イネの bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の機能解析

応用生命工学専攻

平成 21 年度博士課程進学

氏名　　宮本　皓司

指導教員　　山根　久和

イネの**bZIP** 型転写因子**OsTGAP1** の機能解析

目次

	目次	I
	略語表	III
	論文の内容の要旨	V
第1章	**序論**	**1**
1-1	**植物の基礎的病害抵抗性反応**	**1**
1-2	**ファイトアレキシン**	**2**
1-3	**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**	**6**
1-4	**ヒストン修飾を介した転写制御**	**8**
1-5	**植物の病害抵抗性反応に関与するTGA factor**	**9**
1-6	**本研究の目的**	**12**
	第1章の図	**14**
第2章	**ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現制御におけるOsTGAP1の関与**	**24**
2-1	**緒言**	**24**
2-2	**材料と方法**	**25**
2-2-1	イネの培養細胞の培養とキチンエリシター処理	25
2-2-2	OsTGAP1過剰発現株培養細胞	26
2-2-3	イネ培養細胞におけるファイトアレキシンの定量	26
2-2-4	イネ培養細胞からのtotal RNA抽出	27
2-2-5	Total RNAからのcDNA合成	27
2-2-6	定量的RT-PCRによる発現量の解析	27
2-2-7	マイクロアレイ解析	28
2-2-8	本章で扱った遺伝子のgene ID	29
2-3	**結果および考察**	**31**
2-3-1	T7-OsTGAP1過剰発現株におけるphytocassaneの蓄積量	31
2-3-2	T7-OsTGAP1過剰発現株における*OsKSL7* , *OsDXS3* の発現解析	31
2-3-3	OsTGAP1過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析	32
	第2章の図	**35**
第3章	**OsTGAP1の結合領域の網羅的同定**	**43**
3-1	**緒言**	**43**
3-2	**材料と方法**	**44**
3-2-1	イネの培養細胞の培養とキチンエリシター処理	44
3-2-2	OsTGAP1過剰発現株培養細胞	44
3-2-3	抗OsTGAP1抗体の作製	44
3-2-4	GST-OsTGAP1の発現および精製	44
3-2-5	イネ培養細胞からの核タンパク質および細胞質タンパク質の調製	45
3-2-6	抗OsTGAP1抗体を用いた免疫沈降	46
3-2-7	SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング解析	47
3-2-8	クロマチン免疫沈降(ChIP)	47
3-2-9	定量的PCRによるChIP-PCR	49
3-2-10	ChIP-seq解析	50
3-2-11	本章で扱った遺伝子のgene ID	51
3-3	**結果および考察**	**52**
3-3-1	ウェスタンブロッティング解析による抗OsTGAP1抗体の特異性の評価	52
3-3-2	免疫沈降による抗OsTGAP1抗体の特異性の評価	53
3-3-3	ChIP-PCRによる*OsKSL4* 上流域の濃縮の確認	53

3-3-4	ChIP-seq解析	54
	Table 3-1	**55**
	Table 3-2	**56**
	Table 3-3	**57**
3-3-5	ChIP-seq解析のデータの再現性の確認	58
3-3-6	OsTGAP1 結合領域の同定	58
3-3-7	OsTGAP1結合領域におけるコンセンサス配列	59
3-3-8	OsTGAP1標的候補遺伝子の同定	60
	Table 3-5	**61**
	Table 3-6	**65**
3-3-9	ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子近傍におけるOsTGAP1の結合	68
	第3章の図	**70**
第4章	**OsTGAP1と相互作用するタンパク質の探索**	**99**
4-1	**緒言**	**99**
4-2	**材料と方法**	**100**
4-2-1	イネの培養細胞の培養とキチンエリシター処理	100
4-2-2	Yeast two-hybrid assayに用いたベクターの作製	100
4-2-3	Hybrid Hunterによる転写活性化能を指標としたyeast two-hybrid assay	101
4-2-4	CytoTrapによるGTP結合タンパク質の活性化を指標としたyeast two-hybrid assay	104
4-2-5	cDNAライブラリーの構築	107
4-2-6	CytoTrapによるOsTGAP1と相互作用するタンパク質の探索	111
4-2-7	酵母からのプラスミド抽出	112
4-2-8	GST融合タンパク質の発現および精製	112
4-2-9	MBP融合タンパク質の発現および精製	112
4-2-10	Pull-down assay	113
4-2-11	SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング解析	114
4-2-12	ChIP-PCRによるヒストン修飾の解析	114
4-2-13	本章で扱った遺伝子のgene ID	116
4-3	**結果および考察**	**117**
4-3-1	核内における転写活性化を指標としたyeast two-hybrid assay	117
4-3-2	CytoTrapによるyeast two-hybrid assayの準備	117
4-3-3	cDNAライブラリーの構築	118
4-3-4	CytoTrapによるOsTGAP1と相互作用するタンパク質の探索	119
	Table 4-6	121
4-3-5	Pull-down assayによるOsTGAP1とTIF1の相互作用の確認	122
4-3-6	ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の遺伝子領域におけるヒストン修飾の解析	123
	第4章の図	125
第5章	**総括と展望**	**140**
	参考文献	**142**
	補表1	**153**
	補表2	**181**
	謝辞	**209**

略語表

3-AT	3-Aminotriazole
ANOVA	Analysis of variance
bHLH	Basic helix-loop-helix
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Base pair
BS^3	Bis[sulfosuccinimidyl] suberate
BSA	Bovine serum albumin
bZIP	Basic-leucine zipper
CaMV	Cauliflower mosaic virus
cDNA	Complementary DNA
CFU	Colony-forming unit
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
cRNA	Complementary RNA
Cy3	Cyanine3
Cy5	Cyanine5
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
DIBOA	2,4-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one
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
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
HGB	High glycerol buffer
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IAN	Indole-3-acetonitirile
IAOx	Indole-3-acetaldoxime
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunoprecipitation
IRGSP	International Rice Genome Sequencing Project
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry
LGB	Low glycerol buffer
LOB domain	Lateral organ boundaries domain
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBP	Maltose binding protein
MEP	Methylerythritol phosphate
mRNA	Messenger RNA
OD	Optical density
ORF	Open reading frame
OsTGAP1	*Oryza sativa* TGA factor for phytoalexin productin 1
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride

ppm	Parts per million
PR	Patogenesis-related
rATP	Adenosine triphosphate
RI	Radioisotope
RiceXPro	The Rice Expression Profile Database
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloroacetic acid
TIF1	OsTGAP1 interacting factor 1
UBQ	Ubiquitin
UV	Ultraviolet

論 文 の 内 容 の 要 旨

応用生命工学専攻
平成２１年度博士課程進学
氏　名　宮本　皓司
指導教員名　山根　久和

論文題目　　イネの bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の機能解析

植物は病原体の表層由来の物質（キチンエリシターなど）が細胞膜上のレセプターに結合することで、病原体の感染を認識する。そして、これが引き金となって、様々な二次シグナル物質を介したシグナル伝達が起こり、エリシター応答性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、最終的に抗菌性タンパク質の生産や抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産などの一連の防御応答が誘導される。イネにおいては、15 種類のファイトアレキシンが同定されている。このうちフラボノイド型の sakuranetin を除いた 14 種類はジテルペン型の構造を持つ。ジテルペン型では、momilactone および phytocassane が主要なファイトアレキシンであることが知られている。また、momilactone および phytocassane の生合成酵素遺伝子は、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ていることが明らかになっている。高等植物において二次代謝産物の生合成に関与する一連の酵素遺伝子が遺伝子クラスターを形成している例は、数例しか報告例がなく、その発現制御機構に興味が持たれた。これまでに我々の研究グループにより、キチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 が momilactone 生合成酵素遺伝子の 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ていた。さらに、その後の OsTGAP1 過剰発現株を用いた解

析から、OsTGAP1 は *OsKSL4* 以外の momilactone 生合成酵素遺伝子の転写制御にも関与していることが明らかになり、OsTGAP1 が momilactone 生産を制御する鍵転写因子として機能することが明らかになっていた。しかしながら、momilactone 生合成酵素遺伝子以外のジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現制御への OsTGAP1 の関与や OsTGAP1 による momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターの転写制御機構などについては未解明であった。

そこで、本研究においては、OsTGAP1 の機能解明を目的として、OsTGAP1 過剰発現株におけるファイトアレキシン生産能の解析やトランスクリプトーム解析を行うとともに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP)と次世代シークエンサーによる高速シークエンシングを組み合わせた ChIP-seq 解析により OsTGAP1 の標的遺伝子の網羅的同定を行った。また、OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索も行った。

ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現制御への OsTGAP1 の関与

まず、OsTGAP1 が phytocassane 生産に関与するかを検討するため、OsTGAP1 過剰発現株における phytocassane の蓄積量を解析したところ、momilactone と同様にエリシター処理後の phytocassane の蓄積量が、野生型株と比較して OsTGAP1 過剰発現株において顕著に増加した。このことから、OsTGAP1 が momilactone 生産だけでなく phytocassane 生産の制御にも関わっていることが示された。次に、ファイトカサン生合成酵素遺伝子の 1 つである *OsKSL7* の OsTGAP1 過剰発現株における発現量を定量的 RT-PCR により解析した。その結果、エリシター処理後に OsTGAP1 過剰発現株において野生型株と比較して、*OsKSL7* の発現量が顕著に増加していた。また、さらに上流の生合成段階である methylerythritol phosphate (MEP)経路の酵素遺伝子である *OsDXS3* についても同様に、OsTGAP1 過剰発現株における発現量を定量的 RT-PCR により解析したところ、エリシター処理後では OsTGAP1 過剰発現株において野生型株と比較して、*OsDXS3* の発現量が顕著に増加していた。また、OsTGAP1 過剰発現株を用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、エリシター処理後では OsTGAP1 過剰発現株において野生型株と比較して、すべての phytocassane 生合成酵素遺伝子・MEP 経路遺伝子の発現量が上昇していた。これらのことから OsTGAP1 がイネのジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御するマスター転写因子であることが明らかになった。

OsTGAP1 の結合領域の網羅的同定

イネゲノム中における OsTGAP1 の結合領域を網羅的に同定するため、キチンエリシター未処理および処理後 6 時間の OsTGAP1 過剰発現株培養細胞を用いて、抗 OsTGAP1 抗体による ChIP-seq 解析を行い、OsTGAP1 の結合領域の網羅的同定を行った。その結果、エリシター未処理時において 2,763 箇所を、エリシター処理後 6 時間において 2,777 箇所を、それぞれ OsTGAP1 の結合領域として同定した。さらに、先に行ったトランスクリプトーム解析の結果と合わせることで、OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp

以内に結合していて、かつ OsTGAP1 過剰発現株において発現量が上昇する遺伝子が 161 遺伝子、OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp 以内に結合していて、かつ OsTGAP1 過剰発現株において発現量が低下する遺伝子が 88 遺伝子存在していることを見出した。これらが OsTGAP1 の標的候補遺伝子と考えられる。

次に、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子近傍における OsTGAP1 の結合位置を解析した。まず、MEP 経路遺伝子については、*OsDXS3* の転写開始点近傍にエリシター未処理時・処理時のどちらにおいても OsTGAP1 の結合領域が見出された。このことから、OsTGAP1 が *OsDXS3* の上流域に結合し、直接転写制御を行っていると考えられる。その一方で、他の MEP 経路遺伝子については遺伝子領域近傍への OsTGAP1 の結合は見出されなかった。次に momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターについては、*CYP99A2, OsKSL4, CYP99A2* については上流域への OsTGAP1 の結合が確認された。しかし、*CYP99A3, OsMAS* の上流域には OsTGAP1 の結合領域は認められなかった。さらに、phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスターにおいても、phytocassane 生合成酵素遺伝子の上流域に OsTGAP1 の結合は見出されず、遺伝子間領域やクラスター領域の外側において OsTGAP1 の結合が認められた。このことから、OsTGAP1 は全てのジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の上流域それぞれに結合して転写制御を行っているのではなく、未知の制御機構が存在することが示唆された。また、遺伝子間領域やクラスター領域の外側における OsTGAP1 の結合がこれらの遺伝子の転写制御においてどのような意味を持つのかは興味深く、今後解析していく必要がある。

また、OsTGAP1 が上流域に結合しているジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子についてはエリシター未処理時・処理時どちらにおいても OsTGAP1 の結合が認められた。しかし、OsTGAP1 過剰発現株において、エリシター未処理時にはジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現は微弱にしか誘導されず、エリシター処理によりその発現が顕著に誘導されることがわかっている。このことから、これらの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。

OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索

細胞質における GTP 結合タンパク質の活性化を指標とした yeast two-hybrid 法を用いて、OsTGAP1 と相互作用するタンパク質を探索した。エリシター未処理時および処理後 6 時間の野生型株培養細胞から cDNA ライブラリーを作製し、スクリーニングを行った。スクリーニングにより得られた陽性クローンのシークエンスを解析したところ、10 個の候補遺伝子を得た。その中には、トウモロコシにおいてヒストン修飾に関与することが報告されている ENT-domain containing protein のホモログ遺伝子が含まれていた。これを TIF1 (OsTGAP1 Interacting Factor 1)と名付け、以後の解析対象とした。まず、pull-down assay により TIF1 と OsTGAP1 との相互作用を確認した。さらに、ヒストン抗体を用いた ChIP 解析により、*OsKSL4* の遺伝子

領域および上流域のヒストン修飾を解析したところ、翻訳開始点付近の領域においてキチンエリシター処理により、ヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導されることが示唆された。さらに、他の momilactone 生合成酵素遺伝子におけるヒストン修飾を解析したところ、*OsCPS4* についても、翻訳開始点付近の領域においてヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導されることが示唆された。*CYP99A2, CYP99A3, OsMAS* については、翻訳開始点付近の領域においてヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導された。また、MEP 経路遺伝子である *OsDXS3* については、転写開始点付近の領域において、エリシター処理によりヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導された。これらのことから、*OsKSL4, OsCPS4* の転写制御にヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が関与していることが考えられた。また、*CYP99A2, CYP99A3, OsMAS, OsDXS3* の転写制御についても、ヒストン H3 の K4 のトリメチル化が関与していることが示唆された。今後 ChIP-seq 解析や ChIP-chip 解析により、OsTGAP1 下流遺伝子の遺伝子領域近傍におけるヒストン修飾を網羅的に解析していくとともに、これらのヒストン修飾に OsTGAP1 や TIF1 が関係しているかを解析することが必要であると考えられる。

総括

本研究においては、イネの bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の機能解析を行い、OsTGAP1 がジテルペン型ファイトアレキシン生合成を制御するマスター転写因子であることを示すとともに、OsTGAP1 の標的候補遺伝子の網羅的同定を行った。さらに、OsTGAP1 によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の転写制御機構については、生合成酵素遺伝子の上流域それぞれに結合して転写制御を行っているのではなく、未知の制御機構が存在する可能性を示した。今後は、遺伝子間領域やクラスター領域の外側における OsTGAP1 の結合の意義の解明も含め、さらなる解析を行っていくことが必要である。また、momilactione 生合成酵素遺伝子クラスターおよび *OsDXS3* の転写制御にはヒストン H3K9/14 のアセチル化とヒストン H3K4 のトリメチル化の両方またはいずれか一方が関与していることが示唆された。今後は OsTGAP1 や TIF1 を介したこれらの遺伝子の転写制御とヒストン修飾の関係を明らかにしていくことで、OsTGAP1 によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の転写制御機構が明らかになると考えられる。

発表論文

A. Okada, K. Okada, K. Miyamoto, J. Koga, N. Shibuya, H. Nojiri, and H. Yamane: OsTGAP1, a bZIP transcription factor, coordinately regulates the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice. J Biol Chem (2009) 284:26510-8

第１章　序論

1-1　植物の基礎的病害抵抗性反応

近年、環境保全型の農業技術へ注目が集まっている。このような農業技術の１つに、農作物の病害対策として農薬ではなく植物が元来有している防御機構を利用するものがある。これを実現するために、植物の病害抵抗性反応について研究がなされ、多くの知見が集まってきている。しかし、依然として分子レベルから見た植物の病害抵抗性の発現に至るシグナル伝達機構については未解明な部分が少なくない。

植物が病原体の感染を受けると、病原体の表層由来の物質が細胞膜上のレセプターによって認識され、それによって過敏感細胞死、活性酸素群の生産、細胞壁の強化、抗菌性タンパク質の生産、そして抗菌性の二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産など一連の防御応答が誘導されると考えられている(Yoshikawa et al., 1983, Nicaise et al., 2009)。このような植物の生態防御反応を誘導する作用のある物質をエリシターと総称し、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種のものがエリシターとして機能することが分かっている(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。

このようなエリシターの認識から、抵抗性反応の発現にいたるまでのシグナル伝達のモデルを Fig. 1-1 に示す。

まず、細胞膜上のレセプターにより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 AtCERK1 (Miya et al., 2007)や OsCERK1(Shimizu et al., 2010)、フラジェリン(flg22)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。

