

植物の過敏感細胞死における
液胞プロセッシング酵素の機能解明

初谷 紀幸

要旨

植物は我々と同じように常に病原体の攻撃にさらされている。しかし植物は本来、大多数の病原体に対して抵抗性を示し、ほんの一握りの病原体によってのみ病気になる。植物は動物に見られるような免疫システムによる生体防御機構はもっていないが、それとは異なる仕組みで病原体の攻撃から身を守っている。植物の典型的な防御機構として、感染組織における過敏感細胞死 (hypersensitive cell death) があげられる。感染を受けた細胞は急速に細胞死を起こすことで病原体を閉じ込め、抗菌性タンパク質やファイトアレキシンを蓄積して病原体の感染に抵抗する。過敏感細胞死は遺伝的にプログラムされた細胞死 (programmed cell death) であるが、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。動物のプログラム細胞死では、カスペース (caspase) と呼ばれるシステインプロテアーゼを実行因子とする細胞死機構が知られている。植物における過敏感細胞死にも類似した活性をもつプロテアーゼが関与することを示唆する結果が報告されている。それは、①細胞死の過程でカスペース活性が上昇する、②カスペース阻害剤が細胞死を抑制する、などである。これまで植物版カスペースの検索は精力的に行われてきたにもかかわらず、植物から動物のカスペースに相当する遺伝子の単離は報告されておらず、活性の実体は不明である。このような現状をふまえ、本研究ではタバコモザイクウイルス (tobacco mosaic virus, TMV) の感染によって誘導されるタバコの過敏感細胞死を解析し、液胞に局在する液胞プロセシング酵素 (vacuolar processing enzyme, VPE) が植物のカスペース-1 活性の実体であり、過敏感細胞死に関わる重要な酵素であることを証明した。これは動物には見られない、植物特有の液胞を中心とするプログラム細胞死の鍵を握る分子が初めて同定されたことにも意義がある。

過敏感細胞死に関わるカスペース-1 活性を持つプロテアーゼをタバコから同定するために、ビオチン標識したカスペース-1 阻害剤を TMV 感染葉に浸潤した。これにより細胞内で阻害剤と結合するカスペース-1 様プロテアーゼを検出することに成功し、このプロテアーゼが VPE であることを突き止めた。VPE は液胞に局在し、液胞へ輸送された不活性な前駆体タンパク質を活性型の成熟タンパク質に変換するシステインプロテアーゼである。驚いたことに、VPE の

阻害剤を TMV 感染葉に浸潤したところ、カスパー-1 阻害剤を浸潤した場合と同じように過敏感細胞死が抑えられた。

ウイルス誘発性遺伝子サイレンシングにより内在性の VPE 遺伝子の発現を抑制させた植物体を作製した。作製した植物体における VPE 活性とカスパー-1 活性について調べたところ、その両方の活性が共に低下していた。この結果は、植物におけるカスパー-1 活性の実体が VPE であることを示している。さらに、この植物体では TMV の感染による過敏感細胞死が顕著に抑えられた。これは液胞内のプロテアーゼである VPE が植物のプログラム細胞死において重要な役割を担っていることを端的に示している。タバコの VPE とヒトのカスパー-1 のアミノ酸配列を比較すると全体的にはほとんど相同性はないが、触媒部位や基質結合部位の形成に必須なアミノ酸に関してはほぼ保存されている。そのため、VPE はカスパー-1 と同等な活性をもつことができたと考えられる。

TMV に感染した葉の細胞を電子顕微鏡で観察したところ、葉に病斑が現れる前に、液胞膜が部分的に分解されることがわかった。ところが、VPE 遺伝子をサイレンシングした植物体では、液胞膜の分解は全く起こっていなかった。液胞膜の分解と細胞死の関係について調べるために、BCECF-AM という蛍光色素で液胞を染色した感染葉からプロトプラストを調製し、詳細に解析した。その結果、過敏感細胞死誘導前のプロトプラストでは、BCECF の蛍光は液胞に局在しているが、誘導後はその蛍光が液胞から細胞質に漏れ出ることが分かった。過敏感細胞死を起こした細胞はトリパンブルーで染色されるが、BCECF の液胞外への漏出はトリパンブルーで染色される前に起きていた。このことは細胞が死ぬ前に液胞膜の分解が起こることを示している。一方、VPE 遺伝子をサイレンシングした植物では、BCECF の蛍光は液胞に局在したままであった。この結果から VPE は細胞死の過程で液胞膜の分解を引き起こし、これによって細胞死が進むのではないかと考えられた。

同じカスパー活性を持つ酵素が、植物では液胞に存在し、一方、動物では細胞質ゾルに存在することは進化的に興味深い。植物は貪食細胞を持たず、細胞には細胞壁がある。そのため植物は動物と異なり、多様な分解酵素を含む液胞を破壊することで、自らを分解する戦術を獲得したと考えられる。今後、過敏感細胞死のみならず、老化や形態形成、発生過程の細胞死など様々なタイプの植物細胞死の研究に新たな視点を与えるものと期待される。

目次

要旨	2
序論	5
実験材料と方法	13
結果	22
考察	38
引用文献	46
謝辞	54

報文目録

報文

図 1-28

序論

植物は動物と違って、不都合な環境から逃げ出すことができない。そのため生育に不適切な環境変化に耐えていくための様々なしくみをもっている。植物は環境刺激に応答して遺伝子発現や代謝系をダイナミックに変動させ、ホメオスタシス、増殖・分化、生体防御などの生理機能を調節することで恒常的かつ基本的な生命活動を維持している。病原体の感染による病害は、植物の生存にとって致命的となりうる重大な環境ストレスの一つである。

植物は動物のような免疫応答機構を持たないが、植物独自の病原体に対抗する手段を発達させている。植物が外敵から身を守る手段として、細胞壁やクチクラ層の発達といった物理的手段や抗菌物質生産による化学的手段などがある。これらの防御手段は、外敵の存在の有無にかかわらず植物が先天的に備えているものであり静的抵抗性と呼ばれる。これとは別に動的抵抗性と呼ばれる手段があり、これは通常は発達が認められないが、外敵の侵入を認識することで、形態学的、生化学的な反応を始める。動的抵抗性が発動する時には、シグナル伝達に重要な役割を果たすサリチル酸 (salicylic acid: SA)、ジャスモン酸 (jasmonic acid: JA) やエチレンの生合成、さらに侵入してくる病原体を攻撃するためのファイトアレキシンの生合成など様々な代謝経路が活性化される。

防御手段としての細胞死

植物における最も代表的な動的抵抗反応として、過敏感反応 (hypersensitive response/reaction) がある (Goodman and Novacky, 1994)。この反応の開始にともない、防御システムにかかわる多くの遺伝子が活性化され、様々な代謝系が動き出すことが知られており (Greenberg et al., 1994; Greenberg, 1997; Pennell and Lamb, 1997)、それらの発現様式や機能解明に関する研究が精力的に行われている。現時点では不明な

点が多く存在するが、病原体感染による抵抗性誘導は以下に示すように展開する (Goodman and Novacky, 1994). 過敏反応は植物が病原体の侵入を認識することから始まる. 認識シグナルが細胞内に伝達されると, ごく早い時期に液胞や細胞外から細胞礎質への Ca^{2+} の流入, タンパク質のリン酸化と脱リン酸化などが起こり, さらに O_2^- や H_2O_2 などの活性酸素種が生成される. この活性酸素種の生成は一般的にオキシダティブバーストと呼ばれるもので, 細胞膜上に存在する NAD(P)H オキシダーゼの活性によるものとされている. 生成された活性酸素種は直接的な抗菌作用を有するだけではなく, 細胞壁のリグニン化や糖タンパク質架橋反応を促進し, さらにはファイトアレキシン生合成経路の活性化や感染時特異的タンパク質 (PR タンパク質: pathogenesis-related protein) 遺伝子の発現に関わるセカンドメッセンジャーとして機能していることが示されている. また, 過敏反応は感染細胞において過敏細胞死 (hypersensitive cell death) と呼ばれる自発的な細胞死を伴うことが知られている. 植物は過敏細胞死を起こした細胞に病原体を閉じ込め, 病原体が隣接する健全細胞へ拡がるのを阻止している.

植物の過敏細胞死と動物のアポトーシス

多細胞生物の生命は, 個体を構成する種々の細胞群の増殖と分化によるのみ維持されているのではなく, 積極的な細胞死によって巧妙に制御されている. このいわば自殺ともいえる細胞死がアポトーシス (apoptosis) である. アポトーシスは, 単なる細胞の受動的な崩壊過程として知られていたネクローシス (necrosis) とは異なり, 遺伝子によって制御された能動的な細胞死である. アポトーシスは個体発生における形態形成や神経系ネットワークの確立ばかりでなく, 成熟個体における細胞交替や内分泌系による恒常性の維持, 免疫系の成立などに重要な役割を果たしている. さらにアポトーシスは癌, 自己免疫疾患, エイズなどのウイルス感染症, アルツハイマー病などの神経変性疾患などの発症に密接に関わっていることが明らかになっている (田沼, 2001).

アポトーシスは現在, 細胞の形態学的変化と生化学的变化によって定義され

ている(田沼, 2001). アポトーシスを起こしている細胞の形態的特徴としては, 細胞表面の微繊毛が消失し平滑になり, 細胞が縮小する. 核内ではクロマチンが凝縮し, 核が断片化する. そして細胞自体が断片化してアポトーシス小体(apoptotic body)が形成され, マクロファージなどの食細胞や隣接する細胞によって貪食除去される. 顕著な生化学的な変化は, 核 DNA のヌクレオソーム単位での断片化である.

アポトーシスは, 便宜的に 3 つの過程に分けて考えられている. 最初は, 様々なアポトーシスシグナルによるアポトーシスの誘導機構である. そして次に, 細胞が自らの状態を総合的に判断してアポトーシスのスイッチを入れる決定機構である. ここで不帰点と呼ばれる不可逆点を通り抜けて, 最終的な実行機構に入る. アポトーシスの誘導機構と決定機構には, シグナルの種類あるいは細胞の種類と状態の違いによって多様性がみられるが, 実行機構はカスパーゼ(Caspase)と DNase による分解カスケードに収束すると考えられる. この実行機構において重要な働きをするカスパーゼは, 活性中心にシステインを持つシステインプロテイナーゼである. カスパーゼは細胞質に存在し, 最終的にヌクレアーゼを活性化することで, 核 DNA の断片化を引き起こす. 以上は, 線虫, ショウジョウバエ, 哺乳動物などを中心に詳細に研究されたアポトーシスの分子メカニズムの概要である(田沼, 2001).

最近の研究によって, 植物の抵抗性反応における過敏感細胞死は遺伝子に制御された細胞死(プログラム細胞死; programmed cell death)であり(Greenberg et al., 1994; Greenberg, 1997; Pennell and Lamb, 1997), 動物細胞におけるアポトーシスと似た一面をもつことが明らかになってきた. TMV の感染により過敏感細胞死を誘導しているタバコの細胞で, アポトーシス様の核 DNA の断片化が検出されている(Mittler et al., 1995; Mittler et al., 1997). このとき, 過敏感細胞死の形成に伴い, ヌクレアーゼの活性が誘導されることから(Mittler and Lam, 1995), ヌクレアーゼの誘導が核 DNA の断片化と深く関係しているのではないかと考えられている. ダイズにおいては, 非親和性細菌の接種や H_2O_2 処理によって誘導される細胞死の過程で核の凝縮や細胞の収縮, 核 DNA の断片化が起こることが報告されている(Levine et al., 1996). また, 非親和性のさび病菌の感染によって過敏感細胞死を起こしているエン麦の細胞では, 核

DNA のヌクレオソーム単位での断片化 (Ryerson and Heath, 1996; Tada et al., 2004) やクロマチンの凝集, 細胞質の断片化が検出されている (Tada et al., 2004). さらに, 動物細胞にアポトーシスを起こす *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* が産出する AAL 毒素を処理したトマト細胞において, 核の断片化に伴う DNA のラダー化とアポトーシス小体が検出されている (Wang et al., 1996). しかし, 植物にはマクロファージなどの食細胞がなく, また植物細胞は細胞壁をもつため, 動物細胞のように周りの細胞によって貪食されたりすることはない. 細胞死の形態的特徴は動物のアポトーシスと共通する部分があるものの, 異なる機構の存在が示唆されている.

植物におけるカスパーゼ様活性

動物のプログラム細胞死では, カスパーゼが鍵酵素として機能している. 植物にもカスパーゼは存在するのであろうか. 現在までに様々なシグナルで誘導される植物の細胞死でカスパーゼ様活性 (動物のカスパーゼと同じ基質を切断する活性) が検出されている. バクテリア感染により細胞死を誘導したタバコ (del Pozo and Lam, 1998), 一酸化窒素または過酸化水素により細胞死を誘導したシロイヌナズナ (Clarke et al., 2000), Isopentenyladenosine により細胞死を誘導したタバコ培養細胞 (Mlejnek and Prochazka, 2002) において, カスパーゼ-1 活性が検出され, 紫外線照射により細胞死を誘導したシロイヌナズナ (Danon et al., 2000), 熱ショックにより細胞死を誘導したタバコ培養細胞 (Tian et al., 2000) において, カスパーゼ-3 活性が検出されている. また動物にアポトーシスを誘導する薬剤の処理により, 細胞死を誘導したトマト培養細胞からはカスパーゼ-1 活性およびカスパーゼ-3 活性の両方が存在することが報告されている (De Jong et al., 2000). 一方, カスパーゼの阻害剤によって植物の細胞死 (del Pozo and Lam, 1998; Clarke et al., 2000; De Jong et al., 2000; Korthout et al., 2000) および細胞死に伴う核 DNA の断片化 (Sun et al., 1999; Zhao et al., 1999) が抑えられることも報告されている. これらの報告は動物と同じように植物の細胞死もカスパーゼ様の活性によって制御されていることを示唆しているものの, 植物ではカスパーゼのホモログが未だに同定されていない. しかしながら最近, 本研究室におけるシャジクモを用いた

実験から、カスパーゼ-1 活性が細胞質ではなく、液胞に局在していること、また、後述するシロイヌナズナの液胞プロセシング酵素 (VPE) がカスパーゼ-1 活性をもっていることが示された (黒柳, 2002)。現時点で、動物と植物に共通した細胞死機構が存在するのか、また植物に共通な細胞死機構が存在するのかは明らかでない。植物において、細胞死の機構を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。

液胞プロセシング酵素

液胞プロセシング酵素 (VPE) は、PAC 小胞 (Hara-Nishimura et al., 1985) によって液胞に輸送された種子貯蔵タンパク質のプロ型前駆体を成熟型に変換する酵素として発見された (Figure 1) (Hara-Nishimura et al., 1991)。VPE は種子貯蔵タンパク質と同様に、粗面小胞体 (rough endoplasmic reticulum, rER) で合成され、PAC 小胞を介して液胞へと運ばれる (Hiraiwa et al., 1993)。VPE はパパインやカテプシン B, H, L などの酵素とは相同性が認められず新規のシステインプロテイナーゼとして 1 つのファミリーを形成している (Hara-Nishimura, 1998)。これまでに報告のある植物由来の VPE は 2 つのグループに分かれる (Kinoshita et al., 1999)。一方のグループは種子などの貯蔵器官で発達しているタンパク質蓄積型液胞に局在する VPE を、他方は根や葉などの栄養器官で発達している分解型液胞に局在する VPE を含んでいる。高等植物の 2 種類の液胞にはそれぞれ特異的な VPE が存在することが明らかにされている。

モデル高等植物として用いられるシロイヌナズナからは 3 種類の VPE ホモログ (α VPE, β VPE, γ VPE) の遺伝子が単離されている (Kinoshita et al., 1995a, b)。 β VPE は種子で、 α VPE と γ VPE は葉や根などの栄養器官で発現しており、系統樹から予想されたとおり器官特異的に発現する (Kinoshita et al., 1999)。

タンパク質蓄積型液胞で発現している β VPE は種子貯蔵タンパク質をアスパラギン残基の C 末端側で切断し成熟型に変換する働きを持つ (Hara-Nishimura et al., 1991)。 β VPE によるプロセシングには貯蔵タンパク質を効率よく輸送し、限られた空間にできるだけ多量に蓄積するといった生理的な意義が考えられる (Hara-Nishimura et al., 1995)。また、酵母で発現させたヒマの cbVPE の活性化機構の解析から、VPE のホ

モログ間で保存されている Cys-83, His-180, Cys-222 の残基が活性に必須であること、不活性型のプロ型前駆体から活性をもつ成熟型への変換は自己触媒的に起こることがわかっている (Hiraiwa et al., 1997a). 一方、分解型液胞で発現している γ VPE の活性化機構は、まず酵素の活性中心を覆っている C 末端プロペプチドがプロ型前駆体から除去される。そして次に、N 末端プロペプチドが 46 番目のアスパラギンの C 末端側でプロセシングされて、成熟型になる。アスパラギンでのプロセシングは、アスパラギン残基に基質特異性を持つ VPE 自身によって行われる (Kuroyanagi et al., 2002).

TMV 感染で誘導されるタバコの過敏感細胞死

前述したように過敏感反応は植物が病原体の侵入を認識することから始まる。タバコからは TMV に対する特異的な受容体をコードする抵抗性「N」遺伝子が同定されている (Holmes, 1938; Weststeijn, 1981). タバコが N 遺伝子をもっている場合、そのタバコは TMV に対して抵抗性を示し、過敏感反応を誘導する。N 遺伝子がコードするタンパク質は N 末端側にヌクレオチド結合部位 (nucleotide-binding site; NBS) を、C 末端側にロイシンリッチリピート (leucine-rich repeat; LRR) をもつ構造をしており、細胞質内に局在すると考えられている (Whitham et al., 1994). NBS は ATPase や GTP 結合タンパク質などのヌクレオチド結合部位に保存されている配列であるが、どのようなヌクレオチドが結合し制御されているかなど、その機能は現在のところ明らかになっていない。LRR はロイシンを多く含むアミノ酸配列の繰り返しが存在する領域で、タンパク質-タンパク質相互作用に関係している。さらに、N 末端近傍には TIR (Toll/interleukin-1 receptor) ドメインをもつ。TIR ドメインはショウジョウバエの膜受容体である Toll や哺乳類のインターロイキン-1 レセプター (IL-1R) の細胞質ドメインと相同性を有する配列であり、下流へのシグナル伝達に機能していると考えられている。このことから N 遺伝子依存的に誘導される過敏感反応においても Toll や IL-1R と類似の情報伝達カスケードが存在する可能性が考えられるが、具体的に N 遺伝子産物がどのような機構で過敏感反応の情報伝達系に関わっているかは明らかになっていない。

TMV に感染したタバコが N 遺伝子依存的に過敏感反応を引き起こす系は過

敏感細胞死の機構を調べるのに適している。N 遺伝子の発現または N 遺伝子産物の機能は温度感受性(その機構は現在のところ明らかになっていない)である。N 遺伝子は 26~28 °C 以上の高温では働かず、感染した TMV は N 遺伝子をもたないタバコと同様に増殖を続け、植物体全身に拡がる。その結果、植物は衰退し、モザイク症状を呈す(Figure 2A)。一方、N 遺伝子は 26~28 °C 以下では働き、TMV 感染部位は速やかに過敏細胞死を引き起こし、小さな病斑として観察される(Figure 2B)。TMV は細胞死を起こした細胞内に閉じ込められ、植物は全身感染から免れる。この N 遺伝子の発現または N 遺伝子産物の機能が温度感受性であることを利用して、TMV を感染させたタバコを高温に維持し、ウイルスを十分に増殖させた後、そのタバコを低温に移すことにより同調的に病斑を誘導させることができる(Holmes, 1938; Weststeijn, 1981)。

感染防御における液胞の機能

高等植物の液胞(vacuole)は、単位膜で囲まれたオルガネラであり、動物のリソソーム(lysosome)に対応する。若い細胞中には小さい液胞が多数見られるが、細胞生長とともに小さな液胞は融合して大きな中央液胞(central vacuole)となる。成熟した細胞では細胞全容積中の相当部分を占め、植物細胞を特徴づける細胞内器官となる。液胞の役割として浸透圧の保持、代謝中間産物の貯蔵、老廃物の蓄積、不要物質の分解などが挙げられる。

植物は、動物の免疫系などのような感染防御のために特殊化した細胞・組織を持っていない。植物は、病原体の感染や昆虫による食害に遭った場合、素早く液胞に抗菌タンパク質を蓄積し、それ以上、感染や食害が拡大しないように液胞内に外敵から身を守る機構を備えている。そのような抗菌タンパク質として、PR タンパク質と呼ばれる一群の防御タンパク質の存在が知られている(Van Loon and Van Strien, 1999)。PR タンパク質はこれまでに 14 種類が同定されており、細胞外に分泌されて細胞間隙に蓄積するタイプと、液胞に蓄積するタイプがある。液胞に蓄積する PR-2 や PR-3 は細胞間隙に蓄積する PR-2 や PR-3 よりも抗菌活性が高いことが報告されている

(Sela-Buurlage et al., 1993). PR-2 は β -1,3 グルカナーゼ活性を, PR-3 はキチナーゼ活性をもち, 感染した病原菌の細胞壁を分解すると考えられている. (Kauffmann et al., 1987; Kombrink et al., 1988). また, 昆虫により食害を受けた植物体は, PR-6 に属するプロテアーゼインヒビター (PI) を液胞に蓄積する (Green and Ryan, 1972; Graham et al., 1985b; Graham et al., 1985a). この PI の多くはセリンプロテアーゼに対するインヒビターである. 一方, 昆虫の消化酵素はセリンプロテアーゼが多く, 植物の PI は昆虫が摂食した植物の葉の消化吸收を抑え, 昆虫の成長を抑制する働きがあると考えられている (Ryan, 1990). また液胞は抗菌タンパク質を蓄積するだけでなく, 高濃度の Ca^{2+} を蓄積している. 過敏反応のごく早い時期には細胞礎質の Ca^{2+} 濃度が上昇することが必須であるが, このとき液胞からの Ca^{2+} 流出が重要となる.

実験材料と方法

実験材料

実験材料として以下に示す 5 種類の植物体を用いた。

Nicotiana tabacum cv. Samsun nn (*nn* タバコ, *N* 遺伝子無)

N. tabacum cv. Samsun NN (*NN* タバコ, *N* 遺伝子有)

N. tabacum cv. SR1 (*N* 遺伝子無)

N. benthamiana (*N* 遺伝子有)

35S::*GFP* を形質転換した *N. benthamiana* (*N* 遺伝子有)

それぞれの植物体は 16 時間明所, 8 時間暗所, 26 °C で生育させた。実験には播種後 10~12 週間経過した植物体の完全に展開した葉 (第 5~7 葉) を使用した。

温度シフトを利用した同調的な病斑形成

N 遺伝子を持つタバコは, TMV の感染に対して抵抗性を示し, 過敏感細胞死を引き起こす。*N* 遺伝子/遺伝子産物が温度感受性である性質を利用して, 過敏感細胞死の指標となる病斑を同調的に形成させた (Ohtsubo et al., 1999)。TMV のタバコ葉への接種は, TMV (1~10 µg/mL) を 10 mM リン酸緩衝液 (Na-phosphate, pH 7.2) に懸濁し, カーボランダム (炭化ケイ素, 600 mesh) とともに展開葉の表面を摩擦することにより行った。TMV を接種したタバコの植物体を 30 °C で 40 時間維持し, ウイルスを接種部位で増殖・拡大させた後, 温度を 23 °C にシフトすることで, TMV 接種部位において病斑を同調的に誘導させた。

プロテアーゼ阻害剤の病斑形成に対する阻害効果

葉に TMV を接種したタバコ植物体を 30 °C で 40 時間維持した後, 感染葉を切断した。切断した感染葉に, 針のついていない注射筒を用いてプロテアーゼ阻害

剤を浸潤させ、30 °Cで1時間維持した後、温度を23 °Cにシフトした。以下に使用した阻害剤を示す。1 mM Ac-ESEN-CHO (Ac-Glu-Ser-Glu-Asn-aldehyde) (VPE 阻害剤, Peptide Institute), 0.25~1 mM Ac-YVAD-CHO (Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyde) (カスパーゼ-1 阻害剤, Peptide Institute), 1 mM Ac-DEVD-CHO (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde) (カスパーゼ-3 阻害剤, Peptide Institute), 1 mM ペプスタチン A (アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤, Peptide Institute), 1, 5 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride; セリンプロテアーゼ阻害剤, Sigma), 1 mM E-64 [(L-3-*trans*-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl agmatinine] (パパイン型システインプロテアーゼ阻害剤, Sigma)。

VPE cDNA の単離とシーケンス解析

シロイヌナズナ VPE のアミノ酸配列 (Kinoshita et al., 1995a, b) をもとに以下に示す 4 種類のディジェネレートプライマーを設計した。

Fwd1: (5'-TGGGCIRTIYTIBTIGCIGG-3')

Fwd2: (5'-CAYCARGCIGAYRTITGYCAYGC-3')

Rev3: (5'-ARRTSIRCRTCICKYTGRTT-3')

Rev4: (5'-CCARTCRTCIACIARIGG-3')

RNA の抽出は RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコールに従って行った。温度シフト後 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間の TMV 感染葉から抽出した全 RNA に DNase I を処理し、フェノール/クロロホルム抽出により全 RNA を精製した。70 °C で 30 分間熱処理した全 RNA (1 µg) に対して 50 µL の反応系で逆転写反応を行った。逆転写反応は Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech) と oligo-dT を用い、添付のプロトコールに従って行った。逆転写反応によって得られた cDNA を鋳型として Fwd1 と Rev4 を用いて PCR を行った。得られた cDNA 断片を鋳型として Fwd2 と Rev3 を用いて nested-PCR を行い、得られた cDNA 断片を T-ベクター; pT7Blue T-vector (Novagen) にクローニングし、塩基配列を決定した。シーケンス解析は DNA Sequencing Kit (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction, Applied Biosystems)を用いて行った。さらに、5'-Full RACE Core Setと3'-Full RACE Core Set (TaKaRa)を用いて5'RACE (Rapid amplification of cDNA ends)および3'RACEを行い、タバコ VPE の全長配列を決定した。RACE 法はそれぞれ添付のプロトコールに従って行った。

RT-PCR による mRNA 量の解析

RT-PCR は上記方法に従って行った。DNase I 処理をした全 RNA (2 µg) に対して 50 µL の反応系で逆転写反応を行った。逆転写反応によって得られた cDNA (2 µL) を鋳型として特異的プライマーを用いて PCR を行った。内部標準としてはアクチンを用いた。以下に設計した特異的プライマーの塩基配列を示す。

〈タバコ VPE に特異的なプライマー〉

NtVPE-1 Fwd: (5'-GGGTGGTCTCAAAGATGAGAACATTG-3')

NtVPE-1 Rev: (5'-GTATAGAGCATCCTTGCTG-3')

NtVPE-2 Fwd: (5'-AGGGCATCATGTTACAGCC-3')

NtVPE-2 Rev: (5'-GGGAAAGAGGATCATCCATTAGCTTC-3')

NtVPE-3 Fwd: (5'-AAGGAGTTATCATCAATAGTCCTGC-3')

NtVPE-3 Rev: (5'-GTACATGAACAGAGAATCCATACCC-3')

〈*N. benthamiana* VPE に特異的なプライマー〉

NbVPE-1a Fwd: (5'-CAGGCGGACGTGTGCCACGCG-3')

NbVPE-1a Rev: (5'-GGCGTCGCTTTGGTTGATAGCCGTTG-3')

NbVPE-1b Fwd: (5'-CAGGCGGATATGTGTCACGCA-3')

NbVPE-1b Rev: (5'-CGGCGTCGCGCTGATTGACAGCCGTT-3')

NbVPE Fwd: (5'-CAACTGTTGAAGAAGGGTGGTCTC-3')

NbVPE Rev: (5'-GATACTCGCAAGGAATTGTCATCC-3')

〈タバコの PR タンパク質に特異的なプライマー〉

acidic PR-1 Fwd: (5'-TAGTCATGGGATTTGTTCTC-3')

acidic PR-1 Rev: (5'-TCAGATCATAACATCAAGCTG-3')

basic PR-1 Fwd: (5'-GGGATACTCCACAACATTAG-3')

basic PR-1 Rev: (5'-CACATACATATACACACCTC-3')

〈タバコのアクチンに特異的なプライマー〉

Actin Fwd: (5'-ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA-3')

Actin Rev: (5'-GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG-3')

SDS-PAGE とイムノプロット解析

SDS-PAGE は Laemmli, 1970 の方法に準じて行った。タバコ葉を SDS-抽出緩衝液 [100 mM Tris-HCl, (pH 6.8), 4% (w/v) SDS and 12% (v/v) 2-mercaptoethanol] 中で破碎し, 遠心分離 (15000 g, 20 分間) 後, 上清を試料とした。試料は試料緩衝液 [100 mM Tris-HCl, (pH 6.8), 4% (w/v) SDS and 12% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.1 % BPB, 10% glycerol] に懸濁し, 95 °C で 5 分間熱処理を行った。その後, アクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動後, ゲル中のタンパク質は GVHP メンブレン (0.22 μm, Nihon Millipore) にセミドライブロッター装置 (Bio Craft) を用いて転写した。

タンパク質が転写されたメンブレンは 5% スキムミルクを含む TBST 緩衝液 [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % (w/v) Tween 20] で 1 時間ブロッキング処理した。特異抗体を含む TBST 緩衝液中でメンブレンを 1 時間反応させ, 一次抗体反応とした。以下に特異抗体の希釈率を示す。抗 VPE 抗体 (1:1000, [v/v] (Toyooka et al., 2000)), 抗 PR-1 抗体 (1:5000 (Yamakawa et al., 1998)), 抗 PR-2 抗体 (1:5000 (Yamakawa et al., 1998)), 抗 PR-3 抗体 (1:5000 (Yamakawa et al., 1998)), 抗 TMV-CP 抗体 (1:5000)。一次抗体処理後, TBST 緩衝液で洗浄した。二次抗体としてアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:5000, Amersham Pharmacia Biotech) を含む TBST で 30 分間反応させた。メンブレンを TBST 緩衝液で洗浄後, ECL (Enhanced Chemiluminescence) detection kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて各特異抗体と反応するタンパク質を検出した。

イムノディプレッション

タバコ葉を抽出緩衝液[10 mM Na-phosphate (pH 7.2), 130 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5mM ペプスタチン A, 5 mM PMSF, 0.5 mM E-64] 中で破碎し, 遠心分離 (15000 g, 20 分間) 後, 上清を試料とした. 試料は抗 VPE 抗体と 4 °C で一晩反応させた後, Protein G Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) を加えてさらに 4 °C で 4 時間反応させた. その後, 遠心分離 (15000 g, 5 分間) を行い, その上清をインヒビター・プロット解析に供した.

