

第 4 章

OsWRKY71 の機能解析

4-1 緒言

本論文第 2 章において、イネにおけるエリシター応答性 WRKY 型転写因子、OsWRKY53 とともに、OsWRKY71 の cDNA を単離した。本章では、OsWRKY71 の機能解析の一環として、*OsWRKY71* 過剰発現変異株を作製してマイクロアレイ解析を行い、その標的遺伝子のスクリーニングを行った。

4-2 材料と方法

4-2-1 生物試料および培養条件

イネ培養細胞、イネ植物体および DNA 操作に用いた大腸菌の取り扱いは、第 2 章 2-2-1 の方法に準じて行った。

4-2-2 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 操作法は成書の方法に従った【Sambrook and Russell, 2001】。

4-2-3 *OsWRKY71* 過剰発現変異株の作製

OsWRKY71 過剰発現変異株作製のプラスミドとして、第 2 章にて構築した pENOsWRKY71 内の挿入断片を、LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) のプロトコールに従って LR 反応によって pGWB2 に移し替え、pG2OsWRKY71 を得た。

アグロバクテリウムの形質転換、イネの形質転換は、第 3 章 3-2-4 の方法に準じて行った。

4-2-4 イネからの total RNA の抽出

イネ液体培養細胞およびイネ植物体からの total RNA 抽出は、第 2 章 2-2-5 の方法に準じて行った。

4-2-5 ノーザン解析

ノーザン解析に使用するプローブとして、Table 4-2 に示すプライマー (*OsWRKY71* pENTR-F, *OsWRKY71* pENTR-R) と、pTOsWRKY71 をテンプレートとして、PCR に

よって増幅した *OsWRKY71* の ORF 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、³²P で標識した。

ノーザン解析の方法は、第 2 章 2-2-8 の方法に準じて行った。

4-2-6 マイクロアレイ解析 (プローブの調製)

マイクロアレイ解析用プローブのテンプレートとして、*OsWRKY71* 過剰発現株、ベクターコントロールである pGWB2 形質転換株から抽出した total RNA を用いた。これらの total RNA からのプローブの調製は、第 3 章 3-2-7 の方法に準じて行った。以下、Cyanine 3 でラベルしたベクターコントロール cRNA を C: Cy3、*OsWRKY71* 過剰発現株 cRNA を A1: Cy5 または A2: Cy5 と呼ぶことにする。

4-2-7 マイクロアレイ解析 (ハイブリダイゼーション)

Rice Oligo Microarray Kit, G4138A (Agilent) に対し、付属のプロトコールに従ってハイブリダイゼーションを行った。ラベル化 cRNA を *in situ* ハイブリダイゼーションキットプラス (Agilent) をもちいて断片化し、C: Cy3 と A1: Cy5、C: Cy3 と A2: Cy5 の組み合わせでハイブリダイゼーション溶液を調製した。これを、スライドグラスをセットしたチャンバーに注入し、60°C で 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、スライドを洗浄し、N₂ ガスで乾燥させた後、マイクロアレイスキャナー (Agilent) を用いてデータのスキャンを行った。

4-2-8 マイクロアレイ解析 (データ解析)

得られたイメージからのマイクロアレイ結果の解析は、第 3 章 3-2-9 の方法に準じて行った。

Table 4-1 本章で使⽤したプラスミド

Plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
pENOsWRKY71	Km ^r pENTR D-TOPO containing OsWRKY71 ORF	This study
pGWB2	Km ^r Hm ^r CaMV35S Gateway system destination vector	Nakagawa <i>et al.</i> , unpublished data
pG2OsWRKY71	Km ^r Hm ^r pGWB2 containing OsWRKY71 ORF	This study

Table 4-2 本章で使⽤したプライマー

Primer	Sequence
OsWRKY71 pENTR-F	5'-CACCATGGATCCGTGGATTAGCAC-3'
OsWRKY71 pENTR-R	5'-TCAATCCTTGGTCGGCGAGAGCTC-3'

4-3 結果

4-3-1 *OsWRKY71* 過剰発現株 (イネ培養細胞) の作製

OsWRKY71 過剰発現変異株において、ベクターコントロールで形質転換した対照区より mRNA レベルが高い遺伝子があれば、それらの遺伝子の発現活性化に *OsWRKY71* が関与している可能性が高いと考えられる。そこで、*OsWRKY71* の標的遺伝子をスクリーニングする材料として、CaMV35S プロモーターの下流に *OsWRKY71* の ORF を組み込んだプラスミド pG2*OsWRKY71* を用いてイネの培養細胞を形質転換し、*OsWRKY71* 過剰発現株の培養細胞を作製した。対照区として、pGWB2 で形質転換したイネ培養細胞も作製した。N6SE プレート上でのスクリーニングを 2 回行った後、N6 液体培地 (Hm, 30 mg/ml) において最終的なスクリーニングを行った。

得られた *OsWRKY71* 過剰発現株における *OsWRKY71* の過剰発現の確認は、ノーザン解析を用いて行った。継代後 4 日目の培養細胞から total RNA を抽出し、ノーザン解析に供した。ノーザン解析に用いたプローブは、*OsWRKY71* の ORF 部分のみを含むように設計した。ノーザン解析の結果、*OsWRKY71* の過剰発現が、1 ライン (Ox-71c No.4) においてのみ確認された。その他のラインにおいては、過剰発現とまではいかないものの、中程度の発現が認められた (Ox-71c No.1, 2, 3, 5, 6) (Fig. 4-1)。

4-3-2 マイクロアレイ解析による *OsWRKY71* の標的遺伝子のスクリーニング

得られた *OsWRKY71* 過剰発現変異株 1 ライン (Ox-71c No.4) と、*OsWRKY71* の中程度の発現が認められたラインのうち、1 ライン (Ox-71c No.3) から抽出した total RNA をマイクロアレイ解析に供した。対照区として、pGWB2 で形質転換したイネ培養細胞から抽出した total RNA を使用した。マイクロアレイ解析は使用した 2 ラインそれぞれに対し独立して行い、それぞれの結果を比較した。

まず、*OsWRKY71* 過剰発現変異株において、対照区と比較して 2 倍以上発現量が増加しているもののみを選択した。次に、その中からマイクロアレイに供した 2 ライン両方において発現の増加が認められたものを選択した。その結果を Table 4-3 に示す。しかし、Ox-71c No.3 における *OsWRKY71* の発現量が少なかったためか、このスクリ

