

博 士 論 文 (要約)

イネの根における JA 誘導性の

ジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構に関する研究

吉 田 悠 里

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成26年度博士課程進学
氏名 吉田 悠里
指導教員名 野尻秀昭

論文題目 イネの根における JA 誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構に関する研究

ファイトアレキシンは、植物が病原体などの感染を受けると生産される抗菌性の二次代謝化合物であり、イネにおいては、これまでに 17 種類のファイトアレキシンが同定されている。フラボノイド型のサクラネチンを除き、残りの 16 種は全て環状ジテルペン型の構造を持つが、その中でも momilactone および phytocassanes が主要なジテルペン型ファイトアレキシン(DP)として知られる。これらの生合成遺伝子はイネ染色体上においてそれぞれ遺伝子クラスターを形成し、ストレスに応答して一過的な発現誘導を示す。キチンエリクター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 は、momilactone および phytocassanes の各生合成遺伝子クラスターおよび生合成上流に位置するメチルエリスリトールリン酸(MEP)経路遺伝子の転写制御に関与し、DP 生産を誘導する転写因子としてイネの培養細胞で同定された。先行研究における ChIP-seq 解析により、MEP 経路で働く *OsDXS3* 遺伝子上流域に結合が見出される一方で、クラスター内の生合成遺伝子については、多くの遺伝子上流域で明白な結合が認められなかったことから、OsTGAP1 による DP 生産制御機構の解明には、その他の関連因子の探索を含む、より詳細な解析が必要とされた。また、先行研究ではイネ培養細胞を用いた解析が行われていたため、植物体における OsTGAP1 の生理機能や組織特異的あるいは誘導時特異的な制御の実態を明らかにする必要があると考えられた。

そこで、本研究においては、OsTGAP1 による DP 生産における転写制御機構の解明を目的として、野生型株および OsTGAP1 の発現が増強あるいは抑制されたイネ植物体の表現型を解析するとともに、クロマチン免疫沈降法

(ChIP)により、植物体における *OstGAP1* の標的遺伝子プロモーターへの結合性について検討を行った。さらに、*OstGAP1* とその相互作用因子による DP 生産制御への関与についても検討した。

イネ植物体での DP 生産制御における *OstGAP1* の機能

DP 生産での *OstGAP1* の重要性を検討するため、野生型株を用いて遺伝子発現解析、DP 蓄積量の定量解析を行った。その結果、*OstGAP1* は根で恒常的に高い発現レベルを維持しており、ジャスモン酸(JA)処理による根特異的な発現誘導を示した。この結果を支持するように、DP 生合成遺伝子(*OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7*)の発現量および DP の蓄積は、JA 処理により根でのみ増加した。これらの結果は、*OstGAP1* がイネの根における DP の生産誘導の制御に関与することを示唆する。そこで、*OstGAP1* の発現量が変化した *ostgap1 tos17* 挿入変異体および過剰発現体を用いてさらに解析を行ったところ、*OstGAP1* のノックダウンおよび過剰発現が *OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7* の発現量および DP 蓄積量に対し、それぞれ抑制的あるいは誘導的な影響を示すことを明らかにした。

次に、*OstGAP1* による遺伝子のプロモーター領域への結合を介した直接的な転写制御の可能性を検討するため、*OstGAP1* をエフェクターとしてこれらの生合成遺伝子の TGACGT-sequence(*OstGAP1* 結合配列)を含むプロモーター領域に対するレポーター遺伝子アッセイを行った。*OsDXS3* プロモーターについては、TGACGT-sequence 依存的に転写を活性化することが示された。一方でクラスター内の遺伝子については *OsKSL4* プロモーターについては *OstGAP1* による明瞭な転写活性が観察されたが、*OsKSL7* プロモーターについては強い影響が認められなかった。以上の結果から *OstGAP1* はイネの根における DP 生産において、*OsDXS3* および *OsKSL4* の転写を直接制御することで特に momilactone の生産に関与することが示唆された。

さらに、*OstGAP1* による直接的な転写制御の実態を明らかにするため、JA 処理有無の条件下での、根における *OstGAP1* の *OsKSL4* プロモーターに対する結合を、*OstGAP1* 特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降によって検討した。その結果、JA 未処理の定常時において、恒常的な *OstGAP1* の結合が認められたが、JA 処理による結合性の変化は認められなかった。

野生型株において JA 処理により *OsKSL4* の発現が顕著に誘導されることを考えると、クラスター遺伝子の発現誘導には *OstGAP1* の結合以外に *OstGAP1* の翻訳後修飾や *OstGAP1* と相互作用するタンパク質などの他の因子が関与していると予想される。

植物体の根における *OstGAP1* によるモミラクトン生産制御の生理的意義

OstGAP1 による根での momilactone 生産制御の生理的意義を明らかにするため、イヌビエとの混植実験によるアレロパシー活性試験を行い *OstGAP1* の発現量の変化がイネのアレロパシー活性に及ぼす影響を解析した。その結果、*ostgap1 tos17* 挿入変異体と混植したイヌビエでは野生型と混植した場合と比較して生育阻害効果の抑制がみられ、対照的に *OstGAP1* 過剰発現体と混植した場合には生育阻害効果の亢進を確認した。以上の結果から、*OstGAP1* はイネの根において JA 誘導的に機能し、momilactone 生産を制御することでイネのアレロパシー活性に寄与することが示された。

根における *OstGAP1* の生理的役割をさらに追究するため、JA 未処理時もしくは処理 24 時間における

ostgap1 tos17 挿入変異体と野生型株の根を用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い *OstGAP1* の下流標的遺伝子を探索した。その結果、野生型株で JA 誘導性を示した遺伝子のうち、*OstGAP1* 依存的に JA による発現誘導が抑制される遺伝子の中には、MYB 型、bZIP 型、Homeobox タンパク質などの制御因子や、シクロロム P450 やフェニルアラニン合成に関与する酵素などの二次代謝産物合成に関わる遺伝子が含まれていた。*OstGAP1* による DP 生合成遺伝子の転写制御はこれらの転写因子との協調的もしくは拮抗的な作用が存在している可能性や、DP 以外のアレロパシー化合物の根における生産も *OstGAP1* の制御下にある可能性が考えられる。

OstGAP1 とその相互作用因子(*OstTIF*)による DP 生合成遺伝子の発現制御

OstGAP1 による DP 生合成遺伝子のクラスターレベルでの転写制御メカニズムを明らかにするため、相互作用因子の機能解析を足掛かりとして、相互作用因子との協調作用を検討した。先行研究において yeast two-hybrid 法により *OstGAP1* の相互作用因子(*OstGAP1*-interacting Factor: *OstTIF*)として 10 種の候補遺伝子が得られている。このうち、これまでに転写制御に関与する可能性が示唆されている遺伝子 *OstTIF1*(ENT-domain タンパク質)、*OstTIF3* (serine/threonine kinase)、*OstTIF4* (Kinesin heavy chain) を解析対象として選抜した。まず BiFC (Bimolecular fluorescence complementation)法により植物細胞内での *OstGAP1* と各 *OstTIF* との相互作用を確認した。次に、*OstTIF* 単独もしくは *OstGAP1* との共導入において *OsDXS3*, *OsKSL4* および *OsKSL7* のプロモーター活性に対する影響を解析した。その結果、全ての *OstTIF* が単独で *OsDXS3*, *OsKSL4* プロモーターにおけるレポーター活性を上昇させることが示された。また、*OstTIF3* については *OstGAP1* との共導入により、*OsDXS3*, *OsKSL4* プロモーターの *OstGAP1* による転写活性化を亢進することが示された。

次に、*OstTIF* による遺伝子プロモーター活性への影響が、*OsKSL4* プロモーターへの *OstGAP1* の結合性の変化に起因する可能性を検討するため、イネプロトプラストー過剰発現系を用いて *OstTIF* および *OstTIF/OstGAP1* 過剰発現細胞における *OstGAP1* の結合を ChIP アッセイにより解析した。その結果、いずれの *OstTIF/OstGAP1* 過剰発現時においても *OstGAP1* の結合性に変化はみられなかった。このことから *OstTIF* と *OstGAP1* の相互作用による DP 生産制御には *OstGAP1* の結合性以外の要因の存在が考えられるため、ヒストン修飾や翻訳後修飾による活性状態の変化についても検討する必要がある。

総括

本研究では、イネの bZIP 型転写因子 *OstGAP1* の植物体における機能解析を行い、*OstGAP1* が根特異的に JA 誘導性の DP 生合成を制御する転写因子であることを示し、特に momilacton e 生産を制御することでイネのアレロパシー活性において重要な役割を担うことを示した。また、*OstGAP1* が *OsKSL4* プロモーター活性を促進すること、根においてプロモーター領域に恒常的に結合していることを明らかにした。さらに、*OstGAP1* とその相互作用因子が *OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7* のレポーター活性に影響を与えることを示した。一方で、*OstTIF* によるこれらの遺伝子プロモーター活性への影響は、*OstGAP1* の結合性の変化によるものでないことが ChIP アッセイによって示された。最近の研究で DP 生産に関与すると考えられる転写因子がいくつか報告されており、*OstGAP1* とこれらの

転写因子の関係性についても解析を進める必要があると考えられる。今後はこれらの転写因子および OsTF の詳細な機能解析を進めるとともに、ChIP-seq による生合成遺伝子プロモーターのヒストン修飾状況などクロマチンレベルの網羅的解析を行うことで、クラスター生合成遺伝子の転写制御機構を解明する足掛かりになると考えられる。

発表論文

Yoshida, Y., Miyamoto, K., Yamane, H., Nishizawa, Y., Minami, E., Nojiri, H., Okada, K.:

OsTGAP1 is responsible for JA-inducible diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice roots with biological impacts on allelopathic interaction. ***Physiologia Plantarum*** (2017) Vol. 161, No.4 , pp. 532-544

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	緒言	1
1-2	植物の基礎的病害抵抗性	2
1-3	イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン	3
1-4	植物における二次代謝産物の生合成酵素遺伝子クラスター	4
1-5	植物の病害抵抗性反応に関与する bZIP 型転写因子	6
1-5-1	bZIP 型転写因子	6
1-5-2	TGA ファクター	6
1-6	ジテルペン型ファイトアレキシン生産制御に関与する転写因子	9
1-6-1	O _s TGAP1	9
1-6-2	O _s bZIP79	9
1-6-3	DITERPENOID PHYTOALEXIN FACTOR(DPF)	10
1-6-4	WRKY 型転写因子	10
1-7	本研究の目的	12

第2章 イネ植物体でのファイトアレキシン生産制御における O_sTGAP1 の機能

2-1	緒論	18
2-2	材料及び方法	19
2-2-1	植物材料	19
2-2-2	植物体の生育方法	19
2-2-3	イネ植物体からのゲノムの単離	20
2-2-4	<i>ostgap1 Tos17</i> 挿入変異体および O _s TGAP1 過剰発現体のゲノタイピング	20
2-2-5	エリシター処理	21
2-2-6	イネ植物体からの total RNA 抽出及び cDNA の調製	21
2-2-7	定量的 RT-PCR (qRT-PCR)法による遺伝子発現解析	22
2-2-8	イネ植物体からのジテルペン型ジテルペン型ファイトアレキシンの抽出・定量	23
2-2-9	プロトプラストを用いた一過的発現系	24
2-2-10	ルシフェラーゼレポーターアッセイ	26

2-2-11	クロマチン免疫沈降	27
2-2-12	ChIP-PCR, ChIP-qPCR による <i>OsTGAP1</i> の結合性の評価	31
2-3	結果と考察	32
2-3-1	公共データベースによる <i>OsTGAP1</i> の発現プロファイルの解析	32
2-3-2	野生型植物における <i>OsTGAP1</i> の生理機能解析	32
2-3-3	<i>ostgap1 Tos17</i> 挿入変異株 を用いた解析	33
2-3-4	<i>OsTGAP1</i> 過剰発現体を用いた解析	36
2-3-5	一過的発現系を用いた <i>OsTGAP1</i> の転写制御機能解析	37
2-3-6	JA 誘導時の根における <i>OsTGAP1</i> のジテルペン型ファイトアレキシン 生合成遺伝子プロモーターへの結合性	38
第3章	植物体の根における <i>OsTGAP1</i> によるモミラクソン生産制御の生理的意義	54
3-1	緒論	55
3-2	材料及び方法	56
3-2-1	植物材料	56
3-2-2	アレロパシー活性評価	56
3-2-3	<i>ostgap1 Tos17</i> 挿入変異体の根を用いたトランスクリプトーム解析	56
3-3	結果と考察	59
3-3-1	<i>OsTGAP1</i> 発現量の変化がイネのアレロパシー活性に及ぼす効果の検討	59
3-3-2	<i>ostgap1 Tos17</i> 挿入変異体の根でのトランスクリプトーム解析	60
3-3-3	<i>OsTGAP1</i> 依存的な JA 誘導性遺伝子の Gene Ontology 解析	64
第4章	<i>OsTGAP1</i> とその相互作用因子 (<i>OsOsTIF</i>) による ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現制御	83
4-1	緒論	84
4-2	材料及び方法	85
4-2-1	植物材料	85
4-2-2	プラスミドの構築	85
4-2-3	Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay	86
4-2-4	組み換えタンパク質の発現	86
4-2-5	AlphaScreen によるタンパク質間相互作用解析	87
4-2-6	一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイ	87
4-2-7	一過的発現系を用いたクロマチン免疫沈降	88
4-2-8	ChIP-qPCR による <i>OsTGAP1</i> の結合性の評価	91

4-3	結果と考察	92
4-3-1	OstGAP1 と相互作用因子(OstTIF)の相互作用の解析	92
4-3-2	OstTIF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子に対する 転写活性化能の検討	94
4-3-3	OstTIF によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子プロモーター に対する OstGAP1 結合性の検討	96
第 5 章	総括と展望	106
	参考文献	108
	謝辞	125

略語表

bHLH	Basic helix-loop-helix
β -ME	β -Mercaptoethanol
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
bZIP	Basic-leucine zipper
cDNA	Complementary DNA
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
ChIP-chip	Chromatin immunoprecipitation with microarray technology
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation with next-generation sequencing technology
CIPK	Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ENT-domain	EMSY N-terminal domain
FDR	False discovery rate
GGDP	Ggeranylgeranyl diphosphate
GO	Gene ontology
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunoprecipitation
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBP	Maltose binding protein
MEP	Methylerythritol phosphate
mRNA	Messenger RNA
ORF	Open reading frame
OstGAP1	<i>Oryza sativa</i> TGA factor for phytoalexin productin 1
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
ppm	Parts per million

PR	Patogenesis-related
RI	Radioisotope
RiceXPro	The Rice Expression Profile Database
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
TIF1	OstGAP1 interacting factor 1
UBQ	Ubiquitin
UV	Ultraviolet

第 1 章

序論

1-1 緒言

現在人類は、急速な人口増加や、砂漠化などによる農耕地の不足に伴う食糧の枯渇という深刻な問題に直面しつつある。食料の中でも、特に穀類は人類に必須なエネルギー源であり、田畑における効率的な生産のため、化学肥料や農薬が多用されてきた。これに伴って生じた問題が土壌汚染をはじめとする環境汚染問題である。これを解決する環境保全型農業技術の一つとして、植物に内在する病害抵抗性をはじめとした環境適応能力の利用が挙げられる。植物が環境ストレスなどに応答して生産する二次代謝産物の生理学的存在意義は、病原菌や害虫に対する防御にあるものと考えられており、実際に抗菌活性や、摂食阻害および殺虫活性を示す二次代謝産物が多く知られている。またこれらの代謝産物は、医薬、農薬、香粧品、食品等の種々の産業分野において利用されている。植物は分化全能性をもち、細胞から個体への分化、個体から細胞への脱分化が可能のため、細胞培養法を用いて、有用二次代謝産物を高生産する培養細胞系の研究が行われている。こういった有用植物二次代謝産物の生合成機構を解明することは学術上重要であるだけでなく、耐病性育種や、難入手化合物の効率的生産系の開発といった、人類の抱える問題に対する解決策として期待される。

本研究では、主要穀物であるイネの病害抵抗性反応、および競合作物に対するアレロパシー活性を担う Specialized metabolite であるファイトアレキシンの生産制御機構の解明を目指したテーマに取り組んでいる。

本章では、はじめに植物の基礎的病害抵抗性反応について紹介し、植物におけるファイトアレキシン生産、その生産制御を担う bZIP 型転写因子についての過去の研究成果について記した。

1-2 植物の基礎的病害抵抗性

自然環境下において、植物はウイルス、細菌類、線虫などといった多様な病原体の攻撃による生物的ストレスや、乾燥、低温および重金属ストレスなどの非生物的ストレスに曝されている(Tian et al., 2003; Matyssek et al., 2005). 固着生物である植物は昆虫や動物のように自発的な移動手段を持たず、環境ストレスへの曝露から容易に逃れることが出来ないため、さまざまな構造的・化学的防御戦略を駆使することで自己を防御する能力を獲得してきた。病原体の感染に対して植物が抵抗性を発現する際は、病原体の初期認識、情報シグナルの変換と伝達、抵抗性反応に関連した遺伝子の発現誘導、過敏細胞死による病原体の封じ込み、および周辺細胞での抵抗反応誘導に働くタンパク質群(pathogenesis-related protein: PR タンパク質)や低分子性抗菌物質(ファイトアレキシン)の生産といった、一連の防御応答が働いている(Yoshikawa et al., 1983; Nicaise et al., 2009). 病原体由来の特定の物質が一連の防御応答を遺伝子レベルで誘導することがこの仮説を支持している。このように植物の生体防御反応を誘導する作用を持つ物質を総称してエリシターと呼び、重金属イオンなどの非生物起源のものから、タンパク質、脂質、オリゴ糖などの生物由来のものまで様々な分子がエリシターとして機能することが知られている(Ebel and Cosio, 1994; Koga et al., 1998; Umemura et al., 2002; Koga et al., 2006; Shimizu et al., 2008). また、紫外線(UV)などの物理的刺激によっても同様の抵抗性反応が誘導される。

一般的なモデルとして、感染部位もしくは感染部位周辺の細胞膜に存在するレセプターが、これらエリシターを認識することによって、植物における病原体感染の一次シグナルの認識が成立した後、病原体感染情報は二次シグナルにより感染部位から離れた細胞へと伝えられると考えられている(Lusso et al., 1999).

現在、病原体によって引き起こされる植物の自己防御応答機構については Fig. 1-1 で示したモデルが提唱されている。まず初めに、細胞膜上のレセプターにより病原体由来のエリシターが認識される。このようなレセプターとしてはキチンオリゴ糖のレセプターである CEBiP(Kaku et al., 2006)や AtLYK5(Liao et al., 2017), オリゴガラクトuron酸のレセプターである WAK(Kohorn et al., 2014), フラジェリン(flgl22)のレセプターである FLS2(Gomez-Gomez and Boller, 2000), 細菌の翻訳伸長因子でエリシター活性を持つ EF-Tu のレセプターである EFR(Zipfel et al., 2006)などが知られている。

また、多くの植物において細胞膜におけるイオンチャネルの活性化がエリシター処理後に観察されており、防御応答への関与が考えられている。エリシター受容後のごく初期に、細胞質中の Ca^{2+} 濃度が上昇し、pH が低下することが知られており(Nurnburger et al., 2004; Garcia-Brugger et al., 2006), この Ca^{2+} はエリシター応答において下流の抵抗性反応へとシグナルを伝達する二次シグナル物質として機能する。すなわち Ca^{2+} の存在下でカルモジュリンや calcium-dependent protein kinase などを経たシグナル伝達(Chiasson et al., 2005; Takabatake et al., 2007; Galon et al., 2008)により NADPH 酸化酵素が活性化され、Oxidative burst と呼ばれる急速な活性酸素種の発生が起こる(Torres et al., 2006). Oxidative burst も抵抗性反応の初期応答の一つで、これによって生産される活性酸素は病原体にとって有害となる(Legendre et al., 1993; Mehdy, 1994). さらに活性酸素もまた下流の抵抗性反応へとシグナルを伝える二次シグナル物質であると考えられており、細胞壁タン

パク質の架橋による病原体に対する物理的な抵抗性の強化や過敏感細胞死による病原体の封じ込み、防御遺伝子の活性化に関わると考えられている(Torres et al., 2006). また、サリチル酸(SA), ジャスモン酸(JA), エチレン(ET), アブシジン酸(ABA)といった植物ホルモンも病害抵抗性シグナル伝達経路において重要な役割を果たすことが報告されている(Bari et al., 2009). このようなエリシターはシグナルとして機能し, mitogen activated protein kinase (MAPK)の活性化などを介したシグナル伝達機構により核へと伝達され(Pitzschke et al., 2009), 最終的にファイトアレキシンの生産を含む様々な防御応答が引き起こされる. このようにして植物は自然界に存在する膨大な種類の病原菌を認識し, 効果的な防御反応を引き起こすことで自己を防御するような精巧な機構を発達させてきた(Boller, 1995; Bell, 1984; Dixon and Harrison, 1990).

エリシターによって引き起こされる様々な防御応答の一つとして, 植物ホルモンの一種である JA の生合成が誘導されることが多くの植物種において観察されている(Gundlach et al., 1992; Muller et al., 1993). JA は, 植物が腐生菌による感染などの生物的ストレスや, 重金属, 食害や傷害などの非生物的ストレスを受けたときに急速かつ多量に生合成され, 食害の進行や病原菌の感染を防ぐのに必要なさまざまな応答反応を誘導する働きがある. JA 処理した細胞において, ファイトアレキシンの生合成が促進されることがいくつかの植物種で観察されており(Gundlach et al., 1992), イネにおいても葉身および根への JA 処理によって抗菌性二次代謝物質であるファイトアレキシンの生産が誘導されることが示されている(Ogawa et al., 2016). このことは JA が防御関連遺伝子の発現において二次シグナル伝達物質として重要な役割を担っていることを示唆するものである.

