

「植物－微生物間相互作用の解明による新たな共生系・病害抵抗性植物の開発のための基礎研究」

(H12年～H14年、第1期)

H14年度予算額：2.4(2.9)億円

研究代表者：河内 宏（農業生物資源研究所）

研究体制：農業生物資源研究所 他13機関

研究の概要・目標

1. 何を目指しているのか

植物と共生及び病原微生物との相互作用を分子・遺伝子レベルで解明し、窒素固定共生系の有効利用と画期的な耐病性植物作出のための基盤を確立する。

第I期の目標：

- * 特異的相互認識の関与分子、遺伝子の同定・単離
- * 相互作用の分子遺伝学的研究の基盤確立

第II期の目標：

- * 特異的相互認識、植物の反応のメカニズムの解明
- * 共生・病害抵抗性重要遺伝子の単離

2. 何を研究しているのか

- * 植物－微生物間の認識機構、シグナル伝達系、植物の応答の分子レベルでの解析。
- * 植物－微生物間相互作用におけるモデル系とその分子遺伝学的研究基盤の確立並びにそれによる相互作用解析への新しいアプローチ。

3. 何が新しいのか

- * 微生物シグナルの認識から、植物応答に至る生物間相互作用の一連のプロセスを微生物、植物の両面から総合的・統一的に解明する。
- * 我が国オリジナルなモデル実験系（ミヤコグサ）の確立とそれによる分子遺伝学的アプローチ。
- * 植物病理学、植物生理学、植物遺伝学等の分野を横断する研究体制

(ミヤコグサ：我が国に自生するマメ科植物)

諸外国の現状等

1. 現状

近年、植物－微生物共生、植物－病原菌の相互作用を分子生物学的手法により統一的かつ体系的に扱おうとする試みが、欧米を中心に活発化している。また、シロイヌナズナなどのモデル植物を利用した分子遺伝学的研究が大きな流れとなり、そのための基盤形成が米国、デンマーク及び我が国などで本格化しつつあるため、共生関連遺伝子や病害抵抗性遺伝子の単離、実用化への応用など国際競争の激化が予想される。

2. 我が国の水準

この分野への若手研究者の参入は増加しており、世界レベルに伍する研究成果も生まれつつある。また、ミヤコグサの共生ミュータントの作出など、世界をリードしうる研究の萌芽も生まれている。この分野の体系的な研究組織化を図ることが重要である。

(モデル植物：ゲノムサイズが小さい、世代時間が短い、形質転換が容易など分子生物学的研究に好適な特質を備えた実験植物。シロイヌナズナ、イネが代表的)

