

博 士 論 文

イネのフラボノイド型ファイトアレキシンの
生産制御機構の解明

小 川 哲 史

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 25 年度博士課程進学
氏 名 小川 哲史
指導教員名 野尻 秀昭

論文題目

イネのフラボノイド型ファイトアレキシンの生産制御機構の解明

植物は病原菌の感染を受けると、ジャスモン酸 (JA) などの二次シグナル物質を介したシグナル伝達を誘導し、最終的に抗菌性化合物であるファイトアレキシンの生産など様々な抵抗性反応を誘導する。イネにおいては 16 種類のジテルペン型化合物および 1 種類のフラボノイド型化合物がファイトアレキシンとして同定されているが、そのうちフラボノイド型のサクラネチンは抗菌活性の高さやイネいもち病菌感染時の蓄積量の多さから主要なファイトアレキシンの一つとされている。サクラネチン生産はその誘導に JA を要求する防御応答であり、主要なジテルペン型ファイトアレキシンの生産が JA 要求性、非要求性いずれのシグナルでも誘導されることと対照的である。本研究では、JA 要求性防御応答のモデルケースと考えられるサクラネチンの生産誘導に着目した。

サクラネチン合成の最終ステップでは、前駆体であるナリンゲニンが naringenin 7-O-methyltransferase (NOMT) によってサクラネチンに変換される。当研究室の先行研究において NOMT をコードする遺伝子 *OsNOMT* が同定された。その後の研究において、*OsNOMT* の発現が抑制されるとイネ葉身における JA 誘

導的なサクラネチン蓄積量が顕著に減少することから、*OsNOMT* がサクラネチン生産における必須遺伝子であることが示された。また、*OsNOMT* の発現もサクラネチン生合成と同様に JA 要求性をもって誘導されることが示されていたが、*OsNOMT* 発現機構の詳細については未解明であった。そこで本研究では、JA 要求性を示すサクラネチン生産の制御機構の解明を目的とし、特に *OsNOMT* の発現制御機構の詳細な解析を行うこととした。

ジャスモン酸 (JA) 要求性をもつサクラネチン生合成を制御する転写因子の機能解析¹⁾

ファイトアレキシンの生産を含む植物の防御応答は、種々の転写因子によって厳密に制御されている。イネにおいて、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産およびそれらの生合成遺伝子の発現を制御する転写因子は研究が進んでいる一方、サクラネチン生産や *OsNOMT* 発現に関与する転写因子はほぼ知られていなかった。先述の通りサクラネチン生産や *OsNOMT* 発現は JA 要求性であることから、その制御に関わる転写因子の発現も JA 要求性の誘導を示すと予想し、JA 生合成変異株を用いたトランスクリプトーム解析により JA 要求性の発現誘導を示す転写因子の選抜を行った。その結果、JA シグナルを正に制御する bHLH 型転写因子 *OsMYC2*、*OsMYC2* と相同性の高い *OsMYC2*-like protein 1 (*OsMYL1*)、およびフラボノイド生合成遺伝子の発現を誘導することが報告されている MYB 型転写因子などが選抜された。これらの転写因子について、*OsNOMT* の転写開始点上流域に対する影響を調べたところ、*OsMYC2* が *OsNOMT* のプロモーター活性を顕著に上昇させた。そこで、*OsMYC2* による *OsNOMT* のプロモーター領域の活性化に必要なシス配列を調べるために、*OsNOMT* 転写開始点上流域においてデリーションアッセイによりプロモーター領域の絞り込みを行ったが、*OsMYC2* により活性化される領域の同定には至らなかった。次に *OsMYC2* の発現抑制株の解析を進めたところ、JA 誘導的な *OsNOMT* 発現およびサクラネチン蓄積、さらに前駆体であるナリングニンの蓄積が抑制された。また、*OsMYC2* 過剰発現株の解析を進めたところ、JA 誘導的なサクラネチン蓄積量は一部の系統で増加傾向を示すものの、*OsNOMT* の JA 誘導性発現に対する影響は認められなかった。以上の結果から、*OsNOMT* の発現およびサクラネチンの生産は *OsMYC2* の制御下で起こっていることが示された。

OsMYC2 などの bHLH 型転写因子は、MYB 型転写因子や bHLH 型転写因子と相互作用して機能変化するという報告があるため、上述のトランスクリプトームで選抜した *OsMYC2* 以外の転写因子をエフェクターとし、*OsMYC2* と共導入して *OsNOMT* のプロモーター活性に対する影響を解析した。その結果、*OsMYC2* による *OsNOMT* のプロモーター活性の上昇が *OsMYL1* により相乗的に亢進されることが示された。また、JA により誘導はされないものの *OsMYL1* と相同性の高い *OsMYL2* について同様の解析をした結果、*OsMYL1* と同様に *OsNOMT* のプロモーター活性の上昇が認められた。さらに *OsMYC2*、*OsMYL1*、*OsMYL2* についてタンパク質間相互作用を解析したところ、*OsMYC2* が *OsMYL1* および *OsMYL2* と物理的に相互作用することが示された。この相互作用による *OsMYC2* の転写機能の変化に着目して解析を行ったところ、*OsMYC2* が有する転写活性化能が *OsMYL1* および *OsMYL2* との相互作用により増強されることが明らかになった。

以上より、OsMYC2はOsMYL1およびOsMYL2と相互作用することで活性化し、OsNOMTの発現をJA誘導的に上昇させることで、サクラネチンの生産を促進していることが示唆された。本研究では、OsMYL1とOsMYL2は同様の機能を示したが、これらにはJAによる発現誘導の有無において明確な差が存在する。また、OsMYC2の発現抑制株を用いたRNA-Seq解析の結果より、OsMYL1の発現がOsMYC2依存的に誘導されることも示された。したがって、植物体内においてOsMYC2-OsMYL1複合体とOsMYC2-OsMYL2複合体を状況により使い分けられていることが考えられ、OsNOMTの発現制御機構の解明においてこの使い分けを解析することが必要であると考えられる。

サクラネチン合成酵素遺伝子を直接制御する転写因子の同定と機能解析

OsNOMTのプロモーターに結合し、発現を直接制御する転写因子を同定するため、yeast one-hybrid screeningによる探索を試みた。先述の通り、OsNOMTの転写活性化に重要な領域を絞り込むことができなかったため、標的配列には最大限広い範囲であるOsNOMT転写開始点上流1 kbの領域を用いた。ライブラリーとして、イネ転写因子をコードするcDNAのみが含まれるライブラリーを用いた。Screeningの結果、OsNOMTのプロモーターに結合し発現を制御する候補として8個の転写因子を得た。その中には、既に解析済みのOsMYC2をはじめ、NACファミリーに属し鉄欠乏応答に関与するIron deficiency-responsive cis-acting element binding factor (IDEF)であるOsIDEF2などが含まれていた。OsMYC2以外の7個の転写因子について、OsNOMTの転写開始点上流域に対する影響を調べたところ、OsIDEF2がOsNOMTのプロモーター活性を上昇させたが、OsMYC2のような顕著な影響は見られなかった。また、他の転写因子はOsNOMTのプロモーター活性に影響しなかった。ここで、OsMYL1やOsMYL2のように、単独では影響がみられないものの他の因子と相互作用することにより影響が見られるものがあるのではないかと予想し、OsMYC2と共導入してOsNOMTのプロモーター活性に対する影響を解析した。その結果、OsMYC2とOsIDEF2を共導入すると、それぞれ単独で導入した場合よりも強くOsNOMTのプロモーター活性を上昇させたため、OsMYC2とOsIDEF2が相乗的にOsNOMTの発現を上昇させていることが示された。OsMYC2などのbHLH型転写因子については、OsIDEF2などのNAC型転写因子と相互作用する例は報告がないため、OsMYL1やOsMYL2と異なり、OsIDEF2はタンパク質間相互作用以外の形でOsMYC2と協調的に作用し、OsNOMTのプロモーター活性を亢進している可能性も考えられる。今後、OsMYC2とOsIDEF2のタンパク質間相互作用を解析し、上記の仮説を検証していくことが急務である。

またOsIDEF2については、過剰発現株およびChimeric repressor silencing technology (CRES-T法)により機能が抑制される株の解析を試みたが、用いたいずれの株においても過剰発現が確認されなかった。今後、OsIDEF2の過剰発現および機能抑制が行われている株の再作出、選抜を行い、OsIDEF2がOsNOMT制御に果たす役割を詳細に解明することが必要であると考えられる。

総括と展望

本研究では、サクラネチンの生合成遺伝子 *OsNOMT* の発現制御機構の解明を目的として研究を行い、*OsMYC2* が *OsMYL1* および *OsMYL2* と相互作用しながら JA 要求性の *OsNOMT* 発現を誘導していることを示した。また、*OsNOMT* プロモーターに結合し発現を直接制御する転写因子として *OsIDEF2* を選抜し、*OsIDEF2* が *OsMYC2* と協調的に *OsNOMT* プロモーターを活性化していることを示した。すなわち、このような転写因子の機能によって、サクラネチンの生産誘導が制御されていることを示唆した。今後は、*OsNOMT* 転写開始点上流域に存在する *OsIDEF2* や *OsMYC2* の結合領域を同定し、タンパク質の DNA 結合能の解析、また当該領域にタンパク質が結合できなくなった場合の *OsNOMT* プロモーター活性に及ぶ影響の解析が必要であると考えられる。*OsMYC2* の場合、デリーションアッセイの結果から *OsMYC2* が直接プロモーター領域に結合することなく *OsNOMT* の転写を制御していることが考えられる。DNA への直接的な結合なしに遺伝子制御を行う転写因子について、*OsMYC2* と同じく MYC タンパク質に分類される Myc 転写因子がヒストン修飾によるエピジェネティック制御を介して遺伝子の発現制御を行っていることが報告されている。したがって、*OsMYC2* および *OsMYL1*、*OsMYL2* との複合体もエピジェネティックな遺伝子制御を行っている可能性が考えられるため、ヒストン修飾解析やクロマチンの構造解析などエピジェネティクス解析を行う必要があると考えられる。

OsMYC2 の発現抑制株および過剰発現株を用いた解析より、サクラネチンの生合成経路のうちナリンゲニンよりも上流に位置する経路は、*OsNOMT* の発現制御よりも強く *OsMYC2* に依存することが示唆された。さらに、*OsMYC2* の発現抑制株を用いた RNA-Seq 解析の結果、少なくともナリンゲニン生合成経路の下流で機能する酵素の遺伝子発現は *OsMYC2* 依存的に JA シグナルで誘導されることが示され、*OsMYC2* がナリンゲニン生産を正に制御していることが示唆された。今後ナリンゲニン生合成経路の上流に位置する生合成遺伝子の発現などに関する情報を得ることで、*OsNOMT* 発現を含めた JA シグナル誘導的なサクラネチン生産制御機構の詳細が明らかになると考えられる。

本研究で得られた知見をもとに、今後サクラネチンを多量蓄積し強い病害抵抗性を示すイネやその他の作物を作出すること、またサクラネチン生産以外の JA 要求性防御応答の分子メカニズムの解明がなされることが期待される。

参考文献

- 1) [Ogawa S, Miyamoto K, Nemoto K, Sawasaki T, Yamane H, Nojiri H, and Okada K. OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability. *Sci. Rep.* In press.](#)

博士論文 目次

論文の内容の要旨

目次

略語表

第1章 序論	1
1-1 緒言	1
1-2 植物の防御応答	1
1-3 ジャスモン酸の生理機能およびジャスモン酸を介したシグナル伝達	3
1-4 イネのファイトアレキシン	8
1-5 植物の防御応答に関与する転写因子	15
1-6 本研究の目的	16
第2章 ジャスモン酸 (JA) 要求性をもつサクラネチン生合成を制御する転写因子の機能解析	17
2-1 緒言	17
2-2 材料と方法	18
2-3 結果	32
2-3-1 JA 誘導的に <i>OsNOMT</i> の発現を制御する転写因子の探索	32
2-3-2 2-3-1 で選抜した転写因子が <i>OsNOMT</i> の発現に与える影響の解析	38
2-3-3 <i>OsMYC2</i> による <i>OsNOMT</i> 転写開始点上流域の活性化に必要なシスエレメントの探索	41
2-3-4 <i>OsMYC2</i> が <i>OsNOMT</i> 発現やサクラネチン生産に与える影響の解析	45
2-3-5 <i>OsMYC2</i> と協調的に <i>OsNOMT</i> の発現を制御する転写因子の探索	49
2-3-6 <i>OsMYC2</i> と <i>OsMYL1</i> および <i>OsMYL2</i> の相互作用の解析	52
2-3-7 タンパク質間相互作用による <i>OsMYC2</i> の転写機能の変化の解析	56
2-4 考察	58
第3章 サクラネチン生産および <i>OsNOMT</i> 発現が抑制された <i>OsMYC2</i> 発現抑制株における 遺伝子発現の網羅的な解析	63
3-1 緒言	63
3-2 材料と方法	64
3-3 結果	67
3-3-1 RNA-Seq 解析に用いた RNA サンプルの選抜	67
3-3-2 シーケンシング	67

3-3-3	OsMYC2により影響を受けるJA応答性遺伝子	69
3-3-4	JA誘導性遺伝子のGene Ontology解析	69
3-3-5	OsMYC2を介して誘導されるJA誘導性遺伝子の詳細な解析	76
3-3-6	OsMYC2が二次代謝産物の生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響の解析	80
3-3-7	OsMYC2がJA以外のホルモン応答性遺伝子や鉄欠乏応答性遺伝子の発現に及ぼす影響の解析	85
3-4	考察	90
第4章 サクラネチン生合成酵素遺伝子を直接制御する転写因子の同定と機能解析		92
4-1	緒言	92
4-2	材料と方法	93
4-3	結果	105
4-3-1	Screeningに用いる <i>OsNOMT</i> 上流域の決定	105
4-3-2	Yeast one-hybrid screeningに用いる菌体および培地に添加する3-AT濃度の決定	105
4-3-3	<i>OsNOMT</i> プロモーターに直接結合する候補因子の探索-1st screening	106
4-3-4	<i>OsNOMT</i> プロモーターに直接結合する候補因子の探索-2nd screening	112
4-3-5	Yeast one-hybrid screeningで選抜された転写因子が <i>OsNOMT</i> 転写開始点上流に与える影響の解析	115
4-4	考察	119
第5章 総括と展望		121
補章1 第3章で行ったRNA-Sequencing解析に関するデータ		124
補章2 <i>OsIDEF2</i>の過剰発現株および機能抑制株の解析		133
参考文献		139
謝辞		152

略語表

4CL	4-coumaroyl-CoA-ligase
ACS	Acyl-CoA synthetase
Alpha	Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay
Amp	Ampicillin
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
Bls	Biotin ligation site
bp	Base pair
C4H	Cinnamate-4-hydroxylase
Cb	Carbenicillin
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding sequence
CHI	Chalcone isomerase
CHS	Chalcone synthase
Clusters PF	Clusters passing filter
Cm	Chloramphenicol
COI	Coronatine insensitive
cRNA	Complementary RNA
CRES-T	Chimeric repressor silencing technology
DERF	Drought-responsive ethylene response factor
dH ₂ O	Deionized, distilled water
DHFR	Dihydrofolate reductase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxy nucleotide triphosphate mix
DREB	Dehydration responsive element binding factor
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ERF	Ethylene response factor
ESI	Electrospray ionization
GGPP	Geranylgeranyl diphosphate
Gm	Gentamicin
GO	Gene Ontology

GST	Glutathione <i>S</i> -transferase
GUS	β -glucuronidase
h	Hour(s)
His	Histidine
HPT	hygromycin phosphotransferase
HRP	Horseradish peroxidase
IDEF	Iron deficiency-responsive <i>cis</i> -acting element binding factor
JA	Jasmonic acid
JAd	Jasmonic acid-dependent
JA-Ile	Jasmonoyl-L-isoleucine
JAM	Jasmonate-associated MYC2-like
JAR	Jasmonic acid resistant
JAs	Jasmonates
JAV	Jasmonate-associated VQ motif
JAZ	Jasmonate ZIM-domain
kbp	Kilo base pair
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
KSL	Kaurene synthase-like
LC-MS/MS	High-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry
Leu	Leucine
LUC	Luciferase
Mbp	Mega base pair
MEP	2-C-Methylerythritol 4-phosphate
min	Minute(s)
Myc	Myelocytomatosis
MYL	MYC2-like
NAC	NAM, ATAF, and CUC
NC	Negative control
NOMT	Naringenin 7- <i>O</i> -methyltransferase
OD	Optical density
OX	Overexpression
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis

PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
PANTHER	Protein analysis through evolutionary relationships
PC	Positive control
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PR	Pathogenesis-related
psi	Pound-force per square inch
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
RAP-DB	The Rice Annotation Project Database
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA-interference
RNase	Ribonuclease
RNA-Seq	RNA-Sequencing
RT	Room temperature
s/sec	Second(s)
SD	Synthetic defined
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRDX	Superman repression domain modified ver. X
T _m	Melting temperature
TPS	Terpene synthase
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UBQ	Ubiquitin
Ura	Uracil
UTR	Untranslated region
VC	Vector control
w/o	without
WT	Wild-type

第1章

序論

1-1 緒言

世界中で増加し続ける人類の食糧需要は、これまで多収量作物の育種や有機合成農薬、化学肥料の使用により食糧生産力を増大させることで支えられてきた。しかしそれら従来型の方法による食糧増産は限界を迎えており、新たな対策を講じることが望まれている。このような状況下、近年植物が元来保有するシグナル伝達機構を利用した環境保全型の農業研究の重要性が広く認識され始めている。特に植物の病害抵抗性反応を制御するシグナル伝達機構について多くの研究がなされ、ここ10年で飛躍的に多くの知見が得られてきた。しかしながら、依然として植物の病害抵抗性反応発現に至るシグナル伝達機構には未解明な部分が多く残されており、重要な研究課題であると考えている。

1-2 植物の防御応答

植物は病原菌の感染を受けると、病原菌細胞表層由来の成分（キチンオリゴマーなど）が細胞膜上の受容体と特異的に結合することで病原菌の感染を認識する。そして、これが引き金となって植物ホルモンなど二次シグナル物質の生産を含むシグナル伝達により核内で転写因子の発現が誘導される。発現した転写因子は下流の標的遺伝子の発現を誘導し、最終的に抗菌性低分子化合物であるファイトアレキシンの生産、細胞死の誘引、pathogenesis-related (PR) タンパク質と称される抗菌性タンパク質の生産といった様々な防御応答が誘導されると考えられている (Fig. 1-1) [Yoshikawa *et al.*, 1983; Nicaise *et al.*, 2009]。このように、植物の防御応答を誘導する作用のある物質もしくは原因をエリシターと総称する。重金属や植物ホルモンもまたエリシターとして作用し、防御応答遺伝子の発現やファイトアレキシンの蓄積が誘導することが多くの植物種で報告されている [Shinozaki *et al.*, 2003; Shoji *et al.*, 2008; Pauwels *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2013]。

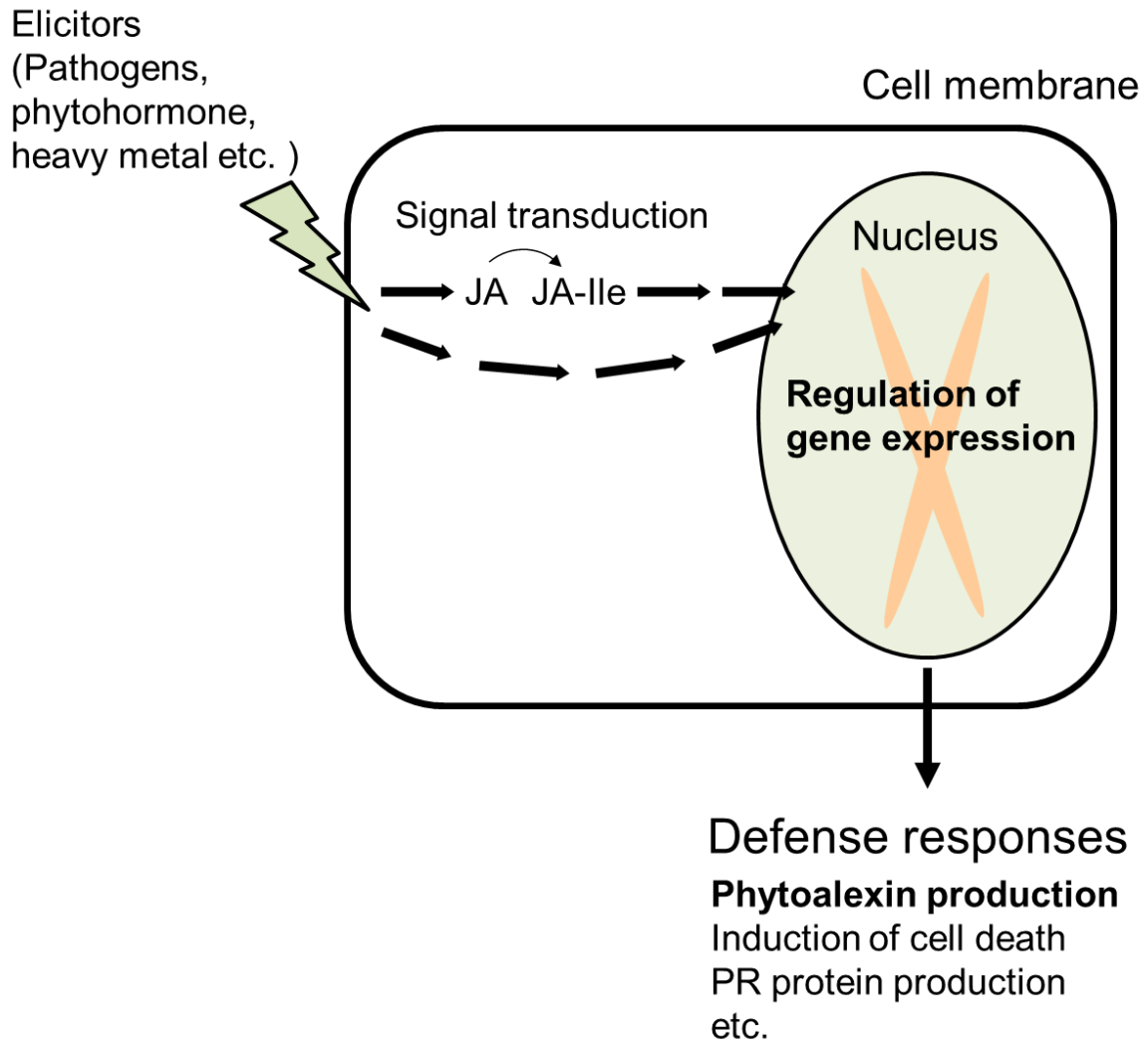


Figure 1-1 植物の基礎的病害抵抗性反応を誘導するシグナル伝達

植物がエリシターを認識してから抵抗性反応の発現を誘導するまでのシグナル伝達のモデル図を示した。

JA: jasmonic acid, JA-Ile; jasmonoyl-L-isoleucine.

1-3 ジャスモン酸の生理機能およびジャスモン酸を介したシグナル伝達

ジャスモン酸 (JA) およびその類縁体であるジャスモン酸類 (jasmonates, JAs) (Fig. 1-2) は植物界に広く分布しており、植物ホルモンの一つとして認められている。JA は、前駆体であるリン脂質から幾つかの過程を経ることで生合成され、得られた JA はアミノ酸との複合体を形成するなどさらに変化する (Fig. 1-3)。植物体内における JAs の内生量は傷害処理や、紫外線照射、いもち病菌感染といったストレスにより増加することが知られている [Creelman *et al.*, 1992; Riemann *et al.*, 2013; Miyamoto *et al.*, 2016]。植物は多様な植物ホルモンを生合成し、自身の成長や防御応答の調節に利用するが [Bari and Jones, 2009; Pieterse *et al.*, 2012]、とりわけ JAs は生物学的ストレスに対する抵抗性や発芽、成長を制御するホルモンとして広く機能が解明されてきた。JAs の中でも、特に JA とイソロイシンの複合体である jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile) が活性型の化合物として機能しており [Thines *et al.*, 2007]、JA を JA-Ile に変換する酵素 Jasmonic acid resistant protein 1 (JAR1) [Staswick and Tiryaki, 2004] の欠損または機能阻害により JA シグナルが阻害されること [Shimizu *et al.*, 2013; Meesters *et al.*, 2014]、*jar1* 欠損株においては JA ではなく JA-Ile を外部から処理した場合のみ JA シグナルが活性化されることが示されている [Shimizu *et al.*, 2013]。

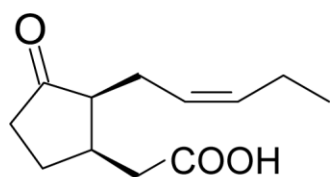
1-3-1 JAs により誘導される抵抗性反応

JA 処理により、様々な植物体において PR タンパク質の発現、ファイトアレキシンの生産、殺虫活性のある proteinase inhibitor の発現などが誘導されることが示されており [Sembdner and Parthier, 1993]、植物の病虫害抵抗性に対し大きい影響を与えることがわかっていた。その後も、害虫の天敵を誘引するための揮発性物質の放出や、病虫害を防ぐための低分子化合物や抗菌性タンパク質の生産を誘導すること、さらにそれらに必要な遺伝子の発現を誘導するという報告がなされている [Wasternack and Hause, 2013; Taniguchi *et al.*, 2014b; Okada *et al.*, 2015]。

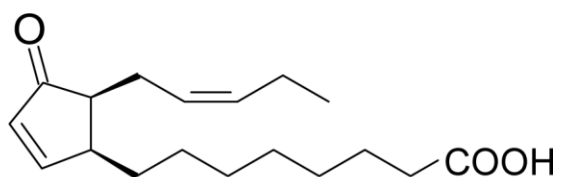
また、高等植物に留まらず、蘚類であるハイゴケにおいても JA の前駆体である 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) を処理することによりアレロパシー物質の生産が誘導されている [Okada *et al.*, 2016]。

1-3-2 JAs による病害抵抗性反応以外への影響

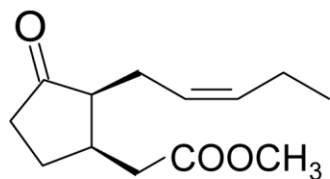
JAs は防御応答以外にも植物の成長や形態形成にも深く関与している。よく知られている事象が老化への関与であり、JA 処理によりクロロフィルやプラスチックタンパク質の分解などが誘導される [Chou and Kao, 1992; Reinbothe *et al.*, 2009; Uji *et al.*, 2016]。また、イネ種子の発芽や根の伸長を阻害するなど、成長抑制物質としても機能している [Yamane *et al.*, 1980; Lorenzo *et al.*, 2004]。その他、幼葉鞘の伸長や小穂の形成など形態形成の制御においても、健全に生育するために必要不可欠なはたらきをしている [Riemann *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014]。



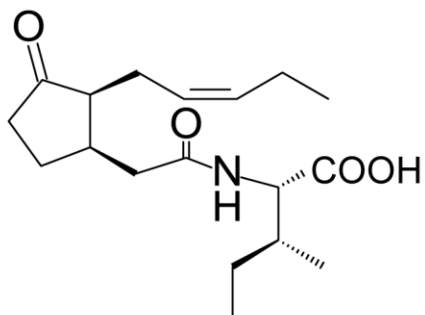
(+)-*cis*-jasmonic acid



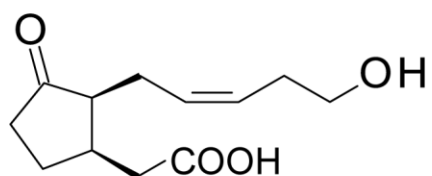
(+)-*cis*-OPDA



Methyl jasmonate



Jasmonoyl-L-isoleucine



Tuberonic acid

Figure 1-2 ジャスモン酸 (JA) とその主な類縁体

OPDA: 12-oxo-phytodienoic acid.

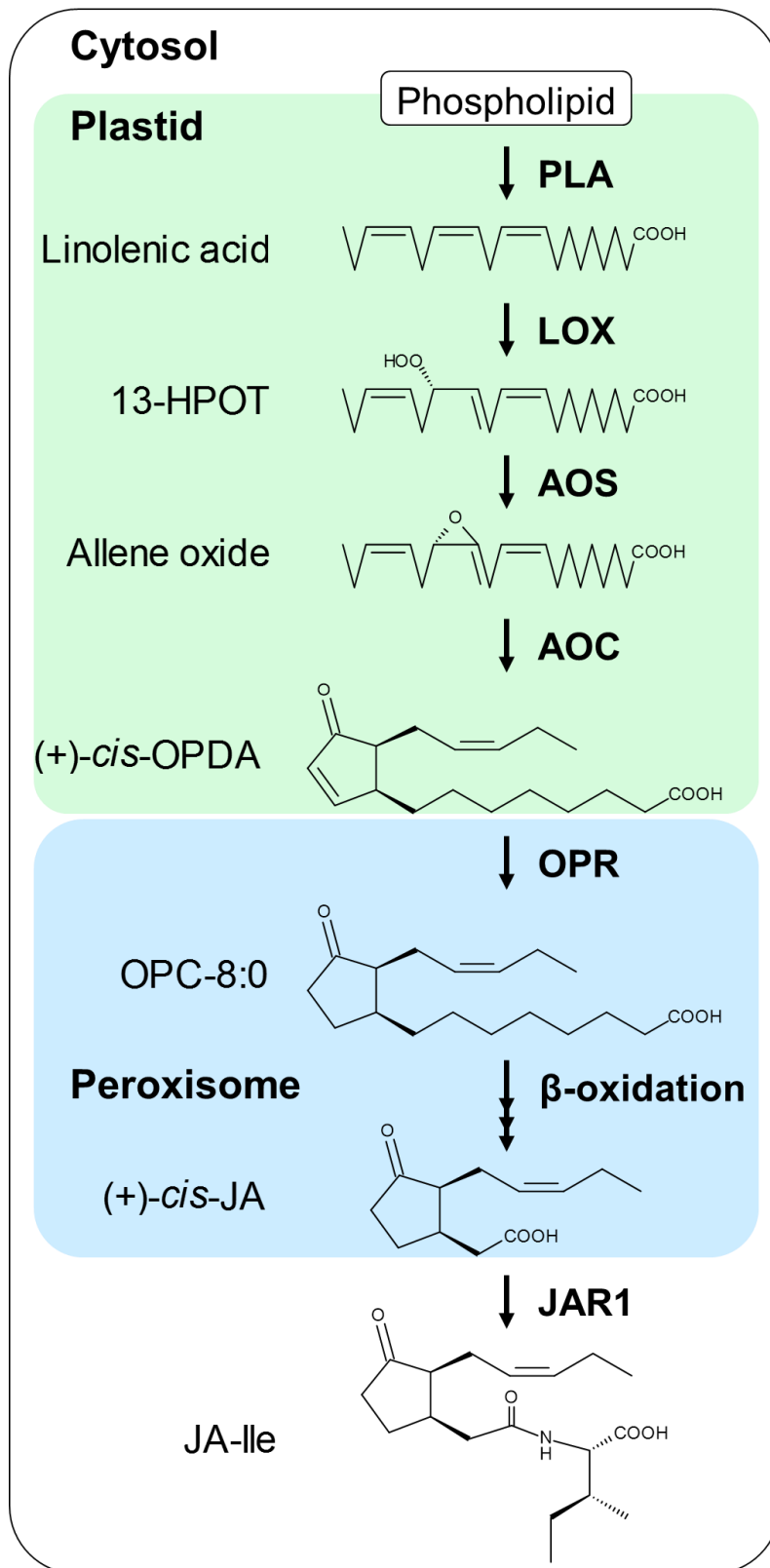


Figure 1-3 イネの JA 生合成経路

1-3-3 JA シグナルの制御

上記のように、JAs は防御応答および成長に対して非常に大きい影響力をもち、植物に対して正負両方の影響を及ぼす。そのため、JA により誘導されるシグナル伝達（以下 JA シグナル）は厳密に調節されている。最もよく研究されているのが、MYC2 タンパク質と Jasmonate ZIM-domain protein (JAZ) による制御であり、特にシロイヌナズナにおいては研究が進んでいる。MYC2 は当初、シロイヌナズナのアブシジン酸シグナルを正に制御するレギュレーターとして同定され、機能解析が行われてきた [Abe *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2003]。その後、JA シグナルのレギュレーターとしても機能していることが報告され、以降特に双子葉植物で解析が進んでいる。MYC2 は遺伝子プロモーター中の G-box (CACGTG) に結合して JA 早期応答性遺伝子の発現を誘導するが、細胞内の JA 濃度が低い定常状態では、MYC2 は JAZ-interacting domain (JID) を介して JAZ と相互作用している。その JAZ がさらに Novel Interactor of JAZ (NINJA) および Groucho/Tup1-type corepressor タンパク質の TOPLESS (TPL) と複合体を形成し、TPL のはたらきにより遺伝子の発現は抑制されている (Fig. 1-4A) [Chini *et al.*, 2007; Pauwels *et al.*, 2010]。一方、病原菌感染などで細胞内の JA 濃度が上昇すると、JAR1 により JA は JA-Ile に変換され、この JA-Ile を介して JAZ はユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{COI1} と結合する。JAZ は SCF^{COI1} によりユビキチン化され、26S プロテアソーム系で分解される。それにより、TPL による MYC2 の抑制は解除され、JA 応答性遺伝子の発現が誘導される (Fig. 1-4B) [Kazan and Manners, 2013]。さらに、MYC2 と高い相同性をもつ MYC3 や MYC4 についても同様の仕組みで JA シグナルを制御しており、三重変異株を用いた解析などにより MYC2、MYC3、および MYC4 は互いの機能を補い合えることが報告されている [Fernández-Calvo *et al.*, 2011, Niu *et al.*, 2011, Goossens *et al.*, 2015]。MYC2 と JAZ による制御について、イネにおいてもいくつか報告があるが [Yamada *et al.*, 2012; Uji *et al.*, 2016]、OsMYC2 がパラログを持たない単一遺伝子でありその機能が必須であるためか遺伝子欠損変異体も存在しておらず、シロイヌナズナやタバコと比較すると機能解明は進んでいない。

さらに最近、JA シグナルにより制御される病虫害抵抗性を負に制御する因子として Jasmonate-associated VQ motif 1 protein (JAV1) が同定され、この JAV1 の発現を抑制すると、植物の形態形成に影響を及ぼさずに灰色カビ病菌やシロイチモジヨトウの幼虫、モモアカアブラムシなどに対して強い抵抗性を示すようになることが報告されている [Hu *et al.*, 2013]。

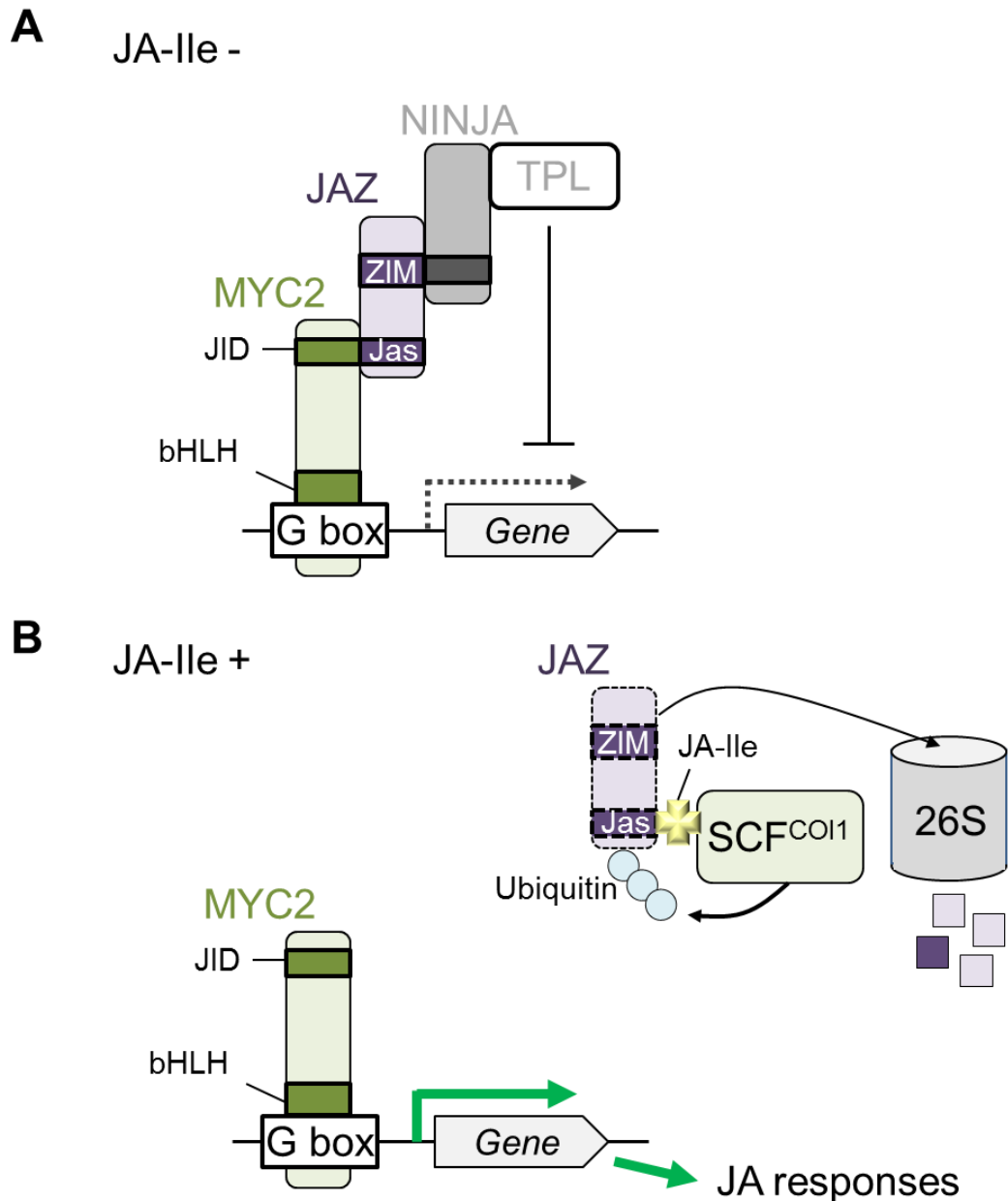


Figure 1-4 MYC2、JAZ、COI1 による JA 応答性遺伝子の発現制御

(A) In the absence of jasmonates, basic helix-loop-helix (bHLH) MYC factors interact with the Jas domain of JAZ proteins that interact through their TIFY motif with domain C of NINJA. The EAR motif of NINJA is essential for interaction with the TOPLESS (TPL) co-repressors.

(B) In the presence of (1)-7-*iso*-JA-L-Ile, JAZ proteins interact with the ubiquitin ligase SCF^{COI1}, leading to proteasomal JAZ degradation and subsequent release of the NINJA-TPL complex from the MYC factors and activation of jasmonate responsive gene expression.

JID: JAZ-interacting domain, NINJA: Novel Interactor of JAZ, SCF: Skp1/Cullin/F-box E3 ubiquitin ligase, TPL: TOPLESS, 26S: 26S proteasome. [Pauwels *et al.*, 2010のFig. 4A, Bを改変して引用]

1-4 イネのファイトアレキシン

植物の防御応答のうち、代表的なものとしてファイトアレキシンの生産が挙げられる。ファイトアレキシンとは、「病原菌感染により植物体内で生合成され蓄積する抗菌性低分子化合物 ("Phytoalexins are low molecular weight, antimicrobial compounds that are both synthesized by and accumulated in plants after exposure to microorganisms")」と定義づけられた化合物を指す [Paxton, 1981]。これまでに様々な植物において数多くのファイトアレキシンが報告されてきたが [Hammerschmidt, 1999; Okada *et al.*, 2015]、特にイネにおいては多くの知見が得られてきた。

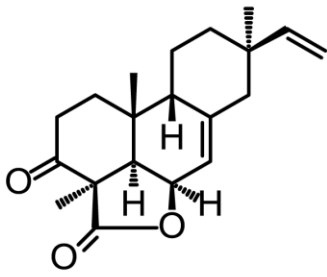
イネにおけるファイトアレキシン生産は JA 誘導性防御反応の最たるものの 1 つであり [Nojiri *et al.*, 1996]、これまでに 17 種類の化合物がファイトアレキシンとして同定されてきた。17 種類のうち 16 種類がジテルペン型、1 種類がフラボノイド型の化合物である [Miyamoto *et al.*, 2014b; Horie *et al.*, 2015]。これらのうち、特にジテルペン型のモミラクトン A-B、ファイトカサン A-F、*ent*-10-oxodepressin、およびフラボノイド型のサクラネチン (Fig. 1-5) は抗菌活性の高さやいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 感染時に多く蓄積することから主要なファイトアレキシンとされている [Cartwright *et al.*, 1977; Umemura *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2010; Inoue *et al.*, 2013; Hasegawa *et al.*, 2014; Horie *et al.*, 2015]。

1-4-1 ジテルペン型ファイトアレキシン

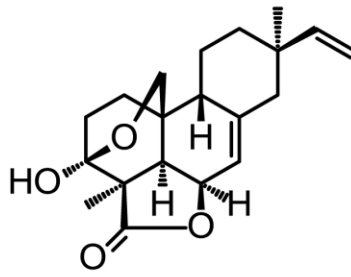
イネのジテルペン型ファイトアレキシンは、ゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP) を共通の前駆体として生合成される。このうち、labdane であるモミラクトン類、ファイトカサン類、オリザレキシン類は、GGPP からまず copalyl diphosphate (CDP) に変換され、その後さらに *ent*-Cassa-12, 15-diene や 9 β H-Pimara-7, 15-diene を経てそれぞれの化合物に変換される。GGPP からモミラクトン類、ファイトカサン類、オリザレキシン類に変換されるまでの生合成酵素として、CDP synthase や kaurene synthase、kaurene synthase-like、cytochrome P450 が同定されている [Yamane, 2013]。一方、casbane である *ent*-10-oxodepressin の生合成については、詳細が明らかになっていない。

モミラクトンについては、抗菌活性のほかにアレロパシー効果を有し、レタス、アルファルファ、および水田雑草の一つであるイヌビエなどの成長を阻害することがわかっている [Kato *et al.*, 1973; Kato-Noguchi, 2004; Kato-Noguchi *et al.*, 2010]。

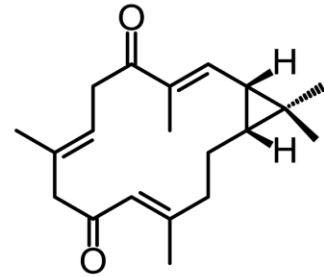
Diterpenoid



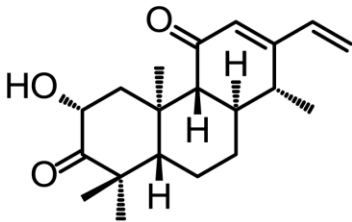
Momilactone A



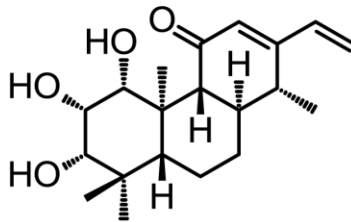
Momilactone B



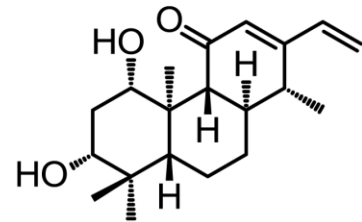
ent-10-Oxodepressin



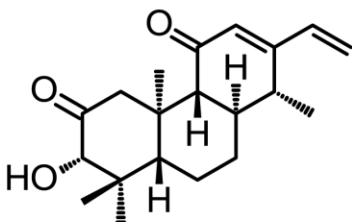
Phytocassane A



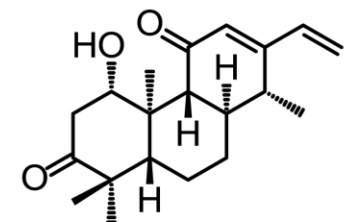
Phytocassane B



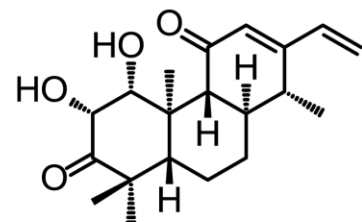
Phytocassane C



Phytocassane D

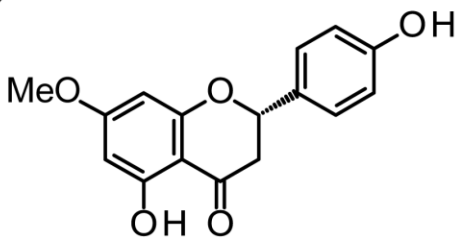


Phytocassane E



Phytocassane F

Flavonoid



Sakuranetin

Figure 1-5 イネの主要なファイトアレキシン

1-4-2 サクラネチン

イネのファイトアレキシンのうち唯一のフラボノイド型化合物であるサクラネチン [Kodama *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 2014] は、シキミ酸経路で生合成されたフェニルアラニンから幾つかの段階を経て生合成される。フェニルアラニンは、phenylalanine ammonia-lyase、cinnamate-4-hydroxylase、4-coumaroyl-CoA-ligase、chalcone synthase、chalcone isomerase が触媒する反応によって共通の前駆体であるナリングニンに変換される。そして、生合成の最終ステップでナリングニンが naringenin 7-O-methyltransferase (NOMT) によりメチル化されることでサクラネチンが生産される (Fig. 1-6) [Rakwal *et al.*, 1996]。サクラネチンはイネいもち病菌に対する抗菌活性を有し、胞子の発芽阻害活性は $ED_{50} = 15$ ppm、発芽管の伸長阻害活性は $ED_{50} = 5$ ppm と低濃度ではたらく [Kodama *et al.*, 1992]。これだけでは主要なジテルペン型ファイトアレキシンの違いが見られないが (モミラクトン A、B およびファイトカサン E によるイネいもち病菌の発芽管の伸長阻害活性は ED_{50} でそれぞれ 5 ppm、1 ppm、2 ppm [Cartwright *et al.*, 1977; Koga *et al.*, 1997])、サクラネチンにはイネいもち病菌の菌糸の成長を阻害する効果がある。これは、モミラクトン A が最終的には菌糸の成長を阻害できないことと対照的である [Hasegawa *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2014]。

サクラネチンの生合成は JA シグナル要求性であり、JA 生合成変異株である *cpm2* においてはいもち病菌感染や紫外線照射によるサクラネチンの生産誘導が顕著に抑制される。いもち病菌感染後の蓄積については、同じく JA 生合成変異株である *hebiba* でも同様の現象が見られている [Riemann *et al.*, 2013; Miyamoto *et al.*, 2016]。さらに、JAR1 の欠損株 *osjar1* を用いた解析により、サクラネチンの生産誘導には JA-Ile が必須であることが報告されている [Shimizu *et al.*, 2013]。これは、ジテルペン型のファイトアレキシンの生産が JA シグナル要求性、非要求性いずれの経路でも誘導されることと対照的である (Figs. 1-7 and 1-8) [Riemann *et al.*, 2013; Miyamoto *et al.*, 2016]。

1-4-3 サクラネチン生合成酵素 NOMT をコードする遺伝子 *OsNOMT*

近年、NOMT をコードする遺伝子として *OsNOMT* が同定された [Shimizu *et al.*, 2012]。この *OsNOMT* の発現が抑制されたイネの葉身では、JA 処理によりジテルペン型ファイトアレキシンは野生型株と同等の蓄積を示したが、サクラネチンの蓄積量は顕著に減少した [石田ら、未発表データ]。したがって、*OsNOMT* がサクラネチン生産の必須遺伝子であると示された。この *OsNOMT* の発現誘導について、サクラネチンの生産と同様 JA 要求性を有することが明らかになっている (Fig. 1-9) [Shimizu *et al.*, 2012; Miyamoto *et al.*, 2016]。