1-3 イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン

ファイトアレキシンは病原体の感染による生物的な要因や UV 照射および重金属ストレスなどの非生物的な要因により, 植物が誘導的に合成し蓄積する低分子の抗菌性二次代謝物質 (specialized metabolite)の総称であり, 生体防御系の一環をなすと考えられている. テルペン(テルペノイド・イソプレノイド)やフラボノイド, アルカロイド等の抗菌性二次代謝産物は, 植物が生産する有機化合物の中でも特に多様性に富む化合物である. 中でもテルペン化合物は, これまでに多種多様な植物種において約 25,000 種類が単離されており, 自然界で最も複雑な化合物集団を形成している(Gershenzon and Dudareva, 2007). 双子葉植物のテルペノイド型ファイトアレキシンは, タバコ (*Nicotiana tabacum*), コットン (*Gossypium hirsutum*), サツマイモ (*Ipomoea batatas*), ニレ属 (*Ulmus americana*)などの系統学的に離れた種において存在が確認されている(Harborne, 1999). 一方で単子葉植物では, ヤシ, ラン, ショウガ, ユリ, タマネギおよび牧草に至るまで多様な種が存在するにもかかわらず, イネ科に属するイネ (*Oryza sativa*)およびトウモロコシ (*Zea mays*)でのみテルペノイド型ファイトアレキシンの存在が明らかになっている.

ファイトアレキシンは通常分子量 1000 以下の低分子化合物であり, 分子構造によりフラボノイド系, テルペン系などに分類される. イネにおいてはこれまでに 17 種類のファイトアレキシンが同定されている. フラボノイド型のサクラネチンを除き, 残りの 16 種は全て環状ジテルペン型である(Fig. 1-2). これらジテルペン型ファイトアレキシンは, 基本炭素骨格により, モミラクソン A, B (Cartwright

et al., 1977, 1981), ファイトカサン A-F(Koga et al., 1995, 1997; Yajima and Mori, 2000; Horie et al., 2015), オリザレキシン A-F(Akatsuka et al., 1983, 1985; Kono et al., 1984, 1985; Sekido et al., 1986; Kato et al., 1993, 1994), オリザレキシン S(Kodama et al., 1992), ent-10-oxodepressin(Inoue et al., 2013)の 5 つのタイプに分類されている。

これらの化合物は *E,E,E*-geranylgeranyl diphosphate(GGDP)を共通の前駆体として生合成される。まず、GGDP が 2 段階の環化反応を受け、それぞれのファイトアレキシンの基本炭素骨格であるジテルペン炭化水素が合成される。GGDP を前駆体としたファイトアレキシン生合成経路について、2 段階の環化反応に関わる 6 種全てのジテルペン環化酵素遺伝子(OsCPS2, OsCPS4, OsKSL7, OsKSL10, OsKSL4, OsKSL8)が我々及び共同研究者である山形大学の研究グループにより単離・同定されている(Otomo et al., 2004a, b, Nemoto et al., 2004, Cho et al., 2004)。その後、ジテルペン炭化水素は酸化反応などを経てファイトアレキシンへと変換されると考えられている。モミラクトン類およびファイトカサン類の生合成については、その酸化反応に P450 酸化酵素やデヒドロゲナーゼが関与していることが示されている(Shimura et al., 2007; Swaminathan et al., 2009; Wang et al, 2011; Wang et al, 2012; Schmelz et al., 2014)。

また、前駆体である GGDP の生合成段階についても解析がされている。一般に GGDP は methylerythritol phosphate(MEP)経路もしくはメバロン酸経路により生成するジメチルアリル 2 リン酸とイソペンテニル 2 リン酸が縮合を繰り返して生合成されるが、我々の研究グループにより、キチンエリシター処理時には MEP 経路の酵素遺伝子(OsDXS3, OsDXSR, OsCMS, OsCMK, OsMCS, OsHDS, and OsHDR)が転写誘導を受けること、エリシター誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積が DXS や DXR の活性の阻害剤処理により減少することから、ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成には MEP 経路が関与することが明らかとなっている(Okada et al., 2007; Vranova et al., 2013)(Fig. 1-3)。

1-4 植物における二次代謝産物の生合成酵素遺伝子クラスター

現在までに、高等植物において二次代謝産物に関与する一連の酵素遺伝子がクラスターを形成している例は 14 例報告されている(Nuetzmann and Osbourn et al., 2014; Boycheva et al., 2014)。植物における生合成遺伝子クラスターの最初の報告例は、トウモロコシ(*Zea mays*)における防虫・抗菌性化合物として知られるベンザキソジノンの 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)の生合成遺伝子クラスターである(Frey et al., 1997)。DIMBOA 生合成遺伝子クラスターには、トリプトファン合成酵素サブユニットのホモログをコードする Bx1, 4 つの P450 酸化酵素遺伝子 Bx2/3/4/5, グリコシル基転移酵素遺伝子 Bx8 の 6 つの遺伝子が存在しており、これらの遺伝子が 4 番染色体上において約 260 kb の領域に集中して存在していることが明らかになっている(Frey et al., 2003; von Rad et al., 2001; Jonczyk et al., 2008)。

カラスムギ属(*Avena* spp.)の複数の種においては、抗菌性化合物として知られるトリテルペンのアベナシン(avenacin)の生合成遺伝子クラスターが存在することが報告されている(Qi et al., 2004)。アベナシン生合成遺伝子クラスターには、テルペン環化酵素をコードする Sad1, P450 酸化酵素遺伝

子 Sad2, アシル基転移酵素遺伝子 Sad7, グリコシル基転移酵素遺伝子 UGT74H5 の 4 つの遺伝子が存在しており, 約 140 kb の領域に集中して存在していることが明らかになっている(Qi et al., 2004; Qi et al., 2006; Mylona et al., 2008; Mugford et al., 2009).

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)においては, トリテルペンであるタリアノール(thalianol)類およびマルネナール(marneral)類の生合成に関与する遺伝子クラスターがそれぞれ報告されている(Field and Osbourn, 2008; Field et al., 2011). これら 2 つの生合成遺伝子クラスターはそれぞれテルペン環化酵素遺伝子および P450 酸化酵素遺伝子からなっている. 2 つの遺伝子クラスターにはテルペン環化酵素遺伝子と CYP705A サブファミリーに属する P450 遺伝子が共通で存在する一方で, それぞれの遺伝子クラスター固有の P450 酸化酵素遺伝子(THAD, MRO)が存在している. このことから, シロイヌナズナにおけるこれらの 2 つの生合成遺伝子クラスターの進化的起源として, 祖先となる 1 つの遺伝子クラスターからゲノムのセグメント重複により 2 つの遺伝子クラスターが形成された後, それぞれの遺伝子クラスターが固有の遺伝子を獲得したことが考えられる(Field et al., 2011).

イネにおいては, モミラクソン生合成遺伝子(*OsCPS4*, *OsKSL4*, *CYP99A2*, *CYP99A3*, *OsMAS*)は 4 番染色体上にファイトカサン生合成遺伝子(*OsCPS2*, *OsKSL7*, *CYP71Z7*, *CYP76M5-8*)は 2 番染色体上に, それぞれ遺伝子クラスターを形成していることが明らかとなっている. 興味深いことに, これらの生合成遺伝子はキチンエリター処理などにより一過的に同調的な発現誘導を示す(Okada et al., 2011; Shimura et al., 2007; Swaminathan et al., 2009).

また, ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)・トウキビ(*Sorghum bicolor*)・キャッサバ(*Manihot esculenta*)において, 昆虫などの食害に対する防御物質であるシアン化グルコシドの生合成遺伝子がそれぞれクラスターを形成していることが最近報告された(Takos et al., 2011). これらの遺伝子クラスターは, 複数の P450 酸化酵素遺伝子とグリコシル化酵素遺伝子から形成されている. しかし, それぞれの遺伝子クラスターに含まれる遺伝子は異なるファミリーに属しており, これらの遺伝子クラスターは単純な水平伝播によって生じたものではないと考えられる. さらにナス科植物(トマト, ポテト)において病害抵抗性物質であるステロイドグリコアルカロイドの生合成遺伝子がそれぞれ 1 番染色体上にクラスターを形成し, ERF 型転写因子と bHLH 型転写因子により同調的な制御を受けている例が報告されている(Pablo et al., 2016). これまでに報告されている植物の生合成遺伝子クラスターについては, その生理機能が未知であるタリアノールおよびマルネナールを除き, 病虫害などに対する防御応答に関与する化合物の生産に関与する. これらのことから, このような防御物質の生合成遺伝子がクラスターを形成していることは, 植物が大勢を獲得する上で何らかの理由があると考えられる.

以上のように, 複数の植物種で生合成遺伝子クラスターの存在が報告されていることから, 植物における生合成遺伝子クラスターの存在は一部の属種に特別なことではなく, 植物全般にわたり一般的に存在する可能性が示唆されている.

1-5 植物の病害抵抗性反応に関与する bZIP 型転写因子

1-5-1 bZIP 型転写因子

bZIP 型転写因子は、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)からヒトまで全ての真核生物に存在する。植物ではこれまでにシロイヌナズナ(Jakoby et al., 2002), イネ(*Oryza sativa* L.)(Nijhawan et al., 2008), トウガラシ(Hwang et al., 2005), ポプラ(Ji et al., 2013), インゲンマメ(Astudillo et al., 2013), トウゴマ(*Ricinus communis* L.)(Jin et al., 2014), トウモロコシ(*Zea mays* L.)(Wei et al., 2012), ブドウ(*Vitis vinifera*)(Liu et al., 2014), キュウリ(*Cucumis sativus*)(Baloglu et al., 2014), オオムギ(*Hordeum vulgare* L.)(Pourabed et al., 2015), 最近ではキャッサバ(*Manihot esculenta*)(Hu et al., 2016)において bZIP 型転写因子の存在が確認されており, これらは病害抵抗性(Alves et al., 2013), 非生物学的ストレス応答(Fujita et al., 2005; Banerjee and Roychoughury, 2017), ホルモンシグナル伝達(Choi et al., 2000), エネルギー代謝(Baena-González et al., 2007; Sagor et al., 2016)のみならず, 開花(Abe et al., 2005)・老化(Smykowski et al., 2010)・苗成熟(Alonso et al., 2009)といった発生や成長段階における重要なプロセスに関与していることが示唆されている。bZIP ファミリーは配列相同性と機能的特徴から, シロイヌナズナにおいて A~I, S の 10 グループに分類されている(Jakoby et al., 2002; Nijhawan et al., 2008; Wei et al., 2012)。イネにおける bZIP 型転写因子については現在までに 89 種類報告されており(Nakagawa et al., 1995; Roychoughury et al., 2008), そのうち OsTGAP1 および OsbZIP79 を含む 16 種類が *Arabidopsis* のグループ D の bZIP ファミリーと TGA-like モチーフを共有している(Nijhawan et al., 2008)。

上で述べたように本研究の解析の対象である OsTGAP1 は group D に属する bZIP 型転写因子であり, 病害抵抗性に関与することが知られているシロイヌナズナやタバコの TGA ファクターと高い相同性を持つ(Okada et al., 2009)。TGA ファクターはホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成して, TGACG motif(TGACG(T/G))という配列を認識して DNA に結合し, 標的遺伝子の転写制御を行う転写因子として知られている(Jakoby et al., 2002)。

1-5-2 TGA ファクター

TGA ファクターは グループ D の bZIP 型転写因子に属しており(Jakoby et al., 2002), 全ての真核生物において発見されている。TGA ファクターは特徴的な bZIP ドメインと核移行シグナルを共有し, C 末端領域に 2 つの glutamine-rich region(Q1/Q2)を保持している(Gatz et al., 2013; Jakoby et al., 2002)。シロイヌナズナにおいては, 10 の TGA ファクターが同定されており, 配列相同性に基づいて 5 つの clade に分類されている : clade I : TGA1, および TGA4, clade II : TGA2, 5, および TGA6, clade III : TGA3 および TGA7, clade IV : TGA9 および TGA10, clade V : PERIANTHIA (PAN)および TGA8(Gatz., 2013)。これらの TGA ファクターは, ホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成し遺伝子上流のプロモーター領域に存在する, TGACG core モチーフを含むシスエレメントに特異的に結合し, 標的遺伝子の転写制御をおこなうことが明らかとなっている(Krawczyk, Thurow, Niggeweg, and Gatz et al., 2002; Lebel et al., 1998; Maier et al., 2009; Kesarwani et al., 2007)。

TGA ファクターの最初の報告は タバコにおいて *as-1* に結合する bZIP 型転写因子として単離された TGA1a であり, その主要な構造である bZIP モチーフが他の植物種の転写因子において高度に保存されていることが明らかとなった(Katagiri et al., 1989). シロイヌナズナにおける TGA ファクターは, 2 つの研究グループによって SA 誘導性の防御応答において必須な制御因子として発見された. Label らにより, SA もしくはその類縁体である 2,6-dichloroisonicotinic acid(INA)処理をしたシロイヌナズナ幼苗において, 防御応答関連タンパク質をコードする *pathogenesis-related-1(PR-1)* 遺伝子の活性化に必須な配列として TGACG-motif が発見され(Lebel et al., 1998), 次いで clade II の TGA ファクターが SA シグナルの主要制御因子である NONEXPRESSOR OF PR GENE 1 (NPR1)と相互作用することが示された(Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000; Kim et al., 2002). 一般的に, SA が蓄積すると細胞内の酸化還元(レドックス)状態が変化し, NPR1 が核内に流入することで TGA ファクターと相互作用し, 標的である防御関連遺伝子発現の co-activator として機能すると考えられている. *PR-1* の転写制御機構について, 当初は *PR-1* 遺伝子プロモーターに存在する TGACG-motif に NPR1 と結合し複合体を形成した TGA ファクターが結合することで co-activator である NPR1 と *PR-1* 遺伝子プロモーター間のインターフェースとして機能することで転写を誘導するという単純なモデルが提唱された. しかしその後の解析から, *PR-1* の転写制御機構はより複雑であることが明らかになりつつある. *PR1* 遺伝子プロモーター上には, 2 つの TGACG-motif(*LS5*: ネガティブエレメント, *LS7*: ポジティブエレメント)と W-box(*LS4*: ネガティブエレメント)が存在するが, 非誘導状態(SA 非存在下)においては, NPR1 による活性化を受けていない TGA2, および co-repressor である SUPPRESSOR OF NPR1, INDUCIBLE1(SNI1)が *PR1* 遺伝子プロモーター上の ネガティブエレメントである *LS5* に結合することで *PR-1* の転写は抑制されているが, 誘導状態(SA 存在下)では 核膜腔タンパク質によってモノマー化した NPR1 の核への移行が促進され, 核内で TGA ファクター(TGA1, TGA2, TGA3, TGA5, および TGA6)と 相互作用し *PR1* 遺伝子プロモーター上の ポジティブエレメントに結合する. これらの制御因子が転写因子複合体を形成し RNA polymerase II をリクルートすることで, co-activator として機能することが報告されている(Kesarwani et al., 2007; Rochon et al., 2006).

ここまで *PR-1* の転写制御機構について詳しく述べてきたが, TGA ファクターの転写制御機構については *PR-1* などのマーカー遺伝子以外の標的遺伝子についても解析が行われている. シロイヌナズナの Clade II TGA ファクターは, ACC 誘導性の APETALA2/ERF 転写因子の 1 つである OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR domain protein59(ORA59)のプロモーターに存在する TGACG-motif に結合することで *ORA59* の転写を活性化し, また, SA による転写抑制の重要な制御ハブを構成することが示唆されている(Zander et al., 2014). カキの DkTGA1 は CO₂ 処理により誘導され, エタノールとアセトアルデヒドの触媒酵素をコードする遺伝子である DkADH2, DkPDC2, および DkPDC3 のプロモーター活性を正に制御することで蓄積したアセトアルデヒドとタンニンの縮合を亢進し, カキの脱渋に関与することが示されている. また, DkPDC2 の制御に関しては ERF 型転写因子である DkERF9 と協調して働くことで転写活性を亢進することが示唆されている(Zhu et al., 2016). このように TGA ファクターによる標的遺伝子の転写

制御および病害抵抗性反応への関与については多くの知見が得られているが、その詳細な分子制御メカニズムは依然として不明な点が多く、シグナル伝達経路の全貌の解明にはさらなる解析が必要と考えられる。

このように PR-1 の転写制御および病害抵抗性反応への TGA ファクターの関与については多くの知見が得られているが、シグナル伝達経路の全貌の解明にはさらなる解析が必要と考えられる。

1-6 ジテルペン型ファイトアレキシン生産制御に関する転写因子

1-6-1 OsTGAP1

OsTGAP1 は、モミラクトン生合成遺伝子の 1 つである *OsKSL4* の上流域に存在するキチンエリシター応答性シスエレメントに結合し、*OsKSL4* の転写制御を行う転写因子として同定され (Okada et al., 2009), その後の OsTGAP1 過剰発現培養細胞を用いた解析により、モミラクトンおよびファイトカサンの各生合成遺伝子クラスター、および生合成上流に位置する MEP 経路遺伝子の転写制御を行うことでジテルペン型ファイトアレキシン生産全体を制御する転写因子として機能することが示されている (Okada et al., 2009; Miyamoto et al., 2014). さらに、先行研究において OsTGAP1 の結合領域の網羅的同定のために OsTGAP1 過剰発現培養細胞を用いた ChIP-seq 解析が行われ、その結果 MEP 経路で働く初発酵素遺伝子である *OsDXS3* 遺伝子の上流域に結合が見出された。この *OsDXS3* 上流域に存在する OsTGAP1 の結合領域についてさらに詳細に解析を行ったところ、この領域への OsTGAP1 の結合が *OsDXS3* の転写誘導に重要であることが明らかになった (Miyamoto et al., 2014)。このことから、OsTGAP1 が *OsDXS3* の転写を直接的に制御していることが明らかになった。一方、クラスター内の生合成遺伝子については、多くの遺伝子の上流域には明白な結合が認められず、遺伝子クラスター領域の外側や遺伝間領域に OsTGAP1 の強い結合が見られた。このことから、OsTGAP1 はすべてのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の上流域に結合し、直接転写制御を行っているのではなく、他のタンパク質と協調的に働き、タンパク質翻訳後修飾やゲノムの 3 次元構造を変えることでクラスター全体の転写を誘導するといった新規な制御機構が機能している可能性が示唆されている (Miyamoto et al., 2014)。

1-6-2 OsbZIP79

OsZIP79 は、先行研究において酵母ツーハイブリッドシステムを用いたスクリーニングによる OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索において候補遺伝子の 1 つとして同定された (Miyamoto et al., 2015)。OsbZIP79 は OsTGAP1 と同じ、groupD の bZIP 型転写因子であり、DNA 結合および二量体形成に関与する bZIP ドメイン、TGA ファクターに特有の TGA-like モチーフを持つ。公共データベース (RiceXPro) 上の OsbZIP79 および OsTGAP1 の配列情報をもとに BLAST のアラインメントによってアミノ酸配列の相同性を調べたところ、54% と高い相同性を示した。プルダウンアッセイおよび BiFC アッセイによって OsTGAP1 と OsbZIP79 の *in vitro*, *in vivo* での相互作用が確認された。さらに OsbZIP79 の転写活性化試験により OsbZIP79 が転写活性化能を持つことが示唆された (Miyamoto et al., 2015)。一方で、OsbZIP79 過剰発現培養細胞を用いた解析では、野生型と比較してキチンエリシター誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生合成関連遺伝子発現が抑制され、ジテルペン型ファイトアレキシン蓄積量が減少することが示され、OsbZIP79 がジテルペン型ファイトアレキシン生産における負の転写制御因子であることが示唆されていた (Miyamoto et al.,

2015) . その後, イネ植物体を用いた OsbZIP79 の詳細な解析が行われ, OsbZIP79 にはタンパク質モチーフの異なる複数のバリエーションが存在することが示され, これらのバリエーションが OsTGAP1 とタンパク質相互作用することで MEP 経路遺伝子 OsDXS3 の転写を協調的に制御している可能性が示唆されている (渋谷大地 修士論文, 2016) .

1-6-3 DITERPENOID PHYTOALEXIN FACTOR(DPF)

bHLH 型転写因子 DPF は, イネの遺伝子共発現データベース RiceFRIEND(Sato et al., 2013, <http://ricefrend.dna.affrc.go.jp/>) を用いた *in silico* 解析によりジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子(OsKSL4, OsKSL7, および OsCPS4)と共発現する転写因子として同定された(Yamamura et al., 2015). その後 DPF のノックダウン変異株および過剰発現体を用いた解析により, DPF の発現の抑制もしくは増強が, ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現およびジテルペン型ファイトアレキシン蓄積をそれぞれ抑制もしくは亢進することが示され, DPF が植物体におけるジテルペン型ファイトアレキシン生産の正の制御因子であることが示された. さらに野生型株を用いた解析により, DPF はイネ葉身において重金属ストレス(塩化銅), UV 曝露, およびイネいもち病菌感染によって誘導されるジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御することが示唆された. また, DPF をエフェクターとしたジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子プロモーターに対するルシフェラーゼレポーターアッセイにより, DPF がファイトカサン生合成遺伝子 OsCPS2 およびモミラクソン生合成遺伝子 CYP99A2 遺伝子上流に存在する N-box に結合し, これらの遺伝子の転写を活性化することが示されている(Yamamura et al., 2015).

1-6-4 WRKY 型転写因子

WRKY45 はイネにおいて SA シグナルにより発現を誘導され, いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の感染により SA シグナルにおける病害応答の中心的な働きをする転写因子として同定されている. SA シグナルは植物の全身獲得抵抗性(systemic acquired resistance:SAR)を誘導することが知られているが, イネにおける SAR のシグナル伝達系はシロイヌナズナやタバコとは異なり, SA シグナルの下流で WRKY45 および NPR-1 に制御される二つの系に分岐しており, WRKY45 と NPR-1 のそれぞれが抵抗性に関わる多数の遺伝子群の発現を制御している因子であることが示されている(Akagi et al., 2014). 最近の研究によってイネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成遺伝子や PR タンパク質など防御にかかわる重要な遺伝子の発現が WRKY II 型転写因子である WRKY62 に制御されていること, さらに, WRKY62 は WRKY45 の制御下にあることが明らかになった(Fukushima et al., 2016). また, その後の WRKY62 および WRKY4 をエフェクターとし, DPF 遺伝子プロモーター領域をレポーターとして用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより, WRKY45 は単独では DPF 遺伝子上流域にある W-box を介して DPF 遺伝子の転写を活性化するが, WRKY62 遺伝子を共導入すると, DPF プロモーターの転写活性化が亢進されること, 一方で WRKY62 過剰発現の条件では低下することが示された. これらの結果から, WRKY45-WRKY62 はヘテロ二量体を形成することで DPF 遺伝子に対する強力な転写活性化因子として機能する一方, WRKY62 ホモ二量体は転写抑

制因子として機能する事が示されている(Fukushima et al., 2016).