多くの植物において、エリシター処理により細胞膜上のイオンチャネルの活性化が引き起こされることが知られており、これが防御応答に関与していると考えられている。イオンチャネルの活性化により、エリシター処理後数分で細胞内に Ca^{2+}が流入し、pH が低下する(Nurnberger et al., 2006, 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 などを介したシグナル伝達(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、その結果として急速な活性酸素の発生が起こる(Torres et al., 2006)。このような活性酸素種の急速な生産は oxidative burst と呼ばれる。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 (Mehdy, 1994)。さらに活性酸素も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と考えられている(Torres et al., 2006)。また、サリチル酸・ジャスモン酸・エチレン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知られている(Bari et al., 2009)。

さらに、エリシターシグナルは 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、核へと伝達される(Pitzschke et al., 2009)。そして最終的に抗菌性タンパク質の生産・ファイトアレキシンの生産といった様々な防御応答が引き起こされる。

1-2　ファイトアレキシン

植物の病害抵抗性反応の代表的なものとしてファイトアレキシンの生産があげられる。

ファイトアレキシンは 1940 年に Müller らによってその存在が予測された。Müller らは、非親和性のジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* を接種したジャガイモの塊茎において、その後親和性のジャガイモ疫病菌を接種してもその感染が抑えられることを見出した。このことから菌感染を受けたジャガイモの塊茎において病原菌の増殖を阻害する物質が蓄積していると予測し、その物質をファイトアレキシンと名付けた(Müller and Börger, 1940)。その後、1958 年に Müller よって非親和性病原菌の感染を受けたマメのさやにおいて、強い抗菌活性を持つ物質が蓄積していることが報告され、ファイトアレキシンの存在が実証された(Müller, 1958)。1981 年には、ファイトアレキシン＝「病原菌感染やエリシター処理によって生産が誘導される抗菌活性を持つ低分子化合物」という定義付けが Paxton によってなされた(Paxton, 1981)。1960 年代前半に、エンドウマメのファイトアレキシンである pisatin の構造が報告された(Cruickshank, 1963)。これを皮切りに、数多くのファイトアレキシンが現在までに報告されている(Hammerschmidt, 1999)。ファイトアレキシンの生合成経路や生産制御機構については、モデル植物であるシロイヌナズナおよびイネにおいて多くの知見が得られている。

・シロイヌナズナにおけるファイトアレキシン

シロイヌナズナにおいては、camalexin (Tsuji et al., 1992)と rapalexin A (Pedras et al., 2007)という２種類のファイトアレキシンが知られている(Fig. 1-2A)。このうち camalexin については、その生合成経路や生産制御機構の研究が盛んになされている。

Camalexin は *in vitro* において抗菌活性を持つことが報告されている(Glawischnig, 2007)とともに、camalexin 欠損変異株において黒すす病菌 *Alternaria brassicicola* や灰色カビ病菌 *Botrytis cinerea* などの病原菌に対する抵抗性が低下することから、camalexin がこれらの病害菌に対する抵抗性反応において機能を担っていると考えられる(Kliebenstein et al., 2005, Nafisi et al., 2007)。

Camalexin の生合成経路を Fig. 1-2B に示す。まず、トリプトファンが CYP79B3 による酸化反応を受け、indole-3-acetaldoxime (IAOx)へと変換される。さらに、IAOx は CYP71A13 による酸化反応を受け、indole-3-acetonitrile (IAN)へと変換される。生成した IAN に対して、glutathione-S-transferase により glutathione が付加された後、γ-glutamyl transpeptidase もしくは phytochelatine synthase により、cysteine-IAN に変換される。さらに CYP71B15 (PAD3)による変換を受けて、最終的に camalexin が生成する(Glawischnig et al., 2004; Schuhegger et al., 2006; Nafisi et al., 2007; Bottcher et al., 2009, Su et al., 2011)。

Camalexin の生合成は病原菌の感染や様々なエリシター処理（ペプチドグリカンやキトサ

ンなどの生物的エリシター・硝酸銀などの非生物的エリシター）や UV 処理などによって誘導されることが知られている(Zhao et al., 1998, Tierens et al., 2002, Gust et al., 2007, Povero et al., 2011)。このような刺激の受容から camalexin の生合成に至るまでのシグナル伝達経路において、種々の植物ホルモン・活性酸素種などの二次シグナル物質や様々な転写因子や MAPK カスケードが機能していることが報告されている。

一般に病害抵抗性反応に関わる植物ホルモンと言われるジャスモン酸・サリチル酸・エチレンが camalexin の生産誘導に関与していることが知られている(Thomma et al., 1999, Heck et al., 2003, Denby et al., 2005, Rowe et al., 2010)。しかし、一方でそれぞれの植物ホルモンの欠損変異株やシグナル伝達変異株において camalexin の生産が起こることも報告されている(Thomma et al., 1999, Nawrath and Metraux, 1999, Roetschi et al., 2001, van Wees et al., 2003, Ren et al., 2008)ことから、camalexin の生産誘導にはこれらの植物ホルモンのシグナル伝達経路が複雑に絡み合っていると考えられる。また、植物ホルモンの一種であるオーキシンが ARF 転写因子の活性化を介して camalexin の生産誘導に関与していることが報告されている(Robert-Seilaniantz et al., 2010)。また、活性酸素種についても camalexin の生産誘導に関与することが報告されている(Chaouch et al., 2010)。

Camalexin の生産誘導には、MAPK カスケードのうち MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 カスケードが重要な役割を果たしていることが報告されている(Ren et al., 2008)。MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 カスケードにより、AtWRKY33 のリン酸化が引き起こされる。AtWRKY33 はリン酸化を受けることで転写活性化能が上昇し、*CYP71A13* や *CYP71B15* などの転写を誘導することが知られている(Mao et al., 2011)。また、AtWRKY33 による camalexin 生合成酵素遺伝子の転写制御には MPK4 も関与していることが知られている(Qiu et al., 2008)。また、AtWRKY18 および AtWRKY40 が *CYP71A13* などの camalexin 生合成酵素遺伝子の転写を負に制御していることが二重変異株を用いた研究から示唆されている(Pandey et al., 2010)。

このように、camalexin の生産誘導に関与する因子が同定されているが、病原菌感染やエリシター処理の受容から camalexin の生合成にいたるシグナル伝達経路においてこれらの因子がどのようなカスケードを形成しているかについては不明な点が多く、シグナル伝達経路の全貌解明にはさらなる研究が必要である。

・イネにおけるファイトアレキシン

イネにおいては、これまでに 15 種類のファイトアレキシンが同定されている(Fig. 1-3)。フラボノイド型の sakuranetin (Kodama et al., 1992)を除き、残りの 14 種は全て環状ジテルペン型である(Akatsuka et al., 1985, Kato et al., 1993, Yamada et al., 1993, Tamogami et al., 1993, Kato et al., 1994, Koga et al., 1995, Koga et al., 1997)。これらのジテルペン型ファイトアレキシンはその基本炭素骨格により、momilactone A および B, phytocassanes A-E, oryzalexins A-F, oryzalexin S の４つのタイプに分類される。これらのうち momilactone および phytocassane はそれらの生産量が高く、主要なジテルペン型ファイトアレキシンであると考えられている。

ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成経路を Fig. 1-4 に示す。ジテルペン型ファイト

アレキシンは全て 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。これらの反応を担う 6 種のジテルペン環化酵素(OsCPS2, OsCPS4, OsKSL7, OsKSL10, OsKSL4, OsKSL8)は全て単離・同定されている(Cho et al., 2004, Nemoto et al., 2004, Otomo et al., 2004a, Otomo et al., 2004b)。その後、ジテルペン炭化水素は酸化反応などを経て、それぞれのファイトアレキシンへと変換されると考えられる。Momilactone および phytocassane の生合成については、これらの酸化反応に関与する P450 酸化酵素やデヒドロゲナーゼが明らかになっている。Momilactone の生合成においては、CYP99A3 が 19 位の酸化に関わっている可能性が示され(Wang et al., 2011)、OsMAS が 3β-hydroxy-9βH-pimra-7,15-dien-19,6β-olide から momilactone A への変換を行うことが報告されている(Shimura et al., 2007)。Phytocassane の生合成においては、CYP76M7 が 11 位の酸化に (Swaminathan et al., 2009)、CYP71Z7 が 2 位の水酸化に関わっていることが強く示唆されている(蓑田、2008, Wu et al., 2011)。

また、興味深いことに momilactone 生合成酵素遺伝子(*OsCPS4*, *OsKSL4*, *CYP99A2*, *CYP99A3*, *OsMAS*)は 4 番染色体上において、ファイトカサン生合成酵素遺伝子(*OsCPS2*, *OsKSL7*, *CYP71Z7*, *CYP76M5-8*)は 2 番染色体上において、それぞれ遺伝子クラスターを形成していることがわかっている(Fig. 1-5) (Shimura et al., 2007, Swaminathan et al., 2009)。

さらに、GGDP 以前の生合成段階についても解析がなされており、ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成には methylerythritol phosphate (MEP)経路が関与することがわかっている(Fig. 1-4) (Okada et al., 2007) 。

一方、フラボノイド型の sakuranetin については naringenin が OsNOMT1 による一段階のメチル基転移反応を受けて生成することが示されている(清水、2010)。

これらのファイトアレキシンの生産はイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の感染や様々なエリシター処理（キチンオリゴ糖やスフィンゴ脂質などの生物的エリシター・塩化銅などの非生物的エリシター）や UV 処理などによって誘導されることが知られている(Akatsuka et al., 1985, Kodama et al., 1992, Kato et al., 1993, Tamogami et al., 1993, Yamada et al., 1993, Kato et al., 1994, Koga et al., 1995, Koga et al., 1997, Umemura et al., 2002)。

これらの刺激の受容から種々のファイトアレキシンの生合成に至るまでのシグナル伝達経路において、様々な因子が機能していることが報告されている。

イネにおけるキチンオリゴ糖の受容体である OsCERK1 の RNAi 株においては、キチンエリシター誘導のファイトアレキシン生産が強く抑制されることが知られている(Shimizu et al., 2010)。

イネの葉にジャスモン酸を処理するとファイトアレキシンの生産が誘導されることから、ファイトアレキシン生産においてジャスモン酸が重要なシグナル物質として機能すると考えられてきた(Rakwal et al., 1996)。しかし、ジャスモン酸欠損変異株を用いた解析から、momilactone および phytocassane の生産にはジャスモン酸は必須ではないが、sakuranetin の生産にはジャスモン酸が必須であることが明らかになった（清水、2010）。また、サイトカイニン処理によりファイトアレキシンの生産が誘導されることも知られている(Ko et al.,

2010)。

シロイヌナズナ MPK3/MPK6 のイネオルソログである OsMPK3/OsMPK6 もファイトアレキシンの生産誘導に関わることが報告されている。キチンエリシター処理により活性化される OsMKK4-OsMPK3/OsMPK6 カスケードにより、momilactone および phytocassane の生合成酵素遺伝子の転写が誘導され、momilactone および phytocassane の生産が誘導されることが知られている(Kishi-Kaboshi et al., 2010a)。

また、calcineurin B-like protein-interacting protein kinase (CIPK)のうち OsCIPK14/15 が、キシラナーゼエリシターによって誘導されるファイトアレキシン生産に部分的に関わっていることもわかっている(Kurusu et al., 2010)。

さらに、bZIP (basic-leucine zipper) 型転写因子である OsTGAP1 (*Oryza sativa* TGA factor for phytoalexin productin 1) が momilactone の生合成を制御する鍵転写因子として同定されている。Momilactone 生合成酵素遺伝子の 1 つである *OsKSL4* のプロモーター領域に存在するエリシター応答性シスエレメントとして働く TGACG-motif (TGACGT) に結合し、転写活性化を行う転写因子として OsTGAP1 は同定された(Okada et al., 2009)。その後の、*OsTGAP1* 過剰発現株を用いた解析から、OsTGAP1 が *OsKSL4* だけでなく他の momilactone 生合成酵素遺伝子の発現制御にも関与することおよび *OsTGAP1* 過剰発現株においては momilactione の生産量が増大することが明らかになっている(Okada et al., 2009, Okada, 2011)。

シロイヌナズナにおいては、先に述べたように AtWRKY33 が MPK3/MPK6 によりリン酸化を受けることで活性化され、camalexin 生合成酵素遺伝子の転写を誘導することが知られている。そこで、イネにおいても OsTGAP1 が OsMPK3/OsMPK6 によりリン酸化を受けることで活性化する可能性も考えられたが、*in vitro* においては OsMPK3/OsMPK6 による OsTGAP1 のリン酸化は確認できていない(Kishi-Kaboshi et al., 2010b)。

また、サリチル酸シグナル伝達経路において重要な役割を担う OsWRKY45 がジテルペン型ファイトアレキシン生産の制御に関わることが過剰発現株や発現抑制株を用いた解析から明らかになりつつある（高辻、私信）。さらに、ブラシノステロイドシグナル伝達に関与すると考えられる bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子 BU2 も、過剰発現株や発現抑制株を用いた解析からジテルペン型ファイトアレキシン生産の制御に関わると考えられている（森、私信）。

イネにおけるファイトアレキシン生産についても、病原菌感染やエリシター処理の受容からそれぞれのファイトアレキシン生合成にいたるシグナル伝達経路の全貌解明にはさらなる研究が必要である。

イネのファイトアレキシンは、*in vitro* において抗菌活性を持つことが報告されている(Akatsuka et al., 1985, Kodama et al., 1992, Kato et al., 1993, Tamogami et al., 1993, Yamada et al., 1993, Kato et al., 1994, Koga et al., 1995, Koga et al., 1997)。また、momilactone と oryzarexin S の生合成酵素遺伝子である *OsCPS4* の変異株においてイネいもち病菌に対する抵抗性が低下することから、momilactone および oryzarexin S の両方もしくは一方がイネいもち病菌に対する抵抗性に関与していると考えられる（豊増、私信）。さらに、イネいもち病菌を接種した葉身に対して、momilactone A を吸収させることにより、病状の進展が抑えられることが

示されている(Hasegawa et al., 2010)。

また、momilactone については寒天培地上で生育させたイネの根から浸出し他の植物の生育を阻害するアレロパシー物質として働くことが報告されている(Kato-Noguchi et al., 2002, Kato-Noguchi and Ino, 2003, Toyomasu et al., 2008)。Phytocassane についても同様に根から浸出することが報告されているが、アレロパシー物質としての活性は確認されていない(Toyomasu et al., 2008)。

1-3　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

バクテリアにおいては、共通の機能に関係する遺伝子群がゲノム上において近接して存在してオペロンを形成し 1 つの polycistronic な転写単位として転写される現象が一般的に見られる。バクテリアの遺伝子のうち 30-50%がこのようなオペロンを形成していると言われる(Zheng et al., 2002)。真核生物においても、カビなどにおいては二次代謝産物の生合成酵素遺伝子がゲノム中において近傍に存在し、遺伝子クラスターを形成している例が一般的に見られる(Misiek and Hoffmeister, 2007)。ただし、バクテリアの場合と異なり、これらのクラスター上の遺伝子はそれぞれ monocistronic な転写単位として転写される。

植物においては、二次代謝産物の生合成酵素遺伝子はゲノム中において離れて存在していると考えられてきた。しかし、植物においても二次代謝産物の生合成酵素遺伝子が遺伝子クラスターを形成している例が 6 例報告されている(Chu et al., 2011, Field et al., 2011)。

植物において最初に報告された遺伝子クラスターは、トウモロコシにおける 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) 生合成酵素遺伝子クラスターである(Frey et al., 1997)。DIMBOA の生合成経路を Fig. 1-6 に示す。まず、トリプトファン合成酵素αサブユニットのホモログである Bx1 によって indole-3-glycerole phosphate から indole が生成する。次に、4 つの P450 酸化酵素 Bx2/3/4/5 によって、indole が 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA)へと変換される(Frey et al., 1997)。その後、glycosyltransferase である Bx8/9 によってグリコシド化を受け、DIBOA-glc が生成する(von Rad et al., 2001)。さらに、dioxygenase である Bx6 と methyltransferase である Bx7 により、DIBOA-glc が DIMBOA-glc へと変換される(Frey et al., 2003, Jonczyk et al., 2008)。Indole-3-glycerole phosphate から DIMBOA-glc までの生合成に関与する 9 つの酵素遺伝子 *Bx1-9* のうち、*Bx1,2,3,4,5,6,8* が 4 番染色体上において 6 cM の領域に集中して存在し、遺伝子クラスターを形成していることが明らかになっている(Frey et al., 2003, Jonczyk et al., 2008)。*Bx7* については、これらの遺伝子クラスターから 35 cM 離れた位置に位置している(Jonczyk et al., 2008)。*Bx9* については 1 番染色体に位置することが明らかになっている(Frey et al., 2003)。

