイブリダイゼーションした。野生型と形質転換体を比較する事で、HR 時の遺伝子発現の変化を解析した。

全体的に、病気を含むストレス応答遺伝子群、転写因子の発現が促進され、光合成関連遺伝子群の発現が抑制される傾向があった。これらの事は、HR 時に光合成活性が減少する事 (Gechev *et al.*, 2004)等から、構築していた実験系が正しく動いている事を示している。経時的な変化として、時間を追うごとに、発現に変化のある遺伝子の数が増加していた。これに伴って、病害を含むストレス応答遺伝子群の発現数も増加していた。DEX 処理後 10 時間では発現が抑制されていたものも、12 時間、18 時間で促進に転じているものも確認された。例えば *Cellulose synthase* や、*Bax inhibitor 1 (BI-1)* である。逆に促進から抑制に転じた遺伝子はほとんど確認出来なかった。

このような現象は、p50 によって誘導された HR が一斉に細胞死を引き起こすのではなく、DEX 処理後 18 時間では細胞死が約 50% 起こって

いる様に、徐々に細胞死を起こす事から以下の様に考えられる。p50を発現し、HRの情報伝達を始めた細胞が、細胞外へ何らかの情報伝達因子、例えばH₂O₂やイオンを放出しているとも限らない。それらの情報伝達因子を受け取った細胞が、二次的な抵抗性を発揮する遺伝子の発現をも誘導していると考えられる。具体的にはBI-1が良い例である。BI-1はプログラム細胞死の抑制因子として、シロイヌナズナを始めとする植物から同定された因子である (Kawai-Yamada *et al.*, 2004)。細胞死を抑制する遺伝子である、BI-1を発現する細胞が18時間のデータから検出されたことから、DEX処理後p50の発現が最初に確認出来た10時間、細胞死が起こり始めている12時間のデータを中心に解析を進める事で、HRの初期に発現し、機能する遺伝子に焦点を絞った。

10、12時間のデータから、これまでに病害応答遺伝子として同定されてきていたSKP1やNtPRp23、SPMSのように発現の促進が観察された。これと同時に、病害応答時に発現が促進する遺伝子として同定されているにも関わらず、Hfi22やSnakin-1、WRKY6の様に発現してこない遺伝子も存在していた。これらの事から、発現が上昇した遺伝子を病害応答遺伝子の中でも、N因子下流特異的に働き、細胞死に直接関わる遺伝子であると分類した。これに対して、発現が上昇しなかった遺伝子を、病害応答性遺伝子の中でもN因子非特異的に働き、HRに引き続き起こるSAR等に関わる二次的な抵抗性を発揮する、または一般的な抵抗性を発揮する遺伝子として分類した。

N因子の下流特異的に発現する遺伝子

DEX処理後10、12時間で発現が促進していた遺伝子かつ、病害応答遺伝子として報告のあったものでは、SKP1、SPMS、Prohibitin-1、NtPRp23、PAT1、Cytochrome c oxidase等が代表に挙げられる。SKP1は、タンパク質分解系であるE3ユビキチンライゲース複合体に関わる因子の1つであり、N因子を介したTMVに対する抵抗にSGT1と相互作用する事に関わっている事がすでに報告されている (Liu *et al.*, 2002)。SPMS (spermine synthase)は、ポリアミンの1つスペルミンの合成遺伝子である。ポリアミンはHR時のH₂O₂の発生源の1つとして当研究室で同定されている因子である (Yoda *et al.*, 2003)。Prohibitin-1はミトコンドリアの電子伝達系の分子シャペロンで、イネでは細胞死に関わる事が報告されている (Takahashi *et al.*, 2003)。NtPRp23は温度シフト後3時間で発現が検出される、TMV感染初期に応答する遺伝子として私たちが同定した遺伝子の1つである (Akiyama *et al.*, 2005)。

PAT1 (*patatin-like protein 1*)は、TMV 感染時に蓄積する Oxylipin を合成するためのホスホリパーゼの活性を上昇させる因子である (Dhondt *et al.*, 2000; Montillet *et al.*, 2004)。Cytochrome c oxidase は、ミトコンドリアのシトクローム c の放出に関わる因子である。シトクローム c の放出は動物のアポトーシスを含む細胞死の際に共通して起こる現象の 1 つである (Kadenbach *et al.*, 2004)。この他に、DEX 処理後 10 時間にだけ HR 時の極めて早い時間に H₂O₂ を発生させる因子として報告されている NADP⁺ oxidoreductase、NADPH oxidase の発現が促進していた (Montesano *et al.*, 2003)。また、DEX 処理後 12 時間から発現が促進する遺伝子として、H₂O₂ の発生に関わる *peroxidase*、HR の情報伝達に関わるとされる低分子量 G タンパク質等が検出された。以上の様な遺伝子を、N 因子の下流特異的に働き、HR に必要な遺伝子として分類した。ここに分類された遺伝子は、細胞死に直接関わる因子をコードする遺伝子が多く含まれていた。