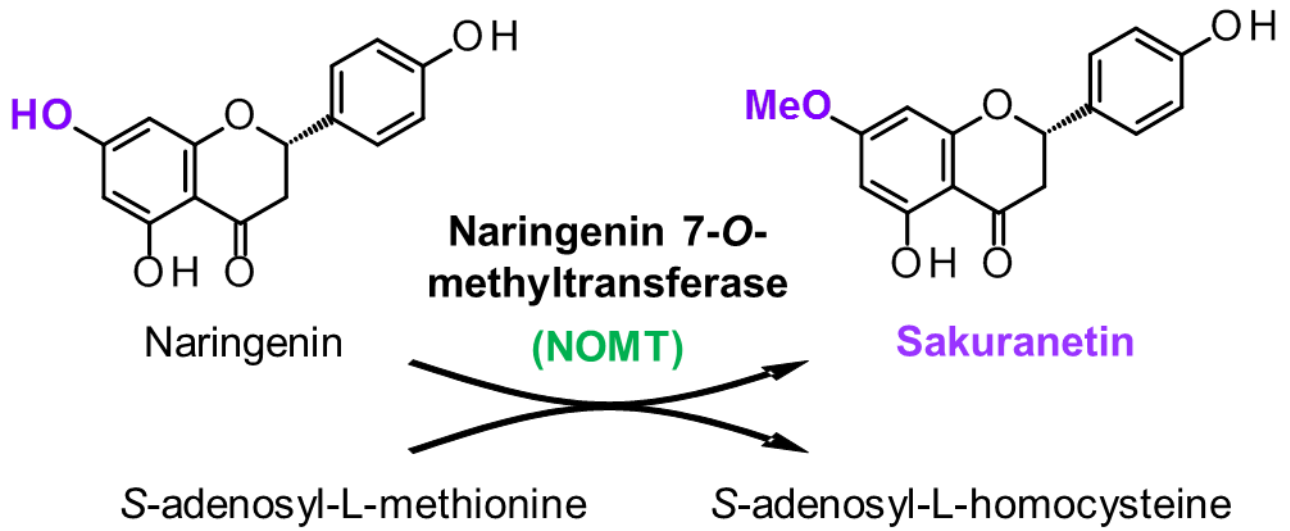


Figure 1-6 サクラネチン生合成の最終ステップにおける NOMT 反応

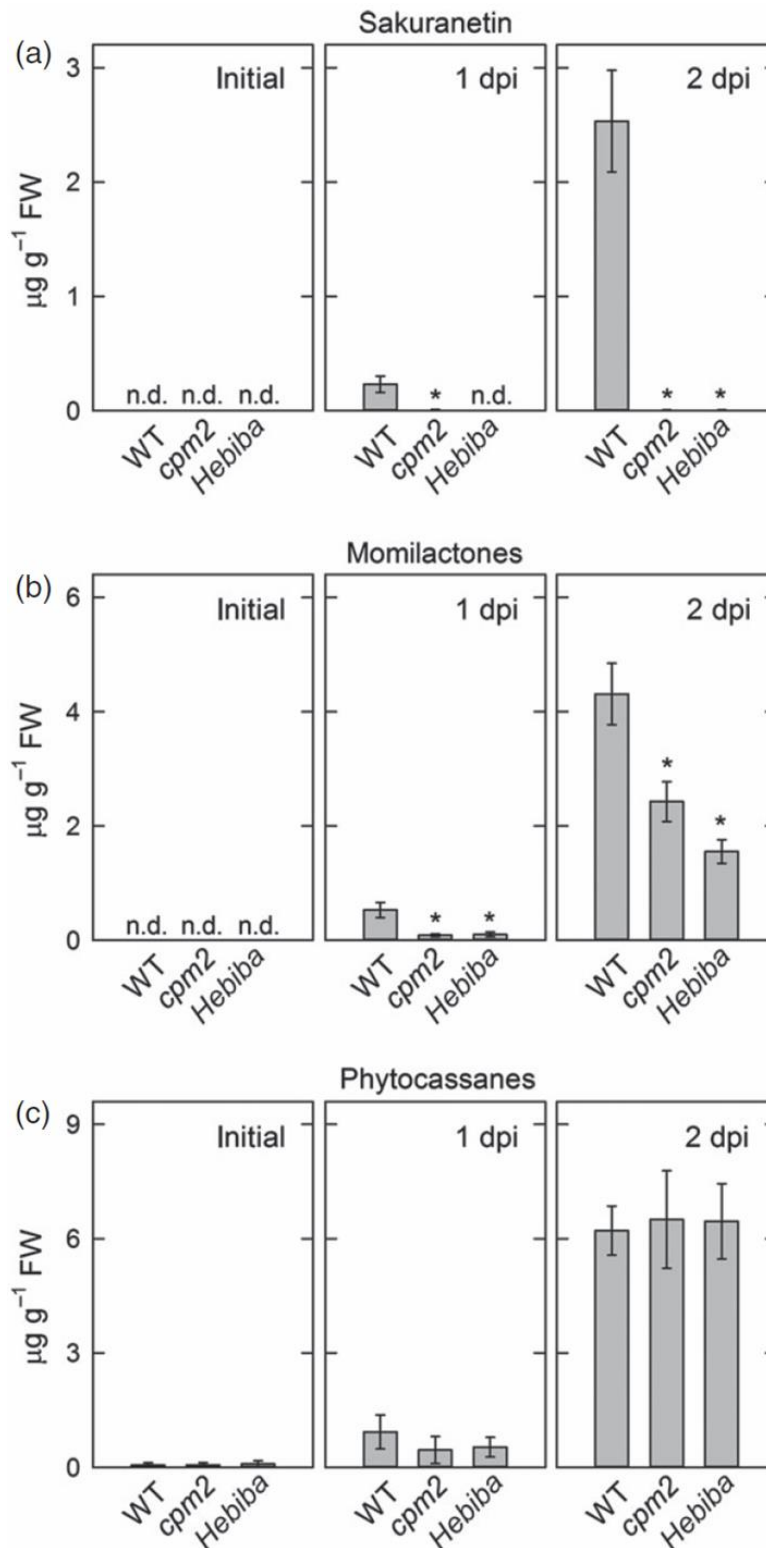


Figure 1-7 JA 生合成変異株 (*cpm2*, *hebiba*) におけるいもち病菌感染後のファイトアレキシン蓄積量
 Effects of *Magnaporthe oryzae* (P91–15B) inoculation on the levels of phytoalexins in wild-type, *cpm2* and *hebiba* leaf sheaths. The levels of sakuranetin (a) momilactones (b) and phytocassanes (c) were determined before infection (initial) and at 1 and 2 days post-inoculation (dpi). Values are means \pm standard errors of the means of three independent samples. Asterisks indicate statistically significant differences from the wild-type control (Student's *t*-test, **P* < 0.05). [Riemann *et al.*, 2013のFig. 9を改変して引用]

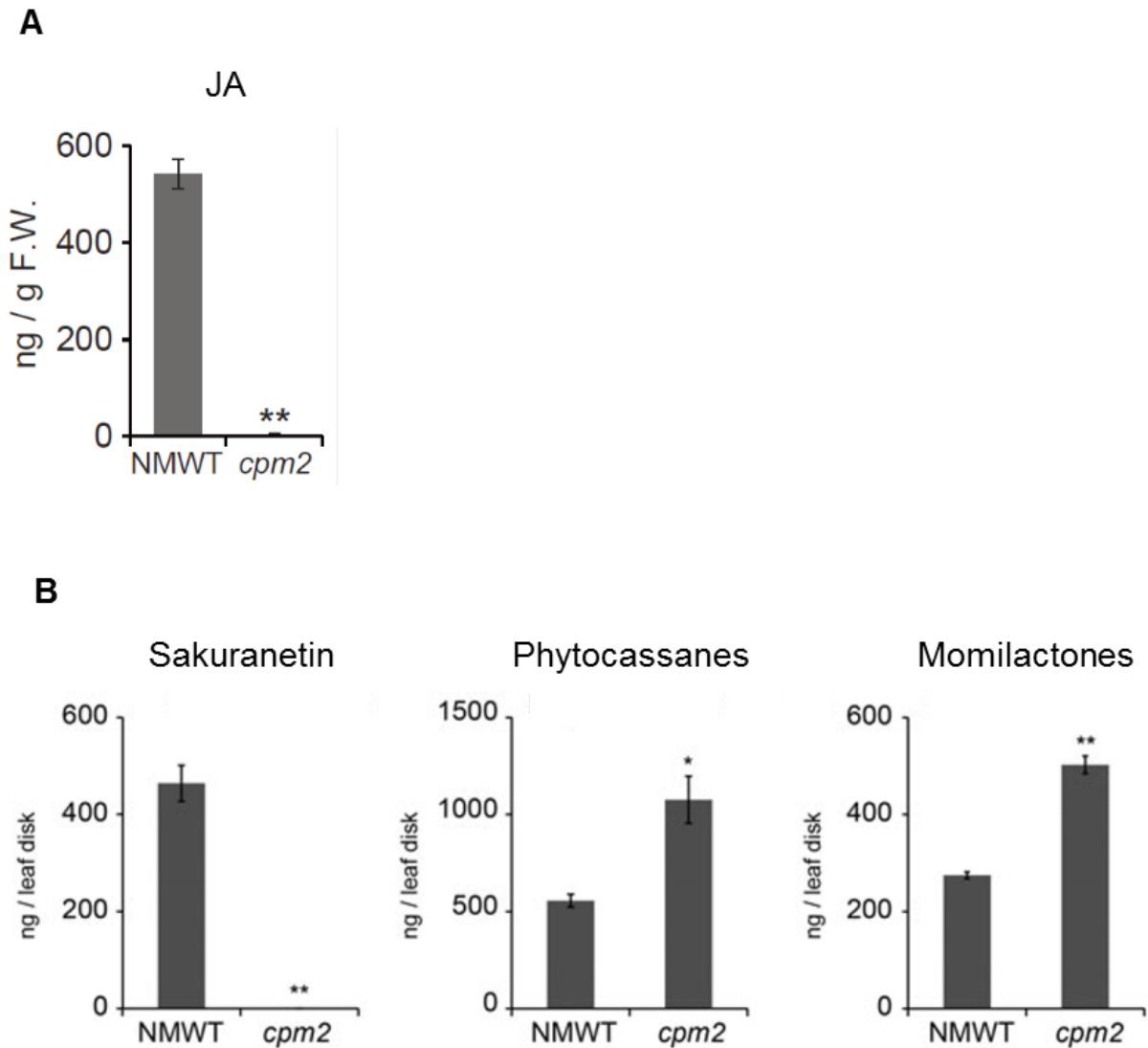


Figure 1-8 JA 生合成変異株 *cpm2* における紫外線照射後の JA およびファイトアレキシンの蓄積

Effects of UV irradiation on accumulation levels of endogenous jasmonic acid (A) and the levels of sakuranetin, phytocassanes and momilactones (B) in WT and *cpm2* rice leaves. (A) $n = 3$, (B) $n = 5$. Bars indicate standard errors of the means. Asterisks show statistical significance between WT and *cpm2* by Welch's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). NMWT: Nihonmasari wild-type. [Miyamoto *et al.*, 2016のFig. 2A, C, EおよびFig. S1を改変して引用]

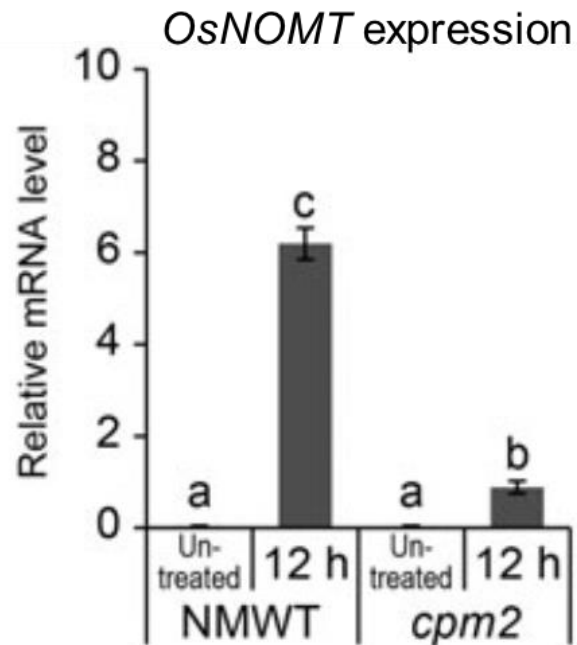


Figure 1-9 *cpm2* における紫外線照射後の *OsNOMT* の発現量

Effect of UV-irradiation on expression of *OsNOMT* in WT and *cpm2* rice leaves as determined by qRT-PCR. Values indicate relative expression levels before and 12 h after UV irradiation (n = 4). Expression levels are normalized to the expression of the ubiquitin domain-containing protein gene (*Os10g0542200*); bars indicate standard errors of the means. Statistically different data groups are indicated with different letters ($p < 0.05$ by one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test). NMWT: Nihonmasari wild-type. [Miyamoto *et al.*, 2016のFig. 3Aを改変して引用]

1-5 植物の防御応答に関与する転写因子

植物における防御応答は成長や稔性とトレードオフの関係であることが多いため、防御応答を誘導するシグナル伝達は極めて厳密に制御されている。その制御を担う因子として転写因子が存在する。防御応答に関与する転写因子として WRKY 型転写因子 [Chujo *et al.*, 2014; Mutuku *et al.*, 2015]、NAC 転写因子 [Nakashima *et al.*, 2007; Yoshii *et al.*, 2009]、bHLH 型転写因子 [Chinnusamy *et al.*, 2003; Miyamoto *et al.*, 2013]、MYB 転写因子 [Lee *et al.*, 2001]、bZIP 型転写因子 [Jakoby *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2009] などが知られている。転写因子は、タンパク質間相互作用 [Li, 2014; Miyamoto *et al.*, 2015] やリン酸化などの翻訳後修飾による活性化 [Wamaita *et al.*, 2012; Chujo *et al.*, 2014] を経て、あるいはエピジェネティック制御 [Roy, 2016; Gontarek *et al.*, in press] を介して、遺伝子の発現制御を行う。転写因子をコードする遺伝子の発現は植物ホルモンにより誘導または抑制され [Uno *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2006; Miyamoto *et al.*, 2013]、植物ホルモンによるシグナル伝達はそれらの転写因子を介して行われることが知られている。

ファイトアレキシン生産についても例外ではなく、多くの植物種において、植物ホルモンによりその発現やはたらきが制御される多種多様な転写因子がファイトアレキシンを含む二次代謝産物の生産制御因子として同定、解析されてきた [Shoji *et al.*, 2010; Saga *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2015]。

1-5-1 イネのファイトアレキシンの生産を制御する転写因子

イネのファイトアレキシンについても生産を制御する転写因子について研究が進められており、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産およびその生合成遺伝子の発現を制御する転写因子が同定、機能解析されている。これまでに、OsWRKY53、OsWRKY45、OsTGAP1、OsbZIP79、diterpenoid phytoalexin factor (DPF) などが既に同定され、イネの葉身や根において生合成遺伝子の発現を制御し、最終的にモミラクトン類、ファイトカサン類の蓄積量に影響を及ぼすことが報告されてきた [Chujo *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2014a; Akagi *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2015; Yamamura *et al.*, 2015; 吉田ら, 未発表データ]。一方、サクラネチンの生産や *OsNOMT* の発現を制御する転写因子に関する知見は、その重要性にもかかわらずこれまでに殆ど得られていない。

1-6 本研究の目的

以上の背景より、サクラネチンの生合成は JA 要求性防御応答のモデルケースとして位置づけられると考
えている。しかしながら、その制御メカニズムは殆ど解明がなされていない。

サクラネチン生産における必須遺伝子である *OsNOMT* の発現について、サクラネチンの生産同様 JA
要求性がある。したがって、JA 要求性を示す *OsNOMT* の発現制御を解明することで、サクラネチンの生
産制御機構の解明につながると予想される。

そこで本研究では、主に *OsNOMT* の発現を制御する転写因子の同定と機能解析を行うことで、サクラ
ネチンの生産制御機構を解明することを目的とした。

第2章

ジャスモン酸 (JA) 要求性をもつサクラネチン生合成を制御する転写因子の機能解析

2-1 緒言

第1章で述べたように、いもち病菌に対し強い抗菌活性を示すサクラネチンの生合成には *OsNOMT* 遺伝子が必須であり、その発現機構の解明はイネの防御応答解明において重要である。しかし、*OsNOMT* の発現を制御する転写因子については殆ど知見がなかった。一方、研究開始当初 *OsNOMT* の発現は JA により誘導されることが明らかにされており [Shimizu *et al.*, 2012]、またサクラネチンの生産は JA 要求性であることが示されていた [Riemann *et al.*, 2013; Shimizu *et al.*, 2013]。以上の背景から、*OsNOMT* の発現を制御する転写因子の発現も JA により誘導されることが予想された。そこで本章では、JA 要求性の誘導を示し、*OsNOMT* の発現、さらにはサクラネチンの生産を制御する転写因子の同定と機能解析を行うことを目的とした。

なお、本章におけるトランスクリプトーム解析および *OsMYC2* 発現抑制株、過剰発現株に関する実験は帝京大学の山根久和教授ら、コムギ無細胞タンパク質に関する実験は愛媛大学の澤崎達也教授らと共同で行った。

2-2 材料と方法

2-2-1 植物材料

レポータージーンアッセイには、*Oryza sativa* L., cv. Nipponbare を用いた。トランスクリプトームには、JA 合成変異株 *cpm2* [Riemann *et al.*, 2013] およびそのバックグラウンドである *Oryza sativa* L., cv. Nihonmasari を用いた。qRT-PCR による発現解析およびファイトアレキシンの定量には、*Oryza sativa* L., cv. Nihonmasari をベースとし、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下で RNAi 法により発現が抑制される *OsMYC2* 発現抑制株（以下 *osmyc2RNAi*）、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下で発現が促進される *OsMYC2* 過剰発現株（以下 *OsMYC2-OX*）、およびそれらの空ベクターである pANDA [Miki and Shimamoto, 2004]（奈良先端科学技術大学院大学・故島本功教授より譲渡）もしくは p2KG [Kitagawa *et al.*, 2010]（明治大学、澁谷直人教授より譲渡）で形質転換されたベクターコントロール（VC）を用いた。

イネの種子は籾を剥き、70%エタノールで2分間滅菌をした後 dH₂O で5回洗浄し、続いて1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液（関東化学）で20分滅菌した。塩素による滅菌後、オートクレーブ滅菌された水で5回以上洗浄した。滅菌した種子は0.5%の寒天培地に播種し、14時間明条件、10時間暗条件、28°C で生育した。

イネの形質転換体は、帝京大学理工学部バイオサイエンス学科の山根久和教授および宮本皓司博士が作出したものを譲渡頂き、系統の選抜から実験を開始した。

2-2-2 DNA の取り扱い

DNA 操作には大腸菌として *Escherichia coli* DH5 α 株または DB3.1 株を用いた。大腸菌は LB 培地にて 37°C で培養した [Sambrook and Russell, 2001]。培養に際して培地には kanamycin (Km; 終濃度 50 μ g/mL)、carbenicillin (Cb; 終濃度 50 μ g/mL)、chloramphenicol (Cm; 終濃度 30 μ g/mL) を必要に応じて添加した。プラスミドは LaboPassTM Plasmid Mini Plasmid DNA Purification Kit (cosmo GENETECH) または Wizard[®] Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) を用いて大腸菌より抽出した。DNA 断片は Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて抽出、精製した。操作は付属のプロトコールに従って行った。その他の DNA の取り扱いについては成書に従った [Sambrook and Russell, 2001]。

2-2-3 プラスミドの構築

プラスミドは、標準的な方法により構築した。PCR で増幅した断片はプラスミドにクローニングまたはサブクローニングした後シーケンス解析により配列を確認した。本章で使用したプラスミドは Table 2-1 に、クローニングに使用したプライマーは Table 2-2 に記載した。

pUbi-RLUC: 構築には、pRL (Promega, WI, USA) 由来の *renilla luciferase* の coding sequence (CDS) を PCR で

増幅し、pENTR/D-TOPO (Invitrogen, CA, USA) に組み込むことで得られたpENTR-RLUC (帝京大学、宮本博士より譲渡) [Ogawa *et al.*, 2017] を用いた。LR反応 (Gateway®) によりpENTR-RLUC に組み込まれたCDSをpUbi-RfA-Tnos [Chujo *et al.*, 2014] に組み込み、pUbi-RLUCを得た。

*pGL4-OsNOMT*₅₀₀₀, *pGL4-OsNOMT*₂₀₀₀, *pGL4-OsNOMT*₁₀₀₀, *pGL4-OsNOMT*₅₀₀, *pGL4-OsNOMT*₂₅₀, *pGL4-OsNOMT*₁₅₀, and *pGL4-OsNOMT*₅₀: *OsNOMT* 遺伝子の転写開始点上流5 kb、2 kb、1 kb、500 bp、250 bp、150 bp、および50 bpの領域をPCRで増幅し、*EcoRV*で切断したpZErO2 (Invitrogen) に組み込んだ。それらのベクターからプロモーター領域を切り出してpGL4.10-Tnos (pGL4.10 (Promega) のSV40 late poly (A) signalを*Bam*HIと*Xba*Iサイトで切断し、nopaline synthase terminator (Tnos) に置き換えたもの) に組み込み、レポータープラスミドを得た。

*pGL4-OsNOMT*₂₅₀₋₅₁, *pGL4-OsNOMT*₂₅₀₋₂₆: *OsNOMT* 遺伝子の転写開始点上流250 bpのうち、転写開始点に近い50 bpまたは25 bpを含まない領域 (-250~-51または-250~-26) をPCRで増幅し、*EcoRV*で切断したpGL4.10-Tnosに組み込み、レポータープラスミドを得た。

pUbi-JA-dependent MYB1, *pUbi-JA-dependent MYB2*, *pUbi-JA-dependent MYB3*, *pUbi-JA-dependent MYB4*, *pUbi-JA-dependent MYB5*, *pUbi-OsJAmyb*, *pUbi-OsMYB55*, *pUbi-OsMYC2*, *pUbi-OsMYL1*, and *pUbi-OsMYL2*: それぞれの遺伝子のCDSをPCRで増幅し、pENTR/D-TOPOに組み込んだ。続いてLR反応 (Gateway®) によりCDSをpUbi-RfA-Tnosに組み込み、エフェクタープラスミドを得た。なお、*OsMYL1*のCDSはRAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) のアノテーションと比較して39 bp長いことがPCRおよびシーケンス解析より確認された (章末参照)。

pnYOsMYC2, *pcYOsMYC2*, *pcYOsMYL1*, and *pcYOsMYL2*: 上で述べた、pENTR/D-TOPOに組み込まれたCDSをLR反応によりpnYGWまたはpcYGW [Hino *et al.*, 2010] (島根大学、中川強教授より譲渡) に組み込み、BiFC用プラスミドを得た。

pEU-E01-6His-Bls-optOsMYC2 and *pEU-E01-FLAG-optOsMYC2*: シロイヌナズナのcodon usageを用いて最適化した*OsMYC2* (*optimized OsMYC2*, *optOsMYC2*) のCDSについて、配列を3つに分けてGeneArt® Strings™ DNA Fragments service (Invitrogen) に合成を依頼した。合成された断片を2段階のPCRにより連結、増幅し、pENTR/D-TOPOに組み込むことでpENTR-optOsMYC2を得た。続いてLR反応によりCDSをpEU-E01-6His-Bls-GW (愛媛大学、根本圭一郎博士より譲渡) [Ogawa *et al.*, 2017] またはpEU-E01-FLAG-GW [Yano *et al.*, 2016] に組み込み、コムギ無細胞発現系によるタンパク質発現用プラスミドを得た。

pEU-E01-FLAG-OsMYL1 and *pEU-E01-FLAG-OsMYL2*: 上で述べた、pENTR/D-TOPOに組み込まれたCDSをLR反応によりpEU-E01-6His-Bls-GWまたはpEU-E01-FLAG-GW vectorに組み込み、コムギ無細胞発現系によるタンパク質発現用プラスミドを得た。

p35S-GAL-OsMYC2, *p35S-GAL-OsMYL1*, and *p35S-GAL-OsMYL2*: それぞれの遺伝子のCDSをPCRで増幅し、In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio USA) を用いて430T1.2 [Ohta *et al.*, 2000] (埼玉大学、高木優教授より譲渡) に組み込むことで目的プラスミドを得た。

2-2-4 レポータージーンアッセイ

播種後6-7日経過した第3葉期のイネから最大展開葉を切り離し、明条件、28°Cで一晩順化させた後、パーティクルガンによる遺伝子導入に用いた。

*OsNOMT*の転写開始点上流域が*firefly luciferase (FLUC)* に連結されたベクターをレポータープラスミド、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下で*Renilla luciferase (RLUC)* を恒常的に発現させるベクターをインターナルコントロール、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下でGUSまたは転写因子を恒常的に発現させるベクターをエフェクタープラスミドとして用いた。遺伝子導入はPDS-1000 He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad) を用いて行った。1回の遺伝子導入には、レポータープラスミド1 µg、0.5 µgのpUbi-RLUC、およびエフェクタープラスミド (1種類につき0.5 µg) でコーティングした金粒子0.6 mg ($\Phi = 1.6 \mu\text{m}$, Bio-Rad) を使用した。コーティングされた金粒子は9 cmの距離から1100 psiの圧力で葉身に打ち込んだ。遺伝子が導入された葉身を24時間、明条件、28°Cでインキュベートし、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) および Centro LB960 plate reader (Berthold Japan) を用いて付属のプロトコールに従いluciferase (LUC) assayを行った。インキュベート前、必要に応じて500 µMのJAまたは塩化銅を処理してからインキュベートを開始した。それぞれのLUC assayについて、Firefly LUCのシグナル値を*Renilla* LUCのシグナル値で割った値を算出し、レポーター活性を評価した。

2-2-5 トランスクリプトーム解析

それぞれのサンプルには、4個体のイネから第4葉を切り取り、1つにまとめたものを用いた。1 mMの塩化銅を処理し、2、6、24時間の経時点で回収したイネ葉身からRNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用いてtotal RNAを抽出した。コントロールとして、塩化銅を処理しなかったサンプルからも同様の方法でRNAを抽出した。RNAはCyanine 3 dye (Cy3) でラベリングし、各サンプル1650 ngのラベル化cRNAを44k features (Agilent Technologies, CA, USA) にハイブリダイズさせた。

それぞれ3連分のデータを解析し、Subio Platform with Basic Plug-in (Subio Inc., Kagoshima, Japan) を用いてデータのノーマライゼーションおよび統計処理を行った。トランスクリプトームデータはNCBIの

Gene Expression Omnibus にデポジットした (ID: GSE87698)。

なお、マイクロアレイ解析および Subio を用いたデータ処理は帝京大学、宮本皓司博士に行って頂き、ノーマライゼーションおよび統計処理が行われたデータをもとにした解析から開始した。

2-2-6 イネ形質転換体の選抜

形質転換体の選抜は、イネのゲノム DNA をテンプレートとし、transgene に含まれる大腸菌由来の *hygromycin phosphotransferase (HPT)* を増幅することで行った。まずイネの地上部を 2 mm 各程度で切り取り、100 μ L の TPS buffer (100 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) に浸漬した後チップで穴をあけ、ボルテックスの後 95°C で 10 分加熱してゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA 溶液は 16000 g で 5 分遠心し、上清を以下の PCR に用いた。

Primers

Fw: 5'-ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTC-3'

Rv: 5'-CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG-3'

Components	(μ L)
2x KOD FX neo buffer	5
dNTPs (2 mM each)	2
Fw Primer (10 μ M)	0.3
Rv Primer (10 μ M)	0.3
Template	1
KOD FX neo	0.2
<u>d2W</u>	<u>1.2</u>
Total	10

Program: 94°C 2 min. → [98°C 10 sec. → 68°C 70 sec.] x36 → 4°C

この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、*HPT* の増幅が見られたものを形質転換体とした。

2-2-7 qRT-PCR による遺伝子発現解析

2-2-6 の方法で選抜した形質転換体について、播種後 10 日でイネ葉身を切り出し、明条件、28°C で一晩静置して傷害処理を解除して実験に用いた。イネ葉身を 500 μ M の JA または塩化銅で 6 時間処理し、回

収後すぐに液体窒素で凍結させた。また、処理前 (0 h) にもイネ葉身を回収しコントロールとした。サンプルは RNA の抽出を行うまで -80° C にて保存した。イネからの total RNA の抽出は Maxwell® 16 LEV Plant RNA Kit (Promega) を用いて付属のプロトコールに従い行った。抽出した total RNA のうち最大 1 µg を、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara BioInc.) を用いて逆転写し、合成された cDNA を qRT-PCR に用いた。それぞれの qRT-PCR につき、全てのサンプルで cDNA 量を total RNA 量相当で統一した。qRT-PCR において検量線を作製するための検量線用サンプルは、イネ葉身由来の cDNA をテンプレートにして PCR を行い、PCR 産物をアガロース電気泳動に供してバンドが単一であることを確認した後に切り出して精製したものをを用いた。

qRT-PCR は Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、付属のプロトコールに従って行った (PCR 条件および Dissociation 条件は下に示した)。シグナルの検出には ABI Prism 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。内部標準としてユビキチンをコードする *OsUBQ* を用い、各遺伝子由来のシグナルをこの *OsUBQ* のシグナル値で割った値を算出し、発現レベルを評価した。qRT-PCR に使用したプライマーは Table 2-3 に記載した。

qRT-PCR components

Power SYBR® Green PCR Master Mix	10 µL
Primers (10 µM)	0.4 µL each
Template DNA	2 µL
<u>dH₂O</u>	<u>7.2 µL</u>
total	20 µL

qRT-PCR 条件 :

95°C 10 min. → [95°C; 15 sec. → 60°C: n sec.] x 40

n; *OsUBQ*, *OsNOMT*: 35, *OsMYC2*: 30

Dissociation 条件 :

95°C 15 sec. → 60°C 1 min. → 95°C 15 sec. → 60°C 15 sec.

2-2-8 ファイトアレキシンおよびナリングニンの定量

2-2-6 の方法で選抜した形質転換体について、播種後 10 日でイネ葉身を切り出し、明条件、28°C で一晚静置して傷害処理を解除して実験に用いた。イネ葉身を 500 µM の JA 溶液または塩化銅溶液で 72 時間処理し、ファイトアレキシン抽出溶媒 (エタノール:蒸留水:アセトニトリル:酢酸、79:13.99:7:0.01 (v/v/v/v)) に浸漬した。回収の際、それぞれのサンプルについて葉身重量を測定した。溶媒に浸漬後 4°C で 24 時間静置することでファイトアレキシンおよびナリングニンを抽出した。また、処理前 (0 h) にもイネ葉身を回収しコントロールとした。サンプルはファイトアレキシンの定量を行うまで -20°C にて保存した。

抽出後のサンプルを 16000 g で 15 分、4°C で遠心し、上清 5 μ L 分を LC-MS/MS 分析に供した。測定は liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) を用いた。

定量には抽出サンプルの内 5 μ L 分を用い、各ファイトアレキシンの標品 50 pg 分を混合したサンプルを測定して得られたピーク面積との比で計算した。下記の定量条件は Shimizu *et al.* (2008) に従った。

HPLC 条件：

カラム PEGASIL ODS 2 ϕ ×150 mm (Senshu Scientific)
 溶出溶媒 (アイソクラティック) 70% アセトニトリル、0.1% 酢酸
 流速 200 μ L/min

MS/MS 条件：

MS/MS PE.API3000
 イオンソース Turbo ion spray (ESI)

イオン化条件；

共通パラメーター

NEB	CUR	CAD	IS	TEM	Time	EP
14	10	4	5000	400	150	10

固有パラメーター

	Q1	Q3	DP	FP	CE	CXP
Phytocassanes A, E, D	316.978	299.100	26	120	15	26
Phytocassane B	335.071	317.100	41	180	21	30
Phytocassane C	319.114	301.200	31	140	17	18
Momilactone A	315.175	271.300	41	190	25	12
Momilactone B	331.078	269.000	51	230	25	20
Sakuranetin	287.019	167.200	46	200	37	14
Naringenin	273.120	152.900	41	180	35	10

2-2-9 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay

実験には、市販のタマネギを用いた。N末端側にnEYFPを融合させたタンパク質、N末端側にcEYFPを融合させたタンパク質、およびDsRed1をそれぞれコードする3種類のプラスミドを、PDS-1000 He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad, CA, USA) を用いてタマネギ表皮細胞に導入した。1回の遺伝子導入には

3種類のプラスミドを0.5 µgずつ使用した。その他の遺伝子導入の条件は2-2-4と同様とした。遺伝子導入後、蛍光顕微鏡で観察する前にイネ葉身を24時間明条件、25°Cでインキュベートした。蛍光はBX53 microscope system (Olympus, Japan) を用いて観察した。YFP蛍光およびDsRed1蛍光の観察には、それぞれU-FBNA filter cube (excitation filter, BP470-495 nm; dichromatic mirror, DM505 nm; and suppression filter, BA510-550 nm) とU-FGW cube (excitation filter, BP530-550 nm; dichromatic mirror, DM570 nm; and suppression filter, BA575IF nm) を用いた。

2-2-10 組み換えタンパク質の発現

タンパク質の発現はコムギ無細胞発現系を用いて行った [Madin *et al.*, 2000; Sawasaki *et al.*, 2002]。発現には WEPRO7240H Expression Kit (CellFree Sciences) を用い、付属のプロトコールに従って行った。OsMYC2 の発現は、シロイヌナズナの codon usage を用いて最適化、同義置換した CDS をもとに行った (章末参照)。His タグと biotin ligation site (Bls) [Sawasaki *et al.*, 2008] を付加したタンパク質はビオチン化後、FLAG タグ付きタンパク質との相互作用解析に用いた。

なお、実験はプラスミドの構築まで行い、コムギ無細胞発現系を用いたタンパク質の発現は愛媛大学、根本圭一郎博士に行って頂いた。

2-2-11 AlphaScreen によるタンパク質間相互作用解析

Alpha とは、Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay の略である。2-2-10 で発現させた組換えタンパク質を用いて AlphaScreen を行った。相互作用は、Donor bead を 680 nm の光で励起させ、acceptor bead より放出される (520-620 nm) の光の強度を測定することで評価した。方法は、Nemoto *et al.* (2015) で述べられたものを一部改変して行った。

15 µL のタンパク質溶液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.1% Tween20, 1 mg/mL BSA, 1 µL 分 (約 2 µg) の粗製ビオチン化タンパク質, 1 µL 分 (約 2 µg) の粗製 FLAG タグ付きタンパク質) を 384-well Optiplate (PerkinElmer) 中で 1 時間、25° C でインキュベートした。その後、AlphaScreen IgG (ProteinA) detection kit (PerkinElmer) のプロトコールに従い、10 µL の検出溶液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.1% Tween20, 1 mg/mL BSA, 5 µg/mL anti-DYKDDDDK 抗体 (1E6, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan), 0.1 µL streptavidin-coated donor beads, 0.1 µL Protein A-coated acceptor beads) を先述のタンパク質溶液に加え、25°C で 1 時間インキュベートした。発光は AlphaScreen detection program により検出した。

なお、AlphaScreen は愛媛大学、根本圭一郎博士に行って頂いた。

2-2-12 統計解析

全てのデータは平均 ± 標準誤差で表した。トランスクリプトーム解析以外では、有意差検定は両側検定、独立の Welch's *t*-test により行った。P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), または P < 0.001 (***) のとき、有意差があると定義した。トランスクリプトーム解析では、2-2-5 で述べた方法で有意差検定を行った。False discovery rate (FDR) Q value < 0.05 のとき、有意差があると定義した。

2-2-13 本章で扱った遺伝子の gene ID

RAP-DB の gene ID は以下の通りである。

JAdMYB1 (Os01g0702700), JAdMYB2 (Os12g0564100), JAdMYB3 (Os01g0192300), JAdMYB4 (Os05g0429900), JAdMYB5 (Os08g0549000), OsJAmyb (Os11g0684000), OsMYB55 (Os05g0553400), OsMYC2 (Os10g0575000), OsMYL1 (Os01g0705700), OsMYL2 (Os01g0235700), OsNOMT (Os12g0240900), OsUBQ (Os10g0542200).

先述の通り、OsMYL1 の CDS の一部がイントロンとしてアノテーションされている。

Table 2-1 本章で使用したプラスミド

Vector	Relevant characteristics	Reference
pENTR/D-TOPO	Km ^R , Gateway system entry vector	Invitrogen
pENTR-RLUC	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>renilla luciferase</i> CDS	Ogawa <i>et al.</i> , 2017
pRL	Amp ^R , CaMV 35S promoter- <i>Renilla LUC</i>	Promega
pUbi-RfA-Tnos	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , pUCAP/Ubi-NT containing gateway cassette (RfA, invitrogen) cloned into <i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I sites after blunting	Chujo <i>et al.</i> , 2014
pUbi-RLUC	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>renilla luciferase</i> CDS	This study
pZErO2	Km ^R , <i>ccdB</i> , cloning vector	Invitrogen
pZErO2-OsNOMT ₅₀₀₀	Km ^R , pZErO2 containing 5' 5-kb upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₂₀₀₀	Km ^R , pZErO2 containing 5' 2-kb upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₁₀₀₀	Km ^R , pZErO2 containing 5' 1-kb upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₅₀₀	Km ^R , pZErO2 containing 5' 500-bp upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₂₅₀	Km ^R , pZErO2 containing 5' 250-bp upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₁₅₀	Km ^R , pZErO2 containing 5' 150-bp upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₅₀	Km ^R , pZErO2 containing 5' 50-bp upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₂₅₀₋₅₁	Km ^R , pZErO2 containing 5' 250–51-bp upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pZErO2-OsNOMT ₂₅₀₋₂₆	Km ^R , pZErO2 containing 5' 250–26-bp upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pGL4-Tnos	Amp ^R , Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₅₀₀₀	Amp ^R , 5' 5-kb upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₂₀₀₀	Amp ^R , 5' 2-kb upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₁₀₀₀	Amp ^R , 5' 1-kb upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₅₀₀	Amp ^R , 5' 500-bp upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₂₅₀	Amp ^R , 5' 250-bp upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₁₅₀	Amp ^R , 5' 150-bp upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₅₀	Amp ^R , 5' 50-bp upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₂₅₀₋₅₁	Amp ^R , 5' 250–51-bp upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pGL4-OsNOMT ₂₅₀₋₂₆	Amp ^R , 5' 250–26-bp upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study
pENTR-OsMYC2	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pENTR-OsMYL1	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsMYL1</i> CDS	This study
pENTR-OsMYL2	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsMYL2</i> CDS	This study
pENTR-JAdMYB1	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>JA-dependent (JAd) MYB1</i> CDS	This study
pENTR-JAdMYB2	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>JAdMYB2</i> CDS	This study
pENTR-JAdMYB3	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>JAdMYB3</i> CDS	This study

Table 2-1 (続き)

Vector	Relevant characteristics	Reference
pENTR-JAdMYB4	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>JAdMYB4</i> CDS	This study
pENTR-JAdMYB5	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>JAdMYB5</i> CDS	This study
pENTR-OsJAmyb	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsJAmyb</i> CDS	This study
pENTR-OsMYB55	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsMYB55</i> CDS	This study
pUbi-GUS	Amp ^R , pUbi_RfA containing 1.8 kb <i>GUS</i> fragment from pENTR-GUS	Chujo <i>et al.</i> , 2014
pUbi-OsMYC2	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pUbi-OsMYL1	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsMYL1</i> CDS	This study
pUbi-OsMYL2	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsMYL2</i> CDS	This study
pUbi-JAdMYB1	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>JAdMYB1</i> CDS	This study
pUbi-JAdMYB2	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>JAdMYB2</i> CDS	This study
pUbi-JAdMYB3	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>JAdMYB3</i> CDS	This study
pUbi-JAdMYB4	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>JAdMYB4</i> CDS	This study
pUbi-JAdMYB5	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>JAdMYB5</i> CDS	This study
pUbi-OsJAmyb	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsJAmyb</i> CDS	This study
pUbi-OsMYB55	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsMYB55</i> CDS	This study
pENTR-OsMYC2 RNAi	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing 748-bp trigger region of <i>OsMYC2</i>	Ogawa <i>et al.</i> , 2017
pANDA	Hm ^R , Km ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , maize <i>ubiquitin</i> promoter-Gateway (reverse)- <i>gus</i> linker-Gateway- <i>NOS</i> terminator,	Miki and Shimamoto, 2004
pANDA-OsMYC2	Hm ^R , Km ^R , pANDA containing 748-bp trigger region of <i>OsMYC2</i>	Ogawa <i>et al.</i> , 2017
pENTR-OsMYC2 OX	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsMYC2</i> CDS for p2KG-OsMYC2	This study
p2KG	Hm ^R , Km ^R , maize <i>ubiquitin</i> promoter-Gateway- <i>NOS</i> terminator	Kitagawa <i>et al.</i> , 2010
p2KG-OsMYC2	Hm ^R , Km ^R , p2KG containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pnYGW	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , CaMV 35S promoter- nEYFP-Gateway- <i>NOS</i> terminator	Hino <i>et al.</i> , 2011
pcYGW	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , CaMV 35S promoter- cEYFP-Gateway- <i>NOS</i> terminator	Hino <i>et al.</i> , 2011
pnYOsMYC2	Amp ^R , pnYGW containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pcYOsMYC2	Amp ^R , pcYGW containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pcYOsMYL1	Amp ^R , pcYGW containing <i>OsMYL1</i> CDS	This study
pcYOsMYL2	Amp ^R , pcYGW containing <i>OsMYL2</i> CDS	This study
pTH121R	Amp ^R , CaMV 35S promoter- <i>DsRed1</i> - <i>NOS</i> terminator	Miyamoto <i>et al.</i> , 2015
pENTR-optOsMYC2	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing optimized <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pEU-E01-6His-Bls-GW-STOP	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , SP6 promoter-E01 translational enhancer-His tag-biotin ligation site-Gateway	Ogawa <i>et al.</i> , 2017

Table 2-1 (続き)

Vector	Relevant characteristics	Reference
pEU-E01-FLAG-GW-STOP	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , SP6 promoter-E01 translational enhancer-FLAG tag-Gateway	Yano <i>et al.</i> , 2016
pEU-HisBls-optOsMYC2	Amp ^R , pEU-E01-6His-Bls-GW containing optimized <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pEU-FLAG-optOsMYC2	Amp ^R , pEU-E01-FLAG-GW containing optimized <i>OsMYC2</i> CDS	This study
pEU-FLAG-OsMYL1	Amp ^R , pEU-E01-FLAG-GW containing <i>OsMYL1</i> CDS	This study
pEU-FLAG-OsMYL2	Amp ^R , pEU-E01-FLAG-GW containing <i>OsMYL2</i> CDS	This study
430T1.2	Amp ^R , CaMV 35S promoter-GAL4 DNA binding domain- <i>NOS</i> terminator	Ohta <i>et al.</i> , 2000
p35S-GAL-OsMYC2	Amp ^R , 430T1.2 containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study
p35S-GAL-OsMYL1	Amp ^R , 430T1.2 containing <i>OsMYL1</i> CDS	This study
p35S-GAL-OsMYL2	Amp ^R , 430T1.2 containing <i>OsMYL2</i> CDS	This study
GAL4-TATA-LUC-NOS	Amp ^R , GAL4 <i>cis</i> -firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	Hiratsu <i>et al.</i> , 2004

Table 2-2 ベクター構築に使用したプライマー

Primer	Sequence
RLUC Fw	5'-CACCATGACTTCGAAAGTTTATGATCCA-3'
RLUC Rv	5'-TTATTGTTTCATTTTTGAGAACTCGCT-3'
OsNOMT ₅₀₀₀ Fw	5'-AAAGGTACCATTTAATCGACCTTTAAGCAATTTTCTATAATCTTCTTC-3'
OsNOMT ₅₀₀₀ Rv	5'-GGGGAGCTCGCTACTATACGGGGACACTG-3'
OsNOMT ₂₀₀₀ Fw	5'-AAAGGTACCACACCTATTTTTTTTATTACGTGATACACC-3'
OsNOMT ₂₀₀₀ Rv	5'-GGGGAGCTCGCTACTATACGGGGACACTG-3'
OsNOMT ₁₀₀₀ Fw	5'-AAAGGTACCATAATTCTCCCATATATGTAGACAGTTTC-3'
OsNOMT ₁₀₀₀ Rv	5'-GGGGAGCTCGCTACTATACGGGGACACTG-3'
OsNOMT ₅₀₀ Fw	5'-AAACTCGAGAAACAGTAGTTAAGTTTTTTTTTATAGTCGTAC-3'
OsNOMT ₅₀₀ Rv	5'-GGGAGATCTGCTACTATACGGGGACAC-3'
OsNOMT ₂₅₀ Fw	5'-AAACTCGAGTAGGAAGTTTAATGGACTTTTAGTAGATAATAG-3'
OsNOMT ₂₅₀ Rv	5'-GGGAGATCTGCTACTATACGGGGACAC-3'
OsNOMT ₁₅₀ Fw	5'-AAACTCGAGAACGTTGGAAAAACCAACTACAC-3'
OsNOMT ₁₅₀ Rv	5'-GGGAGATCTGCTACTATACGGGGACAC-3'
OsNOMT ₅₀ Fw	5'-AAACTCGAGAGCTAGGTATCCTAGCTATATAAAC-3'
OsNOMT ₅₀ Rv	5'-GGGAGATCTGCTACTATACGGGGACAC-3'
OsNOMT ₂₅₀₋₅₁ Fw	5'-TAGGAAGTTTAATGGACTTTTAGTAGATAATAGATAAATAG-3'
OsNOMT ₂₅₀₋₅₁ Rv	5'-TATTGGGCACGCATGCATG-3'
OsNOMT ₂₅₀₋₂₆ Fw	5'-TAGGAAGTTTAATGGACTTTTAGTAGATAATAGATAAATAG-3'
OsNOMT ₂₅₀₋₂₆ Rv	5'-GTTTATATAGCTAGGATACCTAGCTTATTGG-3'
OsMYC2 Fw	5'-CACCATGAACCTTTGGACGGACGACAACGCGTC-3'
OsMYC2 Rv	5'-TTACCGGGCGGCGGTGCC-3'
OsMYL1 Fw	5'-CACCATGTCGTGGTCCGAGACG -3'
OsMYL1 Rv	5'-TCACGGGGAGGGAGTGGTG -3'
OsMYL2 Fw	5'-CACCATGGTGATGAAGATGGAGGC -3'
OsMYL2 Rv	5'-CTACCCTGAGTTCATCACGC -3'
JAdMYB1 Fw	5'-CACCATGGGACGGCACGCGTGCTC -3'
JAdMYB1 Rv	5'-TCATCGGAAGTACTCGAAGTTGAAGTCGCCGAC -3'
JAdMYB2 Fw	5'-CACCATGGCAGCATCGCAGAGGAG -3'
JAdMYB2 Rv	5'-TCATCGATTCCATATATAATTCGAATCAAATCGACATCG -3'
JAdMYB3 Fw	5'-CACCATGGCCAGGAAATGCTCCAGCTG -3'
JAdMYB3 Rv	5'-TCAAGTGACCCTGATTGTCCCCAAAAAAGG -3'

Table 2-2 (続き)

Primer	Sequence
JAdMYB4 Fw	5'-CACCATGGGGAGGTCGCCGTGCTG -3'
JAdMYB4 Rv	5'-TCATATGTAAGTGGCCTTGTTCACCGCCTG -3'
JAdMYB5 Fw	5'-CACCATGGGGAGGTCGCCGTGCTG -3'
JAdMYB5 Rv	5'-TCATTTTCATGGGGAGGCTTCTGAAGTCGAGC -3'
OsJAmyb Fw	5'-CACCATGGAGATGGTGCTGCAGAGGAC -3'
OsJAmyb Rv	5'-TTATTGCATCTTCCATATGTCCTCTAGACTCCATAGAG -3'
OsMYB55 Fw	5'-CACCATGGGGCGCGCGCCGTGCTG -3'
OsMYB55 Rv	5'-CTATGTCAGGGTGTGTCAGAGACCCTGTGGCTTGG -3'
OsMYC2 RNAi Fw	5'-CACCTCCTACATCAACGAGCTCC-3'
OsMYC2 RNAi Rv	5'-ACAAGGACCAACATATCGCC-3'
OsMYC2 p2KG Fw	5'-CACCATGAACCTTTGGACGGACGACAACG-3'
OsMYC2 p2KG Rv	5'-TTACCGGGCGCGGTGCC-3'
pEU-bls-InFusion Fw	5'-AACGACATCTTCGAGGCCAGAAAGATCGAGTGGCACGAAACAAGTTTGTACAAAAAAGC-3'
pEU-bls-InFusion Rv	5'-CTCGAAGATGTCGTTCCAGGCCATGATGGTGATGGTGATGCATGATATCTTGGTGATGTAG-3'
optOsMYC2 Fw 1-	5'-CACCATGAACCTCTGGACCGATGATAACG-3'
optOsMYC2 Fw 671-	5'-GTGTTCTCGAGCTTGATCTACCGATGTGATCTTCCAGAC-3'
optOsMYC2 Rv	5'-TCATCTAGCAGCAGTACCAGGTTTC-3'
OsMYC2 GAL4 Fw	5'-GGAGGCCGAATTC <u>CCCGGG</u> GATGAACCTTTGGACGGACGACAACCGCTC-3'
OsMYC2 GAL4 Rv	5'-GGTCGACGGAT <u>CCCGGG</u> TTACCGGGCGCGGTGCC-3'
OsMYL1 GAL4 Fw	5'-GGAGGCCGAATTC <u>CCCGGG</u> GATGTCGTGGTCCGAGACGGACG-3'
OsMYL1 GAL4 Rv	5'-GGTCGACGGAT <u>CCCGGG</u> TACGGGGAGGGAGTGGTGAC-3'
OsMYL2 GAL4 Fw	5'-GGAGGCCGAATTC <u>CCCGGG</u> GATGGTGATGAAGATGGAGGCTGATG-3'
OsMYL2 GAL4 Rv	5'-GGTCGACGGAT <u>CCCGGG</u> CTACCCTGAGTTCATCACGCGAG-3'