研究進展・成果がもたらす利点

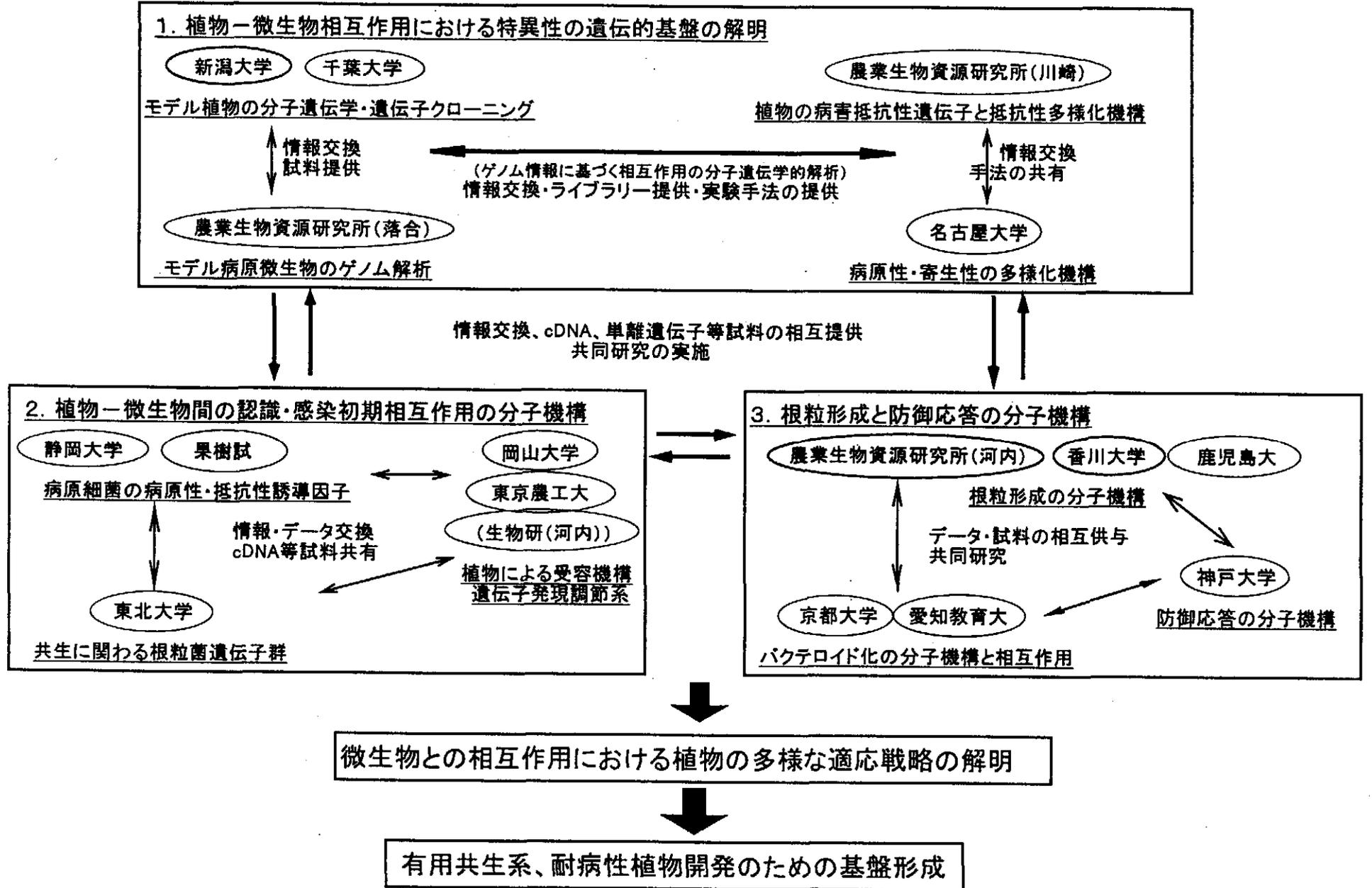
1. 世界との水準の関係

- * 植物－微生物間相互作用に係る基礎研究分野で欧米に伍する研究知見と体制を構築できる。
- * ミヤコグサを用いたモデル系の確立など我が国オリジナルな分子遺伝学的研究基盤が創出される。
- * 研究成果の提供をとおして、この分野の研究での世界的なイニシアチブを確立することができる。
- * 高等植物の持つ普遍的な環境適応メカニズムへの理解を飛躍的に深化できる。

2. 波及効果

- * 共生遺伝子や抵抗性遺伝子など有用な遺伝子の単離・実用化。
- * 植物バイオテクノロジー分野での国際競争力の強化。
- * 遺伝子組換え等による有用共生系創出、画期的な抵抗性植物の開発
- * 窒素を効率的に利用し、病害によるロスを減らすことによる作物収量の飛躍的向上。
- * 生産力増強、安全な病害防除法開発、新たな病害診断システム開発など農業技術への貢献並びに新産業創出への寄与。

「植物－微生物間相互作用の解明による新たな共生系・病害抵抗性植物の開発のための基礎研究



科学技術振興調整費 総合研究
「植物-微生物間相互作用の解明による新たな共生系・病害抵抗性植物の開発のための基礎研究」
第1期(平成12-14年度)における研究実施体制 および所用経費

(単位:千円)

