

平成17年9月24日

東京高等裁判所 民事第5部 御中

## ディフェンシンによる耐性菌出現問題等に関する報告書

茨城県つくば市観音台2-1-18

(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構

作物研究所 所長

黒田 秧

印

1. 「本実験の圃場の田の水中に、ディフェンシン耐性菌が容易に出現する可能性」および「ディフェンシン耐性菌が圃場の外部に容易に流出・伝搬するおそれ」について債権者準備書面(8)、「第3、ディフェンシン耐性菌に対する事実認定と判断の誤り」(10頁)において、債権者が問題の所在として指摘した上記2点について、誤認であることを以下に述べます。

まず、カラシナディフェンシンがイネの体外に流出する可能性についてです。債権者はこの可能性を前提に上記2点の問題を指摘しており、事実誤認の核心部分であるからです。

イネに導入したカラシナディフェンシンは熱安定性が高く、水溶性で、塩基性の蛋白質であり、プラスに荷電されています。遺伝子の構造から分泌シグナルをもつのでイネの細胞内で生合成されたディフェンシンは細胞(膜)外に分泌されますが、細胞を取り囲みマイナスに荷電した細胞壁と結合するとともに、細胞壁の構造的な特徴から細胞壁外や植物体外に流動したり、流出することは考えられません。

植物と動物の細胞構造の基本的な違いは、細胞壁の有無です。植物にはセルロースを主成分とする数マイクロメートルの厚さの強固な細胞壁があり、細胞を閉じこめるとともに、植物の形態の形成や維持にも深く関わっています。動物のディフェンシンは細胞外に分泌され体外に流出することがあっても、植物では細胞外に分泌(細胞膜を通過)されたディフェンシンが細胞を取り囲む細胞壁に結合してトラップされ、細胞間隔にとどまると考えられます。この結合を乖離させるには、細胞壁のプラスの電荷を中和させる必要があり、細胞外シグナルに応答して多量の $Ca^{2+}$ イオンが細胞間隙に流入するとか、人工的には高塩濃度の化合物の処理が必要となります。植物ディフェンシンと類縁の抗菌蛋白質で第13群に属する塩基性のチオニンの局在性を調べた研究(文献1)でも、エン麦由来のチオニン産生遺伝子を導入した組換えイネのチオニンは細胞(膜)外に分泌されますが、すべて細胞壁に結合して蓄積することが確認されています。このように植物の細胞壁での蓄積が、植物に感染し細胞壁を貫通して侵入した病原体の増殖に抑止効果を発揮すると考えられています。

抗菌蛋白質が植物体外に分泌されず個々の細胞の細胞壁にとどまることは、植物の細胞壁の構造的な特徴からも論理的説明が可能です。特殊化した数種の細胞を除きほとんどの植物細胞が両隣の細胞と細い通路(プラスモデスム)でつながっており、この通路は細胞と細胞を仕切る細胞壁を貫通しています。この円筒形の通路こそが植物の細胞間の直接的

な連絡機構となっており、隣接する細胞や植物体外との間で栄養物質や生体成分等の流動性を確保しています。しかし、通路の直径は20～40ナノメートルと極めて細く、自由に通過できる物質の大きさは分子量に換算して800以下のサイズであり（文献2）、分子量が約5,700のカラシナディフェンシンを含めた植物ディフェンシンは水溶性であっても大きすぎて細胞壁を貫通するこの通路を物理的に通過することができず、従って、細胞外および植物体外への分泌は考えられません。

本実験に用いた組換えイネは、カラシナディフェンシン遺伝子が茎や葉の緑色組織で特異的に発現するような調節機能をもつプロモーターを使用しており、ディフェンシン遺伝子が茎葉で発現し、根や米の胚乳で発現しないことが確認されています。従って、生育中のイネでは、ディフェンシンは茎葉で作られますが、茎葉から水田の水に溶けて流失する可能性は上記の理由により考えられません。しかし、細胞壁の荷電状態に何らかの要因によって変化が起これば、ディフェンシンが細胞壁から乖離し、さらにその蛋白質の立体構造を変化させて（分子間のS-S結合の切断）糸状のほぐれた状態になり、細胞壁を通過して体外に出た後に何らかの仕組みで元の立体構造に戻り抗菌活性をもつという、およそ起こりえない何重もの仮定を否定する証拠があるか、と問われるかもしれません。

そこで、北陸研究センターでは組換えイネの茎葉からディフェンシンが水中に溶出し抗菌活性をもつかどうかを検証する2つの実験を行いました（未発表、後日提出）。

第1の実験の概要：本栽培実験の隔離圃場において生育中の組換えイネまたは非組換えイネ(対照)から採取した茎葉を、超純水を入れた容器にそのままの形状または5 cm程度に細断して入れ、2日間放置した後、水を回収。それぞれの実験区の水をフィルター(ディフェンシンの通過は確認済)で濾過した後、この濾液を用いていもち病菌が増殖しやすい専用の培養培地を作製(抽出し精製したディフェンシンの抗菌活性は、90℃で10分間はほぼ安定ですが、この実験では60℃で培地を作製)。この培地にイネいもち病菌を植菌して4日間培養。その結果、いもち病菌の増殖程度は各実験区間で差異が認められず、組換えイネおよび非組換えイネのすべての濾液は抗菌活性を示しませんでした。また、回収した水を1,000倍に濃縮した水溶液に含まれるディフェンシンの有無を、ディフェンシン抗体を用いてメンブレン上で抗原抗体反応を行うことにより(免疫染色法)、調べました。その結果、組換えイネおよび非組換えイネ(対照)ともにすべて陰性であり、高感度な検出法を用いてもディフェンシンは検出されませんでした。

第2の実験の概要：本栽培実験の隔離圃場において生育中の組換えイネの株元のくぼ地に溜まった水を採取し、その上澄を同様にフィルターで濾過し、1,000倍に濃縮した後、ディフェンシン抗体を用いた免疫染色法により濾液中のディフェンシンの有無を調べました。その結果、組換えイネおよび非組換えイネ(対照)ともに陰性であり、高感度な検出法を用いても組換えイネ株周辺の水からはディフェンシンが検出されませんでした。

以上のように、組換えイネの茎葉中に蓄積したディフェンシンが体外に漏出して水田の水に溶出し、微生物や病原体の増殖に影響を及ぼす可能性がないことが、上記の各実験により明らかになりました。

このように、イネで作られたカラシナディフェンシンが植物体外に分泌され、「その結果、茎から漏出したディフェンシンが水に溶けて拡散し、多くの微生物と接触することになり、耐性菌出現の条件が完璧に整うこととなります。」(金川陳述書(3)、5頁17行

目～19行目)、および「常時大量に作り続けられるディフェンシンが、本実験の圃場の田の水の中の微生物と頻繁に接触することになることから、・・・ディフェンシン耐性菌が生じることは容易に可能である。」(債権者準備書面(8)、13頁9行目から13行目)、との債権者側の陳述には根拠がありません。植物の特性を無視し、科学的な根拠を著しく欠いた意図的な誤認といわざるをえません。

以上の理由により、債権者が問題の所在として指摘した標記2点、すなわち水田におけるディフェンシン耐性菌の出現と流出、伝搬の恐れについては、その問題の前提条件が消失し、議論が成立し得ないことが明白です。債権者側の誤認に基づく指摘に対して、これ以上の論議は机上の空論を重ねることになり、まったく意味をなさないと考えます。

## 2. 「一匹の耐性菌が数万匹、数億匹にふえる可能性」と「危険性」について

債権者準備書面(8)、14頁3行目において標記の問題を指摘し、5行目で「たとえ1匹でもいったん耐性菌が出現すれば、通常、そこから爆発的な増殖が起こるから危険である」と主張しています。その根拠として、同12頁15行目において黒田陳述書の『「他の生物相等の環境影響の存在しない」ことが耐性菌の出現にとって有利に働くという前提』が常に成立するとは限らないとし、標記の可能性を誘導しています。後段の「出現」とは自己増殖の意味と理解され、一貫してディフェンシン耐性菌の猛威と脅威論を展開しています。この指摘も債権者側の誤認であることを以下に述べます。

植物に感染する病原微生物には宿主域があります。債権者はこの事実を無視しています。これは木暮意見書(疎甲第99号証、11頁、3. 私の見解と理由)の基本的で重大な欠陥です。即ち、植物に病原性をもつ菌は、自然界において生存のために必要な栄養を摂取するのに競合が多くて厳しい“腐生性”から、競合の少ない、特定の植物にしか寄生しない“宿主特異性”を獲得することによって進化してきました。例えば、イネに被害をもたらすイネいもち病菌は、イネ科植物を宿主として感染してもそれ以外の植物種には感染しません。また、イネ白葉枯病菌はイネとサヤヌカグサなどのイネ科雑草にしか感染しません。いずれの病原菌にも点突然変異等によって生じたと推測される変異菌株(レース)が存在しますが、特定の宿主域内での分布と生存に限られています。この事実は、先の『「他の生物相等の環境影響の存在しない」ことが耐性菌の出現にとって有利に働くという前提』を強く裏付けています。

このように、組換えイネで仮にディフェンシン耐性のいもち病菌株が出現したとしても、この変異菌株はイネ科植物に感染する可能性があっても、宿主域の特性から他の植物種への感染は考えられません。しかも感染したイネ科植物では多様な生体防御機構(後述)が働きますので、この変異菌株が爆発的に増殖することは考えられません。

木暮意見書では、「今回の耐性菌の影響が懸念される作物は、カラシナです。・・・カラシナに侵入し、そこで爆発的に増殖するおそれが出てきます」と指摘しています。しかし、イネを宿主とする病原菌に変異が起こりディフェンシン耐性を示して病原菌化し、さらにカラシナなどの双子葉植物に寄生したり、さらには変異菌株のディフェンシン耐性遺伝子がそれら双子葉植物の病原菌に組み換えられて新たな変異菌株を生み、双子葉植物に重大な被害をもたらす可能性は、変異菌株の病原性獲得の複雑な機構、宿主特異性、病原菌種間での競合、宿主植物が高度に発達させた生体防御機構など、何重もの大きな壁を変

