

# 阿拉伯芥之 NPR1 蛋白在植物誘導性系統抗病反應中所扮演的角色

林盈宏<sup>1</sup> 張碧芳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>台中市 國立中興大學植物病理學系

<sup>2</sup>聯絡作者，電子郵件：pfchang@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2286-0442

接受日期：中華民國 97 年 1 月 31 日

## 摘要

林盈宏、張碧芳. 2008. 阿拉伯芥之 NPR1 蛋白在植物誘導性系統抗病反應中所扮演的角色 植病會刊 17 : 101-110.

NPR1 蛋白為阿拉伯芥「誘導性系統抗病反應」中最重要的調控因子，此蛋白不僅可以正向促進由水楊酸 (salicylic acid, SA) 調控的「系統性後天抗病 (systemic acquired resistance, SAR)」反應，也可以負向抑制由茉莉香酸 (jasmonic acid) 調控的「誘導性系統抗病 (induced systemic resistance, ISR)」反應。在 SAR 啟動之初，被 SA 活化的 NPR1 蛋白可以與一些還原態的 TGA 轉錄因子結合，來共同誘導並累積「病程相關蛋白 (pathogenesis-related proteins, PR proteins)」。此外，NPR1 蛋白可能與一些轉錄因子；例如：WRKY70 (此蛋白包含高度保留的 WRKYGQK 胺基酸序列) 等蛋白結合，藉此調控 SAR 與 ISR 兩種反應。

關鍵詞：水楊酸、系統性後天抗病、病程相關蛋白、誘導性系統抗病、轉錄因子

\*本文有部分內容譯自 Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547-552.

## 緒言

「系統性後天抗病 (systemic acquired resistance, SAR)」反應被視為植物體內的免疫反應之一。與動物免疫反應系統相比，SAR 只能被特定病原或微生物所誘導，而所誘發的抗性可對相同或不同的病原菌產生系統性的抗病反應，抗性反應的對象可廣泛涵蓋細菌、真菌甚至是病毒性的病害<sup>(12,15,42,46)</sup>。而在阿拉伯芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn] 體內的 SAR 系統裡一般會觀察到水楊酸 (salicylic acid, SA)<sup>(16,44)</sup> 與病程相關蛋白 -1 (pathogenesis-related proteins-1, PR-1 proteins)<sup>(44,45)</sup> 的累積，其中有些病程相關蛋白，例如： $\beta$ -1,3-葡聚糖分解酵素 ( $\beta$ -1,3-glucanase, 或稱 PR-2) 與幾丁質分解酵素 (chitinase, 或稱 PR-3)，甚至有拮抗微生物的活性<sup>(39,44)</sup>。有趣的是，於植物體外施用水楊酸的方式可誘導特定植物體內的 SAR 對抗特定病原【如：於菸草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中促進其對菸草嵌紋病毒 (tobacco mosaic virus) 的抗性即為一例】<sup>(47)</sup>；經研究也

發現，有些化學物質，例如 2,6-二氯異菸酸 (2,6-dichloroisonicotinic acid, INA)<sup>(31)</sup> 或苯基噁二唑硫代羧酸硫甲酯 [benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, BTH]<sup>(15)</sup>，與 SA 一樣具有誘導抗病的功能，且都能在沒有病原菌感染時誘導病程相關基因的表現。過去十多年間，學者利用遺傳篩選 (genetic screening) 的方式，篩選失去 SAR 並對各種誘導性抗病物質產生不同反應的突變植株，藉此研究各突變基因於 SAR 機制中可能扮演的角色。1994 年，由 Cao 氏等人<sup>(2)</sup> 於阿拉伯芥中篩選到一個在 SA、INA 或 BTH 誘導後皆無法表現 PR-1 基因的突變株，此突變株被命名為 *npr1* (non-expressor of pathogenesis-related genes 1), *npr1* 無法被上述誘導性抗病物質刺激產生 PR-1 蛋白與表現 SAR，意即正常的 NPR1 基因於 SAR 機制中，扮演不可或缺的角色。後來的研究也指出，*npr1* 突變株除了失去系統性抗病的能力，也同時失去植物本身的基本抗性 (basal resistance)<sup>(11)</sup>。

本篇文章主要以近年來最熱門的 NPR1 蛋白作為

探討的對象，內容將以 NPR1 蛋白如何被 SA 活化，以及 NPR1 如何與其他因子共同作用來活化 PR 基因的表現，最後將闡述 NPR1 在整個植物誘導性抗病系統中(包括 SAR 與 ISR)所扮演的角色(詳圖一路徑圖)。

## NPR1 蛋白的功能

NPR1 蛋白，一開始被認為是涉及「由 SA 媒介的 SAR (SA-mediated SAR)」，但經研究發現，NPR1 蛋白可能也被用來調控植物其他不同的抗性反應。例如：由非病原性的根圈細菌 (non-pathogenic rhizobacteria) 所誘導的「誘導性系統抗性 (induced systemic resistance, ISR)」反應，由於 ISR 被認為是「不需經由 SA 所誘導 (SA-independent)」的抗性系統，而是由茉莉香酸 (jasmonic acid, JA) 與乙烯 (ethylene) 所調控<sup>(35)</sup>，然而在 *npr1* 突變株體內卻會因 NPR1 蛋白被破壞而中斷 ISR 該有的反應<sup>(35)</sup>，因此除了 SAR 外，目前 ISR 也被認為會受到 NPR1 蛋白的調控(詳圖一)。