一般的な抵抗性に関わる遺伝子

DEX 処理後 10 時間で発現が抑制された遺伝子かつ、病害応答遺伝子として報告のあったものでは、*Snakin-1*、*Hfi22*、*Thionin*、*NtWRKY1*、*WRKY6* 等が代表に挙げられる。*Snakin-1* は、ジャガイモで ABA や病原菌感染によって発現が促進される遺伝子として単離同定されている遺伝子である。*Hfi22* は、ロイシンジッパー型のタンパク質で TMV などの movement protein (MP) と相互作用し防御関連遺伝子を誘導する遺伝子である (Desvoyes *et al.*, 2002)。*Thionin* は、殺菌ペプチドとして知られているタンパク質である。*NtWRKY1*、*WRKY6* は、W-box と呼ばれるプロモーター内の cis-エレメントに結合する転写因子で、病害抵抗に関わるとされている (Laloi *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004)。特に *WRKY1* は N を介した抵抗性に必要であると報告されているが、DEX 処理後 10 時間では発現せず、12、18 時間に発現の上昇が検出された。細胞壁合成遺伝子、病原菌の細胞壁を攻撃する Chitinase、細胞壁周辺に蓄積して物理的な侵入を防ぐカロース合成遺伝子の発現も抑制していた。また、シロイヌナズナやジャガイモの AAA と相同性の高い遺伝子も抑制されていた。これは、HR を抑制する因子として当研究室から同定されている AAA タイプの ATPase と同じタイプの遺伝子であった (Sugimoto *et al.*, 2004)。以上の遺伝子に加えて、病害抵抗性遺伝子として報告のある遺伝子の中で発現の上昇、減少を起こさなかった遺伝子 (*Proteinase inhibitor :PI*, *Pathogenesis-related 1 :PR1* 等)も、N 因子非特

異的な抵抗性に関わる遺伝子と分類した。ここに分類した遺伝子の多くは自身の細胞死を起こす因子をコードしているのではなく、病原菌を直接攻撃する、細胞の物理的な防御を高くする因子をコードする遺伝子が多く含まれていた。

その他の遺伝子

上記以外にも発現量の変化した遺伝子に、タンパク質キナーゼや代謝関連の遺伝子が多くあった。全体的に観て、キナーゼ、糖代謝は促進される傾向があった。その他にも、病害抵抗性遺伝子と相同性が高いがタバコから全長が単離されていないため、病害応答遺伝子と推定されるものや、全く機能未知の遺伝子が多く検出された。これらの遺伝子群は、これまで病害応答、特に N 因子下流特異的な遺伝子として同定されていない新規の遺伝子の可能性も高い。タバコはシロイヌナズナと違い、まだ全ての遺伝子が解析されていないため、同定には時間が掛かると予測される。しかし、本研究の解析により未知の病害応答遺伝子の同定が進展すると思われる。

酵母 two-hybrid 法によるライブラリースクリーニング

N 因子が p50 を認識した情報を、伝達する事で発現する遺伝子の同定は出来た。しかし、N 因子は転写因子ではない。そのため、N 因子から遺伝子発現までの間には、いくつかの情報伝達因子が関与している事が予測される。また、その情報伝達因子の中には、遺伝子発現を伴わない機構が働いている可能性もある。そのため、N 因子と相互作用するタバコ側の因子を同定する事を目的として、酵母 two-hybrid 法を用いたライブラリースクリーニングを行なった。これまでに N 因子の LRR ドメイン単独で相互作用する因子は HSP90、SGT1 等が報告されている (Liu *et al.*, 2002, 2004b)。それに対して、TIR ドメインと相互作用する因子は同定されていない。TIR ドメインは、動物では death ドメインと呼ばれ、Toll や Interleukin (IL) の N 末端領域で存在している (Aravind *et al.*, 1999)。Death ドメインは Toll や IL の細胞外に出ている C 末端領域によって認識された情報を細胞内の別の因子 MyD88、TIRAP、TRAM 等のアポトーシス因子に伝達している領域である (Medzhitov, 2001; Akira and Takeda, 2004; van Duin *et al.*, 2005)。また、第 1 章の結果より、N 因子の NBS/LRR 領域が p50 と相互作用に必要であった。しかし、TIR ドメインは p50 との相互作用に必要でなかった。従って、N 因子の TIR ドメインも同じ様に、次へ情報を伝達するための情報伝達因子が相互作用している可能性が多いと考えられた。スクリーニングの結果、いくつかの候補となるクローンが得られた。その中でも、NtSnRK1、スプライシング因子 (NtSC35)、CLB1 の 3 つに着目した。これら 3 つの遺伝子産物はいずれもタバコで全長が報告されていない。そこで、酵母 two-hybrid 法で用いた cDNA 断片を含み、トマトやシロイヌナズナで高度に保存されている領域をクローニングし、タンパク質を発現させた。この部分的なタンパク質を用いて Pull-down 試験を行い、相互作用を確認した。