OsWRKY76 は SA シグナルや ABA 処理, および低温処理により誘導される WRKY 型転写因子であり, 核に局在し W-box 配列に結合することで転写抑制因子として機能することが示されている. また, OsWRKY76 過剰発現株を用いた解析により, OsWRKY76 の過剰発現がジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子, およびジテルペン型ファイトアレキシン生産を顕著に抑制することから OsWRKY76 がジテルペン型ファイトアレキシン生産における抑制因子であることが報告されている (Yokotani et al., 2013). 最近の研究において, WRKY62/WRKY76 が協調的にジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった. WRKY62/WRKY76 二重変異株において, モミラクトン生合成遺伝子 *OsCPS4*, *OsKSL4*, *CYP99A2*, *CYP99A3*, *OsMAS*, ファイトカサン生合成遺伝子 *OsCPS2*, *OsKSL7*, *CYP71Z7*, *CYP76M7*, *CYP76M8*, *CYP76M5*, *CYP76M6* の発現が野生型株と比較して抑制されていたが, *OsTGAP1* の発現には変化がなかったことから WRKY62/WRKY76 は *OsTGAP1* と独立してジテルペン型ファイトアレキシン生産制御に関与していることが示唆されている(Liang et al., 2017).

OsWRKY53 はイネの EST (expressed sequence tag)に対するマイクロアレイ解析により, キチンエリター応答性の WRKY 型転写因子として単離され過剰発現株を用いた解析からイネに耐病性を付与することが示されていた. また, 転写活性化試験から OsWRKY53 が転写活性化因子として機能することが示されていた(Chujo et al., 2007). その後の解析により OsWRKY53 のリン酸化が抵抗性発現に重要であること, mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナルの下流で OsWRKY53 がリン酸化されることが示された(Chujo et al., 2014). さらに, イネの MAPK シグナルである OsMKK4-OsMPK6 がジテルペン型ファイトアレキシン生産を正に制御すること(Kishi-Kaboshi et al., 2010), 擬似リン酸化 OsWRKY53 の過剰発現株においてモミラクトン生合成遺伝子およびモミラクトン蓄積量が増加することから, OsMKK-OsMPK6 によりリン酸化された OsWRKY53 が活性型となり, ジテルペン型ファイトアレキシン生産の転写活性化因子として機能することが示されている(Chujo et al., 2014).

1-7 本研究の目的

これまで述べてきたように, OsTGAP1 を介したジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構は未解明なままである. 先行研究において, OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の候補遺伝子が同定されている. これらの候補遺伝子のうち bZIP 型転写因子である OsbZIP79 がジテルペン型ファイトアレキシン生産制御において, OsTGAP1 と二量体を形成することで転写活性化に寄与することが示唆されている(渋谷大地 修士論文, 2016). また, エリシター処理後の野生型株においてジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子プロモーターのヒストン修飾状況が変化する可能性が示唆されている(宮本 博士論文)ことなどから, 相互作用因子とのタンパク質間相互作用の関与やその他の関連因子の探索を含む, より詳細な解析が必要とされた. 先行研究ではイネ培養細胞でのみ行われてきたため, OsTGAP1 による転写制御の実態を明らかにするためには植物体における OsTGAP1 の生理機能や組織特異的あるいは誘導時特異的な制御の詳細な解析の必要があると考えられた. そこで, 本研究においては, OsTGAP1 によるジテルペン型ファイトアレキシン生産における転写制御機構の解明を目的として, 野生型株および OsTGAP1 の発現が増強あるいは抑制されたイネ植物体の表現型を解析するとともに CHIP (Chromatin immunoprecipitation) により, 植物体における OsTGAP1 の標的遺伝子プロモーターへの結合性について検討を行った. さらに, OsTGAP1 とその相互作用因子によるジテルペン型ファイトアレキシン生産制御への関与についても検討した.

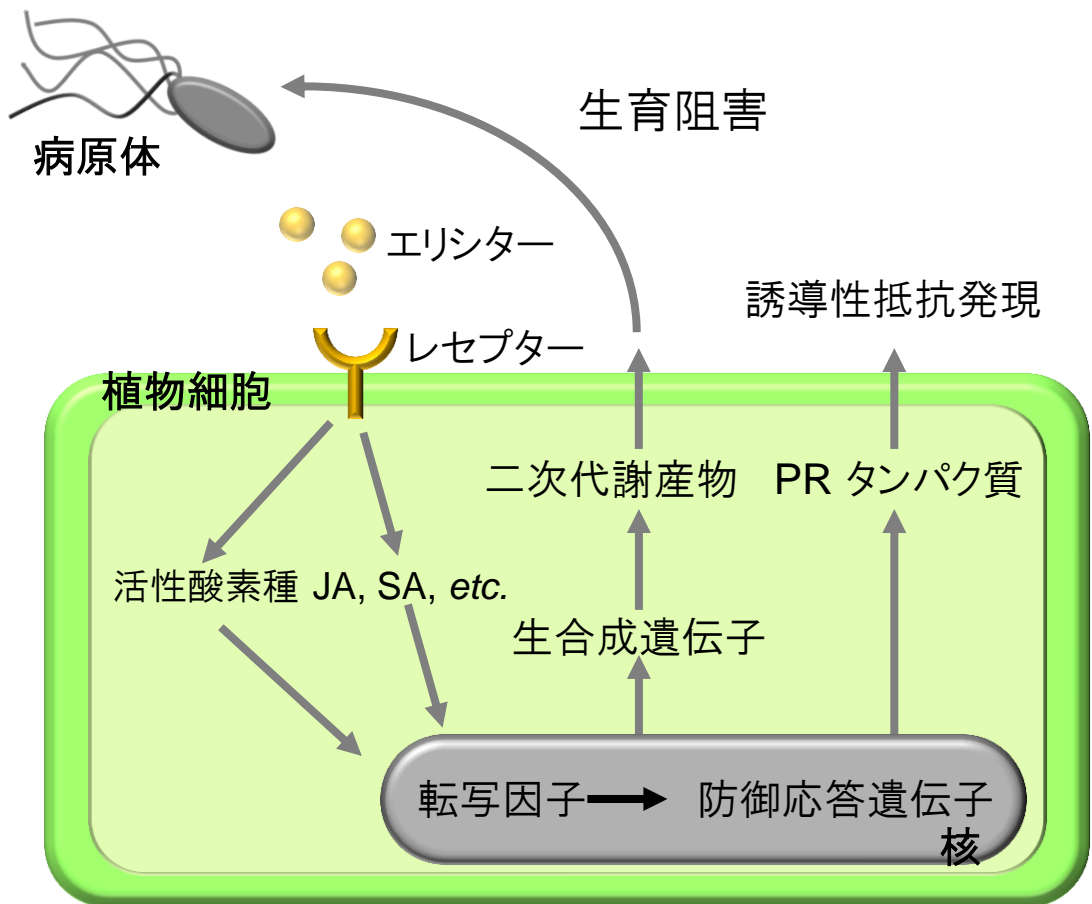


Fig.1-1. イネにおける病害応答制御ネットワークの模式図

JA : ジヤスモン酸
 SA : サリチル酸
 PR タンパク質 : Pathogenesis-related protein

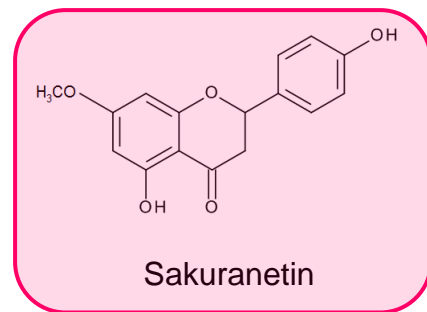
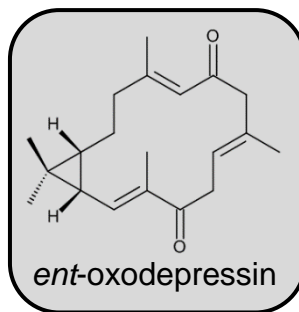
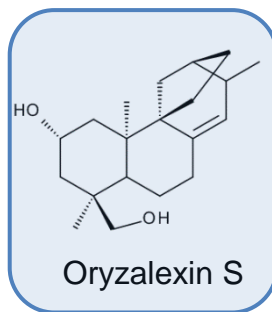
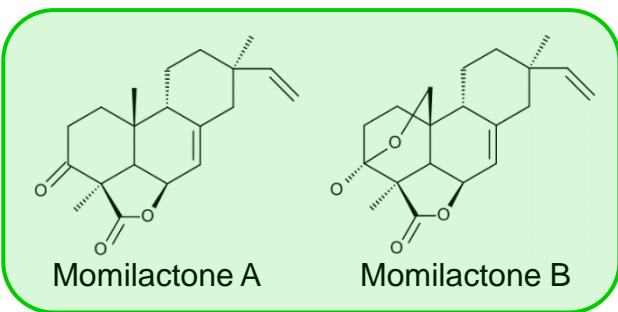
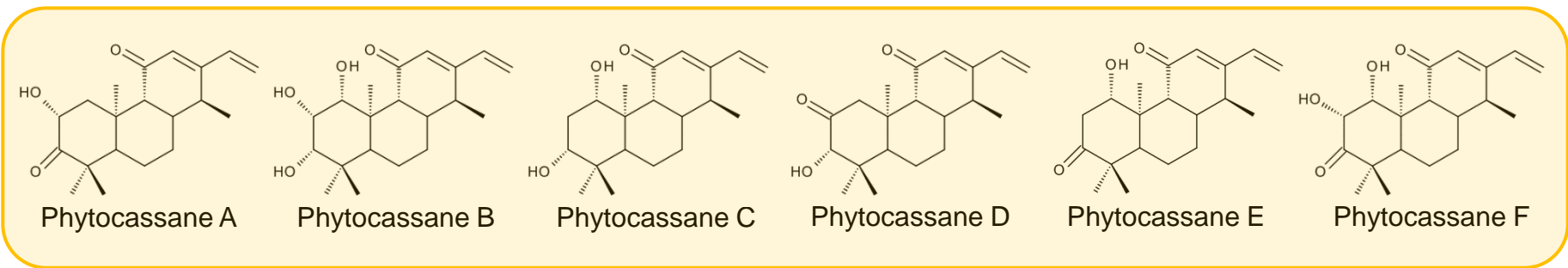
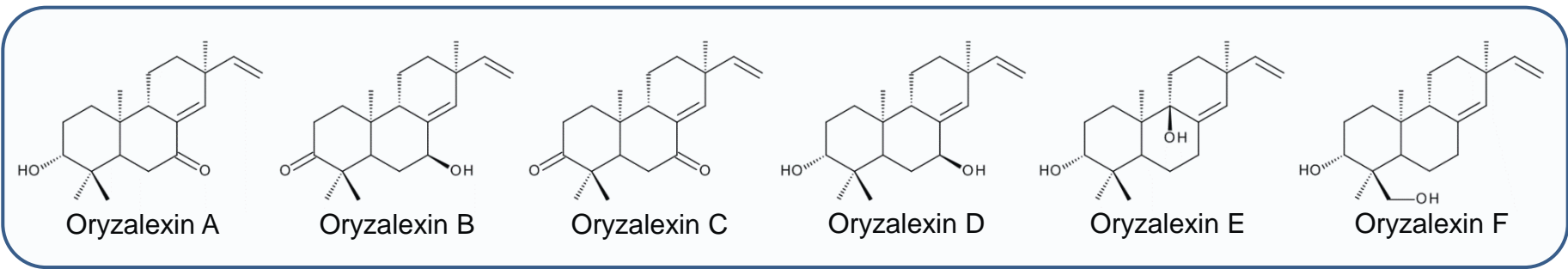


Fig.1-2. イネにおけるファイトアレキシン

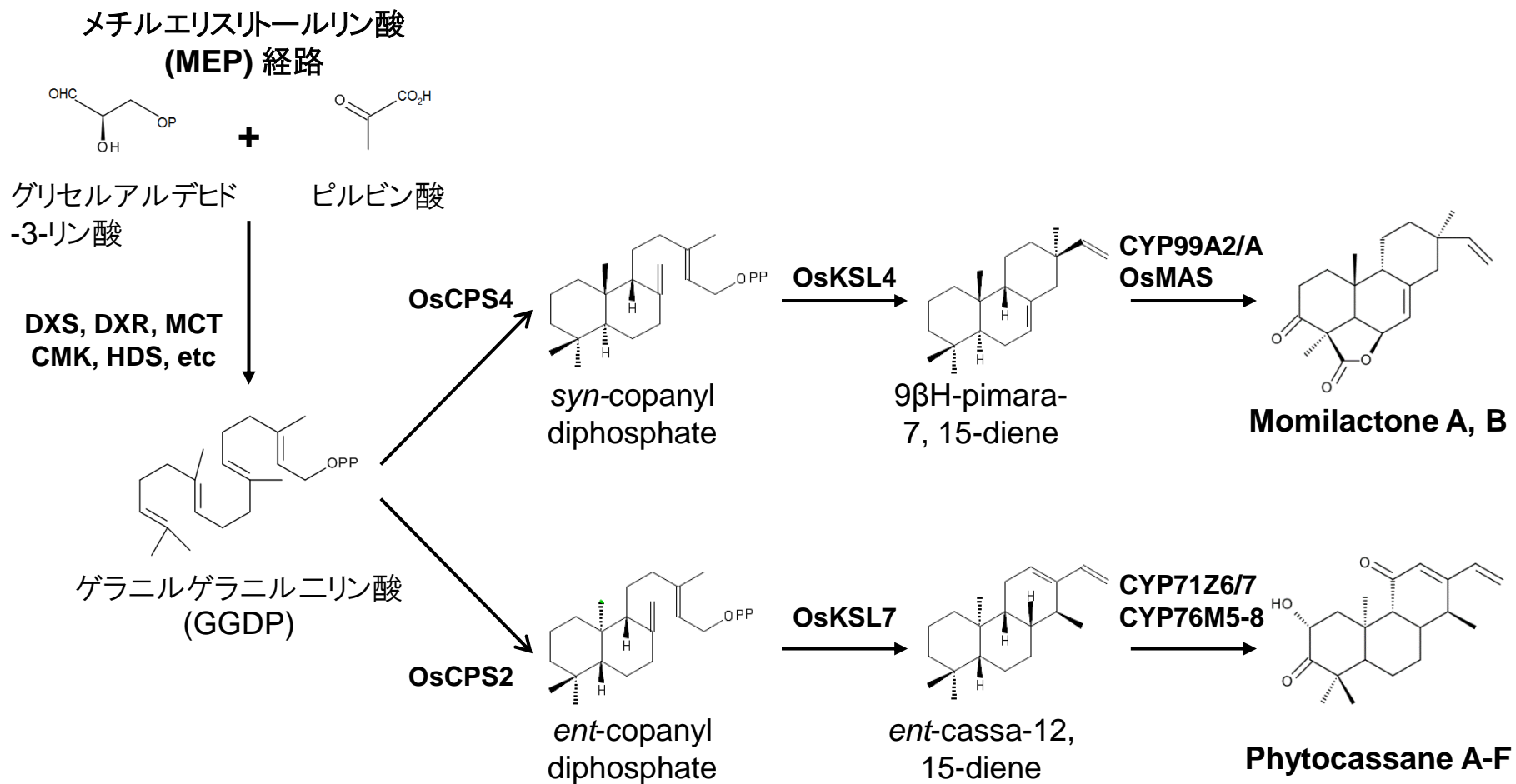
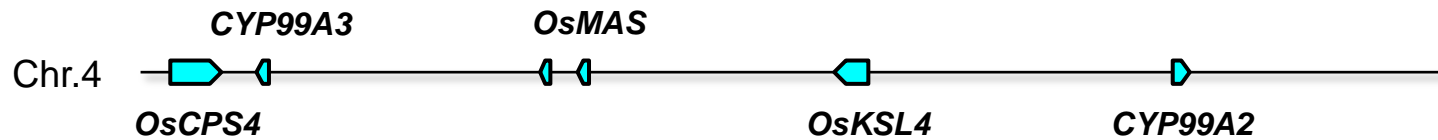


Fig.1-3. イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成経路

モミラクトン生合成遺伝子クラスター



ファイトカサン生合成遺伝子クラスター

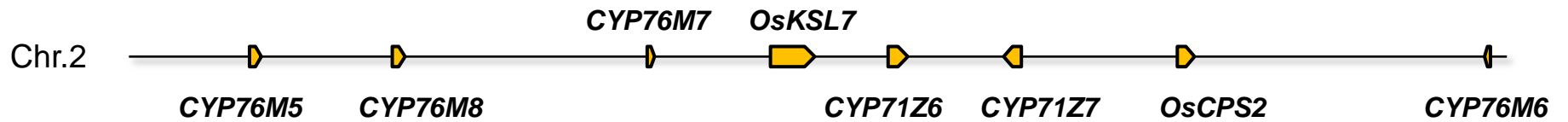


Fig.1-4. イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子クラスター

第 2 章

イネ植物体でのファイトアレキシン生産制御における OsTGAP1 の機能

2・1 緒論

序論で述べたように, OsTGAP1 はイネ培養細胞におけるキチンエリシター誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産において正の制御因子として機能することが示されていた. 培養細胞での OsTGAP1 の過剰発現は, ファイトアレキシン生合成に必要な上流経路から末端生合成経路を構成する多くの酵素遺伝子(MEP 経路遺伝子群, モミラクトン生合成酵素遺伝子クラスターおよびファイトカサン生合成酵素遺伝子クラスター内の遺伝子群)のエリシター誘導的な発現の増強を引き起こし, 結果として最終産物であるジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積量増加が認められる(Okada et al., 2009; Miyamoto et al., 2014). さらに, このような OsTGAP1 による転写制御における直接のターゲット(レギュロン)を探索するために OsTGAP1 過剰発現培養細胞を用いた ChIP-seq 解析が行われ, OsTGAP1 のゲノム上の結合領域が明らかになった. その結果, 一部のファイトアレキシン生合成遺伝子の上流域への結合が見られたものの, クラスター周辺領域を含む OsTGAP1 のゲノム上の結合領域から, OsTGAP1 によるファイトアレキシン生産における転写制御の全貌を説明するには至っていない. OsTGAP1 による転写制御機構の理解を深めるためには, 植物体における OsTGAP1 の生理機能を調べ, また, 組織特異的あるいは誘導時特異的なレギュロンを明らかにする必要があると考えられる. そこで, 本章では野生型および OsTGAP1 の発現が増強あるいは抑制されたイネ植物体のキャラクタリゼーションを進めた.

2-2 材料及び方法

2-2-1 植物材料

イネ野生型として *Oryza sativa* L. cv.Nipponbare を用いた.

ostgap1-Tos17 挿入変異株として, (独)農業生物資源研究所の Rice Mutant Panel Database (<http://tos.nias.affrc.jp/~miyao/pub/to17/>)から, OsTGAP1 の翻訳領域のうち第 2 エキソンへの *Tos17* 挿入が記載されている系統(NG3606)の種子を購入し, 実験に用いた. *Tos17* 挿入変異ホモ接合体は, 植物体の葉から得られたゲノム DNA をテンプレートとしてゲノム中の *Tos17* 挿入部位を外側からはさむように設計したプライマーおよび *Tos17* 内部配列特異的プライマーを用いた genotyping PCR により選抜した(方法は 2-2-4 参照). 得られたホモ接合体から次世代の種子を取得し, 以降の解析に用いた.

OsTGAP1 過剰発現株としては, 宮本の先行研究(未発表データ)で作出された OsTGAP1 過剰発現株を用いた. この過剰発現株には, ユビキチンプロモーターにより OsTGAP1 が恒常的に発現するコンストラクト(p2KG-OsTGAP1)が導入されており, マーカー遺伝子としてハイグロマイシン耐性遺伝子も導入されている. 植物体から抽出した total DNA をテンプレートとして PCR によるゲノタイピングを行い, ハイグロマイシン耐性遺伝子の増幅(方法は 2-2-4 に準ずる)を指標に形質転換体を選抜した.

2-2-2 植物体の生育方法

種子は, 粃すり機を用いてもみ殻を取り除き, 50 mL ファルコンチューブに入れ 70% エタノール中で軽く振盪した後, 1 分間静置した. エタノールを取り除いた後, 十分量の滅菌蒸留水で 5 回以上洗浄した. その後, 5% アンチホルミン中で 30 分間振とうさせて滅菌し, クリーンベンチ内で滅菌水を用いて洗浄した. 滅菌した種子を水寒天培地に播種し, インキュベーター(日本医化器械製作所 BIOTRON LH300)内で, 28 °Cで 14 時間明条件, 10 時間暗条件(約 65.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)下で播種後 6 日まで静置した. 水寒天培地は, 70% エタノールで消毒したプラスチックポットに 0.5% 寒天培地(nacalai tesque)を 150 ml ずつ分注し 121 °C, 20 分間オートクレーブ滅菌を行った後に固めたものを用いた. その後, イネ芽生えをフロートに移し穴に固定し水道水の入った容器に浮かべ, 16 時間 暗条件で順化し以降の実験に供した.

