

タバコ遺伝的腫瘍の腫瘍形成に関わる遺伝子の検索

藤田知道*

(1994年10月7日受理)

1. はじめに

1939年, Whiteはタバコ *Nicotiana glauca* と *N. langsdorffii* の雑種植物が腫瘍を形成し易いことに着目し, この腫瘍組織を用いて人工培地上ではじめて連続培養に成功した¹⁾. その後今日まで, 人工培地にオーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンを加えることにより植物の連続培養は確立された技術となっている. このように *N. glauca* と *N. langsdorffii* の雑種植物により植物組織培養の幕が開かれたと言っても過言ではない.

この *N. glauca* と *N. langsdorffii* の雑種植物に形成される腫瘍は, 遺伝的腫瘍として知られている. 遺伝的腫瘍は, 植物体発育のある特定の時期に自然に生じる. その原因としては, 植物細胞に内在する, ある特定の遺伝子構成が原因であると考えられている. 従って, この性質は種子によって次代へ受け継がれることになる. この点で, クラウンゴールを代表とするバクテリア, ウイルス, 昆虫, カビなど他種の生物の感染で生じる腫瘍や, 植物ホルモンを投与する人為的操作により誘導される腫瘍(カルス)とは明らかに区別される. 遺伝的腫瘍の形成は1873年のアプラナでの報告を皮切りに広範な植物で報告されている. また, 今日まで遺伝的腫瘍の形成機構の解明に向けてかなりの生理学的な研究が蓄積している.

この点に関しては, 既にいくつかの総説があり, それらを参照していただきたい²⁻⁴⁾. しかしながら分子レベルにおいてその実体は未だ不明であり, その解明がこれからの課題である. 本稿では, 遺伝的腫瘍の形成機構解明が, 高等植物の形態形成機構の解明に一石を投じうると考えている我々の研究を中心に記述する.

2. タバコ遺伝的腫瘍

1930年 *Nicotiana* 属の種間雑種に遺伝的腫瘍が生じることがはじめて報告された. 以来, *Nicotiana* 属の遺伝的腫瘍は高率かつ再現性よく形成されることから, 最も詳細に研究されてきた. これまで約300種の種間雑種の組合せが検討され, そのうち約30の組合せで遺伝的腫瘍の形成が報告されている. その際どちらの植物を雌にしても腫瘍が形成される. その後, 図1に示すように, これら遺伝的腫瘍を形成する組合せは, それぞれプラスおよびマイナスグループと名付けた特定の2グループに分けられることが見いだされた⁵⁾. 即ち一部例外はあるものの, 遺伝的腫瘍はプラスグループとマイナスグループに属する種間雑種(F_1)において形成され, 同じグループ同士の種間雑種においては形成されない.

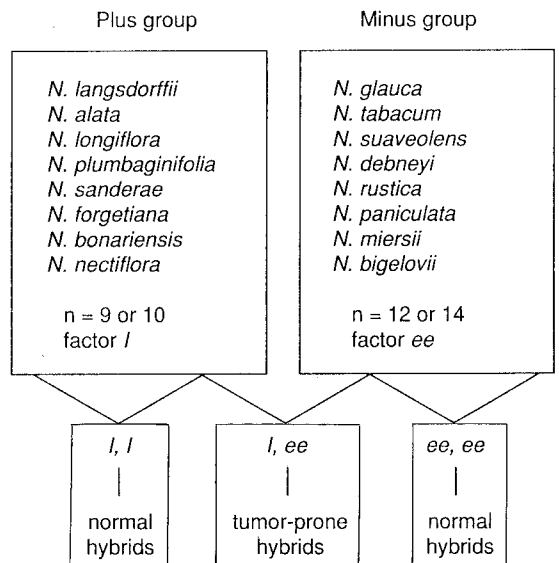


図1 タバコ遺伝的腫瘍を形成しうる種間雑種の組合せ⁵⁾.

プラスグループは $n=9$ あるいは 10 の染色体数をもつ種が, マイナスグループは $n=12$ あるいは 14 の染色体数をもつ種が属する. I および ee は, 各グループに存在する仮想的な腫瘍誘導因子を表す.

Tomomichi FUJITA*

Screening of Genes Related to Tumor Formation in Tobacco Genetic Tumors.