NtSnRK1

SNF1 (SUCROSE NONFERMENTING1) は、酵母や植物の糖代謝の情報伝達に関わる AMP-activated protein Kinase (AMPK) として同定されたタンパク質である (Halford and Hardie, 1998; Hardie *et al.*, 1998; Johnston, 1999)。SNF1 は糖代謝時だけでなく、ATP が減少するようなストレスに対して応答し、ATP の分解を抑え、ATP の生産を開始させる働きを持つ。これまでに植物でステロイドやイソプレノイドの合成、

窒素同化に関わるアミノ酸やヌクレチドの合成、および糖の合成の鍵を握る酵素として働いている事が知られている (Sugden *et al.*, 1999)。また、シロイヌナズナの SNF1 (AKIN11)が病原菌によって抑制されることで、病原菌が感染しやすくなることが報告されている (Hao *et al.*, 2003)。この事に関連して、動物では SNF1/AMP 複合体と相互作用する Kinase がアポトーシスを抑制するなど細胞死と関連する報告がある (Legember *et al.*, 2004)。今回同定した NtSnRK1 も同様の機能を有していると考えられる。N 因子が p50 と相互作用する事で ATP の加水分解を促進する結果から、以下の可能性が予測出来る。N 因子の ATP 加水分解によって生じた ADP が、更に何らかの因子によって AMP にまで分解され、その AMP が NtSnRK1 と複合体を形成し、代謝経路を活性化することで病害抵抗性を促進する事である。

NtSC35

同定されたスプライシング因子は、シロイヌナズナのスプライシング因子である atSC35 と相同性が高かった。atSC35 はヒトのスプライシング因子である SC35 (Graveley, 2000)と相同性の高いタンパク質で、N 末端側に RRM (RNA recognition motif)、C 末端側に SR (Ser/Arg-rich) ドメインを持つ (Lopato *et al.*, 2002)。また、SR タイプのスプライシング因子は選択的なスプライシングに関わっている事が報告されている (Manley and Tacke, 1996; Graveley, 2000; Isshiki *et al.*, 2006)。植物の NBS/LRR タイプの R の多くは、選択的なスプライシングを受ける事が報告されており (Jordan *et al.*, 2002; Zhang and Gassmann, 2003)、タバコ N 因子も、選択的なスプライシングを受ける R の 1 つである。N 因子は TMV 感染によって、選択的なスプライシングを受け、C 末端側にある LRR ドメインが欠失した TIR/NBS のみの N 因子(N_L)が発現する (Dinesh-Kumar and Baker, 2000)。N_L は TMV 感染後 4 時間から発現し始め、8 時間で N 因子に対して 25 倍まで発現が上昇する。しかし、この N_L がなぜ生じ、どのような機能を果たしているかは、未だに明らかになっていない。N_L を発現する時に関わるスプライシング因子も明らかになっていない。もし、今回同定した NtSC35 と TIR ドメインが実際に相互作用すれば、以下の様な情報伝達経路が想像出来る。全長 N 因子の TIR ドメインが、常時 NtSC35 と相互作用している。そこに、TMV 感染によって発現した p50 と相互作用する事で N 因子内の構造が変化し、TIR ドメインから NtSC35 が放出される。放出したスプライシング因子によって、N_L が発現する。以上の事は、今回スクリーニングに用

いたのが TIR ドメイン単独、もしくは p50 と相互作用していない N 因子全長であったことから、p50 と相互作用する事で N 因子の構造が変わり、TIR ドメインがリン酸化等の活性化を受け構造が変化し、非活性化状態では相互作用していたものが、活性化状態で相互作用しなくなると言う考えに妥当性が生じる。この予測は、SC35 が Protein Kinase によってリン酸化を受ける事が報告されている事 (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2000)、TIR ドメイン内にリン酸化される可能性のあるアミノ酸がいくつかある事がコンピュータ上で予測された事 (NetPhos 1.0 Server : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) から、支持されると考える。更に、マイクロアレイ解析からも、DEX 処理後 12 時間で atSC35 と相同性のある遺伝子の、発現上昇が確認されている。いずれにせよ、タバコのスプライシング因子や機構は、ほとんど同定されていない (Petiot *et al.*, 1997)。今回同定した因子の機能解析は興味深いものであり、今後の解析に期待出来る。

