

博士論文

植物の塩および酸化ストレスの応答性と抵抗性獲得に関する研究

平成16年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物機能科学専攻

立石能子

<目次>

略号

第1章 序論 (p. 1~3)

第2章 材料・方法 (p. 4~27)

1. 材料 (p. 4~5)

- (1)シカクマメ植物
- (2)シカクマメ培養細胞
- (3)タバコ植物
- (4)タバコ培養細胞

2. 試薬組成 (p. 5~13)

- (1)DNA 操作関連試薬
- (2)抗生物質
- (3)大腸菌用培地
- (4)アグロバクテリウム用培地
- (5)RNA 調製用試薬
- (6)ノーザンプロット解析用試薬
- (7)ウエスタンプロット解析用試薬
- (8)硝酸銀染色
- (9)過酸化脂質測定用試薬
- (10)タンパク質調製・酵素活性測定用試薬
- (11)プロリン測定用試薬
- (12)シカクマメ培養細胞用貯蔵液
- (13)タバコ植物体・BY-2 培養細胞用貯蔵液
- (14)同調培養実験用試薬

3. 方法 (p. 13~26)

- (1)エタノール沈殿
- (2)フェノール / クロロホルム抽出
- (3)大腸菌からのプラスミド DNA 調製
- (4)DNA の制限酵素処理
- (5)DNA のアガロース電気泳動
- (6)アガロースゲルからのDNA 切り出し精製
- (7)DNA の結合

- (8)大腸菌への遺伝子導入(トランスフォーメーション)
- (9)DNA の PCR (Polymerase Chain Reaction)増幅
- (10)PCR 増幅 DNA 断片のサブクローニング(TA クローニング)
- (11)DNA 塩基配列の決定(シーケンス解析)
- (12)GTC(guanidine thiocyanate)法による RNA の調製
- (13)ATA(aurintricarboxylic acid)法による RNA の調製
- (14)シカクマメクラス I 型キチナーゼ cDNA のクローニング
- (15)タバコ BY-2 のプロリンデヒドロゲナーゼ(*NtProDH*) cDNA  
のクローニング
- (16)形質転換タバコ BY-2 細胞の作製
- (17)ノーザンブロット解析
- (18)ウエスタンブロットティング
- (19)シカクマメのオスモティックストレス応答性
- (20)タバコ植物体へのアスコルビン酸および前駆体の添加
- (21)タバコの葉への塩ストレス処理
- (22)タバコへの UV ストレス処理
- (23)アスコルビン酸量の測定
- (24)クロロフィル含量の測定
- (25)過酸化脂質の測定
- (26)硝酸銀還元法
- (27)プロリン含量の測定
- (28)プロリンデヒドロゲナーゼ酵素活性の測定
- (29)生細胞のフルオロセインジアセテートによる染色
- (30)タバコ形質転換培養細胞の同調培養

第3章 塩ストレスおよびオスモティックストレスによるシカクマメのキチナーゼ遺伝子の発現応答 (p. 27~44)

緒言 (p. 27~28)

結果 (p. 29~32)

- (1)シカクマメのクラス I キチナーゼ cDNA の単離
- (2)シカクマメのクラス I キチナーゼ遺伝子の各組織における発現
- (3)シカクマメのクラス I キチナーゼのオスモティックストレス応答性

(4)耐塩性シカクマメ培養細胞におけるクラスIキチナーゼの発現  
考察 (p. 33~35)

図 (p. 36~44)

第4章 タバコ植物体へのアスコルビン酸の添加と塩および酸化ストレス抵抗  
性 (p. 45~59)

緒言 (p. 45~46)

結果 (p. 47~49)

(1)L-ガラクトノ-1,4-ラクトンおよびアスコルビン酸処理したタバ  
コの植物体における AsA 含量の変化

(2)L-ガラクトノ-1,4-ラクトンおよびアスコルビン酸処理したタバ  
コの葉における塩および UV ストレス抵抗性

(3)L-ガラクトノ-1,4-ラクトンおよびアスコルビン酸処理したタバ  
コ植物体における AsA の組織局在性

考察 (p. 50~52)

図 (p. 53~59)

第5章 RNAi 法によりプロリンデヒドロゲナーゼ遺伝子を発現抑制した形質  
転換タバコの作製とその性質 (p. 60~79)

緒言 (p. 60~61)

結果 (p. 62~64)

(1)タバコの植物体と培養細胞における *ProDH* 遺伝子の発現

(2)RNAi 法によるタバコ BY-2 *NtProDH* の発現抑制

(3)Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞における細胞増殖の促進

(4)Pro 高含有タバコ培養細胞の Pro に対する感受性

(5)Pro 高含有タバコ培養細胞のオスモティックストレス感受性

考察 (p. 65~68)

図 (p. 69~79)

第6章 総合討論 (p. 80~82)

参考文献 (p. 83~98)

謝辞 (p. 99)

<略号>

本論文に用いた略号を以下に記載する。

AAO; ascorbic oxidase

ABA; abscisic acid

AsA; ascorbic acid

DHA; dehydroascorbate

DNA; deoxyribonucleic acid

DMF; *N,N*-dimethylformamide

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

EtBr; ethidium bromide

FDA; fluorescein diacetate

FW; fresh weight

xg; gravity

GalL; L-galactono-1,4-lactone

GalLDH; L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase

GTC; guanidine thiocyanate

h; hour (s)

IPTG; isopropyl- $\beta$ -D(-)-thiogalactopyranoside

K-; potassium

Li-; lithium

M; molar

M.I.; mitotic index

mRNA; messenger ribonucleic acid

Na-; sodium

PAGE; polyacrylamidegel electrophoresis

P5C ;  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate

P5CDH ;  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase

PCR; polymerase chain reaction

P5CR ;  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase

P5CS ;  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase

PEG; polyethylene glycol

PVDF; poly vinylidene difluoride

Pro; proline

ProDH; proline dehydrogenase

RACE; rapid amplification of cDNA ends

RNA; ribonucleic acid

RNase; ribonuclease

RNAi; RNA interference

rpm; revolutions per minute

SDS; sodium dodecyl surfate

SOD; superoxide dismutase

TBARS; thiobarbituric acid-reactive substance

Tris-; Tris-aminomethane

WT; wild-type

w/v; volume per weight

v/v; volume per volume

## 第1章 序論

西暦元年頃の世界人口は3億人であったが、20世紀初頭には15億人になった。5倍に増えるまで2000年近くかかったことになる。ところが20世紀に入ると、医療など科学技術の発達により、人口は、100年足らずでさらに4倍近く増加した。国連の世界人口予測によれば、現在約60億人といわれている世界人口は、2050年には98億人になると推定されている(世界人口白書、2003年)。人口増加に伴い食糧不足や環境の悪化も深刻な問題となってきた。現在、1700万ha/年の砂漠化や温暖化の進行、オゾンホール拡大等地球規模での環境悪化が進んでいる(国連環境計画、1991)。また、アフリカなどの発展途上国では食糧問題が深刻で、10億もの人々が食糧不足、あるいは栄養不足の状況にあると言われている(FAO Newsroom 2003/68)、これらの地域では気候や土壌条件などが農作物の栽培にとって厳しく、また、非効率的な農業システムのため農作物の収量が低いと考えられている。

食糧不足への対策としては、農耕地を拡大したり、作物の生産性を向上させることが不可欠であると考えられる。ところが、地球上の陸地の3分の1は乾燥地・半乾燥地で農耕に適さない。さらに世界の主要穀倉地の10%以上で、過剰な灌漑のために土壌に塩類が集積し、作物の収量が著しく減少しつつある。このため、乾燥や高・低温、高塩などの劣悪環境に耐える植物の作出は農業生産問題の観点からも環境問題の観点からも緊急な課題となっている。

乾燥や、高・低温、高塩、酸化ストレスは、しばしば相互に関係しており、細胞に同じようなダメージをもたらす。例えば、乾燥や塩はオスモティックストレスとなり、細胞のホメオスタシスやイオンの分布を乱す(Serrano *et al.*, 1999, Zhu, 2001a)。高温や高塩、乾燥ストレスに伴う酸化ストレスは、タンパク質の機能を阻害したり、構造を変性させる(Smirnoff, 1998)。その結果、これらの多様な環境ストレスは同一の細胞情報伝達系路を活性化させたり(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000, Knight and Knight, 2001, Zhu, 2001b, 2002)、ストレスタンパク質の生産や抗酸化物の増加、適合溶質の蓄積など、細胞応答を活性化させる(Vierling and Kimpel, 1992, Zhu *et al.*, 1997, Cushman and Bohnert, 2000)。

環境ストレス耐性の分子機構の解明により、ストレス特異的に発現が誘導される遺伝子が明らかにされてきた。MAPキナーゼやSOSキナーゼなどのシグナ

ル伝達や転写調節に関与する遺伝子(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997, Munnik *et al.*, 1999, Zhu, 2001b)や、リン脂質代謝関連酵素(Chapman, 1998, Frank *et al.*, 2000)、HSFやCBF/DREB、ABF/ABAEファミリーなどの転写因子(Stochinger *et al.*, 1997, Schöffl *et al.*, 1998, Choi *et al.*, 2000, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000)がストレスにより発現誘導される。また、ヒートショックタンパク質(Hsps)などのシャペロン(Vierling, 1991)、LEAタンパク質(Ndong *et al.*, 2002)、オスモティック保護剤、活性酸素のスカベンジャー(Bohnert and Sheveleva, 1998)などの膜やタンパク質を保護する機能を持つ遺伝子や、アクアポリンやイオントランスポーター(Maurel, 1997, Serrano *et al.*, 1999, Tyerman *et al.*, 1999, Zimmermann and Sentenac, 1999, Blumwald, 2000)などの水やイオンの取り込みに関与する遺伝子も誘導されることが知られている。

植物の環境ストレス耐性を向上させるために、ストレス時に発現誘導される遺伝子や、オスモティック調節剤の合成・代謝に関わる酵素の遺伝子を導入した形質転換植物が作製され、環境ストレス耐性の植物も報告されている。CBF/DREB1ファミリーは*rd2A*や、*rd17*, *cor6.6*, *cor15a*, *erd10*, *kin1*, *kin2*などの乾燥や水ストレスに応答する遺伝子の転写を調節する転写因子である。アラビドプシスの転写因子である*DREB1A*遺伝子を導入した形質転換アラビドプシスは、乾燥、塩、凍結に対し耐性を示した(Kasuga *et al.*, 1999)。また、アラビドプシスの*CBF1*遺伝子をトマトで過剰発現させた形質転換体では、低温と酸化ストレス抵抗性が向上した(Hsieh *et al.*, 2002)。塩ストレスを受けた植物では、細胞質や葉緑体にグリシンベタインが数百mM~1 Mも蓄積することが知られている。グリシンベタインは適合溶質として知られ、窒素原子がトリメチル化された正電荷と負電荷を持つ4級アンモニウム化合物である。植物では、グリシンベタインは、葉緑体でコリンから合成される。土壌バクテリアの*Arthrobacter globiformis*のコリンオキシダーゼ*codA*遺伝子を導入したアラビドプシスやイネでは、グリシンベタイン量が増加し、塩耐性も野生株に比べ増加した(Hayashi *et al.*, 1997, Sakamoto *et al.*, 1998)。また、大腸菌のベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ*betB*遺伝子を導入した形質転換タバコも耐塩性を獲得した(Holmsrom *et al.*, 2000)。その他、適合溶質のマンニトールやトレハロース、*myo*-イノシトール、ソルビトールなどの糖アルコールの生産量を増大させた報告もある。大腸菌のトレハロース-6-リン酸シンターゼと

トレハロース-6-リン酸フォスファターゼを導入した形質転換イネは、トレハロース含量が高く、乾燥、塩、低温ストレスに耐性を示した(Jang *et al.*, 2003)。

抗酸化物質には、カタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、グルタチオンレダクターゼなどの酵素や、アスコルビン酸、グルタチオン、カロテノイド、アントシアニンなどの化学物質が知られている。Mn-SOD遺伝子を過剰発現した形質転換アルファルファは、水欠乏ストレスによる傷害を減少させた(McKersie *et al.*, 1996)。一方、他の研究では、Mn-SODまたはFe-SODのいずれかの遺伝子を過剰発現させた形質転換アルファルファは冬季の生存率と収量が増加した(McKersie *et al.*, 1999, 2000)。しかし、Fe-SOD形質転換アルファルファは酸化ストレス耐性は示さなかった(McKersie *et al.*, 2000)。β-カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子を過剰発現したアラビドプシスはキサントフィルサイクルの貯蔵量を2倍に増加させ、強光と温度に対する抵抗性を増加させた(Davison *et al.*, 2002)。このように現在、1つまたは数個の遺伝子を導入した形質転換植物の作製によって、植物のストレス耐性獲得のための研究が行われている。しかしながら、環境ストレス耐性の遺伝子応答のメカニズムは複雑であり、実際に育種レベルでの実用化をはかるためには厳密な遺伝子発現の制御を行うことが必要である。

本研究では、塩および酸化ストレスに関与する遺伝子の発現応答や機能を調べ、それらの遺伝子の発現を調節することにより、塩および酸化ストレス耐性の植物を作出することを目的とした。(1)塩ストレスにより発現誘導される遺伝子であるシカクマメのクラスIキチナーゼ遺伝子のcDNAのクローニング、および塩ストレス応答性の解析を行った。シカクマメは亜熱帯性のマメ科植物であり、亜熱帯地方の食糧資源として農業上有用な植物である。(2)フリーラジカルや活性酸素種を除去して無毒化する抗酸化剤として知られているアスコルビン酸をタバコに添加して、塩およびUVに対するストレス抵抗性の検討を行った。(3)Proデヒドロゲナーゼ遺伝子(*ProDH*)をRNAi法により発現抑制することにより、適合溶質であるProを高濃度に蓄積した形質転換タバコ培養細胞を作製し、その塩ストレス抵抗性を解析した。以上、3つの視点から研究を行い、植物の塩および酸化ストレス耐性の獲得に関する評価、考察を行った。

## 第2章 材料・方法

### 1. 材料

#### (1)シカクマメ植物

シカクマメは農林水産省熱帯農業研究センターより譲渡して頂いた *Psophocarpus tetragonolobus* L. DC. Nigeria TPT-2 を使用した。水を含ませた濾紙を敷いたシャーレに、シカクマメ種子を蒔き、28 °C、明所で 3~5 日間静置して発芽させた。発芽後、市販の土（花と野菜の土/（株）ダイキ）に移植し、生育させた。

#### (2)シカクマメ培養細胞

シカクマメ種子を無菌的に発芽させ、その子葉からカルス化した培養細胞を用いた。1ヶ月ごとに、100 ml 容三角フラスコ内の 0.8% (w/v) の精製寒天末を含む 50 ml のシカクマメカルス培地上に、培養細胞を 1g ずつ植え付け、継代培養した。

#### (3)タバコ植物

*Nicotiana tabacum* L. BY-4 (Bright Yellow 4) を用いた。日本たばこ産業株式会社より譲渡していただいた種子を 1.5 ml 容マイクロチューブへ 0.1g 分取し、1ml の 70%エタノールを加え、1 分間転倒混合した。マイクロピペットを用い、エタノールを除去した後、1ml の種子の滅菌溶液を加え、2 分間転倒混合した。滅菌溶液を取り除いたあと、滅菌水を加え転倒混合した。滅菌水を除去し、新たな滅菌水を加え、転倒混合した。滅菌水による洗浄は 5 回繰り返した。先端を切断した、マイクロピペット用チップを用いて、種子を滅菌水ごと吸い上げ、シャーレ中の 0.8% (w/v) の精製寒天末を含むタバコ植物体用培地へ均等に種子を蒔いた。明所 16 時間、暗所 8 時間の条件下で 6,000 lux、25°C にて栽培を行った。

#### (4)タバコ培養細胞

日本たばこ産業株式会社より譲渡していただいた *Nicotiana tabacum* L. BY-2 (Nagata *et al.*, 1992) を用いた。カルス培養細胞は、100 ml 用三角フラスコ内の 0.8% (w/v) の精製寒天末を含む 50 ml の BY-2 カルス培地上で、28°C、

暗所で2週間ごとに1gずつ継代培養したものを用いた。懸濁培養細胞は、300ml 容三角フラスコ内の100 mlの懸濁培養培地中で、28°C、暗所、130 rpmの回転振盪の条件下で1週間ごとに2 mlずつ継代培養したものを用いた。

## 2. 試薬組成

### (1) DNA 操作関連試薬

- TE
  - 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
  - 1 mM EDTA, pH 8.0
- フェノール/クロロホルム  
(phenol : chloroform = 1:1)/TE
- 3 M 酢酸ナトリウム, pH 5.2
- I液 (プラスミド DNA 精製用)
  - 50 mM glucose
  - 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
  - 10 mM EDTA, pH 8.0
- II液 (プラスミド DNA 精製用)
  - 0.2 N NaOH
  - 1.0% (w/v) SDS
- III液 (プラスミド DNA 精製用)
  - 5 M 酢酸カリウム 60 ml
  - glacial acetic acid 11.5 ml
  - 水 28.5 ml
- PEG 溶液
  - 20% (w/v) polyethylene glycol #6,000
  - 2.5 M NaCl
- TAE (DNA アガロース電気泳動用緩衝液)
  - 40 mM Tris-acetate, pH 8.0
  - 1 mM EDTA, pH 8.0

### (2) 抗生物質

- Ampicillin (Amp)※注射用アンピシリンナトリウム (明治製菓)

100 mg/ml に調製し、凍結保存

- Kanamycin (Km)※注射用硫酸カナマイシン (明治製菓)

100 mg/ml に調製し、凍結保存

- Cefotaxime sodium (Claforum, Cla)※注射用セフトキシムナトリウム (中外製薬)

250 mg/ml に調製し、凍結保存

- Hygromycin B (Hyg) (ロシュ)

50 mg/ml に調製し、凍結保存

- Chloramphenicol (Cm) (ロシュ)

30 mg/ml に調製し、凍結保存

### (3)大腸菌用培地

- LB 液体・固形培地

1.0% (w/v) Bacto-tryptone

0.5% (w/v) Bacto-yeast extract

1.0% (w/v) NaCl

1.5% (w/v) agar (固形培地用)

※1 N NaOH で pH 7.0 に調製する。

- SOC 液体培地

2.0% (w/v) Bacto-tryptone

0.5% (w/v) Bacto-yeast extract

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgSO<sub>4</sub>

10 mM MgCl<sub>2</sub>

20 mM glucose

※1 N NaOH で pH 7.0 に調製する。

### (4)アグロバクテリウム用培地

- YEB 液体・固形培地

0.5% (w/v) Bacto-beef extract

0.5% (w/v) Bacto-tryptone

0.1% (w/v) Bacto-yeast extract

0.5% (w/v) sucrose

1 mM MgSO<sub>4</sub>

1.5% (w/v) agar (固形培地用)

※最終濃度 30 mg/l Cm、50 mg/l Hyg、50 mg/l Km を加える。

#### (5)RNA 調製用試薬

- GTC (guanidine thiocyanate)抽出緩衝液 (GTC 法)
  - 4.2 M guanidine thiocyanate
  - 0.5% (w/v) *N*-lauroylsarcosine sodium salt
  - 25 mM sodium citrate dihydrate
  - 0.1% (v/v) antifoam A emulsion (30%)
- 10 M LiCl
- ATA (aurintricarboxylic acid) 抽出緩衝液 (ATA 法)
  - 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
  - 300 mM NaCl
  - 5 mM EDTA
  - 2 mM aurintricarboxylic acid
  - 2.0% (w/v) SDS
- 3M KCl

#### (6)ノーザンブロット解析用試薬

- 20 x MOPS
  - 0.4 M MOPS, pH 7.0
  - 100 mM 酢酸ナトリウム
  - 10 mM EDTA, pH 8.0
- RNA 変成溶液
  - formamide : 20 x MOPS : formaldehyde = 10 : 3 : 4
- RNA 用アガロースゲル
  - 1.0% (w/v) agarose
  - 16.7% (v/v) formamide
  - 1 x MOPS

- 20 x SSC
  - 3 M NaCl
  - 300 mM sodium citrate
- プレハイブリダイゼーション緩衝液
  - 50% (v/v) formamide
  - 5 x SSC
  - 5 x デンハルト溶液
  - 1.0% (w/v) SDS
  - 50 mM リン酸バッファー, pH 6.5
  - 0.5 mg/ml 変性サケ精子 DNA

(7)ウエスタンブロット解析用試薬

- 30%アクリルアミド混合液
  - 30% (w/v) acrylamide
  - 0.8% (w/v) bis-acrylamide
- 12%ポリアクリルアミドゲル

(a)濃縮ゲル(10 ml)

- 水 6.8 ml
- 30%アクリルアミド混合液 1.7 ml
- 1 M Tris-HCl, pH 6.8 1.25 ml
- 10% (w/v) SDS 0.1 ml
- 10% (w/v) ammonium persulfate 0.1 ml
- TEMED 0.01 ml

(b)分離ゲル(20 ml)

- 水 4.6 ml
- glycerol 2 ml
- 30%アクリルアミド混合液 8.0 ml
- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 5.0 ml
- 10% (w/v) SDS 0.2 ml
- 10% (w/v) ammonium persulfate 0.2 ml
- TEMED 0.01 ml

- タンパク質変性溶液(X6)

0.3 M Tris-HCl, pH 6.8  
50% (v/v) glycerol  
6% (w/v) SDS  
12% (v/v) 2-mercaptoethanol  
0.15% (w/v) bromophenol blue (BPB)

・電気泳動用緩衝液

25 mM Tris  
192 mM glycerol  
0.1% (w/v) SDS

・TBS

20 mM Tris-HCl, pH7.5  
150 mM NaCl

・ブロッキング溶液

3.0% (w/v) skim milk/TBS

・抗体反応溶液

1.0% (w/v) skim milk/TBS

・Tween-洗浄液

0.05% (v/v) Tween 20/TBS

・DAB 検出溶液

5 mg DAB (3,3'-diamino acetic acid)  
3 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
10 ml TBS

(8)硝酸銀染色

・硝酸銀溶液

5% (w/v) silver nitrate  
66% (v/v) 無水アルコール  
5% (v/v) glacial acetic acid

※超純水で調製した。

・洗浄液

5 ml ammonia  
95 ml ethanol (70%)

(9)過酸化脂質測定用試薬

- 0.1% (w/v) trichloroacetic acid
- 20% (w/v) trichloroacetic acid/0.5% (w/v) thiobarbituric acid

(10)タンパク質調製・酵素活性測定用試薬

- タンパク質抽出緩衝液（ミトコンドリア画分調製用）
  - 100 mM リン酸カリウムバッファー, pH 7.4
  - 400 mM sucrose
  - 1 mM EDTA
- チトクロム c 溶液
  - cytochrome c 1.05 mg/ml
- 基質溶液
  - 0.5 M L-proline
- 0.5% o-aminobenzaldehyde/5% trichloroacetic acid

(11)プロリン測定用試薬

- プロリン抽出緩衝液
  - 3% (w/v) sulfosalicylic acid
- 酸性ニンヒドリン
  - glacial acetic acid 30 ml
  - ninhydrin 1.25g
  - 6M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20ml

(12)シカクマメ培養細胞用貯蔵液

- 貯蔵液 A (X10) (1l)
  - NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 4.8g
  - KNO<sub>3</sub> 48.5g
  - CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 4.4g
  - MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.7g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7g
  - EDTA-Na-Fe(III)salt 0.422g
  - 10 ml 貯蔵液 B

・貯蔵液 B (1l)

$\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2g

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  24.1g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10.6g

KI 0.83g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025g

・ 2,4-D 溶液

100mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

・ Kinetine 溶液

50mg/l kinetine

・ ビタミン溶液 (1l)

inositol 10g

glycine 0.2g

nicotinic acid 0.05g

pyridoxine-HCl 0.05g

thiamine-HCl 0.01g

・ シカクマメカルス液体・固形培地

10% (v/v) 貯蔵液 A

3.0% (w/v) sucrose

0.1% (v/v) 2,4-D 溶液

0.1% (v/v) kinetine

0.1% (v/v) ビタミン溶液

0.8% (w/v) 精製寒天末 (ナカライ) (固形培地用)

※1N NaOH で pH 5.6 に調製する。

※液体懸濁培地は、300 ml 用三角フラスコに上記の培地 (精製寒天末は含まない) 100 ml を入れ、シリコンキャップをかぶせて滅菌する。

(13) タバコ植物体・BY-2 培養細胞用貯蔵液

・貯蔵液 A (X10) (1l)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  16.5g

KNO<sub>3</sub> 19.0g  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 4.4g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.7g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.7g  
EDTA-Na-Fe(III)salt 0.422g  
10 ml 貯蔵液 B

・貯蔵液 B (1)

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6.2g  
MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 24.1g  
ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10.6g  
KI 0.83g  
Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25g  
CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.025g  
CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.025g

・2,4-D 溶液

200 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

・ビタミン溶液

10% (w/v) myo-inositol  
0.1% (w/v) thiamine hydrochloride

・タバコ BY-2 液体・固形培地

10% (v/v) 貯蔵液 A  
3.0% (w/v) sucrose  
0.1% (v/v) 2,4-D 溶液  
0.1% (v/v) ビタミン溶液  
0.2% (w/v) Gelrite (Wako) (固形培地用)

※1N NaOH で pH 5.6 に調製する。

※液体懸濁培地は、300 ml 用三角フラスコに上記の培地 (Gelrite は含まない) 100 ml を入れ、シリコンキャップをかぶせて滅菌する。

※植物の培養には、上記の培地から 2,4-D を除いたものを用いた。

(14)同調培養実験用試薬

・細胞固定液

ethanol : acetic acid = 3 : 1

・オルセイン染色液

1.0% (w/v) orcein

45% (v/v) propionic acid

### 3. 方法

#### (1) エタノール沈殿

DNA・RNA 溶液に 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)と 2.5 倍量の冷却 100%エタノールを加えてよく混和させた後、10 分間、 $-20^{\circ}\text{C}$  で放置した。その後、冷却遠心機を用いて、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $12,000 \text{ xg}$  で 15 分間遠心して DNA または RNA の沈殿を得た。この沈殿を約 1 ml の冷却した 70%エタノールで洗浄した後、再び同条件で 3 分間遠心した。エタノールを除去し、沈殿を真空乾燥機で乾燥させた。