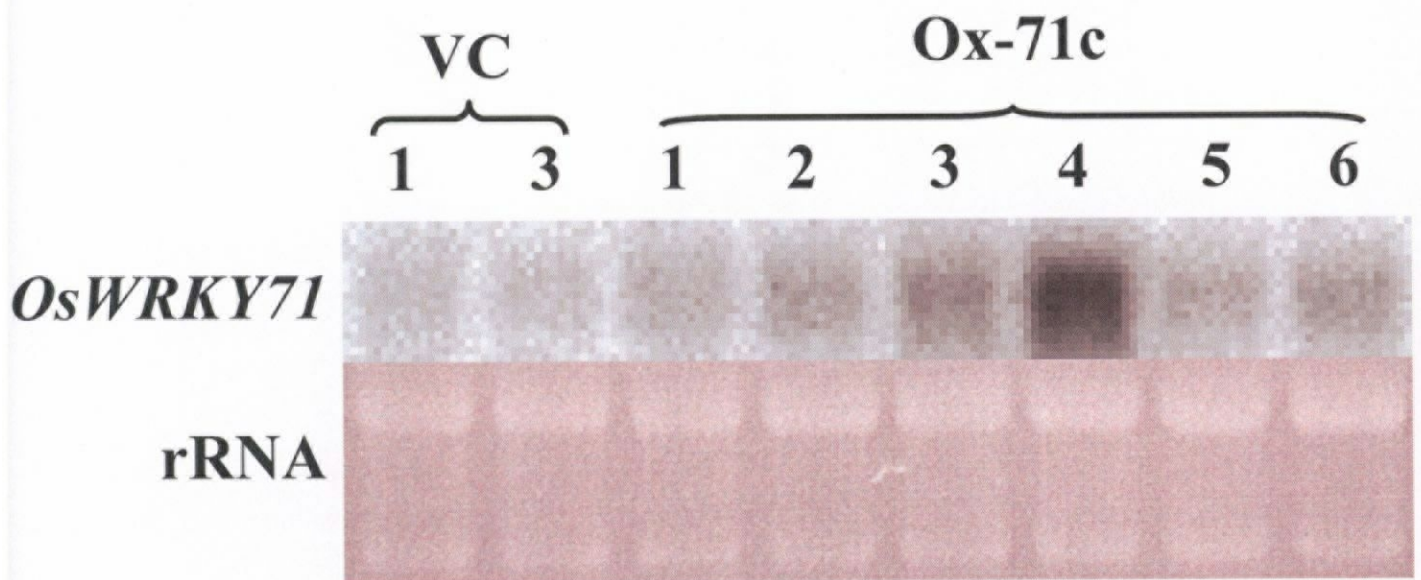


Fig. 4-1 *OsWRKY71* 過剰発現変異株(イネ培養細胞)の確認

VC : vector control

Ox-71c : *OsWRKY71* 過剰発現変異株 (イネ培養細胞)

ーニングによって得られた OsWRKY71 の標的遺伝子の候補は全部で 17 種しか得られなかった。

Table 4-3 マイクロアレイ解析結果

2ラインともに対照区に対して2倍以上発現量の増加が認められたものを選択した。

また、エリシター応答性が認められている遺伝子は赤字で示した。

Rank	Accession	Fold (Red(Cy5)/Green(Cy3))			Description
		Average	No. 4	No. 3	
1	AK064306	6.44	6.28	6.6	Nicotiana tabacum cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylase (CYP94A5)
2	AK060340	6.135	10.18	2.09	O.sativa lipid transfer protein, b21
3	AK063618	5.5	7.52	3.48	Oryza sativa heat shock protein 26
4	AK063368	4.68	7.02	2.34	Arabidopsis thaliana auxin-responsive GH3 homologue
5	AK069347	4.4	3.39	5.41	Wheat initiation factor 1A (eIF-1A)
6	AK063583	4.21	5.02	3.4	Unknown expressed protein
7	AK064436	3.395	3.29	3.5	Glycine max heat shock protein (SB100)
8	AK105599	3.28	4.32	2.24	Oryza sativa DRE-binding protein 1A
9	AK105331	3.245	3.93	2.56	Arabidopsis thaliana At5g12010/F14F18_180
10	AK103295	3.14	3.98	2.3	Oryza sativa class III chitinase homologue (OsChib3H-c),
11	AK071240	3.14	3	3.28	Maize 18kDa heat shock protein
12	AK065160	2.615	3.22	2.01	Unknown expressed protein
13	AK105323	2.445	2.82	2.07	Arabidopsis thaliana At5g12010/F14F18_180
14	AK106404	2.41	2.36	2.46	Arabidopsis thaliana At2g27690/F15K20.21
15	AK099963	2.32	2.25	2.39	Arabidopsis thaliana unknown protein (At4g37300)
16	AK064946	2.31	2.48	2.14	Arabidopsis thaliana At2g46510/F13A10.4
17	AK060058	2.255	2.46	2.05	Unknown expressed protein

4-4 考察

本章では、イネのエリシター応答性 WRKY 型転写因子である *OsWRKY71* の機能解析の一環として、*OsWRKY71* 過剰発現変異株を作製し、マイクロアレイ解析により *OsWRKY71* の標的遺伝子の同定を試みた。

OsWRKY71 の標的遺伝子のスクリーニングは、*OsWRKY71* 過剰発現変異株を 1 ラインと *OsWRKY71* が中程度発現している変異株を 1 ライン、計 2 ライン使用し、まず両方のラインにおいて対照区に対して発現量が 2 倍以上増加している遺伝子群を選択した。また、発現の絶対量が全体的に少ない遺伝子群は、以後の解析で発現量の差を区別することが困難であることから除外した。

第 2 章の結果より、*OsWRKY71* はイネの病害抵抗性反応および非生物的なストレスに対する抵抗性反応に関与している可能性が高いと考えられる。さらに、共同研究先の農水省のグループによる、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【南, 私信】も加味すると、wheat initiation factor 1A の homolog もしくはキチナーゼといった遺伝子が *OsWRKY71* の標的遺伝子である可能性が高いと考えられる。実際、これらの遺伝子群の上流域には、W-box が存在していた。この事実は、上記の仮説を強く支持するものであると考えられる。また、initiation factor *elF1A* は植物において塩ストレス耐性に関与していることが報告されている【Rausell *et al.*, 2003】。

今回、補足実験として、*OsWRKY71* が中程度発現している変異株 Ox-71c No.3 に対し、対照区として、野生株のイネ液体培養細胞を用いたマイクロアレイ解析も行った。前述の *OsWRKY71* 過剰発現変異株のマイクロアレイ解析から得られた遺伝子群と、補足実験の結果得られた遺伝子群の中で、共通に含まれるものを Table 4-4 に示す。この結果はあくまで参考ではあるが、この遺伝子群に含まれるキチナーゼは、キチンエリシター応答性であり、かつ上流域に W-box が 4 個存在していたことから、*OsWRKY71* の標的遺伝子の有力な候補であることが示唆される。今後は、*OsWRKY71* 過剰発現変異株の培養細胞を新たに作製し、各ラインで今回のマイクロアレイ解析で予測された遺伝子群の発現量が増加していることを確認するとともに、これらの遺伝子群が *OsWRKY71* の標的遺伝子であることを確認する必要があると考えている。

Table 4-4 マイクロアレイ解析結果 (補足実験)