カラスムギ(*Avena* spp.)においては、avenacin 生合成酵素遺伝子が遺伝子クラスターを形成していることが報告されている(Qi et al., 2004)。Avenacin の生合成経路を Fig. 1-7 に示す。まず、2,3-oxidosqualene がテルペン環化酵素である Sad1 による環化反応を受け、β-amyrin へと変換される(Qi et al., 2004)。その後、P450 酸化酵素である Sad2、glycosyltransferase である Sad3/4、acyltransferase である Sad7 による変換および他の変換により avenacin が生成する(Qi et al., 2004, Qi et al., 2006, Mylona et al., 2008, Mugford et al., 2009)。Avenacin 生合成酵素遺伝子

のうち、*Sad7, Sad1, Sad2* が約 143 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(Mugford et al., 2009)。また、*Sad3* についてもこれらの３つの遺伝子と強く連鎖しており、近傍に存在していることが示されている(Osbourn, 2010)。*Sad4* については、*Sad1* と連鎖しておらず、染色体上の別の位置に存在していると考えられる(Qi et al., 2004)。

シロイヌナズナにおいては、thalianol 生合成酵素遺伝子クラスターおよび marneral 生合成酵素遺伝子クラスターの存在が報告されている(Field and Osbourn, 2008, Field et al., 2011)。Thalianol とその誘導体の生合成経路を Fig. 1-8 に示す。まず、2,3-oxidosqualene がテルペン環化酵素である THAS による環化反応を受け、thalianol へと変換される。その後、P450 酸化酵素である THAH, THAD により thalian-diol, desaturated thalian-diol へと変換される。これら３つの酵素遺伝子は 30 kb 以内に集中して存在し､遺伝子クラスターを形成している(Field and Osbourn, 2008)。また、この遺伝子クラスターの近傍には aceyltransferase をコードする遺伝子が存在しているが、thalianol 生合成への関与は不明である。Marneral とその誘導体の生合成経路を Fig. 1-8 に示す。まず、2,3-oxidosqualene がテルペン環化酵素である MRN1 による環化反応を受け、marneral へと変換される。その後、P450 酸化酵素である MRO により hydroxylated desaturated marneral へと変換される。これら２つの酵素遺伝子は 30 kb 以内に集中して存在し、遺伝子クラスターを形成している (Field et al., 2011)。また、この遺伝子クラスターの近傍には P450 酸化酵素遺伝子が存在しているが、marneral 生合成への関与は不明である。

イネにおいては、前項で述べたようにジテルペン型ファイトアレキシンである momilactone および phytocassane の生合成酵素遺伝子がそれぞれ遺伝子クラスターを形成していることが我々の研究グループおよび Iowa 大学の Peters のグループにより報告されている。

このような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が限られた例であるのか全ての植物において一般的な現象であるのかは現在のところ不明であるが､今後植物の二次代謝についての研究が進むとともに､新たな生合成酵素遺伝子クラスターが発見される可能性も考えられる。

植物がなぜこのようなクラスターを持っているのかについてははっきりとした理由は得られていないが、共遺伝(co-inheritance)と協調制御(co-regulation)という２つの利点があるのではないかと考えられている(Chu et al., 2011)。

・共遺伝 (co-inheritance)

Avenacin 生合成酵素遺伝子である *sad3* 変異株や thalianol 生合成酵素遺伝子 *THAS* の過剰発現株では、根の形態異常や生育阻害が引き起こされることが報告されており、これは毒性を持つ生合成中間体が蓄積することによるものであると予想されている(Chu et al., 2011)。また、我々のグループの研究において、phytocassane 生合成酵素に関与すると考えられる *CYP76M7/M8* の RNAi 株では生育後期において葉身に擬似病班が現われることが観察されており、生合成中間体の蓄積が原因である可能性が考えられる(Yamazaki, unpublished data)。このように一連の生合成酵素遺伝子の一部を欠落することは､二次代謝物質を生合成できなく

なるだけでなく、毒性を持つ生合成中間体が蓄積することを引き起こす可能性がある。そこで、一連の生合成酵素遺伝子が 1 つのセットとして遺伝される、すなわち共遺伝されることによってこのような一部の生合成酵素遺伝子の欠落を防ぎ、二次代謝物質の生合成を正常に行うために有利に働いているのではないかと予想される。

・協調制御 (co-regulation)

これまでに知られている生合成酵素遺伝子クラスター上の遺伝子が共発現していることが知られている。DIMBOA 生合成酵素遺伝子は *Bx1-9* の全てが吸水後 3-5 日後の幼植物体の地上部において強く発現していることが知られている(Frey et al., 1995, Frey et al., 1997, von Rad et al., 2001, Frey et al., 2003, Jonczyk et al., 2008)。その後、生長とともにこれらの生合成酵素遺伝子の発現量は低下していく。Avenacin 生合成酵素遺伝子については、*Sad1, 2, 7* が根の皮質細胞において強く発現していることが報告されている(Qi et al., 2004, Qi et al., 2006, Mugford et al., 2009)。Thalianol 生合成酵素遺伝子クラスターおよび marneral 生合成酵素遺伝子クラスター上の遺伝子は全て根特異的な発現パターンを示すのに対し、クラスター外の遺伝子は示さないことがわかっている(Field and Osbourn, 2008, Field et al., 2011)。また、momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターおよび phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスター上の遺伝子は、キチンエリシター処理によって協調的な発現誘導を受けることが知られている(Okada et al., 2007, Shimura et al., 2007, Okada et al., 2009)。また、momilactone および phytocassane は前述したようにイネの根において生産されることが知られているが、The Rice Expreession Profile Database (RiceXPro：http://riceexpro.dna.affrc.go.jp/index.html) の遺伝子発現データを参照すると、これらの生合成酵素遺伝子が根特異的な発現パターンを示すことや発現プロファイルに強い相関が見られることが見出される。

このような遺伝子クラスターの協調的な発現制御には、ヒストン修飾の変化などによるクロマチンの構造変化が関与していることが予想されている。実際に、thalianol 生合成酵素遺伝子クラスターにおいて、この領域のヒストン H3 の 27 残基目の lysine (K27)のトリメチル化が起こっていることが知られている(Field and Osbourn, 2008)。また、avenacin 生合成酵素遺伝子が発現している組織において、これらの領域のクロマチンの脱凝縮が起きていることが DNA fluorescence *in situ* hybridization により示されており、avenacin 生合成酵素遺伝子クラスターの発現制御にクロマチンの構造変化が関与していると考えられる(Wegel et al., 2009)。このように一連の生合成酵素遺伝子がクラスターを形成することが、クラスター上の遺伝子の発現制御において何らかの意味を持っているのではないかと予想されている。

1-4　ヒストン修飾を介した転写制御

1-3 で述べたように、高等植物における遺伝子クラスターの発現制御には、ヒストン修飾が関与していることが予想されている。そこで、本項ではヒストン修飾を介した遺伝子の転写制御に関して、特に植物における知見について述べる。

真核生物においては、染色体 DNA はヒストンオクタマー(各 2 分子の H2A, H2B, H3, H4

のヘテロ8量体)にDNAが巻き付いたヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造を取っている。さらに、このクロマチン構造の変換に伴って、遺伝子の転写制御が行われることが知られている(堀越、1997)。クロマチン構造が凝縮されていて転写が抑制されているクロマチン構造をヘテロクロマチン、脱凝縮されていて転写が活性化されているクロマチン構造をユークロマチンと呼ぶ。クロマチン構造の変化を起こす要因の1つとして、ヒストン修飾があげられる。ヒストンオクタマーの各サブユニットがそれぞれアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化を受けることが知られている(Pfluger and Wagner, 2007)。アセチル化やリン酸化などの修飾を受けるとヒストンの表面電荷を変化させて、負電荷を持つDNAとの相互作用を弱め、クロマチン構造がゆるみ、ユークロマチンへと変化することが知られている(Pfluger and Wagner, 2007)。また、ヒストン修飾が転写因子を含むタンパク質複合体に認識され、これらが機能するための目印となることも知られている(中園ら、2007, Pfluger and Wagner, 2007)。ヒストン修飾を介した遺伝子の転写制御は主に哺乳類と *Saccharomyces cerevisiae* において、研究が進んでいる。以下に一般的によく解析されているヒストン修飾と転写制御の関係を示す。

・ヒストン H3 のメチル化

ヒストンH3においては、4, 9, 27番目のlysine残基(K4, K9, K27)のメチル化が良く知られている。ヒストンH3のK4のメチル化は転写活性化に関与するのに対し、K9, K27のメチル化は転写抑制に関与することが知られている(中園ら、2007, Kouzarides, 2007, Pfluger, Wagner, 2007)。特にK9のメチル化はヘテロクロマチンの形成と関連することが知られている(Kouzarides, 2007)。また、ヒストンH3のlysine残基のメチル化には、モノメチル化・ジメチル化・トリメチル化が存在することが知られており、これらの間に機能の違いが存在すると考えられている(中園ら、2007)。

・ヒストン H3 のアセチル化

ヒストンH3においては、9, 14番目のlysine残基(K9, K14)のアセチル化が良く知られている。これらのアセチル化は先に述べたように、転写活性化に関与することが知られている(中園ら、2007, Kouzarides, 2007, Pfluger, Wagner, 2007)。

植物におけるヒストン修飾の研究は哺乳類や *Saccharomyces cerevisiae* における研究と比較して遅れているが、植物におけるヒストン修飾も哺乳類や *S.cerevisiae* における知見と大部分は一致すると考えられている(中園ら、2007)。

1-5　植物の病害抵抗性反応に関与する TGA factor

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 factorと高い相同性を持つ(Okada et al., 2009)。TGA factorはホモダイマーもしく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)。

シロイヌナズナにおいては、７つの TGA factor (AtTGA1-7)がサリチル酸依存的な病害抵抗性反応に関与することが報告されている(Zhang et al., 1999, Despres et al., 2000, Zhou et al., 2000, Fan and Dong, 2002)。AtTGA1-7 は系統樹解析から group I : AtTGA1, 4; group II : AtTGA2, 5, 6; group III : AtTGA3,7 の３つのグループに分類されている(Xiang et al., 1997)。AtTGA1-7 の機能解析においては、病害抵抗性反応のマーカー遺伝子である *PR-1*(pathogenesis-related 1)の発現制御機構に注目し、詳細な解析を行っている例が数多く報告されている。

PR-1 の発現制御において co-activator として NPR1 が機能することが知られている。これまでに AtTGA1-7 の全てが NPR1 と相互作用することが知られており、この相互作用が TGA factor による *PR-1* の転写誘導において重要であると考えられている(Zhang et al., 1999, Despres et al., 2000, Zhou et al., 2000, Fan and Dong, 2002)。TGA factor と NPR1 の相互作用には、細胞内の redox の変化が関与していることが知られている(Fig. 1-9) (Mou et al., 2003) 。定常状態では NPR1 は cysteine 残基間でジスルフィド結合を形成しオリゴマーの状態で細胞質に存在している。しかし、病害抵抗性反応が誘導されると、細胞内の redox が変化し NPR1 のジスルフィド結合が還元され、その結果モノマーとなった NPR1 が核内へと移行して TGA factor と相互作用することができるようになる。また、TGA factor についても AtTGA1, AtTGA4 は 2 つの cysteine 残基間で分子内においてジスルフィド結合を形成することが知られている。このジスルフィド結合は AtTGA1, AtTGA4 と NPR1 の相互作用を阻害する。NPR1 の場合と同様に、病害抵抗性反応が誘導されると、細胞内の redox が変化し AtTGA1, AtTGA4 のジスルフィド結合が還元され、NPR1 と相互作用することが可能となる(Despres et al., 2003)。また、AtTGA1, AtTGA4 のこれら２つの cysteine 残基のチオール基が *in vitro* においてニトロシル化および glutathione の付加を受けることが報告されており、これらの修飾が AtTGA1, AtTGA4 の活性化に関与している可能性が考えられる(Fig. 1-9) (Lindermayr et al., 2010)。

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 TGA factor の複合体が結合し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。

まず、*PR-1* の転写制御において、AtTGA1-7 が機能重複しながらも、それぞれが独自の機能を持っていることが明らかになってきた(Kesarwani et al., 2007)。AtTGA2, 5, 6 の三重変異株において、*PR-1* の転写誘導が見られなくなる一方で、定常時の発現量が増加することが報告されている(Zhang et al., 2003)。このことから、AtTGA2, 5, 6 は *PR-1* の転写制御において正負どちらにも機能することが示唆されている。このうち、AtTGA2 については repressor として機能しているという報告が存在する一方で(Kesarwani et al., 2007)、NPR1 と相互作用することで activator として機能するという報告も存在する(Rochon et al., 2006, Boyle et al., 2009)。また、AtTGA1, 4 は activator として機能すると考えられている(Kesarwani et al., 2007)が、AtTGA1, 4 の二重変異株において *PR-1* の転写が上昇するという報告も存在する(Lindermayr et al., 2010)。AtTGA3, 7 についても、それぞれ病害抵抗性を正に制御するという

報告がある(Kesarwani et al., 2007, Song et al., 2011)。このように、AtTGA1-7 が *PR-1* の転写制御および病害抵抗性反応に関与することは明らかにされているが、それぞれの因子が *PR-1* の転写制御にどのように関わっているかは不明な点が多く残されている。

また、*PR-1* の転写制御には NPR1 と TGA factor 以外の因子が関わることも明らかにされている。Co-repressor として機能する SNI1 は *PR-1* を含む NPR1 の下流遺伝子の転写抑制に関与することが報告されている(Li et al., 1999)。さらに、DNA の相同組み換えや修復において働くタンパク質と相同性を持つ SSN2, BRCA2, RAD51D が *PR-1* の転写制御に関わることも明らかにされている(Durrant et al., 2007, Song et al., 2011)。

これらの情報を元に、以下のような *PR-1* の転写制御機構の仮説が提唱されている(Fig. 1-10) (Moore et al., 2011) 。

定常状態においては、NPR1 により活性化されていない TGA factor および co-repressor である SNI1 によって *PR-1* の転写は抑制されている(Fig. 1-10A)。しかし、病害抵抗性反応が誘導されると TGA factor が NPR1 により活性化されるとともに、NPR1 依存的に AtTGA7 が SSN2 と相互作用し、さらに SSN2 と BRCA2 および RAD51D が相互作用することによって、これらの因子が *PR-1* 遺伝子プロモーターに呼び込まれる(Fig. 1-10B)。そして、SSN2 および RAD51A が co-repressor である SNI1 を *PR-1* 遺伝子プロモーターから排除し、*PR-1* 遺伝子プロモーターの別の部分に結合する他の転写因子（WRKY 型転写因子など）が RNA polymerase II を呼び込み、*PR-1* の転写が開始される(Fig. 1-10C)。この際、BRCA2 により RAD51D が非鋳型鎖の一本鎖 DNA に結合することで転写を安定にしていることが予想されている(Moore et al., 2011)。

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 factor の *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。AtTGA2 については、その特異的抗体を用いた chromatin immunoprecipitation with microarray technology (ChIP-chip)の結果から、51 の結合領域が報告されている(Thibaud-Nissen et al., 2006)。

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 factor 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。

OsTGAP1 は、先に述べたようにイネの momilactone 生合成を制御する鍵転写因子として機能するが、OsTGAP1 の過剰発現のみでは momilactone 生合成酵素遺伝子の転写を十分に誘導することができず、キチンエリシター処理を行うことで、これらの酵素遺伝子の転写が hyper-induce されることが示されている(Okada et al., 2009)。このことから、OsTGAP1 についても AtTGA1-7 のように NPR1 を始めとする他のタンパク質と相互作用することや翻訳後修飾による活性化を受けることなどが考えられる。OsTGAP1 は AtTGA1-7 のうち AtTGA1, 4 と特に高い相同性を示す。しかし、AtTGA1, 4 において分子内のジスルフィド結合を形成する cysteine 残基は保存されておらず、細胞内の redox の変化による OsTGAP1 自体の活性化機構は存在しないと考えられる(Okada et al., 2009)。イネにおいても NPR1 のホモログである OsNPR1 が存在する。OsNPR1 も病害抵抗性反応に関与することが報告されているが、ジテルペン型ファイトアレキシン生産への関与については未解析である(Chern et al., 2001, Yuan

et al., 2007, Sugano et al., 2010)。また、シロイヌナズナにおける TGA factor のようにイネにおける他の TGA factor が OsTGAP1 の標的遺伝子の転写制御に関与する可能性が考えられる。イネにおいては、OsTGAP1 の他に rTGA2.1, rTGA2.2, rTGA2.3 という TGA factor が存在することが報告されている(Chern et al., 2001, Fitzgerald et al., 2005, Yuan et al., 2007, Sugano et al., 2010)。これらの TGA factor は OsNPR1 と相互作用することが明らかになっている(Chern et al., 2001)。また、RNAi 株を用いた解析から白葉枯病菌に対する抵抗性を負に制御する因子であることが明らかにされている(Fitzgerald et al., 2005)。しかし、その一方で変異株を用いた解析からイネいもち病菌に対する抵抗性を正に制御する因子であるという報告もなされている(Delteil et al., 2011)。これらの TGA factor がファイトアレキシン生産に関与するかについての知見は得られていない。