酵素活性測定法

活性測定には, α -(4-methyl-coumaryl-7-amide) (MCA) を結合させた 3 種類の蛍光基質を用いた. VPE の蛍光基質として Ac-ESEN-MCA (Acetyl-Glu-Ser-Glu-Asn-MCA) と z-AAN-MCA (Carbobenzoxy-Aln-Aln-Asn-MCA), カスパーゼ-1 の蛍光基質として Ac-YVAD-MCA (Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-MCA) を合成, あるいは購入した (Peptide Institute). タバコの葉を抽出緩衝液 [50 mM Na-acetate (pH 5.5), 50 mM NaCl, 1mM EDTA] 中で破碎し, 遠心分離 (15000 g, 20 分間) 後, 上清を試料とした. 試料は反応緩衝液 [100 mM Na-acetate (pH 5.5), 0.5 mM EDTA, 0.5 M dithiothreitol] 中で 1 時間プレインキュベートした. 各蛍光基質 (最終濃度 100~500 μ M) を加え, 反応を始めた. 反応により生じる蛍光強度を, 励起波長 405 または 360 nm, 吸収波長 465 または 460 nm の条件で蛍光分光光度計 (micro plate reader, GENios または TECAN RF-500, Shimadzu) により測定した.

酵素活性に及ぼす阻害剤の影響を調べる場合, 各阻害剤は基質を加える 1 時間前に加え, 反応緩衝液中で 1 時間プレインキュベートした. 蛍光強度の検出は前述した酵素活性の測定条件と同様に行った. 以下に使用した阻害剤を示す. 0.5 mM ペプスタチン A, 1, 5 mM PMSF, 0.5 mM E-64, 0.5~200 μ M biotin-xVAD-fmk (biotin-x-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) (カスパーゼ阻害剤, CALBIOKEM)

インヒビター・プロット解析

(1) *In vitro* 解析

タバコ葉を抽出緩衝液[50 mM Na-acetate (pH 5.5), 50 mM NaCl, 1mM EDTA]中で破碎し, 遠心分離(15000 g, 20 分間)後, 上清を試料とした. 試料は最終濃度 20 μ M の biotin-xVAD-fmk を加えて, 反応緩衝液[100 mM Na-acetate (pH 5.5), 0.5 mM EDTA, 0.5 M dithiothreitol]中で 30 分間インキュベートした. この試料を SDS-PAGE で分離し, GVHP メンブレン(0.22 μ m, Nihon Millipore)に転写した. メンブレンを 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキング処理, 洗浄後, スレプトアビジンを結合した西洋ワサビペルオキシダーゼ(3000 倍希釈)と 30 分間反応させた. 検出は ECL detection kit を用いて行った.

酵素-biotin-xVAD-fmk の複合体形成に及ぼす阻害剤の影響を調べる場合, 各阻害剤は biotin-xVAD-fmk を加える 1 時間前に加え, 反応緩衝液中で 1 時間プレインキュベートした. 以降の手順は前述した方法に従った. 以下に使用した阻害剤を示す. 0.5 mM ペプスタチン A, 5 mM PMSF, E-64, 1, 3, 5 mM Ac-YVAD-CHO, 1, 3, 5 mM Ac-DEVD-CHO, 1, 3, 5 mM Ac-ESEN-CHO

(2) *In vivo* 解析

温度シフトする 1 時間前に 1 mM biotin-xVAD-fmk を浸潤させ, 24 時間インキュベートした TMV 感染葉は, 破碎中に biotin-xVAD-fmk が酵素と複合体を形成するのを避けるために, SDS-抽出緩衝液中で破碎した. 上記方法に従って, 遠心分離後の上清を試料としてインヒビター・プロット解析を行った.

パルスフィールドゲル電気泳動法

タバコ葉を液体窒素で粉碎し, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M EDTA に溶解し, 等量の 1.4%低融点ゲル (NeSieve GTG Agaros; TaKaRa)/1 \times ET 緩衝液[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA]に包埋した. 包埋したゲルブロックを ESP 溶解緩衝液[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M EDTA, 1% (w/v) *N*-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 1mg/mL Proteinase K]中で 55 $^{\circ}$ C で 18 時間緩やかに浸透させた. 1 \times ET 緩衝

液で洗浄後, 0.5×TBE [44.5 mM Tris (pH 8.0), 44.5 mM boric acid, 0.001 M EDTA] 中で 1% アガロースゲルを用いて電気泳動した. 電気泳動装置は Bio-Rad CHEF Mapper apparatus (Bio-Rad) を用い, 泳動条件は, 電場の強さ (6V/cm), 電場の交差角度 (120 °C), パルスタイム (5.3~20.5), 泳動時間 (18 時間), 温度 (14 °C) で行った. 泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色した.

ウイルス誘発性遺伝子サイレンシング (viral-induced gene silencing; VIGS)

VIGS は

(<http://www.jic.bbsrc.ac.uk/sainsbury-lab/David-Baulcombe/dcbhome.htm>) に準じて行った. タバコ VPE と *N. benthamiana* VPE 間で保存されている 2 つの領域をもとに以下に示す 4 種類のプライマーを設計した.

(領域 1) Fwd: (5'-CCGTCGACGGAGTTATCATTAAATAGCCC-3')

(領域 1) Rev: (5'-CAGTCGACCCCAGCTACTCTCTTCAGC-3')

(領域 2) Fwd: (5'-CAGTCGACGAGGGTCTTCTTCCTGAAG-3')

(領域 2) Rev: (5'-CAGTCGACGATACTCGCAAGGAATTGTC-3')

領域 1 と領域 2 のそれぞれのプライマー対を用いて, クローニングした *NbVPE-1a* および *NbVPE-1b* を鋳型として PCR を行い, 得られた 4 種類の PCR 産物を Potato virus X (PVX) 由来のウイルスベクター (pgR107; 以下 pPVX) に挿入し, ヘルパープラスミド (pJIC SA_Rep) を持つアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) に導入した. また, GFP に対するプライマー Fwd:-

(5'-CAGTCGACCCATCTTCTTCAAGGACGAC-3') と (5'-CAGTCGAC

CATCCATGCCATGTGTAATC-3') を用いて, 上記方法に従って, 35S::GFP が形質転換された *N. benthamiana* から全 RNA を抽出し, RT-PCR を行い, 得られた PCR 産物を pPVX に挿入し, アグロバクテリウムに導入した. Ratcliff らの方法 (Ratcliff et al., 2001) に準じて, 背丈が 5~6cm くらいに生長した *N. benthamiana* の葉にアグロバクテリウムを針のついていない注射筒を用いて浸潤させることによって感染させ, 目的の cDNA を挿入した pPVX を植物に導入した.

透過型電子顕微鏡観察

試料の作製は Hara-Nishimura ら(1993)の方法に準じて行った。

N. benthamiana の葉は、固定液[4%(w/v)パラホルムアルデヒド, 1%(w/v)グルタルアルデヒド, 0.05 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4, TAAB Laboratories Equipment Ltd)]に浸し、減圧処理を行い、固定液を組織に浸透させた。その後、2~4 時間室温で放置し固定した。試料をカコジル酸緩衝液で洗浄し、0.5% 四酸化オスミウム溶液で 4 時間、後固定を行った。1% 酢酸ウラン溶液中に 2 時間置き、ブロック染色を行った。試料を 50%(v/v)エタノール溶液で洗浄後、50, 70, 80, 90, 99, 100%のエタノール溶液に置換し脱水した。100% 酸化プロピレンに置換した後、50%(v/v) Epon 樹脂 (TAAB 社) / 酸化プロピレンに置き換えた。アスピレーター中で一晩置き、酸化プロピレンを揮発させた後、100% エポン樹脂に置換した。60 °C で 3 日間置き、樹脂を重合させ包埋した。マイクローム (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems) で超薄切片 (50~80 nm) を作製し、銅グリッド (VECO 社) に固定した。グリッド上の試料は、1~2%(w/v) 酢酸ウラン液 (関東化学) とクエン酸鉛溶液 [2.7%(w/v) 硝酸鉛 (TAAB 社) および 3.5%(w/v) クエン酸ナトリウムの混合溶液] で染色し、透過型電子顕微鏡 (1200EX, JEOL Ltd.) を使用して、80kV で検鏡を行った。

プロトプラストの調整と BCECF の蛍光観察

プロトプラストの調整は Yamada ら(2001)の方法に準じて行った。 *N.*

benthamiana の葉を、酵素液 [1% (w/v) cellulase Onozuka-RS (Yakult, Tokyo), 0.1% (w/v) pectolyase Y-23 (Seishin, Tokyo), 25 mM Tris-MES (pH 5.5), 0.55 M mannitol] に浸し、減圧処理を行い、酵素液を組織に浸透させた。その後、1 時間室温で振とうし、細胞壁を分解した。遊離したプロトプラストはミラクロスで濾過し、濾液を遠心分離 (700 g, 5 分間) した。上清は 0.55 M mannitol を含む 25 mM Tris-MES (pH 5.5) 溶液に再懸濁し、プロトプラスト溶液とした。3'-O-acetyl-2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-4 or

5-carboxyfluorescein, diacetoxymethyl ester (BCECF-AM)は、温度シフトする1日前に針のついていない注射筒を用いて葉に浸潤させた。BCECFの蛍光は共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss, Germany)を使用して、励起フィルター 465-505 nm, 蛍光フィルター BP500-550(Carl Zeiss, Germany)を用いて観察した。

***N. tabacum* cv. SR1**における病斑形成

N. tabacum cv. SR1 は *N* 遺伝子を持っていないため、TMV に対して罹病性であり、過敏感細胞死を誘導することが出来ない。*N* 遺伝子を持たない植物にも抵抗性反応を誘導させることができる変異トマトモザイクウイルス(ToMV, TL-CYZ および TL-27/77) (Saito et al., 1989)を用いて SR1 に過敏感細胞死を誘導させた。変異 ToMV の感染は *in vitro* 転写によって合成した RNA 溶液を、カーボランダムとともに展開葉の表面に摩擦することにより行った。変異 ToMV が挿入されたプラスミドからの *in vitro* 転写は T7 RNA ポリメラーゼ(TaKaRa)を用いて添付のプロトコールに従って行った。

β -Glucuronidase (GUS) 染色

GUS 染色は Jefferson ら(1987)の方法に準じて行った。試料は染色液[1 μ mol/mL X-gluc, 0.5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0.5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 0.3%(w/v) TritonX-100, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0)]に浸し、減圧処理を行い、細胞間隙に染色液を浸透させた後、37 °Cで一晩インキュベートした。染色後、70 および 100% エタノールで組織よりクロロフィルを脱色し、かつ固定を行った。

結果

TMV 感染による過敏感細胞死

TMV 感染葉における過敏感細胞死は病斑として観察することができる。N 遺伝子をもつタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN; NN タバコ) の展開葉に TMV を接種し、30 °C で 40 時間維持した後、温度を 23 °C にシフトすることによって、同調的に誘導される病斑を観察した。TMV 接種部位において、温度シフト後、6 時間目までは全く変化が見られないが、9 時間目頃から徐々に病斑が形成され始め、24 時間目には発達した病斑が観察された (Figure 3)。一方、N 遺伝子をもたないタバコ (*N. tabacum* cv. Samsun nn; nn タバコ) では TMV 接種後に同様な温度処理をしても NN タバコで観察されたような病斑は全く形成されず、接種後 2~3 週間目には Figure 2A に示すように、植物は衰退し、モザイク症状を呈した。

タバコ VPE ホモログのクローニング

シロイヌナズナ VPE のアミノ酸配列 (Kinoshita et al., 1995a, b) を比較し、良く保存されている 4 箇所をディジェネレートプライマー (Fwd1, Fwd2, Rev3, Rev4) を設計した。NN タバコから過敏感反応の過程で発現している VPE ホモログを RT-PCR によって単離するために、温度シフト後 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間目の TMV 感染葉から全 RNA を抽出し、逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として Fwd1 と Rev4 を用いて PCR を行い、さらに Fwd2 と Rev3 を用いて nested-PCR を行った結果、約 870 bp の cDNA 断片が増幅された。この cDNA 断片を T-ベクターにクローニングし、塩基配列を決定したところ、4 種類の VPEcDNA 断片が得られた。次に 5'RACE および 3'RACE を行い、4 種類すべての VPE の全長配列を決定し、それぞれ、*NtVPE-1a* (Figure 4-1), *NtVPE-1b* (Figure 4-2), *NtVPE-2* (Figure 4-3), *NtVPE-3* (Figure 4-4) と名

付けた。

NtVPE-1a, *NtVPE-1b*, *NtVPE-2*, *NtVPE-3* 遺伝子にコードされているタンパク質はそれぞれ 490, 489, 484, 481 アミノ酸からなり, 推定分子量はそれぞれ 54162, 54045, 53365, 53196 Da と予想された。これら 4 つのタバコ VPE 間のアミノ酸配列を比較すると少なくとも 69% 以上の相同性があり (Figure 5A), いずれも N 末端に疎水性アミノ酸に富むシグナル領域をもっていた。酵母で発現させたヒマ cbVPE の活性化機構の解析から明らかにされた (Hiraiwa et al., 1999) 活性に必須な 2 つのシステイン残基と 1 つのヒスチジン残基は, タバコ VPE すべてにおいて保存されていた (Figure 4, 赤字)。植物由来の VPE は 2 つのグループ (種子タイプと栄養器官タイプ) に分けることができる (Kinoshita et al., 1999)。これまでに見つかっている植物由来の 10 種類の VPE に, 本研究で単離した 4 つのタバコ VPE を加えて系統樹を作成した (Figure 5B)。TMV 感染葉から単離したタバコ VPE は, すべて老化や傷害, サリチル酸処理で発現が誘導されるシロイヌナズナの α VPE や γ VPE と同じ栄養器官タイプに属し, γ VPE とは 64% 以上の相同性があった (Figure 5A)。

VPE は TMV の感染によって誘導される

TMV の感染に伴うタバコ VPE の発現量の経時変化を RT-PCR 法を用いて調べるために, Figure 4 の下線で示した箇所で *NtVPE-1*, *NtVPE-2*, *NtVPE-3* 遺伝子それぞれに特異的なプライマーを設計した。設計したプライマーの特異性を調べた結果, それぞれのプライマーは, 各々の *NtVPE* 遺伝子にアニーリングすることがわかった (Figure 6A)。*NtVPE-1a* と *NtVPE-1b* は塩基レベルでの相同性が非常に高く, 2 つを区別できる特異的なプライマーは設計することが出来なかった。

葉に TMV を接種した植物体を 30 °C で 40 時間維持した後, 温度を 23 °C にシフトしてから 0, 1, 3, 6, 9, 12 時間後の感染葉から全 RMA を抽出し, 設計したプライマーを用いて, RT-PCR を行った (Figure 6B)。RT-PCR は鋳型の濃度を一定にし, *NtVPE* 間でサイクル数を違えて行った。*NtVPE-1* の場合は 25 サイクル, *NtVPE-2* と

NtVPE-3 の場合は 28 サイクルで行った。NN タバコにおいて、3 種類の *NtVPE* の発現量を比較すると *NtVPE-1* が最も多かった。また *NtVPE* すべての発現量が温度シフト後 1 時間で最大となり、その後は徐々に減少し温度シフト後 12 時間ではほとんど検出されない程度であった (Figure 6B, C)。一方, mock でも温度シフト後, わずかに発現量の増加がみられた。この増加は TMV 感染に伴い全身的に抵抗性反応が誘導されたためではないかと考えられた。また *nn* タバコでは TMV 感染に伴う *NtVPE* の発現量の変化はほとんどみられなかった。病原体の感染により過敏感反応を誘導している組織では, PR タンパク質と呼ばれる一群の防御タンパク質が合成されることが知られており (Van Loon and Van Strien, 1999), この PR タンパク質は感染時におけるマーカーとして良く実験に用いられている。Figure 6B, C に示すように NN タバコにおける PR-1 の発現量は温度シフト後に増加し始め, 12 時間目までは断続的に増加し続けていた。*NtVPE* の発現と PR-1 の発現の経時変化を比較すると, *NtVPE* は PR-1 に先立って発現することがわかった (Figure 6B, C)。

次に TMV の感染に伴うタバコ VPE のタンパク質量の経時変化をイムノブロット法を用いて調べた。NN タバコにおいて, *NtVPE* のタンパク質量は, 温度シフト後増加し続け, 3 時間で最大となった。その後は徐々に減少し, 温度シフト後 12 時間目では基底レベルにまで減少していた (Figure 7A, B)。*NtVPE* のタンパク質量の変化は, 対応する *NtVPE* 遺伝子の発現量の変化と類似していた。RT-PCR の結果と同様に *NtVPE* のタンパク質は PR タンパク質に先立って発現していた。また, NN タバコにおいて病斑は温度シフト後 9 時間目頃から形成されるが (Figure 3), *NtVPE* は病斑の形成に先立って誘導されることがわかった (Figure 6B, C)。一方, mock では温度シフト後, わずかに発現量の増加がみられたが, この増加は前述した RT-PCR の結果と同様に感染に伴い全身的に抵抗性反応が誘導されたためではないかと考えられた。また *nn* タバコでは TMV 感染に伴う *NtVPE* のタンパク質量の変化はほとんどみられなかった。これらの結果から VPE は過敏感反応の初期に誘導されることが明らかとなった。

組織レベルにおける VPE の発現

シロイヌナズナの γ VPE 遺伝子のプロモーターと GUS 遺伝子のキメラ遺伝子を導入した形質転換タバコ (*N. tabacum* cv. SR1) を用いて、ウイルス感染に伴う VPE 遺伝子の発現を組織レベルで調べた。SR1 は N 遺伝子を持っていないため、TMV に対して罹病性であり、過敏感細胞死を誘導することが出来ない。そのため本実験では N 遺伝子非依存的に過敏感細胞死を誘導させることができる変異トマトモザイクウイルス (ToMV, TL-CYZ および TL-27/77) (Saito et al., 1989) を用いて SR1 に病斑を形成させた。変異 ToMV による病斑は、接種後 48 時間目頃から徐々に形成され始め、72 時間目にははっきりとスポット状に形成された。SR1 の展開葉一枚を 6 区画に分け、12 時間間隔で変異 ToMV を接種し、感染葉全体を GUS 染色した。Figure 8 は GUS 染色した一枚の葉の中で、接種後 0, 36, 72 時間目の部分を実体顕微鏡で観察した結果を示す。接種後 72 時間目の葉では、病斑の周囲が青色に染色されているのが観察された (Figure 8)。また接種後 36 時間目の葉では、スポット状に青く染色されており (Figure 8)、その部分に病斑が形成されるのではないかと考えられた。この GUS 染色の結果は、病斑の形成に先立って γ VPE 遺伝子が発現していることを示しており、前述した *NtVPE* 遺伝子が病斑の形成に先立って発現している結果と一致した。

カスパーゼ-1 阻害剤および VPE 阻害剤は TMV 感染による過敏感細胞死を阻害する

植物のプログラム細胞死ではカスパーゼ様の活性をもったプロテアーゼが関与していることが示唆されている。(del Pozo and Lam, 1998; Sun et al., 1999; Zhao et al., 1999; Clarke et al., 2000; Danon et al., 2000; De Jong et al., 2000; Korthout et al., 2000; Tian et al., 2000; Mlejnek and Prochazka, 2002)。そこで TMV 感染で誘導される過敏感細胞死の過程にもカスパーゼ様活性をもつプロテアーゼが関わっているのかを明らかにするために、過敏感細胞死におけるカスパーゼ阻害剤の影響を調べた。TMV を接種した NN タバコ植物体を 30 °C で 40 時間維持した後、温度を 23 °C にシフトすると、Figure 9, control に示すようにシフト後 24 時間で典型的な病斑が形成された。温度シフトする 1 時間前にカスパーゼ-1 阻害剤 (Ac-YVAD-CHO) を TMV 接種部位に浸

潤させると病斑の形成が抑えられることがわかった (Figure 9). この結果から植物の過敏感細胞死にも、動物と同様にカスパーゼ様の活性をもつプロテアーゼが関与していることが示唆された.

カスパーゼと同じシステインプロテアーゼである VPE は老化や傷害そして死に向かう細胞で発現が誘導される (Kinoshita et al., 1999). また昆虫細胞で発現させたシロイヌナズナ VPE にカスパーゼ-1 活性があることが明らかにされている (黒柳, 2002). そこで過敏感細胞死における VPE 阻害剤 (Ac-ESEN-CHO) の影響を調べた. 温度シフトする 1 時間前に Ac-ESEN-CHO を TMV 接種部位に浸潤させると Ac-YVAD-CHO 同様に病斑の形成が抑えられた (Figure 9). しかし, Ac-ESEN-CHO による阻害効果は Ac-YVAD-CHO による阻害効果よりも弱かった. これは, Ac-ESEN-CHO が構造上不安定であるためと考えられた. 一方, E-64 (パパイン型システインプロテアーゼ阻害剤) によって多少病斑の形成が抑えられたが, カスパーゼ-3 阻害剤である Ac-DEVD-CHO, ペプスタチン A (アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤), PMSF (セリンプロテアーゼ阻害剤) では全く抑えられなかった. これらの結果は, 植物の過敏感細胞死にはカスパーゼ様活性と VPE 活性によって制御される機構が存在することが示唆された.

TMV 感染に伴う VPE 活性とカスパーゼ-1 活性

TMV 感染後のタバコ葉におけるカスパーゼ-1 活性と VPE 活性を, それぞれに特異的な蛍光基質 (Ac-YVAD-MCA および Ac-ESEN-MCA) を用いて測定した. TMV を感染させた *NN* タバコ葉におけるカスパーゼ-1 活性は, 温度シフト後急速に増加し続け, 3 時間で最大レベルに達し, 病斑の形成とともに低下した (Figure 10A). 一方, 興味深いことに VPE 活性の経時変動は, カスパーゼ-1 活性の経時変動によく似ており, 温度シフト後 3 時間で最大レベルに達した (Figure 10B). また, *mock* におけるカスパーゼ-1 活性と VPE 活性はともに弱く, また TMV を感染させた *nn* タバコ葉においては, どちらの活性も全く増加しなかった. この結果はカスパーゼ-1 活性と VPE 活性が過敏感細胞死に先立って誘導されることを示している.

過敏細胞死を制御するカスパーゼ-1 活性の実体は VPE である

過敏反応で検出されるカスパーゼ-1 活性をもつプロテアーゼを同定するために、ビオチン標識した非可逆的なカスパーゼ阻害剤 biotin-xVAD-fmk を用いたインヒビター・ブロット法を開発した。カスパーゼ活性をもつプロテアーゼは xVAD を基質として認識する。また、フロロメチルケトン (fmk) はプロテアーゼの触媒部位に活性中心をブロックするように共有結合する。この性質により、ビオチン標識した xVAD-fmk とプロテアーゼとが 1:1 で結合し、複合体を形成する。この酵素・阻害剤の複合体は、SDS-PAGE 後、メンブレンにブロットし、ビオチンと特異的に結合するアビジンで検出することができる。Figure 11A に示すように biotin-xVAD-fmk は温度シフトする 1 時間前に TMV 接種部位に浸潤させることにより、Ac-YVAD-CHO 同様に病斑の形成を抑えた。TMV 接種部位に浸潤させた biotin-xVAD-fmk は細胞内で何らかのプロテアーゼと結合し、酵素・阻害剤の複合体を形成していることが期待された。その複合体を検出するために、biotin-xVAD-fmk を温度シフトする 1 時間前に浸潤し 24 時間インキュベートした後サンプリングし、*In vivo* インヒビター・ブロット解析を行った。その結果、biotin-xVAD-fmk を浸潤した葉からのみ分子量 40, 38 および 23 kDa の 3 つのバンドが特異的にブロット上で検出された (Figure 11, レーン 1)。

In vivo インヒビター・ブロット解析で検出された 3 つのタンパク質の性質を明らかにするために、酵素・阻害剤の複合体形成における様々なプロテアーゼ阻害剤の影響を調べた (Figure 12A)。温度シフト後 3~6 時間目の感染葉から抽出した粗抽出液に biotin-xVAD-fmk を加え、*In vitro* インヒビター・ブロット解析を行った。その結果、*In vivo* インヒビター・ブロット解析と同様に分子量 40, 38 および 23 kDa の 3 つのバンドがブロット上で検出された (Figure 12A, レーン 1)。biotin-xVAD-fmk を加える前に予め競争剤として Ac-YVAD-CHO (1, 3, 5 mM) を処理すると、40 kDa と 38 kDa のバンドが完全に消失した (Figure 12A, レーン 5, 8 および 11)。このことから、40 kDa と 38 kDa のタンパク質は VAD 配列を認識するプロテアーゼであることが考えられた。一方、23 kDa のバンドは Ac-YVAD-CHO 処理によって消失しなかった。このバンドはパピイン

型システインプロテアーゼの阻害剤である E-64 処理で完全に消失した. このことから 23 kDa のタンパク質は, biotin-xVAD-fmk の fmk と非特異的に結合する (Schotte et al., 1999) パパイン型システインプロテアーゼであると考えられた. さらに, 40 kDa と 38 kDa バンドのシグナル強度は VPE の阻害剤である Ac-ESEN-CHO (1, 3, 5 mM) の処理により, 濃度依存的に減少した (Figure 12A, レーン 5, 8 および 11). Ac-ESEN-CHO は Ac-YVAD-CHO よりも酵素・阻害剤の複合体形成を阻害する能力が弱かった. この結果は, Ac-YVAD-CHO が Ac-ESEN-CHO よりも病斑を強く阻害したという Figure 9 の結果に矛盾しない. また, ペプスタチン A, PMSF, E-64 および Ac-DEVD-CHO のいずれもが, 40 kDa または 38 kDa と biotin-xVAD-fmk との複合体形成を阻害しなかった. 本研究室における研究から昆虫細胞で発現させたシロイヌナズナ VPE の活性はこれらの阻害剤で阻害されないことが明らかになっている (黒柳, 2002). これらの結果は, 40 kDa と 38 kDa のタンパク質がカスパーゼ様の活性をもっていることを示しており, そのタンパク質が VPE であることを示唆している.