*NPR1* 基因於 1997 年被 Cao 氏等人自阿拉伯芥中選殖出來<sup>(4)</sup>，同年，Ryals 氏等人<sup>(37)</sup> 也報告篩選到 *nim1* (*non-inducible immunity 1*) 突變株，其性狀與 *npr1* 突變株一樣，皆失去對病原菌的「免疫」能力。後經研究發現，*NPR1* 與 *NIM1* 為相同的基因 (allele)，另外，*NPR1* 蛋白的功能也因 *NPR1* 基因序列的發表，讓學者們有更深入的認識，此後 *NPR1* 在植物系統性抗病研究上便佔有相當重要的地位。經觀察發現：*NPR1* 基因在阿拉伯芥體內為持續表現的基因，若以 SA 誘導也只能提高約兩倍的表現量，在當時推測 *NPR1* 可能是由蛋白質的層次來調控植物系統性抗性<sup>(3)</sup>。Kinkema 氏等人<sup>(22)</sup> 發現：SA 可誘導 *NPR1* 蛋白進入細胞核內 (nuclear localization)，藉此誘導 *PR-1* 基因的轉錄。但在當時的研究顯示，*NPR1* 蛋白沒有核酸結合區 (DNA-binding domain) 可用來驅動 *PR-1* 基因上的啟動子 (promoter)，故被推測應該有一些轉錄因子 (transcription factor) 來幫助 *NPR1* 蛋白誘導 *PR-1* 基因的表現。在 1999 年至 2002 間，多位學者利用「酵母菌雙雜交篩選法 (yeast two-hybrid screens)」的方式找到幾個可與 *NPR1* 結合的 bZIP 轉錄因子【此類蛋白具有「鹼性-白胺酸拉鍊區域 (basic leucine zipper domain)」，此轉錄因子亦隸屬於 TGA 家族】<sup>(7, 21, 38, 52)</sup>。*PR-1* 基因的啟動子上，有正 (positive) 與負 (negative) 調控的序列 (cis-elements)，分別可被正或負調控因子 (regulator) 所調控，例如 Li 氏等人於 1999 年發表<sup>(29)</sup> 的負調控因子 SNI1 (SUPPRESSOR OF NPR1 INDUCIBLE 1) 即可以用來負調控 SAR，此負調控因子，是從 *npr1*

突變株再經突變後所得的二次突變株 (*npr1 sni1* double mutant) 中分析所得的蛋白，此二次突變株可被 SA 誘導回復原來 *NPR1* 突變株中所不會表現的 *PR-1* 基因。至於 *NPR1*、TGAs 與 SNI1 蛋白之間的相互作用關係尚待釐清。

## SA 如何活化 NPR1 蛋白

近十多年來，最常被學者用來研究「植物防禦相關機制」的策略，是利用遺傳篩選 (genetic screen) 的方式來篩選失去防禦反應之各種不同表現型 (phenotype) 的突變株，除了欲分析的蛋白或欲選殖的基因失去功能外，此突變株在其他基因座 (loci) 上沒有發生任何突變 (或稱單一突變株)，這些單一突變株皆可用來解釋或證實所突變的基因或失去功能的蛋白於植物防禦機制中可能扮演的角色。自 1994 到 1997 年間，許多學者就試圖以此方式解釋 SAR 的機制，並開始尋找「不被 SA 誘導產生 SAR」的突變株<sup>(2, 6, 17, 38)</sup>。此外，也有學者利用生物化學的方法，以放射性同位素標定的 SA 分子，從植物體內篩選到幾個可與 SA 鍵結的蛋白 (SA-binding proteins, SABPs)，例如：過氧化氫酶 (catalase)<sup>(5)</sup>、抗壞血酸過氧化酶 (ascorbate peroxidase)<sup>(13)</sup>、碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)<sup>(40)</sup> 與解脂酶 (lipase)<sup>(23)</sup> 等蛋白，上述蛋白都被證實具有與 SA 鍵結的能力。在目前找到的 SABPs 中，lipase (SABP2) 被證實對 SA 最具親和性，且可被 SA 誘導其酶活性<sup>(11)</sup>，然而若無 SABP2，植物將失去 SAR 的能力<sup>(23)</sup>，由此可知解脂酶於 SAR 中，可能扮演極重要的角色。至於其他 SABPs 蛋白的活性多與移除植物體內的過氧化物有關 (即與抗氧化有關)，而這些抗氧化蛋白與 SA 鍵結後，其酶活性會受到抑制，並造成植物體內激活態氧 (reactive oxygen species) 的累積，這些激活態氧為活化 *NPR1* 蛋白所必需，因此目前推測，植物可能藉由 SA 抑制抗氧化蛋白，藉此達到「引發爆性氧化作用 (oxidative burst) 進而活化 *NPR1* 蛋白」的生理目的<sup>(11)</sup>，但 SA 與各 SABPs 之間的交互作用與 SAR 表現的關係尚待更多證據來證明。Mou 氏等人於 2003 年<sup>(32)</sup> 報導指出 *NPR1* 蛋白平常於植物體內為恆常合成 (constitutively synthesized *NPR1*)，且利用分子內的雙硫鍵 (intra-molecular disulfide bonds) 鍵結形成大的聚合體 (oligomer)，但在 SAR 的活化過程中，*NPR1* 蛋白的分子內雙硫鍵會被打斷成為還原態 (reducing condition)，而形成活化的單體 (active monomer)，此活化的 *NPR1* 單體可活化 *PR-1* 基因的表現。有些學者利用「酵母菌雙雜交分析法」，發現部分 TGA 轉錄因子可以持續地與 *NPR1* 蛋白結合，然而 Després 氏等人<sup>(7)</sup>