異菌株が乗り越えて進化し増殖する必要があり、皆無と考えられます。

### 3. ディフェンシン耐性菌の出現と植物生存の脅威について

植物は、動物に見られるような免疫系を駆使した生体防御機構をもたない代わりに、体細胞が病原体を認識して抵抗性を発現する複雑な防御機構を高度に発達させて、病原体から身を守っています。そのため、植物は大多数の病原体に対して抵抗性を示し、ごく限られた少数の病原体によってのみ被害を受けることが知られています。その典型的な生体防御機構として、病原体が感染した植物の細胞が過敏反応と呼ばれる細胞死を起こして病原体を封じ込め、感染によって誘導されたサリチル酸やエチレンなどのシグナル伝達物質（植物ホルモン）によって、周囲の細胞では活性酸素の生成、抗菌蛋白質や低分子の抗菌物質のファイトアレキシンの合成、細胞壁の強化などが起こり、協働して新たに感染した病原体の侵入を食い止める防御の仕組みが明らかになってきました。

植物ディフェンシンは生体防御機構の一端を担う抗菌蛋白質（感染特異的蛋白質）の一つです。植物の抗菌蛋白質は、すでに数百種類が知られており、その作用の特性から17群に分類され、ディフェンシンは第12群に属します。アブラナ科のカラシナを含めた8種類の野菜のディフェンシンはその構造がそれぞれわずかに異なります。ダイコンにも4種類の存在が知られています。また、研究蓄積の多いキチナーゼは第3群に属し、50種類以上が知られています。イネにおいても各種のキチナーゼ、グルカナーゼ、チオニン、パーオキシダーゼなど複数の抗菌蛋白質を生合成する遺伝子がゲノムに存在し、多様な抗菌作用を示す蛋白質を産生することが確認されており、イネの耐病性発現に関わっています。同様に、個々のアブラナ科の野菜でも複数の抗菌蛋白質の存在が知られています。

このように、植物では抗菌蛋白質に限ってみても、植物の進化の過程においてよくその遺伝情報が保存され、各種の抗菌蛋白質がかなり共通して存在し、高度な生体防御機構を働かせています。仮に自然界においてカラシナ由来のディフェンシンに耐性な菌が出現したとしても、イネやカラシナなどの植物は各種の多様な生体防御機構を働かせる仕組みを備えています。これは、カラシナを始め多数のアブラナ科植物が自然界で各種の病原体に犯されながらも依然として種を維持し続けている実態からも明らかです。従って、金川陳述書（疎甲19、2頁23行目）の「特に植物の場合には、抗原抗体反応による防御機構を持っておらず、ディフェンシン耐性菌は大きな脅威となりうる。」とは考えられず、これをもって「植物は、食物連鎖の根幹をなすものであり、植物なくして、動物の存在はありえない」とする見解は、極めて飛躍した、脅威をことさら煽る議論であり、同意できません。

#### 引用文献

1. Iwai T.ら(2002) : Enhanced Resistance to Seed-Transmitted Bacterial Diseases in Transgenic Rice Plants Overproducing an Oat Cell-Wall-Bound Thionin (岩井ら : エン麦の細胞壁結合チオニンを過剰発現させた組換えイネにおける苗立枯れ病抵抗性の増強) , *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 515 頁～ 521 頁
2. *Molecular Biology of The Cell* (3rd Edition) (細胞の分子生物学 第3版), Bruce 編 (1994年発行)、Newton Press, 961 頁～ 962 頁

# Enhanced Resistance to Seed-Transmitted Bacterial Diseases in Transgenic Rice Plants Overproducing an Oat Cell-Wall-Bound Thionin

Takayoshi Iwai,<sup>1,3</sup> H. Kaku,<sup>1</sup> R. Honkura,<sup>2</sup> S. Nakamura,<sup>2</sup> H. Ochiai,<sup>1</sup> T. Sasaki,<sup>1</sup> Y. Ohashi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan; <sup>2</sup>Miyagi Prefectural and Horticulture Research Center, Takadate-kawakami, Natori, Miyagi 981-1243, Japan; <sup>3</sup>Core Research of Evolutional Science and Technology (CREST), Chiyodaku, Tokyo 101-0062, Japan

Submitted 30 November 2001. Accepted 5 February 2002.

Bacterial attack is a serious agricultural problem for growth of rice seedlings in the nursery and field. The thionins purified from seed and etiolated seedlings of barley are known to have antimicrobial activity against necrotrophic pathogens; however, we found that no endogenous rice thionin genes alone are enough for resistance to two major seed-transmitted phytopathogenic bacteria, *Burkholderia plantarii* and *B. glumae*, although rice thionin genes constitutively expressed in coleoptile, the target organ of the bacteria. Thus, we isolated thionin genes from oat, one of which was overexpressed in rice. When wild-type rice seed were germinated with these bacteria, all seedlings were wilted with severe blight. In the seedling infected with *B. plantarii*, bacterial staining was intensively marked around stomata and intercellular spaces. However, transgenic rice seedlings accumulating a high level of oat thionin in cell walls grew almost normally with bacterial staining only on the surface of stomata. These results indicate that the oat thionin effectively works in rice plants against bacterial attack.

In rice-growing areas such as Japan, the method for raising rice seedlings for machine transplantation into paddy fields has recently changed from the anaerobic conditions of paddy fields to the aerobic conditions of upland fields. This change to upland fields from paddy fields promises more vigorous growth of rice seedlings in the nursery and subsequent enhanced growth in the paddy fields after transplantation, resulting in a stable mass production of rice seed. However, seedlings grown in upland areas at a higher temperature are susceptible to attack by bacterial pathogens. Such infections have not been reported in seedlings grown in paddy fields. Thus, a change from anaerobic to aerobic growing conditions likely altered the kinds of infectious bacteria afflicting the rice plant and induced a new agricultural problem, seedling blight disease, caused by seed-transmitted bacteria such as *Burkholderia* (previously classified to *Pseudomonas*) *plantarii* and *B. glumae*. The grain rot phenotype caused by *B. glumae*, in particular, has become a major topic of research.

Generally, attempts to control diseases rely on the use of agrochemicals. However, it repeatedly has been shown that bacteria easily acquire resistance to bactericides. Furthermore, enhanced chemical injury by the use of bactericides together with fungi-

cides has become another problem in rice seedlings grown in upland fields. Another orthodox method for obtaining resistant plants is crossbreeding. However, we could not find suitable genetic resources to cross with practical Japonica rice cultivars.

Thus, the generation of transgenic rice plants resistant to bacterial attack has been awaited. Among the genes available for this purpose, thionin genes are of particular interest because they are reported to have antimicrobial activity as follows: (i) a barley leaf thionin induced by *Septoria nodorum* (Stevens et al. 1996) and *Drechslera graminea* (Vale et al. 1994) has been reported to be toxic to phytopathogenic bacteria and fungi in vitro (Bohlmann et al. 1988; Molina et al. 1993); (ii)  $\alpha$ -holdothionin from barley seed conferred enhanced resistance to *Pseudomonas syringae* when overproduced in tobacco plants (Carmona et al. 1993); and (iii) Epple and associates (1997) reported that overexpression of the *Arabidopsis th2.1* gene in *Arabidopsis* plants resulted in enhanced resistance to *Fusarium oxysporum*.

We first evaluated the role of the endogenous rice thionins, concluding that they alone are not enough to protect against bacterial infection. Then, we newly isolated five thionin genes from oat plants originally grown in aerobic conditions and report here that overproduction of an oat thionin in Japonica rice plants resulted in a strong resistance to infection by two major seed-transmitted soilborne bacteria.

## RESULTS

### Evaluation of the endogenous thionin genes for resistance to bacterial attacks in rice plants.

Rice seedlings grown in upland fields are susceptible to attack by soilborne bacteria. We first evaluated the contribution of endogenous rice thionins to disease resistance. In  $8 \times 10^4$  clones of raw rice expressed sequence tags, we found more than 100 clones that encode the same amino acid sequence for the predicted thionin *Osthi1* with the three conserved domains characteristic of plant thionins: a signal peptide, a mature thionin, and an acidic protein region (Fig. 1A) (Bohlmann 1999; Bohlmann and Apel 1991; Broekaert et al. 1997). The mature rice thionin contains 45 amino acids, including 6 consensus cysteine residues with a predicted pI of 8.77 (Fig. 1A).

To elucidate the genomic organization of *Osthi1*, DNA from *Oryza sativa* cv. Nipponbare was subjected to Southern blot analysis, first, with a common probe for the thionin region and second, with the 3' untranslated region (UTR) of *Osthi1* as a specific probe (Fig. 1A). The common probe detected approximately 10 signals in all digests, indicating that thionin genes

Corresponding author: Yuko Ohashi, National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan; Telephone: +81-298-38-7440; Fax: +81-298-38-7469; E-mail: yohashi@affrc.go.jp

compose a multigene family in rice. The specific probe detected approximately four bands in high stringency conditions, suggesting the *Osthi1* gene and several quite similar genes are contained in the rice genome (Fig. 1B).