#### (2) フェノール / クロロホルム抽出

DNA・RNA 溶液に含まれるタンパク質はフェノール/クロロホルム抽出により除去した。等量のフェノール/クロロホルム溶液を加えて、ボルテックスを用いて激しく攪拌した。卓上遠心機を用いて、室温、 $12,000 \text{ xg}$  で 10 分間遠心後、上層を新しいマイクロチューブに移した。さらに等量のクロロホルムを加え、再び同条件で遠心後、その上層を回収した。

#### (3) 大腸菌からのプラスミド DNA 調製

大腸菌(*E. Coli*)からのプラスミド DNA の調製は、改変アルカリ法により行った。まず、一晚培養した大腸菌 1 ml をマイクロチューブにとり、卓上遠心機を用いて  $12,000 \text{ xg}$  で 30 秒間遠心して菌体を回収した。培地を除去した後、I 液 0.1 ml を加えて菌体を懸濁した。II 液 0.2 ml を加えて転倒混和させた後、さらに III 液を 0.15 ml 加えて再び転倒混和させた。さらにクロロホルム/イソアミルアルコールを 0.15 ml 加えて、ボルテックスで激しく混合した。卓上遠心機を用いて  $12,000 \text{ xg}$  で 5 分間遠心し、水層を新しいマイクロチューブに移した後、2.5 倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行った。得られた沈殿を適量の滅菌水に溶解させた後、1  $\mu\text{l}$  の RNase 溶液を加え  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間イ

ンキュベートして大腸菌由来の RNA を分解させた。さらに 3/5 倍量の PEG 溶液を加えて氷上で 20 分間静置した後、冷却遠心機を用いて 4°C、12,000 xg で 15 分間遠心した。沈殿を 70%エタノールで洗浄した後、真空乾燥させ、適量の滅菌水に溶解させた。得られたプラスミド DNA はアガロース電気泳動により確認し、制限酵素処理やトランスフォーメーション等の操作に使用した。

#### (4) DNA の制限酵素処理

プラスミド DNA、PCR 増幅断片の制限酵素処理は、添付の緩衝液を用いて指定の反応温度(37°C または 30°C)で 2 時間以上反応させた。反応後は、アガロース電気泳動により DNA の消化を確認した後、エタノール沈殿またはフェノール/クロロホルム抽出を行って、制限酵素を除去した。

#### (5) DNA のアガロース電気泳動

DNA の濃度測定および制限酵素処理はアガロース電気泳動により行った。大きさが 1.0~15.0 kbp の高分子 DNA は 0.6~0.8% (w/v)のアガロース (Agarose LE, Classic Type/ナカライ)ゲルを使用し、また 0.1~1.0 kbp の低分子 DNA は 1.0~1.5% (w/v)のアガロースゲルにより分離した。DNA の分子量マーカーとして、 $\lambda$  *Hind* III 分子量マーカー(BioLabs)および 100 bp ラダー分子量マーカー (宝酒造) を用いた。泳動は電気泳動緩衝液として TAE を用いてサブマリン型電気泳動装置で行った。泳動後のアガロースゲルは、エチジウムブロマイドを含む TAE で染色し、UV イルミネーターを用いて UV 照射下で DNA を検出した。

#### (6)アガロースゲルからのDNA 切り出し精製

アガロース電気泳動後のアガロースから目的の DNA 断片を剃刀を用いて切り出した後、Quantum Prep Freeze N Squeeze Spin Column (バイオ・ラッド)を用いて精製した。精製後、一部を再びアガロース電気泳動を行い回収率を確認した。

#### (7) DNA の結合

制限酵素処理した DNA を結合させる際は、市販のライゲーションキット (Ligation High/東洋紡、DNA Ligation Kit/宝酒造)を使用し、16°C で 1 時

間以上反応させた。なお、制限酵素処理した DNA 断片をプラスミド DNA に挿入する際には、モル比が挿入 DNA : プラスミド DNA = 3 : 1 になるように調製した。

#### (8)大腸菌への遺伝子導入(トランスフォーメーション)

氷上でゆっくりと溶かしたコンピテントセル 100  $\mu$ l にプラスミドを加え 30 分間氷冷した。42°C で 40 秒間ヒートショックを与え、氷上に 5 分放置したのち、500  $\mu$ l の SOC 培地を加え 37°C で 1 時間培養した。この培養液を抗生物質を含む大腸菌用培地(LB 培地)に均一に塗布し、37°C で 12~15 時間静置培養した。得られた大腸菌のコロニーは、導入されたプラスミド DNA を確認した後、抗生物質を含む大腸菌用液体培地に植菌し、37°C で 9~12 時間振盪培養を行った。培養後の大腸菌液をキャップ付きのマイクロチューブにとり、等量の滅菌 80% (v/v)グリセロール溶液を加えてよく混合した。この混合液は、グリセロールストックとして-80°C で保存した。

#### (9) DNA の PCR (Polymerase Chain Reaction)増幅

PCR 法による目的の DNA 断片の増幅は、市販の耐熱性 PCR 用ポリメラーゼ(KOD Dash/東洋紡、Ex Taq polymerase/宝酒造)を用いて行った。反応は、添付説明書の基本条件をもとに改変しながら行った。また、増幅に用いたプライマーは北海道システムサイエンス社に依頼して合成したものを使用した。なお PCR 増幅機器は、PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700, PC-707 (アステック)を使用した。

#### (10) PCR 増幅 DNA 断片のサブクローニング(TA クローニング)

PCR 増幅 DNA 断片のサブクローニングは市販の T ベクター(pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I/プロメガ)を用いて行った。反応は添付説明書に従い行った。

#### (11) DNA 塩基配列の決定(シーケンス解析)

DNA の塩基配列の決定は、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (アマシャムバイオサイエンス)を用いて反応を行い、DNA シークエンサー 373A (パーキンエルマー)により決定した。また、得られた塩基配列の解析は、Editview ver.1.0.1 (アプライドバイオシステム)および DNASIS-Mac v3.0 (日

立ソフトエンジニアリング)を使用した。

#### (12) GTC (guanidine thiocyanate)法による RNA の調製

0.6 ml の GTC 抽出緩衝液を滅菌したマイクロチューブにとり、数 $\mu$ l の 2-メルカプトエタノールを加えた。この抽出緩衝液に液体窒素で粉碎した試料約 100 mg を加え、直ちにボルテックスを用いて攪拌した。冷却遠心機を用いて 12,000 xg で 5 分間遠心分離した。上清を新しいマイクロチューブに移し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加えた後、フェノール/クロロホルム抽出処理を 5 回行った。水層を新しいマイクロチューブに移し、室温の 2.5 倍量のエタノールを加え冷却遠心機を用いて 12,000 xg で 20 分間遠心し、上清を取り除いた。得られた沈殿を 400  $\mu$ l 滅菌水にとかし、100  $\mu$ l の 10 M LiCl を加え転倒混和させ、氷中に 30 分間静置した後、冷却遠心機を用いて 12,000 xg で 20 分間遠心し上清を取り除いた。70%エタノールで洗浄後、滅菌水に溶解し RNA サンプルとした。

#### (13) ATA (aurintricarboxylic acid)法による RNA の調製

0.6 ml の ATA 抽出緩衝液を滅菌したマイクロチューブにとり、数 $\mu$ l の 2-メルカプトエタノールを加えた。この抽出緩衝液に液体窒素で粉碎した試料約 100 mg を加え、直ちにボルテックスを用いて攪拌した。3 M 塩化カリウムを 84  $\mu$ l 添加して転倒混和させ、氷中に 15 分間静置した後、冷却遠心機を用いて 1,800 xg で 5 分間遠心分離した。上清を新しいマイクロチューブに移し、最終濃度が 4M となるように塩化リチウムを加え、4°C で数時間から一晩静置して RNA の析出を行った後、遠心分離器を用いて 12,000 xg で 15 分間遠心して粗 RNA 沈殿を得た。この沈殿を適量の滅菌水に溶解させ、さらに 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加えた後、フェノール/クロロホルム抽出処理を行った。水層を新しいマイクロチューブに移し、2.5 倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行った。得られた沈殿を滅菌水に溶解し RNA サンプルとした。

#### (14)シカクマメクラス I 型キチナーゼ cDNA のクローニング

##### (a) RT (reverse transcription)-PCR

1% (w/v) NaCl を液体培地に添加して 4 日間振盪培養したシカクマメ培養細胞から、GTC 法により調製した total RNA を鋳型として、Takara RNA PCR Kit

(AMV) Ver.2.1 (宝酒造)を使用し、cDNA の合成および PCR 増幅を行った。反応は添付説明書の基本条件をもとに改変しながら行った。Oligo dT-Adapter Primer (キット添付)を用いて逆転写反応を行った後、センスプライマー 5'-AGCCAGTTCGGGTGGTGC GGC-3' (P1) とアンチセンスプライマー 5'-CCAGAACCATATGGCTGTCTTGAA-3' (P2)で PCR 増幅を行った。

(b) 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)法

RT-PCR によりクローニングしたシカクマメクラス I 型キチナーゼ cDNA の部分塩基配列をもとに、新たにセンスプライマー 5'-ACGTACGAGGAGATGCTGAAGCAT-3' (P6)を作成した。3'-RACE には前項で合成された cDNA を鋳型として、P6 プライマーと M13 primer M4 (キット添付)を用いて PCR 増幅を行った。

(c) 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)法

RT-PCR によりクローニングしたシカクマメクラス I 型キチナーゼ cDNA の部分塩基配列をもとに、新たに 5' 末端リン酸化プライマー 5'-CCACACTGTCCGT-3' (P3) とセンスプライマー 5'-CCATACGCCTGGGGATACTGC-3' (P4) とアンチセンスプライマー 5'-CCGTCGTTGCGATGCTTCAGCAT-3' (P5)を作成した。前項のシカクマメ total RNA から P3 プライマーを用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した後、T4 RNA リガーゼ(宝酒造)により 1 本鎖 DNA の環状化を行い、P4 プライマーと P5 プライマーを用いて PCR 増幅を行った。

(15)タバコ BY-2 のプロリンデヒドロゲナーゼ(*NtProDH*) cDNA のクローニング

100 mM Pro を添加した培地に 1 日間培養したタバコ BY-2 のカルスから、GTC 法により調製した total RNA を鋳型として、Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 (宝酒造)を使用し、cDNA の合成および PCR 増幅を行った。センスプライマー 5'-TTA CAC CAC CGA GGT TTT AGT-3' とアンチセンスプライマー 5'-TCA TGA AGT TGC CAC TTT-3'で PCR 増幅を行った。

(16)形質転換タバコ BY-2 細胞の作製

#### (a) RNAi 用プラスミドの構築

RNAi 用ベクターは島根大学の中川強先生から譲渡していただいた pGWHPR を使用した。この pGWHPR は attP1、attP2 配列が組み込まれており、BP クロナーゼにより attB1、attB2 配列と組み換えることができる。NtProDH クローンを鋳型にして attB1、attB2 配列を付加した 429-bp (NtProDH-B1、Fig. 5-2) と 376-bp (NtProDH-B2、Fig. 5-2) cDNA 断片を PCR により増幅した。B1 の増幅では、センスプライマーとして 5'-G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCC TCC GAT CAT TTG TCC-3' を、アンチセンスプライマーとして 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CAC CCC ATA ATC AAG C-3' を用いた。B2 の増幅では、センスプライマーとして 5'-G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TGC TGA GAT GGG AAC ACA-3' を、アンチセンスプライマーとして 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CAT TTT CTC TGC AGC C-3' を用いた。NtProDH-B1、-B2 PCR 増幅断片をそれぞれ、BP クロナーゼ反応を行い RNAi ベクター pGWHPR-attP1-attP2 へ組み換えた。

#### (b) アグロバクテリウムへの導入

構築した形質転換用プラスミド 10~100 ng をアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA101 のコンピテント細胞 50  $\mu$ l にエレクトロポレーション法により導入した。なお、エレクトロポレーションには、エレクトロポレーション用キュベット (E.Coli Pulser Cubette/バイオ・ラッド) を使用し、Gene Pulser II (バイオ・ラッド) を用いて、電圧 2.5 kV、電気容量 25  $\mu$ F、パルス制御 200  $\Omega$  の条件で行った。導入したアグロバクテリウムに SOC 培地を 1 ml 加え、28°C で 1 時間インキュベートした後、約 1  $\mu$ l を抗生物質として 30 mg/l のクロラムフェニコール、50 mg/l のハイグロマイシン、50 mg/l のカナマイシンを含む YEB 固形培地に塗布して、28°C で 2 日間培養した。得られたコロニーを抗生物質として 30 mg/l のクロラムフェニコール、50 mg/l のハイグロマイシン、50 mg/l のカナマイシンを含む YEB 液体培地に植菌し、28°C で振盪させながら一晩培養した。培養後のアグロバクテリウムはタバコ培養細胞へ感染させるまで 80%グリセロールを加えて -80°C で保存した。

#### (c) タバコ培養細胞への感染

形質転換用プラスミドを導入したアグロバクテリウムを一晩、抗生物質として 30 mg/l のクロラムフェニコール、50 mg/l のハイグロマイシン、50 mg/l のカナマイシンを含む YEB 液体培地で振盪培養した。懸濁培養 3 日目のタバコ BY-2 培養細胞 4 ml を無菌シャーレに取り、アグロバクテリウム培養液 100  $\mu$ l を加えて十分混和させた。28°C で 48 時間静置して共存培養を行うことにより、タバコ培養細胞への感染を行った。なお、この操作は、クリーンベンチ内で無菌的に行った。

#### (d)形質転換細胞の洗浄・選抜

共存培養した細胞に、タバコ培養用の新鮮培地(タバコ BY-2 液体培地)約 10 ml を加えてよく懸濁させた後、無菌の 15 ml 容遠心管に取り、卓上遠心機を用いて、800 rpm で 1 分間、室温条件下で遠心して細胞を沈降させた。液体培地を除去し、さらに新鮮な液体培地約 10 ml を加えてよく懸濁して細胞を洗浄した。この洗浄操作を 5 回繰り返してアグロバクテリウムを完全に除去した。最終的に細胞を約 10 ml の新鮮培地に懸濁させた後、約 2~3 ml の細胞懸濁液を、抗生物質を含む BY-2 選択固形培地に広げ、この培地を 28°C、暗所に静置して培養した。この BY-2 選択培地は、抗生物質としてアグロバクテリウム死滅用に 500 mg/l のクラフォラン、および形質転換体耐性マーカー用の 200 mg/l のカナマイシンを含んでいる。培養約 2 週間後にカナマイシン耐性遺伝子が組み込まれた形質転換細胞株のコロニーを得た。これらのコロニーを滅菌した爪楊枝で掻き取り、新しい BY-2 選択固形培地に植え換えて継代培養を行った。

#### (17)ノーザンプロット解析

##### (a) RNA のアガロース電気泳動

GTC 法または、ATA 法により抽出した total RNA の濃度を測定した後、解析に必要な量になるように調製した。数 $\mu$ l の RNA 変性溶液と total RNA を混和し、65°C で 5 分間加熱変性させ、直ちに氷中に静置した。これらの変性 RNA は、電気泳動用色素と混和させた後、RNA 用アガロースゲルで泳動した。なお、電気泳動緩衝液は 1 x MOPS で行った。泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド液で数十秒染色した後、大量の滅菌水で 2 時間以上振盪しながら洗浄した。洗浄後のゲルは、UV 照射下で写真撮影した。

#### (b) RNA の膜転写

RNA 泳動後のアガロースゲルは 20 x SSC を溶媒としたキャピラリーブロッティングにより、ナイロンメンブレン Hybond N<sup>+</sup> (アマシャムバイオサイエンス) に 6 時間以上かけて転写した。転写後のメンブレンは、UV イルミネーターを用いて表裏それぞれ 3 分間 UV 照射して RNA のメンブレンへの固定化を行った。

#### (c) プレハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーション溶液にメンブレンを浸し、ポリエチレン袋に入れた。適等量のプレハイブリダイゼーション溶液を加え、ポリエチレン袋を空気が入らないようにシールし、42°C で 1 時間以上インキュベートした。

#### (d) プローブの標識

シカクマメのクラス I キチナーゼ mRNA の検出には Ser<sup>34</sup>~Trp<sup>221</sup> に相当する cDNA 断片をプローブとして用いた。タバコの *ProDH* mRNA の検出には 5' 末端から 251bp から 575 bp までの cDNA 断片を PCR により増幅して用いた。20 ng のプローブを rediprime<sup>™</sup>II (アマシャムバイオサイエンス) を用いて、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (37MBq/ml、ICN) で標識し、プローブとした。操作は添付のプロトコールに従って行った。

#### (e) ハイブリダイゼーションおよび洗浄

プレハイブリダイゼーションを行ったナイロンメンブレンを、新しい 20 ml のプレハイブリダイゼーション溶液と標識プローブの入ったタッパー容器に浸し、42°C で 16 時間インキュベートした。洗浄はタッパー容器にメンブレンを浸しインキュベートすることで行った。2XSSC-0.1%SDS 溶液を用いて 42°C、15 分間の洗浄を 3 回、0.2XSSC-0.1%SDS 溶液を用いて 65°C、15 分間の洗浄を 1 回、0.1XSSC-0.1%SDS 溶液を用いて 65°C、15 分間の洗浄を 1 回行った。

#### (f) 検出

洗浄したナイロンメンブレンは、台紙の上に置きラップをかぶせた後、X 線フィルムを重ねたカセットに入れ、-80°C にてオートラジオグラフィーを行っ

た。もしくは、メンブレンを富士イメージングプレート（富士写真フイルム株式会社）に露光した後、バイオイメージングアナライザー（富士写真フイルム株式会社）で解析した。

#### (18)ウエスタンブロッティング

##### (a) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

粗抽出液にタンパク質変性溶液を加え、よく混和した後、沸騰湯浴中で5分間煮沸した後、12%アクリルアミドゲルで泳動、分離した。

##### (b)タンパク質の膜転写

泳動後のアクリルアミドゲル中のタンパク質をPVDF膜(ポリスクリーン)にセミドライブロッティング装置を用いて転写した。転写は、膜の面積( $\text{cm}^2$ )  $\times$  2 mA の低電流で1時間行った。転写後の膜をブロッキング溶液に移し、ゆっくり浸透させて30分以上ブロッキングした。

##### (c)抗体反応・検出

ブロッキング後の膜を1%の抗カボチャクラスIキチナーゼ抗体を含む溶液で37℃、1時間反応させた。反応後、Tween-TBSで激しく浸透させながら5分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した。洗浄後、1/10,000量の抗ウサギIgG-ペルオキシダーゼ抗体(ICN)を含む溶液で37℃、1時間反応させた後、再びTween-TBSによる洗浄操作を行った。タンパク質の検出は、DAB検出溶液で検出した。

#### (19)シカクマメのオスモティックストレス応答性

シカクマメから葉をカットし、NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、マンニトール、サッカロースまたはアブシジン酸溶液を入れたシャーレに28℃、常光化で1~4日間浮かべた。シカクマメカルスのオスモティックストレスは、1.0gのカルスを100mlの250mM NaCl、250mM KCl、250mM CaCl<sub>2</sub>、250mM マンニトールまたは250mM サッカロースを添加したシカクマメ培養細胞用液体培地へ移し、28℃暗所で2~6日間振盪培養した。

#### (20)タバコ植物体へのアスコルビン酸および前駆体の添加

寒天培地で 3~4 週間育てたタバコ植物体を、アスコルビン酸またはその前駆体溶液が入ったマイクロチューブへ移した。24 時間培養後、アスコルビン酸含量を測定した。

#### (21)タバコの葉への塩ストレス処理

寒天培地で 3~4 週間育てたタバコ植物体を、アスコルビン酸または L-ガラクトノ-1,4-ラクトン溶液が入ったマイクロチューブへ移した。24 時間培養後、葉を茎からカットしリーフディスクとした。リーフディスクをアスコルビン酸または L-ガラクトノ-1,4-ラクトンと 600 mM NaCl 溶液を入れたシャーレに浮かべ、25℃で 3 日間、常光下で培養した後クロロフィル量を測定した。

#### (22)タバコへの UV ストレス処理

##### (a)タバコの葉への UV ストレス処理

寒天培地で 3~4 週間育てたタバコの植物体をアスコルビン酸溶液で 24 時間処理し、葉を切り取った後、アスコルビン酸溶液に葉を浮かべて 24 時間 UV 照射を行った。照射した UV の強度は  $400 \text{ W/cm}^2$  (GL15/Toshiba)、253.7 nm (UV-C)の波長であった。バックグラウンドの光量は  $17 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  (FL20SS-W/18/Toshiba)であった。試料とランプとの距離は 45 cm であった。照射後、それぞれ新しい溶液に移し、24 時間インキュベートした後、クロロフィル量を測定した。

##### (b)タバコ植物体への UV ストレス処理

寒天培地で 3~4 週間育てたタバコ植物体を、アスコルビン酸溶液が入ったマイクロチューブへ移した。24 時間インキュベート後、前項の条件下で UV を照射し、さらに 24 時間インキュベートした後、土(花と野菜の土/(株)ダイキ)に植え換え、2 週間後の生存率を比較した。生存率は、植え換えた全植物体のうちの生存している植物の割合で算出した。生存している植物体は、2 週間後に新しい葉が出芽してその後大きく育つかどうかで判断した。一方、死んだ植物体は 2 週間後でも新しい葉は出芽せず、その後枯れてしまった。

#### (23)アスコルビン酸量の測定

液体窒素中で粉碎した試料に 2 倍量(v/w)の 6%メタリン酸(w/v)を加え、

10,000 xg、4°C、10 分間遠心し、得られた上清をアスコルビン酸含量の測定に使用した。アスコルビン酸含量は RQ-Flex-Plus (MERCK)によって測定した。アスコルビン酸試験紙に得られた上清を反応させ、詳細は付属の方法に従った。なお、得られた値から試料の希釈率を換算し、新鮮重量あたりのアスコルビン酸含量を算出した。

#### (24)クロロフィル含量の測定

サンプルを乳鉢を用いて液体窒素中で粉碎し、サンプル 0.02g に対して 1 ml の DMF (*N,N*-dimethylformamide)を加えて攪拌した。4°C、1,500 xg、10 分間遠心し上清 100  $\mu$ l を新しいチューブに移し、900  $\mu$ l の DMF を加えて攪拌、4°C、6,000 xg、5 分間遠心した。上清の 647 nm の吸光度( $A_{647}$ )および 664.5 nm の吸光度( $A_{664.5}$ )を測定した。

総クロロフィル量は以下の式で求めた。

$$\text{総クロロフィル量(mg/l)} = 17.90 A_{647} + 8.08 A_{664.5}$$

#### (25)過酸化脂質の測定

過酸化脂質の測定は、チオバルビツール酸とマロンジアルデヒドとの反応により生成する色素を測定することにより求めた。0.1 g の試量を 0.2 ml の 0.1% (w/v)トリクロロ酢酸中でホモジナイズし、0.8 ml の 0.5% (w/v)チオバルビツール酸を含む 20% (w/v)トリクロロ酢酸を加えた。反応液を 95°C で 30 分反応させた後、氷上で冷却した。冷却遠心機で 10,000 xg で 10 分遠心した。上清を新しいマイクロチューブへ移し、532 nm の吸光度( $A_{532}$ )を測定した。過酸化脂質量は生成色素のモル吸光係数  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  より換算し求めた。

#### (26)硝酸銀還元法

##### (a) 100%第三ブチルアルコールの調製

第三ブチルアルコールは、Molecular sieve 0.4 nM (MERCK)で脱水した。Molecular sieve はよく洗浄、風乾した後 200°C、120 分間乾燥させたものを、溶媒 1l に対して 150g 加え 1 時間以上攪拌して作製した。

##### (b)硝酸銀染色・固定・パラフィン包埋

タバコの発芽 5 日目の植物体をイオン交換水または 10 mM L-ガラクトノー

1,4-ラクトン、10 mM アスコルビン酸を含む水溶液に根のみが浸るようにして 24 時間インキュベートした。植物体を一個体ずつイオン交換水ですすぎ、シュートの部分をカッターで切り取った。シュートは 5% (w/v)硝酸銀溶液に浸漬し、暗所下で、4°C、5 日間インキュベートした。その後組織を洗浄液(70% エタノール、5%アンモニア)で洗浄し、第三ブチルアルコールシリーズを使って脱水した。

	第三ブチルアルコール : エタノール : 水		
①	10	:	40 : 50
②	20	:	50 : 30
③	35	:	50 : 15
④	55	:	45 : 0
⑤	75	:	25 : 0
⑥	100	:	0 : 0

それぞれの溶液に半日以上、100%第三ブチルアルコールのみ 36 時間以上浸けて脱水した。第三ブチルアルコールシリーズが終了したら、組織を第三ブチルアルコールに入れたままで蓋付きのビンに移しかえ、60°C、恒温器内で 1 日インキュベートした。アルコールと等量のあらかじめ 60°C でインキュベートすることにより溶かしておいたパラフィンを追加して蓋を閉め、60°C で半日間インキュベートした。恒温器内で蓋を取り、2~3 日間アルコールをとばした。ピンをアルコールランプで温めてパラフィンを溶かし、組織とパラフィンごと包埋皿に移した。完全にパラフィンが固まったことを確認した後、固定された組織を包埋皿から取り出した。

#### (c)スライドの作製

組織の入ったパラフィンブロックを包埋された組織に合わせてカットし、8  $\mu\text{m}$  の切片に切り、Haupt 接着液(1%ゼラチン、2%フェノール、15%グリセリン)を薄く塗ったスライドガラスに載せ、その上から水を垂らし、伸展器(50°C)で伸展させた。十分に伸展させた後、水分を除いて再び伸展器上で 12 時間以上乾燥させた。