發現：TGA1 與 TGA4 平常並無法與 NPR1 蛋白結合，但若經 SA 誘導 SAR 時，TGA1 與 TGA4 就可與 NPR1 蛋白結合；此外，該研究室也於 2003 年<sup>(8)</sup> 發現當植物以 SA 處理後，其體內的 TGA1 與 TGA4，也會將其分子內的雙硫鍵還原成兩個半胱胺酸態 (Cys-260 及 Cys-266)，此還原態的 TGA1 與 TGA4 可以與 NPR1 蛋白結合而活化下游基因的轉錄作用。由此可知，SA 可利用植物體內的還原作用來活化 SAR 反應。至於 NPR1 蛋白的主要還原力 (reducing power) 經推估是由細胞內的五碳糖磷酸反應路徑 (pentose phosphate pathway) 所供給<sup>(11)</sup>。Rao 與 Davis 二氏<sup>(36)</sup> 發現在無法累積 SA 的 *nahG* 轉基因阿拉伯芥【此轉殖植物可利用表現水楊酸 1-羥化酶 (salicylate 1-hydroxylases) 來分解 SA】中，臭氧 (ozone) 所誘導的還原反應會減少，因此也證實了 SA 的累積除了用來活化阿拉伯芥的 SAR 外，SA 可能也是被用來進行植物體內還原反應的重要因子之一。目前在植物或動物中，對於其體內的還原反應能量來源皆認為主要是由「五碳糖磷酸反應路徑」所提供，而此反應路徑之速率決定步驟酵素為「葡萄糖-6-磷酸 1-脫氫酶 (glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, G6PDH)」，對此，Mou 氏等人<sup>(32)</sup> 曾利用抑制劑「6-胺基菸鹼醯胺 (6-amino nicotinamide)」抑制該酵素的活性，發現當 G6PDH 失去活性後，植物體內會失去原有的還原反應，且無法形成 NPR1 蛋白的活化單體，導致無法活化 *PR* 基因表現與無法引發 SAR。至於植物如何利用 SA 的累積造成體內的猛爆性氧化作用並進行後續的還原反應，乃將來所需釐清的重要課題。

綜合菸草<sup>(18)</sup> 與阿拉伯芥<sup>(43)</sup> 等例子，已知 SA 可以活化兩波段的基因表現，首先是 SA 處理後約 2-3 小時即可活化「保護性」(或稱「抗氧化性」) 的基因，例如穀胱甘肽-S-轉移酶 (glutathione-S-transferase) 與葡萄糖基轉移酶 (glucosyltransferase) 等酵素的基因，可保護植物細胞免於遭受氧化逆境的傷害<sup>(43)</sup>。隨之在 SA 處理後約 12-16 小時，一些「可藉由 NPR1 蛋白活化 (NPR1-dependent)」的 *PR* 基因即會被誘導表現<sup>(18)</sup>。因此植物利用 SA 與 NPR1 蛋白協同調控 SAR 的事實已無庸置疑。

## NPR1 如何活化 *PR* 基因的表現

NPR1 蛋白已被發現可與多種不同的 TGA 轉錄因子結合，而 TGA 轉錄因子也被證實可調控 *PR* 基因的表現<sup>(7, 12, 21, 48, 52)</sup>。Johnson 氏等人<sup>(20)</sup> 利用「染色質免疫沉澱 (chromatin immunoprecipitation)」分析法，於 2003 年在生體內 (*in vivo*) 證實：在 *PR-1* 基因的啟動子上可發現 NPR1 蛋白與 TGA 轉錄因子的結合體。至於 TGA

