

## 1Ba08

植物の病害抵抗性に関与する遺伝子のクローニング：ダイズの  
 エリシター遊離因子( $\beta$ -1,3-endoglucanase) cDNA の単離  
 竹内洋二・竹葉 剛<sup>1</sup>・田中國介・正子 朔・吉川正明  
 (京都府大・農, <sup>1</sup>生活科学)

演者らはダイズ植物と疫病菌 (Phytophthora megasperma f. sp. glycinea, 病原糸状菌の一種) の系を用いて、植物の病害抵抗性の発現機構について解析を行ってきた。その中で、ダイズ組織内における疫病菌の進展を阻止する抵抗反応の主要因は、感染組織による抗菌性物質グリセオリン (ファイトアレキシンの一種) の合成および蓄積であることが明らかとなってきた。さらに、この感染ダイズ組織におけるグリセオリンの蓄積を誘導する機構について検討した結果、疫病菌細胞壁にはダイズ組織にグリセオリン蓄積を誘導する物質 (エリシター) が結合しており、感染に際してダイズ組織と接触すると、ダイズ組織に存在するある種の因子により疫病菌細胞壁からエリシター分子が切り離され遊離し、この遊離したエリシターがダイズ組織に対しグリセオリンを誘導することが明らかとなった。また、このダイズ組織に存在するエリシターを遊離する因子は  $\beta$ -1,3-endo-glucanase ( $\beta$ -1,3-EG) であることが判明した。本実験においては、ダイズ植物の抵抗反応誘導の過程において最も初期の宿主・病原菌相互反応に関与し、また、宿主の抵抗反応誘導に必須なものであると考えられるエリシター遊離因子 ( $\beta$ -1,3-EG) のクローニングを試みた。また、 $\beta$ -1,3-EG 活性のエチレンによる活性増大の機構についても併せて検討した。

既報のようにダイズ組織の  $\beta$ -1,3-EG 活性はエチレン処理により増加する。そこでエチレン処理により  $\beta$ -1,3-EG の mRNA が増加したと思われるダイズ実生の子葉組織からポリ(A)RNAを得た。この mRNA 標品中にはウサギ網状赤血球ライゼートを用いた in vitro 蛋白合成系により  $\beta$ -1,3-EG に対する完全な mRNA が存在することを確認した。そこで、この mRNA 標品に対する cDNA を合成し、この cDNA をファージ発現ベクターである  $\lambda$  gt 11 に挿入し、E. coli に感染させた。その結果、約  $10^{-4}$  の頻度で  $\beta$ -1,3-EG 抗体と反応する陽性ブランクが検出された。これら陽性ブランクから得た  $\lambda$  gt 11 の挿入 cDNA のうち約 700 bp の cDNA について塩基配列を解析した。また、この 700 bp の cDNA とハイブリダイズした mRNA は、in vitro 蛋白合成系で  $\beta$ -1,3-EG を合成し、この cDNA は  $\beta$ -1,3-EG の cDNA であることが確認された。さらにこの cDNA をプローブとしたブランク・ハイブリダイゼーション法により、 $\beta$ -1,3-EG の全長 cDNA と考えられる cDNA (1400 bp) が得られ、現在その塩基配列を解析している。

つぎに、エチレン処理による  $\beta$ -1,3-EG の活性増大がどのような分子レベルで制御されているのかについて検討した。まず、エチレン処理後の  $\beta$ -1,3-EG 蛋白量の変化についてロケット免疫電気泳動法で調べたところ、活性の増大に平行して  $\beta$ -1,3-EG 量も増加した。また、ダイズ組織から抽出した mRNA 標品の in vitro 蛋白合成系における  $\beta$ -1,3-EG 翻訳活性もエチレン処理後著しく増加した。さらに、この mRNA 標品中の  $\beta$ -1,3-EG mRNA 量に関して、前述の 700 bp の  $^{32}$ P-cDNA をプローブとしてドット・プロット法により定量したところ、エチレン処理後  $\beta$ -1,3-EG mRNA 量が顕著に増加した。これらの結果から、エチレン処理したダイズ組織における  $\beta$ -1,3-EG 活性の増大は、 $\beta$ -1,3-EG 遺伝子の転写レベルでの調節によるものであることが明らかとなった。また、エチレン処理により  $\beta$ -1,3-EG 活性の増大したダイズ組織では、疫病菌に対する抵抗性が増強されるようであった。以上のように、 $\beta$ -1,3-EG 遺伝子はダイズの病害抵抗性に関係した遺伝子であるとともに、エチレンによる遺伝子発現機構を解析する遺伝子としても興味深いと思われる。