2-2-3 イネ植物体からのゲノムの単離

イネの total DNA の抽出は以下の手順で行った。植物試料(播種後 5~8 日目イネ葉, 先端 2~5 mm)を TPS buffer (100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.1 M KCl, 10 mM EDTA) 200 μ l が入った 1.5 ml チューブに加え, サンプルをチップの先で破碎した。95 $^{\circ}$ C, 10 分間インキュベート後, 15,000 rpm, 20 $^{\circ}$ C, 10 分間遠心を行い, 上清 150 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移した。回収した上清と当量の 2-プロパノールを加えてボルテックスした後に, 10 分間室温で静置し, 15,000 rpm 10 分間, 室温で遠心した。上清を捨て, 70% エタノールを 1 ml 加え, 15,000 rpm, 20 $^{\circ}$ C, 10 分間遠心を行った(洗浄)。洗浄の過程を再度繰り返した後, 上清を丁寧に取り除き, 沈殿を風乾した。エタノールを完全に除去した後, 50 μ l の TE buffer を加え, 56 $^{\circ}$ C で 5 分間静置後, ボルテックスによってゲノム DNA を溶解させ -20 $^{\circ}$ C で保存した。

2-2-4 *ostgap1 Tos17* 挿入変異体および *OsTGAP1* 過剰発現体のゲノタイピング

ゲノムをテンプレートにしてゲノム中の *Tos17* 挿入部位をはさむように設計したプライマー及び *Tos17* 内部配列特異的プライマーを用いて PCR を行った。使用したプライマー, 反応条件は以下に示すとおりである。

NG3606	Forward	5' - TTGGTTCAGTATCAGCAGCG -3'	(20 bases)
	Reverse	5' - AATCAAAGCGGATGTGTTCC -3'	(20 bases)
<i>Tos17</i> 3bd outer	Forward	5' - AGGTTGCAAGTTAGTTAAGA -3'	(26 bases)

*各反応に用いたプライマーセットは以下の通りである。

1. ゲノム用プライマー forward, reverse (WT ゲノム特異的増幅)
2. *Tos17* 3bd outer Fw + ゲノム用プライマー reverse (*Tos17* 挿入特異的増幅)

・PCR 条件

用いた酵素: KOD Fx Neo(TOYOBO)

98 $^{\circ}$ C, 2 min \rightarrow [98 $^{\circ}$ C, 10 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 15 s \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 30 s] x 35 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 7 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C, ∞

ゲノタイピングによる過剰発現株の選抜は、ゲノムをテンプレートとした PCR によりハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)を増幅した後、アガロースゲル電気泳動に供し、1026 bp の増幅断片を確認する事を行った。使用したプライマー、反応条件は以下に示すとおりである。

HPT Forward 5' - ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTC -3' (33 bases)
HPT Reverse 5' - CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG -3' (28 bases)

・PCR 条件

用いた酵素: KOD Fx Neo(TOYOBO)

98 °C, 2 min→[98 °C, 10 s→60 °C, 30 s→68 °C, 35 s] x 30→68 °C, 7 min→4 °C, ∞

2-2-5 エリシター処理

播種後 6 日目のイネ幼苗をフローターを用いて水道水に浮かべ、暗所、28 °Cで 16 時間静置し、順化した。その後、7 日目の幼苗に対し、500 μM のジャスモン酸(JA)溶液(0.035% DMSO)あるいは 500 μM 塩化銅水溶液を根への浸漬によって処理した。JA 処理サンプルに対する未処理サンプル(Mock)は 0.035% DMSO 水溶液を同様に処理することで、比較した。葉身に対する JA 処理は、播種後 6 日目のイネの葉身をハサミを用いて切片化し、傷害による JA の誘導等を解除するため、滅菌水道水に浮かべ暗所、28 °Cで 16 時間順化し、その後 500 μM JA 溶液で浸漬処理を行った。葉身切片は 5 片で 1 連としてサンプリングをした。塩化銅水溶液はあらかじめ 500 mM の水溶液を、JA 溶液は 1 M の DMSO 溶液をそれぞれ調製しておき 4 °C で保存していたものを適宜希釈して用いた。

2-2-6 イネ植物体からの total RNA 抽出及び cDNA の調製

Total RNA はエリシター未処理および処理後のイネ幼苗から抽出した。イネ幼苗の地上部(Shoot)もしくは根(Root)をステンレスビーズ入りの凍破碎用 2 ml チューブに 1 個体ずつサンプリングし、直後に液体窒素を用いて凍結後にマルチビーズショッカー(YASUI 機器)を用いて粉末状になるまで破碎した。その後 Maxwell 16 LEV Plant RNA Kit(Promega)を用い、付属の説明書に従って total RNA を抽出した。得られた total RNA 250 ng を鋳型とし、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)を用いて、付属の説明書に従い cDNA 合成を行った。以後、特記しない限り total RNA 抽出及び cDNA の調製は上記の方法に従って行った。

2-2-7 定量的 RT-PCR (qRT-PCR)法による遺伝子発現解析

イネの根および葉から調製した cDNA をテンプレートとして qRT-PCR を行った。

また, qRT-PCR において検量線を作成するために, 検量線用のサンプルを調製した。下記に示した解析用の各遺伝子及びユビキチン遺伝子(UBQ)のプライマーを用いて, 各種 cDNA を鋳型とした PCR を行い, それぞれのバンドが単一であることを確認した。その後, アガロースゲルから目的の DNA 断片を切り出し, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製し, 検量線用サンプルとした。このサンプルを 10 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM, 1 fM, 100 aM に希釈し, 6 点で検量線を作成した。

qRT-PCR は, Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用い, 検出は ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems)により行った。内部標準として 恒常的に発現している UBQ も同様に増幅させ, サンプルの値をこの内部標準(UBQ)の発現量の値で割ることにより発現レベルを評価した。以後, qRT-PCR については反応条件を含め, この方法に従って行った。用いたプライマーの配列及び反応条件は以下の通りである。

・用いたプライマー

<i>OsTGAP1-CDS</i>	Forward	5'- GGTCAGAATGGGGGCGTA -3'	(18 bases)
	Reverse	5'- TCCAGAACTACTTGGGGAATTT -3'	(22 bases)
<i>OsTGAP1-3'UTR</i>	Forward	5'- ATGGCCAGTGAAGGATGAAG -3'	(20 bases)
	Reverse	5'- CTCTTGTGCCACATCAGAA -3'	(20 bases)
<i>OsDXS3</i>	Forward	5'- GGGGGAGGTTCCAGTAAGAA -3'	(20 bases)
	Reverse	5'- TCATTTTGCATTTGGAAGCA -3'	(20 bases)
<i>OsKSL4</i>	Forward	5'- CGCCTTTGTAAGTCTAAGGTA -3'	(21 bases)
	Reverse	5'- ACGTAAAAGGCTTGTATATC -3'	(20 bases)
<i>OsKSL7</i>	Forward	5'- TTCATCTCTGTCACTTTTCTTTT -3'	(25 bases)
	Reverse	5'- ATCCAACGAAGTCATCCAC -3'	(20 bases)
<i>UBQ</i>	Forward	5'- TCCGAGAGATGGGTTTCATC -3'	(20 bases)
	Reverse	5'- GCCAAGATTGCCAAGAAGAC -3'	(20 bases)

・<qRT-PCR 反応液組成>

Power SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
Primers (5 µM)	2 µl
Template cDNA	1 µl
dH ₂ O	up to 20 µl

<PCR 反応条件>

50 °C, 2 min → 94 °C, 10 min → [94 °C, 30 s → 52 °C, 30 s → 72 °C, 30 s]×40

2-2-8 イネ植物体からのジテルペン型ジテルペン型ファイトアレキシンの抽出・定量

イネ幼苗の地上部および根からのジテルペン型ファイトアレキシン抽出には、エリシター処理前および処理後各経時点において回収したサンプルを用いた。1 個体の地上部および根の重量をそれぞれ電子天秤で測定し、サンプルを 3 mL のジテルペン型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, 79:13.9:7:0.1 (v/v/v/v))に浸漬し、4 °C, 24 時間以上静置し、その後ボルテックスにて激しく攪拌した後、遠心し上清を回収することで行った。

定量には抽出サンプルの内 5 µl を用い LC-MS/MS 分析に供した。定量は、各ジテルペン型ジテルペン型ファイトアレキシンの標品を混合した Standard サンプル(Phytocassane A, B, C, D, E 及び Momilactone A, B, 各 0.01 ppm) を測定し得られたピーク面積との比で計算した。HPLC および MS/MS の条件は以下に示す通りである。

・<HPLC 条件>

Column	PEGASIL ODS 2 φ ×150 mm (Senshu Scientific)
展開溶媒(単一相)	70% アセトニトリル, 0.1 %酢酸
移動相流速	0.2 ml/min

・<MS/MS 条件>

MS/MS	PE. API3000
イオン化プローブ	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
10	10	4	5000	400	150	10

(固有パラメーター)

	Q1	Q3	DP	FP	CE	CXP
Phytocassanes A,E,D	317	299	26	120	15	26
Phytocassane B	335	317	41	180	21	30
Phytocassane C	319	301	31	140	17	18
Momilactone A	315	271	41	190	25	12
Momilactone B	331	269	51	230	25	20
Sakuranetin	287	167	46	200	37	14

2-2-9 プロトプラストを用いた一過的発現系

プロトプラストは播種後 9 日から 12 日のイネ植物体から単離した。Millipore® Stericup™ filtration system 0.22 μm でフィルター滅菌した 20 ml の酵素処理液を真空ポンプにより脱気し気泡を完全に除去した。播種後約 9-12 日目の 30 – 40 個体のイネの葉鞘もしくは根を新しいメスで刻んで切片化し、酵素処理液に浸した後、脱気→常圧に戻す操作を三回以上繰り返し気泡を完全に除去した。振盪機(タイテック)にセットし 25 °C, 80 rpm で 2 時間振盪培養することでプロトプラストを単離した。得られたプロトプラスト懸濁液は 70 μm Cell Strainer (Nunc)で濾過し、50 mL ファルコンチューブに回収した。反応に使用したチューブに残ったプロトプラストを回収するためにチューブを 20 mL の W5 buffer. で洗浄し、前述の 70 μm Cell Strainer (Nunc)で濾過し、プロトプラスト溶液を回収した 50 mL ファルコンチューブに回収後、穏やかに懸濁した。W5 buffer による洗浄を行った後、スウィング式ローターを用いてプロトプラストを回収し、血球計算版で細胞数を計測後、 $2.0 - 2.5 \times 10^6$ cells/mL になるように MMg solution を加えプロトプラスト溶液を調製した。使用した溶液の組成は以下に示す通りである。

・<試薬組成>

200 mM MES (pH5.7)

MES (42.65 g) adjust with KOH (pH 5.7)

dH₂O up to 1000 mL

1 M CaCl₂

CaCl₂·2H₂O 73.51 g

dH₂O up to 500 mL

Digestion buffer

<u>Reagent</u>	<u>usage</u>	<u>Final</u>
Mannitol	54.65 g	600 mM
KCl	0.75 g	20 mM
1 M CaCl ₂	5 mL	10 mM
<u>200 mM MES (pH 5.7)</u>	<u>50 mL</u>	<u>20 mM</u>
dH ₂ O		up to 500 mL

W5 buffer

<u>Reagent</u>	<u>usage</u>	<u>Final</u>
5 M NaCl	30 mL or 8.77g	150 mM
1 M CaCl ₂	125 mL	125 mM
<u>KCl</u>	0.37 g	5 mM
<u>200 mM MES (pH 5.7)</u>	<u>10 mL</u>	<u>2 mM</u>
dH ₂ O		up to 1000 mL

MMg solution

<u>Reagent</u>	<u>usage</u>	<u>Final</u>
Mannitol	36.43 g	400 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	1.53 g	15 mM
<u>200 mM MES (pH 5.7)</u>	<u>10 mL</u>	<u>4 mM</u>
dH ₂ O		up to 500 mL

* 上記 5 試薬はフィルター滅菌後, 4°C 保存

Enzyme solution (for 30 seedlings)

Cellulase "onozuka" RS (Yakult)	0.20 g	(final 1%)
Macerozyme R10 (Yakult)	0.10 g	(final 0.5%)
<u>BSA (粉末)</u>	<u>0.02 g</u>	<u>(final 0.1%)</u>

Digestion buffer up to 20 ml

* 用時調製し, 気泡がなくなるまで脱気してから使用

PEG 法による遺伝子導入では, $2.0 - 2.5 \times 10^6$ cells のプロトプラストに対し, 各種解析に至適な量のプラスミドを導入するよう溶液を調製した後, 等量の PEG solution を加え vortex にて 900 rpm → 1500 rpm 5 sec → 900 rpm で混合し 28 °C, 暗所で 30 分間静置した. その後, W5 buffer による洗浄を行い, 回収したプロトプラストを 1 mL の W5 buffer に懸濁し 28 °C, 暗所で 24 時間インキュベートし, その後の解析に用いた. 以後, 特記しない限りは プロトプラスト単離および PEG 法による一過的遺伝子導入は上記の方法に従って行った. 使用した溶液の組成は以下に示す通りである.

・<試薬組成>

PEG solution

Reagent	usage	Final
PEG 4000 (Fluka 製品)	16 g	40% (w/v)
Mannitol	1.44 g	0.2 M
1 M CaCl ₂	4 mL	0.1 M
UPW	22.4 mL	(up to 40 mL)

* 調製後, 室温で保存し, 2 週間以内に使用

2-2-10 一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイ

レポータージーンの活性評価法としてデュアルルシフェラーゼ法を用いた. この評価法はホタル由来のルシフェラーゼ活性とウミシイタケ由来のルシフェラーゼ活性の異なる検出波長(ホタル:565 nm, ウミシイタケ:480 nm)を利用することで, 1 回の分析でプロモーター活性の数値を標準化できる利点がある.

エフェクターコンストラクトには, 当研究室の先行研究において作成された *OsTGAP1* 過剰発現用ベクター(pUbi_*OsTGAP1_Tnos*) (Miyamoto et al., 2014), およびコントロール用に作成された β -glucuronidase (*GUS*)過剰発現用ベクター(pUbi_*GUS_Tnos*) (Chujo et al., 2014)を使用した. これらのコンストラクトはそれぞれ, トウモロコシのポリコピキチンプロモーター制御下で *OsTGAP1* および *GUS* 遺伝子を発現するベクターである. ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子 *OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7* の上流の *OsTGAP1* 結合配列(TGACGT)を含むプロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子 (FLUC) を連結したコンストラクト pGL3-DXS3p-2k (Miyamoto et al., 2014), pGL3-KSL4p-2k (Okada et al., 2009)および pGL3-KSL7p-1k をレポーターコンストラクトとして用いた. リファレンスコンストラクトにはウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (RLUC) 過剰発現ベクター (pUbi_*RLUC_Tnos*)を使用した. 播種後 10 日目のイネ幼苗から単離したプロトプラスト 2.0×10^6 cells に対し, エフェクターコンストラクト 3 μ g, レポーターコンストラクト 3 μ g, リファレンスコンストラクト 1.5 μ g を PEG 法により遺伝子導入し, 暗所で 28 °C, 24 時間インキュベートした. その後遠心操作によってプロトプラストを回収し, 液体窒素で細胞を凍結し, ルシフェラーゼ活性測定まで -80 °C で保存した.

ルシフェラーゼアッセイは, Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, U.S.A)のプロトコールに従って行った. 回収したイネプロトプラストを, 1 サンプルあたり 100 μ l の 1 \times Passive Lysis Buffer に懸濁し, 細胞を破碎後, 15,000 g, 30 分間, 4 $^{\circ}$ Cで遠心し, 上清を酵素液とした. このうち 10 μ l を活性測定に供し, ルミノメーター Centro LB960(Berthold, Japan)を用いて測定し, 内部標準(ウミシイタケルシフェラーゼ)による補正值で活性を評価した.

2-2-11 クロマチン免疫沈降

クロマチン免疫沈降には播種後 7 日目の野生型株の根を用いた. 約 1 g (30 個体)のイネの根を 50 mL ファルコンチューブにサンプリングし, 1% ホルムアルデヒドを含む Cross-link buffer 30 ml 中で真空にて 40 分間架橋反応を行った. 2.5 ml の 2 M glycine を加え, 10 分間インキュベートし架橋反応を停止させた後, 40 ml の滅菌蒸留水で 5 回以上洗浄し, 水気を切った後直ちに液体窒素で凍結させた. クロスリンク後のサンプルに液体窒素を加えながら乳鉢, 乳棒を用いて粉末状にし, 10 ml の Extraction buffer I を加え懸濁した後, 8 本の 2 ml チューブに分注して 2,900 x g, 4 $^{\circ}$ C, 20 分間遠心し上清を取り除いた. ペレットに 750 μ l の Extraction Buffer 2 を加えて懸濁後, 1,2000 x g, 4 $^{\circ}$ Cで 10 分間遠心し, 上清を取り除いた. ペレットに 200 μ l の Extraction Buffer 2 を加えて再懸濁した後, 600 μ l の Extraction Buffer 3 の上に重層し, 16,000 x g, 4 $^{\circ}$ Cで 1 時間遠心し, 上清を取り除いた. 得られたペレットに 75 μ l の Nuclei Lysis Buffer を加え懸濁後にサンプルを 1 本のチューブにまとめ, 遠心によって気泡を取り除いた. その後, QSONICA Q125 の CL-18 probe (ϕ 3.2 mm)を用いて, amplitude 30% , [10 sec sonicate/ 30 sec off] x 15 回] x 10 回 の条件で DNA を断片化した. 15,000 x g, 4 $^{\circ}$ Cで 5 分間の遠心操作を行い, 上清をクロマチン DNA 溶液として回収した.

225 μ l のクロマチン DNA 溶液に対して 1.2 ml の ChIP-Ab binding buffer, および洗浄を行った Dynabeads-Protein G (Invitrogen)を 25 μ l 加え, 4 $^{\circ}$ C, 1 時間, ローテーターでインキュベートした. Dynabeads を除去した後, 上清を新しい 1.5 ml チューブに移し, 11 μ l は Input として回収した. 上清 800 μ l に対して OTGAO1 抗体 5 μ l もしくはコントロールとして Normal rabbit IgG を加えた後で, 洗浄した Dynabeads を 25 μ l 加え, 4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした. その後, Dynabeads を回収し, Low Salt Wash Buffer, High Salt Wash Buffer, LiCl Wash Buffer, TE Buffer の順で洗浄し, 再度 TE Buffer で 2 回洗浄した後, 65 $^{\circ}$ Cで保温した 100 μ l の Elution Buffer を加えて 5 分毎にボルテックスを行い計 15 分間インキュベートすることで抗体と DNA の複合体を溶出した. 再度溶出操作を行った後, 終濃度 200 mM となるよう 5M NaCl を加え, 65 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし, タンパク質と DNA を解離した. フェノール・クロロホルム処理, クロロホルム処理によりタンパク質を除去した後, QIAquick gel purification kit (Qiagen)により DNA 断片を精製した. 回収した精製 DNA 断片はその後の PCR 解析に用いた. 使用した溶液の組成は以下に示す通りである.

·<試薬組成>

Crosslink buffer

Reagent	final
37% formaldehyde	1%
2 M sucrose	400 mM
1 M Tris-HCl pH8.0	10 mM
0.1 M Na butyrate	1 mM
100 mM PMSF	0.1 mM
25xPI	1x
14.4 M 2ME	5 mM
dH2O	30 ml/sample

Extraction buffer I

Reagent	final
2 M sucrose	400 mM
1 M Tris-HCl pH8.0	10 mM
0.1 M Na butyrate	1 mM
14.4 M 2ME	5 mM
100 mM PMSF	0.1 mM
25xPI	0.1x
dH2O	10 ml/sample

Extraction buffer II

Reagent	final
2 M sucrose	250 mM
1 M Tris-HCl pH8.0	10 mM
10% Triton X-100	0.01%
0.1 M Na butyrate	1 mM
14.4 M 2ME	5 mM
100 mM PMSF	0.1 mM
25xPI	0.1x
dH2O	

Extraction buffer III

Reagent	final
2 M sucrose	1.7 M
1 M Tris-HCl pH8.0	10 mM
10%Triton X-100	0.0015%
0.1 M Na butyrate	1 mM
14.4 M 2ME	5 mM
100 mM PMSF	0.1 mM
25xPI	0.1x
dH2O	

Nuclei lysis buffer

Reagent	final
1 M Tris-HCl pH8.0	50 mM
0.5 M Na ₂ EDTA pH8.0	10 mM
20% SDS	0.004%
100 mM PMSF	0.1 mM
25xPI	1x
dH2O	

ChIP Ab-binding buffer

Reagent	final
1 M Tris-HCl pH8.0	50 mM
0.5 M Na ₂ EDTA pH8.0	1 mM
10%Triton X-100	0.001%
5 M NaCl	150 mM
100x (10mg/ml) BSA	10 ug/ ml
dH2O	

Wash buffer

Reagent	Low Salt Wash buffer	High Salt Wash buffer	LiCl Wash buffer
	final	final	final
1 M Tris	20 mM	20 mM	20 mM
500 mM EDTA	2 mM	2 mM	1 mM
10% Triton	1%	1%	0
20% SDS	0.1%	0.1%	0
5M NaCl	150 mM	500 mM	0
5M LiCl	0	0	250 mM
10% NP40	0	0	1%
10% Na deoxycholate	0	0	1%
dH2O			

ChIP elution buffer

Reagent	final
1M NaHCO3	0.1 M
20% SDS	0.01%
dH2O	

2-2-12 CHIP-PCR, ChIP-qPCR による OsTGAP1 の結合性の評価

2-2-13 により得られた DNA 断片をサンプルとした。

PCR による半定量的解析は ExTaq HS (TaKaRa) を用いて付属の説明書に従って行った。定量 PCR は GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega) を用いて付属の説明書に従って行った。

以下に用いたプライマーの配列および PCR 条件に示す。

・半定量的 PCR に用いたプライマー

KSL4p TGACGT Forward 5' - gcagactgcactgattga-3' (20 bases)
Reverse 5' - tccagctttattgccgact-3' (20 bases)

・PCR 条件

用いた酵素: ExTaq HS (TaKaRa)

94 °C, 1 min → [94 °C, 10 s → 55 °C, 30 s → 68 °C, 30 min] × 35 → 4 °C, ∞

・定量 PCR に用いたプライマー

KSL4p TGACGT-GoTaq	Forward	5' - gactcgctctcctataaacc-3'	(29 bases)
	Reverse	5' - agtcggcaataaagctgga-3'	(20 bases)
KSL4p 300bp-GoTaq	Forward	5' - cctatgtcacaggatgcaa-3'	(20 bases)
	Reverse	5' - gtagcagcctggtaggtcca-3'	(20 bases)
Os04g0177600 (Actin-like protein)	Forward	5' - ggcttctctcccctctcaat-3'	(20 bases)
	Reverse	5' - ggaaccaccgtcttgaggta-3'	(20 bases)

・PCR 条件

用いた酵素: GoTaq qPCR Master Mix (Promega)