#### (d)染色・封入・観察

スライドガラスを 1% (w/v)サフラニン水溶液(0.1% サフラニン, 95%

alcohol)で 10 分間染色し、流水で洗った後、蒸留水で 1 分間浸漬した。続いて水分をふき取り、0.5% (w/v)ファストグリーン溶液(0.5% fast green, 95% alcohol)で 10 分間染色し、流水で洗い、蒸留水で 1 分間(2 回)浸漬した。37°C で乾燥させ、キシレンに 5 分間(2 回)浸漬させた。スライドをキシレンから取りだし、エンテラン・ニュー(MERCK)で封入した。観察は光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE E600; Nikon)により行った。

#### (27)プロリン含量の測定

0.5g の試料を 1 ml の 3% (w/v)スルホサリチル酸溶液中でホモジナイズし、冷却遠心機で 10,000 xg で 10 分遠心した。新しいマイクロチューブに 0.2 ml の上清および 0.2 ml の酸性ニンヒドリンと 0.2 ml の無水酢酸を加え、100°C で 1 時間反応させた後、氷冷した。反応溶液は 0.4 ml のトルエンで抽出した。トルエンをブランクとして、520 nm の吸光度( $A_{520}$ )を測定した。また、検量線は L-Pro を適當の倍率で希釈して作製した。Pro の濃度は検量線より求め、得られた値から新鮮重量あたりの Pro 含量を算出した。

#### (28)プロリンデヒドロゲナーゼ酵素活性の測定

##### (a)粗ミトコンドリア画分の調製

プロリンデヒドロゲナーゼ(ProDH)はミトコンドリアタンパク質であるため、タバコ BY-2 培養細胞からミトコンドリア画分の調製を行った。まず、十分に冷却した乳鉢を氷上に置き、試料を入れた。試料の生鮮重量に対して 3 倍量のタンパク質抽出緩衝液(100 mM リン酸カリウムバッファー、400 mM ショ糖、1 mM EDTA)を加え、乳鉢を用いてゆっくりすりつぶした。ガーゼで濾過した後、新しいマイクロチューブに 1 ml ずつ数本に分けて取り、冷却遠心機で 300 xg で 10 分間遠心し、さらに上清を 10,000 xg で 20 分間遠心した。得られた沈殿を 0.1 ml のタンパク質抽出緩衝液に溶解させたものを粗ミトコンドリア画分として、ProDH 活性の測定に使用した。

##### (b)プロリンデヒドロゲナーゼ活性の測定

ProDH 活性は、その基質である Pro の代謝産物である  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボキシレートと *o*-アミノベンズアルデヒドが反応して生成する色素を 443 nm の吸光度( $A_{443}$ )を測定することにより求めた。75 mM リン酸カリウムバッファ

ー(pH7.4)、1.0 M L-Pro、3.4  $\mu$ M チトクロム c と 20  $\mu$ l の粗ミトコンドリア画分を含む 600 $\mu$ l の反応バッファーを 37°C で 16 時間反応させた。反応液に、0.5 ml の 0.5% (w/v) *o*-アミノベンズアルデヒド/5% (w/v) トリクロロ酢酸を加え室温で 30 分静置した。卓上遠心機で 10,000 xg で遠心後、上清を新しいマイクロチューブに移した。基質である L-Pro を入れずに反応させたものをブランクとして、443 nm の吸光度( $A_{443}$ )を測定した。生成色素のモル吸光係数は  $2,710 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  として酵素活性を求めた。

#### (29) 生細胞のフルオロセインジアセテートによる染色

フルオロセインジアセテート(FDA)は細胞内のエステラーゼ活性により分解され蛍光物質となる。死細胞はエステラーゼ活性を持たないので、生細胞のみ染色できる。固形培地から 0.5 g のカルスを Pro、NaCl またはマンニトールを添加した液体培地に移し、24 時間振盪培養した。細胞を 0.01% (w/v) FDA で染色し、蛍光顕微鏡(Nikon ECLIPSE E600; Nikon)による観察を行った。約 1,000 個の細胞を観察し、生存率を算出した。

#### (30) タバコ形質転換培養細胞の同調培養

タバコ BY-2 培養細胞の同調化は Nagata ら(1992)および Kato and Esaka (1999)に記述されている方法に従って行った。まず、懸濁培養 6 日目の細胞 10 ml を細胞分裂阻害剤であるアフィディコリン(シグマ) 5 mg/l を含む新鮮培地 100 ml に植え、24 時間回転振盪培養して細胞分裂直前の状態に停滞させた。培養細胞をガラス濾過器で濾過した後、新鮮培地 1 l を用いて懸濁・濾過を繰り返して細胞を洗浄し、アフィディコリンを除去した。アフィディコリンの除去により細胞分裂の停滞が解除された細胞を再び新鮮培地 100 ml に移して回転振盪培養を行い、1 時間ごとに 1 ml ずつ細胞を分取した。回収した細胞は卓上遠心機を用いて、70 xg で 1 分間、室温条件下で培地を除去した後、細胞固定液(エタノール：酢酸 = 3:1)を加えて固定した。固定した細胞は、オルセイン染色液で細胞核を染色し、光学顕微鏡(LABOPHOT; Nikon)による観察をした。約 1,000 個の細胞を観察し、有糸分裂している細胞の割合を有糸分裂指数(Mitotic Index; M.I.)として算出した。1 時間あたりの有糸分裂指数の変移を指標として細胞分裂活性を評価した。

### 第3章 塩ストレスおよびオスモティックストレスによるシカクマメのキチナーゼ遺伝子の発現応答

#### 緒言

キチナーゼは *N*-acetyl-D-glucosamine のポリマーであるキチンの  $\beta$ -1,4 結合を加水分解する。植物におけるキチナーゼの研究は生体防御に関するものがほとんどである。植物はキチンを構成成分に含む病原菌から自身を守るため、キチナーゼを生産する(Bell, 1981)。植物は病原菌に感染すると、キチナーゼの誘導が起こる。また、キチン、キトサンのオリゴ糖、タバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、植物ホルモンのエチレン(Mauch and Staehelin, 1989) やサリチル酸、重金属の塩化水銀(Margis-Pinheiro *et al.*, 1993)や、傷害(Hamel and Bellemare, 1995)などの物理的な刺激によっても誘導が起こる。キチナーゼを高発現させたトランスジェニック植物は病気抵抗性が増加することが報告されており、キチナーゼが生体防御に深く関わっていることが知られている(Brogli *et al.*, 1991, Suarez *et al.*, 2001)。また、開花時や種子の形成の際にキチナーゼの発現が誘導される(Neale *et al.*, 1990)という報告や、マメ科のキチナーゼが根粒形成に関与する Nod factor と呼ばれるリポオリゴサッカライドを認識することも知られており(Goormachtig *et al.*, 1998, Staehelin *et al.*, 1994)、植物のキチナーゼは生体防御以外の機能も有していると考えられている。

キチナーゼはその一次構造によって4種類に分類される(Collinge *et al.*, 1993, Fig. 3-1)。クラス I キチナーゼは N 末端側からキチン結合ドメイン、ヒンジドメインと呼ばれる結合部分、活性触媒ドメインの3つの領域で構成されている。クラス I キチナーゼはさらに液胞輸送シグナルの有無によって2つのサブクラスに分類される。液胞輸送シグナルのあるものが Ia、無いものが Ib とされている。クラス II キチナーゼはクラス I キチナーゼの N 末端側のキチン結合ドメインとヒンジドメインが欠失している以外は、クラス I キチナーゼと似ている。クラス III キチナーゼはクラス I キチナーゼ及びクラス II キチナーゼとは構造的に異なっており、むしろ細菌などのキチナーゼに構造が類似している。クラス IV キチナーゼは基本的にはクラス I キチナーゼと同じ構造をしているがそのアミノ酸配列の4カ所で欠失が見られる。

これまでの研究で、耐塩性シカクマメカルスから特異的に6種類のタンパク

質が分泌されることが SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析により明らかにされており、それぞれ SAP1、-2、-3、-4、-5、および-6 と名付けられている(Esaka *et al.*, 1992)。N末端のアミノ酸解析により SAP3 はクラス I キチナーゼであることが分かっている(Esaka *et al.*, 1994)。これまで、クラス II キチナーゼがオスモティックストレスとアブシジン酸(ABA)により誘導されたという報告はあるが、クラス I キチナーゼが塩およびオスモティックストレスによって誘導されたという報告はない。そこで、シカクマメからクラス I キチナーゼの cDNA を単離し、シカクマメの葉組織とシカクマメの培養細胞を用いて塩およびオスモティックストレスによる発現応答について解析した。

## 結果

### (1)シカクマメのクラス I キチナーゼ cDNA の単離

1% (w/v) NaCl を含むシカクマメ液体培養用培地で、4 日間振盪培養したシカクマメ培養細胞から全 RNA を抽出した。インゲン豆(Brogliè *et al.*, 1986)、タバコ(Shinshi *et al.*, 1990)やカボチャ(Arie *et al.*, 2000)のアミノ酸配列を比較し、高度に保存されている領域を調べた。保存領域の塩基配列をもとに 2 つの PCR 増幅用プライマー P1 と P2 を設計した。シカクマメ培養細胞から調製した全 RNA を鋳型として RT (reverse transcription)-PCR 増幅を行った結果、約 570 塩基の cDNA 断片を得た。この cDNA 断片をサブクローニングした後、DNA シークエンサーにより塩基配列を解析したところ、他のクラス I キチナーゼと相同性が高いことから、クラス I キチナーゼであることが判明した。次にこの塩基配列をもとにシカクマメのクラス I キチナーゼに特異的な 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)および 5'-RACE 用プライマーを設計した。

特異的プライマーを用いて 3'、5'-RACE を行なった結果、約 1,000 塩基と 400 塩基の cDNA 断片を獲得し、それぞれ塩基配列を決定した。シカクマメのクラス I キチナーゼの全鎖 cDNA は 1,070 塩基で、945 塩基のオープンリーディングフレームを有し、315 アミノ酸残基をコードしていた(Fig. 3-2)。また N 末端側には 15 アミノ酸からなるシグナルペプチドを持っていた(Fig. 3-2)。一般にクラス I キチナーゼは液胞に集積すると言われている。しかし、今回クローニングしたクラス I キチナーゼ遺伝子が液胞輸送シグナルを持つかは不明であった。また、得られたクラス I キチナーゼは N 末端のアミノ酸配列が SAP3 (Esaka *et al.*, 1994)とは異なっていたので、今回クローニングされた cDNA は SAP3 とは異なるクラス I キチナーゼ遺伝子であると考えられた(Fig. 3-3)。シカクマメのクラス I キチナーゼのアミノ酸配列は、インゲン豆のクラス I キチナーゼ(Brogliè *et al.*, 1986)とでは 70%、タバコ(Shinshi *et al.*, 1990)とでは 58%、カボチャ(Arie *et al.*, 2000)とでは 64%、イネ(Huang *et al.*, 1991)とでは 58%、ポテト(Ancillo *et al.*, 1999)とでは 60%と、他のクラス I キチナーゼとホモロジーが高かった(Fig. 3-4)。また、N 末端側にクラス I キチナーゼに特徴的な 8 つのシステイン残基が認められた(Iseli *et al.*, 1993)。一方、ゲノミック PCR でクラス I キチナーゼゲノム遺伝子のクローニングも行った。その結果、多くのクラス I キチナーゼと同様にシカクマメのクラス I キチナーゼ遺伝

子もイントロンを持たなかった(Fig. 3-2)。

### (2)シカクマメのクラス I キチナーゼ遺伝子の各組織における発現

発芽後 1 ヶ月のシカクマメ植物の各組織についてノーザンブロット解析を行い、シカクマメのクラス I キチナーゼ mRNA 量を調べた。シカクマメのクラス I キチナーゼ mRNA の検出には Ser<sup>34</sup>~Trp<sup>221</sup> に相当する cDNA 断片をプローブとして用いた。したがって、他のクラス I キチナーゼ mRNA とハイブリダイズした可能性もある。シカクマメのクラス I キチナーゼは根、莖、子葉、葉にそれぞれ発現しており、植物体において恒常的に発現していた(Fig. 3-5A)。次に種子の発芽時におけるキチナーゼ mRNA の発現について調べた。吸水後 5 日目から発現が増大し 10 日目で最高となり、12 日目以降は急激に減少したことから、種子の発芽の際にクラス I キチナーゼ遺伝子が誘導されることが示された(Fig. 3-5B)。

### (3)シカクマメのクラス I キチナーゼのオスモティックストレス応答性

シカクマメのクラス I キチナーゼが塩ストレスによって誘導されるかを調べるため NaCl 処理した発芽後 1 ヶ月のシカクマメ葉組織と培養細胞のノーザンブロット解析を行い mRNA 量を調べた。1 ヶ月間生育させたシカクマメ植物体の葉を用いて塩ストレスを与えた。切り取った直後の葉をコントロールとし、0% (w/v)、0.5% (w/v) または 1.0% (w/v) の NaCl 溶液をいれたシャーレにシカクマメの葉を浮かべ、インキュベートした葉から RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行った。塩ストレスを与えない 0%濃度下では 2 日目、4 日目と徐々にクラス I キチナーゼ mRNA の発現が低下したのに対し、塩ストレスを与えた葉組織においては、0.5%、1.0%と塩濃度が高くなるにつれクラス I キチナーゼ mRNA のより高い発現が見られた(Fig. 3-6A)。特に 1.0%塩濃度下では 4 日目にクラス I キチナーゼ mRNA の発現量が高くなった。また、塩の入っていない寒天培地で 20 日間培養したシカクマメカルス培養細胞を 0%、5%、10.% または 1.5% の NaCl を添加したシカクマメ液体培地に植え継ぎ、振盪培養後 RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行った。培養細胞においても 0.5%、1.0%、1.5%と塩濃度が高くなるにつれクラス I キチナーゼ mRNA の発現量が高くなった(Fig. 3-6B)。1.0%では 2 日目に、1.5%では 4 日目に最もクラス I キチナーゼ mRNA の発現量が増加した。

次に、NaClによる発現量の増加がNaClに特異的なものかどうかを調べた。シカクマメ植物体の葉を用いて、切り取った直後の葉をコントロールとして、250 mM KCl、250 mM CaCl<sub>2</sub>、250 mM マンニトール、250 mM ショ糖によるストレスを4日間与えた。その結果、葉組織においては、クラス I キチナーゼは塩だけでなく、マンニトールやショ糖などによるオスモティックストレスによっても発現が誘導されることが分かった(Fig. 3-7A)。また、シカクマメカルス細胞を、250 mM KCl や、250 mM CaCl<sub>2</sub>、250 mM マンニトール、250 mM ショ糖を添加した液体培地へ移し、4 日間振盪培養を行いストレスを与えた。培養細胞においても、塩だけでなく、マンニトールやショ糖などによるオスモティックストレスによってもクラス I キチナーゼの発現が誘導されることが分かった(Fig. 3-7B)。

シカクマメカルス細胞を0%、2%、4%、6%、8%または10%のショ糖を含む液体培地へ移し、振盪培養を行い、培養2日目および4日目のクラス I キチナーゼ mRNA の発現を解析した。6%、8%および10%の高ショ糖濃度でクラス I キチナーゼ mRNA の発現量は増加した。通常の液体培地に含まれているショ糖濃度(3%)に近い2%および4%ショ糖濃度ではクラス I キチナーゼ mRNA の発現は低かったが、まったくショ糖を含まない0%の条件では培養2日目においてクラス I キチナーゼ mRNA が強く誘導された(Fig. 3-8A)。

シカクマメ種子を吸水後、0%、1%または2%のマンニトール溶液下で7日間インキュベートしたところ、0%、1%マンニトール下ではほとんどクラス I キチナーゼ mRNA の発現が認められなかったが、2%マンニトール下では mRNA 量は顕著に増加したことから、種子の発芽時にもオスモティックストレスによりクラス I キチナーゼ mRNA の発現が誘導されることが示された(Fig. 3-8B)。

ABA は、一般に植物の乾燥や塩ストレス応答に関与するホルモンといわれている(Skriver and Mundy, 1990)。これまでの研究で、塩およびオスモティックストレスにより誘導される遺伝子の多くは ABA によっても誘導されることが知られている(Vasil *et al.*, 1995, Mundy and Chua, 1988)。そこで、シカクマメのクラス I キチナーゼも ABA によって発現が誘導されるかどうかを解析した(Fig. 3-7C)。シカクマメの葉を0.1 mM や1 mM のABAで処理してもクラス I キチナーゼ mRNA 量に変化は認められなかった。

#### (4)耐塩性シカクマメ培養細胞におけるクラス I キチナーゼの発現

0.5%または 1.0% NaCl 濃度下で維持し、耐塩性を獲得しているシカクマメのカルス培養細胞におけるクラス I キチナーゼの遺伝子発現について調べた。0%、0.5%または 1.0%の NaCl 濃度下のカルス培養細胞をそれぞれの濃度の液体培地に植え継ぎ、2、4、6 日目のクラス I キチナーゼの mRNA の発現量をノーザンブロット解析で、クラス I キチナーゼタンパク質量の変化を抗カボチヤクラス I キチナーゼ抗体(Arie *et al.*, 2000)を用いたウエスタブロット解析により調べた(Fig. 3-9)。0%より 0.5%および 1.0%NaCl 濃度下のカルス細胞の方が mRNA の発現量が高かった(Fig. 3-9A)。ウエスタブロット解析では2本のバンドが検出されたが、これは、今回クローニングしたキチナーゼに似たアイソザイムが存在するためと考えられ、分子量 34,000 に相当するバンドが本クラス I キチナーゼと思われる。クラス I キチナーゼタンパク質量の変化も mRNA の発現量の変化と相関していた(Fig. 3-9B)。

## 考察

シカクマメのクラス I キチナーゼは 315 アミノ酸残基をコードしており (Fig. 3-2)、他の植物のクラス I キチナーゼのアミノ酸配列と相同性が高かった (Fig. 3-4)。ほとんどのクラス I キチナーゼは液胞シグナルを持つクラス Ia であるが、シカクマメのクラス I キチナーゼが液胞シグナルを持つかどうかは不明であり、Ia であるか Ib であるかは分からなかった。インゲン豆のクラス I キチナーゼは N 末端領域に 10 アミノ酸の欠失があるが (Broglie *et al.*, 1986)、シカクマメのクラス I キチナーゼにも 9 アミノ酸の欠失が見られた (Fig. 3-4)。今回その cDNA がクローニングされたクラス I キチナーゼは SAP3 (Esaka *et al.*, 1994) とは N 末端アミノ酸配列が異なっていたので (Fig. 3-3)、SAP3 とは異なるクラス I キチナーゼであることが示唆された。

シカクマメのクラス I キチナーゼ mRNA は、種子の発芽後 10 日目に最も高くなり、その後、減少することから種子の発芽時に何らかの生理的機能を有する可能性があることが示された (Fig. 3-5B)。ノーザンブロット解析により、シカクマメの葉組織と培養細胞において添加した NaCl 濃度に比例してクラス I キチナーゼ mRNA の発現が誘導され、またシカクマメ耐塩性培養細胞においても同様に NaCl 濃度に比例してクラス I キチナーゼの mRNA とタンパク質が発現していたことから (Figs. 3-6、3-9)、クラス I キチナーゼの mRNA 発現は NaCl ストレスに応答すると考えられた。さらに、KCl や、CaCl<sub>2</sub>、マンニトール、ショ糖によってもクラス I キチナーゼ mRNA の発現が葉組織と培養細胞の両方において増加したことから (Fig. 3-7)、クラス I キチナーゼ遺伝子は塩ストレスに特有なだけでなく、オスモティックストレスにも応答することがノーザンブロット解析により示された。また、シカクマメ種子の発芽時にも、2% マンニトール下でクラス I キチナーゼ mRNA 量が顕著に増加することから (Fig. 3-8B)、クラス I キチナーゼは発芽の際のオスモティックストレスによっても誘導されることが示された。

ショ糖濃度 0%、2%、4%、6%、8% または 10% の液体培地におけるシカクマメ培養細胞のクラス I キチナーゼ mRNA の発現は、6% 以上の高ショ糖濃度下では強く誘導された (Fig. 3-8A)。しかし、2% や 4% 濃度では mRNA 発現量は低かった。一方、ショ糖を含まない場合では処理 2 日目にクラス I キチナーゼ mRNA の強い発現が認められた。これは、通常培養細胞を維持している培地には、3% のショ糖が含まれているため、2% や 4% ショ糖が含まれている培地では

培養細胞は大きなオスモティックストレスを受けずクラス I キチナーゼが誘導されなかったと考えられる。一方、0%では培地からショ糖を取り去ったため、オスモティックの低下によるストレスを受けクラス I キチナーゼの mRNA の発現が誘導されたものと考えられる。

乾燥、塩ストレスで誘導される遺伝子の多くは ABA で誘導されるが、一部の遺伝子は ABA による誘導を受けない。すなわち、ABA を介したシグナル伝達系路と、ABA を介さないシグナル伝達系路があると考えられている。ABA によって誘導される遺伝子には、小麦の *Em* (Vasil *et al.*, 1995) 遺伝子やイネの *rab* (Mundy and Chua, 1988) 遺伝子などがある。一方、ABA を介さないで誘導される遺伝子には、アラビドプシスの *DREB* 遺伝子 (Liu *et al.*, 1998) がある。本クラス I キチナーゼはシカクマメの葉を 0.1 mM、1 mM の ABA で処理してもその mRNA 量の変化が認められなかったことから (Fig. 3-7C)、少なくともこの条件下では、シカクマメのクラス I キチナーゼ遺伝子は ABA による誘導を受けないことが示された。

アラビドプシスの塩ストレス時に発現誘導される遺伝子がマイクロアレイにより解析されている (Seki *et al.*, 2002a)。また、大麦の塩ストレス時に誘導される遺伝子のマイクロアレイ解析も行われている (Oztur *et al.*, 2002)。これらのマイクロアレイ解析によって、塩ストレスによってキチナーゼや  $\beta$ -1,3-グルカナーゼなど生体防御に関わる遺伝子が塩ストレスにより多数誘導されることが示されている。一方、タバコの塩ストレスによって誘導される EREBP/AP2 ファミリーの転写因子 *Tsi1* 遺伝子はエチレンやサリチル酸によっても誘導される (Park *et al.*, 2001)。*Tsi1* 遺伝子を過剰発現させたタバコは、いくつかの病原性関連の遺伝子の発現を誘導し、その結果、塩ストレス耐性と病気抵抗性を獲得し、*Tsi1* 遺伝子が 2 つのシグナル伝達系路に関与することを示した。このように、塩ストレスや病原菌などに応答するための生体防御系路はクロストークしていると考えられる。

本研究で、シカクマメのクラス I キチナーゼ遺伝子は塩およびオスモティックストレスにより発現が誘導されることを示した。植物は塩ストレスやオスモティックストレスを受けると生体防御機能が弱まる。そこで、病気抵抗性を増大させるためにキチナーゼの誘導を引き起こすのではないかと推測される。一方、ストレス時のシグナル伝達にクラス I キチナーゼが関与し、耐性に関与する遺伝子の発現を制御する可能性も否定できない。シカクマメのクラス I キチ