*東京大学教養学部基礎科学科

(〒153 東京都目黒区駒場3-8-1)

*Department of Pure and Applied Sciences, The University of Tokyo, 8-1, Komaba 3-chome, Meguro-ku, Tokyo 153, Japan

さらに、マイナグループの複2倍体 *N. debneyi-tabacum* とプラスグループの *N. longiflora* の F₁ 雑種に *N. debneyi-tabacum* を用いて戻し交配を繰り返し、*N. debneyi-tabacum* のバックグラウンドに *N. longiflora* の1本の染色体が付加されたものを得た⁹。逆に、プラスグループの *N. langsdorffii* とマイナグループの *N. glauca* の F₁ 雑種に *N. langsdorffii* を連続的に戻し交配することにより、*N. langsdorffii* のバックグラウンドに *N. glauca* の染色体が1本付加された個体が得られた⁷。その結果、いずれの場合においても遺伝的腫瘍の形成が認められた。以上のことから、遺伝的腫瘍の形成には、核内に存在するある特定の遺伝子(群)の組合せが必須であり、その様な場において引き起こされる異常な遺伝子発現の制御が原因となるのであろうと推測されている。では、その原因遺伝子の実体はなんであろうか。

3. 腫瘍遺伝子の検索-その1

遺伝的腫瘍は、その形態やホルモン非要求性等の点においてクラウンゴールと共通性が見いだされる。また、遺伝的腫瘍形成能とオーキシン含量の間に正の相関が見られるとの報告もある(相関はないとする報告もある)^{3,8}。そこでクラウンゴール形成の原因遺伝子である T-DNA 上のオーキシン合成酵素やサイトカイニン合成酵素をコードする遺伝子と相同性のある遺伝子の存在が調べられてきたが、現在まで見いだされていない⁹。Feng らは、X線照射で得られた腫瘍を形成しない *N. glauca* と *N. langsdorffii* の F₁ 変異体に T-DNA に存在するサイトカイニン合成酵素遺伝子を導入発現させることにより腫瘍形成能が回復したこと、またサイトカイニンを培地に含ませることにより腫瘍形成能の回復が見られたことを報告している¹⁰。これらの結果は、遺伝的腫

瘍形成にサイトカイニンの関与を示唆するものであるが、植物側の相同遺伝子は見いだされていない。

土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenese* は植物に感染して毛根病(hairy root disease)を引き起こす。その原因はクラウンゴールの場合と同様に、このバクテリアから植物細胞内に転移される Ri プラスミド内の DNA 断片にある *rolA*, *rolB*, *rolC*, ORF13, ORF14 の遺伝子群が深く関与していることが知られている¹¹。毛状根が正常根に比べ1,000倍もの低いオーキシン濃度で同様な反応を示すことから、これらの遺伝子産物の機能は、オーキシン感受性の増大に関与している可能性が考えられてきた。その後、*rolB*, *rolC* の遺伝子産物は、それぞれ、オーキシンおよびサイトカイニンの結合型(不活性)を遊離型(活性)にする酵素活性を有することが報告された^{12,13}。一方、White らは、非感染の *N. glauca* のゲノム中に Ri プラスミド内の *rolB*, *C*, *D* を含む領域とホモロジーのある配列が存在するを見いだした¹⁴。さらに Furner らは、*rolB*, *rolC* に相同性のある部分の塩基配列を決定し、それぞれを Ng *rolB*, Ng *rolC* と名付けた¹⁵。我々のグループでもこのことに注目し、*N. glauca* ゲノム中のさらに残りの部分の塩基配列を決定した。その結果、青木らは、ORF13, ORF14 に相同性のある配列(Ng ORF13, Ng ORF14)が保存されていることを見いだした¹⁶。図2に示されているように、これらの領域内の塩基配列は、それぞれの遺伝子間の配列も含め非常によく保存されている。Ng *rolB* 遺伝子は、633 bp 目に stop コドンが生じ、*rolB* より 144 bp 短くなっている。一方、Ng *rolC*, Ng ORF13, Ng ORF14 は、途中での stop コドンは見られず、アミノ酸レベルでの相同性は、それぞれ 75%, 87%, 84% に達していた。

