

# イネにおけるエリシター応答性 WRKY 型転写因子の 機能解析

応用生命工学専攻

平成13年度博士課程進学

氏名 中条 哲也

指導教員名 山根 久和

目次	i
略語表	v
使用データベース	vi
論文内容の要旨	vii
<b>第1章 序論</b>	<b>1</b>
1-1 植物の防御応答	2
1-2 植物の病害応答に関与する転写因子	5
1-2-1 TGA ファミリー	6
1-2-2 Myb ファミリー	6
1-2-3 ERF ファミリー	7
1-2-4 ORCA ファミリー	8
1-3 WRKY ファミリー	8
1-3-1 WRKY ファミリーの構造	8
1-3-2 WRKY ファミリー遺伝子の発現様式	10
1-3-3 防御応答における WRKY ファミリーの役割	11
1-3-4 WRKY ファミリーの標的遺伝子	14
1-4 イネにおけるファイトアレキシン生合成への WRKY ファミリーの関与	14
1-4-1 イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン	14
1-4-2 ファイトアレキシン生合成への WRKY ファミリーの関与の可能性	15
<b>第2章 エリシター応答性 WRKY 型転写因子 OsWRKY53・OsWRKY71 の単離</b>	<b>20</b>
2-1 緒言	20
2-2 材料および方法	21
2-2-1 生物試料および培養条件	21
2-2-2 エリシター処理およびジャスモン酸処理	21
2-2-3 DNA の取り扱い	22

2-2-4	イネからの total DNA の抽出	22
2-2-5	イネからの total RNA の抽出	22
2-2-6	逆転写反応	22
2-2-7	各 WRKY 型転写因子の cDNA の単離	23
2-2-8	ノーザン解析	23
2-2-9	OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性プラスミドの構築	24
2-2-10	タマネギ表皮細胞を用いた核局在性の解析	24
2-2-11	OsWRKY53 発現用プラスミドの構築	27
2-2-12	N-Trx-OsWRKY53 の発現、精製	27
2-2-13	OsWRKY71 発現用プラスミドの構築	28
2-2-14	N-MBP-OsWRKY71 の発現、精製	28
2-2-15	ゲルシフトアッセイ用プローブのテンプレートの作製	29
2-2-16	ゲルシフトアッセイ	29
<b>2-3</b>	<b>結果</b>	<b>30</b>
2-3-1	OsWRKY53、OsWRKY71 の cDNA のクローニング	30
2-3-2	OsWRKY53、OsWRKY71 のエリシター応答性の解析	30
2-3-3	OsWRKY53、OsWRKY71 のイモチ病菌接種に対する応答性の解析	34
2-3-4	OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性の解析	38
2-3-5	OsWRKY53 組換えタンパク質の発現、精製	38
2-3-6	OsWRKY71 組換えタンパク質の発現、精製	41
2-3-7	OsWRKY53、OsWRKY71 の W-box への特異的結合	41
2-3-8	OsWRKY53、OsWRKY71 のジャスモン酸応答性の解析	43
<b>2-4</b>	<b>考察</b>	<b>47</b>
2-4-1	OsWRKY53、OsWRKY71 のエリシター応答性、イモチ病菌応答性	47
2-4-2	OsWRKY53、OsWRKY71 の homolog	49
2-4-3	OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性、W-box 結合能および OsWRKY53、 OsWRKY71 のジャスモン酸応答性	52
<b>第3章</b>	<b>OsWRKY53 の機能解析</b>	<b>54</b>
<b>3-1</b>	<b>緒言</b>	<b>54</b>

<b>3-2 材料および方法</b>	<b>55</b>
3-2-1 生物試料および培養条件	55
3-2-2 エリシター処理	55
3-2-3 DNA の取り扱い	55
3-2-4 <i>OsWRKY53</i> 過剰発現変異株の作製	55
3-2-5 イネからの total RNA の抽出	56
3-2-6 ノーザン解析	56
3-2-7 マイクロアレイ解析 (プローブの調製)	56
3-2-8 マイクロアレイ解析 (ハイブリダイゼーション)	57
3-2-9 マイクロアレイ解析 (データ解析)	57
3-2-10 逆転写反応	57
3-2-11 Real Time RT-PCR 検量線用サンプルの調製	60
3-2-12 Real Time RT-PCR	60
3-2-13 イモチ病菌のパンチ接種	61
<b>3-3 結果</b>	<b>62</b>
3-3-1 <i>OsWRKY53</i> 過剰発現変異株 (イネ培養細胞) の作製	62
3-3-2 マイクロアレイ解析による <i>OsWRKY53</i> の標的遺伝子のスクリーニング	62
3-3-3 マイクロアレイ解析結果の検証	70
3-3-4 標的遺伝子群のエリシターに対する発現 kinetics	70
3-3-5 <i>OsWRKY53</i> 過剰発現変異株 (イネ植物体) の作製	75
3-3-6 <i>OsWRKY53</i> 過剰発現変異株 (イネ植物体) の親和性イモチ病菌に対する 抵抗性の観察	79
<b>3-4 考察</b>	<b>82</b>
3-4-1 <i>OsWRKY53</i> の標的遺伝子のスクリーニング	82
3-4-2 <i>OsWRKY53</i> のイネにおける病害抵抗性への関与	84
<b>第4章 <i>OsWRKY71</i> の機能解析</b>	<b>88</b>
<b>4-1 緒言</b>	<b>88</b>
<b>4-2 材料および方法</b>	<b>89</b>
4-2-1 生物試料および培養条件	89



4-2-2	DNA の取り扱い	89
4-2-3	<i>OsWRKY71</i> 過剰発現変異株の作製	89
4-2-4	イネからの total RNA の抽出	89
4-2-5	ノーザン解析	89
4-2-6	マイクロアレイ解析 (プローブの調製)	90
4-2-7	マイクロアレイ解析 (ハイブリダイゼーション)	90
4-2-8	マイクロアレイ解析 (データ解析)	90
<b>4-3</b>	<b>結果</b>	<b>92</b>
4-3-1	<i>OsWRKY71</i> 過剰発現変異株 (イネ培養細胞) の作製	92
4-3-2	マイクロアレイ解析による <i>OsWRKY71</i> の標的遺伝子のスクリーニング	92
<b>4-4</b>	<b>考察</b>	<b>96</b>
<b>第5章</b>	<b>総括と展望</b>	<b>99</b>
<b>参考文献</b>		<b>104</b>
<b>Appendix A</b>	<b>アグロバクテリウム形質転換法</b>	<b>118</b>
<b>Appendix B</b>	<b>イネ形質転換法</b>	<b>119</b>
<b>謝辞</b>		<b>124</b>

## 略語表

Ap	ampicillin
BAP	6-benzylaminopurine
BLAST	basic local alignment search tool
cDNA-AFLP	cDNA amplified restriction fragment length polymorphism
Cb	carbenicillin
Cm	chloramphenicol
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DIG	digoxigenin
CDP	copalyldiphosphate
GAAS	genome auto annotation system
GGDP	geranylgeranyldiphosphate
GST	glutathione S-transferase
Hm	hygromycin
IMAC	immobilized metal ion affinity chromatography
Km	kanamycin
KOME	knowledge-oriented molecular biological encyclopedia
LRR	leucine-rich repeat domain
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAPKK	mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK	mitogen activated protein kinase kinase kinase
MBP	maltose binding protein
NAA	1-naphthaleneacetic acid
NBS	nucleotide-binding site
PLACE	plant cis—acting regulatory DNA elements database
PR	pathogenesis related
SAR	systemic acquired resistance
TIR	Toll/interleukin-1-receptor
Trx	thioredoxin

## 使用データベース (URL)

DDBJ	DNA DataBank of Japan ( <a href="http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html/">http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html/</a> )
KOME	Knowledge-Oriented Molecular Biological Encyclopedia ( <a href="http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/">http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/</a> )
NCBI	National Center for Biotechnology Information ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
PLACE	PLANT Cis-acting Regulatory DNA Elements Database ( <a href="http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/">http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/</a> )
Rice BLAST	Rice sequence database BLAST search ( <a href="http://RiceBLAST.dna.affrc.go.jp">http://RiceBLAST.dna.affrc.go.jp</a> )
Rice GAAS	Rice Genome Auto Annotation System ( <a href="http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp">http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp</a> )

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成13年度博士課程進学

氏名 中条 哲也

指導教員名 山根 久和

## 論文題目

# イネにおけるエリシター応答性 WRKY 型転写因子の機能解析

植物は動物のような免疫系を持たないが、糸状菌、細菌、ウィルスなどの病原体が感染すると、これを特異的な機構で認識し、様々な抵抗性反応を示すことで生存を図っている。病原体感染に対する植物の抵抗性応答の直接的な引き金となる特異的因子を一般にエリシターと呼び、病原体の感染を受けた植物では、病原体や植物の細胞表層由来の断片などがエリシターとなって活性酸素の発生、PR タンパク質と総称される抗菌性タンパク質やファイトアレキシンと呼ばれる低分子の抗菌性物質の生産など様々な抵抗性反応が誘導されることが知られている。

我々の研究グループは、イネ液体培養細胞におけるエリシター誘導のシグナル伝達経路の全貌の解明を目的として研究を進めてきた。その過程において、イネの expression sequence tag (EST) を用いたマイクロアレイ解析を行ったところ、エリシター応答性の WRKY 遺伝子が少なくとも2種類存在していることが明らかになった。WRKY 型転写因子は、エリシター応答性遺伝子のエリシター応答配列 (W-box) に特異的に結合する植物特有の転写因子として同定されたが、エ

リシター応答はもとより、サリチル酸応答を示す防御関連遺伝子の発現制御に重要な役割を果たす転写因子として、現在もっとも注目されている転写因子ファミリーの一つである。イネにおいて WRKY 型転写因子の生物学的な役割はほとんど報告されていない。イネ以外の植物において、これまで報告されている防御応答に関わる WRKY 型転写因子の多くがエリシターによって誘導されることから、これらのイネのエリシター応答性 WRKY 型転写因子もイネの防御応答に関わっている可能性が高いと考えられ、その生物学的機能に非常に興味を持たれる。

本研究では、イネのエリシター誘導のシグナル伝達経路の一端を明らかにすることを目的として、これら2種のエリシター応答性 WRKY 型転写因子を単離し、機能解析を試みた。

### 1. エリシター応答性 WRKY 遺伝子 *OsWRKY53*・*OsWRKY71* の単離

マイクロアレイ解析によって存在が示された2種のエリシター応答性 WRKY 遺伝子の cDNA を EST データベースの配列データ及び Rice GAAS の推測配列データに基づいて設計したプライマーと、キチンエリシター処理後1時間のイネ液体培養細胞から抽出した total RNA を用いて RT-PCR によってクローニングした。得られた cDNA の塩基配列をデータベースで解析した結果、それぞれ *OsWRKY53*、*OsWRKY71* であることが確認された。また、アミノ酸配列を解析した結果、*OsWRKY53* は Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger motif タイプである WRKY ドメインを2個持つグループ I、*OsWRKY71* は Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger motif タイプである WRKY ドメインを1個持つグループ II に属していることが明らかになった。

ノーザン解析により、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はイネ液体培養細胞において、イモチ病菌由来の2種類のエリシターであるキチンエリシター及びスフィンゴリピドエリシターによって処理後30分以内に発現が誘導され、1時間でピークに達し、以後漸減することが示された。さらに、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はイネ植物体において、イモチ病菌接種によって接種後6時間以内に発現が誘導されることが示された。以上の結果から、これらの WRKY 型転写因子がイネのイモチ病菌に対する非特異的な抵抗性反応の初期段階に関与している可能性が示唆された。

また、ノーザン解析により、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はイネ液体培養細胞において、ジャスモン酸によっても発現が誘導されることが明らかになった。我々の研究グループは、イネ液体培養細胞におけるエリシター誘導のファイトアレキシン生産において、エリシター刺激のシグナルトランスデューサーとしてジャスモン酸 (JA) が重要な役割を果たしていることを明らかにしていることから、イネの抵抗性反応における JA の役割を解明する上でも、これらの WRKY 型転写因子の機能に興味を持たれる。

## 2. OsWRKY53・OsWRKY71 の核局在性・W-box 結合能の確認

GFP と OsWRKY53 及び OsWRKY71 の融合タンパク質を CaMV35S プロモーターの制御のもと、タマネギ表皮細胞内で一過的に発現させたところ、核にのみ GFP の蛍光が観察されたことから、OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性が確認された。また、thioredoxin (Trx) と OsWRKY53 の融合タンパク質及び maltose-binding protein (MBP) と OsWRKY71 の融合タンパク質をタンデムに並んだ W-box を含むプローブに対するゲルシフトアッセイに供した結果、シフトバンドが観察された。Trx 及び MBP のみではシフトバンドが観察されなかったこと、及び W-box に変異を導入したプローブを用いた場合 Trx-OsWRKY53 または MBP-OsWRKY71 を加えてもシフトバンドが観察されなかったことから、OsWRKY53、OsWRKY71 が特異的に W-box を認識して結合することが確認された。

## 3. OsWRKY53 の機能解析

OsWRKY53 の機能解析の一環として、マイクロアレイ解析を用いて OsWRKY53 の標的遺伝子をスクリーニングすることにした。アグロバクテリウムを用いた形質転換により OsWRKY53 過剰発現変異株（イネ培養細胞）を5ライン作製し、そのうち2ラインをマイクロアレイ解析に供した。対照区として、空のプラスミドで形質転換したイネ培養細胞を用いた。アジレント社のオリゴマイクロアレイを用いた結果、OsWRKY53 過剰発現変異株においてキチナーゼや PR-4 などの PR タンパク質遺伝子や、いくつかの WRKY 遺伝子などの抵抗性反応に関わると考えられる遺伝子の発現量が対照区と比べて2倍以上増加していることが明らかになった。また、OsWRKY53 過剰発現変異株5ライン全てにおいて、これらの遺伝子の発現が活性化されていることを定量的 RT-PCR により明らかにした。これは、マイクロアレイ解析によって得られた複数の遺伝子の発現が活性化しているという結果が、ライン特異的なものではなく、OsWRKY53 を過剰発現させたことによるものであることを示している。

次に、データベースを用いてこれらの遺伝子の5'上流域の塩基配列を解析した結果、多くの遺伝子の5'上流域に W-box が複数存在していた。また、現時点で少なくとも3種類の遺伝子（キチナーゼ、PR-4、WRKY）がキチンエリシターによって発現が誘導されることが明らかになった。以上の結果は、これら一連の遺伝子群が、キチンエリシターによって誘導された OsWRKY53 によって発現を正に制御されている可能性が極めて高いことを示している。現在、レポータージーンアッセイにより、これらの遺伝子のキチンエリシター応答性領域の同定を W-box を中心に試みるとともに、OsWRKY53 過剰発現変異株、OsWRKY53 発現抑制株（それぞれ

イネ植物体) を作製し、それらのイモチ病菌に対する抵抗性の変化を観察している。

#### 4. OsWRKY71 の機能解析

OsWRKY71 の機能解析の一環として、マイクロアレイ解析を用いて OsWRKY71 の標的遺伝子をスクリーニングすることにした。アグロバクテリウムを用いた形質転換により *OsWRKY71* 過剰発現変異株 (イネ培養細胞) を 6 ライン作製したが、*OsWRKY71* の発現量にライン間で差が認められたため、発現量が多いほうから 2 つのラインをマイクロアレイ解析に供した。アジレント社のオリゴマイクロアレイを用いた結果、*OsWRKY71* 過剰発現変異株においてキチナーゼやヒートショックプロテインなどの抵抗性反応に関わると考えられる遺伝子の発現量が対照区と比べて 2 倍以上増加していることが明らかになった。

#### 5. まとめ

本研究ではイネにおける 2 種のエリシター応答性 *WRKY* 遺伝子、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* を単離し、それぞれの遺伝子がイネ植物体においてイモチ病菌接種によっても発現が誘導されることを明らかにするとともに、核内局在性、W-box 特異的な結合能を確認した。さらに、*OsWRKY53* 過剰発現株及び *OsWRKY71* 過剰発現変異株を用いたマイクロアレイ解析の結果、イネの抵抗性反応に関わると考えられる様々な遺伝子の発現が活性化されていることが明らかになった。また、これらの遺伝子の多くがエリシター応答性であり、かつそれらの 5' 上流域には、複数の W-box が存在しているものが多く見受けられた。以上のことは、イネの抵抗性反応に関わると考えられる遺伝子群が、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* もしくはそれらによって誘導される *WRKY* 型転写因子によって発現を制御されている可能性が高いということを示唆している。

近年、植物が有している抵抗性を高めることによって病害を防除する薬剤が注目されている。本研究で得られた知見は、イネの自己防御機構の解明につながるとともに、そのような薬剤開発のための科学基盤の構築に寄与するものと期待される。

# 第1章

## 序論

世界の人口は 20 世紀後半から爆発的なスピードで増加しており、1950 年には 20 億人程度であったものが現在では 60 億人を突破している。今日まで食糧生産力も世界人口の増加に対応して増大し、急速に増加した人類の生命を支える食糧供給を可能にしてきた。このような急激な食糧増産は、「緑の革命」の IR8 に代表される多収穫作物の開発や、20 世紀半ばの有機合成農薬と化学肥料の発明と欧米の化学産業による、それらの急速な普及が大きな要因となっている。一方、現在の世界人口の増加率が続くと仮定すると、2025 年までには世界の人口は 80 億人を突破すると考えられており、その人口をまかなうためには、主要穀物類（イネ、ムギ、トウモロコシ）の収量を約 50%増収する必要があると考えられている。しかし、近年農業増産率がとみに低下していることを考えあわせると、有効な対策がとられない限り、近い将来において食糧危機が到来することは必至と見られている。このような食糧危機に対処するためには、食糧の増産がまず考えられなければならないが、その一方で、環境保全型病虫害防除法を確立することも急務である。しかしながら、従来の殺虫剤、殺菌剤等の農薬の大量使用では深刻な環境汚染がもたらされ、薬剤耐性病虫害の発生も避けられない問題となる。さらに、現時点では遺伝子組み換え作物が一般に許容されていない。以上のことから、遺伝子組み換えに依存することのない環境保全型の農業技術を確立することが極めて重要であると考えられている。

このような状況下、植物免疫賦活型農薬が開発され注目を集めている。このタイプの農薬は、ほとんど無毒で土壌、河川などに残留して生態系を乱すことなく、長年にわたって使用されても耐性病害が発生しないという、農薬として理想的な性質を有しているが、いわば偶然発見されたもので作用機構が未解明であることはもちろん、効率的なスクリーニング法も確立されていない。植物が本来有している病害抵抗性発現機構を解明し、その成果を植物免疫賦活型農薬の開発に応用することが非常に重要であると考えられる。