ナーゼの塩およびオスモティックストレス時における生理的役割を解明するために、さらなる研究が必要であると考えられる。

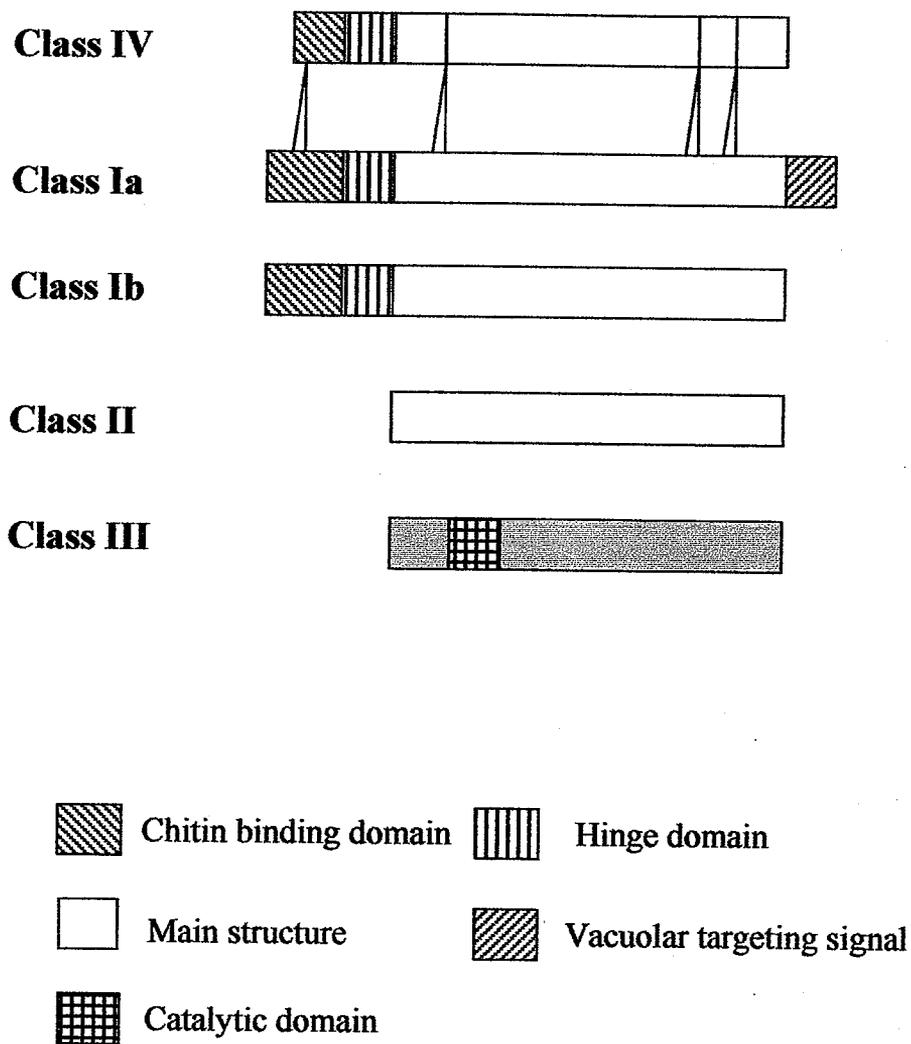


Fig. 3-1 Classification of plant chitinases based on their amino acid sequences.

```

1 TGT GGA AGA AAT GGA GAA GAG GAG AGT GTT ATG GCT ATG CGT GTT GAC GTT GTT GTT GTT 60
1 H G H R V D V V V V 10
61 GGT GGA AGG AAG GGA GAG CAA TGT GGA AGA CAG GCA GGG GGT GGA GTG TGC CCA GGG GGG 120
11 G G R K G E Q C G R Q A G G G V C P G G 30
121 CTG TGT TGC AGC AAG TTC GGG TGG TGC GGC TCA ACA GCT GAG TAC TGC GGG GAG GGA TGC 180
31 L C C S K P G W C G S T A E Y C G E G C 50
181 CAA AGT CAA TGC TGG GGG CCC AAA CCC ACA CCG AGG GGT GAT CTT AGC AGC ATC ATA AGC 240
51 Q S Q C W G P K P T P R G D L S S I I S 70
241 AGG AAC ACG TAC GAG GAG ATG CTG AAG CAT CGC AEC GAC GGA GCC TGC CCA GCA AGA GGC 300
71 R H T Y E E H L K H R H D G A C P A R G 90
301 TTT TCC ACG TAC GAT GCA TTC CTA GCA GCG GCA AGG GCA TTC CCC AGC TTT GGA AAC ACG 360
91 F S T Y D A F L A A A R A F P S F G N T 110
361 GGA GAC ACT GCC ACT CGC AAA AGG GAG GTT GCA GCA TTC TTG GGG CAA ACC TCT CAC GAA 420
111 G D T A T R K R E V A A F L G Q T S H E 130
421 ACA ACC GGT GGA TGG GGA ACC GCG CCG GAC GGA CCA TAC GCC TGG GGA TAC TGC TTT CTT 480
131 T T G G W G T A P D G P Y A W G Y C F L 150
481 AGG GAA CGA AAC CCA ACA AGT AAC TAC TGC TCA CCC AAC GCC CAA TTC CCA TGT GCT TCC 540
151 R E R H P T S H Y C S P N A Q F P C A S 170
541 GGC AGG CAA TAC TAC GGT CGG GGT CCC ATC CAA ATC TCA TGG AAC TAC AAC TAC GGA CAG 600
171 G R Q Y Y G R G P I Q I S W N Y H Y G Q 190
601 TGT GGA AGA GCA ATC AGC GTG GAC CTG CTC AAC AAC CCA GAC CTG GTT GCC ACA GAC GCT 660
191 C G R A I S V D L L N N P D L V A T D A 210
661 ATC ATC TCC TTC AAG TCC GCC TTA TGG TTC TGG ATG ACT CCA CAG TCT CCC AAG CCT TCC 720
211 I I S F R S A L W F W M T P Q S P K P S 230
721 TGC CAC GAC GTC ATC ACC GGA CGA TGG ACC CCC TCC TCT GCA GAT CAG GCC GCC GGC CGC 780
231 C H D V I T G R W T P S S A D Q A A G R 250
781 CTT CCC GGC TAC GGC ACA CTT ACC AAC ATC ATC AAC GGT GGC CTT GAA TGC GGC CGC GGT 840
251 L P G Y G T L T N I I N G G L E C G R G 270
841 CAG GAT TCC CGC GTC CAG GAC CGT ATC GGC TTC TAC AAG AGA TAC TGT GAC TTA CTC TCT 900
271 Q D S R V Q D R I G F Y K R Y C D L L S 290
901 GTT CCT TAT GGC AAC AAC CTC GAC TGT TTC TCT CAG AGG CCA TTT GGA AAT TCT CTT CTC 960
291 V P Y G N N L D C F S Q R P F G N S L L 310
961 CTA CAT CCC TTC ATC TAA CAT CTC TTC TTT GCT TCG CTC TTC GCT CTT CCC TCT TCC CTC 1020
311 L H P P I 315
1021 TTC CCA CTT CCA TCT TCC ATA TTA AAT AAA ATC TAA TCG TTA TCC TTC GTA AAA AAA AAA 1080

```

Fig. 3-2 Nucleotide sequence of the genomic DNA of class I chitinase from winged bean. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence of winged bean class I chitinase cDNA is shown under each codon. The arrowhead indicates the processing site for removal of putative signal peptide sequence.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Class I chitinase</b>	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	G	V	C	P	G	G	L
<b>SAP3</b>	E	Q	X	G	K	Q	G	G	G	A	V	V	P	N	G	L

Fig. 3-3 Comparison of the amino-terminal amino acid sequences of class I chitinase and SAP3 from winged bean. Identical amino acids were shown in gray boxes.

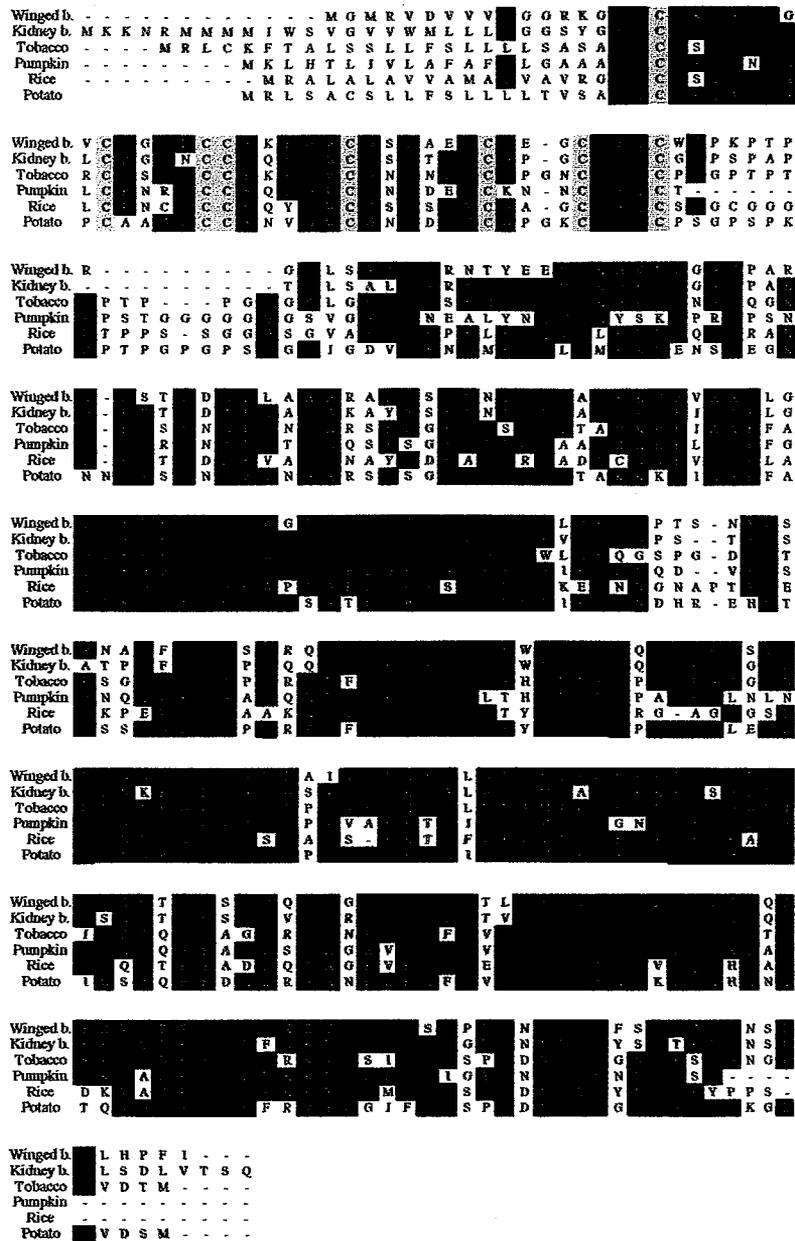


Fig. 3-4 Comparison of amino acid sequences of class I chitinases from winged bean, kidney bean (Broglie *et al.*, 1986), tobacco (Shinshi *et al.*, 1990), pumpkin (Arie *et al.*, 2000), rice (Huang *et al.*, 1991), and potato (Ancillo *et al.*, 1999). Amino acid sequences were aligned to give maximum homolog. Amino acid residues conserved in more than four sequences were shown in black boxes. The Cys residues that are characteristic of class I chitinases were shown in gray boxes.

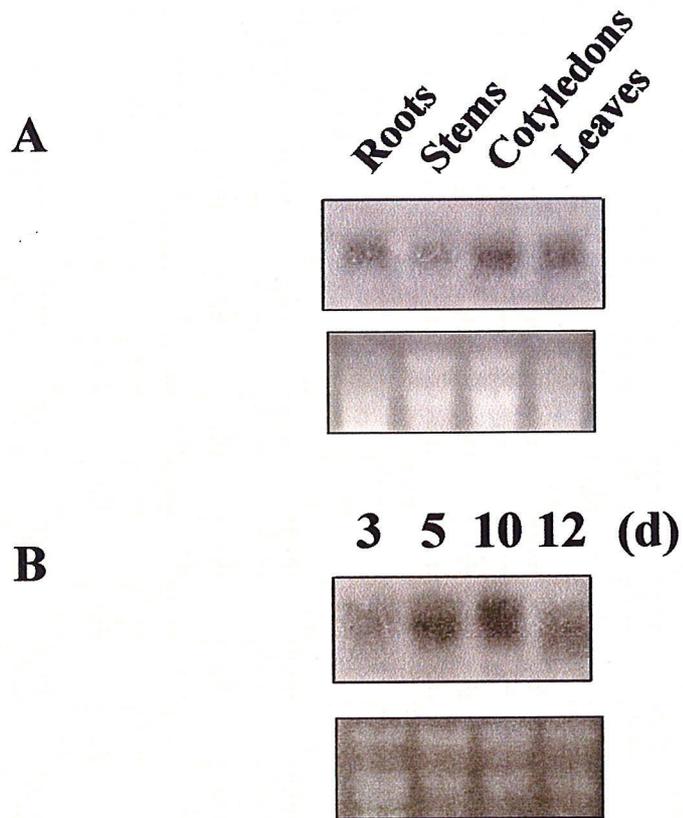


Fig. 3-5 Northern blot analysis of class I chitinase mRNA in various tissues of winged bean. (A) Northern blot analysis of class I chitinase mRNA in roots, stems, cotyledons and leaves of winged bean. (B) Northern blot analysis of class I chitinase mRNA in winged bean seedlings germinated for 3, 5, 10 or 12 d after water absorption.

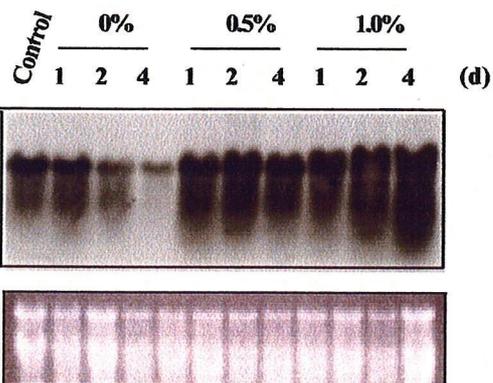
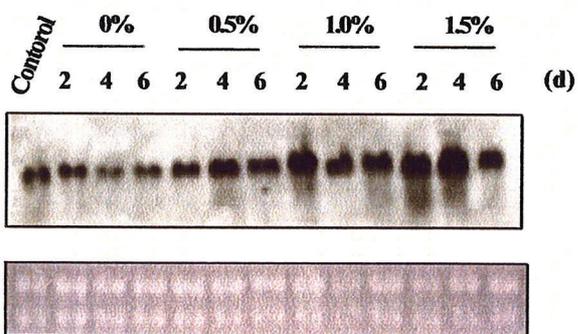
**A****B**

Fig. 3-6 Northern blot analysis of class I chitinase mRNA treated with NaCl in leaves or suspension-cultured cells of winged bean. (A) RNA was extracted from leaves treated with 0, 0.5 or 1.0% (w/v) NaCl for 0 (Control), 1, 2 or 4 d. (B) RNA was extracted from cells suspension-cultured in culture medium containing 0, 0.5, 1.0 or 1.5% (w/v) NaCl for 0 (Control), 2, 4 or 6 d.

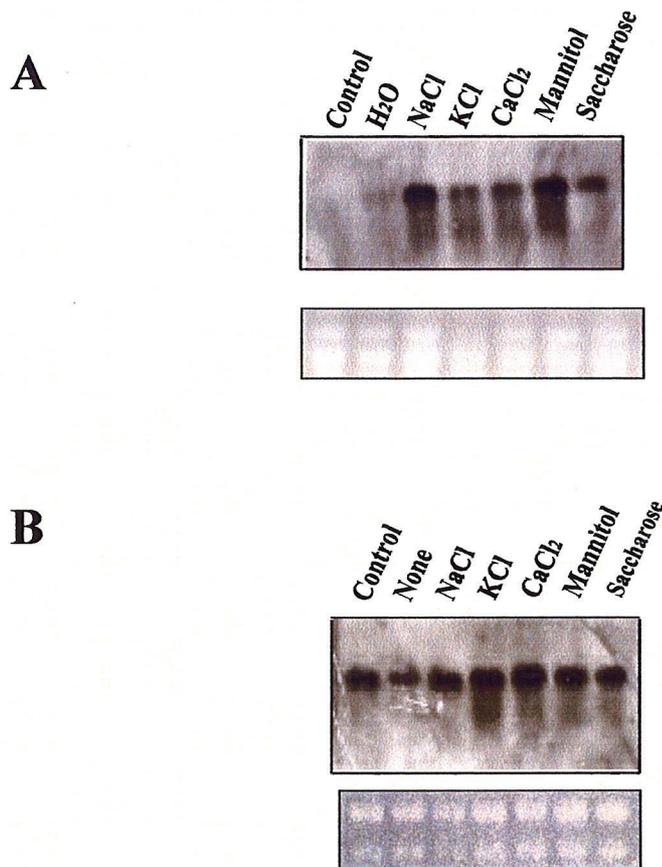


Fig. 3-7 Northern blot analysis of class I chitinase mRNA in leaves or suspension-cultured cells of winged bean during osmotic stress. (A) RNA was extracted from leaves treated with water ( $H_2O$ ), 250 mM NaCl, 250 mM KCl,  $CaCl_2$ , 250 mM mannitol or 250 mM saccharose for 0 (Control) or 4 d. (B) RNA was extracted from cells suspension-cultured in the culture medium without (None), or with 250 mM NaCl, 250 mM KCl,  $CaCl_2$ , 250 mM mannitol or 250 mM saccharose for 0 (Control) or 4 d.

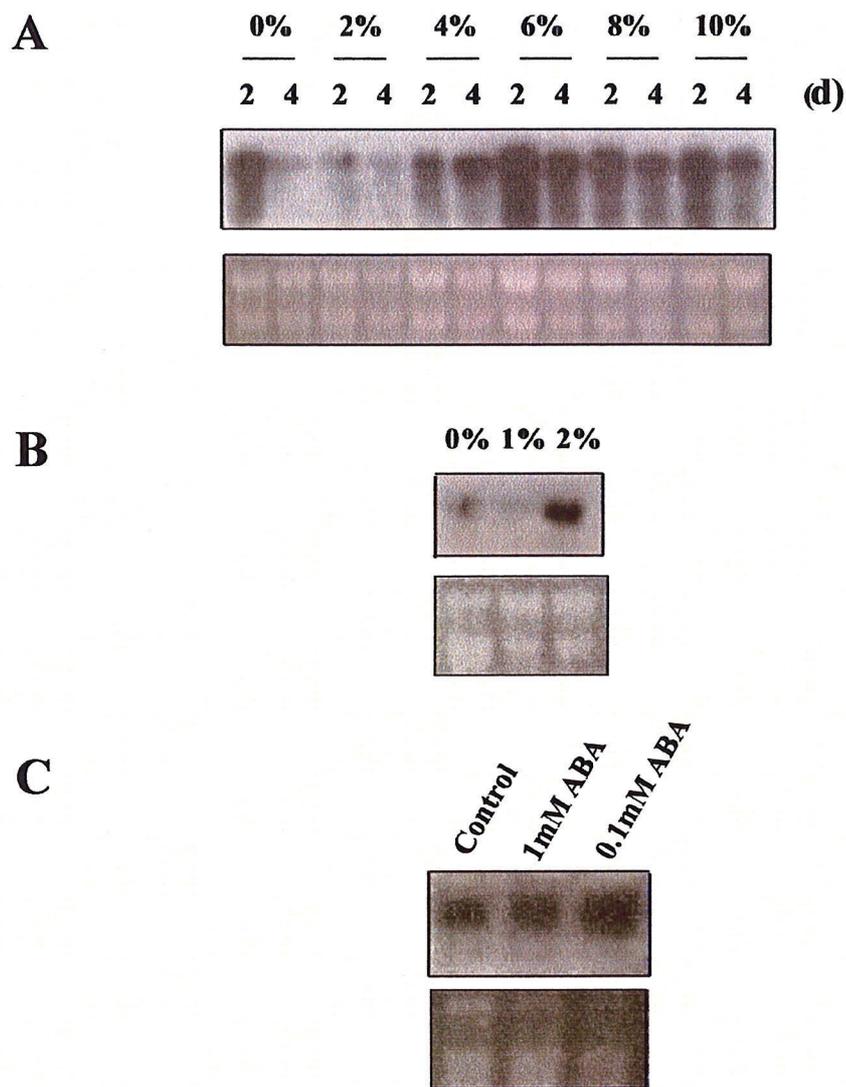


Fig. 3-8 Northern blot analysis of class I chitinase mRNA of winged bean. (A) RNA was extracted from cells suspension-cultured in the culture medium containing 0, 2, 4, 6, 8 or 10% (w/v) saccharose for 2 or 4 d. (B) RNA was extracted from the seedlings germinated in the presence of 0, 1 or 2% (w/v) mannitol for 7 d. (C) RNA was extracted from leaves treated with 0 (Control), 1 or 0.1 mM ABA for 1 d.

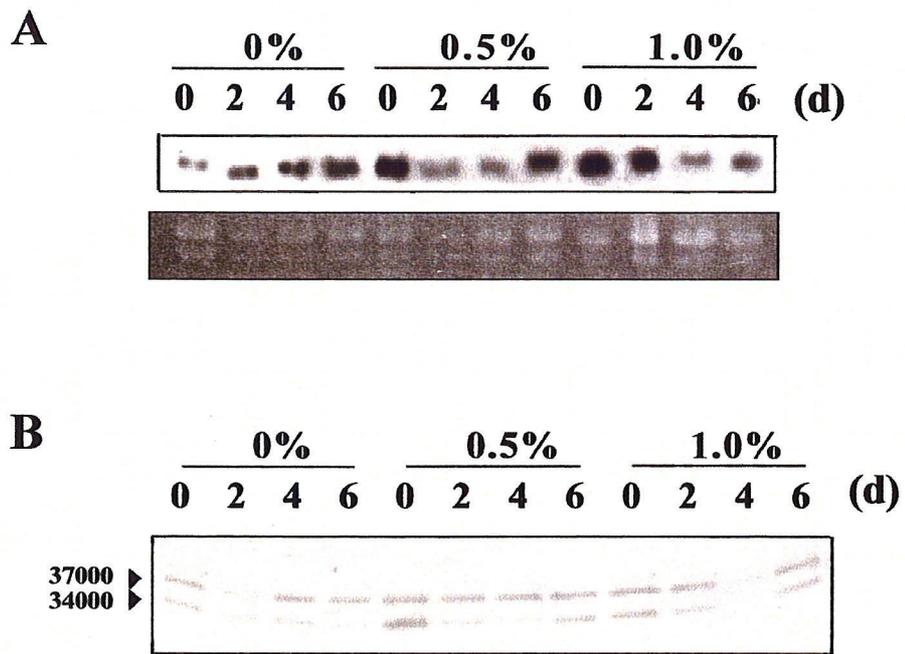


Fig. 3-9 Analysis of class I chitinase gene in salt-adapted suspension-cultured cells of winged bean. Northern blot analysis (A) and western blot analysis (B) of cell suspension-culture of winged bean callus adapted to 0, 0.5 or 1.0% (w/v) NaCl for 0, 2, 4 or 6 d.

## 第4章 タバコ植物体へのアスコルビン酸の添加と塩および酸化ストレス抵抗性

### 緒言

多くの植物は、数 mM から数十 mM 濃度の L-アスコルビン酸(AsA)を生合成している。AsA はサイトソルやミトコンドリアに局在する酵素により D-グルコースから合成されるが、アポプラストや液胞、ペルオキシソーム、葉緑体にも局在する(Smirnoff *et al.*, 2001)。自然の状態では、植物は様々なストレスにさらされている。AsA は様々な酸化ストレス耐性と関係していることが良く知られている。すなわち、AsA は抗酸化剤として働き、光合成や酸化的代謝、様々なストレスから生じるフリーラジカルや、活性酸素種を除去することにより、酸化的ダメージから植物を保護する(Foyer and Lelandais, 1993)。活性酸素種の一つである過酸化水素は急速に、water-water サイクルと呼ばれるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ経路により、水へと無毒化される(Asada, 1999)。アラビドプシスの突然変異体 *vtc1* は野生株の 30%しかアスコルビン酸量がなく、オゾンや UV-B、SO<sub>2</sub> に高感受性を示す(Conklin *et al.*, 1996, 1997)。しかし、このオゾン感受性は AsA の添加により回復する。

AsA やその酸化物デヒドロアスコルビン酸(DHA)の細胞内外への輸送は、プロトンシンポートや AsA-DHA アンチポートによって行われていると提唱されている(Horemans *et al.*, 2000)。Kollist ら(2001)は DHA と AsA が、アラビドプシスの葉組織でアポプラストからシンプラストへ輸送されることを報告した。また、アラビドプシスの葉に L-[<sup>14</sup>C] AsA を添加すると、篩部に AsA が蓄積した後、根端や花器官へ輸送されるが成熟葉には輸送されないことが明らかになっている(Franceschi and Tarlyn, 2002)。アスコルビン酸酸化酵素(AAO)は AsA をモノデヒドロアスコルビン酸へと触媒する酵素である。本研究室でこれまでにカボチャ AAO 遺伝子を高発現した形質転換タバコ培養細胞から調整したプロトプラストは野生株のものに比べ著しく膨張することが示され、AAO が植物の細胞膨張・伸長の制御に必須な酵素であることを提唱している(Kato and Esaka, 2000)。植物では AsA の合成系の最終酵素は L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH)である。本研究室で作製されたタバコ GalLDH 遺伝子をアンチセンス法により抑制した形質転換タバコ培養細胞は、アスコルビン酸量が野生株の 70%も減少し、細胞の形状も細長くなり、細胞の

分裂も遅くなることが示されている(Tabata *et al.*, 2001)。

外部からの AsA の添加により組織内の AsA 含量が増加することが、トマトの植物体を用いた研究で報告されている(Arrigoni *et al.*, 1997)。AsA を添加したトマトの植物体は、300 mM の NaCl で 6 時間処理した塩ストレスから驚異的な回復を示し、さらに、脂質の過酸化も抑制された(Shalata and Neumann, 2001)。また、種子の発芽の際に 2 mM の AsA を添加することにより、100 mM の NaCl 存在下でのアラビドプシスの種子の発芽と成長が、野生株に比べ改善されたという報告もある(Borsani *et al.*, 2001)。そこで、本研究では AsA の添加によりタバコが塩ストレス耐性を獲得することができるかを検討した。さらに、他の酸化ストレスとして UV ストレスに着目し、その抵抗性についても検討した。

## 結果

### (1) L-ガラクトノ-1,4-ラクトンおよびアスコルビン酸処理したタバコの植物体における AsA 含量の変化

AsA は、D-グルコースから GDP-D-マンノース、GDP-L-ガラクトース、L-ガラクトース、L-ガラクトノ-1,4-ラクトン(GalL)を経て AsA へと合成されると考えられている(Wheeler *et al.*, 1998)。4種類の AsA の前駆体、D-グルコース、D-マンノース、L-ガラクトース、GalL をタバコの植物体に添加し、AsA の前駆体の添加でシュートの AsA 含量が増加するかを検討した(Fig. 4-1)。10 mM の D-グルコースや D-マンノースの添加では、AsA 含量に顕著な変化は見られなかった。しかし、10 mM の L-ガラクトースや GalL の添加では、AsA 含量は約 2 倍に増大した。

Vincent and Nathan (Vincent and Nathan, 2002)は、アラビドプシスとアルファルファの葉を 10 mM または 20 mM の GalL で処理すると、7~8 倍 AsA 含量が増大したと報告している。そこで、発芽後 3~4 週間のタバコの植物体を 0 (コントロール)、1、10、50 mM の GalL 溶液または AsA 含溶液で処理して AsA 含量と成長を比較した。各溶液で 24 時間処理後、AsA 含量を測定したところ、コントロールに比べ GalL、AsA のいずれの処理でも AsA 含量は増加したが、特に GalL の方が効果が高かった(Fig. 4-2A)。50 mM の GalL の添加で AsA 含量は 18.7 倍、50 mM の AsA の添加で 14.2 倍増大した。3 日間の 10 mM の GalL や、AsA の添加では植物体に変化はないが、50 mM の濃度では両方とも植物に深刻なダメージを与え葉が萎れた(Fig. 4-2B)。特に GalL の添加によるダメージは大きく、全ての植物が萎れた。