付加した制限酵素サイトは下線で、Bls タグのエピトープ配列は陰影で、His タグ配列は太字で示した。

Table 2-3 qRT-PCR に使用したプライマー

Primer	Sequence	Target gene
OsUBQ RT Fw	5'-TCCGAGAGATGGGTTTCATC -3'	<i>OsUBQ</i>
OsUBQ RT Fw	5'-GCCAAGATTGCCAAGAAGAC-3'	<i>OsUBQ</i>
OsMYC2 RNAi Fw	5'-AGCTCAACCAGCGCTTCTAC-3'	<i>OsMYC2</i> (for <i>osmyc2RNAi</i>)
OsMYC2 RNAi Rv	5'-GTCTCCTTGTCCTCCAG-3'	<i>OsMYC2</i> (for <i>osmyc2RNAi</i>)
OsMYC2 Fw	5'-TGGACGTGTACCATGCCAGC-3'	<i>OsMYC2</i> (for <i>OsMYC2-OX</i>)
OsMYC2 Rv	5'-TTGAGCTGGTCCTGCGAGTAGAC-3'	<i>OsMYC2</i> (for <i>OsMYC2-OX</i>)
OsNOMT Fw	5'-AAGGTGTTTCATGGAGAACTGGTA-3'	<i>OsNOMT</i>
OsNOMT Rv	5'-CTGGTTGAAGAGCGTGTGGA-3'	<i>OsNOMT</i>

2-3 結果

2-3-1 JA 誘導的に *OsNOMT* の発現を制御する転写因子の探索

JA 誘導的に *OsNOMT* の発現を制御する転写因子を同定するにあたり、*OsNOMT* の転写開始点最長 5 kb を用いたレポータージーンアッセイを行い、JA による発現誘導に必要なシス配列の決定を試みた。しかし、イネ葉身に JA および塩化銅を処理してもレポーター活性の上昇が見られなかったため (Figs. 2-1 and 2-2)、先に *OsNOMT* の発現を制御する転写因子の同定を行うこととした。それにあたり、JA 要求性の誘導を示す転写因子群の選抜をトランスクリプトーム解析により行った。イネ植物体としては、JA 生合成酵素の一つである allene oxide cyclase を欠損した JA 生合成変異株 *cpm2* [Riemann *et al.*, 2013] に塩化銅を処理したものをを用いた。*cpm2* においては塩化銅処理時にサクラネチンの蓄積量が顕著に減少する一方、JA 非要求性シグナルでも生産が誘導されるジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積量は野生型株と同等であった。また、JA を処理するとサクラネチンもジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積量は野生型株と同様の蓄積量を示していた [清水博士論文, 2012]。この報告より、塩化銅処理時の *cpm2* では JA 要求性の応答が特異的に抑制されていると判断した。

このトランスクリプトーム解析では、野生型株において *OsNOMT* の発現誘導が 6 時間後に起こり、その後 24 時間後まで発現が上昇した (Table 2-4)。JA 誘導性の制御因子は *OsNOMT* の誘導に先立って誘導されると考えられたため、2 時間後または 6 時間後に以下 3 点の基準を満たす転写因子の遺伝子を選抜した。

- ①WT において、塩化銅処理により未処理のサンプルと比較して 2 倍を超えて発現が誘導される。
- ②塩化銅処理時、*cpm2* において WT と比較して 1/2 未満に発現が抑えられる。
- ③False discovery rate (FDR) が Q value < 0.05 である。

選抜の結果、bHLH、MYB、NAC、WRKY、bZIP 型の転写因子合計 41 個が選抜された (Table 2-5)。このなかには、シロイヌナズナにおける JA シグナルのマスターレギュレーターである AtMYC2 [Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Kazan and Manners, 2013; Goossens *et al.*, 2015] のホモログである OsMYC2 や、非生物的ストレスに対する防御応答を正に制御する R2R3 型の MYB 転写因子 OsJAmyb [Lee *et al.*, 2001; Yokotani *et al.*, 2013] が含まれていた。OsMYC2 自身も JA シグナルを正に制御することが分かっており、JA 処理により誘導されること、過剰発現株ではイネ白葉枯れ病菌に対する抵抗性の上昇など JA シグナルが亢進されることが明らかにされている [Uji *et al.*, 2016]。この OsMYC2 について、系統樹解析の結果、相同性の高い転写因子である OsMYC2-like protein 1 (OsMYL1) が見出された (Fig. 2-3)。この OsMYL1 もまた、JA 要求性の誘導を示していた (Table 2-5)。また、MYB 型転写因子は bHLH 型転写因子と相互作用してフラボノイド生合成遺伝子の発現を誘導し、アントシアニンなどの生合成に関与することが知られている [Li, 2014]。以上より、OsMYC2、OsMYL1、および MYB 転写因子に着目して以降の解析を行った。

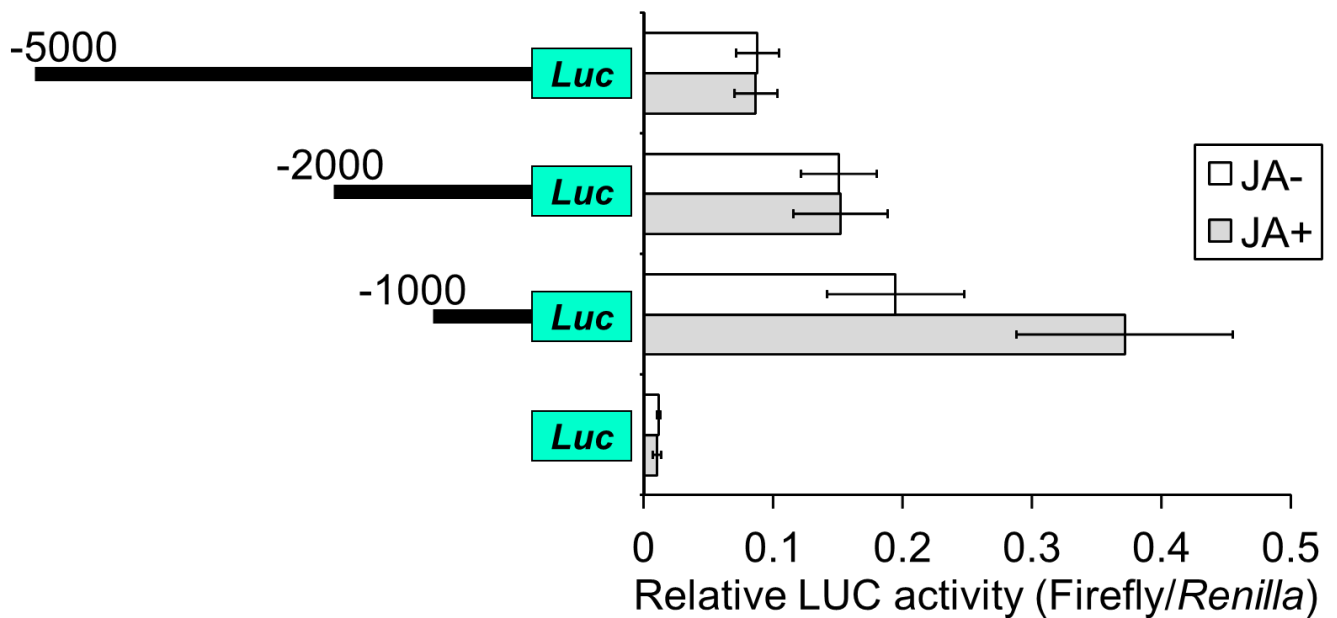


Figure 2-1 *OsNOMT* の転写開始点 1~5 kb を用いたレポーター遺伝子アッセイ

パーティクルガンによる遺伝子導入後、500 μ M の JA を 24 時間処理したイネ葉身 (gray bars) および JA を処理せずに 24 時間インキュベートした葉身 (open bars) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。エフェクタープラスミドは導入しなかった。横軸は、LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 ($n = 7$) \pm 標準誤差で表した。

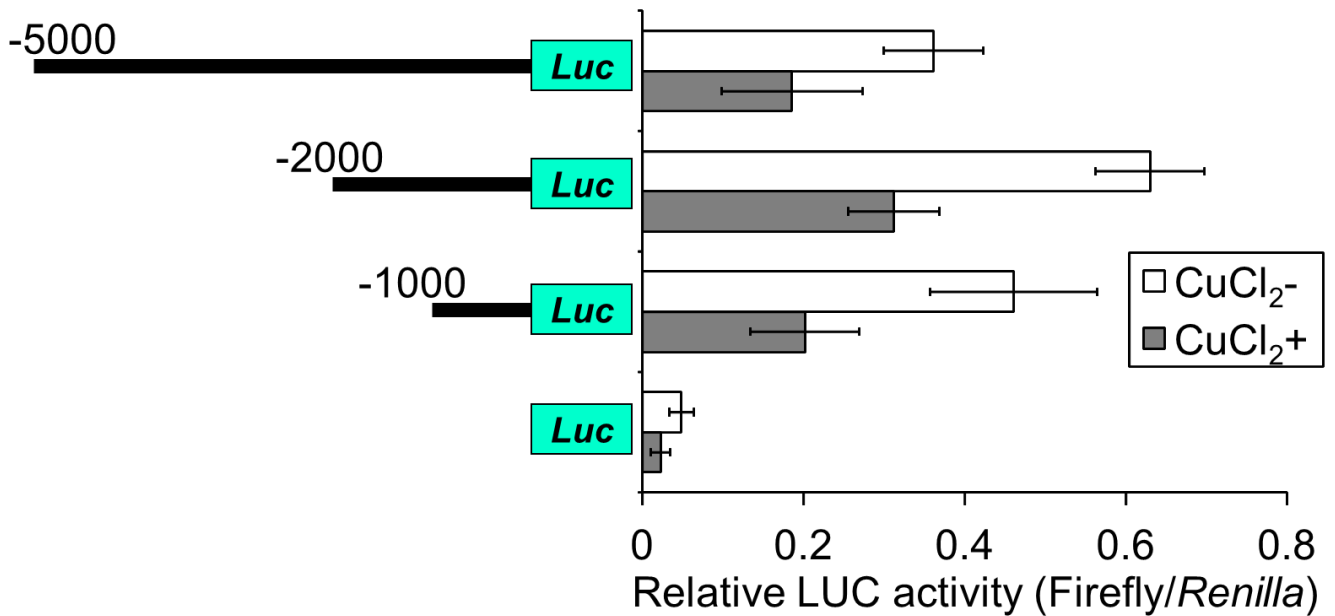


Figure 2-2 *OsNOMT* の転写開始点 1~5 kb を用いたレポータージーンアッセイ

パーティクルガンによる遺伝子導入後、500 μM の塩化銅を 24 時間処理したイネ葉身 (gray bars) および塩化銅を処理せずに 24 時間インキュベートした葉身 (open bars) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。エフェクタープラスミドは導入しなかった。横軸は、LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (*Renilla luciferase*) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 7) ± 標準誤差で表した。

Table 2-4 トランスクリプトーム解析における塩化銅処理後の *OsNOMT* の発現誘導 (WT)

Gene ID	Gene name	WT CuCl ₂ 2 h		WT CuCl ₂ 6 h		WT CuCl ₂ 24 h	
		/WT water 2 h	Q value	/WT water 6 h	Q value	/WT water 24 h	Q value
Os12g0240900	OsNOMT	1.115	#	12.213	0.0038	17.002	0.0011

は 誘導倍率が 2 倍以下、FDR が 0.05 以上の片方または両方であることを表す。

Table 2-5 トランスクリプターム解析により選抜されたJA誘導性転写因子

Type	Gene ID	Gene name	Description	WT CuCl2 2 h /WT water 2 h	Q value	cpm2 CuCl2 2 h /WT CuCl2 2 h	Q value	WT CuCl2 6 h /WT water 6 h	Q value	cpm2 CuCl2 6 h /WT CuCl2 6 h	Q value	
HLLH/bHLH	Os01g0108600	JADMYB3	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein.	2.208	0.0031	0.081	0.0085	1.401	#	0.042	#	
	Os01g0196300	DPF	Helix-loop-helix DNA binding domain containing protein.	65.337	0.0041	0.488	0.0204	130.220	#	2.781	#	
	Os01g0705700	OsMYL1	Similar to Transcription factor ICE1 (Inducer of CBF expression 1) (Basic helix-loop-helix protein 116).	70.452	0.0019	0.107	0.0015	49.453	0.0004	0.045	0.0054	
	Os02g0120500	OsbHLH5	Helix-loop-helix DNA binding domain containing protein.	2.960	0.0337	0.327	0.0440	1.902	#	1.018	#	
	Os02g0605600	OsbHLH10	Similar to Phytochrome-interacting factor 3 (Phytochrome-associated protein 3) (Basic helix-loop-helix protein 8)	1.080	#	0.870	#	2.380	0.0080	0.401	0.0371	
	Os03g0741100	OsbHLH148	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein.	38.999	0.0017	0.128	0.0183	22.264	#	0.229	#	
	Os04g0301500	REB1	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein.	631.858	0.0137	0.007	0.0066	58.968	#	0.016	#	
	Os05g0163900	OsbHLH036	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein.	9.984	0.0137	0.092	0.0126	5.653	0.0009	0.344	0.0414	
	Os07g0628500	OsbHLH1	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein.	1.398	#	0.483	#	3.197	0.0261	0.417	0.0210	
	Os09g0501600	OsbHLH092	Similar to MYC1.	1.901	#	0.417	#	6.826	0.0039	0.288	0.0035	
	Os10g0376900	OsbHLH045	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein.	2.558	#	0.243	#	3.365	0.0013	0.139	0.0251	
	Os10g0575000	OsMYC2	Similar to Transcription factor MYC7E (Fragment).	3.177	0.0083	0.177	0.0103	2.355	0.0011	0.214	0.0179	
	MYB	Os01g0192300	JADMYB3	Similar to R1MYB1 protein.	15.686	0.0072	0.083	0.0396	9.418	0.0330	0.104	0.0117
		Os01g0702700	JADMYB1	Similar to Transcription factor MYB86 (Myb-related protein 86)	2.210	0.0101	0.032	0.0065	3.497	0.0027	0.010	0.0098
		Os02g0641300		Rep. ATMYB4-like - Oryza sativa subsp. japonica (Rice), complete [TC417408]	1.745	#	0.308	#	2.171	0.0063	0.319	0.0060
		Os02g0429900	JADMYB4	Similar to MybH5 (Fragment).	10.548	0.0041	0.343	0.0016	11.496	0.0098	0.134	0.0009
		Os05g0442400	OsMYB-1	Similar to MybSH1.	132.454	0.0128	0.014	0.0033	49.550	0.0306	0.046	0.0034
		Os05g0553400	OsMYB5	Similar to Myb-related transcription factor-like protein (MYB transcription factor).	7.073	0.0025	0.409	0.0247	10.666	0.0025	0.194	0.0027
		Os05g0549000	JADMYB5	Similar to MybH5 (Fragment).	4.410	0.0060	0.419	0.0123	5.257	0.0035	0.329	0.0191
		Os11g0684000	OsJAMyb	Similar to Transcription factor MYB21 (Myb-related protein 21) (AMMYB21) (Myb homolog 3) (AMG03).	20.002	0.0008	0.126	0.0063	24.901	0.0004	0.070	0.0034
Os12g0564100		JADMYB2	Similar to R2R3MYB-domain protein (Fragment).	4.645	0.0048	0.019	0.0037	2.439	0.0280	0.022	0.0203	
Os06g0662200		RISBZ5	bZIP transcription factor; bZIP-1 domain containing protein.	0.647	#	1.451	#	3.875	0.0070	0.079	0.0175	
bZIP	Os08g0357300	OsbZIP65	Similar to bZIP DNA-binding protein.	0.605	#	0.597	#	4.375	0.0007	0.195	0.0207	
	Os12g0560900	OsOBF1	Similar to bZIP protein.	1.889	#	0.561	#	3.170	0.0027	0.443	0.0088	
WRKY	Os01g0158900	OsWRKY107	Similar to WRKY 1 (Fragment).	9.353	0.0009	0.413	0.0064	12.934	0.0008	0.466	0.0149	
	Os01g0158000	OsWRKY10	Similar to WRKY transcription factor 10.	24.393	0.0022	0.050	0.0159	26.186	0.0012	0.065	0.0057	
	Os01g0626400	OsWRKY11	DNA-binding protein WRKY2-like (WRKY transcription factor 11) (WRKY16).	5.141	0.0009	0.185	0.0092	9.051	0.0014	0.154	0.0027	
	Os01g0714800	OsWRKY26	WRKY transcription factor 26.	1478.633	0.0009	0.049	0.0075	1800.347	0.0003	0.363	0.0091	
	Os01g0734000	OsWRKY23	Similar to WRKY DNA binding protein.	4.291	0.0013	0.225	0.0108	3.804	0.0073	0.124	0.0066	
	Os01g0750100	OsWRKY13	Similar to WRKY13 transcription factor.	1.366	#	0.534	#	2.201	0.0033	0.320	0.0100	
	Os01g0821600	OsWRKY21	WRKY transcription factor 48-like protein (WRKY transcription factor 21).	58.586	0.0003	0.485	0.0072	35.706	#	0.679	#	
	Os02g0770500	OsWRKY32	Similar to WRKY transcription factor 32.	9.112	0.0009	0.196	0.0227	8.687	0.0020	0.149	0.0054	
	Os05g0583000	OsWRKY8	WRKY transcription factor 34.	1.790	#	0.194	#	2.318	0.0033	0.136	0.0058	
	Os11g0117500	OsWRKY40	DNA-binding WRKY domain containing protein.	398.079	0.0115	0.026	0.0015	731.906	0.0077	0.076	0.0109	
	Os11g0499900	OsWRKY72	Similar to WRKY transcription factor 72.	29.821	0.0011	0.321	0.0035	39.339	#	0.967	#	
	Os12g0116700	OsWRKY64	Similar to WRKY transcription factor 64.	345.859	0.0072	0.022	0.0021	582.052	0.0041	0.063	0.0041	
	NAC	Os01g0816100	OsNAC4	Similar to NAC domain protein.	140.804	0.0010	0.140	0.0047	199.857	0.0003	0.476	0.0231
		Os03g0777000	OsNAC66	Similar to NAC-domain containing protein 19 (ANAC019) (ANAC) (Abscisic-acid-responsive NAC).	10.184	0.0007	0.165	0.0068	14.617	#	0.910	#
		Os03g0815100	OsNAC9	Similar to OsNAC6 protein.	8.674	0.0012	0.489	0.0412	9.519	#	0.583	#
Os08g0206000		OsNAC104	Similar to NAC-domain containing protein 21/22 (ANAC021) (ANAC022). Splice isoform 2.	1.512	#	0.830	#	5.387	0.0003	0.125	0.0045	
Os11g0126900		OsNAC10	Similar to NAC domain transcription factor.	2.607	0.0180	0.310	0.0066	1.163	#	0.219	#	
(OsMYL2)	Os01g0235700	OsMYL2	Similar to bHLH transcription factor (Fragment).	1.027	#	1.004	#	1.156	#	0.971	#	

#は選抜の基準を満たさなかったものを表す。
OsMYL2はJA誘導性転写因子ではないが、本研究に必要な情報であるため掲載した。

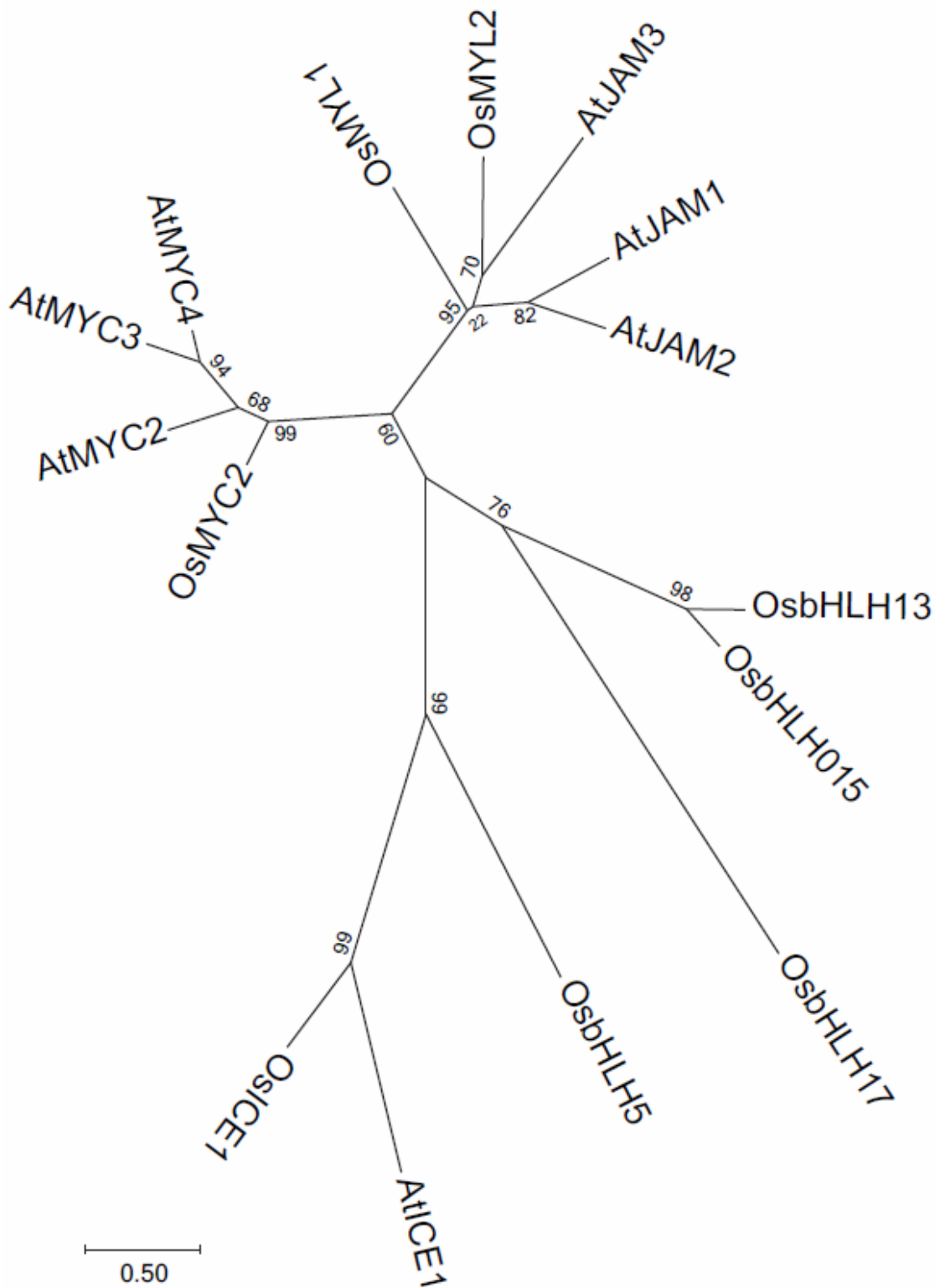


Figure 2-3 イネおよびシロイヌナズナの bHLH 型転写因子の系統樹
作成にあたっては JTT+G モデルを用いた。

2-3-2 2-3-1 で選抜した転写因子が *OsNOMT* の発現に与える影響の解析

選抜した転写因子が *OsNOMT* プロモーターに与える影響を解析するため、*OsNOMT* の転写開始点 1 kb を用いたレポータージーンアッセイを行った。OsMYC2、OsMYL1、および MYB 転写因子 7 種 (JA-dependent [JAd] MYB1–MYB5, OsMYB55, and OsJAmyb) の計 9 個の候補について、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下で恒常的に発現するエフェクターとして用いた。コントロールとして、*OsNOMT* プロモーターに影響を与えない GUS をエフェクターとして用いた。先行実験として、*OsNOMT* の転写開始点を含まない空のレポータープラスミドを用いて解析を行ったところ、OsJAmyb がプロモーター非依存的にレポーターを活性化していた。そのほかの因子はレポーター活性に影響を与えなかった (Fig. 2-4)。この系では OsJAmyb の影響を議論できないと判断し、OsMYC2、OsMYL1、JAdMYB1–JAdMYB5、OsMYB55 の 8 種類についてプロモーターへの影響を調べた。*OsNOMT* の転写開始点上流 1 kb をプロモーター領域として導入した結果、OsMYC2、JAdMYB1、OsMYB55 がレポーター活性を上昇させていたが、中でも OsMYC2 が顕著に上昇させていた。ほかの転写因子については、レポーター活性を抑制する傾向が見られるものもあった (Fig. 2-5)。

2-3-3 OsMYC2 による *OsNOMT* 転写開始点上流域の活性化に必要なシスエレメントの探索

OsMYC2 が *OsNOMT* のプロモーター活性を上昇させていたため、OsMYC2 による *OsNOMT* プロモーターの活性化に必要なシス配列の同定を試みた。*OsNOMT* 転写開始点上流 1 kb には、OsMYC2 など bHLH 型転写因子が結合すると考えられる E box (CANNTG) が 4 箇所存在していた (Fig. 2-6)。そこで、*OsNOMT* 転写開始点上流域のデリーションシリーズを作製し、それらをレポータープラスミドとしたデリーションアッセイを行うことで、OsMYC2 によるレポーターの活性化に重要な領域を同定することを試みた。しかし、TATA box (転写開始点から数えて -34 ~ -27 bp に位置する) を除く大部分の領域を欠落させたにもかかわらず、OsMYC2 によるレポーター活性の亢進が検出された (Figs. 2-7 and 2-8)。結果として、OsMYC2 により活性化される *OsNOMT* 転写開始点上流域中の領域の同定には至らなかった。



Figure 2-6 *OsNOMT* 転写開始点上流 1 kb の模式図

黒矢印は、*OsMYC2* などの bHLH 転写因子が結合すると考えられる配列 (E box、CANNTG) の位置を表す。橙の矢印は TATA box の位置を表す。

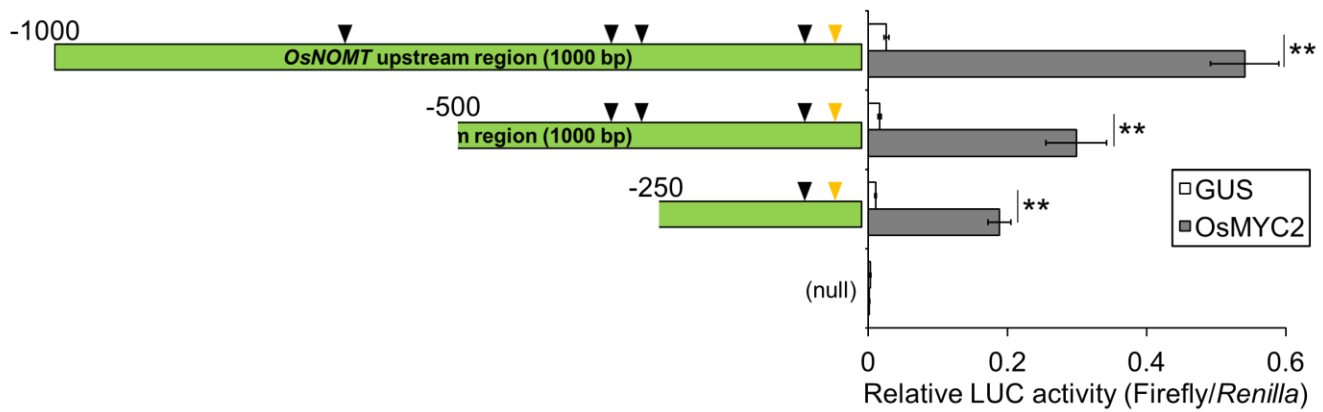


Figure 2-7 OsNOMT 転写開始点を用いたデリベーションアッセイ (5'-側を欠落させたシリーズ)

エフェクターとして、GUS または OsMYC2 を用いた。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 4 or 5) ± 標準誤差で表した。*P < 0.05、** P < 0.01、***P < 0.001。

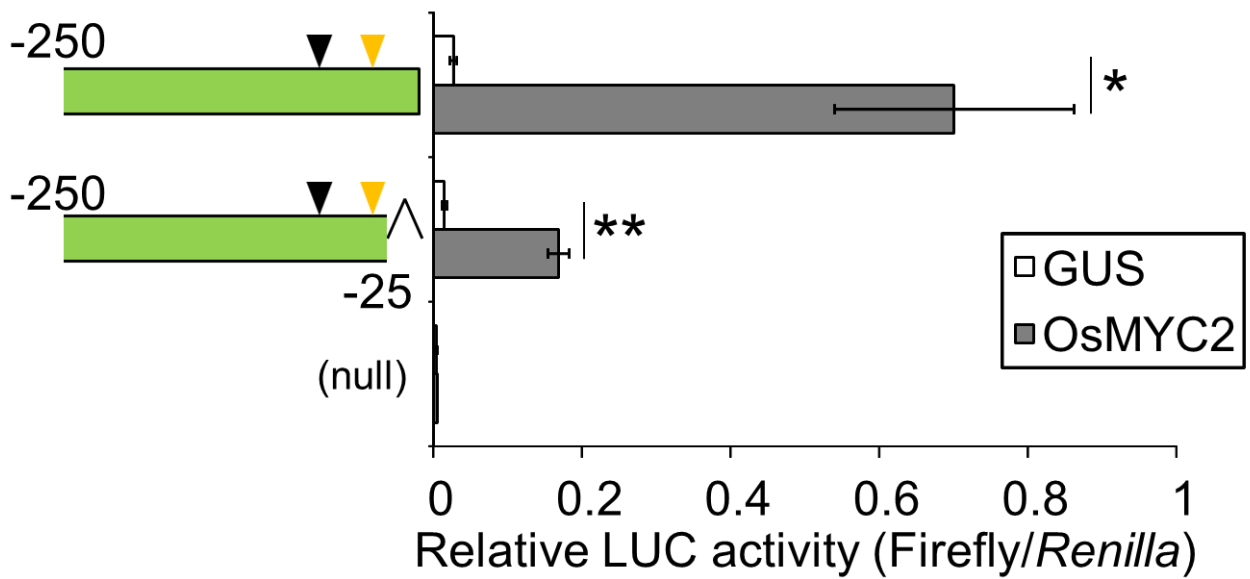
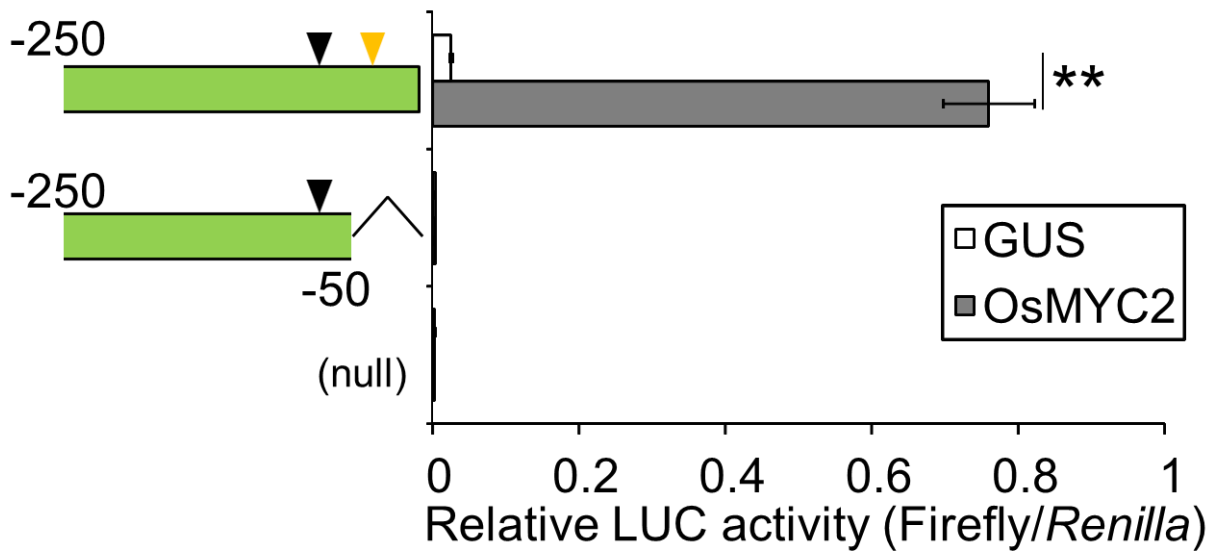


Figure 2-8 *OsNOMT* 転写開始点を用いたデリーションアッセイ (3'-側を欠落させたシリーズ)

エフェクターとして、GUS または OsMYC2 を用いた。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 4) ± 標準誤差で表した。*P < 0.05、** P < 0.01。

2-3-4 OsMYC2 が OsNOMT 発現やサクラネチン生産に与える影響の解析

MYC2 は、先述のイネやシロイヌナズナだけでなくタバコでも JA 誘導的なニコチン生合成遺伝子を正に制御しており [Shoji and Hashimoto, 2011]、JA 誘導的な二次代謝産物の生産を制御していると考えられた。そこでまず、RNAi 法により *OsMYC2* の発現を抑制したノックダウン株 (以下 *osmyc2RNAi*)、およびそのベクターコントロール株 (VC) を用いて遺伝子の発現解析およびファイトアレキシンの定量を行った。定常状態においては、*osmyc2RNAi* 2 系統 (#2、#9) において VC と比較してそれぞれ 75% と 89% *OsMYC2* の発現が抑制されていた (Fig. 2-9A)。*osmyc2RNAi* の見た目の表現型は VC と変わらなかった。次に JA を処理したイネにおける *OsMYC2* の発現を調べたところ、VC においては Uji *et al.* (2016) の報告と同様 JA 処理により発現が誘導された。一方、*osmyc2RNAi* においてはそのような誘導は見られなくなった (Fig. 2-9A)。また *OsNOMT* の発現を解析した結果、*osmyc2RNAi* では JA 処理による *OsNOMT* の発現誘導が全く見られなくなった (Fig. 2-9B)。次に、葉身に蓄積したファイトアレキシン、およびサクラネチンの前駆体であるナリングニンの定量を行ったところ、*osmyc2RNAi* では JA 誘導的なサクラネチンの蓄積が顕著に抑制され、ナリングニンの蓄積も抑制された (Fig. 2-9C, D)。

JA 処理のほか、JA 要求性、非要求性いずれのシグナルも誘導する塩化銅をエリシターとした実験では、*osmyc2RNAi* において塩化銅誘導的な *OsMYC2* の発現およびサクラネチン、ナリングニンの蓄積は抑えられていたものの (Fig. 2-10A, C, D)、*OsNOMT* の発現については VC と同等の誘導が認められた (Fig. 2-10B)。

植物体における *OsMYC2* の役割をさらに解明するため、*OsMYC2* をトウモロコシユビキチンプロモーターの制御下で過剰発現させた株 (以下 *OsMYC2-OX*) も用いて実験を行った。定常状態においては、3 系統 (#1、#3、#11) において VC と比較して *OsMYC2* の発現が 8-13 倍に亢進されていた (Fig. 2-11A)。*OsMYC2-OX* の見た目の表現型は VC と変わらなかった。*OsNOMT* の発現量およびサクラネチンの蓄積量を定量した結果、JA 誘導的なサクラネチンの蓄積については #1 で増加していたものの (Fig. 2-11C)、*OsNOMT* の発現は、定常状態、JA 処理時いずれも VC と差は見られなかった (Fig. 2-11B)。

以上の結果から、*OsNOMT* の発現およびサクラネチンの生産は *OsMYC2* の制御下で起こっていることが示された。その一方で、*OsMYC2* の高発現だけでは、非誘導時における *OsNOMT* の発現誘導に繋がらず、また JA 処理時に *OsNOMT* の発現誘導を増強させることもないことが示された。

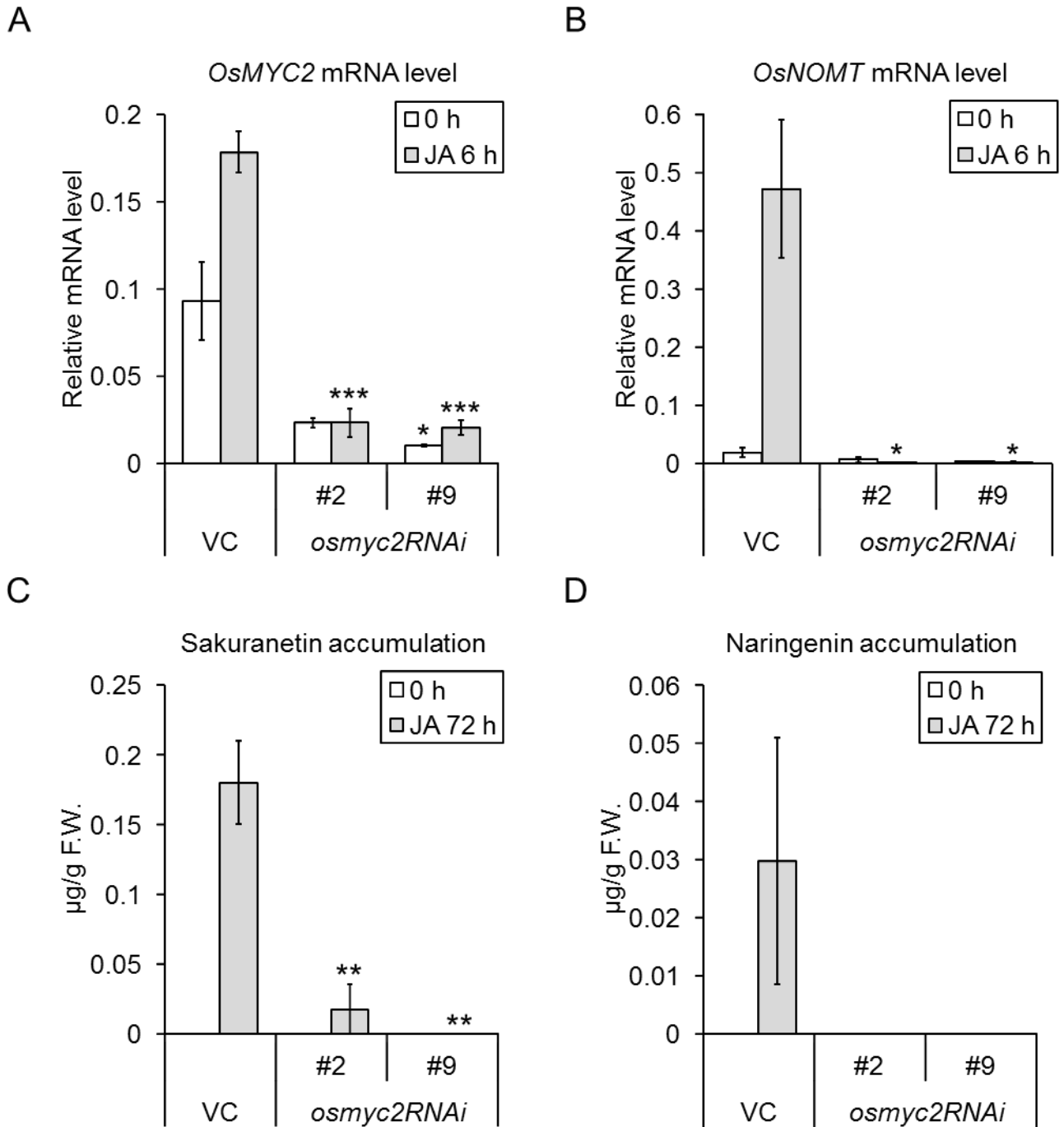


Figure 2-9 *OsMYC2* 発現抑制株 (*osmyc2RNAi*) における JA 処理時の遺伝子発現量およびサクラネチン、ナリンゲニン蓄積量

(A, B) *OsMYC2* (A) および *OsNOMT* (B) の発現量。500 μ M の JA で 6 時間処理したイネ (gray bars) および未処理のイネ (open bars) より total RNA を抽出し、逆転写で合成した cDNA を qRT-PCR に用いた。(C, D) 500 μ M の JA で 72 時間処理したイネ (gray bars) および未処理のイネ (open bars) におけるサクラネチン (C) およびナリンゲニン (D) の蓄積量。データは平均 \pm 標準誤差で表した。(A, B) $n = 3-4$, (C, D) $n = 4-6$ 。有意差検定は JA 処理、未処理それぞれについて VC と比較して行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

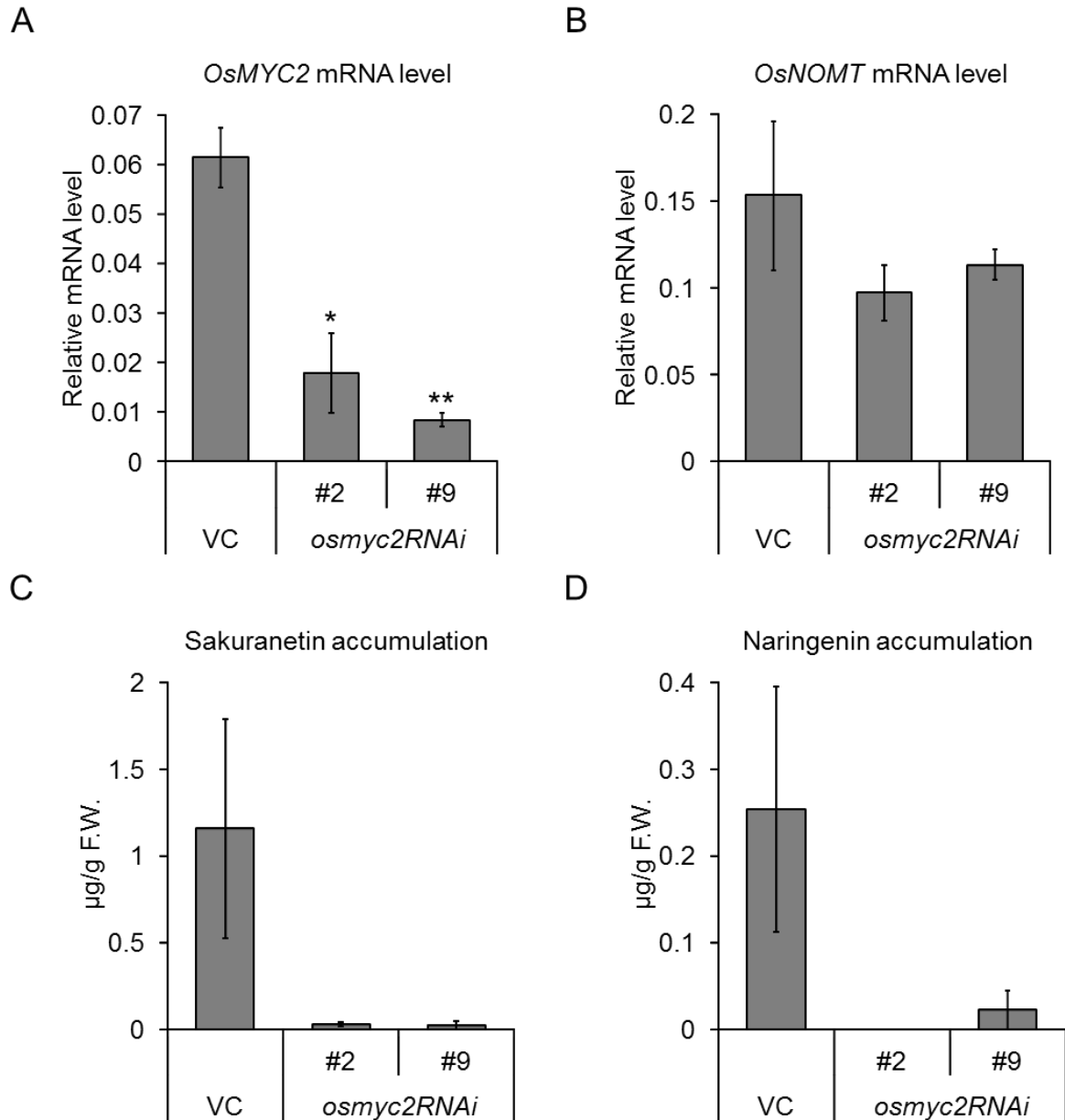
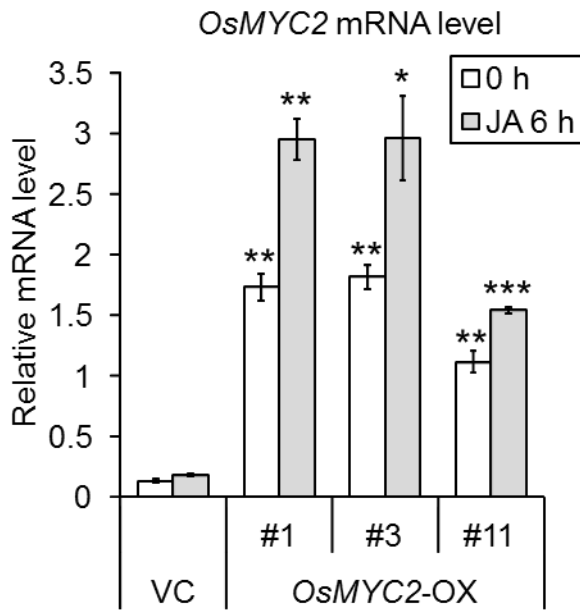


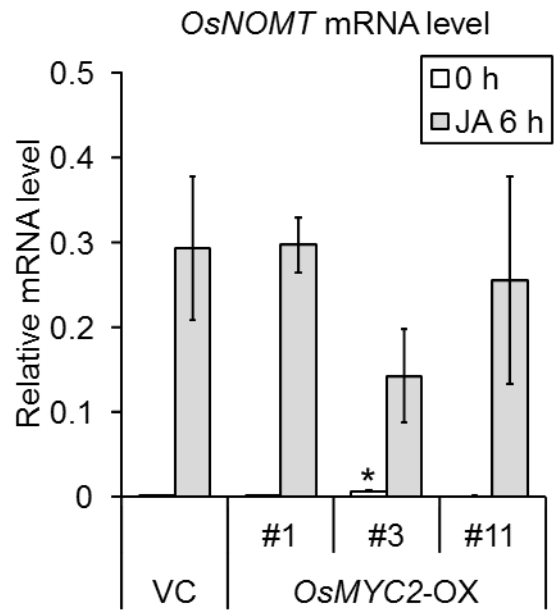
Figure 2-10 *OsMYC2* 発現抑制株 (*osmyc2RNAi*) における塩化銅処理時の遺伝子発現量およびサクラネチン、ナリンゲニン蓄積量

(A, B) *OsMYC2* (A) および *OsNOMT* (B) の発現量。500 µM の塩化銅で 6 時間処理したイネより total RNA を抽出し、逆転写で合成した cDNA を qRT-PCR に用いた。(C, D) 500 µM の塩化銅で 72 時間処理したイネにおけるサクラネチン (C) およびナリンゲニン (D) の蓄積量。データは平均 ± 標準誤差で表した。(A, B) n = 3–4, (C, D) n = 4–6。有意差検定は VC と比較して行った (*P < 0.05, **P < 0.01)。

A



B



C

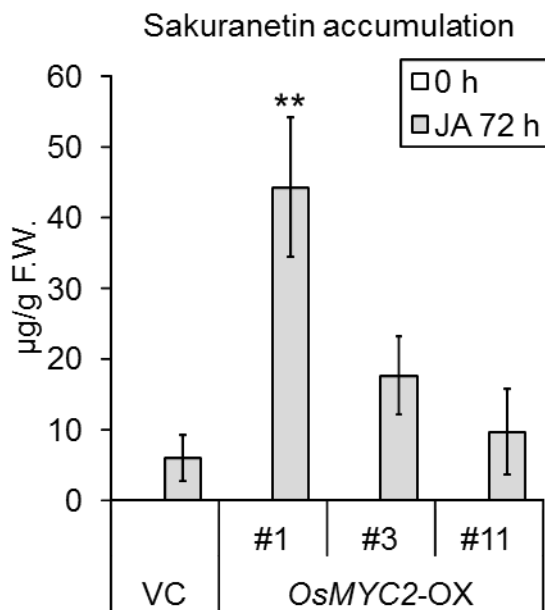


Figure 2-11 *OsMYC2* 過剰発現株 (*OsMYC2-OX*) における遺伝子発現量およびサクラネチン蓄積量

(A, B) *OsMYC2* (A) および *OsNOMT* (B) の発現量。500 μ M の JA で 6 時間処理したイネ (gray bars) および未処理のイネ (open bars) より total RNA を抽出し、逆転写で合成した cDNA を qRT-PCR に用いた。(C) 500 μ M の JA で 72 時間処理したイネ (gray bars) および未処理のイネ (open bars) におけるサクラネチンの蓄積量。データは平均 \pm 標準誤差で表した。(A, B) $n = 3$, (C) $n = 8-16$ 。有意差検定は JA 処理、未処理それぞれについて VC と比較して行った (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