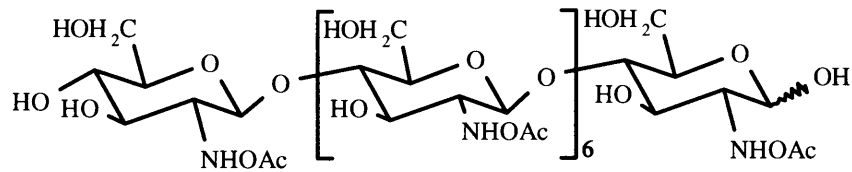


## 1-1 植物の防御応答

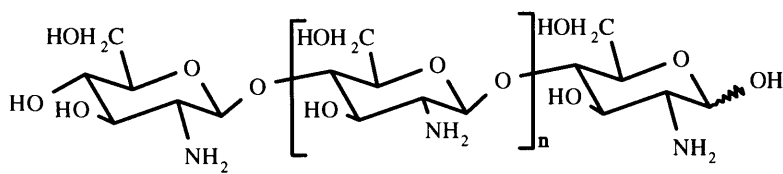
植物は動物のような免疫系を持たないが、糸状菌、細菌、ウイルスなどの病原体が感染すると、これを特異的な機構で認識し、様々な抵抗性反応を誘導する。そして、これらの抵抗性反応を効果的に組み合わせることによって生存を図っていると考えられている。病原体の感染を受けると、細胞膜を通してその感染シグナルが細胞内へ伝えられ、また近傍の細胞にもそのシグナルが伝達し、一連の防御反応を引き起こす。主な防御応答としては過敏細胞死、活性酸素群の発生、細胞壁の強化、pathogenesis-related (PR) タンパク質と総称される抗菌性タンパク質の生産、そして抗菌性の低分子化合物であるファイトアレキシンの生産などが挙げられる。病原体の感染は病原体の細胞表層由来の物質が植物細胞膜のレセプターと結合することによって認識され、それによって、一連の防御応答が誘導されることが考えられている【Yoshikawa *et al.*, 1983, 1993】。病原体由来の特定の物質が、病原体感染の場合と同様に一連の防御応答を誘導することが示されており、この仮説が正しいことを裏付けている。このように、植物の防御反応を誘導する作用のある物質もしくは原因を総称してエリシターと呼び、タンパク質、脂質、多糖やオリゴ糖などの生物由来のものから、紫外線 (UV) や重金属イオンなどの非生物起源のものまで、様々な種類のエリシターが現在までに報告されている (Fig. 1-1) 【Ebel and Cosio, 1994; Koga *et al.*, 1998; Umemura *et al.*, 2002】。

一般的なモデルとして、感染を受ける、もしくは感染部位周辺の細胞がこれらエリシターを認識することによって、植物における病原体感染の一次シグナルの認識が成立すると考えられている。その後、病原体感染の二次シグナルを介した情報伝達経路によって感染部位から離れた細胞へと伝えられる【Lusso *et al.*, 1999】。

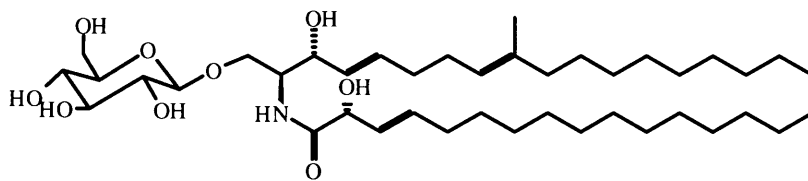
現在、病原体によって引き起こされる植物の自己防御応答機構については、Fig. 1-2で示したようなモデルが提唱されている。細胞膜におけるイオンチャネルの活性化がエリシター処理された多くの植物で観察されており、防御応答にこれが関与すると考えられている。エリシター処理後数分のうちに細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増し、pH が低下する【Mathieu *et al.*, 1991; Ebel *et al.*, 1995】。このときの  $\text{Ca}^{2+}$  はエリシター応答反応においてセカンドメッセンジャーとして下流のシグナル伝達経路へとつながると考えられている【Farmer *et al.*, 1991】。 $\text{Ca}^{2+}$  がプロテインキナーゼの活性化を介して NADPH 酸化酵素系を活性化し、その結果急激な活性酸素の発生が起これると考えられている。



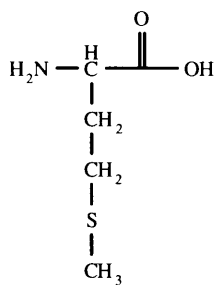
N-acetylchitooctase



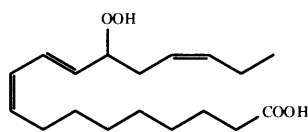
キトサン



セレブロシドB



メチオニン



過酸化脂肪酸



塩化銅

UV

紫外線

Fig.1-1 イネに防御応答を引き起こすエリシター

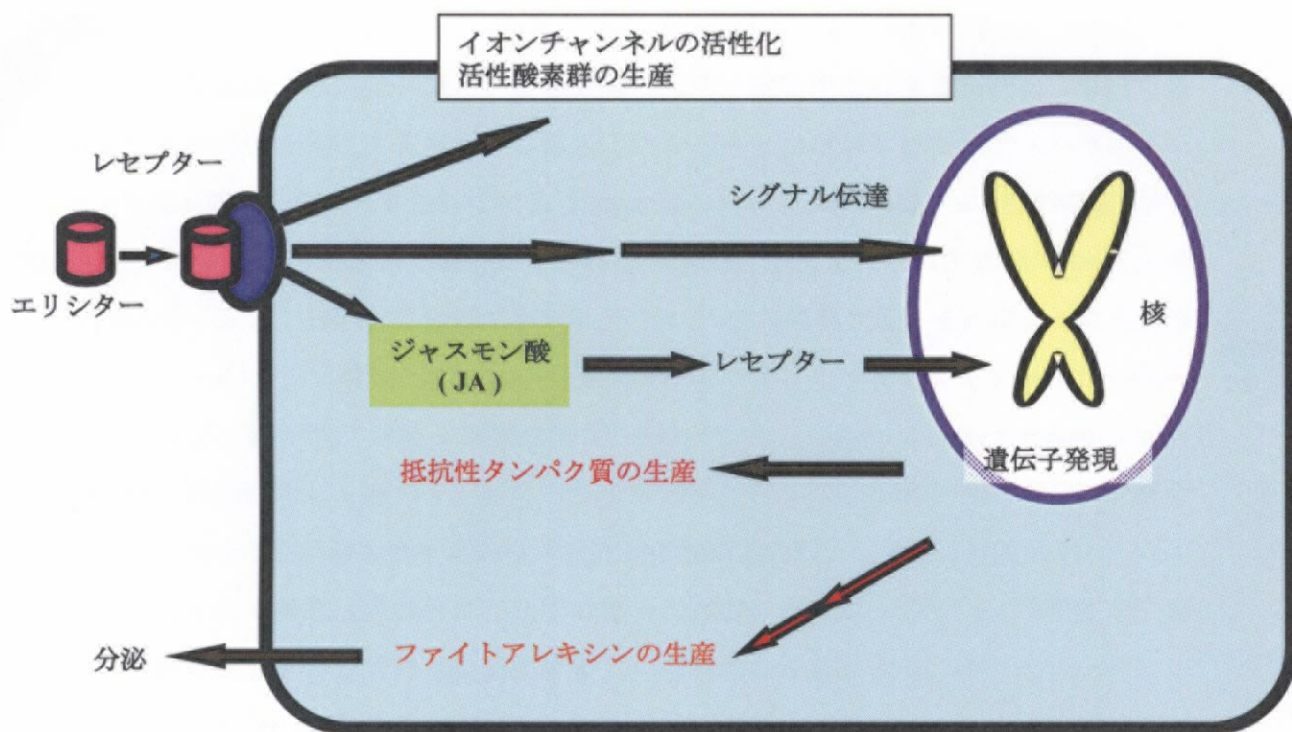


Fig. 1-2 イネにおける防御応答のモデル

このような情報伝達経路を介して oxidative burst と呼ばれる活性酸素群の急激な発生が各組織において観察される【Apostol *et al.*, 1989; Bradley *et al.*, 1992; Mehdy, 1994】。

Oxidative burst は感染に対する誘導抵抗性の初期応答の一つで、これによって生産される活性酸素は病原体にとって有害となる【Legendre *et al.*, 1993; Mehdy, 1994】。また、活性酸素は、細胞壁タンパク質の架橋による、病原体に対する物理的な抵抗性の強化や過敏感細胞死による病原体の封じ込めなどへとつながるセカンドメッセンジャーとしても機能すると考えられている【Degousée *et al.*, 1994; Bradley *et al.*, 1992】。さらにエリシターシグナルは proton-pumping ATPase や三量体 GTP 結合タンパク質【Legendre *et al.*, 1993】を介してホスホリパーゼ C を活性化し、それによって生じるイノシトール-3-リン酸 (IP<sub>3</sub>) によってカルシウムイオンのイオンチャンネルが活性化され、Ca<sup>2+</sup> 依存性プロテインキナーゼ (CDPK) や mitogen activated protein kinase (MAPK) が活性化し、核へとシグナルが伝達する。そして最終的に PR タンパク質やファイトアレキシンの生産を含む様々な防御応答が引き起こされると推定されている。このようにして植物は自然界に存在する膨大な種類の病原菌を認識し、効果的な防御反応を引き起こすことで自己を防衛するような精巧な機構を発達させてきたと考えられている【Boller, 1995; Bell, 1981; Dixon *et al.*, 1994】。

## 1-2 植物の病害応答に関与する転写因子

2000 年、高等植物であるシロイヌナズナのゲノム全塩基配列が決定された【The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000】。その結果、植物は動物や酵母に比べ、転写因子遺伝子の割合がはるかに大きく、総遺伝子の約 6% が転写因子をコードしていることが明らかになった。また、それらのうちの約半数は植物固有のものであった。さらに、植物では、転写因子のほとんどが大きなファミリーを形成していた【Riechmann *et al.*, 2000】。このような、数、構成における植物の転写因子の多様性は、転写因子が植物の遺伝子発現の制御に動物以上に重要な役割を果たしており、植物の機能、つまり発生、分化、環境応答、病傷害応答などの調節に転写レベルの制御が重要な役割を果たしていることを示唆している。しかしながら、これらの転写因子の機能は大多数が未知のままである。現在までに病害応答に関与すると考えられている転写因子ファミリーとして、WRKY ファミリー、TGA ファミリー、Myb ファミリー、ERF ファミリー、ORCA

ファミリーが知られている。以下に、WRKY ファミリーを除く 4 つのファミリーについて概説する。WRKY ファミリーに関しては、次節で詳しく述べる。

### 1-2-1 TGA ファミリー

単子葉、双子葉にわたって多くの植物種から単離されているファミリーで、bZIP ドメインを持ち、bZIP ドメインから C 末端領域にわたって相互に高い相同性を有する。bZIP 領域はさらに二種類の領域に分かれており、塩基性アミノ酸に富む領域が DNA 結合に、ロイシンジッパー領域がホモ、ヘテロ二量体形成に関与していると考えられている。TGA ファミリーはカリフラワーモザイクウィルスの 35 S プロモーター領域に存在する *as-1* (TGACG(T)) と呼ばれる領域に結合するが、この *as-1* は 4 塩基離れて 2 コピー存在している。TGA ファミリーに制御される遺伝子は多くが 35 S プロモーターと同じように *as-1* 様配列が数塩基離れた位置に 2 コピー存在している。

TGA ファミリーの標的遺伝子として、グルタチオン *-S-* トランスフェラーゼ遺伝子 (*GST* 遺伝子) が挙げられる。タバコにおいて *GST* 遺伝子はオーキシシン、サリチル酸、ジャスモン酸、過酸化水素によって誘導されるが、この特異性および発現誘導 kinetics はプロモーター領域に *as-1* 配列を有する他の遺伝子とよく一致することが示されている【Xiang *et al.*, 1996】。TGA ファミリーによって制御を受けることが予想されるその他の遺伝子として、サリチル酸で誘導されるタバコの *PR-1a* 遺伝子が挙げられる。タバコ *PR-1a* 遺伝子のプロモーターに存在する *as-1* 様配列は、実際に TGA1a との結合能をもち、その変異によってサリチル酸およびタバコモザイクウィルス誘導性の著しい減少が認められている【Strompen *et al.*, 1998】。さらに、シロイヌナズナ *PR-1* 遺伝子のプロモーターには TGA ファミリーが結合できる配列 TGACGT が存在しているが、この部位の変異によりイソニコチン酸に対する応答性を失うことが明らかにされている【Lebel *et al.*, 1998】。

### 1-2-2 Myb ファミリー

サリチル酸やファイトアレキシンの合成に関わるフェニルプロパノイド合成経路の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼの遺伝子 (*PAL* 遺伝子) やカルコ

ンシンターゼの遺伝子は、エリシターなどのストレスによる発現応答に関わるシスエレメント、H-box (CCTACC) を共通してもつ【Loake et al., 1992】。H-box 様配列はタバコのトランスポゾン *Tto1* の傷害やサリチル酸応答に関わるシスエレメントにも存在し、ここに特異的に結合するいくつかの Myb 転写因子の遺伝子がクローニングされている【Yang et al., 1996; Sugimoto et al., 2000】。*NtMyb1* 遺伝子の転写産物はタバコモザイクウィルス感染やサリチル酸によって、*NtMyb2* 遺伝子の転写産物は傷害やエリシターによって誘導されると報告されている。*NtMyb1* および *NtMyb2* はともに H-box に結合するが、*NtMyb1* は *PR-1a* 遺伝子プロモーターの-520 近くに存在する GTTTGGT 配列にも結合し、*PR-1a* 遺伝子の発現制御への関与が示唆されている。また、*NtMyb2* を過剰発現させたタバコでは *PAL* 遺伝子の発現が誘導されていることから、H-box を介した Myb 転写因子依存的な転写活性化機構が機能しうることが示唆されている。

### 1-2-3 ERF ファミリー

病原体感染後、過敏反応に伴って増加するホルモン類には、サリチル酸のほかにエチレンとジャスモン酸がある。エチレンやジャスモン酸によって転写が誘導される塩基性キチナーゼ、グルカナーゼなどの塩基性 PR タンパク質遺伝子のプロモーター領域には共通して GCC-box (AGCCGCC) が存在する。タバコにおいてこの GCC-box に特異的に結合する因子としてその遺伝子がクローニングされたのが ERF ファミリーである【Ohme-Takagi and Shinshi, 1995】。ERF ファミリーには高い相同性を持つ約 60 アミノ酸残基からなる共通領域 [ERF ドメイン (または AP2 ドメイン)] が存在し、この領域が GCC-box に特異的な結合能をもつ DNA 結合ドメインであることが示されている【Okamuro et al., 1997】。

ERF ファミリー遺伝子の発現は、エチレンやサリチル酸、傷害ストレス、シクロヘキシミドなど多くのストレスに迅速に応答することが知られている【Suzuki et al., 1998; Fujimoto et al., 2000】。しかし、個々の ERF によってその発現様式は異なっており、エチレン応答性転写制御において異なる役割を果たしていることが示唆される。一方、GCC-box を介した遺伝子発現はシクロヘキシミドによって阻害されることから、GCC-box を介したエチレン応答性転写誘導には新たなタンパク質の合成が必要である

ことが示唆された。

#### 1-2-4 ORCA ファミリー

ファイトアレキシン生産の場合と同様に、アルカロイドなどの二次代謝産物の生産も植物の病原体に対する防御反応に重要な役割を果たしている。ニチニチソウにおいて、ジャスモン酸やエリシターで誘導されるテルペノイドインドールアルカロイド合成系に関与するストリクトシジン合成酵素の遺伝子 (*Str* 遺伝子) において、この活性化に関わるシスエレメントであるエリシター/ジャスモン酸応答配列 (JERE) (ACCGCC) が同定された。また、この配列に特異的に結合する転写因子 ORCA2、ORCA3 がクローニングされ、*Str* 遺伝子の転写は ORCA2、ORCA3 によって正に制御されていることが示されている【Menke *et al.*, 1999; van der Fits *et al.*, 2001】。ORCA は ERF と同様、AP2 ドメインをもつタンパク質で、JERE 中の ACCGCC を含む配列に結合すると考えられている。

#### 1-3 WRKY ファミリー

WRKY ファミリーはエリシター応答遺伝子のエリシター応答配列 (W-box) に特異的に結合する転写因子として同定されたが、エリシター応答はもとより、サリチル酸応答を示す防御関連遺伝子の発現制御に重要な役割を果たす転写因子として、現在最も注目されている転写因子ファミリーのひとつである。WRKY ファミリーは植物特有の転写因子ファミリーで、シロイヌナズナゲノムでは 74 種のメンバーが、イネゲノムでは 90 種以上のメンバーがコードされていることから、高等植物において大きなファミリーを構成しているものと考えられる。

##### 1-3-1 WRKY ファミリーの構造

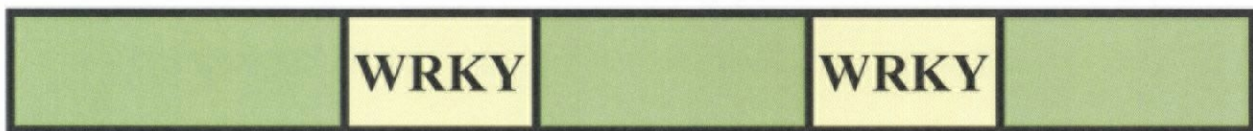
WRKY ファミリーは、WRKY ドメインとして知られる 60 アミノ酸残基からなる保存領域を持つ (Fig. 1-3a)。WRKY ドメインの N 末端側に存在する配列 WRKYGQK は、現在までに同定されている全ての WRKY ファミリーに存在し、WRKY の名もこ

(a)

**WRKYGQK-X<sub>13</sub>-C-X<sub>4-5</sub>-C-X<sub>23</sub>-H-X-H/C**

(b)

グループ I (ダブル WRKY ドメイン)



グループ II (シングル WRKY ドメイン-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型)

グループ III (シングル WRKY ドメイン-C<sub>2</sub>HC 型)

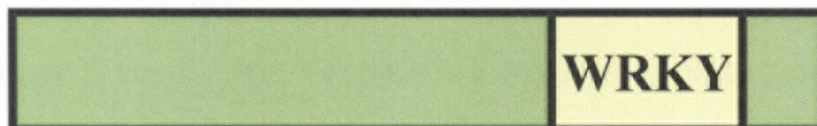


Fig. 1-3 WRKY ファミリーの構造

(a) WRKY ドメインの構造

(b) WRKY ドメインの構造から分類される三つのグループ



こから命名された【Eulgem *et al.*, 2000; Rushton *et al.*, 1996】。WRKY ドメインの C 末端領域には保存されたジンクフィンガーモチーフが存在し、直接の DNA 結合に関わっていると考えられている【Rushton *et al.*, 1995; Eulgem *et al.*, 1999】。WRKY ファミリーは、その構造から三つのグループに大きく分けられている【Eulgem *et al.*, 2000】。グループ I が WRKY ドメインを二つ持つ分子種で、グループ II とグループ III が一つ持つものである。さらに、グループ I とグループ II のジンクフィンガーモチーフが C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型なのに対して、グループ III のものは C<sub>2</sub>HC 型であることで区別される (Fig. 1-3b)。シロイヌナズナではグループ II に属するものが大半を占めている。三つのグループに属するそれぞれのメンバーの W-box TTGAC(C/T) への DNA 結合特異性に大きな違いはなく、パセリの PcWRKY1 やサツマイモの IbSPF1 の DNA 結合能には二つの WRKY ドメインのうち C 末端側ドメインのみで十分であることが示されている【Eulgem *et al.*, 1999; Ishiguro *et al.*, 1994】。また、ある種のメンバーにはロイシンジッパー構造が存在し、タンパク質間の相互作用に関わることが示唆されている。また、パセリの PcWRKY4 と PcWRKY5 に存在するロイシンジッパー領域は、その欠失により転写活性化能が失われることが示されている【Cormack *et al.*, 2002】。