95 °C, 3 min → [95 °C, 30 s → 51.5 °C, 30 s → 68 °C, 30 min] × 45 → 4 °C, ∞

2-3 結果と考察

2-3-1 公共データベースによる *OsTGAP1* の発現プロファイルの解析

序論でも述べたように、これまでの *OsTGAP1* に関する研究はすべてイネ培養細胞でのみ行われており実際の植物体における *OsTGAP1* のジテルペン型ファイトアレキシン生産制御への関与は不明であった。イネ植物体における *OsTGAP1* の機能を追究するため、まず、*OsTGAP1* の発現部位の解析を行った。そこで初めに野生型植物体での *OsTGAP1* のバイオインフォマティクスデータを公共データベースによって探索した。RiceXPro (ricexpro.dna.affrc.go.jp)における部位特異的な発現パターンを確認したところ、*OsTGAP1* は根での発現量が他の部位と比較して高いことが示唆された。TENOR (Transcriptome ENcyclopedia Of Rice (tenor.dna.affrc.go.jp))における根と地上部での *OsTGAP1* のストレス誘導性の発現プロファイルを調べたところ、浸透圧ストレス、重金属ストレス(カドミウム)、および JA 処理により根で発現誘導されることが示唆されていた。また、先行研究においてモミラクソン類およびファイトカサン類が根から根圏に滲出されること(Toyomasu et al. 2008)、JA や塩化銅処理によって誘導される(Okada et al., 2007; Hasegawa et al., 2010; Kodama et al., 1988; Shimizu et al., 2012)ことなどが示されていることから、根でもジテルペン型ファイトアレキシンが合成されていると推測される。

以上のことから、イネ植物体でのストレス誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産制御において *OsTGAP1* が根において主要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで、次に、*OsTGAP1* による部位特異的なジテルペン型ファイトアレキシン生産制御への関与の実態の検証実験を行った。

2-3-2 野生型植物における *OsTGAP1* の生理機能解析

OsTGAP1 が実際にイネの根において高発現していることを確認するため、播種後 7 日目のイネ幼苗を用いて定常状態での根と地上部における *OsTGAP1* の発現量を qRT-PCR により解析した (Fig. 2-1-A)。その結果、根での *OsTGAP1* の発現が地上部と比較して有意に高い事を確認した (Fig. 2-2-A)。次に、根におけるストレス条件下での *OsTGAP1* およびジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の応答性を検討するために、根に JA 浸漬処理を行い、処理後 0, 12, 24, 48 時間での根および地上部でのこれらの遺伝子発現パターンを qRT-PCR により調べた (Fig. 2-1-A)。ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子として、生合成上流に位置するメチルエリスリトールリン酸 (MEP)経路の初発酵素遺伝子である *OsDXS3*、モミラクソン生合成遺伝子 *OsKSL4*、およびファイトカサン生合成遺伝子 *OsKSL7* を用いることにした。その結果、*OsTGAP1* の発現は根において JA 処理後に経時的に誘導されるのに対し、地上部では JA による誘導性発現は見られなかった (Fig. 2-2-B)。このような根での *OsTGAP1* の JA 誘導性の発現パターンと類似して、*OsDXS3*、*OsKSL4*、および *OsKSL7* いずれのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子においても根からの浸漬処理時では根特異的に JA によって発現誘導をうけることが示された (Fig. 2-2-C)。

また、これまで植物体の根に対してエリシター処理を行った際の部位特異的なジテルペン型ファイトアレキシン蓄積に関する知見は得られていない。そこでエリシターによる根からの浸漬処理時の根と地上部の経時的なジテルペン型ファイトアレキシン蓄積量を LC-MS/MS により定量することにした。

エリシター処理として、ジテルペン型ファイトアレキシン生産を誘導することが報告されている既知のエリシターである JA および塩化銅水溶液を用いた。播種後 7 日目のイネ幼苗の根に 500 μ M の JA もしくは塩化銅水溶液により浸漬処理を行い、24, 48, 72 時間後に根と地上部をそれぞれサンプリングし LC-MS/MS による定量解析に供した。その結果、モミラクソン類およびファイトカサン類のいずれにおいても JA 処理後 24 時間で根での有意な誘導が認められた(Fig. 2-3-A)。一方で、JA 処理時とは対照的に塩化銅処理によるこれらのジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積量は地上部でのみ経時的に誘導されることが示された(Fig. 2-3-B)。

また、先行研究においてイネ葉身に対する JA 処理によりジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現およびジテルペン型ファイトアレキシン蓄積が誘導されることが報告されている(Shimizu et al., 2012)。OsTGAP1 が地上部での JA 誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積に関与するかを明らかにするためには、イネ葉身への JA 処理時の OsTGAP1 の発現パターンおよびジテルペン型ファイトアレキシン蓄積量を調べる必要があると考えられた。そこで、播種後 7 日目のイネ幼苗の葉身切片に対して 500 μ M の JA で浸漬処理を行い、0, 12, 24, 36, 48 時間後の OsTGAP1 の発現量および 24 時間後のファイトアレキシン蓄積量をそれぞれ qRT-PCR と LC-MS/MS により解析した。その結果、過去の報告と一致して JA 処理によりモミラクソン類およびファイトカサン類の蓄積量の増加が認められたが、OsTGAP1 の発現誘導はみられなかった(Fig. 2-4-A, B)。このことから、葉における JA 誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積には OsTGAP1 は関与していないこと、地上部でのジテルペン型ファイトアレキシン生産制御は OsTGAP1 に依存しない機構が存在することが示唆された。

以上の結果から、OsTGAP1 は植物体での JA 誘導性のファイトアレキシン生産制御において根特異的に機能していることが示唆された。地上部でのエリシター誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御する転写因子として、最近の研究において bHLH 型転写因子である Diterpenoid Phytoalexin Factor(DPF)が葉身におけるいもち病菌感染、塩化銅および UV 処理により誘導されるジテルペン型ファイトアレキシン生産を正に制御することが報告(Yamamura et al., 2015)されていることから、地上部では OsTGAP1 非依存的な制御機構が働いている可能性が考えられる。

2-3-3 *ostgap1 Tos17* 挿入変異株 を用いた解析

OsTGAP1 が根における JA 誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産制御において重要な役割を担っていることを検証するため、OsTGAP1 の発現が抑制された変異体を用いた解析を行った。

イネの内在性レトロトランスポゾンである *Tos17* は、脱分化した細胞を培養すると転移能が活性化し、再分化によって不活性化する。ある遺伝子に対して *Tos17* 挿入変異株の培養細胞が得られた場合、そこから再分化させた植物体から得られる F1 世代の種子には、1/4 の確率でその遺伝子に対して *Tos17* 挿入のホモ接合体が単離される。(独)農業生物資源研究所ではこのような *Tos17* 挿入変異株の変異株ライブラリーを作製し、F1 種子とその挿入部位隣接塩基配列のデータベースである ミュータントパネル(<https://tos.nias.affrc.go.jp>)の公開と種子の配布を行っている。そこで、OsTGAP1 が存在する領域のゲノムの塩基配列を query としてデータベースを検索したところ、

OsTGAP1 をコードする Os04g0637000 上に *Tos17* の挿入が確認されている株は 25 株存在していることが明らかとなった(Fig.2-5-A). 本研究ではその中でも唯一エキソンに *Tos17* が挿入されている NG3606 の種子を農業生物資源研究所から入手し, *ostgap1* mutant として用いることとした(Fig.2-5-B). 本研究では以降特記しない限りこの NG3606 由来で Os04g0637000 上への *Tos17* 挿入のホモ接合体を *ostgap1* 変異株と呼称する. また, 変異体を用いた解析での野生型株とは, この NG3606 ヘテロ接合体から分離され, 少なくとも Os04g0637000 上には *Tos17* の挿入が認められない株を指すこととする.

ostgap1 変異株のホモ接合体および野生型株の選抜は, ゲノム DNA をテンプレートとし, データベース上の挿入部位近傍の塩基配列より *Tos17* 挿入部位を挟み込むように設計したプライマーセット, および Os04g0637000 の内部配列由来のプライマーと *Tos17* の内部配列由来のプライマーセットを用いた PCR により行った(Fig. 2-5-B, C). この方法により, 隣接塩基配列と *Tos17* 内部配列より設計したプライマーセットで PCR を行った場合に限り増幅が確認された株を *ostgap1 Tos17* 挿入変異のホモ接合体, 隣接塩基配列同士のプライマーセットでのみ増幅が確認された株を野生型株, いずれのプライマーセットでも増幅が確認された株をヘテロ接合体として選抜した. 実験には上記の方法によって選抜した T1 世代の植物体を生育させ収穫した T2 世代の種子を用いた.

ostgap1 変異株において *OsTGAP1* の発現量が実際に低下しているかどうかを確認するために, qRT-PCR による *OsTGAP1* 発現量の検討を行った. 播種後 7 日目の野生型株および *ostgap1* 変異株の根と地上部から total RNA を抽出し合成した cDNA をテンプレートに, *OsTGAP1* の 3'-UTR に設計したプライマーを用いて qRT-PCR を行い, それぞれの植物体における定常状態での *OsTGAP1* の発現量を解析した. その結果, 野生型株の根で見られた *OsTGAP1* の高い発現が, *ostgap1* 変異株では有意に抑制されていることを確認した(Fig. 2-6-A). さらに, 野生型株では根特異的に JA 誘導性の *OsTGAP1* 遺伝子発現が確認されているのに対し, *ostgap1* 変異株ではそのような JA による *OsTGAP1* の発現誘導は見られなかった(Fig. 2-6-B).

以上の結果から, 野生型株と比較して *ostgap1* 変異株では *Tos17* の挿入により, ORF 全長の発現が低下していること, および *OsTGAP1* の JA 誘導性が抑制されていることが示された.

ostgap1 変異株において *OsTGAP1* 発現量の低下および JA による発現誘導が見られなくなることが確認されたため, 次に根での JA 処理時のジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子 (*OsDXS3*, *OsKSL4*, および *OsKSL7*) の発現パターンについて検討した. 播種後 7 日目の野生型株および *ostgap1* 変異株のイネ幼苗の根に対して 500 μ M の JA 溶液による浸漬処理を行い, 処理後経時的にこれらの遺伝子の発現について qRT-PCR により解析した. その結果, 野生型株では処理後 12 時間でいずれの遺伝子においても JA により経時的に発現が誘導されたが, *ostgap1* 変異株では発現誘導が顕著に抑制されていることが示された(Fig. 2-6-C).

次に, *ostgap1* 変異株における JA および塩化銅処理後のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積について検討を行った. JA 処理条件については, 根への浸漬処理および葉身切片への浸漬処理の条件について検討した. *ostgap1* 変異株と野生型株の根もしくは葉身切片に対し, 終濃度 500 μ M の JA 処理を行い, 処理後 0, 24, 48, 72 時間での根および葉身切片におけるジテルペン型ファイトアレ

キシンの蓄積量を LC-MS/MS で定量した。その結果、根に対する JA 処理時にはいずれのジテルペン型ファイトアレキシンも野生型に比べ *ostgap1* 変異株で蓄積が顕著に低下していたのに対し、葉身切片への JA 処理時には野生型と *ostgap1* 変異株で同等の蓄積が観察された (Fig. 2-7-A, Fig. 2-4-B)。この結果は、2-3-2 で述べた *OstGAP1* は根での JA 誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産には関与するが、地上部における生産制御への寄与は低いという可能性を支持している。次に、*ostgap1* 変異株の塩化銅処理時のジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積についても検討を行った。*ostgap1* 変異株と野生型株の根に対し終濃度 500 μ M で塩化銅処理を行い、処理後 24 時間での根および地上部でのジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積量を LC-MS/MS で定量したところ、野生型株および *ostgap1* 変異株ともに同程度の蓄積が地上部でのみ見られた (Fig. 2-7-B)。

以上の結果から、*OstGAP1* は根での JA によって誘導されるジテルペン型ファイトアレキシン生産制御において、主要な機能を有していることが示された。*ostgap1* 変異株の葉身への JA 処理によって野生型株と同程度のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積がみられたことから、*OstGAP1* は地上部でのジテルペン型ファイトアレキシン生産には関与しておらず、根で特異的に機能している可能性が支持された。また、塩化銅処理時の野生型株と *ostgap1* 変異株におけるジテルペン型ファイトアレキシン蓄積量に変化が見られなかったこと、2-3-2 において JA 処理時と比較して塩化銅処理による根でのジテルペン型ファイトアレキシン蓄積がみられないことから、塩化銅処理によるジテルペン型ファイトアレキシン生産には *OstGAP1* は関与していないことが示唆された。このことから地上部や重金属ストレスなどのシグナルの下流では *OstGAP1* 以外の転写因子が機能している可能性が考えられる。最近の研究において bHLF 型転写因子 DPF がジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御する転写因子として同定された (Yamamura et al., 2015)。DPF はイネの葉身に対する塩化銅処理、UV 曝露、イネいもち病菌の感染によって誘導され、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現およびジテルペン型ファイトアレキシン生産を亢進することが示されている。一方で、DPF ノックダウン変異株での *OstGAP1* 発現量が野生型と同程度であること、および *OstGAP1* が葉身への塩化銅処理、UV 曝露、イネいもち病菌感染による発現誘導を受けないことから DPF と *OstGAP1* は独立して機能していることが示唆されている (Yamamura et al., 2015)。また、WRKY 型転写因子である WRKY62 がジテルペン型ファイトアレキシン生産制御に関与することが報告されている (Fukushima et al., 2016; Guo et al., 2017a, b)。興味深いことに、WRKY62 はストレスやシグナルの種類により機能を使い分けており、病原菌などの感染により SA 経路が活性化されている場合には WRKY 型転写因子の WRKY45 とヘテロ二量体を形成し、DPF 遺伝子プロモーター領域に存在する W-box に結合することで DPF の転写を活性化しジテルペン型ファイトアレキシン生産を亢進するが、低酸素ストレス条件下では WRKY45 とは二量体を形成せず、WRKY62 ホモ二量体を形成することで DPF の転写を抑制することが示されている (Fukushima et al., 2016)。さらに、同じく WRKY 型転写因子である WRKY76 とヘテロ二量体を形成してジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御していることも示唆されている (Guo et al., 2017a, b)。一方で、*OstGAP1* はこれらの WRKY 型転写因子とは独立して機能していることが示唆 (Akagi et al., 2014; Guo et al., 2017a) されており、ジテルペン型ファイトアレキシン生産制御は、ストレスの種類や認識部位により、機能する転写因子の使い分けや、

ホモもしくはヘテロ二量体を形成することで下流の遺伝子発現を正および負に制御するなどの複雑な様式が存在していると考えられる。

2-3-4 OsTGAP1 過剰発現体を用いた解析

ここまで、野生型株を用いた解析により OsTGAP1 が根特異的に機能することを示し、さらに OsTGAP1 の発現量の抑制によって根特異的に JA 誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産量が低下することを示してきた。OsTGAP1 が根でのジテルペン型ファイトアレキシン生産を正に制御していることをより明確にするため、OsTGAP1 を過剰発現する株を用いた解析を行った。

使用した過剰発現株の作製では、先行研究において恒常的発現ベクター p2KG (Kitagawa et al., 2010)を用いて既に構築されていた、トウモロコシユビキチンプロモーターの下流に OsTGAP1 の CDS を保持したコンストラクト(Fig. 2-8-A)を用い、生物資源研究所の南博士に依頼しアグロバクテリウム法 (Toki et al., 2006)で野生型株 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)を形質転換していただいた。こうして得られた形質転換培養細胞由来の再分化過剰発現個体(F1 世代)のうち、OsTGAP1 を高発現している個体の次世代種子(F2 世代)をその後の解析に用いた。実験に用いた3株(#51, #53, #69)について転写レベルでの OsTGAP1 の発現確認を行うとともに、根と地上部でのジテルペン型ファイトアレキシン合成遺伝子(OsDXS3, OsKSL4, OsKSL7)の発現およびジテルペン型ファイトアレキシン蓄積量について検討を行うこととした。

播種後 7 日目の過剰発現株の根と地上部での OsTGAP1 の発現量を coding sequence(CDS)の内部に設計したプライマー(Fig. 2-8-A)を用いた qRT-PCR によって解析したところ、いずれの株においても定常状態での野生型株における OsTGAP1 の発現量と比較して、根と地上部ともに高い発現が確認された(Fig. 2-8-B)。OsDXS3, OsKSL4, および OsKSL7 の発現についても調べた結果、OsTGAP1 の高い発現量と類似して、これら 3 株においていずれの遺伝子についても根と地上部ともに野生型と比較して高発現していた(Fig. 2-8-C)。次にこれら 3 系統の過剰発現株を用い、定常状態での根と地上部のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積を調べた。その結果、3 株全てにおいて野生型株と比較してモミラクソン類およびファイトカサン類の蓄積量が高かった(Fig. 2-9-A, B)。また、JA 処理 24 時間での過剰発現株におけるモミラクソン類およびファイトカサン類の蓄積を調べたところ、根ではいずれの株においても JA 誘導的な蓄積量の増加が確認されたのに対して、地上部では未処理時と比較して JA 誘導的な蓄積量の増加は見られなかった(Fig. 2-10-A, B)。

以上の結果から、OsTGAP1 の過剰発現によって植物体全体でジテルペン型ファイトアレキシン合成遺伝子の発現およびモミラクソン類、ファイトカサン類の蓄積が増加することが示され、OsTGAP1 が植物体でのジテルペン型ファイトアレキシン生産の正の制御因子として機能していることが示唆された。また、過剰発現株への JA 処理時に根でのみジテルペン型ファイトアレキシン蓄積の亢進傾向が見られたことについては、野生型株での JA 処理時の OsTGAP1 の転写レベルでの増加と、ジテルペン型ファイトアレキシン蓄積誘導の結果から、OsTGAP1 の過剰発現が priming となり、JA 処理によって誘導される天然に存在する OsTGAP1 や他の制御因子による生産誘導を増強している可能性が考えられる。しかし、この可能性を述べるにはタンパク質レベルでの JA 処理時の

O_sTGAP1 発現が重要であり、今後は過剰発現体に JA 処理を行った場合の天然に存在する O_sTGAP1 の転写レベルおよびタンパク質レベルでの解析を行う必要がある。また、これまでに根に対するエリシター処理によるジテルペン型ファイトアレキシン生産制御に関与する転写因子についての知見は得られていないため、根におけるジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構の全貌を明らかにするためには O_sTGAP1 と他の制御因子との関連についても解析を行う必要があると考えられる。

2-3-5 一過的発現系を用いた O_sTGAP1 の転写制御機能解析

これまでに、イネ培養細胞(胚盤由来カルス)を用いた解析において O_sTGAP1 が O_sTGAP1 結合配列(TGACGT-sequence)を介して MEP 経路遺伝子 O_sDXS3 (Miyamoto et al., 2014)およびモミラクソン生合成遺伝子 O_sKSL4 (Okada et al., 2009)のプロモーター領域に結合することが示されている。しかし、ファイトカサン生合成遺伝子 O_sKSL7 のプロモーター領域への結合に関しては不明なままであった。さらに、レポータージーンアッセイを用いた先行研究において、O_sTGAP1 によるこれらの遺伝子プロモーターに対する転写活性化試験が行われた。その結果、O_sTGAP1 は O_sDXS3 のプロモーターへのみ転写活性化能を有することが示されたが、O_sKSL4 および O_sKSL7 に対する転写活性化は確認されていない(Miyamoto et al., 2014)。胚盤カルスの特殊性が転写活性化に影響を与えている可能性を考慮し、より *in planta* 条件に近いイネプロトプラストを用いた一過的発現系を用いて、O_sTGAP1 の転写活性化能の再検討を行った(Fig. 2-11-A)。

先行研究において作製された、O_sDXS3、O_sKSL4、および O_sKSL7 のプロモーター上流の TGACGT-sequence を含む領域の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を融合したコンストラクトを用いた Dual luciferase assay を行った。エフェクターとしてトウモロコシユビキチンプロモーターの制御下で O_sTGAP1 を恒常的に発現するコンストラクトもしくはエフェクターコントロールとして GUS 遺伝子を恒常的に発現するコンストラクトを用いた(Fig. 2-11-B)。野生型株のイネの根から単離したプロトプラストに PEG 法によってレポーターコンストラクト、インターナルコンストラクト、およびエフェクターコンストラクトの 3 種類のプラスミドを遺伝子導入し、暗条件、28 °C、24 時間インキュベーションを行い、ルシフェラーゼ活性を測定した。まず初めに、これまでにイネ培養細胞での解析において O_sTGAP1 による転写活性化が示されていた O_sDXS3 のプロモーター領域について、解析を行った。その結果、先行研究の結果と一致して O_sDXS3 プロモーターに対する O_sTGAP1 による有意なルシフェラーゼ活性の上昇が確認された(Fig. 2-12-A)。次に、これまでに O_sTGAP1 のエフェクター効果が見られていないクラスター遺伝子である O_sKSL4 および O_sKSL7 のプロモーターについて解析を行ったところ、O_sKSL4 プロモーターについてはコントロールと比較して O_sTGAP1 をエフェクターとした場合に有意な転写活性化が見られた(Fig. 2-12-A)。さらに、O_sKSL4 上流に存在する TGACGT-sequence が O_sTGAP1 による転写活性化に重要であることを検討するために、TGACGT-sequence に変異を導入したコンストラクト(Okada et al., 2009)を用いた解析を行ったところ、native プロモーターでみられた O_sTGAP1 によるルシフェラーゼ活性の上昇が、変異導入後のプロモーターにおいてみられなくなった(Fig. 2-12-B)。このことから、O_sTGAP1 による O_sKSL4 の転写活

性化には上流約 1100 bp に存在する TGACGT-sequence が重要であることが示された。一方で, *OsKSL7* については, 現在の実験条件では *OsTGAP1* によるルシフェラーゼ活性の上昇は見られなかった(Fig. 2-12-A)。また, *OsDXS3* および *OsKSL4* のプロモーターに対する内在性の *OsTGAP1* による転写活性を調べるため, これらのレポーターコンストラクトを根由来のプロトプラストおよび葉身由来のプロトプラストに遺伝子導入しルシフェラーゼ活性を測定したところ, どちらのコンストラクトにおいても *OsTGAP1* が機能していると考えられた。また, 根由来のプロトプラストで高いルシフェラーゼ活性が確認された(Fig. 2-12-C)。特に *OsKSL4* プロモーターでは根での活性が顕著であった(Fig. 2-12-C)。

以上の結果から, *OsTGAP1* はイネの根特異的に *OsDXS3* および *OsKSL4* のプロモーターに対し, エフェクター効果をもち, これらの転写を活性化することでモミラクソン生産を正に制御していることが示唆された。また, 根のプロトプラストでの *OsDXS3* および *OsKSL4* プロモーターの高いレポーター活性に関しては, 根において通常 *OsTGAP1* の転写レベルが高いことと矛盾しない結果となった。また, TGACGT-sequence のミュートーションコンストラクトを用いた解析の結果から, *OsKSL4* 遺伝子上流約 1100 bp に存在する TGACGT-sequence が重要であることが示された。一方で, *OsTGAP1* をエフェクターとしたルシフェラーゼレポーターアッセイの結果から, ファイトカサン生合成遺伝子の *OsKSL7* プロモーターに対する *OsTGAP1* による転写の活性化は確認されなかった。宮本により行われた *OsTGAP1* 過剰発現培養細胞を用いた ChIP-qPCR および ChIP-seq による *OsTGAP1* の結合領域の解析結果からも, *OsDXS3* および *OsKSL4* プロモーター領域近傍の TGACGT-sequence への *OsTGAP1* の結合は示されているがファイトカサン生合成遺伝子クラスター内の生合成遺伝子についてはプロモーター近傍への *OsTGAP1* の結合はみられないことから, モミラクソン生合成遺伝子クラスターとファイトカサン生合成遺伝子クラスターに対する *OsTGAP1* による制御様式は異なっている可能性が考えられる。

2-3-6 JA 誘導時の根における *OsTGAP1* のジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子プロモーターへの結合性

ここまで JA 処理により誘導された *OsTGAP1* が, *OsDXS3* および *OsKSL4* プロモーターの転写を活性化することでモミラクソン生産を正に制御することを示してきた。また, 当研究室の先行研究において *OsTGAP1* の過剰発現イネ培養細胞を用いた解析によってキチンエリシター処理の有無による *OsTGAP1* の結合領域および結合能の解析がなされたが, エリシター処理による結合領域および結合能の変化は確認されていない。これまで, ジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子のプロモーター領域への *OsTGAP1* の結合に関しても, 植物体を用いた検討は行われていなかったことから, *OsTGAP1* が実際に機能している植物体組織を用いた解析が必要であると考えられた。そこで, JA 処理および未処理の野生型株の根でのこれらの遺伝子プロモーターに対する *OsTGAP1* の結合性を, *OsTGAP1* の特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降によって検討した。*OsTGAP1* 特異的抗体は, 当研究室の宮本皓司氏によって作製され, イネ培養細胞から単離した核タンパク質および細胞質タンパク質を用いたウェスタンブロットティングにより, この抗体がイネ由来のサンプルから *OsTGAP1*

を特異的に認識することが確認されている(Miyamoto et al., 2014).