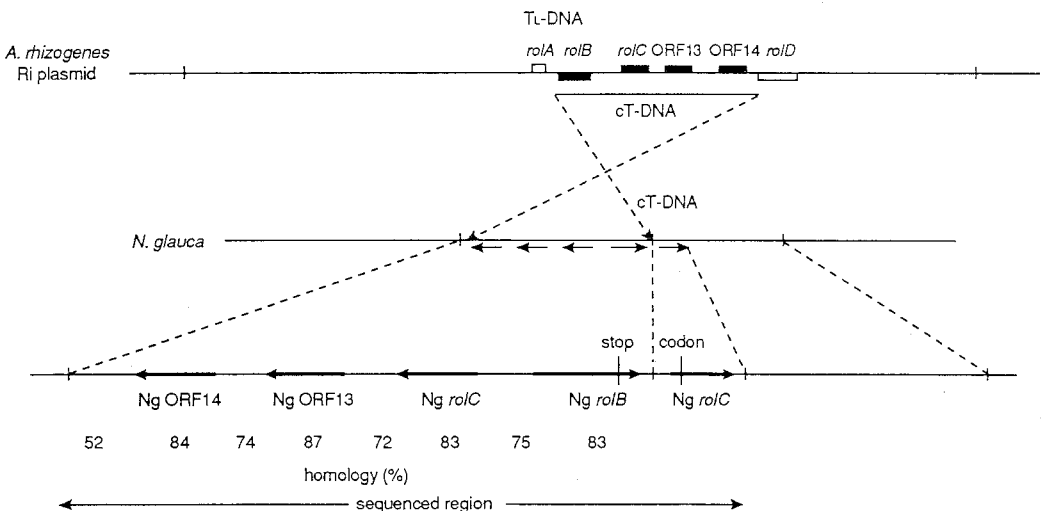


図2 *N. glauca* の核ゲノムに検出された Ri プラスミドと相同な領域の構造⁹。

当初, Ng *rolB*, Ng *rolC* は, *N. glauca* の組織で転写が確認できなかったことから偽遺伝子であると考えられていた. しかし, 遺伝的腫瘍形成との関連から, Ng *rolB*, *C* の転写を再検討したところ, *N. glauca* や *N. glauca* と *N. langsdorffii* の F₁ 個体の芽生えにおいて転写産物は検出されなかったが, F₁ 個体から誘導された遺伝的腫瘍組織では Ng *rolB*, *C* 遺伝子が転写されていることが見いだされた. さらに, これらの転写産物量と腫瘍化の程度は正の対応関係にあった^{17,18}). また, Ng ORF13, 14 についても同様に, F₁ 個体の葉組織ではこれらの転写産物は検出されなかったが, 遺伝的腫瘍においてその転写が確認された¹⁶). 以上の結果は, これら遺伝子が, 遺伝的腫瘍の形成に関与しており, *N. glauca* がもつ腫瘍遺伝子の候補となりうる可能性を示唆するものであった. しかしながら一方で, 遺伝的腫瘍を形成する *N. gossie* と *N. longiflora* など一部の組合せにおいては, Ri プラスミドに相同性のある塩基配列が見いだされていない⁹). Ng *rol* あるいは Ng ORF 遺伝子は, 腫瘍形成を促進する因子ではあるものの, 必須ではないのかもしれない. これらの点については, より詳細な今後の研究を必要とする. また, 現在までのところ, 遺伝的腫瘍形成に関与する *N. langsdorffii* 側の因子についての具体的な情報は, 得られていない.

4. 腫瘍遺伝子の検索-その2

既に記してきたように, 遺伝的腫瘍の形成はある核遺伝子の発現調節異常が原因であるとするコンセンサスが得られてはいるものの, その実体や腫瘍形成機構に関しては, 全くといってよい程解明されていない. そこで我々は, このような原因遺伝子は, 正常な親や F₁ 個体では発現せず, 増殖を続ける遺伝的腫瘍において, 異常に発現しているとの観点に立ち, 遺伝的腫瘍形成過程ならびに遺伝的腫瘍組織で特異的に発現している遺伝子のクローニングを試み, その実体に迫ろうとした. これに先立ち, 腫瘍形成過程に伴うポリペプチドの変動の様子を2次元電気泳動により追跡した. 約400のポリペプチドのうち, 腫瘍化に伴い増加したものと新たに出現したもの, あるいは減少や完全に消滅したものなどが計27個同定された¹⁹). これらの中のいくつかは, 腫瘍化に伴う遺伝子発現の変化を反映していると考えられた.

(1) *N. glauca* と *N. langsdorffii* の正常 F₁ 個体からの遺伝的腫瘍の誘導

自然条件下においては, 正常 F₁ 個体における遺伝的腫瘍の形成は, その多くが開花期を過ぎた頃によく観察される. しかし, 栽培期間中の環境条件等の影響で, 個体間における腫瘍化の程度や形成時期のばらつきが多

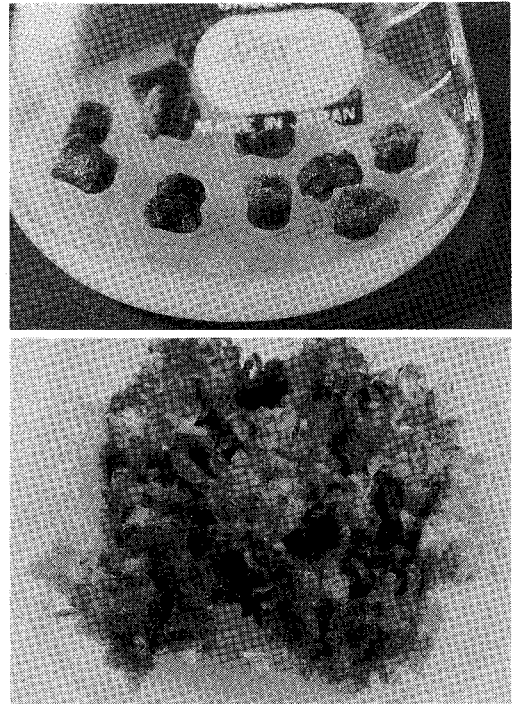


図3 *in vitro* のタバコ遺伝的腫瘍.