2-3-5 OsMYC2 と協調的に *OsNOMT* の発現を制御する転写因子の探索

先に述べたように、bHLH 型転写因子と MYB は相互作用してフラボノイド生合成遺伝子の発現を誘導することがある [Li, 2014]。また、bHLH 型転写因子どうしは helix-loop-helix モチーフを介してダイマーを形成することが報告されている [Chavali *et al.*, 2001]。タンパク質間相互作用により、時に翻訳後修飾を受け、転写活性化能などの機能が変化することは多数報告がある。[Pfluger and Wagner, 2007; Pauwels *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013; Chujo *et al.*, 2014]。したがって、bHLH 型転写因子である OsMYC2 と OsMYL1 も相互作用して *OsNOMT* の発現を制御している可能性が考えられた。そこで、2-3-2 でエフェクターとして用いた OsMYC2 以外の転写因子 8 種類のうち、OsJAmyb を除く 7 種類について OsMYC2 の働きを亢進するものが存在するか解析した。OsMYC2 を含む 2 種類のエフェクターを共導入した実験の結果、OsMYC2 によるレポーターの活性化が OsMYL1 により相乗的に亢進した。一方、MYB については OsMYC2 と協調的にレポーター活性を亢進するものは見られず、逆に活性を低下させるものがあった (Fig. 2-12)。OsMYL1 単独では *OsNOMT* プロモーター活性を上昇させないことから (Fig. 2-5)、OsMYC2 と OsMYL1 が相乗的に *OsNOMT* プロモーターを活性化していることが示唆された。

また、系統樹解析により OsMYL1 とは別に OsMYC2 と相同性の高いタンパク質 OsMYC2-like protein 2 (OsMYL2) が見出されたが、OsMYL2 は OsMYL1 とも高い相同性を示した (Fig. 2-3)。このため、トランスクリプトーム解析では JA 誘導的な発現は見られなかったが (Table 2-5)、OsMYL1 と類似した機能を持つ可能性があったため解析対象に加えた。

OsMYL2 をエフェクターとしたレポータージーンアッセイの結果、OsMYL2 は OsMYL1 同様単独では *OsNOMT* のプロモーター活性を上昇させないものの OsMYC2 との共導入により *OsNOMT* のプロモーター活性を亢進させた (Fig. 2-13)。

また、*OsNOMT* の転写開始点を導入しない解析を行い、OsMYL2 がプロモーター非依存的にレポーターを活性化しないことを確認した (Fig. 2-14)。

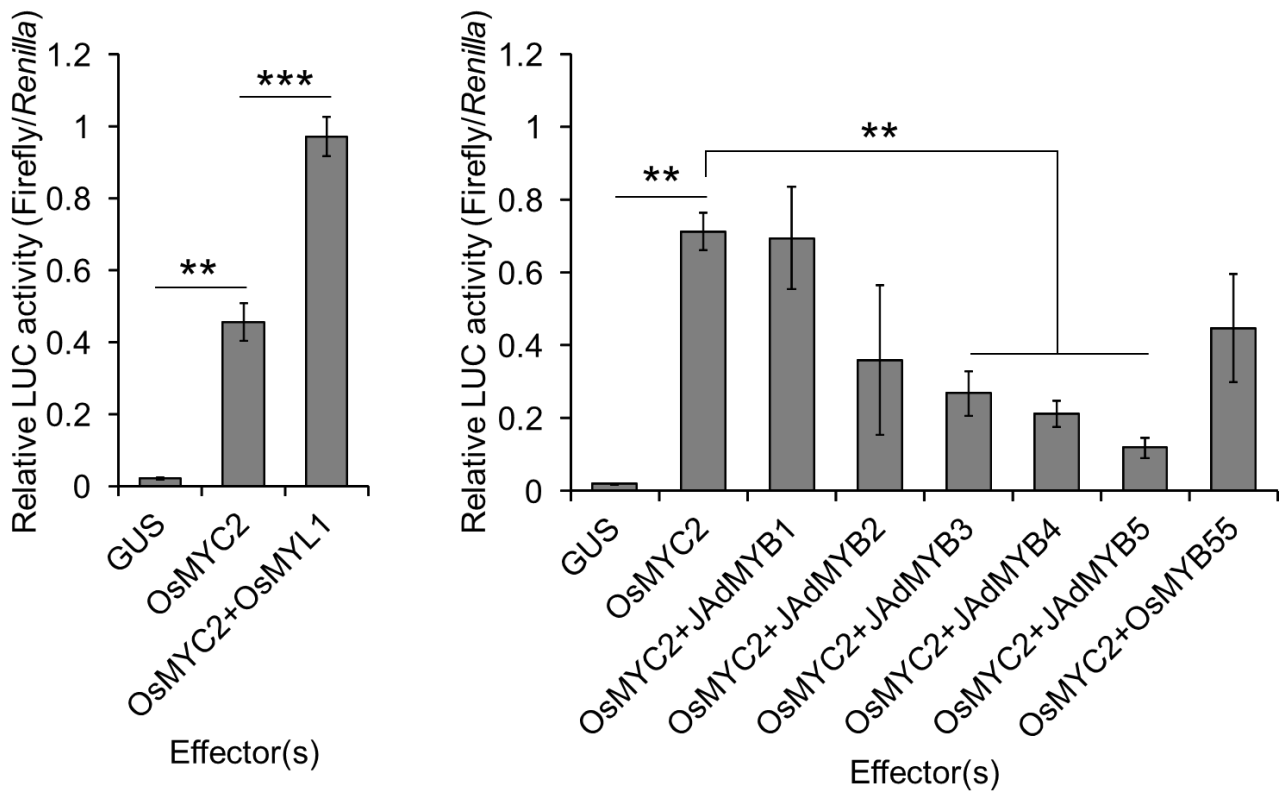


Figure 2-12 OsMYC2 との共導入による JA 誘導性転写因子の

OsNOMT 転写開始点上流域 1 kb への影響

LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 3-5) ± 標準誤差で表した。**P < 0.01、*** P < 0.001。

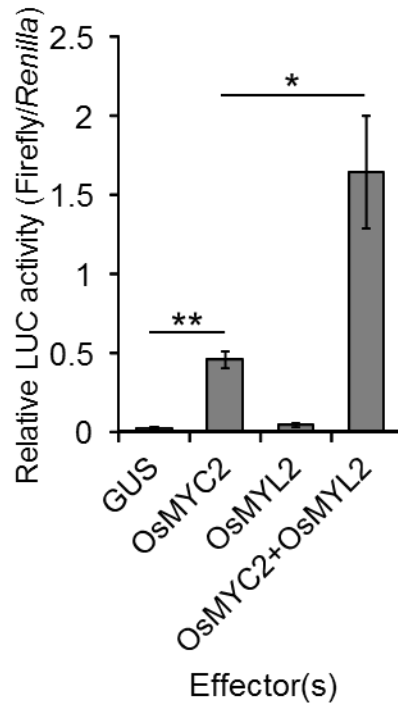


Figure 2-13 *OsNOMT* 転写開始点上流域 1 kb に対する *OsMYL2* の影響

LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 5) ± 標準誤差で表した。*P < 0.05、** P < 0.01。

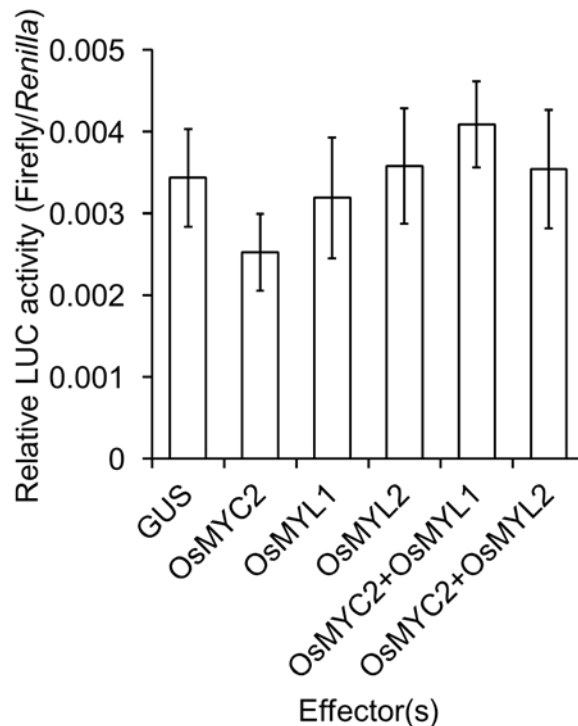


Figure 2-14 *OsNOMT* 転写開始点上流域に依存しない *OsMYL2* のレポーター活性への影響

LUC 活性の相対値。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 4) ± 標準誤差で表した。

2-3-6 OsMYC2 と OsMYL1 および OsMYL2 の相互作用の解析

OsMYC2 と OsMYL1 または OsMYL2 の共導入による *OsNOMT* プロモーターの相乗的な活性化について、相互作用によりタンパク質の機能が変化したことで起こったと考えられた。この仮説を検証するため、まずは bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay によりタンパク質間相互作用を解析した。

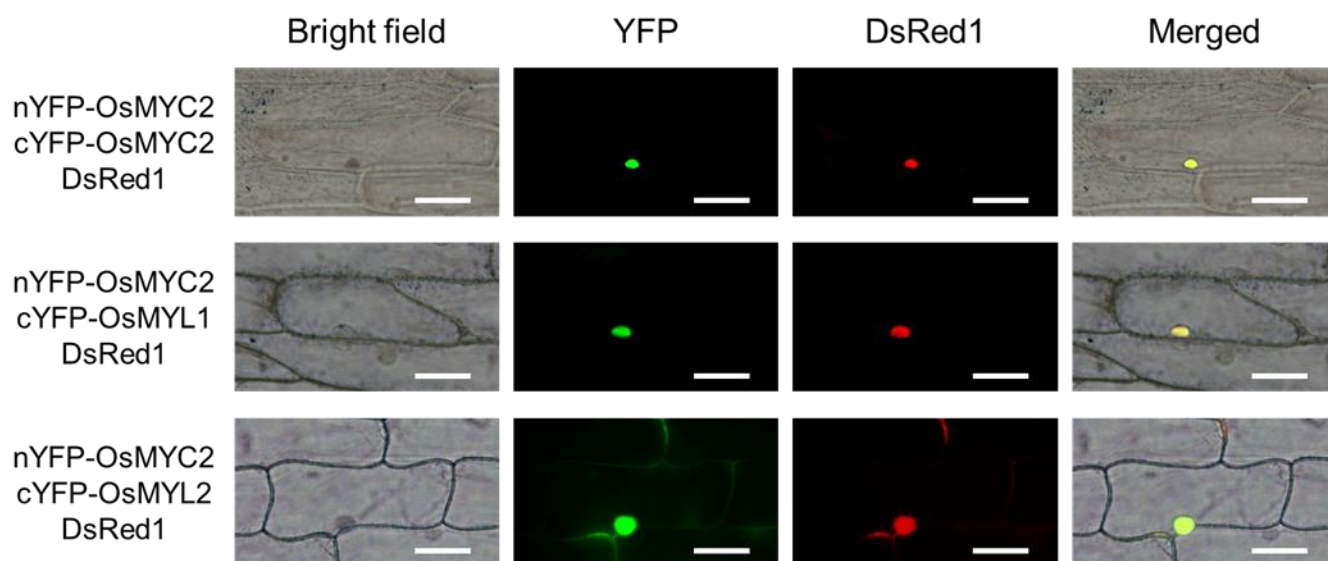
CaMV 35S プロモーターの制御下、N 末端側に nEYFP を融合させたタンパク質を発現させるプラスミド (pnYGW [Hino *et al.*, 2011] を元に構築)、N 末端側に cEYFP を融合させたタンパク質を発現させるプラスミド (pcYGW [Hino *et al.*, 2011] を元に構築)、および DsRed1 を発現させるプラスミド (pTH121R [Miyamoto *et al.*, 2015]) の 3 種類をタマネギ表皮細胞に導入し、蛍光観察を行った。nYFP-OsMYC2 と同時に cYFP-OsMYC2、cYFP-OsMYL1、または cYFP-OsMYL2 を発現させると、YFP 由来の蛍光と DsRed1 由来の蛍光が両方観察された。蛍光は、核で特に強く見られた (Fig. 2-15A)。一方、nYFP または cYFP のいずれかを融合タンパク質ではない形で発現させると、DsRed1 由来の蛍光のみが観察された (Fig. 2-15B)。この結果より、OsMYC2 は OsMYL1、OsMYL2、および OsMYC2 自身と細胞の核内で相互作用することが示唆された。

次に、*in vitro* でのタンパク質間相互作用を検証するため、コムギ無細胞発現系で発現させた組み換えタンパク質を amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaScreen) により解析した。OsMYC2 について、CDS の GC 含量が 71% と高いこともありそのままの配列をクローニングしたベクターを用いても組み換えタンパク質を発現させることができなかった。コムギ無細胞発現系においては GC 含量が 50% に近いほどタンパク質の合成効率が高くなるが、シロイヌナズナの codon usage における GC 含量は約 50% である。そのため、GeneArt® Strings™ DNA Fragments service (Invitrogen) のサイト

(<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/gene-synthesis/gene-strings-dna-fragments.html>) にてシロイヌナズナの codon usage を用いて OsMYC2 の CDS を同義置換し、GC 含量を 50% にしたものを用いてタンパク質を発現させた。OsMYL1、OsMYL2 についてはイネの CDS をそのまま用いてタンパク質を発現させることができた。発現した粗タンパク質について、His-Bls-OsMYC2 については anti-Biotin HRP により検出できた (Fig. 2-16A)。FLAG タグ付き OsMYC2、OsMYL1、OsMYL2 について、タンパク質の発現量が高かったため Chemiluminescent 試薬を反応させた段階で肉眼によりバンドを確認できた (Fig. 2-16B)。これらの組み換えタンパク質を用いて AlphaScreen を行った。

AlphaScreen には、ネガティブコントロールとしてホモマーを形成しない Dihydrofolate reductase (DHFR) を用いた。ビオチン化 OsMYC2 あるいは FLAG タグ付きの OsMYC2、OsMYL1、および OsMYL2 を単独で用いると、ビオチン化 DHFR-FLAG タグ付き DHFR の組み合わせと同等のシグナルが検出された。次に、ビオチン化 OsMYC2 と FLAG タグ付きの OsMYC2、OsMYL1、および OsMYL2 の組み合わせを用いた解析を行った結果、シグナル値が顕著に上昇した。したがって、OsMYC2 が物理的に OsMYL1、OsMYL2、および OsMYC2 自身と相互作用することが示された (Fig. 2-17)。

A



B

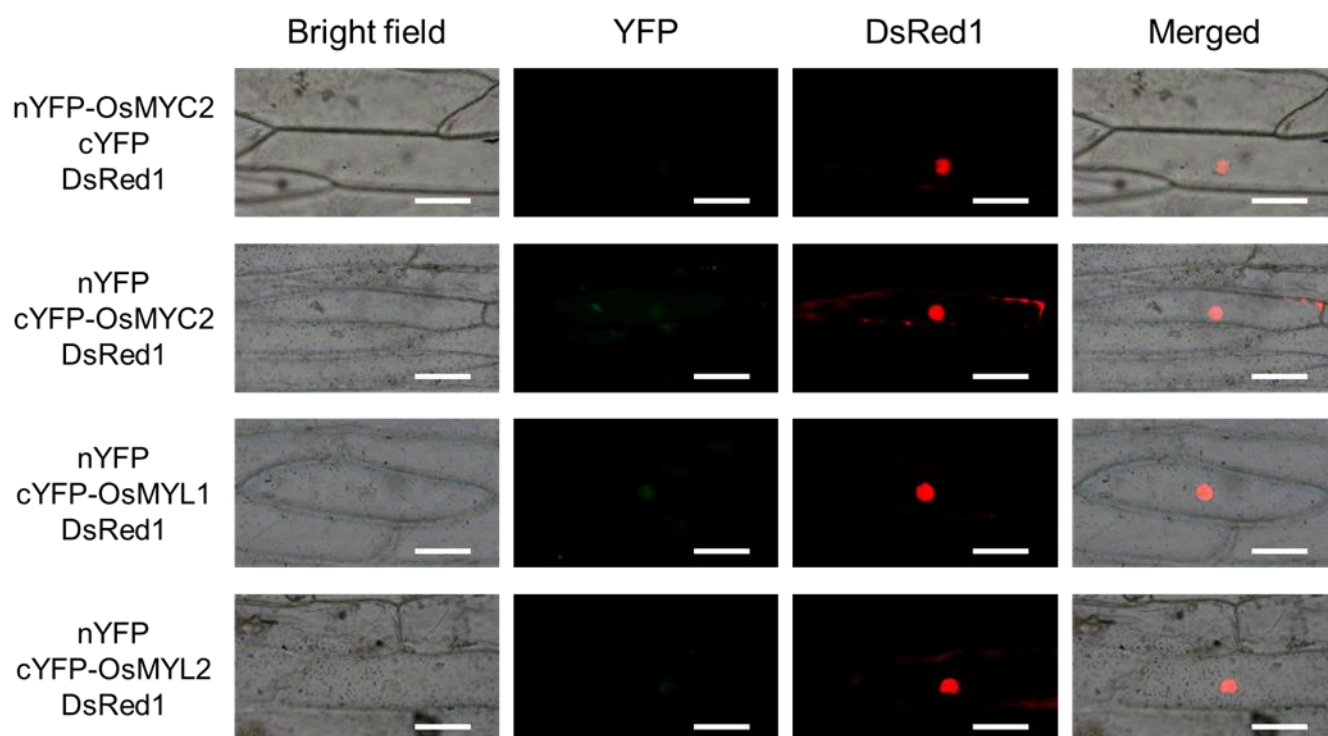


Figure 2-15 BiFC assay によるタンパク質間相互作用の検出

(A) タマネギ表皮細胞中に nEYFP 融合タンパク質、cEYFP 融合タンパク質、および DsRed1 をコードするプラスミドを共導入した。遺伝子導入後 24 時間で落射蛍光顕微鏡 BX53 (Olympus) により蛍光を観察した。(B) nEYFP もしくは cEYFP のいずれかを融合タンパク質ではない形で導入した。(A, B) スケールバーは 100 μm を表す。

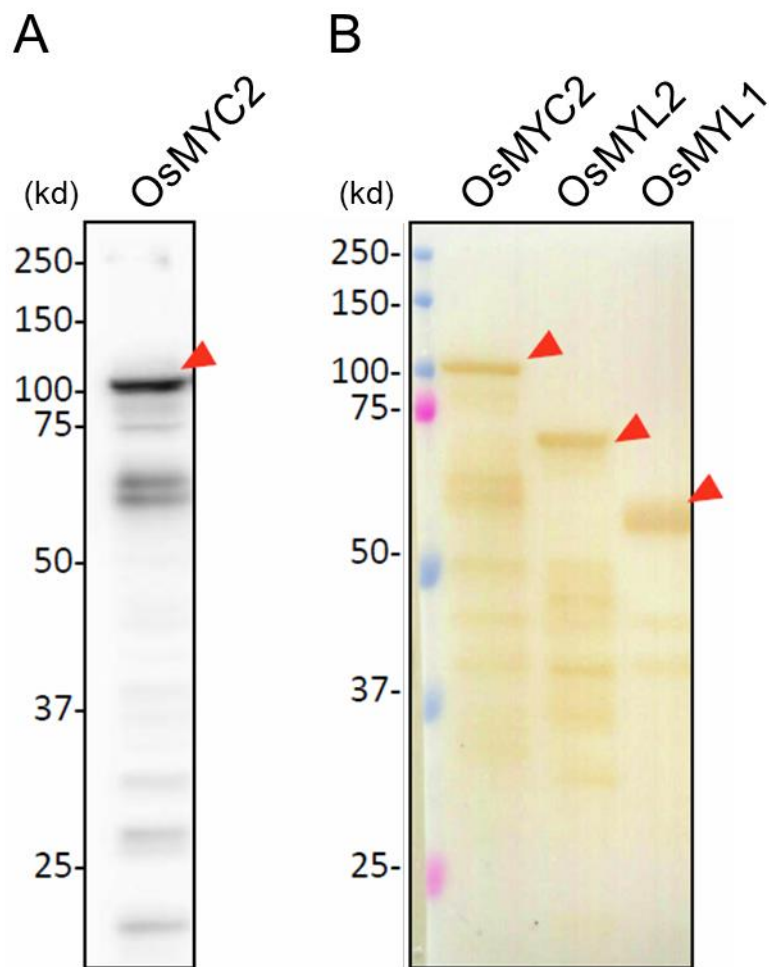


Figure 2-16 コムギ無細胞発現系を用いた組換えタンパク質の発現

粗タンパク質液を 1 μ L (約 2 μ g の粗タンパク質) ずつウェスタンブロットティングに供した。赤矢印で示したバンドが目的のタンパク質と考えられる。(A) anti-Biotin HRP 抗体によるビオチン化 OsMYC2 の検出。(B) anti-FLAG M2 HRP による FLAG タグ付きタンパク質の検出。Chemiluminescent 試薬を反応させたところ、LAS により化学発光を検出することなく目的タンパク質由来のバンドを確認できた。タグ付きの OsMYC2、OsMYL1、OsMYL2 の分子量はそれぞれ 77 kDa、53 kDa、70 kDa である。

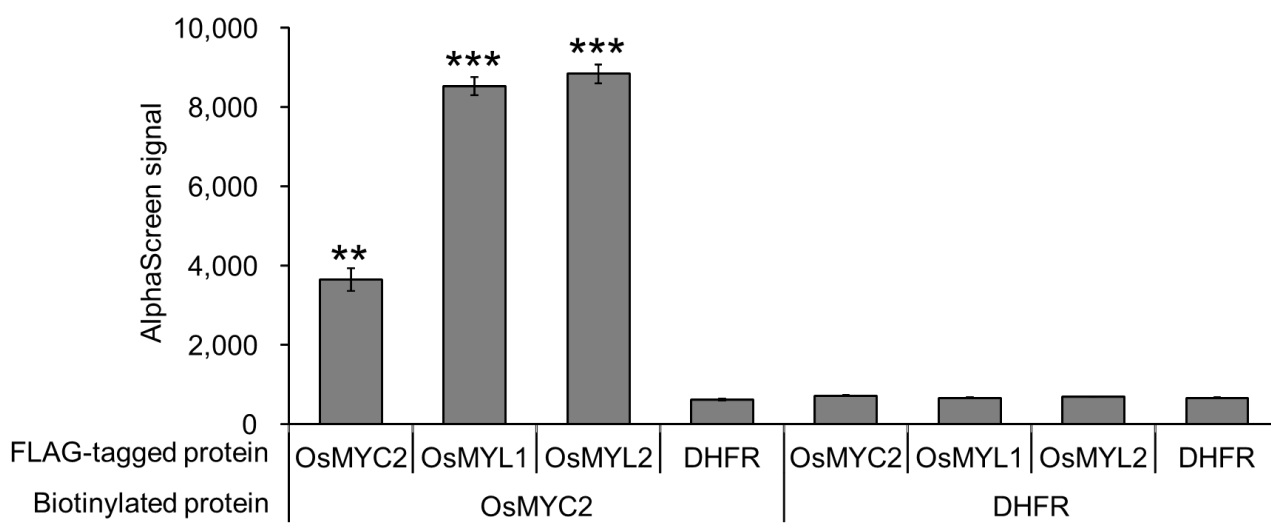


Figure 2-17 AlphaScreen によるタンパク質間相互作用の検出

ビオチン化 OsMYC2 および FLAG タグ付きタンパク質を、粗タンパク質溶液の状態での AlphaScreen に用いた。ネガティブコントロールとして、ビオチン化した、または FLAG タグを付けた dihydrofolate reductase (DHFR) を用いた。データは平均 ± 標準誤差で表した。n = 3。有意差検定は、ビオチン化 DHFR と FLAG タグ付き DHFR を用いた試行と比較して行った (**P < 0.01, ***P < 0.001)。

2-3-7 タンパク質間相互作用による OsMYC2 の転写機能の変化の解析

OsMYC2 が OsMYL1 および OsMYL2 と物理的に相互作用していたため、相互作用によるタンパク質の機能変化を解析し、OsMYC2 と OsMYL1 または OsMYL2 の相互作用が *OsNOMT* プロモーターの相乗的な活性化 (Figs. 2-12 and 2-13) の原因となっているか検証した。転写因子の機能として転写活性化能/転写抑制能に着目し、タンパク質間相互作用による影響を解析することにした。

解析には GAL4 binding domain を介してエフェクターを人工プロモーターに結合させる系 (Fig. 2-18A) [Hiratsu *et al.*, 2004] を用い、エフェクターの転写機能を定量した。その結果、OsMYL1 および OsMYL2 は OsMYC2 と同じく転写活性化因子であることが示された (Fig. 2-18B)。なお、OsMYC2 については Cai *et al.* (2014) の結果と一致した。また、GAL4-DBD に連結された OsMYC2 を、GAL4DBD-free の OsMYL1 または OsMYL2 と共導入すると、OsMYC2 の転写活性化能が著しく上昇した。一方、GAL4-DBD に連結された OsMYC2 が存在しない状態で GAL4DBD-free の OsMYL1 または OsMYL2 を導入しても、シスエレメントに結合できないためレポーター活性は上昇しなかった (Fig. 2-18C, D)。以上より、OsMYC2 は OsMYL1 および OsMYL2 と結合して活性化されることで転写活性化能が上昇し、*OsNOMT* の転写を活性化していることが示唆された。

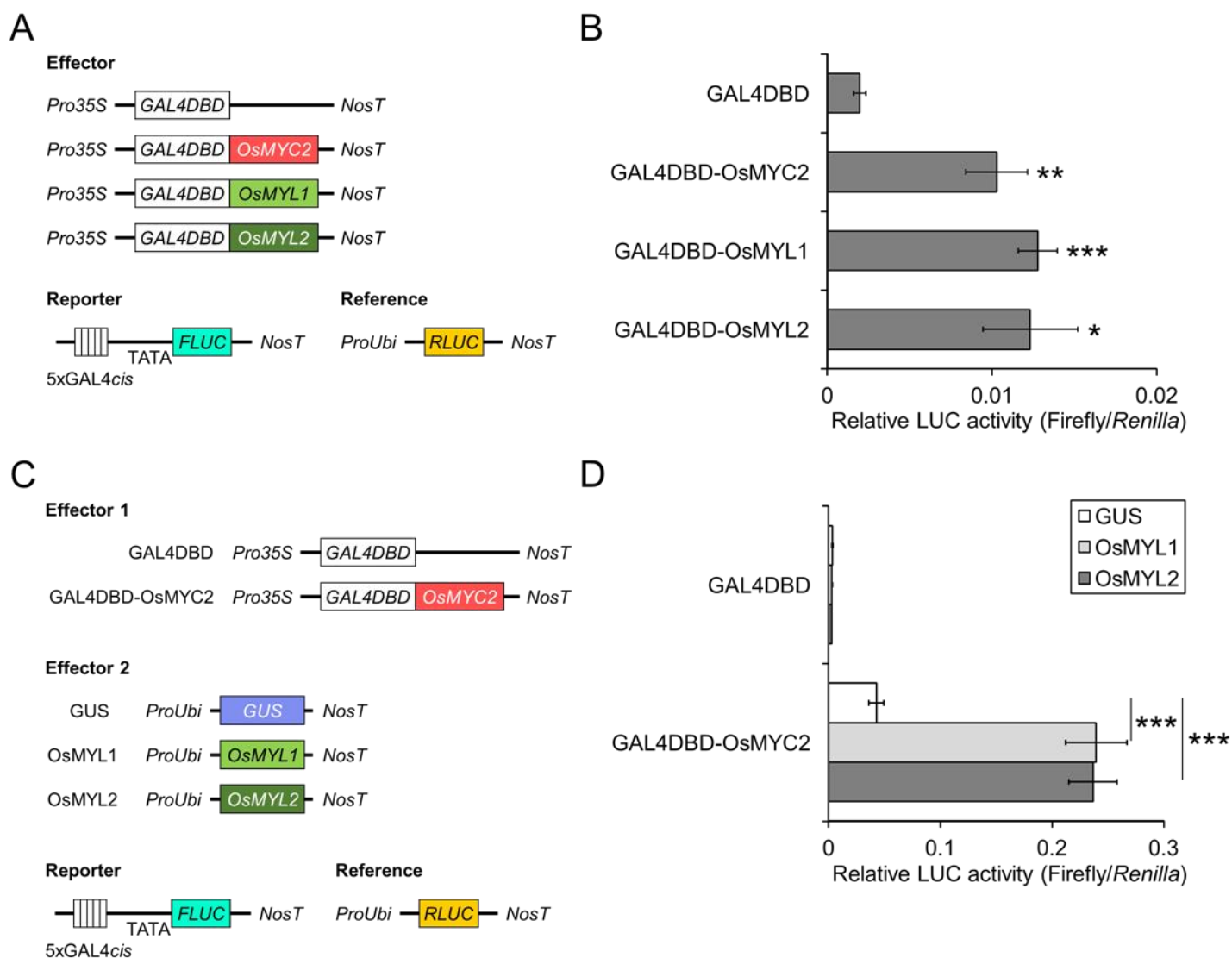


Figure 2-18 OsMYC2、OsMYL1、OsMYL2 の転写機能

(A) レポーター遺伝子アッセイに用いたベクターの概略図。Pro35S, CaMV 35S promoter, ProUbi: Maize ubiquitin promoter, NosT: nopaline synthase terminator。 (B) OsMYC2、OsMYL1、OsMYL2 の転写機能の測定結果。LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 6) ± 標準誤差で表した。有意差検定は、空ベクター (GAL4DBD) を用いた試行と比較して行った (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)。 (C) GAL4DBD-OsMYC2 と、GAL4DBD-free の OsMYL1 および OsMYL2 を共導入したベクターの概略図。 (D) 共導入した試行の転写機能の測定結果。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 6) ± 標準誤差で表した。***P < 0.001。

2-4 考察

本章では、bHLH 型転写因子 *OsMYC2* がイネにおける JA 誘導性のサクラネチンの生産および *OsNOMT* の発現を制御する重要因子であることを示し、さらにその転写活性化能が bHLH 型転写因子 *OsMYL1*、*OsMYL2* との物理的相互作用により亢進されることを示した。

植物体内で *OsMYC2* の発現を抑制すると、JA 誘導的な *OsNOMT* 発現およびサクラネチンとその前駆体ナリンゲニンの蓄積が大きく損なわれた。反対に *OsMYC2* を過剰発現すると、一部の系統ではサクラネチンの蓄積が増加したものの *OsNOMT* 発現に対しては影響が見られなかった (Figs. 2-9 and 2-11)。また、*OsMYC2* 発現抑制株について塩化銅誘導的なサクラネチンやナリンゲニンの蓄積は抑制されていたものの *OsNOMT* 発現については抑制が見られなかった (Fig. 2-10)。以上より、サクラネチンの生合成経路、特にナリンゲニンの生合成よりも上流に位置する経路は *OsMYC2* に強く依存する一方で、*OsNOMT* の発現は *OsMYC2* 非依存的な経路によっても制御されることが示唆された。

系統樹解析の結果 (Fig. 2-3)、および *osmyc2RNAi* で JA 誘導的な *OsNOMT* 発現やサクラネチン生産が大きく損なわれた結果から (Fig. 2-9)、機能の重複する MYC3 や MYC4 を有するシロイヌナズナと異なり、イネには *OsMYC2* の機能を補える転写因子が存在しないことが示唆された。当研究室において、韓国 POSTECH より購入した *OsMYC2* T-DNA 系統の種子からノックアウト株を取得する試みが行われたものの、mutant のホモ個体は得られなかった [Valea ら、未発表データ]。これは、*OsMYC2* T-DNA 変異体のヘテロ個体から得られる次世代では、胚性致死を引き起こしている可能性を示唆するもので、イネの生殖成長においても *OsMYC2* が重要かつ替わりのきかない転写因子であるという仮説を支持するものである。

OsMYC2 と *OsMYL1*、*OsMYL2* の相互作用について、*OsMYC2* が *OsMYL1* または *OsMYL2* とヘテロマーを形成することで転写活性化能が増強したと予想されるが、実際どのような形でタンパク質が結合し機能しているかは未解明のままである。しかし、*OsMYL1* および *OsMYL2* 自身も転写活性化因子であるにもかかわらず (Fig. 2-18B)、単独では *OsNOMT* の転写開始点上流域を活性化しなかったことから (Figs. 2-5 and 2-13)、*OsMYL1* または *OsMYL2* と相互作用することで *OsMYC2* の構造が変化し、転写活性化能が増強されて *OsNOMT* の転写開始点上流域の活性化に至ったことが予想される。

OsMYL1 および *OsMYL2* は、シロイヌナズナにおける jasmonate-associated MYC2-like proteins (AtJAMs) 1-3 と高い相同性を持つ (Fig. 2-3)。bHLH 型転写因子のグループにおいても、*OsMYC2* や *AtMYC2* がグループ IIIe に分類されるのに対し、*OsMYL1*、*OsMYL2*、*AtJAM1-3* は *AtMYC2* がグループ IIIId に分類される [Niu *et al.*, 2011]。AtJAMs は MYC2 と逆に JA シグナルを負に制御し、根の伸長やアントシアニンの生合成を抑制することが知られている [Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013; Goossens *et al.*, in press]。AtJAM1 についてはさらに解析が進んでおり、転写抑制因子であること、*AtMYC2* と共通の DNA 結合配列をもち競合してはたらくこと、*AtMYC2* とは相互作用しないことが示されている [Nakata *et al.*, 2013]。この *AtMYC2* と AtJAMs の関係は *OsMYC2* と *OsMYL1*、*OsMYL2* の関係とは大きく異なるものであり、それ

によって JA 誘導性防御反応における単子葉植物と双子葉植物の間の差が生じている可能性が考えられる。この検証のためにも、OsMYC2、OsMYL1、OsMYL2 における転写活性化能およびタンパク質間相互作用に重要な領域の同定が必須と言える。さらに、OsMYL1 と OsMYL2 の間にも JA により発現が誘導されるか否かという大きな差が存在しており (Table 2-5)、イネがどのように OsMYC2-OsMYL1 複合体と OsMYC2-OsMYL2 複合体を使い分けているかも *OsNOMT* の発現制御機構の解明において興味を持たれる。

本章では、OsMYC2 の DNA 結合能の解析の一環として OsMYC2 および OsMYL1、OsMYL2 との複合体により活性化される *OsNOMT* 転写開始点上流域中のシスエレメントの決定を試みたが、デリレーションアッセイを行っても決定することはできなかった (Figs. 2-7 and 2-8)。一方、クロマチン免疫沈降により OsMYC2 が *OsJAZ10* プロモーター内に存在する E-box (CACGTG) に *in vivo* で結合することが報告されており [Uji *et al.*, 2016]、*OsNOMT* プロモーターについても *in vivo* での解析が必要であると考えられる。また別の可能性として、OsMYC2 が直接プロモーター領域に結合することなく *OsNOMT* の転写を制御していることが考えられる。OsMYC2 はヒトの細胞をガン化させる転写因子 Myc [Vita and Henriksson, 2006] と同じ MYC タンパク質に分類され、この Myc がヒストン修飾によるエピジェネティック制御を介して多くの遺伝子発現を制御していることから [Varlakhanova and Knoepfler, 2009]、OsMYC2 および OsMYL1、OsMYL2 との複合体もエピジェネティックな制御を行っている可能性が考えられる。

本章の研究を通し、サクラネチン生産制御機構解明の一環として OsMYC2 およびその相互作用因子 OsMYL1、OsMYL2 に関する知見が得られた。今後さらに研究を進め、サクラネチンを多量生産し強い病害抵抗性を示すイネを作出することが期待される。

本章で述べた *OsMYL1* の CDS

ATGTCGTGGTCCGAGACGGACGCCGCGCTGTTCGCGGCGGTGCTGGGGCACGACGCGGCG
CATCACCTGGCCACCACGCCGCCGCACCTCGACGCGCCGGAGGGGTCGCCGTCGTCGGCC
GAGCTGCAGGCGAGCCTGCACGACCTCGTCGAGCGGCAGGGAGGGGCCTGGACGTACGGC
ATCTTCTGGCAGGAGTCCC GCGGCGCGGTGCCGCCAGCGGCCGCGCTGCCCGCGCCGTG
CTCGGCTGGGGCGACGGCCACTGCCGCGACGGTGCCGGACACGGGGAGGTCCGGCGCCGCG
GAGAGGAGCGTGCGCGGAAGCGCGTGCTGCTGCGGCTGCACGCGCTGTACGGAGGCGGG
GATGAGGATGGCGCCGACTACGCGCTCCGGCTGGACCGGGTCACCGGCGCCGAGATGTAC
TTCCTGGCGTCCATGTACTTCTCCTTCCC GAGGGCTCGGGCGGACCGGGCCGCGCTCTG
GCCTCCGGCCGCCACGCCTGGGCGGACGTAGACCCCCACCCTTCCGGCTCCGGTAGCGCG
CCAGGGTGGTACGTTTCGCTCGTCTCTCGCCCAGTCCGCGGGGTTACGCACCGTCTCTTC
CTCCCGTGCAAGGGCGGCGTTCGAGCTCGGTTCCGTCGTAGCCATCCGCGAGACCCCC
GAGGTCTTGCGCGCCATCCAATCTGCCATGCGCGCCGTGCCAGCTCCGCCGGAAGATTTTC
ATGAGAATCTTCGGCAAGGATCTCTCACCCGGCCGACCGTCCCAGCCCATGGGATGCGAC
GCCCCATGGACGCCGCGGCTCGTTGTCCAAACCACGCCGGTGCGCCAGCCAAGAAGGAG
GTGGTCAAGGCGAAACCAGCCGAGCCCCCAAGAGCTTGGACTTCTCCAAGGCGAACGTC
CAGGAACAGGCCGGCGGCCAGGAGCGGCGGCCGCGGAAGCGTGGGCGCAAGCCGGCGAAC
GGGCGGGAGGAGCCGCTGAACCACGTGGAGGCGGAGCGGCAGCGGCGGGAGAAGCTGAAC
CAGAGGTTCTACGCGCTGCGCGCGGTGGTGCCCAAGATCTCCAAGATGGACAAGGCGTCC
CTGCTCAGCGACGCCATCGCGTACATCCAGGAGCTGGAGGCCCGGCTCAGGGGCGACGCG
CCCGTGCCCGCGCGGGCGGATGGGCCGGCCGTGGAGGTGAAGGCAATGCAGGACGAGGTG
GTGCTGCGCGTGACCACGCCCTGGACGAGCACCCCATCTCCAGGGTGTTCACGCCATG
AGGGAATCCCAGATCAGCGTCGTGGCGTCGGACGTGGCGGTGTCGGACGACGCCGTCACG
CACACGCTCATGGTGCGGTCGGCCGGGCCGGAGCGGCTCACGGCGGAGACGGTGCTCGCG
GCGATGTCGCGGGGGGTGAGCGTCACCACTCCCTCCCCGTGA

下線部の配列は、RAP-DB ではイントロン、MSU libraries ではエキソンとアノテーションされている。

タンパク質発現用に最適化した *OsMYC2* の CDS

ATGAACCTCTGGACCGATGATAACGCTTCTATGATGGAAGCTTTTATGGCTTCTGCTGAT
CTCCCTGCTTTTCCTTGGGGTGCTGCTTCTACCCCTCCTCCACCACCTCCACCTCCACAT
CATCATCACCAACAGCAGCAACAGCAAGTTCTTCCTCCTCCTGCTGCTGCACCAGCTGCT
GCTGCTTTTAATCAGGATACTCTCCAGCAGAGGCTCCAGTCTATTATCGAGGGATCTAGA
GAGACTTGGACCTACGCTATCTTCTGGCAGTCATCTATCGATGTGTCTACCGGTGCTTCT
CTTCTCGGATGGGGTGATGGATATTACAAGGGATGTGATGATGATAAGAGGAAGCAGAGG
TCATCTACCCCTGCTGCAGCTGCTGAACAAGAGCATAGAAAGAGAGTGCTCAGGGAACCTC
AACTCTCTTATCGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GATAACCGAGTGGTTCTTCCTTGTGTCTATGACCCAGTCTTTCCTAACGGACTTGGACTT
CCTGGACAGGCTCTTTTTGCTGCTCAACCTACTTGGATCGCTACCGGACTTTCTTCTGCT
CCTTGCGATAGAGCTAGACAGGCTTACACTTTCGGACTCAGGACTATGGTTTGCCTTCT
CTCGCTACTGGTGGTCTCGAGCTTGGATCTACCGATGTGATCTTCCAGACCGGTGATTCT
ATCCCTAGAATCAGGGCTCTCTTCAACCTCAGTGCTGCAGCAGCTTCTTCTTGGCCTCCT
CATCCAGATGCTGCTTCAGCTGATCCTTCTGTTCTTTGGCTTGCTGATGCTCCTCCTATG
GATATGAAGGATTCTATCTCTGCTGCTGATATCTCTGTGTCTAAGCCTCCTCCTCCTCCA
CCTCATCAAATCCAGCATTTTCGAGAACGGATCTACCTCTACCCTTACCGAGAACCCTTCT
CCTTCTGTGCATGCTCCTACACCTTCTCAACCTGCAGCTCCTCCACAAAGACAACAACAA
CAGCAACAATCTTCTCAGGCTCAGCAGGGACCTTTCAGAAGAGAGCTTAACTTCTCTGAT
TTCGCTTCTAACGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CTCAACTTCGGAAACGATTCTTCATCTGGAAGAAGAAACCCTTACCAGCTCCACCAGCA
GCTACAGCTTCTTACTACTGCTCCTGGATCACTCTTCTCACAGCACACTCCTACTCTT
ACCGCTGCTGCTAACGATGCTAAGTCTAACAACCAGAAAAGATCTATGGAAGCTACCTCT
AGGGCTTCTAACACCAACAACCATCCTGCTGCAACCGCTAACGAGGGAATGCTCTTTTT
TCATCTGCTCCAACCACCAGGCCTTCTACTGGAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GATCACTCTGATCTCGAGGCTTCAGTGAGAGAGGTTGAGTCATCTAGAGTTGTGGCACCT
CCTCCAGAGGCTGAGAAAAGACCTAGAAAAAGAGGTAGGAAGCCTGCTAACGGAAGGGAA
GAACCTCTCAACCATGTGGAAGCTGAGAGGCAGAGAAGAGAGAAGCTCAACCAGAGATTC
TACGCTCTCAGAGCTGTGGTGCCTAACGTGTCAAAGATGGATAAGGCTTCACTCCTCGGA
GATGCTATCTCTTACATCAACGAGCTTAGGGGAAAGCTCACCGCTCTCGAGACTGATAAG
GAAACCTTGCAGTCTCAGATGGAATCTCTCAAGAAAGAAAGGGATGCTAGGCCTCCTGCT
CCTTCAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ATCCTTGGACTCGAGGCTATGATTAGAGTGCAGTGCCACAAGAGAAACCACCCAGCTGCT
AGACTTATGACCGCTCTTAGAGAACTCGATCTCGATGTGTACCACGCTTCTGTGTCTGTG

タンパク質発現用に最適化した *OsMYC2* の CDS (続き)

GTGAAGGATCTCATGATCCAGCAAGTGGCTGTGAAGATGGCTTCTAGGGTGTACTCTCAG
GATCAGTTGAACGCTGCTCTCTACACCAGAATCGCTGAACCTGGTACTGCTGCTAGATGA

第3章

サクラネチン生産および *OsNOMT* 発現が抑制された *OsMYC2* 発現抑制株における遺伝子発現の網羅的な解析

3-1 緒言

本論文第2章で、*OsMYC2* が JA 誘導的な *OsNOMT* の発現、ひいてはサクラネチンの生産において中心的な役割を果たしていることを示した。この *OsMYC2* およびそのオルソログについて、複数の植物種において JA シグナルのマスターレギュレーターとして機能することが明らかになっている [Shoji and Hashimoto, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Kazan and Manners, 2013]。イネにおいても、本研究で解明したことのほか、*OsMYC2* は JA シグナルを正に制御し、proteinase inhibitor などの防御関連遺伝子の発現や小穂の成長を促す遺伝子 *OsMADS1* の発現を誘導していることが知られている [Cai *et al.*, 2014; Uji *et al.*, 2016]。しかし、*OsMYC2* 過剰発現株においてサクラネチン蓄積量は増加する傾向が見られたものの *OsNOMT* の発現量に影響は見られないなど、*OsMYC2* の機能には不明な点が多い。*OsMYC2* の機能の詳細を解明することは、サクラネチン生産制御機構はもとよりイネの防御応答や成長の影響を解明することにも役立つと考えられる。

そこで本章では、第2章で用いた *OsMYC2* 発現抑制株を用いた RNA-Sequencing (RNA-Seq) 解析を行い、*OsMYC2* の機能の詳細に迫ることを目的とした。

なお、本章における *OsMYC2* 発現抑制株の RNA 抽出に関する実験は帝京大学の山根久和教授・宮本皓司博士、RNA-Seq 解析に関する実験は東京農業大学の辻井良政准教授・三木玲香博士と共同で行った。

3-2 材料と方法

3-2-1 植物材料

RNA-Seq 解析には、*Oryza sativa* L., cv. Nihonmasari をベースとし、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下で RNAi 法により発現が抑制される *OsMYC2* 発現抑制株（以下 *osmyc2RNAi*）、空ベクターである pANDA [Miki and Shimamoto, 2004]（奈良先端科学技術大学院大学・故島本功教授より譲渡）で形質転換されたベクターコントロール（VC）、および野生型株（WT）を用いた。

イネの種子は籾を剥き、70%エタノールで2分間滅菌をした後 dH₂O で5回洗浄し、続いて1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液（関東化学）で20分滅菌した。塩素による滅菌後、オートクレーブ滅菌された水で5回以上洗浄した。滅菌した種子は0.5%の寒天培地に播種し、14時間明条件、10時間暗条件、28°Cで10日間生育した。

イネの形質転換体は、帝京大学の山根教授および宮本博士が作出したものを譲渡頂いた。

3-2-2 イネ形質転換体の選抜

形質転換体の選抜は、第2章 2-2-6の方法で行った。

3-2-3 total RNA の抽出

RNA サンプルについて、*osmyc2RNAi* 株2系統（#2、#9）、VC、およびWTの計4系統から抽出するサンプルを2サンプルずつ選抜した。植物体から葉身を切り出し、明条件、28°Cで一晩静置して傷害処理を解除したのから抽出した。イネ葉身を500 μMのJAで6時間処理し、回収後すぐに液体窒素で凍結させた。また、処理前（0h）にもイネ葉身を回収しコントロールとした。Total RNAの抽出は、第2章 2-2-7の方法で行った。抽出したサンプルはバイオアナライザーによるクオリティーチェックに供した。

なお、RNAのクオリティーチェックは東京農業大学、三木玲香博士に行って頂いた。

3-2-4 qRT-PCR による *OsMYC2* 発現解析

cDNAの合成およびqRT-PCRは、第2章 2-2-7の方法で行った。使用したプライマーは第2章 Table 2-3に記載した。

3-2-5 シーケンシングに用いるライブラリーの作製

3-2-3で抽出したRNAについて、500 ngをライブラリー作製に用いた。作製にはTruseq RNA Sample Preparation Kit V2 (Illumina, CA, USA)を用い、以下の要領で行った。この実験は東京農業大学、三木玲香博士に行って頂いた。

①PolyA RNAを単離し、断片化した。

- ②断片化RNAをテンプレートとし、二本鎖cDNAを合成した。
- ③合成した二本鎖cDNAの両末端を平滑化し、さらにリン酸化処理を行った。
- ④3'-dA突出を付加した。
- ⑤DNA断片にIndex付きのアダプターを付加した。Index配列はTable 3-1に示した。
- ⑥DNAをPCRで増幅し、AMPureXP (Beckman, CA, USA) を用いて付属のプロトコールに従い精製した。
- ⑦作製したライブラリーの断片長をバイオアナライザーでチェックし、さらに濃度を10 nMに合わせた。

3-2-6 シーケンシング

シーケンシングは、HiSeq2500 (Illumina, CA, USA) を使用し、シングルリード法、リード長100 bpで行った。

データの解析は、CLC Genomics Workbench (ver. 8.5.1) を使用して以下の要領で行った。

まず、シーケンスデータのクオリティーチェックを行い、配列のフィルタリングおよびトリミングを行った。トリミング配列について再度クオリティーチェックを行った後、マッピングと発現解析を行い、PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) の情報を元にGene Ontology解析を行った。Gene Ontology以外の解析については、RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) の情報を元に解析を行った。

なお、データのマッピングまでは東京農業大学、三木玲香博士と共同で行った。

3-2-7 ファイトアレキシンの定量

ファイトアレキシンの定量は、第2章2-2-8の方法で行った。

3-2-8 統計解析

RNA-Seq のデータについて、CLC Genomics Workbench を用いてノーマライゼーションおよび統計処理に供した。False discovery rate (FDR) P value < 0.05 のとき、有意差があると定義した。

ファイトアレキシン蓄積量のデータは平均 ± 標準誤差で表した。有意差検定は両側検定、独立のWelch's *t*-test により行った。P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), または P < 0.001 (***) のとき、有意差があると定義した。