CLB1

トマトから同定された CLB1 (Calcium-dependent lipid-binding 1) は、シロイヌナズナの cPLA₂ (cytosolic phospholipase A₂) や、PKC (protein kinase C) の持つ CaLB (Ca²⁺-dependent lipid-binding) ドメインや、C2 ドメインと相同性の高いタンパク質である (Kiyosue and Ryan, 1997)。R による Avr の認識によって引き起こされる HR の現象の 1 つに、Ca²⁺ を含むイオンの流入出がある。この現象に PKC が関与しており、病原菌感染によって PKC の発現が促進され、PKC が活性化される事で活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) が生産される事がシロイヌナズナ、イネ、タバコで報告されている (Harding *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2003; Kasparovsky *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2005)。今回同定された CLB1 も CaLB ドメインを持つ事から、PKC 同様に HR 時のイオンの流入出の細胞膜の透過性に関与している可能性がある。また、PKC や cPLA₂ は膜と結合し、GTPase 等と相互作用する事で初めて情報伝達が起こる事から (Kim *et al.*, 2004)、この CLB1 が TIR ドメインと相互作用する事は、活性の不活化制御に関わっていると考えられる。

総括

病原菌による作物の収穫に対する被害は大きく、植物の病害に対する抵抗性の研究は盛んである。植物は、深刻な被害を与える病原菌に対して HR を起こす事で、感染を防ぐ機構を発達させた。これまでに、多くの宿主植物と感染する病原菌から R と Avr が単離された。しかし、R による Avr の認識や、R の周りで働く因子の知見は少ない。そこで本研究は、タバコのタバコモザイクウイルス感染による HR の初期の情報伝達機構を明らかにするために、以下の実験を行なった。(1)タバコ N 因子による Avr である p50 の認識機構の解析 (2)HR を誘導する実験系の構築 (3)構築した実験系を用いた N 因子下流特異的な遺伝子の探索 (4)N 因子と相互作用する情報伝達因子の探索。

これらの実験の結果から、以下の事を明らかにした。(1)N 因子が p50 を直接相互作用する事で認識しており、その相互作用には ATP の N 因子への結合が必要である。また、p50 と相互作用する事で ATP の加水分解を促進し、N 因子内の分子内相互作用を変化させる。(2)p50 を DEX 処理によって発現し、誘導的に HR による細胞死を起こす形質転換体を用いて HR 初期に応答する遺伝子を多数単離し、N 因子下流特異的な遺伝子と、一般的な抵抗性に関わる遺伝子とに分類した。(3)タンパク質キナーゼの 1 つである NtSnRK1、スプライシング因子である NtSC35、膜脂質と相互作用する CLB1 を N 因子と相互作用する候補として単離した。これらの事からタバコのタバコモザイクウイルス感染による HR の情報伝達のモデルを作製した (図 21)。

今回の報告した結果によって、TMV の認識機構や、HR の遺伝子レベル、タンパク質レベルでの情報伝達経路の網羅的な解析への足がかりができ、今後の展開に期待出来る。