### (2) L-ガラクトノ-1,4-ラクトンおよびアスコルビン酸処理したタバコの葉における塩および UV ストレス抵抗性

AsA 含量の増大と塩耐性の獲得の関係を解析するために、タバコの植物体を GalL 溶液または AsA 溶液で 24 時間処理し、葉を切り取った後、葉を 600 mM の NaCl を添加した GalL 溶液または AsA 溶液に浮かべて 25℃、常光下(6,000 lux)で 3 日間塩処理を行い、葉緑体に含まれる色素で、塩や UV などのストレスによって分解されやすいクロロフィル含量を指標として塩抵抗性を解析した(Fig. 4-3)。600 mM の NaCl で塩処理した AsA を添加していない葉では、無処理の葉と比較してクロロフィル含量が 61.8%減少した。AsA を添加した 600

mM NaCl 溶液で処理した葉では、AsA 濃度 0.8 mM で 37.1%、3 mM で 15.7%、10 mM で 5.4%とそれぞれ低下した。また、GalL を添加した葉では、0.8 mM では 25.6%、3 mM では 43.4%、10 mM では 19.1%減少した。AsA の添加により塩ストレスによるクロロフィル合成阻害が軽減されたことが示された。一方、GalL を添加して塩処理した葉のクロロフィル含量の減少も GalL を含まない NaCl 溶液で処理した葉に比べ低かった。しかし、塩処理をしていない 10 mM の GalL を添加した葉のクロロフィル含量は、水のみで処理した葉のクロロフィル含量の 34.3%も減少した。GalL の添加により、塩ストレスを与えない条件でもクロロフィル含量が減少することから、GalL は植物体にとって毒性を有することが示唆された。

次に、葉の酸化ストレスとして UV 抵抗性についても解析した(Fig. 4-4)。UV 照射は細胞に光酸化ストレスを与え、成長や光合成、開花、受粉、蒸散などに影響を与える(Rozema *et al.*, 1997, Jansen *et al.*, 1998)。タバコ個体を AsA 溶液で 24 時間処理し、切り取った葉を AsA 溶液に浮かべて 24 時間 UV 照射を行った。照射後、それぞれ新しい AsA 溶液に移し、24 時間 28℃常光下 (6,000 lux) でインキュベートした後、クロロフィル含量を測定した(Fig. 4-4)。コントロールの水に浮かべた葉では、クロロフィル含量が 66.4%減少した。AsA を添加した葉では、0.8 mM では 41.7%、3 mM では 43.0%、10 mM では 15.3%の減少を示したことから、AsA の添加は UV 照射による酸化ストレスの軽減にも有効であることが示された。

さらに詳細な解析を行うために、UV 照射後のタバコ個体の生存率を調べた。はじめに、UV 耐性を獲得と AsA 濃度の関係について検討した。0 mM、0.8 mM、3 mM および 10 mM の AsA で 24 時間処理後、120 分間 UV を照射し新鮮な AsA 溶液に移しかえた。24 時間 AsA 溶液でインキュベート後、植物体を土壌へ移植し、さらに 2 週間観察を行った。生存率は、2 週間で新しい葉が生芽し、生育するかどうかで判定した。UV による傷害の激しい個体は、2 週間後でも新しい葉が生じず、その後枯れてしまった。添加濃度がタバコ個体の UV 耐性に与える影響を検討した結果、AsA の至適濃度は 0.8 mM であったので、この濃度をその後の解析に用いた。AsA 0 mM (コントロール) または 0.8 mM 処理したタバコ植物を用い 0、75、90、105 または 120 分間の UV 処理を行った。コントロールでは生存率は UV 照射により低下し、120 分では 26%と最も低かった(Fig. 4-5B)。一方、0.8 mM AsA 処理下では、105 分、および 120 分の

照射後も 93%の生存率を示した。

0.8 mM AsA で処理したタバコ植物体の AsA 含量に、UV 照射が与える影響を測定した。UV 照射の開始後 75 分まで AsA 含量は急激に増加したが、その後、減少した(Fig. 4-6A)。コントロールに比べ AsA 処理によって AsA 含量は上昇したが、その差は UV 照射 120 分で AsA 含量がコントロールの 1.2 倍とあまり大きくはなかった。

酸化ストレスによるダメージは、脂質の過酸化の測定により評価できる(Rao *et al.*, 1997, Rao and Davis, 1999)。UV 照射後のチオバルピチュリック酸反応性物質(TBARS)を測定することにより脂質の過酸化量を調べた(Fig. 4-6B)。タバコ植物を 0.8 mM AsA で 24 時間処理を行い、105 分間 UV を照射した後、AsA 溶液を更新した。コントロールの TBARS 量は UV 照射後 1~3 日後で急激に上昇したが、AsA 処理下のそれは減少した。

### (3) L-ガラクトノ-1,4-ラクトンおよびアスコルビン酸処理したタバコ植物体における AsA の組織局在性

0 mM (コントロール)および、10 mM の GalL または AsA 溶液で処理したタバコの植物体における AsA の組織局在性を硝酸銀染色法(Chinoy, 1984)により調べた。発芽 5 日目のタバコの植物体を 24 時間、それぞれの溶液でインキュベートした後、シュートを切り取りスライド標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。10 mM の GalL で処理したものは、大きな AsA のドットがコントロールに比べより多く頂端分裂組織で観察された(Fig. 4-7A)。また、葉組織においても多量のドットがつながって列状に観察された(Fig. 4-7B)。10 mM の AsA で処理したものは、頂端分裂組織ではコントロールとほぼ同程度の AsA のドットが観察された(Fig. 4-7C)。しかし、葉組織においては 10 mM の AsA で処理したものは多量の列状につながったドットが観察された(Fig. 4-7D)。

## 考察

AsA はフリーラジカルや過酸化水素、酸化ストレスから植物を防御する主要なファクターである。AsA の添加は脂質の過酸化を抑制し、活性酸素種による膜やタンパク質へのダメージから生体を保護する(Shalata and Neumann, 2001)。本研究では、タバコの植物体への AsA の添加により、*in vitro* の条件下で葉において塩ストレスと UV ストレスに対する耐性を獲得することが明らかにされた(Figs. 4-3, 4-4)。さらに、*in vivo* 下でも 0.8 mM AsA の添加によりタバコの UV 耐性が向上することが示唆された(Fig. 4-5)。0.8 mM AsA の植物体では、120 分間 UV 照射した場合の 2 週間目の生存率は 93%であった。しかし、AsA 無添加のコントロールでは 26%と生存率は低かった。しかしながら、UV 照射時の AsA を添加したタバコの植物体とコントロールとの AsA 含量の差は小さかった(Fig. 4-6A)。105 分の UV 処理後の脂質過酸化の指標となる TBARS は 1 日目から 3 日目にかけ減少したのに対し、コントロールでは急激に増加した(Fig. 4-6B)。これらの結果により、タバコ植物体の AsA 含量が UV 耐性に影響を与えたと推測される。Shalata and Neumann (Shalata and Neumann, 2001)は 0.5 mM の AsA の添加によりトマトが塩耐性を獲得したと報告している。また、Borsani ら(2001)も 2 mM の AsA の培地への添加により、100 mM NaCl 存在下でのアラビドプシスの種子の発芽やその後の成長が改善されたと報告している。タバコで本研究では 0.8 mM の AsA 濃度で UV ストレス耐性が得られている。一方、GalL は AsA に比べ、タバコ植物体に添加したときの AsA 含量の増大が大きかったが(Fig. 4-2A)、添加により植物体が萎れて枯れることから植物体にとり有毒であることが示唆され、また塩ストレス抵抗性も AsA と比較して低かった(Figs. 4-2B, 4-3)。

タバコの植物体の AsA 含量は、AsA の前駆体である L-ガラクトースや GalL の添加で約 2 倍量増加した(Fig. 4-1)。しかし、D-グルコースや D-マンノースの添加では変化が見られなかった。D-グルコースと D-マンノースは AsA 生合成のための経路以外にも様々な経路で代謝されるので(Smirnoff, 2000)、AsA 含量に影響を与えなかったものと推測される。

タバコの植物体を 10 mM の GalL で 24 時間処理すると、3.1 倍、10 mM の AsA で 24 時間処理すると 2.7 倍 AsA 含量が増加した(Fig. 4-2A)。また、10 mM の GalL や AsA で処理したタバコの植物体において、多量の AsA が葉に局在することが硝酸銀染色法による結果から示された(Figs. 4-7B, 4-7D)。これら

の結果から、AsA を培地に添加するとタバコの根から AsA が吸収され葉へと輸送されることが明確になった。また、GalL も根から吸収された後 AsA に変換され、同様に葉へと輸送されたと考えられる。しかし、どの組織で GalL から AsA へ変換されたかは不明である。

Maddison ら(2001)は、オゾン感受性のラディッシュに 50 mM の GalL を添加すると AsA 含量が 2 倍に増大し、オゾン耐性が増大することを示した。本研究で、タバコに GalL を添加した結果、塩ストレス抵抗性は増大せず、逆に植物体に対して毒性を示した(Figs. 4-2B、4-3)。両者の結果が相違する理由については明確ではないが、Maddison らの実験は GalL 処理が 1 日だったのに対し、本研究では 3 日または 4 日間 GalL 処理を行っており、処理時間の違いから起因したものかもしれない。あるいは、塩ストレスにより細胞は酸化ストレスのほかイオンによるストレスやオスモティックストレスを受けるので、オゾンストレスと塩ストレスの両者のストレスが細胞に与えるダメージの違いによるものかもしれない。一方、ラディッシュは 50 mM の GalL の添加で AsA 含量が 2 倍増大するのに対し、タバコの植物体は 10 mM の GalL の添加で AsA 含量が約 3 倍増大する(Fig. 4-2A)ことから、増大した AsA 含量の違いから起因した可能性も否定できない。

Yabuta ら(2002)は、チラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコは野生株に比べて約 37 倍の酵素活性が増大し、結果的にスーパーオキシドを発生させるメチルバイオロゲンに対する抵抗性や、強光下での低温ストレスに対する耐性が増加したと報告している。キュウリのアスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコは野生株の 380 倍のアスコルビン酸オキシダーゼ活性を有した結果、全体の AsA 含量は変化しなかったが、アポプラストの AsA レドックス状態が変化してアポプラスト内の AsA 含量が減少し、酸化型の DHA 量が増加した(Sanmartin *et al.*, 2003)。この形質転換タバコは、オゾン感受性が野生株より高かったことから、アポプラストの AsA のレドックスがオゾン耐性に関与することが示唆された。最近では、アラビドプシスの低 AsA 含量ミュータント *vtc1* においてマイクロアレイ解析により種々の遺伝子の発現が調べられた(Pastori *et al.*, 2003)。*vtc1* では生体防御遺伝子、特に  $\beta$ -グルカナーゼやキチナーゼなどの病原菌に対する防御に関連する遺伝子が野生株に比べ高い発現を示した。*vtc1* では ABA 量が野生株より 60%高くなり、その結果、細胞伸長や分裂活性

が減少したことが示された。ABA は多くの生体防御に関連する遺伝子を誘導する。これらの結果から、AsA 含量が生体防御や成長に関与する遺伝子の発現を調節することが明確になった。

AsA の生合成経路については未だ明確になっておらず、AsA 含量を増加させるための様々な研究が行なわれている。D-ガラクトツロン酸から L-ガラクトン酸へ変換する酵素 D-ガラクトツロン酸レダクターゼ遺伝子を過剰発現させたアラビドプシスの形質転換体の AsA 含量は 2~3 倍に増加したという報告もある (Agius *et al.*, 2003)。また、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ遺伝子を過剰発現させたタバコとトウモロコシの形質転換体は、2~4 倍アスコルビン酸含量が増大し、AsA レドックスポテンシャルが顕著に増加した (Chen *et al.*, 2003)。しかし、アラビドプシスの L-ガラクトースを GalL へ酸化する L-ガラクトースデヒドロゲナーゼ遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは、L-ガラクトースデヒドロゲナーゼ活性は増加したものの AsA 含量は変化しなかった (Gatzek *et al.*, 2002)。本研究室で作製されたタバコの GalLDH を過剰発現させた形質転換タバコ培養細胞は AsA 含量が野生株の 1.5~2.0 倍高く、活性酸素の発生をひき起こすパラコートに耐性を示した。AsA の合成系路は複数存在している可能性が高く、AsA 含量を増加させるには 1 つの遺伝子だけでなく多数の遺伝子を制御する必要があると思われる。AsA 高含量植物の作製は、栄養価が高く、生育が早くて酸化的ストレス耐性のある植物の作出につながると考えられ、今後の研究の発展が望まれる。

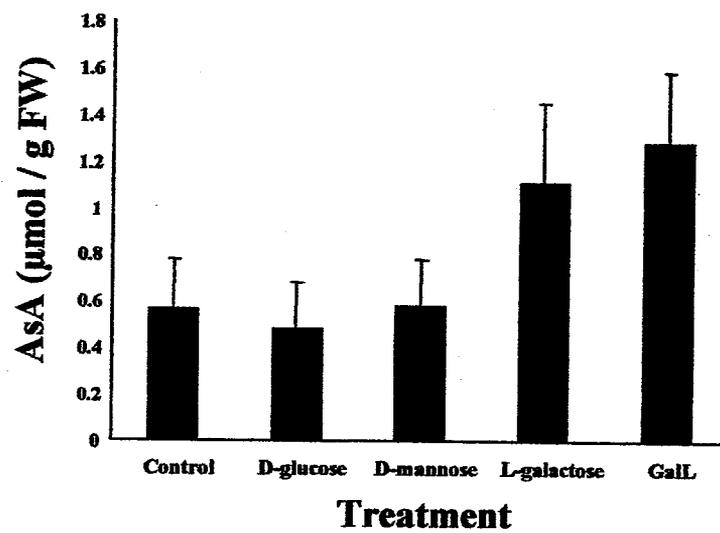
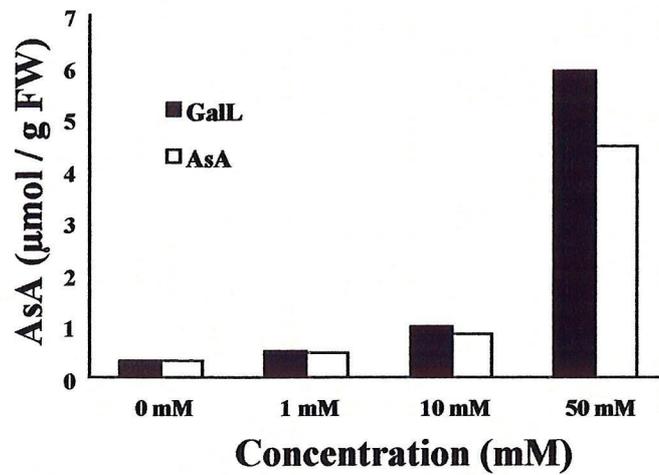


Fig. 4-1 Effect of applying AsA precursors on the AsA content of tobacco seedlings. Four-week-old tobacco seedlings were transferred to test tubes containing 10 mM D-glucose, D-mannose, L-galactose or Gall (AsA precursor) solution for 24 h, and the AsA content in the crude extract was measured. Mean value  $\pm$  SE (n=15) from three independent experiments.

**A****B**

Treatment	3 days	Wilting ratio
Control		0 / 5
1 mM AsA		0 / 5
10 mM AsA		0 / 5
50 mM AsA		2 / 5
1 mM Gall		0 / 5
10 mM Gall		0 / 5
50 mM Gall		5 / 5

Fig. 4-2 Effect of treatment with Gall or AsA on AsA content of tobacco seedlings. Four-week-old tobacco seedlings grown in agar medium were transferred to test tubes containing 1.5 ml of a 1, 10 or 50 mM Gall or AsA solution at 28°C under continuous illumination of 6,000 lux. (A) AsA content of the seedlings after a 24 h treatment. (B) Photographed at 3 d after the start of culture.

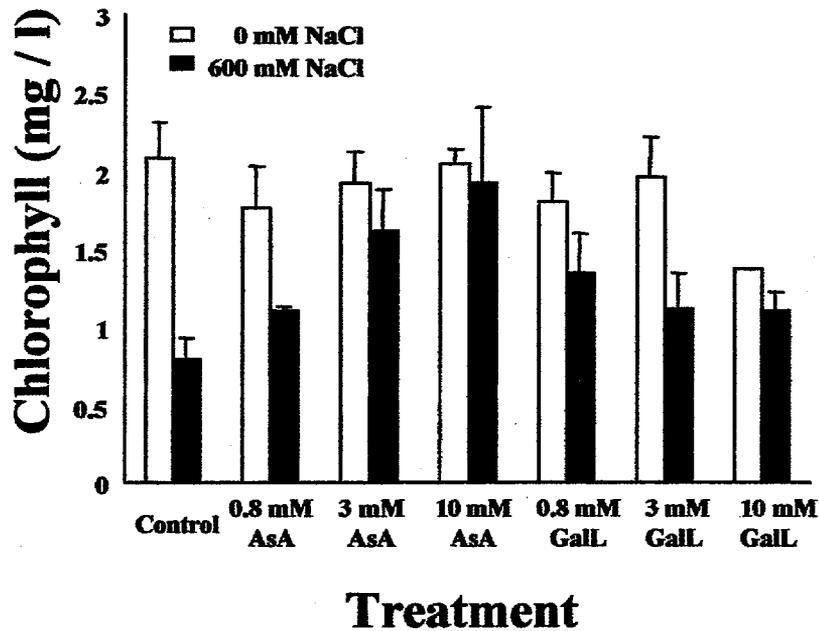


Fig. 4-3 Effect of Gall or AsA treatment on chlorophyll contents in tobacco leaves. The tobacco seedlings were transferred to test tubes containing 1.5 ml of a 0.8, 3 or 10 mM Gall or AsA solution for 24 h, and cut the leaves. The detached leaves were floated in the treatment solution with or without 600 mM NaCl for 72 h at 28°C under continuous illumination at 6,000 lux, and chlorophyll contents were measured. Mean value  $\pm$  SE (n=15) from three independent experiments.

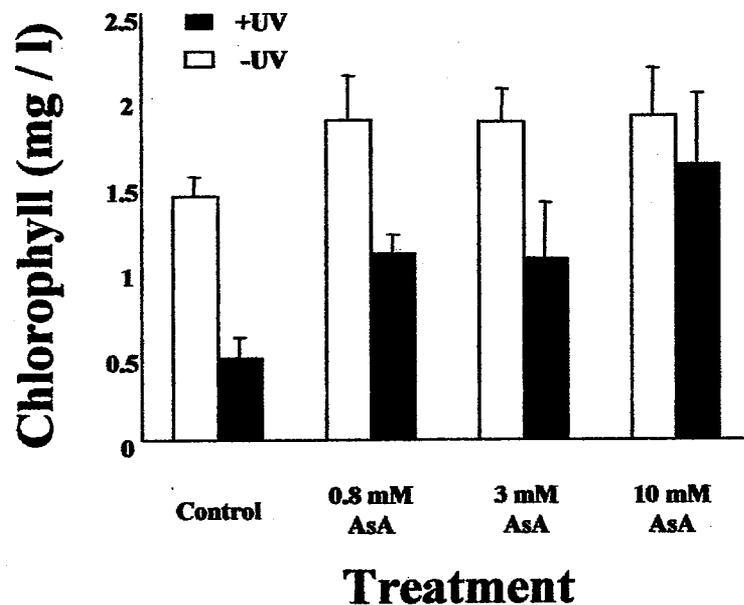


Fig. 4-4 Effect of AsA treatment on chlorophyll contents in tobacco leaves. The tobacco seedlings were transferred to test tubes containing 1.5 ml of a 0.8, 3 or 10 mM AsA solution for 24 h, and cut the leaves. The detached leaves were floated in the treatment solution, and exposed to UV light for 0 (-UV) or 24 h (+UV). The leaves were transferred to new solution for 24 h at 28 °C under continuous illumination at 6,000 lux, and chlorophyll contents were measured. Mean value  $\pm$  SE (n=15) from three independent experiments.

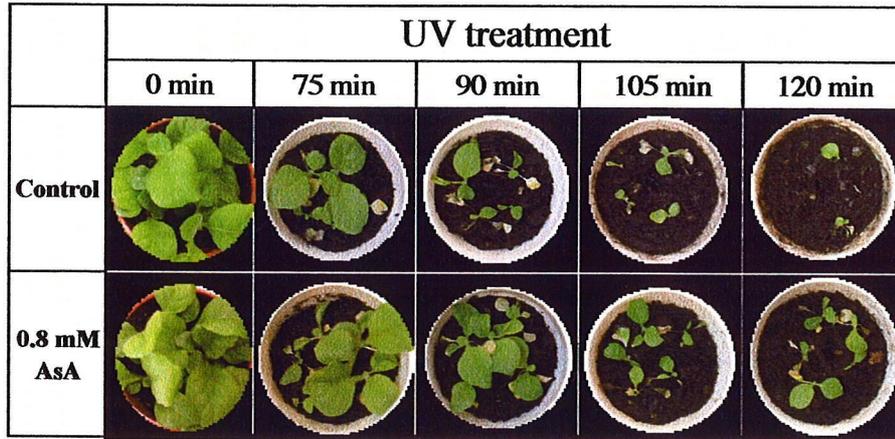
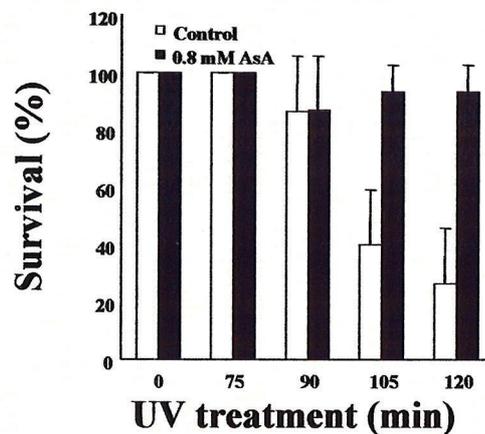
**A****B**

Fig. 4-5 Effect of AsA on the survival rate of tobacco seedlings exposed to UV light. Three- to 4-week-old seedlings were transferred to 0.8 mM AsA or water (control) for 24 h, and then were exposed to UV light for 0, 75, 90, 105 or 120 min. One day after, they were transplanted to soil, and grown at 28 °C under continuous illumination at 6,000 lux. (A) Photographed at 2 weeks after UV irradiation. The survival rate, which was defined as number of survival plants to total plants examined, was determined at 2 weeks after transplantation. Mean value  $\pm$  SE (n=15) from three independent experiments. (B) Survival rate at 2 weeks after exposure to UV light.

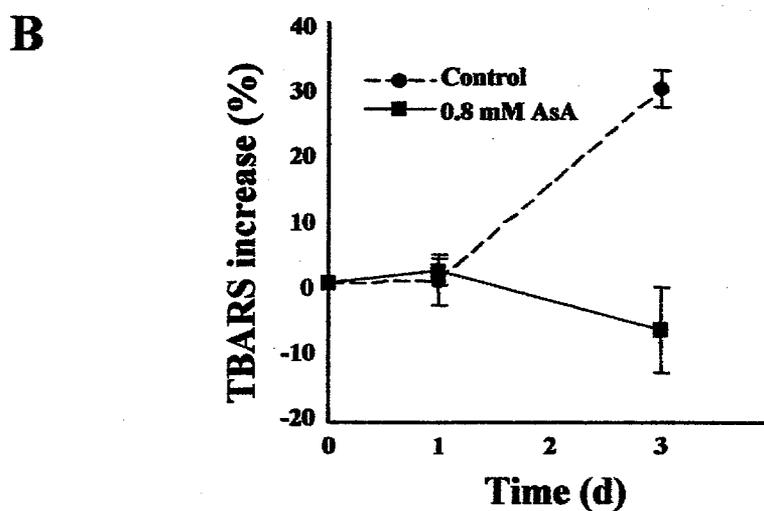
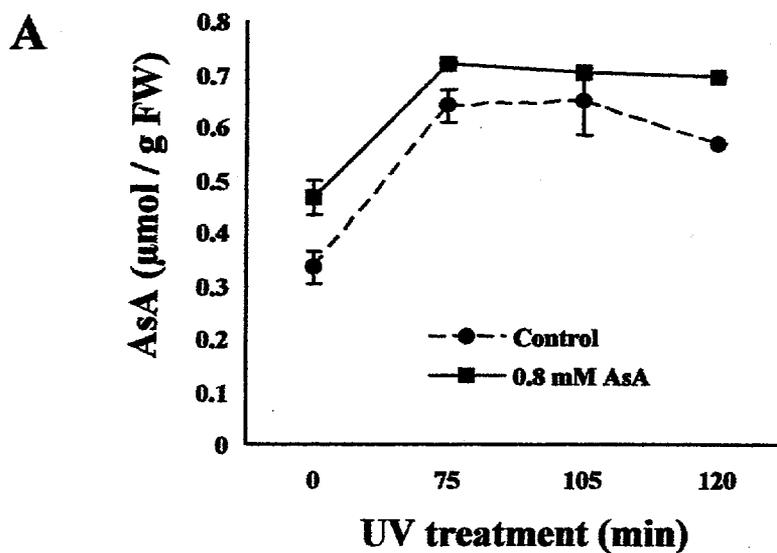
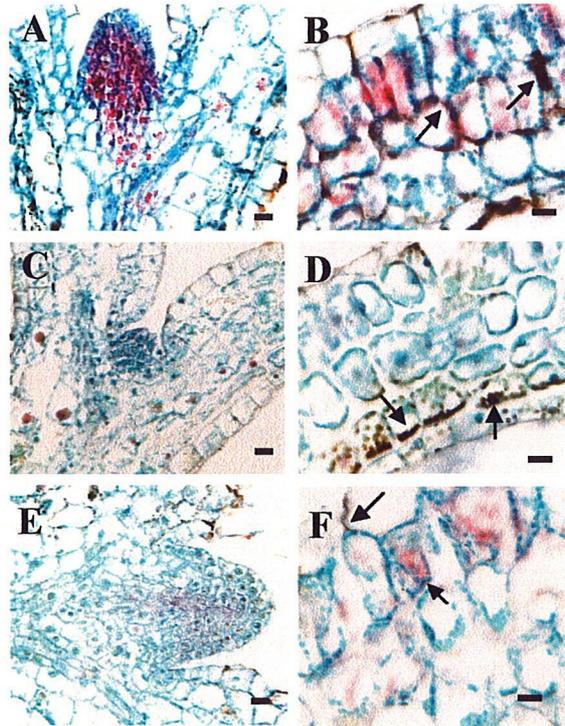


Fig. 4-6 Effect of UV irradiation on AsA content and time course changes in TBARS content after UV treatment in seedlings. The seedlings were cultured in 0.8 mM AsA solution or water (control) for 24 h before and after exposure to UV light. (A) AsA content of the seedlings after exposure to UV light for 0, 75, 105 or 120 min. Mean value  $\pm$  SE (n=15) from three independent experiments. (B) TBARS content was determined at 0, 1 or 3 d after exposure to UV light for 105 min. TBARS increase was defined as increase ratio (%) to TBARS without exposure to UV light. Mean value  $\pm$  SE (n=15) from three independent experiments.