そこで, 40 kDa と 38 kDa のタンパク質が VPE であるかを調べるために, TMV を感染させたタバコ葉から抽出した粗抽出液を試料とし, VPE 抗体を用いてイムノブロット解析を行った. その結果, 40 kDa と 38 kDa のバンドが検出され, インヒビター・ブロット解析で検出された 2 つのタンパク質がそれぞれ VPE の中間型と成熟型であることが強く示唆された (Figure 12B) (Hiraiwa et al., 1999; Kuroyanagi et al., 2002). また, イムノブロット解析で検出された 50 kDa タンパク質は VPE のプロ型前駆体である可能性が考えられた. さらに, イムノディプレッション後の試料で *In vitro* インヒビター・ブロット解析を行った結果, Figure 12C に示すように, 40 kDa と 38 kDa のバンドのシグナル強度がともに減少した. これらの結果から, 40 kDa と 38 kDa のタンパク質は VPE であり, VPE が過敏感細胞死に関わるカスパーゼ-1 活性をもつプロテアーゼであることが明らかとなった.

TMV 感染で誘導される VPE 活性はカスパーゼ阻害剤で完全に抑えられる

NV タバコ葉における VPE 活性は温度シフト後増加し 3 時間で最大となった

(Figure 10B). この VPE 活性に対するカスパーゼ阻害剤 (biotin-YVAD-fmk) の影響を調べたところ, biotin-YVAD-fmk の濃度が 50 μM では VPE 活性がほぼ完全に抑えられ, 5 μM の濃度でも, 36%にまで抑えられた (Figure 13). この濃度による阻害の程度は, 動物のカスパーゼ-1 活性に対する阻害の程度と一致した (Schumann et al., 1998). 一方, ペプスタチン A (0.5 mM), PMSF (1 および 5 mM) および E-64 (0.5 mM) は, VPE 活性を全く抑えなかった. これらの結果から, Figure 10 および Figure 11A で示したようなカスパーゼ-1 阻害剤 (Ac-YVAD-CHO および biotin-xVAD-fmk) によって TMV 感染による病斑の形成が抑えられた結果は, カスパーゼ-1 阻害剤が VPE 活性を阻害したためであると考えられた.

植物 VPE とヒトカスパーゼ-1 の構造比較

Figure 14A はタバコ VPE (NtVPE-1) とヒトのカスパーゼ-1 (hcaspace) の構造を比較したものである. VPE もカスパーゼ-1 も不活性のプロ型前駆体で合成され, 活性をもつ成熟型に変換されるシステインプロテアーゼである (Hara-Nishimura et al., 1995; Cohen, 1997; Hiraiwa et al., 1997a). VPE とカスパーゼ-1 の全アミノ酸配列を比較しても, 相同性は高くない. ところが, 活性に重要な限られた領域に関しては, 類似しており, 構造的な特性を共有している (Figure 14B). Figure 14B はタバコ VPE を含むこれまでに報告されている植物由来の 10 種類の栄養器官型 VPE とヒトのカスパーゼ-1 の構造を比較したものである. VPE の触媒部位は赤色で示したヒスチジンとシステインであることが報告されている (Hiraiwa et al., 1999). これら 2 つの残基はカスパーゼ-1 の触媒部位であるヒスチジン-237 とシステイン-285 に対応している (Cohen, 1997; Nicholson, 1999). さらに, カスパーゼ-1 の基質結合部位を形成するのに必要な 4 つのアミノ酸, アルギニン-179, グルタミン-283, アルギニン-341, セリン-347 (Wilson et al., 1994; Nicholson, 1999) も VPE 間で保存されている (Figure 14B, 青字). VPE が形成する基質結合部位がカスパーゼ-1 の基質結合部位と似ていることは, VPE がカスパーゼ-1 阻害剤に結合するという結果と合致している.

VPE は TMV 感染による過敏感細胞死の初期過程で機能している

インヒビター・ブロット法で検出できる 40 kDa と 38 kDa のタンパク質は VPE の中間型と成熟型である (Figure 12B). 中間型と成熟型はともに活性型であるため, 2 本のバンドの濃さは VPE の活性強度を現す. インヒビター・ブロット法を用いて TMV 感染に伴う活性型 VPE 量の経時変化を調べた. 温度シフト後 0, 1, 3, 6, 9, 12 時間目の感染葉から抽出した粗抽出液に biotin-xVAD-fmk を加え, *In vitro* インヒビター・ブロット解析を行った (Figure 15). *NN* タバコにおいて, 活性型 VPE 量は, 温度シフト後増加し続け 3 時間で最大となり, その後は減少した. 一方, *mock* では温度シフト後わずかに発現量が増加したが, *nn* タバコではほとんど増加しなかった. これらの結果から, 活性型 VPE が過敏感細胞死の初期過程に誘導されることが分かった.

VPE は過敏感細胞死の初期過程に働いていることが考えられ, 温度シフト後, 時間をおいてから Ac-YVAD-CHO を処理した場合, 病斑の形成が阻害されないことが期待された. この仮説を調べるために, 温度シフトする 1 時間前, 温度シフトしてから 0, 1, 3, 6, 9, 12 時間後に Ac-YVAD-CHO を浸潤させ, 病斑の形成を観察した. その結果, TMV 感染による病斑の形成は, 阻害剤を温度シフト後 1 時間目までに浸潤させた場合は完全に阻害されたが, 温度シフトしてから 3 時間後に浸潤させた場合には, わずかに阻害される程度であった (Figure 16). さらに, 阻害剤を温度シフトしてから 6 時間目以降に浸潤させた場合は病斑の形成は全く阻害されなかった. これらの結果から, VPE は *NN* タバコにおいて, TMV 感染による過敏感細胞死の初期過程で機能していることが示唆された.

ウイルス誘発性遺伝子サイレンシング (VIGS) を用いた遺伝子の発現抑制

VPE が植物におけるカスパーゼ-1 活性を担っており, 過敏感細胞死を制御する重要なプロテアーゼであることを *in planta* で証明するために, ウイルス誘発性遺伝子サイレンシング (viral-induced gene silencing; VIGS) システムを用いて内在性の VPE 遺伝子の発現を抑制させることを考えた. そこでまず初めに効率よく VIGS を誘導させ

るための条件を検討した。

細胞はその活動に不適切な RNA を選択的に分解する仕組みを備えている。植物にウイルスが感染すると、細胞にとって好ましくないウイルス由来の RNA (mRNA や RNA ウイルスのゲノム RNA) が大量に生産される。そこで感染細胞は VIGS を誘導し、ウイルス RNA を駆除しようとする。植物 RNA ウイルスは複製過程で、ウイルスゲノムに対して相補的な RNA を合成する。この二本鎖 RNA を認識し、標的とする VIGS が誘導される。一方、ウイルスは VIGS による増殖抑制に対抗するために、VIGS の誘導を抑えるサプレッサーを発現させる。

ジャガイモ X ウイルス (PVX) は VIGS に対するサプレッサーを発現しないか、あるいは発現が弱い。また、*N. benthamiana* は PVX の感染に対して効率良く VIGS を誘導することができる植物である。そのため、VIGS を利用して内在性の遺伝子の発現を抑制させる場合、その遺伝子を挿入した PVX を *N. benthamiana* に感染させる方法が適しており、最も頻繁に用いられている。最近では、VIGS を効率良く誘導することができる PVX 由来のウイルスベクター (Figure 17A; pPVX) が開発されており、標的遺伝子の塩基配列を挿入した pPVX をアグロバクテリウムを介して、*N. benthamiana* に導入することによって比較的容易に標的遺伝子の発現を抑制させることが可能となっている。

N. benthamiana の葉は、UV 照射下において、クロロフィルの自家蛍光により赤色に観察される (Figure 17C, 上)。35S::GFP (35S プロモーターの下流に GFP をコードする遺伝子配列を連結したキメラ遺伝子) を形質転換し、GFP を恒常的に発現している葉ではクロロフィルの自家蛍光と GFP の蛍光が重なり橙色に観察された (Figure 17C, 中)。一方、GFP を恒常的に発現している *N. benthamiana* の幼植物体の葉に pPVX:GFP (Figure 17B) を接種し、21 日後に接種葉よりも上葉を UV 照射下で観察すると、葉は赤色に観察された (Figure 17C, 下)。これは pPVX:GFP に対して VIGS が誘導されたことにより GFP の蛍光が消失した結果である。VIGS による GFP 蛍光強度の低下は pPVX:GFP 接種後 7 日目頃から接種葉で観察され始めた。さらに接種後 14 日目頃からは上葉の若い葉でも葉脈に沿って GFP 蛍光の消失が認められ、21 日目頃になるとその葉全体で GFP 蛍光が消失した。接種後 28 日目頃までに展開してくる葉では

その全面で GFP 蛍光が消失していた。しかし、28 日目頃以降に新たに展開した葉では徐々にサイレンシングの効果が薄れ、GFP の蛍光が強く観察されるようになった。以上の pPVX:GFP を接種した *N. benthamiana* における GFP 蛍光の観察から、サイレンシングの効果が最も強く現れる期間は接種後 21~28 日であり、接種葉よりも 8~11 葉上位の展開葉でその効果が著しいことが明らかとなった。

N. benthamiana からの VPE ホモログ cDNA のクローニングと VPE 遺伝子の VIGS

VIGS により *N. benthamiana* の内在性 VPE 遺伝子の発現を抑制させるために、*N. benthamiana* から VPE ホモログをクローニングした (Figure 18)。タバコ VPE と *N. benthamiana* VPE 間の相同性の比較から、*NtVPE-1a* と *NtVPE-1b* に相当するクローンをそれぞれ *NbVPE-1a* および *NbVPE-1b* と名付け実験に用いた。クローニングした *NbVPE-1a* と *NbVPE-1b* を鋳型とし、タバコ VPE と *N. benthamiana* VPE 間で保存されている 2 つの領域がそれぞれ増幅するように設計した 2 組のプライマー対を用いて PCR を行った。得られた 4 つの PCR 産物をそれぞれ pPVX ベクターに挿入し (pPVX:VPE; Figure 19A), それぞれをアグロバクテリウムを介して、別々の *N. benthamiana* の幼植物体の葉に接種した。接種してから 21 日後に、接種葉よりも 8~11 葉上位の葉における VPE 遺伝子のサイレンシングの程度を RT-PCR により調べた (Figure 19B)。植物 VPE 間で保存されている領域が増幅するように設計したプライマー (*NtVPE*) および *NbVPE-1a* と *NbVPE-1b* それぞれに特異的なプライマー (*NbVPE-1a* および *NbVPE-1b*) を用いて RT-PCR を行ったところ、すべての組み合わせにおいて遺伝子は増幅されなかった (Figure 19B)。この結果は、pPVX:VPE を接種した *N. benthamiana* において、*NbVPE-1a* と *NbVPE-1b* を含む主な *NbVPE* 遺伝子がサイレンシングされていることを示す。

植物におけるカスパーゼ-1 活性を担っているプロテアーゼは VPE である

VPE が植物におけるカスパーゼ-1 活性を担うプロテアーゼであることを *in*

planta で証明するために、*VPE* 遺伝子をサイレンシングした葉とサイレンシングしていない葉における *VPE* 活性とカスパーゼ-1 活性を測定した。Figure 20A はその測定値 ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{h}$) をグラフ上にプロットしたものである。*VPE* 活性とカスパーゼ-1 活性は、それぞれに特異的な蛍光基質 (Ac-ESEN-MCA および Ac-YVAD-MCA) を用いて測定した。シロイヌナズナにおいて α *VPE* と γ *VPE* はサリチル酸の処理によって発現が誘導される (Kinosita et al. 1999)。 *N. benthamiana* においても、*VPE* 活性はサリチル酸 (2.5 mM サリチル酸ナトリウム) を処理することによって増加した (Figure 20A)。サリチル酸処理後の *VPE* 活性は、*VPE* 遺伝子をサイレンシングした葉において低く抑えられていた。*VPE* 活性が低い植物体では、カスパーゼ-1 活性も低く、両者の活性を示す丸印が零を起点とする直線上に乗っていた。

次に *VPE* 遺伝子をサイレンシングした葉とサイレンシングしていない葉にサリチル酸を処理し、処理後 24 時間目の葉から抽出した粗抽出液を試料として、インヒビター・ブロット解析を行った (Figure 20B)。 *VPE* 遺伝子をサイレンシングしていない葉においては、Figure 12A 同様に 2 本の *VPE* のバンドが検出された。一方、*VPE* 遺伝子をサイレンシングした葉においては 2 本の *VPE* のバンドは検出されなかった。以上の結果は、 *N. benthamiana* におけるカスパーゼ-1 活性の実体が *VPE* であることを示している。

VPE 遺伝子をサイレンシングした植物では TMV 感染による過敏感細胞死と液胞の崩壊が抑えられる

VPE が過敏感細胞死を制御する重要なプロテアーゼであることを *in planta* で証明するために、*VPE* 遺伝子をサイレンシングした *N. benthamiana* の葉に TMV を接種した。*VPE* 遺伝子をサイレンシングしていない葉においては、温度シフト後 24 時間で典型的な病斑が形成された (Figure 21, pPVX, *)。しかし興味深いことに *VPE* 遺伝子をサイレンシングした葉においては、病斑の形成が顕著に抑えられた (Figure 21, pPVX:*VPE*, *)。この結果は TMV 感染による過敏感細胞死に *VPE* が重要な役割を担っていることを示している。

植物のプログラム細胞死では液胞を崩壊することにより、液胞内の加水分解酵素が細胞礎質に流出することが重要であると考えられている (Groover et al., 1997; Groover and Jones, 1999; Jones, 2001). そこで、過敏細胞死の誘導に伴う液胞膜の形態変化について電子顕微鏡により詳細に観察した. *N. benthamiana* ではタバコに比べて過敏細胞死の指標となる病斑の形成が遅く、温度シフト後 12 時間目頃から観察され始める. そこで、温度シフト後 0, 9, 12, 24 時間目の感染葉の細胞を電子顕微鏡で観察した (Figure 22). 葉に病斑が形成される前の温度シフト後 9 時間目の細胞を観察すると、細胞は原形質分離を起こし、液胞膜が部分的に崩壊していた (Figure 22C, D, E). この液胞膜の崩壊は時間の経過に伴って広範囲に広がり、温度シフト後 24 時間目の細胞では完全に崩壊していた (Figure 22B). また温度シフト後 24 時間目の細胞は、細胞質全体が凝縮し、収縮していた (Figure 22B). この細胞の収縮はすでに報告されている過敏細胞死の形態的特徴と一致していた (Levine et al., 1996; Mittler et al., 1997; Tada et al., 2004). しかし *VPE* 遺伝子をサイレンシングした葉では、24 時間後も液胞膜の崩壊は全く起こっていなかった (Figure 22G). この結果から *VPE* は植物の細胞死過程において、液胞膜が崩壊する過程に関わっていることが考えられた.

TMV 感染葉における液胞膜の崩壊と細胞死の関係について調べるために、BCECF で液胞を染色した感染葉から、温度シフト後 0 時間目と 9 時間目にプロトプラストを調製し、詳細に解析した. また、プロトプラストの生死を調べるためにトリパンブルー (trypan blue) による染色を行った. 温度シフト後 0 時間目の感染葉から調整したプロトプラストは、BCECF が液胞だけに局在しており、トリパンブルーで染色されなかった (Figure 23, 0 h, pPVX). 温度シフト後 9 時間目の感染葉から調整したプロトプラストは、BCECF の細胞内局在が以下に示す 3 つに分かれていた (Figure 23, 9 h, pPVX). タイプ I : BCECF が液胞に局在している (70%), タイプ II : BCECF が細胞質に局在している (20%), タイプ III : BCECF が細胞内に局在していない (10%). タイプ I と II のプロトプラストはトリパンブルーで染色されなかったが、タイプ III のプロトプラストはトリパンブルーで染色された. このトリパンブルー染色の結果は、タイプ I と II のプロトプラストは生きている状態であり、タイプ III のプロトプラストは死んでいる状態であることを示す.

すなわちタイプⅡのプロトプラストは、液胞膜が崩壊し BCECF が細胞質に流出しているにも関わらず、細胞は生きている状態である。また、温度シフト後 12 時間目の感染葉から調整したプロトプラストにおける BCECF の細胞内局在を調べると、温度シフト後 9 時間目の感染葉から調整したプロトプラストに比べてタイプⅡとⅢの割合が増加していた。これらの結果から、過敏細胞死の誘導に伴い、液胞膜が崩壊し、その後、細胞が死に至ることが示唆された。一方、VPE をサイレンシングした感染葉においては、温度シフト後 9 時間目の感染葉から調整したプロトプラストでも BCECF は液胞に局在しており、トリパンブルーでは染色されなかった (Figure 23, 9 h, pPVX:VPE)。この結果から VPE は液胞膜が崩壊する過程に関わっており、液胞膜が崩壊することによって過敏細胞死が促進されるのではないかと考えられた。

動物のアポトーシスでは、核 DNA のヌクレオソーム単位 (およそ 180 bp) での断片化が起こり、アガロースゲル電気泳動によってラダー化が観察される。非親和性のさび病菌の感染によって過敏細胞死を起こしているエンバク細胞でも核 DNA のラダー化が検出されている (Ryerson and Heath, 1996; Tada et al., 2004)。しかし一方で、TMV 感染により過敏細胞死を起こしているタバコではヌクレオソーム単位の断片化は起こらず、~50 kbp の大きな断片化が起こることが報告されている (Levine et al., 1996; Mittler et al., 1997)。動物におけるアポトーシスでも、同様な~50 kbp での断片化が報告されている (Oberhammer et al., 1993)。TMV の感染によって過敏細胞死を起こしている温度シフト後 24 時間目の *N. benthamiana* の感染葉から核 DNA を抽出し、通常のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、ヌクレオソーム単位の断片化は検出されなかった。同様の試料でパルスフィールドゲル電気泳動を行ったところ、~50 kbp の断片化が検出された (Figure 24, 24 h, pPVX)。しかし、VPE 遺伝子をサイレンシングした感染細胞の核 DNA を調べたところ、ヌクレオソーム単位の断片化も~50 kbp の断片化も検出されなかった (Figure 24, 24 h, pPVX:VPE)。これまでプログラム細胞死に先だって液胞内のヌクレアーゼ活性が上昇することが報告されており (Jones, 2001)、VPE を介した液胞膜の崩壊が核 DNA の断片化に深く関わっていることが示唆された。核 DNA の~50 kbp の断片化は温度シフト

後 12 時間目からすでに起こり初めており (Figure 24, 12 h, pPVX), 液胞膜の崩壊が温度シフト後 9 時間目頃から起こり始まること (Figure 22C, D, E) から推察して, VPE を介して液胞膜が崩壊し, 液胞から細胞礎質に流出したヌクレアーゼによって核 DNA が断片化されるのではないかと考えられた (Figure 27).

VPE の発現を抑制すると TMV の増殖が促進される

VPE 遺伝子をサイレンシングした *N. benthamiana* の葉では, TMV 感染による過敏感細胞死が抑えられることから, TMV は感染細胞内で増殖し続けることが予想された. そこで VPE 遺伝子をサイレンシングした葉に TMV を接種し, 温度シフト後の TMV の増殖量の変化を経時的に調べた. ウイルスの量はウイルスの外被タンパク質の量を指標に調べることができる. 葉に TMV を接種し, 温度シフト後 0, 8, 24 時間目の感染葉から抽出した粗抽出液を試料として, TMV の外被タンパク質に対する抗体を用いて, イムノブロット解析を行った (Figure 25A). VPE 遺伝子をサイレンシングしていない葉における外被タンパク質量の増加は, 温度シフト後 8 時間目以降抑えられた (Figure 25A, B). 一方, VPE 遺伝子をサイレンシングした葉における外被タンパク質量は, 温度シフト後 8 時間目でも全く抑えられることなく増加し続けた. そして 24 時間目には, サイレncing していない葉に比べて 2 倍以上に増加していた (Figure 25A, B). 以上の結果から, 予想した通り敏感細胞死を抑えると TMV は増殖し続けることがわかった.

過敏感反応における細胞死と防御タンパク質発現は独立した現象である

病原体の感染に伴い過敏感反応を誘導している組織では, PR タンパク質と呼ばれる一群の防御タンパク質が生成される (Van Loon and Van Strien, 1999). VPE 遺伝子をサイレンシングすることにより TMV 感染による過敏感細胞死が抑えられている *N. benthamiana* において, PR タンパク質は生成されるのであろうか. この疑問に答えるために, VPE 遺伝子をサイレンシングした葉に TMV を接種し, 温度シフト後の PR タン

パク質量の変化を経時的に調べた。葉に TMV を接種し、温度シフト後 0, 6, 12 時間目の感染葉から抽出した粗抽出液を試料として、PR タンパク質に対する抗体を用いてイムノブロット解析を行った (Figure 26)。VPE 遺伝子をサイレンシングしていない葉における PR-1 と PR-2 タンパク質の量は、温度シフト後 12 時間目までは増加し続けた。一方、VPE 遺伝子をサイレンシングした葉では、過敏感細胞死が抑えられているにも関わらず PR-1 と PR-2 タンパク質の量はサイレンシングしていない葉と同じように増加し続けた (Figure 26)。以上の結果から、過敏感反応における細胞死と防御タンパク質の発現は、それぞれ独立した情報伝達経路によって制御されていることが示唆された。そして、VPE は防御タンパク質の発現過程には関与せず、細胞死の過程を制御していることが考えられた。防御タンパク質が生成されているのにも関わらず、ウイルスの増殖が抑えられなかったという結果は、植物の抵抗性反応における過敏感細胞死の有効性を直截に示している。

考察

植物のカスパーゼ-1 活性の実体は VPE である

本研究では、過敏感細胞死の過程で誘導されるカスパーゼ-1 活性の実体が VPE であることを明らかにし、VPE が過敏感細胞死における鍵酵素として機能していることを証明した。2000 年にシロイヌナズナの全ゲノム配列が決定されたが、その配列の中にアミノ酸配列から類推されるカスパーゼのホモログは存在せず、植物からは未だにカスパーゼのホモログは単離されていない。しかしながら、植物のプログラム細胞死がカスパーゼ様活性をもつ酵素によって制御されていることを示唆する実験結果が多数報告されている (Lam and del Pozo, 2000; Lam et al., 2001; Woltering et al., 2002)。本研究結果は、これらカスパーゼ様活性によって制御される多くのプログラム細胞死に VPE が関わっている可能性を示唆している。事実、シロイヌナズナの γ VPE は植物のプログラム細胞死である老化や導管形成の過程で強く発現することが報告されている (Kinoshita et al., 1999)。また、葯の環状細胞塊では花粉の成熟に伴って細胞が死に、花粉を外に放出することが知られているが、この葯の環状細胞塊でも γ VPE が強く発現することが明らかになっている (Kinoshita et al., 1999)。VPE はカスパーゼと同じシステインプロテアーゼであり、活性に重要な限られた領域に関してはカスパーゼと類似するものの (Figure 14B)、アミノ酸配列全体としての相同性は決して高くない。カスパーゼはアスパラギン酸残基を特異的に認識し、その C 末端側を切断する酵素である (Stennicke and Salvesen, 1998; Earnshaw et al., 1999)。一方、VPE はアスパラギン残基を認識してその C 末端側を切断する酵素であるが (Hara-Nishimura et al., 1991; Hara-Nishimura, 1998)、本研究室におけるこれまでの研究から VPE はカスパーゼ同様にアスパラギン酸残基も認識することが明らかになっている (Becker et al., 1995; Hiraiwa et al., 1999)。カスパーゼ-1 の基質結合部位を形成するのに必須なアミノ酸も VPE で保存されており (Figure 14B)、VPE が形成する基質結合部位の構造がカスパー

ーゼ-1と似ていることが推察される。これについてはVPEの結晶構造解析を行うことにより明らかになると思われる。

動物にもVPEのホモログが存在し、レグメイン(legumain)とよばれている。このレグメインはカスパーゼ-1の阻害剤で活性が多少阻害されるものの、カスパーゼ-1の基質をほとんど切断することができない(Rozman-Pungercar et al., 2003)。この事実から、植物では、VPEがカスパーゼ様活性を担い、細胞死を制御するように進化してきたことが推察される。近年、データベース検索によってカスパーゼ様タンパク質(カスパーゼドメインが保存されている)として、後生動物ではパラカスパーゼ、植物やカビ、原生動物ではメタカスパーゼが同定された(Uren et al., 2000)。酵母のメタカスパーゼにはカスパーゼ様活性があり、 H_2O_2 処理によって誘導される細胞死がメタカスパーゼの欠損変異体においては起こらないことが報告されている(Madeo et al., 2002)。しかし植物のメタカスパーゼにカスパーゼ様活性があるかどうかは明らかにされておらず、メタカスパーゼが植物細胞死に関与しているかは不明である。酵母の全ゲノム配列の中にはアミノ酸配列から類推されるVPEホモログおよびカスパーゼホモログが存在しないことが分かっている。この事実から酵母においてはメタカスパーゼにカスパーゼ様活性があるため、VPEホモログおよびカスパーゼホモログは必要なかったのではないかと考えられる。一方、動物のパラカスパーゼにはカスパーゼ様活性はなく、ユビキチンリガーゼ活性をもっていることが報告されている(Zhou, et al., Nature AOP, 24 December 2003)。これらのことから、動物、植物、酵母において、カスパーゼ(様)活性がプログラム細胞死を制御していることは共通しているが、その活性を担うプロテアーゼは進化の過程で使い分けられてきたことが推察される。

植物において液胞は細胞死を引き起こす重要なオルガネラである

VPEは植物におけるカスパーゼ様活性を担っており、植物のVPEと動物のカスパーゼ、これら2つのシステインプロテアーゼは細胞内で同じような機能を司っている可能性が示唆される。しかしながら、カスパーゼとVPEの細胞内における局在は全く異なっている。カスパーゼは細胞質で機能する酵素であり(Cohen, 1997)、それに対し

VPE は液胞で機能する酵素である (Hiraiwa et al., 1993; Kinoshita et al., 1999; Hara-Nishimura and Maeshima, 2000). 動物においてアポトーシスを起こした細胞は細かく断片化してアポトーシス小体 (apoptotic body) を形成し, その後マクロファージや好中球などの貪食細胞によって除去される (Figure 28) (Franc, 2002; Geske et al., 2002). それに対して, 植物には貪食細胞がなく, 植物細胞は細胞壁で覆われている. そのため植物細胞は自ら細胞内容物を分解しなければならない. 植物において死にゆく細胞が分解される過程は, 動物における過程とは異なり, 植物独自の機構が存在することが考えられる. 植物細胞特有の液胞は様々な加水分解酵素を含んでいることが広く知られており (Nishimura and Beevers, 1979), 動物の貪食細胞のように不要な細胞を除去するための条件を兼ね備えている. 本研究から, 植物は動物と異なり, 液胞に局在する VPE を介して多様な分解酵素を含む液胞が崩壊することにより, 自らを分解するという戦術を進化させてきたことが示唆された (Figure 28). VPE 本来の液胞タンパク質をプロセッシングして活性化させるという機能から類推して, VPE は死にゆく細胞の液胞でも, 様々な加水分解酵素の活性化に関わっていることが考えられる. VPE によって活性化した酵素または VPE 自身が, 液胞膜の崩壊をもたらし, さらには細胞礎質に漏れ出すことによって細胞は死に至ると考えられた (Figure 27).