1-6　本研究の目的

これまで述べてきたように、ファイトアレキシン生産は植物の病害抵抗性反応において一定の役割を担っており、その生産誘導のメカニズムを明らかにすることは植物の病害抵抗性反応の全貌を明らかにするための足がかりとなると考えられる。また、イネにおける主要なジテルペン型ファイトアレキシンである momilactone および phytocassane の生合成酵素遺伝子は遺伝子クラスターを形成しており、その発現制御機構について興味が持たれた。これまでに述べたように、OsTGAP1 が momilactone 生産を制御する鍵転写因子として機能することが明らかになっていた。しかしながら、momilactone 生合成酵素遺伝子以外のジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現制御への OsTGAP1 の関与や OsTGAP1 による momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターの転写制御機構などについては未解明であった。

そこで、本研究においては、OsTGAP1 の機能解明を目的として、OsTGAP1 過剰発現株におけるファイトアレキシン生産能の解析やトランスクリプトーム解析を行うとともに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP)と次世代シークエンサーによる高速シークエンシングを組み合わせた ChIP-seq 解析により OsTGAP1 の標的遺伝子の網羅的同定を行った。また、OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索も行った。

まず、第 2 章においては、OsTGAP1 過剰発現株を用いた解析から、OsTGAP1 が momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターのみでなく、phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスターや上流の生合成段階である MEP 経路の酵素遺伝子の発現制御にも関わっていることを示した。さらに、OsTGAP1 過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析を行い、OsTGAP1 の下流遺伝子を網羅的に同定した。

次に、第 3 章においては、OsTGAP1 特異的抗体を用いた ChIP-seq 解析を行うことにより、OsTGAP1 のイネゲノム中における結合位置を網羅的に同定した。この結果から、OsTGAP1 のジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスター内における OsTGAP1 の結合位置を同定し、これらのクラスターの発現制御機構の解明の足がかりとなる結果を得た。また、第 2 章における OsTGAP1 過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析の結果と合わせることで、OsTGAP1 の標的候補遺伝子の網羅的同定を行った。

さらに、第 4 章においては、yeast two-hybrid screening により OsTGAP1 と相互作用するタ

ンパク質の探索を行った。そして、OsTGAP1 がヒストン修飾に関与すると考えられるタンパク質と相互作用することが明らかになったことから、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の遺伝子領域におけるヒストン修飾の変化を解析した。

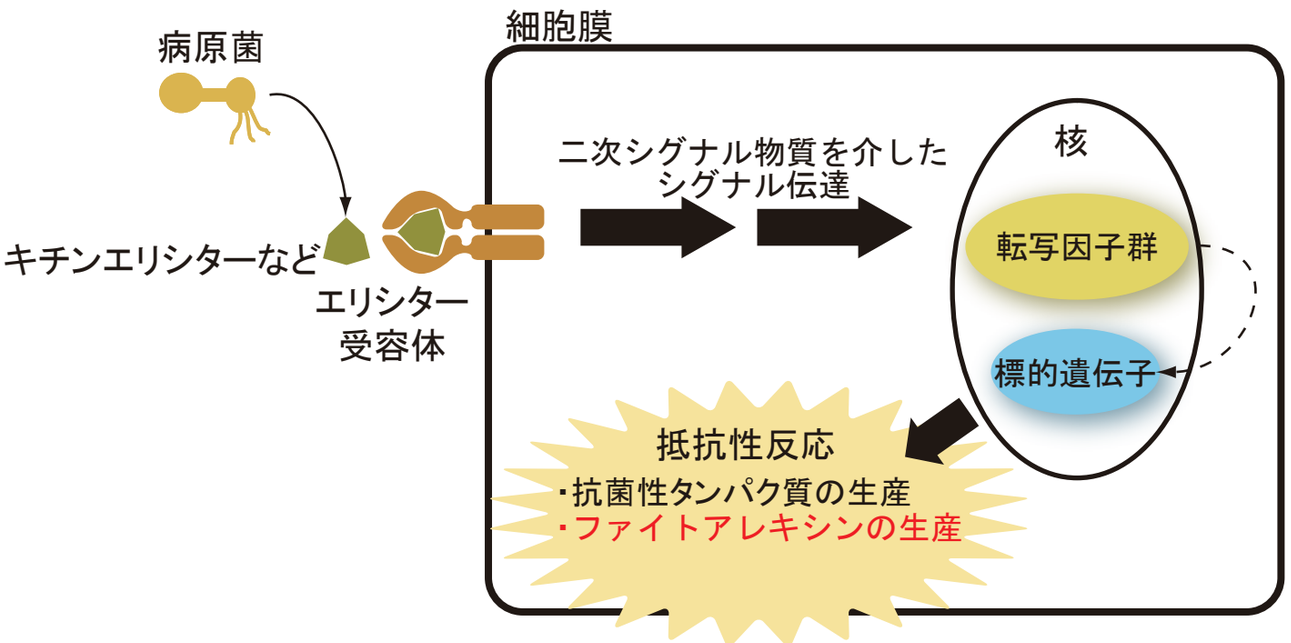
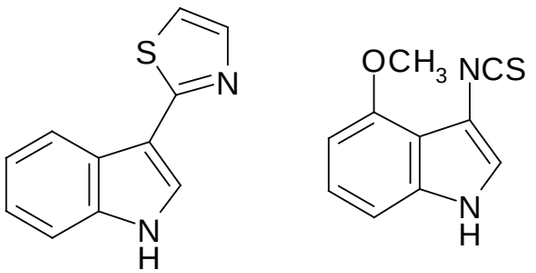


Fig. 1-1　植物における基礎的病害抵抗性反応のシグナル伝達のモデル

植物が病原菌の感染を認識してから、抵抗性反応の発現にいたるまでのシグナル伝達のモデルを示した。

A



Camalexin　　Rapalexin A

B

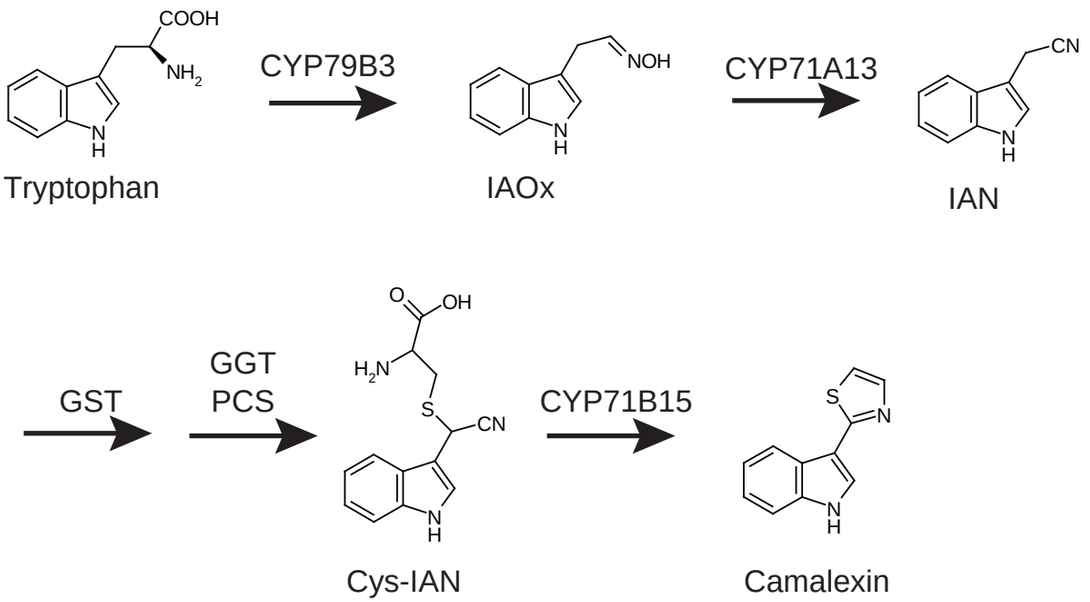


Fig. 1-2　シロイヌナズナにおけるファイトアレキシンと生合成経路
A : Camalexinとrapalexin Aの構造
B : Camalexinの生合成経路

IAOx : Indole-3-acetaldoxime
IAN : Indole-3-acetonitrile
GST : Glutathione-S-transferase
GGT : γ-Glutamyl transpeptidase
PCS : Phytochelatine synthase

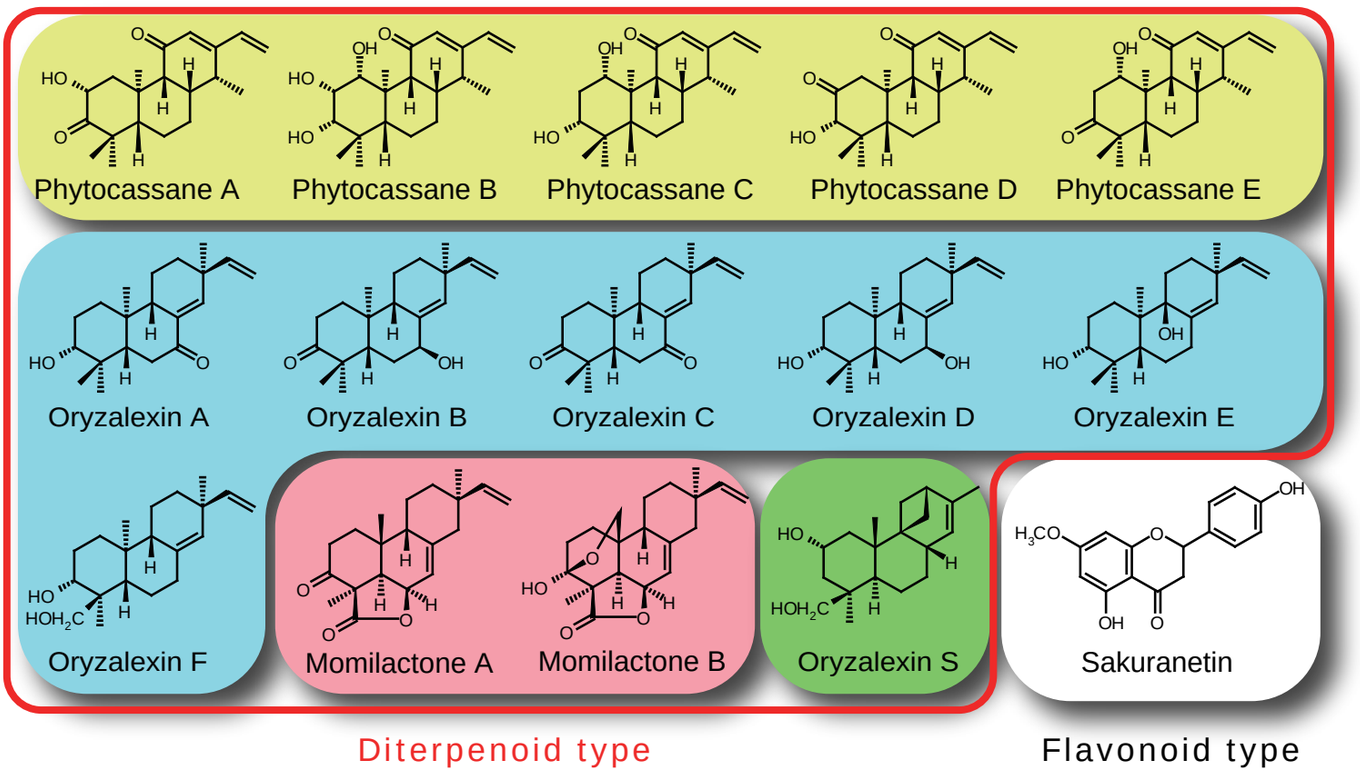


Fig. 1-3　イネにおけるファイトアレキシン

イネにおける 15 種類のファイトアレキシンを示した。
フラボノイド型の Sakuranetin を除く 14 種類がジテルペン型の構造を持つ。
ジテルペン型ファイトアレキシンは、その基本炭素骨格から 4 つのグループに分類される。