### 1-3-2 WRKY ファミリー遺伝子の発現様式

WRKY ファミリー遺伝子の転写は、傷害、病原菌の感染、非生物的なストレスによって迅速に誘導されることが知られている【Eulgem *et al.*, 2000】。タバコにおいて、タバコモザイクウイルスの感染や、エリシター、サリチル酸、過酸化水素によって、いくつもの WRKY ファミリー遺伝子が誘導される【Chen *et al.*, 2000; Yoda *et al.*, 2002; Takemoto *et al.*, 2003; Vandenabeele *et al.*, 2003】。イネやジャガイモでも同様に発現が誘導される WRKY ファミリーの存在が明らかになっている【Kim *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2003; Beyer *et al.*, 2001; Dellagi *et al.*, 2000】。また、シロイヌナズナにおいては、解析された 72 種の WRKY ファミリーのうち、49 種が病原菌の感染またはサリチル酸によって発現が誘導されることが明らかになっている【Dong *et al.*, 2003】。

WRKY ファミリーはまた、傷害、乾燥、温度ストレスなどの非生物的なストレスや、植物の老化時においても発現が誘導されることが明らかになっている【Huang *et al.*, 2002; Rizhsky *et al.*, 2002; Robatzek *et al.*, 2001; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Chen *et al.*,

2002; Hinderhofer *et al.*, 2001; Robatzek *et al.*, 2002】。

### 1-3-3 防御応答における WRKY ファミリーの役割

病害抵抗性を誘導するためには防御関連遺伝子の発現制御が重要であるが、防御応答における WRKY ファミリーの直接的な関与はあまり知られていない【Nimchuk *et al.*, 2003】。最近、防御応答に関与する MAP キナーゼのシグナルカスケードにおいて、WRKY ファミリーが関与していることが明らかになった【Wan *et al.*, 2004; Asai *et al.*, 2002】。シロイヌナズナの 2 種の WRKY 型転写因子 (AtWRKY22, AtWRKY29) が、病原細菌および病原糸状菌に対する抵抗性を賦与する MAP キナーゼカスケードの重要な下流因子であることが同定されている (Fig. 1-4)。タバコにおいて、タバコモザイクウイルスに対する抵抗性反応は、抵抗性遺伝子である *N* 遺伝子産物を介して引き起こされるが【Whiteham *et al.*, 1994】、MAPK キナーゼ (*NtMEK1*)、MAP キナーゼ (*NtNTF6*) または 3 種の WRKY ファミリー (*NtWRKY1*, *NtWRKY2*, *NtWRKY3*) 遺伝子の発現を抑制することで *N* 遺伝子産物を介した抵抗性反応が抑制された。これは、WRKY 型転写因子がこの経路において重要な役割を果たしていることを示している (Fig. 1-5)【Liu *et al.*, 2004】。さらに、タバコの MAPK キナーゼである *NtMEK2* およびサリチル酸応答性 MAP キナーゼである SIPK が関与するシグナルカスケードにおいても、WRKY ファミリー遺伝子と防御関連遺伝子の発現誘導が観察されている (Fig. 1-5)【Kim *et al.*, 2004】。このような防御応答に関わる MAP キナーゼシグナルカスケードへの WRKY ファミリーの関与は、パセリにおいても認められている【Kroj *et al.*, 2003】。

最近、シロイヌナズナの AtWRKY70 がサリチル酸依存性およびジャスモン酸依存性の防御シグナル経路のクロストークを制御していることが明らかになった【Li *et al.*, 2004】。AtWRKY70 の過剰発現は病原菌に対する抵抗性を増加させ、サリチル酸応答性遺伝子の恒常的発現を引き起こす。また、サリチル酸依存性防御応答の重要な制御因子である NONEXPRESSOR OF *PR1* (*NPRI*) の発現も WRKY 型転写因子によって制御されていると考えられている【Yu *et al.*, 2001】。

また、立ち枯れ病菌 *Ralstonia solanacearum* に対する抵抗性遺伝子として RESISTANCE TO RALSTONIA SOLANACEARUM1 (*RRS1*) がシロイヌナズナにおいてクロ

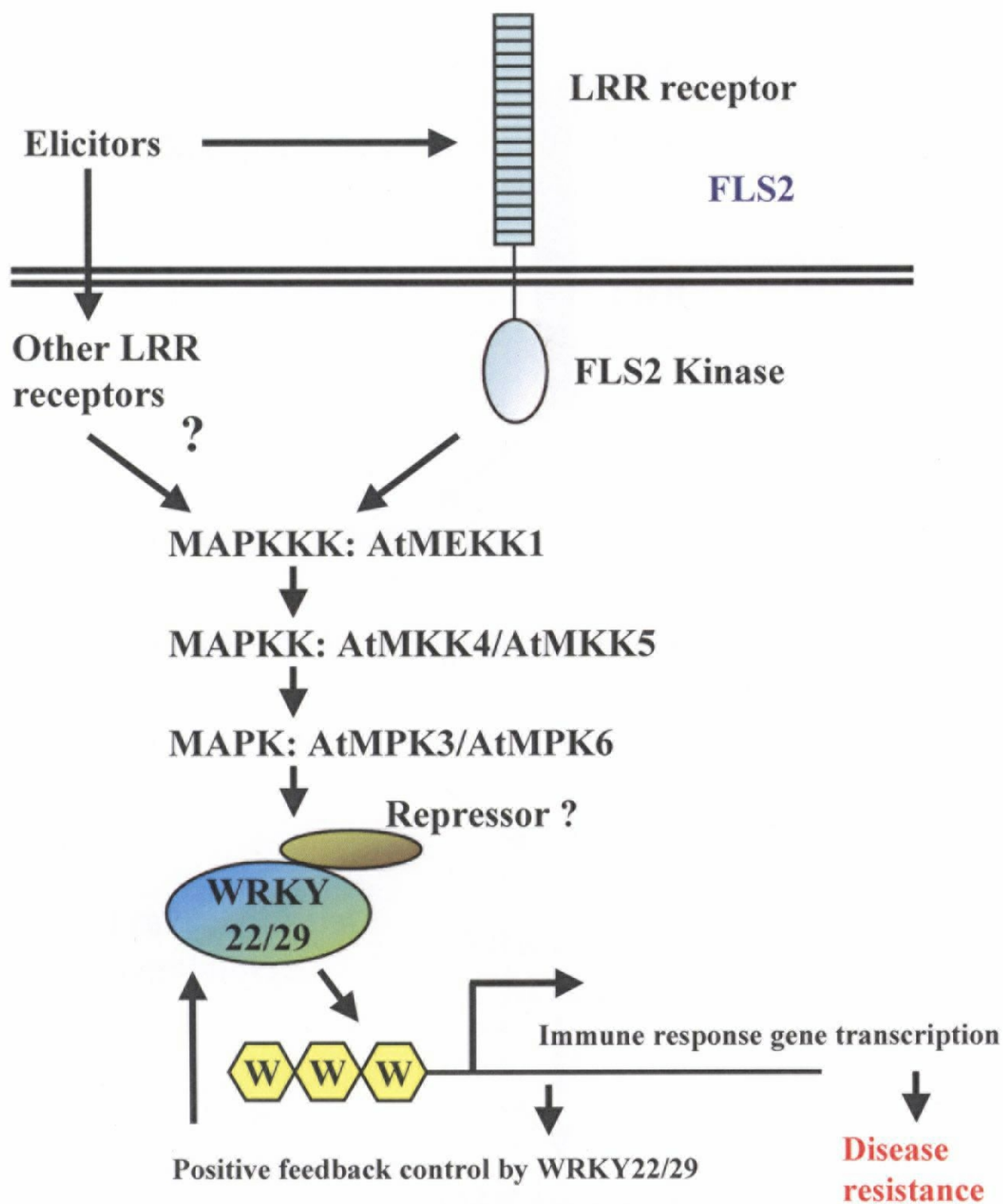


Fig. 1-4 シロイヌナズナの防御応答におけるシグナル伝達モデル

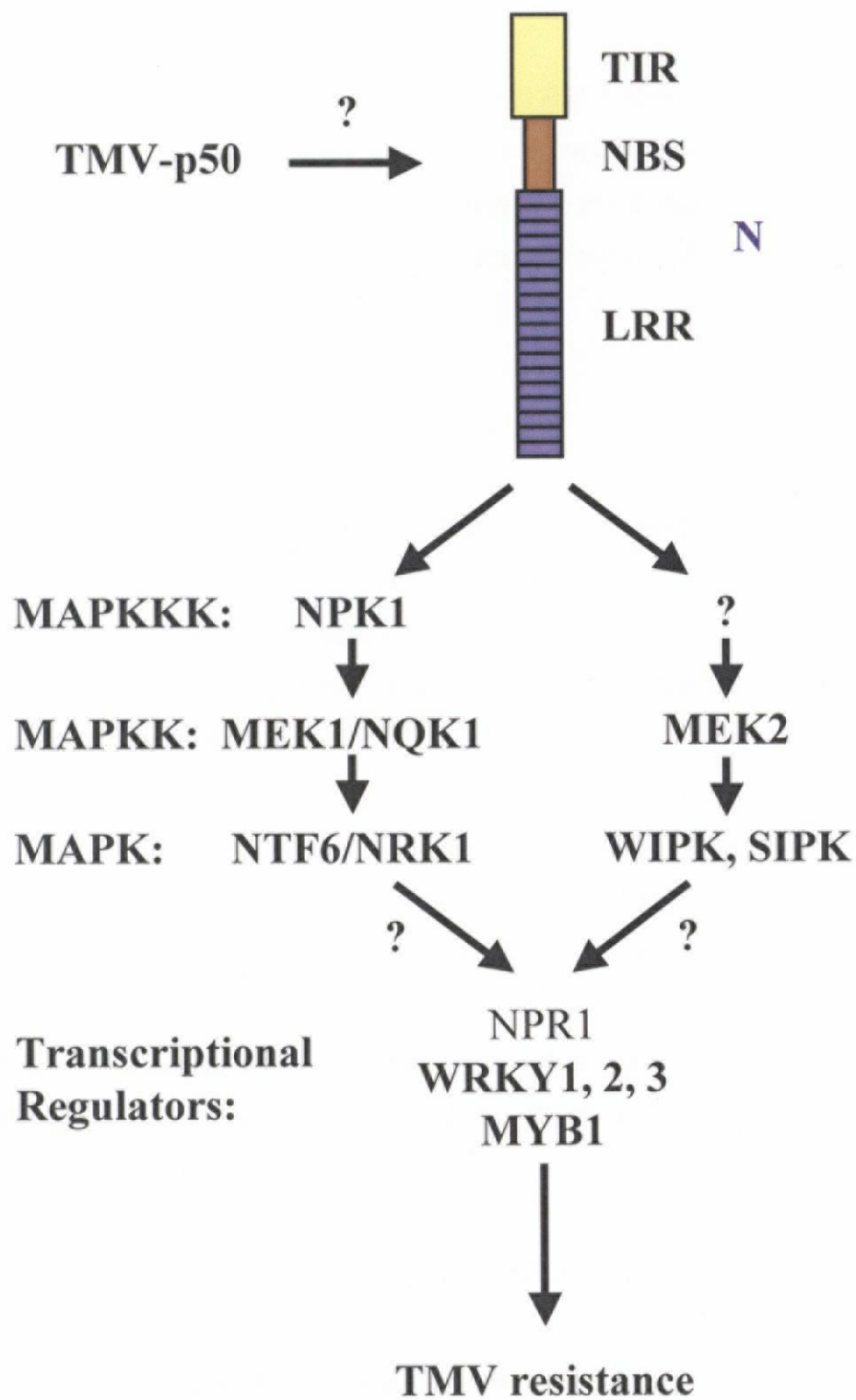


Fig. 1-5 タバコの防御応答におけるシグナル伝達モデル

一ニングされているが、この遺伝子は多くの抵抗性遺伝子産物において保存されている TIR-NBS-LRR モチーフ【Nimchuk *et al.*, 2003】と WRKY ドメインが一体となった構造を有している【Deslandes *et al.*, 2002】。RRS1/AtWRKY52 は、対応する avirulence 遺伝子産物である PopP2 と相互作用し、ともに植物細胞の核に局在することが確認されている【Deslandes *et al.*, 2003】。

#### 1-3-4 WRKY ファミリーの標的遺伝子

WRKY 型転写因子の下流の標的遺伝子を同定することが WRKY ファミリーの機能を理解する上で重要である。現在までに、主に WRKY ファミリーの遺伝子を植物体内で過剰発現させることで下流の遺伝子をスクリーニングする方法が採られている。パセリにおいて、プロトプラスト内で *PcWRKY1* を一過的に過剰発現させることでパセリの *PATHOGENESIS-RELATED 1-1 (PcPRI-1)*、*PcWRKY1* および *PcWRKY3* のプロモーター下流につないだレポーター遺伝子の発現が活性化されることが明らかになっている【Eulgem *et al.*, 1999】。シロイヌナズナにおいても、葉肉細胞由来のプロトプラストにおいて *AtWRKY29* および *AtWRKY22* を一過的に過剰発現させると、それら自身のプロモーターおよび受容体型キナーゼである *FRK1/SIRK1* 遺伝子のプロモーターを活性化するとともに、*GLUTATHION S-TRANSFERASE6 (GST6)* のプロモーターを不活性化することが明らかになっている【Asai *et al.*, 2002】。また、*AtWRKY6* を過剰発現させた植物体を用いた cDNA-AFLP 解析により、*FRK1/SIRK1* が標的遺伝子であることが明らかになっている【Robatzek *et al.*, 2002】。

### 1-4 イネにおけるファイトアレキシン生合成への WRKY ファミリーの関与

#### 1-4-1 イネにおけるゲテルペン型ファイトアレキシン

ファイトアレキシンは病原体の感染により、植物が誘導的に合成する低分子の抗菌性二次代謝産物の総称で、生体防御系の一環をなすと考えられている。ファイトアレキシンの生合成はまた、非生物的要因、たとえば UV 照射や重金属イオンによっても促進されることが明らかになっている。ファイトアレキシンは通常分子量 1000 以下

の低分子であり、その分類は分子構造によりフラボノイド系、テルペン系などに分類される。

イネにおいては今までに 15 種類のファイトアレキシンが単離、同定されている。そのうち 14 種が環状ジテルペン型のファイトアレキシンである。これらジテルペン型のファイトアレキシンはイモチ病菌 (*Magnaporthe grisea*) 感染もしくは UV 照射した葉から単離、同定されている。イネにおけるジテルペン型のファイトアレキシンは、その分子骨格から、*ent-cassa-12, 15-diene* 骨格を有する *phytocassanes* A-E、*ent-sandaracopimaradiene* 骨格を有する *oryzalexins* A-F、*syn-pimara-7,15-diene* 骨格を有する *momilactones* A, B、*stemar-13-ene* 骨格を有する *oryzalexin* S という 4 つのタイプに分類されている (Fig. 1-6)。

#### 1-4-2 ファイトアレキシン生合成への WRKY ファミリーの関与の可能性

ジテルペン型のファイトアレキシンの生合成はジベレリンと類似した反応によって生合成されることが予想されていた。イネのジテルペン型ファイトアレキシンの推定生合成経路を Fig. 1-7 に示す。現在までに、我々のグループによって *ent-cassa-12,15-diene synthase* である *OsDTC1*、および *stemar-13-ene synthase* である *OsDTC2* が単離されている【Cho *et al.*, 2004; Nemoto *et al.*, 2004】。また、共同研究先である山形大学のグループによって、*ent*-CDP synthase である *OsCyc2*、*syn*-CDP synthase である *OsCyc1* が単離されており、*OsCyc2* はジベレリン生合成における *ent*-CDP synthase のアイソザイムであるが、*OsCyc2* はジベレリン生合成に関与していないことが示されている【Otomo *et al.*, 2004a】。さらに、同グループによって、*syn-pimara-7,15-diene synthase* である *OsKS4*、および *ent-sandaracopimaradiene synthase* である *OsKS10* が最近単離された【Otomo *et al.*, 2004b】。

これらの遺伝子のうち、当研究室で単離・同定された *OsDTC1*、*OsDTC2* の 5' 上流域には、WRKY ファミリーの結合配列である W-box がタンデムに複数存在していた (Fig. 1-8)。これらの遺伝子はエリシター応答性遺伝子であり、その発現制御にエリシターによって誘導される WRKY ファミリーの関与が示唆された。*OsDTC2* に関しては、実際にそのエリシター応答に W-box が関与していることがレポータージーンアッセイを用いた解析により明らかになっている【根本, 私信】。