轉錄因子用來轉錄 *PR* 基因的直接遺傳證據則於學理上不易獲得，因為目前在阿拉伯芥中找到的幾個 TGA 轉錄因子，在蛋白序列上有高度的相似度 (sequence similarity)，且具功能重複性 (functional redundancy)，例如，可以與 NPR1 蛋白結合的 TGA2、TGA5 與 TGA6 等三轉錄因子之間，蛋白序列相似度可達 90%。此外，TGA2 與 TGA5 兩基因位於阿拉伯芥的第五號染色體相鄰處，沒有辦法利用「遺傳重組 (genetic recombination)」的方式分析 TGA2 與 TGA5 兩基因的功能。Zhang 氏等人於 2003 年<sup>(50)</sup> 利用基因刪除 (gene deletion) 的方式得到 *tga2 tga5 tga6* 三基因缺失突變株 (triple knockout mutant)，發現阿拉伯芥 TGA2、TGA5 與 TGA6 三轉錄因子若同時失去功能，SA 將無法誘導 *PR* 基因的表現且無法引發 SAR，且此突變株於表現型上與 *npr1* 突變株相似，對於外加高量 SA 致使植物體內產生過多的激活態氧所引起的傷害之耐受度皆會降低。值得一提的是，*tga2 tga5 tga6* 三基因缺失突變株與 *npr1* 突變株相比，對於具毒力病原菌 (virulent pathogens) 的耐受性較高，故學者推測，植物利用 NPR1 蛋白與其他的 TGA 轉錄因子結合，而誘導下游基因的表現，進而產生對微生物 (或病原菌) 的基本抗性 (basal resistance)。

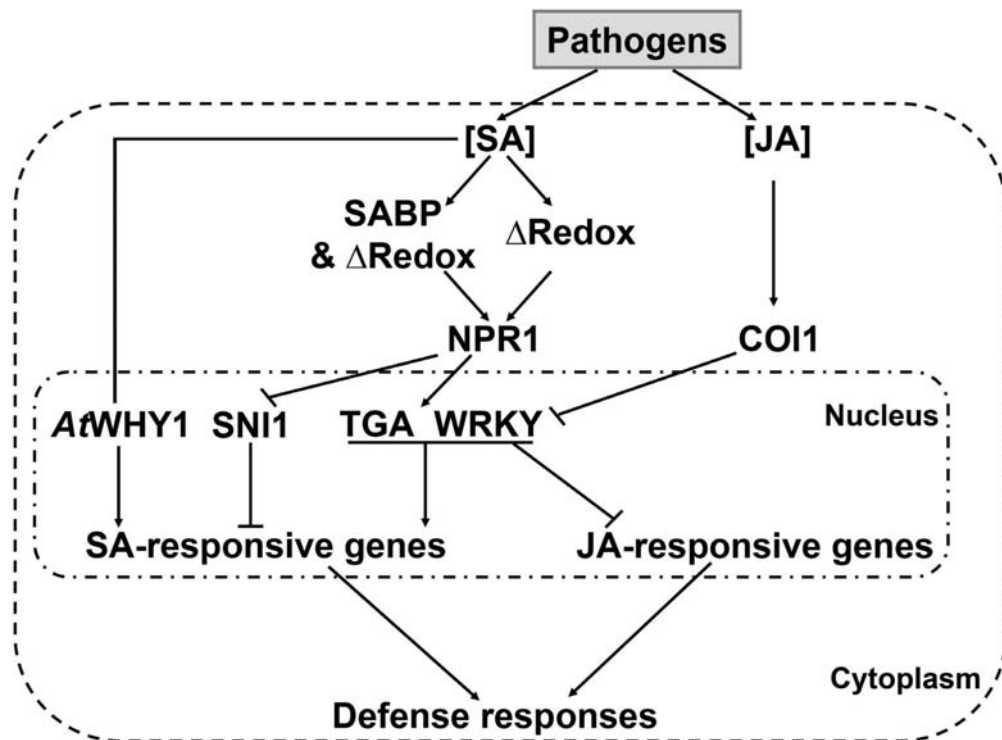
除了上述 TGAs 轉錄因子，Maleck 等人於 2000 年<sup>(30)</sup> 找到另外一群 WRKY 轉錄因子，在植物體中也可以被用來調控 SAR 與 *PR* 基因的表現，此類蛋白的 N 端具有高度保留的 WRKYGQK 胺基酸序列，屬於一種「鋅指型轉錄因子 (zinc finger transcription factor)」。可被 WRKY 轉錄因子所辨識的基因之調控序列被稱為「W-box」，在阿拉伯芥 *PR-1* 基因的啟動子 (promoter) 上，即可發現重複性的「W-box」序列<sup>(30)</sup>，而且若將 *PR-1* 基因上的 W-box 突變後，將使 *PR-1* 的啟動子活性降低<sup>(25)</sup>。與 TGAs 轉錄因子相比，植物體內具有更多樣的 WRKY 轉錄因子<sup>(14)</sup>，因此要證明哪些 WRKY 轉錄因子會被用來調控 *PR* 基因之表現的難度很高，Li 氏等人<sup>(27)</sup> 利用過度表現 (overexpression) 與反義基因法 (antisense) 抑制表現 WRKY 基因的方式，證實 WRKY70 轉錄因子確實可被用來正調控 SAR 與 *PR* 基因的表現。

研究 SAR 的學者不免會問：是否有負調控因子可用來調控 SAR？Li 氏等人<sup>(29)</sup> 在 *npr1* 的突變株族群中，篩選到另一個表現型發生改變的突變株，命名為 *npr1 sni1* (suppressor of *npr1* inducible) 雙突變株，此突變株可回復 *npr1* 所失去的 SAR 表型，意即 SNI1 蛋白為負調控 SAR 的調控因子，並猜測 NPR1 蛋白可能利用抑制 SNI1 蛋白的活性，進而活化 SAR 與 *PR* 基因的