Transcripts of endogenous rice thionin genes were found to be abundant in coleoptiles and rare in roots but not detectable at all in leaf blade and panicle, using the common probe under low stringency conditions (Fig. 1C, left panel). In 2-week-old rice seedlings, no transcript was found in leaf blade and leaf sheath treated with defense signal molecules salicylic acid (SA) and ethephon (ET), an ethylene-releasing compound. The level of the transcript was only increased in the leaf sheath at 24 h after jasmonic acid (JA) treatment (Fig. 1D, left panel). When the 3' UTR was used as the probe (Fig. 1C and D, right panel), very similar results were obtained, suggesting that the *Osthi1* gene and related genes are the major thionin genes expressed in rice coleoptile, the target organ of phytopathogenic

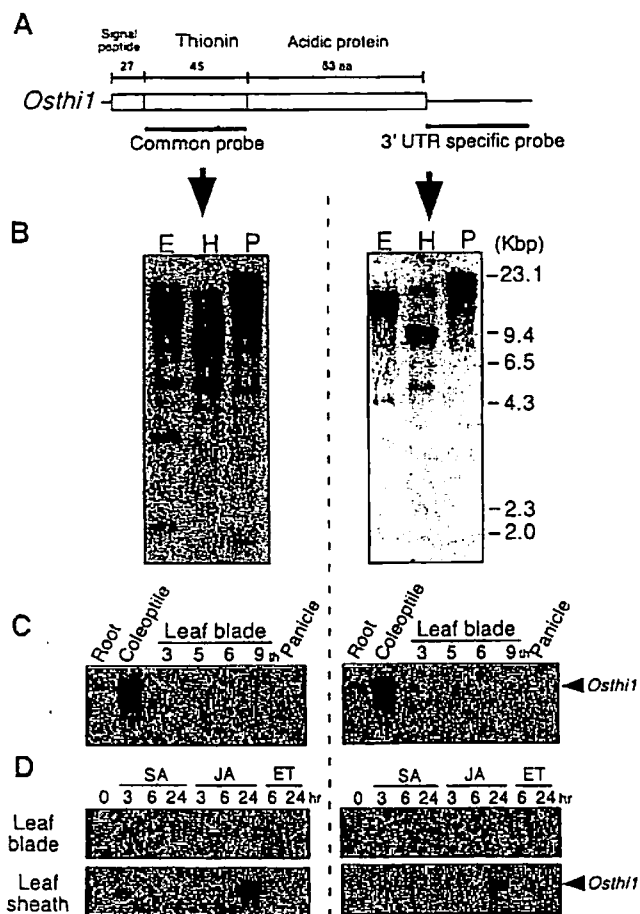


Fig. 1. Characterization of the rice thionin gene. A, The *Osthi1* gene encodes three conserved domains for plant thionins. B, Southern blot analysis was performed using genomic DNA (5  $\mu$ g) from *Oryza sativa* cv. Nipponbare after digestion with *EcoRI* (E), *HindIII* (H), and *PstI* (P), using a common probe corresponding to the mature thionin domain (left panel) and a specific probe corresponding to the 3' untranslated region (right panel). C, Total RNA (20  $\mu$ g) was subjected to RNA blot analysis using the common probe under low stringency conditions (two washes with 1 $\times$  SSC (0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) at 60°C for 20 min, left panel) and the specific probe under high stringency conditions (two washes with 0.1 $\times$  SSC and 0.1% SDS at 68°C for 20 min, right panel). Root from 2-week-old rice plant, coleoptile from 4-day-old etiolated plant, leaf blade from fully expanded leaf of the plant at each leaf stage, and panicle from 2-month-old plant. D, Total RNA (20  $\mu$ g) was subjected to RNA blot analysis as in C. Leaf blades and sheaths from the plant at 3.5 leaf stage were treated for 24 h with 3 mM salicylic acid (SA), 1 mM jasmonic acid (JA), and 1 mM ethephon (ET).

bacteria. However, seedlings of Japonica rice cultivars, including Nipponbare and Chiyohonami, are known to be vulnerable to seed-transmitted bacteria such as *B. plantarii* and *B. glumae*, indicating that expression of rice thionin genes, including *Osthi1*, did not protect against the infection.

#### Cloning and characterization of oat thionin genes.

As described above, the expression of endogenous thionin genes alone is not enough to prevent bacterial attack in rice plants. To obtain more effective antibacterial thionin genes, we selected as a genetic source the oat plant, a secondary crop that has been bred from weed and originally grew under aerobic conditions in upland fields.

The target organ of the two bacteria is coleoptile; therefore, we prepared a cDNA library ( $1.5 \times 10^5$  clones) of etiolated oat (*Avena sativa* cv. Zensin) seedlings. Using degenerate primers deduced from the signal sequence and C-terminal sequence of mature barley thionin, the fragments for the thionin genes were amplified from oat genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). Thus, we could isolate five full-length cDNA clones for putative thionin genes (*Asthi1* = 5) using the fragments as probes. DNA sequence analysis showed that they encode proteins with the three conserved domains of plant thionins. For example, *Asthi1* has 28 amino acids (aa) for the signal peptide, 46 aa for the mature thionin, and 63 aa for the acidic protein domain. In the mature thionin region, six cysteine residues (Fig. 2) and the thirteenth tyrosine residue (asterisk) are conserved in oat and other plant species, and two cysteine residues are conserved in barley, wheat, and oat. The amino acid sequence homology of a barley leaf thionin (DB4) to *Asthi1*, *Asthi2*, *Asthi3*, *Asthi4*, and *Asthi5* and *Osthi1* is 76, 78, 54, 65, 61, and 59%, respectively. Thus, *Asthi1* and *Asthi2* are most similar to the cell wall-bound barley leaf thionin DB4. The predicted pI of *Asthi1* and *Asthi2* calculated by GENETIX (Software Development Co., Tokyo) is the same, 9.13, which is the highest value among leaf thionins reported to date.

Comparison of the C-terminal amino acid sequences of mature thionin regions (Fig. 2) showed a clear divergence between the leaf-type (DYPK, green) sequence and the seed-type (PK, orange) sequence, which lacks the twenty-first amino acid of the leaf-type. *Asthi4*, *Asthi5*, *Osthi1*, *thi2.1*, and *thi2.2* are classified as other types, in which only the amino acid sequences of *Osthi1* and *Asthi5* share high homology (67% identity), lacking the thirty-eighth residue (dark blue). Thus, *Osthi1* may have different characteristics from leaf and seed thionins in localization or the antimicrobial spectrum.

The presence of eight or more thionin-related genes in the oat genome was revealed by DNA blot analysis using the thionin domain of *Asthi1* as probe (Fig. 3A). The level of *Asthi1* transcript was high in oat coleoptile but negligible in the first and second leaves of 2-week-old oat plants (Fig. 3B). A transient small increase was found in leaves 6 h after cutting, but SA treatment seemed to have no effect. Alternatively, methyl jasmonate (MeJA), a wound signal compound, clearly induced an accumulation of the *Asthi1* transcript at 6 h, with a peak at approximately 24 to 48 h. Thus, *Asthi1* differs from rice *Osthi1* in structure and in the expression profile in leaves.

#### Generation of transgenic rice plants overproducing *Asthi1*.

For overproduction in rice plant, we selected *Asthi1*, with a predicted pI value higher than that of *Asthi3* and of *Asthi4*, because the thionin with higher pI value was suggested to exhibit greater antimicrobial activity (Thevissen et al. 1996). We constructed a binary vector, pMLH7133-thionin, containing seven tandem repeats of the 0.2-kb *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S enhancer (E7), the  $\Omega$  sequence from *Tobacco mosaic virus*, and an intron of phaseolin (Mitsuhashi et al. 1996) 5'

upstream of the *Asthi1* gene. The hygromycin resistance gene was used as a selectable marker (Mochizuki et al. 1999). The vector was reported to confer a 70 times higher constitutive expression than the 35S *CaMV* promoter in pBI 121 in rice protoplasts (Mitsuhara et al. 1996).

By *Agrobacterium* species-mediated transformation, 41 hygromycin-resistant rice lines were generated with 20% efficiency from infected calli exhibiting a normal phenotype. In all T0 plants, we found a high level of *Asthi1* transcript by RNA blot analysis (data not shown). In *Hyg*<sup>r</sup> progeny (T1), we immunologically detected high levels of *Asthi1* (20 to 100 µg/g of fresh leaf) in 16 lines and low levels (10 to 20 µg per g of fresh leaf) in 3 lines. However, the progeny of 22 out of 41 regenerated lines (T0) showed no *Asthi1* accumulation or *Hyg*<sup>r</sup>, indicating that both the *Asthi1* and hygromycin resistance genes were likely silenced. We selected three representative T1 transgenic lines (2, 77, and 91) containing the highest levels of *Asthi1* and prepared homozygous progeny (T2) by selfing. Genomic DNA blot analysis showed the three selected lines to have a single copy of the transgene (Fig. 4B). All of the transgenic rice plants were likely normal in growth, fertility, and phenotype.

#### Accumulation and localization of *Asthi1* gene products in transgenic rice plants.

In the coleoptiles and immature leaves of 1-week-old T3 plants of lines 2 and 77, the level of introduced *Asthi1* gene transcript was as high as that of the endogenous *Asthi1* transcript in healthy oat coleoptiles, and the level was moderate in line 91 (Fig. 4C and D). In the three lines, the major endogenous rice thionin gene *Osthi1* was expressed abundantly in the coleoptiles but not in leaf blades, as was found in wild-type rice plants. In other words, the expression of *Osthi1* was not affected by the ectopic expression of *Asthi1*. Immunoblot analysis showed that the amount of *Asthi1* protein exceeded 100 µg per g fresh weight in the coleoptiles (Fig. 4E) and leaves (data not shown) of lines 2 and 77. Even the moderate expresser line 91 contained approximately 70 µg, equivalent of *Asthi1* per gram of coleoptile (Fig. 4E). To study the localization of the *Asthi1* protein, coleoptiles from 1-week-old seedlings of transgenic line 2 (T3) were homogenized, and the insoluble fraction containing the cell wall was subjected to

immunoblot analysis. A similar level of *Asthi1* was detected in the insoluble fraction as in the total extract, while no *Asthi1* was found in the soluble fraction (Fig. 4F). Thus, the oat leaf thionin *Asthi1* produced in transgenic rice plants was secreted outside cells and ionically bound to cell walls.