(上)正常な F₁ の茎を切断処理後 11 日目, 腫瘍形成中の切片. (下)明所で継代培養している遺伝的腫瘍.

く, 腫瘍形成機構解析のための材料とするには適さない. そこで, 市川らは, 腫瘍を同調的かつ高頻度で誘導することができ, さらにその誘導処理が単純である, 等を満たす条件を様々に検討した. その結果, F₁ 個体を切断処理することにより, その生育時期がいつであれ, またどの部位であれ遺伝的腫瘍が, 100% 誘導できることを見いだした²⁰). 我々は, 遺伝的腫瘍で特異的に発現が誘導される遺伝子を単離するための材料を得るため, 温室で育てた正常 F₁ 個体の茎を無菌化後, 約 1 cm の大きさに切断した. その切片をそのままホルモンフリーの培地におき腫瘍を誘導した. 切断から約 5 日後にはすでに切り口の維管束を中心に, 小さなこぶ状の隆起を肉眼で確認できた. 切断後 10 日目には, 新生腫瘍組織中に, 芽や葉の原基様の構造をもった細胞が分化し始めていることが光学顕微鏡で観察された(図3-上)^{19,21}). その後遺伝的腫瘍は, 奇形状の茎や葉を分化させながら典型的なテラトーマ状腫瘍として急激な増殖を続けた(図3-下).

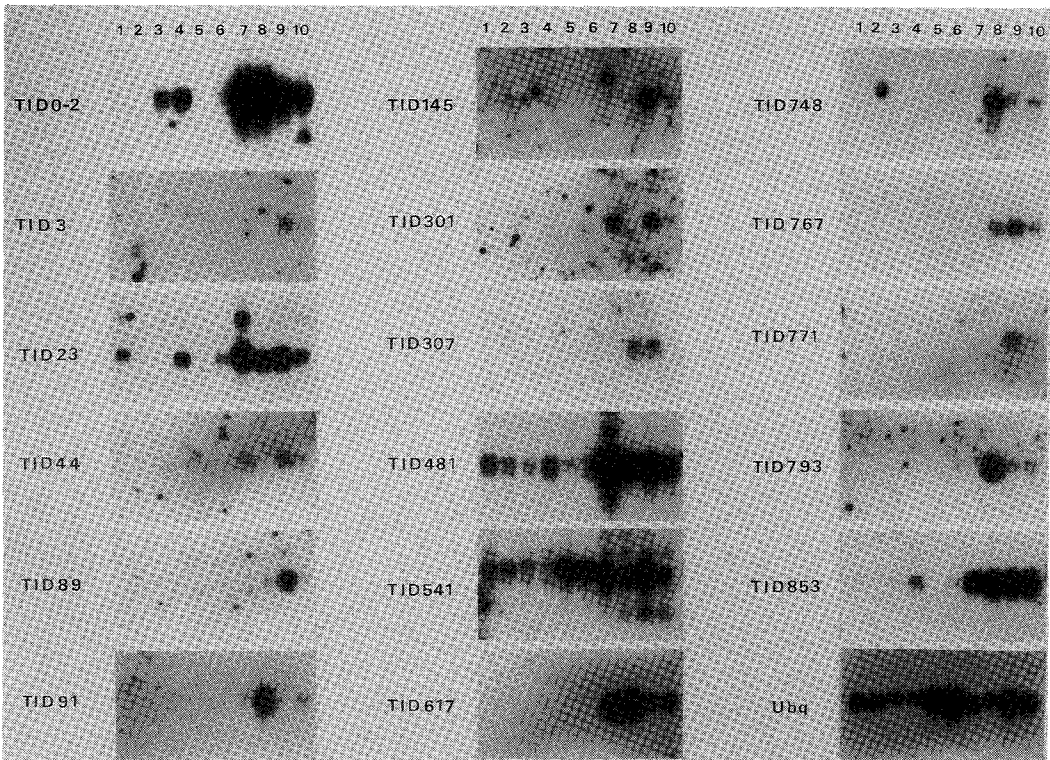
(2) 遺伝的腫瘍に特異的な cDNA の単離

遺伝的腫瘍で発現が誘導される cDNA クローンの単離をサブトラクション法を用いて行った. 正常 F₁ 個体の茎を切断処理後, 11 日目の遺伝的腫瘍形成過程にあ

表1 遺伝的腫瘍で発現が誘導された cDNA クローン.