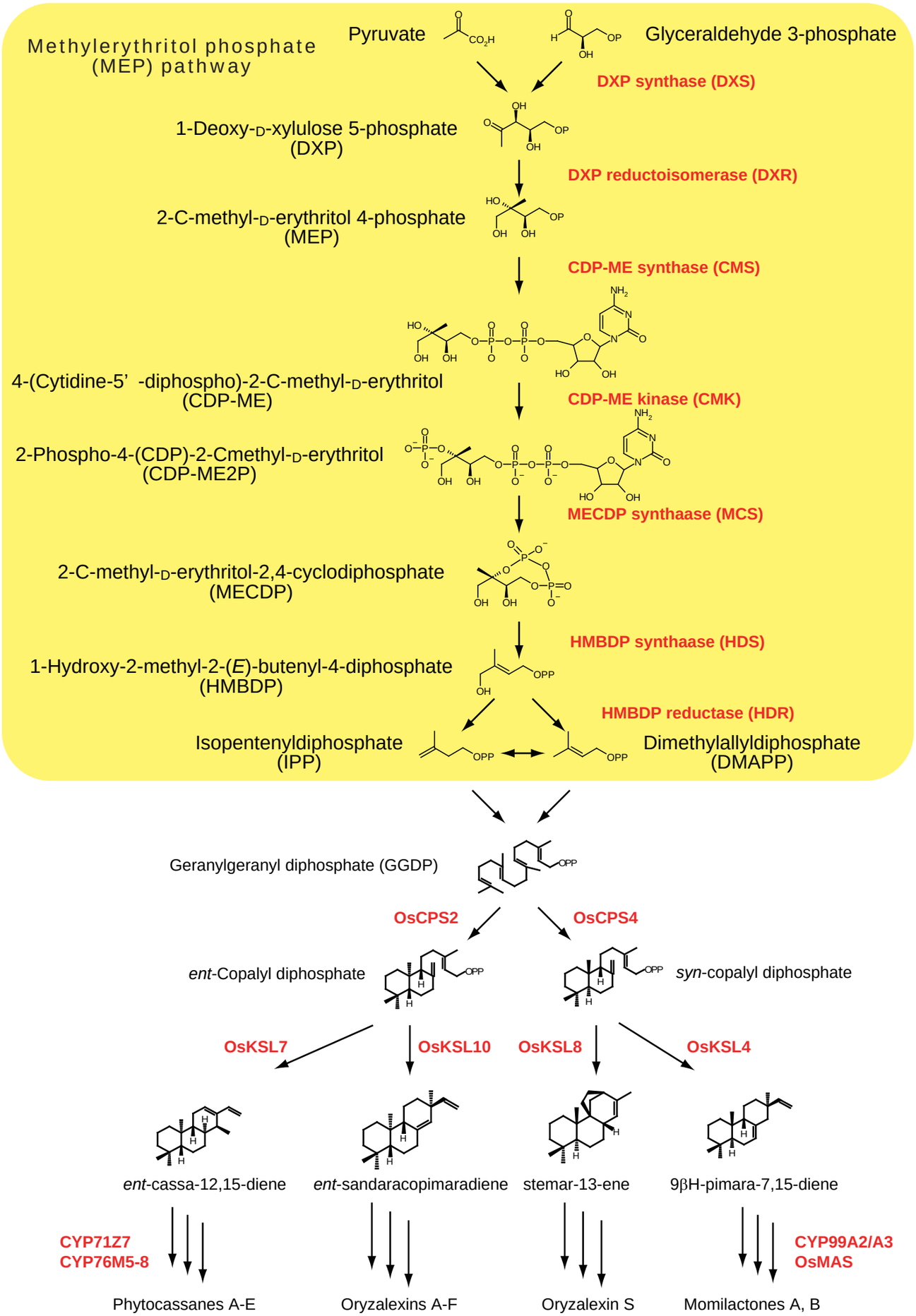


Fig. 1-4　ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成経路

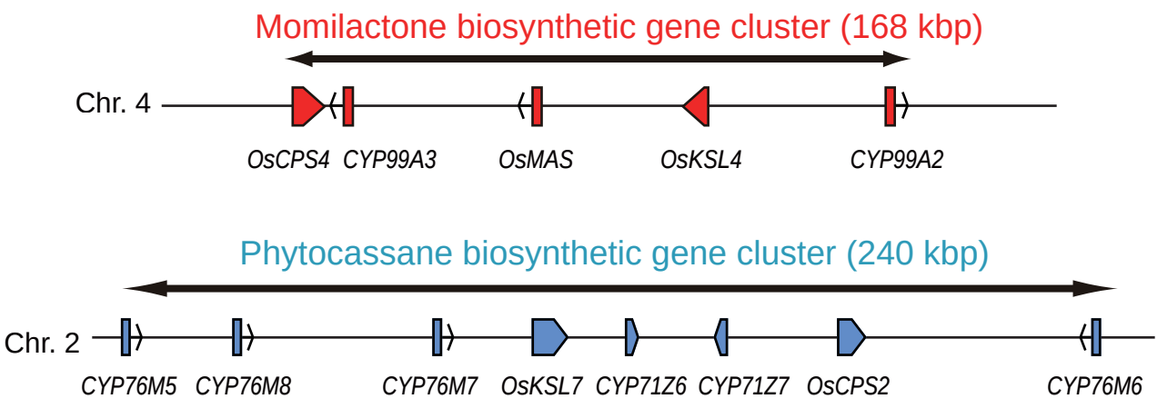


Fig. 1-5　イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子クラスター

Momilactoneおよびphytocassaneの生合成酵素遺伝子は、4番染色体および2番染色体においてそれぞれ遺伝子クラスターを形成している。

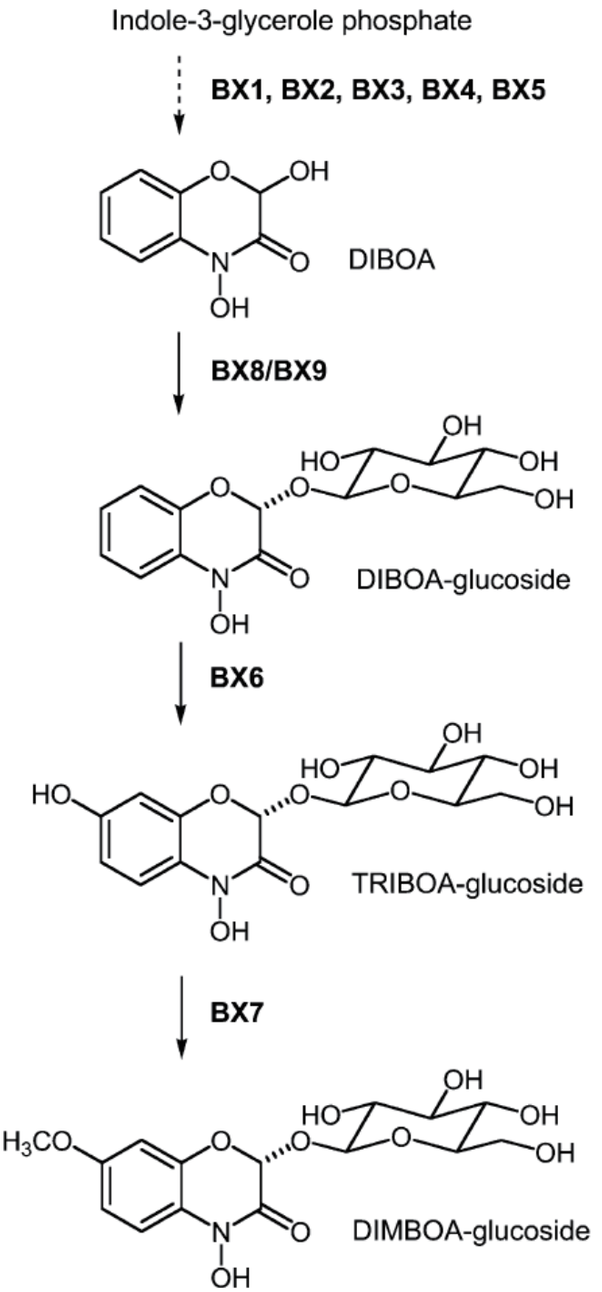


Fig. 1-6　DIMBOAの生合成経路（Jonczyk et al., 2008 より引用）

DIBOA : 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one
TRIBOA : 2,4,7-trihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one
DIMBOA : 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one

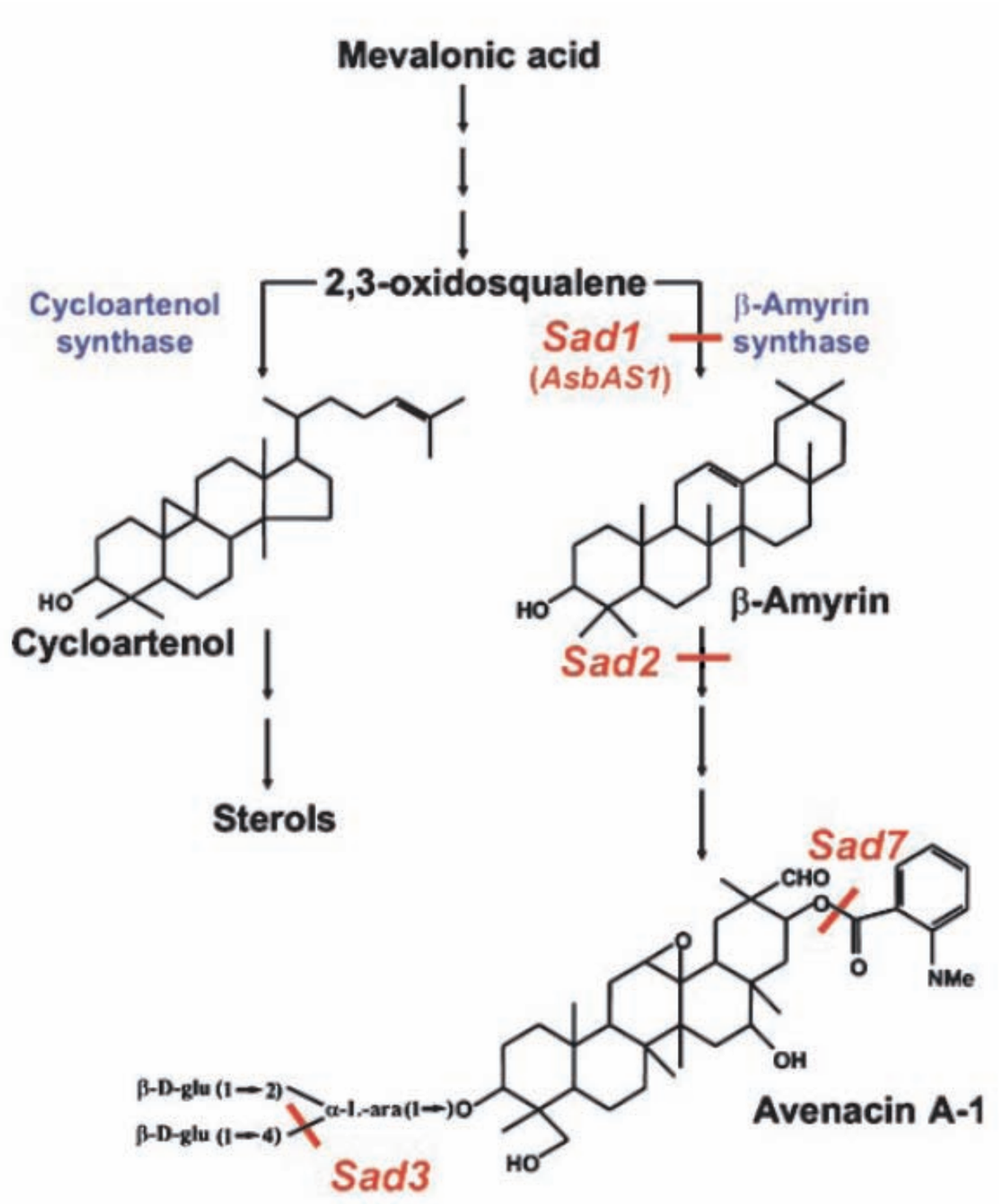


Fig. 1-7 Avenacinの生合成経路 (Qi et al., 2004を引用)

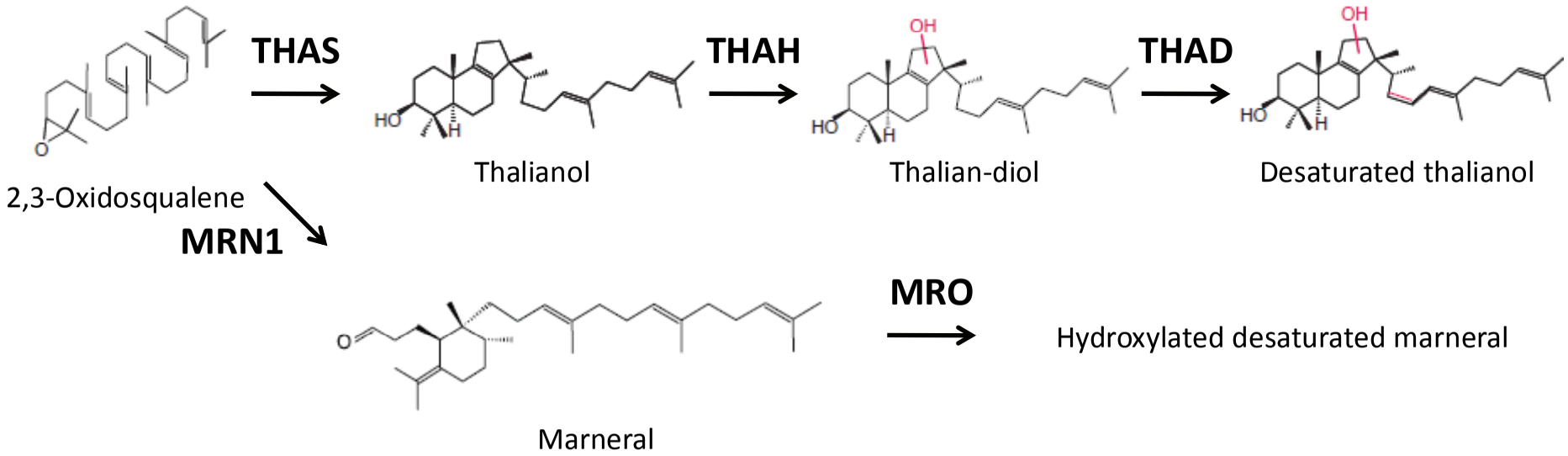


Fig. 1-8 Thalianolとmarneralの生合成経路

THAS : Thalianol synthase
THAH : Thalianol hydroxylase
THAD : Thalian-diol desaturase
MRN1 : Marneral synthase
MRO : Marneral oxidase

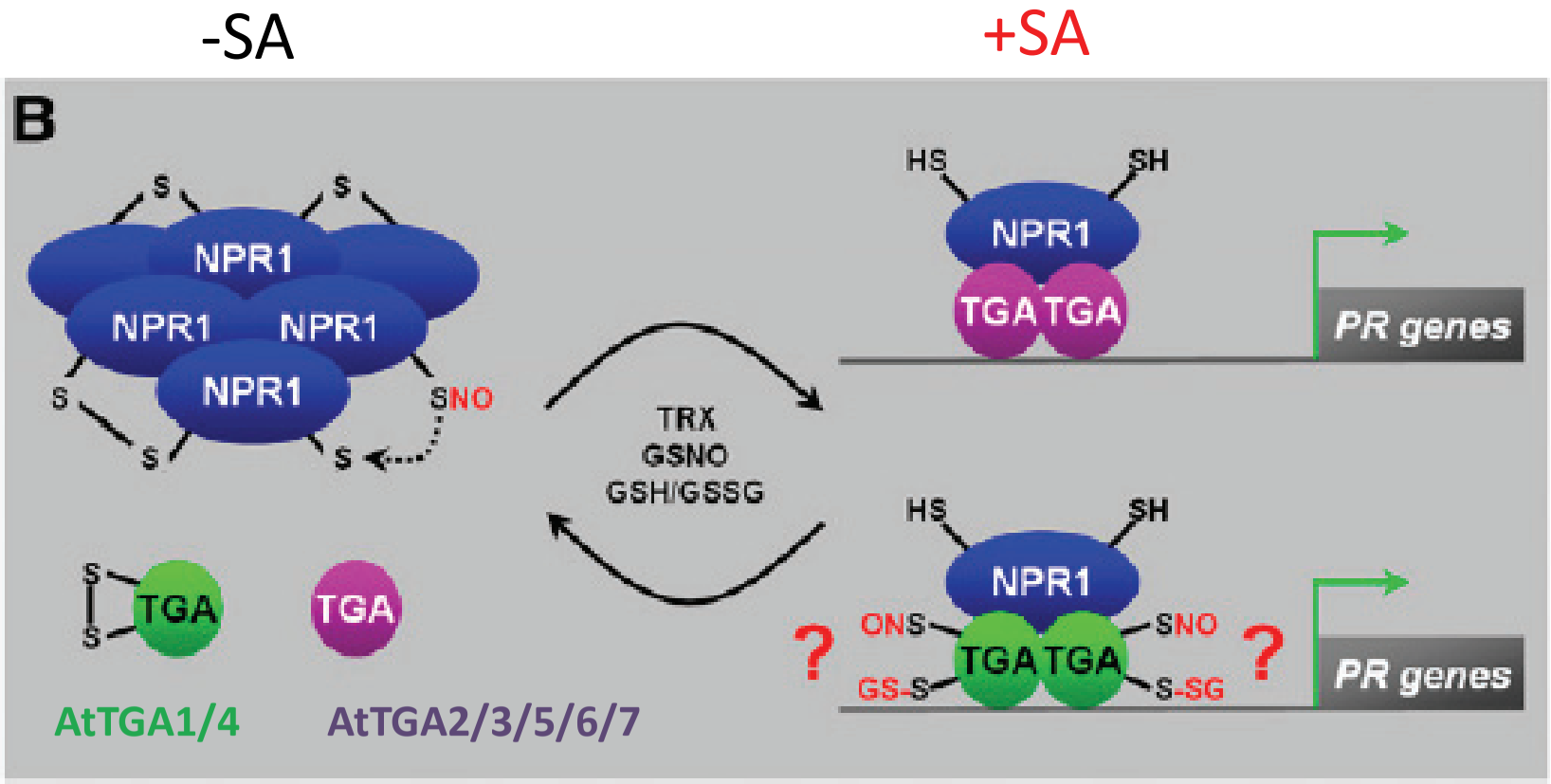


Fig. 1-9 細胞内のredox変化によるTGA factorとNPR1の相互作用の変化
（Moore et al., 2011を一部改変）

SA : サリチル酸
PR : Pathogenesis-related
TRX : Thioredoxin
GSNO : *S*-Nitrosoglutathione
GSH/GSSG : Gluthathione

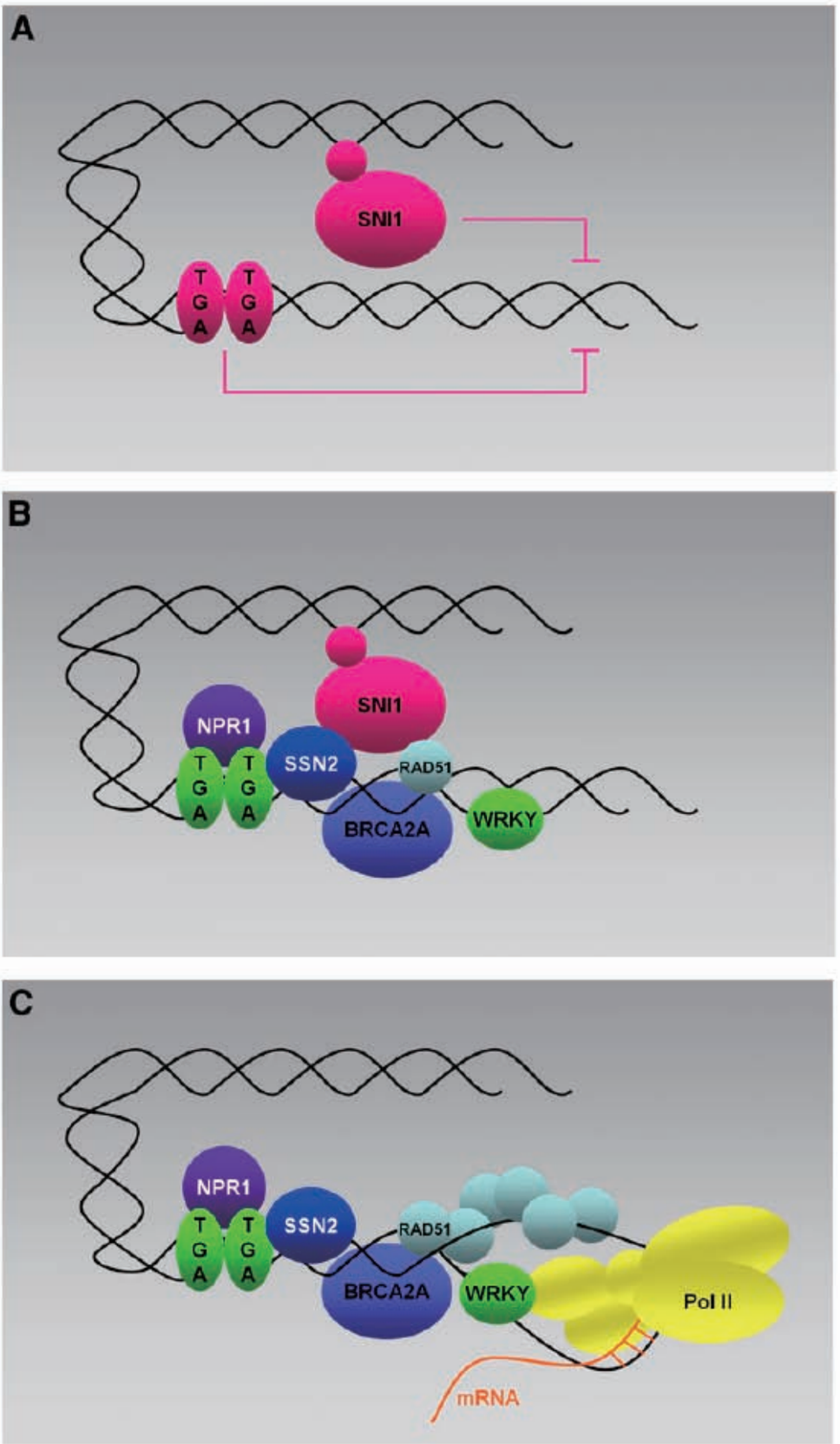


Fig. 1-10 *PR-1*の転写制御機構のモデル (Moore et al., 2011を引用)