植物における細胞死では, 液胞の崩壊が共通した現象であることが指摘されている. 液胞の崩壊後, 液胞内の加水分解酵素が細胞礎質に流出することにより, オルガネラの崩壊を引き起こし, 結果として細胞死が促進されると考えられている (Groover et al., 1997; Groover and Jones, 1999; Jones, 2001). 維管束組織の道管・仮道管を構成する管状要素 (tracheary elements) は, 分化 (木部分化; xylem differentiation) の過程で細胞内容物を分解して死に至る. この細胞死の結果, 植物は空洞になった内部を水路として利用している. 木部分化の進行に伴ってリグニン沈着 (木化: lignification) が起こり, 道管細胞は, 強固な二次細胞壁を新たに合成する. ヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans*) の葉肉細胞を用いて管状要素分化の際に見られる細胞死の過程を詳細に調べることにより, 液胞が中心となって引き起こす細胞死の形態が明らかにされている (Groover et al., 1997; Fukuda, 2000; Obara et al., 2001). これらの解析に

よるとリグニン沈着の開始後数時間して液胞の崩壊が起こり、その後さらに数時間して核を含むオルガネラと細胞内容物の消失が起こる。その際にアポトーシスで見られるような核の凝縮や核の断片化は伴わず、液胞が崩壊して数分内に細胞内の形態変化に先立って核 DNA の断片化が起こることが示されている。シロイヌナズナ γ VPEも管状要素の分化の過程で強く発現することが示されている (Kinoshita et al., 1999)。VPE は管状要素の分化の過程で液胞から細胞礎質に漏出するプロテアーゼ (Minami and Fukuda, 1995) やヌクレアーゼ (Obara et al., 2001) の活性化に関わっている可能性が推察される。

一方、過敏反応に伴うプログラム細胞死 (過敏細胞死) は、管状要素などの分化の際に見られるプログラム細胞死とは違って、感染した病原体に対抗する防御手段として発達してきたものであり、病原体の拡散を防ぐ目的をもっている (Goodman and Novacky, 1994)。両者の細胞死の目的は異なっているが、そのメカニズムは類似している可能性が考えられる。本研究により過敏細胞死においても液胞の崩壊が重要であることが明らかとなり、液胞の崩壊過程に VPE が関わっていることが示唆された。

最近、動物細胞においてリソソームを起点として誘導されるプログラム細胞死機構の存在が明らかにされつつある (Ferri and Kroemer, 2001; Turk et al., 2002)。リソソームは液胞と同じように至適 pH を酸性側にもつカテプシン等の様々な加水分解酵素を含んでおり、カテプシンが細胞礎質に流出することによって、カスパーゼが活性化されることが報告されている。酸性ストレスによるアポトーシス誘導時には、ミトコンドリアからのシトクロム c の流出に先行してカテプシン D がリソソームから放出される (Kagedal et al., 2001)。またカテプシン B は TNF (tumor necrosis factor) によるアポトーシスに必要であり (Foghsgaard et al., 2001)、カスパーゼ 11 を活性化して、ヌクレオソーム単位での核 DNA の断片化を引き起こすことが報告されている (Schotte et al., 1998)。さらに、カテプシン L のファミリー分子が、アポトーシス経路の上流因子である不活性型の Bid を活性型にすることで、アポトーシスに関与することが示されている (Stoka et al., 2001)。しかしながら、リソソームがどのようなアポトーシス刺激をどのようにして感知しているか、

その分子機序はほとんど解明されていない。

植物と動物のプログラム細胞死における共通性

最近、動物の VPE ホモログである asparaginyl endopeptidase (AEP) / レグマインはカテプシン B, H, L の成熟化 / 活性化に関わっていることが明らかにされた (Shirahama-Noda et al., 2003). 植物においても VPE によって成熟化 / 活性化されたカテプシン様の酵素が細胞礎質に放出され、植物の細胞死機構を活性化していることが推察できる。また先に VPE を介した液胞主導型の細胞死機構の存在を考察したが、過敏細胞死の過程でカテプシン様の酵素だけでなく VPE も液胞から細胞礎質に放出され、細胞質に存在する細胞死機構を活性化する可能性が考えられる。VPE は酸性側に至適 pH をもつ液胞酵素であり、通常の細胞質条件 (pH 7.5) では活性を発揮することが出来ない。しかし興味深いことに過敏反応の初期において、細胞内が一時的に酸性化することが報告されている (Mathieu et al., 1996; Kuchitsu et al., 1997; Pugin et al., 1997; Yamaoka et al., 2000). これは細胞外のプロトンが細胞内に流入するために起こる現象であり、細胞内が酸性化することにより防御反応が活性化されることが報告されている (Hagendoorn et al., 1991; He et al., 1998; Lapous et al., 1998; Schaller and Oecking, 1999). このとき細胞内の pH は 6.5 にまで低下するという報告もあり、pH 6.5 の条件において VPE は 70% の活性を発揮できる (Hara-Nishimura et al., 1991; Hiraiwa et al., 1997b). このことから、VPE が液胞から漏出し酸性化した細胞礎質で機能している可能性も考えられる。液胞 / リソソームを中心とした細胞死機構は植物と動物の両方に共通しているのかもしれない。

植物と動物とで活性を担うプロテアーゼは異なるが、両者のプログラム細胞死はカスパーゼ (様) 活性によって制御されていることが明らかとなった。植物と動物の細胞死は共通な機構を備えている可能性が考えられる。植物と動物のプログラム細胞死における共通性を示唆する実験結果がいくつか報告されている。動物において *Bax* はアポトーシス遺伝子である *Bcl-2* ファミリーに属し、ミトコンドリアからシトクロム c の放出を制御する細胞死誘導因子として機能していることが知られている。*Bax* をタバコで発

現させると、過敏感細胞死に似た細胞死が誘導される (Lacomme and Santa Cruz, 1999). また、動物で Bax とは逆に抑制因子として働く Bcl-X_L や、線虫で Ced-4 の活性化を抑えている Ced-9 をタバコで発現させると、過敏感細胞死が抑制される (Mitsuhara et al., 1999). このように、植物においても Bcl-2 ファミリーの遺伝子が細胞死誘導において同様な機能をもつことが考えられるが、植物からは Bcl-2 ファミリー様の遺伝子は見つかっていない。

過敏感細胞死では、動物のアポトーシスの特徴であるクロマチンの凝集や細胞質・核の収縮が観察される例があり (Levine et al., 1996; Mittler et al., 1997; Tada et al., 2004), また生化学的な特徴である核 DNA のラダー化もいくつかの系で報告されている (Ryerson and Heath, 1996; Tada et al., 2004). これらの事実はプログラム細胞死の機構が多細胞生物に古くから存在し、広く保存されていることを示唆している。しかし一方、植物細胞には細胞壁があり、また食細胞が存在しないため、アポトーシス小体が形成され貪食されるような過程は基本的に考えにくい。核 DNA のラダー化もすべての植物プログラム細胞死で観察されるわけではなく、Figure 24 で示したような~50 kbp の大きな断片化が観察される例も少なくない。また過敏感細胞死の中にはネクローシス様の細胞死の特徴をみせるものも報告されている (Bestwick et al., 1997). したがって植物のプログラム細胞死では、動物のそれと共通する部分はあるものの、動物で定義されたアポトーシスと同様の形態的過程を経るわけではないと考えられる。

動物細胞において細胞死の時に核 DNA の分解が起こらなくても細胞死は完結することが示されている (Sakahira et al., 1998). このことは細胞死に核 DNA の断片化が必須ではないことを示している。動物において、感染症のときには壊れた細菌から流出した DNA が免疫細胞を活性化することが報告されている (Hemmi et al., 2000). そのため動物細胞は自身の DNA を予め分解することによって、細菌の DNA と誤って免疫応答を起こすことを防いでいると考えられる。実際、DNase を欠くマウス (Kawane et al., 2003) やハエ (Mukae et al., 2002) では免疫系に異常をきたすという報告もある。免疫細胞を持っていない植物においては、核 DNA の断片化は細胞死に必須ではないように思われる。

病害抵抗性における細胞死の役割

Figure 25 で示したように、細胞死が抑制された *N. benthamiana* では TMV の増殖が阻害されることなく増殖し続けた。本研究以外にも、バキュロウイルスのアポトーシス抑制タンパク質である p35 を導入した形質転換タバコ (del Pozo and Lam, 2003) や前述の Bcl-X_L, Ced-9 を形質転換したタバコ (Mitsuhara et al., 1999) でも、ウイルス感染による細胞死が抑制されると共にウイルスに対する抵抗性が無効になることが示されている。

しかし、これらの例とは逆に、強力な植物毒素を産出する殺生菌の場合には、植物の細胞死の機構を利用して寄生していることも示唆されている。前述の p35 をトマトに導入した例では、その形質転換体は *Alternaria alternata* f. sp *lycopersici* が産出する AAL 毒素に抵抗性を示すようになっただけでなく、同菌の感染にも抵抗性になったことが示されている (Lincoln et al., 2002)。また *Fusarium moniliforme* が産出するフモニシン B1 は動物と植物の両方にプログラム細胞死を誘導する。フモニシン B1 に非感受性な変異シロイヌナズナでは、フモニシン B1 で誘導される細胞死が抑制され、同菌の感染にも抵抗性になったことが報告されている (Stone et al., 2000)。また、カルシウムチャンネルタンパク質をコードすることが明らかとなったシロイヌナズナの *Dnd1* は、非親和性の *Pseudomonas syringae* の感染に対して細胞死は起こさないが抵抗性を示す (defense with not death) 変異体として同定されており、必ずしも抵抗性に細胞死が必要ないことを示唆している (Clough et al., 2000)。多くの種類の植物・病原体の関係で、過敏感細胞死は抵抗性に付随して認められる。ウイルスや絶対寄生菌のように宿主細胞の生存が増殖に必須である場合には、細胞死が抵抗性に有効に働くことが考えられる。

結語

VPE は植物の細胞死機構を制御するプロテアーゼとして本研究により初めて同定された分子である。動物にはカスパーゼを介した細胞質における細胞死機構が存在するのに対し、植物にはVPEを介した液胞主導型の細胞死機構が存在する可能性が示唆される。今後、VPEを中心に解析することにより植物の細胞死カスケードで機能する分子を一つずつ明らかにしていくことが今後の課題である。現時点ではまだ不明な点が多く存在する過敏感細胞死のメカニズムを明らかにすることは、植物の耐病性機構を理解する上で重要であると考えられる。

引用文献

- Becker, C., Shutov, A.D., Nong, V.H., Senyuk, V.I., Jung, R., Horstmann, C., Fischer, J., Nielsen, N.C., and Muntz, K.** (1995). Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B, an asparagine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Eur. J. Biochem.* **228**, 456-462.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H., and Mansfield, J.W.** (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Plant Cell* **9**, 209-221.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* **24**, 667-677.
- Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I.C., Lippok, B., Smith, R.K., Jr., and Bent, A.F.** (2000). The *Arabidopsis* dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 9323-9328.
- Cohen, G.M.** (1997). Caspase: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**, 1-16.
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., and Gallois, P.** (2000). Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* **18**, 647-655.
- De Jong, A.J., Hoerberichts, F.A., Yakimova, E.T., Maximova, E., and Woltering, E.J.** (2000). Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* **211**, 656-662.
- del Pozo, O., and Lam, E.** (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr. Biol.* **8**, 1129-1132.
- del Pozo, O., and Lam, E.** (2003). Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to Tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 485-494.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.
- Ferri, K.F., and Kroemer, G.** (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**, E255-E263.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M.,**

- Elling, F., Leist, M., and Jaattela, M.** (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* **28**, 999-1010.
- Franc, N.C.** (2002). Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*: molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci.* **7**, d1298-d1313.
- Fukuda, H.** (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**, 245-253.
- Geske, F.J., Monks, J., Lehman, L., and Fadok, V.A.** (2002). The role of the macrophage in apoptosis: hunter, gatherer, and regulator. *Int. J. Hematol.* **76**, 16-26.
- Goodman, R.N., and Novacky, A.J.** (1994). *The Hypersensitive Response Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon.* (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press).
- Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L., and Ryan, C.A.** (1985a). Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. II. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor II. *J. Biol. Chem.* **260**, 6561-6564.
- Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, H.L., and Ryan, C.A.** (1985b). Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves: I The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor I and its post-translational processing. *J. Biol. Chem.* **260**, 6555-6560.
- Green, T.R., and Ryan, C.A.** (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* **175**, 776-777.
- Greenberg, J.T.** (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525-545.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., and Ausubel, F.M.** (1994). Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**, 551-563.
- Groover, A., DeWitt, N., Heidel, A., and Jones, A.** (1997). Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. *Protoplasma* **196**, 197-211.
- Groover, A.T., and Jones, A.M.** (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* **119**, 375-384.
- Hagendoorn, M.J.M., Poortinga, A.M., W., W.F.S.H., W., v.d.P.L.H., and S., v.W.H.** (1991). Effect of elicitors on the plasma membrane of *Petunia hybrida* cell suspensions. *Plant Physiol.* **96**, 1261-1267.
- Hara-Nishimura, I.** (1998). Asparaginyl endopeptidase. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, A.J. Barrett, N.D. Rawlings, and J.F. Woessner, eds (London, UK: Academic Press), pp. 746-749.
- Hara-Nishimura, I., and Maeshima, M.** (2000). Vacuolar processing enzymes and auqaporins. In *Vacuolar Compartments in Plants.*, A.D.G. Robinson and J.C.

- Rogers, eds (London, UK: Sheffield Academic Press), pp. 20-42.
- Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Akazawa, T.** (1985). Biosynthesis and intracellular transport of 11S globulin in developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.* **77**, 747-752.
- Hara-Nishimura, I., Inoue, K., and Nishimura, M.** (1991). A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS Lett.* **294**, 89-93.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hiraiwa, N., and Nishimura, M.** (1995). Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J. Plant Physiol.* **145**, 632-640.
- He, D.Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., and Minami, E.** (1998). Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitooligosaccharide. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1167-1174.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Lipford, G.B., Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J., and Marshak-Rothstein, A.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **408**, 740-745.
- Hiraiwa, N., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1997a). Expression and activation of the vacuolar processing enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J.* **12**, 819-829.
- Hiraiwa, N., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1999). Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. *FEBS Lett.* **44**, 213-216.
- Hiraiwa, N., Takeuchi, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1993). A vacuolar processing enzyme in maturing and germinating seeds: Its distribution and associated changes during development. *Plant Cell Physiol.* **34**, 1197-1204.
- Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1997b). An aspartic proteinase is involved in the maturation of storage proteins in concert with the vacuolar processing enzyme. *Eur. J. Biochem.* **246**, 133-141.
- Holmes, F.O.** (1938). Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathology* **28**, 553-561.
- Jones, A.M.** (2001). Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol.* **125**, 94-97.
- Kagedal, K., Johansson, U., and Ollinger, K.** (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* **15**, 1592-1594.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., and Fritig, B.** (1987). Biological function

- of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-*b*-glucanase activity. *EMBO J.* **6**, 3209-3212.
- Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Okada, K., Iida, T., and Nagata, S.** (2003). Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol* **4**, 138-144.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1995a). The sequence and expression of the g-VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1555-1562.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1995b). Homologues of a vacuolar processing enzyme that are expressed in different organs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 81-89.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* **19**, 43-53.
- Kombrink, E., Schroder, M., and Hahlbrock, K.** (1988). Several 'pathogenesis-related' proteins in potato are 1,3-*b*-glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 782-786.
- Korthout, H., Berecki, G., Bruin, W., van Duijin, B., and Wang, M.** (2000). The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Lett.* **475**, 139-144.
- Kuchitsu, K., Yazaki, Y., Sakano, K., and Shibuya, N.** (1997). Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1012-1018.
- Kuroyanagi, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2002). Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant Cell Physiol.* **43**, 143-151.
- 黒柳美和. (2002). 高等植物のプログラム細胞死における液胞プロセッシング酵素の機能. お茶の水女子大学大学院 学位論文
- Lacomme, C., and Santa Cruz, S.** (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7956-7961.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, E., and del Pozo, O.** (2000). Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* **44**, 417-428.
- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lapous, D., Mathieu, Y., Guern, J., and Lauriere, C.** (1998). Increase of defense

- gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspensions. *Planta* **205**, 452-458.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., and Lamb, C.** (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* **6**, 427-437.
- Lincoln, J.E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., and Gilchrist, D.G.** (2002). Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 15217-15221.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., and Frohlich, K.U.** (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* **9**, 911-917.
- Mathieu, Y., Lapous, D., Thomine, S., Lauriere, C., and Guern, J.** (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* **199**, 416-424.
- Minami, A., and Fukuda, H.** (1995). Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase associated with autolysis during differentiation of Zinnia mesophyll cells into tracheary elements. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1599-1606.
- Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M., and Ohashi, Y.** (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.* **9**, 775-778.
- Mittler, R., and Lam, E.** (1995). Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell* **7**, 1951-1962.
- Mittler, R., Shulaev, V., and Lam, E.** (1995). Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell* **7**, 29-42.
- Mittler, R., Simon, L., and Lam, E.** (1997). Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* **110**, 1333-1344.
- Mlejnek, P., and Prochazka, S.** (2002). Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* **215**, 158-166.
- Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., and Nagata, S.** (2002). Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. *Genes Dev.* **16**, 2662-2671.
- Nicholson, D.W.** (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **6**, 1028-1042.
- Nishimura, M., and Beevers, H.** (1979). Hydrolysis of protein in vacuoles isolated from higher plant tissues. *Nature* **277**, 412-413.
- Obara, K., Kuriyama, H., and Fukuda, H.** (2001). Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in zinnia. *Plant Physiol.* **125**, 615-626.

- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., and Sikorska, M.** (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* **12**, 3679-3684.
- Ohtsubo, N., Mitsuhashi, I., Koga, M., Seo, S., and Ohashi, Y.** (1999). Ethylene Promotes the Necrotic Lesion Formation and Basic PR Gene Expression in TMV-Infected Tobacco. *Plant Cell Physiol.* **40**, 808-817.
- Pennell, R.I., and Lamb, C.** (1997). Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**, 1157-1168.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J.** (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., and Baulcombe, D.C.** (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **25**, 237-245.
- Rozman-Pungercar, J., Kopitar-Jerala, N., Bogyo, M., Turk, D., Vasiljeva, O., Stefe, I., Vandenabeele, P., Bromme, D., Puizdar, V., Fonovic, M., Trstenjak-Prebanda, M., Dolenc, I., Turk, V., and Turk, B.** (2003). Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ* **10**, 881-888.
- Ryan, C.A.** (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 425-449.
- Ryerson, D.E., and Heath, M.C.** (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* **8**, 393-402.
- Saito, T., Yamanaka, K., Watanabe, Y., Takamatsu, N., Meshi, T., and Okada, Y.** (1989). Mutational analysis of the coat protein gene of tobacco mosaic virus in relation to hypersensitive response in tobacco plants with the N' gene. *Virology* **173**, 11-20.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S.** (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.
- Schaller, A., and Oecking, C.** (1999). Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* **11**, 263-272.
- Schotte, P., Declercq, W., Van Huffel, S., Vandenabeele, P., and Beyaert, R.** (1999). Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett.* **442**, 117-121.
- Schotte, P., Van Criekinge, W., Van de Craen, M., Van Loo, G., Desmedt, M., Grooten, J., Cornelissen, M., De Ridder, L., Vandekerckhove, J., Fiers, W., Vandenabeele, P., and Beyaert, R.** (1998). Cathepsin B-mediated activation of

- the proinflammatory caspase-11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 379-387.
- Schumann, R.R., Belka, C., Reuter, D., Lamping, N., Kirschning, C.J., Weber, J.R., and Pfeil, D.** (1998). Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* **91**, 577-584.
- Sela-Buurlage, M., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van den Elzen, P.J.M., and Cornelissen, B.J.** (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and b-1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* **101**, 857-863.
- Shirahama-Noda, K., Yamamoto, A., Sugihara, K., Hashimoto, N., Asano, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2003). Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S.** (1998). Properties of the caspases. *Biochim. Biophys. Acta* **1387**, 17-31.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J.C., Yin, X.M., Turk, V., and Salvesen, G.S.** (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* **276**, 3149-3157.
- Stone, J.M., Heard, J.E., Asai, T., and Ausubel, F.M.** (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* **12**, 1811-1822.
- Sun, Y.L., Zhao, Y., Hong, X., and Zhai, Z.H.** (1999). Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett.* **462**, 317-321.
- Tada, Y., Mori, T., Shinogi, T., Yao, N., Takahashi, S., Betsuyaku, S., Sakamoto, M., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S.** (2004). Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 245-253.
- 田沼靖一. (2001). アポトーシスがわかる 実験医学シリーズ 羊土社
- Tian, R.H., Zhang, G.Y., Yan, C.H., and Dai, Y.R.** (2000). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett.* **474**, 11-15.
- Toyooka, K., Okamoto, T., and Minamikawa, T.** (2000). Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J. Cell Biol.* **148**, 453-463.
- Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungercar, J., Cirman, T., Droga-Mazovec, G., Oreic, K., and Turk, V.** (2002). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal

- proteases. *Biol. Chem.* **383**, 1035-1044.
- Uren, A.G., Oroureke, K., Aravind, L., Pisabarro, T.M., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M.** (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT Lymphoma. *Mol. Cell* **6**, 961-967.
- Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85-97.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., and Gilchrist, D.G.** (1996). Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* **8**, 375-391.
- Weststeijn, E.A.** (1981). Lesion growth and virus localization in leaves of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. After inoculation with tobacco mosaic virus and incubation alternately at 22 – C and 32 – C. *Physiol. Plant Pathol.* **18**, 357-368.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B.** (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcho, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A., and Livingston, D.L.** (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-274.
- Woltering, E.J., van der Bent, A., and Hoeberichts, F.A.** (2002). Do plant caspases exist? *Plant Physiol.* **130**, 1764-1769.
- Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M., and Ohashi, Y.** (1998). Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **118**, 1213-1222.
- Yamaoka, N., Yoshida, S., Motoyama, E., Takeuchi, Y., Takada, Y., and Fukunaga, N.** (2000). Resistance induction in barley coleoptile cells by intracellular pH decline. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1321-1326.
- Zhao, Y., Jiang, Z.F., Sun, Y.L., and Zhai, Z.H.** (1999). Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Lett.* **448**, 197-200.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、本当にお忙しい中、終始適切なお指導を賜り、便宜を計って頂きました。西村幹夫教授、京都大学の西村いくこ教授に心から感謝の意を表します。また常日頃適切なお助言とお指導を頂きました山田健志助手に深く感謝致します。

研究において適切なお助言と激励を頂きました林誠助教授、真野昌二助手をはじめとする細胞機構研究部門の研究員、学生みなさまに深く感謝致します。また丁寧にご指導して下さいました京都大学の嶋田知生助手をはじめ、京都大学・植物分子細胞生物学教室の皆様にも深く感謝致します。飯 哲夫博士(現・独立行政法人 農業生物資源研究所)には植物病理学分野全般にわたり終始多くのお助言とお指導を頂きました。心から感謝致します。

また、透過型電子顕微鏡写真を撮影して頂いた近藤真紀技官には深く感謝致します。

報文目録

Noriyuki Hatsugai, Miwa Kuroyanagi, Kenji Yamada, Tetsuo Meshi, Shinya Tsuda,
Maki Kondo, Mikio Nishimura, Ikuko Hara-Nishimura

A Plant Vacuolar Protease, VPE, Mediates Virus-Induced Hypersensitive Cell Death

Science 305, 855-858 (2004)

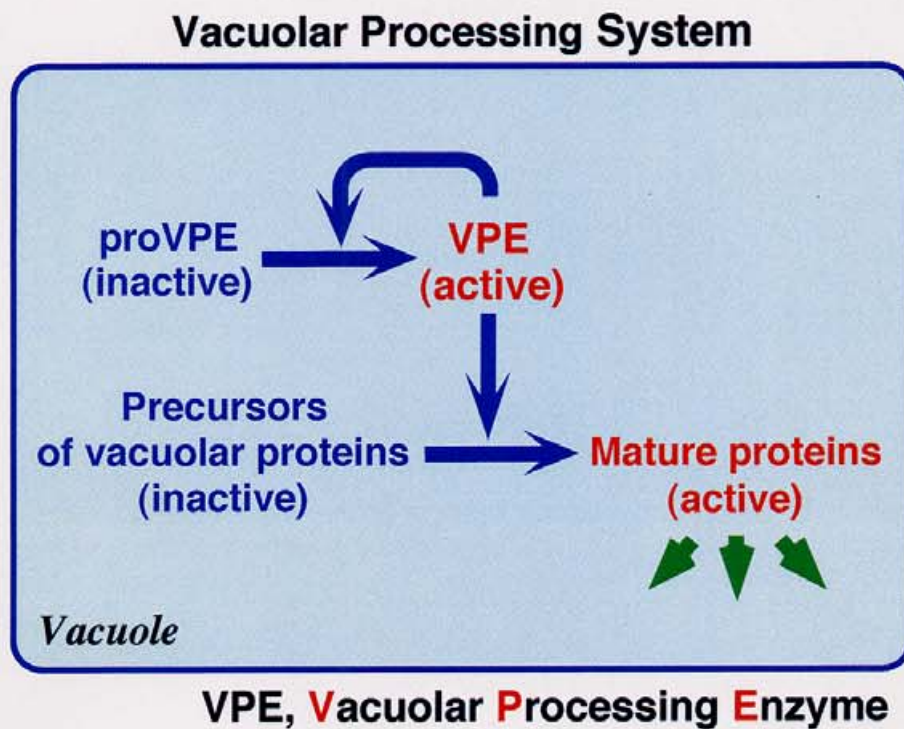


Figure 1. A schematic model for vacuolar processing system.

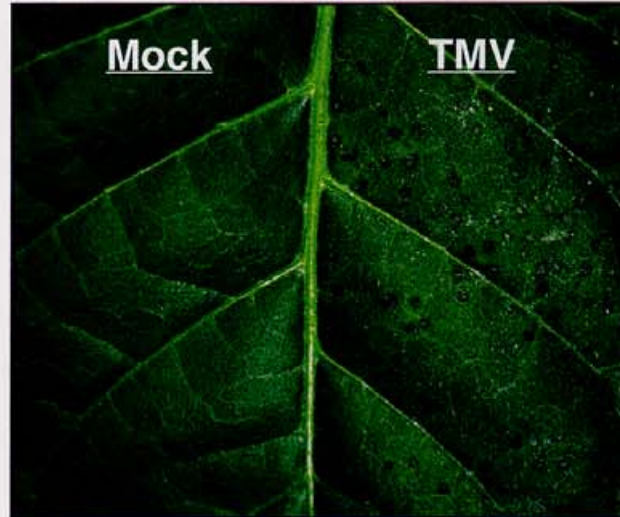
The VPE precursor is synthesized as an inactive form on the endoplasmic reticulum in the cells and then transported to the vacuoles. The inactive precursor is converted into the mature active VPE after arrival at the vacuoles. The active VPE might be involved in the maturation and activation of vacuolar proteins.

A



***nn* tobacco**

B



***NN* tobacco**

Figure 2. Typical chlorotic lesion (mosaic disease symptom) and necrotic lesion (hypersensitive cell death) in tobacco leaves.

A, In tobacco cultivars lacking the *N* resistance gene (*nn* tobacco), TMV multiplies and spreads systemically, causing reduced growth and mosaic disease symptoms, characterized by intermingled areas of light and dark green leaf tissue.

B, In tobacco cultivars carrying the *N* resistance gene (*NN* tobacco), TMV infection causes rapid and localized cell death at the infected sites, and virus particles are restricted to the region immediately surrounding the necrotic lesions.