#### Evaluation of the resistance to rice bacterial diseases.

We evaluated the resistance of high-level *Asthi1* expressers against infection of two major seed-transmitted bacteria, *B. glumae* for both grain rot and seedling blight phenotypes and *B. plantarii* for bacterial seedling blight. First, we examined the resistance of the seed of first progeny lines (T1) and observed a considerable level of enhanced resistance in almost all lines tested (data not shown). Then the resistance of seed that are homozygous for the transgene was studied.

Wild-type and transgenic rice seed (T3) were soaked in a suspension of *B. glumae* (10<sup>6</sup> CFU/ml) and were sowed in sterilized soil. Browning or rotting was found in all 24 wild-type plants tested. However, all 24 high-level *Asthi1* expressers of lines 2 and 77 and all 24 moderate expressers of line 91 grew normally, as did the noninoculated wild-type rice plants (Fig. 5A). Although T3 plants of lines 2, 77, and 91 accumulated *Asthi1* at different levels (Fig. 4E), resistance to *B. glumae* was similarly high, suggesting that more than a threshold level of *Asthi1* is enough to confer the resistance to *B. glumae*.

Transgenic lines also resisted infection by *B. plantarii*. After the treatment of rice seed with bacteria at 10<sup>6</sup> CFU/ml, severe wilting and subsequent cell death occurred in all wild-type seedlings. Growth was limited to 1 to 2 cm at 5 days after germination in wild-type plants (Fig. 5B). However, in transgenic lines, no remarkable symptoms were found, and almost all plants grew like uninoculated wild-type plants, although growth was suppressed slightly. To examine the level of resistance quantitatively, we recovered the bacteria from the inoculated plants. Ten coleoptiles each from 1-week-old seedlings, which had been germinated for 3 days in the bacterial suspension, were homogenized with an aliquot of water, and the crude extract was plated on an agar medium containing tropolone (the toxin produced by *B. plantarii*) at 50 µg/ml. In wild-type seedlings, approximately 500 CFU of the bacteria was detected per mg of fresh coleoptile, compared with less than 10 CFU per mg in transgenic line 2 (Fig. 5B, bottom). In

Type	Gene	Plant	Mature thionin region										AAs	pI		
Leaf	• <i>Asthi1</i>	Oat	1	KS	KDIMARN	CYNV	21	RIPGTR	PRPV	ATT	CR	38	KIISGNK	PKDY	46	9.13
	• <i>Asthi2</i>	Oat	..	..	..TT	..	..	..	..	..	..	..	..	..	46	9.13
	• <i>Asthi3</i>	Oat	NT	..	..DI	..	..	..	..	..TFI	..	..	..	..I.TRR	46	8.04
	• <i>BTH6</i>	Barley	..	..	..TL	..	..	..	..	..	..	..	..	..	46	8.88
	• <i>DB4</i>	Barley	..	..	..ATL	..	..	..	..	..	..	..	..	..	46	8.88
	• <i>DG3</i>	Barley	..	..	..NTTG	..	..	..	..	..	..	..	..	..	46	8.89
Seed	• <i>α1-purothionin</i>	Wheat	..	..	..RTTLG	..	..	..	..	..	..	..	..	45	9.87	
	• <i>α2-purothionin</i>	Wheat	..	..	..RSTLG	..	..	..	..	..	..	..	..	45	9.87	
	• <i>α1-purothionin</i>	Barley	..	..	..RSTLG	..	..	..	..	..	..	..	..	45	9.87	
	• <i>α2-purothionin</i>	Barley	..	..	..RNTLG	..	..	..	..	..	..	..	..	45	9.52	
Others	• <i>Asthi4</i>	Oat	..	..	..STT	..	..	..	..	..	..	..	..	46	8.26	
	• <i>Asthi5</i>	Oat	..	..	..PSTS	..	..	..	..	..	..	..	..	45	8.46	
	• <i>Osthi1</i>	Rice	..	..	..PSTT	..	..	..	..	..	..	..	..	45	8.77	
	• <i>thi2.1</i>	Arb.	..	..	..IPSNQ	..	..	..	..	..	..	..	..	43	9.61	
• <i>thi2.2</i>	Arb.	..	..	..IPTKDD	..	..	..	..	..	..	..	..	46	8.49		

Fig. 2. Characteristics of oat leaf-specific thionin genes. A comparison of the mature thionin region of representative plant thionins. Leaf-type (shown in green), seed-type (orange) and other thionins were classified using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) by GENETIX 9.0 (Software Development Co., Tokyo). Conserved cysteine residues are shaded in lighter purple or blue. The conserved thirteenth tyrosine residue is marked with an asterisk. The sequences are from *BTH6* (Holtorf et al. 1995), *DB4* and *DG3* (Bohlmann and Apel 1987),  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-purothionin (Mak and Jones 1976),  $\alpha$ -hordothionin (Rodriguez et al. 1988), and *thi2.1* and *thi2.2* (Epple et al. 1995). The sequences of *Asthi1* through *Asthi5* (GenBank accession numbers AB072338 to AB072342) and *Osthi1* (accession number AB072337) are from the present study. AAs = number of amino acids. The calculated isoelectric point is given on the right.

the presence of tropolone, only *B. plantarii* could multiply in the medium, indicating that the data reflected the actual number of *B. plantarii* not disturbed by other bacteria.

The localization of the bacteria in the infected seedlings was examined microscopically. Sections of rice coleoptiles infected with *B. plantarii* were fixed, cut into cross-sections 15  $\mu$ m thick, and then subjected to Stoughton's double staining (Stoughton 1930), by which bacteria turn purple. In wild-type rice coleoptiles, the bacteria appeared to invade the inner tissue through stomata on the surface of the coleoptiles (red arrowhead in Fig. 5Ce and h), and accumulated in aerenchyma (black arrowheads in Fig. 5Cb) and the intercellular spaces (green arrowheads). However, in the coleoptiles of transgenic rice line 2, invasion of bacteria was completely blocked at the stomata (Fig. 5Cf and i), and no bacterium was found in the inner tissue (Fig. 5Cc). At higher magnification, we observed that the bacteria were likely restricted only on the surface of the stomata (Fig. 5Ci).

## DISCUSSION

In this study, overproduction of an oat leaf thionin resulted in the generation of transgenic rice plants with enhanced resistance to seed-transmitted soilborne bacteria. To our knowledge, this is the first report to show that ectopic expression of a monocotyledonous leaf thionin enhanced resistance to necrotrophic bacterial infection in rice, an economically important monocotyledonous plant. The level of resistance was high, and the bacteria were likely stopped at the surface of stomata in coleoptiles, which is the invasion site of *B. plantarii* (Fig. 5). Seed transmission of bacteria to the next generation could be protected in transgenic plants, because infection and multiplication of *B. glumae* and *B. plantarii* were considerably suppressed at the seedling stage. Furthermore, the grain rot phenotype caused by *B. glumae* at flowering stage also may be

protected. Thus, overproduction of Asth1 in rice plants would be useful for conferring enhanced resistance to bacterial diseases, especially in Asian countries where bacterial diseases are more serious because of the climate of high temperature and high humidity.

As the expressed gene, *Asth1* would be suitable for our purposes. The oat thionin gene possibly has evolved in oat plants that grow in aerobic soils on upland fields, acquiring resistance

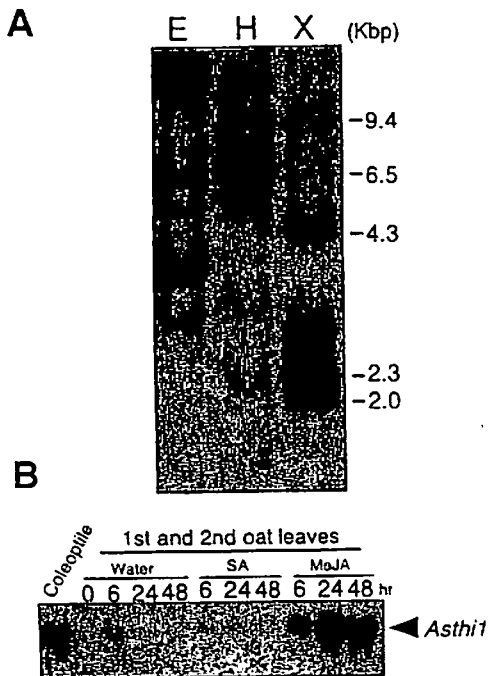


Fig. 3. Characterization of oat leaf thionin genes. A, Digested genomic DNA (5  $\mu$ g) from *Avena sativa* cv. Zensin was subjected to DNA blot analysis using the mature thionin domain of *Asth1* as probe. B, Poly(A) RNA (2  $\mu$ g) was subjected to RNA blot analysis. Coleoptiles were prepared from 5-day-old etiolated oat seedling. First and second leaves, treated with water, 50  $\mu$ M salicylic acid, and 50  $\mu$ M methyl jasmonate for the indicated time period, were prepared from 10-day-old oat seedlings.