第２章　ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現制御における **OsTGAP1** の関与

2-1　緒言

序論で述べたように、イネのキチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 が momilactone 生産の制御を行う鍵転写因子として同定されていたが、phytocassane 生産の制御への関与は未解析であった。そこで、本章では OsTGAP1 過剰発現株培養細胞を用いた発現解析を行うことにより、phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスターや上流の生合成段階である MEP 経路の酵素遺伝子の発現制御に OsTGAP1 が関与しているかを解析することにした。また、OsTGAP1 過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析の結果から、OsTGAP1 の下流候補遺伝子の同定を行った。

2-2　材料と方法

2-2-1　イネの培養細胞の培養とキチンエリシター処理

農業生物資源研究所から入手した *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare の胚由来の培養細胞を 1 mg/l の 2,4-D を含む N6 培地 (Table 2-1) 中で 25℃・暗所・120 rpm で懸濁培養した。液体培養細胞の継代については、大槻の方法に準じて行った（大槻, 1990）。液体培養した細胞を 1 週間おきに 20 メッシュの金網で裏ごしした後に、新しい 1 mg/l の 2,4-D を含む N6 培地に植え継いだ。 培地の量および植え継ぐ細胞の量は培養のスケールに応じて、Table 2-2 のように変更した。実験には裏ごし後 6 日目の細胞を用いた。

Table 2-1　N6 培地の組成

Componet	mg/ml	
KNO_3	2830	CHU (N6) BASAL SALT MIXTURE (Sigma)
$(NH_4)_2SO_4$	463	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	125.3	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	90.37	
K_3PO_4	400	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85	
Na_2-EDTA	37.25	
$MnSO_4 \cdot H_2O$	3.3	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5	
KI	0.8	
H_3BO_3	1.6	MURASHIGE and SKOOG VITAMIN MIXTURE (x1000) (Sigma)
Nicotinic acid	0.5	
Thiamine-HCl	0.1	
Pyridoxine-HCl	0.5	
Myo-Inositol	100	
Glycine	2	
Sucrose	30000	
2, 4-D	1	

培地の調製は以下のように行った。

CHU (N6) BASAL SALT MIXTURE (4.3 g), MURASHIGE and SKOOG VITAMIN MIXTURE (x1000) (1 ml) , 2,4-D (1 mg) , sucrose (30 g)に dH_2O 900 ml を加え、よく攪拌、KOH で pH 5.8 に調整後、1 l に fill up しオートクレーブを行った。

Table 2-2　培地の量および植え継ぐ培養細胞の量

フラスコのスケール	培地の量	培養細胞の量
100 ml	30 ml	約 1 ml
300 ml	90 ml	約 1.5 ml
500 ml	150 ml	約 2 ml

キチンエリシター(*N*-acetylchitooctaose)は明治大学･渋谷直人教授より譲渡されたものを用いた。溶媒として水を用い、0.25 mg/ml となるように調製した後、ろ過滅菌を行った。キチンエリシター処理を行う際には､終濃度 1 ppm となるように液体培地にキチンエリシターを加えた。

2-2-2　OsTGAP1 過剰発現株培養細胞

定量的 RT-PCR による発現解析においては、当研究室の岡田により作製された N 末端に T7 タグを付加した OsTGAP1 をカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) *35S* プロモーターの下流で構成的に発現する株を用いた(Okada et al., 2009)。

トランスクリプトーム解析においては､当研究室の小宮山により作製されたタグを付加しない OsTGAP1 をトウモロコシユビキチンプロモーター（Christensen et al., 1992）の下流で構成的に発現する株を用いた（小宮山、2010）。

2-2-3　イネ培養細胞におけるファイトアレキシン蓄積量の定量

液体培地からファイトアレキシンを抽出し、定量に用いた。液体培地 50 μl に対して、等量の酢酸エチルで抽出を３回行い、得られた酢酸エチル層を合わせた後に、減圧下で蒸発乾固させた｡得られた残渣を 200 μl のファイトアレキシン抽出溶媒（79% (v/v) エタノール, 7% (v/v) アセトニトリル, 0.1% (v/v) 酢酸）に溶解し、LC-MS/MS による定量に用いた。LC-MS/MS による定量には 5 μl のサンプルを用い、各ファイトアレキシンの標品 0.1 ng を混合したサンプルを測定し得られたピーク面積との比で計算した｡LC-MS/MS の条件を以下に示す。

HPLC 条件

カラム	PEGASIL ODS 2ϕ×150 mm　（センシュー科学）
展開溶媒（単一相）	70%アセトニトリル・0.1%酢酸
流速	200 μl/min

MS/MS 条件

MS/MS	PE SCIEX API 3000
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, D, E	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

2-2-4　イネ培養細胞からの total RNA 抽出

イネ培養細胞からの total RNA の抽出は、Sepasol-RNA I super G (Nacalai Tesque)を用いて、付属のプロトコールに従って行った。

2-2-5　Total RNA からの cDNA 合成

Total RNA からの cDNA 合成は、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara)を用いて、付属のプロトコールに従って行った。cDNA 合成には 1 μg の total RNA を用いた。

2-2-6　定量的 RT-PCR による発現量の解析

定量的 RT-PCR は、一部の遺伝子を除き、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用い、検出は ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems)により行った。また、それぞれの遺伝子について検量線を作成し、発現量の定量を行った。検量線用サンプルの調製は、下記の各遺伝子のプライマーを用いて、野生型株培養細胞由来の cDNA をテンプレートとして PCR を行い、PCR 産物をアガロース電気泳動に供して、それぞれのバンドが単一であることを確認した。その後、目的の DNA 断片を切り出し、精製して検量線用サンプルとした。検量線は、このサンプルを 10 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM, 1 fM, 100 aM, 10 aM に希釈し、7 点で作成した。そして、それぞれの遺伝子の発現量はインターナルコントロールであるユビキチン遺伝子(*UBQ* : Os10g0542200)の発現量で割ることで標準化し、標準化した値を用いて発現量を評価した。

Primer

OsKSL7	Forward	5’-TTCATCTCTGTCACTTTTTCTTTTT-3’	(25 bases)
	Reverse	5’-ATCCCAACGAAGTCATCCAC-3’	(20 bases)
OsDXS3	Forward	5’-GGGGGAGGTTCCAGTAAGAA-3’	(20 bases)
	Reverse	5’-TCATTTTGCATTTGGAAGCA-3’	(20 bases)

UBQ	Forward	5’-TCCGAGAGATGGGTTTCATC-3’	(20 bases)
	Reverse	5’-GCCAAGATTGCCAAGAAGAC-3’	(20 bases)

反応液の組成

SYBR Green PCR Master Mix	10 μl
Primers (50 μM)	0.08 μl
Template cDNA	1 μl
H_2O	8.84 μl
Total	20 μl

温度条件

94℃, 10 min→[94℃, 30 sec→55℃, 30 sec→72℃, 30 sec]×40

OsKSL4 については、蛍光プローブ法により発現量の定量を行った。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO)を用い、検出は ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems)により行った。また、検量線の作成については SYBR Green を用いた場合と同様に行った。

Primer および probe

OsKSL4	Forward	5’-GGGACTCGAGCGGTGATGT-3’	(19 bases)
	Reverse	5’-TCTAGCCTCCCATCCCATGTT-3’	(21 bases)
	Probe	5’-FAM-CTGTCCCGGATATGTT-MGB-3’	(16 bases)

反応液の組成

THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	10 μl
Primers (100 μM)	0.18 μl
Probe (5 μM)	0.2 μl
Template cDNA	1 μl
H_2O	8.04 μl
ROX reference dye	0.4 μl
Total	20 μl

温度条件

50℃, 2 min→95℃, 10 min→[95℃, 15 sec→60℃, 1 min]×40

2-2-7　マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析には、エリシター処理を行った野生型株(WT)および OsTGAP1 過剰発現株(OX)の培養細胞から抽出した total RNA を用いた。これらの total RNA の抽出は、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて付属のプロトコールに従って行った。次に Low RNA Input

Linear Amplification Kit (Agilent）を用いて、付属のプロトコールに従ってラベル化 cRNA を作製した。ラベル化は Cyanine3 (Cy3)と Cyanine5 (Cy5)を用いた。作製したラベル化 cRNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

作製したラベル化 cRNA を以下に示した。

Cy3 ラベル	Cy5 ラベル
WT 処理後 0 時間	WT 処理後 6 時間
WT 処理後 6 時間	WT 処理後 24 時間
WT 処理後 24 時間	OX 処理後 0 時間
	OX 処理後 6 時間
	OX 処理後 24 時間

ラベル化 cRNA を Gene Expression Hybridization Kit (Agilent）を用いて断片化し、以下に示すラベル化 cRNA の組み合わせでハイブリダイゼーション溶液を調製した。これを、スライドグラスをセットしたチャンバーに注入し、The Rice Gene Expression 4×44K Microarrays (Agilent Technologies)に対し、60℃で 17 時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、スライドグラスを洗浄し、N_2 ガスで乾燥させた後、Microarray Scanner (Agilent）を用いてスライドグラスのスキャンを行った。その後得られたイメージから、Feature Extraction (Agilemt)により各スポットのシグナル強度を Cy3, Cy5 それぞれの波長において数値化し、バックグラウンド補正を行った。

以下にハイブリダイゼーションの組み合わせを示した。

Cy3 ラベル		Cy5 ラベル
WT 処理後 0 時間	vs	WT 処理後 6 時間
WT 処理後 0 時間	vs	WT 処理後 24 時間
WT 処理後 0 時間	vs	OX 処理後 0 時間
WT 処理後 6 時間	vs	OX 処理後 6 時間
WT 処理後 24 時間	vs	OX 処理後 24 時間

なおマイクロアレイ解析はそれぞれ４連で行った。

データ解析は、Partek Genomics Suite 6.5 (Partek)・Microsoft Office Excel (Microsoft)・map2slim (http://search.cpan.org/~cmungall/go-perl-0.10/scripts/ map2slim)を用いた。

2-2-8　本章で扱った遺伝子の gene ID

OsTGAP1: Os04g0637000; *OsDXS1*: Os05g0408900; *OsDXS2*: Os06g0142900; *OsDXS3*: Os07g0190000; *OsDXR*: Os01g0106900; *OsCMS*: Os01g0887100; *OsCMK*: Os01g082100; *OsMCS*: Os02g0680600; *OsHDS*: Os02g0603800; *OsHDR*: Os03g0731900; *OsCPS2*: Os02g0571100; *OsCPS4*: Os04g0178300; *OsKSL4*: Os04g0179700; *OsKSL7*: Os02g0570400; *CYP71Z6*:

Os02g0570500; *CYP71Z7*: Os02g0570700; *CYP76M5*: Os02g0569000; *CYP76M6*: Os02g0571900; *CYP76M7*: Os02g0569900; *CYP76M8*: Os02g0569400; *CYP99A2*: Os04g0180400; *CYP99A3*: Os04g0178300; *OsMAS*: Os04g0179200

2-3　結果および考察

2-3-1　T7-OsTGAP1 過剰発現株における phytocassane の蓄積量

これまでに OsTGAP1 が momilactone 生産の制御に関わっていることが示されていたが、phytocassane 生産の制御に OsTGAP1 が関与しているかどうかは不明であった。そこで、phytocassane 生産制御への OsTGAP1 の関与を明らかにするため、T7-OsTGAP1 過剰発現株における phytocassane の蓄積量を定量した。野生型株および T7-OsTGAP1 過剰発現株の培養細胞に対して、キチンエリシターを終濃度 1 ppm で処理し、処理後 0, 24, 48, 72 時間の液体培地中における momilactone および phytocassane の蓄積量を LC-MS/MS を用いて定量した。

定量結果を Fig. 2-1 に示す。Momilactone については、これまでの結果と同様に野生型株においては処理後 0 時間にはほとんど蓄積は見られないのに対し、T7-OsTGAP1 過剰発現株においては処理後 0 時間から微弱ではあるが蓄積が見られた。さらに、エリシター処理後の momilactone の蓄積量は野生型株と比較して、T7-OsTGAP1 過剰発現株において顕著に増加した。これと同様に、phytocassane についても野生型株においては処理後 0 時間にはほとんど蓄積は見られないのに対し、T7-OsTGAP1 過剰発現株においては処理後 0 時間から微弱な蓄積が見られた。さらに、エリシター処理後の phytocassane の蓄積量についても野生型株と比較して、T7-OsTGAP1 過剰発現株において顕著に増加した。このことから、OsTGAP1 が momilactone 生産だけでなく phytocassane 生産の制御にも関わっていることが示された。

2-3-2　T7-OsTGAP1 過剰発現株における *OsKSL7, OsDXS3* の発現解析

次に、OsTGAP1 が phytocassane 生合成酵素遺伝子の転写制御に関与するかについて検討するため、T7-OsTGAP1 過剰発現株における phytocassane 生合成酵素遺伝子 *OsKSL7* の発現量を定量することにした。また、T7-OsTGAP1 過剰発現株においてジテルペン型ファイトアレキシンの生産量が顕著に増大していることから、GGDP 以前の生合成段階である MEP 経路の酵素遺伝子についても T7-OsTGAP1 過剰発現株において発現量が増加している可能性が考えられたため、MEP 経路遺伝子の 1 つである *OsDXS3* についても発現解析を行うことにした。

野生型株および T7-OsTGAP1 過剰発現株の培養細胞に対して、キチンエリシターを終濃度 1 ppm で処理し、処理後 0, 6, 12, 24 時間における *OsKSL4*（momilactone 生合成酵素遺伝子）, *OsKSL7, OsDXS3* の発現量を定量的 RT-PCR により定量した。

発現量の定量の結果を Fig. 2-2 に示す。*OsKSL4* についてはこれまでの結果と同様に(Okada et al., 2009)、エリシター処理後 0 時間においては、T7-OsTGAP1 過剰発現株において野生型株と比較して微弱にしか発現が誘導されないのに対し、エリシター処理後については T7-OsTGAP1 過剰発現株において発現量が顕著に増加した。これと同様に *OsKSL7, OsDXS3* についてもエリシター処理後 0 時間においては、T7-OsTGAP1 過剰発現株において野生型株と比較して微弱にしか発現が誘導されないのに対し、エリシター処理後については T7-OsTGAP1 過剰発現株において発現量が顕著に増加した。このことから、OsTGAP1 が少なくとも *OsKSL7, OsDXS3* の転写制御に関わることが示された。

2-3-3　OsTGAP1 過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析

OsTGAP1 が *OsKSL7* 以外の phytocassane 生合成酵素遺伝子や *OsDXS3* 以外の MEP 経路遺伝子の転写制御に関わるかを検討するとともに、OsTGAP1 の機能解析の一環として OsTGAP1 の下流候補遺伝子を網羅的に同定するため、OsTGAP1 過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析には、当研究室の小宮山により作製されたタグを付加しない OsTGAP1 をトウモロコシユビキチンプロモーターの下流で構成的に発現する株を用いた（小宮山、2010）。なお、この OsTGAP1 過剰発現株においても、T7-OsTGAP1 過剰発現株と同様に、momilactone および phytocassane の蓄積量が野生型株と比較して増加することは確認されている（小宮山、2010）。

トランスクリプトーム解析は The Rice Gene Expression 4×44K Microarrays (Agilent)を用いたマイクロアレイ解析により行い、2 色法を用いた。マイクロアレイ解析は、野生型株におけるキチンエリシター処理後 6, 24 時間の転写変動を解析するとともに、キチンエリシター処理後 0, 6, 24 時間において野生型株と OsTGAP1 過剰発現株の比較を行い、4 連で行った。

まず、マイクロアレイ解析の結果のうち、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成に関与する遺伝子について注目した。これらの遺伝子の発現変動を求めるため、Partek Genomics Suite 6.5 を用い、4 連における各遺伝子の発現量の変化の平均値を求めた。MEP 経路遺伝子の発現量の変化を Fig. 2-3 に、momilactone および phytocassane の生合成酵素遺伝子の発現量の変化を Fig. 2-4 にそれぞれ示した。