表現。此外，*npr1 sni1* 突變株可回復 SAR 的表型，顯示此調控因子在無 NPR1 蛋白時（因為此雙突變株之 NPR1 蛋白也失去功能），SAR 的表型才會顯現，這是否暗示植物另有「不需 NPR1 蛋白參與 (NPR1-independent)」的 SAR 路徑？因為在無正調控因子 (NPR1 蛋白) 時，植物一樣可以因負調控因子 (如 SNI1 蛋白) 失去活性而誘發 SAR 與表現 PR 基因。而 Desveaux 氏等人<sup>(9)</sup> 指出，植物可能利用另一轉錄因子—Whirly1，來啟動 PR 基因表現並誘發「不需 NPR1 蛋白參與」的 SAR。此外，阿拉伯芥體內的 Whirly1 基因 (*AtWhy1*) 若發生缺失，阿拉伯芥將出現致死病徵<sup>(10)</sup>，這也解釋了為何在此之前很少人找到類似的轉錄因子。至於 *AtWhy1* 與 *AtWhy2* 這兩個突變株能被順利發現，是因為此二突變株為非致死性的點突變植物，且根據研究顯示，這兩個突變株無法被 SA 誘導其體內的 PR 基因表現，並失去對菌 *Peronospora parasitica* 的抗性。經深入分析 *AtWhy1* 突變株發現，此突變株乃是對 PR 基因啟動子上的序列 (GTCAAAA/T) 失去結合能力，造成無法利用 SA 來誘導「不需 NPR1 蛋白參與」的 PR 基因表現 (詳圖一)。

## NPR1 蛋白在整個植物防禦系統中扮演的角色

*NPR1* 基因自 1997 年被選殖出來後，學者就深入論證 NPR1 蛋白在整個植物防禦反應機制中所扮演的角色，在這十年間，NPR1 蛋白被視為植物的 SAR 與 ISR 中最重要的調控因子之一。研究指出，NPR1 蛋白除了被植物用來調控 SAR 與 ISR 外，此蛋白也被認為可調控「抗性基因媒介的防禦反應 (Resistance-gene-mediated defense)」。此外，Li 氏等人<sup>(28)</sup> 從 *npr1-1* 突變株中篩選到另一個可持續活化 SAR 的突變株 (*sncl*, *suppressor of npr1-1, constitutive 1*)，經分析之後發現，*sncl* 是在抗性基因上出現點突變的突變株，此突變株可在無 NPR1 蛋白時，持續活化 PR-2 基因的表現並引發抗性【即為「不需 NPR1 蛋白參與的抗性 (NPR1-independent resistance)」】<sup>(49)</sup>。然而在其他例子中，將帶有 *Pto* 抗性基因的番茄體內的 *NPR1* 基因突變後，會使得該番茄對帶有 *avrPto* 基因的細菌性葉斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*PstDC3000*) 之抗性消失<sup>(11)</sup>，因此植物體內由「抗性基因媒介的防禦反應」，可利用「需要 NPR1 蛋白」或「不需 NPR1 蛋



圖一、NPR1 蛋白在阿拉伯芥系統性抗病路徑中可能扮演的角色 (修改自參考文獻 12 與 27)。

Fig.1. Proposed model for the NPR1-mediated signaling pathway as part of the network of pathways controlling biologically induced systemic disease resistance in Arabidopsis (Modified from: Ref. 12 and Ref. 27). COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; JA, jasmonic acid; NPR1, NON-EXPRESSION OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1; SA, salicylic acid; SABP, SA-binding protein; SNI1, SUPPRESSOR OF NPR1 INDUCIBLE 1; AtWHY1, *AtWhy1*;  $\Delta$ Redox, changes in redox status.