Clone	Homology	Size of mRNA (kb)	Source of clone	
TID0-2	Glucan <i>endo</i> -1, 3- β -glucosidase (92%, a)	1.3	G	L
TID3		1.2	G	L
TID23	14kDa protein(67%, a)	0.8	G	L
TID44	Proteinase inhibitor I(75%, a)	0.6	G	L
TID89	PR protein 1a(52%, a)	0.6	G	L
TID91	Miraculin(59%, a)	0.8	G	L
TID145		1.8	—	L
TID301	<i>Lol pI</i> (30%, a)	1.0	G	L
TID307		0.6	—	L
TID481	Osmotin(90%, n)	1.0	G	L
TID541	*	1.7/0.5	G	L
TID617		1.1	G	L
TID748		2.6	G	L
TID767		0.6	—	L
TID771		0.8	G	—
TID793		0.7	—	L
TID853	Basic form of PR protein 1 (84%, n)	0.7	G	L

ホモロジーの程度は核酸(n)あるいはアミノ酸(a)レベルで記している。TID541の塩基配列は未決定である(*)。サザンプロット分析の結果、“G”、“L”は、それぞれ *N. glauca*, *N. langsdorffii* のゲノム中に相同性のある配列が存在したことを示し、“—”は存在しなかったことを示している。

図4 各組織における TID クローンの発現²³⁾.

レーン1, 2, 7; それぞれ *N. glauca* の茎, 葉, カルス, レーン3, 4, 8; それぞれ *N. langsdorffii* の茎, 葉, カルス, レーン5, 6; F₁ の茎, 葉, レーン9; F₁ の茎を切断後 11 日目切片, レーン10; 明所で培養している遺伝的腫瘍. Ubq は, タバコユビキチンを示す.

る組織片, および明所で継代培養中の遺伝的腫瘍に特異的なサブトラクト cDNA プローブをそれぞれ作成し, 対応する各組織より作成した cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果, 正常な F₁ では全く, あるいはほとんど発現しておらず, 腫瘍形成過程の組織および遺伝的腫瘍組織で, 強く発現の認められた 17 種類の cDNA クローンを得ることができた²²⁾。これらのクローンの主な特徴を表 1 に, また様々な組織におけるノーザンプロット分析の結果を図 4 に示した。塩基配列を決定した 16 種類のクローンのうち, 8 種が既知の遺伝子と相同性を示した。グルカンエンド-1,3-β-グルコシダーゼ²³⁾, プロテアーゼインヒビター I²⁴⁾, PR (pathogenesis-related) 1a タンパク質²⁵⁾, オスモチン²⁶⁾, および塩基性 PR1 タンパク質²⁷⁾はいずれもウイルス感染による壊死病斑形成時や傷害を与えること等により誘導されるいわゆるストレスタンパク質である。ミラクリンはアフリカ原産の *Richadella duleitica* の実から精製されたタンパク質で, それ自体は甘くはないが, 酸味を甘味にかえる作用をもつ²⁸⁾。Lol PI は *Lolium perenne* の花粉アレルゲンとして同定されたタンパク質である²⁹⁾。各クローンについて, 両親のゲノム DNA に対するサザンプロット分析を行った結果, *N. langsdorffii* にのみ相同性のある配列が存在したクローンを 4 種, 逆に, *N. glauca* にのみ存在したクローンを 1 種同定した²²⁾。これらの中に, 腫瘍形成に必須なプラスグループあるいは, マイナスグループ由来のクローンが含まれているかも知れない。

(3) 遺伝的腫瘍形成と TID クローンの発現

単離した 17 クローンのうち, 15 クローンまでが, オーキシンあるいはサイトカニンを加えた培地で継代培養している親由来のカルスにおいても発現していた(図 4)。このことは, 遺伝的腫瘍とカルスとの間で, 健全な個体ではみられないような遺伝子発現調節の乱れがかなり共通して生じている可能性が考えられる。一方で, TID3 と TID771 において, その発現は親個体や正常な F₁ 個体のみならずカルスにおいても認められず, 遺伝的腫瘍に限られていた。

ところで, 遺伝的腫瘍の誘導のためには, その引き金としてある種のストレスが必要である。その引き金として, 我々は, 切断処理を行った。したがって, 今回単離されてくるクローンの中には, 当然傷害ストレスにより誘導されるものが含まれてくるのが考えられる。実際, 前述のように今回相同性が見いだされたクローン 8 種類のうち 5 種類までがストレスタンパク質に関連したものであった。このうち, TID0-2 と TID89 について,