研究項目	研究担当機関	研究担当者	所要経費			
			H12年度	H13年度	H14年度	合計
1. 植物-微生物相互作用における特異性の遺伝的基盤の解明						
(1)ゲノム情報に基づく宿主決定・抵抗性誘導の分子機構の解析						
①病原細菌のゲノム情報に基づく病原性分化機構の解析	農業生物資源研究所	落合弘和	14,228	56,122	29,506	99,856
②植物の抵抗性遺伝子による病原体認識機構の分子遺伝学的解析	農業生物資源研究所	川崎信二	16,616	15,623	26,426	58,665
(2)共生系の成立に関わる根粒菌の遺伝的基盤						
①細胞内共生の成立を支える根粒菌遺伝子群の解析	東北大学 遺伝生態研究センター	三井久幸	10,392	9,138	9,089	28,619
(3)モデル植物ミヤコグサを用いた共生及び病害抵抗性遺伝子群の解析						
①突然変異飽和法によるミヤコグサ共生遺伝子群の顕在化	新潟大学 理学部	川口正代司	10,327	9,862	9,562	29,751
②ミヤコグサ高密度分子連鎖地図の作製	千葉大学 園芸学部	原田久也	11,386	11,760	11,172	34,318
2. 植物-微生物間の認識・感染初期相互作用の分子機構						
(1)発病及び抵抗性誘導因子の生合成と受容に関わる遺伝子群の解析						
①植物病原細菌における病原力制御機構	農業技術研究機構 果樹研究所	塩谷浩	14,691	23,891	11,448	50,030
②発病および抵抗性誘導因子の植物による受容機構	静岡大学 農学部	露無慎二	14,015	19,278	17,754	51,047
(2)共生および病原微生物のシグナル分子と宿主特異性の決定機構						
①根粒菌Nodファクターに対するマメ科植物細胞の遺伝子応答	東京農工大学 農学部	横山正	14,534	12,850	12,208	39,592
②宿主特異的毒素性合成を介した病原系状菌の宿主決定機構	名古屋大学 農学部	柘植尚志	11,573	11,597	11,539	34,709
(3)宿主植物における感染シグナル伝達と遺伝子発現調節系						
①病原菌シグナル物質による宿主受容化の分子機構	岡山大学 農学部	豊田和宏	13,876	13,149	12,492	39,517
②マメ科植物における共生シグナル伝達と遺伝子発現調節系	鹿児島大学 理学部	阿部美紀子	14,911	14,037	13,181	42,129
3. 根粒形成・防御応答の分子機構						
(1)マメ科植物の共生器官形成過程の分子生物学的解析						
①マメ科植物における根粒特異的遺伝子の機能と発現調節機構	農業生物資源研究所	河内浩	18,044	42,571	30,005	90,620
②根粒形成における特異的オルガネラ分化の分子機構	香川大学 農学部	田島茂行	12,866	12,413	11,985	37,264
(2)窒素固定能発現に関わる根粒細胞-バクテロイドの相互作用						
①根粒特異的遺伝子の分子進化と共生微生物認識機構	京都大学 農学部	畑信吾	12,921	11,590	11,022	35,533
②Fix-突然変異体を用いた窒素固定能発現調節機構の解析	愛知教育大学 教育学部	菅沼教生	14,639	16,330	13,922	44,891
(3)病原菌感染に対する植物の防御応答の分子機構						
①過敏細胞死の誘導分子機構の解析	神戸大学 農学部	土佐幸雄	10,354	10,892	10,432	31,678
4. 研究推進	文部科学省 研究振興局		276	276	129	681
合計			215,649	291,379	241,872	748,900

研究成果の概要

課題名 (研究代表者) : 「植物-微生物相互作用の解明による新たな共生系・病害抵抗性植物の開発のための基礎研究」 (河内 宏)