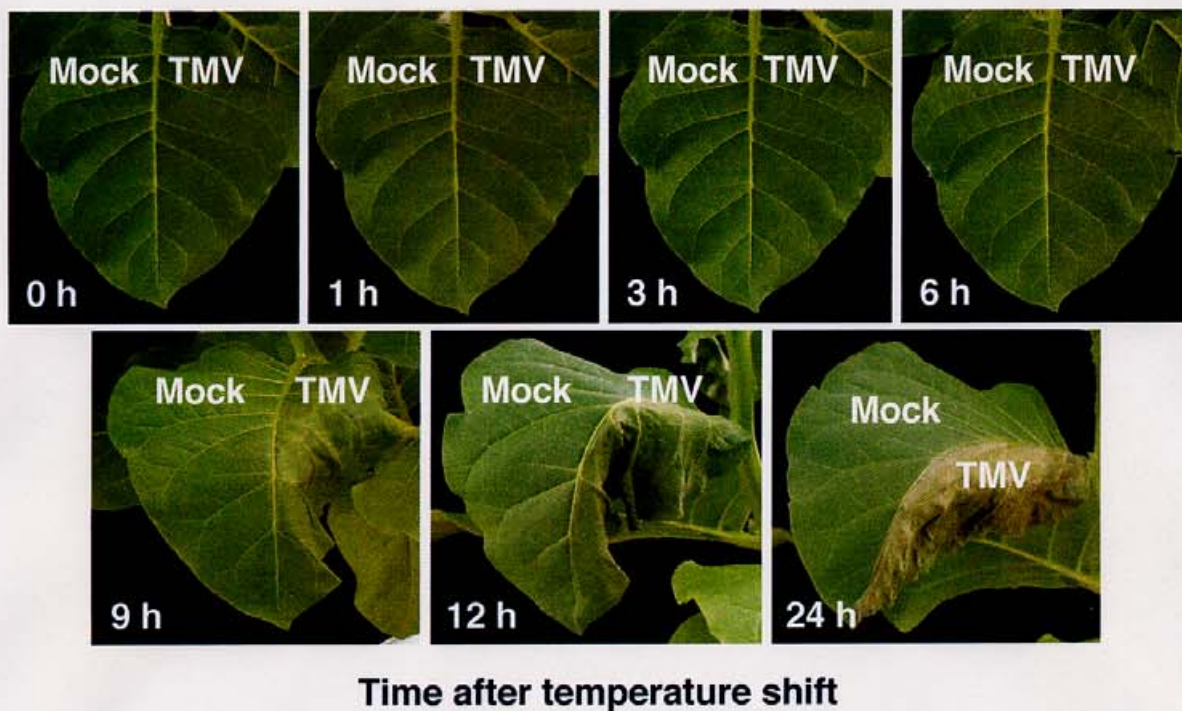
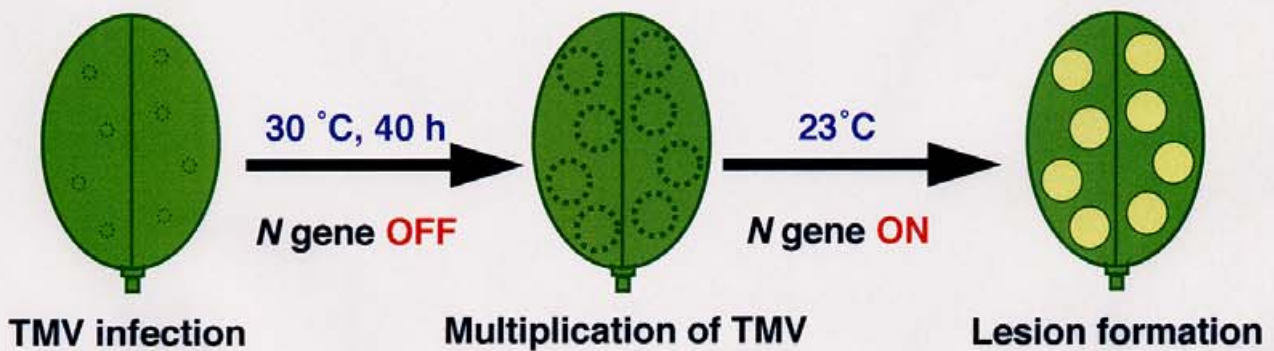


Figure 3. Synchronous lesion formation by using temperature shift system in TMV-Infected *NN* tobacco leaf.

After the TMV infection, plants were maintained at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 40 h to multiply the virus, and cooled them to $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ to cause the synchronous formation of lesions in the infected regions. The visible lesions started to form at approximately 9 h after the temperature shift and then clearly developed at 24 h after the temperature shift.

atataaatttacataatccatttgcgcccctacctttgatataacagcttcttccatttttttcccttgatcaccggagctgata	88
ATGATTCGTCACATTGCCGGTACTCTGTTCAATTTGGACTCGCACTTAACGTGCGCGTTTCAGAGAGCCGTAATGTTTGAACCTCCG	177
M I R H I A G T L F I I G L A L N V A V S E S R N V L K L P	30
TCAGAAGTTTCTAGATTCTTCGGTCCCGATAAGAGTAATGTCCGGCATGATCATGATGACGACTCCGTCGGTACCAGATGGGCTATCCTG	267
S E V S R F F G A D K S N V G D D H D D D S V G T R W A I L	60
CTAGCCGGATCTAACGGTATTGGAATTACCGTCACCAGGCTGATATGCCACGCATATCAACTGTTGAAGAAGGGTGGTCTCAAAGAT	357
L A G S N G Y W N Y R H Q A D I C H A Y Q L L K K G G L K D	90
GAGAACATTGTTGTGTTTATGTACGATGACATTGCTAACCAATGAAGAGAATCCAAGACCAGGAGTTATCATTAAAGCCCTCATGGTGAG	447
E N I V V F M Y D D I A N N E E N P R P G V I I N S P H G E	120
GATGTTTACAAAGGAGTTCCTAAGGATTACACTGGGGATGATGTTACTGTTAACAACTTTTTTCTGCTCTCCTGGGAACAAAAGTCT	537
D V Y K G V P K D Y T G D D V T V N N F F A A L L G N K T A	150
CTTAGTGGAGGCAGCGAAAGGTGGTGAATAGTGGTCCGAATGATCATATCTCTCTATAGTGATCATGGCGCCCTGGAGTGCTT	627
L S G G S G K V V N S G P N D H I L I F Y S D H G G P G V L	180
GGGATGCCTACCGATCCTTACCTCTATGCCAACGATCTGATTGACGTGTTGAAGAAGAAGCATGCTCCGGAACATATAAAAGCTTGGTA	717
G M P T D P Y L Y A N D L I D V L K K K H A S G T Y K S L V	210
TTTTACCTGAAGCTTGTGAGTCTGGTAGTATATTTGAGGCTTCTTCTGAAAGTTTAAATATCTATGCCACAACAGCATCAAATGCT	807
F Y L E A C E S G S I F E G L L P E G L N I Y A T T A S N A	240
GAAGAGAGTAGCTGGGAACCTATTGTCTGGAGAGTATCCCAGTCTCCTATTTGAATATGAGACTTGCCTGGGTGACTTGTACAGTATT	897
E E S S W G T Y C P G E Y P S P P I E Y E T C L G D L Y S I	270
TCCTGGATGGAGACAGTGAATTACACAACCTCGGACTGAAAGTCTGAAGCAGCAGTATCACCTGGTCAGAGAGAACTGCTACTGGG	987
S W M E D S E L H N L R T E S L K Q Q Y H L V R E R T A T G	300
AATCCTGTTTATGGTTCACATGTCATGCAATATGGTATCTACATCTCAGCAAGGATGCTCTATACTTATATATGGGTACAAATCCTGCT	1077
N P V Y G S H V M Q Y G D L H L S K D A L Y L Y M G T N P A	330
AATGATAATTATACTTTTATGGATGACAATTCCTTGCAGATATCAAAGCCGTTAACCAGCGTGATGCAGATCTTCTGCATTTTTGGTAC	1167
N D N Y T F M D D N S L R V S K A V N Q R D A D L L H F W Y	360
AAGTCCGCAAGGCTCCTGAGGGCTCTGTGAGGAAAATTGAGGCTCAGAAACAGTTAAATGAAGCAATATCACATAGAGTGCACCTGGAC	1257
K F R K A P E G S V R K I E A Q K Q L N E A I S H R V H L D	390
AACAGCATAGCCCTTGTCCGTAACCTTCTATTTGGAATTAAGGTTCCAGAGGTGTAAGTAGTGTCCGCCCTGCTGGTCAGCCTCTT	1347
N S I A L V G K L L F G I K K G P E V L S S V R P A G Q P L	420
GTTGATGACTGGGACTGCCTTAAATCCTTTGTAAGAACATTTGAGACACATTGTGGATCGTTATCCCAGTATGGAATGAAACATATGCCG	1437
V D D W D C L K S F V R T F E T H C G S L S Q Y G M K H M R	450
TCCATTGCTAACATATGCAACGTTGGAATTAAGATGGCCAGATGGTGGAGGCATCAGCACAAAGCTTGTCCAGCTTTGCATCCAATACT	1527
S I A N I C N V G I K M A Q M V E A S A Q A C P S F A S N T	480
TGGAGTTCCTCCAGAGGGGTTTTAGTGCATGATTggcatctaagtctcaatatgtcgagattatcagtacgaagattgatatagtgatt	1617
W S S L Q R G F S A *	491
gtaagatggttcttaagcataattgcttcttgaataacaggttagaagcgcatcattattgagttgaaatgtactcgaagcagatc	1707
ttattgtaactatgttatagttctgtcatcatgtatagaactcctactatgcaaaagctttgcctgaacaaactatgtttggaagggaa	1797
tataagcttgacttcttttgaattagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1871

Figure 4-1. cDNA and deduced amino acid sequences of tobacco NtVPE-1a.

The nucleotide sequence of the putative coding region is shown in uppercase letters and the 5' and 3'-noncoding region are shown in lowercase letters. The potential essential residues for the VPE activity (two-cysteine and one-histidine) are marked with red color. Sequences corresponding to a pair of primers for RT-PCR in figure 7 are underlined with direction. The nucleotide sequence of the isolated tobacco *NtVPE-1a* has been submitted to DDBJ/GenBank with the accession number AB075947.


```

                                taacagctcctccattatttcttttcttgtatcacgggagccgata      49
ATGATTCGTTACGTCGCCGGTACTCTGTTCTTAATTGGACTCGCACTTAACGTCGCCGTTTCAGAGAGCCGTAATGTTTTGAAACTCCG      -139
M I R Y V A G T L F L I G L A L N V A V S E S R N V L K L P      30
TCAGAAGTTTCTAGATTCTTCGGTGCCGATGAGAGTAACGCCGGCGATCATGATGACGACTCCGTCGGTACTAGATGGCTATTCTGCTA      229
S E V S R F F G A D E S N A G D H D D D S V G T R W A I L L      60
GCCGGATCAAACGGTTATTGGAATTACGCCACCAGGCTGATATATGCCACGCATATCAACTGTTGAAGAAGGGTGGTCTGAAAGATGAG      319
A G S N G Y W N Y R H Q A D I C H A Y Q L L K K G G L K D E      90
AACATTGTTGTTCATGTACGATGACATTGCAAACAACGAAGAGAACCAAGACGAGGATTATCATTAAATAGCCCTCATGGTGAGGAT      409
N I V V F M Y D D I A N N E E N P R R G V I I N S P H G E D      120
GTTTACAAAGGAGTCCCTAAGGATTACACTGGGATGATGTTACTGTTGACAACTTTTTGCTGTTATCCTTGGGAACAAAACCTGCCCTT      499
V Y K G V P K D Y T G D D V T V D N F F A V I L G N K T A L      150
AGTGGAGGCAGCGGAAAGTGGTGAATAGTGGTCCAAATGATCATATCTTCTTCTATAGTATGATGATGGAGGCTCGGAGTGCTGGG      589
S G G S G K V V N S G P N D H I F I F Y S D H G G P G V L G      180
ATGCCTACCGATCCATACCTCTATGCAAACGATCTTATTGACGTGTTGAAGAAGAAGCATGCTCCGGTACATATAAAAGCTGGTATTT      679
M P T D P Y L Y A N D L I D V L K K K H A S G T Y K S L V F      210
TACCTGAAGCTTCCGAGTCTGGTAGTATATTTGAGGGTCTTCTCCTGAAGGTTTAAATATCTATGCCACAACAGCATCAAATGCTGAA      769
Y L E A C E S G S I F E G L L P E G L N I Y A T T A S N A E      240
GAGAGTAGCTGGGAACTATTGCCAGGAGAGTATCCAGTCTCCTATTGAATACATGACCTGCCCTGGTACTGTACAGTATTTCC      859
E S S W G T Y C P G E Y P S P P I E Y M T C L G D L Y S I S      270
TGGATGGAGGACAGTGAATTACACAACCTGGGACTGAAAGTCTGAAGCAGCAATATCACCTGGTCAAAGAGAGAAGTCTACTGGGAAT      949
W M E D S E L H N L R T E S L K Q Q Y H L V K E R T A T G N      300
CCTGTTTATGGTTCACATGTCATGCAATATGGTATCTACATCTCAGCAAGGATGCTCTATACTTATATATGGGTACAAATCCTGCAAA      1039
P V Y G S H V M Q Y G D L H L S K D A L Y L Y M G T N P A N      330
GATAATTATACTTTATGGATGACAATTCATTGCGAGTATCAAAGGCTGTCAACCAGCGTGATGCAGATCTTCTGCATTTCTGGCACAAG      1129
D N Y T F M D D N S L R V S K A V N Q R D A D L L H F W H K      -360
TTCCGCACGGCTCCTGAAGGCTCTGTTAGGAAAATTGAGGCTCAAAAACAGTTAAATGAAGCAATATCACATAGAGTGCCTTGGACAAC      1219
F R T A P E G S V R K I E A Q K Q L N E A I S H R V H L D N      390
AGCGTAGCCCTTGTGCGTAAACTTCTGTTGGAATTGAAAAGGTCAGAGGTGCTGAGTGGCGTCCGCCCTGCTGGTCAAGCCTCTTGT      1309
S V A L V G K L L F G I E K G P E V L S G V R P A G Q P L V      420
GATGACTGGGACTGCCTTAAATCCTTTGTAAGAAGCTTTGAGACACATTGTGGATCGTTATCCAGTATGGAATGAAACATATGCGCTCT      1399
D D W D C L K S F V R T F E T H C G S L S Q Y G M K H M R S      450
ATTGCTAACATATGCAACGCTGGAATTAAGAAGGAGCAGATGGTGGAGGCATCAGCACAAAGCTGCCCCAGCGTCCATCCAATACTGG      1489
I A N I C N A G I K K E Q M V E A S A Q A C P S V P S N T W      480
AGTTCCTCCACAGGGTTTTAGTGCATGAttggcatctaattgctcaatatgtcgagattatcagttacgaagattgatatagtattgta      1579
S S L H R G F S A *      490
agatggttcttaagcataattgcttcttgaataacaggttagaagcgcatcattattgagttgaaatgtactagaagcagatatctta      1669
ttgtaactattgttatagttcgtcatcattgtatataactcttactatgcaaaagctctgctgaacaaactatgtttggaagagaatgt      1759
aagcttgactttcctttgaattaaaaaaaaa      1789

```

Figure 4-2. cDNA and deduced amino acid sequences of tobacco NtVPE-1b.

The nucleotide sequence of the putative coding region is shown in uppercase letters and the 5' and 3'-noncoding region are shown in lowercase letters. The potential essential residues for the VPE activity (two-cysteine and one-histidine) are marked with red color. Sequences corresponding to a pair of primers for RT-PCR in figure 7 are underlined with direction. The nucleotide sequence of the isolated tobacco *NtVPE-1b* has been submitted to DDBJ/GenBank with the accession number AB075948.

gaagcattgaagcgtaatcatctcattaattgactagcatt	41
aaaaactgaaaatgaagatatcgtcaacgaaacttttttttttcttttctaactgtgatgtactagctttgatttaccttgtttgaaaca	131
ATGATTGTTTCGCTACGTTGTGAGTGCTATCTTGATCATTGGACTGTCAGTTGTCGCCCGCTTGACGGCAGGGATGTGCTGAAATTACCA	221
M I V R Y V V S A I L I I G L S V V A A V D G R D V L K L P	30
TCGGAAGCATCAACGTTTTTCAGTGGTAATTATGATGATGATCAATTGGTACTAAATGGGCTGTGTTGGTTGCTGGATCAAGAGGCTAC	311
S E A S T F F S G N Y D D D S I G T K W A V L V A G S R G Y	60
TGGAATTACAGGCACCAGGCAGATGTTTGTACGCATATCAGCTGTTGAAGAAAGGTGGCCTCAAGGATGAGAATATTATTGTGTTTATG	401
W N Y R H Q A D V C H A Y Q L L K K G G L K D E N I I V F M	90
TATGATGACATTGCTCATAATTTTGAAAATCCTAGGCCAGGAGTCATCATAAATAGCCCTAATGGTACGATGTCTATAAAGGAGTTCCA	491
Y D D I A H N F E N P R P G V I I N S P N G D D V Y K G V P	120
AAGGATTATACAGGCATCATGTTACAGCCAACAACCTTTCTGCTGTATCCTTGGGAACAAGCCGCTCTTAGTGAGGCAGTGGGAAG	581
K D Y T G H H V T A N N F L A V I L G N K A A L S G G S G K	150
GTGGTGAAAGTGGTCCAAATGATCATATCTTCATCTTCTACAGTGATCATGGTGGTCTGGAGTGCCTGGGATGCCTAGTGGCCCTTAT	671
V V E S G P N D H I F I F Y S D H G G P G V L G M P S G P Y	180
CTCTATGCTGATGATTAATTGATGCTTGAAGGAAGCATGCTTCAGGGACATACAAAAGCTTAGTCTTTACATTGAGGCTTGTGAA	761
L Y A D D L I D V L K R K H A S G T Y K S L V F Y I E A C E	210
TCTGGGAGTATATTTGAGGGCCTTCTACCTGAAGGTCTTAATATCTATGCAACAACAGCATCAAATGCTGAAGAGGACAGTGGGAACC	851
S G S I F E G L L P E G L N I Y A T T A S N A E E D S W G T	240
TACTGTCCAGGAGACTATCCAGGTCTCTCCAGAATACAGACCTGCTGGGTGACTGTACGCTGTATCTTGGATGGAAGATAGTGAA	941
Y C P G D Y P G P P P E Y Q T C L G D L Y A V S W M E D S E	270
AAACACAATCTCCGAAGAGAAACTTTAGGAATGCAATATGAGCTGGTAAAAGGAGAAGTCTAACTCATTCCCTATGCAAGTTCGCAT	1031
K H N L R R E T L G M Q Y E L V K R R T A N S F P Y A S S H	300
GTCATGCAATATGGTATCTGAAGCTAATGGATGATCCTCTTCCCTTATATGGGCACCAATCCCGCAATGATAATTACACTTTTCTG	1121
V M Q Y G D L K L M D D P L S L Y M G T N P A N D N Y T F L	330
GACGAGAATCCTCACTGCTCTCCGCAAAGCCTGTTAACCAACGTGATGCAGATCTTTTGCATTTCTGGACAAGTTCCTCAAGGCTCCT	1211
D E N S S L L S A K P V N Q R D A D L L H F W D K F L K A P	360
CAAGGTTCTGTTAGGAAAGTTGAAGCCCAAGCAGCTGAGTGAAGCTATGTCACACAGAATGCACATAGATGACAGCATTGCTCTTGT	1301
Q G S V R K V E A Q K Q L S E A M S H R M H I D D S I A L V	390
GGGAGGCTTCTATTCCGAAATTGAGAAAGTCTGACGTGCTGATTAGAGTCCGACCTACTGGCGAGCCTCTTGTGATGATTGGAATTGT	1391
G R L L F G I E K G P D V L I R V R P T G E P L V D D W N C	420
CTTAAATCCTTTGTAAGAACATTTGAGACACGTTGTGGATCATTGTCAGTATGGAATGAAACATATGCGTGTGTTGCTAACATATGC	1481
L K S F V R T F E T R C G S L S Q Y G M K H M R A V A N I C	450
AACTCTGTATAACAATGGAGCAGATAGCCAAAGCATCAGCACAAGCTTGTGTGAGTATTCCTTCCAACCTTTGGAGTTCGCTCGACGAG	1571
N S C I T M E Q I A K A S A Q A C V S I P S N S W S S L D E	480
GGATTTAGTCATAGgacacacaaaattctgatctctcgggatgatctcttcttgatcattgacttcagtataatcttatgaaaatg	1661
G F S A *	485
attgtaaatatgcttttcttaaaaaataaattaatgtacattggttattagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1751
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1801

Figure 4-3. cDNA and deduced amino acid sequences of tobacco NtVPE-2.
The nucleotide sequence of the putative coding region is shown in uppercase letters and the 5' and 3'-noncoding region are shown in lowercase letters. The potential essential residues for the VPE activity (two-cysteine and one-histidine) are marked with red color. Sequences corresponding to a pair of primers for RT-PCR in figure 7 are underlined with direction. The nucleotide sequence of the isolated tobacco *NtVPE-2* has been submitted to DDBJ/GenBank with the accession number AB075949.

	gaacctttacgcttaccctttttaactcctgaccagttgata	45
ATGATTTTCGTACGCTGCCGGAATATTCTTCTCGTAGGATTCTCCATCGCCGCCGCCGACGGACGTAATGTTTTGAAACTTCCGTCG		135
M I S Y A A G I F F L V G F S I A A A A D G R N V L K L P S		30
GAAGCTTCCAGATTCTTCGATGAAGCCGATGACTCTGTTGGAACCAGATGGGCCCTCTTCTTCCGGATCAAATGTTATTGGAATTAT		225
E A S R F F D E A D D S V G T R W A V L L A G S N G Y W N Y		60
AGACATCAGGCTGATGTATGCCACCGTATCAGCTGTTGAGAAAAGTGGTCTCAAAGATGAGAATATTATCATGTTTCATGTATGATGAC		315
R H Q A D V C H A Y Q L L R K G G L K D E N I I M F M Y D D		90
ATTGCTTATAATGAAGAGAACCCAAAGACAAGGAGTTATCATCAATAGTCTCTGCGGAGGATGTCTACAAGGAGTCCCTAAGATTAT		405
I A Y N E E N P R Q G V I I N S P A G E D V Y K G V P K D Y		120
ACTGGAGATGATGTTAATGTGGACAACTTTTGGCCGTTCTCCTTGGTAACAAAAGTCTTACTGGAGGTAGTGGAAAGGTGGTGGAT		495
T G D D V N V D N F L A V L L G N K T A L T G G S G K V V D		150
AGTGGTCCAAATGATCATATTTTCATATTCATAGTATGATGATGGTGGCCCTGGGGTCTGGGATGCCTACCAATCCTTATCTCTATGCA		585
S G P N D H I F I F Y S D H G G P G V L G M P T N P Y L Y A		180
AGTGATCTGATTGATGTGTTGAAAAGAAGCATGCCTCTGGAACATATAAAAGCTTGGTACTGTACATTGAAGCTGTGAGTCCGGAAGT		675
S D L I D V L K K K H A S G T Y K S L V L Y I E A C E S G S		210
ATCTTTGAGGCTCTTCTCTAAAGTCTAAATATTTATGCCACAACAGCATCAAACGCTGTAGAGAGCAGCTGGGGCACCTATTGCTCT		765
I F E G L L P K G L N I Y A T T A S N A V E S S W G T Y C P		240
GGAGACTATCCTAGTCTTCTCCTCGCTATGAGACCTGCCTGGGTGACTTGTATGCTGTTTCTGGATGGAGGACAGTGAATGCACAAT		855
G D Y P S L P P G Y E T C L G D L Y A V S W M E D S E M H N		270
TTGCGGACTGAAAATTTGAGGCAACAGTATCACCTGGTCAAAGAGAGAACTGCTAATGAAAATCTGCTTATGTTCCCATGCTTTGCAA		945
L R T E N L R Q Q Y H L V K E R T A N G N S A Y G S H V L Q		300
TTTGGTATCTACAACCTGGTATGGATTCTCTGTTTCATGTACATGGGTACAATCCTGCAAATGATAACTACACCTATGTAGATGATAAT		1035
F G D L Q L G M D S L F M Y M G T N P A N D N Y T Y V D D N		330
TCCTTGGCGGCATCATCAAAGGCTGTCAACCAGCGTATGCAGATCTTTTGCAATTTCTGGGACAAGTCCGCAAGGCTCCTGAAGGCTCT		1125
S L R A S S K A V N Q R D A D L L H F W D K F R K A P E G S		360
GCTCGGAAAGTTGAAGCTCAGAAGCAATCACTGAAGCTATGTACACAGAATGCACCTAGACAACAGCATGGCTCTTGTGGTAAGCTT		1215
A R K V E A Q K Q F T E A M S H R M H L D N S M A L V G K L		390
CTGTTTGAATTCAAAAGGCTCCTGAGGTGCTGAAGCGTTCGACCTGTAGGTCAACCTCTTGTGATGACTGGACCTGCCTGAAGTAC		1305
L F G I Q K G P E V L K R V R P V G Q P L V D D W T C L K Y		420
TTTGTAAAGAACATTTGAGACACACTGTGGATCATTATCCCAATATGGAATGAAACACATGCGATCCATCGCCAATATCTGTAATGCTGGA		1395
F V R T F E T H C G S L S Q Y G M K H M R S I A N I C N A G		450
ATTAAGATGGAGCAGATGGTGGAGGCATCAACACAAGCTGTCCAGCGTCCCGACCAATATTTGGAGTCCCTCCACAGGGGTTTTAGT		1485
I K M E Q M V E A S T Q A C P S V P T N I W S S L H R G F S		480
GCATAAacgccatggaatgtgcagtcctcacactctgatgctggtattagtgatgctacccttatcaatatcaatattcatgtcctgtctg		1575
A *		482
taaatagtgattgatgctggtattagtgaaagttaccggtattggtatcaagattcatgtcctggttgaattgttctctgttggcat		1665
aatggcttctctgtaatacagctgaaaagcacacatatattgtctggaatatattgagagcacatttctcattgtaaaaaaaaaaaaaa		1755
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa		1777

Figure 4-4. cDNA and deduced amino acid sequences of tobacco NtVPE-3. The nucleotide sequence of the putative coding region is shown in uppercase letters and the 5' and 3'-noncoding region are shown in lowercase letters. The potential essential residues for the VPE activity (two-cysteine and one-histidine) are marked with red color. Sequences corresponding to a pair of primers for RT-PCR in figure 7 are underlined with direction. The nucleotide sequence of the isolated tobacco *NtVPE-3* has been submitted to DDBJ/GenBank with the accession number AB075950.