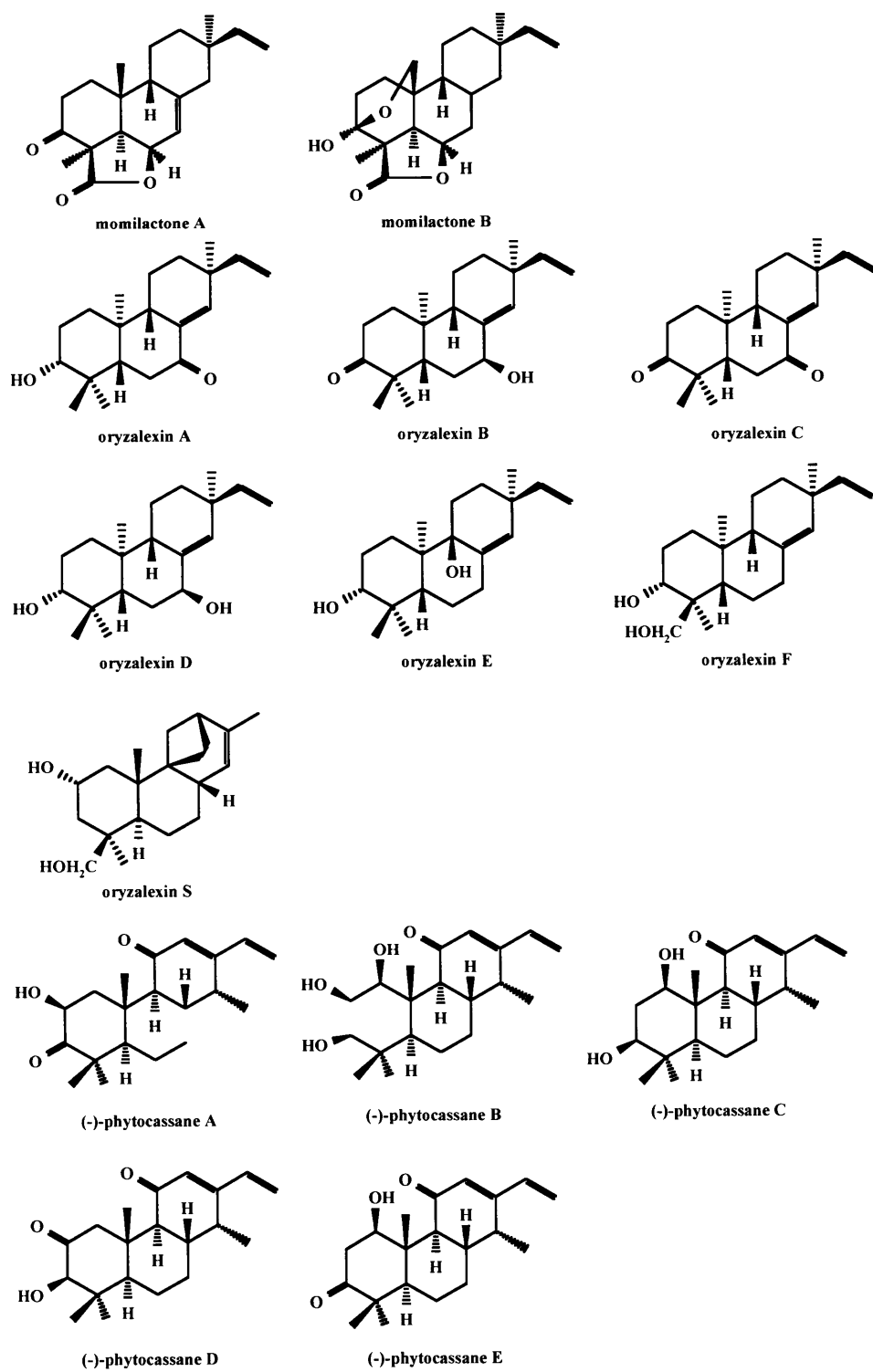


Fig. 1-6 イネのジテルペン型ファイトアレキシン

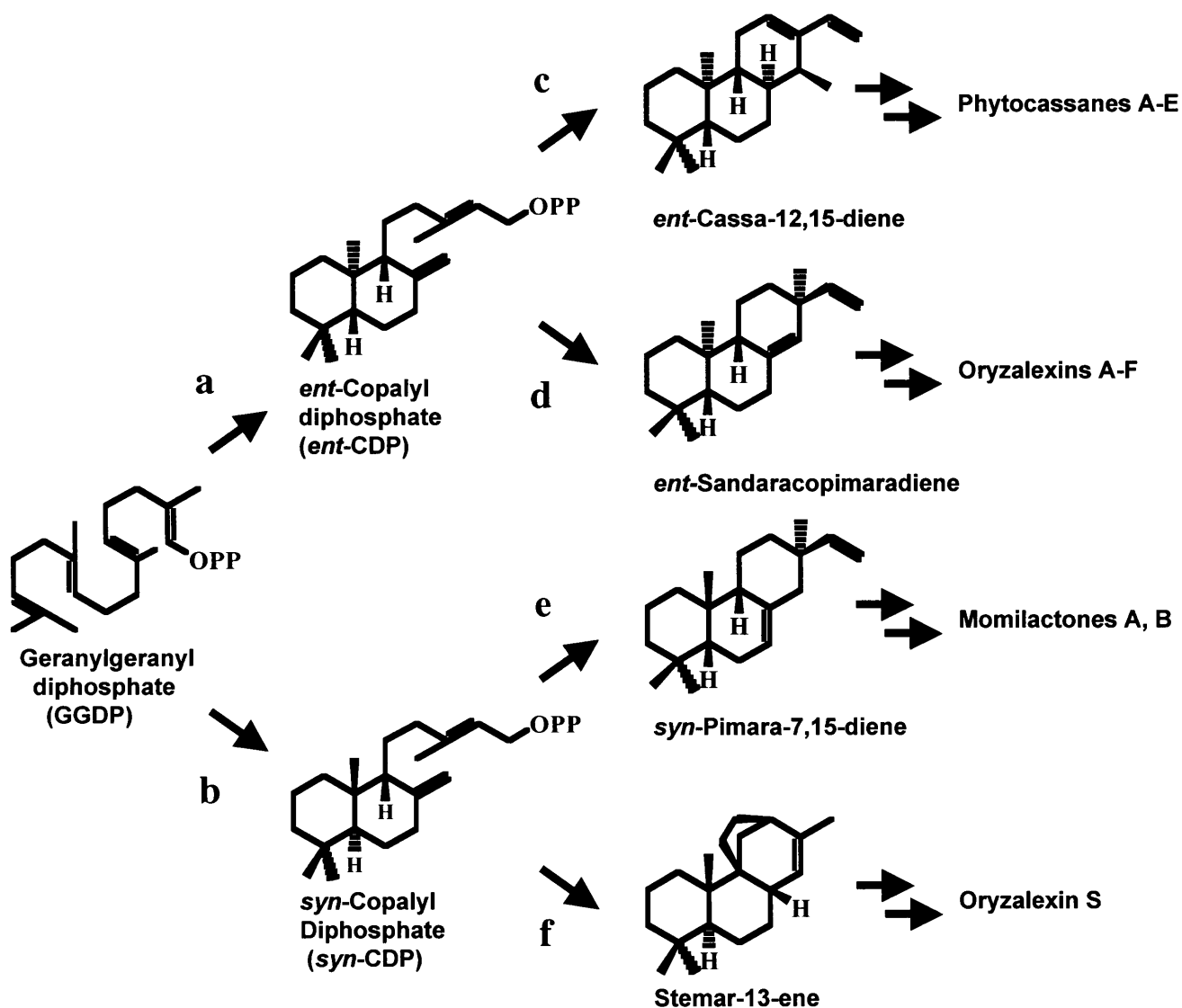


Fig. 1-7 イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成経路

a : OsCyc2 (*ent*-CDP synthase)

b : OsCyc1 (*syn*-CDP synthase)

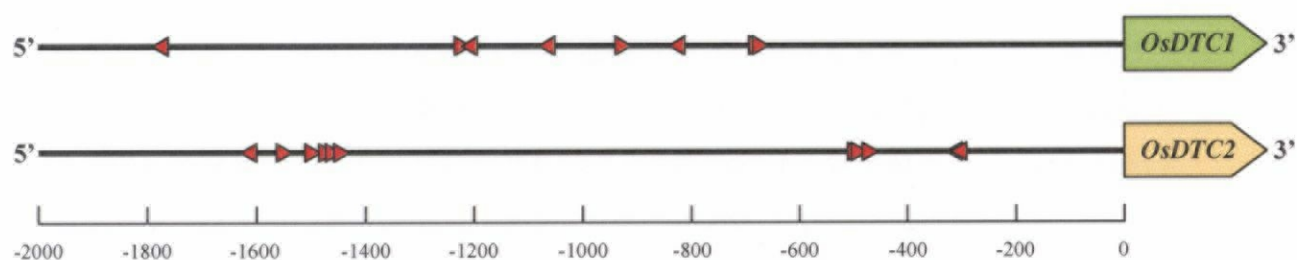
c : OsDTC1 (*ent*-cassa-12,15-diene synthase)

d : OsKS10 (*ent*-sandaracopimaradiene synthase)

e : OsKS4 (*syn*-pimara-7,15-diene synthase)

f : OsDTC2 (stemar-13-ene synthase)





Gene	No. of W-boxes	Position from Transcription Start Site
<i>OsDTC1</i>	8	-688(+), -694(+), -843(-), -942(+), -1082(-), -1224(-), -1237(+), -1797(-)
<i>OsDTC2</i>	11	-322(-), -331(-), -485(+), -504(+), -513(+), -1461(+), -1475(+), -1487(+), -1514(+), -1565(+), -1632(-)

Fig. 1-8 *OsDTC1*, *OsDTC2* の 5' 上流域に存在する W-box  
(矢印は W-box を表す)

一方、キチンエリシター処理後 2 時間のイネ培養細胞由来の cDNA を用いたマイクロアレイ解析の結果、キチンエリシターによって発現が誘導される WRKY ファミリーが少なくとも 2 種類存在することが明らかになった【Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003】。これらのことを考え併せると、イネにおいてもエリシター誘導の抵抗性反応のシグナル伝達経路において、WRKY ファミリーが重要な役割を果たしていることが予想される。

以上のような背景から、本研究ではイネにおけるエリシター誘導のシグナル伝達経路の解明研究の一環として、マイクロアレイによってスクリーニングされたイネの 2 種類のキチンエリシター応答性 WRKY 型転写因子の機能を解析することを目的とした。イネにおいて WRKY 型転写因子の生物学的な役割はほとんど報告されていない。イネ以外の植物において、これまで報告されている防御応答に関わる WRKY 型転写因子の多くがエリシターによって誘導されることから、これらのイネのエリシター応答性 WRKY 型転写因子もイネの防御応答に関わっている可能性が高いと考えられ、その生物学的機能に非常に興味を持たれる。まず、これら 2 種の WRKY 型転写因子の cDNA を単離し、そのエリシターに対する発現 kinetics および病原菌接種に対する発現 kinetics を解析するとともに、核内局在性、W-box への特異的結合能を解析した（第 2 章）。また、各 WRKY 型転写因子の過剰発現株を作製し、マイクロアレイ解析によってそれぞれの WRKY 型転写因子の標的遺伝子のスクリーニングを行った（第 3 章、第 4 章）。

## 第2章

### エリシター応答性 WRKY 型転写因子 OsWRKY53・OsWRKY71 の単離

#### 2-1 緒言

序論で述べたように、イネ *O. sativa* L. cv. Nipponbare において、キチンエリシター応答性の WRKY 型転写因子が少なくとも2種類存在していることが EST を用いたマイクロアレイ解析によって明らかになった。イネにおけるエリシター応答性の WRKY 型転写因子の単離、機能解析はこれまで報告されておらず、その生物学的機能に非常に興味を持たれる。本章では、これら2種類のエリシター応答性 WRKY 型転写因子の cDNA を単離し、イネ液体培養細胞における各種エリシターに対する応答性を解析した。また、イネ植物体におけるイモチ病菌接種に対する応答性を同様に解析した。さらに、得られた2種類の WRKY 型転写因子の核局在性、W-box 結合能についても調べることにした。

一方、我々の研究グループは、イネ液体培養細胞におけるエリシター誘導のファイトアレキシン生産において、エリシター刺激のシグナルトランスデューサーとしてジャスモン酸が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。そこで、これらの WRKY 型転写因子のジャスモン酸応答性についても調べることにした。

## 2-2 材料および方法

### 2-2-1 生物試料および培養条件

イネ培養細胞として *O. sativa* L. cv. Nipponbare の胚由来の培養細胞を用いた。培養細胞は 1 mg/ml の 2,4-D を含む N6 培地 (Appendix 参照) において、25℃、80 rpm、暗所で懸濁培養した。イネ液体培養細胞の継代方法については、大槻の方法に準じて行った【大槻、1990】。液体培養したイネ培養細胞を 2 週間おきに 20 メッシュの金網で裏ごしし、細胞塊内部の新しい細胞約 1 ml を 300 ml 三角フラスコ中の 2,4-D を含む N6 培地 60 ml に植え継いだ。本論文の実験には、特記しない限り裏ごし後 4 日目の細胞を用いた。

イネ植物体として *O. sativa* L. cv. Nipponbare を用いた。イネ植物体は室温 25℃、湿度 60%の温室内で生育させた 4 葉期の植物体を実験の実験に使用した。

イモチ病 *Magnaporthe grisea* (Race 007) は、オートミール培地上で培養し、孢子形成させた。イモチ病菌のイネ植物体への接種は、イモチ病菌プレート 1 枚あたり、8 ml の滅菌水 (0.4 % Tween20) を加えて孢子懸濁液を調製し、接種箱において噴霧接種法によって接種を行った。噴霧接種後、イネ植物体は接種箱内において、25℃、湿度 100%、暗所の状態で静置した。

*Escherichia coli* DH5  $\alpha$  株は 2×YT または LB 培地にて 37℃にて培養した (Sambrook and Russell, 2001)。大腸菌の培養に際して培地には ampicillin (Ap; 200  $\mu$ g/ml)、carbenicillin (Cb; 100  $\mu$ g/ml)、kanamycin (Km; 50  $\mu$ g/ml)、hygromycin (Hm; 50  $\mu$ g/ml)、chloramphenicol (Cm; 34  $\mu$ g/ml)、glucose (10 mM) を必要に応じて添加した。また平板培地には寒天を培地に対して 1.5% (w/v) となるように加えた。

### 2-2-1 エリシター処理およびジャスモン酸処理

キチンエリシター (*N*-acetylchitooctase) は、明治大学・渋谷直人教授より入手した。キチンエリシター stock solution は、水を用い、250 ppm となるように調製した後、濾過滅菌を行った。スフィンゴリピドエリシター (cerebroside B) は明治製菓より 2 mg/ml のエタノール溶液として入手した。キチンエリシターは終濃度 1 ppm、スフィンゴリ

ピドエリシターは終濃度 10 ppm となるようにイネの液体培地に加えた。

ジャスモン酸は SIGMA 社より入手した。ジャスモン酸の stock solution は、メタノールを用い、 $10^{-1}$  M となるように調製した。ジャスモン酸は終濃度  $10^{-4}$  M となるようにイネの液体培地に加えた。

### 2-2-1 DNA の取り扱い

プラスミドはアルカリ SDS 法により *E. coli* から抽出した。DNA 断片は QIAEX® II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてアガロースゲルより精製した。その他の DNA 操作法は成書に従った【Sambrook and Russell, 2001】。

### 2-2-4 イネからの total DNA の抽出

イネからの total DNA の抽出は、クローニングとシーケンス【杉山, 1989】のプロトコールに従って行った。

### 2-2-5 イネからの total RNA の抽出

イネ液体培養細胞及びイネ植物体からの total RNA 抽出は、セパゾール RNA I Super (ナカライテスク) を用いてプロトコールに従って行った。また、RNA を溶かすための水は、RNA secure (Ambion®) を用いてプロトコールに従って RNase を失活させたものを使用した。得られた RNA 溶液は、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

### 2-2-6 逆転写反応

RQ1 RNase-Free DNase (Promega) を用い、プロトコールに従って total RNA 溶液に含まれる DNA を分解した。次に、1  $\mu\text{g}$  の total RNA、1  $\mu\text{l}$  の Oligo (dT)<sub>20</sub> primer (5  $\mu\text{M}$ )、1  $\mu\text{l}$  の 10 mM dNTP mix を含む 13 ml の混合液を  $65^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートした後、氷上で 1 分間静置した。その後、4  $\mu\text{l}$  の 5×First-Strand Buffer、1  $\mu\text{l}$  の 0.1 M dithiothreitol、1  $\mu\text{l}$  (40 U) の RNase OUT、1  $\mu\text{l}$  (200 U) の SuperScript™ III Reverse

Transcriptase (Invitrogen Corp. Carlsbad, Calif.) を加え、55°Cで 60 分間逆転写反応を行った後、70°Cで 15 分間インキュベートして酵素を失活させた。最後に、1  $\mu$ l (2 U) の RNaseH (Invitrogen Corp. Carlsbad, Calif.) を加え、37°Cで 20 分間インキュベートした。

#### 2-2-7 各 WRKY 型転写因子の cDNA の単離

Table 2-2 に示すプライマー (OsWRKY53: OsWRKY53 cDNA-F, OsWRKY53 cDNA-R; OsWRKY71: OsWRKY71 cDNA-F, OsWRKY71 cDNA-R) と、テンプレートとしてキチンエリシター処理後 1 時間のイネ液体培養細胞から調製した cDNA を用いて、PCR を行った。各 PCR 産物をそれぞれ pT7Blue T-Vector (Novagen) にクローニングし、pTOsWRKY53、pTOsWRKY71 を作製した。その後、挿入断片の塩基配列を確認した。

#### 2-2-8 ノーザン解析

Total RNA の変性および電気泳動は、ホルムアルデヒドを用いた方法に従って行った【Sambrook and Russell, 2001】。Total RNA は 1 サンプルあたり 10  $\mu$ g 使用した。電気泳動終了後、核酸をバイオダイン B ナイロンメンブレン (Pall BioSupport, Pensacola, FL) にキャピラリートランスファーした。

プローブとして、Table 2-2 に示すプライマー (OsWRKY53 probe: OsWRKY53 N-probe-F, OsWRKY53 cDNA-R; OsWRKY71 probe: OsWRKY71 N-probe-F, OsWRKY71 cDNA-R) と、pTOsWRKY53、または pTOsWRKY71 をテンプレートとして、PCR によって増幅したそれぞれの遺伝子の 3'-UTR を含む DNA 断片を使用した。プローブは Megaprime™ DNA labeling systems (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) を用い、<sup>32</sup>P で標識した。

ハイブリダイゼーションは Rapid-Hybri buffer (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) を用い、プロトコールに従って行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを 2×SSC (0.1% SDS) を用いて室温で 20 分洗浄した後、1×SSC (0.1% SDS) および、0.1×SSC (0.1% SDS) を用いてそれぞれ 65°Cで 15 分洗浄した。メンブレンを風乾させたのち、イメージングプレート BAS-MS (富士フイルム) に一晩露光した。解析にはバイオイメージングアナライザー FLA-3000 (富士フイルム) を用いた。

### 2-2-9 OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性解析用プラスミドの構築

Table 2-2 に示すプライマー (OsWRKY53: OsWRKY53 pENTR-F, OsWRKY53 pENTR-R; OsWRKY71: OsWRKY71 pENTR-F, OsWRKY71 pENTR-R) と、テンプレートとして pTOsWRKY53、または pTOsWRKY71 を用いて、PCR を行った。各 PCR 産物を pENTR D-TOPO (Invitrogen) にプロトコールに従ってクローニングし、pENOsWRKY53、pENOsWRKY71 を得た。挿入断片の塩基配列を確認した後、LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) のプロトコールに従って、pENOsWRKY53、pENOsWRKY71 内の挿入断片を LR 反応によって pGWB5 に移し替え、pG5OsWRKY53、pG5OsWRKY71 を得た。最後に、pG5OsWRKY53、pG5OsWRKY71 の *Hind*III-*Sac*I 断片を pSN221 の適切なクローニングサイトに挿入し、pSNOsWRKY53、pSNOsWRKY71 を作製した。

### 2-2-10 タマネギ表皮細胞を用いた核局在性の解析

タマネギ表皮細胞への pSNOsWRKY53、pSNOsWRKY71 の導入は、パーティクルガンを用い、Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (BIO-RAD) のプロトコールに従って行った。1 サンプルあたり  $\phi = 1.6$  mm の金粒子 3 mg、66.7 mM スペルミジン、100 mM  $\text{CaCl}_2$  を含む溶液に pSNOsWRKY53、pSNOsWRKY71 を 10  $\mu\text{g}$  加え、最終的に 125  $\mu\text{l}$  とした。これらをよく攪拌した後数分間静置し、22,000 g で 20 秒間遠心し、金粒子を回収した。この金粒子を 70% エタノール 50  $\mu\text{l}$  で滅菌し、同様に遠心して回収した。この金粒子を 99.5% エタノールに懸濁し、サンプル液とし、全量をマクロキャリアーに載せ、MS プレート上のタマネギ表皮細胞に撃ち込んだ。撃ち込みの圧力は 1100 p.s.i. で行った。撃ち込み後、タマネギ表皮細胞をのせたプレートを 22°C、暗所で 24 時間インキュベーションし、PROVIS AX (OLYMPUS®, Tokyo) を用いて GFP の蛍光を観察した。また、対照区 (ポジティブコントロール) として、pTH121 (Table 2-1) を使用した。