**Fig. 4-7** Histochemical localization of AsA in 5-day-old seedlings cultured in 10 mM GalL or AsA solution for 24 h. Localization of AsA in apical meristem and in the leaf of the seedling cultured in GalL solution (A, B), AsA solution (C, D) and water (E, F). The arrows show the silver granules formed by AsA-dependent reduction of Ag ions. Scale bars, 10  $\mu$ m.

## 第 5 章 RNAi 法によりプロリンデヒドロゲナーゼ遺伝子を発現抑制した形質転換タバコの作製とその性質

### 緒言

多くの植物は、高塩や低温、乾燥ストレスなどの環境ストレスにさらされるとプロリン(Pro)やグリシンベタイン、マンニトールなどの適合溶質と呼ばれる物質を蓄積し、タンパク質や膜などの高分子を保護すると考えられている(Delauney and Verma, 1993)。Pro は細胞構造を安定化させ、フリーラジカルを除去することが知られている(Smirnoff and Cumbes, 1989)。

Pro は、グルタミン酸から $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸(P5C)を経て合成される(Fig. 5-1)。合成系では P5C 合成酵素(P5CS)が律速酵素であることが知られている(Kishor *et al.*, 1995)。Pro からグルタミン酸への代謝系はミトコンドリアで行われている(Bogges and Koeppe, 1978, Huang and Cavalieri, 1979, Elthon and Stewart, 1981)。この経路は 2 つの酵素によって触媒される。まず、Pro デヒドロゲナーゼ (ProDH)がはじめに触媒し、次に、P5C デヒドロゲナーゼによって触媒される。

*ProDH* cDNA はアラビドプシスからはじめて単離された(*AtProDH*; Kiyosue *et al.*, 1996, Peng *et al.*, 1996, Verbruggen *et al.*, 1996)。*AtProDH* 遺伝子の発現は乾燥ストレス時に抑制されるが Pro の添加や乾燥ストレスからの回復時に誘導される(Kiyosue *et al.*, 1996, Nakashima *et al.*, 1998)。Nanjo ら(1999a)は、*AtProDH* のアンチセンス遺伝子をアラビドプシスに導入し、その発現を抑えることにより乾燥ストレスからの回復時においても高 Pro 含量を維持することができる形質転換植物(*anti-ProDH*)を作製した。この *anti-ProDH* 植物は、600 mM の NaCl 下でも倒伏するまで時間が野生株より延長されることから、Pro の蓄積量の増加が塩耐性獲得に寄与していると考えられる。しかし、Mani ら(2002)も、*AtProDH* のアンチセンス遺伝子を導入したアラビドプシスの形質転換体を用いて同様の研究を行ったが、Nanjo ら(1999a)の結果とは異なり、塩耐性を示さなかったと報告している。

アラビドプシスの P5CS 遺伝子をアンチセンス法で抑制した形質転換体では、葉の形態に異常が見られ、花序も伸長せず、オスモティックストレスに高感受性を示した(Nanjo *et al.*, 1999b)。一方、トマトの P5CS 遺伝子を過剰発現させた酵母は、Pro を 100 倍量蓄積したにも関わらず顕著な塩ストレス耐性を示

さなかった(Maggio *et al.*, 2002)。アラビドプシスの耐塩性ミュータント *pst1* は、オスモティック耐性を示すが、塩ストレス下での Pro 含量は 50%も低下した(Tsugane *et al.*, 1999)。アラビドプシスの塩感受性ミュータント *sos1* は、野生株より 20 倍も NaCl 感受性が高いが、塩ストレス後には野生株の 2 倍の Pro 含量の増加を示した(Wu *et al.*, 1996)。また、トマトの塩感受性ミュータント *tos1* は、オスモティックストレス後の Pro 含量が野生株の約 3 倍であった(Borsani *et al.*, 2002)。

このように、Pro の蓄積により植物の耐塩性が増加するかどうかは未だに明確になっていない。そこで、タバコの *ProDH* 遺伝子(*NtProDH*)の発現を二本鎖 RNA interference (RNAi)法を用いて抑制し、Pro の蓄積により塩ストレス耐性を獲得するかどうかを検討した。

## 結果

### (1) タバコの植物体と培養細胞における *ProDH* 遺伝子の発現

タバコの *ProDH* 遺伝子は Kimura ら(2001)によってサイトカイニンによって誘導される遺伝子(*cig1*)として *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN(NI)より単離されている。タバコ BY-2 の *ProDH* (*NtProDH*) cDNA は、培養3日目の BY-2 カルス培養細胞から抽出した全 RNA を鋳型とし、*cig1* の配列をもとに設計したプライマーを用いた RT-PCR により増幅した。タバコ BY-2 の *NtProDH* cDNA の塩基配列から推定したアミノ酸配列にはその N 末端にミトコンドリアターゲティングシグナルと推定される配列が存在した(Fig. 5-2)。タバコ植物体と BY-2 培養細胞を寒天培地から Pro を添加した溶液や培地に移して処理し、*NtProDH* の mRNA 量をノーザンプロット解析により調べた(Fig. 5-3)。タバコの植物体では、50 mM の Pro により 24 時間後にわずかな発現が認められ、100 mM、150 mM の Pro 処理では 12 時間後に大量の mRNA の発現が認められた(Fig. 5-3A)。一方、BY-2 培養細胞においても、50 mM、100 mM の Pro 処理により 1 日後および 2 日後に大量の mRNA の発現が認められた(Fig. 5-3B)。タバコの *NtProDH* は、アラビドプシスの *AtProDH* 遺伝子(Nakashima *et al.*, 1998)と同様に通常の培養条件下ではほとんど発現していなかったが、Pro の添加によって著しく誘導された。

### (2) RNAi 法によるタバコ BY-2 *NtProDH* の発現抑制

タバコ BY-2 の *NtProDH* 遺伝子の発現を RNAi 法を用いて抑制するために、N 末端側 429 塩基(B1)と内部領域 376 塩基(B2)の cDNA 断片(Fig. 5-2)を RNAi 用ベクター pGWHPR へ GATEWAY クローニングテクノロジーを用いて挿入し、それぞれ pGWHPR-*NtProDH*-B1 および-B2 とした(Fig. 5-4)。アグロバクテリウム法により、pGWHPR-*NtProDH*-B1 および-B2 をタバコ BY-2 培養細胞に導入し、抗生物質(Km)により選抜を行った。得られた形質転換株から無作為に 70 株を選抜し、ノーザンプロット解析により *NtProDH* mRNA の発現を解析した。通常の培養条件では、*NtProDH* mRNA 量の発現は非常に低いので(Fig.5-3B)、50 mM Pro で 24 時間処理して *NtProDH* の発現を誘導してから RNA の抽出を行い、ノーザンプロット解析を行った。その結果、ほとんど全ての B2 系統の株において、*NtProDH* mRNA の発現が、野生株のものに比べ抑えられていた(Fig. 5-5A)。しかし、B1 系統の株では *NtProDH* mRNA

の発現が抑制されているものは少なかった。そこで、B2 系統の中で *NtProDH* mRNA の発現が顕著に抑えられている 11 個体の株についてより詳細な解析を行った。

これら 11 個体の形質転換株と野生株を 3 日間培養し ProDH の酵素活性を測定した結果、形質転換株の ProDH 活性は野生株の 4.9~32.2%となり非常に低い活性を示した(Fig. 5-5B)。さらに、遊離の Pro 量を測定したところ、形質転換株の Pro 含量は野生株のものより 1.2~3.0 倍高かった(Fig. 5-5C)。以上の解析結果をもとに、*NtProDH* mRNA の発現が低く、かつ、遊離の Pro 含量の高い B2 系統の 3 株 17、22 および 23 株についてさらに詳細な解析を行った。

### (3) Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞における細胞増殖の促進

野生株および形質転換株である 17、22、23 株の細胞を振盪培養し 7 日後に光学顕微鏡によって細胞を観察したところ、形質転換株の細胞は野生株のものより非常に小さなことが分かった。それぞれ、50 個の細胞の長さを測定し、比較したところ、野生株では  $79.2 \pm 17.9 \mu\text{m}$  であったのに対し、17、22 および 23 株の細胞の長さは、それぞれ  $33.4 \pm 8.3$ 、 $31.5 \pm 8.1$ 、 $36.9 \pm 9.9 \mu\text{m}$  となり、野生株のその 1/2 以下であった(Fig. 5-6A)。固形培地でのカルスの増殖を培養後、1 週間および 3 週間後に比較したところ、形質転換株の増殖が野生株の増殖よりも速いことが示された(Fig. 5-6B)。さらに、懸濁培養下における細胞増殖速度も調べた。培養後、1 日おきに細胞を回収してその新鮮重量を測定した結果、野生株よりも 17 および 23 株の方が増殖能が高いことが明らかになった(Fig. 5-6C)。また、タバコ同調培養系を用いて細胞分裂速度を比較した。DNA の合成阻害剤であるアフィディコリンを加え全ての細胞を S 期(DNA 合成期)の直前に停滞させ、その後、アフィディコリンを除去することにより細胞分裂を同調化させることができる。17、23 株および野生株について同調培養を行い、1 時間ごとに有糸分裂細胞の割合(有糸分裂指数)を比較したところ、野生株では 9 時間後に有糸分裂指数が最大となったが、17、23 株では 8 時間後に最大となり、細胞分裂速度が増加したことが分かった(Fig. 5-6D)。

以上の結果から、Pro 高含有形質転換タバコ培養細胞の細胞分裂活性が野生株より高くなり、結果的に増殖速度も高まったと考えられる。興味深いことに、高 Pro 含量形質転換株は細胞分裂速度が高いにも関わらず、細胞の老化によって引き起こされる褐変化が野生株に比べ抑えられていることが分かった(Fig.

5-7)。

#### (4) Pro 高含有タバコ培養細胞の Pro に対する感受性

Pro がストレスに対して膜やタンパク質などの高分子を保護するにも関わらず、植物に過剰の Pro を添加すると、植物の生育を阻害するなど植物にとって有毒であることが報告されている(Bonner *et al.*, 1996, Hellmann *et al.*, 2000, Deuschle *et al.*, 2001)。そこで、Pro 含量の高い形質転換株に Pro の添加が与える影響について解析を行った。Pro を添加した液体培地に、固形培地で増殖させたカルスを 0.5g ずつ移植して振盪培養を行い、24 時間後の細胞の生存率を調べた。生存はフルオロセインジアセテート(FDA)による染色によって評価した。約 1,000 個の細胞の FDA による染色率を蛍光顕微鏡により観察した(Fig. 5-8C)。FDA は生細胞内のエステラーゼ活性により分解されて蛍光物質となる。死細胞はエステラーゼ活性を有していないので、FDA により染色されない(Zhang *et al.*, 1998)。2 mM Pro の添加では、生存率は野生株の 21%~62%を示した(Fig.5-8A)。5 mM の Pro を添加した場合には形質転換株の生存率は野生株の 35%~54%となり、Pro 添加に対し高感受性を示した(Fig. 5-8B)。

#### (5) Pro 高含有タバコ培養細胞の塩およびオスモティックストレス感受性

形質転換株の塩ストレス抵抗性を解析するために、200 mM の NaCl を液体培地に添加し、形質転換株および野生株の 24 時間後の生存率を求めた。形質転換株では、野生株と比較して 2.5~2.9 倍高い生存率を示した(Fig. 5-9A)。また、250 mM NaCl 下でも形質転換株は野生株に比べ、3.5~3.9 倍高い生存率を示した(Fig. 5-9B)。

さらに、Pro 含量の増大が塩ストレス以外の水ストレスに対しても有効であるかどうかを検討した。液体培地に 0.5 M マンニトールを添加し、形質転換株および野生株の 24 時間後の生存率を求めた。その結果、形質転換株では野生株に比べ 2.5~2.7 倍の生存率を示した(Fig. 5-10)。

これらの解析により、Pro 高含有形質転換タバコ培養細胞では、塩ストレスおよびオスモティックストレスに対しての抵抗性が増大するものと考えられた。

## 考察

これまで、P5CS や P5CR、ProDH などの酵素遺伝子を過剰発現・抑制した形質転換体を用いた研究や、耐塩性あるいは塩感受性ミュータントを用いた研究があるにもかかわらず、Pro の蓄積とオスモティック耐性の関係は不明であった(Borsani *et al.*, 2002, Hong *et al.*, 2000, Nanjo *et al.*, 1999a, Nanjo *et al.*, 1999b, Mani *et al.*, 2002, Maggio *et al.*, 2002, Tsugane *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 1996)。本研究では、タバコ BY-2 培養細胞の *ProDH* 遺伝子の発現を RNAi 法により抑制することで Pro 含量を増大させた形質転換タバコ BY-2 培養細胞を作製した。

タバコの *NtProDH* mRNA の発現は、Pro を添加した誘導条件下でもほとんど認められず、ほとんどの B2 系統の株で RNAi 法により *NtProDH* の発現は抑制されていた。一方、B1 系統の株では RNAi 法による抑制効果はほとんど認められなかった(Fig. 5-5A)。この相違が、どのような理由からか不明であるが以下の可能性が考えられる。(i) RNAi 活性が RNA の構造によって異なるため B1 より B2 の方が mRNA の分解反応が高かった(Hohjoh, 2002)。(ii) アラビドプシスのゲノムには *AtProDH* と 84%の相同性のある遺伝子が存在するので、タバコの BY-2 にも、まだクローニングされていないが *NtProDH* に類似したアイソザイムが存在する可能性がある。その場合、導入した B1 の二本鎖 RNA のターゲットより B2 の二本鎖 RNA のターゲットの方が *NtProDH* に類似したアイソザイムと *NtProDH* の相同性の高い領域に存在するため、*NtProDH* とそのアイソザイムの両方の mRNA の分解反応が生じた。ともあれ RNAi 法により *NtProDH* mRNA の発現が抑制された結果、形質転換タバコ培養細胞の ProDH 活性が低下して野生株のもの 4.9~23.3%となり、結果的に、Pro 含量は野生株の 1.2~3.0 倍に増大した(Figs. 5-5B, 5C)。

アラビドプシスの *ProDH* 過剰発現株では、Pro 含量が約 50%低下し、*ProDH* のアンチセンス遺伝子を導入した抑制株では Pro 含量が約 60%増大した(Mani *et al.* 2002)。しかし、この Pro 含量の変化は、形質転換植物体の種子の発芽や成長に影響を及ぼさなかった。アラビドプシスの *ProDH* が欠失した突然変異体 *pdh* においても、十分な水条件下では生育に影響は見られなかった(Nanjo *et al.* 2003)。P5CS のアンチセンス遺伝子を導入した形質転換アラビドプシスでは、野生株よりも Pro 含量が低下し、葉の形態に異常が認められ、花序の伸長も阻害された(Nanjo *et al.* 1999b)。また、トマトの P5CS を過剰発現させた

酵母では Pro 含量が野生株より約 63 倍高くなり、生育の遅延が認められた (Maggio *et al.* 2002)。本研究によって得られた研究結果は、これまでの報告とは異なっていた。固形培地での Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞は野生株より速い増殖を示した (Fig. 5-6B)。また、液体懸濁培養においても、同様に Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞は野生株より速い増殖を示した (Fig. 5-6C)。同調培養による細胞分裂の解析結果から Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞の細胞分裂が野生株よりも活性化されていることが示された (Fig. 5-6D)。また、Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞のサイズは野生株の細胞のサイズの 40%~47%と小さく (Fig. 5-6A)、Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞が細胞分裂が活発であることと相関している。

多くの植物において、乾燥や、高塩、低温や高温、重金属などのストレスにより Pro は蓄積される。植物体に Pro が蓄積されることにより、膜やタンパク質へのダメージを軽減させることができる (Alia and Matysik 2001, Shah and Dubey, 1998, Verma, 1999)。Pro の生合成は、細胞質の  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  比を適正に維持する。ストレス時の回復による急速な Pro 代謝も、ミトコンドリアでの酸化リン酸化を軽減し、オスモティックストレスによるダメージから回復するための ATP の合成を誘起する (Hare and Cress, 1997)。Pro はオスモティック調節剤 (Paleg *et al.*, 1984, Delauney and Verma, 1993, Taylor, 1996) や、タンパク質安定剤 (Kuznetsov and Shevyakova, 1997, Shah and Dubey, 1998)、金属のキレーター (Farago and Mullen, 1979)、脂質の酸化防止 (Mehta and Gaur, 1999)、ヒドロキシラジカルのスカベンジャー (Smirnoff and Cumbes, 1989) として機能すると提唱されている。タバコ BY-2 懸濁培養細胞では 1 週間で細胞は飽和し、栄養分および増殖空間が不足し、生育を阻害する老廃物も蓄積するために増殖を行えず、やがて死に至る。Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞は高い増殖度を示すにも関わらず、細胞の酸化による褐変が野生株に比べ低下した (Fig. 5-7)。これらのことにより、Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞では Pro の蓄積により脂質の酸化が抑制され、膜やタンパク質に対する傷害が軽減されたと推察される。

アラビドプシスで Pro の添加が成長を阻害するという報告がいくつかある。Mani ら (2002) は、アラビドプシスの *ProDH* 遺伝子をアンチセンス法で抑制して得られた Pro 高含量形質転換アラビドプシスが Pro に高感受性であることを示した。Nanjo ら (2003) も、アラビドプシスの *ProDH* が欠失した突然変異体

*pdh* が Pro に高感受性であることを報告しており、これらの結果から過剰量の Pro 蓄積が植物体にとって有毒であることを示している。本研究においても、*ProDH* の発現を RNAi 法により抑制した Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞を 2 mM や 5 mM の Pro で処理すると野生株のものに比べ、それぞれ、21%~62%、35%~54%の生存率となった(Fig. 5-8)。グリシンを除くアミノ酸は高濃度の存在で他のアミノ酸の合成や代謝を阻害する(Bonner *et al.*, 1996)。Pro 処理した *pdh* のマイクロアレイ解析の結果、過剰の Pro によりアスパラギンの合成が阻害されていることが明らかとなった(Nanjo *et al.*, 2003)。従って、Pro 代謝が抑制された Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞も、Pro の添加により、他のアミノ酸の合成や代謝を阻害し、Pro に対する感受性が高まったものと考えられる。

Nanjo ら(1999a)は、アラビドプシスの *AtProDH* の発現をアンチセンス法で抑制した形質転換アラビドプシスが、塩ストレス耐性を獲得したと報告している。一方、Mani ら(2002)は、*AtProDH* の発現を同様にアンチセンス法で抑制した形質転換アラビドプシスは、耐塩性を獲得しなかったと報告している。本研究では、タバコの *NtProDH* の発現を RNAi 法により抑制することにより Pro 含量を増加させることができ、その結果、塩耐性を獲得することができた(Figs. 5-5、5-9)。Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞は、200 mM の NaCl 処理条件下で野生株の 2.5~2.9 倍、250 mM の NaCl 条件下で 3.5~4.9 倍の生存率を示した(Fig. 5-9)。さらに、500 mM マンニトール処理の条件下でも野生株のものに比べ 2.5~2.7 倍の生存率を示した(Fig. 5-10)。これらの結果から、Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞は塩およびオスモティック耐性を獲得したことが示された。しかし、本研究の結果は細胞レベルでの解析にとどまっているため、植物体における組織レベルでの解析がさらに必要であると思われる。

Pro と、その水酸化物のヒドロキシプロリンは、細胞壁の主要構成成分である。Cooper ら(1994)は、Pro を水酸化する酵素プロリルヒドロキシラーゼを 3,4 デヒドロ-L-プロリンにより阻害した細胞壁の再生を阻害したタバコの葉肉細胞のプロトプラストを用いて、細胞壁のヒドロキシプロリンリッチな糖蛋白質の機能を調べた。3,4 デヒドロ-L-プロリンで 6 日間処理したプロトプラストは膨張するものの、細胞分裂も観察されなかった。この結果は、Pro が細胞分裂に重要な役割を果たしていることを示している。本研究で、Pro 高含量形質転換タバコ培養細胞の細胞分裂が活性化された理由については以下の

ように考えた(Fig. 5-11)。 (i) Pro の蓄積が細胞壁の合成を活性化し、その結果、細胞分裂が促進された。 (ii) 培養細胞条件下で、常にオスモティックストレスにさらされているが Pro が高含量になったことによってオスモティックストレスに耐性を獲得し、もともと抑制されていた細胞分裂が解除され、見かけ上細胞分裂が活性化された(Figs. 5-9、5-10)。

本研究において、Pro の代謝を抑制することにより Pro 含量を高めた形質転換タバコ BY-2 培養細胞は、その細胞分裂・増殖が活性化されることが明らかになった。Pro はストレスを受けている植物にとってオスモティック調節や活性酸素のスキャベンジャーとして機能するだけでなく、細胞の分裂を刺激する可能性も示した。他の適合溶質を増加させた形質転換体の解析では生育阻害が認められたという報告もあるので(Romero *et al.*, 1997, Karakas *et al.*, 1997)、本研究の成果は、植物にオスモティック耐性を獲得させるとともに成長速度の高い作物を作出できる可能性を示したもので、非常に興味深い。

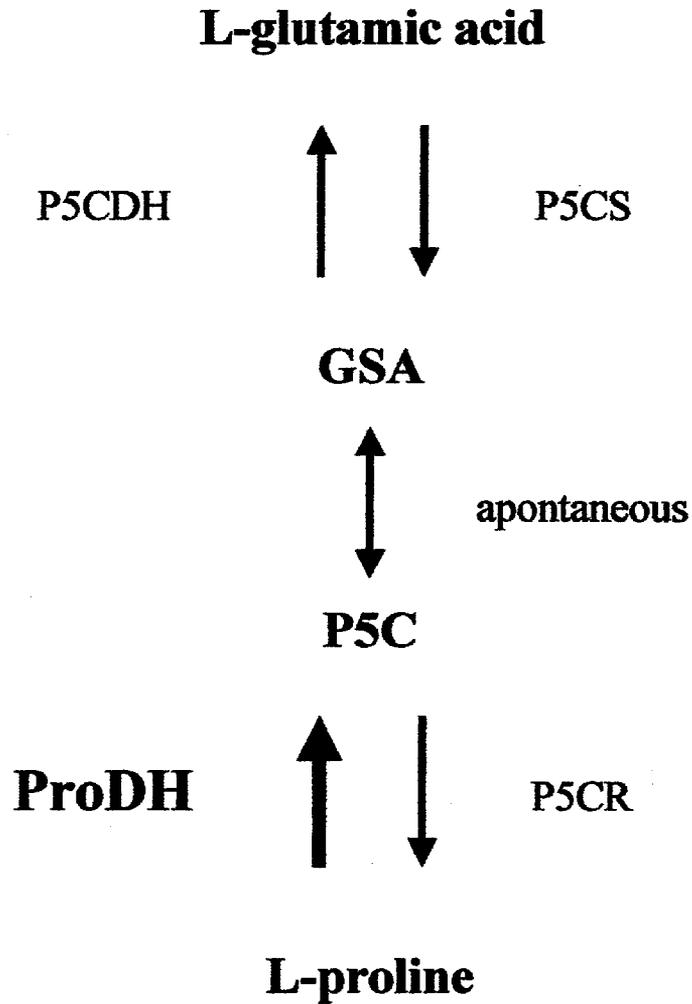


Fig. 5-1 Metabolic pathway of Pro in plants. GSA, glutamic- $\gamma$ -semialdehyde; P5C,  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate; P5CS, P5C synthetase; P5CR, P5C reductase; ProDH, proline dehydrogenase; P5CDH, P5C dehydrogenase.

MANKVVCPKAFRDLSFVRCLENTAPTVPFMNFTGAYDATTVTTPALIPTD  
QVITADKKVINFEDEVKELFTGVSTLKLIRSTLTLQMAATEPMVDVGIWVM  
NSKLMHMPIVKEVILGFVKQTFYEHFCAGKDLIEVRRRTVTKLSDVGLKGM  
LDYGVEHATENESCDQSMKVFLQTAESTKSLPSSSVSFVVVKITAICTPK  
LLKRMSDLLRWEHKNPSENLFPWKOKSLPLESDSSPFYHTPOKPEPLTVEE  
EHDLOLAHERLMTICKKCLELDVDLLIDAEDTAIQPAIDYFAYSAAIKYH  
KDDDFMIFGTIQAYLKDSKERMVIAKKAEEKMGVPMGFKLVRGAYMSSER  
ELASRLGVQSPIHDSIEQTHDCFNSCAEFMLDEISNGSGAVVLATHNIDS  
GKLAASKAIDLGIRKDSQKLQFAQLYGMAEGLSFGLRNAGFQVSKYLPFG  
PVEQVMPYLI RRAEENRGLLSTSAFDRQLMRKELTRRFKVATS

Fig. 5-2 Amino acid sequence and the region used for RNAi construction of *NtProDH*. Putative mitochondrial signal is indicated by gray box. The region used for constructing pGWHPR-NtProDH-B1 is indicated by double underline, and -B2 is indicated by bold line. The accession number is AB046419.