Rank	Accession	Fold	Description
1	AK064644	5.05	Arabidopsis thaliana unknown protein
2	AK063959	4.58	Medicago truncatula amt2-like protein
3	AK073267	4.42	Oryza sativa mRNA for class III chitinase homologue (OsChib3H-d),
4	AK061401	4.25	Nicotiana tabacum phi-1
5	AK067007	4.22	Arabidopsis thaliana putative cytochrome P450 protein (At4g19230)
6	AK063832	4.18	Oryza sativa, relating to carbonate stress
7	AK064063	4.1	Elaeis guineensis clone FS1 actin depolymerizing factor
8	AK111852	3.71	Triticum aestivum EF-hand Ca ²⁺ -binding protein CCD1 (ccd1)
9	AK070734	3.66	Oryza sativa xyloglucan endotransglycosylase
10	AK061237	3.66	Arabidopsis thaliana clone 19976
11	AK071798	3.42	Prunus armeniaca pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase
12	AK103526	3.37	Arabidopsis thaliana putative P-glycoprotein,
13	AK107730	2.97	Arabidopsis thaliana unknown protein
14	AK101962	2.96	Arabidopsis thaliana putative pectin methylesterase
15	AK071816	2.9	Arabidopsis thaliana putative phosphoribosylglycinamide synthetase
16	AK069815	2.89	O.sativa novel protein, osr40c1
17	AK071191	2.89	Unknown expressed protein
18	AK071397	2.89	Arabidopsis thaliana unknown protein
19	AK103002	2.88	Unknown expressed protein
20	AK069247	2.87	Arabidopsis thaliana At2g41640/T32G6.16
21	AK101481	2.86	Unknown expressed protein
22	AK099400	2.85	Arabidopsis thaliana unknown protein (At3g22530)
23	AK108282	2.81	Arabidopsis thaliana unknown protein (At1g20823)
24	AK073172	2.79	Arabidopsis thaliana Unknown protein (At2g35680; T20F21.13)
25	AK068181	2.73	Arabidopsis thaliana putative protein (At3g58790)
26	AK066687	2.7	L.esculentum shikimate kinase precursor
27	AK067214	2.67	Juniperus oxycedrus pollen allergen Jun o 4
28	AK111879	2.66	Arabidopsis thaliana putative receptor kinase
29	AK062422	2.64	Oryza sativa putative DRE-binding protein 1B
30	AK101655	2.63	Arabidopsis thaliana unknown protein
31	AK065702	2.61	Unknown expressed protein
32	AK103391	2.56	Arabidopsis thaliana trehalose-6-phosphate phosphatase
33	AK102357	2.55	Glycine max farnesylated protein GMFP5
34	AK063206	2.54	Arabidopsis thaliana unknown protein (At4g17670)
35	AK100965	2.49	Arabidopsis thaliana clone U09474 putative NAD dependent epimerase
36	AK107800	2.46	Unknown expressed protein
37	AK065307	2.44	Arabidopsis thaliana putative arm repeat-containing protein
38	AK070719	2.37	Unknown expressed protein
39	AK067690	2.35	Oryza sativa OsNAC3 protein
40	AK099529	2.33	Arabidopsis thaliana putative arm repeat-containing protein
41	AK063743	2.33	Oryza sativa (japonica cultivar-group) EL2
42	AK068934	2.3	Arabidopsis thaliana clone 19721
43	AK073470	2.27	Oryza sativa chitin-inducible gibberellin-responsive protein (GIGR2)
44	AK063795	2.22	Unknown expressed protein
45	AK101245	2.2	Arabidopsis thaliana putative trehalose 6-phosphate synthase
46	AK068312	2.19	Zea mays DRE binding factor 1 (dbf1)

Table 4-4 マイクロアレイ解析結果 (補足実験) (続き)

Rank	Accession	Fold	Description
47	AK107370	2.18	<i>Linum usitatissimum</i> secreted glycoprotein
48	AK106493	2.17	Unknown expressed protein
49	AK108944	2.14	<i>Musa acuminata</i> calmodulin-like protein
50	AK065739	2.13	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i> cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase
51	AK109445	2.13	<i>Arabidopsis thaliana</i> At2g16590/F1P15.3
52	AK062460	2.11	Unknown expressed protein
53	AK107951	2.09	Unknown expressed protein
54	AK108245	2.07	<i>Arabidopsis thaliana</i> At1g28600/F1K23_6
55	AK071321	2.04	<i>Arabidopsis thaliana</i> AT3g11930/MEC18.3
56	AK065552	2.03	<i>Arabidopsis thaliana</i> cell wall protein SEB1
57	AK101393	2.03	<i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (At5g64550)
58	AK067080	2.03	Unknown expressed protein
59	AK109131	2.03	Unknown expressed protein
60	AK101787	2.03	<i>Z.mays</i> annexin p35
61	AK067761	2.02	<i>Arabidopsis thaliana</i> clone 124385
62	AK073462	2	Unknown expressed protein

第5章

総括と展望

本研究は、イネにおけるエリシター誘導のシグナル伝達経路を解明する研究の一環として、イネのエリシター応答性 WRKY 型転写因子を単離し、機能解析を行ったものである。

第2章において、イネのエリシター応答性 WRKY 型転写因子、OsWRKY53、OsWRKY71 を単離し、OsWRKY53、OsWRKY71 がキチンオリゴマーやスフィンゴリピドなどの非特異的エリシターや、イモチ病菌感染に対する応答性があることをノーザン解析を用いて明らかにした。この結果は、OsWRKY53、OsWRKY71 がイネの病害抵抗性反応に関与している可能性が高いことを示している。また、OsWRKY53、OsWRKY71 が核局在性の転写因子であることを GFP を用いたレポータージーンアッセイを用いて明らかにした。さらに、OsWRKY53、OsWRKY71 が W-box を特異的に認識して結合することをゲルシフトアッセイを用いて明らかにした。

第3章において、OsWRKY53 過剰発現変異株を作製し、マイクロアレイ解析を行うことで、OsWRKY53 の標的遺伝子の候補を絞り込みを行った。選抜された標的遺伝子候補の中から、イネの病害抵抗性反応に関与していると考えられる、PR タンパク質遺伝子 (3 種) および WRKY 型転写因子遺伝子 (2 種) を選び、さらに解析を行った。また、これらの 5 種の候補遺伝子群のキチンエリシターに対する発現 kinetics と OsWRKY53 のキチンエリシターに対する発現 kinetics を Real-Time RT-PCR を用いて解析し、それらのキチンエリシターに対する発現ピークが OsWRKY53 のキチンエリシターに対する発現ピークよりも 1 時間程遅れているか、またはほぼ同様であることを明らかにした。さらに、OsWRKY53 過剰発現変異株が親和性のイモチ病菌に対して抵抗性を獲得したことを明らかにした。以上の結果は、OsWRKY53 がイネの病害抵抗性反応に関与しているという前述の仮説を支持するものであると考えられる。

第4章において、OsWRKY71 過剰発現変異株を作製し、マイクロアレイ解析を行うことで、OsWRKY71 の標的遺伝子の候補の絞り込みを行った。マイクロアレイ解析

の結果、PR タンパク質遺伝子などのイネの病害抵抗性反応に関与すると考えられる複数の遺伝子の発現量の増加が認められていることから、OsWRKY71 もイネの病害抵抗性反応に関与している可能性が高いと考えられる。

すでに述べたように、パセリにおいてクロマチン免疫沈降法によって、パセリの WRKY 型転写因子である PcWRKY1 が、エリシター処理時にその標的遺伝子である *PcPRI* の上流域および *PcWRKY1* 自身の上流域に存在する W-box に結合していることが示された。さらに、PcWRKY1 が結合していないときは、その他の WRKY 型転写因子がその W-box に結合していることが明らかになった【Turck *et al.*, 2004】。パセリにおいて、*PcWRKY1* の発現誘導には、翻訳後のリン酸化や、MAP キナーゼカスケードの活性化が必要であることが示されている【Kroj *et al.*, 2003】。また、このシグナル伝達経路に関与する MAP キナーゼ、PcMPK3a/b および PcMPK6 がエリシター処理時に核内に局在し、エリシターシグナルを正に制御していることが明らかになっている【Lee *et al.*, 2004】。現在、そのような MAP キナーゼが、PsWRKY1 の結合配列に結合している何らかの WRKY 型転写因子を修飾し、その配列から乖離させることで PcWRKY1 の結合を促進し、エリシターのシグナルを下流に伝える、というモデルが提唱されている (Fig. 5-1)。