**Table 2-1 本章で使したプラスミド**

Plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
pBluescript II KS(-)	Ap <sup>r</sup> <i>lacZ</i>	Stratagene
pBKOswRKY53	Ap <sup>r</sup> pBluescript II KS(-) containing OsWRKY53 cDNA	This study
pBKOswRKY71	Ap <sup>r</sup> pBluescript II KS(-) containing OsWRKY71 cDNA	This study
pENTR D-TOPO	Km <sup>r</sup> Gateway system entry vector	Invitrogen
pENOsWRKY53	Km <sup>r</sup> pENTR D-TOPO containing OsWRKY53 ORF	This study
pENOsWRKY71	Km <sup>r</sup> pENTR D-TOPO containing OsWRKY71 ORF	This study
pET-32b(+)	Ap <sup>r</sup> T7promoter <i>lacI</i>	Novagen
pEOswRKY53	Ap <sup>r</sup> pET-32b(+) containing OsWRKY53 ORF	This study
pGWB6	Km <sup>r</sup> Hm <sup>r</sup> CaMV35S promoter GFP Gateway system destination vector	Nakagawa <i>et al.</i> , unpublished data
pG6OsWRKY53	Km <sup>r</sup> Hm <sup>r</sup> pGWB6 containing OsWRKY53 ORF	This study
pG6OsWRKY71	Km <sup>r</sup> Hm <sup>r</sup> pGWB6 containing OsWRKY71 ORF	This study
pMAL-c2X	Ap <sup>r</sup> Tac promoter	New England BioLabs®
pMOswRKY71	Ap <sup>r</sup> pMAL-c2X containing OsWRKY71 ORF	This study
pSN221	Ap <sup>r</sup> pUC19 containing CaMV35S promoter	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
pSNOswRKY53	Ap <sup>r</sup> pSN221 containing OsWRKY53 ORF fused with GFP	This study
pSNOswRKY71	Ap <sup>r</sup> pSN221 containing OsWRKY71 ORF fused with GFP	This study
pT7Blue T-vector	Ap <sup>r</sup> T-vector	Novagen
pTOswRKY53	Ap <sup>r</sup> pT7Blue T-vector containing OsWRKY53 ORF	This study
pTOswRKY71	Ap <sup>r</sup> pT7Blue T-vector containing OsWRKY71 ORF	This study
pTPdte2	Ap <sup>r</sup> pT7Blue T-vector containing 320-bp region from OsDTC2 transcription start point amplified with primer set Pdtc2-F and Pdtc2-R	This study
pTmPDTC2	Ap <sup>r</sup> pT7Blue T-vector containing 60-bp PCR-amplified fragment with primer set Pdtc2-F and Pdtc2-R and mPdtc2	This study
pTH121	Ap <sup>r</sup> CaMV35S promoter GFP	Zhu <i>et al.</i> , 1997



Table 2-2 本章で使したプライマー

Primer	Sequence
OsWRKY53 cDNA-F	5'-GTCGTCTCGTTCTCGTCTCCGATCACTCTC-3'
OsWRKY53 cDNA-R	5'-GAAAAATTCATCAGTCTTATTTGACCTGTC-3'
OsWRKY71 cDNA-F	5'-CTCCTTGGCTCAGCTTGACATCGTCGGAG-3'
OsWRKY71 cDNA-R	5'-GTTCGGGACCGAAGCAAATTTG-3'
OsWRKY53 N-probe-F	5'-GGTGCGGAAGCACGTGGAGCGGGCGTC-3'
OsWRKY71 N-probe-F	5'-GCGTGACCCAAGCTTCAAGGC-3'
OsWRKY53 pENTR-F	5'-CACCATGGCGTCCTCGACGGGGGGTTG-3'
OsWRKY53 pENTR-R	5'-CTAGCAGAGGAGCGACTCGACGAAC-3'
OsWRKY71 pENTR-F	5'-CACCATGGATCCGTGGATTAGCAC-3'
OsWRKY71 pENTR-R	5'-TCAATCCTTGGTCGGCGAGAGCTC-3'
OsWRKY53 pET32b-F	5'-AGAG <u>GATATC</u> GATGGCGTCCTCGACGGGGGGTTG-3'
OsWRKY53 pET32b-R	5'-AGAG <u>GCGGCCGC</u> GCAGAGGAGCGACTCGACGAAC-3'
OsWRKY71 pMALc2X-F	5'-AGAG <u>GAATTC</u> ATGGATCCGTGGATTAGCAC-3'
OsWRKY71 pMALc2X-R	5'-AGAG <u>GTCGAC</u> TCAATCCTTGGTCGGCGAG-3'
Pdte2-F	5'-CGAATGATAAAACATGTGCT-3'
Pdte2-R	5'-ACTCCCTCCGTTTCTAAATATTC-3'
mPdte2	5'-CGAATGATAAAACATGTGCTAAAAATAGGA CGGTTAGGAATATTTAGAAACGGAGGGAGT-3'

\*付加した制限酵素サイトは、下線で示した。

### 2-2-11 OsWRKY53 発現用プラスミドの構築

Table 2-2 に示すプライマー (OsWRKY53 pET32b-F, OsWRKY53 pET32b-R) と、テンプレートとして pTOsWRKY53 を用いて、PCR を行った。PCR 産物を *EcoR* V 及び *EcoR* I で切断し、pBluescript II KS (-) (Stratagene) の適切なクローニングサイトに挿入し、pKSOsWRKY53 を作製した。挿入断片の塩基配列を確認した後、pKSOsWRKY53 の *EcoR* V -*EcoR* I 断片を pET-32b(+) の適切なクローニングサイトに挿入し、pEOsWRKY53 を作製した。

### 2-2-12 N-Trx-OsWRKY53 の発現、精製

*E. coli* Rosetta(DE3) 株 (Invitrogen) を pEOsWRKY53 により形質転換し、形質転換体を LB 培地にて一晩前培養した。前培養液 200  $\mu$ l を 10 ml の同培地に植菌した後、20°Cにて 12 時間培養した。ネガティブコントロールには pET-32b(+) を用いた。培養終了後、培養液を遠心 (3,300  $\times$  g, 5 min, 4°C) により集菌し、500  $\mu$ l の 1  $\times$  Wash buffer (BIO-NOBILE, Turku, Finland) に懸濁した。Sonifer 250D (Branson) により超音波破碎した後、遠心 (21,600  $\times$  g, 15 min, 4°C) により粗酵素抽出液を得た。得られた粗酵素抽出液から QuickPick™ IMAC (BIO-NOBILE, Turku, Finland) を用いて、N-Trx-OsWRKY53 の粗精製を行った。pET-32b(+) は、N 末端に Trx-tag だけでなく、His<sub>6</sub>-tag も挿入されているため、His<sub>6</sub>-tag を用いたアフィニティー精製を行うことができる。粗酵素抽出液および精製タンパク質溶液のタンパク質濃度はプロテインアッセイキット (Bio-Rad Lab.) を用いて、bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質としてスタンダードアッセイ法により測定した。発現、精製度合いを確認するため、粗酵素抽出液および精製タンパク質溶液に SDS-PAGE sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 mM EDTA, 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 8% glycerol, 0.025% bromophenol blue] を等量加え、それぞれタンパク質 5  $\mu$ g 相当を含むサンプルを煮沸処理後 12% SDS polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE に供した。タンパク質バンドの検出は、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) を用いて、プロトコールに従って行った。

### 2-2-13 OsWRKY71 発現用プラスミドの構築

Table 2-2 に示すプライマー (OsWRKY71 pMALc2X-F, OsWRKY71 pMALc2X-R) と、テンプレートとして pTOsWRKY71 を用いて、PCR を行った。PCR 産物を *EcoR* I 及び *Sal* I で切断し、pBluescript II KS (-) (Stratagene) の適切なクローニングサイトに挿入し、pKSOsWRKY71 を作製した。挿入断片の塩基配列を確認した後、pKSOsWRKY71 の *EcoR* I -*Sal* I 断片を pMAL-c2X (New England Biolabs) の適切なクローニングサイトに挿入し、pMOsWRKY71 を作製した。

### 2-2-14 N-MBP-OsWRKY71 の発現、精製

*E. coli* Rosetta 株 (Invitrogen) を pMOsWRKY71 により形質転換し、形質転換体を LB 培地にて一晩前培養した。前培養液 200  $\mu$ l を 10 ml の同培地に植菌した後、25°C において 4 時間培養し、続いて培養液に終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加し、更に 25°C において 12 時間誘導した。ネガティブコントロールには pMAL-c2X を用いた。培養終了後、培養液を遠心 (3,300  $\times$  g, 5 min, 4°C) により集菌し、500  $\mu$ l の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁した。Sonifer 250D (Branson) により超音波破碎した後、遠心 (21,600  $\times$  g, 15 min, 4°C) により粗酵素抽出液を得た。得られた粗酵素抽出液から Amylose Resin (New England BioLabs®) を用いて、N-MBP-OsWRKY71 の粗精製を行った。粗酵素抽出液および精製タンパク質溶液のタンパク質濃度はプロテインアッセイキット (Bio-Rad Lab.) を用いて、bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質としてスタンダードアッセイ法により測定した。発現、精製度を確認するため、粗酵素抽出液および精製タンパク質溶液に SDS-PAGE sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 mM EDTA, 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 8% glycerol, 0.025% bromophenol blue] を等量加え、それぞれタンパク質 5  $\mu$ g 相当を含むサンプルを煮沸処理後 10% SDS polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE に供した。タンパク質バンドの検出は、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) を用いて、プロトコールに従って行った。

## 2-2-15 ゲルシフトアッセイ用プローブのテンプレートの作製

Table 2-2 に示すプライマー (Pdtc2-F, Pdtc2-R) と、テンプレートとしてイネの total DNA を用いて、PCR を行った。PCR 産物を pT7Blue T-Vector (Novagen) にクローニングし、pTPdtc2 を作製した。その後、挿入断片の塩基配列を確認した。同様に、Table 2-2 に示すプライマーとテンプレート (Pdtc2-F, Pdtc2-R, mPdtc2) を用いて PCR を行った。PCR 産物を pT7Blue T-Vector (Novagen) にクローニングし、pTmPdtc2 を作製した。その後、挿入断片の塩基配列を確認した。

## 2-2-16 ゲルシフトアッセイ

DIG Gel Shift Kit, 2nd generation (Roche Diagnostics GmbH, Pentzberg, Germany) を用いて、プロトコールに従って行った。pTPdtc2 または pTmPdtc2 をテンプレートとしてプライマー Pdtc2-F と Pdtc2-R を用いて PCR により増幅した 60 bp の DNA 断片の末端を digoxigenin (DIG) でラベリングした。20  $\mu$ l の反応溶液 [0.2 mM potassium cacodylate, 25 mM Tris-HCl (pH 6.6), 0.25 mg/ml BSA, 0.1  $\mu$ g poly L-lysine, 1  $\mu$ g poly (dI-dC), 0.4 ng DIG labeled probe, 0.4 ng protein] を調製した。また、競合解析のために 100 ng の non-labeled probe を加えた。室温において 15 分間静置した後、5  $\mu$ l の loading buffer を加え、10  $\mu$ l を PAGE に供した。PAGE には 6% の polyacrylamide gel を使用し、0.5  $\times$  Tris-borate-EDTA (TBE) buffer (10  $\times$  conc.; 890 mM Tris, 890 mM boric acid, 20 mM EDTA, pH 8.0) において定電圧 80 V で泳動した。泳動終了後、ニトロセルロースメンブレンに核酸をブロッティングした。データのイメージは、バイオイメージングアナライザー LAS1000 (富士写真フイルム社) を用いて行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* の cDNA のクローニング

*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の Expression sequence tag の塩基配列は既に明らかになっていたが、*OsWRKY71* に関しては Rice GAAS によって予測された塩基配列と異なっていた。そこで、実際の塩基配列を確認するため、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の cDNA のクローニングを行った。

キチンエリシター (*N*-acetylchitooctase) 処理後 1 時間のイネ液体培養細胞から調製した cDNA をテンプレートとし、EST および Rice GAAS のデータに基づいて、それぞれの遺伝子の 5' UTR、3' UTR にマッチするよう設計したプライマーを用いて、PCR を行った。得られた DNA 断片の塩基配列を確認したところ、それぞれ Rice GAAS によって予測されていた塩基配列と一致した。一方、*OsWRKY71* に関して、EST の塩基配列にのみ含まれている領域をプライマーとして同様に PCR を行ったところ、DNA 断片の増幅は認められなかった (data not shown)。以上の結果から、今回クローニングした cDNA がそれぞれ *OsWRKY53*、*OsWRKY71* の cDNA であると結論づけた。

WRKY 型転写因子は、WRKY ドメインの特徴から、Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 型ジンクフィンガーモチーフを有する WRKY ドメインを 2 個持つグループ I、Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 型ジンクフィンガーモチーフを有する WRKY ドメインを 1 個持つグループ II、Cys<sub>2</sub>HisCys 型ジンクフィンガーモチーフを有する WRKY ドメインを 1 個持つグループ III の 3 種のグループに分けられている。アミノ酸配列の解析から、*OsWRKY53* はグループ I に、*OsWRKY71* はグループ II に属していることが明らかになった (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。

### 2-3-2 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のエリシター応答性の解析

イネ液体培養細胞を用いて、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* のエリシター応答性を解析した。エリシターとして、キチンエリシター (*N*-acetylchitooctase) および、スフィンゴリピドエリシター (cerebroside B) を使用し、各エリシター処理後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間でサンプリングを行いノーザン解析に供した。

*OsWRKY53* は、キチンエリシターによって、処理後 30 分以内に発現が誘導され、1

```

1  GTCGTCTCGT TCTCGTCTCC GATCACTCTC CTCCTCATCT TCGTCACGGT
51 CTCCTCGCTT CGCTAGCTCG CTTGCTTGCT GGCTGAGCTG TGGTACGCTC
101 GCCATGGCGT CCTCGACGGG GGGGTTGGAC CACGGGTTCA CGTTACAGCC
   M A S S T G G L D H G F T F T P
151 GCCGCCGTTC ATCACGTCGT TCACCGAGCT GCTGTCGGGG GGCGGTGGGG
   P P F I T S F T E L L S G G G G D
201 ACCTGCTCGG CGCCGGCGGT GAGGAGCGCT CGCCGAGGGG GTTCTCCAGA
   L L G A G G E E R S P R G F S R
251 GCGGAGCGA GGGTGGGCGG CGGGGTGCCC AAGTTCAAGT CCGCGCAGCC
   G G A R V G G G V P K F K S A Q P
301 GCGAGCGCTG CCGCTCTCGC CGCCGCGGGT GTCGCCGTCG TCCTACTTCG
   P S L P L S P P P V S P S S Y F A
351 CCATCCCGCC GGGGCTCAGC CCCACCGAGC TGCTCGACTC CCCCCTCCTC
   I P P G L S P T E L L D S P V L
401 CTCAGCTCCT CCCATATCTT GGCGTCCCGG ACCACCGGTG CAATCCCGGC
   L S S S H I L A S P T T G A I F A
451 TCAGAGGTAC GACTGGAAGG CCAGCGCCGA TCTCATCGCT TCTCAGCAAG
   Q R Y D W K A S A D L I A S Q Q D
501 ATGACAGCCG CGGCGACTTC TCCTTCCACA CCAACTCCGA CGCCATGGCC
   D S R G D F S F H T N S D A M A
551 GCGCAACCGG CCTCTTTCCC TTCCTTCAAG GAGCAAGAGC AGCAAGTGGT
   A Q P A S F P S F K E Q E Q Q V V
601 CGAGTCGAGC AAGAACGGCG CCGCCGCGCG GTCGAGCAAC AAGAGCGCGC
   E S S K N G A A A A S S N K S G G
651 GCGGCGGGAA CAACAAGCTG GAGGACGGGT ACAACTGGAG GAAGTACGGG
   G G N N K L E D G Y N W R K Y G
701 CAGAAGCAGG TGAAGGGGAG CGAGAACCCG AGGAGCTACT ACAAGTGCAC
   Q K Q V K G S E N P R S Y Y K C T
751 CTACAACGGC TGCTCCATGA AGAAGAAGGT GGAGCGCTCG CTCGCCGACG
   Y N G C S M K K K V E R S L A D G
801 GCGCATCAC CCAGATCGTC TACAAGGGCG CACACAACCA CCCCAGCCG
   R I T Q I V Y K G A H N H P K P
851 CTCTCCACCC GCCGCAACGC CTCCTCCTGC GCCACCGCGG CCGCCTGCGC
   L S T R R N A S S C A T A A A C A
901 CGACGACCTC GCGGCGCCCG GCGCGGGCGC GGACCAGTAC TCCGCCGCGA
   D D L A A P G A G A D Q Y S A A T
951 CGCCCGAGAA CTCCTCCGTC ACGTTCGGCG ACGACGAGGC CGACACGCA
   P E N S S V T F G D D E A D N A
1001 TCGCACCGCA GCGAGGGCGA CGAGCCCGAA GCCAAGCGCT GGAAGGAGGA
   S H R S E G D E P E A K R W K E D
1051 TGCTGACAAC GAGGGCAGCT CCGGCGGCAT GGGCGGCGGC GCCGGCGGCA
   A D N E G S S G G M G G G A G G K
1101 AGCCGGTGCG CGAGCCGAGG CTTGTGGTGC AGACGCTGAG CGACATCGAC
   P V R E P R L V V Q T L S D I D
1151 ATCCTCGACG ACGGCTTCCG GTGGAGGAAG TACGGCCAGA AGGTCGTCAA
   I L D D G F R W R K Y G Q R V V K
1201 GGGCAACCCC AACCAGGA GCTACTACAA GTGCACGACG GTGGGCTGCC
   G N P N P R S Y Y K C T T V G C P
1251 CGGTGCGGAA GCACGTGGAG CGGGCGTCGC ACGACACGCG CGCCGTGATC
   V R K H V E R A S H D T R A V I
1301 ACCACCTACG AGGGCAAGCA CAACCACGAC GTCCCGGTGCG GCCGCGGCGG
   T T Y E G K H N H D V P V G R G G
1351 CGGCGGCGGA CGCGCCCGG CGCGGCGGCC GCCGACGTCG GGGGCGATCC
   G G G R A P A P A P P T S G A I R

```

Fig. 2-1 O<sub>3</sub>WRKY53 の cDNA 及び推定アミノ酸配列

WRKY ドメインは赤字で、開始コドンは青字で、終止コドンは下線で示した。  
また、推定核移行シグナルを緑字で示した。

```

1401 GGCCGTCGGC CGTCGCCGCC GCCCAGCAGG GGCCCTACAC CCTCGAGATG
      P S A V A A A Q Q G P Y T L E M
1451 CTCCCCAACC CCGCCGGCCT CTACGGCGGC TACGGCGCCG GCGCCGGCGG
      L P N P A G L Y G G Y G A G A G G
1501 CGCCGCGTTC CCGCGCACCA AGGACGAGCG GCGGGACGAC CTGTTCGTCG
      A A F P R T K D E R R D D L F V E
1551 AGTCGCTCCT CTGCTAGTCG AGCCGAGCCG AGCCGAGCTG AGCTGGGCCC
      S L L C *
1601 CACATCCCC TGCTCGCCAC GTGGCGTATT TTCGCCTCGC CGTATACGTA
1651 CGGCCGTATA GCGTACGTAT ACACGCTCGC ACGCCCTGCC CAACACGGCA
1701 ATACACACAT ACATACTCTC GTACACACGT AGTAGCATAC ATATACAGTA
1751 TAGTAGGTGG TAGTGGTAGC TAGCTAGGGA GTGAGATCCA ATTTGTTGAT
1801 TCGTTGCAGG CCACTGCCAC GTGGGCCACA CCGGAAACAG TACACGCGTA
1851 TACACCACAC TTGGGATACG CGTACGTACG CACATGTACA CGTAGTTTTG
1901 TGCCTTTGTA ACTGCTGAGA GACAGGTCAA ATAAGACTGA TGAATTTTTC