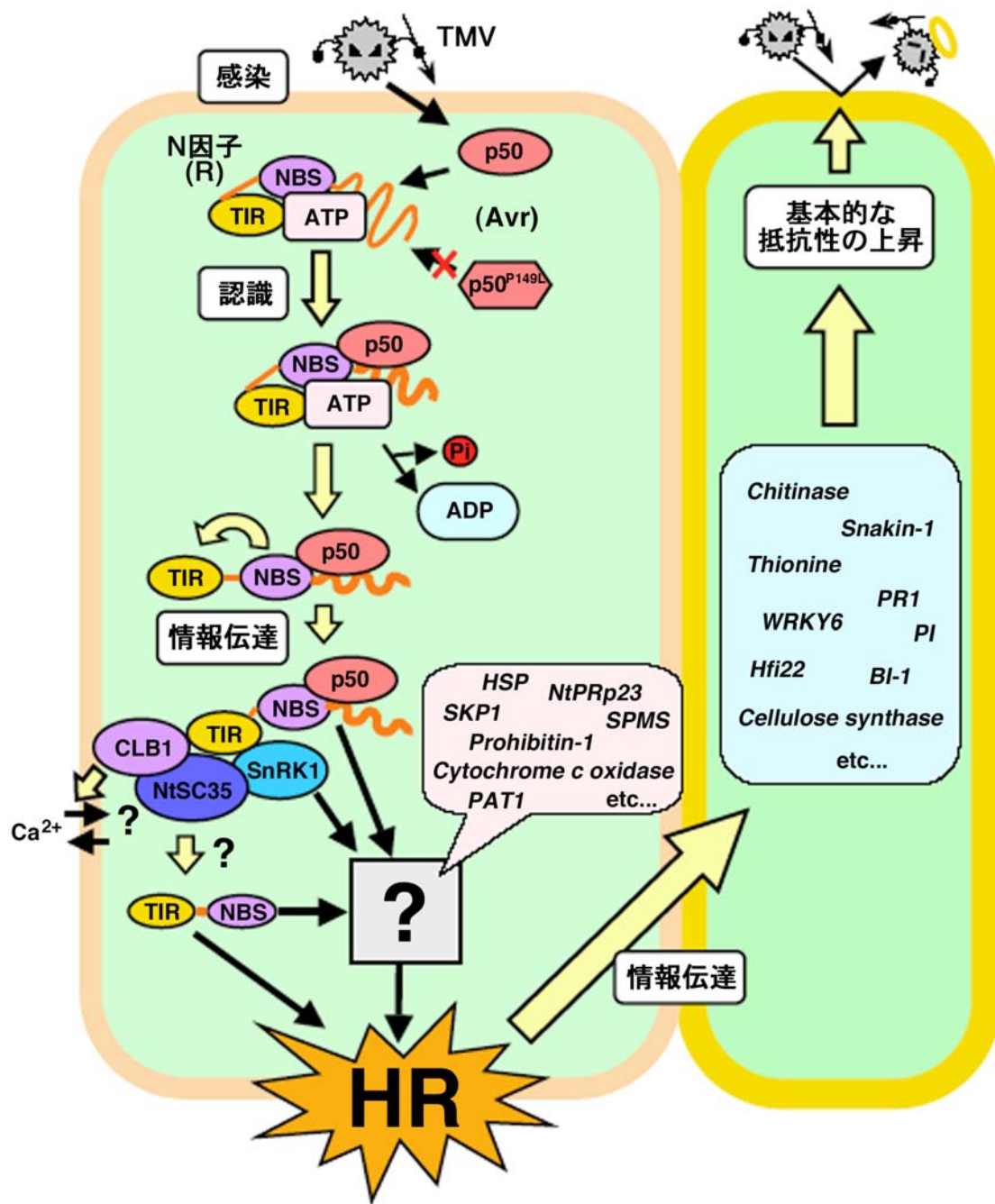


図 21. まとめ

N 因子は ATP と結合する事で分子内相互作用をしている。分子内相互作用している N 因子の NBS/LRR ドメインが、TMV 感染で発現した p50 を直接認識する。それによって N 因子に結合していた ATP の加水分解が促進され、N 因子の分子内構造が変化する。分子内構造が変化する事で、次の因子にその情報を伝達する。TIR ドメインと相互作用する事が示唆された NtSnRK1、NtSC35、CLB1 が直接、または次の因子に相互作用し、今回分類した HR を起こす N 因子特異的な遺伝子の発現を誘導する。また、HR を起こした細胞からの情報を受け取った近隣の細胞が、今回分類した二次的な感染を防ぐ遺伝子の発現を誘導する。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りましたなら先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 植物細胞工学講座の佐野 浩教授、小泉 望助教授、依田 寛助手、山口 夕助手の諸先生方に厚く御礼申し上げます。副指導教官としてご助言いただきました本学バイオサイエンス研究科植物分子遺伝学講座の島本 功教授、植物遺伝子機能学講座の橋本 隆教授、分化・形態形成学講座の横田明穂教授に深く御礼申し上げます。

マイクロアレイ解析を行うにあたり、アレイスライド作成して頂いた本学情報科学研究科システム細胞学講座の大島 拓助手、室 詠子氏、解析プログラムおよび解析のご助言を頂いた本学バイオサイエンス研究科 植物遺伝機能学講座の加藤 彰助手、cDNA ライブラリーを作製して頂いた本学バイオサイエンス研究科植物細胞工学講座の中村紀美代氏に心から感謝申し上げます。

最後になりましたが、バイオサイエンス研究科 植物細胞工学講座の皆様、特に病傷害研究グループの皆様には公私ともに多くのご助言、ご協力を頂き、良き研究生活を送る事が出来ました。心より御礼申し上げます。



参考文献

- Abbink, T.E.M., Tjermberg, P.A., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M. (1998) Tobacco mosaic virus helicase domain induces necrosis in *N* gene-carrying tobacco in the absence of virus replication. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1242-1246.
- Abbink, T.E.M., Vogel, J., Bol, J.F. and Linthorst, H.M.J. (2001) Induction of hypersensitive response by chimeric helicase sequences of tobamoviruses U1 and Ob in *N*-carrying tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1086-1095.
- Ahn, I.P., Kim, S. and Lee, Y.H. (2005) Vitamin B₁ functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol.* 138: 1505-1515.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499-511.
- Akiyama, K., Ueda, H., Yoda, H. and Sano, H. (2005) A novel basic pathogenesis-related protein from tobacco plants. *Plant Biotech.* 22: 157-159.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004) *Essential cell biology* 2nd Ed. 4: Protein structure and Function. proteins often form large complexes that function as protein machines.. Garland, New York, pp. 156-157.
- Aoyama, T. and Chua, N.H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11: 605-612.
- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (1999) The domains of death: Evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* 24: 47-53.
- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J. (2003) Interaction of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112: 369-377.