一方、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の上流域を解析した結果、それぞれの上流域に複数の W-box が存在していることが明らかになった (Fig. 5-2)。これは、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* 自身も他の WRKY 型転写因子によってその発現を制御されている可能性が高いことを示している。また、イネにおいて、複数の MAP キナーゼがエリシターで誘導されることが明らかにされていること【Agrawal, 2003】、および病害抵抗性に関与する MAP キナーゼが単離されていることから【Lee *et al.*, 2004; Cheong *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2002】、イネにおいてもパセリやシロイヌナズナ、およびタバコと同様に、エリシターのシグナルが MAP キナーゼカスケードを介して WRKY 型転写因子を含む下流の転写因子に伝えられ、病害抵抗性反応を引き起こしている可能性が高いと考えられる。今後は、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の発現を制御している他の WRKY 型転写因子や MAP キナーゼの同定などの、*OsWRKY53*、*OsWRKY71* の上流の解析が必要であると考えている。また、キチンオリゴマーやスフィンゴリピドなどのエリシターの受容体の単離も待たれるところである。

また、本論文のマイクロアレイ解析によって絞り込まれた遺伝子群の上流域には、

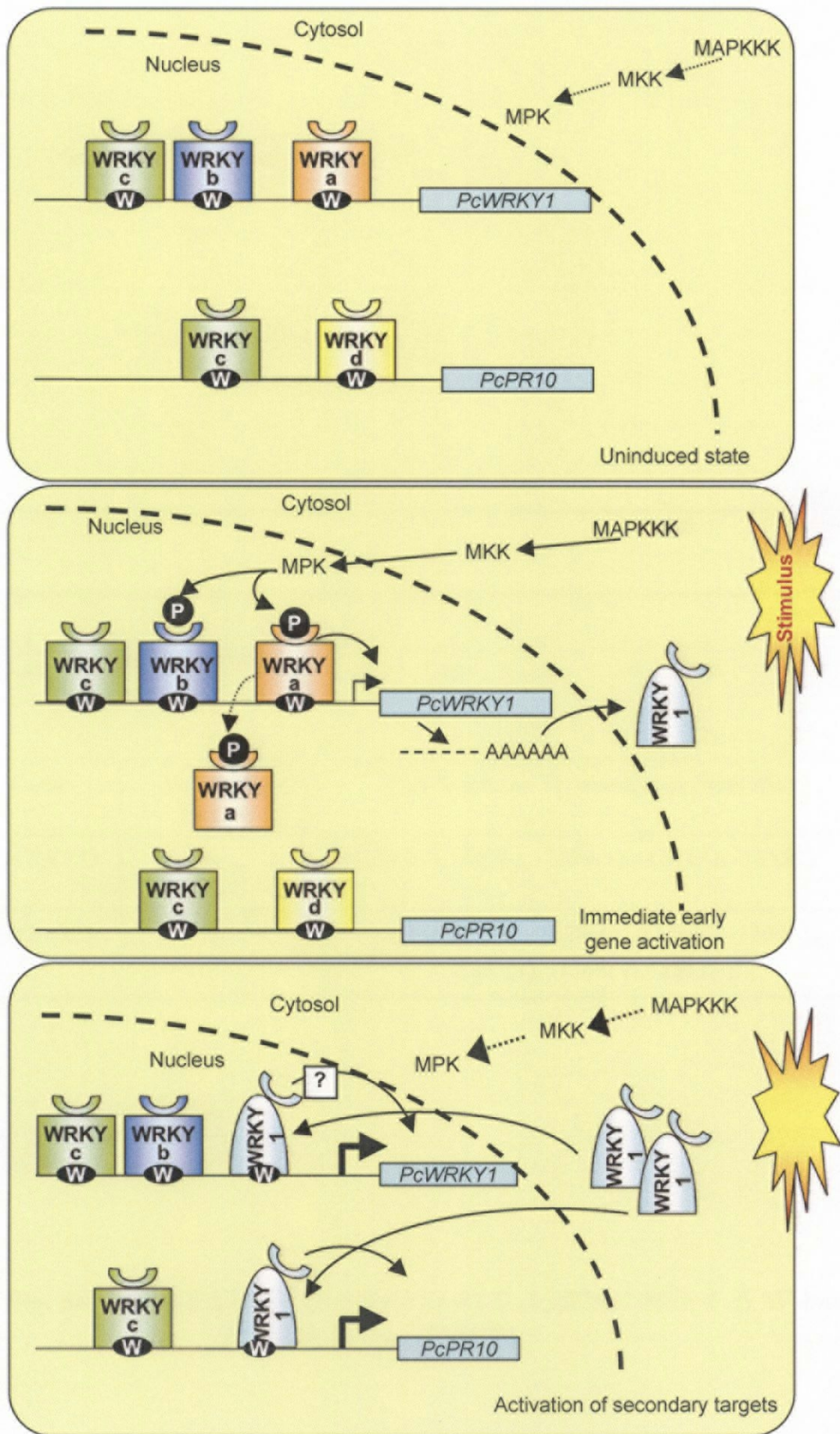
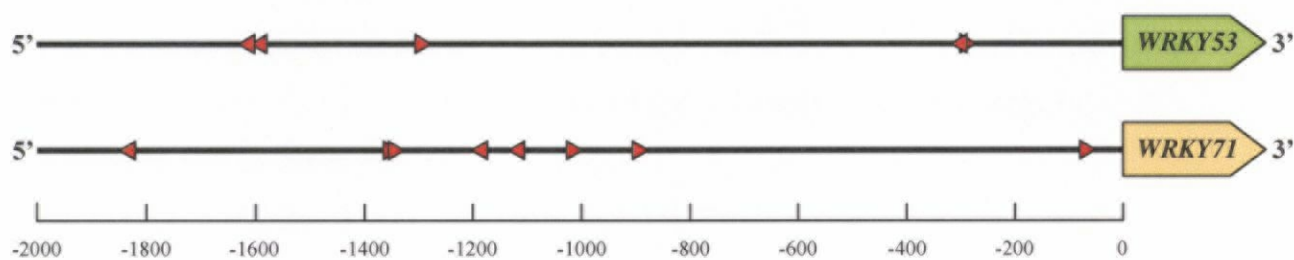


Fig. 5-1 パセリにおける WRKY 型転写因子の転写制御モデル



Gene	No. of W-boxes	Position from Transcription Start Site
<i>OsWRKY53</i>	5	-303(+), -320(-), -1309(+), -1611(-), -1633(-)
<i>OsWRKY71</i>	8	-82(+), -907(+), -1029(+), -1136(-), -1204(-), -1357(+), -1366(+), -1851(-)

Fig. 5-2 *OsWRKY53*、*OsWRKY71* の 5' 上流域に存在する W-box (矢印は W-box を表す)