```

**Fig. 2-1 OsWRKY53 の cDNA 及び推定アミノ酸配列 (続き)**

```

1 CTCCTTGGCT CAGCTTGACA TCGTCGGAGC AGCAGAAAAG TTTGCTCGAT
51 CGAGCTAGCT AACTAGGTCG TCGGATCAGT GATAAATCGT TCGCCGATGG
M D
101 ATCCGTGGAT TAGCACCAG CCTTCGCTGA GCCTGGACCT CCGCGTCGGG
P W I S T Q P S L S L D L R V G
151 CTGCCGGCGA CGGCGGCCGT CGCCATGGTT AAGCCCAAGG TGCTCGTCGA
L P A T A A V A M V K P K V L V E
201 GGAGGACTTC TTTCAACAGC AGCCTCTCAA GAAAGACCCA GAGGTTGCGG
E D F F H Q Q P L K K D P E V A A
251 CGCTGGAGGC GGAGCTGAAG CGGATGGGCG CGGAGAACCG GCAGCTGAGC
L E A E L K R M G A E N R Q L S
301 GAGATGCTGG CGGCGGTGGC GGCCAAGTAC GAGGCGCTGC AGAGCCAGTT
E M L A A V A A K Y E A L Q S Q F
351 CAGCGACATG GTCACCGCCA GCGCCAACAA CGGCGGCGGC GCGGCAACA
S D M V T A S A N N G G G G G N
401 ACCCGTCGTC CACCTCCGAG GCGGCTCCG TCTCGCCGTC GAGGAAGCGC
P S S T S E G G S V S P S R K R
451 AAGAGCGAGA GCCTCGACGA CTCCCCGCCG CCGCCGCCGC CGCCGCACCC
K S E S L D D S P P P P P P P H P
501 ACACGCGGCG CCGCACCACA TGCACGTCAT GCCCGGCGCC GCCCGCGCCG
H A A P H H M H V M P G A A A A G
551 GCTACGCCGA CCAGACCGAG TGCACCTCCG GCGAGCCCTG CAAGCGCATC
Y A D Q T E C T S G E P C K R I
601 CGCGAGGAGT GCAAGCCCAA GATCTCCAAG CTCTACGTCC ACGCCGACCC
R E E C K P K I S K L Y V H A D P
651 ATCCGACCTC AGCCTGGTGG TGAAAGATGG GTACCAATGG AGGAAGTATG
S D L S L V V K D G Y Q W R K Y G
701 GTCAGAAGGT CACCAAGGAC AACCCCTGCC CAAGAGCCTA CTTCAGATGC
Q K V T K D N P C P R A Y F R C
751 TCATTTGCTC CCGCTGCCC TGTCAAGAAG AAGGTTGAGA GAAGCGCGGA
S F A P A C P V K K K V Q R S A E
801 GGACAACACG ATCCTCGTGG CGACGTACGA GGGGAGCAC AACCACGGCC
D N T I L V A T Y E G E H N H G Q
851 AGCCGCCGCC GCCGCTGCAG TCGGCGGCGC AGAACAGCGA CGGCTCCGGC
P P P P L Q S A A Q N S D G S G
901 AAGAGCGCCG GGAAGCCACC CCATGCGCCG GCGGCGGCGC CGCCGGCGCC
K S A G K P P H A P A A A P P A P
951 GGTGGTGCCG CACCGTCAGC ACGAACCAGT CGTCGTCAAC GGCGAGCAGC
V V P H R Q H E P V V V N G E Q Q
1001 AGGCCGCGGC GCGCTCGGAG ATGATCAGGC GGAACCTGGC CGAGCAGATG
A A A A S E M I R R N L A E Q M
1051 GCGATGACGC TGACGCGTGA CCCAAGCTTC AAGGCGGCGC TCGTCACCGC
A M T L T R D P S F K A A L V T A
1101 CCTCTCCGGC CGCATCCTCG AGCTCTCGCC GACCAAGGAT TGACGATTGC
L S G R I L E L S P T K D *
1151 TACTGATCGA CGCGGCGGAT TCGATCGCTT CTTCTTGCAA CTGCGGGCAT
1201 GGCCATTGCC ATCCTCTCCT GTCTGTGCTT CTTCTGTTCTT GGTGGCGCCA
1251 GCAAGAACAC GATCGACGCG GTGTCCATCC ATGGCGGAGT TCGATCGATC
1301 GATTGATCGG CTAGGGAGGA ATTGATGATT CGCTGTATAT AACCTAGAAT
1351 TTTTACACGA TTAGTCGAGG GATAGATCGA CGAGCAACAT TTTCGGCCGG
1401 CGCCCATGGC TGATCAACCA ACGATCATCG GCGGCGGCCG GACGTGAGCA
1451 AGACGATTCA GAAAAAATT CAGATATTTG CGTCGGCAAA AGACGCTTGT
1501 AACATGTAGA GTAGGGAGGA AAATTATTTG AAGTGACGT AGTGCAGTCC
1551 TTTTGAGCAA AATTAATCCC AAATTGCTT CGGTCCCGAA C

```

Fig. 2-2 OsWRKY71 の cDNA 及び推定アミノ酸配列

WRKY ドメインは赤字で、開始コドンが青字で、終止コドンは下線で示した。

また、推定核移行シグナルを緑字で示した。



時間ほどでピークとなり、以後漸減しつつも、8 時間後でも発現が認められた (Fig. 2-3)。一方、スフィンゴリピドエリシターの場合、キチンエリシターと同様に処理後 30 分以内に発現が誘導され、かつ 30 分ほどでピークとなり、以後漸減するが、キチンエリシター処理に比べてシグナルが弱かった (Fig. 2-4)。

また、*OsWRKY71* は、キチンエリシターによって、処理後 30 分以内に発現が誘導され、かつ 30 分ほどでピークとなり、以後漸減した (Fig. 2-3)。一方、スフィンゴリピドエリシターの場合、キチンエリシターと同様に処理後 30 分以内に発現が誘導され、かつ 30 分ほどでピークとなり、以後漸減するが、キチンエリシター処理に比べてシグナルが弱かった (Fig. 2-4)。

以上の結果から、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* がキチンエリシター、スフィンゴリピドエリシターという異なる 2 種類のエリシターによって発現を誘導されることが明らかになった。

### 2-3-2 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のイモチ病菌接種に対する応答性の解析

イネ培養細胞において、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の各種エリシターに対する応答性は確認できたが、実際に病原菌が感染したイネ植物体においてこれらの WRKY 型転写因子が発現していることを確認するため、イネ植物体 (4 葉期) を用いて、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* のイモチ病菌接種に対する応答性を解析した。イモチ病菌として、*M. grisea* (Race 007) を使用し、噴霧接種法による孢子接種を行った。イモチ病菌を接種したイネ植物体は、暗黒下で生育させた。イモチ病菌接種後 6 時間、9 時間、12 時間、24 時間において、4 葉 3 枚を一組としてサンプリングを行い、total RNA を抽出した後ノーザン解析に供した。

ノーザン解析の結果、*OsWRKY53* は、イモチ病菌によって、接種後 6 時間以内に発現が誘導され、以後漸減することが明らかになった。また、*OsWRKY71* も *OsWRKY53* 同様、イモチ病菌によって、接種後 6 時間以内に発現が誘導され、以後漸減することが明らかになった (Fig. 2-5)。

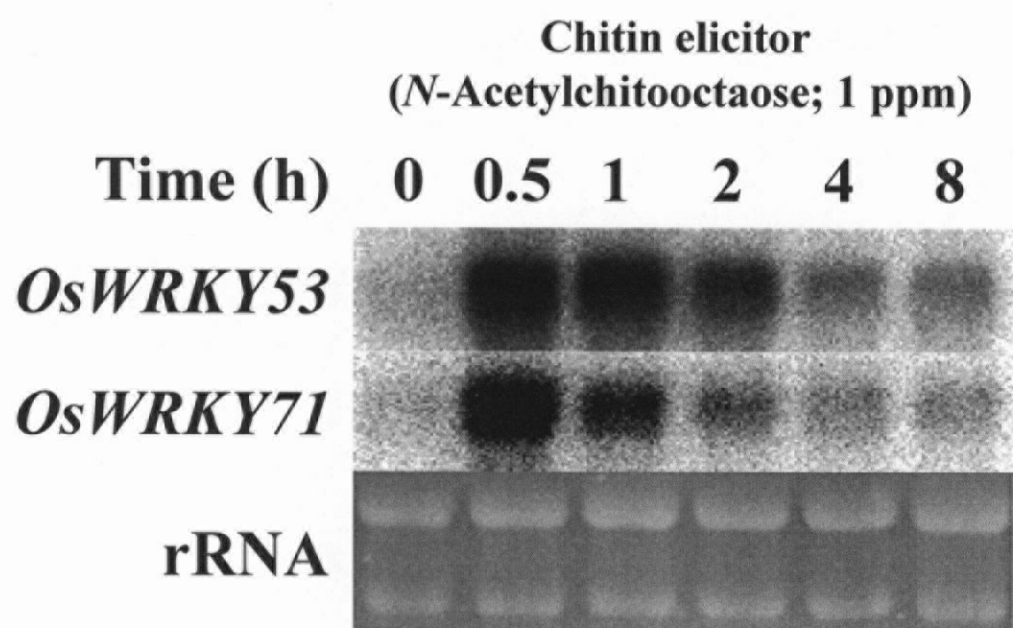


Fig. 2-3 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のキチンエリシター応答性

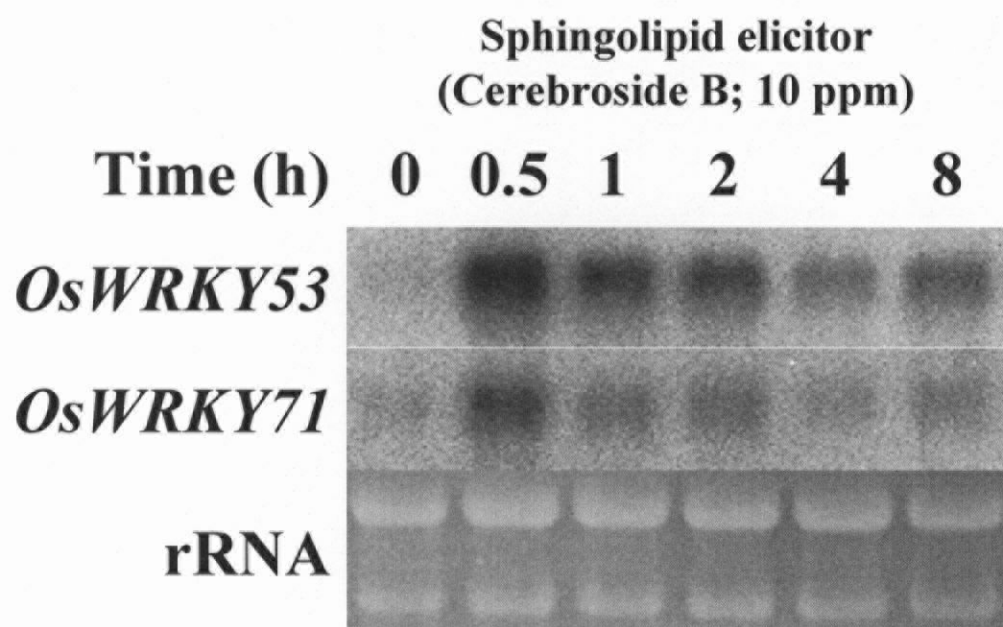


Fig. 2-4 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のスフィンゴリピドエリシター応答性

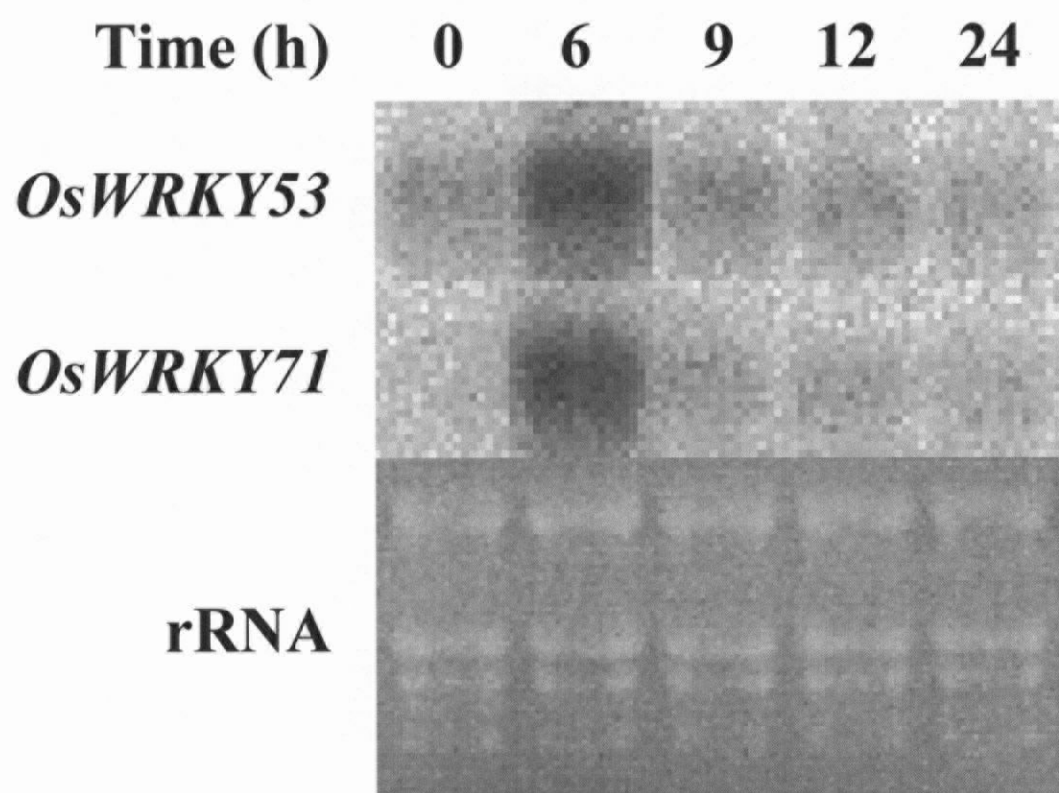


Fig. 2-5 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のイモチ病菌応答性

#### 2-3-4 OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性の解析

これまでに、双子葉植物において多くの WRKY 型転写因子が核局在性であることが報告されている。そこで、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の核局在性を、タマネギ表皮細胞を用いた系によって解析した。

*OsWRKY53*、*OsWRKY71* を GFP との融合タンパク質として CaMV35S プロモーターの制御下で発現させるプラスミドを構築し、パーティクルガンを用いてタマネギ表皮細胞に導入した。対照区として、GFP のみを CaMV35S プロモーターの制御下で発現させるプラスミド pTH121 を使用した。プラスミドを導入して 24 時間後にタマネギ表皮細胞を顕微鏡を用いて観察したところ、GFP-*OsWRKY53*、GFP-*OsWRKY71* ともに GFP の蛍光は核にのみ観察された。一方、対照区においては、GFP の蛍光は核を含む細胞質内全体で観察された (Fig. 2-6)。

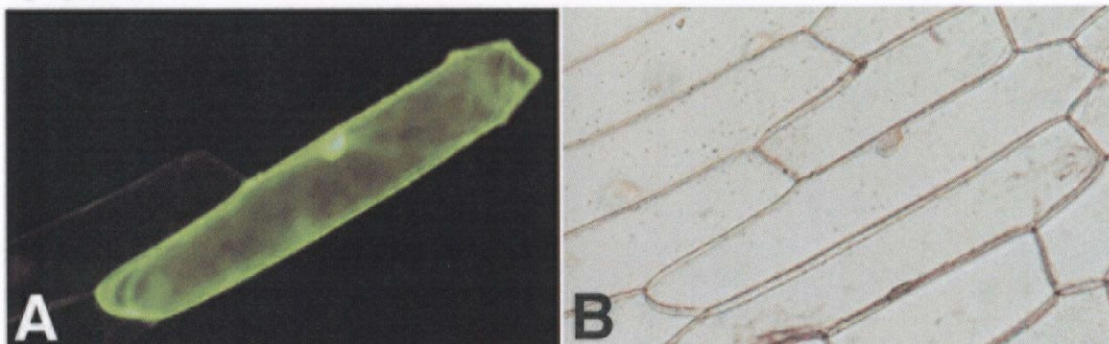
以上の結果から、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の核局在性が確認された。

#### 2-3-5 OsWRKY53 組換えタンパク質の発現、精製

*OsWRKY53* の W-box 結合能を解析するためには、*OsWRKY53* の組換えタンパク質が必要である。そこで、*OsWRKY53* の組換えタンパク質発現系を構築することにした。これまでに報告されている WRKY 型転写因子の組換えタンパク質の多くが thioredoxin (Trx) タグ融合タンパク質として調製されていることから、発現用のベクターとして pET-32b(+) (Novagen) を使用した。また、*OsWRKY53* の cDNA 配列内には多くのレアコドンが認められたことから、発現用のホストとして *E. coli* Rosetta(DE3) (Novagen) を使用した。

N-terminus thioredoxin-tagged *OsWRKY53* (Trx-*OsWRKY53*) の発現を 20℃において IPTG の添加による誘導なしで行った。粗酵素抽出液の SDS-PAGE を行ったところ、Trx-*OsWRKY53* (約 66 kDa) が発現していることが確認された。pET-32b(+) を保持する Rosetta(DE3) 株の粗酵素抽出液には、約 66 kDa のバンドは確認されなかった。さらに、immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) により精製した Trx-*OsWRKY53* 溶液を SDS-PAGE に供した結果、Trx-*OsWRKY53* がほぼ単一に精製されたことが確認できた (Fig. 2-7)。以降、この精製 Trx-*OsWRKY53* 溶液をゲルシフト