Table 3-1 cDNAに付加したIndex 配列

Sample name	Index sequence
WT1 0 h	GTCCGC
WT2 0 h	GTGAAA
VC1 0 h	GTGGCC
VC2 0 h	GTTTCG
RNAi 2-1 0 h	CGTACG
RNAi 2-2 0 h	GAGTGG
RNAi 9-1 0 h	ACTGAT
RNAi 9-2 0 h	ATTCCT
WT1 JA	GATCAG
WT2 JA	TAGCTT
VC1 JA	GGCTAC
VC2 JA	CTTGTA
RNAi 2-1 JA	AGTCAA
RNAi 2-2 JA	AGTTCC
RNAi 9-1 JA	ATGTCA
RNAi 9-2 JA	CCGTCC

3-3 結果

3-3-1 RNA-Seq 解析に用いた RNA サンプルの選抜

RNA-Seq を行う前に、抽出した total RNA サンプルから合成した cDNA を用いて qRT-PCR を行い、*OsMYC2* の発現量を解析した。その結果、*osmyc2RNAi* 株において *OsMYC2* の発現が抑制されていることが確認された (Fig. 3-1)。続いて RNA をバイオアナライザーで解析した結果、RIN (RNA integrity number) がいずれも 8.0 を超えていたため (補章参照)、RNA-Seq に使用できると判断し、解析に用いた。

3-3-2 シーケンシング

まず、RNA をもとに合成したライブラリーの平均長を測定したところ、全てのサンプルで 314-330 bp とほぼ同等であった (補章参照)。そこで、このライブラリーを用いて RNA-Seq 解析を行った。解析結果の概要は補章 1 に示した。

得られたデータをさらに CLC Genomics Workbench (ver. 8.5.1) で解析した。さらに、配列のフィルタリングとトリミングを行い、その後マッピングを行った。これらの概要は補章 1 に示した。

CLC でノーマライズしたデータを元にヒートマップを作成しクラスタリングを行ったところ、JA 未処理のサンプルについて WT のみ他と異なる挙動を示していた (補章参照)。この結果と、第 2 章でコントロールに VC を用いていることを受け [Ogawa *et al.*, 2017]、以下の解析のコントロールには VC を用いることにした。

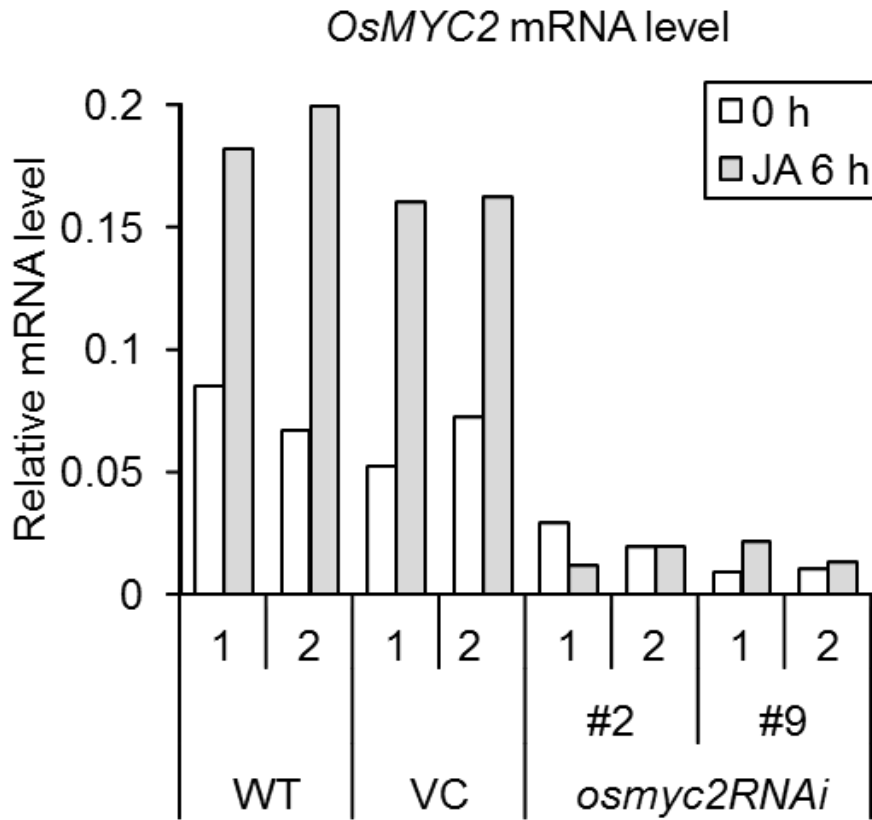


Figure 3-1 *OsMYC2* 発現抑制株 (*osmyc2RNAi*) における JA 処理時の *OsMYC2* 発現量
 500 μ M の JA で 6 時間処理したイネ (gray bars) および未処理のイネ (open bars) より total RNA を抽出し、逆転写で合成した cDNA を qRT-PCR に用いた。

3-3-3 OsMYC2 により影響を受ける JA 応答性遺伝子

JA シグナル伝達において OsMYC2 の影響を受ける遺伝子を選抜するため、以下の選抜を行った。まず、以下 4 点の基準を満たす遺伝子を選抜することで、OsMYC2 を通して JA シグナルにより誘導される遺伝子を選抜した。

- ①VC において、JA 処理により未処理のサンプルと比較して 2 倍を超えて発現が誘導される。
- ②JA 処理時、*osmyc2RNAi* において WT と比較して 1/2 未満に発現が抑えられる。
- ③False discovery rate (FDR) が P value < 0.05 である。
- ④*osmyc2RNAi* について、両方の系統で上記②と③を満たす。

また、以下 4 点の基準を満たす遺伝子を選抜することで、OsMYC2 を通して JA シグナルにより抑制される遺伝子を選抜した。

- ①VC において、JA 処理により未処理のサンプルと比較して 1/2 未満に発現が抑えられる。
- ②JA 処理時、*osmyc2RNAi* において WT と比較して 2 倍を超えて発現が誘導される。
- ③False discovery rate (FDR) が P value < 0.05 である。
- ④*osmyc2RNAi* について、両方の系統で上記②と③を満たす。

選抜の結果、JA により誘導される遺伝子のうち 59%が OsMYC2 依存的に誘導されていた (Fig. 3-2A)。一方、JA により抑制される OsMYC2 依存的に抑制されるものは 42%に留まった (Fig. 3-2B)。この結果より、OsMYC2 は特に JA シグナルによる遺伝子の発現誘導においてマスターレギュレーターとして機能していることが示唆された。

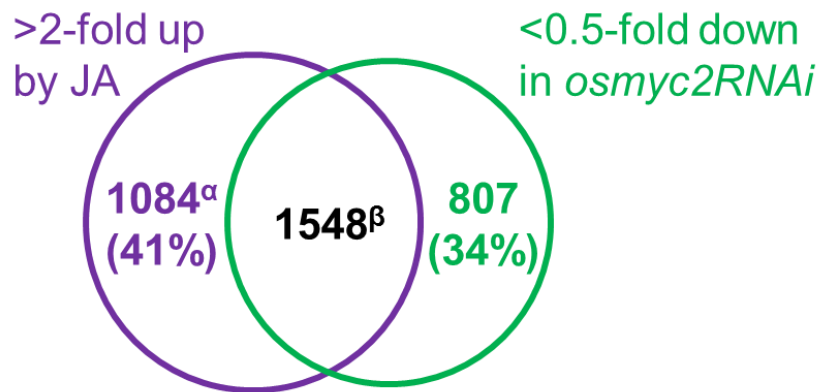
なお、今回は経時点が 6 時間のみのため、JA 処理後早期に発現が誘導され 6 時間後には元の発現量に戻る病虫害応答性遺伝子 *RERJ1* [Miyamoto *et al.*, 2013; Shimizu *et al.*, 2013] などは選抜対象から外れた。したがって、実際には OsMYC2 を介する JA 誘導性遺伝子はさらに多いといえる。

3-3-4 JA 誘導性遺伝子の Gene Ontology 解析

JA により誘導される遺伝子群 (Fig. 3-2A) について、PANTHER を用いて Gene Ontology 解析を行った結果、JA 誘導性の defense/immunity protein や transcription factor の多くが OsMYC2 依存的な発現パターンを示すことが示され、特に defense/immunity protein は全て OsMYC2 に依存していた (Table 3-2)。この 9 個の defense/immunity protein は全て pathogenesis-related protein であった。Defense/immunity protein、cell adhesion molecule (これらは storage protein と同一のタンパク質群である)、transcription factor、ligase の内訳を Tables 3-3~3-6 に示す。

以上の結果より、JA 処理により転写誘導のうち、特に防御応答関連遺伝子の誘導は OsMYC2 を介して行われることが示唆された。

A



B

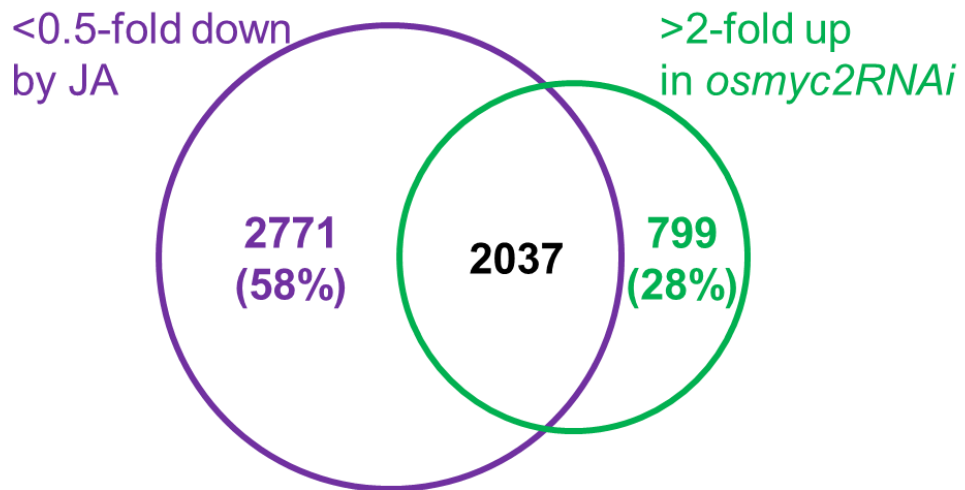


Figure 3-2 JA シグナルにおいて OsMYC2 依存的に誘導もしくは抑制される遺伝子数

誘導される遺伝子数 (A) および抑制される遺伝子数 (B) をベン図で示した。() 内の数字は全体に対する割合を表す。(A) の (α , β) は Table 3-2 に対応する。

Table 3-2 Gene Ontology解析によるJA誘導性遺伝子の機能分類

アノテーションには PANTHER を使用した。α および β は Fig. 3-2A に対応する。

1 つのタンパク質が複数の class に分類されていることもある。そのため、合計数が α, β と異なる。

Protein Class	>2-fold up by JA and		β/(α+β)
	>2-fold up by JA (α+β)	<0.5-fold down in <i>osmyc2RNAi</i> (β)	
hydrolase	140	90	64.3%
isomerase	64	35	54.7%
ligase	53	37	69.8%
lyase	77	39	50.6%
oxidoreductase	223	121	54.3%
transferase	224	129	57.6%
defense/immunity protein	9	9	100.0%
extracellular matrix protein	2	1	50.0%
cytoskeletal protein	63	32	50.8%
transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	1	0	0.0%
cell adhesion molecule	4	4	100.0%
signaling molecule	29	14	48.3%
nucleic acid binding	159	52	32.7%
enzyme modulator	52	22	42.3%
calcium-binding protein	34	22	64.7%
transfer/carrier protein	41	26	63.4%
membrane traffic protein	46	11	23.9%
transcription factor	32	22	68.8%
chaperone	17	9	52.9%
cell junction protein	4	1	25.0%
structural protein	1	1	100.0%
storage protein	4	4	100.0%
receptor	14	6	42.9%
transporter	140	71	50.7%
unclassified	1649	1022	62.0%
total	2632	1548	58.8%

Table 3-3 Table3-2 に示した defense/immunity protein の内訳

Gene ID	Description
Os07g0124900	OsPR1-71 (PR protein)
Os07g0125000	OsPR1b (PR protein)
Os07g0125500	Allergen V5/Tpx-1 related family protein. (PR protein)
Os07g0125600	Allergen V5/Tpx-1 related family protein. (PR protein)
Os07g0126301	Allergen V5/Tpx-1 related family protein. (PR protein)
Os07g0126401	Allergen V5/Tpx-1 related family protein. (PR protein)
Os07g0127600	OsPR1-73 (PR protein)
Os07g0129200	OsPR1a (PR protein)
Os10g0191300	OsPR1-101 (PR protein)

Table 3-4 Table3-2 に示した cell adhesion molecule (= storage protein) の内訳

Gene ID	Description
Os03g0244700	Armadillo-like helical domain containing protein.
Os05g0476700	OsPUB2 (U-BOX DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 16)
Os05g0573800	ARMADILLO/BETA-CATENIN-LIKE REPEAT-CONTAINING PROTEIN
Os06g0223800	CELLULOSE SYNTHASE-INTERACTIVE PROTEIN 1

赤字は *OsMYC2* 発現抑制株で発現が抑制される遺伝子 (Fig. 3-2A の β) を表す。

Table 3-5 Table3-2 に示した transcription factor の内訳

Gene ID	Description
Os01g0108600	BASIC HELIX-LOOP-HELIX DOMAIN-CONTAINING PROTEIN
Os01g0128000	Myb transcription factor domain containing protein.
Os01g0274800	CARBON STARVED ANTHER (R2R3-type MYB transcription factor)
Os01g0298400	Myb transcription factor domain containing protein.
Os01g0702700	OsMYB14
Os01g0806000	Similar to UBA-like.
Os01g0908200	OsBT
Os01g0952800	OsbHLH056
Os02g0506400	Similar to Ubiquitin-specific protease 15.
Os02g0523500	Rp120
Os02g0748300	OsFbox109
Os03g0171600	OsFbox130
Os03g0710900	Similar to CCAAT displacement protein-related.
Os03g0851000	BTF3b
Os04g0517100	OsMYB4
Os04g0532800	R2R3-MYB
Os04g0684900	OsCAF1B
Os05g0140100	OsMYB2P-1
Os05g0162800	SANT domain, DNA binding domain containing protein.
Os05g0429900	R2R3-MYB
Os05g0481500	K Homology domain containing protein.
Os05g0543600	OsMYB86-L2
Os06g0245900	DP-LIKE 2
Os07g0432800	Similar to Typical P-type R2R3 Myb protein (Fragment).
Os07g0558100	OsMyb7
Os07g0634900	OsMYB86
Os09g0106700	R2R3-MYB
Os10g0346200	Zinc finger, RING-type domain containing protein.
Os10g0478300	OsMyb9
Os11g0602800	Galactose oxidase/kelch, beta-propeller domain containing protein.
Os11g0684000	OsJAmyb
Os12g0564100	R2R3-MYB

赤字は *OsMYC2* 発現抑制株で発現が抑制される遺伝子 (Fig. 3-2A の β) を表す。

Table 3-6 Table3-2 に示した ligase の内訳

Gene ID	Description
Os01g0159300	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein.
Os01g0654100	Similar to CTP synthase.
Os01g0681200	Similar to Acyl-CoA synthetase.
Os01g0723600	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3
Os01g0842400	Laccase-4
Os01g0842500	Laccase
Os01g0901500	4-coumarate--CoA ligase-like 5;4CLL5 (ACS5)
Os01g0901600	4-coumarate--CoA ligase-like 6;4CLL6 (ACS6)
Os02g0261100	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 5B;UBC5B
Os02g0525900	Acetyl-coenzyme A synthetase
Os02g0681200	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein.
Os02g0682300	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein.
Os02g0743100	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein.
Os02g0749700	Putative laccase-9;LAC9
Os02g0759400	OsRING-1
Os03g0108200	Similar to Transposon protein.
Os03g0132000	4-coumarate--CoA ligase-like 4;4CLL4 (ACS4)
Os03g0223400	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-2;GLN1-2
Os03g0273200	Laccase-10;LAC10
Os03g0291500	Asparagine synthetase
Os03g0335600	VALYL-TRNA SYNTHETASE, ISOFORM C
Os03g0650900	OsRFPHC-1
Os03g0712800	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-3;GLN1-3
Os03g0744600	Similar to Ripening-associated protein (Fragment).
Os04g0512400	OsRFPHC-12
Os04g0580800	OsRFPH2-6
Os04g0580866	OSJNBa0064M23.13 protein;OSJNBa0064M23.13;ortholog
Os04g0623500	GLYCOLATE OXIDASE 3; GLO3
Os06g0192800	Similar to RING-H2 finger protein ATL1R (RING-H2 finger protein ATL8).
Os06g0218300	Zinc finger, RING-type domain containing protein.
Os06g0265000	Asparagine synthetase
Os06g0506600	OsUBC17
Os06g0617800	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
Os06g0617800	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
Os06g0677300	OsRFPV-5
Os06g0695600	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein.
Os07g0280200	4-coumarate--CoA ligase-like 7;4CLL7 (ACS7)
Os07g0673200	OsRFPHC-13
Os08g0241400	DNA binding zinc finger protein-like.

Table 3-6 (続き)

Gene ID	Description
Os08g0424200	METHYLCROTONOYL-COA CARBOXYLASE BETA CHAIN,
Os08g0503200	PLC-like phosphodiesterase.
Os10g0363300	Acetyl-CoA carboxylase 1;ACC1
Os10g0544600	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein.
Os10g0574400	Zinc finger, RING-type domain containing protein.
Os11g0642800	Glutathione synthetase
Os12g0143900	long-chain acyl-CoA synthetase 7
Os12g0169000	Similar to Amidase family protein, expressed.
Os12g0235800	Argininosuccinate synthase.
Os12g0257600	Similar to Laccase-25.
Os12g0264500	3-HYDROXYISOBUTYRYL-COA HYDROLASE, MITOCHONDRIAL
Os12g0479100	Os12g0479100 protein;LOC_Os12g29500;ortholog
Os12g0566300	Similar to ATP citrate lyase beta (Fragment).
Os12g0605800	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial;MCCA

赤字は *OsMYC2* 発現抑制株で発現が抑制される遺伝子 (Fig. 3-2A の β) を表す。

3-3-5 OsMYC2 を介して誘導される JA 誘導性遺伝子の詳細な解析

OsMYC2 を介して JA により誘導される遺伝子群 (Fig. 3-2A の β に含まれる 1548 遺伝子) について、さらなる情報を得るため RAP-DB を用いて解析した。

まず、JA 生合成遺伝子や JAZ など JA シグナルに関する遺伝子を抜粋した (Table 3-7)。第 1 章で JA 生合成経路を示したが (Fig. 1-3)、OsJAR1 を含めほぼ全ての生合成遺伝子が含まれていた。したがって、OsMYC2 発現抑制株では JA および JA-Ile の蓄積量が低下し、結果 JA 応答性反応が起こりにくくなっていることが示唆された。また、OsMYC2 の抑制因子である JAZ に着目すると、イネの JA シグナルを抑制すると示されている OsJAZ8 や、OsMYC2 により直接誘導される OsJAZ10 を含め [Yamada *et al.*, 2012; Uji *et al.*, 2016]、15 個の JAZ のうち 10 個が含まれていた。したがって、OsJAZ8 や OsJAZ10 以外の JAZ も JA シグナルの調節を行っていることが示唆された。また、3-3-3 で述べた基準こそ満たさなかったが、OsMYL1 も JA により誘導される傾向が見られ、さらに OsMYC2 発現抑制株において発現が顕著に低下していた。一方、OsMYL2 は第 2 章の結果と同じく (Table 2-5)、発現は常に一定であった。

次に、転写因子を抜粋した (Table 3-8)。アントシアニンなどの生合成に関与することが知られている MYB 型転写因子 [Li, 2014] や防御応答に関連する WRKY 型転写因子 [Chujo *et al.*, 2014] のほか、ethylene response factor (ERF) が多く含まれていた。ERF 遺伝子の発現はエチレンだけでなく JA や病原菌感染でも誘導されることが知られており [McGrath *et al.*, 2005]、ERF が多く抜粋されたことは OsMYC2 発現抑制株において JA シグナルが低下していることを裏付ける結果となった。また、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産を正に制御する bHLH 型転写因子 diterpenoid phytoalexin factor (DPF) について [Yamamura *et al.*, 2015]、3-3-3 で述べた基準は満たさなかったが JA により誘導される傾向が見られ、さらに OsMYC2 発現抑制株において発現が顕著に低下していた。そこで、ジテルペン型ファイトアレキシンのうち、代表的なファイトカサン E の量を測定した結果、OsMYC2 発現抑制株において JA 処理後の蓄積量が低下していた (Fig. 3-3)。したがって、OsMYC2 はサクラネチンだけでなくジテルペン型ファイトアレキシンの生産においても中心的な役割を担っていることが示された。

Table 3-7 OsMYC2を介してJAにより誘導されるJAシグナル関連遺伝子の発現変化

Fig. 3-2A の β (1548 遺伝子) に含まれるものを選抜した。

OsMYL1、OsMYL2 は基準から外れるが、本研究に必要な情報であるため掲載した。

Feature ID		VC JA6 h /VC 0 h	VC JA6 h /VC 0 h FDR p-value	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value
MYC2 and	OsMYC2	2.583	0.000	0.267	0.000	0.374	0.000
JAZs	OsJAZ9 (OS03G0180800)	22.941	0.000	0.012	0.000	0.014	0.000
	OsJAZ11 (OS03G0180900)	14.954	0.000	0.036	0.000	0.041	0.000
	OsJAZ10 (OS03G0181100)	7.399	0.000	0.167	0.000	0.153	0.000
	OsJAZ6 (OS03G0402800)	7.011	0.000	0.337	0.000	0.251	0.000
	OsJAZ5 (OS04G0395800)	15.656	0.000	0.015	0.000	0.010	0.000
	OsJAZ2 (OS07G0153000)	55.476	0.000	0.004	0.000	0.017	0.000
	OsJAZ7 (OS07G0615200)	3.384	0.000	0.304	0.000	0.236	0.000
	OsJAZ8 (OS09G0439200)	16.859	0.000	0.033	0.000	0.034	0.000
	OsJAZ13 (OS10G0391400)	20.518	0.000	0.067	0.000	0.082	0.000
	OsJAZ12 (OS10G0392400)	12.845	0.000	0.060	0.000	0.051	0.000
JA	OsFAD7 (OS03G0290300)	3.166	0.000	0.152	0.000	0.110	0.000
Biosynthetic	OsLOX2 (OS03G0179900)	2.802	0.000	0.418	0.000	0.382	0.000
Pathway	OsLOX1 (OS03G0700700)	5.302	0.000	0.117	0.000	0.078	0.000
	LOX1.1 (OS03G0738600)	17.849	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000
	OsLOX11 (OS12G0559200)	9.241	0.000	0.011	0.000	0.012	0.000
	OsAOS1 (OS03G0767000)	18.316	0.000	0.091	0.000	0.074	0.000
	OsAOC (OS03G0438100)	3.581	0.000	0.214	0.000	0.193	0.000
	OsOPR7 (OS08G0459600)	3.886	0.000	0.266	0.000	0.240	0.000
	OsJAR1 (OS05G0586200)	2.918	0.000	0.430	0.000	0.404	0.000
	OsMYL1 (OS01G0705700)	2.051	0.125	0.083	0.000	0.123	0.000
	OsMYL2 (OS01G0235700)	0.828	1.000	1.163	1.000	1.008	1.000

Table 3-8 OsMYC2を介してJAにより誘導される転写因子をコードする遺伝子の発現変化

Fig. 3-2A の β (1548 遺伝子) に含まれるものを選抜した。

DPF は基準から外れるが、本研究に必要な情報であるため掲載した。

Feature ID	VC JA6 h /VC 0 h	VC JA6 h /VC 0 h FDR p-value	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value
bHLH OsMYC2 (OS10G0575000)	2.583	0.000	0.267	0.000	0.374	0.000
OsbHLH148 (OS03G0741100)	2.216	0.002	0.251	0.000	0.218	0.000
bHLH domain containing protein (OS01G0108600)	5.237	0.000	0.285	0.000	0.215	0.000
OsbHLH032 (OS09G0475400)	2.134	0.000	0.454	0.000	0.362	0.000
MYB Myb domain containing protein (OS01G0128000)	2.437	0.012	0.162	0.000	0.141	0.000
R2R3-type MYB transcription factor (OS01G0274800)	11.035	0.000	0.222	0.000	0.180	0.000
OsMYB14 (OS01G0702700)	4.380	0.000	0.164	0.000	0.214	0.000
R2R3-MYB (OS04G0532800)	2.362	0.008	0.313	0.000	0.471	0.032
OsMYB2P-1 (OS05G0140100)	11.752	0.000	0.212	0.018	0.127	0.001
R2R3-MYB (OS05G0429900)	5.857	0.000	0.265	0.000	0.342	0.000
Myb-related protein (OS05G0543600)	4.408	0.000	0.082	0.000	0.086	0.000
P-type R2R3 Myb protein (OS07G0432800)	2.786	0.000	0.362	0.000	0.263	0.000
R2R3-MYB (OS09G0106700)	2.925	0.000	0.298	0.000	0.235	0.000
Similar to MYB71 (OS09G0431300)	3.984	0.003	0.160	0.000	0.112	0.000
OsMyb9 (OS10G0478300)	14.987	0.000	0.318	0.000	0.256	0.000
OsJAmyb (OS11G0684000)	9.660	0.000	0.100	0.000	0.117	0.000
R2R3-MYB (OS12G0564100)	3.123	0.000	0.045	0.000	0.106	0.000
NAC OsNAC4 (OS01G0816100)	17.839	0.000	0.050	0.000	0.051	0.000
ONAC59 (OS01G0862800)	8.205	0.000	0.061	0.000	0.106	0.000
ONAC39 (OS03G0327100)	3.403	0.000	0.249	0.000	0.265	0.000
WRKY OsWRKY10 (OS01G0186000)	34.007	0.000	0.032	0.000	0.034	0.000
OsWRKY1 (OS01G0246700)	2.678	0.000	0.493	0.000	0.437	0.000
OsWRKY26 (OS01G0714800)	29.774	0.000	0.006	0.000	0.007	0.000
OsWRKY55 (OS03G0321700)	3.262	0.000	0.457	0.000	0.435	0.000
OsWRKY8 (OS05G0583000)	2.262	0.000	0.200	0.000	0.213	0.000
OsWRKY73 (OS06G0146250)	3.483	0.000	0.227	0.000	0.211	0.000
OsWRKY28 (OS06G0649000)	3.208	0.000	0.349	0.001	0.219	0.000
OsWRKY104 (OS11G0117400)	2.919	0.000	0.020	0.000	0.039	0.000
OsWRKY72 (OS11G0490900)	4.088	0.000	0.211	0.000	0.162	0.000
OsWRKY95 (OS12G0116600)	3.079	0.000	0.092	0.000	0.114	0.000
OsWRKY94 (OS12G0597700)	3.003	0.000	0.440	0.000	0.453	0.000
bZIP OsbZIP16 (OS02G0191600)	2.732	0.000	0.381	0.000	0.306	0.000
OsbZIP89 (OS12G0634500)	6.999	0.000	0.186	0.000	0.346	0.041
ERF OsERF68 (OS01G0313300)	3.100	0.003	0.204	0.000	0.309	0.002
OsDREB2A (OS01G0165000)	2.979	0.000	0.369	0.000	0.368	0.000
OsERF32 (OS02G0656600)	19.380	0.000	0.072	0.000	0.050	0.000
OsERF35 (OS02G0657000)	3.289	0.040	0.040	0.000	0.102	0.000
OsDERF9 (OS02G0781300)	12.782	0.000	0.030	0.000	0.017	0.000
OsERF83 (OS03G0860100)	96.316	0.000	0.013	0.000	0.004	0.000
OsDERF6 (OS04G0398000)	7.516	0.000	0.185	0.000	0.171	0.000
OsDREB4-2 (OS04G0549700)	13.497	0.000	0.101	0.000	0.091	0.000
ERF (OS05G0437100)	16.203	0.000	0.008	0.000	0.009	0.000
OsERF74 (OS05G0497300)	3.119	0.000	0.197	0.000	0.220	0.000
OsDERF2 (OS07G0410700)	4.319	0.000	0.242	0.001	0.247	0.001
OsDERF8 (OS12G0168100)	3.219	0.025	0.157	0.000	0.300	0.020
ARF OsARF6a (OS02G0164900)	2.693	0.000	0.265	0.000	0.331	0.000
OsARF7a (OS06G0702600)	2.473	0.000	0.367	0.000	0.372	0.000
OsDof6 (OS01G0758200)	2.742	0.000	0.497	0.007	0.437	0.001
OsWOX6 (OS03G0325600)	39.897	0.000	0.013	0.000	0.023	0.000
OsHAP3C (OS05G0573500)	2.098	0.012	0.416	0.002	0.467	0.009
OsBZR1 (OS07G0580500)	2.382	0.000	0.417	0.000	0.405	0.000
B3 domain-containing protein (OS08G0157700)	3.188	0.020	0.056	0.000	0.076	0.000
OsHox25 (OS09G0379600)	10.278	0.000	0.103	0.000	0.073	0.000
DPF (OS01G0196300)	2.597	0.143	0.162	0.000	0.002	0.000

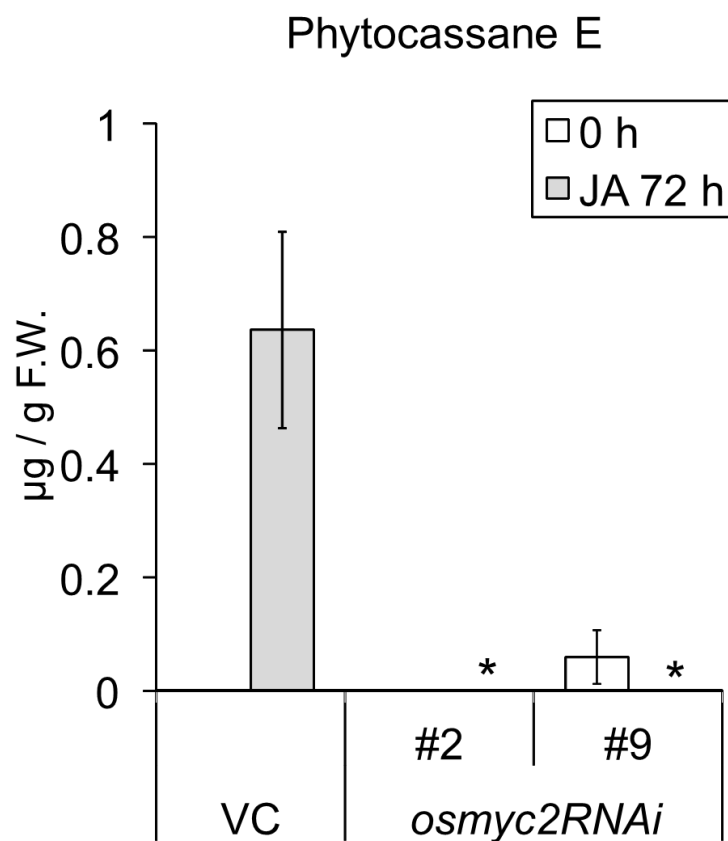


Figure 3-3 *OsMYC2* 発現抑制株 (*osmyc2RNAi*) における JA 処理時のファイトカサン E 蓄積量
 500 μ M の JA で 72 時間処理したイネ (gray bars) および未処理のイネ (open bars) におけるファイトカサン E の蓄積量。データは平均 (n = 4–6) \pm 標準誤差で表した。有意差検定は JA 処理、未処理それぞれについて VC と比較して行った (*P < 0.05)。

3-3-6 OsMYC2 が二次代謝産物の生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響の解析

OsMYC2 がサクラネチンをはじめとする二次代謝産物の生産にどのような影響を与えているか詳細に解析するため、生合成遺伝子の発現を解析した。遺伝子の発現変動を Table 3-9 に示す。

サクラネチン生合成遺伝子について、*phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* など生合成経路 (Fig. 3-4) の上流で機能する酵素遺伝子は JA 処理による発現変動が見られないか、あるいは JA シグナルにおいて OsMYC2 依存的に発現が抑制されていた。一方、*Acyl-CoA-synthase (ACS, 4-coumaroyl-CoA-ligase-like)*、*chalcone synthase (CHS)* や *chalcone isomerase (CHI)*、さらに *OsNOMT* といった下流の遺伝子は JA シグナルにおいて OsMYC2 依存的に発現が誘導されていた。したがって、サクラネチン生合成経路のうち少なくとも下流は OsMYC2 を介して JA シグナルにより活性化されることが示された。なお、ナリンゲニンはサクラネチン以外にもアントシアニンなど様々なフラボノイドに変換される共通の前駆体であるが、*Flavanone 3-hydroxylase* などナリンゲニンの変換に寄与する生合成酵素は、*OsNOMT* を除き OsMYC2 による影響を受けていなかった。

次に、テルペンやテルペノイドの共通前駆物質であるゲラニルゲラニルピリン酸 (GGPP) の前駆体の生合成経路である MEP 経路 (Fig. 3-5) に着目すると、7 遺伝子中 4 遺伝子の発現が OsMYC2 を介して JA シグナルにより誘導されていた。さらに、残り 3 遺伝子についても基準に満たなかったものの同様の傾向が見られた。したがって、OsMYC2 は様々なテルペン、テルペノイドの生産に影響を与えていることが示唆された。

さらに、GGPP をジテルペン型ファイトアレキシンに変換する酵素遺伝子群や、その他の *terpene synthase (TPS)* に着目すると、病虫害抵抗性に関与する揮発性物質 *linalool* の生合成遺伝子 *linalool synthase (OsLIS)* [Yuan *et al.*, 2008; Taniguchi *et al.*, 2014a] をはじめ 16 遺伝子中 8 遺伝子が OsMYC2 を介して JA シグナルにより誘導されていた。さらに、残りの遺伝子についても基準に満たなかったものの同様の傾向が見られた。したがって、OsMYC2 はファイトアレキシンのみならず様々な二次代謝産物の生産に関与し、病害抵抗性を正に制御していることが示唆された。

Table 3-9 二次代謝産物の生合成遺伝子の発現変化

Feature ID		VC JA6 h /VC 0 h	VC JA6 h /VC 0 h FDR p-value	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value
Sakuranetin and naringenin	PAL (OS02G0626100)	0.598	0.045	1.014	1.000	0.990	1.000
	PAL (OS02G0626400)	0.679	0.126	0.854	1.000	0.803	0.943
biosynthesis	PAL (OS02G0626600)	1.381	1.000	0.896	1.000	0.867	1.000
	PAL (OS02G0627100)	0.198	0.000	2.179	0.017	2.545	0.002
	PAL (OS04G0518100)	0.304	0.000	2.014	0.002	2.186	0.000
	PAL (OS04G0518400)	0.092	0.000	2.333	0.203	1.016	1.000
	PAL (OS05G0427400)	1.286	0.854	0.518	0.004	0.397	0.000
	PAL (OS05G0558900)	1.194	0.947	1.008	1.000	0.981	1.000
	PAL (OS12G0520200)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	C4H1 (OS02G0467600)	0.742	1.000	0.422	0.259	0.669	1.000
	C4H2 (OS05G0320700)	1.268	0.511	0.728	0.186	0.701	0.092
	4CL1 (OS08G0245200)	0.381	0.000	0.880	1.000	0.943	1.000
	4CL2 (OS02G0697400)	0.015	0.000	2.072	1.000	12.628	0.001
	4CL3 (OS02G0177600)	0.624	0.030	0.896	1.000	0.890	1.000
	4CL4 (OS06G0656500)	1.272	0.346	0.788	0.404	0.873	1.000
	4CL5 (OS08G0448000)	0.432	0.000	1.479	0.260	0.843	1.000
	ACS1 (OS03G0152400)	0.735	0.290	1.173	1.000	0.805	0.877
	ACS2 (OS10G0578950)	2.840	1.000	1.416	1.000	0.475	1.000
	ACS3 (OS08G0143300)	1.834	1.000	0.519	1.000	0.506	1.000
	ACS4 (OS03G0132000)	2.567	0.000	0.432	0.000	0.340	0.000
	ACS5 (OS01G0901500)	2.906	0.000	0.228	0.000	0.278	0.000
	ACS6 (OS01G0901600)	4.912	0.000	0.367	0.011	0.364	0.010
	ACS7 (OS07G0280200)	6.493	0.003	0.136	0.001	0.075	0.000
	CHS1 (OS11G0530600)	2.826	0.113	0.033	0.000	0.077	0.000
	CHS2 (OS07G0214900)	4.146	1.000	0.048	0.515	0.048	0.489
	CHS (OS07G0525900)	4.134	0.000	0.857	1.000	1.045	1.000
	CHI1 (OS03G0819600)	0.389	0.000	1.676	0.018	1.754	0.007
	CHI2 (OS06G0203600)	4.371	0.000	0.308	0.000	0.224	0.000
	OsNOMT (OS12G0240900)	21.916	0.000	0.008	0.000	0.005	0.000
MEP pathway	OsDXS3 (OS07G0190000)	2.102	0.393	0.157	0.000	0.001	0.000
	OsDXR (OS01G0106900)	2.333	0.005	0.223	0.000	0.100	0.000
	OsCMS (OS01G0887100)	2.959	0.000	0.632	0.029	0.530	0.001
	OsCMK (OS01G0802100)	2.709	0.000	0.209	0.000	0.114	0.000
	OsMCS (OS02G0680600)	3.041	0.000	0.247	0.000	0.178	0.000
	OsHDS (OS02G0603800)	3.561	0.000	0.217	0.000	0.147	0.000
	OsHDR (OS03G0731900)	1.799	0.005	0.351	0.000	0.201	0.000
	Diterpenoid phytoalexin	OsCPS4 (OS04G0178300)	1.377	1.000	0.294	0.049	0.004
	OsKSL8 (OS11G0474800)	0.702	1.000	0.404	0.026	0.163	0.000
biosynthesis	OsKSL10 (OS12G0491800)	5.822	0.003	0.039	0.000	0.001	0.000
	CYP76M5 (OS02G0569000)	2.169	0.410	0.100	0.000	0.000	0.000
	CYP76M6 (OS02G0571900)	3.057	0.095	0.217	0.010	0.007	0.000
	CYP71Z6 (OS02G0570500)	4.276	0.001	0.064	0.000	0.207	0.001
	CYP99A3 (OS04G0178400)	0.602	1.000	0.212	0.022	0.012	0.000
Terpene synthase	OsLIS (OS02G0121700)	8.684	0.000	0.007	0.000	0.007	0.000
	OsTPS5 (OS02G0568700)	213.117	0.000	0.001	0.000	0.002	0.000
	OsTPS10 (OS03G0348200)	0.078	0.000	0.051	0.009	0.011	0.002
	OsTPS20 (OS04G0341500)	5.833	0.000	0.009	0.000	0.012	0.000
	OsTPS23 (OS04G0344400)	14.341	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000
	OsTPS28 (OS07G0218200)	11.444	0.022	0.002	0.000	0.001	0.000
	OsTPS29 (OS08G0139700)	0.328	0.399	0.046	0.000	0.039	0.000
	OsTPS30 (OS08G0167800)	0.502	0.559	0.007	0.000	0.012	0.000
	Sesquiterpene synthase (OS08G0168000)	7.850	0.000	0.001	0.000	0.002	0.000

赤字は JA シグナルにおいて OsMYC2 依存的に発現誘導される遺伝子 (Fig. 3-2A の 1548 個に含まれる)、
青字は JA シグナルにおいて OsMYC2 依存的に発現抑制される遺伝子 (Fig. 3-2B の 2037 個に含まれる)
を表す。

PAL: Phenylalanine ammonia-lyase, C4H: cinnamate-4-hydroxylase, 4CL: 4-coumaroyl-CoA-ligase, ACS:

Acyl-CoA-synthase (4CL-like), CHS: chalcone synthase, CHI: chalcone isomerase, DPF: diterpenoid phytoalexin
factor, LIS: linalool synthase, IDEF: Iron deficiency-responsive *cis*-acting element binding factor.

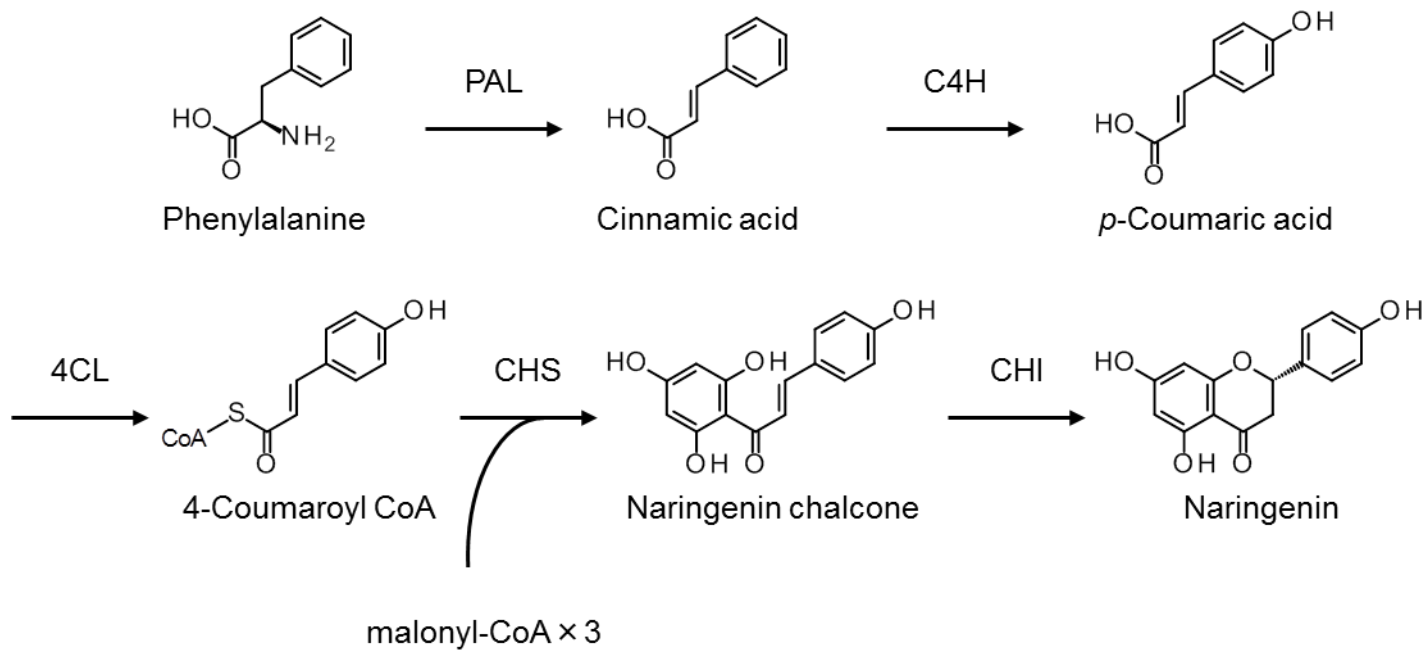


Figure 3-4 ナリンゲニン生合成経路

PAL: Phenylalanine ammonia-lyase, C4H: cinnamate-4-hydroxylase, 4CL: 4-coumaroyl-CoA-ligase, CHS: chalcone synthase, CHI: chalcone isomerase.

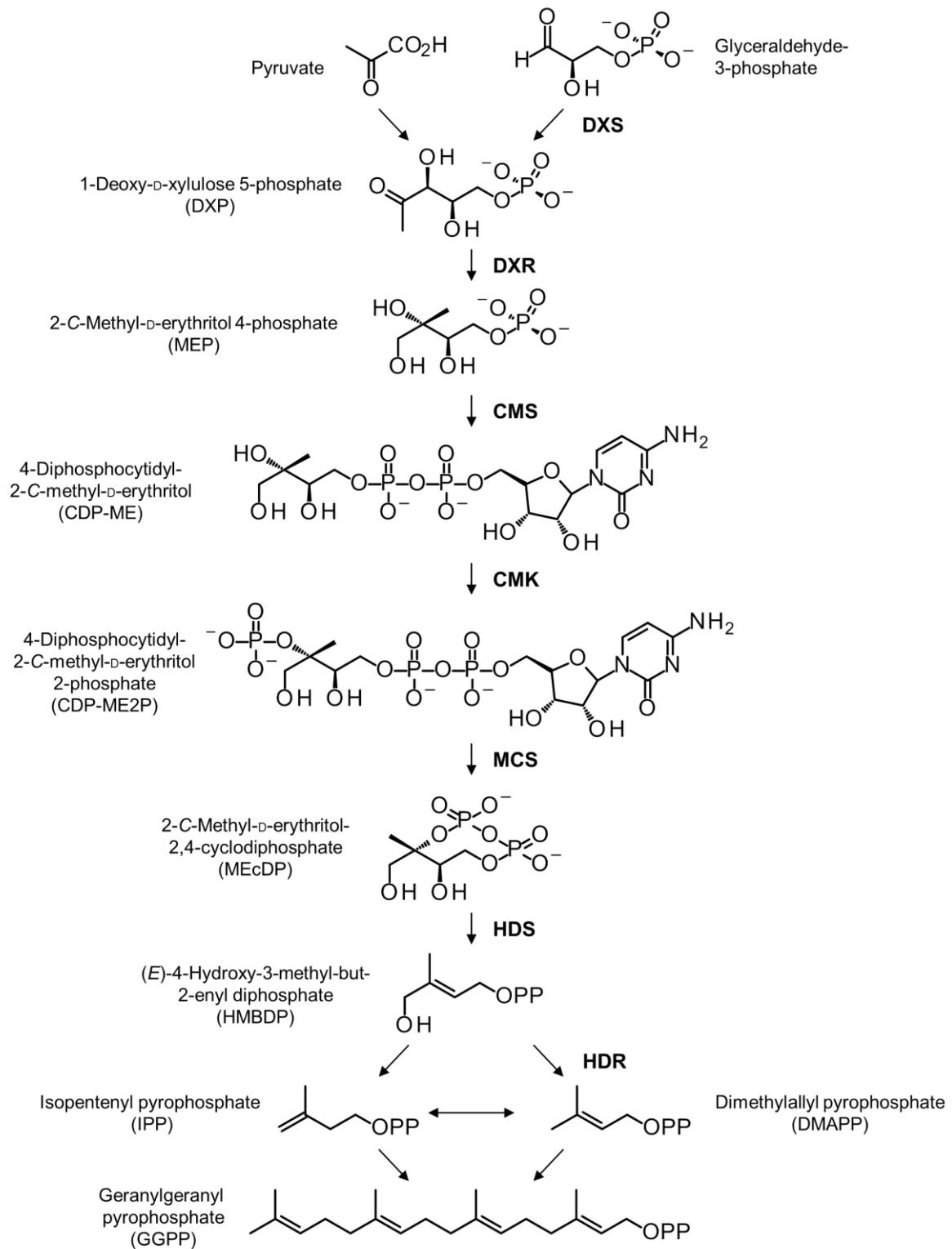


Figure 3-5 MEP 経路

DXS: DXP synthase, DXR: DXP reductoisomerase, CMS: CDP-ME synthase, CMK: CDP-ME kinase, MCS: MEcDP synthase, HDS: HMBDP synthase, HDR: HMBDP reductase.