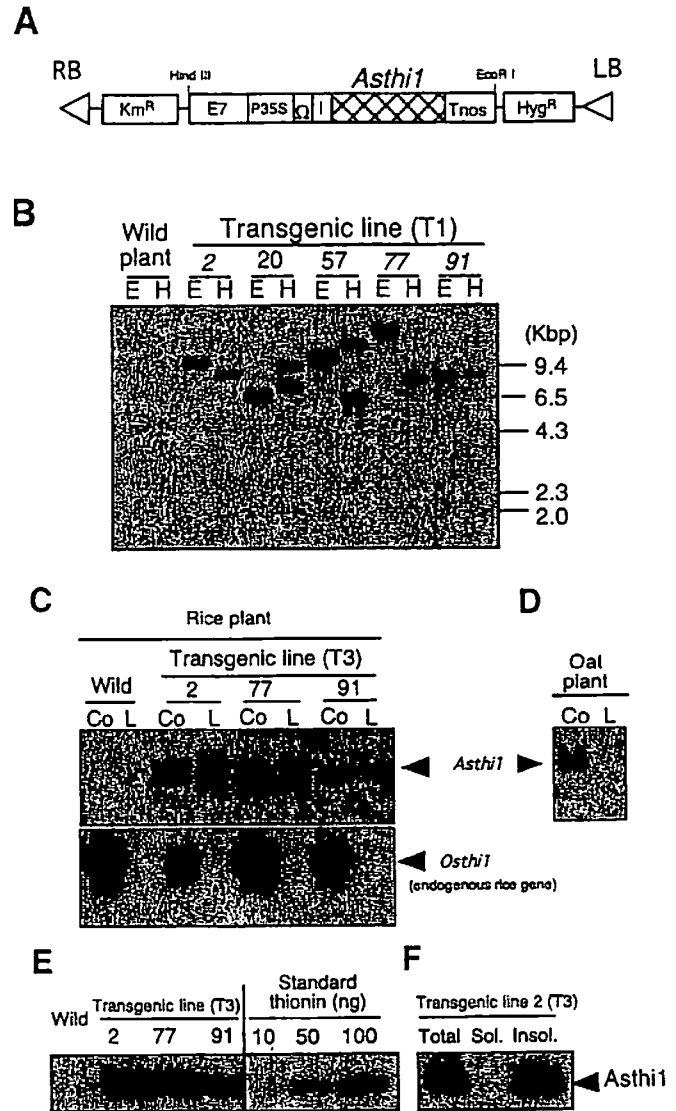


Fig. 4. Generation of transgenic rice plants overproducing *Asth1*. A, Construct of the introduced gene. B, Southern blot analysis of the *Asth1* gene in transgenic rice lines. Digested genomic DNA (5  $\mu$ g) was hybridized with the thionin region of *Asth1* as probe. C, Total RNA (20  $\mu$ g) from the coleoptile (Co) and leaf blade (L) of transgenic rice lines 2, 77, and 91 (T3) was subjected to Northern blot analysis using the thionin region of *Asth1* as probe under high stringency conditions (two washes with 0.1 $\times$  SSC [1 $\times$  SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate] and 0.1% sodium dodecyl sulfate at 68 $^{\circ}$ C for 20 min, upper panel) and the common probe of *Osth1* under low stringency conditions as shown in the legend of Figure 1C (lower panel). D, Levels of *Asth1* transcript in the coleoptiles of 5-day-old wild-type oat seedlings. E, Accumulation of *Asth1* protein in the coleoptiles of 5-day-old transgenic rice lines 2, 77, and 91. Synthetic *Asth1* was used as the standard. Polyclonal antibody against synthetic *Asth1* was prepared in rabbits and used as primary antibody. Crude protein extract corresponding to 1 mg of fresh coleoptile from transgenic lines was used in each lane. F, Localization of expressed *Asth1* protein. Coleoptiles from 1-week-old transgenic line 2 were homogenized and fractionated to soluble (sol.) and insoluble (insol.). Insoluble fraction mainly included the cell walls. An aliquot corresponding to 1 mg of fresh coleoptile was subjected to Western blot analysis.

to phytopathogenic aerobic bacteria such as *B. plantarii* and *B. glumae*. Interestingly, we could not find any *Asthi1*-type thionin genes in rice plant. The major thionin gene expressed in rice coleoptiles is *Osthi1*, which encodes a type of thionin different from that found in *Asthi1* (Fig. 2). Alternatively, in rice plants that have grown in paddy fields with anaerobic soil, thionin genes have evolved to protect against anaerobic bacteria but not aerobic bacteria, resulting in the lack of an *Asthi1*-type thionin gene. Thus, introduction of the oat *Asthi1* gene into rice plants conferred additive resistance to aerobic bacteria, aiding the normal growth of rice seedlings in upland soil.

We observed a predominant accumulation of the *Asthi1* protein in cell walls (Fig. 4) and restriction of the bacteria to the stomata of transgenic rice plants (Fig. 5), suggesting that *B. plantarii* first makes contact with the cell wall in rice coleoptiles and that cell wall-bound *Asthi1* effectively inhibits bacterial multiplication. Indeed, evidence indicating the importance of the cell wall in pathogen infection has been reported. In barley leaves resistant to powdery mildew infection, a localized accumulation of thionin in the cell wall at the infection site was detected immunoelectronically (Ebrahim et al. 1989; Ebrahim-Nesbat 1993), and Aldon and associates (2000) reported that contact between the bacteria and cell wall was necessary for the activation of bacterial virulence genes in *Arabidopsis* spp.

Use of the strong E7 $\Omega$ I promoter resulted in accumulation of 100  $\mu$ g or more of *Asthi1* protein per g of fresh coleoptile in transgenic lines (Fig. 4). *Asthi1* in transgenic rice plants was found to be ionically bound to the cell wall, which is the original target of the protein in oat plants. Cell walls would be the ideal place for the highly expressed *Asthi1* protein to accumulate. Actually, ectopic mass production of a foreign antibacterial peptide sarcotoxin 1A from fresh fly interior cells resulted in distorted plant growth and form (Okamoto et al. 1998), whereas secretion of the peptide outside cells resulted in normal growth and normal phenotypes with bacterial resistance (Mitsuhashi et al. 2000;

Ohshima et al. 1999). Thus, accumulation of *Asthi1* in the cell wall resulted in normal growth and fertility of transgenic rice plants, in addition to conferring bacterial resistance.

It has been reported that high levels of transgene expression frequently induces gene silencing, and this was the case in our experiments; 22 out of 41 transgenic rice lines (T0) exhibited transgene silencing in the next generation. However, the remaining 19 lines produced high levels of *Asthi1* protein in the later generations. The progeny of *Asthi1* homozygotes (lines 2, 77, and 91) stably accumulated high levels of *Asthi1* at all time points tested. Thus, we could select stable *Asthi1* overproducers, even if transgenic plants (T0) expressed a very high level of transgene transcript.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials and bacterial strains.

Rice seed (*Oryza sativa* cvs. Nipponbare and Chiyohonami) soaked in water overnight at 31°C was sown in soil (Bonsoll, Sumitomo Chemical Corp., Tokyo) and was grown in a greenhouse at 20 to 30°C. Oat plants (*Avena sativa* cv. Zenshin) were grown in the dark on moist vermiculite at 25°C for 5 days and then in a greenhouse for a week. *B. plantarii* (MAFF 301723), the cause of rice bacterial seedling blight disease, and *B. glumae* (MAFF 302554), the cause of grain rot disease in seedlings, were obtained from the MAFF collection (Tsukuba, Japan).

### RNA and DNA blot analysis.

Total RNA from rice plant materials was extracted by the aurin tricarboxylic acid method described by Nagy and associates (1988). Genomic DNA was isolated from oat and rice seedlings as described by Murray and Thompson (1980). RNA and DNA blot analysis were performed using the digoxigenin (DIG) nonradioactive nucleic acid labeling and detection sys-

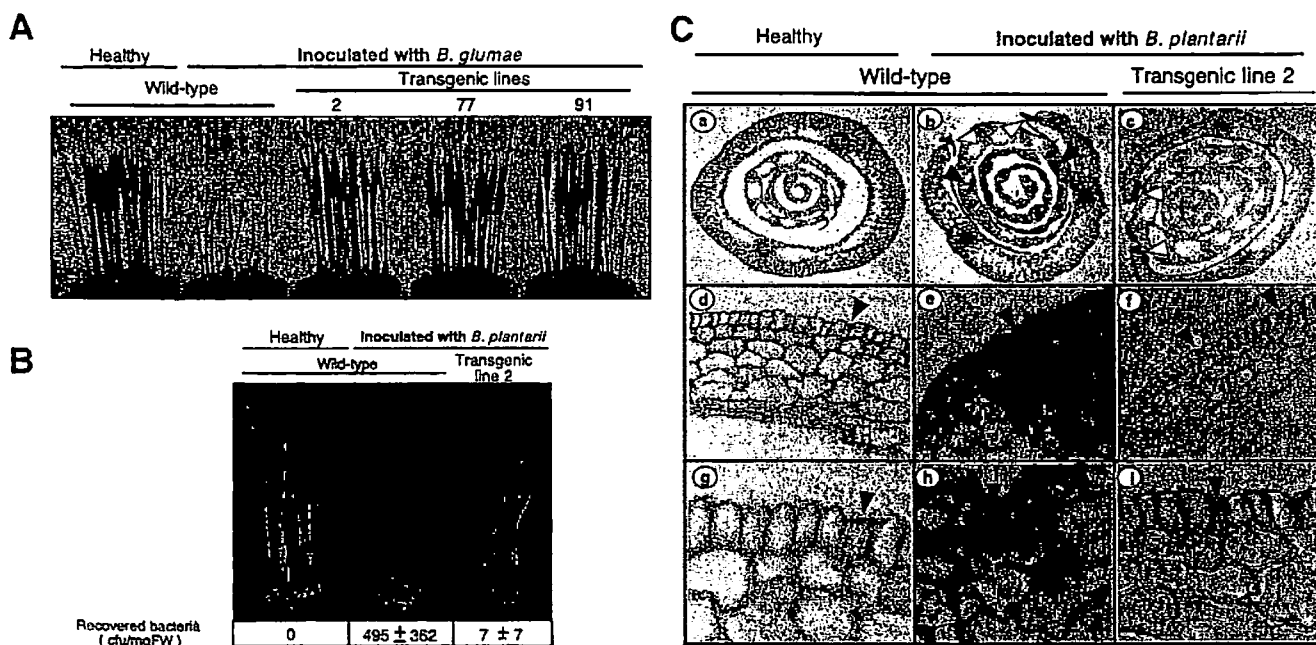


Fig. 5. Enhanced resistance to infection by necrotrophic bacteria in transgenic rice lines overproducing *Asthi1*. A, Phenotype of transgenic rice lines at 10 days after inoculation with *Burkholderia glumae*. B, Transgenic line 2 phenotype 10 days after inoculation with *B. plantarii*. The number of bacteria recovered from infected seedlings is shown at the bottom of the picture; crude extract of inoculated seedlings was spread on agar medium containing tropolone, the toxin produced by *B. plantarii*, at 50  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis) and colonies were enumerated 2 days after incubation at 27°C. C, Microscopic observation of *B. plantarii* in cross sections (15  $\mu$ m thick) of the inoculated rice seedlings. (a), (d), and (g): Coleoptiles in healthy wild-type seedlings. (b), (e), and (h): Wild-type coleoptiles inoculated with  $1 \times 10^6$  CFU/ml. (c), (f), and (i): Coleoptiles from inoculated transgenic line 2. Black arrowheads show the aerenchyma. Red arrowheads show the immature stomata on the surface of coleoptiles. Green arrowheads show bacteria accumulated in the intercellular spaces. White arrowheads show the nonspecific absorption of the bacteria at the cut sites that developed with coleoptile splits at the growth stage. All sections were stained by Stoughton's double staining method (Stoughton 1930), making the bacteria appear purple.

tem (Roshe, Mannheim, Germany) and following the manufacturer's instructions. Sequences of the primers for the *Osthi1* common probe (Fig. 1) are 5'-GCAAAGAGTTGTTGCCCAT-CC-3' and 5'-GGTATGGTGAACGTAAGG-3'. Those for the 3' UTR probe of *Osthi1* are 5'-AGCAAGTGCAACATGCAAGC-3' and 5'-CTTACGCAATGATATCATCA-3'.