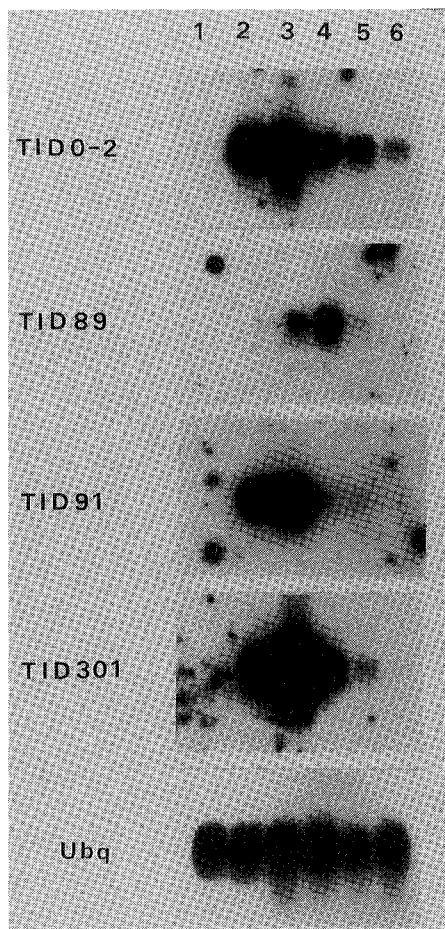


図 5 TID クローン発現のタイムコース。レーン 1; 正常な F₁ の茎。レーン 2, 3, 4; それぞれ F₁ の茎を切断処理後, 2, 5, 11 日目の切片。レーン 5, 6; 明所および暗所で培養している遺伝的腫瘍。

正常な F₁ 個体の茎を切断後の発現の様子を経時的に調べた。その結果, 切断後一過的に発現が誘導された(図 5)。傷害処理後の一過発現は, 傷害ストレス誘導型のタンパク質をコードする遺伝子において一般にみられるパターンである³⁰⁾。また, TID91 と TID301 においても同様の発現パターンが得られた(図 5)。さらに, TID91 は, アブシジン酸やグルタチオンでも誘導されることがわかった。これらのクローンのいずれもがカルスでも発現していることと併せて, 我々は, これら発現パターンの類似性から, TID91 と TID301 もストレスタンパク質としての機能を類推している。切断処理により誘導される一連のストレスタンパク質のうちのいくつかは, 正常 F₁ 個体から遺伝的腫瘍への誘導に直接関係しうるのであろうか, それとも切断ストレスに対する単なる防御反応の結果なのであろうか。傷害により誘導された加水分解酵素が, 細胞壁からのオリゴサッカリンの