A

	NtVPE-1a	NtVPE-1b	NtVPE-2	NtVPE-3	γ VPE
NtVPE-1a	—	94.0	69.0	76.1	68.5
NtVPE-1b	—	—	70.3	77.5	69.7
NtVPE-2	—	—	—	70.3	64.3
NtVPE-3	—	—	—	—	68.8

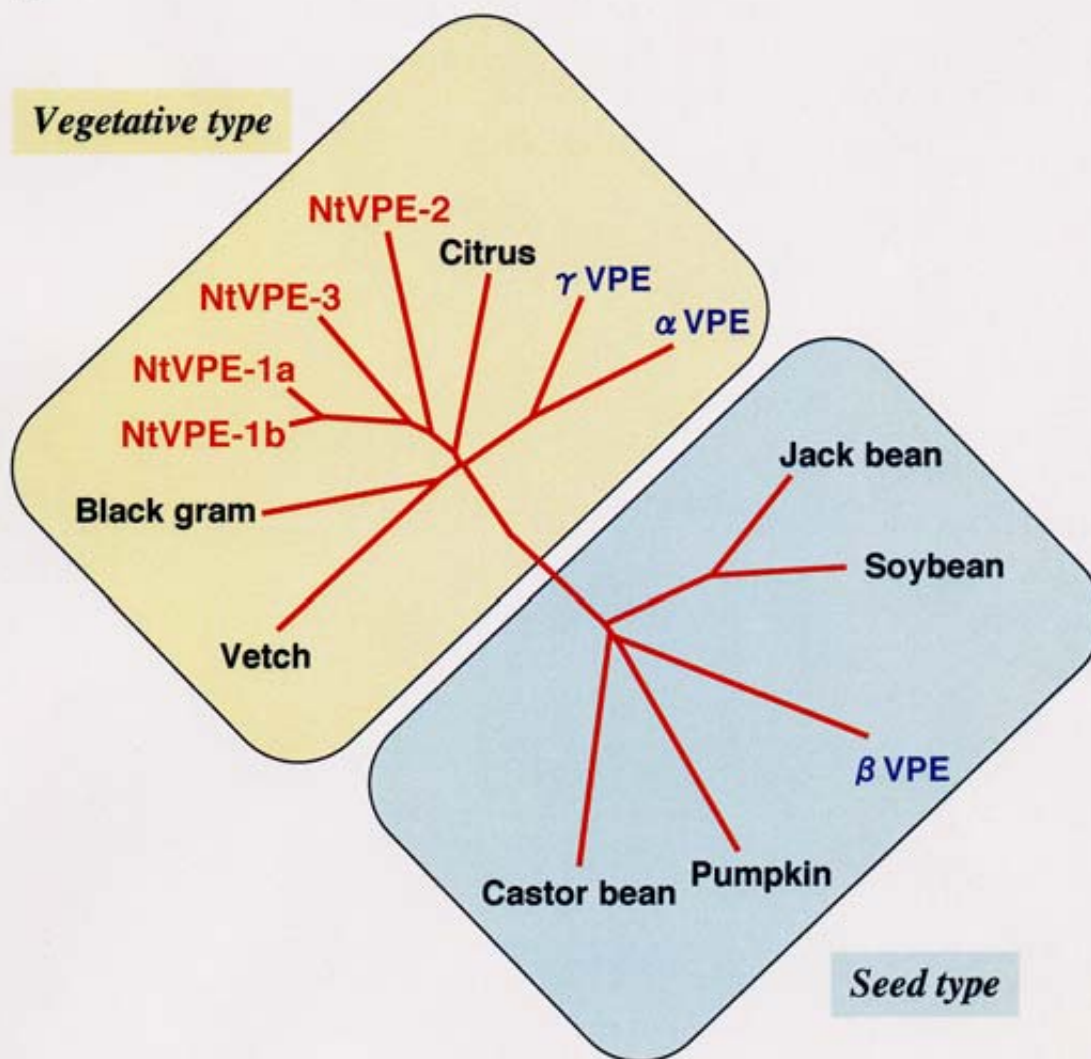
B

Figure 5. Comparison of four tobacco NtVPEs with other VPE homologs.

A, Comparison of tobacco NtVPEs with Arabidopsis γ VPE. The numbers show amino-acid sequence identity (%).

B, A phylogenetic tree of VPE homologs drawing with the Clustal W and TreeView programs. The scale represents evolutionary distance expressed in the number of substitutions per amino acid. VPE homologs are separated into two types, vegetative type and seed type. References to the published sequences are as follows; NtVPE-1a, NtVPE-1b, NtVPE-2 and NtVPE-3 (this study), Arabidopsis α VPE and β VPE (Kinoshita, et al., 1995a), Arabidopsis γ VPE (Kinoshita, et al., 1995b), castor bean VPE (Hara-Nishimura, I., et al., 1993a), soybean VPE (Shimada, T., et al., 1994), pumpkin VPE (unpublished data), black gram VmPE-1 (Okamoto, T. and Minamikawa, T., 1999), jack bean VPE (Takeda, O., et al., 1994), vetch VPE (Becker, C., et al., 1995) and citrus VPE (Alonso, J.M. and Granell, A., 1995).

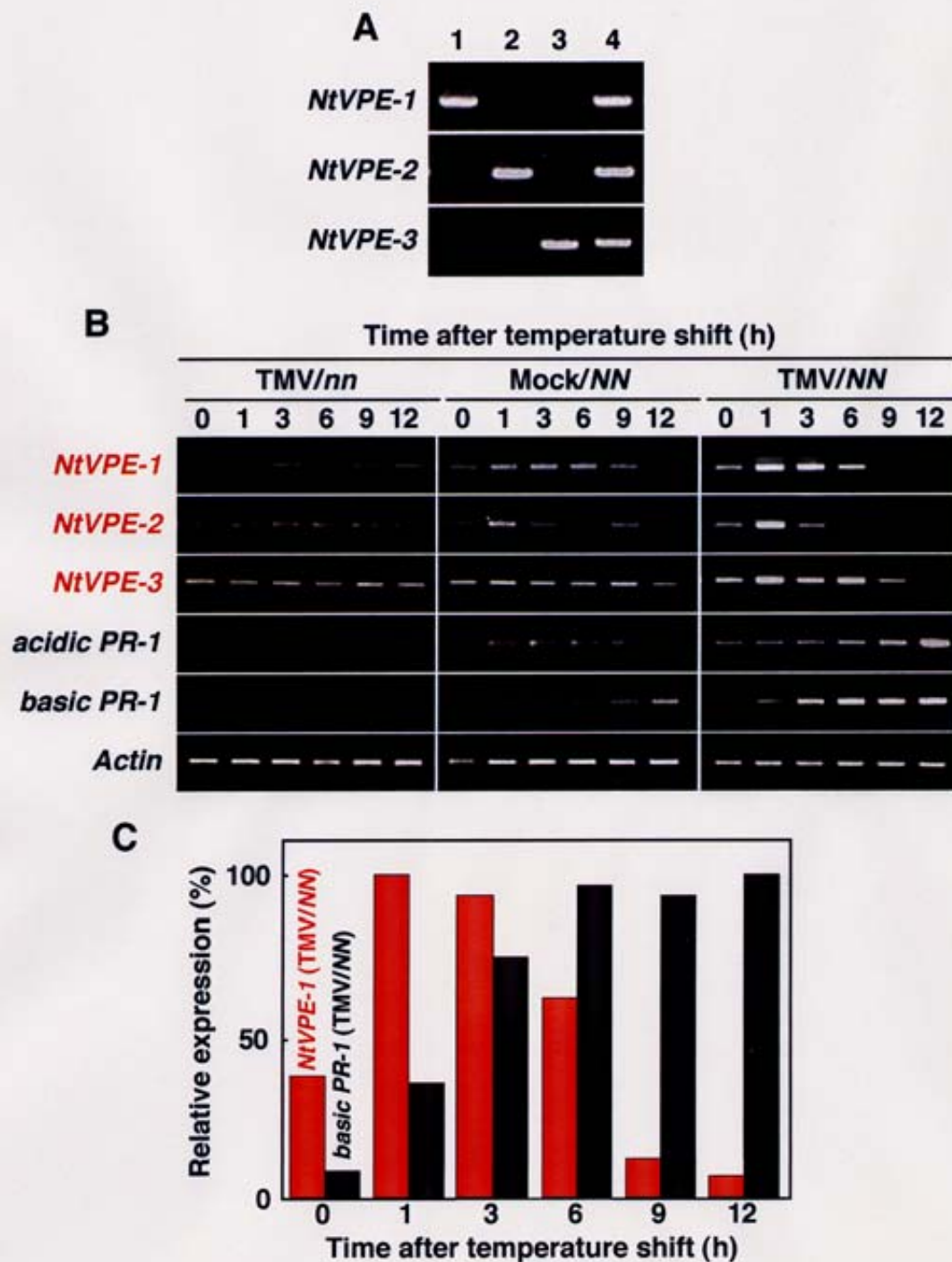


Figure 6. Developmental changes in the levels of *NtVPE* mRNAs during TMV-induced HR in tobacco leaves.

A, To show specificity of each designed primer set for tobacco *VPEs*, PCR was carried out using the specific primer sets and a plasmid having each of *NtVPE-1* (lane 1), *NtVPE-2* (lane 2) and *NtVPE-3* (lane 3) cDNAs or the mixture of these three plasmids (lane 4) as a template.

B, RT-PCR showing changes in the mRNA levels of *NtVPEs* and *PR-1s* in tobacco leaves after the temperature shift: TMV-infected *NN* tobacco leaves (TMV/*NN*), mock-infected *NN* tobacco leaves (Mock/*NN*) and TMV-infected *nn* tobacco leaves (TMV/*nn*). *Actin* is an internal standard. RT-PCR was performed with 25 amplification cycles for *NtVPE-1*, *acidic PR-1*, *basic PR-1* and *actin* and with 28 cycles for *NtVPE-2* and *NtVPE-3*.

C, The levels of mRNAs of *NtVPE-1* and *basic PR-1* in TMV-infected *NN* tobacco leaves were densitometrically determined. The relative amount is given as a percentage of the maximum value for *NtVPE-1* at 1 h and for *basic PR-1* at 12 h.

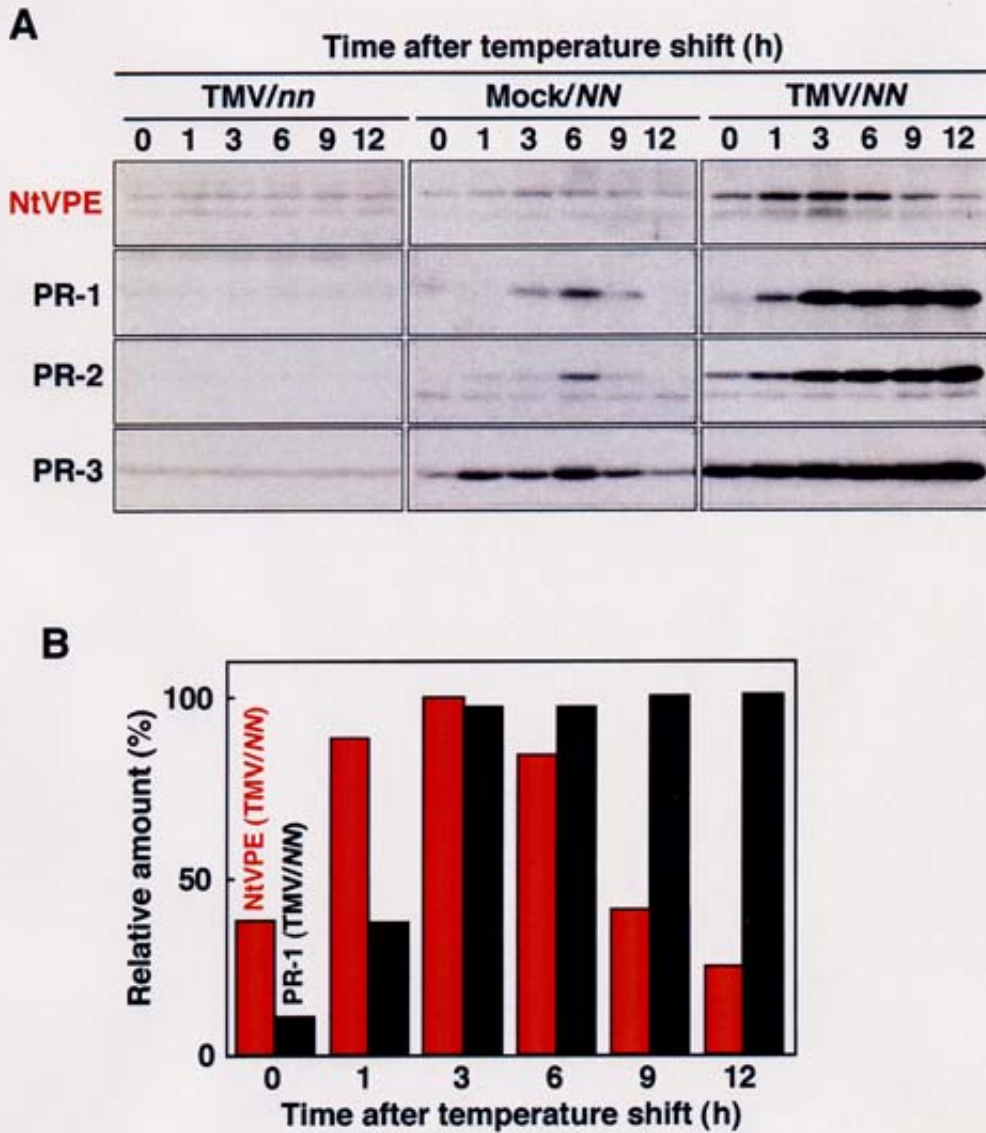


Figure 7. Developmental changes in the levels of the NtVPE protein during TMV-induced HR in tobacco leaves.

A, Immunoblots showing changes in the protein levels of NtVPE and PR proteins in tobacco leaves after the temperature shift: TMV-infected *NN* tobacco leaves (TMV/*NN*), mock-infected *NN* tobacco leaves (Mock/*NN*) and TMV-infected *nn* tobacco leaves (TMV/*nn*).

B, The levels of NtVPE and PR-1 in TMV-infected *NN* tobacco leaves were densitometrically determined. The relative amount is given as a percentage of the maximum value for NtVPE at 3 h and for PR-1 at 12 h.

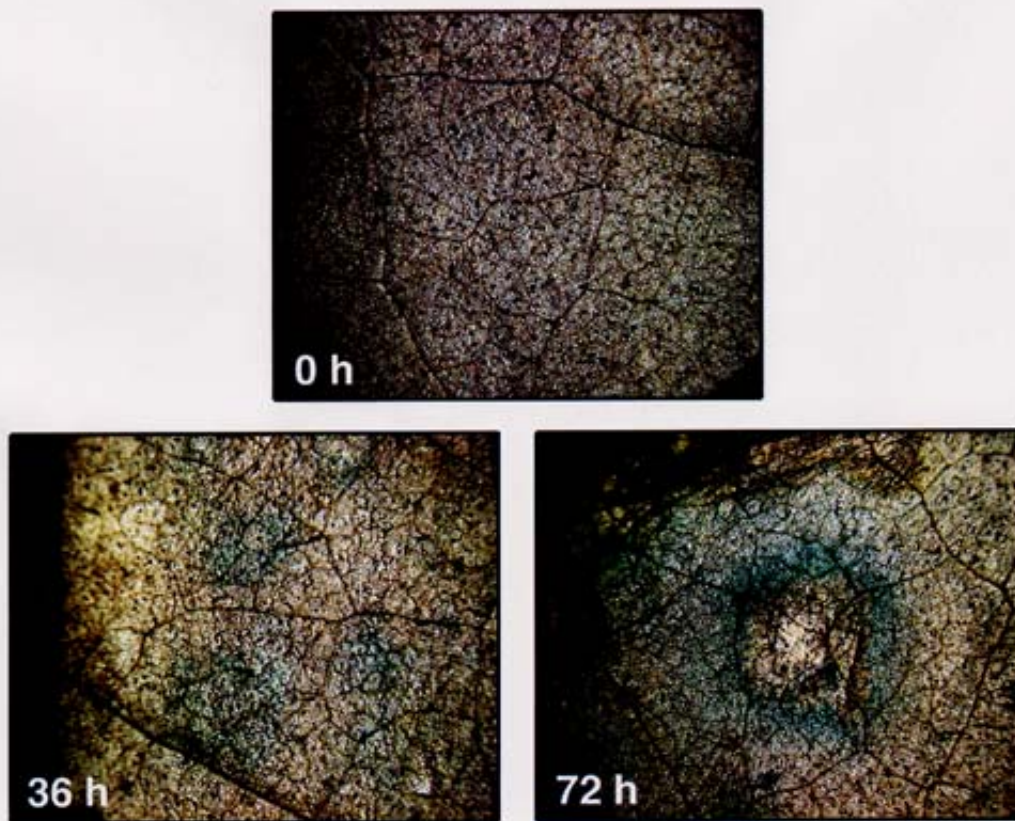


Figure 8. β -glucuronidase (GUS) staining of a transgenic tobacco leaf harboring γ VPE promoter/GUS gene after virus infection.

Transgenic tobacco (SR1) leaf with the chimeric γ VPE promoter/GUS gene was inoculated with RNA of mutated ToMV. SR1 can induce visible lesion after mutated ToMV infection. The leaf that had been incubated for 0, 36 and 72 h after inoculation was used for the GUS staining.

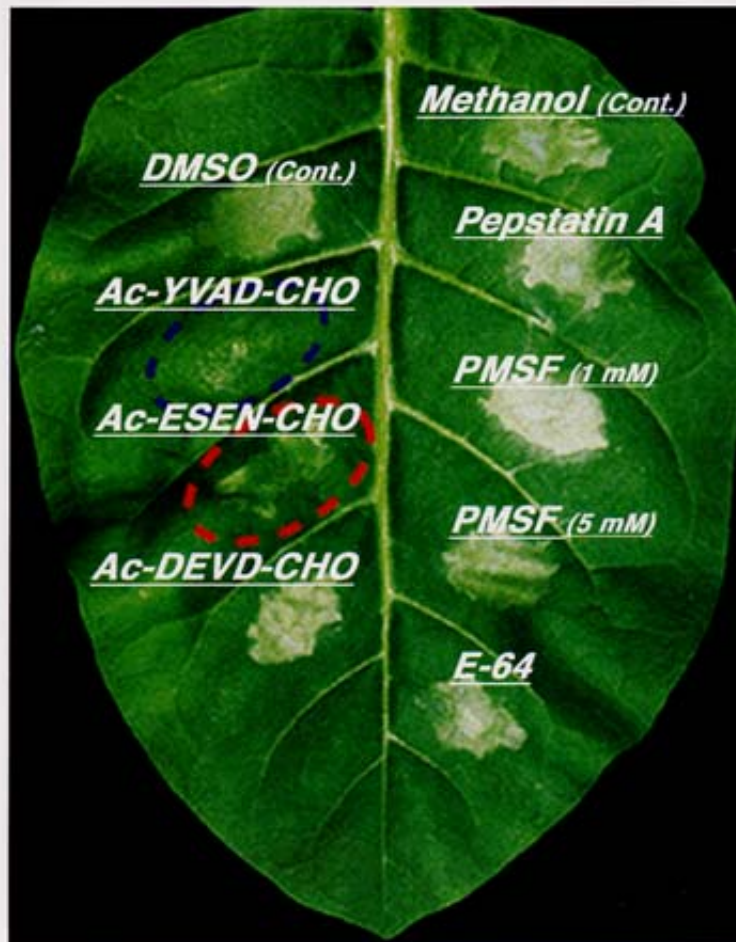


Figure 9. TMV-induced hypersensitive cell death in an NN tobacco leaf is abolished by a caspase-1-specific inhibitor and a VPE-specific inhibitor. The TMV-infected sites of the NN tobacco leaf were infiltrated with each proteinase inhibitor at 1 h before the temperature shift or with 1% DMSO or 5% methanol as controls. The proteinase inhibitors used were 1 mM Ac-YVAD-CHO (a caspase-1-specific inhibitor), 1 mM Ac-ESEN-CHO (a VPE-specific inhibitor), 1 mM Ac-DEVD-CHO (a caspase-3-specific inhibitor), 1 mM pepstatin A, and 1 mM E-64 dissolved in 1% DMSO. Both 1 mM PMSF in 1% methanol and 5 mM PMSF in 5% methanol were also used. The photograph was taken 24 h after the infiltration.

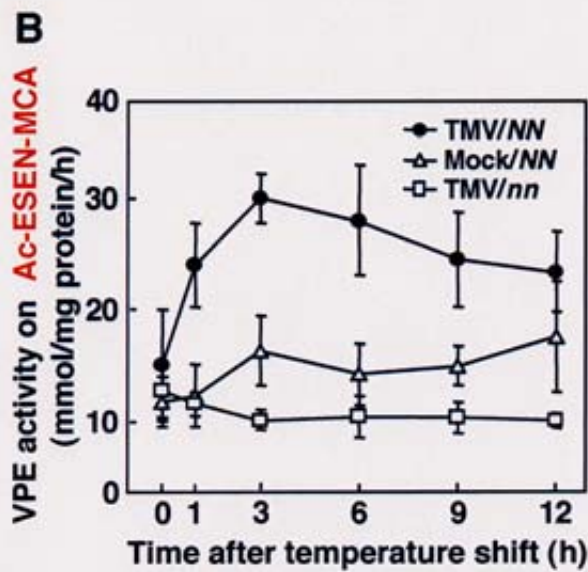
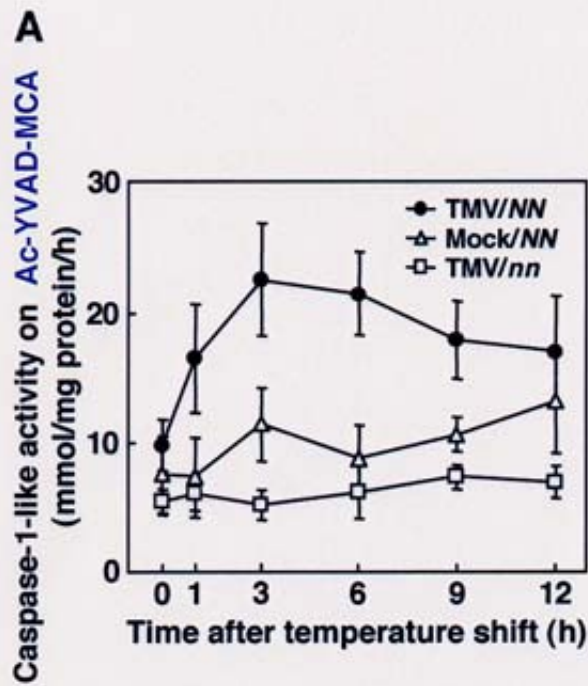


Figure 10. Comparison of caspase-1-like activity and VPE activity.

A, B, Change in the levels of caspase-1-like activity (**A**) and VPE activity (**B**) in tobacco leaves at the indicated times after the temperature shift: TMV-infected *NN* tobacco leaves (TMV/*NN*), mock-infected *NN* tobacco leaves (Mock/*NN*) and TMV-infected *nn* tobacco leaves (TMV/*nn*).

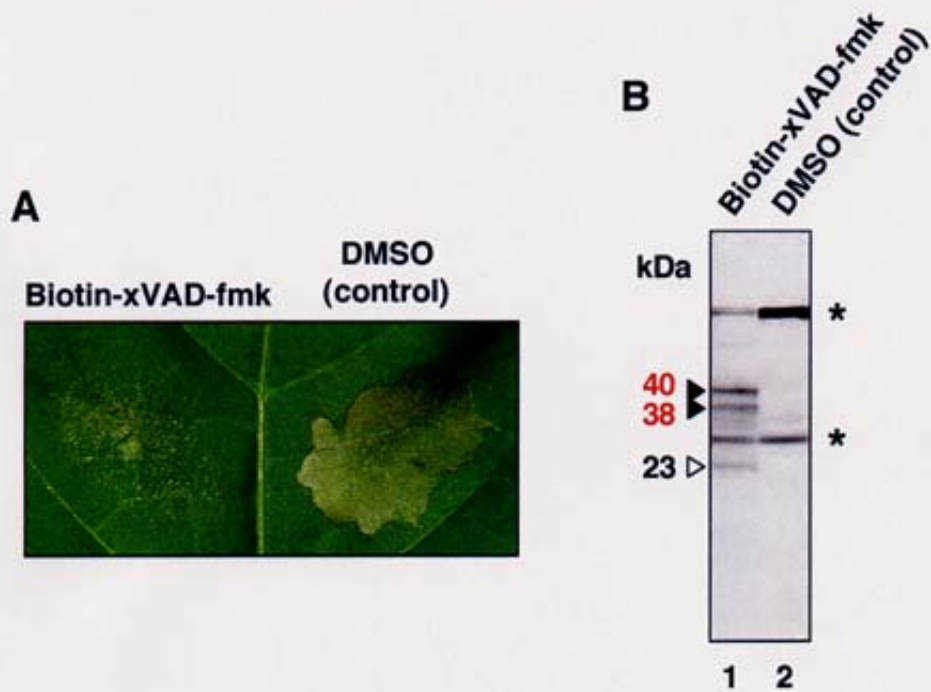


Figure 11. Visualization of proteins that bound to a biotinylated inhibitor of caspase in the TMV-infected *NN* tobacco leaves.

A, The TMV-infected sites of the *NN* tobacco leaf were infiltrated with 1 mM biotin-xVAD-fmk or with 1% DMSO as a control. Biotin-xVAD-fmk abolished the lesion formation. The molecular masses are indicated in kDa.

B, A biotinylated-inhibitor blot with biotin-xVAD-fmk-infiltrated leaves (lane 1) and DMSO-infiltrated leaves (lane 2). Asterisks indicate non-specific signals.

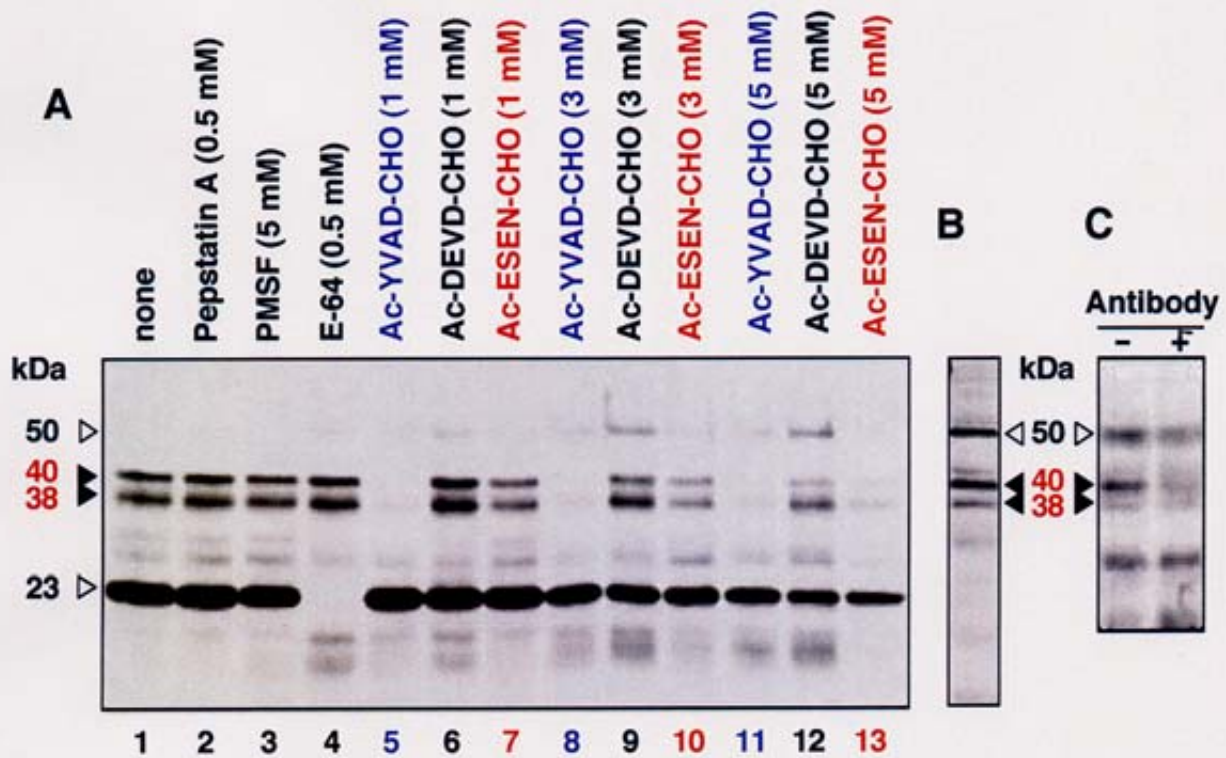


Figure 12. Identification of proteinase exhibiting caspase-1-like activity in TMV-infected *NN* tobacco leaves as VPE.

A, A biotinylated-inhibitor blot of the extract from TMV-infected leaves that were pre-incubated with each proteinase inhibitor before further incubation with biotin-xVAD-fmk (lanes 1-13).

B, An immunoblot of the leaf extracts with anti-VPE antibodies.

C, A biotinylated-inhibitor blot of the supernatant of the leaf extract after immunoprecipitation with (+) or without (-) anti-VPE antibodies.