W-box が複数存在していた。今後は、OsWRKY53、OsWRKY71 が標的遺伝子群の上流域の W-box にエリシター処理時に結合していることをクロマチン免疫沈降法を用いて示す必要があると考えている。さらに、OsWRKY53 の標的遺伝子の候補として、*OsWRKY1*、*OsWRKY28* が得られた。前述したように、これらの遺伝子の上流域には W-box が複数存在していたが、シロイヌナズナにおいても、多くの WRKY 型転写因子遺伝子の上流域に W-box が複数存在することが示されている【Dong *et al.*, 2003】。さらに、パセリやシロイヌナズナにおいて、WRKY 型転写因子の標的遺伝子の候補としていくつかの WRKY 型転写因子遺伝子が報告されていることから【Eulgem *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004】、植物において、WRKY カスケードのようなシグナル伝達経路が存在する可能性が考えられる。WRKY 型転写因子の下流のシグナル伝達経路はほとんどあきらかになっていないことから、OsWRKY1、OsWRKY28 の標的遺伝子のスクリーニングも今後の課題であると考えている。

以上のような研究を通して、イネの病害抵抗性反応のメカニズムの全貌が明らかになることが期待される。

参考文献

Agrawal, G.K., Iwahashi, H., and Rakwal, R. (2003). Rice MAPKs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 171-180.

Akimoto-Tomiyama, C., Sakata, K., Yazaki, J., Nakamura, K., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sasaki, T., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Shibuya, N., and Minami, E. (2003). Rice gene expression in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor: comprehensive analysis by DNA microarray with randomly selected ESTs. *Plant Mol. Biol.* **52**, 537-551.

Apostol, I., Heinstein, P. F. and Low, P. S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* **90**, 109-116.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.

Bell, A. A. (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 21-81

Beyer, K., Binder, A., Boller, T., and Collinge, M. (2001). Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.* **2**, 125-134.

Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.

Bradley, D. J., Kjellbom, P. and Lamb, C. J. (1992) Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21-30.

Chen, C., and Chen, Z. (2000). Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **42**, 387-396.

Chen, C., and Chen, Z. (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. *Plant Physiol.* **129**, 706-716.

Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., and Cho, M.J. (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* **132**, 1961-1972.

Cho, E.M., Okada, A., Kenmoku, H., Otomo, K., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Yajima, A., Yabuta, G., Mori, K., Oikawa, H., Toshima, H., Shibuya, N., Nojiri, H., Omori, T., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2004). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding ent-cassa-12,15-diene synthase, a putative diterpenoid phytoalexin biosynthetic enzyme, from suspension-cultured rice cells treated with a chitin elicitor. *Plant J.* **37**, 1-8.

Cormack, R.S., Eulgem, T., Rushton, P.J., Kochner, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E. (2002). Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 92-100.

Degouseé, N., Triantaphylides, C. and Motillet, J-L. (1994) Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* **104**, 945-952.

Dellagi, A., Helibronn, J., Avrova, A.O., Montesano, M., Palva, E.T., Stewart, H.E., Toth, I.K., Cooke, D.E., Lyon, G.D., and Birch, P.R. (2000). A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **13**, 1092-1101.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y. (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**,

2404-2409.

Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 8024-8029.

Dixon, R.A., Harrison, M.J., and Lamb, C.J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopath.* **32**, 479-501.

Dong, J., Chen, C., and Chen, Z. (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* **51**, 21-37.

Du, L., and Chen, Z. (2000). Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 837-847

Ebel, J. , and Cosio, E.G. (1994). Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **148**, 1-33.

Ebel, J., Bhagwat, A. A., Cosio, E. G., Feger, M., Kissel, U., Mithofer, A. and Waldmuller, T. (1995) Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response. *Can. J. Bot.* **73**, S506-S510.

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.

Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo J.* **18**, 4689-4699.

Farmer, E. E., Moloshok, T. D., Saxton, M. J. and Ryan, C. A. (1991) Oligosaccharide signaling in plants: Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**, 3140-3145.

Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.

Fukuda, Y. (1997). Interaction of tobacco nuclear protein with an elicitor-responsive element in the promoter of a basic class I chitinase gene. *Plant Mol. Biol.* **34**, 81-87.

Hejgaard, J., Jacobsen, S., Bjorn, S.E., and Kragh, K.M. (1992). Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf. *FEBS Lett.* **307**, 389-392.

Hennig, J., Dewey, R.E., Cutt, J.R., and Klessig, D.F. (1993). Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a beta-1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **4**, 481-493.

Hinderhofer, K., and Zentgraf, U. (2001). Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**, 469-473.

Hood, E.E. (1993). New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* **2**, 208-218.

Huang, T., and Duman, J.G. (2002). Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol. Biol.* **48**, 339-350.

Ishiguro, S., and Nakamura, K. (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and

beta-amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 563-571.

Kamei, A., Seki, M., Fujita, M., Toh, T., and Shinozaki, K. (2004). Functional analysis of a stress-inducible gene, *WRKY40*, in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **45**, S91.

Kim, C.Y., and Zhang, S. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.* **38**, 142-151.

Kim, C.Y., Lee, S.H., Park, H.C., Bae, C.G., Cheong, Y.H., Choi, Y.J., Han, C., Lee, S.Y., Lim, C.O., and Cho, M.J. (2000). Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 470-474.

Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M., and Ogasawara, N. (1998). Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 31985-31991.

Kroj, T., Rudd, J.J., Nurnberger, T., Gabler, Y., Lee, J., and Scheel, D. (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* **278**, 2256-2264.

Laloi, C., Mestres-Ortega, D., Marco, Y., Meyer, Y., and Reichheld, J.P. (2004). The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.* **134**, 1006-1016.

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.

Lee, D.E., Lee, I.J., Han, O., Baik, M.G., Han, S.S., and Back, K. (2004a). Pathogen resistance of transgenic rice plants expressing mitogen-activated protein kinase 1, MK1, from *Capsicum annuum*. *Mol. Cells* **17**, 81-85.

Lee, J., Rudd, J.J., Macioszek, V.K., and Scheel, D. (2004b). Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. *J. Biol. Chem.* **279**, 22440-22448.

Legendre, L., Yueh, Y. G., Crain, R., Haddock, N., Heinstein, P. F. and Low, P. S. (1993) Phospholipase-C activation during elicitation of the oxidative burst plant cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 24559-24563.

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.

Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2004). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **38**, 800-809.

Loake, G.J., Faktor, O., Lamb, C.J., and Dixon, R.A. (1992). Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 9230-9234.

Lorito, M., Woo, S.L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 7860-7865.

Lusso, M. and Kuc, J. (1999) Plant responses to pathogens. Profigen Inc., Lexington, Kentucky. pp.683-706.

Maleck, K., Levin, A., Eulgem, T., Morgen, A., Schmid, J., Lawton, K., Dangl, J.L., and Dietrich, R.A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.*

26, 403-410.

Mare, C., Mazzucotelli, E., Crosatti, C., Francia, E., Stanca, A.M., and Cattivelli, L. (2004). Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol. Biol.* **55**, 399-416.

Mathieu, Y., Kurkdijan, A., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, M., O'Neil, M., Albersheim, P. and Darvil, A. (1991) Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J.* **1**, 333-343.

Mehdy, M. C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**, 467-472.

Menke, F.L., Champion, A., Kijne, J.W., and Memelink, J. (1999). A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *Embo J.* **18**, 4455-4463.

Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* **135**, 1113-1128.

Nemoto, T., Cho, E.M., Okada, A., Okada, K., Otomo, K., Kanno, Y., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Minami, E., Shibuya, N., Nishiyama, M., Nojiri, H., and Yamane, H. (2004). Stemar-13-ene synthase, a diterpene cyclase involved in the biosynthesis of the phytoalexin oryzalexin S in rice. *FEBS Lett.* **571**, 182-186.

Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F., 3rd, and Dangl, J.L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 579-609.

Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.Y., Shibuya, N., and Minami, E. (1999). Regulation of

the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Mol. Biol.* **39**, 907-914.

Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N., and Omori, T. (1996). Involvement of Jasmonic Acid in Elicitor-Induced Phytoalexin Production in Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Physiol.* **110**, 387-392.

Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.

Okamuro, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., and Jofuku, K.D. (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7076-7081.

Otomo, K., Kenmoku, H., Oikawa, H., Konig, W.A., Toshima, H., Mitsuhashi, W., Yamane, H., Sassa, T., and Toyomasu, T. (2004a). Biological functions of ent- and syn-copalyl diphosphate synthases in rice: key enzymes for the branch point of gibberellin and phytoalexin biosynthesis. *Plant J.* **39**, 886-893.

Otomo, K., Kanno, Y., Motegi, A., Kenmoku, H., Yamane, H., Mitsuhashi, W., Oikawa, H., Toshima, H., Itoh, H., Matsuoka, M., Sassa, T., and Toyomasu, T. (2004b). Diterpene cyclases responsible for the biosynthesis of phytoalexins, momilactones A, B, and oryzalexins A-F in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2001-2006.

Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., and Parker, J.E. (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.

Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Sela-Buurlage, M.B., van den Elzen, P.J., Melchers, L.S., and

Cornelissen, B.J. (1994). A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol.* **104**, 109-118.

Rausell, A., Kanhonou, R., Yenush, L., Serrano, R., and Ros, R. (2003). The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *Plant J.* **34**, 257-267.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and Yu, G. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.

Rizhsky, L., Liang, H., and Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **130**, 1143-1151.

Robatzek, S., and Somssich, I.E. (2001). A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* **28**, 123-133.

Robatzek, S., and Somssich, I.E. (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* **16**, 1139-1149.

Rushton, P.J., Macdonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M., and Hooley, R. (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol. Biol.* **29**, 691-702.

Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *Embo J.* **15**, 5690-5700.

Samac, D.A., and Shah, D.M. (1994). Effect of chitinase antisense RNA expression on disease

susceptibility of Arabidopsis plants. *Plant Mol. Biol.* **25**, 587-596.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanchez-Ballesta, M.T., Lluch, Y., Gosalbes, M.J., Zacarias, L., Granell, A., and Lafuente, M.T. (2003). A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta* **218**, 65-70.

Song, F., and Goodman, R.M. (2002). OsBIMK1, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance responses. *Planta* **215**, 997-1005.

Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., and Jones, J.D. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**, 661-667.

Strompen, G., Gruner, R., and Pfitzner, U.M. (1998). An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **37**, 871-883.

Sugimoto, K., Takeda, S., and Hirochika, H. (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell* **12**, 2511-2528.

Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Boren, M., Ahlandsberg, S., and Jansson, C. (2003). A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* **15**, 2076-2092.

Suzuki, K., Suzuki, N., Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (1998). Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting. *Plant J.* **15**, 657-665.

Tabei, Y., Kitade, S., Nishizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, T., and Akutsu, K. (1998).

Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cineria*). *Plant Cell Rep.* **17**, 159-164.

Takahashi, A., Kawasaki, T., Wong, H.L., Suharsono, U., Hirano, H., and Shimamoto, K. (2003). Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant *cdr1*. *Plant Physiol.* **132**, 1861-1869.

Takemoto, D., Yoshioka, H., Doke, N., and Kawakita, K. (2003). Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. *Plant Physiol.* **118**, 545-553.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.

Thomma, B., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15107-15111.

Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., and Broekaert, W.F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **121**, 1093-1102.

Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V., and Vera, P. (1997). Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 624-634.

Turck, F., Zhou, A., and Somssich, I.E. (2004). Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene *PcPR1-1* in Parsley. *Plant Cell* **16**, 2573-2585.

Umemura, K., Ogawa, N., Koga, J., Iwata, M., and Usami, H. (2002). Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* **43**, 778-784.

Van Damme, E.J., Charels, D., Roy, S., Tierens, K., Barre, A., Martins, J.C., Rouge, P., Van Leuven, F., Does, M., and Peumans, W.J. (1999). A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. *Plant Physiol.* **119**, 1547-1556.

van der Fits, L., and Memelink, J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**, 295-297.

Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S., Rottiers, P., Slooten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M., Inze, D., and Van Breusegem, F. (2003). A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 16113-16118.

Wan, J., Zhang, S., and Stacey, G. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in Arabidopsis by chitin. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 125-135.

Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., and Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1073-1084.

Wen, N., Chu, Z., and Wang, S. (2003). Three types of defense-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. *Mol. Genet. Genomics* **269**, 331-339.

Whiteham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115.

Xiang, C., Miao, Z.H., and Lam, E. (1996). Coordinated activation of as-1-type elements and a tobacco

glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol. Biol.* **32**, 415-426.

Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., and Akatsuka, T. (1993). Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetyl-chitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 405-409.

Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., and Shibuya, N. (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell* **12**, 817-826.

Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., and Chen, Z. (1999). A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J.* **18**, 141-149.

Yang, Y., and Klessig D.F. (1996) Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14972-14977.

Yoda, H., Ogawa, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T., and Sano, H. (2002). Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 154-161.

Yoshikawa, M., Keen, N. T. and Wang M. C. (1983) A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. *Plant Physiol.* **73**, 497-506.

Yoshikawa, M., Yamaoka, N. and Takeuchi, Y. (1993) Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiol.* **34**, 1163.

Yu, D., Chen, C., and Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins

in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* **13**, 1527-1540.

Zhang, Z.L., Xie, Z., Zou, X., Casaretto, J., Ho, T.H., and Shen, Q.J. (2004). A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiol.* **134**, 1500-1513.

Zhu, X.F., Suzuki, K., Saito, T., Okada, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H., and Kawamukai, M. (1997). Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Mol. Biol.* **35**, 331-341.