白」參與之兩反應途徑來達成。

NPR1 蛋白除了可以調控植物的 SAR 外，經證實也被植物用來調控 ISR<sup>(46)</sup>，現已證實 SAR 與 ISR 為植物體內兩獨立的系統性抗病路徑，但皆受到 NPR1 蛋白的調控(詳圖一)，至於 NPR1 蛋白如何調控兩系統性抗病反應，為近年間最受關注的研究課題之一。植物利用 ISR 對抗病原菌的例子中，常被提到的例子是：利用無病原性的根圈細菌 *Pseudomonas fluorescens* 誘發阿拉伯芥的 ISR 以抵抗十字花科露菌<sup>(41)</sup> (*Peronospora parasitica*) 與十字花科黑斑病菌<sup>(34)</sup> (*Alternaria brassicicola*)；在露菌的例子中，現已證實阿拉伯芥利用根圈細菌所產生的 2,4-二乙酰基間苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG) 誘發其體內的 ISR，進而抵抗該病原菌之感染<sup>(49)</sup>。比較 ISR 與 SAR 兩不同的抗病反應可發現，兩抗病反應若由相同因子所調控，則 NPR1 蛋白勢必成為兩抗病反應所共同競爭的對象，所以 Dong 氏<sup>(41)</sup> 提出：「ISR 通常由根部所誘發，而 SAR 由葉部所誘發」，根據此現象可推測植物的 ISR 與 SAR 不會在相同組織上相互競爭 NPR1 蛋白，但若植物葉片上的 ISR 也可以靠另一「系統葉 (systemic leaf)」來誘發，那植物葉部的 SAR 與 ISR 兩系統可能面臨相互競爭 NPR1 蛋白的命運。近來的研究顯示，若同時將 SA (可誘導 SAR) 與 JA (可誘導 ISR) 一起施用於植物的葉片上，可發現 SA 將抑制 JA 的合成，並抑制 JA 所誘導的抗病反應，而且此抑制現象於 *npr1* 的突變株中會有減緩的情形<sup>(41)</sup>，亦即 NPR1 蛋白在兩系統性抗病路徑中，實有居中調控的功能。分析 NPR1 蛋白的功能可知，若突變 NPR1 蛋白的細胞核定位區域 (nuclear localization domain)，將會減少 *PR* 基因的表現量<sup>(22)</sup>，但是卻仍會抑制 JA 的訊號傳遞路徑 (JA signaling pathway)<sup>(41)</sup>。Dong 氏認為，植物會在細胞質中利用「被 SA 所活化的」NPR1 蛋白與「JA 訊號傳遞路徑的正調控因子」結合，以避免「JA 訊號傳遞路徑的正調控因子」進入細胞核後啟動「JA 媒介的抗性 (JA-mediated resistance)」；當然另一種情形可能是 NPR1 蛋白可能活化「JA 訊號傳遞路徑的負調控因子」進而抑制「JA 媒介的抗性」。

Spoel 等人於 2003 年首次發表有關 SA 與 JA 媒介的抗性反應之間的相互調控對植物抗性反應之研究<sup>(41)</sup>，指出阿拉伯芥可利用 SAR 來抵抗細菌性葉斑病菌 (*PstDC3000*)，而且阿拉伯芥的 SAR 【或「SA 媒介的防禦反應 (SA-mediated defense responses)」】對抗 *PstDC3000* 的效果會比 ISR 【或「JA 媒介的防禦反應 (JA-mediated defense responses)」】好<sup>(41)</sup>。當野生型的阿拉伯芥經 *PstDC3000* 感染後，其體內會累積 SA 且會

有「SA 媒介的防禦反應」，此外，在 *npr1-1* 突變株 (*NPR1* 基因發生突變的阿拉伯芥突變株，其體內無法累積具活性的 NPR1 蛋白) 或是在 *nahG* 轉基因植物【轉殖 SA 分解酵素 (水楊酸羥化酶，salicylate hydroxylase) 的轉基因阿拉伯芥，其體內無法累積 SA】，兩者體內的 SA 與「SA 媒介的防禦反應」並不會因為 *PstDC3000* 的誘導而累積或啟動；有趣的是，上述突變株或是轉基因植物，其 JA 的累積量與「JA 媒介的防禦反應」卻會因此而受到誘導<sup>(41)</sup>，由此可推測：在阿拉伯芥體內之「JA 的訊號傳遞路徑」會因為 *PstDC3000* 的感染而誘導，但是若其植物體內存有 SA (由 *nahG* 轉基因植物實驗證實) 或是 NPR1 蛋白 (由 *npr1-1* 突變株實驗證實)，此誘導「JA 的訊號傳遞路徑」之機制將會受到抑制。

研究證實 *PstDC3000* 在感染番茄的過程中會分泌冠菌素 [coronatine，一種植物毒素 (phytotoxin)] 來活化番茄之「JA 的訊號傳遞路徑」，並抑制番茄 *PR* 基因的表現，以加重病害發生的嚴重性<sup>(51)</sup>。由 *PstDC3000* 感染番茄的例子可以發現，如能利用植物體內「SA 的訊號傳遞路徑」與「JA 的訊號傳遞路徑」之間的相互影響，使植物在感染 *PstDC3000* 過程中，有效活化 SA 的訊號傳遞路徑，應可提高植物對於病原菌 *PstDC3000* 的抗性。

Li 氏等人<sup>(27)</sup> 發現 WRKY70 轉錄因子累積量受到 SA 調控而增加並會受到 JA 調控而減少，且在過度表現 WRKY70 的轉基因阿拉伯芥中，*PR* 基因不需外加 SA 就能持續性表現，另一方面，在此轉基因植物體內，本來會受到 JA 誘導的植物防禦素基因 (*PLANT DEFENSIN 1.2*, *PDF 1.2*) 之表現卻被抑制。此外，Li 氏等人<sup>(27)</sup> 也發現 WRKY70 轉錄因子誘導 *PR* 基因表現也是利用「需要 SA 及 NPR1 蛋白參與 (SA- and NPR1-dependent) 代謝路徑的，因為外加 SA 處理此轉基因阿拉伯芥，會有最大量的 *PR* 基因表現；作者也利用反義基因法抑制表現 WRKY70 基因，反向證明當 WRKY70 基因表現受到抑制時，*PR* 基因的表現量降低，但卻可持續性的表現 *ATHCOR1* (*A. thaliana coronatine-induced gene 1*) 基因 (該基因於野生型的阿拉伯芥中會受到 JA 誘導表現<sup>(1)</sup>)，故 WRKY70 蛋白現已被視為正調控 *PR* 基因【或「對 SA 有反應的基因 (SA-responsive genes)」】的轉錄因子，同時也具有負調控「對 JA 有反應的基因 (JA-responsive genes)」的能力。Li 氏等人於 2006 年<sup>(26)</sup> 提出，阿拉伯芥可能利用 WRKY70 當作調節因子來決定表現 SAR 或是 ISR 的反應，即阿拉伯芥利用累積 SA 來活化 NPR1 或累積 JA 來活化 COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1，為 ISR