Chinnaiyan, A.M., Chaudhary, D. and O'Rourke, K. (1997) Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 388: 728-729.

Chinnaiyan, A.M. (1999) The apoptosome: Heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1: 5-15.

Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411. 826-833.

Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M.H., Park, J.W. and Scholthof, H.B. (2002) A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol.* 129: 1521-1532.

Dinesh-Kumar, S.P. and Baker, B.J. (2000) Alternative splicing *N* resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1908-1913.

Dinesh-Kumar, S.P., Tham, W.H. and Baker, B.J. (2000) Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14789-14794.

Dhondt, S., Geoffroy, P., Stelmach, B.A., Legrand, M. and Heitz, T. (2000) Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J.* 23: 431-440.

Erickson, F.L., Dinesh-Kumar, S.P., Holzberg, S., Ustach, C.V., Dutton, M., Handley, V., Corr, C. and Baker, B.J. (1999a) Interactions between tobacco mosaic virus and the tobacco *N* gene. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354: 653-658.

Erickson, F.L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C. and Baker, B. (1999b) The helicase domain of the TMV replicase

proteins induces the N-mediated defense response in tobacco. *Plant J.* 18: 67-75.

Flor, H.H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.

Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Genet.* 9: 275-296.

Gechev, T.S., Gadjev, I.Z. and Hille, J. (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 1185-1197.

Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W. and Dangl, J.L. (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269: 843-846.

Graveley, B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6: 1197-1211.

Greenberg, J.T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 525-545.

Halford, N. and Hardie, D.G. (1998) SNF1-related protein kinases: Global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37: 735-748.

Hammond-Kosack, K.H., and Jones, J.D.G. (1997) Plant Disease Resistance Genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 48: 575-607.

Hao, L., Wang, H., Sunter, G. and Bisaro, D.M. (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* 15: 1034-1048.

Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu.*

Rev. Biochem. 67: 821-855.

Harding, S.A., Oh, S.H. and Roberts, D.M. (1997) Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J.* 16: 1137-1144.

Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M and Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855-858.

Hishida, T., Iwasaki, H., Yagi, T. and Shinagawa, H. (1999) Role of Walker motif A of RuvB protein in promoting branch migration of Holliday junctions: Walker motif A mutations affect ATP binding, ATP hydrolyzing, and DNA binding activities of RuvB. *J. Biol. Chem.* 274: 25335–25342.

Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77: 61-68.

Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N. and Pease, L.R. (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 8: 528-535.

Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L. and Nunez, G. (1999) Role of cytochrome *c* and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18: 3586-3595.

Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C. and Nunez, G. (2005) NOD-LRR proteins: Role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 355-383.

Isshiki, M., Tsumoto, A. and Shimamoto, K. (2006) The serine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *Plant Cell* 18: 146-158.

- Jaroszowski, L., Rychlewski, L., Reed, J.C. and Godzik, A. (2000) ATP-activated oligomerization as a mechanism for apoptosis regulation: fold and mechanism prediction for CED-4. *Proteins* 39: 197-203.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19: 4004-4014.
- Johnston, M, (1999) Feasting, fasting, and fermenting: Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* 15: 29-33.
- Jones, D.A. and Jones, J.D.G. (1996) The role of leucine-rich repeat proteins in plant disease. *Adv. Bot. Res. Inc. Adv. Plant Pathol.* 24: 89-167.
- Jordan, T., Schornack, S. and Lahaye, T. (2002) Alternative splicing of transcripts encoding Toll-like plant resistance proteins-What's the functional relevance to innate immunity? *Trends Plants Sci.* 7: 392-398.
- Kadenbach, B., Arnold, S., Leec, I. and Hüttemann, M. (2004) The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1655: 400-408.
- Kasparovsky, T., Blein, J.P. and Mikes, V. (2004) Ergosterol elicits oxidative burst in tobacco cells via phospholipase A₂ and protein kinase C signal pathway. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 429-435.
- Kawai-Yamada, M., Ohori, Y. and Uchimiya, H. (2004) Dissection of arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell* 16: 21-32.
- Keen, N.T. (1992) The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol Biol* 19: 109-122.
- Kim, H., Nahm, M., Lim, C., Yun, D., Cho, M. and Bahk, J. (2004) A rac-like small G-protein from *Brassica campestris* activates a

PKC-dependent phospholipase D. *Phytochem.* 65: 71-80.

Kim, H.E., Du, F., Fang, M. and Wang, X. (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome *c*-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17545-17550.