3-3-7 OsMYC2 が JA 以外のホルモン応答性遺伝子や鉄欠乏応答性遺伝子の発現に及ぼす影響の解析

植物ホルモンにより誘導されるシグナルはクロストークにより互いに影響を与えている [Anderson *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006; Tamaoki *et al.*, 2013]。また、イネの根において、鉄欠乏状態になるとすぐに JA 応答が誘導されることが知られている [Kobayashi *et al.*, 2016]。したがって、JA シグナルを広く制御している *OsMYC2* の発現量が低下すれば、他のホルモンのシグナル伝達、あるいは鉄欠乏応答性反応にも影響が及ぶことが予想された。そこで、過去の解析で明らかにされた、エチレン、サリチル酸、アブシジン酸により誘導される遺伝子群、および鉄欠乏応答性遺伝子群の発現を調べた。

エチレン応答性遺伝子は、RAP-DB において ERF とされているものを解析した。その結果、Dehydration responsive element binding factor (DREB) や Drought-responsive ethylene response factor (DERF) など、特に乾燥ストレス応答性 ERF が *OsMYC2* を介して JA により誘導されていた (Table 3-10)。JA シグナルにより ERF 遺伝子の発現が誘導されることは本章 3-3-5 で述べたが、特に乾燥ストレス応答性の ERF に対し強く働き掛けることが明らかになった。

サリチル酸応答性遺伝子は、サリチル酸シグナルを活性化する benzothiadiazole の処理により誘導される遺伝子 [Shimono *et al.*, 2007] を解析した。その結果、WRKY 型転写因子や抗菌性タンパク質であるキチナーゼおよび PR1a、防御応答物質の生産などに関与する Tau class glutathione S-transferase (GSTU) [Tiwari *et al.*, 2016] が選抜された (Table 3-11)。すなわち、*OsMYC2* はサリチル酸シグナルのうち特に防御応答に関する部分を正に制御していることが示された。

アブシジン酸応答性遺伝子は、先行研究で行われたマイクロアレイの結果 [Moons, 2003; Rabbani *et al.*, 2003] をもとに解析した。その結果、虫の摂食行動を阻害する protease inhibitor である BOWMAN-BIRK INHIBITOR や塩ストレス耐性に関与する *OsSalT* などが選抜された (Table 3-12)。

鉄欠乏応答性遺伝子は、先行研究で行われたマイクロアレイの結果 [Ogo *et al.*, 2008] をもとに解析した。その結果、酸化反応を促進する haem peroxidase などが選抜された (Table 3-13)。

Table 3-10 エチレン誘導性遺伝子の発現変化

Feature ID		VC JA6 h /VC 0 h	VC JA6 h /VC 0 h FDR p-value	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value
DREB	OsERF31 (OS09G0522000, DREB1B)	0.620	1.000	3.109	0.027	3.272	0.020
	OsERF40 (OS01G0165000, DREB2A)	2.979	0.000	0.369	0.000	0.368	0.000
	OsERF33 (OS04G0549700, DREB4-2)	13.497	0.000	0.101	0.000	0.091	0.000
drought- responsive	OsDERF2 (OS07G0410700)	4.319	0.000	0.242	0.001	0.247	0.001
	OsDERF6 (OS04G0398000)	7.516	0.000	0.185	0.000	0.171	0.000
ERF	OsDERF8 (OS12G0168100)	3.219	0.025	0.157	0.000	0.300	0.020
	OsDERF9 (OS02G0781300)	12.782	0.000	0.030	0.000	0.017	0.000
	OsDERF11 (OS10G0371100)	1.987	0.295	0.085	0.000	0.257	0.004
	OsBIERF1 (OS09G0434500)	0.543	0.001	3.656	0.000	4.032	0.000
	OsERF3 (OS01G0797600)	1.849	0.026	0.320	0.000	0.357	0.000
	OsERF99 (OS01G0868000)	1.861	0.114	0.348	0.001	0.447	0.017
	OsEREBP1 (OS02G0782700)	2.061	0.000	0.551	0.000	0.575	0.000
	SHAT1 (OS04G0649100)	0.325	0.000	2.576	0.000	2.670	0.000
	ERF domain containing protein (OS05G0437100)	16.203	0.000	0.008	0.000	0.009	0.000
	OsERF130 (OS05G0497200)	1.641	0.709	0.057	0.000	0.192	0.000

JA 処理時、ベクターコントロール (VC) と *OsMYC2* 発現抑制株において発現に差が見られたもの (FDR < 0.05、倍率は不問) を選抜した。

赤字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現誘導される遺伝子 (Fig. 3-2A の 1548 個に含まれる)、青字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現抑制される遺伝子 (Fig. 3-2B の 2037 個に含まれる) を表す。

Table 3-11 サリチル酸誘導性遺伝子の発現変化

Feature ID		VC JA6 h /VC 0 h	VC JA6 h /VC 0 h FDR p-value	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h p-value	FDR	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value
WRKY	OsWRKY8 (OS05G0583000)	2.262	0.000	0.200	0.000		0.213	0.000
	OsWRKY64 (OS12G0116700)	0.373	0.000	0.115	0.000		0.004	0.000
	OsWRKY71 (OS02G0181300)	2.417	0.000	0.508	0.000		0.526	0.000
	OsWRKY72 (OS11G0490900)	4.088	0.000	0.211	0.000		0.162	0.000
Chitinase	OsChia1c (OS06G0726100)	2.753	0.037	0.124	0.000		0.151	0.000
	OsChia2a (OS10G0542900)	4.651	0.004	0.089	0.000		0.196	0.002
Tau class	OsGSTU3 (OS10G0528400)	6.672	0.000	0.394	0.000		0.468	0.004
Glutathione	OsGSTU7 (OS01G0949700)	1.041	1.000	0.514	0.006		0.419	0.000
S-transferase	OsGSTU8 (OS10G0529700)	1.030	1.000	4.764	0.000		3.435	0.001
	OsGSTU10 (OS10G0531400)	0.296	0.000	3.466	0.000		4.404	0.000
	OsGSTU19 (OS10G0527400)	2.039	0.028	0.084	0.000		0.107	0.000
	OsGSTU24 (OS10G0528100)	2.330	0.000	1.594	0.011		1.491	0.042
	OsPR1a (OS07G0129200)	2.677	0.019	0.175	0.000		0.064	0.000
	OsLOX11 (OS12G0559200)	9.241	0.000	0.011	0.000		0.012	0.000

JA 処理時、ベクターコントロール (VC) と *OsMYC2* 発現抑制株において発現に差が見られたもの (FDR < 0.05、倍率は不問) を選抜した。

赤字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現誘導される遺伝子 (Fig. 3-2A の 1548 個に含まれる)、青字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現抑制される遺伝子 (Fig. 3-2B の 2037 個に含まれる) を表す。

Table 3-12 アブシジン酸誘導性遺伝子の発現変化

Feature ID	VC JA6 h	VC JA6 h	RNAi#2 JA6 h	RNAi#2 JA6 h	RNAi#9 JA6 h	RNAi#9 JA6 h
	/VC 0 h	/VC 0 h	/VC JA6 h	/VC JA6 h	/VC JA6 h	/VC JA6 h
	FDR	FDR p-value	FDR	p-value	FDR	FDR p-value
BOWMAN-BIRK INHIBITOR 2-3 (OS01G0124650)	4.818	0.000	0.045	0.000	0.110	0.000
OsSalT (Os01g0348900)	28.594	0.000	0.014	0.000	0.018	0.000
OsPDR9 (OS01G0609300)	15.977	0.000	0.165	0.000	0.127	0.000
Putative translation initiation factor (OS01G0794500)	1.543	0.019	0.646	0.020	0.586	0.002
OsATX (OS01G0826000)	0.372	0.000	3.615	0.000	2.706	0.000
OsZIP12 (OS01G0867300)	1.169	1.000	1.543	0.013	1.576	0.008
OsNAC6 (OS01G0884300)	3.061	0.000	0.507	0.001	0.559	0.009
DEHYDRIN 1 (OS02G0669100)	0.671	0.463	0.490	0.022	0.496	0.025
Dihydroorotate dehydrogenase 1 (OS02G0736400)	4.926	0.000	0.166	0.000	0.162	0.000
Putative phosphate-induced protein 1 (OS02G0756800)	4.149	0.001	0.002	0.000	0.035	0.000
Monosaccharide transporter 4 (OS03G0218400)	1.842	0.009	0.481	0.001	0.253	0.000
Similar to Sugar-starvation induced protein. (OS03G0701200)	2.624	0.027	0.222	0.000	0.289	0.002
Cold acclimation WCOR413 family protein. (OS03G0767800)	1.162	1.000	0.485	0.000	0.574	0.012
OsLTI6B (OS05G0138300)	2.460	0.000	0.495	0.000	0.543	0.001
Phosphoglycerate kinase 4 (OS06G0668200)	1.015	1.000	1.975	0.002	2.244	0.000
Catalase isozyme B (OS06G0727200)	2.139	0.000	0.611	0.011	0.643	0.028
Unknown (OS07G0213500)	0.977	1.000	0.340	0.000	0.417	0.002
Pyruvate dehydrogenase kinase 2 (OS07G0637300)	1.177	1.000	0.183	0.000	0.157	0.000
Aconitase 1 (OS08G0191100)	2.181	0.000	0.654	0.023	0.546	0.000
Zeaxanthin epoxidase (OS08G0205800)	0.686	1.000	0.233	0.000	0.363	0.012
G3P dehydrogenase (OS08G0440800)	0.167	0.000	3.853	0.000	3.759	0.000

JA 処理時、ベクターコントロール (VC) と *OsMYC2* 発現抑制株において発現に差が見られたもの (FDR < 0.05、倍率は不問) を選抜した。

赤字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現誘導される遺伝子 (Fig. 3-2A の 1548 個に含まれる)、青字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現抑制される遺伝子 (Fig. 3-2B の 2037 個に含まれる) を表す。

Table 3-13 鉄欠乏誘導性遺伝子の発現変化

Feature ID		VC JA6 h /VC 0 h	VC JA6 h /VC 0 h FDR p-value	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#2 JA6 h /VC JA6 h p-value	FDR	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h	RNAi#9 JA6 h /VC JA6 h FDR p-value
OsDREB1B (OS09G0522000)		0.620	1.000	3.109	0.027		3.272	0.020
Enzyme	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family (OS01G0179600)	2.127	0.002	8.192	0.000		10.971	0.000
	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family (OS09G0517900)	0.041	0.000	10.278	0.000		11.237	0.000
	Alpha/beta hydrolase fold-1 domain containing protein (OS01G0595600)	2.245	0.011	0.152	0.000		0.434	0.009
	Xyloglucan endotransglucosylase 14 (OS02G0280300)	4.221	0.000	0.169	0.000		0.190	0.000
	Haem peroxidase (OS04G0688300)	5.177	0.000	0.136	0.000		0.215	0.000
	Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein (OS05G0590300)	0.438	0.512	4.161	0.022		3.922	0.031
	Aldehyde oxidase (OS10G0138100)	0.323	0.000	4.948	0.000		2.881	0.001
	Endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor (OS11G0275000)	0.076	0.000	4.050	0.000		3.551	0.000

JA 処理時、ベクターコントロール (VC) と *OsMYC2* 発現抑制株において発現に差が見られたもの (FDR < 0.05、倍率は不問) を選抜した。

赤字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現誘導される遺伝子 (Fig. 3-2A の 1548 個に含まれる)、青字は JA シグナルにおいて *OsMYC2* 依存的に発現抑制される遺伝子 (Fig. 3-2B の 2037 個に含まれる) を表す。

3-4 考察

本章では、OsMYC2 が JA シグナルによる遺伝子の発現に広く関与し、特に防御応答遺伝子や転写因子の誘導において主要な役割を果たしていることを示した。

OsMYC2 発現抑制株では、JA 処理後の OsMYL1 の発現量が顕著に低下していた。したがって、第 2 章で述べたことと合わせ、OsMYC2 は JA 要求性シグナルにおいて OsMYL1 の発現を正に制御し、自らの活性化に利用していることが示唆された。

ナリンゲニン生合成遺伝子について、PAL などの上流に存在する遺伝子については JA 処理による発現変動が見られない、あるいは発現が抑制されるという結果が得られた。しかし、前項でも述べた通り経時点が 1 点のみであり、RERJ1 の様に一度既に発現が上昇した後元に戻っている可能性も考えられる。実際、第 2 章で行ったトランスクリプトーム解析では、Table 3-9 に載せた CHS1 および CHS2 は塩化銅処理後 6 時間で JA 要求性の発現誘導が最大になっているのに対し、PAL の一部 (Os02g0626600, Os04g0518400, Os05g0427400) は塩化銅処理後 2 時間で JA 要求性の発現誘導を示し、6 時間では既に発現が下がり始めているという結果が得られており、ナリンゲニン生合成経路全体が OsMYC2 を介して JA シグナルにより活性化されていることが示唆された。ナリンゲニン生合成経路が JA シグナルで活性化されるとすれば、OsMYC2 発現抑制株においてサクラネチン蓄積量とともに前駆体のナリンゲニン蓄積量も低下した現象にも説明がつく (Figs. 2-9 and 2-10)。今後、OsMYC2 発現抑制株を用いた経時的な発現解析により、上流の遺伝子が JA により誘導されるか、また OsMYC2 の影響を受けるかを解析し、JA シグナルにおける OsMYC2 のナリンゲニンおよびサクラネチン生産への関与を明らかにしていく必要があると考えられる。

サクラネチン以外の二次代謝産物に目を向けると、テルペンやジテルペンの生産に関与する MEP 経路の生合成遺伝子や、ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成遺伝子、さらには防御応答に関する揮発性物質の生合成酵素遺伝子が OsMYC2 を介して JA シグナルにより誘導されていた。また、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現誘導に関与する転写因子 DPF も OsMYC2 の下流で遺伝子の発現が誘導されていることが示された。したがって、OsMYC2 は防御応答物質全般の生産において中心的な役割を果たしていることが示唆された。また、フラボノイド型化合物について、ナリンゲニンより下流のフラボノイド生合成遺伝子は OsNOMT を除き OsMYC2 の影響を受けていなかった。このことから、主に防御応答を制御する JA シグナルにおいて、フラボノイドは防御物質であるサクラネチンに優先して変換されることが示唆された。今後、OsMYC2 発現抑制株を用いた解析について、第 2 章で示したことに加えて病害抵抗性試験やメタボローム解析などを行い、本章で得られた遺伝子の発現変動に関する知見と植物の表現型を結び付けることが重要であると考えられる。

JA シグナルと、JA 以外の植物ホルモンによるシグナル伝達とのクロストークについて、エチレン誘導性遺伝子のうち、特に乾燥ストレスと関係の深い遺伝子が OsMYC2 を介して JA シグナルにより誘導されていた。また、アブシジン酸誘導性遺伝子に目を向けると、塩ストレス耐性に関与する OsSalT が

OsMYC2 を介して JA シグナルにより誘導されていた。すなわち、OsMYC2 は非生物学的ストレスに対する耐性付加にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

本章の序論でも述べたが、第 2 章において *OsMYC2* の過剰発現株では *OsNOMT* の発現が定常時、JA 処理時いずれにおいても亢進されないという結果が得られた (Fig. 2-11)。この結果から、本章において *OsMYC2* の制御下にあるとわかった遺伝子群についても、同様に *OsMYC2* を過剰発現させても発現が亢進されない可能性がある。この原因を解明するため、*OsMYC2* 過剰発現株を用いた RNA-Seq 解析を行うことが必要であると考えられる。

本章の研究を通し、シロイヌナズナやタバコなど双子葉の MYC2 と比較して研究の進んでいない *OsMYC2* について、サクラネチン生産以外の防御応答に対する役割を知ることができた。今後、成長や稔性など防御応答以外の側面に *OsMYC2* がどのような影響を及ぼすのか、植物体を用いた解析により解明されることが期待される。

第4章

サクラネチン生合成酵素遺伝子を直接制御する転写因子の同定と機能解析

4-1 緒言

第2章では、bHLH型転写因子 OsMYC2 が *OsNOMT* プロモーターに及ぼす影響を解析した。しかし、OsMYC2により活性化される *OsNOMT* 転写開始点上流域中のシスエレメントを決定できないなど、最終的にどのように *OsNOMT* プロモーターを制御するかは未解明であった。シスエレメントに直接結合する転写因子の同定は遺伝子発現制御機構の解析において非常に重要であり、シスエレメントに結合する転写因子を決めて詳細を解析した研究は植物だけでも多数報告がある [Kim *et al.*, 2012; Konishi and Yanagisawa, 2013; Nakata *et al.*, 2013]。そこで本章では、*OsNOMT* 転写開始点上流域に結合し直接制御する転写因子を探索し、*OsNOMT* プロモーター活性を制御する転写因子の同定と機能解析を行った。

なお、本章における yeast one-hybrid screening に関する実験は産業技術総合研究所の光田展隆博士らと共同で行った。

4-2 材料と方法

4-2-1 植物材料

レポータージーンアッセイには、*Oryza sativa* L., cv. Nipponbare を用いた。

イネの種子は籾を剥き、70%エタノールで2分間滅菌をした後 dH₂O で5回洗浄し、続いて1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液（関東化学）で20分滅菌した。塩素による滅菌後、オートクレーブ滅菌された水で5回以上洗浄した。滅菌した種子は0.5%の寒天培地に播種し、14時間明条件、10時間暗条件、28°Cで生育した。

4-2-2 酵母材料および培養条件

本章では、酵母として *Saccharomyces cerevisiae* YM4271株 (*MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *lys2-801*, *ade2-101*, *ade5*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *tyr1-501*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *ade5::hisG*) [Liu *et al.*, 1993] を用いた。酵母はYPD培地またはSD平板培地にて、30°Cで培養した。SD平板培地について、Uracil (Ura: U)、Leucine (Leu: L)、Histidine (His: H) の一部または全部を除き、さらに必要に応じて3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) を添加して用いた。

YPD 培地 (L)

Bacto Yeast Extract	10 g
Bacto Peptone	20 g
Glucose	20 g
Agar (プレートのみ)	20 g

SD 平板培地 (L)

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (DIFCO)	6.7 g
10x Dropout solution (後述)	100 mL
Glucose	20 g
Agar	20 g

必要に応じて 3-AT を添加した。3-AT は熱に弱いため、オートクレーブ後培地の温度が 55°C 以下になったことを確認してから添加した。

10x Dropout solution (L)

L-Isoleucine	300 mg
L-Valine	1500 mg
Adenine Sulfate	200 mg
L-Arginine HCl	200 mg

L-Histidine-HCl	200 mg
L-Leucine	1000 mg
L-Lysine HCl	300 mg
L-Methionine	200 mg
L-Phenylalanine	500 mg
L-Threonine	2000 mg
L-Tryptophan	200 mg
L-Tyrosine	300 mg
Uracil	200 mg

必要に応じ、Ura、Leu、His の一部または全部を除いた。

4-2-3 DNA の取り扱い

DNA 操作には大腸菌として *Escherichia coli* DH5 α 株または DB3.1 株を用いた。大腸菌は LB 培地にて 37°C で培養した [Sambrook and Russell, 2001]。培養に際して培地には kanamycin (Km; 終濃度 50 μ g/mL)、carbenicillin (Cb; 終濃度 50 μ g/mL)、ampicilin (Amp; 終濃度 50 μ g/mL)、gentamicin (Gm; 終濃度 7 μ g/mL)、chloramphenicol (Cm; 終濃度 30 μ g/mL) を必要に応じて添加した。プラスミドは LaboPassTM Plasmid Mini Plasmid DNA Purification Kit (cosmo GENETECH)、Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) または Wizard[®] Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) を用いて大腸菌より抽出した。DNA 断片は Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて抽出、精製した。操作は付属のプロトコールに従って行った。その他の DNA の取り扱いについては成書に従った [Sambrook and Russell, 2001]。

4-2-4 プラスミドの構築

プラスミドは、標準的な方法により構築した。PCR で増幅した断片はプラスミドにクローニングまたはサブクローニングした後シーケンス解析により配列を確認した。本章で使用したプラスミドは Table 3-1 に、クローニングに使用したプライマーは Table 3-2 に記載した。

pDESTHISi2-OsNOMT₁₀₀₀: *OsNOMT* 遺伝子の転写開始点上流 1 kb の領域を PCR で増幅し、BP 反応 (Gateway[®]) で pDONRGm P4-P1r (pDONR P4-P1r のカナマイシン耐性遺伝子をゲンタマイシン耐性遺伝子に置き換えたもの、産業技術総合研究所光田博士より譲渡) に組み込み、L4R1pENTR-*OsNOMT₁₀₀₀* を得た。続いて LR 反応 (Gateway[®]) により当該領域を R4L1pDEST-HISi2 [Mitsuda *et al.*, 2010] (Fig. 4-1A、産業技術総合研究所光田博士より譲渡) に組み込み、*pDESTHISi2-OsNOMT₁₀₀₀* を得た。

pUbi-OsIDL, *pUbi-OsIDEF1*, *pUbi-OsIDEF2*, *pUbi-ZHD6*, *pUbi-ZHD1*, *pUbi-ZHD2*, and *pUbi-NOMTVOZ*: そ

それぞれの遺伝子の CDS を PCR で増幅し、pENTR/D-TOPO に組み込んだものを産業技術総合研究所光田博士より譲渡頂いた。LR 反応により CDS を pUbi-RfA-Tnos [Chujo *et al.*, 2014] に組み込み、エフェクタープラスミドを得た。

4-2-5 Yeast one-hybrid screening

Yeast one-hybrid screening には、産業技術総合研究所より提供しているイネ転写因子ライブラリーを用いた [Mitsuda *et al.*, unpublished]。詳細を下記に示す。

cDNA library: イネ転写因子をコードする cDNA のみで構成されるライブラリー。1 個につきイネ転写因子の CDS の cDNA が 2-5 種類組み込まれた 310 個のライブラリーからなり、合計 1128 個の転写因子をカバーする。機能や配列が類似している転写因子の一部は含まれていないためイネの転写因子全てをカバーしているわけではないが、homology search を行うことにより全ての転写因子をカバーできる。

prey vector:

1st screening 用ベクターとして、pGAD424 [Bartel *et al.*, 1993] をもとに構築された pDEST-GAD424 [Mitsuda *et al.*, 2010] (Fig. 4-1B) に、LR 反応 (Gateway®) により上記の cDNA ライブラリーを組み込んだプラスミドを用いた。それぞれのライブラリーは個別に分けた状態で形質転換に用いた。2nd screening 用ベクターとして、pDEST-GAD424 に特定の CDS の cDNA を組み込んだプラスミドを用いた。

bait vector: ヒスチジン生合成遺伝子 *HIS3* の上流に、*OsNOMT* の転写開始点 1 kb および *HIS3* minimal promoter を連結したもの (pDESTHISi2-*OsNOMT*₁₀₀₀) を用いた。

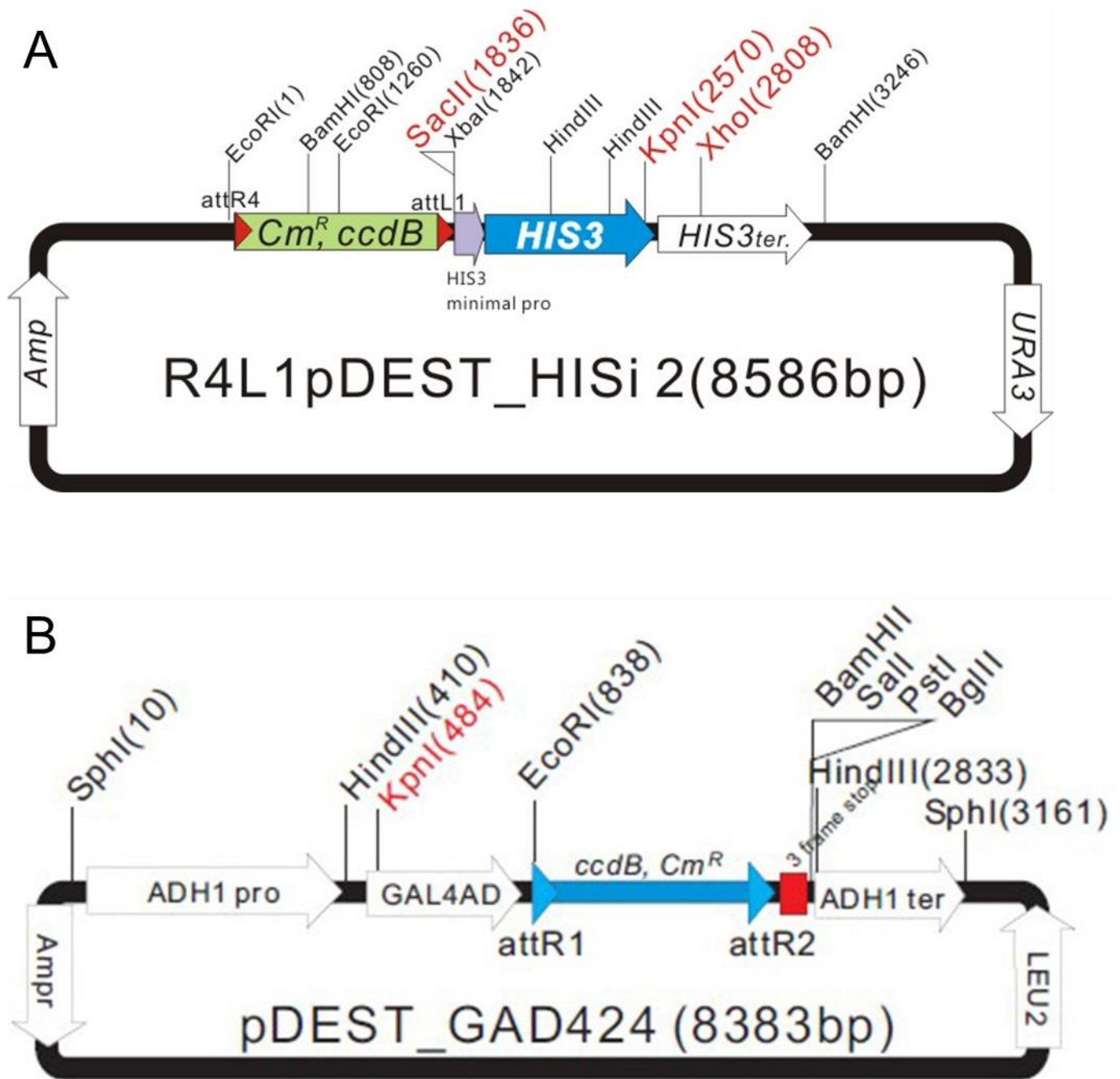


Figure 4-1 クローニング用ベクター

R4L1pDEST-HISi2 (A)および pDEST-GAD424 (B) のベクターマップ。Mitsuda *et al.* (2010) の Fig. 1B および 1D を一部改変して引用した。att 配列間で組み換えを行い、OsNOMT の転写開始点上流 1 kb の領域 (A) およびイネ転写因子の CDS (B) を導入した。

Screening は、以下の手順で行った。なお、酵母を用いた実験は全て産業技術総合研究所、光田展隆博士らと共同で行った。

調製した試薬類

キャリア DNA (Yeastmaker carrier DNA [Clontech], 10 µg/µL)

使用前に 95°C で 20 分間加熱して熱変性させ、その後すぐに 3 分以上氷上に置いて急冷した。

10xTE

EDTA 10 mM

Tris base 100 mM

塩酸で pH を 7.5 に調整し、オートクレーブした。

10xLiAc (/L)

酢酸リチウム 1 M

酢酸で pH を 7.5 に調整し、オートクレーブした。

50% PEG (polyethylene glycol)

100 mL の水に対し 100 g の Fluka Poly (ethylene glycol) 4000 を加えて溶解し、オートクレーブした。

1xTE buffer (/L)

10xTE 100 mL

dH₂O 900 mL

TE-LiAc buffer (/L)

10xTE 100 mL

10xLiAc 100 mL

dH₂O 800 mL

PEG-LiAc solution (/L)

10xTE 100 mL

10xLiAc 100 mL

50% PEG 800 mL

0.1% Agar (L)

Agar 1 g
dH₂O up to 1 L

調製後、オートクレーブした。

DMSO

標的配列の酵母ゲノムへの組み込み

まず YPD 平板培地に酵母を植菌し、数日間培養した。形質転換の前日、十分生育した酵母のコロニーを爪楊枝で YPD 培地 2 mL に植菌し、一晚 170 rpm で振盪培養した。また、bait プラスミド 1 µg を *ApaI* で処理し、一カ所切断することで直線状にしておいた。

形質転換当日、以下の方法で形質転換を行い、直線状にしたプラスミドを用いて酵母を形質転換した。また、ネガティブコントロールとして直線状にしていない bait プラスミド 1 µg を用いた形質転換も同時に行った。

・酵母の形質転換

- ① 液体培地で十分生育させた酵母を 1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
- ② 集菌した菌体を 1.8 mL の水に再懸濁し、1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
この作業を 2 回繰り返した。
- ③ ②の作業中、新しいチューブに予め 1 µg のプラスミド DNA と、熱変性させたキャリア DNA 100 µg を加えて氷上に置いた。
- ④ ②で洗菌した菌体を 120 µL の TE-LiAc Buffer に再懸濁し、そのうち 100 µL を③の DNA 溶液と混ぜた。
- ⑤ 600 µL の PEG-LiAc solution を加えてピペティングし、30°C で 30 分インキュベートした。
- ⑥ 70 µL の DMSO を添加し、すぐに転倒混和した後、42°C で 15 分ヒートショックを与えた。
- ⑦ 氷上で冷却し、5 分後に常温に移した。その後、1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
- ⑧ PEG を除去するため、集菌した菌体を 1.5 mL の 1xTE buffer に再懸濁し、1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清をピペットで捨てた。
- ⑨ 菌体を 120 µL の 1xTE buffer に再懸濁し、SD (-U) 平板培地に塗布した。
- ⑩ 平板培地をビニールテープで密閉し、30°C で 3 日間インキュベートした。
- ⑪ 出現したコロニーを全て白金耳で YPD 平板培地に植え継ぎ、30°C でさらに培養した。
植え継ぐ際、各コロニー由来の酵母が混ざらないようにした。以下このプレートを「オリジナルプレート」と呼び、3-AT 試験や screening の際最初の培養はこのオリジナルプレートのコロニーから植菌することで行った。

Screening に用いる酵母菌体および培地に添加する 3-AT 濃度の決定

「標的配列の酵母ゲノムへの組み込み」で述べた形質転換により標的配列が組み込まれた酵母について、YPD 平板培地で 3 日間生育した菌体のうち 12 コロニー由来の菌体を選択し、それぞれオリジナルプレートから YPD 培地 2 mL に爪楊枝で植菌して 16-17 時間 170 rpm で振盪培養した。十分に生育が見られた菌液から 8 コロニー分を選択してナンバリングし、pDEST-GAD424 (空の prey ベクター) を用いて以下の方法で形質転換を行った。

・酵母の形質転換

- ① 液体培地で十分生育させた酵母を 1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
- ② 集菌した菌体を 1.8 mL の水に再懸濁し、1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
この作業を 2 回繰り返した。
- ③ ②の作業中、新しいチューブに予め 2.5 µg のプラスミド DNA と、熱変性させたキャリア DNA 150 µg を加えて氷上に置いた。
- ④ ②で洗菌した菌体を適量 (500-600 µL) の TE-LiAc Buffer に再懸濁し、OD₆₀₀ の値が 0.3-0.52 (望ましくは 0.4-0.5) になるように調整した。そのうち 220 µL を③の DNA 溶液と混ぜた。
- ⑤ 1.3 mL の PEG-LiAc solution を加えてピペティングし、30°C で 30 分インキュベートした。
- ⑥ 158 µL の DMSO を添加し、すぐに転倒混和した後、42°C で 15 分ヒートショックを与えた。
- ⑦ 氷上で冷却し、5 分後に常温に移した。その後、1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
- ⑧ PEG を除去するため、集菌した菌体を 1.5 mL の 1xTE buffer に再懸濁し、1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清をピペットで捨てた。
- ⑨ 菌体を 300 µL の 0.1% Agar に再懸濁し、その溶液 50 µL を 200µL の 0.1% Agar で希釈した。
そのままの酵母液および希釈した酵母液を 8 µL ずつ、SD (-ULH) に 3-AT を様々な濃度で添加した (終濃度 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 mM) 平板培地にスポットした。ポジティブコントロールとして、SD (-L) 培地にも酵母液をスポットした。
- ⑩ 平板培地をビニールテープで密閉し、30°C で 10 日間インキュベートした。

10 日後に結果を観察し、screening に用いる平板培地の 3-AT 濃度を決定した。また、元々のコロニーが異なると 3-AT による生育阻害の程度も異なるため、最適なコロニーを選択して screening に用いた。

1st screening 用 cDNA ライブラリープレートの準備

310 種類のライブラリープラスミドを各 100 ng/µL となるように濃度を合わせ、96 穴プレートに分注した。96 穴プレートの各ウェルにはプラスミド溶液 4 µL (プラスミド 400 ng 分) と水 4 µL を添加した。分注が

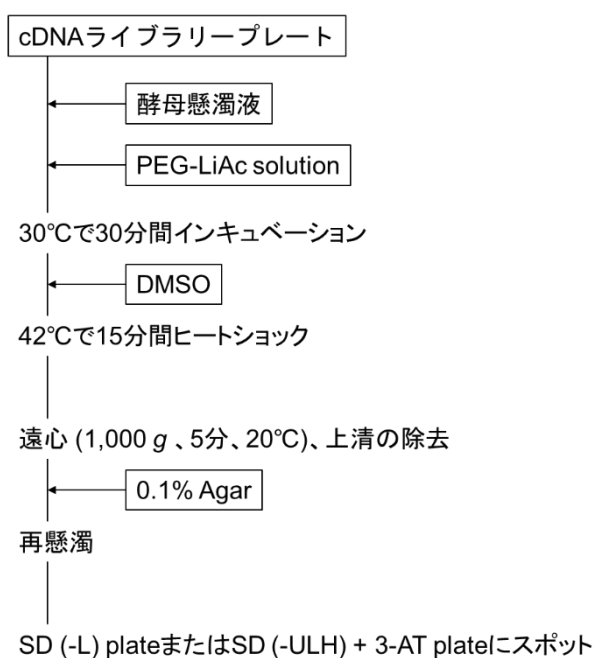
完了したライブラリープレートをパラフィルムで密封し、使用まで-20°Cで保存した。

1st screening

「Screening に用いる酵母菌体および培地に添加する 3-AT 濃度の決定」で選抜したコロニーについて、オリジナルプレートから YPD 培地 3 mL に爪楊枝で植菌して 24 時間 170 rpm で振盪培養した。このとき、酵母が増殖しすぎないように植菌量を少量にした。24 時間後、酵母の菌体量をマクファーランド比濁法により定量し、本培養で酵母が増殖しすぎないように植え継ぐ量を決めた。その後、適量 (350 μ L) を YPD 培地 300 mL に植菌し、170 rpm で 16 時間振盪培養した。培養後、以下の手順で 1st screening を行った。なお、酵母の形質転換および形質転換酵母液のスポンティングは Freedom EVO100 (Tecan, Switzerland) を用いて以下の要領で行った。形質転換後の酵母は、SD (-ULH) に 3-AT を終濃度 2, 3, 7.5 mM となるように添加した平板培地、または SD (-L) 平板培地にスポットした。

- ① 酵母を 1,000 g で 5 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
- ② 集菌した菌体を 50 mL の水に再懸濁し、1,000 g で 5 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
- ③ ②の作業中、予め準備しておいた cDNA ライブラリープレートを 2,700 g で 1 分、20°C で遠心し、その後パラフィルムを外して Freedom EVO100 にセットした。また、80 mL の PEG-LiAc solution を入れたリザーバーと 80 mL の DMSO を入れたリザーバー、および 90 mL の 0.1% Agar を入れたリザーバーも Freedom EVO100 にセットした。
- ④ ②で洗菌した菌体を 50 mL の TE-LiAc buffer に再懸濁し、1,000 g で 5 分、20°C で遠心して上清を捨てた。集めた菌体を、OD₆₀₀ の値が 0.35-0.7 (望ましくは 0.45-0.65) になるように適量 (約 17.5 mL、30 mL を超えたら培養を最初からやり直す) の TE-LiAc buffer に再懸濁した。
- ⑤ 酵母懸濁液 17.5 mL に、熱変性させたキャリア DNA を 3.2 mg 加えて攪拌した。
- ⑥ ⑤の酵母懸濁液を 96 穴ディープウェルに 140-170 μ L ずつ分注し、Freedom EVO100 にセットした。分注作業は、酵母が沈殿しないうちに手早く行った。
- ⑦ Freedom EVO100 に用いて、310 個の cDNA ライブラリーについて別々に形質転換を行った。

流れは以下の通りである。



- ⑧ 液滴がなくなるまで平板培地を乾燥させた後、ビニールテープで密閉し 30°C で 8 日間インキュベートして結果を観察した。

2nd screening 用 prey vector プレートの準備

1st screening で選抜された cDNA ライブラリーについて、含まれる遺伝子が一つ一つ組み込まれたプラスミドを各 100 ng/μL となるように濃度を合わせ、2 μL (プラスミド 200 ng 分) ずつ 96 穴プレートに分注した。

2nd screening

「Screening に用いる酵母菌体および培地に添加する 3-AT 濃度の決定」で選抜したコロニーについて、オリジナルプレートから YPD 培地 2 mL に爪楊枝で植菌して 24 時間 170 rpm で振盪培養した。このとき、酵母が増殖しすぎないように植菌量を少量にした。24 時間後、適量 (50 μL) を YPD 培地 30 mL に植菌し、170 rpm で 20 時間振盪培養した。培養後、以下の手順で 2nd screening を行った。酵母の形質転換は以下の要領で行い、形質転換後の酵母は SD (-ULH) に 3-AT を終濃度 2, 3, 7.5 mM となるように添加した平板培地、または SD (-L) 平板培地にスポットした。

- ① 酵母を 1,000 g で 5 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
- ② 集菌した菌体を 50 mL の水に再懸濁し、1,000 g で 5 分、20°C で遠心して上清を捨てた。
この作業を 2 回繰り返した。
- ③ ②の作業中、予め滅菌しておいた 96 穴ディープウェルに各ウェル 300 μL ずつ水を分注し、

チップ洗浄液とした。

- ④ ②で洗菌した菌体を 50 mL の TE-LiAc buffer に再懸濁し、1,000 g で 3 分、20°C で遠心して上清を捨てた。集めた菌体を、OD₆₀₀ の値が 0.4-0.74 (望ましくは 0.5-0.7) になるように適量 (約 1 mL) の TE-LiAc buffer に再懸濁した。この懸濁液に、熱変性させたキャリア DNA を 250 μg 加えて攪拌した。
- ⑤ ④の酵母懸濁液を 30 μL ずつ prey vector プレートの各ウェルに分注し、そこに 96 穴ピペッターで 150 μL の PEG-LiAc solution を加えてピペッティングし、30°C で 30 分インキュベートした。この間、PEG が固まることを防ぐために洗浄液を用いてチップを洗った。
- ⑥ 各ウェルに 20 μL の DMSO を添加しピペッティングした後、ハイブリオーブンに入れ 50 rpm で振盪させながら 42°C で 15 分ヒートショックを与えた。この間、洗浄液を用いてチップを洗った。
- ⑦ 氷上で冷却し、5 分後に常温に移した。その後、1,000 g で 5 分、20°C で遠心して 96 穴ピペッターで上清を捨てた。その後、洗浄液を用いてチップを洗った。
- ⑧ 0.1% Agar を 50 μL ずつ prey vector プレートの各ウェルに分注して懸濁し、8 μL ずつ SD (-ULH) に 3-AT を終濃度 2, 3, 7.5 mM となるように添加した平板培地、または SD (-L) 平板培地にスポットした。
- ⑨ 液滴がなくなるまで平板培地を乾燥させた後、ビニールテープで密閉し 30°C で 2 週間インキュベートして結果を観察した。

4-2-6 レポータージーンアッセイ

2-2-4 と同様の方法で行った。

4-2-7 統計解析

全てのデータは平均 ± 標準誤差で表した。有意差検定は両側検定、独立の Welch's *t*-test により行った。P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), または P < 0.001 (***) のとき、有意差があると定義した。

4-2-8 本章で扱った遺伝子の gene ID

RAP-DB の gene ID は以下の通りである。

NOMTVOZ (Os05g0515700), OsIDEF1 (Os08g0101000), OsIDEF2 (Os05g0426200), OsIDL (Os04g0676600), OsMYC2 (Os10g0575000), OsNOMT (Os12g0240900), OsUBQ (Os10g0542200), OsZHD1 (Os09g0466400), OsZHD2 (Os08g0479400), OsZHD6 (Os05g0579300).

Table 4-1 本章で使用したプラスミド

Vector	Relevant characteristics	Reference
pDONRGm P4-P1r	Gm ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , Gateway system donor vector	Invitrogen
L4R1pENTR-OsNOMT ₁₀₀₀	Km ^R , Gateway system entry vector containing 1-kb upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
R4L1pDEST-HISi2	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , Gateway-HIS3 minimal promoter- <i>HIS3 CDS-HIS3</i> terminator, <i>URA3</i> , originated from pHISi1 [Alexandre <i>et al.</i> , 1993]	Mitsuda <i>et al.</i> , 2010
pDESTHISi2-OsNOMT ₁₀₀₀	Amp ^R , R4L1pDEST-HISi2 containing 1-kb upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study
pDEST-GAD424	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , <i>ADHI</i> promoter-GAL4AD-Gateway- <i>ADHI</i> terminator, <i>LEU2</i> , originated from pGAD424 [Bartel <i>et al.</i> , 1993]	Mitsuda <i>et al.</i> , 2010
pUbi-RfA-Tnos	Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , pUCAP/Ubi-NT containing gateway cassette (RfA, invitrogen) cloned into <i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I sites after blunting	Chujo <i>et al.</i> , 2014
pUbi-RLUC	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>renilla luciferase</i> CDS	This study (第2章参照)
pZErO2	Km ^R , <i>ccdB</i> , cloning vector	Invitrogen
pZErO2-OsNOMT ₁₀₀₀	Km ^R pZErO2 containing 5' 1-kb upstream region of <i>OsNOMT</i>	This study (第2章参照)
pGL4-Tnos	Amp ^R , Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study (第2章参照)
pGL4-OsNOMT ₁₀₀₀	Amp ^R , 5' 1-kb upstream region of <i>OsNOMT</i> - Firefly <i>LUC-NOS</i> terminator	This study (第2章参照)
pENTR/D-TOPO	Km ^R , Gateway system entry vector	Invitrogen
pENTR-OsMYC2	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study (第2章参照)
pENTR-OsIDL	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsIDEF1-like (OsIDL)</i> CDS	This study
pENTR-OsIDEF1	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsIDEF1</i> CDS	This study
pENTR-OsIDEF2	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsIDEF2</i> CDS	This study
pENTR-OsZHD6	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>zinc finger-homeodomain protein (OsZHD) 6</i> CDS	This study
pENTR-OsZHD1	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsZHD1</i> CDS	This study
pENTR-OsZHD2	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>OsZHD2</i> CDS	This study
pENTR-NOMTVOZ	Km ^R , pENTR/D-TOPO containing <i>NOMTVOZ</i> CDS	This study
pUbi-GUS	Amp ^R , pUbi_RfA containing 1.8 kb <i>GUS</i> fragment from pENTR-GUS	Chujo <i>et al.</i> , 2014
pUbi-OsMYC2	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsMYC2</i> CDS	This study (第2章参照)
pUbi-OsIDL	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsIDL</i> CDS	This study
pUbi-OsIDEF1	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsIDEF1</i> CDS	This study
pUbi-OsIDEF2	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsIDEF2</i> CDS	This study
pUbi-OsZHD6	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsZHD6</i> CDS	This study
pUbi-OsZHD1	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsZHD1</i> CDS	This study
pUbi-OsZHD2	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>OsZHD2</i> CDS	This study
pUbi-NOMTVOZ	Amp ^R , pUbi-RfA-Tnos containing <i>NOMTVOZ</i> CDS	This study

Table 4-2 ベクター構築に使用したプライマー

Primer	Sequence
OsNOMT ₁₀₀₀ BP Fw	5'-GGGGACAACCTTGTATAGAAAAGTTGATAATTCTCCCATATATGTAGACAGTTTC-3'
OsNOMT ₁₀₀₀ BP Rv	5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGGCTACTATACGGGGACACTG-3'

BP クローニングにあたり付加した配列は陰影で示した。

4-3 結果

4-3-1 Screening に用いる *OsNOMT* 上流域の決定

OsNOMT プロモーターを直接制御する転写因子を探索するにあたり、まず標的とする *OsNOMT* 転写開始点上流域の長さを決定した。一般的に、yeast one-hybrid assay においてはシグナル/ノイズ比 (S/N 比) を高め偽陽性を減らすために 20 bp 程の短い領域をタンデムに複数連結した配列を bait とすることが多い。一方、S/N 比はライブラリーの質にも依存し、ライブラリーの質が高ければより長い領域を用いることができる。例えば、シロイヌナズナの転写因子のみで構成された cDNA ライブラリーを用いた yeast one-hybrid screening では 500 bp の領域を bait とした試行でポジティブクローンが得られている [Mitsuda *et al.*, 2010]。しかし、無制限に長い領域を用いることができるわけではなく、領域の長さの上限は酵母の転写機構に依存する。先行研究により、酵母では TATA box よりおよそ 800 bp 以上離れた領域から遺伝子の転写制御を行うことはできないことが明らかになっているため [Dobi and Winston, 2007]、標的配列を 1 kb 以上に長くすることは推奨されない。

前章で述べた通り、*OsNOMT* の転写開始点上流 1 kb の領域を用い OsMYC2 をエフェクターとしたデリベーションアッセイを行ったが、*OsNOMT* の転写活性化に重要な領域を絞り込むことはできなかった (Figs. 2-7 and 2-8)。一方、本実験ではイネの転写因子のみで構成された cDNA を用いるため、長い領域を bait として用いることができると考えられた。

以上の背景より、yeast one-hybrid screening においてはより多くの候補を取得するため、最大限広い範囲である *OsNOMT* 転写開始点上流 1 kb の配列を bait として用いることにした。

4-3-2 Yeast one-hybrid screening に用いる菌体および培地に添加する 3-AT 濃度の決定

本章で行う yeast one-hybrid screening で用いる bait ベクターは、ヒスチジン生合成遺伝子 *HIS3* の上流に bait 配列を連結したものであり (Fig. 4-1A)、そこに転写活性化能を有する prey タンパク質が結合した場合のみヒスチジンが生合成される。この性質を利用し、ヒスチジン要求性の YM4271 株をヒスチジン欠乏培地で生育することで screening を行うことにした。しかし、prey タンパク質がない状態でも *HIS3* 遺伝子が発現しヒスチジン欠乏培地でも酵母が生育することがあるため、まず *HIS3* 遺伝子産物の競合阻害剤である 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) をさまざまな濃度で培地に添加し生育を観察した。形質転換は、既に bait 配列がゲノムに組み込まれた酵母に、ロイシン生合成遺伝子をコードする空の pDEST-GAD424 ベクターを導入することで行った。このとき、8 コロニー分を選択して試験を行い、状態の良いコロニーを screening に用いることにした。

はじめにロイシンのみを欠乏させた SD (-L) 培地で酵母を生育させた結果、全てのコロニーで旺盛な生育が認められ (Fig. 4-2, left, top)、形質転換に問題がないことが確認された。次に、ヒスチジンなど 3 種類のアミノ酸を欠乏させた培地 (SD (-ULH)) で酵母を生育させた結果、SD (-L) 培地上とほぼ変わらず旺盛に生育をしており (Fig. 4-2, right, top)、3-AT による生育の抑制が必須であることが確認された。そ

ここで、0.05 mM から 100 mM まで 23 段階に分け SD (-ULH) 培地に 3-AT を添加した培地で酵母を生育させた結果、3-AT を 2 mM 含む培地では生育がまだ認められるものの 3-AT を含まない培地と比較して大幅に抑制され (Fig. 4-2, left, middle)、3 mM 含む培地ではさらに生育が抑制された (Fig. 4-2, right, middle)。この段階では、コロニーによってはまだ旺盛な生育が認められたが (Fig. 4-2、コロニー8)、3-AT を 7.5 mM まで増やすとほぼ同等に生育が抑制され (Fig. 4-2, left, bottom)、100 mM 添加すると全く生育しなかった (Fig. 4-2, right, bottom)。

以上の結果から、screening は SD (-ULH) に 3-AT をそれぞれ 2, 3, 7.5 mM 添加した培地の 3 種類を用いて行うことにした。また、コロニー3 や 8 のように 3-AT による抑制が弱いものは使用せず、コロニー6 に由来する酵母を形質転換して用いることにした。

4-3-3 *OsNOMT* プロモーターに直接結合する候補因子の探索-1st screening

310 個の cDNA ライブラリー、合計 1128 個の転写因子を prey とし、*OsNOMT* プロモーターを直接制御する転写因子を探索した。形質転換 8 日後にプレートを観察した結果、6 個のライブラリーについて 3-AT を加えた SD (-ULH) 培地上での生育が認められた (Figs. 4-3 and 4-4, Table 4-3)。そこで、これら 20 個の転写因子を一つ一つ pDEST-GAD424 に組み込んだベクターを用いて 2nd screening を行うことにした。