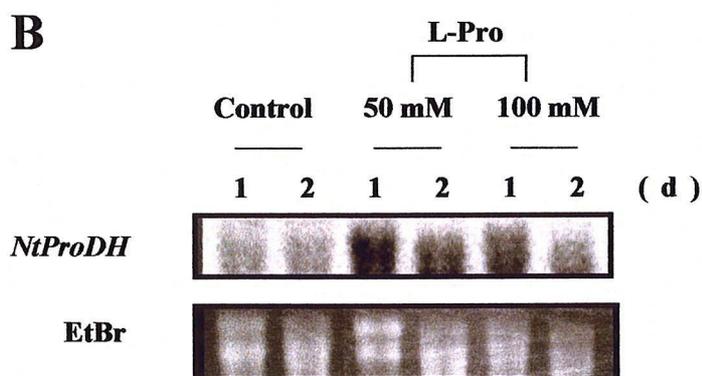
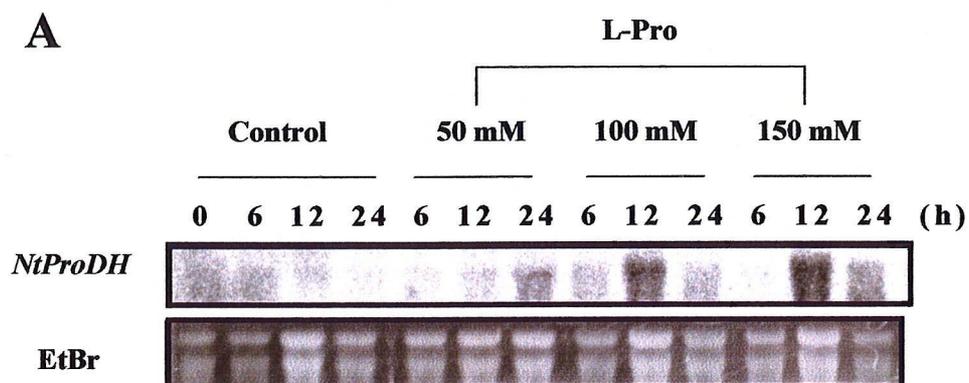
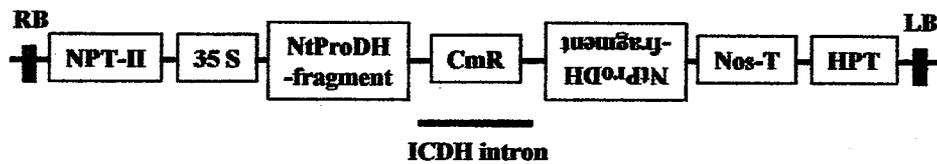


Fig. 5-3 Northern blot analysis for the *ProDH* mRNA in tobacco plants and BY-2 cells. (A) Three- to 4-week-old tobacco plants were transferred to MS medium with 50 mM, 100 mM or 150 mM L-Pro or without Pro (Control). Numbers above each lane indicate the number of hours after the treatment. A total of 10  $\mu$ g RNA was loaded onto each lane and stained with ethidium bromide (EtBr). (B) Tobacco BY-2 cells were transferred to MS agar with 50 mM or 100 mM L-Pro or without Pro (Control). Numbers above each lane indicate the number of days after the treatment. A total of 10  $\mu$ g RNA was loaded onto each lane and stained with ethidium bromide (EtBr).

**pGWHPR-NtProDH**



**Fig. 5-4 Construction of pGWHPR-NtProDH using GATEWAY cloning technology. PCR products B1 and B2 were amplified from the target gene with attB1 and attB2 sites incorporated into the PCR primers. This product is then inserted into the pGWHPR vector by recombination between attB1/attB2 and attP1/attP2 mediated by BP clonase. When the construct is expressed in plants a hairpin RNA (hpRNA) with the intron spliced out is produced. NPT-II; neomycin phosphotransferase II, 35S; CaMV 35S promoter, ICDH; NADP isocitrate dehydrogenase, CmR; chloramphenicol resistance marker, Nos-T; nopaline synthase terminator, HPT; hygromycin phosphotransferase, RB and LB; right border and left border, respectively.**

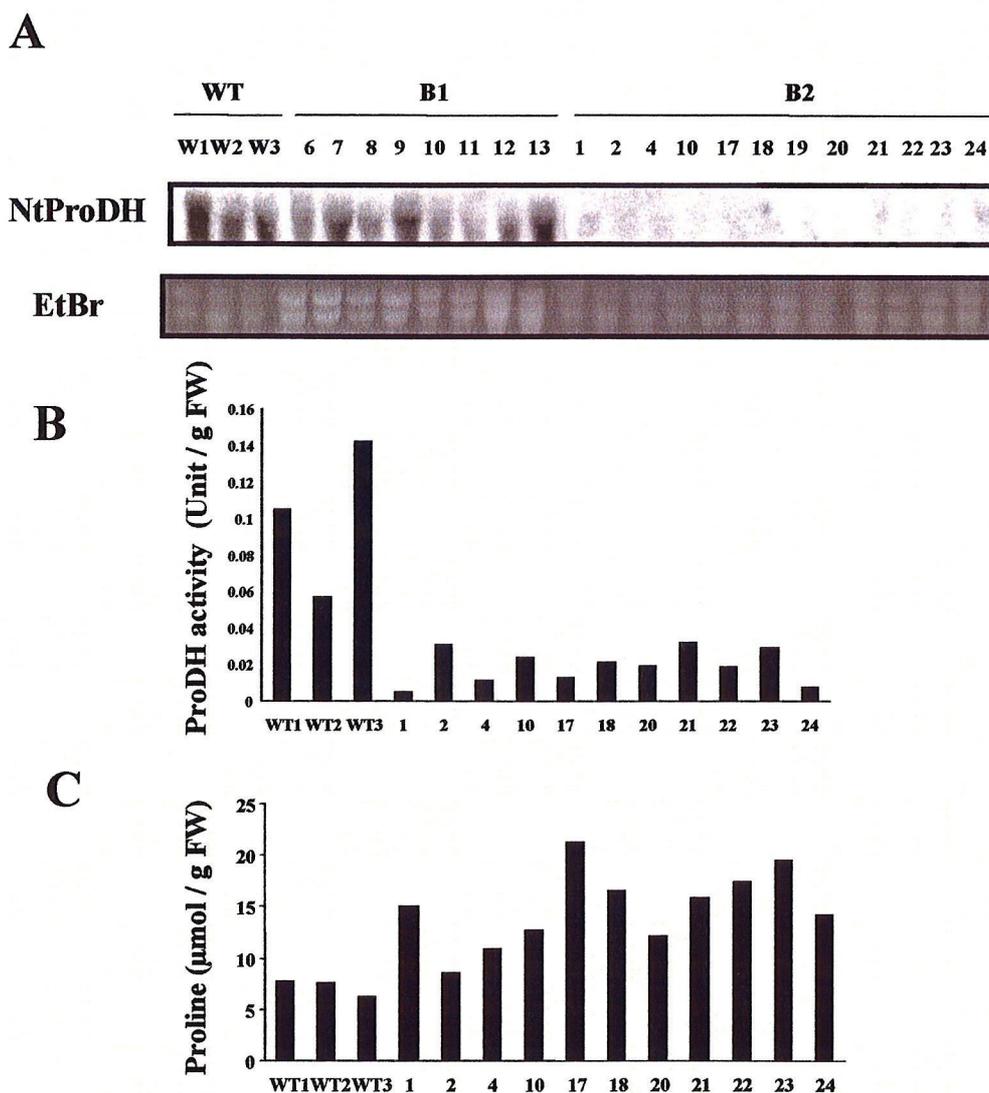


Fig. 5-5 Selection of transgenic cell lines with suppression of *NtProDH* by RNAi. (A) Northern blot analysis for the *NtProDH* mRNA. Transgenic B1 and B2 cell lines and wild-type cells (WT) were treated with 50 mM Pro for 1 d. A total of 10 µg RNA was loaded onto each lane and stained with ethidium bromide (EtBr). (B) ProDH activity of transgenic B2 cell lines. The transgenic cell lines and wild-type cells (WT) were cultured for 3 d on an MS agar plate. Crude mitochondrial fractions prepared from transgenic cell lines and wild-type cells (WT) were used for determination of ProDH activity. (C) Free Pro contents in transgenic B2 cell lines. The transgenic cell lines and wild-type cells (WT) were cultured for 3 d on an MS agar plate. The crude extract from each cell line was used for determination of free Pro.

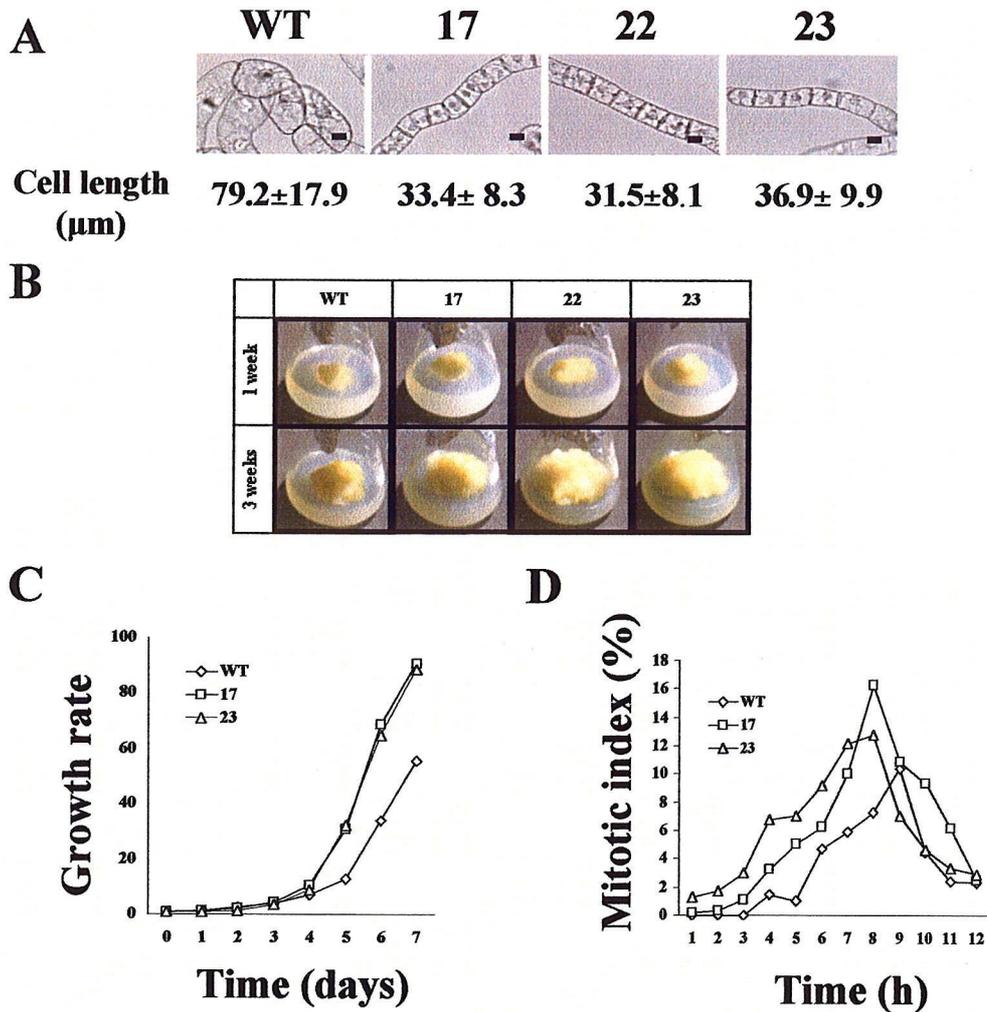
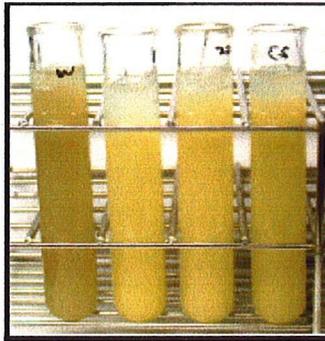


Fig. 5-6 Appearance and growth of *NiProDH*-silencing transgenic cell lines. (A) Microscopic photographs of wild-type cells and transgenic cell lines cultured for 7 d (bars = 20 μm). (B) Appearance of wild-type calli and transgenic calli. Photographs of wild-type calli and transgenic calli cultured for 1 or 3 weeks at 28°C in darkness. (C) 2 ml of line 17 (open square), line 23 (open triangle) and wild-type cells (open diamond) were transferred to 100 ml of fresh medium and maintained on rotary shaker at 130 r.p.m. at 28°C for 1 week. Following this, the cells were collected from each flask every day and the fresh weight of cells was measured. The ratio of fresh weight on 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7 d to fresh weight on 0 d was defined as growth rate. (D) Mitotic division of transgenic cell lines 17 and 23, and wild-type cells in synchronous division culture. The synchronous division cultures of line 17 (open square), line 23 (open triangle) and wild-type cells (open diamond) were carried out using aphidicolin. Mitotic index, which is defined as the ratio of mitotic cells to total cells, was determined every hour.

**WT 17 22 23**



**Fig. 5-7 Senescence of wild-type cells and transgenic cell lines in suspension culture. Photographs of wild-type and transgenic cell lines suspension-cultured for 2 weeks on rotary shaker at 130 rpm.**

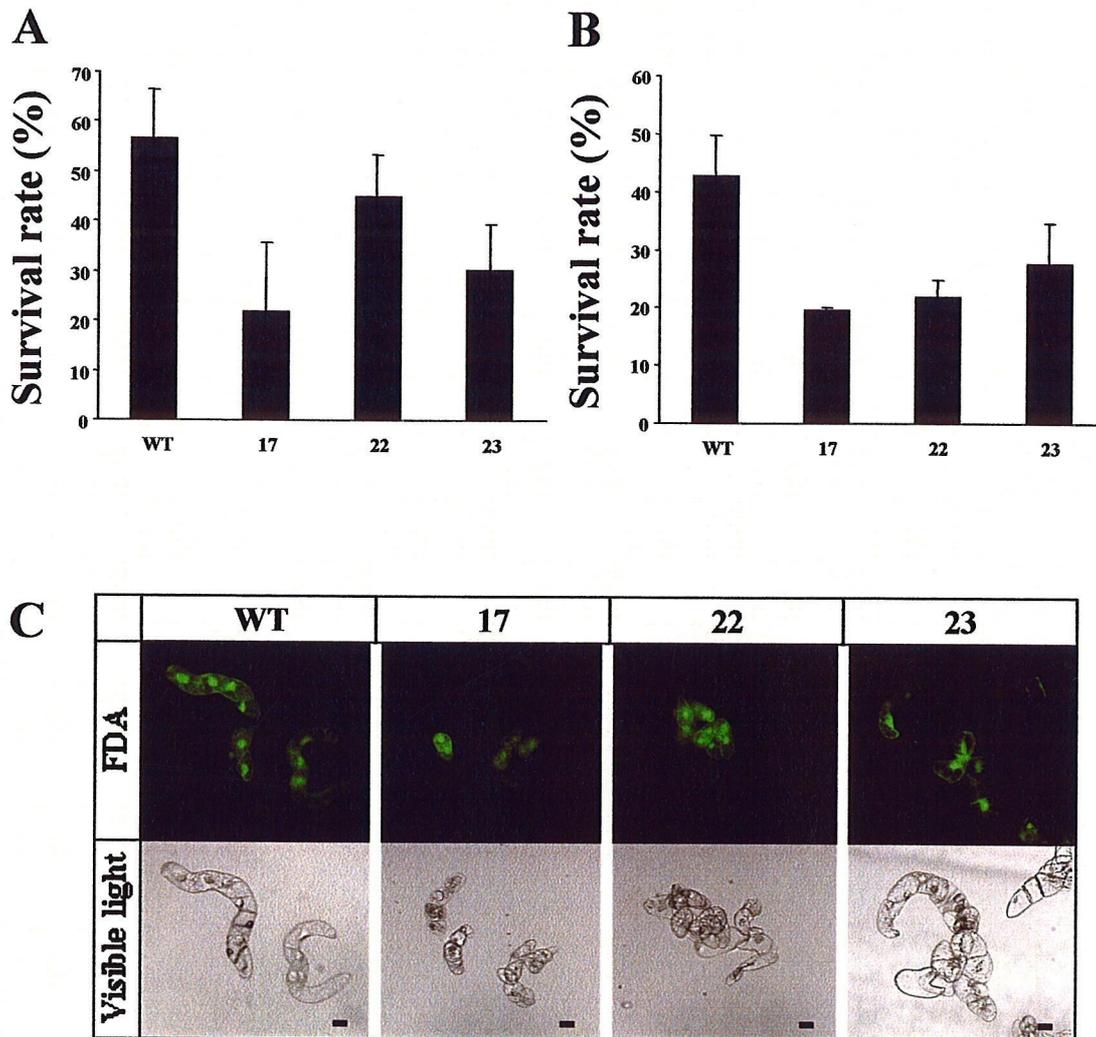


Fig. 5-8 Hypersensitivity of transgenic cell lines in the presence of exogenous Pro. (A) and (B) Percentage mean value  $\pm$  SE (n=3) of survivors of transgenic cell lines treated with 2 mM (A) or 5 mM (B) Pro for 1 d. The wild-type and transgenic calli were transferred to liquid medium with Pro. Survival rate was determined by examining about 1,000 cells stained with fluorescein diacetate (FDA). (C) Microscopic photographs of wild-type cells and transgenic cell lines treated with 2 mM Pro for 1 d and stained with FDA. They were observed under visible light (lower) or an epifluorescence microscope (upper). The viable cells became bright green (bars = 20  $\mu$ m).

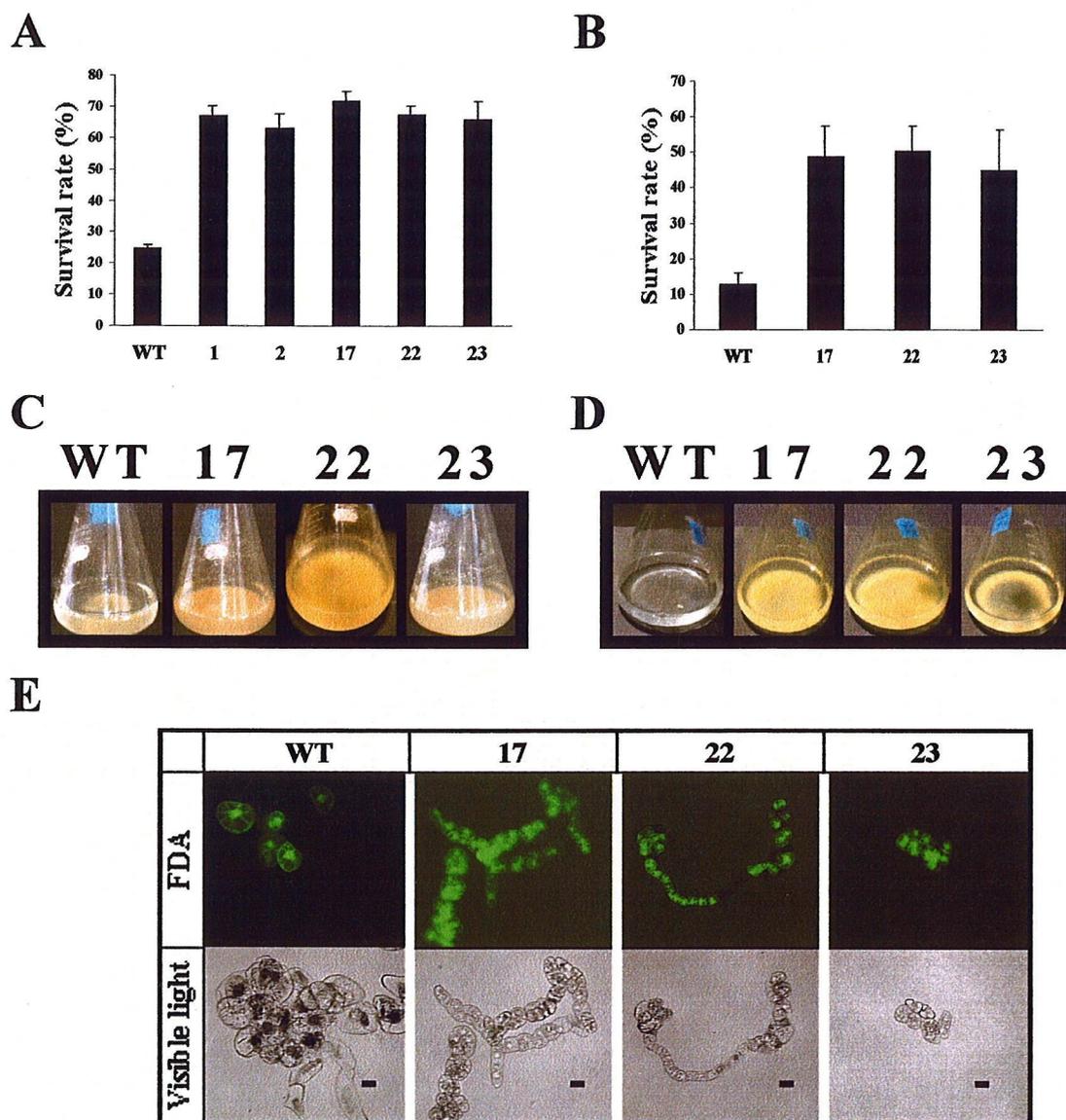


Fig. 5-9 Salt tolerance of transgenic cell lines. The wild-type calli and transgenic calli were transferred to liquid medium with 200 mM (A), or 250 mM NaCl (B) for 1 d and the survival rates (mean value  $\pm$  SE) ( $n=3$ ) were determined by examining about 1,000 cells stained with FDA. Photographs of wild-type cells and transgenic cell lines suspension-cultured with 200 mM (C) for 2 weeks, or 250 mM (D) NaCl for 3 weeks. (E) Microscopic photograph of wild-type cells and transgenic cell lines treated with 200 mM NaCl for 1 d and stained with FDA. They were observed under visible light (lower) or an epifluorescence microscope (upper) (bars = 20  $\mu$ m).

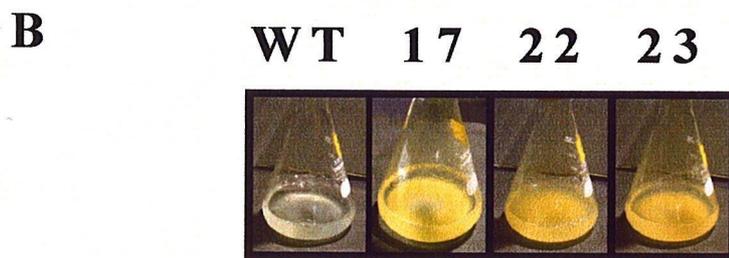
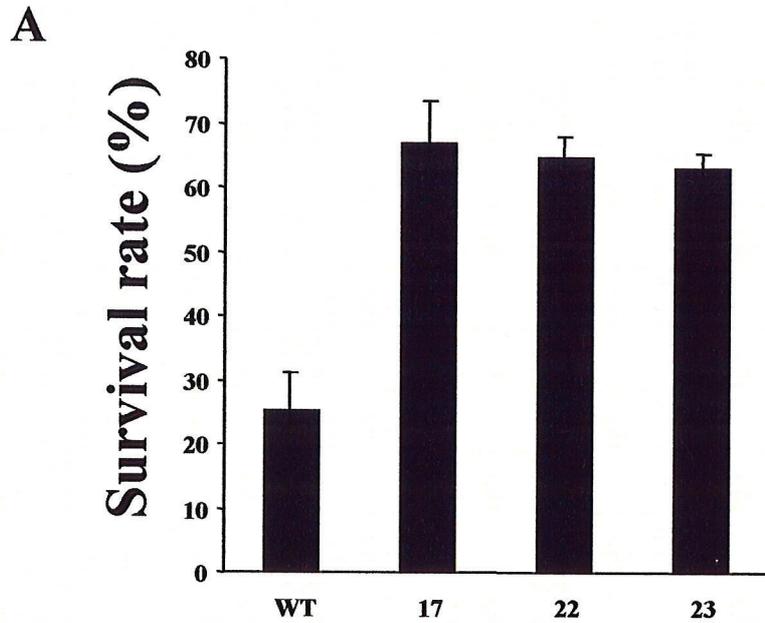


Fig. 5-10 Osmotic tolerance of transgenic cell-lines. (A) The wild-type calli and transgenic calli were transferred to liquid medium with 500 mM mannitol for 1 d and the survival rates mean value  $\pm$  SE (n=3) were calculated by examining about 1,000 cells stained with FDA. (B) Photographs of wild-type cells and transgenic cell-lines suspension-cultured for 3 weeks with 500 mM mannitol.