Kiyosue, T. and Ryan, C.A. (1997) A novel gene of tomato preferentially expressed in fruit encodes a protein with a Ca²⁺-dependent lipid-binding domain. *Plant Mol. Biol.* 35: 969-972.

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

Laloi, C., Mestres-Ortega, D., Marco, Y., Meyer, Y. and Reichheld, J.P. (2004) The arabidopsis cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.* 134: 1006-1016.

Lauge, R. and De Wit, P.J.G.M. (1998) Fungal avirulence genes: Structure and possible functions. *Fungal Genet. Biol.* 24: 285-297.

Legembre, P., Schickel, R., Barnhart, B.C. and Peter, M.E. (2004) Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NK- κ B-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness. *J. Biol.Chem.* 279: 46742-46747.

Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R. and Lamb, C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6: 427-437.

Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Cell* 14: 1483-1496.

Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P. (2004a) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, *COI1* and *CTR1* in N-mediated resistance to *tobacco mosaic virus*. *Plant J.* 38: 800-809.

Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S. and Dinesh-Kumar, S.P. (2004b) Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling protein SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J. Biol. Chem.* 279: 2101-2108.

Lopato, S., Forstner, C., Kalyna, M., Hilscher, J., Langhammer, U., Indrapichate, K., Lorkovic, Z.J. and Barta, A. (2002) Network of interaction of a novel plant-specific arg/ser-rich protein, atRSZ33, with atSC35-like splicing factors. *J. Biol. Chem.* 277: 39989-39998.

Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. and Dangl, J.L. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 743-754.

Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Dangl, J.L. (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112: 379-389.

Manley, J.L. and Tacke, R. (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* 10: 1569-1579.

Martin, G.B., Brommonschenkel, S., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D. and Tanksley, S.D. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436.

Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and Sessa, G. (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 23-61.

McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.H. and Staskawicz, B.J. (1998) Glucocorticoid-inducible expression of a

bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant J.* 14: 247-251.

Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145.

Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramarishnan, S., Sobral, B.W. and Young, N.D. (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20: 317-332.

Mittler, R., Simon, L. and Lam, E. (1997) Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110: 1333-1344.

Mizushima, T., Takaki, T., Kubota, T., Tsuchiya, T., Miki, T., Katayama, T. and Moffett, P., Farnham, G., Peart, J. and Baulcombe, D.C. (2002) Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J.* 21: 4511-4519.

Montesano, M., Hyytiäinen, H., Wettstein, R. and Palva, T. (2003) A novel potato defence-related alcohol:NADP⁺ oxidoreductase induced in response to *Erwinia carotovora*. *Plant Mol. Biol.* 52: 177-189.

Montillet, J.L., Cacas, J.L., Garnier, L., Montane, M.H., Douki, T., Bessoule, J.J., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agnel, J.P., Vial, A. and Triantaphylides, C. (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. *Plant J.* 40: 439-451.

Morel, J.B. and Dangl, J.L. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Different* 19: 17-24.

Ogura, T. and Wilkinson, A.J. 2001. AAA(+) superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 6: 575-597.

Ouwerkerk, P.B.F., Kam, R.J., Hoge, J.H.C. and Meijer, A.H. (2001)

Gulucocorticoid-inducible gene expression in rice. *Planta* 213: 370-378.

Padgett, H.S. and Beachy, R.N. (1993) Analysis of tobacco mosaic virus strain capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. *Plant Cell* 5: 577-586.

Padgett, H.S., Watanabe, Y. and Beachy, R. (1997) Identification of the TMV replicase sequence that activates the *N* gene-mediated hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 709-715.

Peart, J.R., Mestre, P., Lu, R., Malcuit, I. and Baulcombe, D. C. (2005) NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J.* 15: 968-973.

Perlin, D.S. and Spanswick, R.M. (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. *Plant Physiol.* 68: 521-526.

Petiot, A.S., Blein, J.P., Pugin, A. and Suty, L. (1997) Cloning of two plant cDNAs encoding a β -type proteasome subunit and a transformer-2-like SR-related protein: early induction of the corresponding genes in tobacco cells treated with cryptogein. *Plant Mol. Biol.* 35: 261-269.

Rivas, S., Bolland, S., Cabezón, E., Goni, F.M. and de la Cruz, F. (1997) TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. *J. Biol. Chem.* 272: 25583–25590.

Reddy, V.S., Ali, G.S. and Reddy, A.S. (2003) Characterization of a pathogen-induced calmodulin-binding protein: mapping of four Ca^{2+} -dependent calmodulin-binding domains. *Plant Mol. Biol.* 52: 143-159.

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. and Bazan, J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 588-593.

Sano, H., Seo, S., Orudjev, E., Youssefian, S., Ishizuka, K. and Ohashi, Y. (1994) Expression of a small GTP-binding protein gene in tobacco plants elevates cytokinin levels and abnormally induces salicylic acid in response to wounding and increases resistance to tobacco mosaic virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10556-10560.