#### Cloning of oat leaf thionin genes.

The DNA fragment corresponding to the thionin gene was amplified from oat genomic DNA by PCR using the primers 5'-GTTCTGCAGTCATACTGGGTTAGTTCTGGAGC-3' and 5'-GTAGTCTAGAATCAGTTTAGGATAGTC(A,C)CTAG(G,A)GC-3' under the following conditions: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min, and polymerase extension at 72°C for 2 min, for 30 cycles. The PCR fragments were subcloned into pUC18 by a standard method and were used for cDNA screening as probe. Poly (A) RNA was isolated from dark-grown etiolated oat seedlings using the FastTrack 2.0 kit (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). A cDNA library was constructed from 5 µg of poly (A) RNA using the TimeSaver cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, U.K.). cDNAs were ligated into λgt10 vector and then packaged into phage. Plaque hybridization was performed with the DIG nonradioactive nucleic acid labeling and detection system (Roshe), following the manufacturer's instructions.

#### Construction of the introduced gene.

We amplified the oat thionin cDNA by PCR using the primers 5'-CCAAGGATCCATGGGAAGTATCAAAGGTCTTAAAG-3' and 5'-GCATGAGCTCATTAGGCTGCAACTGATGCAACG-3' in which *Bam*HI and *Sac*I sites, respectively, were included. A binary vector, pMLH7133 (Mitsuhara et al. 1996), was digested with *Bam*HI and *Sac*I and the products ligated with the PCR product.

#### Generation of transgenic rice plants.

*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (a gift from E. Hood, Prodigene, TX, U.S.A.) was transformed with pMLH7133 as described by Holsters and associates (1978). Transformation of rice (cv. Chiyohonami) was performed as described by Tanaka and associates (2001) or Hiei and associates (1994), with some modifications.

#### Immunoblot analysis.

For localization of expressed *Asthi1* protein, coleoptiles from 1-week-old transgenic line 2 were homogenized and fractionated to soluble and insoluble fractions after centrifugation at 10,000 × g for 5 min. Insoluble fraction was washed three times with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1% Triton-X100 to remove thylakoid membranes, and soluble proteins were washed according to Reimann-Philipp and associates (1989). The resulting insoluble fraction mainly included the cell walls. Immunoblot analysis was performed as described by Epple and associates (1997).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by the research project COE (center of excellence) program of the National Institute of Agrobiological Science by Japan Science and Technology Corporation, and a grant-in-aid for scientific research on priority area (A) by the Ministry of Education, Science and Culture.

#### LITERATURE CITED

Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., and Genin, S. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia*

- solanacearum* pathogenicity genes. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 19:2304-2314.
- Bohlmann, H., and Apel, K. 1987. Isolation and characterization of complementary DNAs coding for leaf-specific thionins closely related to the endosperm-specific hordothionin of barley *Hordeum Vulgare* L. Mol. Gen. Genet. 207:446-454.
- Bohlmann, H. 1999. The role of thionins in the resistance of plants. Pages 207-234 in: Pathogenesis-Related Proteins in Plants. S. K. Datta and S. Muthukrishnan, eds. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Bohlmann, H., and Apel, K. 1991. Thionins. Pages 227-240 in: Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. W. R. Briggs, R. L. Jones, and V. Walbot, eds. Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.
- Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C., Reimann, P. U., Schrader, G., Barkholt, V., and Apel, K. 1988. Leaf-specific thionins of barley a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 7:1559-1566.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx Genoveva, W., and Osborn, R. W. 1997. Antimicrobial peptides from plants. Crit. Rev. Plant Sci. 16:297-323.
- Carmona, M. J., Molina, A., Fernandez, J. A., Lopez-Fando, J. J., and Garcia-Olmedo, F. 1993. Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant J. 3:457-462.
- Ebrahim, N. F., Behnke, S., Kleinhofs, A., and Apel, K. 1989. Cultivar-related differences in the distribution of cell-wall-bound thionins in compatible and incompatible interactions between barley and powdery mildew. Planta 179:203-210.
- Ebrahim-Nesbat, F., Bohl, S., Heitefuss, R., and Apel, K. 1993. Thionin in cell walls and papillae of barley in compatible and incompatible interactions with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 43:343-352.
- Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H. 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. Plant Physiol. 109:813-820.
- Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H. 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell 9:509-520.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J. 6:271-282.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., and Schell, J. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 163:182-187.
- Holtorf, S., Apel, K., and Bohlmann, H. 1995. Specific and different expression patterns of two members of the leaf thionin multigene family of barley in transgenic tobacco. Plant Sci. 111:27-37.
- Mak, A. S., and Jones, B. L. 1976. The amino acid sequence of wheat beta-purothionin. Can. J. Biochem. 54:835-842.
- Mitsuhara, I., Matsufuru, H., Ohshima, M., Kaku, H., Nakajima, Y., Murai, N., Natori, S., and Ohashi, Y. 2000. Induced expression of sarcotoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:860-868.
- Mitsuhara, I., Utagaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., and Ohashi, Y. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. Plant Cell Physiol. 37:49-59.
- Mochizuki, A., Nishizawa, Y., Onodera, H., Tabei, Y., Toki, S., Habu, Y., Utagaki, M., and Ohashi, Y. 1999. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. Entomol. Exp. Appl. 93:173-178.
- Molina, A., Goy, P. A., Fraile, A., Sanchez-Monge, R., and Garcia-Olmedo, F. 1993. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. Plant Sci. 92:169-177.
- Murray, H. G., and Thompson, F. W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4343.
- Nagy, F., Kay, S. A., and Chua, N.-N. 1988. Analysis of gene expression in transgenic plants. Pages 1-29 in: Plant Molecular Biology Manual. S. V. Gelvin and R. A. Schilperoord, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ohshima, M., Mitsuhara, I., Okamoto, M., Sawano, S., Nishiyama, K., Kaku, H., Natori, S., and Ohashi, Y. 1999. Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. J. Biochem. 125:431-435.
- Okamoto, M., Mitsuhara, I., Ohshima, M., Natori, S., and Ohashi, Y. 1998. Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA

- by GUS fusion in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 39:57-63.
- Reimann-Philipp, U., Schrader, G., Martionia, E., Barkholt, V., and Apel, K. 1989. Intracellular thionins of barley. *J. Biol. Chem.* 264:8978-8984.
- Rodriguez, P. P., Pintor, T. J. A., Carbonero, P., and Garcia, O. F. 1988. Nucleotide sequence and endosperm-specific expression of the structural gene for the toxin alpha hordothionin in barley *Hordeum vulgare* L. *Gene* 70:271-282.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Stevens, C., Titarenko, E., Hargreaves, J. A., and Gurr, S. J. 1996. Defense-related gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora (Septoria) nodorum* and barley (*Hordeum vulgare* L.) coleoptile cells. *Plant Mol. Biol.* 31:741-749.
- Stoughton, R. H. 1930. Thionin and orange G for the differential staining of bacteria and fungi in plant tissue. *Ann. Appl. Biol.* 17:162-164.
- Tanaka, H., Kayano, T., Ugaki, M., Shiobara, F., Onodera, H., Ono, K., Tagiri, A., Nishizawa, Y., and Shibuya, N. 2001. Ultra-fast transformation technique for monocotyledons. Patent Application. WO 01/06844 A1.
- Thevisse, K., Ghazi, A., De Samblanx Genoveva, W., Brownlee, C., Osborn, R. W., and Broekaert, W. F. 1996. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* 271:15018-15025.
- Vale, G. P., Torrigiani, E., Gatti, A., Delogu, G., Porta-Puglia, A., Vannacci, G., and Cattivelli, L. 1994. Activation of genes in barley roots in response to infection by two *Drechslera graminea* isolates. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44:207-215.