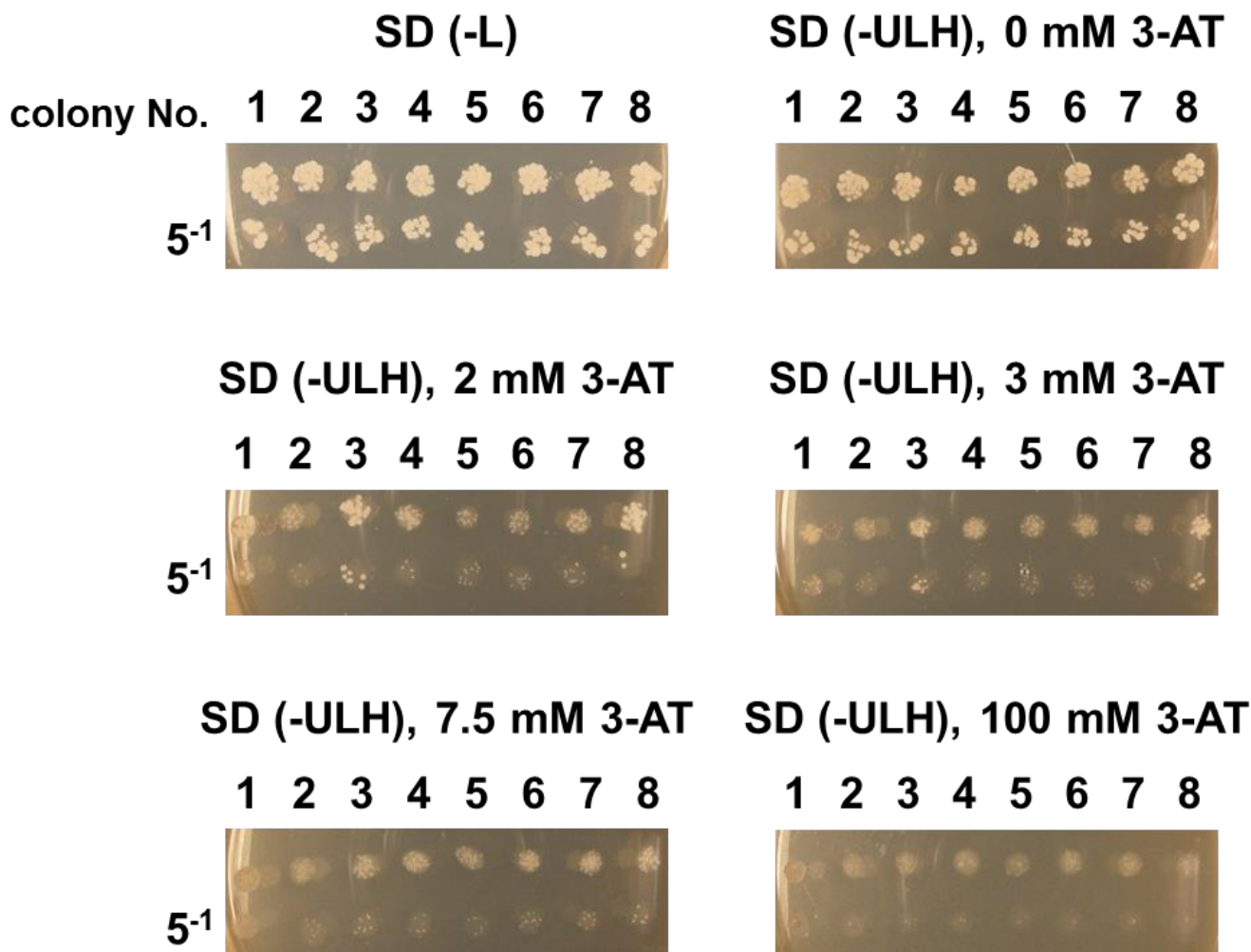


Figure 4-2 3-AT を含む培地における酵母の生育

オリジナルプレートから 8 個のコロニーを選び形質転換に用いた (colony No. 1-8)。写真は形質転換 10 日後の生育状況を示す。形質転換後の酵母液はそのまま (上段)、あるいは 5 倍希釈して (下段、5⁻¹) 培地上に 8 μL ずつスポットした。ポジティブコントロールとして、ヒスチジンを含む培地上にも酵母をスポットし、生育を観察した (left, top)。3-AT を含む培地で生育した酵母について、24 段階の 3-AT 濃度から代表的な 5 種類の濃度を選択し、示している。

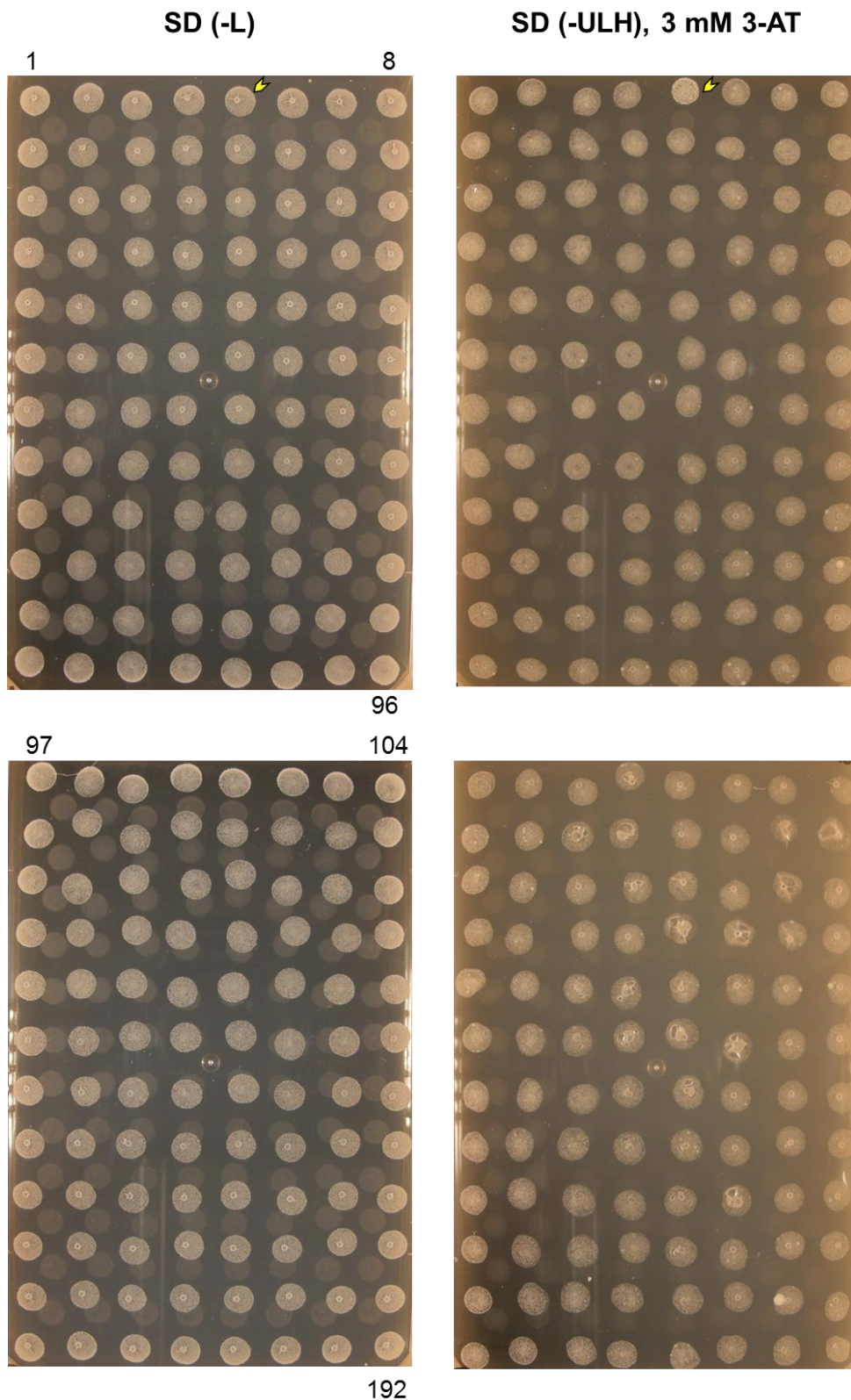


Figure 4-3 それぞれのライブラリーで形質転換した酵母の生育 (1st screening)

数字はライブラリーナンバー、写真は形質転換 8 日後の生育状況を示す。ここでは代表的な結果として、3 mM の 3-AT を添加した SD (-ULH) 平板培地上で生育させた酵母を示した (right panels)。ポジティブコントロールとして、ヒスチジンを含む平板培地上で生育させた酵母を示した (left panels)。黄色の矢印は、3-AT を添加した SD (-ULH) 平板培地上で生育が見られたスポットを表す。

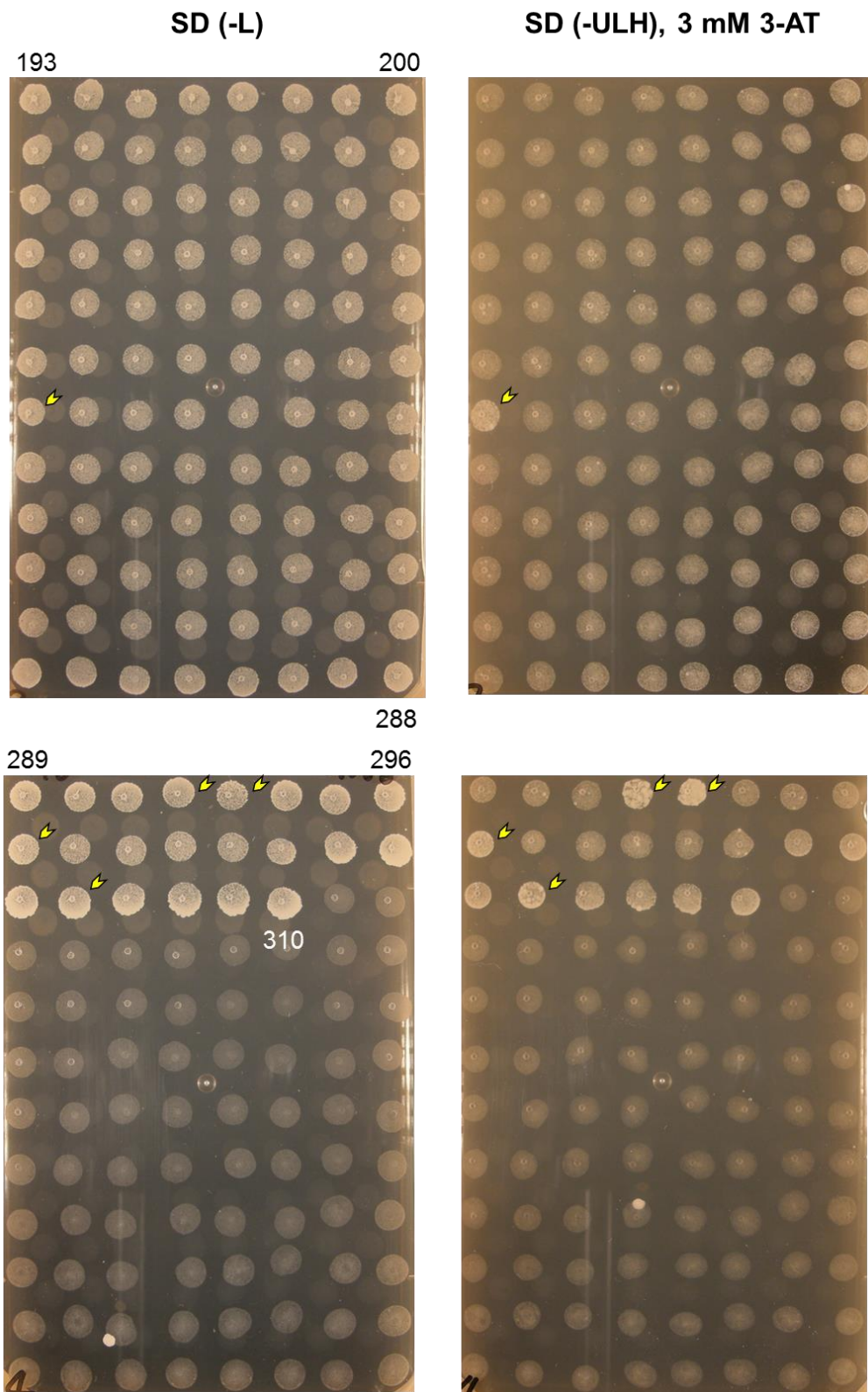


Figure 4-3 (続き)

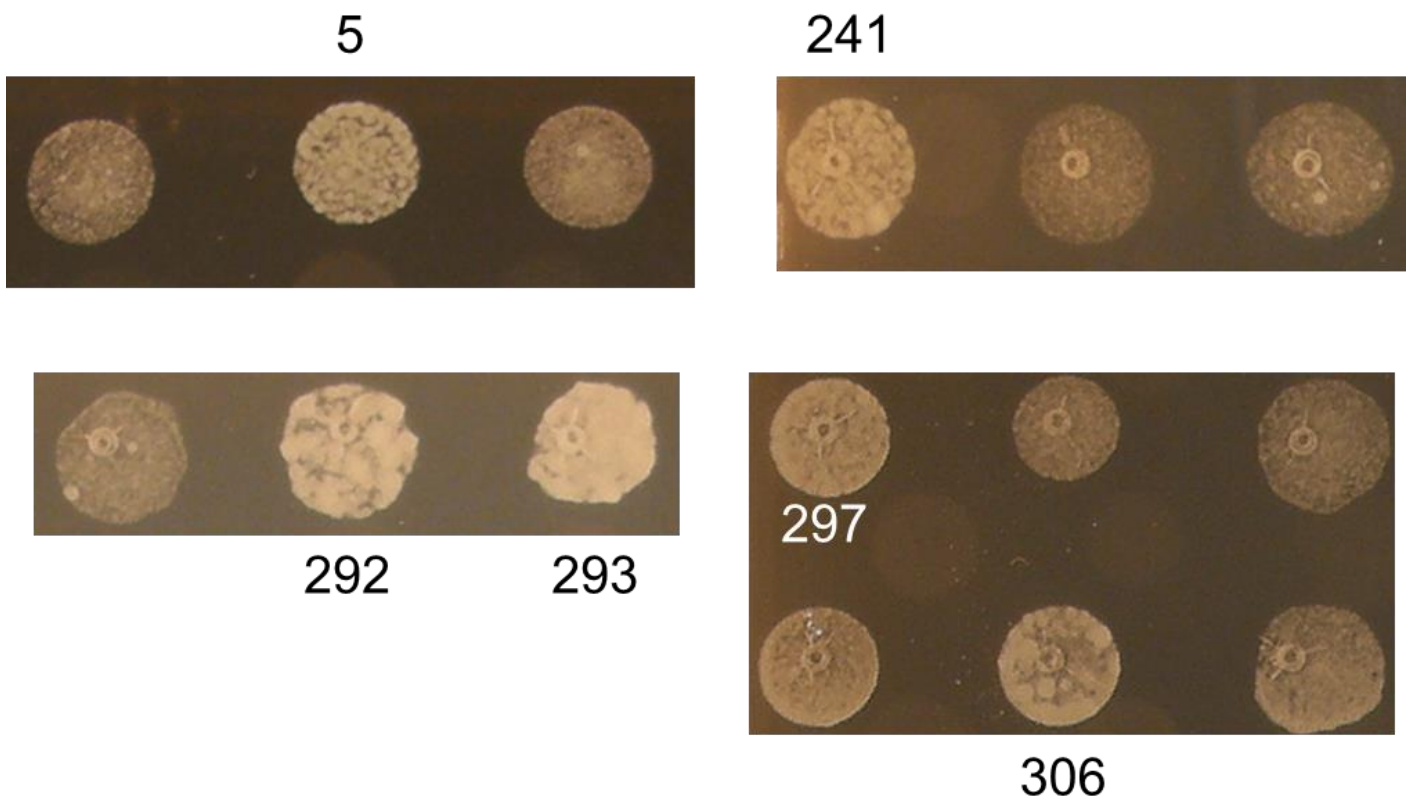


Figure 4-4 1st screening で得られたポジティブクローンの拡大図

Figure 4-3 より、3 mM の 3-AT を添加した SD (-ULH) 平板培地上について、酵母の生育が見られたスポットおよびその周辺を拡大した。

Table 4-3 1st screeningで選抜された6個のライブラリーおよびそこに含まれる転写因子

Library No.	Full-length cDNA	RAP-DB Locus	Family
5	AK072874	Os04g0676600	ABI3 VP1
	AK105441	Os01g0911700	ABI3 VP1
	AK107456	Os08g0101000	ABI3 VP1
241	AK068153		NAM
	AK099540	Os05g0426200	NAM
	AK102808	Os01g0261200	NAM
292	AK058840	Os09g0414500	zf-HD
	AK063715	Os11g0128300	zf-HD
	AK111350	Os05g0579300	zf-HD
293	AK069500	Os09g0414600	zf-HD
	AK108246	Os09g0466400	zf-HD
	AK109528	Os08g0479400	zf-HD
297	AK063035	Os07g0185800	Myc
	AK074022	Os09g0134500	PcG
	AK243085	Os10g0324900	PcG
	AK288082	Os10g0575000	Myc
306	AK071049	Os04g0218900	TRAF
	AK071835	Os06g0529800	UBR1
	AK064375	Os01g0780800	ULT SAND
	AK069076	Os05g0515700	VOZ-9

4-3-4 *OsNOMT* プロモーターに直接結合する候補因子の探索-2nd screening

1st screening で選抜された cDNA ライブラリーについて、含まれる遺伝子が一つ一つ組み込まれた pDEST-GAD424 により形質転換を行い、最終的に *OsNOMT* 転写開始点に結合する転写因子候補を選抜した。形質転換 8 日後にプレートを観察した結果、それぞれのライブラリーから最低 1 個、合計 8 個の転写因子について、3-AT を加えた SD (-ULH) 培地上での生育が認められた (Fig. 4-5, Table 4-4)。「4-2-4 Yeast one-hybrid screening」でも述べたが、本章で yeast one-hybrid screening を行うために使用した cDNA ライブラリーはイネの転写因子全てをカバーしているわけではないが、homology search を行うことにより全ての転写因子をカバーできる。そこで、得られた 8 個の候補について homology search を行うことで候補転写因子を増やすことを試みたが、結果として新しい候補は得られなかった。よって、得られた 8 個の転写因子を最終的な候補転写因子とした。候補の中には、第 2 章で解析した OsMYC2 や、鉄欠乏応答に関与する Iron deficiency-responsive *cis*-acting element binding factor (IDEF) である OsIDEF1 [Kobayashi *et al.*, 2009] および OsIDEF2 [Ogo *et al.*, 2008]、および C₃ 植物、C₄ 植物を含む多くの植物が有する zinc finger- homeodomain protein (ZHD) [Hu *et al.*, 2008] が含まれていた。OsIDEF1 は ABI3/VP1 ファミリーに分類され、OsIDEF2 は NAC ファミリーに分類される。

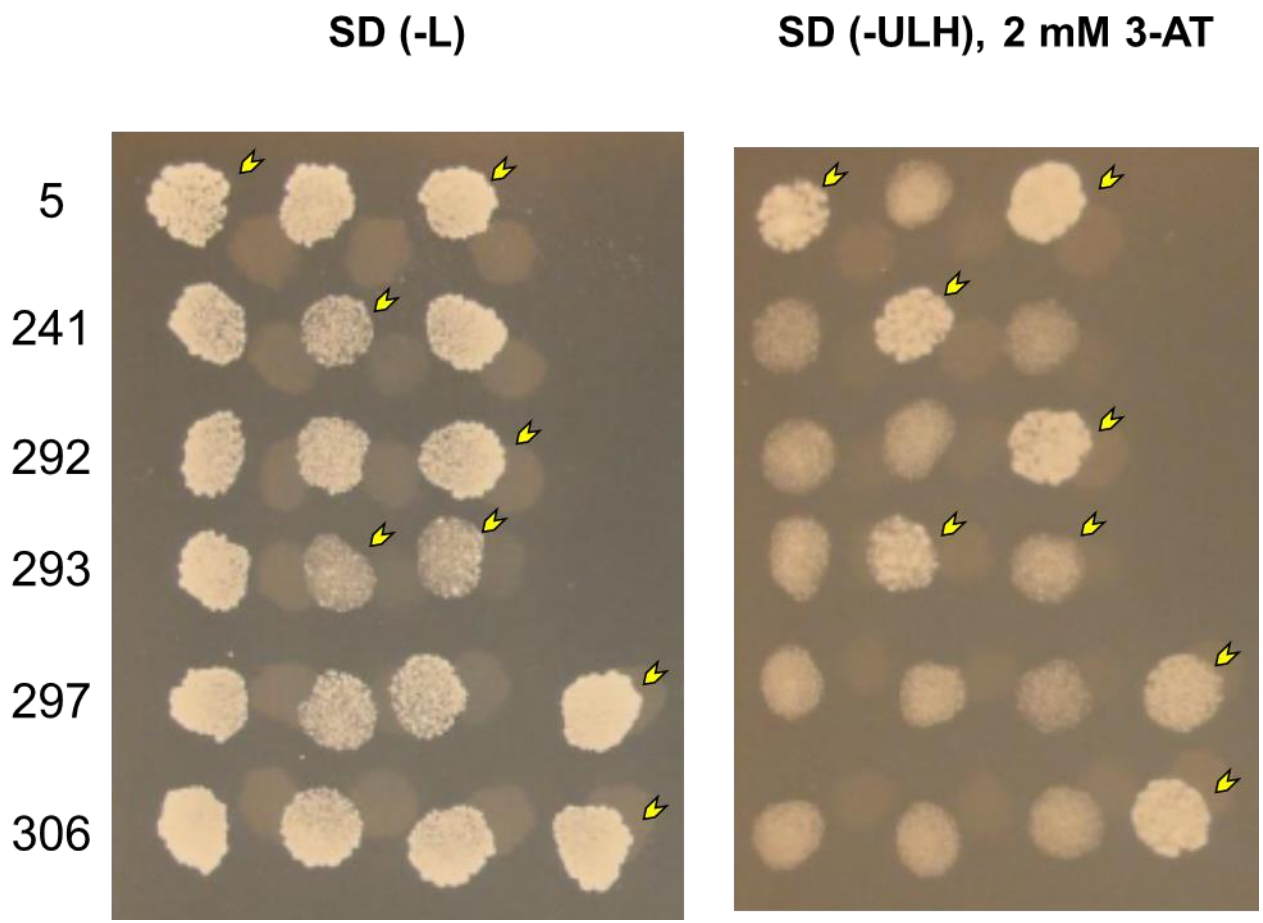


Figure 4-5 それぞれのライブラリーで形質転換した酵母の生育 (2nd screening)

左側の数字はライブラリーナンバー、写真は形質転換 8 日後の生育状況を示す。ここでは代表的な結果として、2 mM の 3-AT を添加した SD (-ULH) 平板培地上で生育させた酵母を示した (right panels)。ポジティブコントロールとして、ヒスチジンを含む平板培地上で生育させた酵母を示した (left panels)。黄色の矢印は、3-AT を添加した SD (-ULH) 平板培地上で生育が見られたスポットを表す。

Table 4-4 *OsNOMT*プロモーターに結合し発現を制御する転写因子の候補

Gene	Protein	Designation	Temporary name	Reference	Remarks
Os04g0676600	ABI3_VP1		IDL (IDEF1-like)		
Os08g0101000	ABI3_VP1	OsIDEF1		Kobayashi <i>et al.</i> , 2009	Response to iron deficiency
Os05g0426200	NAM	OsIDEF2		Ogo <i>et al.</i> , 2008	Response to iron deficiency
Os05g0579300	zf-HD	OsZHD6		Hu <i>et al.</i> , 2008	
Os09g0466400	zf-HD	OsZHD1		Hu <i>et al.</i> , 2008	
Os08g0479400	zf-HD	OsZHD2		Hu <i>et al.</i> , 2008	
Os10g0575000	Myc	OsMYC2		Cai <i>et al.</i> , 2014	Homolog of AtMYC2, a mediator of JA signaling
Os05g0515700	VOZ-9		NOMTVOZ		

4-3-5 Yeast one-hybrid screening で選抜された転写因子が *OsNOMT* 転写開始点上流に与える影響の解析

Yeast one-hybrid screening で得られた転写因子について、実際に *OsNOMT* プロモーターに与える影響を解析するため、*OsNOMT* の転写開始点 1 kb を用いたレポータージーンアッセイを行った。先行実験として、*OsNOMT* の転写開始点を導入しない解析を行ったところ、わずかではあるが OsIDEF2 がプロモーター非依存的にレポーターを活性化していた。そのほかの因子はレポーター活性に影響を与えなかった (Fig. 4-6)。次に、*OsNOMT* の転写開始点上流 1 kb をプロモーター領域として導入した結果、OsMYC2 のほか OsIDEF2 がレポーター活性を上昇させていた。先述の通り、OsIDEF2 はプロモーター非依存的にもレポーターを活性化してはいたが、GUS をエフェクターとした試行と比較すると、*OsNOMT* の転写開始点上流の導入によりレポーター活性の上昇幅が大きくなっていった。よって、プロモーター依存的な活性化が存在すると思われた。一方で、OsMYC2 と比較すると活性の上昇は小さいものに留まった。ほかの転写因子については、大きな影響は与えているものは見られなかった (Fig. 4-7)。

エフェクターを単独で導入した場合、yeast one-hybrid screening で得られた転写因子のうち *OsNOMT* のプロモーター活性に影響を及ぼしたのは OsIDEF2、および第 2 章で述べた OsMYC2 のみであった (Fig. 4-7)。しかし、OsMYL1 および OsMYL2 がそうであったように、他の因子と相互作用して初めて *OsNOMT* のプロモーター活性に影響を与える転写因子が存在する可能性が考えられた。そこで、OsMYC2 を含む 2 種類の転写因子候補をエフェクターとして共導入した。その結果、OsMYC2 と OsIDEF2 を共導入すると、OsMYC2 を単独で導入した場合と比較してレポーターの活性化が顕著に上昇した。他 6 個の転写因子については、OsMYC2 と協調的あるいは拮抗的にレポーター活性を制御するものは見られなかった (Fig. 4-8)。*OsNOMT* プロモーター活性の上昇幅を鑑みると、OsMYC2 と OsIDEF2 が相乗的に *OsNOMT* プロモーターを活性化していることが示唆された。

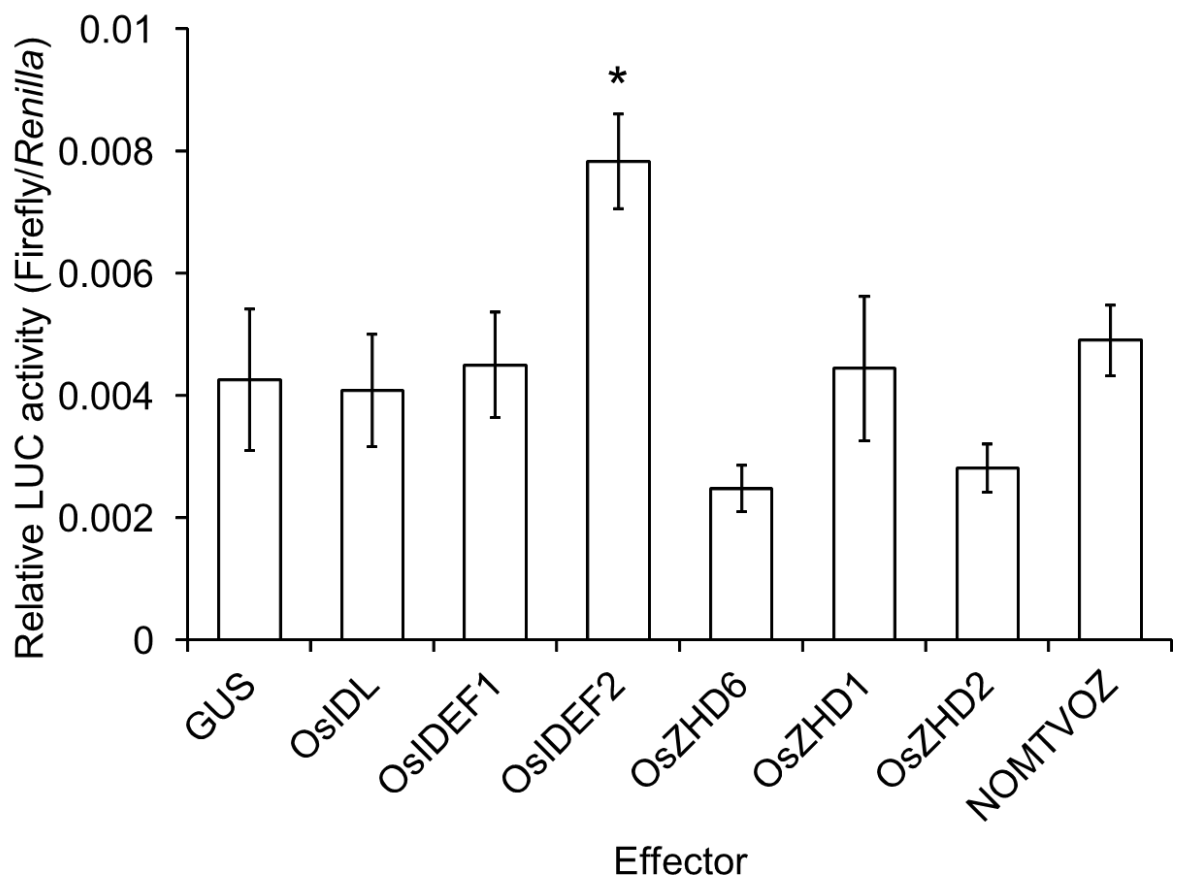


Figure 4-6 *OsNOMT* 転写開始点上流域に依存しない転写制御因子候補のレポーター活性への影響

LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 4) ± 標準誤差で表した。有意差検定は GUS をエフェクターとしたときの試行と比較して行った (*P < 0.05)。

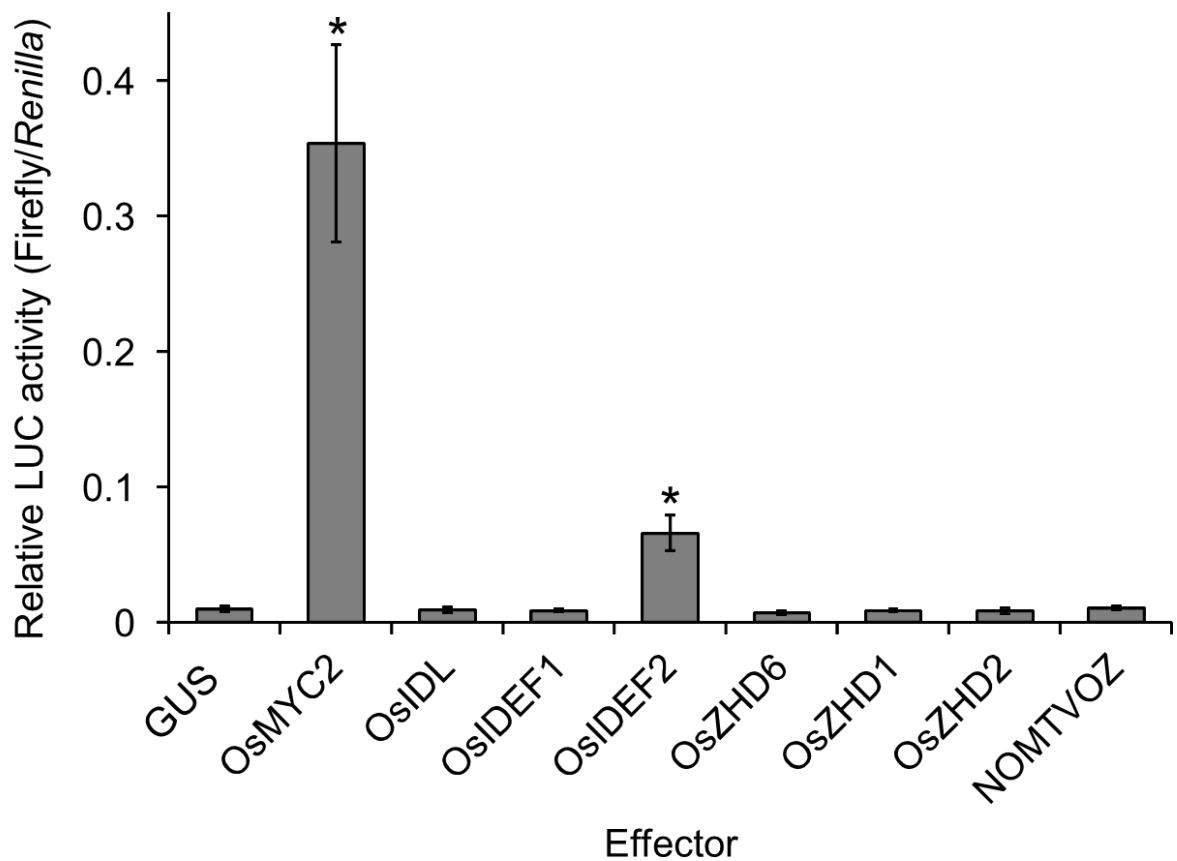


Figure 4-7 *OsNOMT* 転写開始点上流域 1 kb に対する転写制御因子候補の影響

LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 4) ± 標準誤差で表した。有意差検定は GUS をエフェクターとしたときの試行と比較して行った (*P < 0.05)。

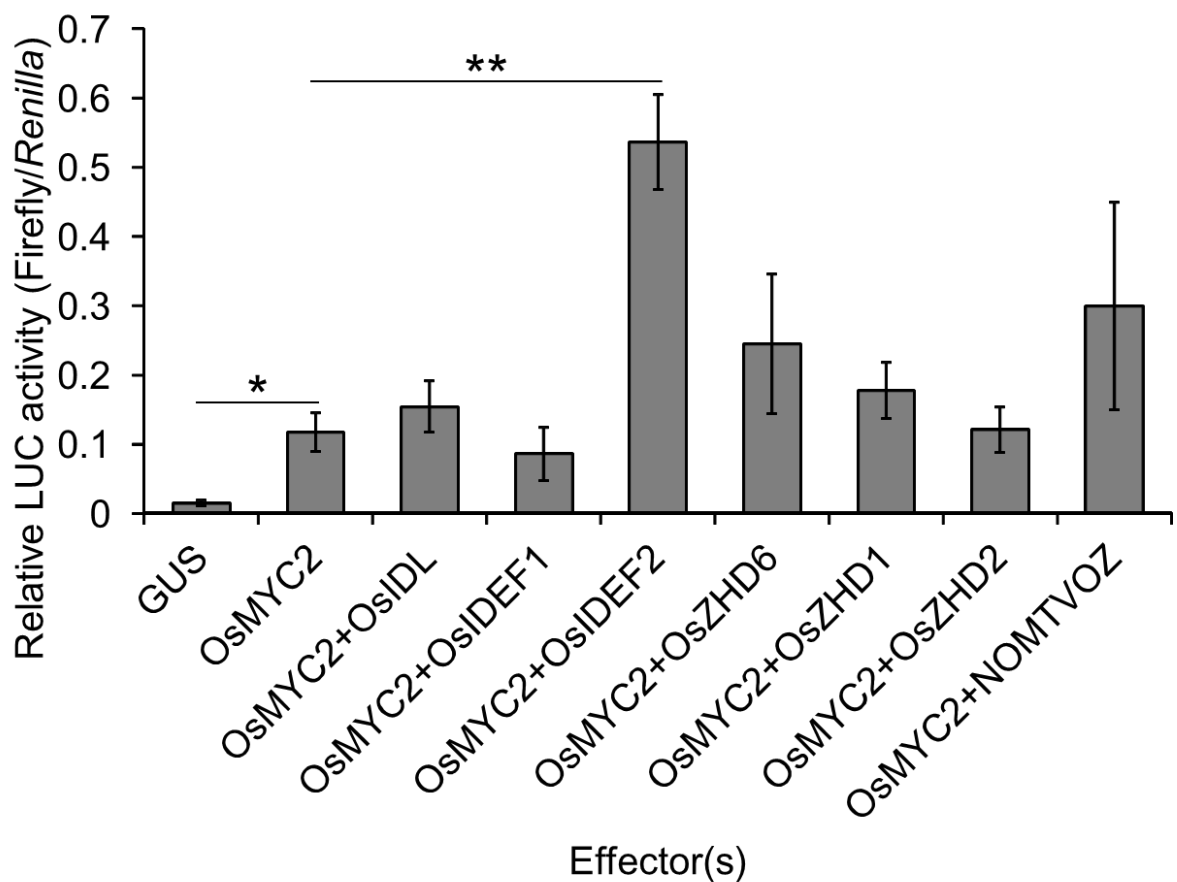


Figure 4-8 OsMYC2 との共導入による転写制御因子候補の *OsNOMT* 転写開始点上流域 1 kb への影響
 LUC 活性の相対値を示す。データはインターナルスタンダード (Renilla luciferase) のシグナル値で標準化したものを平均 (n = 4) ± 標準誤差で表した。*P < 0.05、** P < 0.01。

4-4 考察

本章では、yeast one-hybrid screening により *OsNOMT* プロモーターを直接制御する転写因子を探索し、そこで選抜された *OsMYC2* と *OsIDEF2* が協調的に *OsNOMT* プロモーターを活性化することを示した。

本研究では *OsNOMT* のプロモーター活性に影響を与えていなかったが、鉄欠乏時に *OsIDEF1* が JA シグナルを活性化することが報告されている [Kobayashi *et al.*, 2016]。 *OsIDEF1* は ABI3/VP1 型転写因子であり、NAC 型転写因子の *OsIDEF2* とは配列が大きく異なっている。しかし、*OsIDEF2* と同じく鉄欠乏応答性である *OsIDEF2* も JA シグナルを制御し、その過程で *OsNOMT* のプロモーター活性を制御していることが予想される。

OsMYC2 などの bHLH 型転写因子は MYB や bHLH 型転写因子と相互作用して機能が変化すると知られているが [Chavali *et al.*, 2001; Li, 2014]、*OsIDEF2* などの NAC 型転写因子と相互作用を解析した例はないため、本章で得られた結果がタンパク質間相互作用によるものかどうか大変興味を持たれる。また、野生型株において *OsIDEF2* は JA や塩化銅処理によらず恒常的に発現していたことから（補章参照）、*OsIDEF2* は恒常的に *OsNOMT* の活性に影響を与えていることが示唆された。今後、*OsMYC2* と *OsIDEF2* はどのように協調作用しているのかを明らかにするため、タンパク質間相互作用の解析、*OsMYC2* や *OsIDEF2* が結合する DNA 領域の同定、および DNA 結合能の解析を行うことが急務である。

OsNOMT 転写開始点上流域における *OsMYC2* および *OsIDEF2* の結合領域は明らかになっていないが、*OsIDEF2* について結合配列は CA(A/C)G(T/C) (T/C/A)(T/C/A) であると明らかにされている [Ogo *et al.*, 2008]。 *OsNOMT* の転写開始点上流 1 kb の配列を調べた結果、転写開始点上流 266 bp および 63 bp にこの配列が存在していたため (Fig. 4-9)、今後はこの領域に対する *OsIDEF2* の結合能を解析する必要がある。また、*OsMYC* と *OsIDEF2* の協調作用は、*OsIDEF2* が *OsNOMT* 転写開始点上流域に結合したことによるものかを解析するため、第 2 章で作製したデリーションシリーズを用い、*OsIDEF2* の結合配列候補を欠損した *OsNOMT* 転写開始点上流域に対する *OsMYC* と *OsIDEF2* の影響の解析が待たれる。

本研究では、*OsIDEF2* の過剰発現株、および dominant negative 株を用いて、*OsNOMT* の発現やサクラネチン蓄積量を調べたが、いずれの形質転換体でも *OsIDEF2* の過剰発現が確認されなかった(補章参照)。今後、再度形質転換体の作製を行い、*OsIDEF2* の過剰発現が見られる株を選抜しあらためて影響を解析することが待たれる。

本章の研究を通し、*OsMYC2* およびその相互作用因子 *OsMYL1*、*OsMYL2* が *OsNOMT* 発現を制御するに至るまでの間に存在する、*OsIDEF2* による制御に関する知見が得られた。今後さらに研究を進め、*OsNOMT* の発現制御機構の全貌を解明することが期待される。

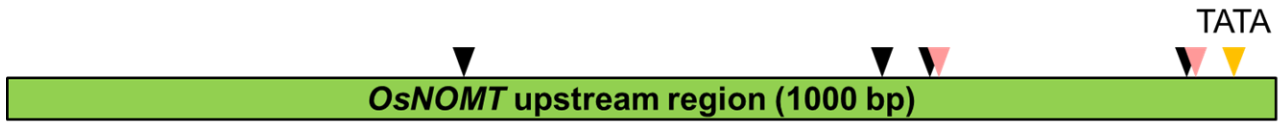


Figure 4-9 *OsNOMT* 転写開始点上流域に存在する IDEF2 結合配列

黒矢印は、OsMYC2 などの bHLH 転写因子が結合すると考えられる配列 (E box、CANNTG) の位置を表す。桃の矢印は、IDEF2 が結合すると考えられる配列((CA(A/C)G(T/C) (T/C/A)(T/C/A)) の位置を表す。橙の矢印は TATA box の位置を表す。

第5章

総括と展望

本博士論文研究は、サクラネチンの生産を JA 要求性の防御応答のモデルケースと位置付け、その制御機構について、特に生合成の最終ステップの触媒に必須の遺伝子である *OsNOMT* の発現の制御に着目して解明することを目的として行ったものである。本章では、本研究で解析した転写因子ごとに分けて記述する。

(1) *OsMYC2*、*OsMYL1*、*OsMYL2*

第2章では、*OsNOMT* の発現を JA 誘導的に制御する転写因子の同定を目的としてトランスクリプトーム解析を行い、選抜された転写因子のうち特に *OsMYC2* が *OsNOMT* のプロモーター活性を顕著に上昇させることを示した。この *OsMYC2* についてさらに解析を進め、*OsMYC2* が JA 要求性を示す *OsNOMT* の発現およびサクラネチンの生産に対し中心的な役割を担っていることが示された。また、*OsMYC2* は *OsMYL1* および *OsMYL2* と物理的に相互作用することで転写活性化能が増強することを示した。以上の結果から、*OsMYC2*、*OsMYL1*、*OsMYL2* により JA 要求性を示す *OsNOMT* の発現、ひいてはサクラネチンの蓄積が亢進されることが示唆された。*OsMYL1* と *OsMYL2* について、本研究では同様の機能を示していたが、*OsMYL1* の発現誘導は JA 要求性がある一方で *OsMYL2* は恒常的に発現しているという大きな差が存在している (Table 2-5)。さらに、第3章で *OsMYC2* の発現抑制株を用いた RNA-Seq 解析を行い、JA シグナルによる *OsMYL1* の発現誘導が *OsMYC2* 依存的に起こっていることも示された。したがって、実際にイネ体内で *OsMYC2* と相互作用して *OsNOMT* 発現を誘導する際、*OsMYL1* と *OsMYL2* は必ずしも互換できるわけではないと考えられる。あるいは、*OsMYC2*-*OsMYL2* 複合体は植物体内に常時一定量存在し、JA シグナルが誘導された際に *OsMYC2*-*OsMYL1* 複合体が新たに形成されシグナルの増幅を行っている可能性も考えられる。今後、*OsMYL1* および *OsMYL2* の片方あるいは両方を過剰発現ないし抑制したイネを作出し、JA 誘導的な *OsNOMT* の発現やサクラネチンの蓄積を解析することで、両者の違いを解明していく必要がある。

第4章で行った yeast one-hybrid screening により、*OsMYC2* が *OsNOMT* プロモーターに結合して直接発現を制御する可能性が示された。*OsMYL1* および *OsMYL2* は選抜の過程で除外されたため、実際の発現制御においては *OsNOMT* プロモーターに *OsMYC2* が結合し、その *OsMYC2* に *OsMYL1* および *OsMYL2* が結合することで *OsNOMT* の発現が亢進されることが示唆された。しかしながら、デリーションアッセイの結果、*OsMYC2* により活性化される *OsNOMT* 転写開始点上流域中のシスエレメントの決定には至らなかった (Figs. 2-7 and 2-8)。この原因について、第2章でエピジェネティック制御による可能性について述べたが、もう一つ、*OsNOMT* プロモーターに結合している *OsIDEF2* と *OsMYC2* が相互作用しているということが考えられる。今後は、*OsMYC2* の interactome 解析などによりこの仮説を検証する必要がある。

ると考えられる。

OsMYC2によるサクラネチンの生産制御について、第2章で述べた通り、サクラネチンの生合成経路のうちナリンゲニンの生合成よりも上流に位置する経路 (Fig. 3-4) は OsMYC2 による制御を強く受ける一方で、*OsNOMT* の発現はさほど厳密に OsMYC2 によって制御されるわけではないことも示唆された (Figs. 2-10B and 2-11B)。OsMYC2 の発現抑制株を用いた RNA-Seq 解析の結果、ナリンゲニン生合成経路のうち下流に存在する遺伝子の一つ *chalcone synthase (CHS)* の発現が JA 誘導的かつ OsMYC2 依存的であることなどを見出した。また、JA 生合成変異株 *cpm2* を用いたトランスクリプトーム解析の結果、ナリンゲニン生合成経路の上流に位置する遺伝子 *phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* は塩化銅処理後早期に JA 要求性の発現誘導を示し、*CHS* の JA 要求性の発現誘導が最大になる頃には既に *PAL* の発現は下がり始めていることも見出された。以上の結果から、ナリンゲニン生合成経路全体が JA シグナルにより OsMYC2 依存的に活性化されていることが示唆された。今後、さらに *OsNOMT* の上流に位置するフラボノイド生合成遺伝子の発現などに関する情報を得ることで、*OsNOMT* 発現を含め JA シグナルを要求するサクラネチン生産制御機構の詳細が明らかになると考えられる。

(2) OsIDEF2

第4章で行った yeast one-hybrid screening により、OsIDEF2 が *OsNOMT* プロモーターに結合する転写因子候補として選抜され、さらに OsIDEF2 が OsMYC2 と協調的に作用しながら *OsNOMT* プロモーターを活性化することが示された。OsIDEF2 の結合配列 CA(A/C)G(T/C) (T/C/A)(T/C/A) [Ogo *et al.*, 2008] は *OsNOMT* 転写開始点上の推定 TATA box から 250 bp 以内に 2 箇所存在するため (Fig. 4-9)、今後はまず OsIDEF2 が結合する領域を決定し、さらにシスエレメントの同定および OsIDEF2 の DNA 結合能を解析することが必要であると考えられる。また、OsIDEF2 の機能に対し OsMYC2 がどのように影響を及ぼすかは、*OsNOMT* の発現制御機構の解明に必要な情報である。今後、OsMYC2 の存在下で OsIDEF2 の DNA 結合能や転写機能がどのように変化するか解析することが期待される。

OsIDEF2 などの NAC 転写因子および OsMYC2 などの bHLH 型転写因子について、それぞれ解析は広く行われている。当然、相互作用タンパク質についても研究が進んでいるが、NAC 転写因子と bHLH 型転写因子が物理的に相互作用するかどうかの解析例はこれまでにない。したがって、OsMYC2 と OsIDEF2 が相互作用していれば、bHLH 型転写因子と NAC 転写因子が相互作用する初めての例となり、今後この 2 群の転写因子の解析を行うにあたって重要な情報となる。そのためにも、まずは OsMYC2 と OsIDEF2 の相互作用の有無を調べる必要がある。

また、*OsIDEF2* の過剰発現株および CRES-T 法による機能抑制株において *OsNOMT* の発現およびサクラネチン生産がどのように影響を受けるかについて、大変興味を持たれる。本研究ではそれぞれの株で *OsIDEF2* の過剰発現を確認できなかったものの (補章参照)、今後新たに過剰発現株および機能抑制株を作出し解析することが急務であると考えられる。

上述のように、本研究ではサクラネチン生産および *OsNOMT* 発現に関与する転写因子を見出し、機能解析を行ってきた。

サクラネチンの生産誘導について、イネ葉身に JA と共にファスファチジン酸の一種 PA8:0 を処理すると、JA を単独で処理した場合よりもサクラネチン生産が顕著に増加する現象が確認されている [軸丸博士論文, 2005; 石田ら, 未発表データ]。この現象と、本研究で得られた知見を結びつけることで、サクラネチンを多量蓄積し強い病害抵抗性を示すイネの作出につながると考えられる。さらに、サクラネチンは、イネのファイトアレキシンとしてだけでなく、抗炎症効果や抗病原活性を有し、動物におけるグルコースのホメオスタシス維持に寄与するなど、医薬品として有用な化合物であることが示唆されている [Zhang *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Grecco Sdos *et al.*, 2012]。したがって、サクラネチン高蓄積イネを作出することで、農学の垣根を越え医学にも貢献できると考えられる。

本章の冒頭でも述べた通り、サクラネチン生産は JA 要求性の防御応答のモデルケースであると考えられる。したがって、本研究で得られた知見を他の JA 要求性防御応答にも応用することで、植物の防御応答をより詳細に理解し、農業研究を前進させることが期待される。