Savaldi-Goldstein, S., Sessa, G. and Fluhr, R. (2000) The ethylene-inducible PK12 kinase mediates the phosphorylation of SR splicing factors. Plant J. 21: 91-96.

Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W. and Staskawicz, B.J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. Science 274: 2063-2065.

Sessa, G., D'Ascenzo, M., Loh, Y.T. and Martin, G.B. (1998) Biochemical properties of two protein kinases involved in disease resistance signaling in tomato. J. Biol. Chem. 273: 15860-15865.

Sinapidou, E., Williams, K., Nott, L., Bahkt, S., Tor, M., Crute, I., Bittner-Eddy, P. and Beynon, J. (2004) Two TIR:NBS:LRR genes are required to specify resistance to *Peronospora parasitica* isolate Cala2 in *Arabidopsis*. Plant J. 38: 898-909.

Slack, J.L., Schooley, K., Bonnert, T.P., Mitcham, J.L., Qwarnstrom, E.E., Sims, J.E. and Dower, S.K. (2000) Identification of two major site in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pre-inflammatory signaling pathways. J.Biol. Chem. 275: 4670-4678.

Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N. and Hardie, D.G. (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate in vitro. Plant Physiol. 120: 257-274.

Sugimoto, M., Yamagushi, Y., Nakamura, K., Tatsumi, Y. and Sano, H. (2004) A hypersensitive response-induced ATPase associated with various

cellular activities (AAA) protein from tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 56: 973-985.

Swaffield, J.C. and Johnston, S.A. (1996) Affinity purification of proteins binding to GST fusion proteins. *In* FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidmen, JA Smith, K Struhl, eds, *Current Protocols in Molecular Biology* (Suppl 33). John Wiley & Sons, New York, 20.2.1-20.2.10.

Takahashi, A., Kawasaski, T., Wong, H.L., Suharsons, U., Hirano, H. and Shimamoto, K. (2003) Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant *cdr1*. *Plant Physiol.* 132: 1861-1869.

Tameling, W.I.L., Elzinga, S.D.J., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L.W., Haring, M.A. and Cornelissen, B.J.C. (2002) The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 14: 2929-2939.

Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y. and Martin, G.B. (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 274: 2060-2063.

Tao, Y., Yuan, F., Leister, R.T., Ausubel, F.M. and Katagiri, F. (2000) Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene *RPS2*. *Plant Cell* 12: 2541-2554.

Tornero, P., Chao, R.A., Luthin, W.N., Goff, S.A. and Dangle, J.L. (2002) Large-scale structure-function analysis of the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *Plant Cell* 14: 435-450.

Trognitz, F.C. and Trognitz, B.R. (2005) Survey of resistance gene analogs in *Solanum caripense*, a relative of potato and tomato, and update on R gene genealogy. *Mol. Gen. Genomics* 274: 595-605.

van der Bizen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998) The NB-ARC domain: a novel

signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol.* 8: 226-227.

van Duin, D., Medzhitov, R. and Shaw, A.C. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol.* (in press)

Wang, J., Song, J.J., Seong, I.S., Franklin, M.C., Kamtekar, S., Eom, S.H. and Chung, C.H. (2001) Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HsIU. *Structure* 9: 1107-1116.

Witham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1994) The Product of the Tobacco Mosaic Virus Resistance Gene N: Similarity to Toll and the interleukin-1 Receptor Cell 78: 1101-1115.

Yamamoto, S., Nakano, T., Suzuki, K. and Shinshi, H. (2004) Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factor in tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* 1679: 279-287.

Yang, Y., Li, R. and Qi, M. (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.* 22: 543-551.

Yoda, H., Yamaguchi, Y. and Sano, H. (2003) Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* 132: 1973-1981.

Zhang, X.C. and Gassmann, W. (2003) *RPS4*-mediated disease resistance requires the combined presence of *RPS4* transcripts with full-length and truncated open reading frames. *Plant Cell* 15: 2333-2342.

学位の主たる部分を公表した論文

Ueda, H., Yamaguchi, Y. and Sano, H. (2006) Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* (in press)

その他発表論文

Akiyama, K., Ueda, H. and Sano, H. (2005) A novel basic pathogenesis-related protein from tobacco plants. *Plant Biotech.* 22: 157-159.

Yap, Y.K., Kodama, Y., Waller, F., Chung, K.M., Ueda, H., Nakamura, K., Oldsen, M., Yoda, H., Yamaguchi, Y. and Sano, H. (2005) Activation of a novel transcription factor through phosphorylation by WIPK, a wound-induced mitogen-activated protein kinase in tobacco plants. *Plant Physiol.* 139: 127-137.