【研究成果の概要】

1) 植物-微生物相互作用における特異性の遺伝的基盤の解明

第1班では微生物、植物側ともに特筆すべき重要な科学的成果が得られた。イネ白葉枯病菌の全ゲノム構造の解読 (生物研・落合) とミヤコグサ根粒過剰着生変異体har1遺伝子のクローニング (新潟大・川口) である。イネ白葉枯病菌には多数のレースが存在するが、全ゲノム構造の解明により宿主特異性に関わるおよそ170のhrp遺伝子を特定することに成功し、その中にはイネ白葉枯病菌に固有の多数の新規遺伝子が含まれていた。イネ白葉枯病菌が属するXanthomonas属には、本研究の第2班で取り上げているカンキツかいよう病菌など多くの植物病原細菌が含まれており、今回の成果はこれらの研究に対しても重要な基盤情報を提供するものである。

ミヤコグサhar1遺伝子のクローニングは、厳しい国際競争のもとで成し遂げられたことも含め、きわめて重要な成果である。Har1遺伝子はロイシンリッチリピート (LRR) をもつレセプターカイネース (RPK) であったが、イネ白葉枯病抵抗性遺伝子や、近年単離されたシステミンレセプターなどと同じLRR-RPK遺伝子群に属しており、共生と病原抵抗性の分子接点を提示した点でもそのインパクトは大きい。

マメ科植物は共生窒素固定という有用な形質をもたらすだけでなく、食料および資源植物としてきわめて重要な位置を占めている。しかし、ダイズ、エンドウなど主要なマメ科植物はゲノムサイズが大きくその構造が複雑であったり、形質転換がきわめて困難などの理由により、マメ科植物の分子遺伝学的研究はあまり進んでこなかった。日本に自生するミヤコグサはしかし、マメ科としては例外的に小さなゲノムサイズ、短い世代時間、安定な形質転換系が確立されているなど、モデル系としての特徴を備えている。そのため、マメ科モデル植物としてのミヤコグサを用いた分子遺伝学的研究基盤を確立・整備することは、本総合研究の重要な目標の一つと位置づけた。この点では、ミヤコグサ高密度連鎖地図の構築 (千葉大・原田) は特筆すべき成果であり、日本に自生する生物資源を活用して、植物-微生物相互作用の解析のみならず、マメ類の育種にも通じる研究基盤を世界に先駆けて確立した点できわめて意義が大きい。構築された連鎖地図は現在世界的にももっとも高密度なものであり、今後ESTのマッピングなどによってさらに高密度化し、ダイズなど有用マメ類とのゲノムシニエー解析を通じて、マメ科植物の分子育種のための不可欠の基盤となる。

東北大・三井と生物研・川崎は、整備されたゲノム情報を利用して、植物-微生物相互作用におけるより高次の生物機能に関して、それぞれ微生物、植物の側からユニークかつ重要な研究を展開した。三井はnif、fix、nodなど既知の共生関連遺伝子ではなく、根粒菌の生活環の根幹を支配する基本転写因子や細胞周期関連遺伝子に着目するというユニークな発想に基づき、基本転写因子RpoHや細胞周期のチェックポイント制御に関わるCtrAが根粒菌の共生成立 (バクテロイド化) に重要な役割を担っていることを示した。川崎はクローニングしたイネいもち病抵抗性遺伝子Pi-b近傍の広範なゲノム領域を系統間で比較解読することによって、抵抗性遺伝子の多様化が1塩基置換をはじめとする高頻度の微少な塩基置換の集積によって成立しているという仮説を提案し、シロイヌナズナの孤立型抵抗性遺伝子と同じ解析を敷衍することによって、このモデルの普遍性を証明しつつある。これは千変万化する病原菌に対する植物の抵抗性多様化機構の解明に重要な示唆と新しい観点を与えるものである。

2) 植物-微生物間の認識・感染初期相互作用の分子機構

第2班では、根粒菌Nodファクター、病原菌の生産するエリシター、サプレッサーなどのシグナル分子の生合成、分泌等に関する遺伝子の機能や制御機構の解明、およびそれらに対する植物応答の解析が研究の中心目標であった。