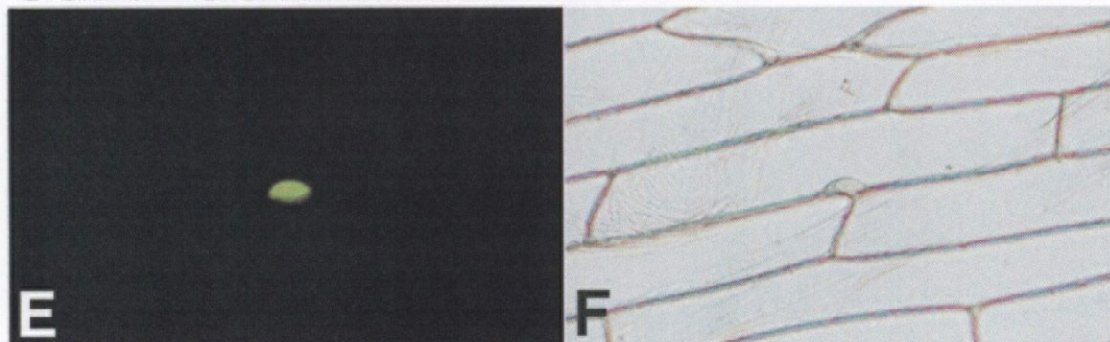
**sGFP**



**sGFP-OsWRKY53**

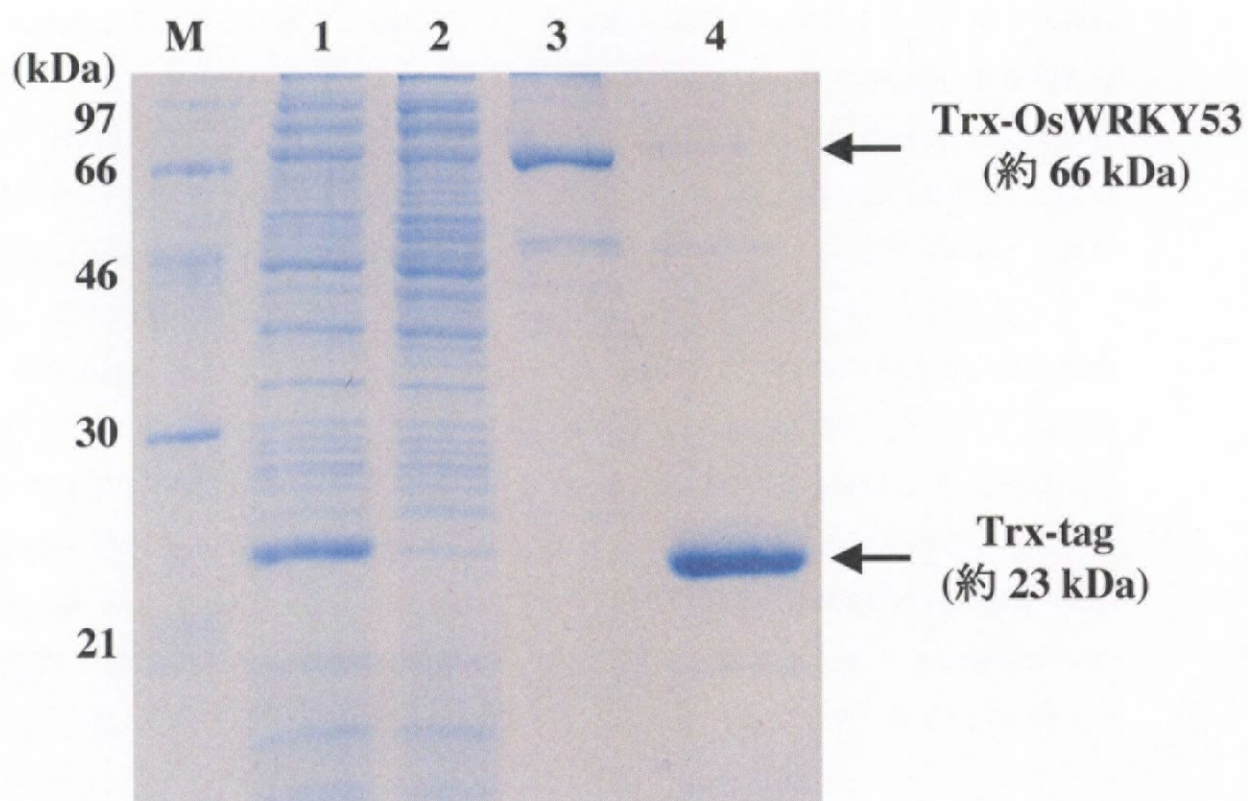


**sGFP-OsWRKY71**



**Fig. 2-6** *OsWRKY53*、*OsWRKY71* の核局在性  
(A、C、E : GFP 蛍光励起時 ; B、D、E : 通常時)





**Fig. 2-7 N-Trx-OsWRKY53 の発現と精製**  
**M: Marker, 1: pET-32b(+), 2: pEOsWRKY53,**  
**3: N-Trx-OsWRKY53, 4: Trx-tag**

アッセイに用いることにした。

### 2-3-6 OsWRKY71 組換えタンパク質の発現、精製

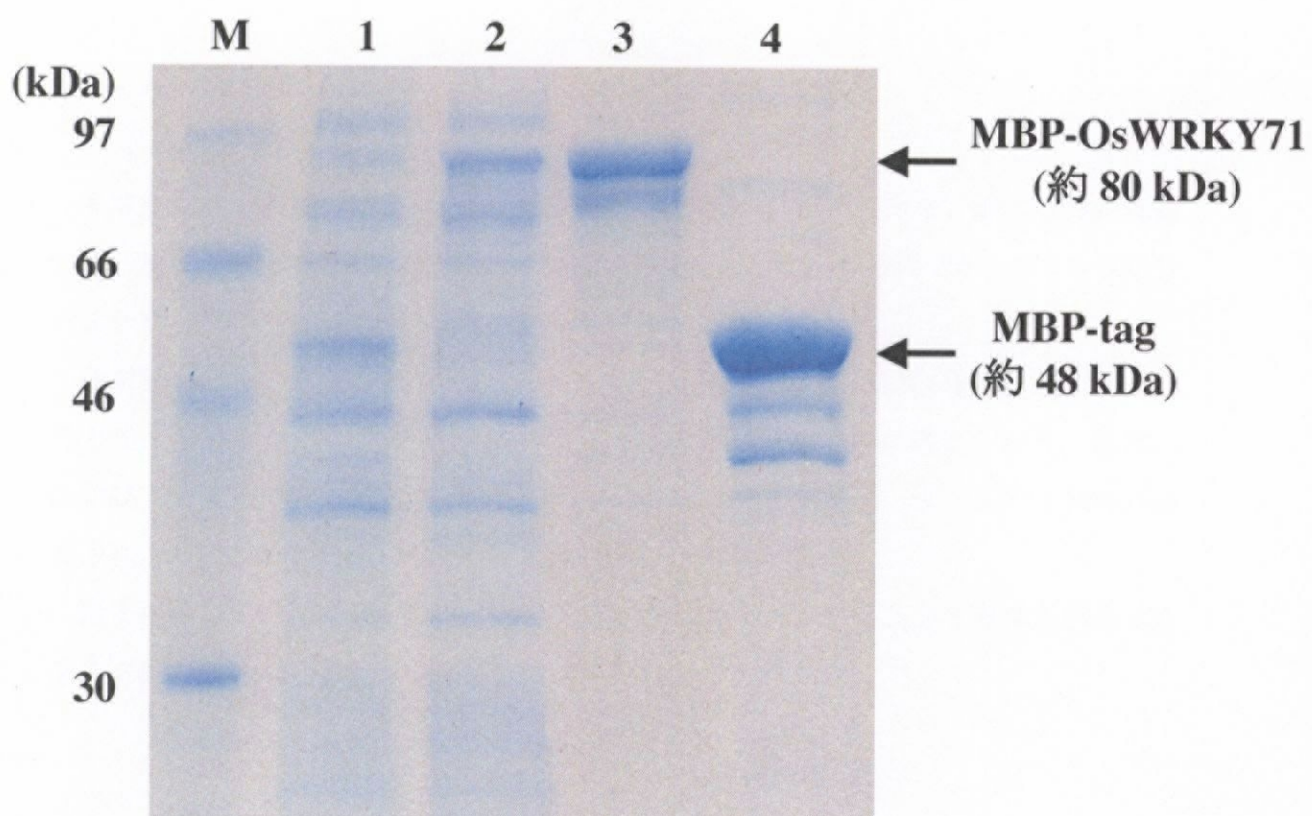
OsWRKY71 の W-box 結合能を解析するためにも、OsWRKY53 と同様 OsWRKY71 の組換えタンパク質が必要である。そこで、OsWRKY71 の組換えタンパク質発現系を構築することにした。OsWRKY53 と同様、発現用のベクターとして pET-32b(+) (Novagen) を使用し、また、OsWRKY71 の cDNA 配列内には多くのレアコドンが認められたことから、発現用のホストとして *E. coli* Rosetta(DE3) (Novagen) を使用したが、目的の組換えタンパク質の発現は認められなかった (data not shown)。そこで、目的のタンパク質を maltose binding protein (MBP) 融合タンパク質として発現することができる pMAL-c2X (New England BioLabs) を発現用のベクターとして用いることにした。また、発現用のホストとして、*E. coli* Rosetta (Novagen) を用いることにした。

N-terminus maltose binding protein-tagged OsWRKY71 (MBP-OsWRKY71) の発現を 25℃において IPTG で誘導した。粗酵素抽出液の SDS-PAGE を行ったら、MBP-OsWRKY71 (約 75 kDa) が発現していることが確認された。pMAL-c2X を保持する Rosetta 株の粗酵素抽出液には、約 75 kDa のバンドは確認されなかった。さらに、amylose resin (New England BioLabs) により精製した MBP-OsWRKY71 溶液を SDS-PAGE に供した結果、MBP-OsWRKY71 がほぼ単一に精製されたことが確認できた (Fig. 2-8)。以降、この精製 MBP-OsWRKY71 溶液をゲルシフトアッセイに用いることにした。

### 2-3-7 OsWRKY53、OsWRKY71 の W-box への特異的結合

OsWRKY53、OsWRKY71 の W-box 結合能を、ゲルシフトアッセイを用いて解析することにした。プローブとして、*OsDTC2* (stemar-13-ene 生合成酵素遺伝子) の転写開始点上流 321 bp ~ 380 bp の W-box がタンデムに存在する 60 bp の DNA 断片 Pdtc2 を使用した。このプローブと Trx-OsWRKY53 または MBP-OsWRKY71 を混合すると、シフトバンドが認められた。標識していないプローブを過剰に加えるとシフトバンドが消失すること、及び Trx タグのみ、または MBP タグのみではシフトバンドが認め





**Fig. 2-8 N-MBP-OsWRKY71 の発現と精製**  
M: Marker, 1: pMAL-c2X, 2: pMOsWRKY71,  
3: N-MBP-OsWRKY71, 4: MBP-tag

られないことから、観察されたシフトバンドは、OsWRKY53、OsWRKY71 そのものがプローブに結合したことによるものであることが示された (Fig. 2-9, Fig. 2-10)。

次に、W-box に変異を導入したプローブ、mPdtc2 (TTGAC→TCCTA) を用いてゲルシフトアッセイを行った。変異を導入したプローブに対し、Trx-OsWRKY53、またはMBP-OsWRKY71 を加えても、シフトバンドは観察されなかった(Fig. 2-9, Fig. 2-10)。

以上の結果から、OsWRKY53 及び OsWRKY71 は、W-box を特異的に認識して結合することが確認された。

### 2-3-8 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のジャスモン酸応答性の解析

イネ液体培養細胞を用いて、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* のジャスモン酸応答性を解析した。ジャスモン酸処理後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間でサンプリングを行いノーザン解析に供した。

*OsWRKY53* は、ジャスモン酸によって、処理後 30 分以内に発現が誘導され、1 時間ほどでピークとなり、以後漸減しつつも、8 時間後でも発現が認められた。また、*OsWRKY71* も、*OsWRKY53* 同様ジャスモン酸によって、処理後 30 分以内に発現が誘導され、1 時間ほどでピークとなり、以後漸減した (Fig. 2-11)。

以上の結果から、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* がジャスモン酸によって発現を誘導されることが明らかになった。

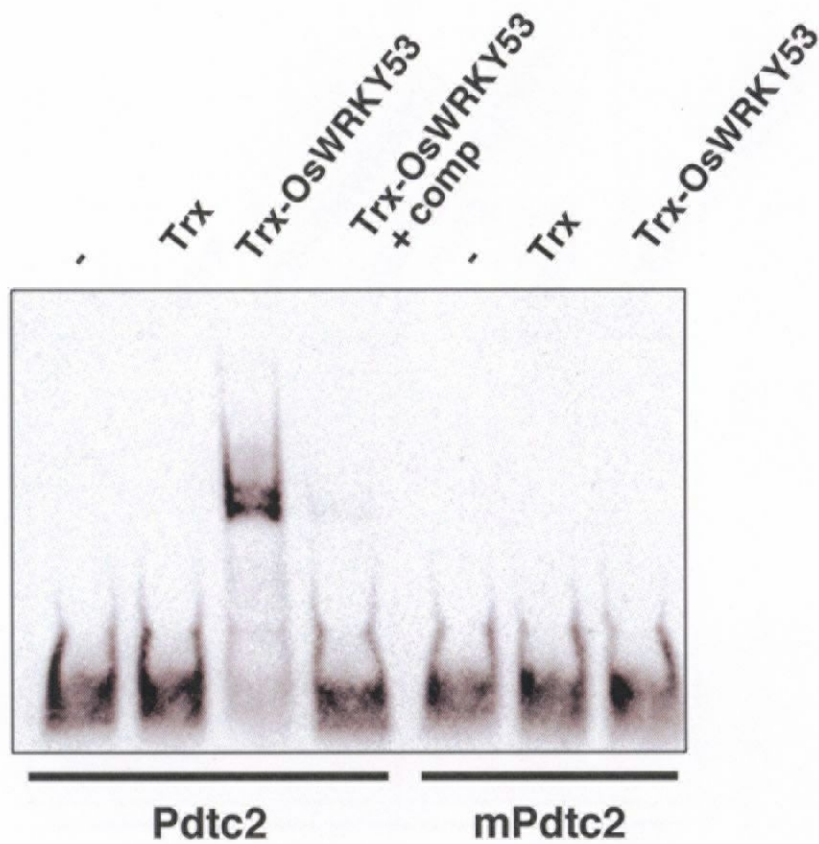


Fig. 2-9 OsWRKY53 の W-box 結合能

- : 標識プローブのみ

Trx : Thioredoxin tag + 標識プローブ

Trx-OsWRKY53 : Trx-OsWRKY53 融合タンパク質 + 標識プローブ

Trx-OsWRKY53 + comp : Trx-OsWRKY53 融合タンパク質 + 標識プローブ + 未標識プローブ

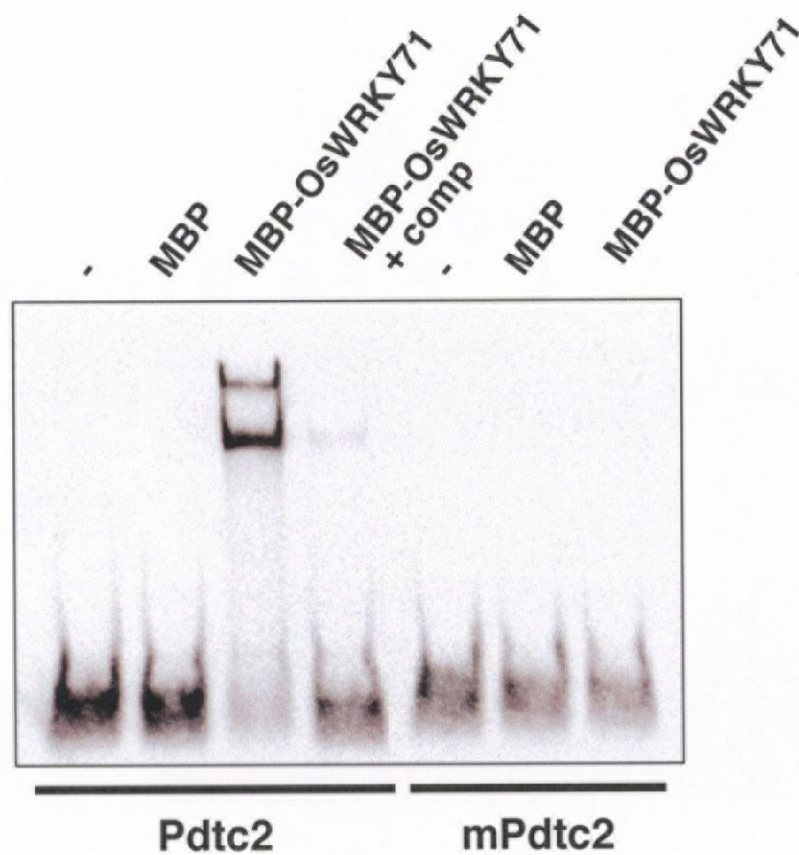


Fig. 2-10 OsWRKY71 の W-box 結合能

- : 標識プローブのみ

MBP : Maltose binding protein tag + 標識プローブ

MBP-OsWRKY71 : MBP-OsWRKY71 融合タンパク質 + 標識プローブ

MBP-OsWRKY71 + comp : MBP-OsWRKY71 融合タンパク質 + 標識プローブ + 未標識プローブ

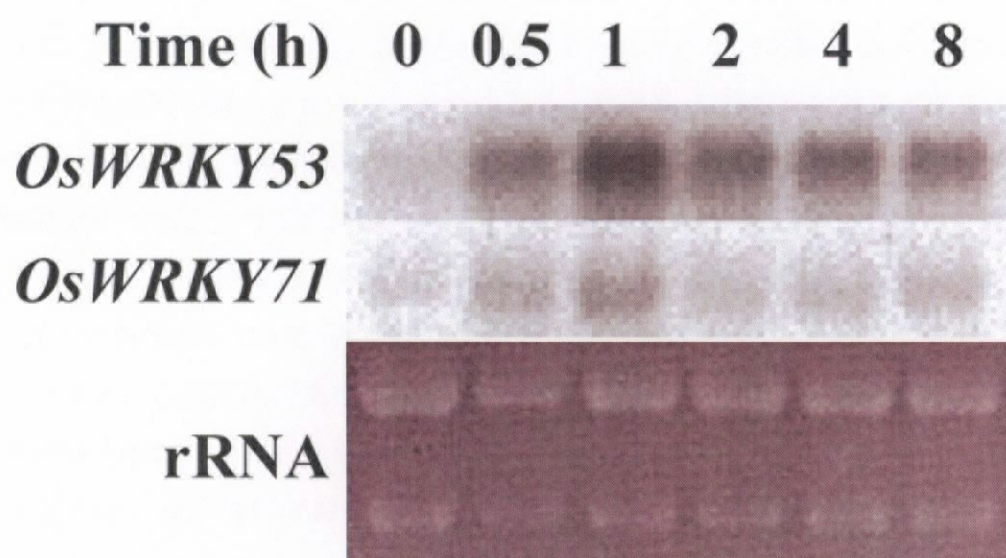


Fig. 2-11 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のジャスモン酸応答性

## 2-4 考察

### 2-4-1 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* のエリシター応答性、イモチ病菌応答性

単離した 2 種の WRKY 型転写因子は、BLAST search の結果、それぞれ *OsWRKY53*、*OsWRKY71* であることが明らかになった。*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はともにキチンエリシター、スフィンゴリピドエリシターという 2 種のエリシターによってその発現が誘導された。また、それぞれのエリシターによってエリシター処理後 30 分以内に発現が誘導されるという、極めて初期の段階で誘導される転写因子であることが明らかになった。さらに、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はともにイモチ病菌接種後 6 時間において、その発現誘導が認められた。イモチ病菌は、接種後 6 時間程で感染が成立することから、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はイモチ病菌感染時の極めて初期の段階で誘導される転写因子であると考えられる。このことはエリシターによる誘導のタイミングと類似することから、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* は、イネの抵抗性反応の初期の段階に参与している転写因子である可能性が高いと考えられる。

イモチ病菌には病原性の異なる様々な菌レースが存在しており、全てのイモチ病菌レースに対する抵抗性のイネを作出することは容易ではない。イネ品種とイモチ病菌レースとの間には、遺伝子対遺伝子 (gene-for-gene) 説の関係が成り立つ (Fig. 2-12) 【Staskawicz *et al.*, 1995】。すなわち、病原体であるイモチ病菌が非病原性遺伝子 (*avirulence gene*) を有し、宿主であるイネが抵抗性遺伝子 (*R gene*) を有する組み合わせにおいて、イネは抵抗性 (非親和性) となる。この相互作用は、非病原性遺伝子産物がイネの品種に対する特異的なエリシターとして作用し、イネにおける抵抗性遺伝子の産物がその特異的エリシターを認識するレセプターとして機能することにより抵抗性反応が開始すると考えられている。このような遺伝子対遺伝子説に従ったレース特異的エリシターに対して、イモチ病菌由来の成分と推定されるキチンオリゴ糖やグルカン、スフィンゴリピドなどが、菌のレースに対して特異性を示さない非特異的エリシターとしてイネの basic な抵抗性反応を誘導することが知られている 【Yamada *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 2000; Umemura *et al.*, 2002】。レース特異的エリシターと非特異的エリシターにより誘導される反応に質的な差は確認されていない。*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はキチンエリシターやスフィンゴリピドエリシターといった非特異的なエ