イネのゲノムにおいて、MEP 経路遺伝子は DXS が 3 コピー存在し、DXS 以外の遺伝子については 1 コピー存在することが知られている(Kim et al., 2005, Okada et al., 2007)。また、3 コピー存在する DXS のうち、*OsDXS3* のみが、キチンエリシター応答的に発現誘導されることが知られている(Okada et al., 2007)。さらに、*OsDXR, OsCMS, OsCMK, OsMCS. OsHDS, OsHDR* についてもキチンエリシター応答的に発現誘導されることが知られている(Okada et al., 2007)。マイクロアレイ解析の結果において、これまでの野生型株における知見と同様に、OsTGAP1 過剰発現株においても *OsDXS3* がエリシター応答的に発現誘導されるのに対し、*OsDXS1, 2* はエリシター処理によって発現誘導されないことが確認された(Fig. 2-3)。さらに、2-3-2 において行った定量的 RT-PCR の結果と同様に、野生型株と比較して OsTGAP1 過剰発現株における OsDXS3 の発現量が、エリシター処理後 24 時間において増加していることが確認された(Fig. 2-3)。*OsDXS1, 2* については野生型株と OsTGAP1 過剰発現株で発現量に変化は見られなかった(Fig. 2-3)。DXS 以外の *OsDXR, OsCMS, OsCMK, OsMCS. OsHDS, OsHDR* についても、これまでの結果と同様にエリシター応答的に発現誘導されることが確認されたとともに、エリシター処理後 24 時間において野生型株と比較して OsTGAP1 過剰発現株における発現量が誘導倍率は低いながらも増加していることが見出された（1.5～2 倍）(Fig. 2-3)。

また、momilactone および phytocassane の生合成酵素遺伝子については *CYP99A3* を除く全ての遺伝子において、特にエリシター処理後 24 時間において、野生型株と比較して OsTGAP1 過剰発現株における発現量が増加していることが確認された(Fig. 2-4)。*CYP99A3* についても以前の T7-OsTGAP1 過剰発現株を用いた定量的 RT-PCR において、野生型株と比較して

T7-OsTGAP1 過剰発現株における発現量が増加していることが確認されていた(Okada et al., 2009)。

これらのことから、OsTGAP1 が MEP 経路遺伝子・momilactone 生合成酵素遺伝子・phytocassane 生合成酵素遺伝子の転写制御に関与し、ジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御するマスター転写因子として機能することが明らかになった。

次に、OsTGAP1 の下流遺伝子を網羅的に同定するため、マイクロアレイ解析の結果から、OsTGAP1 過剰発現株において転写量が変動する遺伝子を絞り込むことにした。まず、Partek Genomics Suite 6.5 を用いて ANOVA (analysis of variance) 解析を行い、マイクロアレイを行った 5 つの組み合わせの少なくとも 1 つにおいて発現が変動している遺伝子を False discovery rate (FDR) < 0.05 の threshold で抽出した。次に、それぞれの組み合わせにおいて、発現が 2 倍以上に誘導されている遺伝子(up)と 1/2 以下に抑制されている遺伝子(down)を抽出した。その結果、Table2-3 に示す数の遺伝子が抽出された、

Table 2-3　各アレイの組み合わせにおいて抽出された遺伝子の数

アレイの組み合わせ	Up	Down
WT 0 h vs WT 6 h	2,749	2,376
WT 0 h vs WT 24 h	1,625	402
WT 0 h vs OX 0 h	1,352	1,278
WT 6 h vs OX 6 h	1,539	1,387
WT 24 h vs OX 24 h	1,267	1,624

さらに、エリシター処理後 0, 6, 24 時間後のいずれかの経時点において OsTGAP1 過剰発現株において野生型株と比較して、発現が 2 倍以上に誘導されている遺伝子と 1/2 以下に抑制されている遺伝子を抽出したところ、OsTGAP1 過剰発現株で発現誘導される 2,268 遺伝子および発現抑制される 2,276 遺伝子を OsTGAP1 下流候補遺伝子として同定した(Fig. 2-5)。これらの OsTGAP1 下流候補遺伝子の機能を GO-perl のモジュールである map2slim (http://search.cpan.org/~cmungall/go-perl-0.10/scripts/ map2slim)を用いて、gene ontology (GO)に基づいて分類した。GO のカテゴリーである biological process・cellular component・molecular function のそれぞれに基づいて分類した結果を Fig. 2-6, 2-7, 2-8 に示す。OsTGAP1 過剰発現株において発現誘導される遺伝子については、biological process のカテゴリーにおいて metabolism・carbohydrate metabolism に分類される遺伝子の割合が高かった。さらに、これと対応するように molecular function のカテゴリーにおいて catalytic activity に分類される遺伝子の割合が高かった。このことから、OsTGAP1 過剰発現株において発現誘導される遺伝子には、代謝関連酵素が多く含まれる可能性が考えられた。逆に、OsTGAP1 過剰発現株において発現抑制される遺伝子については、molecular function のカテゴリーにおいて DNA

binding・transcription factor activity に分類される遺伝子の割合が高かった。このことから、OsTGAP1 過剰発現株において発現抑制される遺伝子には、転写因子が多く含まれる可能性が考えられた。しかし、OsTGAP1 の機能を明らかにするには、直接の標的遺伝子の同定が必要であると考えられたため、第 3 章において ChIP-seq 解析を行い、その結果と合わせ、標的遺伝子について詳細な議論をすることにした。

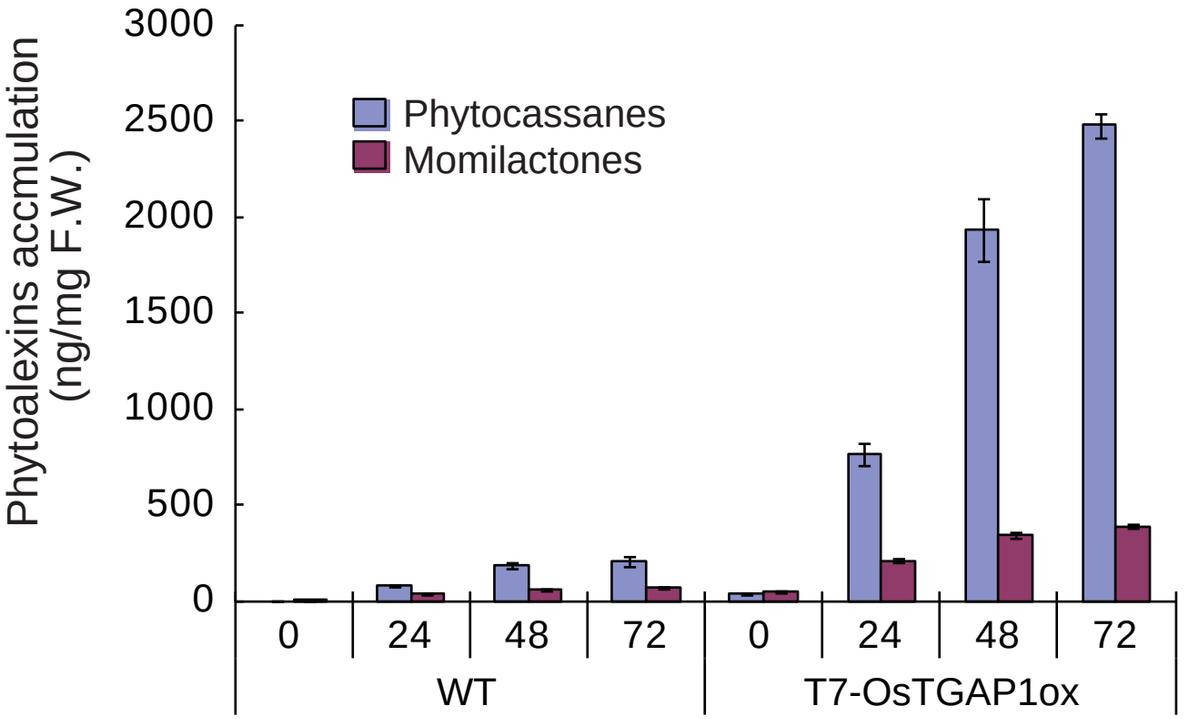


Fig. 2-1　T7-OsTGAP1過剰発現株における
ファイトアレキシンの生産量

WT : 野生型株
T7-OsTGAP1ox : T7-OsTGAP1過剰発現株
グラフの縦軸はmg新鮮重あたりの液体培地中のファイトアレキシンの蓄積量(ng)を示した。
エラーバーは３連の測定における標準偏差を表し、
少なくとも３回の実験で同様の傾向が得られた。

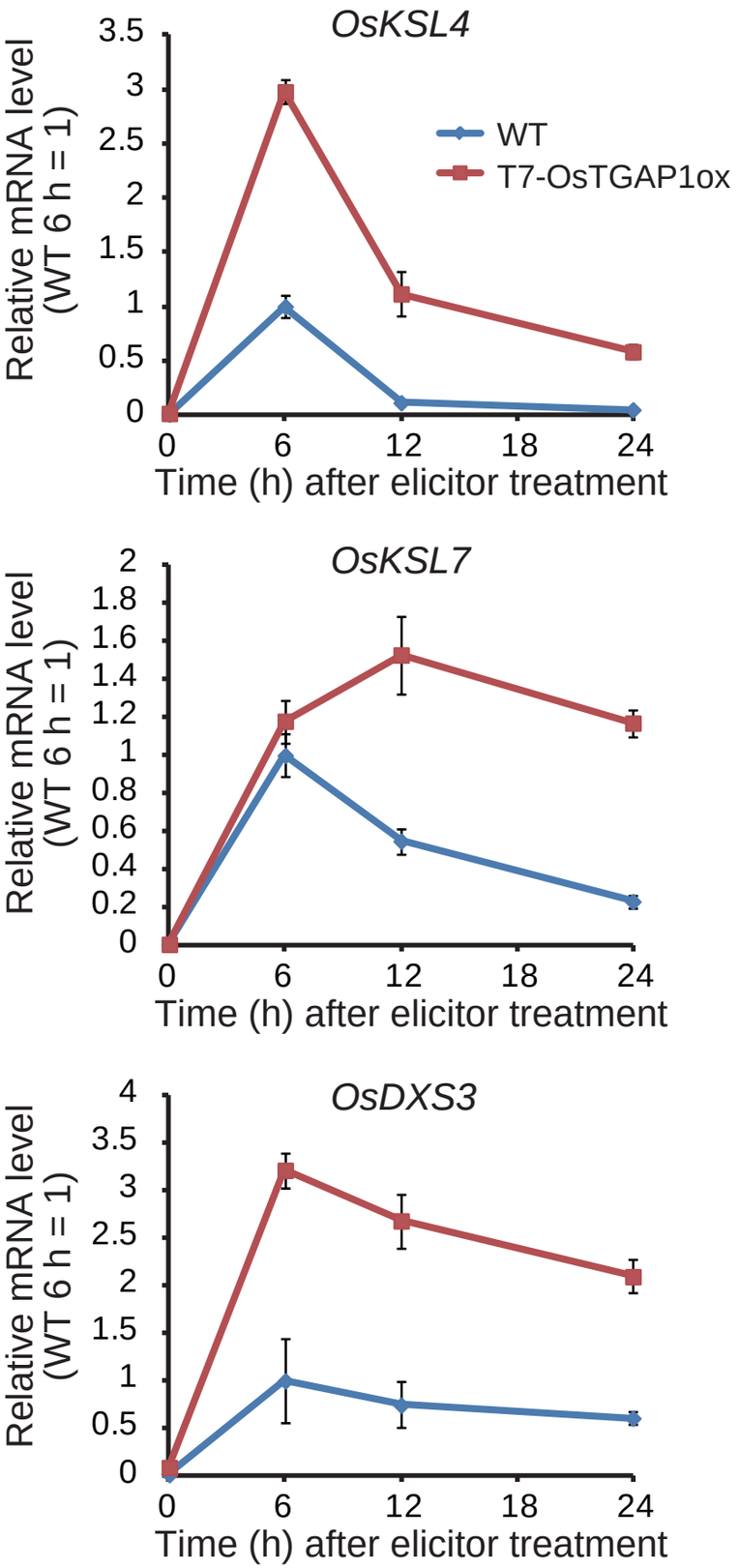


Fig. 2-2　T7-OsTGAP1過剰発現株における
*OsKSL4, OsKSL7, OsDXS3*の発現量

WT : 野生型株
T7-OsTGAP1ox : T7-OsTGAP1過剰発現株
グラフの縦軸は各遺伝子の発現量をユビキチン遺伝子の発現量で補正した後、
野生型株における処理後６時間後の値を１とした相対値で示した。
エラーバーは３連の測定における標準偏差を表し、
少なくとも３回の実験で同様の傾向が得られた。

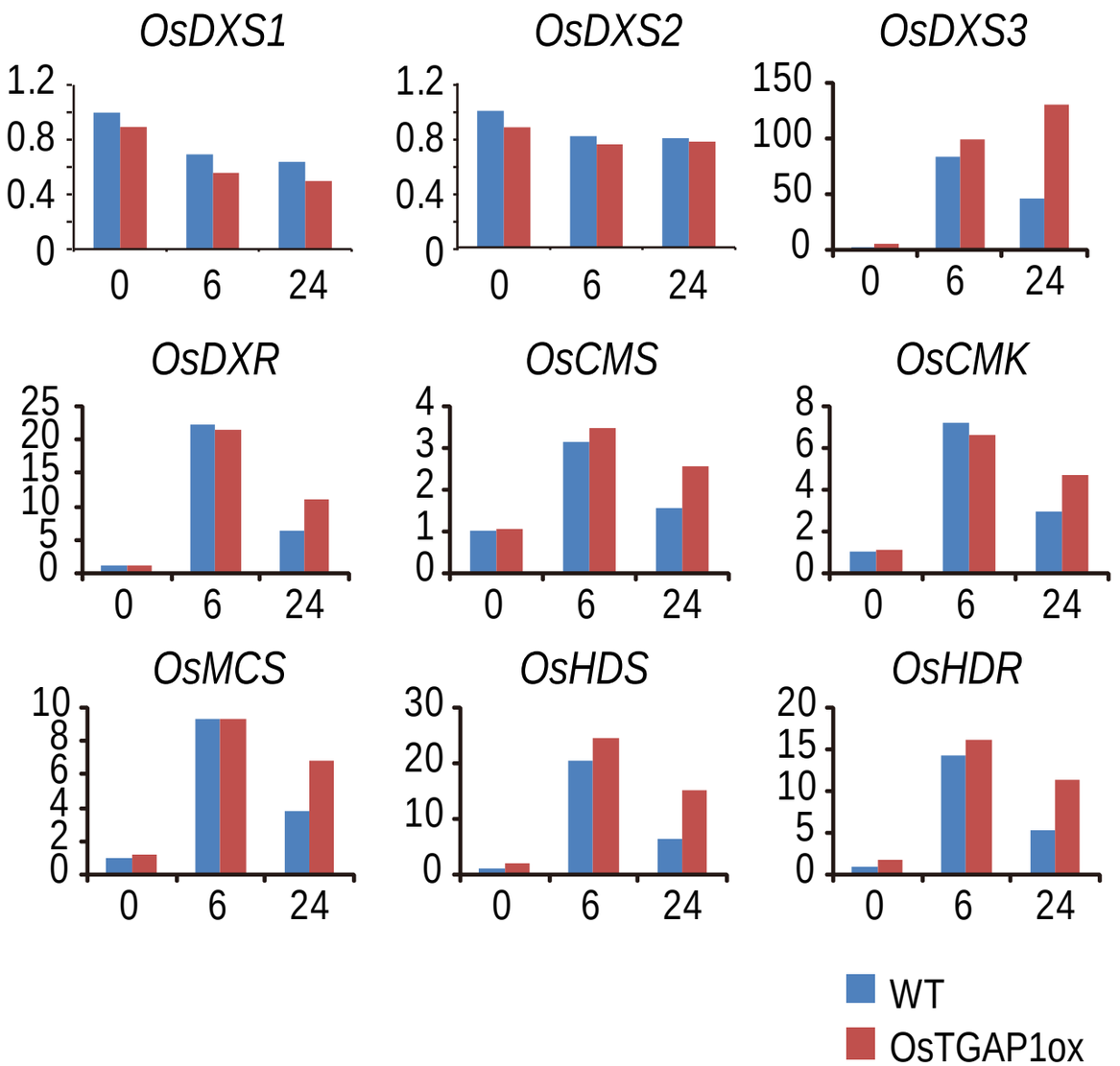


Fig. 2-3　OsTGAP1過剰発現株における
MEP経路遺伝子の発現量（マイクロアレイ解析）

WT : 野生型株
OsTGAP1ox : OsTGAP1過剰発現株
グラフの縦軸はマイクロアレイ解析の結果から得られた各遺伝子の発現量を野生型株における処理後0時間後の値を１とした相対値で示した。