カンキツかいよう病菌のavr/pth遺伝子群の解析を通じて、これまで抵抗性を誘導するエリシターを生産すると考えられてきたavr遺伝子は実はジェネラルなエリシターであるharpinによって誘導される抵抗性反応に対する抑制（サプレッサー）作用をもたらすものであることを明らかにし、品種特異的な病原抵抗性に関する“遺伝子対遺伝子”説（“エリシター：レセプター”説）を塗り替える新知見をもたらした（静岡大・露無）。また同じカンキツかいよう病菌を対象として、宿主特異的にまた非特異的に、病原力の強弱を支配する遺伝子が存在することをつきとめ、従来知られている非病原力遺伝子(avr)とは異なる、新規の病原力支配因子を単離した（果樹研・塩谷）。

Alternaria属の病原糸状菌を対象にして、宿主特異的な毒素生合成に関する遺伝子クラスターの網羅的な解析を行い、多くの遺伝子の機能、細胞内局在性などを解明し、宿主特異的毒素生産をモデル系とした寄生性分化機構の全貌解明に向けて大きく貢献した。同時に、これら毒素生合成遺伝子群が、菌の生存には必要ではない“余分な(CD)染色体”上に存在することを明らかにし、これは病原菌と植物の相互作用における特異性の進化を解明する上で特筆すべき重要な発見となった（名古屋大・柘植）。

一方、微生物シグナルに対する植物の初期応答に関しては、まずエンドウの糸状菌病である褐紋病をモデルとして、植物細胞壁に局在するNTPase（アピラーゼ）が、感染シグナルに厳密に応答することを発見した。すなわち、サプレッサーは宿主であるエンドウのNTPase活性のみを特異的に阻害し、非宿主植物のそれに対しては逆に活性化した。さらに植物原形質膜に存在するインテグリン様分子と、ホスファチジルイノシトール代謝系の相互作用の解析を通じて、防御応答に必須な原形質膜シグナル伝達系が、リン酸化・脱リン酸化を介して、細胞壁におけるシグナル分子の受容と密接にリンクしていることを明らかにした（岡山大・豊田）。これらは病原菌の宿主特異性決定に関わる分子機構を解明するための重要な前進である。

根粒菌の共生シグナル(Nodファクター)に対する植物応答について、ダイズ培養細胞を用いた研究で、Caスパイクなど根毛と同様の応答が宿主特異的に誘導されることを明らかにし、培養細胞系がNodファクター初期応答の解析のための有効な実験系たりうることを示した。さらにこの系を展開することにより、Nodファクターによって一過的かつ広範な遺伝子転写抑制が起こることを見だし、これにCaシグナル伝達系が関与していることを示した（農工大・横山）。また、nod遺伝子を持つクローバー根粒菌とそれを欠く菌に対する植物の遺伝子応答を比較解析することによって、根粒菌nod遺伝子に依存して発現が著しく減少する遺伝子(TrEnodDR1)を単離し、これが感染成立・根粒形成の初期過程に密接に関与していることを示す結果を得た。さらにミヤコグサを用いた形質転換実験により、この遺伝子の発現によってアブシジン酸(ABA)生合成系に関する遺伝子群が大きく影響されることが明らかとなった（鹿児島大・阿部）。

3) 根粒形成・防御応答の分子機構

第2班で研究の対象とした微生物シグナルの受容とそれによって始動するシグナル伝達の結果として、植物側にあらかじめプログラムされた根粒形成や防御応答のプロセスが進行する。第3班では、これら植物側のプログラムの構造を分子レベルで明らかにすることを目指した。

まず根粒形成に関しては、我が国で現在急速に整備されつつあるミヤコグサの分子遺伝学的研究基盤を活用して、約19,000種のESTクローンからなるcDNAマクロアレイを構築し、これを用いて感染と根粒形成の初期過程で特異的に誘導される植物遺伝子の網羅的単離と