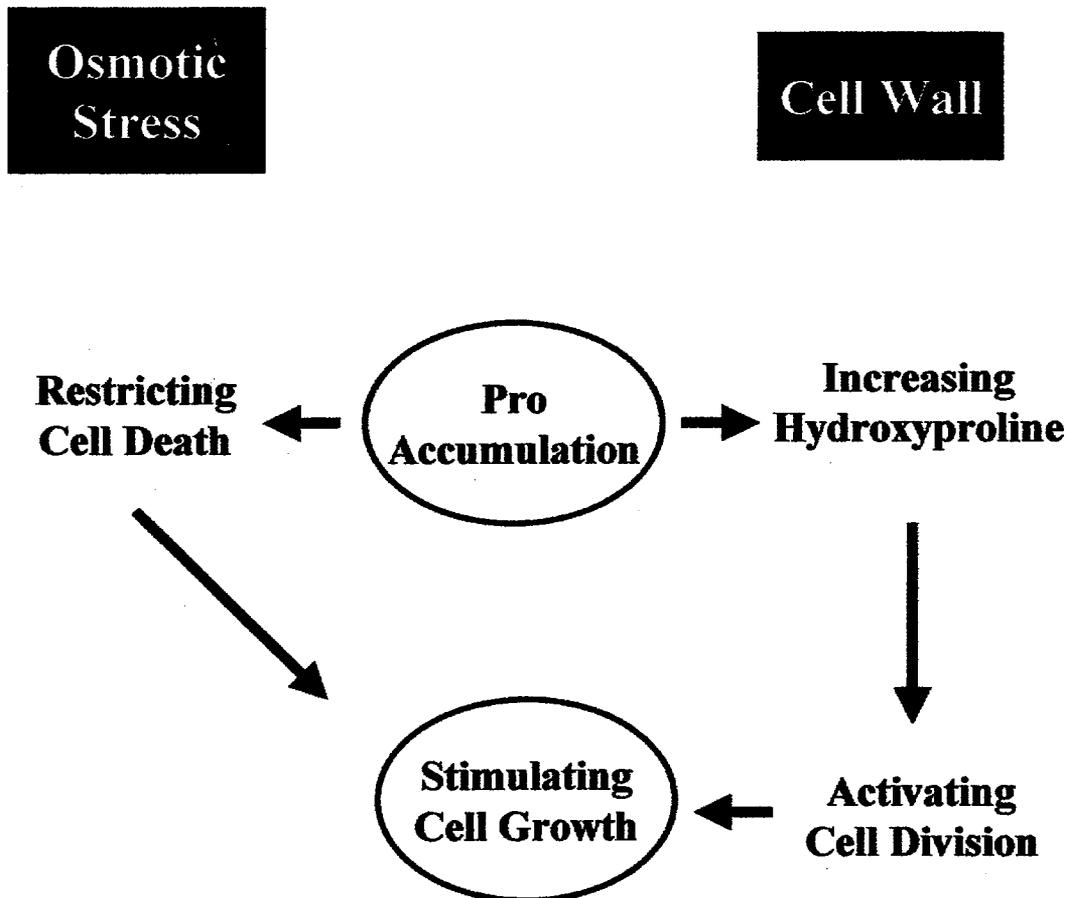


Fig. 5-11 A model for the role of Pro accumulation in cell growth. Accumulation of Pro activates cell wall synthesis by increasing hydroxyproline and consequently stimulating cell division and growth. Furthermore, Pro accumulation restricts cell death caused by osmotic stress. Finally, cell growth may be stimulated by Pro accumulation.

## 第6章 総合討論

本研究により、1)シカクマメのクラスIキチナーゼ遺伝子の発現が塩およびオスモティックストレスに応答することが示され、クラスIキチナーゼがストレス時に何らかの機能をする可能性が示唆された。しかし、その機能の解明までには至らなかった。2)アスコルビン酸をタバコに添加することにより、塩およびUVによって引き起こされる酸化ストレスに対して抵抗性を獲得することが示された。したがって、アスコルビン酸を増大させることにより、様々な酸化的ストレス耐性植物を作出できる可能性が示唆された。3)タバコ培養細胞の *ProDH* 遺伝子をRNAi法により抑制し、Pro含量を増加させることができた。Pro高含量形質転換タバコ培養細胞は、塩およびオスモティックストレスに対して耐性を示すとともに、細胞分裂が活性化され増殖速度も増大した。この結果により、適合溶質であるProの蓄積が塩およびオスモティックストレス耐性の獲得につながるということが明らかとなり、加えて細胞成長の促進にもつながる可能性が示された。

近年、モデル植物であるアラビドプシスゲノムの塩基配列が公開された(Seki *et al.*, 2002b)。また、完全長cDNAのランダムクローニングプロジェクトも進展しポストゲノムのための研究も進んでいる。また、イネやトウモロコシなど、その他の植物のゲノム解析も進んでいる。このようなゲノムやcDNAの塩基配列の情報増加に伴い、従来の特異的遺伝子発現解析法であるディファレンシャルディスプレイ法やcDNAサブストラクション法に代わり、一度に数千~数万の遺伝子を解析できるマイクロアレイによる遺伝子発現解析が盛んになってきている。乾燥、低温、高塩ストレス下における遺伝子の発現が、7,000個のアラビドプシスのcDNAを用いたマイクロアレイ解析により調べられている(Seki *et al.*, 2002a)。その結果、277個の遺伝子が乾燥ストレスにより誘導され、53個の遺伝子が低温により、また、194個の遺伝子が高塩ストレスにより誘導された。また、それらの遺伝子のうち約11%が転写因子であった。さらに、22個の遺伝子は、3種のストレスに共通して発現誘導されていた。一方、78個の遺伝子が乾燥により、89個の遺伝子が高塩により、71個の遺伝子が低温ストレスによりその発現量が減少していることが明らかになった。また、ABAによる遺伝子の発現応答の解析もアラビドプシスを用いたマイクロアレイによって行われている(Seki *et al.*, 2002c)。その結果、ABAにより245個の遺伝子の発現が増大した。ABAにより誘導される多くの遺伝子が、乾燥や、高塩ストレスによ

っても同様に誘導されており、特にABAと乾燥に応答する遺伝子がクロストークしていた。このように、多くの遺伝子が異なるストレスに対して共通に誘導されることがマイクロアレイ解析により明らかとなった。さらに塩ストレスに抵抗性を有するイネ(*var Pokkali*)において、塩ストレス処理後15分から1週間間に転写量を変化させる遺伝子が、1728個の根から調製したcDNAマイクロアレイ解析により調べられた(Kawasaki *et al.*, 2001)。*Pokkali*ではストレス処理後15分からいくつかの遺伝子の転写が活性化し始め、1時間以内に10%の遺伝子が顕著にアップレギュレートまたはダウンレギュレートすることが分かった。これらの遺伝子の発現応答は、普通の塩に対して抵抗性を持たないイネよりも速かった。早期にタンパク質の合成と代謝回転が促進され、引き続いて、数時間以内に既知のストレス応答性遺伝子の転写が活性化され、その後、生体防御に関連する遺伝子の転写が誘導される。ストレスからの回復に関連する遺伝子の誘導は、1週間後に観察された。その他にも、タバコにおけるUV-Bストレスによる遺伝子の発現応答や、アラビドプシスにおける強光ストレスによる遺伝子の発現応答など、様々なストレスによる遺伝子の発現応答がマイクロアレイにより解析されている(Izaguirre *et al.*, 2003, Kimura *et al.*, 2003)。このように、ストレスによる網羅的な遺伝子発現解析によりストレス応答のための発現ネットワークが明らかになりつつある。タバコ植物へのアスコルビン酸の添加により塩および酸化ストレスに対する抵抗性を獲得したメカニズムが、網羅的な遺伝子の変動をマイクロアレイにより解析することにより明らかにできるのではないかと考える。また、本研究で作製したPro高含量形質転換タバコ培養細胞においてもアップレギュレートまたはダウンレギュレートした遺伝子をマイクロアレイにより解析を行うことにより、細胞分裂が活性化されたメカニズムが明らかになるのではないかと期待できる。

他方、突然変異体の解析は、表現形とそれに関わる遺伝子とを相関させることを可能にし、遺伝子の機能同定につながる。突然変異体の作成には2種類あり、遺伝子の機能を破壊したもの(トランスポゾン法、T-DNAタギング法)と遺伝子の機能を増強したもの(アクティベーションタギング法)がある。前者ではアラビドプシスやイネなどで多数のタグラインが作製されて解析されつつある。アラビドプシスのT-DNAタグラインから単離されたミュータント*osm1*はNaClやマンニトールなどのオスモティックストレスに感受性を示した(Zhu *et al.*, 2002)。*osm1*は野生株に比べ乾燥に弱く、ABAによって調節される気孔の開閉

が阻害されていた。T-DNAの挿入位置から、OSMI遺伝子は、膜のCa<sup>2+</sup>やCl<sup>-</sup>イオンチャンネル活性を制御するSNAREタンパク質と相同性が認められた。またOSMI遺伝子が孔辺細胞に多量に発現していたことから、OSMIの機能はオスモティックストレス耐性やABAにより調節される気孔開閉の応答に関与していることが示された。Catalaら(2003)は、アラビドプシスにおいて低温によって誘導され、細胞内Ca<sup>2+</sup>量を調節する液胞のCa<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターをコードするCAX1遺伝子の機能を解析するため、CAX1遺伝子が破壊されているT-DNAタグミュータントを解析した。予想通り、このミュータントは液胞膜のCa<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性が減少していた。また、ミュータントの乾燥、高塩、低温、凍結に対する抵抗性は野生株と変わらなかったが、低温に順化後の凍結耐性は増加し、低温への順応応答に重要な機能をしていることが示された。近年ではDNA挿入部位の配列とそれに伴う植物体の表現型がミュータントパネルとしてデータベース化されてきており、突然変異体を用いた遺伝子の機能解析が一層進展するものと思われる。

現在、遺伝子組換え植物では導入遺伝子産物の安全性やアレルギー誘発性の有無、さらに遺伝子導入によって伴われる副次的な有害物質の産生の可能性などの観点から安全性基準審査が行われ、これらの審査にパスした農作物、例えば日持ちのよい作物（トマト）・害虫に強い作物（ジャガイモ・トウモロコシなど）・除草剤の影響を受けない作物（ダイズ・ナタネ・ワタなど）・病気に耐性の作物（イネ・ニンジンなど）などが、すでに市場に出回っている。しかし、塩や乾燥、酸化などの環境ストレスの遺伝子の発現応答は複雑で、これらの抵抗性を付与するには複数の遺伝子の導入が必要であると言われている。近年、複数の遺伝子を導入することができる多重遺伝子導入の技術の開発が試みられてきている。環境ストレス耐性に関与する遺伝子を複数個植物体へ導入することにより、より精密な遺伝子制御をされた塩や乾燥、高・低温、酸化などのストレス耐性形質転換植物が作製されることが期待される。

## 参考文献

- Agius F., González-Lamothe R., Caballero L.J., Muñoz-Blanco J., Botella A.M. and Valpuesta V. (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotech.* 21: 177-181.
- Alia MP. and Matysik J. (2001). Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acid.* 21: 195-200.
- Ancillo G., Witte B., Schmelzer E. and Kombrink E. (1999) A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. *Plant Mol. Biol.* 39: 1137-1151.
- Arie M., Hikichi K., Takahashi K. and Esaka M. (2000) Characterization of a basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. *Physiol. Plant.* 110: 232-239.
- Arrigoni O., Calabrese G., De Gara L., Bitonti M.B. and Liso R. (1997) Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *J. Plant Physiol.* 150: 302-308.
- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- Bell, A.A. (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 21-81.
- Blumwald E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 431-434.
- Boggess S.F. and Koeppel D.E. (1978) Oxidation of proline by plant mitochondria. *Plant Physiol.* 62: 22-25.
- Bohnert H.J. and Sheveleva E. (1998) Plant stress adaptations-making metabolism

- move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 267-274.
- Bonner C.A., Williams D.S., Aldrich H.C. and Jensen R.A. (1996) Antagonism by L-glutamine of toxicity and growth inhibition caused by other amino acids in suspension cultures of *Nicotiana glauca*. *Plant Sci.* 113: 43-58.
- Borsani O., Cuartero J., Valpuesta V. and Botella M.A. (2002) Tomato *tos1* mutation identifies a gene essential for osmotic tolerance and abscisic acid sensitivity. *Plant J.* 32: 905-914.
- Borsani O., Valpuesta V. and Botella A.M. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 126: 1024-1030.
- Brogliè K.E., Gaynor J.J. and Brogliè R.M. (1986) Ethylene-regulated *Phaseolus vulgaris* gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6820-6824.
- Brogliè K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvais C.J. and Brogliè R. (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 243: 1194-1197.
- Catala R., Santos E., Alonso J.M., Ecker J.R., Martínez-Zapater J.M. and Salinas J. (2003) Mutations in the  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  transporter *CAX1* increase CBF/DREB1 expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 15: 2940-2951.
- Chapman D. (1998) Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci.* 3: 419-426.
- Chen Z., Young E.T., Ling J., Chang S. and Gallie R.D. (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3525-3530.

- Chinoy N.J. (1984) The role of ascorbic acid in growth, differentiation and metabolism of plants. pp. 322. Martinus Nijhoff Publisher, The Hague.
- Choi H.I., Hong J.H., Ha J., Kang J.Y. and Kim S.Y. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275: 1723-1730.
- Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U. and Vad K. (1993) Mini-review: plant chitinases. *Plant J.* 3: 31-40.
- Conklin P.L., Williams E.H. and Last R.L. (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9970-9974.
- Conklin P.L., Pallanca J.E., Last R.L. and Smirnoff N. (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vtc1*. *Plant Physiol.* 115: 1277-1285.
- Cooper J.B., Heuser J.E. and Varner J.E. (1994) 3,4-Dehydroproline inhibits cell wall assembly and cell division in tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 104: 747-752.
- Cushman J.C. and Bohnert H.J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 117-124.
- Davison P.A., Hunter C.N. and Horton P. (2002) Overexpression of  $\beta$ -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418: 203-206.
- Delauney A.J. and Verma D.P.S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223.
- Deuschle K., Funck D., Hellmann H., Däschner K., Binder S. and Frommer W.B. (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J.* 27: 345-355.

- Elthon T.E. and Stewart C.R. (1981) Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol.* 67: 780-784.
- Esaka M., Hayakawa H., Hashimoto M. and Matsubara N. (1992) Specific and abundant secretion of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein from salt-adapted winged bean cells. *Plant Physiol.* 100: 1339-1345.
- Esaka M., Toyota A. and Hayakawa H. (1994) Secretion of basic and acidic chitinases from salt-adapted and –unadapted winged bean cells. *Physiol. Plant.* 92: 90-96.
- Farago M.E. and Mullen W.A. (1979) Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorg. Chim. Acta* 32: L93-L94.
- Franceschi V.R. and Tarlyn N.M. (2002) L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol.* 130: 649-656.
- Frank W., Munnik T., Kerkmann K., Salamini F. and Bartels D. (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12: 111-124.
- Foyer C.H. and Lelandais M. (1993) The role of ascorbate in the regulation of photosynthesis. *In: Photosynthetic Responses to the Environment* (Yamamoto H. Y. and Smith, C. M. eds) Rockville Maryland: American Society of Plant Physiologists, pp. 88-101.
- Gatzek S., Wheeler L.G. and Smirnoff N. (2002) Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J.* 30: 541-554.
- Goormachtig S., Lievens S., Van de Velde W., Van Montagu M. and Holsters M. (1998) Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plant Cell* 10: 905-915.

- Hamel F. and Bellemare G. (1995) Characterization of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 19: 212-220.
- Hare P.D. and Cress W.A. (1997) Metabolism implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21: 79-102.
- Hayashi H., Alia., Mustardy L., Deshniem P., Ida M. and Murata N. (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12: 133-142.
- Hellmann H., Funck D., Rentsch D. and Frommer W.B. (2000) Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiol.* 123: 779-790.
- Hohjoh H. (2002) RNA interference (RNAi) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. *FEBS Lett.* 521: 195-199.
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z. and Verma DP. (2000) Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122: 1129-1136.
- Holmstrom K.O., Somersalo S., Mandal A., Palva T.E. and Welin B. (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* 51: 177-185.
- Horemans N., Foyer C.H. and Asard H. (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Sci.* 5: 263-267.
- Hsieh T.H., Lee J.T., Yang P.T., Chiu L.H., Charng Y.Y., Wang Y.C. and Chan M.T. (2002) Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response

- element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 129: 1086-1094.
- Huang A.H.C. and Cavalieri A.J. (1979) Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves. *Plant Physiol.* 63: 531-535.
- Huang J.K., Wen L., Swegle M., Tran H.C., Thin T.H., Naylor H.M. Muthukrishnan S. and Reeck G.R. (1991) Nucleotide sequence of a rice genomic clone that encodes a class I chitinase. *Plant Mol. Biol.* 16: 479-480.
- Iseli B., Boller T. and Neuhaus J.M. (1993) The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol.* 103: 221-226.
- Izaguirre M.M., Scopel A.L., Baldwin I.T. and Ballare C.L. (2003) Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiol.* 132: 1755-1767.
- Jang I.C., Oh S.J., Seo J.S., Choi W.B., Song S.I., Kim C.H., Kim Y.S., Seo H.S., Choi Y.D., Nahm B.H. and Kim J.K. (2003) Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 131: 516-524.
- Jansen M.A.K., Gaba V. and Greenberg B.M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3: 131-135.
- Karakas B., Ozias-Akins P., Stushnoff C., Suefferheld M. and Rieger M. (1997) Salinity and drought tolerance of mannitol accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* 20: 609-616.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1999)

Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech.* 17: 287-291.

Kato N. and Esaka M. (1999) Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiol. Plant.* 105: 321-329.

Kato N. and Esaka M. (2000) Expression of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. *Planta* 210: 1018-1022.

Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D. and Bohnert H.J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13: 889-905.

Kimura T., Nakano T., Taki N., Ishikawa M., Asami T. and Yoshida S. (2001) Cytokinin-induced gene expression in cultured green cells of *Nicotiana tabacum* identified by fluorescent differential display. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1275-1283.

Kimura M., Yamamoto Y.Y., Seki M., Sakurai T., Sato M., Abe T., Yoshida S., Manabe K., Shinozaki K. and Matsui M. (2003) Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochem. Photobiol.* 77: 226-233.

Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A. and Verma D.P.S. (1995) Overexpression of [ $\delta$ ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.

Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1323-1335.

- Knight H. and Knight M.R. (2001) Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6: 262-267.
- Kollist H., Moldau H., Oksanen E. and Vapaavuori E. (2001) Ascorbate transport from the apoplast to the symplast in intact leaves. *Physiol. Plant.* 113: 377-383.
- Kuznetsov V.V. and Shevyakova N.I. (1997) Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity: Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiol. Plant.* 100: 320-326.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1998) Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
- Maddison J., Lyons T., Plöchl M. and Barnes J. (2001) Hydroponically cultivated radish fed L-galactono-1,4-lactone exhibit increased tolerance to ozone. *Planta* 214: 383-391.
- Maggio A., Miyazaki A., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J. and Bressan A.R. (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J.* 31: 699-712.
- Mani S., Van de Cotte B., Van Montagu M. and Verbruggen N. (2002) Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128: 73-83.
- Margis-Pinheiro M., Martin C., Didierjean L. and Burkard G. (1993) Differential expression of bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV irradiation. *Plant Mol. Biol.* 22: 659-668.
- Mauch F. and Stachelin L.A. (1989) Functional implications of the subcellular

- localization of ethylene-induced chitinase and [beta]-1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell* 1: 447-457.
- Maurel C. (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 48: 399-429.
- McKersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E. and Leprince O. (1996) Water deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 111: 1177-1181.
- McKersie B.D., Bowley S.R. and Jones K.S. (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 119: 839-848.
- McKersie B.D., Murnaghan J., Jones K.S. and Bowley S.R. (2000) Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol.* 122: 1427-1438.
- Mehta S.K. and Gaur J.P. (1999) Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* 143: 253-259.
- Mundy J. and Chua N.H. (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7: 2279-2286.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A. and Hirt H. (1999) Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20: 381-388.
- Nagata T., Nemoto Y. and Hasezawa S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132: 1-30.
- Nakashima K., Satoh R., Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1998)

- A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 1233-1241.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1999a) Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 461: 205-210.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Sanada Y., Wada K., Tsukaya H., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1999b) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18: 185-193.
- Nanjo T., Fujita M., Seki M., Kato T., Tabata S. and Shinozaki K. (2003) Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 44: 541-548.
- Ndong C., Danyluk J., Wilson K.E., Pocock T., Huner N.P.A. and Sarhan F. (2002) Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol.* 129: 1368-1381.
- Neale A.D., Wahleithner J.A., Lund M., Bonnett H.T., Kelly A., Meeks-Wagner D.R., Peacock W.J. and Dennis E.S. (1990) Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* 2: 673-684.
- Oztur Z.N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C.B., Galbraith D.W., Gozukirmizi N., Tuberosa R. and Bohnert H.J. (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* 48: 551-573.
- Paleg L.G., Stewart G.R. and Bradbeer J.W. (1984). Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* 75: 974-978.

- Park J.M., Park C.J., Lee S.B., Ham B.K., Shin R. and Paek .H. (2001) Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*. 13: 1035-1046.
- Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G. and Foyer C.H. (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15: 939-951.
- Peng Z., Lu Q. and Verma D.P.S. (1996) Reciprocal regulation of  $\Delta^1$ -pyrroline-5 carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* 253: 334-341.
- Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D., Murr D.P. and Watkins C.B. (1997) Influence of salicylic acid on  $H_2O_2$  metabolizing enzymes: salicylic acid-mediated oxidative damage requires  $H_2O_2$ . *Plant Physiol.* 115: 137-149.
- Rao M.V. and Davis R.D. (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J.* 17: 603-614.
- Romero R., Bellés JM., Vayá JL., Serrano R. and Culiáñez-Macià FA. (1997) Expression of the yeast *trehalose-6-phosphate synthase* gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297.
- Rozema J., vandeStaaaj J., Björn L.O. and Caldwell M. (1997) UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol. Evol.* 12: 22-28.
- Sakamoto A., Alia., Murata N. and Murata A. (1998) Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol. Biol.* 38: 1011-1019.
- Sanmartin M., Drogoudi P.A., Lyons T., Pateraki I., Barnes J. and Kanellis A.K. (2003)

Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*. 216: 918-928.

Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y. and Shinozaki K. (2002a) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31: 279-292.

Seki M., Narusaka M., Kamiya A., Ishida J., Satou M., Sakurai T., Nakajima M., Enju A., Akiyama K., Oono Y., Muramatsu M., Hayashizaki Y., Kawai J., Carninci P., Itoh M., Ishii Y., Arakawa T., Shibata K., Shinagawa A. and Shinozaki K. (2002b) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296: 141-145.

Seki M., Ishida J., Narusaka M., Fujita M., Nanjo T., Umezawa T., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y. and Shinozaki K. (2002c) Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics*. 2: 282-291.

Serrano R., Mulet J.M., Rios G., Marquez J.A., de Larrinoa I.F., Leube M.P., Mendizabal I., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R. and Montesinos C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* 50: 1023-1036.

Shah K. and Dubey R.S. (1998) Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: Role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol. Plant* 40: 121-130.

Shalata A. and Neumann M.P. (2001) Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 52: 2207-2211.

- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217-223.
- Shinshi H., Neuhas J.M., Ryals J. and Meins F.Jr. (1990) Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol. Biol.* 14: 357-368.
- Schöffl F., Prändl R. and Reindl A. (1998) Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.* 117: 1135-1141.
- Skriver K. and Mundy J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512.
- Smirnoff N. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotech.* 9: 214-219.
- Smirnoff N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 229-235.
- Smirnoff N. Conklin P. and Loewus F. (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 437-457.
- Smirnoff N, Cumbes Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060.
- Staelin C., Granado J., Muller J., Wiemken A., Mellor R.B., Felix G., Regenass M., Broughton W.J. and Boller T. (1994) Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Plant Cell* 15: 2196-2200.

- Stockinger E.J., Gilmour S.J. and Thomashow M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.
- Suarez V., Stachelin C., Arange R., Hiltorf H., Hofsteenge J. and Meins Jr. F. (2001) Substrate specificity and antifungal activity of recombinant tobacco class I chitinases. *Plant Mol. Biol.* 45: 609-618.
- Tabata K., Oba K., Suzuki K. and Esaka M. (2001) Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J.* 27: 139-148.
- Taylor C.B. (1996) Proline and water deficit: Ups, downs, ins and outs. *Plant Cell* 8: 1221-1224.
- Tsugane K., Kobayashi K., Niwa Y., Ohba Y., Wada K. and Kobayashi H. (1999) A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11: 1195-1206.
- Tyerman S.D., Bohnert H.J., Maurel C., Steudle E. and Smith J.A.C. (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.* 50:1055-1071.
- Vasil V., Marcotte W.R.Jr., Rosenkras L., Cocciolone S.M., Vasil I.K., Quatrano R.S. and McCarty D.R. (1995) Overlap of *Viviparous 1 (VPI)* and abscisic acid response elements in the *Em* promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for *VPI* transactivation. *Plant Cell* 7: 1511-1518.
- Verbruggen N., Hua X-J., May M. and Van Montagu M. (1996) Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8787-8791.

- Verma D.P.S. (1999) Osmotic stress tolerance in plants: Role of proline and sulfur metabolisms. *In* Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. eds, Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants austin, TX: R.G. Landers, pp 153-168.
- Vierling E. (1991) The roles of heat-shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.
- Vierling E. and Kimpel J.A. (1992) Plant responses to environmental stress. *Curr. Opin. Biotech.* 3: 164-170.
- Vincent R.F. and Nathan M.T. (2002) L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol.* 130:649-656.
- Wheeler G.L., Jones M.A. and Smirnoff N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369.
- Wu S.J., Ding L. and Zhu J.K. (1996) *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8: 617-627.
- Yabuta Y., Motoki T., Yoshimura K., Takeda T., Ishikawa T. and Shigeoka S. (2002) Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J.* 32: 915-25.
- Zhang S., Du H. and Klessing D.F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora*. *Plant Cell* 10: 435-449.
- Zhu J.K. (2001a) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66-71.
- Zhu J.K. (2001b) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 401-406.

Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 53: 247-273.

Zhu J., Gong Z., Zhang C., Song C.P., Damsz B., Inan G., Koiwa H., Zhu J.K., Hasegawa P.M. and Bressan R.A. (2002) OSM1/SYP61: a syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* 14: 3009-3028.

Zhu J.K., Hasegawa P.M. and Bressan R.A. (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 253-277.

Zimmermann S. and Sentenac H. (1999) Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 477-482.

## 謝辞

本研究は、江坂宗春教授の御指導のもと、広島大学生物生産学部酵素化学研究室において行われました。同教授に心から感謝いたします。

本論文の作成にあたり、水田啓子教授をはじめ、藤田耕之輔教授、永松康德助教授、実岡寛文助教授に多くの御助言と御鞭撻を賜りました。ここに深く感謝いたします。

研究の遂行にあたり、pGWHPR ベクターを譲渡していただいた島根大学の中川強助教授に感謝いたします。

平素より様々の御助言および御協力をしていただきました酵素化学研究室の皆様へ感謝いたします。

最後に、私の広島大学での研究生活を支えてくれた夫と子供、ならびに両親、兄に心から感謝します。