的重要調控因子)<sup>(24)</sup>，而 SA 與 NPR1 蛋白會促使 WRKY70 活化「對 SA 有反應的基因」來使植物產生 SAR；反之，累積 JA 會使 COI1 抑制 WRKY70 而讓「對 JA 有反應的基因」表現，進而促進 ISR (同時 SAR 將受到抑制) (圖一)。另一方面，Ndamukong 氏等人也於 2007 年<sup>(33)</sup> 利用「酵母菌雙雜交篩選法」找到一個可以與菸草 TGA2.2 轉錄因子結合的穀氧還蛋白 (glutaredoxin, GRX480, At1g28480，此蛋白來自阿拉伯芥)，並利用轉基因的方式證實此穀氧還蛋白會抑制植物防禦素 PDF1.2 基因的表現，此外，穀氧還蛋白一樣會受到 SA 的誘導並需 NPR1 蛋白參與才能表現至最大量 (因穀氧還蛋白在 *npr1-1* 的突變株中的表現量會降低)，故作者認為穀氧還蛋白可能利用還原 TGA 轉錄因子的分子間雙硫鍵，以正調控 SAR 與負調控 ISR 兩反應。至於對 SAR 與 ISR 兩反應路徑更深入與詳細的研究，則尚待學者們的努力。

## 結 論

NPR1 蛋白目前被視為植物系統性抗病反應中一重要調節因子，至於單一個 NPR1 蛋白如何調控複雜的抗病反應系統則尚需後續研究來釐清。從目前的研究成果顯示，NPR1 蛋白可能在不同組織與各種調控 (或轉錄) 因子結合，再利用還原作用讓自體或與其結合的蛋白質之氧化還原態發生改變，因而讓不同的調控 (或轉錄) 因子輸往細胞核內或存在細胞質中，進而活化或抑制標的基因之表現，達到調節抗病反應的目的。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Benedetti, C. E., Costa, C. L., Turcinelli, S. R., and Arruda, P. 1998. Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *Coil* mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 116:1037-1042.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., and Dong, X. 1994. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6:1583-1592.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6531-6536.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clark, J. D., Volko, S., and Dong, X. 1997. The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88:57-63.
- Chen, Z., Ricigliano, J. W., and Klessig, D. F. 1993. Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9533-9537.
- Delaney, T. P., Friedrich, L., and Ryals, J. A. 1995. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6602-6606.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P. R. 2000. The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12:279-290.
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P. R. 2003. The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15:2181-2191.
- Desveaux, D., Allard, J., Brisson, N., and Sygusch, J. 2002. A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat. Struct. Biol.* 9:512-517.
- Desveaux, D., Subramaniam, R., Després, C., Mess, J.-N., Lévesque, C., Fobert, P. R., Dangl, J. L., and Brisson, N. 2004. A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. *Dev. Cell* 6:229-240.
- Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547-552.
- Durrant, W. E., and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185-209.
- Durner, J., and Klessig, D. F. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11312-11316.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5:199-206.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J.-P., Kessmann, H., and Ryals, J. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10:61-70.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754-756.
- Glazebrook, J., Rogers, E. E., and Ausubel, F. M. 1996. Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced

- disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143:973-982.
18. Horvath, D. M., and Chua, N.-H. 1996. Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* 31:1061-1072.
  19. Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., and Métraux, J.-P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16:851-858.
  20. Johnson, C., Boden, E., and Arias, J. 2003. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of *trans*-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1846-1858.
  21. Kim, H. S., and Delaney, T. P. 2002. Over-expression of *TGA5*, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. *Plant J.* 32:151-163.
  22. Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* 12:2339-2350.
  23. Kumar, D., and Klessig, D. F. 2003. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:16101-16106.
  24. Kunkel, B. N., and Brooks, D. M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:325-331.
  25. Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., and Ward, E. 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 16:223-233.
  26. Li, J., Brader, G., Kariola, T., and Palva, E. T. 2006. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J.* 46:477-491.
  27. Li, J., Brader, G., and Palva, E. T. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16:319-331.
  28. Li, X., Clarke, J. D., Zhang, Y., and Dong, X. 2001. Activation of an EDS1-mediated *R*-gene pathway in the *snc1* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1131-1139.
  29. Li, X., Zhang, Y., Clarke, J. D., Li, Y., and Dong, X. 1999. Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* 98:329-339.
  30. Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., and Dietrich, R. A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26:403-410.
  31. Métraux, J.-P., Ahl-Goy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J., and Ward, E. 1991. Induced resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. Pages 432-439 *in: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. H. Hennecke and D.P.S. Verma eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
  32. Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935-944.
  33. Ndamukong, I., Abdallat, A. A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., and Gatz, C. 2007. SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. *Plant J.* 50:128-139.
  34. Pieterse, C. M. J., and van Loon, L. C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:456-464.
  35. Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., and van Loon, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1571-1580.
  36. Rao, M. V., and Davis, K. R. 1999. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J.* 17:603-614.
  37. Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.-Y., Johnson, J., Delaney, T. P., Jesse, T., Vos, P., and Uknes, S. 1997. The *Arabidopsis* *NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IκB. *Plant Cell* 9:425-439.
  38. Shah, J., Tsui, F., and Klessig, D. F. 1997. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:69-78.
  39. Shinya, T., Hanai, K., Gális I., Suzuki, K., Matsuoka, K., Matsuoka, H., and Saito, M. 2007. Characterization of NtChitIV, a class IV chitinase induced by beta-1,3-, 1,6-glucan elicitor from *Alternaria alternata* 102: Antagonistic effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the induction of NtChitIV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353:311-317.
  40. Slaymaker, D. H., Navarre, D. A., Clark, D., del Pozo,