補章 1

第 3 章で行った RNA-Sequencing 解析に関するデータ

この章では、本論文第 3 章で行った RNA-Seq の概要を載せた。

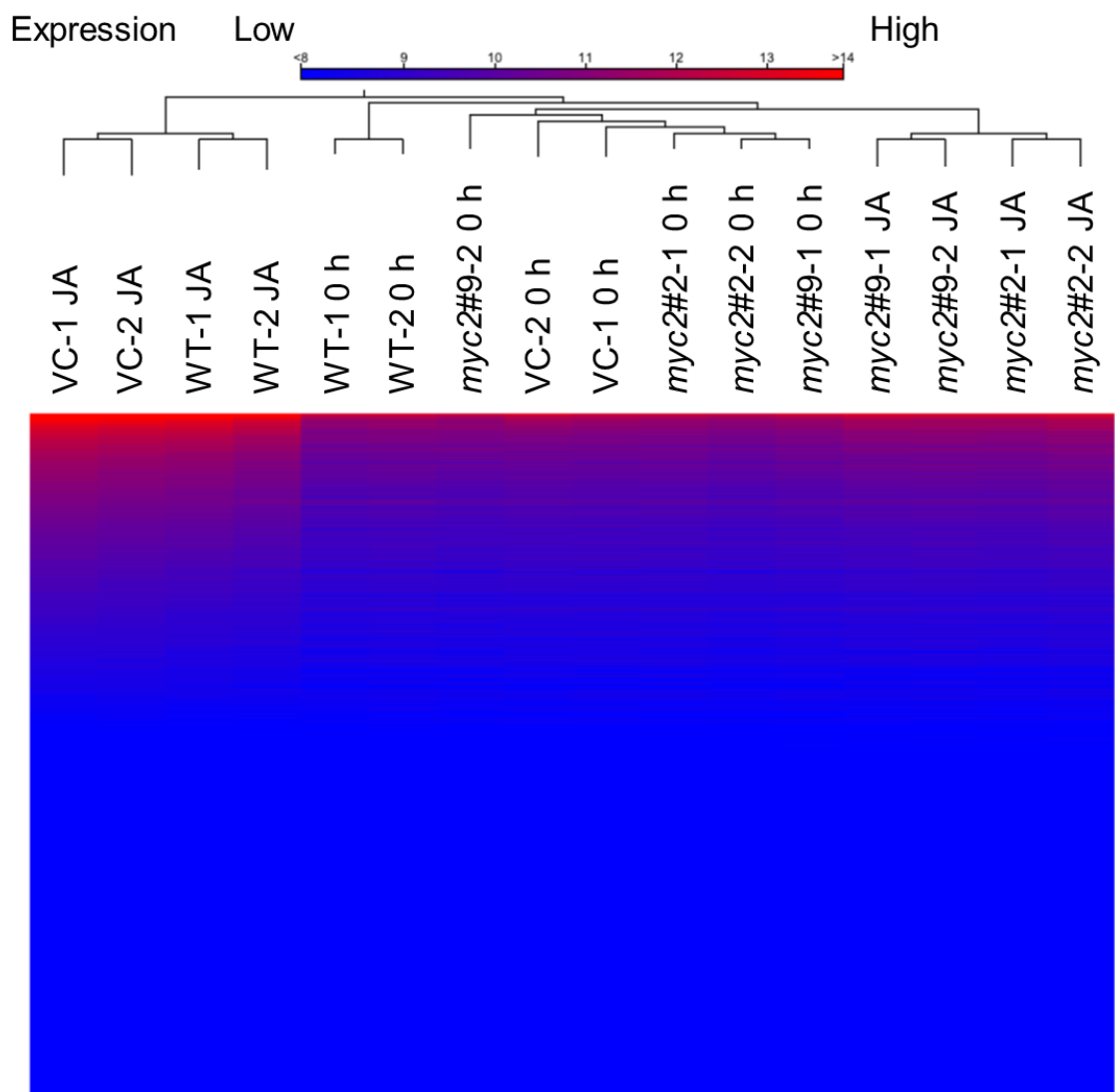


Figure S1-1 発現量を元にしたヒートマップおよびクラスタリング

色は各遺伝子の発現量を表し、赤いほど高発現であることを示している。直線はクラスタリングの結果を表し、近い位置にあるサンプルほど類似した発現パターンを示していることを表す。

Table S1-1 cDNAに付加したIndex 配列

Sample name	Index sequence
WT1 0 h	GTCCGC
WT2 0 h	GTGAAA
VC1 0 h	GTGGCC
VC2 0 h	GTTTCG
RNAi 2-1 0 h	CGTACG
RNAi 2-2 0 h	GAGTGG
RNAi 9-1 0 h	ACTGAT
RNAi 9-2 0 h	ATTCCT
WT1 JA	GATCAG
WT2 JA	TAGCTT
VC1 JA	GGCTAC
VC2 JA	CTTGTA
RNAi 2-1 JA	AGTCAA
RNAi 2-2 JA	AGTTCC
RNAi 9-1 JA	ATGTCA
RNAi 9-2 JA	CCGTCC

Table S1-2 total RNAのRNA integrity number (RIN)

Sample name	RIN
WT1 0 h	9.1
WT2 0 h	9.1
VC1 0 h	9.0
VC2 0 h	9.0
RNAi 2-1 0 h	8.8
RNAi 2-2 0 h	8.9
RNAi 9-1 0 h	8.9
RNAi 9-2 0 h	8.9
WT1 JA	8.7
WT2 JA	8.6
VC1 JA	8.8
VC2 JA	8.8
RNAi 2-1 JA	8.7
RNAi 2-2 JA	8.7
RNAi 9-1 JA	8.8
RNAi 9-2 JA	8.7

Table S1-3 RNA-Seqに用いたライブラリーの平均長

Sample name	Average length (bp)
WT1 0 h	325
WT2 0 h	322
VC1 0 h	324
VC2 0 h	324
RNAi 2-1 0 h	325
RNAi 2-2 0 h	323
RNAi 9-1 0 h	327
RNAi 9-2 0 h	323
WT1 JA	316
WT2 JA	319
VC1 JA	314
VC2 JA	318
RNAi 2-1 JA	330
RNAi 2-2 JA	327
RNAi 9-1 JA	329
RNAi 9-2 JA	322

Table S1-4 RNA-Seq解析結果の概要

Sample name	Clusters PF	Yield (Mbp)	Clusters PF ¹ (%)	≥ Q30 ² (%)	Mean Q Score
WT1 0 h	15,579,186	1,558	96.59	93.50	36.62
WT2 0 h	15,449,435	1,545	96.70	93.68	36.67
VC1 0 h	15,558,776	1,556	96.57	93.55	36.64
VC2 0 h	15,555,503	1,556	96.42	93.62	36.65
RNAi 2-1 0 h	15,192,518	1,519	96.81	93.79	36.70
RNAi 2-2 0 h	17,346,117	1,735	96.79	93.80	36.72
RNAi 9-1 0 h	15,853,930	1,585	96.88	94.00	36.77
RNAi 9-2 0 h	17,892,162	1,789	96.68	94.04	36.78
WT1 JA	15,307,708	1,531	96.77	93.80	36.72
WT2 JA	15,529,960	1,553	96.92	93.88	36.74
VC1 JA	13,889,509	1,389	96.85	93.84	36.74
VC2 JA	16,575,662	1,658	96.91	93.89	36.75
RNAi 2-1 JA	17,510,389	1,751	96.70	94.00	36.79
RNAi 2-2 JA	17,259,112	1,726	96.57	93.86	36.76
RNAi 9-1 JA	16,273,773	1,627	96.76	93.79	36.73
RNAi 9-2 JA	16,399,674	1,640	96.65	93.54	36.68

¹Cluster PF (passing filter): クラスターの純度を表す指標。解析を行うためには 85%以上が求められる。

²Q30: Phred quality score (Q score) を算出した際、ベースコールのエラー率が 0.1%となる指標。したがって、Q score が Q30 以上であれば、DNA の正確性は 99.9%以上である。

Table S1-5 CLCを用いた解析結果の概要

Sample name	Total sequences in data set	Total nucleotides in data set
WT1 0 h	15,579,186	1,547,517,310
WT2 0 h	15,449,435	1,534,813,954
VC1 0 h	15,558,776	1,546,305,004
VC2 0 h	15,555,503	1,545,250,600
RNAi 2-1 0 h	15,192,518	1,510,125,879
RNAi 2-2 0 h	17,346,117	1,723,709,980
RNAi 9-1 0 h	15,853,930	1,575,383,994
RNAi 9-2 0 h	17,892,162	1,778,272,459
WT1 JA	15,307,708	1,519,502,737
WT2 JA	15,529,960	1,544,116,116
VC1 JA	13,889,509	1,381,081,696
VC2 JA	16,575,662	1,647,531,433
RNAi 2-1 JA	17,510,389	1,739,339,208
RNAi 2-2 JA	17,510,389	1,714,091,382
RNAi 9-1 JA	16,273,773	1,615,018,512
RNAi 9-2 JA	16,399,674	1,628,990,745

Table S1-6 フィルタリング、トリミングを行った後のシーケンスサマリー

Sample name	Number of reads	Average length	Number of reads after trimming	Percentage trimmed	Average length after trimming
WT1 0 h	17,591,209	99.4	17,326,086	98.49	79.2
WT2 0 h	18,195,205	99.4	17,886,258	98.3	79.2
VC1 0 h	15,558,776	99.4	15,307,014	98.38	79.2
VC2 0 h	15,555,503	99.3	15,293,312	98.31	79.2
RNAi 2-1 0 h	15,192,518	99.4	14,960,797	98.47	79.2
RNAi 2-2 0 h	17,346,117	99.4	17,078,328	98.46	79.2
RNAi 9-1 0 h	15,853,930	99.4	15,612,136	98.47	79.2
RNAi 9-2 0 h	17,892,162	99.4	17,625,752	98.51	79.2
WT1 JA	15,986,275	99.4	15,704,323	98.24	79.1
WT2 JA	18,693,619	98.9	18,192,858	97.32	79.1
VC1 JA	13,889,509	99.4	13,682,671	98.51	79.2
VC2 JA	16,575,662	99.4	16,321,337	98.47	79.2
RNAi 2-1 JA	17,510,389	99.3	17,228,964	98.39	79.2
RNAi 2-2 JA	17,259,112	99.3	16,968,340	98.32	79.2
RNAi 9-1 JA	16,273,773	99.2	15,980,626	98.2	79.2
RNAi 9-2 JA	16,399,674	99.3	16,120,908	98.3	79.2

Table S1-7 マッピングサマリー

Sample name	Counted fragments	unique fragments	non-specifically	Uncounted fragments	Total fragments
WT1 0 h	16,187,781	14,118,721	2,069,060	245,753	16,433,534
WT2 0 h	16,187,781	14,118,721	2,069,060	245,753	16,433,534
VC1 0 h	15,051,602	13,110,882	1,940,720	255,412	15,307,014
VC2 0 h	15,026,349	13,048,674	1,977,675	266,963	15,293,312
RNAi 2-1 0 h	14,716,685	12,828,216	1,888,469	244,112	14,960,797
RNAi 2-2 0 h	16,789,999	14,637,537	2,152,462	288,329	17,078,328
RNAi 9-1 0 h	15,341,708	13,393,871	1,947,837	270,428	15,612,136
RNAi 9-2 0 h	17,332,558	15,110,175	2,222,383	293,194	17,625,752
WT1 JA	15,487,880	12,899,997	2,587,883	216,443	15,704,323
WT2 JA	17,922,839	14,976,416	2,946,423	270,019	18,192,858
VC1 JA	13,467,806	11,622,196	1,845,610	214,865	13,682,671
VC2 JA	16,052,077	13,803,571	2,248,506	269,260	16,321,337
RNAi 2-1 JA	16,950,848	14,815,971	2,134,877	278,116	17,228,964
RNAi 2-2 JA	16,695,251	14,578,298	2,116,953	273,089	16,968,340
RNAi 9-1 JA	15,693,925	13,685,339	2,008,586	286,701	15,980,626
RNAi 9-2 JA	15,840,143	13,830,677	2,009,466	280,765	16,120,908

補章 2

OsIDEF2 の過剰発現株および機能抑制株の解析

補 2-1 緒言

本論文第 4 章で、*OsIDEF2* が *OsNOMT* プロモーターに結合し制御している転写因子の候補であることを見出し、*OsIDEF2* が *OsMYC2* と協調的に *OsNOMT* プロモーターの発現を誘導していることを示した。この *OsIDEF2* について、*OsMYC2* のように実際の植物体内で *OsNOMT* の発現ならびにサクラネチンの蓄積に影響を与えているか興味を持たれた。

そこで本章では、*OsIDEF2* の過剰発現株ならびに Chimeric repressor silencing technology (CRES-T 法) [Hiratsu *et al.*, 2003] による dominant negative 株を用いた解析を行い、*OsIDEF2* のサクラネチン生合成に対する影響を解明することを目的とした。

なお、本章におけるイネの形質転換体に関する実験は産業技術総合研究所の高木優博士、光田展隆博士ら、および農業・食品産業技術総合研究機構の市川裕章博士らと共同で行った。

補 2-2 材料と方法

補 2-2-1 植物材料

qRT-PCR による発現解析およびファイトアレキシンの定量には、*Oryza sativa* L., cv. Nipponbare をベースとし、イネ Actin1 プロモーターの制御下で発現が促進される *OsIDEF2* 過剰発現株 (以下 OX)、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下でリプレッサーモチーフ (SRDX) と融合させた *OsIDEF2* の発現が促進される *OsIDEF2* dominant negative 株 (以下 CRES-T)、および野生型株 (WT) を用いた。

イネの種子は籾を剥き、70%エタノールで2分間滅菌をした後 dH₂O で5回洗浄し、続いて1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (関東化学) で20分滅菌した。塩素による滅菌後、オートクレーブ滅菌された水で5回以上洗浄した。滅菌した種子は0.5%の寒天培地に播種し、14時間明条件、10時間暗条件、28°C で生育した。

イネの形質転換体は、農業・食品産業技術総合研究機構の市川裕章博士らが作出したものを譲渡頂いた。

補 2-2-2 イネ形質転換体の選抜

形質転換体の選抜は第2章 2-2-6の方法で行った。

補 2-2-3 qRT-PCR による遺伝子発現解析

選抜した形質転換体について、播種後14日でイネ葉身を切り出し、明条件、28°Cで一晩静置して傷害処理を解除して実験に用いた。イネ葉身を500 μMのJAまたは塩化銅で6時間処理し、回収後すぐに液体窒素で凍結させた。また、処理前(0h)にもイネ葉身を回収しコントロールとした。サンプルはRNAの抽出を行うまで-80°Cにて保存した。Total RNAの抽出、逆転写、qRT-PCRは第2章 2-2-7の方法で行った。ただし、*OsIDEF2* についての定量について以下の条件を追加した。qRT-PCRに使用したプライマーはTable S1-1に記載した。

qRT-PCR 条件 :

95°C 10 min. → [95°C; 15 sec. → 60°C: 35 sec.] x 40

その他の条件は 2-2-7 と揃えた。

補 2-2-4 ファイトアレキシンの定量

選抜した形質転換体について、播種後14日でイネ葉身を切り出し、明条件、28°Cで一晩静置して傷害処理を解除して実験に用いた。イネ葉身を500 μMのJA溶液または塩化銅溶液で72時間処理し、ファイトアレキシン抽出溶媒 (エタノール:蒸留水:アセトニトリル:酢酸、79:13.99:7:0.01 (v/v/v/v)) に浸漬した。

回収の際、それぞれのサンプルについて葉身重量を測定した。溶媒に浸漬後 4°C で 24 時間静置することでファイトアレキシンを抽出した。また、処理前 (0 h) にもイネ葉身を回収しコントロールとした。サンプルはファイトアレキシンの定量を行うまで -20°C にて保存した。

ファイトアレキシンの定量は第 2 章 2-2-8 の方法で行った。

補 2-2-5 統計解析

全てのデータは平均 ± 標準誤差で表した。有意差検定は両側検定、独立の Welch's *t*-test により行った。P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), または P < 0.001 (***) のとき、有意差があると定義した。

補 2-2-6 本章で扱った遺伝子の gene ID

RAP-DB の gene ID は以下の通りである。

OsIDEF2 (Os05g0426200), OsNOMT (Os12g0240900), OsUBQ (Os10g0542200).

Table S2-1 qRT-PCR に使用したプライマー

Primer	Sequence	Target gene
OsUBQ RT Fw	5'-TCCGAGAGATGGGTTTCATC -3'	<i>OsUBQ</i>
OsUBQ RT Fw	5'-GCCAAGATTGCCAAGAAGAC-3'	<i>OsUBQ</i>
OsIDEF2 Fw	5'-CATCATGGCAACCCTGTTGG-3'	<i>OsIDEF2</i>
OsIDEF2 Rv	5'-ATCACCATTTGGCACACCCA-3'	<i>OsIDEF2</i>
OsNOMT Fw	5'-AAGGTGTTTCATGGAGAACTGGTA-3'	<i>OsNOMT</i>
OsNOMT Rv	5'-CTGGTTGAAGAGCGTGTGGA-3'	<i>OsNOMT</i>

補 2-3 結果と考察

OsIDEF2 について、植物体内で *OsNOMT* 発現やサクラネチン生産に及ぼす影響を解析するため、アクチンプロモーターの制御下で *OsIDEF2* を過剰発現させた株 (OX)、Chimeric repressor silencing technology (CRES-T 法) [Hiratsu *et al.*, 2003] により、SRDX リプレッションドメインを付加した OsIDEF2 を過剰発現する dominant negative 株 (CRES-T) を用いた解析を試みた。

OsIDEF2 の発現量を定量した結果、WT において JA 処理、塩化銅処理を行っても発現量は定常状態と変わらなかった (Fig. S2-1A)。したがって、OsIDEF2 はイネ体内で恒常的に発現し、*OsNOMT* プロモーターを制御していることが示唆された。OX と CRES-T における *OsIDEF2* の発現を解析したところ、どちらの株でも OsIDEF2 の過剰発現は認められず、OX においてはむしろ *OsIDEF2* の発現が抑制される傾向が認められた (Fig. S2-1A)。

次に、*OsNOMT* 発現量およびサクラネチン蓄積量について解析したところ、OX および CRES-T においていずれも顕著な影響は見られなかった (Fig. S2-1B, C)。

本章で解析した OX および CRES-T について、*OsIDEF2* の発現量から、過剰発現株および dominant negative 株として機能していないと思われる。再度植物体の選抜を行うか、もしくは新たに作出を行い、過剰発現株および dominant negative 株の取得と機能解析を行うことが急務である。

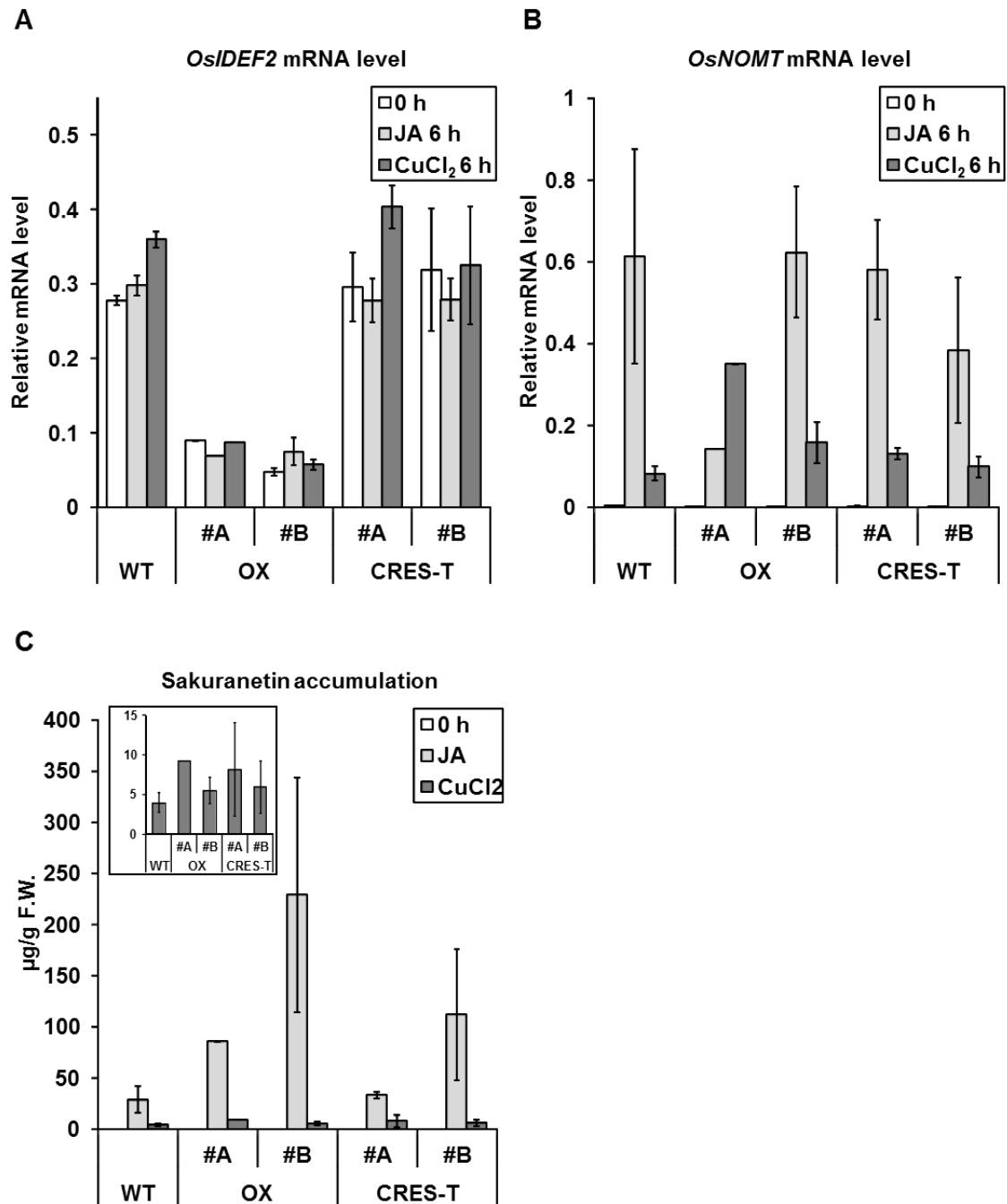


Figure S2-1 *OsIDEF2* 過剰発現株 (OX) および dominant negative 株 (CRES-T) における JA または塩化銅処理時の遺伝子発現量、サクラネチン蓄積量

(A, B) *OsIDEF2* (A) および *OsNOMT* (B) の発現量。500 μ M の JA で 6 時間処理したイネ (light gray bars)、500 μ M の塩化銅で 6 時間処理したイネ (dark gray bars) および未処理のイネ (open bars) より total RNA を抽出し、逆転写で合成した cDNA を qRT-PCR に用いた。(C) 500 μ M の JA で 72 時間処理したイネ (light gray bars)、500 μ M の塩化銅で 72 時間処理したイネ (dark gray bars) および未処理のイネ (open bars) におけるサクラネチンの蓄積量。データは平均 \pm 標準誤差で表した。n=2-4。有意差検定は JA 処理、塩化銅処理、未処理それぞれについて WT と比較して行った。

参考文献

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, and Shinozaki K. (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought- and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* **9**, 1859-1868
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78
- Akagi A, Fukushima S, Okada K, Jiang CJ, Yoshida R, Nakayama A, Shimono M, Sugano S, Yamane H, and Takatsuji H. (2014) WRKY45-dependent priming of diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and the role of cytokinin in triggering the reaction. *Plant Mol. Biol.* **86**, 171-183
- Alexandre C, Grueneberg DA, and Gilman MZ. (1993) Studying Heterologous Transcription Factors in Yeast. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **5**, 147-155
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, and Kazan K. (2004) Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3460-3479
- Bari R, and Jones JD. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **69**, 473-488
- Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, and Fields S. (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp 153-179
- Cai Q, Yuan Z, Chen M, Yin C, Luo Z, Zhao X, Liang W, Hu J, and Zhang D. (2014) Jasmonic acid regulates spikelet development in rice. *Nat. Commun.* **5**, 3476
- Cartwright D, Langcake P, Pryce RJ, Leworthy DP, and Ride JP. (1977) Chemical activation of host defence mechanisms as a basis for crop protection. *Nature* **267**, 511-513
- Chavali GB, Vijayalakshmi C, and Salunke DM. (2001) Analysis of sequence signature defining functional specificity and structural stability in helix-loop-helix proteins. *Proteins* **42**, 471-480

Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, and Solano R. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. *Nature* **448**, 666–671

Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, and Zhu JK. (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **17**, 1043-1054

Chou CM, and Kao CH. (1992) Methyl Jasmonate, Calcium, and Leaf Senescence in Rice. *Plant Physiol.* **99**, 1693-1694

Chujo T, Miyamoto K, Ogawa S, Masuda Y, Shimizu T, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Nishizawa Y, Minami E, Nojiri H, Yamane H, and Okada K. (2014) Overexpression of Phosphomimic Mutated OsWRKY53 Leads to Enhanced Blast Resistance in Rice. *PLoS ONE* **9**, e98737

Costa Y, Ding J, Theunissen TW, Faiola F, Hore TA, Shliaha PV, Fidalgo M, Saunders A, Lawrence M, Dietmann S, Das S, Levasseur DN, Li Z, Xu M, Reik W, Silva JC, and Wang J. (2013) NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature* **495**, 370-374

Creelman RA, Tierney ML, and Mullet JE. (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4938-4941

Dobi KC, and Winston F. (2007) Analysis of Transcriptional Activation at a Distance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5575-5586

Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, and Solano R. (2011) The *Arabidopsis* bHLH Transcription Factors MYC3 and MYC4 Are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses. *Plant Cell* **23**, 701-715

Gontarek BC, Neelakandan AK, Wu H, and Becraft PW. NKD Transcription Factors are Central Regulators of Maize Endosperm Development. *Plant Cell* pii: tpc.00609.2016

Goossens J, Swinnen G, Vanden Bossche R, Pauwels L, and Goossens A. (2015) Change of a conserved amino acid in the MYC2 and MYC3 transcription factors leads to release of JAZ repression and increased activity. *New Phytol.*

Goossens J, Mertens J, and Goossens A. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *J. Exp. Bot.* pii: erw440

Grecco Sdos S, Reimão JQ, Tempone AG, Sartorelli P, Cunha RL, Romoff P, Ferreira MJ, Fávero OA, and Lago JH. (2012) *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Exp. Parasitol.* **130**, 141-145

Hasegawa M, Mitsuhara I, Seo S, Imai T, Koga J, Okada K, Yamane H, and Ohashi Y. (2010) Phytoalexin Accumulation in the Interaction Between Rice and the Blast Fungus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 1000-1011

Hasegawa M, Mitsuhara I, Seo S, Okada K, Yamane H, Iwai T, and Ohashi Y. (2014) Analysis on blast fungus-responsive characters of a flavonoid phytoalexin sakuranetin; accumulation in infected rice leaves, antifungal activity and detoxification by fungus. *Molecules* **19**, 11404-11418

Hammerschmidt R. (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**, 285-306

Hino T, Tanaka Y, Kawamukai M, Nishimura K, Mano S, and Nakagawa T. (2011) Two Sec13p Homologs, AtSec13A and AtSec13B, Redundantly Contribute to the Formation of COPII Transport Vesicles in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1848-1852

Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, and Ohme-Takagi M. (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 733-739

Hiratsu K, Mitsuda N, Matsui K, and Ohme-Takagi M. (2004) Identification of the minimal repression domain of SUPERMAN shows that the DLELRL hexapeptide is both necessary and sufficient for repression of transcription in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 172-178

Horie K, Inoue Y, Sakai M, Yao Q, Tanimoto Y, Koga J, Toshima H, and Hasegawa M. (2015) Identification of UV-Induced Diterpenes Including a New Diterpene Phytoalexin, Phytocassane F, from Rice Leaves by Complementary GC/MS and LC/MS Approaches. *J. Agric. Food. Chem.* **63**, 4050-4059

- Hu P, Zhou W, Cheng Z, Fan M, Wang L, and Xie D. (2013) *JAVI* Controls Jasmonate-Regulated Plant Defense. *Mol. Cell* **50**, 504-515
- Hu W, dePamphilis CW, and Ma H. (2008) Phylogenetic Analysis of the Plant-specific *Zinc Finger-Homeobox* and *Mini Zinc Finger* Gene Families. *J. Integr. Plant Biol.* **50**, 1031-1045
- Inoue Y, Sakai M, Yao Q, Tanimoto Y, Toshima H, and Hasegawa M. (2013) Identification of a Novel Casbane-Type Diterpene Phytoalexin, *ent*-10-Oxodepressin, from Rice Leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 760-765
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, and Parcy F. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**, 106-111
- Kato T, Kabuto C, Sasaki N, Tsunagawa M, Aizawa H, Fujita K, Kato Y, Kitahara Y, and Takahashi N. (1973) Momilactones, Growth Inhibitors from Rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron Lett.* **14**, 3861–3864
- Kato-Noguchi H. (2004) Allelopathic substance in rice root exudates: Rediscovery of momilactone B as an allelochemical. *J. Plant Physiol.* **161**, 271-276
- Kato-Noguchi H, Hasegawa M, Ino T, Ota K, and Kujime H. (2010) Contribution of momilactone A and B to rice allelopathy. *J. Plant Physiol.* **167**, 787-791
- Kazan K, and Manners JM. (2013) MYC2: the master in action. *Mol. Plant* **6**, 686-703
- Kim JS, Mizoi J, Kidokoro S, Maruyama K, Nakajima J, Nakashima K, Mitsuda N, Takiguchi Y, Ohme-Takagi M, Kondou Y, Yoshizumi T, Matsui M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. (2012) *Arabidopsis* GROWTH-REGULATING FACTOR7 Functions as a Transcriptional Repressor of Abscisic Acid- and Osmotic Stress-Responsive Genes, Including *DREB2A*. *Plant Cell* **24**, 3393-3405
- Kitagawa K, Kurinami S, Oki K, Abe Y, Ando T, Kono I, Yano M, Kitano H, and Iwasaki Y. (2010) A Novel Kinesin 13 Protein Regulating Rice Seed Length. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1315-1329
- Kobayashi T, Itai RN, Ogo Y, Kakei Y, Nakanishi H, Takahashi M, and Nishizawa NK. (2009) The rice transcription factor *IDEF1* is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. *Plant J.* **60**, 948-961

- Kobayashi T, Itai RN, Senoura T, Oikawa T, Ishimaru Y, Ueda M, Nakanishi H, and Nishizawa NK. (2016) Jasmonate signaling is activated in the very early stages of iron deficiency responses in rice roots. *Plant Mol. Biol.* **91**, 533-547
- Kodama O, Miyakawa J, Akatsuka T, and Kiyosawa S. (1992) Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochem.* **31**, 3807-3809
- Koga J, Ogawa N, Yamauchi T, Kikuchi M, Ogasawara N, and Shimura M. (1997) Functional moiety for the antifungal activity of phytocassane E, a diterpene phytoalexin from rice. *Phytochem.* **44**, 249-253
- Konishi M, and Yanagisawa S. (2013) Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nat. Commun.* **4**, 1617
- Lee MW, Qi M, and Yang Y. (2001) A Novel Jasmonic Acid-Inducible Rice *myb* Gene Associates with Fungal Infection and Host Cell Death. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 527-535.
- Li S. (2014) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. *Plant Signal. Behav.* **9**, e27522
- Liu J, Wilson TE, Milbrandt J. and Johnston M. (1993) Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. In: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **5**, 125-137
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, and Solano R. (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1938-1950
- Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, and Endo Y. (2000) A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 559-564
- McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, Scheible WR, Udvardi MK, and Kazan K. (2005) Repressor- and Activator-Type Ethylene Response Factors Functioning in Jasmonate Signaling and Disease Resistance Identified via a Genome-Wide Screen of Arabidopsis Transcription Factor Gene Expression.

Plant Physiol. **139**, 949-959

Meesters C, Mönig T, Oeljeklaus J, Krahn D, Westfall CS, Hause B, Jez JM, Kaiser M, and Kombrink E. (2014) A chemical inhibitor of jasmonate signaling targets JAR1 in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 830-836

Miki D, and Shimamoto K. (2004) Simple RNAi Vectors for Stable and Transient Suppression of Gene Function in Rice. *Plant Cell Physiol.* **45**, 490-495

Mitsuda N, Ikeda M, Takada S, Takiguchi Y, Kondou Y, Yoshizumi T, Fujita M, Shinozaki K, Matsui M, and Ohme-Takagi M. (2010) Efficient Yeast One-/Two-Hybrid Screening Using a Library Composed Only of Transcription Factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51**, 2145-2151

Miyamoto K, Shimizu T, Mochizuki S, Nishizawa Y, Minami E, Nojiri H, Yamane H, and Okada K. (2013) Stress-induced expression of the transcription factor RERJ1 is tightly regulated in response to jasmonic acid accumulation in rice. *Protoplasma* **250**, 241-249

Miyamoto K, Matsumoto T, Okada A, Komiyama K, Chujo T, Yoshikawa H, Nojiri H, Yamane H, and Okada K. (2014a) Identification of Target Genes of the bZIP Transcription Factor OsTGAP1, Whose Overexpression Causes Elicitor-Induced Hyperaccumulation of Diterpenoid Phytoalexins in Rice Cells. *PLoS ONE* **9**, e105823

Miyamoto K, Shimizu T, and Okada K. (2014b) Transcriptional regulation of the biosynthesis of phytoalexin: A lesson from specialized metabolites in rice. *Plant Biotechnol.* **31**, 377-388

Miyamoto K, Nishizawa Y, Minami E, Nojiri H, Yamane H, and Okada K. (2015) Overexpression of the bZIP transcription factor OsbZIP79 suppresses the production of diterpenoid phytoalexin in rice cells. *J. Plant Physiol.* **173**, 19-27

Miyamoto K, Enda I, Okada T, Sato Y, Watanabe K, Sakazawa T, Yumoto E, Shibata K, Asahina M, Iino M, Yokota T, Okada K, and Yamane H. (2016) Jasmonoyl-L-isoleucine is required for the production of a flavonoid phytoalexin but not diterpenoid phytoalexins in ultraviolet-irradiated rice leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1934-1938

Moons A. (2003) *Osgstu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Lett.* **553**, 427-432

- Mutuku JM, Yoshida S, Shimizu T, Ichihashi Y, Wakatake T, Takahashi A, Seo M, and Shirasu K. (2015) The *WRKY45*-Dependent Signaling Pathway Is Required For Resistance against *Striga hermonthica* Parasitism. *Plant Physiol.* **168**, 1152-1163
- Nakashima K, Tran LS, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.* **51**, 617-630
- Nakata M, Mitsuda N, Herde M, Koo AJ, Moreno JE, Suzuki K, Howe GA, and Ohme-Takagi M. (2013) A bHLH-Type Transcription Factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, Acts as a Repressor to Negatively Regulate Jasmonate Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 1641-1656
- Nemoto K, Takemori N, Seki M, Shinozaki K, and Sawasaki T. (2015) Members of the Plant CRK Superfamily Are Capable of Trans- and Autophosphorylation of Tyrosine Residues. *J. Biol. Chem.* **290**, 16665-16677
- Nicaise V, Roux M, and Zipfel C. (2009) Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol.* **150**, 1638-1647
- Niu Y, Figueroa P, and Browse J. (2011) Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **62**, 2143-2154
- Ogawa S, Miyamoto K, Nemoto K, Sawasaki T, Yamane H, Nojiri H, and Okada K. (2017) OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability. *Sci. Rep.* **7**, 40175
- Ogo Y, Kobayashi T, Nakanishi Itai R, Nakanishi H, Kakei Y, Takahashi M, Toki S, Mori S, and Nishizawa NK. (2008) A Novel NAC Transcription Factor, IDEF2, That Recognizes the Iron Deficiency-responsive Element 2 Regulates the Genes Involved in Iron Homeostasis in Plants. *J. Biol. Chem.* **283**, 13407-13417
- Ohta M, Ohme-Takagi M, and Shinshi H. (2000) Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J.* **22**, 29-38

- Okada A, Okada K, Miyamoto K, Koga J, Shibuya N, Nojiri H, and Yamane H. (2009) OsTGAP1, a bZIP Transcription Factor, Coordinately Regulates the Inductive Production of Diterpenoid Phytoalexins in Rice. *J. Biol. Chem.* **284**, 26510-26518
- Okada K, Abe H, and Arimura G. (2015) Jasmonates Induce Both Defense Responses and Communication in Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants. *Plant Cell Physiol.* **56**, 16-27
- Okada K, Kawaide H, Miyamoto K, Miyazaki S, Kainuma R, Kimura H, Fujiwara K, Natsume M, Nojiri H, Nakajima M, Yamane H, Hatano Y, Nozaki H, and Hayashi K. (2016) HpDTC1, a Stress-Inducible Bifunctional Diterpene Cyclase Involved in Momilactone Biosynthesis, Functions in Chemical Defence in the Moss *Hypnum plumaeforme*. *Sci. Rep.* **6**, 25316
- Pauwels L, Inzé D, and Goossens A. (2009) Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci.* **14**, 87-91
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Pérez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, García-Casado G, Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, and Goossens A. (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788-791
- Paxton JD. (1981) Phytoalexins — A Working Redefinition. *J. Phytopathol.* **101**, 106-109
- Pfluger J and Wagner D. (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 645-652
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, and Van Wees SC. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 489-521
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. *Plant Physiol.* **133**, 1755-1767
- Rakwal R, Hasegawa M, and Kodama O. (1996) A Methyltransferase for Synthesis of the Flavanone Phytoalexin Sakuranetin in Rice Leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 732-735

- Reinbothe C, Springer A, Samol I, and Reinbothe S. (2009) Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J.* **276**, 4666-4681
- Riemann M, Haga K, Shimizu T, Okada K, Ando S, Mochizuki S, Nishizawa Y, Yamanouchi U, Nick P, Yano M, Minami E, Takano M, Yamane H, and Iino M. (2013) Identification of rice *Allene Oxide Cyclase* mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *Plant J.* **74**, 226-238
- Roy S. (2016) Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant Signal. Behav.* **11**, e1117723
- Ryu HS, Han M, Lee SK, Cho JI, Ryoo N, Heu S, Lee YH, Bhoo SH, Wang GL, Hahn TR, and Jeon JS. (2006) A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep.* **25**, 836-847
- Saga H, Ogawa T, Kai K, Suzuki H, Ogata Y, Sakurai N, Shibata D, and Ohta D. (2012) Identification and Characterization of *ANAC042*, a Transcription Factor Family Gene Involved in the Regulation of Camalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**, 684-696
- Saito T, Abe D, and Sekiya K. (2008) Sakuranetin induces adipogenesis of 3T3-L1 cells through enhanced expression of PPAR γ 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 835-839
- Sambrook J, and Russell DW. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sasaki-Sekimoto Y, Jikumaru Y, Obayashi T, Saito H, Masuda S, Kamiya Y, Ohta H, and Shirasu K. (2013) Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 Are Negative Regulators of Jasmonate Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **163**, 291-304
- Sawasaki T, Hasegawa Y, Tsuchimochi M, Kamura N, Ogasawara T, Kuroita T, and Endo Y. (2002) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Lett.* **514**, 102-105
- Sawasaki T, Kamura N, Matsunaga S, Saeki M, Tsuchimochi M, Morishita R, and Endo Y. (2008) *Arabidopsis* HY5 protein functions as a DNA-binding tag for purification and functional immobilization of proteins on agarose/DNA

microplate. *FEBS Lett.* **582**, 221-228

Sembdner G, and Parthier B. (1993) The Biochemistry and the Physiological and Molecular Actions of Jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 569-589

Shimizu T, Jikumaru Y, Okada A, Okada K, Koga J, Umemura K, Minami E, Shibuya N, Hasegawa M, Kodama O, Nojiri H, and Yamane H. (2008) Effects of a bile acid elicitor, cholic acid, on the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in suspension-cultured rice cells. *Phytochem.* **69**, 973-981

Shimizu T, Lin F, Hasegawa M, Okada K, Nojiri H, and Yamane H. (2012) Purification and identification of naringenin 7-O-methyltransferase, a key enzyme in biosynthesis of flavonoid phytoalexin sakuranetin in rice. *J. Biol. Chem.* **287**, 19315-19325

Shimizu T, Miyamoto K, Miyamoto K, Minami E, Nishizawa Y, Iino M, Nojiri H, Yamane H, and Okada K. (2013) OsJAR1 Contributes Mainly to Biosynthesis of the Stress-Induced Jasmonoyl-Isoleucine Involved in Defense Responses in Rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1556-1564

Shimono M, Sugano S, Nakayama A, Jiang CJ, Ono K, Toki S, and Takatsuji H. (2007) Rice WRKY45 Plays a Crucial Role in Benzothiadiazole-Inducible Blast Resistance. *Plant Cell* **19**, 2064-2076

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, and Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 410-417

Shoji T, Ogawa T, and Hashimoto T. (2008) Jasmonate-Induced Nicotine Formation in Tobacco is Mediated by Tobacco *COII* and *JAZ* Genes. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1003-1012

Shoji T, and Hashimoto T. (2011) Tobacco MYC2 Regulates Jasmonate-Inducible Nicotine Biosynthesis Genes Directly and By Way of the *NIC2*-Locus *ERF* Genes. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1117-1130

Staswick PE, and Tiryaki I. (2004) The Oxylipin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2117-2127

Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, and Harris JM. (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J.* **46**,

Tamaoki D, Seo S, Yamada S, Kano A, Miyamoto A, Shishido H, Miyoshi S, Taniguchi S, Akimitsu K, and Gomi K. (2013) Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant Signal. Behav.* **8**, e24260

Taniguchi S, Hosokawa-Shinonaga Y, Tamaoki D, Yamada S, Akimitsu K, and Gomi K. (2014a) Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice. *Plant Cell Environ.* **37**, 451-461

Taniguchi S, Miyoshi S, Tamaoki D, Yamada S, Tanaka K, Uji Y, Tanaka S, Akimitsu K, and Gomi K. (2014b) Isolation of jasmonate-induced sesquiterpene synthase of rice: Product of which has an antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*. *J. Plant Physiol.* **171**, 625-632

Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, and Browse J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665

Tiwari V, Patel MK, Chaturvedi AK, Mishra A, and Jha B. (2016) Functional Characterization of the Tau Class Glutathione-S-Transferases Gene (*SbGSTU*) Promoter of *Salicornia brachiata* under Salinity and Osmotic Stress. *PLoS One* **11**, e0148494

Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, and Tanaka H. (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.* **47**, 969-976

Uji Y, Taniguchi S, Tamaoki D, Shishido H, Akimitsu K, and Gomi K. (2016) Overexpression of OsMYC2 Results in the Up-Regulation of Early JA-Responsive Genes and Bacterial Blight Resistance in Rice. *Plant Cell Physiol.* **57**, 1814-1827

Umemura K, Ogawa N, Shimura M, Koga J, Usami H, and Kono T. (2003) Possible Role of Phytocassane, Rice Phytoalexin, in Disease Resistance of Rice against the Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 899-902.

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11632-11637

Varlakhanova NV, and Knoepfler PS. (2009) Acting Locally and Globally: Myc's Ever-Expanding Roles on Chromatin. *Cancer Res.* **69**, 7487-7490

Vita M, and Henriksson M. (2006) The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 318-330

Wamaitha MJ, Yamamoto R, Wong HL, Kawasaki T, Kawano Y, and Shimamoto K. (2012) OsRap2.6 transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). *Rice* **5**, 35

Wasternack C, and Hause B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany. Ann. Bot.* **111**, 1021-1058

Xu Y, Wang Y, Long Q, Huang J, Wang Y, Zhou K, Zheng M, Sun J, Chen H, Chen S, Jiang L, Wang C, and Wan J. (2014) Overexpression of *OsZHD1*, a zinc finger homeodomain class homeobox transcription factor, induces abaxially curled and drooping leaf in rice. *Planta* **239**, 803-816

Yamada S, Kano A, Tamaoki D, Miyamoto A, Shishido H, Miyoshi S, Taniguchi S, Akimitsu K, and Gomi K. (2012) Involvement of OsJAZ8 in Jasmonate-Induced Resistance to Bacterial Blight in Rice. *Plant Cell Physiol.* **53**, 2060-2072

Yamamura C, Mizutani E, Okada K, Nakagawa H, Fukushima S, Tanaka A, Maeda S, Kamakura T, Yamane H, Takatsuji H, and Mori M. (2015) Diterpenoid phytoalexin factor, a bHLH transcription factor, plays a central role in the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in rice. *Plant J.* **84**, 1100-1113

Yamane H, Sugawara J, Suzuki Y, Shimamura E, and Takahashi N. (1980) Syntheses of Jasmonic Acid Related Compounds and Their Structure-Activity Relationships on the Growth of Rice Seedlings. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2857-2864

Yamane H. (2013) Biosynthesis of Phytoalexins and Regulatory Mechanisms of It in Rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1141-1148

Yano T, Takeda H, Uematsu A, Yamanaka S, Nomura S, Nemoto K, Iwasaki T, Takahashi H, and Sawasaki T. (2016) AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. *PLoS ONE* **11**, e0156716

Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, Iwabuchi M, Matsui M, Hirochika H, and Oda K. (2013) Role of the rice transcription factor JAmyb in abiotic stress response. *J. Plant Res.* **126**, 131-139

Yoshii M, Shimizu T, Yamazaki M, Higashi T, Miyao A, Hirochika H, and Omura T. (2009) Disruption of a novel gene for a NAC-domain protein in rice confers resistance to *Rice dwarf virus*. *Plant J.* **57**, 615-625

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

Yuan JS, Köllner TG, Wiggins G, Grant J, Degenhardt J, and Chen F. (2008) Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. *Plant J.* **55**, 491-503

Zhang X, Hung TM, Phuong PT, Ngoc TM, Min BS, Song KS, Seong YH, and Bae K. (2006) Anti-Inflammatory Activity of Flavonoids From *Populus Davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 1102-1108

Zhang L, Kong Y, Wu D, Zhang H, Wu J, Chen J, Ding J, Hu L, Jiang H, and Shen X. (2008) Three flavonoids targeting the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. *Protein Sci.* **17**, 1971-1978

Zhang H, Hedhili S, Montiel G, Zhang Y, Chatel G, Pré M, Gantet P, and Memelink J. (2011) The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the *ORCA* genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* **67**, 61-71

軸丸裕介 (2005) 東京大学大学院博士論文

清水崇史 (2010) 東京大学大学院博士論文

謝辞

本博士論文研究を行うにあたり、各方面より多大な御指導、御協力を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

研究にあたり素晴らしい環境ならびにテーマを提供して下さい、また厳しくも暖かく御指導下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教授・野尻秀昭先生に心より御礼申し上げます。また、研究生活全般に亘り熱心に御指導御激励頂き、私のために多くの時間を割いて下さいました同部門准教授・岡田憲典先生に心から感謝申し上げます。まだ経験の浅い私を親身になって御指導下さいました同部門助教・水口千穂先生に深く感謝申し上げます。

本研究において、過剰発現イネおよび発現抑制イネを御提供下さり、またマイクロアレイ解析に御協力下さいました帝京大学・山根久和教授、宮本皓司博士、ならびに酒澤智子様心より御礼申し上げます。組み換えタンパク質の発現、AlphaScreen 解析に御協力下さいました愛媛大学・澤崎達也教授ならびに根本圭一郎博士に感謝申し上げます。Yeast one-hybrid screening の実施からデータ解析まで御指導頂きました産業技術総合研究所・光田展隆博士、坂本真吾博士、戸部文絵様に感謝致します。過剰発現株ならびに dominant negative 株を御提供下さりました埼玉大学・高木優教授、産業技術総合研究所・光田展隆博士、および農業・食品産業技術総合研究機構・市川裕章博士、四方雅仁博士に感謝致します。RNA-Sequencing 解析に御協力下さいました東京農業大学・辻井良政准教授ならびに三木玲香博士に感謝致します。貴重なプラスミドを譲渡して下さいました埼玉大学・高木優教授、島根大学・中川強教授、明治大学・澁谷直人教授、奈良先端科学技術大学院大学・故島本功教授に御礼を申し上げます。パーティクルガンをお貸し下さいました東京大学生物生産工学研究センター植物機能工学部門・柳澤修一准教授に感謝致します。ファイトアレキシン測定にあたり、分析機器をお貸し下さり、また分析に御協力下さいました東京大学生物制御化学研究室・浅見忠男教授ならびに山野博之様に感謝申し上げます。

研究にあたっての姿勢を親身に、時に厳しく教えて下さいました静岡大学・新谷政己准教授ならびに理化学研究所・清水崇史博士に感謝致します。また、研究するにあたり特に支え合い切磋琢磨しながら研究を行い、日常生活でも大変お世話になりました吉田悠里氏、ベハラノ・フェリペ氏、石田明大氏に感謝致します。そして日々の研究生活を行うにあたり、公私共に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御礼申し上げます。まだまだな私ですが、皆様のおかげでここまで来られました。

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、私の意思を尊重して博士課程の延長を認めて下さり研究生活を温かく見守って下さいました両親をはじめ家族に感謝の意を示して本論文の結びと致します。

皆様、本当にありがとうございました。

2017年2月

List of publications

小川 哲史

論 文

1. 題 目 イネのフラボノイド型ファイトアレキシンの生産制御機構の解明

2. 印刷公表の方法及び時期

(1) Jan. 2017 *Scientific Reports* 7:40175

“OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability”

(Ogawa, S., Miyamoto, K., Nemoto, K., Sawasaki, T., Yamane, H., Nojiri, H., Okada, K.)

(2) (In preparation) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*

“OsIDEF2, an iron deficiency-responsive factor, also contributes to expression of the biosynthetic gene of an anti-fungal flavonoid in rice”

(Ogawa, S., Sakamoto, S., Shikata, M., Ichikawa, H., Ohme-Takagi, M., Mitsuda, N., Nojiri, H., Okada, K.)

(3) (In preparation) *Biochemical and Biophysical Research Communications*

“OsMYC2 mediates a large part of jasmonic acid-inductive defense-related transcriptional changes in rice”

(Ogawa, S., Kawahara-Miki, R., Miyamoto, K., Yamane, H., Nojiri, H., Tsujii, Y., Okada, K.)