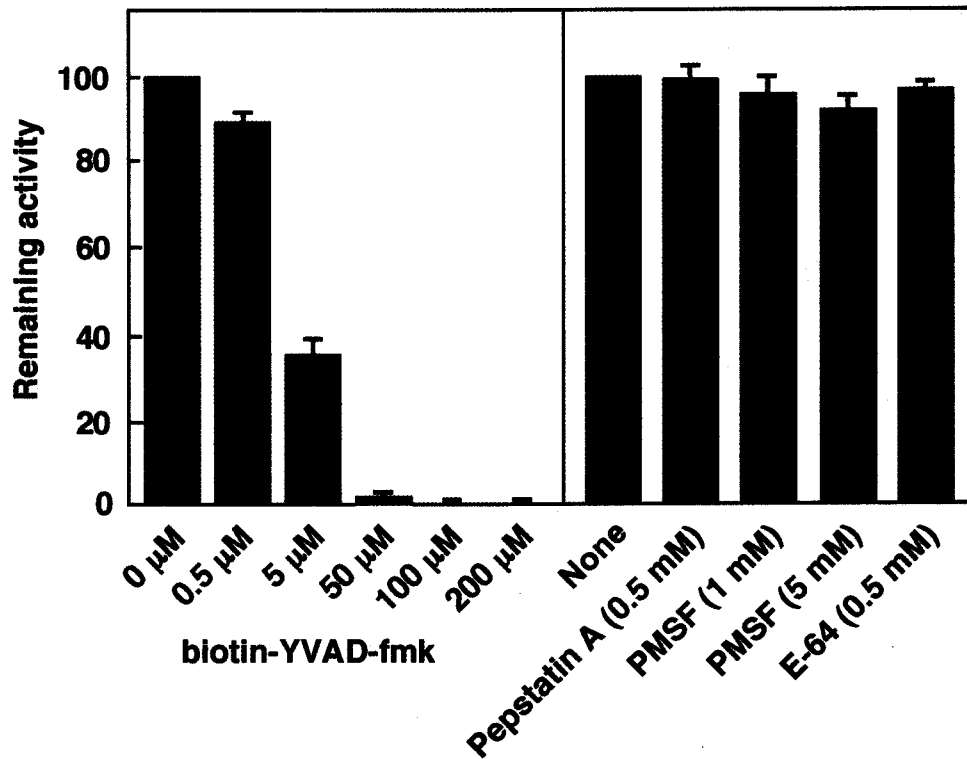
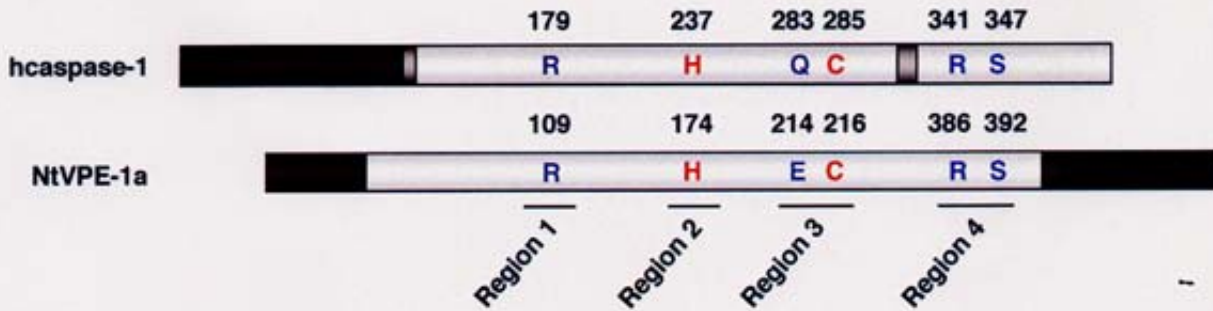


Figure 13. Effects of various inhibitors on VPE activity in TMV-infected leaves 3 h after the temperature shift.

Each experiment was repeated three times and the standard errors were represented as the lengths of the vertical bars.

A



B

Region 1	hcaspace-1	169	CNEEFDSIPRRTGAEVDITGM	189	VPE
	NtVPE-1a	99	DDIANNEENPRPGVIINSPHG	119	
	NtVPE-1b	98	DDIANNEENPRRGVIINSPHG	118	
	NtVPE-2	92	DDIAHNFENPRPGVIINSPNG	112	
	NtVPE-3	89	DDIAYNEENPRQGVIINSPAG	109	
	αVPE	87	DDIAENEENPRPGVIINSPNG	107	
	γVPE	98	DDIANNYENPRPGTIINSPHG	118	
	Black gram	91	DDIAFNEENPRPGVIINSPHG	111	
	Citrus	103	DDIAFNEENPRPGVIINHPHG	123	
	Sweet potato	98	DDIAYNEENPRKGIINSPHG	118	
	Vetch	99	DDIASNEENPRPGVIINKPDG	119	
Region 2	hcaspace-1	227	SDSTFLVFMSHGIREGICGKK	247	VPE
	NtVPE-1a	164	NDHILIFYSDHGGPGVLGMP	184	
	NtVPE-1b	163	NDHIFIFYSDHGGPGVLGMP	183	
	NtVPE-2	157	NDHIFIFYSDHGGPGVLGMP	177	
	NtVPE-3	154	NDHIFIFYSDHGGPGVLGMP	174	
	αVPE	152	NDHIFIYSDHGGPGVLGMP	172	
	γVPE	163	NDHIFIFYSDHGGPGVLGMP	183	
	Black gram	156	NDHIFIYSDHGGPGVLGMP	176	
	Citrus	168	NDHIFIFYSDHGGPGVLGMP	188	
	Sweet potato	163	NDHIFIYSDHGGPGVLGMP	183	
Vetch	164	NDHIFVYYTDHGGPGVLGMPV	184		
Region 3	hcaspace-1	273	LKDKPKV I I I Q A C R G D S P G V V W F K D	297	VPE
	NtVPE-1a	204	GTYKSLVFYLEACESGSIFEGLLPE	228	
	NtVPE-1b	203	GTYKSLVFYLEACESGSIFEGLLPE	227	
	NtVPE-2	197	GTYKSLVFIYI E A C E S G S I F E G L L P E	221	
	NtVPE-3	194	GTYKSLVLYI E A C E S G S I F E G L L P K	218	
	αVPE	192	GTYKSLVFYLEACESGSIFEGLLPE	216	
	γVPE	203	GTYKSLVFYLEACESGSIFEGLLPE	227	
	Black gram	196	GTYKSLAFYLEG C E S G S I F G L L P E	220	
	Citrus	208	GNYSKSLVFYLEACESGSIFEGLLLE	232	
	Sweet potato	203	GAYKSLVFYLEACESGSIFEGILPK	227	
Vetch	204	GTYKSLVFYLEACESGSIFEGLLPD	228		
Region 4	hcaspace-1	331	CSSTPDNVSWRHPTMGSVFIGRLIEHM	357	VPE
	NtVPE-1a	376	QKQLNEAISHRVHLDNSIALVGKLLFG	402	
	NtVPE-1b	375	QKQLNEAISHRVHLDNSVALVGKLLFG	401	
	NtVPE-2	370	QKQLSEAMSHRMHIDDSIALVGRLLFG	396	
	NtVPE-3	367	QKQFTEAMSHRMHLDNSMALVGKLLFG	393	
	αVPE	365	QKQVLEAMSHRLHVDNSILLIGILLFG	391	
	γVPE	376	QKQVLEAMSHRLHIDNSVILVGKILFG	402	
	Black gram	369	QKQILEAMSHRMHIDDSVTLIGKLLFG	395	
	Citrus	380	QKQFFEAMSHRMHVDHSIKLIGKLLFG	406	
	Sweet potato	378	QKQFTEAITHRTHLDNSIALVGKLLFG	404	
Vetch	379	EKQVLEAMSHRKHIDNSVKLIGQLLFG	405		

Figure 14. The essential amino acids for caspase-1-like activity are conserved in VPE homologs from various plants including tobacco.

A, Both caspase-1 (Cohen 1997) and plant VPEs (Kuroyanagi et al. 2002) are synthesized as a proprotein precursor and then converted into the respective mature form (open boxes) after removal of propeptides (closed boxes) and linker peptides (gray boxes). The essential amino acids of hcaspase-1 and the corresponding amino acids of tobacco VPE (NtVPE-1a) are shown in open boxes. Each experiment was repeated three times and the standard errors were represented as the lengths of the vertical bars.

B, His-237 and Cys-285 (red colored) form a catalytic dyad in human caspase-1 (hcaspase-1), while His-174 and Cys-216 (red colored) form a catalytic dyad of NtVPE-1a. A pentapeptide of the active site of hcaspase-1 is similar to those of VPEs from various plants (underlined in region 3). Three essential amino acids, Arg-179, Arg-341 and Ser-347 (blue colored) form the substrate pocket of hcaspase-1. The corresponding amino acids are conserved among plant VPEs. References to the published sequences are as follows: hcaspase-1 , tobacco VPEs (NtVPE-1a, NtVPE-1b, NtVPE-2 and NtVPE-3; this study), *Arabidopsis* α VPE , *Arabidopsis* γ VPE , black gram VmPE-1 , citrus VPE , sweet potato VPE (accession number, AF260827-1) and vetch VPE .

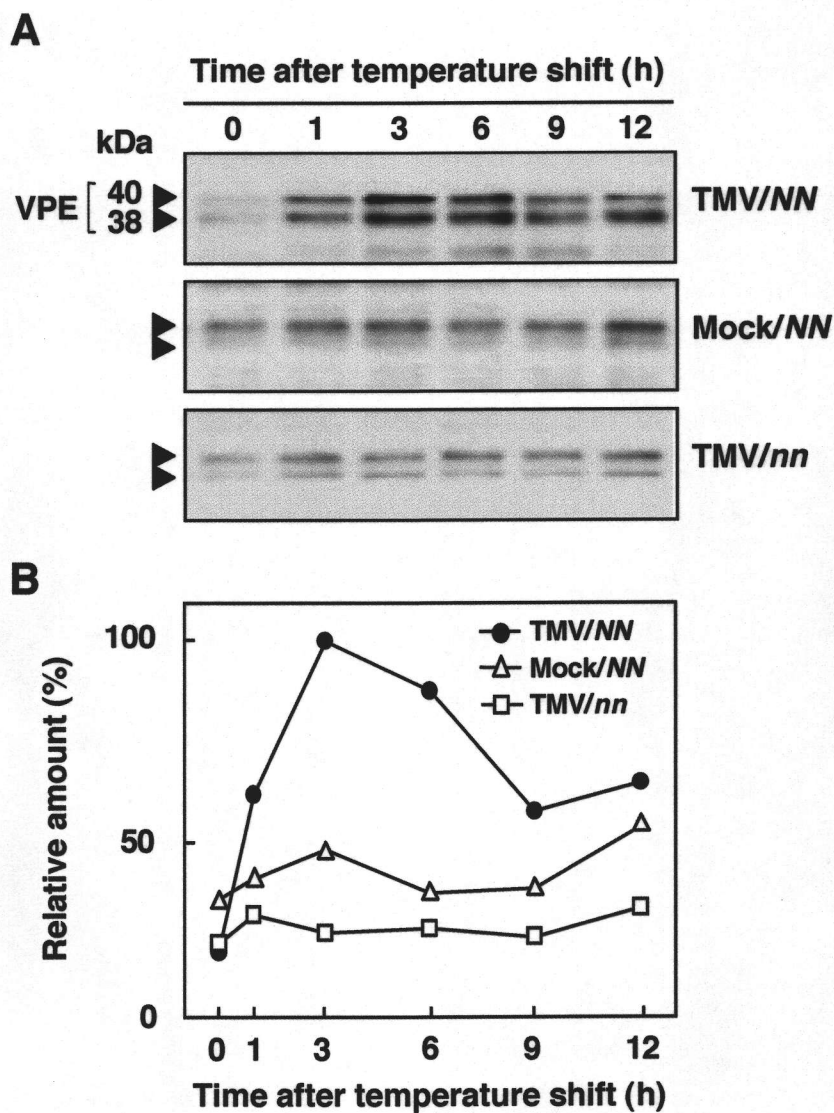


Figure 15. Developmental changes in the levels of the active forms of NtVPE that bound to a biotinylated inhibitor of VPE/caspase during TMV-induced HR in tobacco leaves.

A, Biotinylated-inhibitor blots showing changes in the protein levels of the active forms of NtVPE that bound to biotin-xVAD-fmk in tobacco leaves after the temperature shift: TMV-infected *NN* tobacco leaves (TMV/*NN*), mock-infected *NN* tobacco leaves (Mock/*NN*) and TMV-infected *nn* tobacco leaves (TMV/*nn*).

B, The levels of NtVPE that bound to biotin-xVAD-fmk in (A) were densitometrically determined. The relative amount is given as a percentage of the maximum value for NtVPE/*NN* at 3 h.

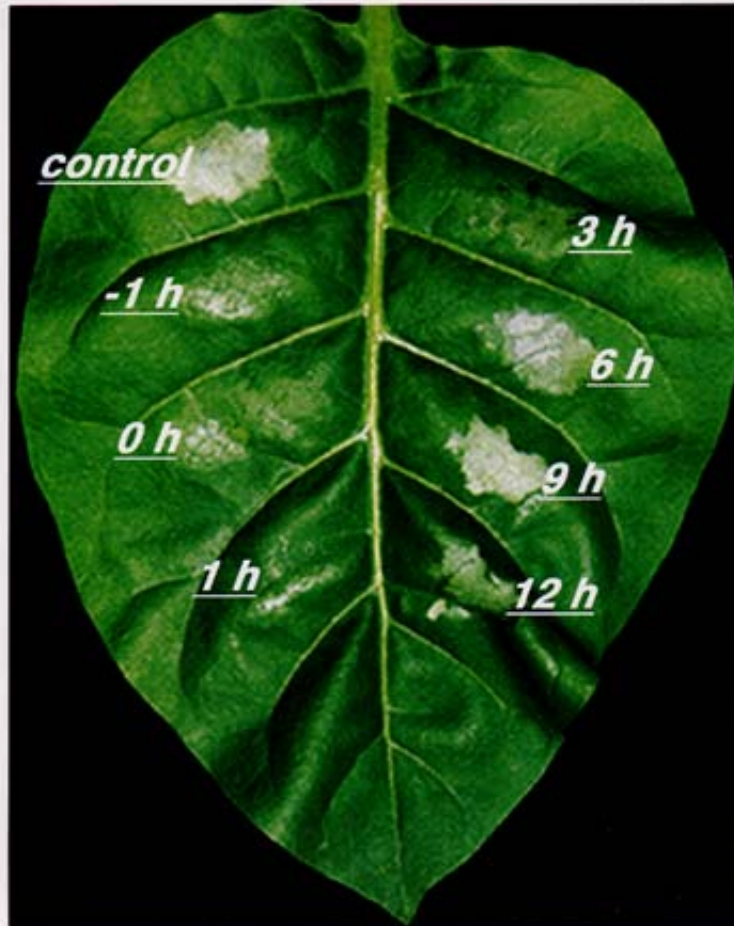


Figure 16. VPE functions in the early process of TMV-induced hypersensitive cell death.

A TMV-infected *NN* tobacco leaf was infiltrated with 1 mM Ac-YVAD-CHO (a VPE/caspase-1-specific inhibitor) at the indicated times after the temperature shift. The photograph was taken 24 h after the temperature shift. control, no infiltration of Ac-YVAD-CHO.

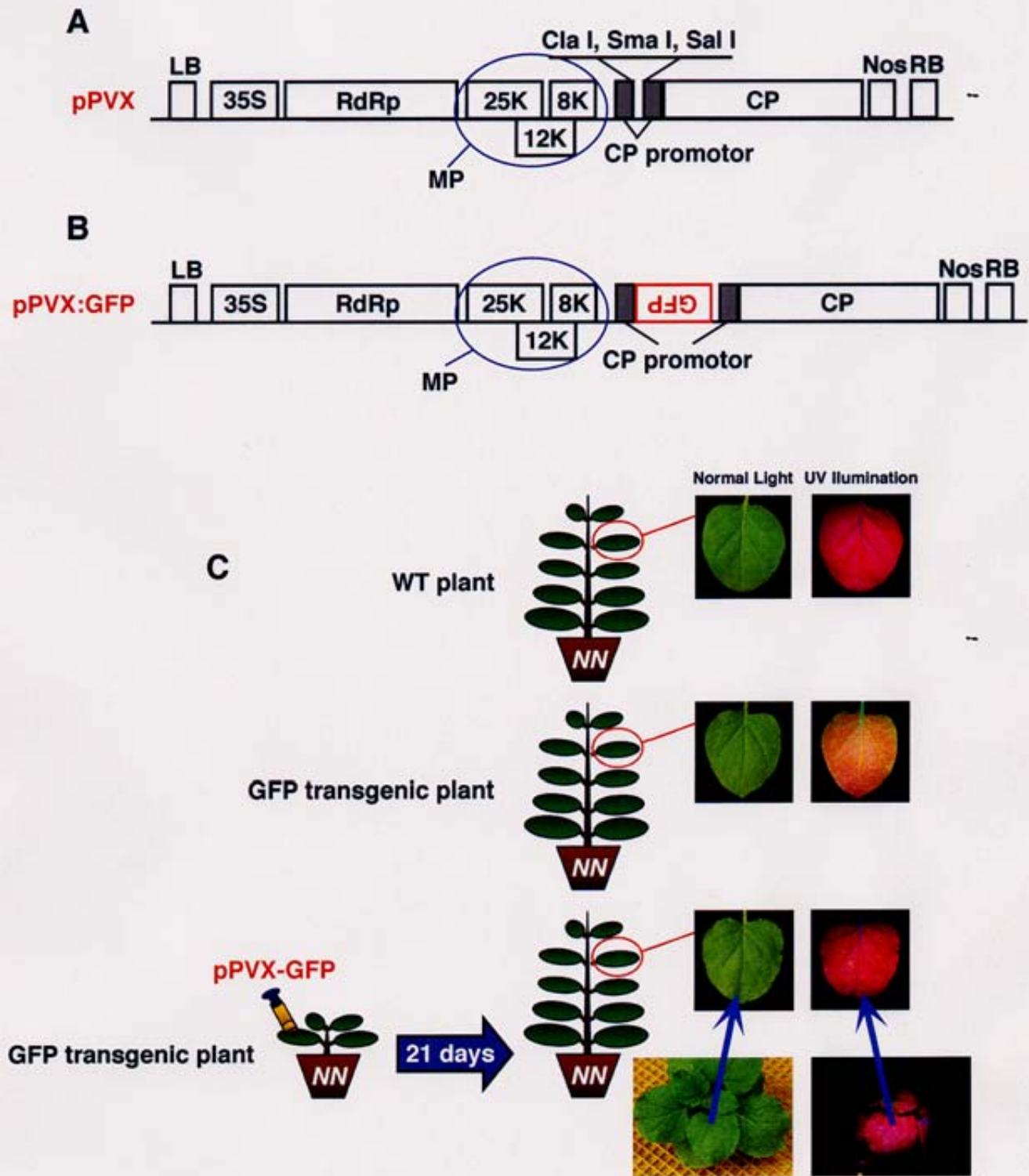


Figure 17. Virus-induced gene silencing of GFP in *N. benthamiana* carrying a GFP gene.

A, The structure of pPVX (Potato virus X Vector). LB, Left border; 35s, 35s promoter; RdRp, RNA dependent RNA polymerase; MP, movement protein; CP, coat protein; Nos, Nos terminator; RB, Right border.

B, The structure of pPVX:GFP. *GFP* cDNA was ligated into the *Sal* I sites of pPVX

C, Plans were inoculated with pPVX (vector) or pPVX:GFP by agroinfiltration.

The photographs of the plants and the leaves were taken under normal light or UV illumination at 21 days after the inoculation.

CACCAGGCGGACGTGTGCCACGGTATCAACTGTTGAAGAAGGGTGGTCTCAAAGATGAG	60
H Q A D V C H A Y Q L L K K G G L K D E	20
AATATTGTTGTTCATGTACGATGACATTGCTAACAATGAAGAGAATCCAATACCAGGA	120
N I V V F M Y D D I A N N E E N P I P G	40
<u>GTTATCATTAATAGCCCTCATGGTGAGGATGTTTACAAAGGAGTACCTAAGGATTACACT</u>	180
V I I N S P H G E D V Y K G V P K D Y T	60
<u>GGGGATGATGTTACTGTTGATAACTTTTTGCTGTTATCCTTGGGAACAAAAGTCTCTT</u>	240
G D D V T V D N F F A V I L G N K T A L	80
<u>AGTGGAGGCAGCGGAAAGGTGGTGAATAGTGGTCCAAATGATCATATTTTCATCTTCTAT</u>	300
S G G S G K V V N S G P N D H I F I F Y	100
<u>AGTGATCATGGCGGTCTGGAGTCTCGGGATGCCTACCGATCCGTACCTCTATGCAAAC</u>	360
S D H G G P G V L G M P T D P Y L Y A N	120
<u>GATCTGATTGACGTGTTGAAGAAGAAGCATGCTTCCGGAACATATAAAAGCTTGGTATT</u>	420
D L I D V L K K K H A S G T Y K S L V F	140
<u>TACCTGAAGCTTGTGAGTCTGGTAGTATATTTGAGGGTCTTCTTCTGAAGGTTTAAAT</u>	480
Y L E A C E S G S I F E G L L P E G L N	160
<u>ATCTACGCCACAACAGCATCAAATGCTGAAGAGAGTAGCTGGGGAACCTATTGCCAGGA</u>	540
I Y A T T A S N A E E S S W G T Y C P G	180
<u>GAGTATCCAGTCCCTCTATTGAATATATGACCTGCCTTGGTGACTTGTACAGTATTTCC</u>	600
E Y P S P P I E Y M T C L G D L Y S I S	200
<u>TGGATGGAGGACAGTGAATTACACAACCTGCGGACTGAAAGTCTGAAGCAGCAATATCAC</u>	660
W M E D S E L H N L R T E S L K Q Q Y H	220
<u>CTGGTCAAAGAGAGAACTGCTACTGGGAATCCTGTTTATGGTTACATGTCATGCAATAT</u>	720
L V K E R T A T G N P V Y G S H V M Q Y	240
<u>GGTGATCTACATCTCAGCAAGGATGCTCTATACTTATATATGGGTACAAATCCTGCAAAT</u>	780
G D L H L S K D A L Y L Y M G T N P A N	260
<u>GATAATTACTTTTATGGATGACAATTCCTTGGCAGTATCAACGGCTATCAACCAAAGC</u>	840
D N Y T F M D D N S L R V S T A I N Q S	280
GACGCCACCT	851
D A H	284

Figure 18-1. Partial cDNA and deduced amino acid sequences of *N. benthamiana* VPEs (NbVPE-1a).

The potential essential residues for the VPE activity (two-cysteine and one-histidine) are marked with red color. Two regions used for VIGS are shown by underlines with a red and blue color. The nucleotide sequence of the isolated *NbVPE-1a* has been submitted to DDBJ/GenBank with the accession number AB181187.

CACCAGGCGGATGTGTGTCATGCATATCAACTGTTGAAGAAGGGTGGTCTCAAAGATGAG	60
H Q A D V C H A Y Q L L K K G G L K D E	20
AACATTGTAGTGTTCATGTACGATGACATTGCAAACAATGTAGAGAATCCAAGACCAGGA	120
N I V V F M Y D D I A N N V E N P R P G	40
<u>GTTATCATTAAATAGCCCTCATGGTGAGGATGTTTACAAAGGAGTCCCTAAGGATTACACT</u>	180
V I I N S P H G E D V Y K G V P K D Y T	60
<u>GGGGATGATGTTACTGTTGATAACTTTTTGCTGTTATCCTTGGGAATAAACTGCTGTT</u>	240
G D D V T V D N F F A V I L G N K T A V	80
<u>AGTGGAGGCAGTGGAAAGGTGGTGAATAGTGGTCCAAATGATCATATCTTCATCTTCTAT</u>	300
S G G S G K V V N S G P N D H I F I F Y	100
<u>AGTGATCATGGAGGTCTGGAGTGCTTGGGATGCCTACCAATCCTTACCTCTACGCAAAC</u>	360
S D H G G P G V L G M P T N P Y L Y A N	120
<u>AATCTGATTGACGTGTTGAAGAAGAAGCATGCTTCCGGAACATATAAAAGCTTGGTATTT</u>	420
N L I D V L K K K H A S G T Y K S L V F	140
<u>TACCTGGAAGCTTGTGAGTCTGGTAGTATATTTGAGGGTCTTCTCCTGAAGGTTTAAAT</u>	480
Y L E A C E S G S I F E G L L P E G L N	160
<u>ATTTATGCCACAACAGCATCAAATGCTGAAGAGAGTAGCTGGGGGACTTATTGCCCAGGA</u>	540
I Y A T T A S N A E E S S W G T Y C P G	180
<u>GAGTATCCAGTCTCCAATTGAATACATGACCTGCCTTGGTGACTTGTACAGTATTTCC</u>	600
E Y P S P P I E Y M T C L G D L Y S I S	200
<u>TGGATGGAGGACAGTGAATTACACAACCTGCGGACTGAAAGCTTGAAGCAGCAGTATCAC</u>	660
W M E D S E L H N L R T E S L K Q Q Y H	220
<u>CTGGTCAAAGAGAGAACTGCTACTGGGAATCCTGTTTATGGTTCACATGTCATGCAATAT</u>	720
L V K E R T A T G N P V Y G S H V M Q Y	240
<u>GTAATCTACATCTCAGCGAGGATGCTCTATACTTGTATATGGGTACAAATCCTGCAAAT</u>	780
G N L H L S E D A L Y L Y M G T N P A N	260
<u>GATTATTACTTTTATGGATGACAATTCCTTGGGAGTATCAACGGCTGTCAACCAGAGC</u>	840
D Y Y T F M D D N S L R V S T A V N Q S	280
GACGCCACCT	851
D A H	284

Figure 18-2. Partial cDNA and deduced amino acid sequences of *N. benthamiana* VPEs (NbVPE-1b).

The potential essential residues for the VPE activity (two-cysteine and one-histidine) are marked with red color. Two regions used for VIGS are shown by underlines with a red and blue color. The nucleotide sequence of the isolated *NbVPE-1b* has been submitted to DDBJ/GenBank with the accession number AB181188.

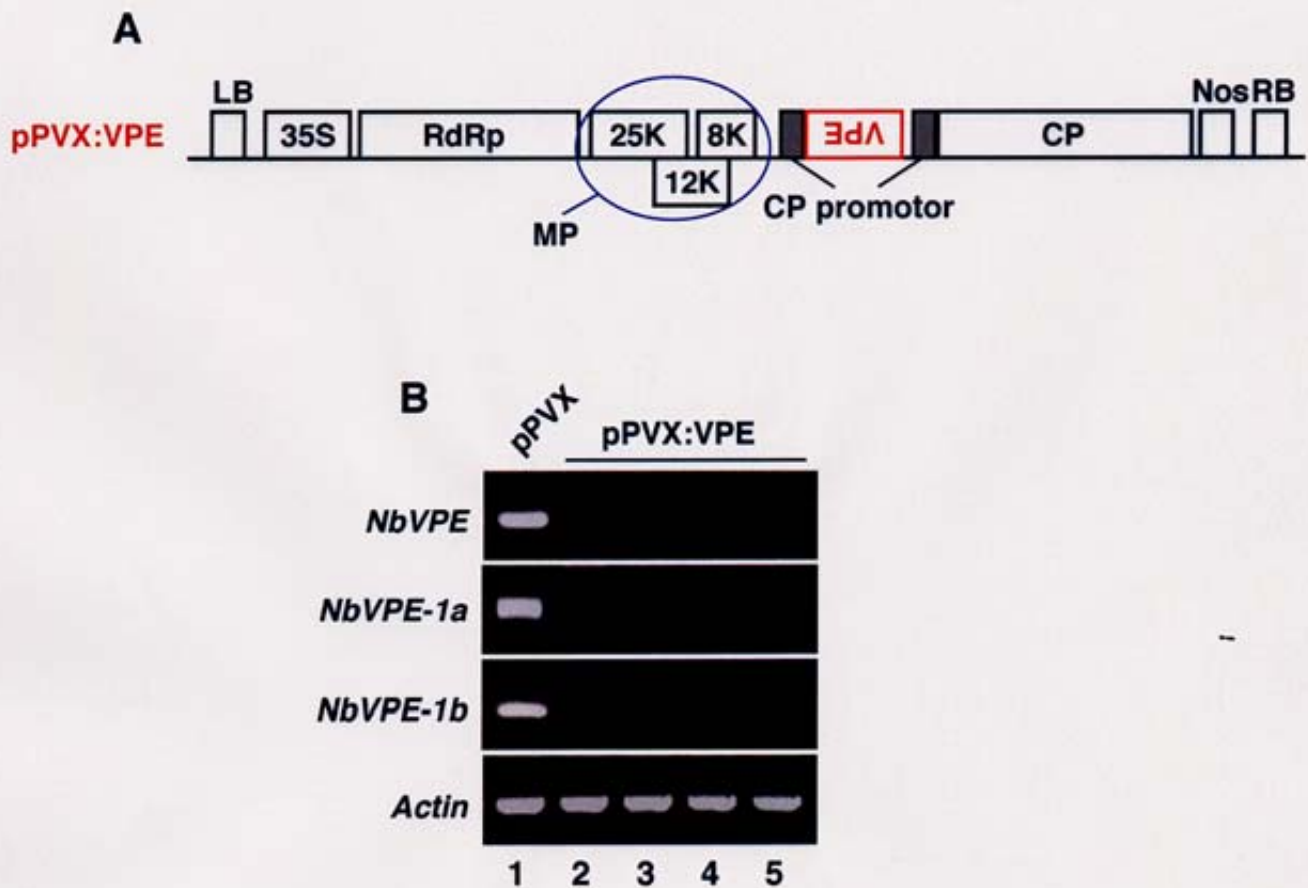


Figure 19. Virus-induced gene silencing of VPEs in *N. benthamiana*.