瀬尾茂美 大橋祐子 (2003) ジャスモン酸類と遺伝子発現、シグナル伝達 植物の生長調節 **38**, 84-97

梅村賢司 古賀仁一郎 (2003) スフィンゴ脂質型エリシター “セレブロシド” の作用 糸状菌由来セレブロシドのイネに対するエリシター作用 植物の生長調節 **38**, 229-239

仲下英雄 安田美智子 (2004) 全身獲得病害抵抗性と植物ホルモン 植物の生長調節 **39**, 203-213

岩淵雅樹 岡田清孝 島本功 編 (2000) モデル植物ラボマニュアル 分子遺伝学・分子生物学的実験法 シュプリンガー・フェアラーク東京

岩淵雅樹 篠崎一雄 編 (2001) 植物ゲノム機能のダイナミズム 転写因子による発現制御 シュプリンガー・フェアラーク東京

大槻義彦 (1990) 実験映像マニュアル イネ・プロトプラスト培養系解説 社団法人 農産技術情報協会

島本功 岡田清孝 (2001) 新版 モデル植物の実験プロトコール 遺伝学的手法からゲノム解析まで 秀潤社

島本功 渡辺雄一郎 柘植尚志 (2004) 新版 分子レベルからみた植物の耐病性 ポストゲノム時代の植物免疫研究 秀潤社

杉山昌弘 (1989) クローニングとシーケンス 植物バイオテクノロジー 実験マニュアル 農村文化社

福田裕穂 町田泰則 神谷勇治 柿本辰男 (2004) 新版 植物ホルモンのシグナル伝達 生理機能からクロストークへ 秀潤社

福田裕穂 町田泰則 神谷勇治 服部東穂 (1998) 植物ホルモンのシグナル伝達 生合成から生理機能へ 秀潤社

山田哲治 島本功 渡辺雄一郎 (1997) 分子レベルからみた植物の耐病性 植物と病原菌の相互作用に迫る 秀潤社

岡田敦 (2004) イネのファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子の機能と発現制御機構に関する研究 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 修士論文

傍嶋宏行 (2004) イネにおける 12-oxophytodienoic acid 還元酵素遺伝子の機能と発現制御機構 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 博士論文

Appendix-A アグロバクテリウムの形質転換法

1: コンピテントセルの調製 (Sucrose 法)

- 1) 1%寒天培地 (LB 培地) にアグロバクテリウムのグリセロールストックをスプレッドし、28°Cで2日間培養する。
- 2) 得られたシングルコロニーを2 ml LB 培地に植菌し、28°Cで1~2日間培養する。
- 3) LB 培地 10 ml に前培養液を100 ml 植菌し、28°Cで $OD_{600}=0.5\sim 0.7$ になるまで振とう培養する。
- 4) 3000 rpm、4°Cで10 min 遠心し、上清を捨てる。次に氷冷 0.3 M Sucrose を1 ml 加え、ピペッティングで混ぜる。
- 5) 3000 rpm、4°Cで10 min 遠心し、上清を捨て、氷冷 0.3 M Sucrose を1 ml 加える。この操作を3回繰り返す。
- 6) 3000 rpm、4°Cで10 min 遠心し、上清を捨てる。次に氷冷 0.5 M Sucrose を350 μ l 加え、ピペッティングで混ぜる。
- 7) 100 μ l ずつ分注し、エレクトロポレーションに使用する。

2: 形質転換 (エレクトロポレーション法)

- 1) あらかじめキュベット (cuvette gap; 0.2 cm) を冷却しておく。
- 2) Sucrose 法で調製したコンピテントセルに、プラスミド DNA 溶液を1 μ l (>0.2~0.5 μ g/ml) 加える。
- 3) 濁液をキュベットに移し、キュベット内の泡を抜く。
- 4) Gene Pulser を以下の条件に合わせる、パルスをかける。
抵抗 (resistor): 200 Ω 、電気容量 (capacitor): 25 μ F、電圧 (voltage): 2.5 kV
- 5) SOC 培地を1 ml 加える。
- 6) 28°Cで1時間、振とう培養を行う。
- 7) 適当な抗生物質を含む LB プレートにスプレッドし、28°Cで2日間培養する。

Appendix-B イネの形質転換法

1 : 完熟種子からのカルス誘導

- 1) 完熟種子の中から形・色などが正常なものを選抜し、100~150粒を小型粉すり器にかける。
- 2) 50 ml 容のファルコンチューブに粉を取り除いた種子を入れ、70% エタノールを加えて軽く振とうする。
- 3) 70% エタノールを捨て、20% 次亜塩素酸溶液を加えて1時間振とうする。
- 4) 次亜塩素酸溶液を捨て、滅菌水を加えて軽く振ったのち、滅菌水を捨てる。このすすぎ洗いを4回ほど繰り返す。
- 5) すすぎ液を捨て、種子をピンセットでカルス誘導培地（2N6 培地、12 穴角形シャーレ）に、1穴に種子を2粒ずつ置き、ふたをしてビニールテープを巻く。
- 6) 28°C、暗所で4~6週間培養する。
- 7) 4~6週間培養すると胚盤がカルス化し、黄色化したシュートが伸びてくる。胚盤由来のカルスの中で、直径が2~3 mm ぐらいで数個がこぼれ落ちているようなもののみをピンセットでつまみ、新しい2N6 培地に移動して、28°C、暗所で3日間培養する。

2 : アグロバクテリウム懸濁液の準備

- 1) アグロバクテリウムのグリセロールストックを取り出し、白金耳で抗生物質を入れた AB 培地に塗り広げる。
- 2) 22°C、暗所で3日間培養する。
- 3) 15 ml 容のファルコンチューブに、MS 培地を2 ml 加える。2) で準備したアグロバクテリウムを、ピンセットで培地表面からかき集めて加える。チューブをよく振り、アグロバクテリウムを懸濁する。
- 4) 分光光度計を用いてアグロバクテリウム懸濁液の OD_{600} を測定し、0.1以下であることを確認する。

3 : アグロバクテリウムの接種

- 1) 9 cm シャーレに MS 培地を9 ml 加え、培養したイネ培養細胞を加える。

- 2) アセトシリンゴンを 50 μ l 加える。
- 3) アグロバクテリウム懸濁液を 1 ml 加え、ときどき混ぜながら 3 分間おく。
- 4) アグロバクテリウム液をピペットマンを用いて取り除く。
- 5) アグロバクテリウム懸濁液を取り除いたカルスを共存培養培地 (N6CO 培地) にピンセットで置き、22°C、暗所で 2~3 日間培養する。

4 : アグロバクテリウムの除菌と形質転換カルスの選抜

- 1) 50 ml 容のファルコンチューブに共存培養したカルスをピンセットで移し、滅菌水を 40 ml ほど加え、おだやかに混ぜたのちに滅菌水を捨て、アグロバクテリウムを洗い落とす。この操作を 5 回繰り返したのち、500 μ g/ml クラフォランを加えた滅菌水を 40 ml ほど加え、同様の洗浄を行う。
- 2) ファルコンチューブの中のカルスを選択培地 (N6SE 培地) の上に置く。シャーレにサージカルテープを巻き、28°C、暗所で 3~4 週間培養する。
- 3) 培養 3 週間後、形質転換してハイグロマイシンに耐性となったカルスとハイグロマイシンに感受性のカルスが区別できるようになる。
- 4) 培養 3~4 週間後、形質転換してハイグロマイシン耐性となったカルスを再分化培地 (MSRE 培地、12 穴角形シャーレ) に移す。1 穴にカルスを 1 個ずつ置き、ふたをしてサージカルテープを巻く。その後、28°C、16 時間明期 (4000~5000 ルクス) - 8 時間暗期で 2 週間培養する。

5 : 形質転換カルスからの植物の再生と形質転換植物の育成

- 1) 再分化培地 (MSRE 培地) に置いたカルスは、2~3 週間後、新しい MSRE 培地に置き換え、同様の条件で培養を続ける。
- 2) さらに 2~3 週間後、カルスを再分化培地 (R2R 培地) に置き換え、同様の条件で 3~4 週間培養する。
- 3) 再分化した幼植物を発根培地 (MSRT 培地、マジエンタ) に移し、同様の条件で 1~2 週間培養する。
- 4) マジエンタの中で十分伸長した植物を取り出し、水道水で根に付着した寒天培地を十分取り除く。マジエンタに土を入れたものに植物を植え付け、ビニール袋でマジエンタを覆って湿度を保ち、同様の条件で 1~2 週間培養する。植物が大きく