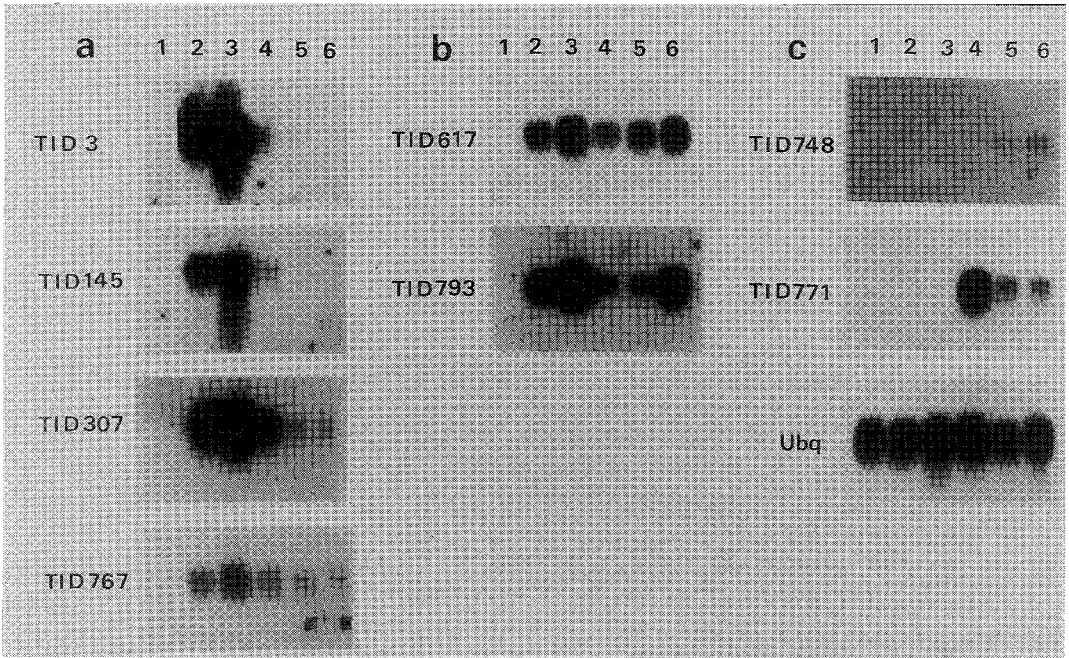


図6 TIDクローン発現のタイムコース²²⁾。
各レーンは、図5に同じ。

生成を促し実際に形態変化をもたらしたとの報告がある³¹⁾。また、PRタンパク質の局在やその遺伝子の発現は、胚発生の後期や花の器官形成のある特定の時期に組織特異的に制御されている等の報告があり、防御反応以外の機能についても注目すべきであると考えられる^{32,33)}。最近になり、PRタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターに結合するトランス因子としてホメオドメインをもつタンパク質のクローニングが報告された³⁴⁾。これらの報告は、いずれもストレスタンパク質が形態形成と密接に関係している可能性を示唆するものであり、遺伝的腫瘍の形成においてもなんらかの直接的役割を果たしているかもしれない。

既知の遺伝子と相同性のみられなかった8種類のクローンについて、F₁の茎を切断後の発現の様子を調べてみた。その結果、これらのクローンは、発現のパターンから、3つのグループに分類することができた²²⁾。切断処理後、一過性の誘導パターンを示すグループ(図6-a)のうち、TID145、TID307およびTID767はカルスにおいても発現していることから、傷害誘導型のストレスタンパク質に関連したものではないかと考えている。一方、TID3は、カルスにおいて発現しておらず、また親植物に傷害やアブジジン酸などのストレス処理を施しても発現が誘導されなかった。これまでのところ、TID3の発現は遺伝的腫瘍形成の初期に限られていることから、腫瘍形成に深く関わっている可能性が考えられ、特に注

目をしている。次に、TID617およびTID793を含むグループ(図6-b)は、切断後2日目の組織で発現が誘導され、継代培養している遺伝的腫瘍においてもその発現が続いている。また、カルスにおいても強く発現していることから、活発な細胞分裂が続く腫瘍状態の維持に関与している可能性が考えられる。第3に、TID748とTID771を含むグループ(図6-c)は、腫瘍化がかなり進み、茎や葉の原基様構造が分化し始める時期と一致して発現が誘導されたことから、葉原基などの器官分化に関連した機能を推測している。最近我々は、典型的なテラトマ状の遺伝的腫瘍(図3-下)から、茎や葉の分化を伴わずに増殖を続ける遺伝的腫瘍を単離した。この組織におけるTID771の発現を調べたところ、その発現はみられなかった。TID748は器官分化をみないカルスにおいても発現していることから、器官分化の観点から、TID771についてさらに解析を進めている。

5. おわりに

遺伝的腫瘍の形成は、ストレス刺激により開始される。従って、腫瘍の形成やその維持に関わった遺伝子の検索は、高等植物が外部刺激に応答し細胞増殖につながるようなシグナル伝達系路上の重要な遺伝子の同定を可能にすることが考えられる³⁵⁾。一方で、我々は、明所で培養している遺伝的腫瘍を暗黒下に移し培養することにより、脱腫瘍化を誘導できることを見いだした²⁰⁾。タバコ遺伝的腫瘍を用いた腫瘍形成機構解明の分子生物学的研究が、

開始されてからまだ日は浅い。しかしながら、近い将来、切断と光という単純な操作で、短期間に、かつ同調的に腫瘍化、脱腫瘍化を制御できるユニークな実験系を用いた研究が、形態形成に関わる突然異体を用いた研究成果などと有機的に結び付くことを期待している。

この研究を進めていくに当たりご指導をいただいた河内 宏博士、市川尚斉博士、庄野邦彦教授にこの場をかりて深くお礼申し上げます。また、一部データの提供を快く引き受けて下さいました青木誠志郎氏にも感謝いたします。