播種後 7 日目の野生型株に対し 500 μ M JA で根への浸漬処理を行い, 処理 0, 12, 24 時間の独立した実験を行い, 根を回収しクロマチン DNA を単離した. その後, 得られたクロマチン DNA に対して OsTGAP1 特異的抗体もしくは Normal rabbit-IgG を用いた免疫沈降を行い CHIP-DNA を得た. 先行研究において宮本により設計された *OsKSL4* 上流に存在する 2 つの TGACGT-sequence のうち 5' 上流 1220 bp 付近に存在する TGACGT-sequence を含む領域約 100 bp を増幅するようなプライマー(Fig. 2-13-A)を作製し, クロマチン免疫沈降によって得られた CHIP DNA をテンプレートに半定量的 PCR を行った. まず初めに定常状態の野生型株の根での *OsKSL4* プロモーターへの OsTGAP1 の結合性を調べたところ, OsTGAP1 抗体でのクロマチン免疫沈降産物で明瞭なシグナルを示すバンドの増幅が見られた (Fig. 2-13-B). 次に JA 処理 12, 16, 24 時間後についても同様の解析を行ったところ, 12 時間後および 16 時間後のサンプルでは OsTGAP1 抗体によるクロマチン免疫沈降産物で明瞭なシグナルを示すバンドが得られたのに対し, 24 時間後ではバンドの増幅が見られなかった. OsTGAP1 の JA 処理時の経時的な DNA 結合性を検討するにあたり, 処理液やイネの生育状態をできるだけ統一する必要があると考えられたため, 0 時間から 24 時間まで一連の実験の中で経時的にサンプリングを行った. また, より定量性の高いデータを得るために, Input DNA および Normal rabbit IgG, 抗 OsTGAP1 抗体で免疫沈降して得たそれぞれの CHIP DNA について, 定量 PCR を行った. 今回, 定量 PCR を行うために新たに設計した *OsKSL4* 上流に存在する 2 つの TGACGT-sequence を含む領域約 200 bp を増幅するようなプライマー(Fig. 2-13-A)を用いた. 得られた定量値を用いてそれぞれの CHIP DNA における免疫沈降前の Input DNA に対する回収率を算出し, IgG の回収率で標準化することで抗 OsTGAP1 抗体による濃縮を検討した. その結果, JA 処理の有無にかかわらず OsTGAP1 抗体による有意な濃縮を確認した(Fig. 2-13-C). また, mock および JA 処理後 24 時間のサンプルについて OsTGAP1 の結合性をより詳細に解析するため, 新たに *OsKSL4* 遺伝子上流 300 bp 付近を増幅するプライマーとネガティブコントロールとしてモミラクソン生合成遺伝子クラスターに隣接する遺伝子である *actin* (*Os04g0177600*)のプロモーター領域を増幅するプライマーを用いて定量 PCR を行った. その結果, ネガティブコントロールの領域ではいずれの処理においても OsTGAP1 抗体による DNA の濃縮は見られなかったが, TGACGT-sequence および *OsKSL4* 遺伝子上流 300 bp の領域に対する OsTGAP1 抗体による濃縮を確認した.

以上の結果から, 野生型株の根において OsTGAP1 は定常状態においても *OsKSL4* プロモーターに結合していることが明らかとなった. また, 半定量的 PCR では処理後 16 時間まで見られていた OsTGAP1 のプロモーターへの結合が 24 時間で見られなくなったが, 定量 PCR による解析においては処理 24 時間後で OsTGAP1 の結合性が上昇する傾向がみられた. このように半定量的 PCR と定量 PCR の結果が一致していない原因として, 半定量的 PCR に用いたプライマーは *OsKSL4* 遺伝子上流約 1100 bp に存在する TGACGT-sequence のみを含む領域を増幅するように設計されているが, qPCR に用いたプライマーには, *OsKSL4* 遺伝子上流に存在する 2 つの TGACGT-sequence をどちらも含む領域を増幅するよう設計されていることが考えられる. 遺伝子のプ

プロモーター上に隣接して存在する同一のシス配列が転写制御において拮抗的もしくは異なる機能を持つ例はいくつか報告されている。シロイヌナズナにおいて TGA ファクターは PR-1 遺伝子上流に存在する 2 つの TGACG モチーフ(LS5, LS7)に結合することでその転写を制御することが知られているが、この 2 つの TGACG モチーフが TGA ファクターによる PR1 遺伝子の転写活性において異なる影響を持つことが明らかになっている。LS7 は、誘導状態において活性化因子である NPR1 と相互作用した TGA ファクターが結合することにより PR-1 遺伝子の転写を亢進するが、LS5 は非誘導条件において TGA ファクターが結合していることで基底レベルの PR-1 遺伝子の転写を抑制することが示されている(Zhang et al., 1999, 2003; Fan and Dong, 2002; Boyle et al., 2009; Kesarwani et al., 2007)。OsKSL4 遺伝子上流の 2 つの TGACGT-sequence も OsTGAP1 による転写制御において異なる機能を持つ可能性が考えられる。また、タバコにおいてオーキシシグナルに関与する bZIP 型転写因子 BZI-1 が、同じく bZIP 型転写因子である BZI-2 とヘテロ二量体を形成することで BZI-1 の転写活性化能を亢進することが示されている。さらに、オーキシシ処理により細胞質から核内に移行した相互作用タンパク質 Ankyrin repeat domain protein(ANK1)が BZI-1/BZI-2 ヘテロ二量体と相互作用することで、BZI-1/BZI-2 による転写活性化を著しく増強することが報告されている(Bottner et al., 2009)。2-3-3 で述べた WRKY62 は、ホモ二量体を形成することで抑制因子として機能し、他の WRKY 型転写因子とヘテロ二量体を形成することで活性化因子として機能することが示されている(Fukushima et al., 2016; Guo et al., 2017a, b)。このように、転写因子が相互作用因子とヘテロもしくはホモ二量体を形成することで標的遺伝子に対する転写制御機構を変化させる例が報告されている。先行研究において、OsTGAP1 と bZIP 型転写因子 OsbZIP79 がホモ二量体およびヘテロ二量体を形成すること(Miyamoto et al., 2015; 渋谷 修士論文, 2016)、OsbZIP79 は JA 処理により発現抑制されることが示唆されている(渋谷 修士論文, 2016)。このことから、OsTGAP1 による OsKSL4 遺伝子プロモーターへの結合において、JA 未処理時の定常状態では OsTGAP1 と OsbZIP79 がヘテロ二量体を形成し、JA 処理により OsbZIP79 の発現が抑制されることで OsTGAP1 ホモ二量体の形成が増加し OsKSL4 の転写を活性化している可能性が考えられる。今後、OsTGAP1 のタンパク質レベルでの JA 誘導時の発現解析や、より詳細な経時点での結合性の検討が必要であると考えられる。

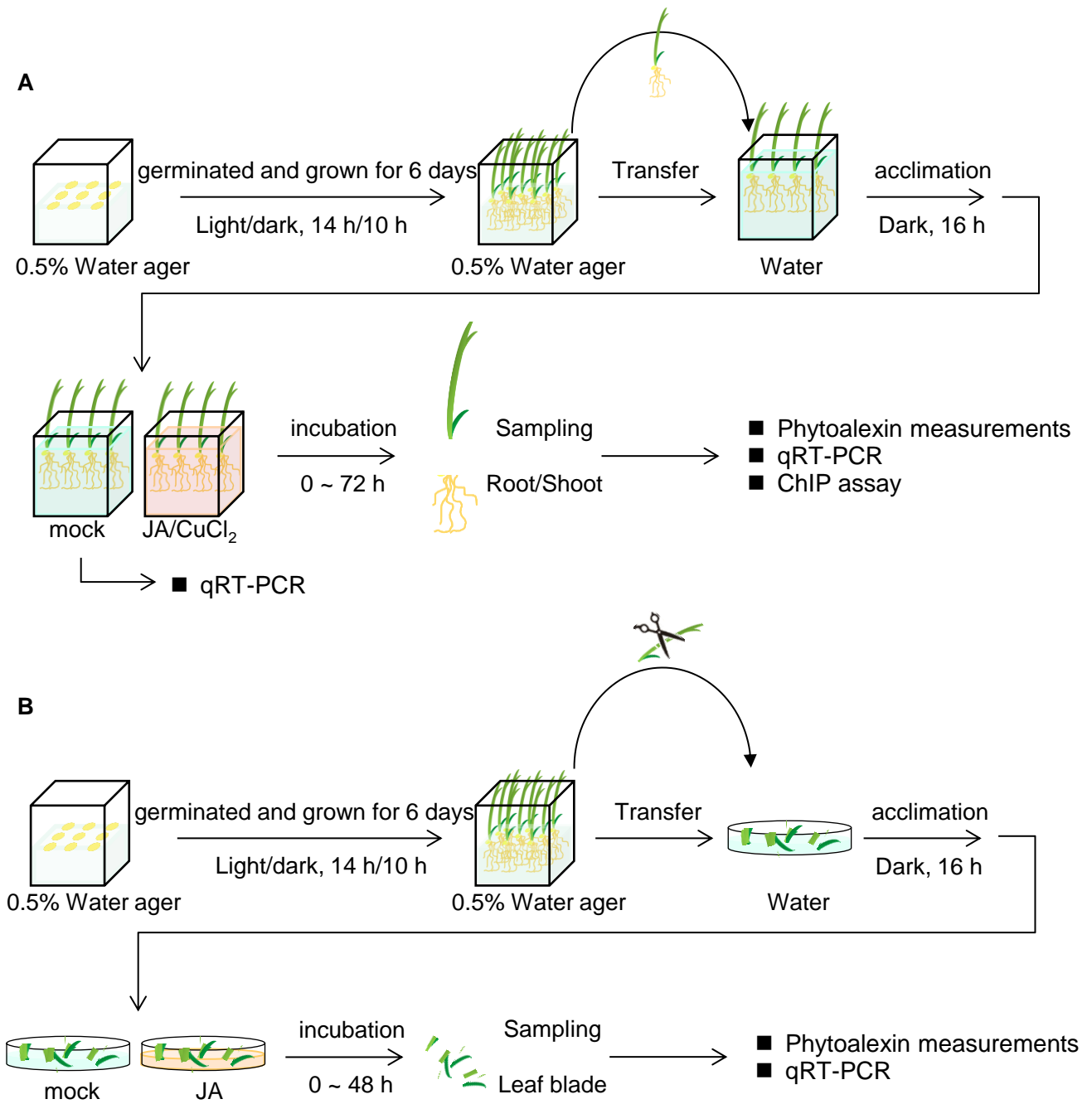


Fig.2-1. イネ植物体の生育条件およびエリシター処理模式図

- A) 根からの浸漬処理. 実験には 500 μ M の JA および塩化銅水溶液を用いた. JA 処理のコントロールとして mock(0.035% DMSO), 塩化銅処理のコントロールとして mock(水道水)を用いた.
- B) 葉身切片に対する浸漬処理.

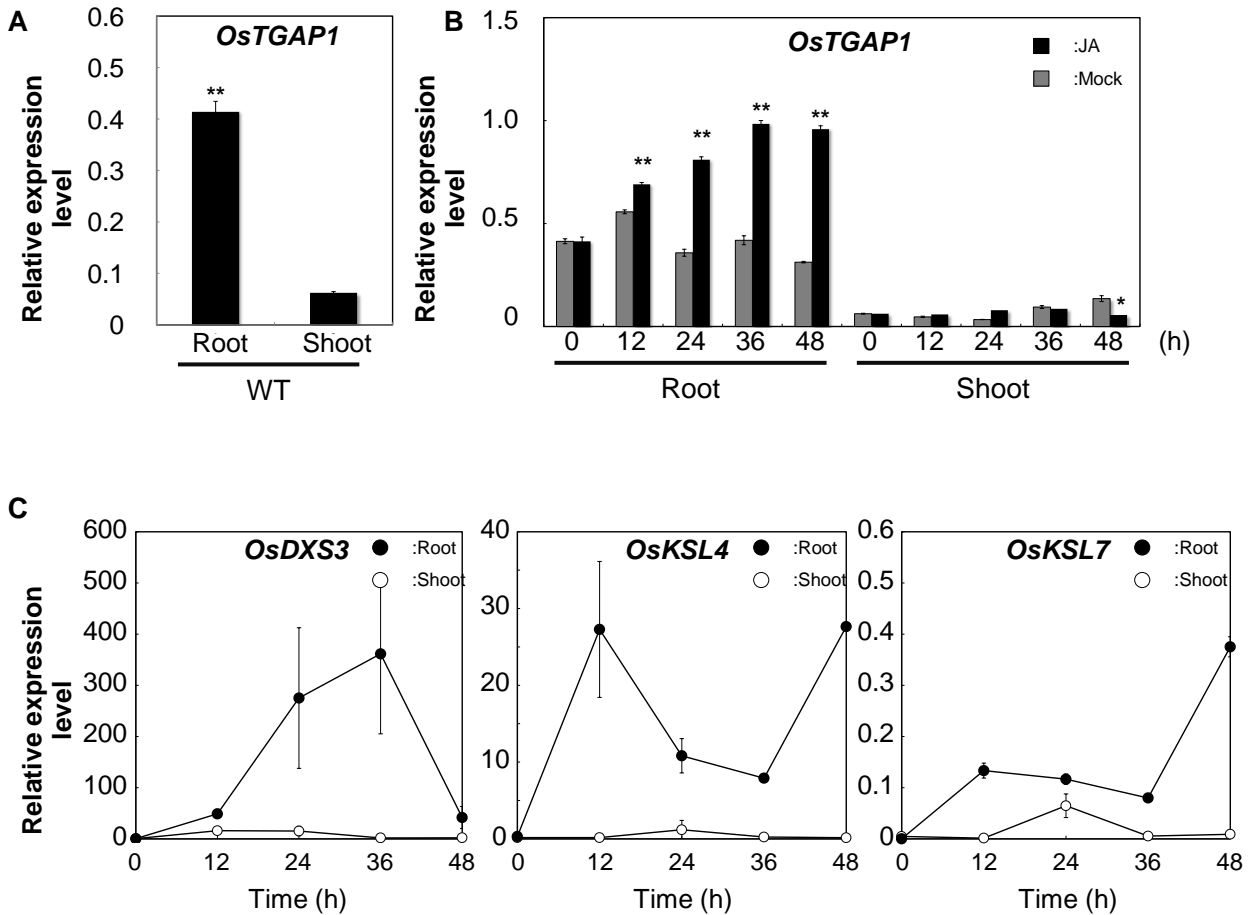


Fig.2-2. 野生型株における *OsTGAP1* およびファイトアレキシン生合成遺伝子の発現解析

- A) 播種後7日目のイネ幼苗での定常状態における *OsTGAP1* の根と地上部での相対発現量を qRT-PCR により調べた。遺伝子の発現量を UBQ 遺伝子の発現で割った値を相対発現量とした (n=3)。縦軸は相対発現量を示す。
- B) 野生型株における根からの JA (500 μ M) による浸漬処理 (根と地上部での *OsTGAP1* の経時的発現解析を qRT-PCR により行った (n=3)。縦軸は相対発現量を、横軸は処理時間を示す。
- C) 野生型株における根からの JA (500 μ M) による浸漬処理後の根と地上部でのファイトアレキシン生合成遺伝子 (*OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7*) の経時的発現解析を qRT-PCR により行った (n=3)。縦軸は相対発現量を、横軸は処理時間を示す。

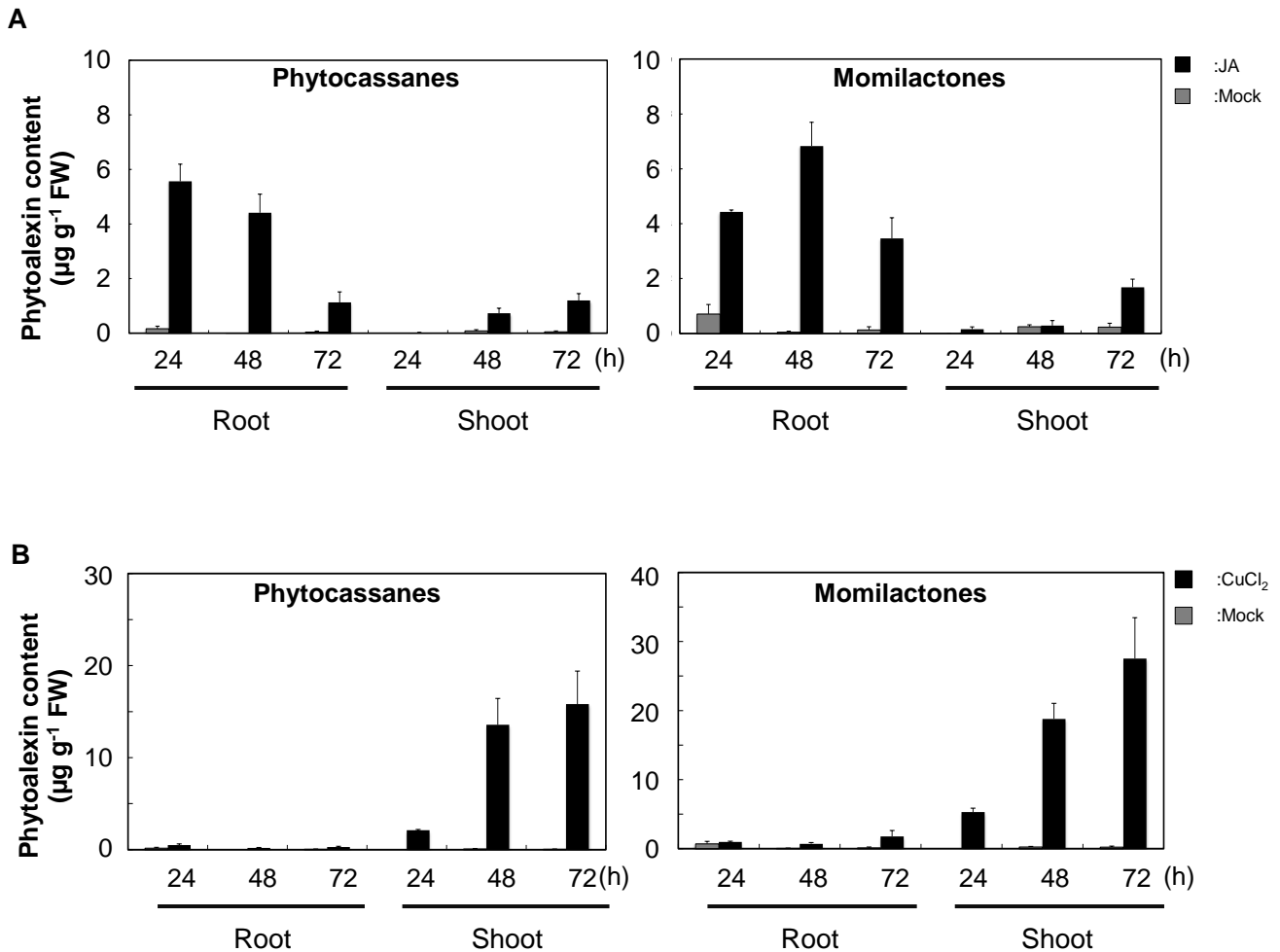
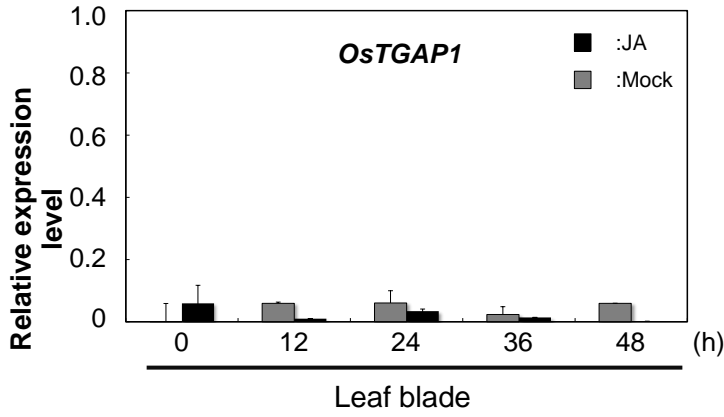


Fig.2-3. 野生型株におけるエリシター処理後のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積

- A) 播種後 7 日目のイネ幼苗における根からの JA (500 µM) による浸漬処理時の根と地上部でのモミラクトン類, ファイトカサン類の経時的な蓄積を LC-MS/MS により解析した (n ≥ 10). 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を, 横軸は処理時間を示す.
- B) 播種後 7 日目のイネ幼苗における根からの塩化銅 (500 µM) による浸漬処理時の根と地上部でのモミラクトン類, ファイトカサン類の経時的な蓄積を LC-MS/MS により解析した (n ≥ 10). 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を, 横軸は処理時間を示す.