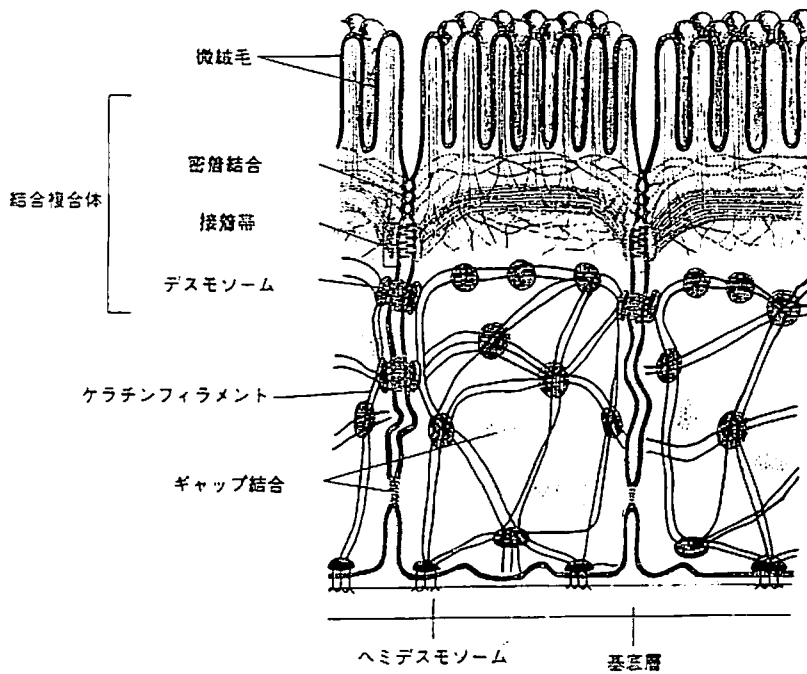


Fig. 19-18 動物上皮にみられる各種の細胞結合のまとめ。この図は小腸の上皮細胞に基づく。

の変化に応じてチャネルを開じるような、可逆的コンフォメーション変化をするゲートを備えたイオンチャネルである。このコンフォメーション変化を表す面白いモデルを Fig. 19-17 に示す。

ギャップ結合の透過性がpHによって調節できることが生理機能にどう役立っているかは、まだわからない。しかし $Ca^{2+}$ による調節については、意味がはっきりしている例を1つあげられる。細胞が損傷を受けると、その細胞膜は何でも通すようになり、細胞外液に高濃度で存在する $Ca^{2+}$ や $Na^{+}$ のようなイオンが細胞内に流入し、内部の大切な代謝産物がもれ出す。もしその細胞が健康な隣接細胞と共役したままだと、健康な細胞の物質組成も乱されてしまう。ところが、病んだ細胞に流入した $Ca^{2+}$ がギャップ結合のチャネルをただちに閉ざし、その細胞を孤立させ、損傷が広がるのを防ぐのである。

脊椎動物上皮層の細胞間に形成される各種の結合を、Fig. 19-18 にまとめた。細胞の頂端部では、細胞結合の相対的な位置関係はどの上皮でも変わらない。密着結合は細胞の頂端部を占め、次に接着帯、その次にデスマソームが並行して並び、これらが集まって“結合複合体”というべき構造を形成する。ギャップ結合と、列を作らないデスマソームには定位置がない。

植物では、ギャップ結合と同じ機能をプラスモデスムが担っている<sup>3</sup>

植物の組織は動物とは違った組み立てられ方をしている。植物細胞は、後述するセルロースに富んだ細胞外マトリックスからなる固い細胞壁の中に閉じこめられている。細胞壁のおかげで細胞をとどめておくための固定結合は必要ないが、別に直接的な細胞間の連絡機構が必要となる。そこで植物細胞には動物細胞と違い、細胞間結合は1種類しかない。ギャップ結合に似たプラスモデスムで、隣接細胞の細胞質を直接結びつける。

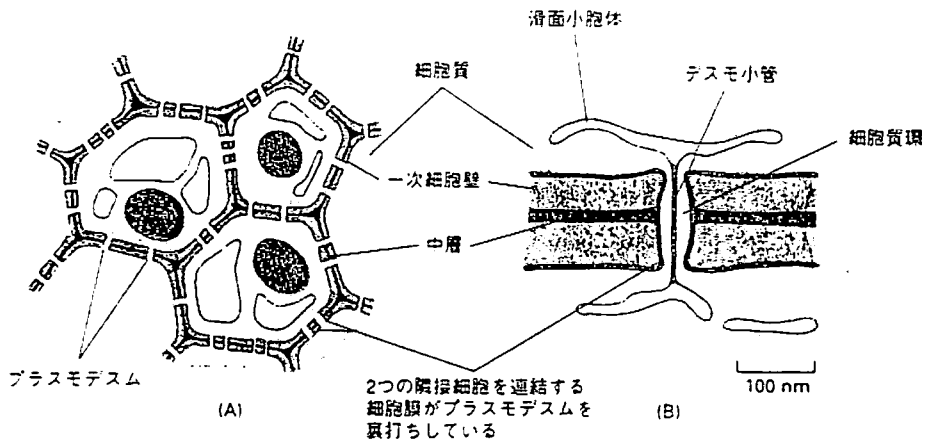


Fig. 19-19 プラスモデスム。(A) プラスモデスムは細胞壁を貫通する細胞質の細い通路であり、これが植物体の全細胞をつないでいる。(B) 各プラスモデスムを裏打ちしている膜は両側の細胞の膜と連続しており、その中を通常デスマ小管とよばれる滑面小胞体由来の細い管状構造も通っている。

植物では、隣接細胞間の細胞壁の厚みは最も薄い所でも  $0.1 \mu\text{m}$  あり、それを横切ったの連絡にはギャップ結合とはまったく違った構造がある。プラスモデスム (plasmodesma) はそのための構造である。高等植物では、特殊化した数種の細胞を除きほとんどの細胞が、両隣の細胞とプラスモデスムでつながっている。プラスモデスムでは、細胞質の細いチャンネルが細胞壁を貫通している。Fig. 19-19Aに示すように、隣接する細胞の細胞膜はプラスモデスムを介して続いており、2つの細胞の細胞質は直径20~40 nmほどの円筒形のチャンネルで連結している。したがって植物の細胞は、多くの細胞核が同じ細胞質を共有する多核細胞 (シンシチウム) を形成しているとみなすこともできる。大部分のプラスモデスムには小管の中央部を通る細い円筒様の構造があり、そこをデスマ小管 (desmotubule) とよぶ。これは両側の細胞の滑面小胞体と連結している (Fig. 19-19B, 20)。デスマ小管の外側と細胞膜でできた円筒状のチャンネル内面との間には細胞質があり、それを通じて小さい分子が細胞から細胞へ通過することができる。プラスモデスムは、細胞分裂での細胞質分裂時に新しく構築される細胞壁の中に作られる。発生中の細胞板 (第18章) を貫いて滑面小胞体が固定されると、そのまわりにプラスモデスムが形成される。

プラスモデスムとギャップ結合の構造はまったく違うが、機能はとてもよく似ている。種々の分子量のトレーサー分子を注入した実験から、プラスモデスムを自由に通過できるのは分子量800以下の分子とわかった。この分子量は、ギャップ結合の場合とほぼ同じである。ギャップ結合の場合と同じように、プラスモデスム経由の輸送も調節されている。たとえば色素を注入する実験では、プラスモデスムによって正常に連結しているように見える細胞間でも、低分子量の物質の移動がはばまれることもある。これらの場合、伝達を制限している調節機構はわからない。もっとも植物ウイルスの中には、プラスモデスムを広げて細胞から細胞へ移動し、それによって感染を広げるものがある。これらのウイルスはプラスモデスムの成分に結合する特殊なタンパク質を作り、チャンネルの孔の大きさを大幅に増加させるらしいが、このタンパク質の働き方は不明である。

## まとめ

組織内の多くの細胞は、細胞相互に、あるいは細胞外マトリックスと、細胞結合とよばれる特定の結合をしている。細胞結合は機能的に、閉塞結合、固定結合、連絡結合の3

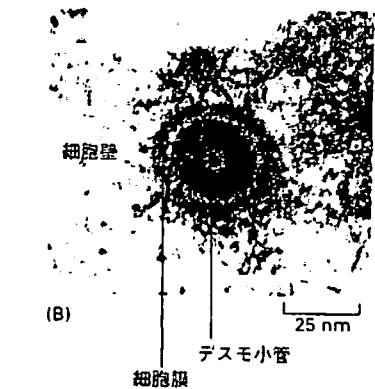


Fig. 19-20 プラスモデスムの電子顕微鏡写真。(A) 水生シダのプラスモデスムの縦断面。細胞膜が小孔の内張りをしており、次の細胞とつながっている。小胞体が中心を通るデスマ小管と連結しているようすが見られる。(B) 同じプラスモデスムの横断面。(写真提供: R. Overall)

## 黒田報告書の第1項に関する実験の概要

平成17年9月24日 作物研究所 黒田 秧

1 黒田報告書、2頁16行目以下に記述した、組換えイネの茎葉からディフェンシンが水中に溶出し抗菌活性を有するか否かについての2つの検証実験を、北陸研究センターが行った。

**実験1**：隔離圃場で栽培中の登熟期の組換えイネ (AD77) または非組換えイネ (対照、どんとこい) の茎葉を2日間 (48時間) 浸せきした水に含まれるディフェンシンおよび抗菌活性の有無の検証

**実験2**：隔離圃場で栽培中の登熟期の組換えイネ (AD77) または非組換えイネ (対照、どんとこい) の株元のくぼ地に溜まった水に含まれるディフェンシンの有無の検証

実験方法と結果の概要は以下のとおりである。

### 実験1

(1) 茎葉浸せき水に含まれるディフェンシンの有無の検証

#### 材料と方法

##### 実験区

- A：非組換えイネの茎葉 (8g) を超純水 (450ml) に浸し、10℃2日間処理 (図1A)
- B：組換えイネの茎葉 (8g) を超純水 (450ml) に浸し、10℃2日間処理 (図1B)
- C：組換えイネの茎葉 (8g) を約5センチに細断し、超純水 (450ml) に浸し、10℃2日間処理 (図1C)
- D：超純水 (450ml) を10℃2日間処理 (図1D)：茎葉浸せきなし



A B C D

図1 イネ茎葉の浸せき処理

上記の4試験区の水をそれぞれ0.45 $\mu$ mのホアサイズの滅菌フィルターで濾過した。なお、このフィルター使用の場合、精製したディフェンシンの水溶液が容易に通過することをあらかじめ電気泳動法で確認している (参考1)。