- O., Martin, G. B., and Klessig, D. F. 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11640-11645.
41. Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., van Loon, L. C., Dong, X., and Pieterse, C. M. J. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760-770.
  42. Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
  43. Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordana, X., and Holuigue, L. 2004. NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:34-42.
  44. van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
  45. 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.
  46. van Wees, S. C. M., de Swart, E. A. M., van Pelt, J. A., van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8711-8716.
  47. White, R. F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99:410-412.
  48. Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., and Dong, X. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6523-6528.
  49. Zhang, Y., Goritschnig, S., Dong, X., and Li, X. 2003. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in *suppressor of npr1-1, constitutive 1*. *Plant Cell* 15:2636-2646.
  50. Zhang, Y., Tessaro, M. J., Lassner, M., and Li, X. 2003. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors *TGA2*, *TGA5*, and *TGA6* reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* 15:2647-2653.
  51. Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C. L., Schaller, A., He, S. Y., and Howe, G. A. 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J.* 36:485-499.
  52. Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., and Klessig, D. F. 2000. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:191-202.





**Mr. Ying-Hong Lin**

Mr. Lin received his B. Sc. in Plant Pathology from National Chung Hsing University (NCHU), Taichung, Taiwan in 2001, and his M. Sc. in Plant Pathology in 2003 under Dr. Pi-Fang Linda Chang's supervision. In his thesis, he studied *Fusarium* wilt of watermelon and developed molecular markers for *Fusarium* wilt-resistant watermelons. He is currently a Ph.D. candidate under the guidance of Dr. Chang working on the molecular technique for rapid detection of *Fusarium oxysporum* via DNA fingerprintings.



**Dr. Pi-Fang Linda Chang**

Dr. Chang is an assistant professor at the Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University (NCHU), Taichung, Taiwan. She received her B. Sc. in Horticulture from National Taiwan University (NTU) in 1989, and her Ph.D. in Plant Physiology from Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA in 1994. After working as a post doctorate in the Department of Botany, NTU, Dr. Chang was appointed as an assistant professor from 1997 to 1999. Her major expertise is in plant physiology and molecular biotechnology with special emphasis on plant stress physiology. Her research interests include molecular aspects of plants under abiotic stresses, including salinity, drought, and heat; defense responses of plants under biotic stresses; and mechanism of biological control agents for crop protection. In recent years, Dr. Chang has studied the plant defense responses in hot pepper-*Colletotrichum acutatum* and watermelon-*Fusarium oxysporum* interactions. Dr. Chang also developed molecular markers for quick detection and identification of soil-borne *Fusarium oxysporum* fungal pathogens and rapid differentiation of *Fusarium* wilt-resistant watermelon cultivars.

## ABSTRACT

Lin, Y.-H.<sup>1</sup>, and Chang, P.-F. L.<sup>1,2</sup> 2008. The role of Arabidopsis NPR1 protein in plant induced systemic disease resistance. *Plant Pathol. Bull.* 17: 101-110 (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 402, R. O. C.; <sup>2</sup>Corresponding Author, E-Mail: pfchang@nchu.edu.tw, Fax: +886-4-2286-0442)

The Arabidopsis NPR1 protein is the most important regulator for plant systemic induced responses. It not only promotes the salicylic acid (SA)-mediated systemic acquired resistance (SAR) but also is involved in crosstalk inhibition of jasmonic acid (JA)-mediated induced systemic resistance (ISR). After the initiation of SAR, activation of NPR1 and its binding to some TGA transcription factors under the reducing conditions could subsequently induce the accumulation of pathogenesis-related proteins. In addition to NPR1 and TGA, other transcription factor such as WRKY70 protein is also found to be involved in SA-mediated defense and crosstalk between SA- and JA- signaling pathways.

**Key words:** salicylic acid, induced systemic resistance (ISR), pathogenesis-related protein (PR protein), systemic acquired resistance (SAR), transcription factor