文 献

- 1) White, P. R., 1939. *Am. J. Bot.*, **26**: 59-64.
- 2) Smith, H. H., 1972. *Prog. Exp. Tumor Res.*, **15**: 138-159.
- 3) Bayer, M. H., 1982. In "Molecular Biology of Plant Tumors" (eds. by Kahl, G., J. Schell), p. 33-67, Academic Press, New York.
- 4) Sekine, M., T. Ichikawa, K. Syono, 1993. *J. Plant Res., Spec. Issue*, **3**: 83-95.
- 5) Näf, U., 1958. *Growth*, **22**: 167-180.
- 6) Ahuja, M. R., 1962. *Genetics*, **47**: 865-880.
- 7) Smith, H. H., 1988. *J. Heredity*, **79**: 277-283.
- 8) Syono, K., T. Fujita, 1994. In "International Review of Cytology" (eds. by Jeon, K. W., J. Jarvik), p. 265-299, Academic Press, California.
- 9) Kung, S. D., 1989. *Bot. Bull. Acad. Sinica*, **31**: 231-240.
- 10) Feng, X. H., S. K. Dube, P. J. Bottino, S. D. Kung, 1990. *Plant Mol. Biol.*, **15**: 407-420.
- 11) Zambryski, P., J. Tempe, J. Schell, 1989. *Cell*, **56**: 193-201.
- 12) Estruch, J. J., J. Schell, A. Spena, 1991. *EMBO J.*, **10**: 3125-3128.
- 13) Estruch, J. J., D. Chriqui, K. Grossmann, J. Schell, A. Spena, 1991. *EMBO J.*, **10**: 2889-2895.
- 14) White, F. F., D. J. Garfinkel, G. A. Huffman, M. P. Gordon, E. W. Nester, 1983. *Nature*, **301**: 348-350.
- 15) Furner, I. J., G. A. Huffman, R. M. Amasino, D. J. Garfinkel, M. P. Gordon, E. W. Nester, 1986. *Nature*, **319**: 422-427.
- 16) Aoki, S., A. Kawaoka, M. Sekine, T. Ichikawa, T. Fujita, A. Shinmyo, K. Syono, 1994. *Mol. Gen. Genet.*, **243**: 706-710.
- 17) Ichikawa, T., Y. Ozaki, K. Syono, 1990. *Mol. Gen. Genet.*, **220**: 177-180.
- 18) Syono, K., T. Ichikawa, T. Fujita, 1992. In "Cellular Basis of Growth and Development" (ed. by Shibaoka, H.), P. 93-100. Osaka University, Osaka.
- 19) Fujita, T., T. Ichikawa, K. Syono, 1991. *Plant Cell Physiol.*, **32**: 169-177.
- 20) Ichikawa, T., K. Syono, 1988. *Plant Cell Physiol.*, **29**: 1373-1378.
- 21) Ichikawa, T., M. Kobayashi, S. Nakagawa, A. Sakurai, K. Syono, 1989. *Plant Cell Physiol.*, **31**: 57-63.
- 22) Fujita, T., H. Kouchi, T. Ichikawa, K. Syono, 1994. *Plant J.*, **5**: 645-654.
- 23) Shinshi, H., H. Wenzler, J. M. Neuhaus, G. Felix, J. Hofsteenge, F. Meins, Jr., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5541-5545.
- 24) Wingate, V. P. M., R. M. Broadway, C. A. Ryan, 1989. *J. Biol. Chem.*, **264**: 17734-17738.
- 25) Cornelissen, B. J. C., R. A. M. Hooft van Huijsduijnen, L. C. van Loon, 1986. *EMBO J.*, **5**: 37-40.
- 26) Singh, N.K., D. E. Nelson, D. Kuhn, P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, 1989. *Plant Physiol.*, **90**: 1096-1101.
- 27) Payne, G., W. Middlesteadt, N. Desai, S. Williams, S. Dincher, M. Carnes, J. Ryals, 1989. *Plant Mol. Biol.*, **12**: 595-596.
- 28) Theerasilp, S., H. Hitotsuya, S. Nakajo, K. Nakaya, Y. Nakamura, Y. Kurihara, 1989. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6655-6659.
- 29) Griffith, I. J., P. M. Smith, J. Pollock, P. Theerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, T. Hough, M. B. Singh, R. J. Simpson, L. D. Ward, R. B. Knox, 1991. *FEBS Lett.*, **279**: 210-215.
- 30) Fujita, T., H. Kouchi, T. Ichikawa, K. Syono, 1993. *Plant Cell Physiol.*, **34**: 137-142.
- 31) Albersheim, P., A. G. Darvill, 1985. *Sci. Am.*, **253**: 44-50.
- 32) Barratt, D. H. P., J. A. Clark, 1991. *Planta*, **184**: 14-23.
- 33) Fluhr, R., G. Sessa, A. Sharon, N. Ori, T. Lotan, 1991. In "Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions" (eds. by Hennecke, H., D. P. S. Verma), p. 387-394, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 34) Korfhage, U., G. F. Trezzini, I. Meier, K. Hahlbrock, I. E. Somssich, 1994. *Plant Cell*, **6**: 695-708.
- 35) Ichikawa, T., K. Syono, 1991. *Plant Cell Physiol.*, **32**: 1123-1128.