5mlの濾液を遠心乾燥機で濃縮乾固させ、このペレットを5 $\mu$ lの蒸留水で溶解し (1,000倍濃縮液)、このうちの1 $\mu$ lをSDS-PAGE電気泳動法により分画した。さらに、このサンプルの10倍希釈液 (100倍濃縮液に相当) および1,000倍希釈液 (濃縮せず、原液に相当) についても各1 $\mu$ lを供試して同様に電気泳動を行い、抗ディフェンシン抗体を用い

た抗原抗体反応による PVDF 膜上での発色 (免疫染色) を調べた。なお、陽性コントロールには精製したディフェンシンを  $25\text{ng}/\mu\text{l}$  供試した。

### 結果

図 2 に示すように、レーン 2 (精製したディフェンシンを  $25\text{ng}$  供試区) のみ陽性 (発色) を示し、ディフェンシンのシグナルに相当する蛋白質の存在が認められた。一方、茎葉を無細断または細断した試料はすべて陰性を示し、ディフェンシンは検出されなかった。

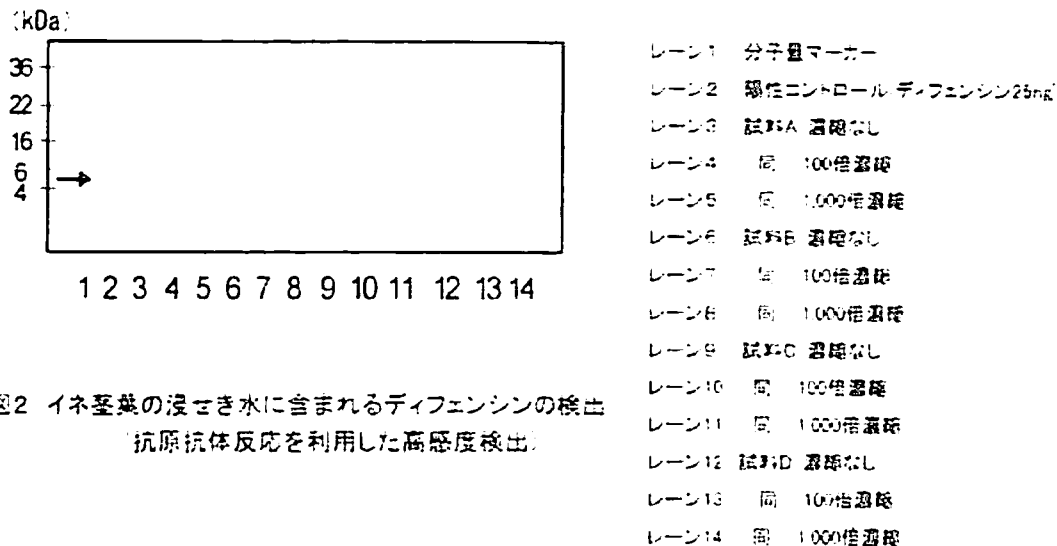


図2 イネ茎葉の浸せき水に含まれるディフェンシンの検出 (抗原抗体反応を利用した高感度検出)

### 考察

本実験において、組換え体イネおよび非組換え体イネの茎葉を浸せきした水に含まれるディフェンシンは、高感度の免疫染色法を用いても検出されなかった。従って、浸せき水の 1,000 倍濃縮液に含まれるディフェンシンは陽性コントロールに供試した  $25\text{ng}/\mu\text{l}$  (約  $5\mu\text{M}$ ) 以下であることから、浸せき水を濃縮しない原液のディフェンシン濃度は  $25\text{pg}/\mu\text{l}$  (約  $5\text{nM}$ ) 以下である。精製したディフェンシンを 5 分の 1 量の  $5\text{ng}/\mu\text{l}$  を電気泳動に供試しても明瞭な陽性反応 (発色) が確認されることから、浸せき水中にディフェンシンが溶出していると仮定した場合でも、 $5\text{pg}/\mu\text{l}$  (約  $1\text{nM}$ ) 以下と推定され、実態的には皆無と見なされる。

植物ディフェンシンに対する抵抗性変異株を *Neurospora crassa* や *Saccharomyces cerevisiae* から分離した実験の報告 (Thevissen et al. 2000, Ferket et al. 2003, Koo et al. 2004) では、それぞれ  $4\sim 10\mu\text{M}$  のディフェンシン濃度を含む寒天培地において変異株の出現が確認された。これらの報告で用いられたディフェンシン濃度は、本実験の浸せき水で推定された  $1\text{nM}$  以下と比較して、少なくとも 4,000 $\sim$ 10,000 倍の濃度に相当する。

### 参考文献

精製ディフェンシンの溶解水を  $0.45\mu\text{m}$  のポアサイズの滅菌フィルターで濾過し、濾液中のディフェンシンの存在を SDS-PAGE 電気泳動法で調べた (クーマシーブリリアントブルーで染色)。その結果、ディフェンシンは滅菌フィルターを容易に通過し、濾液中に含まれ

ることが確認された(図3)。



レーン 1	400ng 濾過フィルター未処理
レーン 2	同 処理
レーン 3	200ng 濾過フィルター未処理
レーン 4	同 処理
レーン 5	100ng 濾過フィルター未処理
レーン 6	同 処理
レーン 7	50ng 濾過フィルター未処理
レーン 8	同 処理
レーン 9	25ng 濾過フィルター未処理
レーン 10	同 処理

図3. フィルター濾過した精製ディフェンシンのSDS-PAGE電気泳動

(2) 浸せき水におけるいもち病菌の増殖抑止効果(抗菌活性)の有無の検証

材料と方法

(1)の実験で採取したフィルター濾過した浸せき水を供試した。あらかじめ3%寒天培地(低融点アガロース)を含むいもち病菌培養培地(PD培地)を調製し、オートクレープ後60°Cまで冷やした後、浸せき水A、B、Cおよび浸せき無しのD液をそれぞれ等量ずつ添加して混合した固形培地を作製した(寒天の最終濃度は1.5%)。各培地の中心にいもち病菌(レース007)を植菌し、25°C暗黒条件下で4日間培養して、いもち病菌の増殖程度を比較した。

結果

組換えイネの茎葉を細断せずに浸せきしたB区および細断して浸せきしたC区のいもち病菌の増殖程度は、非組換えイネを細断せずに浸せきしたA区と比較して差異が認められず、またイネの茎葉を浸せきしないD区との比較においても、いもち病菌の増殖抑制効果はまったく認められなかった(図4)。



B  
D

- A: 非組換えイネ(茎葉細断なし)
- B: 組換えイネ(茎葉細断なし)
- C: 組換えイネ(茎葉細断)
- D: 水のみ(茎葉浸せきせず)

図4. 茎葉浸せき水におけるいもち病菌の増殖程度の比較(培養4日後)

これらの結果より、組換えイネの茎葉を浸せきした水には、いもち病菌の増殖を抑制する効果はなく、抗菌活性は認められなかった。

## 実験2

### (1) 隔離圃場で栽培中の組換えイネの株元の水に含まれるディフェンシンの有無の検証

#### 材料と方法

隔離実験圃場で栽培中の組換えイネおよび非組換えイネの株元のくぼ地に溜まった水を採取した。この水（各5ml）に対し1,000×g、15分間の遠心分離を行って上清を採取した後、ポアサイズが0.45μmのフィルターで濾過し、濾液を遠心乾燥機で濃縮乾固させた。このペレットを5μlの蒸留水で溶解し（1,000倍濃縮に相当）、このうちの1μlをSDS-PAGE サンプルバッファーで混合しSDS-PAGE電気泳動法により分画した。さらに、このサンプルを10倍または1,000倍に希釈し、各1μlを用いて同様に電気泳動した後、抗ディフェンシン抗体を用いた抗原抗体反応によるPVDF膜上での発色（免疫染色）を調べた。また、陽性コントロールとして、精製したディフェンシンを25ng/μl供試した。

#### 結果

図5に示すように、レーン2（精製したディフェンシンを25ng供試区）のみ陽性（発色）を示し、ディフェンシンのシグナルに相当する蛋白質の存在が認められた。一方、組換えイネの株元に溜まった水を1,000倍に濃縮したレーン5は陰性を示した。また非組換えイネの株元の水を1,000倍に濃縮したレーン8も陰性を示し、すべての水田水からディフェンシンは検出されなかった。

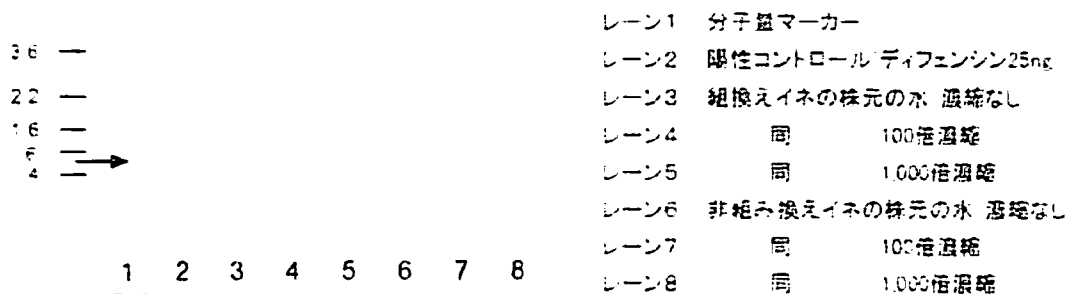


図5 隔離圃場のイネの株元に溜まった水に含まれるディフェンシンの検出  
（抗原抗体反応を利用した高感度検出）

#### 考察

本実験において、隔離圃場で栽培中の組換えイネおよび非組換えイネの株元に溜まった水からは、高感度の免疫染色法を用いてもディフェンシンは検出されなかった。従って、水田水の1,000倍濃縮液に含まれるディフェンシンは陽性コントロールに供試した25ng/μl（約5μM）以下であることから、採取した水田水を濃縮しない原液のディフェンシン濃度