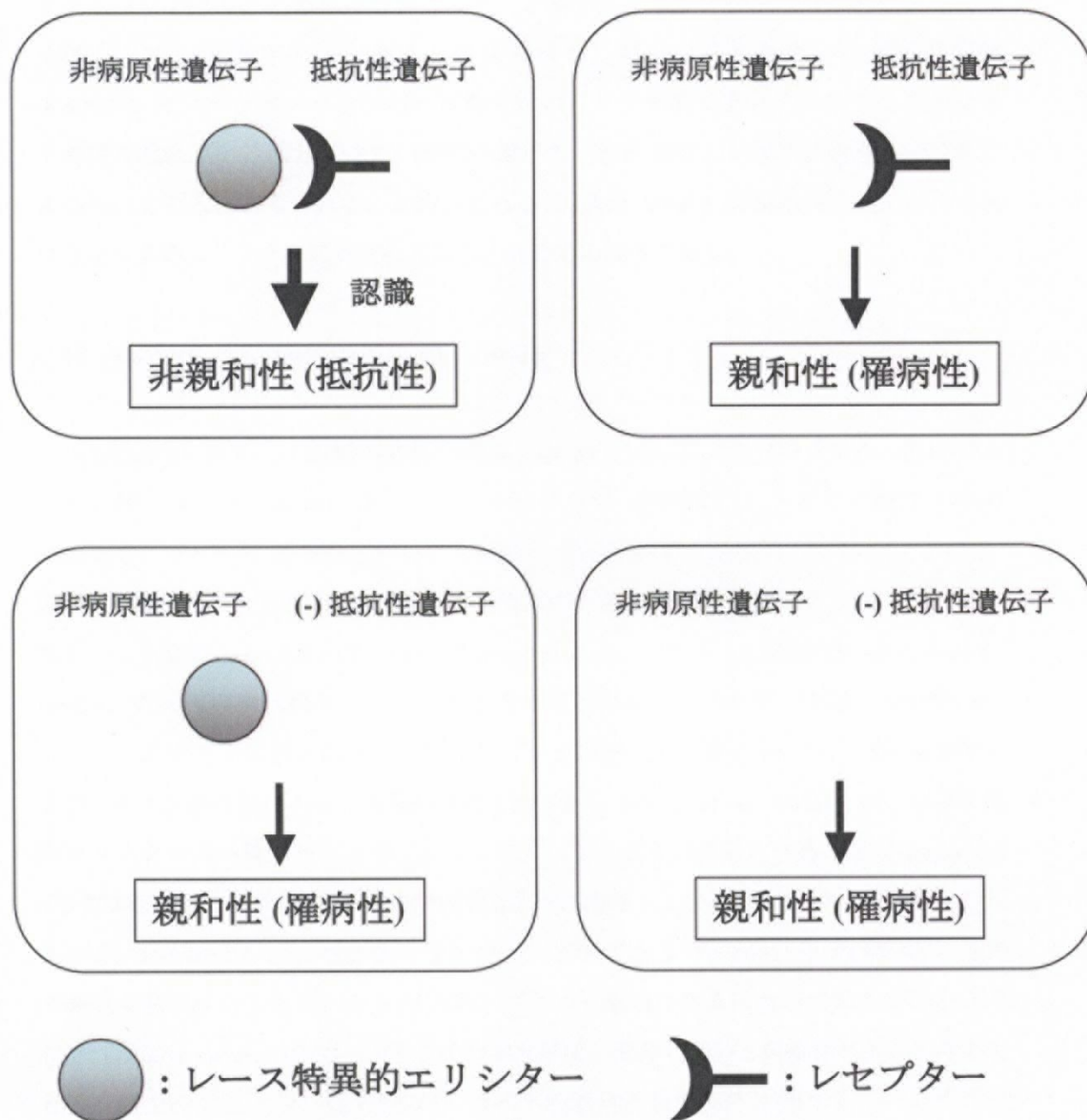


Fig. 2-12 遺伝子対遺伝子 (gene-for-gene) 説

植物が抵抗性 (非親和性) となるのは、病原菌が非病原性遺伝子を有し、宿主が抵抗性遺伝子を有する組み合わせの場合である。非病原性遺伝子産物は宿主特異的なエリシターとして機能し、抵抗性遺伝子はそのエリシターに対するレセプターとして機能すると考えられている。

リシターによってその発現が誘導されたことから、イネの非特異的な抵抗性反応に強く関与している転写因子であると考えられる。また、今回使用したイモチ病菌 (Race007) は、ニッポンバレに対して親和性のイモチ病菌であることから、このイモチ病菌接種によるこれら WRKY 型転写因子の発現誘導は、非特異的な抵抗性反応によるものであると考えられる。なお、これら 2 種の WRKY 型転写因子は、イネにおける非特異的エリシター応答性転写因子の初めての報告である。

#### 2-4-2 OsWRKY53、OsWRKY71 の homolog

OsWRKY53 のアミノ酸配列解析の結果、OsWRKY53 は、サツマイモの IbSPF1 とアミノ酸で 49% の identity が、シロイヌナズナの AtWRKY33 とアミノ酸で 47% の identity が、パセリの PcWRKY1 とアミノ酸で 41% の identity が認められた (Fig. 2-13)。IbSPF1 はサツマイモの  $\beta$ -amylase の発現制御に関与していると考えられているが、詳しいことは明らかになっていない【Ishiguro *et al.*, 1994】。OsWRKY53 がイネの  $\beta$ -amylase の発現制御に関与しているかどうかは現在のところ不明である。AtWRKY33 はシロイヌナズナの病害抵抗性に関与している確固たる証拠はないが、病原菌接種およびサリチル酸処理によって発現が誘導されること【Dong *et al.*, 2003】、および非特異的エリシターの一つであるフラジェリンによっても発現が誘導されること【Navarro *et al.*, 2004】から、シロイヌナズナの病害抵抗性に関与している可能性が高いと考えられている。PsWRKY1 は、パセリの PR タンパク質である PcPR1-1 や PcWRKY1 自身の発現を誘導することがパセリのプロトプラストを用いた系において明らかになっており【Eulgem *et al.*, 1999】、パセリの病害抵抗性に関与している可能性が高いと考えられる。以上のことから、OsWRKY53 はイネの病害抵抗性反応に関与している転写因子である可能性が高いと考えられる。

OsWRKY71 のアミノ酸配列解析の結果、OsWRKY71 は、カラスムギの AfABF2 とアミノ酸で 67% の相同性が、オオムギの HvWRKY38 とアミノ酸で 68% の相同性が、シロイヌナズナの AtWRKY40 とアミノ酸で 37% の相同性が認められた (Fig. 2-14)。AfABF2 はカラスムギの  $\alpha$ -amylase の発現制御に関与していると考えられているが、詳しいことは明らかになっていない【Rushton *et al.*, 1995】。HvWRKY38 は、様々な非生物的なストレスによって発現が誘導されることが明らかになっており、それらのス



OsWRKY53	MASSTGGLDH-----GFTFTPPP-FITSFTELLSGGGGDLGAGGEERSPRGFSGGARV
IbSPF1	MAASSGTIDAPTASSSFSTASSFMSSFTDLLAS---DAYSGGSVSRGLG--DRIAERT
AtWRKY33	-----MDN-----SRTQNMNG-----SANWSQQSGR--TSTSSLE
PcWRKY1	-----MSS-----SLGDLAQ-----PNNDDFGSN---WG----
OsWRKY53	GGGVPKFKSAQPPSLPLSPPPVSPSSYFAIPPGLSPTELLDSPVLLSSSH-ILASPTTGA
IbSPF1	GSGVPKFKSLPPPSLPLSSPAVSPSSYFAFPGLSPSEL LDSPVLLSSSN-ILPSPTTGT
AtWRKY33	DLEIPKFRSFAPSSISISPSLVSPSTCF-----SPSLFLDSPAFVSSSANVLASPTTGA
PcWRKY1	-FENQKTKSFANQSLPFSPPPVSPPSYFS-----FLDSPIQNNNYT-IVSSSGNGT
OsWRKY53	IPAQRYDWKA-----SADLIAS---QQDDSRGDFS FHTNSDAMAAQP-----
IbSPF1	FPAQTFNWK-----DSNASQEDVKQEEKGYPDFSFQTNASMTLNYEDSKR
AtWRKY33	LITNVTNQK-----INEGDKSN--NNNFNLFD FSHQSSGVSAPTITTTT
PcWRKY1	MNAQSFKEENQNFSDFSFPAQTRPASSTSSSFI PANTNLVEDSLKRKQGGWNFEPAKKN
OsWRKY53	-----ASFPSFKEQEQVVESSKN--GAAAASSNKSGGGG-----NNKLE
IbSPF1	-----KDEL--NSLQSLPPVTTSTQMSSQNNGGSYSEYNNQCCPPSQT--LREQRRSD
AtWRKY33	-----TTTTTTNSSIFQSQEQKKNQSEQWSQTETRPNNQAVSYNG---REQRKGE
PcWRKY1	DFLMDNASVTSDIATLQRI SPEMTMNHANMQSNAALQSNLN NYAQSSQSSQTNRDQSKLD
OsWRKY53	DGYNWRKYGQKQVKGSENPRSYKCTYNGCSMKKKVERSLADGRITQIVYKGAHNHPKPL
IbSPF1	DGYNWRKYGQKQVKGSENPRSYKCTHPNCPTKKKVERAL-DGQITEIVYKGAHNHPKPQ
AtWRKY33	DGYNWRKYGQKQVKGSENPRSYKCTFPNCPTKKKVERSL-EGQITEIVYKGSNHPKPQ
PcWRKY1	DGYNWRKYGQKQVKGSENPRSYKCTYLNCPPTKKKVETTF-DGHITEIVYKGNHNHPKPQ
OsWRKY53	STRRNASSCATAAA---CADDLAAPG-----AGADQYSAATPENS-SVTFGDD
IbSPF1	STRSSSSSTASSASTL--AAQSYNAPASDVPDQSYWSNGNGQMDSVATPENS-SISVGDD
AtWRKY33	STRSSSSSSSTFHSAYNASLDHNRQASSDQPNNSNFHQSDSFGMQQEDNTTSDSVGDD
PcWRKY1	STKRSSSQSYQNSIG---TMPESSLE-----NGRSEPVTTPENS-SLSFGED
OsWRKY53	E-ADNASHRSEG-----DEPEAKRWKEDADNEGSSGGMGGGAGGKPVREPRLLVVQTL
IbSPF1	E-FEQSSQKRESGGDEFDEDEPDAKRWKVENESGVS-----AQGSRTVREPRVVQTT
AtWRKY33	E-FEQGSSIIVSRDEEDCG-SEPEAKRWKGDNETNGGN-----GGGSKTVREPRIVVQTT
PcWRKY1	DLFEQGS MNKPGDDDE---NEPDSKRWKGEYESNEPMS---SLGSRTVREPRIVVQTT
OsWRKY53	DIDILDDGFRWKY GQKVVGKNPNPRSYKCTTVGCPVRKHVERASHDTRAVITTYEGKH
IbSPF1	DIDILDDGYRWRKY GQKVVGKNPNPRSYKCTSQGCPVRKHVERASHDIRSVITTYEGKH
AtWRKY33	DIDILDDGYRWRKY GQKVVGKNPNPRSYKCTTIGCPVRKHVERASHDMRAVITTYEGKH
PcWRKY1	DIDILDDGYRWRKY GQKVVGKNPNPRSYKCTQVGPVRKHVERASHDLRAVITTYEGKH
OsWRKY53	NHDVPVGRGGG-----GGRAPAPAPPTSGAIRPSAVAAAQ-----QGPYT
IbSPF1	NHDVPAARGSGSHGLNRGANPNNAAMAMAI RPSTMSLQSNYPIPISTRPMQGEQAP
AtWRKY33	NHDVPAARGSG-----YATNRA PQDSSSVIRPAAIAGHSNYTTS-----SQAPYT
PcWRKY1	NHDVPAPRGSGSYP-AVNRPSDNTTSAPTAIRPTTNYLNPLQN PRAQPAN---GQAPFT
OsWRKY53	LEMLPNPAGL-YGGYG-----AGAGGAAFPRTKDERRDD-LFVESLLC
IbSPF1	YEMLQSGSGFGYSGFGNPMNAY-----ANQIQDNAFSRAKEEPRDD-LFLDTLLA
AtWRKY33	LQMLHNNNTN-TGPFGYAMNNNNNSNLQTQQNFVGGGFSRAKEE PNEETSFFDSFMP
PcWRKY1	LEMLQRPRSYEFSGFTNTSNTYAIN-----QNQQASGQFSTAKDEPDVD-SFFDSFLA

Fig. 2-13 OsWRKY53 およびその homolog のアミノ酸配列のアライメント

OsWRKY71	MDPWISTQPSLSLDLRLVGLPATAA-----V---AMVKPKVLVEEDFFHQQLKKD
AfABF2	MDPWIGSQPSLSLDLHVGLPPMGH-HHHRYQAAAP-MVAMAKPKILVEESFM---PPKDD
HvWRKY38	MDPWMGSQPSLSLDLHVGLPPMGHPHHHQSQYQAPPMIALAKPKILVEENFM---PLKDD
AtWRKY40	MDQYSSSLVDTSLDLTIGVTRMRV-----EDDPPT-----
OsWRKY71	PEVAALAEELKRMGAENRQLSEMLAAVAAYEALQSQFSDMVTASANNGG--GGGNPNSS
AfABF2	PEVAVLESELQRVSEENRRLGEMLREVAAYEALQGQFTDLVTAQQANAGGSNNNNHPSS
HvWRKY38	PEVAVLESELQRVSEENRRLGEMLREVASKYEALQGQFTDMVTAGGNNN--HYHNQPS
AtWRKY40	---SALVEELNRVSAENKKLSEMLTLMCDNYNVLRLKQLMEYVVK-----SN----
OsWRKY71	TSEGGSVSPSRKRKSESLDDSPPPPPPPHHAAPHMHVMPGAAAAGYADQTECTSGE--
AfABF2	ASEGGSVSPSRKRKSE---DSLGTTP---SHAHQHH-----AFPAPADQAECTSGE--
HvWRKY38	ASEGGSVSPSRKRKSE---ESLGTTPP--SHTQQQHYAAGL--AYAVAPDQAECTSGE--
AtWRKY40	ITERDQISPPKKRKS-----AREDAFS---CAVIGGVSESSSTDQDEY
OsWRKY71	PCKRIREE--CKPKISKLYVHADPSDLSLVVKDGYQWRKYGQKVTKDNPCPRAYFRCSFA
AfABF2	PCKRIREE--CKPVVSKRYVHADPSDLSLVVKDGYQWRKYGQKVTKDNPCPRAYFRCSFA
HvWRKY38	PCKRIREE--CKPVISKRYVHADPSDLSLVVKDGYQWRKYGQKVTKDNPCPRAYFRCSFA
AtWRKY40	LCKKQREETVVKESRVYKTEASDTTLVVVKDGYQWRKYGQKVTNRDNPSPRAYFKCACA
OsWRKY71	PACPVKKKVQRSAEDNTILVATYEGEHNGQPPP--PLQSAAQNSDGSAGKPPHAPA
AfABF2	PGCPVKKKVQRSAEDKTIIVATYEGEHNSAPPPAHPPQQDAKNAAKPPQAPVPVPAP-
HvWRKY38	PGCPVKKKVQRSAEDKTIIVATYEGEHNTQPPPSQPPQQNDGSGAGKNAGNGKPPQAP-
AtWRKY40	PSCSVKKKVQRSVEDQSVLVATYEGEHNPMPSPQ-----IDSNNGLNRHISHGGSASTPV
OsWRKY71	AAPPAPVVPHRQHEPVVVNGEQQAAAAS----EMIRRNLAEQMAMTLTRDPSFKAALVTA
AfABF2	HHPPPQQQPKQETVVVVSEETAAAAAS----EMMRNLAEQMAMTLTRDPSFKAALVTA
HvWRKY38	ATPHHPQQQHKQEAADVVSSESAAAAAS----ELIRRNLAEQMAMTLTRDPSFKAALVTA
AtWRKY40	AANRRSSLTVPVTTVDMIESKVTSTSRIDFPQVQKLLVEQMASSLTKDPNFTAALAAA
OsWRKY71	LSGRILELSPTKD--
AfABF2	LSGRILELSPSRDVN
HvWRKY38	LSGRILELSPTRDIN
AtWRKY40	VTGKLYQQNHTEK--

Fig. 2-14 OsWRKY71 およびその homolog のアミノ酸配列のアライメント

トレスに対する防御応答に関与していると考えられている【Mare *et al.*, 2004】。AtWRKY40 も、様々な非生物的なストレスによって発現が誘導されることが明らかになっている【Kamei *et al.*, 2004】。以上のことから、OsWRKY71 はイネの病害応答性反応だけでなく、非生物的なストレスに対する防御応答にも関与している転写因子である可能性が高いと考えられる。さらに、最近 OsWRKY71 はイネの発芽時におけるジベレリンのシグナルの負の調節因子であることが明らかになった【Zhang *et al.*, 2004】。このことから、OsWRKY71 はイネの様々な生理現象に関与している可能性が高く、その時期特異的、部位特異的発現 kinetics の解析が今後必要であると考えられる。

#### 2-4-3 OsWRKY53、OsWRKY71 の核局在性、W-box 結合能、および OsWRKY53、OsWRKY71 のジャスモン酸応答性

GFP を用いた細胞内局在性解析の結果、OsWRKY53、OsWRKY71 はともに核局在性を示した。OsWRKY53、OsWRKY71 のアミノ酸配列内には、核局在性シグナル配列と予想される配列が存在していた。また、実際これまでに、多くの植物種の WRKY 型転写因子の核局在性が示されていることから【Eulgem *et al.*, 1999; Robatzek *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 2002; Deslandes *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Marè *et al.*, 2004】、WRKY ファミリーは植物において主に核内で機能する転写因子であると考えられる。

ゲルシフトアッセイの結果、OsWRKY53、OsWRKY71 は、ともに W-box に特異的に結合することが示された。今回、ゲルシフトのプロープに導入した変異は、TTGAC→TCCTA である。これまでにシロイヌナズナやタバコにおいても WRKY 型転写因子の W-box 特異的な結合能が、変異を導入したプロープを用いたゲルシフトアッセイによって示されているが、多くの場合、その変異は TTGAC→TTGAA の一塩基変異であった【Fukuda, 1997; Yang *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002】。一方、OsWRKY53、OsWRKY71 に対して TTGAC→TTGAA の一塩基変異のプロープを用いたゲルシフトアッセイを行ったところ、シフトバンドは消失しなかった (data not shown)。シロイヌナズナにおいて、TTGAC→TCCTA という変異プロープを用いた例は一件のみ報告されているが【Laloi *et al.*, 2004】、これらのことは、WRKY ファミリーの間に、若干の W-box 認識能の違いがあることを示唆するものであり、今後の検討、解析が必要な部分である。

また、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* はジャスモン酸に対しても応答性を示した。これまでのところ、ジャスモン酸に対して応答性を示す WRKY 型転写因子の報告はない。序論でも述べたが、我々はイネのキチンエリシター誘導におけるファイトアレキシンの生産においてジャスモン酸が重要なシグナルトランスデューサーとして機能していることを明らかにしており【Nojiri *et al.*, 1996】、イネの非特異的な抵抗性反応におけるジャスモン酸の機能、およびイネにおけるジャスモン酸のシグナル伝達経路を解明する上でも非常に興味深い。今後、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の標的遺伝子のジャスモン酸に対する応答性を解析することでイネにおけるジャスモン酸のシグナル伝達経路の一端が明らかになることが期待される。