A, The structure of pPVX:VPE. LB, Left border; 35S, 35S promoter; RdRp, RNA dependent RNA polymerase; MP, movement protein; CP, coat protein; Nos, Nos terminator; RB, Right border.

B, RT-PCR shows the degree of silencing of VPE genes in pPVX-inoculated (lane 1) and four independent pPVX:VPE-inoculated (lanes 2-5) *N. benthamiana* plants. At 21 days after the inoculation, the fourth or fifth leave above the inoculated leaves of each plant were analyzed for transcript levels of VPEs. PCR was carried out using a primer set for the conserved region of plant VPEs (*NbVPE*) and a specific primer set for each of the abundant *NbVPE-1a* and *NbVPE-1b*. *Actin* is an internal standard.

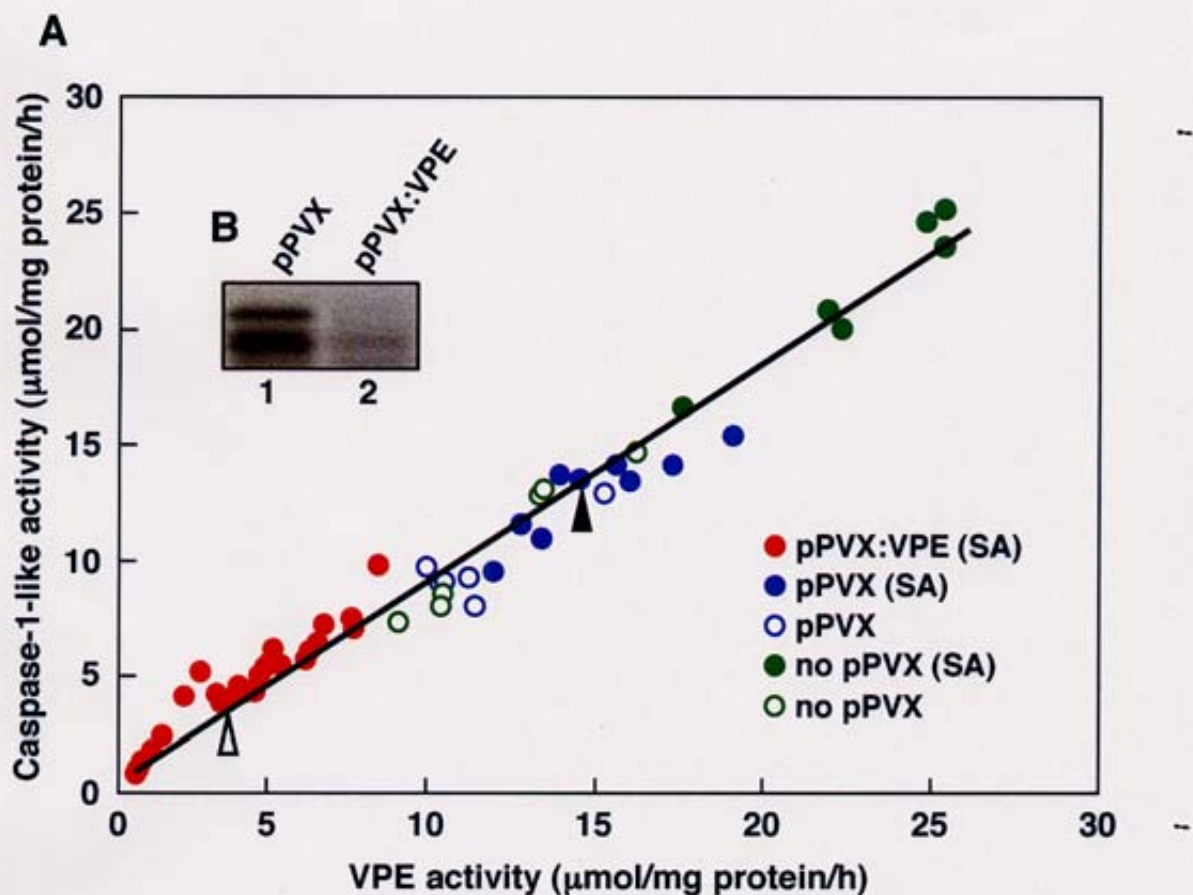


Figure 20. VPE-gene silencing demonstrates that the proteinase exhibiting caspase-1-like activity is VPE.

A, Both the VPE and caspase-1-like activities were measured with the leaves that had been treated with (closed circles) or without (open circles) salicylic acid (SA) for 24 h using the VPE-silenced plants (pPVX:VPE, red) and VPE-non-silenced plants including pPVX-inoculated plants (pPVX, blue) and non-inoculated plants (no pPVX, green).

B, A biotinylated-inhibitor blot of the leaves of VPE-non-silenced plants (indicated by an closed triangle in **A**; pPVX, lane 1) and VPE-silenced plants (indicated by an open triangle in **A**; pPVX:VPE, lane 2).

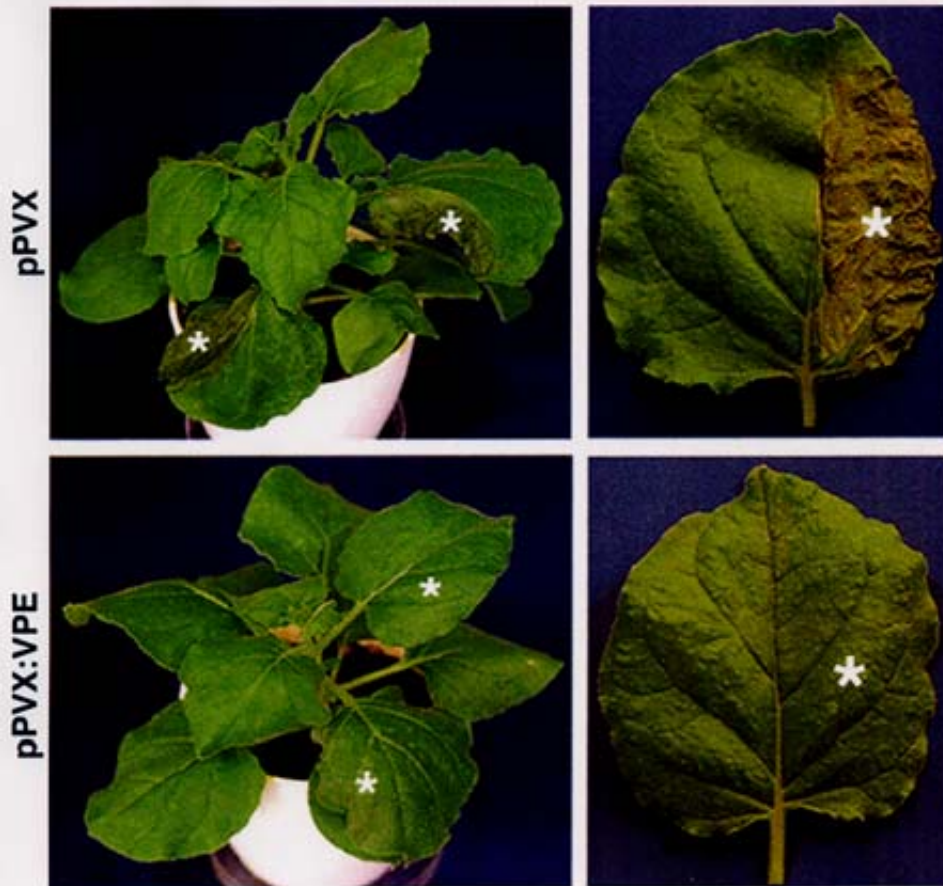


Figure 21. *VPE* deficiency stops the TMV-induced hypersensitive cell death. The *VPE*-non-silenced (pPVX) and *VPE*-silenced (pPVX:VPE) *N. benthamiana* plants were infected with TMV on halves of their leaves (indicated by asterisks). The photographs of the plants (left) and the leaves (right) were taken 24 h after the temperature shift.

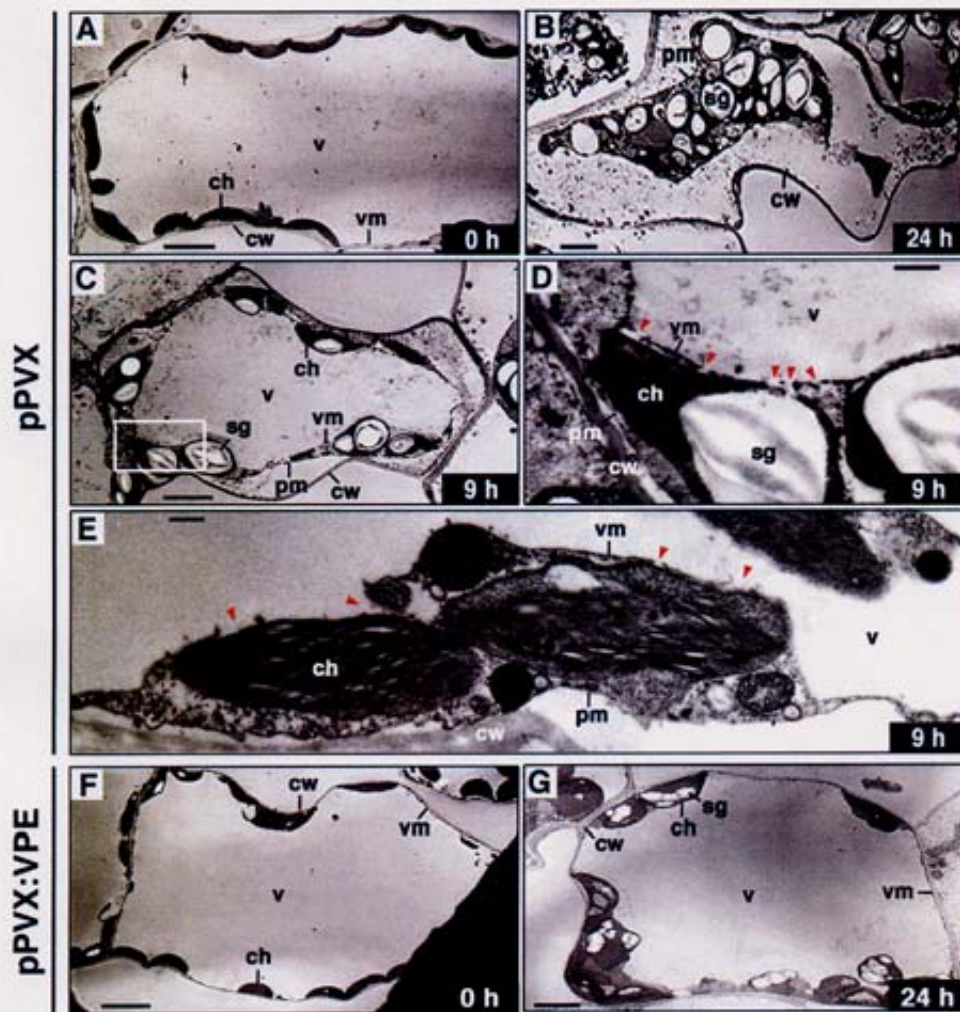


Figure 22. VPE deficiency suppresses the vacuolar collapse leading to the TMV-induced hypersensitive cell death.

Morphological changes of the TMV-infected regions of the non-silenced leaves (pPVX) at 0 (A), 9 (C to E) and 24 (B) hours after the temperature shift, and of the VPE-silenced leaves (pPVX:VPE) at 0 (F) and 24 (G) hours, under the electron microscope. (D) shows a higher magnified view of the boxed area in (C).

Bars = 5 μm for A to C, F and G, and 1 μm for D and E. cw, cell wall; pm, plasma membrane; vm, vacuolar membrane; v, vacuole; ch, chloroplast; sg, starch granule. Red triangles indicate the disintegrated region of vacuolar membranes.

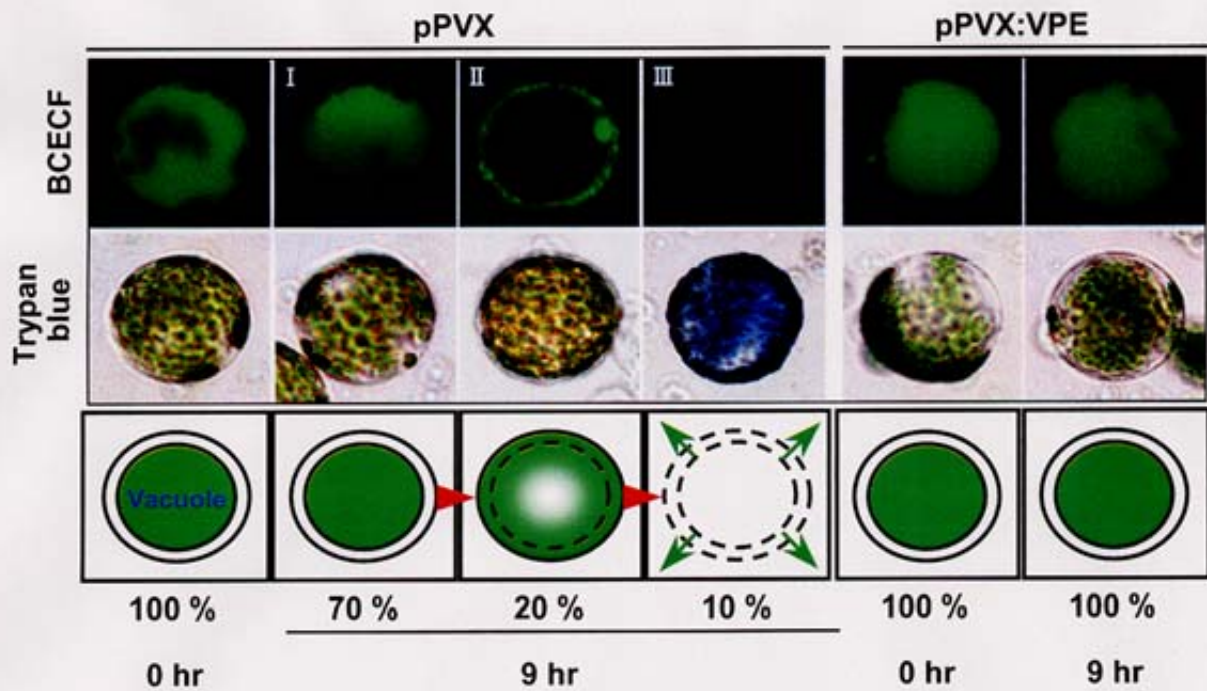


Figure 23. *VPE* deficiency suppresses distribution of the vacuolar components throughout the cells from the vacuoles undergoing the TMV-induced hypersensitive cell death.

The TMV-infected leaves of the non-silenced (pPVX) and *VPE*-silenced (pPVX:VPE) plants were infiltrated with a vital dye BCECF-AM. Protoplasts were prepared from the leaves at 0 and 9 hr after the temperature shift, and then stained with trypan blue. The BCECF fluorescent images (BCECF) and differential interference contrast images after staining with trypan blue (DIC / TB) of the protoplasts were inspected.

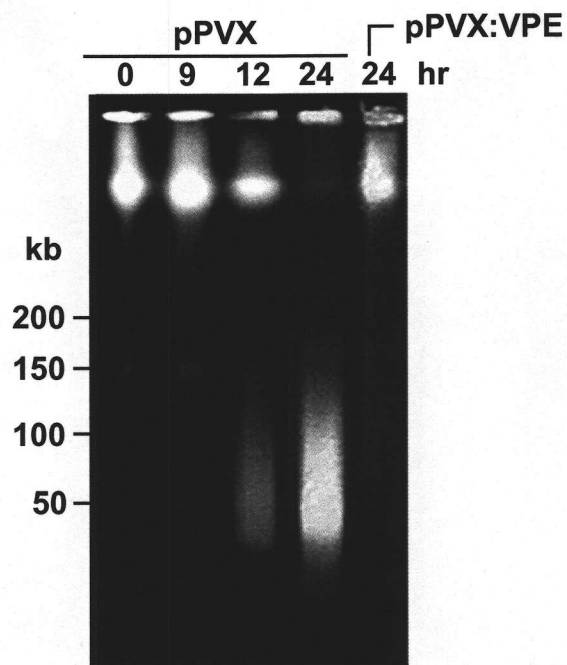


Figure 24. DNA fragmentation associated with hypersensitive cell death is suppressed in *VPE*-silenced plants.

Pulsed-field gel electrophoresis of total DNA from TMV-infected leaves of the non-silenced (pPVX) and *VPE*-silenced (pPVX:*VPE*) plants after the temperature shift.

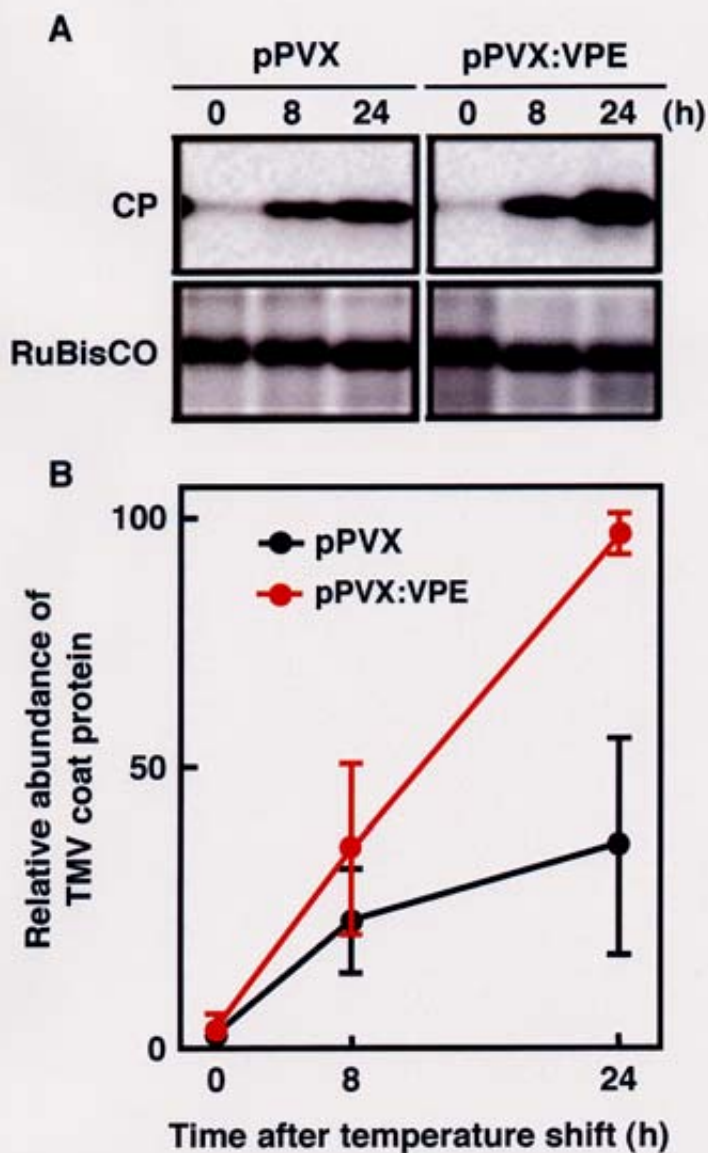


Figure 25. TMV was proliferated more abundantly in the VPE-silenced plants than in the non-silenced plants.

A, Immunoblots showing changes in the protein levels of TMV-coat protein (CP) in TMV-infected leaves of the *VPE*-non-silenced (pPVX) and *VPE*-silenced (pPVX:VPE) plants after the temperature shift. RuBisCO is a loading control of the immunoblot.

B, The levels of TMV-coat protein in (A) were densitometrically determined. Each experiment with a control was repeated with three independent samples, and the standard errors are represented as the lengths of the vertical bars. The relative abundance is given as a percentage of the maximum value.

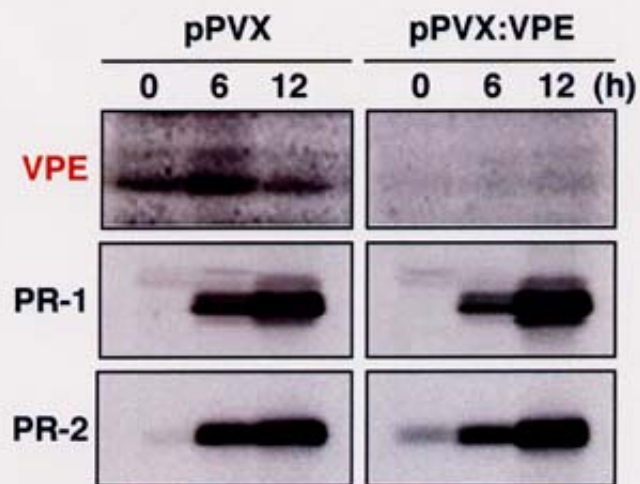


Figure 26. VPE deficiency does not affect induction of PR proteins. Immunoblots show changes in the protein levels of NbVPE, PR-1, and PR-2 in TMV-infected leaves of the *VPE*-non-silenced (pPVX) and *VPE*-silenced (pPVX:VPE) plants after the temperature shift.

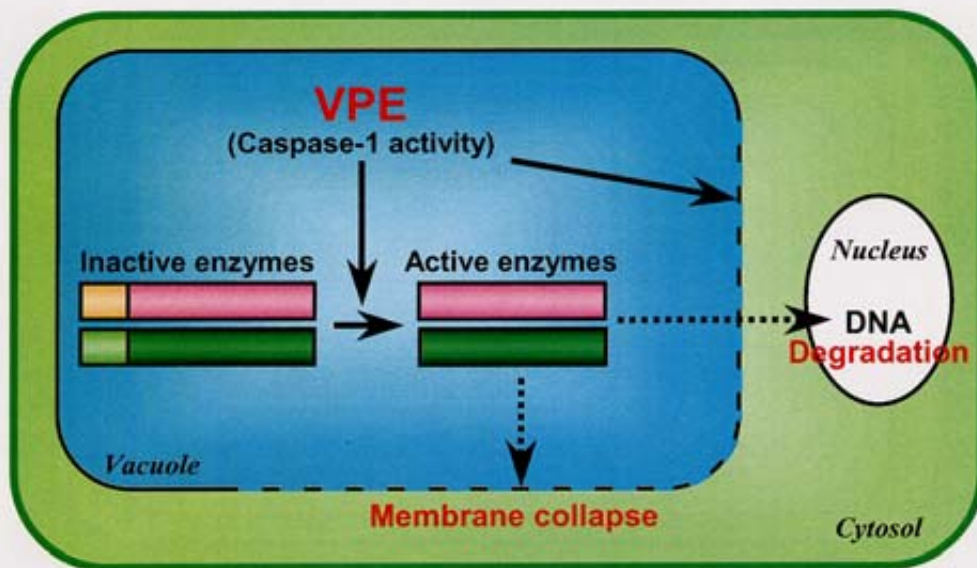


Figure 27. VPE is a Key Molecule in Vacuolar-Mediated PCD.

VPE exhibiting caspase-1 activity is responsible for activation of vacuolar enzymes in plant cells undergoing PCD. The active vacuolar enzymes and VPE degrade vacuolar membranes following distribution of the enzymes, which degrade the cytoplasmic structures and lead to cell death, throughout the cells.

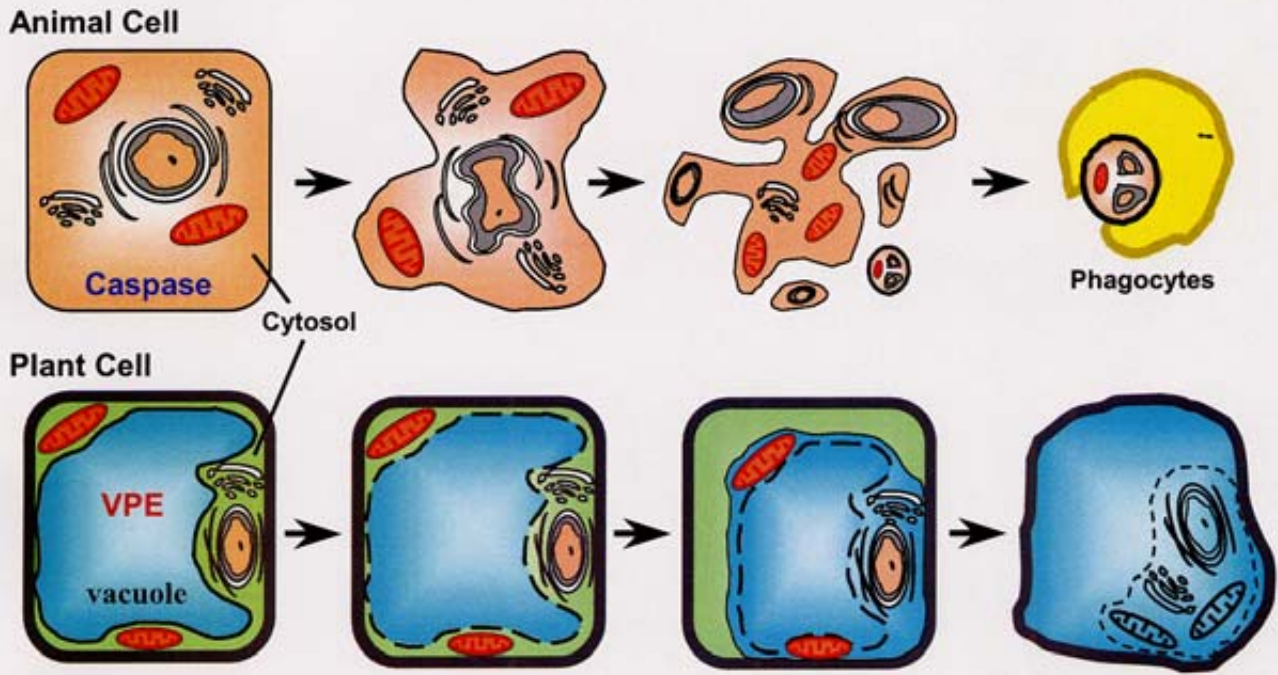


Figure 28. Plants have evolved a VPE-mediated vacuolar system of PCD, in contrast to the caspase-mediated cytosolic system in animals.

Animal cells undergoing PCD are fractionated and packaged into apoptotic bodies. They are engulfed by phagocytes such as macrophages. In contrast, in plants, which do not have phagocytes, cells surrounded by rigid cell walls are degraded their materials by vacuolar enzymes following VPE-mediated vacuolar collapse.