なってきたら、ビニール袋の先をハサミで切って湿度を外界と同じレベルにする。

5) ポットに土を入れたものに植物を植え付け、閉鎖系温室の中で育成する。

Table B-1 アグロバクテリウム培養培地の作製手順

培地名	AB 培地
無機塩	AB 無機塩
バッファー	AB バッファー
糖類	5.5 mg/ml スクロース
pH	pH 7.2
寒天	6.0 mg/ml アガロース
抗生物質など	(Agarose Type 1, Shigma 社 オートクレーブ後、ハイグロマイシン
添加手順	50 µg/ml を加えて分注

各基本培地の組成は、Table B-3 参照。

Table B-2 イネの培地の作製手順

培地名	カルス誘導培地 (2N6 培地)	共存培地 (N6CO 培地)	選択培地 (N6SE 培地)	再分化培地 (MSRE 培地)	再分化培地 (R2R 培地)	発根培地 (MSRT 培地)
無機塩	N6 (マクロエレメント、 ミクロエレメント、鉄) N6 ビタミン	N6 (マクロエレメント、 ミクロエレメント、鉄) N6 ビタミン	N6 (マクロエレメント、 ミクロエレメント、鉄) N6 ビタミン	MS (マクロエレメント、 ミクロエレメント、鉄) MS ビタミン	R2R (マクロエレメント、 ミクロエレメント、鉄) MS ビタミン	MS (マクロエレメント、 ミクロエレメント、鉄) MS ビタミン
有機物	1.0 mg/ml カザミノ酸	30.0 mg/ml スクロース	1.0 mg/ml カザミノ酸	30.0 mg/ml スクロース	30.0 mg/ml スクロース	30.0 mg/ml スクロース
糖類	30.0 mg/ml スクロース	10.0 mg/ml グルコース	30.0 mg/ml スクロース	30.0 mg/ml ソルビトール	30.0 mg/ml ソルビトール	30.0 mg/ml スクロース
植物ホルモン	3 µg/ml 2,4-D	3 µg/ml 2,4-D	3 µg/ml 2,4-D	1 µg/ml NAA 2 µg/ml BAP	1 µg/ml NAA 2 µg/ml BAP	
pH	pH 5.8	pH 5.2	pH 5.8	pH 5.8	pH 5.8	pH 5.8
寒天	8.0 mg/ml アガロース	6.0 mg/ml アガロース	6.0 mg/ml アガロース	8.0 mg/ml アガロース	10.0 mg/ml アガロース	8.0 mg/ml アガロース
抗生物質など		オートクレーブ後、 アセトシリンゴンを 200 µg/ml を加える	オートクレーブ後、 クラフトラン 100 µg/ml、 ハイグロマイシン 50 µg/ml を加える	オートクレーブ後、 クラフトラン 100 µg/ml、 ハイグロマイシン 30 µg/ml を加える	オートクレーブ後、 クラフトラン 100 µg/ml を加える	
添加手順						

各基本培地の組成は Table B-3 参照。
2,4-D: 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸, NAA: 1-ナフトalen酢酸, BAP: 6-ベンジルアミノプリン。 難水溶性なので、少量の弱アルカリ液、ジメチルスルホキシド
あるいはエタノールで溶かしてから蒸留水を加える。
アガロース: Agarose Type 1 (Sigma 社)

Table B-3 アグロバクテリウム培養培地とイネの培地の組成

AB 培地	mg/ml (最終濃度)		
AB 無機塩			
NH ₄ Cl	1		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3		
KCl	0.15		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.0012		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0025		
AB バッファー			
K ₂ HPO ₄	3		
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.15		
	N6 培地	MS 培地	R2R 培地
	μg/ml (最終濃度)	μg/ml (最終濃度)	μg/ml (最終濃度)
マクロエレメント			
KNO ₃	2830	1900	4000
NH ₄ NO ₃	—	1650	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	—	335
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	370	250
CaCl ₂ · 2H ₂ O	166	440	150
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	—	—	273
KH ₂ PO ₄	400	170	—
ミクロエレメント			
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4.4	22.3	1.6
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.5	8.6	2.2
H ₃ BO ₃	1.6	6.2	6
KI	0.8	0.83	—
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	—	0.25	—
CoCl ₂ · 6H ₂ O	—	0.025	—
CuSO ₄ · 5H ₂ O	—	0.025	0.125
鉄類			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8	5.5
EDTA · Na ₂	27.8	27.8	7.5
ビタミン			
ミオイノシトール	—	100	100
グリシン	2	2	2
塩酸チアミン	1	1	1
ニコチン酸	0.5	0.5	0.5
塩酸ピリドキシン	0.5	0.5	0.5

基本培地のストック液の濃度は、AB 無機塩、AB バッファー、N6 培地および MS 培地のマクロエレメントは20倍、ミクロエレメントとビタミンは1000倍、鉄類は500倍の濃度で作製する。鉄類は遮光保存する。

その他必要なもの

500 mg/ml クラフォラン溶液

50 mg/ml ハイグロマイシン溶液

50 mg/ml アセトシリゴン溶液

小型粉すり器

滅菌蒸留水

謝辞

本博士論文研究を行うにあたり、多くの方々の御指導、御協力をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、素晴らしい環境を提供していただき、また研究を進める上で、私のわがままを聞き入れてくださいました東京大学生物生産工学研究センター・環境保全工学部門、山根久和教授に心より御礼申し上げます。また、研究生活全般にわたり御指導していただきました、東京大学生物生産工学研究センター・細胞機能工学部門、西山真教授、および同センター・環境保全工学部門の野尻秀昭助教授、羽部浩助手、岡田憲典助手に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、貴重なサンプル、情報を提供していただきました、農業生物資源研究所の南栄一博士、高井亮太博士、賀来華江博士、秋本-富山千春博士、田部茂博士に厚く御礼申し上げます。また、エリシターを快く譲渡してくださった明治大学の渋谷直人教授、明治製菓株式会社の梅村賢司博士、イモチ病菌接種について御指導、御協力していただきました理化学研究所植物機能研究室の吉田茂男博士、仲下英雄博士、同研究所植物科学研究センターの安田美智子氏、貴重なプラスミドを提供していただきました島根大学の中川強助教授、パーティクルガン装置について御指導していただきました奈良先端科学技術大学院の樽谷芳明博士、イネの形質転換法について御指導、御協力していただきました東京大学大学院農学生命科学研究科栽培学研究室の経塚淳子助教授、西康栄氏、マイクロアレイ解析について御指導、御協力いただきました農業生物資源研究所の長村吉晃博士、本山立子氏に深く感謝いたします。

また、日々の研究生活を送るにあたり、公私ともに大変お世話になりました環境保全工学部門の皆様ならびに卒業生の皆様に心より感謝いたします。

最後になりましたが、私の心の支えとなったかけがえのない友人と、私の意思を最後まで尊重し、温かく見守っていただきました両親に感謝の意を表して本論文の結びとします。

皆様、本当にありがとうございました。

2005年3月