発現プロファイルの解析を行った。その結果、およそ1,300の根粒特異的に発現が増大する遺伝子を見いだすとともに、感染初期過程において病原抵抗性に関与する多くの遺伝子が一過的に発現することを明らかにした（生物研・河内）。また、根粒形成における特異的なオルガネラ分化に着目してプロテオーム解析を実施し、根と根粒のミトコンドリアからおよそ400種のタンパクを検出して、PMF(peptide mass fingerprint)解析を行いデータベース化した。その結果、根と根粒ミトコンドリア間で発現タンパクのプロファイルに大きな違いがあることを明らかにした。さらに、ミヤコグサからオルガネラ間の小胞輸送に関与するSNARE遺伝子を探索し、根粒特異的な発現を示すGEN03をクローニングして発現様式を明らかにした（香川大・田島）。

また、研究内容としては第2班と重複するが、ミヤコグサ根粒菌の生産する共生シグナル(Nodファクター)の全構造を解明し、それに対するミヤコグサの応答を詳細に解析した（生物研・河内）。この成果は、第1班と連携して、今後様々の根粒形成ミュータントの表現形質の解析に適用される予定であり、変異をもたらしている原因遺伝子の機能解明に役立つ。

一方、感染初期の認識や相互作用とは別に、共生窒素固定能に密接に関与する植物遺伝子の特定を目的として、根粒は形成するが窒素固定活性の発現しないfix-変異体の解析を行い、エンドウsym13変異体についてバクテロイドの窒素固定活性発現に関与すると推定される低分子のシステインクラスタータンパク質をコードする一群の遺伝子を見いだした。またミヤコグサのfix-変異体Ljsym75とLjsym81の表現型解析をほぼ終了し、第1班の研究と連携して、これらの原因遺伝子のクローニングを目指し、ラフマッピングまでが完了している（愛教大・菅沼）。一方、京大・畑は、ミヤコグサがインゲン根粒菌によって早期老化型の根粒を形成するユニークな現象を発見し、これを手がかりとして共生窒素固定の発現とその維持に関わる遺伝子の単離を目指した。これまでに、インゲン根粒菌によってミヤコグサに形成される根粒の詳細な表現型解析を終了し、cDNAアレイを用いた遺伝子発現解析と、インゲン根粒菌と親和性を持つミヤコグサ変異体の探索を進めている。

病原菌に対する防御応答について、エンバク葉枯病菌の生産する宿主特異的毒素ピクトリンによる宿主植物の過敏感細胞死がアポトーシス様細胞死の特徴を示すことを明らかにするとともに、この細胞死に関わるいくつかの鍵酵素の遺伝子クローニングに成功した。さらにアポトーシス様細胞死が病原菌の種類を問わない普遍的な植物応答であることを明らかにした。また遺伝子組換えによって持続性のある病害抵抗性植物を作出するためには、特異的な非病原性遺伝子に依存しない抵抗性作動機構を開発する必要があるとの観点から、エンバクレトロトランスポゾン遺伝子のプロモータを利用することを目指し、OARE-1遺伝子を単離した。

研究成果公表等の状況<課題全体>

課題名(研究代表者):「植物-微生物相互作用の解明による新たな共生系・病害抵抗性植物の開発のための基礎研究」(河内 宏)

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	40(7) 件	23(1) 件	176 件	239(8) 件
国外	34(17) 件	12(1) 件	69 件	115(18) 件
合計	74(24) 件	35(2) 件	245 件	354(26) 件

(注: 既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載のこと)

【特許出願等】 4 件 (国内4 件、国外 件)

【受賞等】 件 (国内 件、国外 件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	サブテーマ 3	合計
Nature	27.95	(1)			(1)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA	10.89	(1)			(1)
Plant Cell	11.0		1		1
Plant J.	5.8		1	2	3
Plant Physiol.	5.1			1	1
MPMI	3.86	1	2	6	9
FEBS Lett.	3.64		1		1
M. G. G.	2.47	2	1		3
Plant Cell Physiol.	2.43	2	3	5	10
Phytopathol.	2.13		1		1
Gene			1		1
Genetics			2		2
DNA Res.		1			1
Plant Des.			1		1
Eur. J. Plant Pathol.			1		1
FEMS Lett.		1			1
Eur. J. Biochem.			1		1
主要雑誌小計		9	16	15	40
発表論文合計		24	32	18	74