A



B

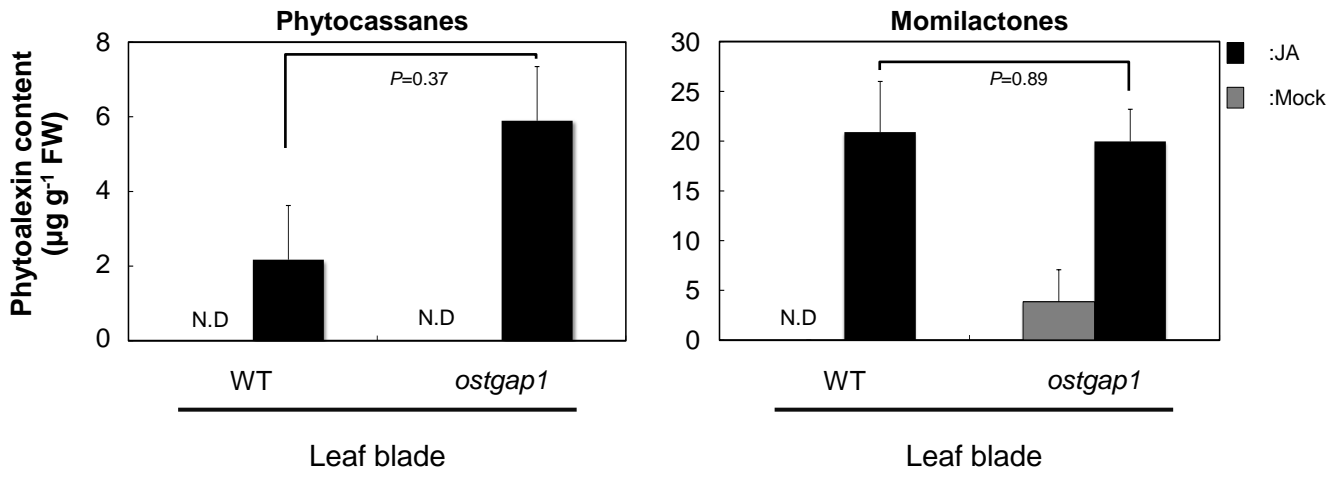


Fig.2-4. 葉身切片へのJA処理時の *OsTGAP1* 発現およびファイトアレキシン蓄積

- A) 播種後7日目の野生型株の葉身切片におけるJA(500 µM)処理時の *OsTGAP1* の相対発現量をqRT-PCRにより調べた. 縦軸は相対発現量を, 横軸は処理時間を示す.
- B) 野生型株, *ostgap1* の葉身切片におけるJA(500 µM)処理時のモミラクトン類, ファイトカサン類の蓄積をLC-MS/MSにより解析した. bar は mock および JA 処理 24 時間後のファイトアレキシン蓄積量を示す.

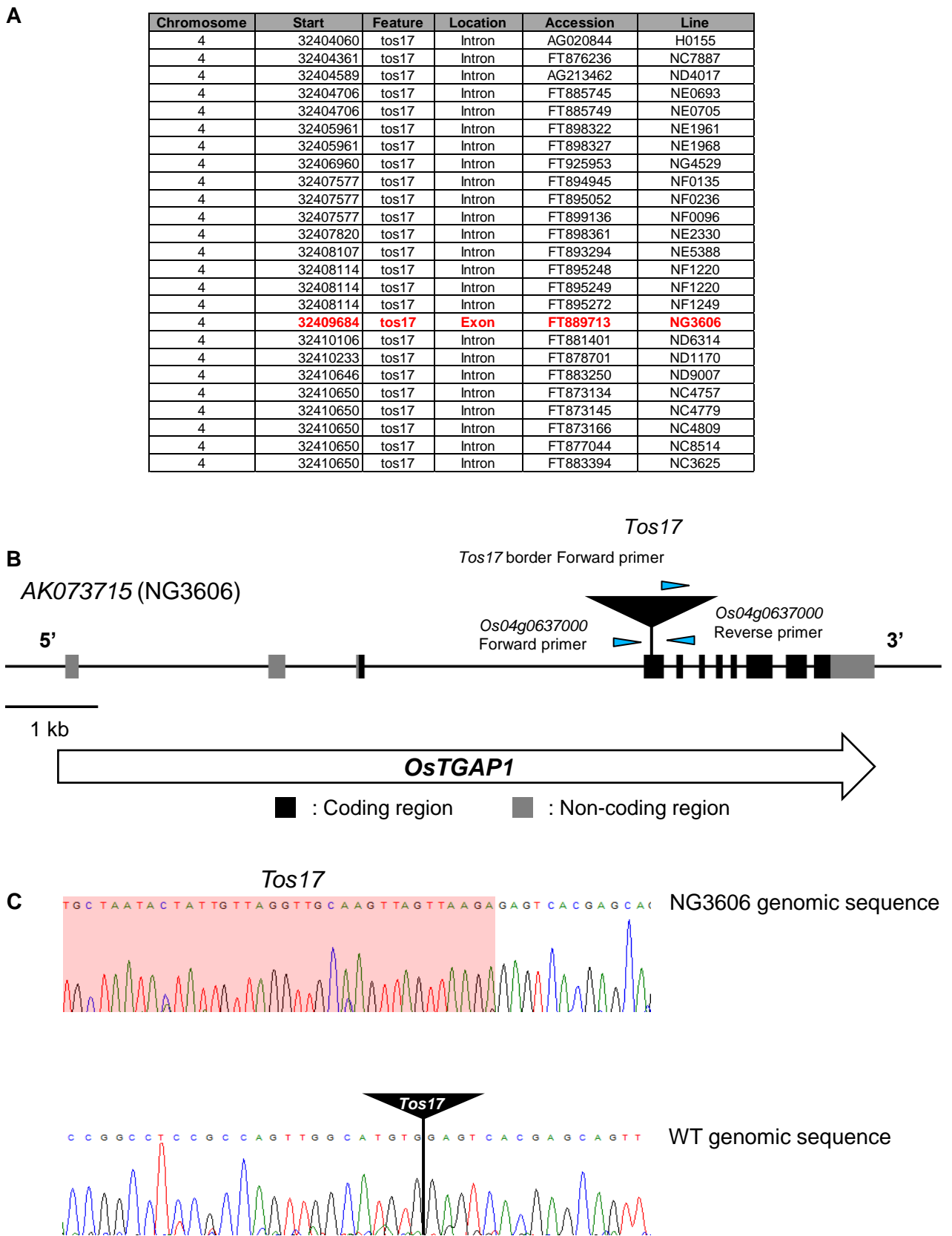
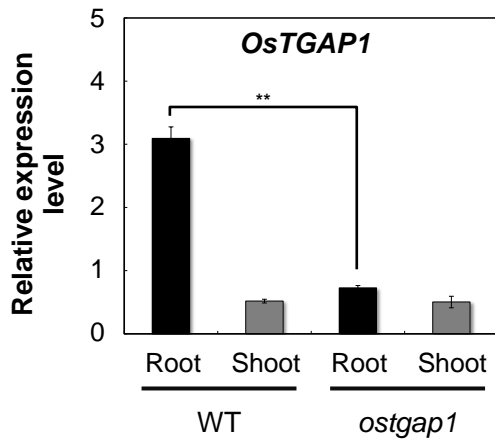


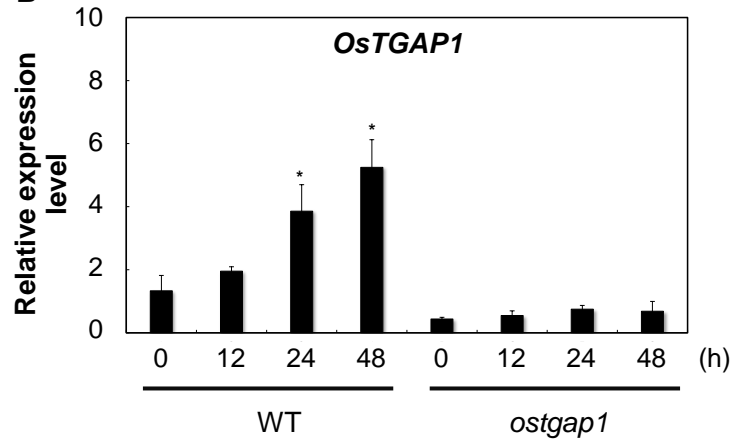
Fig.2-5. *ostgap1* における *Tos17* 挿入位置とゲノタイピングに用いたプライマーセットの概略図

- A) ミュータントパネルにて配布されている Os04g063700 0 上に *Tos17* が挿入されている株のリスト。
 B) *ostgap1* における *Tos17* 挿入位置とゲノタイピングに用いたプライマーセット。
 C) シーケンス解析による *Tos17* 挿入位置の確認。

A



B



C

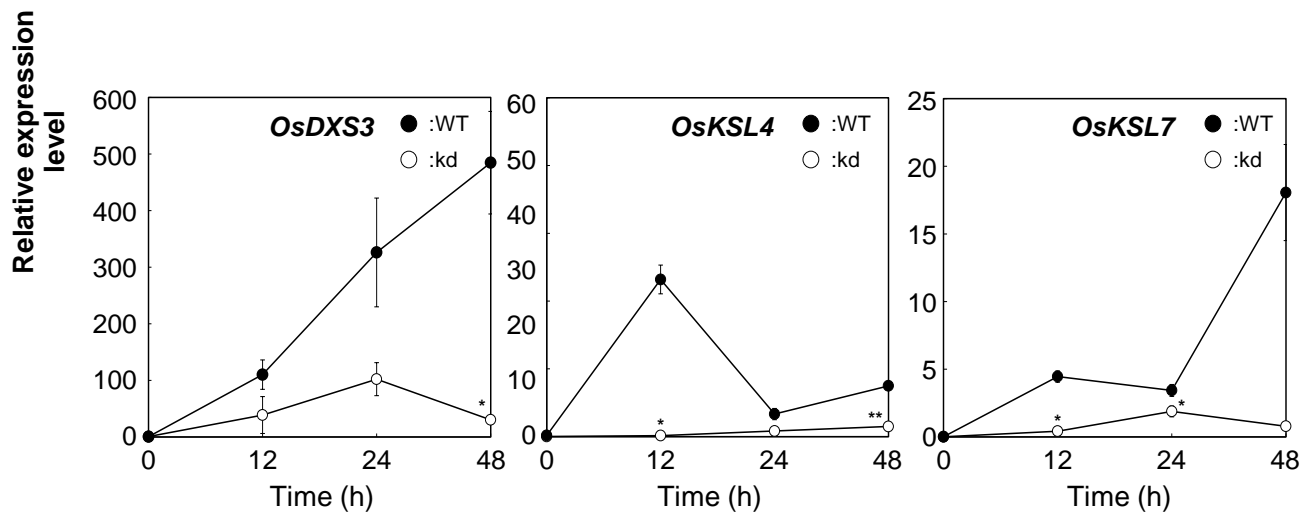


Fig.2-6. *ostgap1* における *OsTGAP1* およびファイトアレキシン合成遺伝子発現解析

- A) 野生型株, *ostgap1* の定常状態における根と地上部での *OsTGAP1* の相対発現量を qRT-PCR により調べた. 遺伝子の発現量を UBQ 遺伝子の発現で割った値を相対発現量とした (n=3). 縦軸は相対発現量を示す.
- B) 野生型株, *ostgap1* の根における JA (500 μ M) 処理時の *OsTGAP1* の経時的発現パターンを qRT-PCR により調べた (n=3). 縦軸は相対発現量を, 横軸は処理時間を示す.
- C) 野生型株, *ostgap1* の根における JA (500 μ M) 処理時の *OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7* の経時的発現パターンを qRT-PCR により調べた (n=3). 縦軸は相対発現量を, 横軸は処理時間を示す.

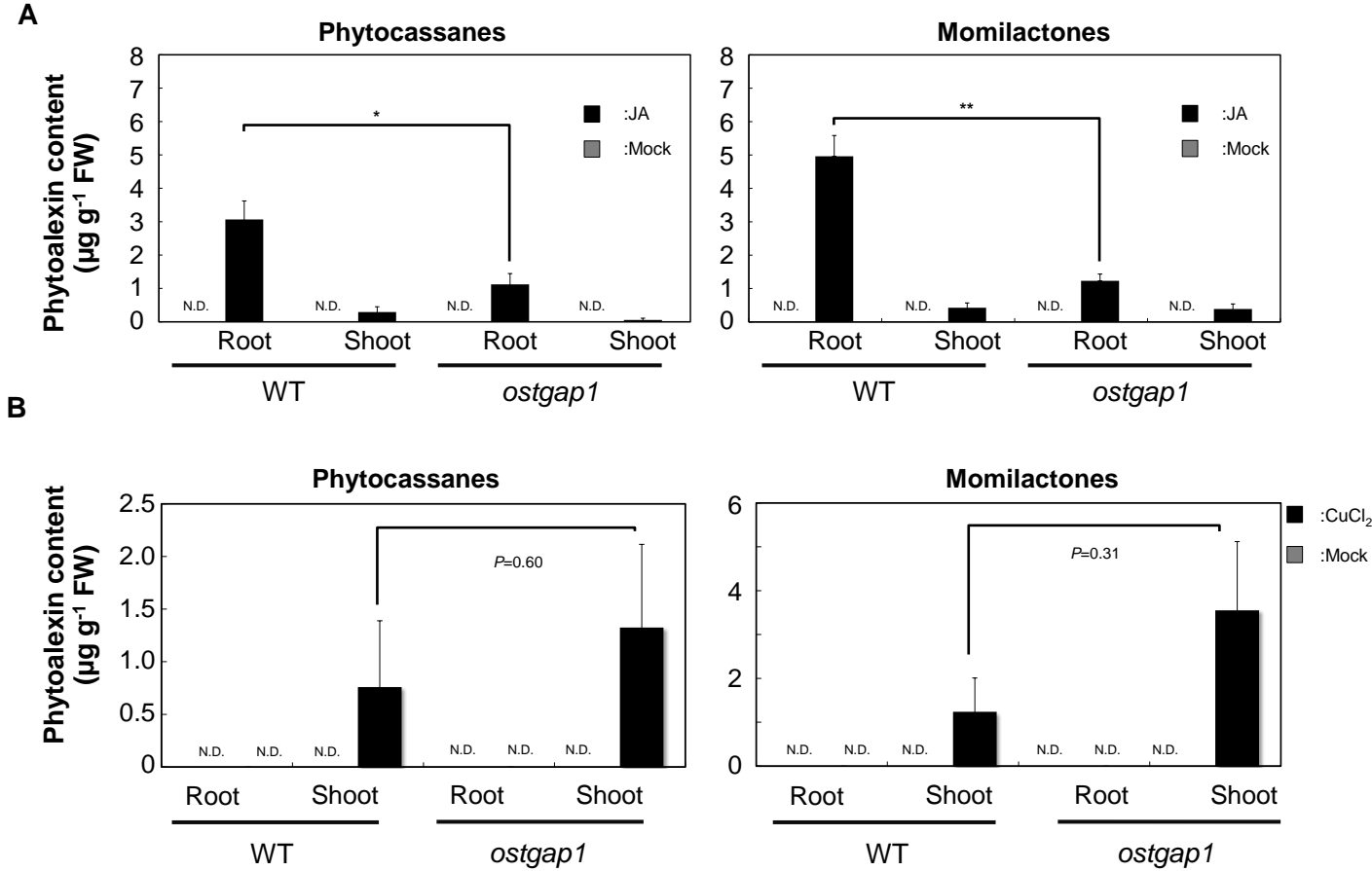
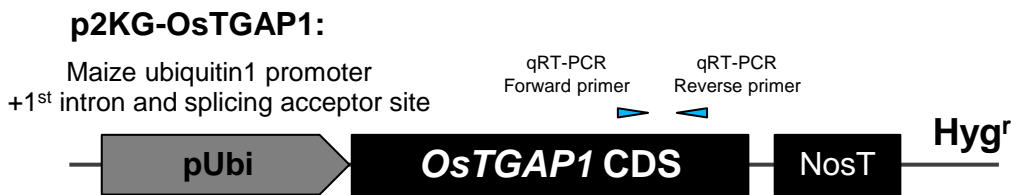


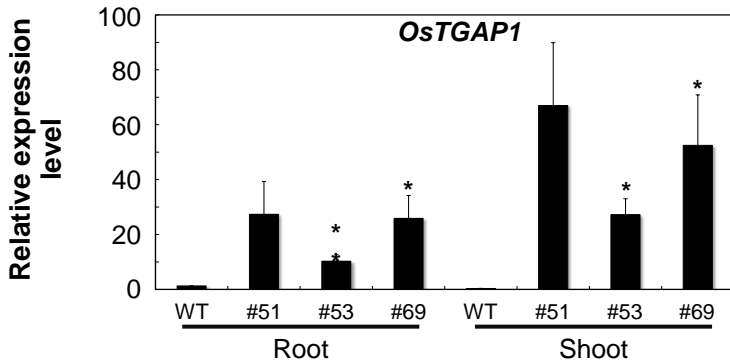
Fig.2-7. *ostgap1* におけるエリシター処理時のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積

- A) 野生型株, *ostgap1* における根からの JA (500 μM) による浸漬処理後 24 時間でのモミラクソン類, ファイトカサン類の蓄積 (n ≥ 10). N.D.=not detected, 有意差検定は JA 処理 24 時間後における野生型株の根での値との T 検定により行った (**: P value < 0.01, *: P value < 0.05). 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を示す.
- B) 野生型株, *ostgap1* における根からの塩化銅 (500 μM) による浸漬処理後 24 時間でのモミラクソン類, ファイトカサン類の蓄積 (n ≥ 10). N.D.=not detected, 有意差検定は JA 処理 24 時間後における野生型株の地上部での値との T 検定により行った (**: P value < 0.01, *: P value < 0.05). 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を示す.

A



B



C

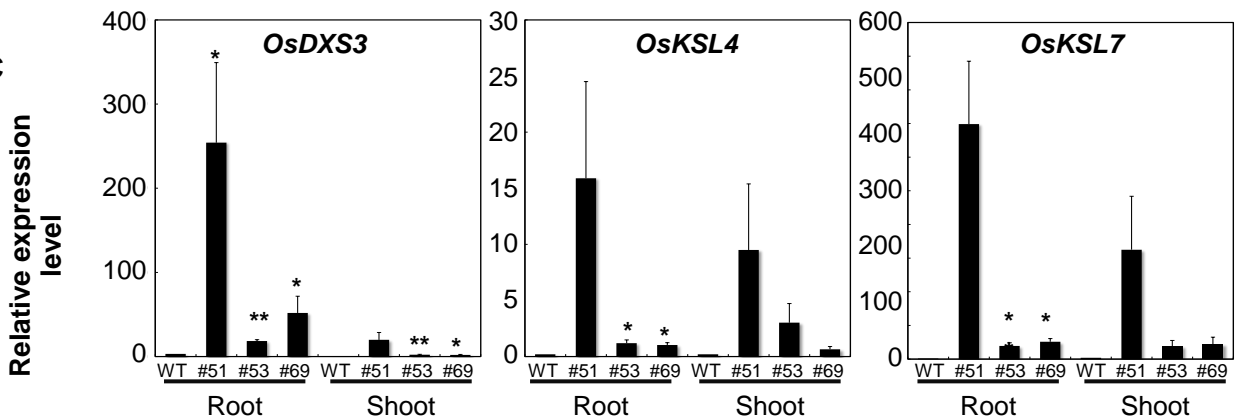


Fig.2-8. OsTGAP1 過剰発現株における *OsTGAP1* およびファイトアレキシン生合成遺伝子発現解析

- A) *OsTGAP1* 過剰発現株作製に用いたプラスミドの概略図。
 B) 野生型株, *OsTGAP1* 過剰発現株の定常状態における根と地上部での *OsTGAP1* の相対発現量を qRT-PCR により調べた (n=3). 縦軸は相対発現量を示す。
 C) 野生型株, *OsTGAP1* 過剰発現株の根への JA (500 μ M) による浸漬処理時の根と地上部での *OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7* の経時的発現パターンを qRT-PCR により調べた (n=3). 有意差検定は JA 処理 24 時間後における野生型株の地上部での値との T 検定により行った (**: P value < 0.01, *: P value < 0.05). 縦軸は相対発現量を示す。

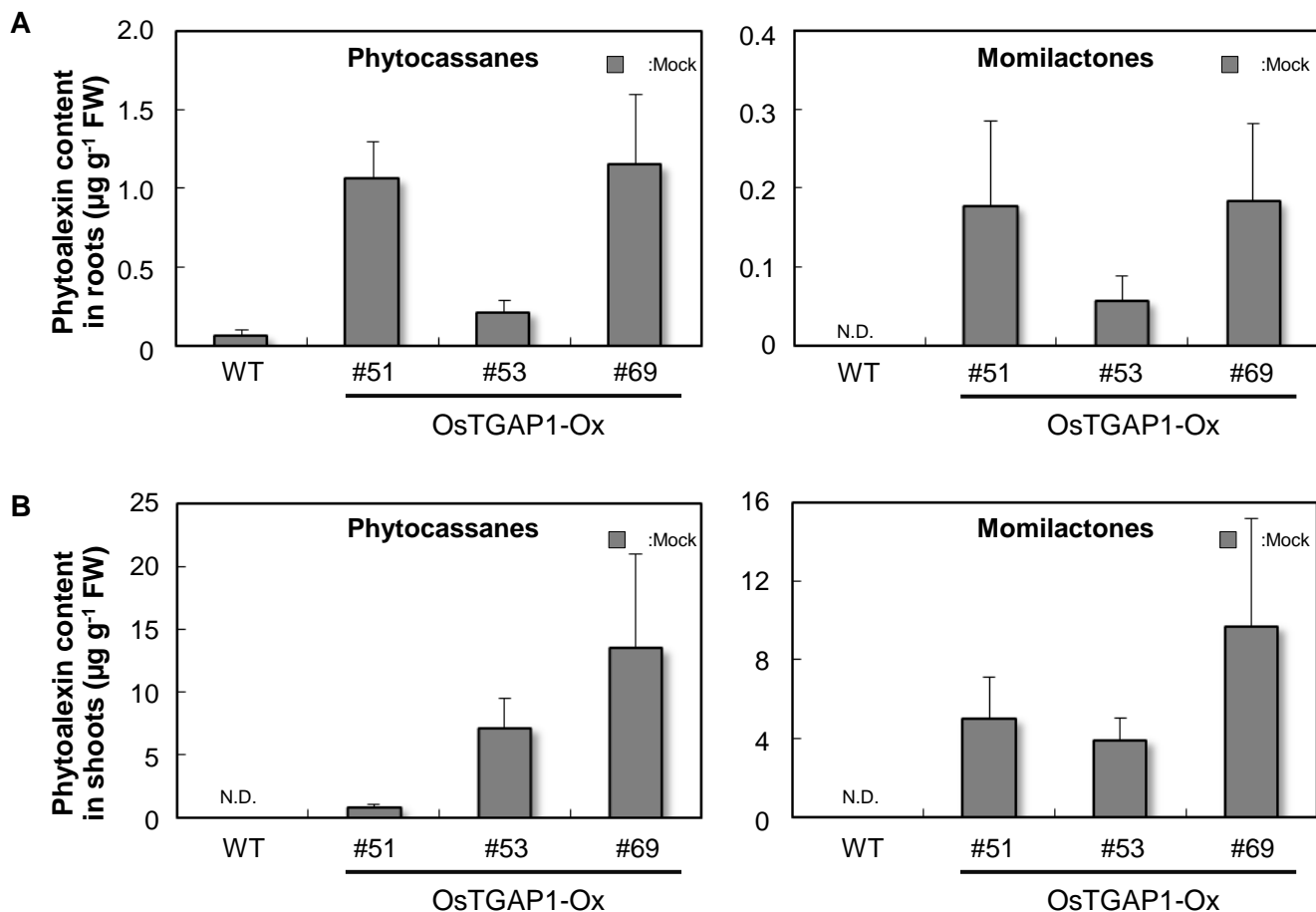


Fig.2-9. OsTGAP1 過剰発現株における未処理時でのジテルペン型ファイトアレキシン蓄積

- A) 野生型株, OsTGAP1 過剰発現株における根でのモミラクトン類, ファイトカサン類の蓄積 ($n \geq 10$). N.D.=not detected. 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を示す.
- B) 野生型株, OsTGAP1 過剰発現株における地上部でのモミラクトン類, ファイトカサン類の蓄積 ($n \geq 10$). N.D.=not detected. 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を示す.

