

## 3Ap-2

タバコストレスタンパク質 mRNA の cDNA クローニング  
と塩基配列の決定

大橋祐子<sup>1</sup>・松岡 信<sup>1</sup>・山本直樹<sup>2</sup>・田中喜之<sup>3</sup>・村上(嘉納)ゆ  
り子<sup>4</sup>・小関良宏<sup>5</sup>(<sup>1</sup>生物研, <sup>2</sup>林試, <sup>3</sup>農環研, <sup>4</sup>果樹  
試, <sup>5</sup>東大教養・生物)

植物に病原菌が感染して過敏反応を起し感染部に壊死斑が形成されると、時  
間の経過と共にその隣接健全部や未感染上葉が病原菌の再感染に対して抵抗性を獲  
得するが、これに伴ない、宿主由来の一群の低分子酸性タンパク質〔感染特異的タ  
ンパク質 (pathogenesis-related proteins: PRs と略す) が誘導されて来る。PRs はサリテ  
ル酸などの化学誘起剤でも、傷害などのストレスによっても誘導されるため、スト  
レスタンパク質の一種と考えられる。我々はタバコ葉における PRs の誘導機構を調  
べてきたが、今までに ① PRs は *de novo* のタンパク質合成により誘導され、② PRs  
mRNA を用いた *in vitro* のタンパク質合成の結果から、PRs はシグナルペプチドを持  
って合成されてくること、③けん濁培養細胞などを用いた PRs の局在性に関する実  
験から、合成された PRs は細胞の外に成熟体として分泌されることなどが明らか  
になった。

今回は、タバコ PRs mRNA を調製しその cDNA クローニングを行なったのでその  
結果を報告する。

(1) サリテル酸処理および AMV 感染の重複 PRs 誘導処理を行なったタバコ葉から、  
グアニジンチオシアネート・CsCl 法により RNA を調製し、oligo(dT) セルロースによ  
り mRNA 画分を得た。

(2) これをさらに蔗糖密度勾配离心にかき、PRs mRNA と思われる約 10S 画分を得て  
*in vitro* のタンパク質合成を行なわせ、その翻訳産物を PRs 抗体で免疫沈殿させ、  
この画分に PRs mRNA が濃縮されていることを確認した。

(3) 次にこの画分を用い、Gubler・Hoffman 法により cDNA を合成し ded 本モホリマーテ  
リング法により pUC8 にアニールさせた後、JM83 のコンピテンツセルに形質転換させ  
cDNA ライブラリーを作成した。

(4) この cDNA ライブラリーから PRs のアミノ酸配列をもとに合成した <sup>32</sup>P-オリゴヌク  
レオチドをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより PRs cDNA を検索した。

(5) その結果、600 塩基対以上の cDNA 挿入部をもつクローンが 15 個得られた。これ  
らは、その制限酵素地図から 3 グループに大別された。

(6) このうち 2 グループより、pPR1183 と pPR2095 を選り挿入 cDNA の全塩基配列を決  
定した結果、前者が PR1a 後者が PR1b であることが明らかになった。

(7) この結果から、この 2 つのクローンに挿入された cDNA は、シグナルペプチドを  
含む部分については、塩基配列で 91%、アミノ酸配列で 91% の相同性があること、  
また成熟タンパク質部分では、前者で 94%、後者で 93% の相同性を持つことが明ら  
かになった。