(): Accepted

【主な原著論文による発表の内訳】

1) 国内[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 47 件)

1. Hayashi, M., Miyahara, A., Sato, S., Kato, T., Yoshikawa, M., Taketa, M., Hayashi, M., Pedrosa, A., Onda, R., Imaizumi-Anraku, H., Bachmair, A., Sandal, N., Stougaard, J., Murooka, Y., Tabata, S., Kawasaki, S., Kawaguchi, M. and Harada, K. (2001) Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F₂ population. *DNA Research* 8(6):301-10.
2. Solaiman, M.Z., Senoo, K., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., Tanaka, A. and Obata, H. (2000) Characterization of mycorrhizas formed by *Glomus* sp. on root of hypernodulating mutants of *Lotus japonicus*. *J. Plant Res.*, 113: 443-448.
3. Senoo, K., Solaiman, M.Z., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., Tanaka, A. and Obata, H. (2000) Isolation of two different phenotypes of mycorrhizal mutants in the model legume plant *Lotus japonicus* after EMS-treatment. *Plant Cell Physiol.*, 41: 726-732.
4. Hakoyama, T., Yokoyama, T., Kouchi, H. and Arima, Y. (2002) Transcriptional response of soybean suspension cultured cells induced by Nod factors obtained from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Plant Cell Physiology*. 43(11): 1314-1322.
5. Almeida, A.G., Sayama, K. and Tsuyumu, S. (2000) Isolation of a protein bound to canker-forming factor from citrus plant. *J. Gen. Plant Pathol.* 66(2): 138-143
6. Almeida, A.G. and Tsuyumu, S. (2000) Cloning of a genomic DNA encoding caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase of citrus. *J. Gen. Plant Pathol.* 66(2): 144-148.
7. Tanaka, A. and Tsuge, T.(2001) Reporter gene analysis of *AKT3-1* and *AKT3-2* expression during conidial germination of the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Journal of General Plant Pathology* 67(1), 15-22.
8. Sugimoto, M., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (2000) Cytochalasin A inhibits the binding of phenylalanine ammonia-lyase mRNA to ribosomes during induction of phytoalexin in pea seedlings. *Plant Cell Physiol.* 41:234-238.
9. Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2001) Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of defense genes in tobacco suspension cultured BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 42:446-449.

2) 国外[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 51 件)

1. Ochiai, H., Inoue, Y., Hasebe, A. and Kaku, H. (2001) Construction and characterization of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bacterial artificial chromosome library. *FEMS Microbiol. letter* 200:59-65.
2. Ono, K., Mitsui, H., Sato, S. and Minamisawa, K. (2001) Two RpoH homologs responsible for the expression of heat shock protein genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet* 264: 902-912.
3. Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Koiwa, H., Niwa, S., Ikuta, A., Syono, K. and Akao, S. (2002) Root, Root Hair, and Symbiotic Mutants of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 15:17-26.
4. Kawaguchi, M., Motomura, T., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S. and Kawasaki, S. (2001) Providing the basis for genomics in *Lotus japonicus*: the accessions Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses. *Mol. Gen. Genomics*, 266:157-166.
5. Niwa, S., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Chechetka, S.A., Ishizuka, M., Ikuta, A. and Kouchi, H. (2001) Responses of a model legume *Lotus japonicus* to lipochitin oligosaccharide nodulation factors purified from *Mesorhizobium loti* JRL501. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 14:848-856.
6. Imaizumi-Anraku, H., Kouchi, H., Syono, K., Akao, S. and Kawaguchi, M. (2000) Analysis of *ENOD40* expression in *alb1*, a symbiotic mutant of *Lotus japonicus* that forms empty nodules with incompletely developed nodule vascular bundles. *Mol. Gen. Genet.*, 264: 402-410.
7. Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.-J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K. and Kawaguchi, M. (2002)

- HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*, 420:426-429.
8. Nishimura, R., Ohmori, M., Fujita, H. and Kawaguchi, M. (2002) A *Lotus* basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:15206-15210
 9. Yokoyama, T., Kobayashi, N., Kouchi, H. Minamisawa, K. and Kaku, H. (2000) Lipo-chitooligosaccharide, Nod factor, induces transient calcium influx in soybean suspension-cultured cells. *Plant J.* **22**:71-78.
 10. Suzuki, A., Kobayashi, F., Abe, M., Uchiumi, T. and Higashi, S. (2001) Cloning and expression of a down-regulated gene (*TrEnodDR1*) of white clover responded by the *nod* genes derived from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 4S. *Gene*, 266:77-84.
 11. Shiotani, H., Ozaki, K., and Tsuyumu, S. (2000) Pathogenic interaction between *Xanthomonas axonopodis* pv. *ctri* and cultivars of pummelo (*Citrus grandis*). *Phytopathology* **90**(12):1383-1389. Y.
 12. Subandiyah, S., Iwanami, T., Kondo, M., Kobayashi, M., Tsuyumu, S. and Ieki, H. (2000) Comparison of 16S rDNA and 16S/23S Intergenic Region Sequences among Citrus Greening Organisms in Asia. *Plant Disease* **84**:15-18.
 13. Sasabe, M., Takeuchi, K., Kamoun, Sophien, Ichinose, Y., Govers, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Yamada, T. (2000) Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5005-5013.
 14. Toyoda, K., Kawahara, T., Ichinose, Y., Yamada, T. and Shiraishi, T. (2001) Potentiation of phytoalexin accumulation in elicitor-treated epicotyls of pea (*Pisum sativum* L.) by a diacylglycerol kinase inhibitor. *J. Phytopathol.* **148**: 633-636.
 15. Imura, Y., Seki, H., Toyoda, K., Ichinose, Y., Shiraishi, T. and Yamada, T. (2001) Contrary operations of Box-I element of pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1 promoter for organ-specific expression. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 355-362.
 16. Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Inagaki, Y. and Ichinose, Y. (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett.* **518**: 164-168.
 17. Ichinose, Y., Andi, S., Doi, R., Tanaka, R., Taguchi, F., Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Yamada, T. (2001) Generation of hydrogen peroxide is not required for harpin-induced apoptotic cell death in tobacco BY-2 cell suspension culture. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 771-776.
 18. Tanaka, A. and Tsuge T. (2000) Structural and functional complexity of the genomic region controlling AK-toxin biosynthesis and pathogenicity in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**(9):975-986.
 19. Masunaka, A., Tanaka, A., Tsuge, T., Peever, T., Timmer, L.W., Yamamoto, M., Yamamoto, H. and Akimitsu K. (2000) Distribution and characterization of AKT homologs in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* **90**(7):762-768.
 20. Tanaka, A. and Tsuge, T. (2000) REAL: an LTR retrotransposon of the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Molecular and General Genetics* **263**(4):625-634.
 21. Hatta, R., Ito, K., Hosaki, Y., Tanaka, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., Akimitsu, K. and Tsuge, T. (2002) A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* **161**(1): 59-70.
 22. Banba, M., Siddique, A.-B.M., Kouchi, H., Izui, K. and Hata, S. (2001) *Lotus japonicus* forms early senescent root nodules with *Rhizobium etli*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:173-180.
 23. Kawashima, K., Sukanuma, N., Tamaoki, M. and Kouchi, H. (2001) Two types of pea leghemoglobin genes showing different O₂-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules. *Plant Physiol.* **125**:641-651
 24. Kato, T., Kawashima, K., Miwa, M., Mimura, Y., Tamaoki, M., Kouchi, H. and Sukanuma, N. (2002) Expression of genes encoding late nodulins characterized by a putative signal peptide and conserved cysteine residues is reduced in ineffective pea nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:129-137