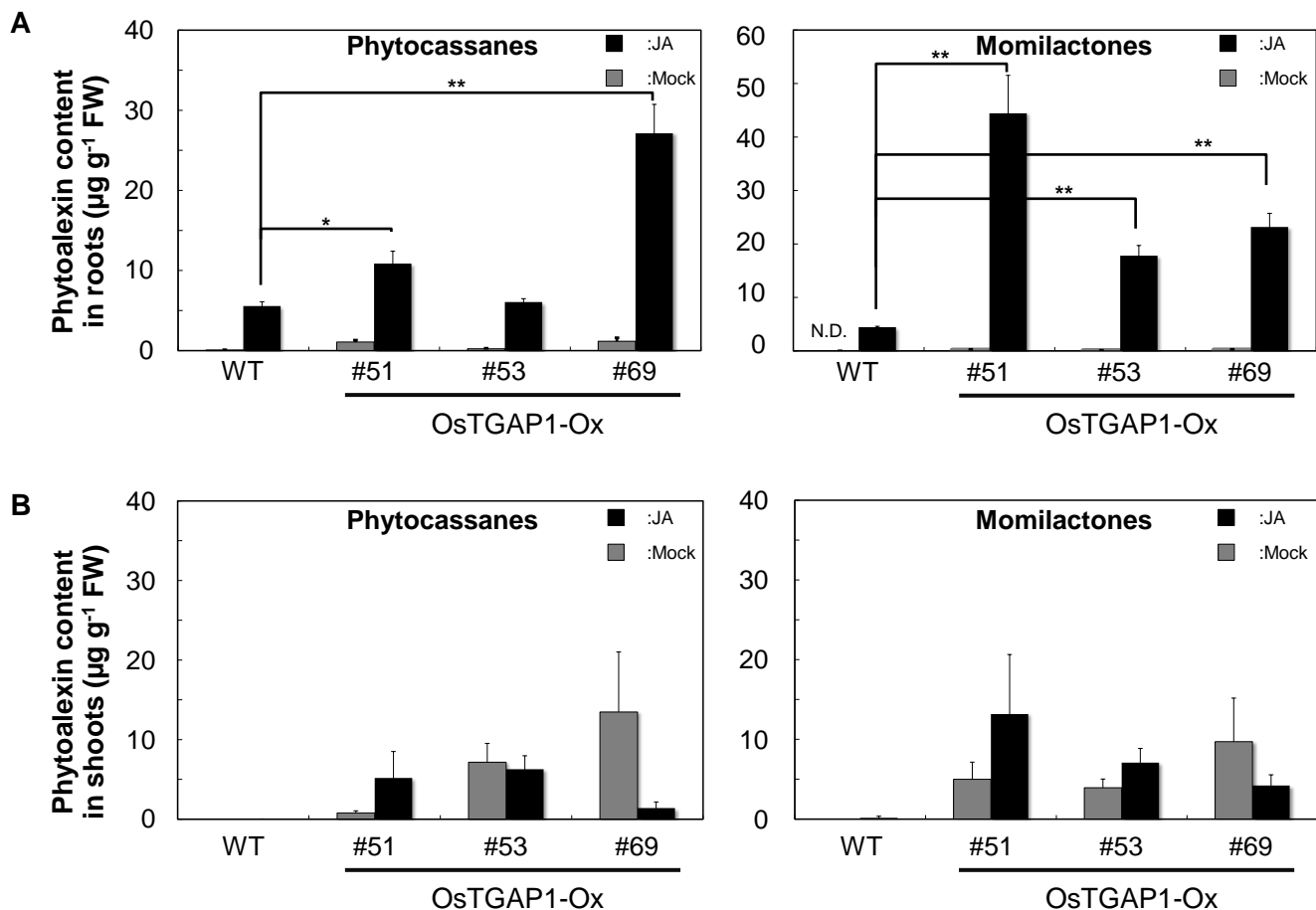
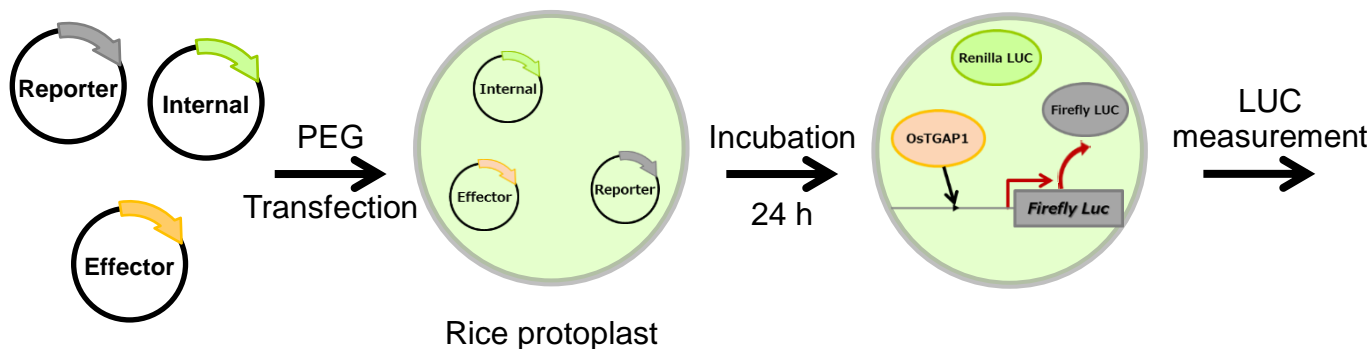


Fig.2-10. OsTGAP1 過剰発現株におけるエリシター処理時のジテルペン型ファイトアレキシン蓄積

- A) 野生型株, OsTGAP1 過剰発現株における根の JA (500 μM)による浸漬処理 24 時間後のモミラクトン類, ファイトカサン類の蓄積 ($n \geq 10$). N.D.=not detected, 有意差検定は JA 処理 24 時間後における野生型株の根での値との T 検定により行った (**: P value<0.01, *: P value<0.05). 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を示す.
- B) 野生型株, OsTGAP1 過剰発現株における根への JA (500 μM)による浸漬処理 24 時間後の地上部でのモミラクトン類, ファイトカサン類の蓄積 ($n \geq 10$). N.D.=not detected. 縦軸はファイトアレキシン蓄積量を示す.

A



B

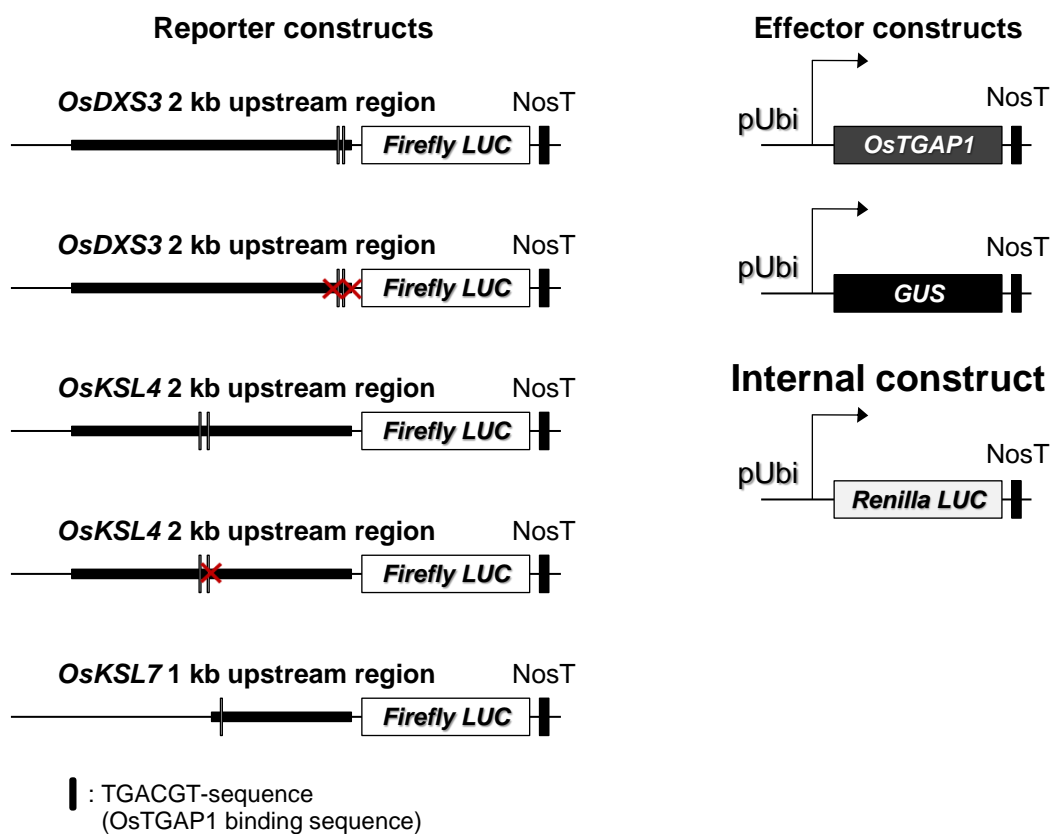


Fig.2-11. イネ根プロトプラスト一過的発現系を用いた OsTGAP1 の機能解析

- A) イネプロトプラストを用いた一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイの模式図
- B) 一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイに用いたエフェクター、レポーター、インターナルコンストラクトの模式図を示す。

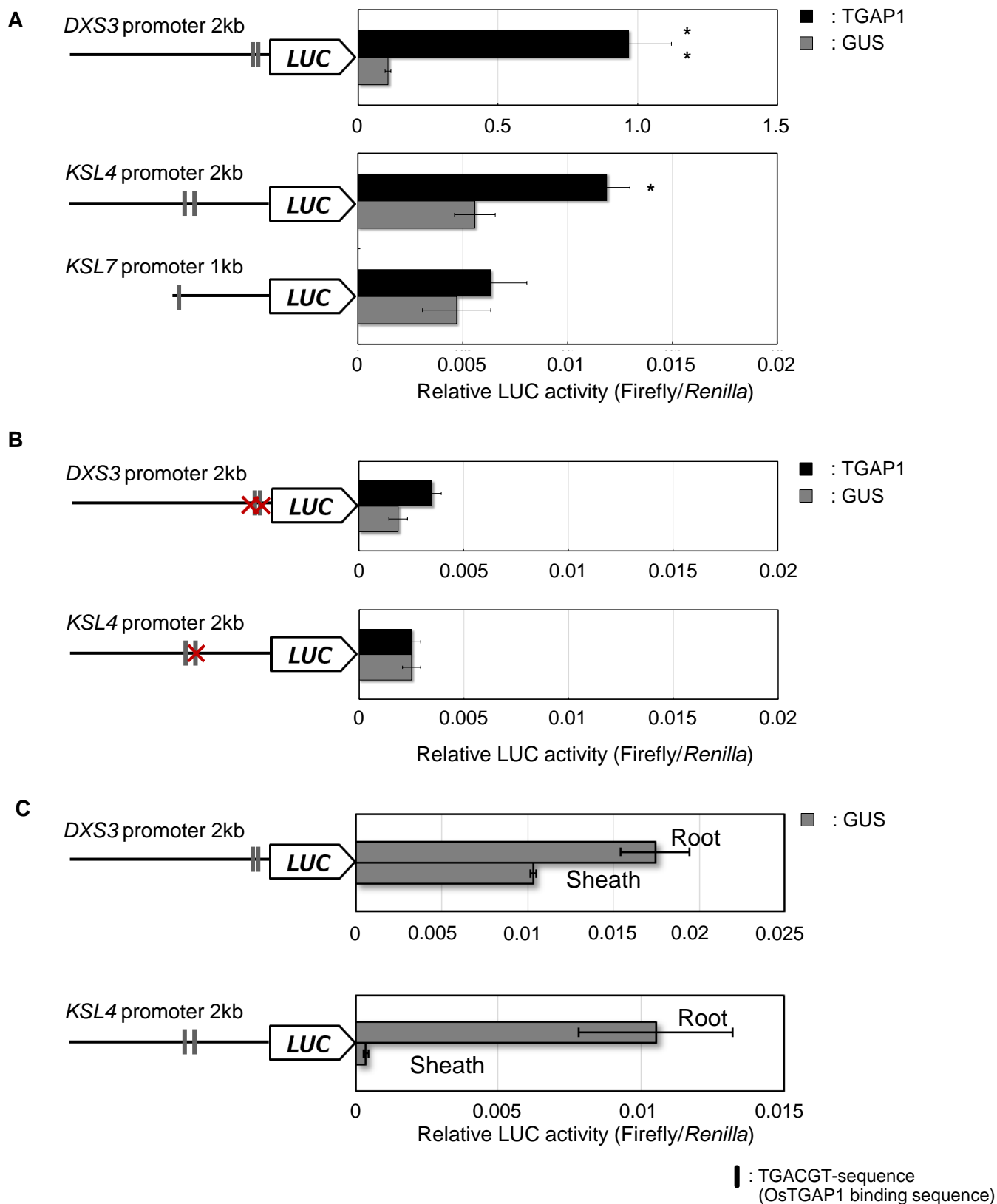


Fig.2-12. イネ根プロトプラスト一過的発現系を用いた *OsTGAP1* の機能解析

- A) 野生型株の根のプロトプラストを用いた一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイにより測定した *OsDXS3*, *OsKSL4*, および *OsKSL7* プロモーターに対する *OsTGAP1* の転写活性を示す。相対活性は Firefly LUC を *Renilla* LUC で割ることにより算出した。有意差検定はエフェクターを GUS とした場合と *OsTGAP1* とした場合の値との T 検定により行った ($n \geq 3$, **: P value < 0.01, *: P value < 0.05)
- B) *OsDXS3* および *OsKSL4* プロモーターのミュートーション解析。
- C) 野生型株の根及び葉身プロトプラストにおける *DXS3*, *KSL4* プロモーターの相対活性値を示す。

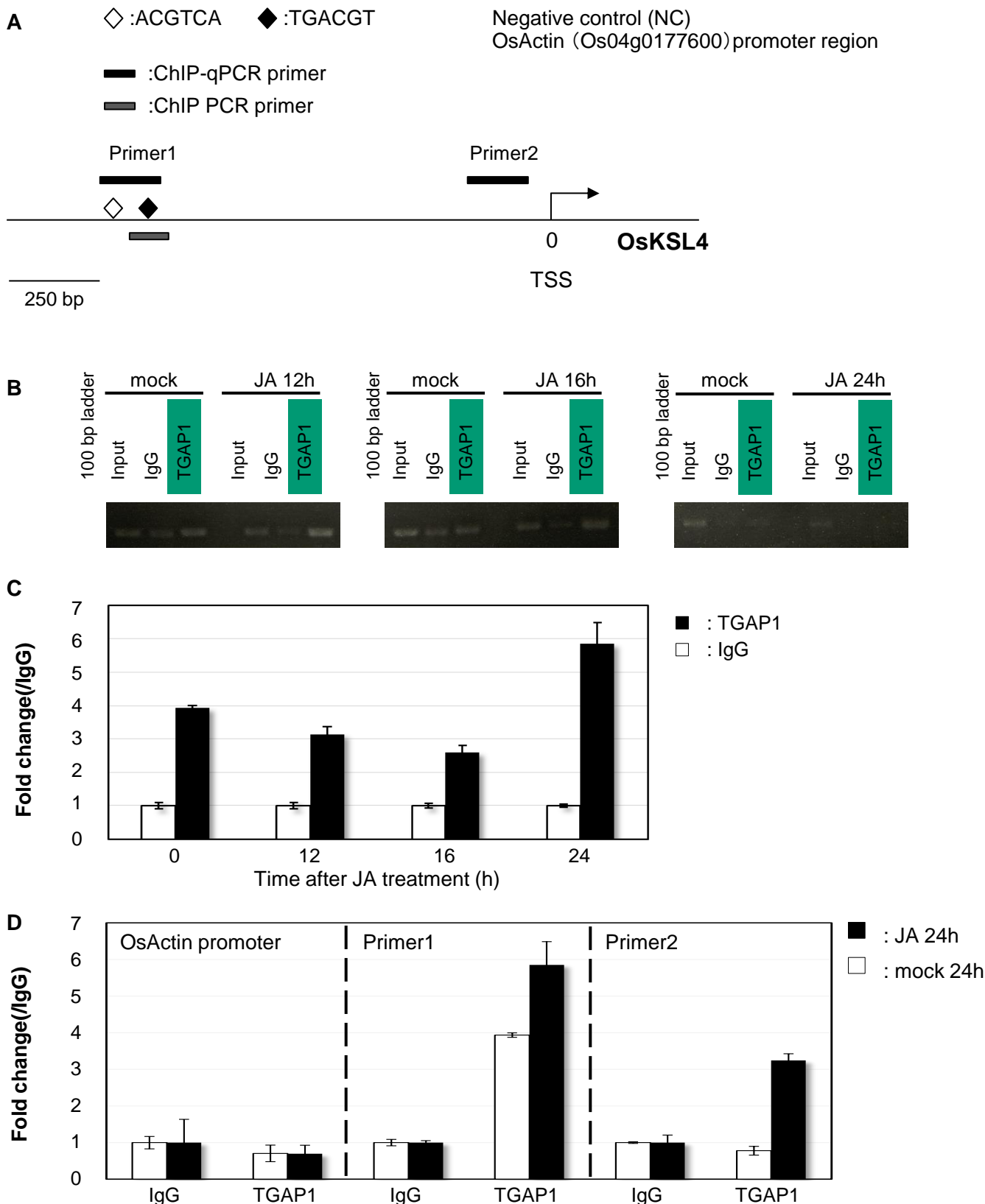


Fig.2-13. 野生型株の根における OsTGAP1 の *OsKSL4* プロモーターに対する結合性の評価

- A) *OsKSL4* 遺伝子プロモーター領域と、上流に存在する TGACGT-sequence の模式図。赤矢印は定量 PCR に用いたプライマーペア、緑矢印は半定量的 PCR に用いたプライマーペアを示す。
- B) 野生型株の根に対し JA(500 μ M)による浸漬処理後 0, 24 時間後での *OsKSL4* プロモーターに対する OsTGAP1 の結合性を ChIP-qPCR により解析した。OsTGAP1 抗体による濃縮はコントロールである IgG に対する fold change で示す。

第 3 章

OsTGAP1 とその相互作用因子 (OsOsTIF) によるファイトアレキシン生合成遺伝子の発現制御

本章の内容は、学術雑誌論文として出版予定であり、出版社との契約条件によって公表できない。

第 4 章

植物体の根における OsTGAP1 によるモミラクソン生産制御の生理的意義

本章の内容は、学術雑誌論文として出版予定であり、出版社との契約条件によって公表できない。

第5章 総括と展望

本章の内容は、学術雑誌論文として出版予定であり、出版社との契約条件によって公表できない。

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。

研究を行う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、研究生生活全般にわたり御指導ご鞭撻頂き、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。博士課程からの入学で、経験や知識不足のため何かとご迷惑や至らない点ばかりだった私を温かく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、過剰発現イネの作製をして頂きました、農業生物資源研究所・南栄一博士ならびに酒澤洋子博士に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。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。研究にあたり、多大なるご助言とご協力を賜りました帝京大学・山根久和教授ならびに宮本皓司先生に心より感謝致します。博士課程の三年間をともに支え合い、時に頼れる先輩として厳しく指導して下さいました小川哲史様に心から御礼申し上げます。また、研究するにあたり特に支え合い鼓舞しつつ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 Ioana Valea さん、河野響くん、伊藤綾華さんに感謝致します。そして日々の研究生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。皆様の支えとご尽力のおかげで、未熟な私も博士を修了することができました。最後になりましたが、わたしの博士課程でお世話になりましたすべての関係者の皆様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。

2018 年 3 月