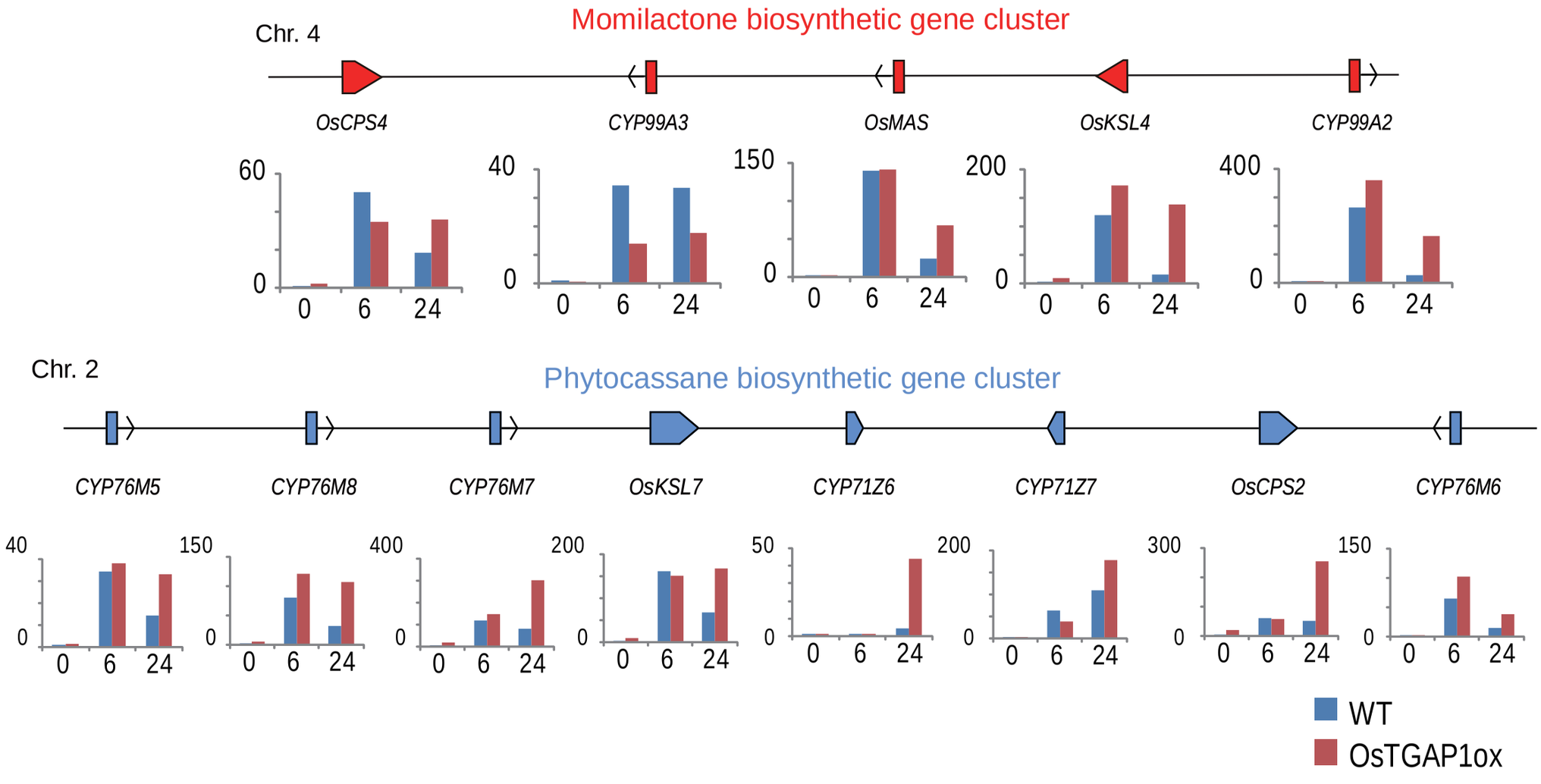
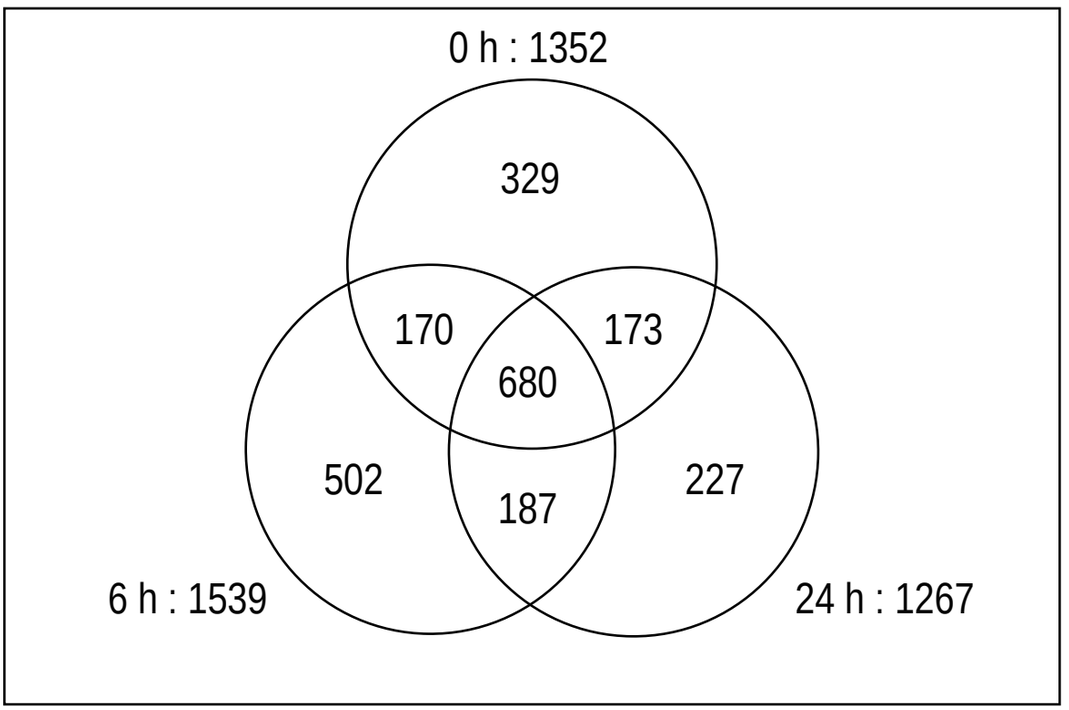


Fig. 2-4　OsTGAP1過剰発現株におけるmomilactioneおよびphytocassaneの生合成酵素路遺伝子の発現量（マイクロアレイ解析）

WT : 野生型株
OsTGAP1ox : OsTGAP1過剰発現株
グラフの縦軸はマイクロアレイ解析の結果から得られた各遺伝子の発現量を野生型株における処理後0時間後の値を１とした相対値で示した。

OsTGAP1 過剰発現株で発現誘導 : 2268



OsTGAP1 過剰発現株で発現抑制 : 2276

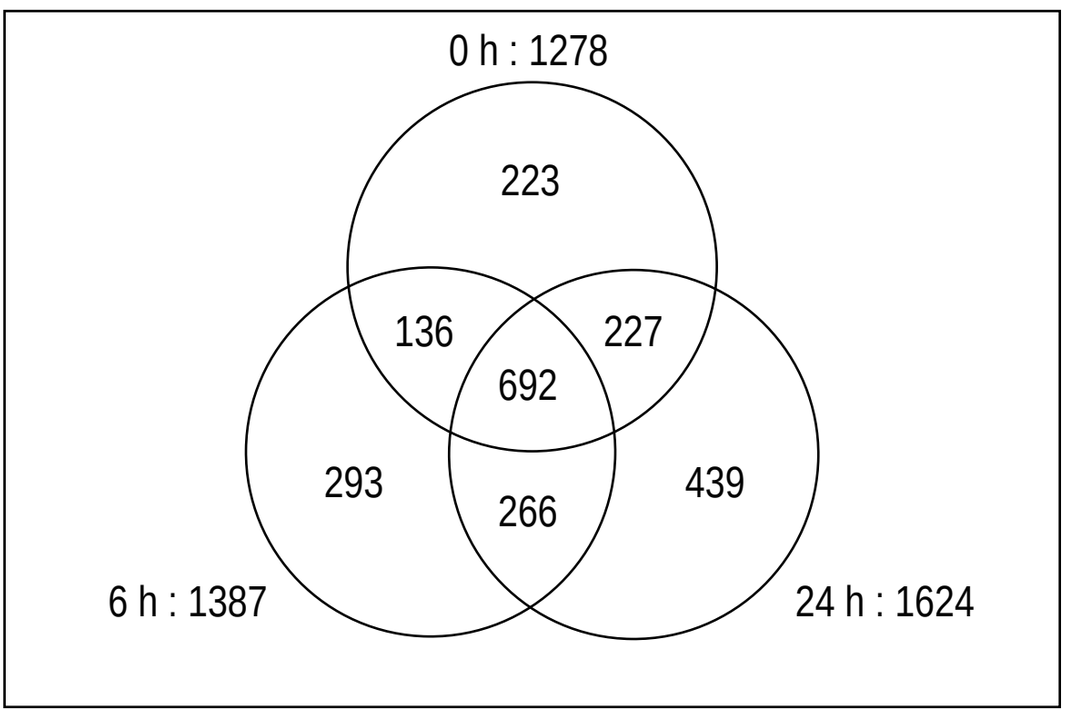


Fig. 2-5　OsTGAP1下流候補遺伝子

OsTGAP1 過剰発現株において野生型株と比較して
2 倍以上に発現量が上昇している遺伝子を発現誘導、
1/2 以下に低下している遺伝子を発現抑制とした。
各経時点において選抜された遺伝子を重ね合わせ、ベン図を描いた。

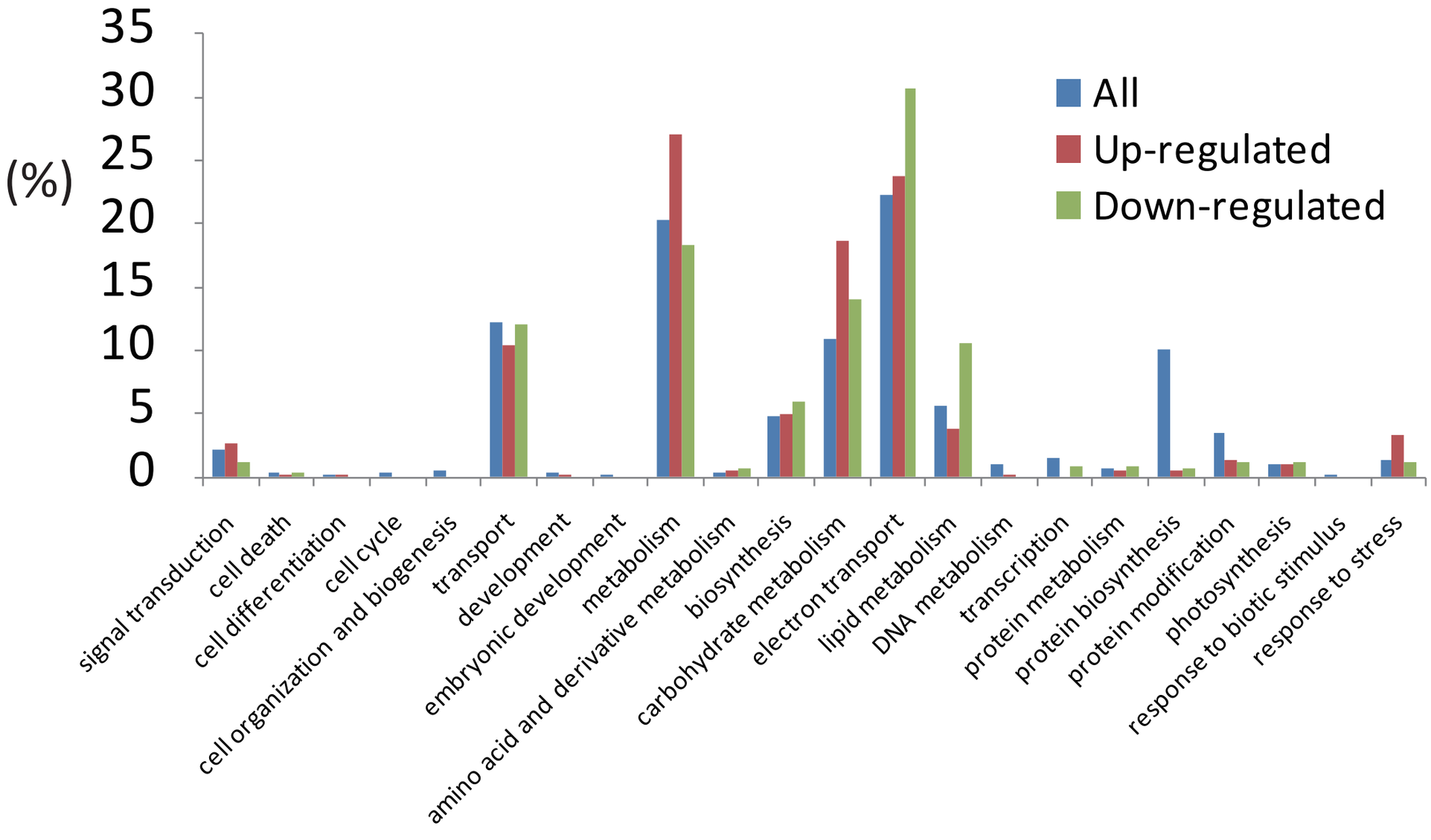


Fig. 2-6　OsTGAP1の下流候補遺伝子の分類（biological process）

map2slimを用いて、gene ontologyのbiological processに基づいて機能分類を行った。
グラフの縦軸はそれぞれのontologyに含まれる遺伝子の割合を示した。

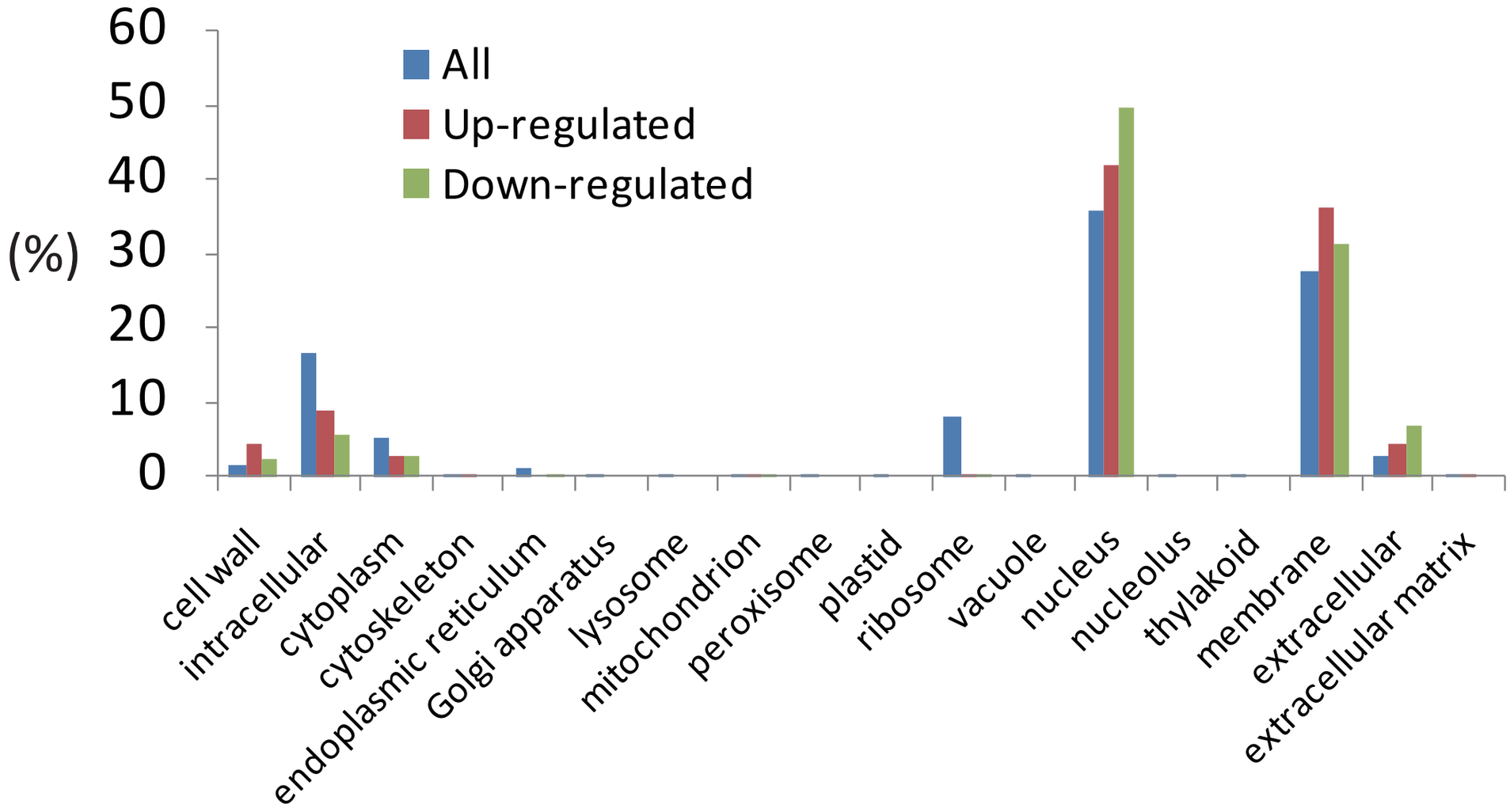


Fig. 2-７　OsTGAP1の下流候補遺伝子の分類（cellular component）

map2slimを用いて、gene ontologyのcellular componentに基づいて機能分類を行った。
グラフの縦軸はそれぞれのontologyに含まれる遺伝子の割合を示した。

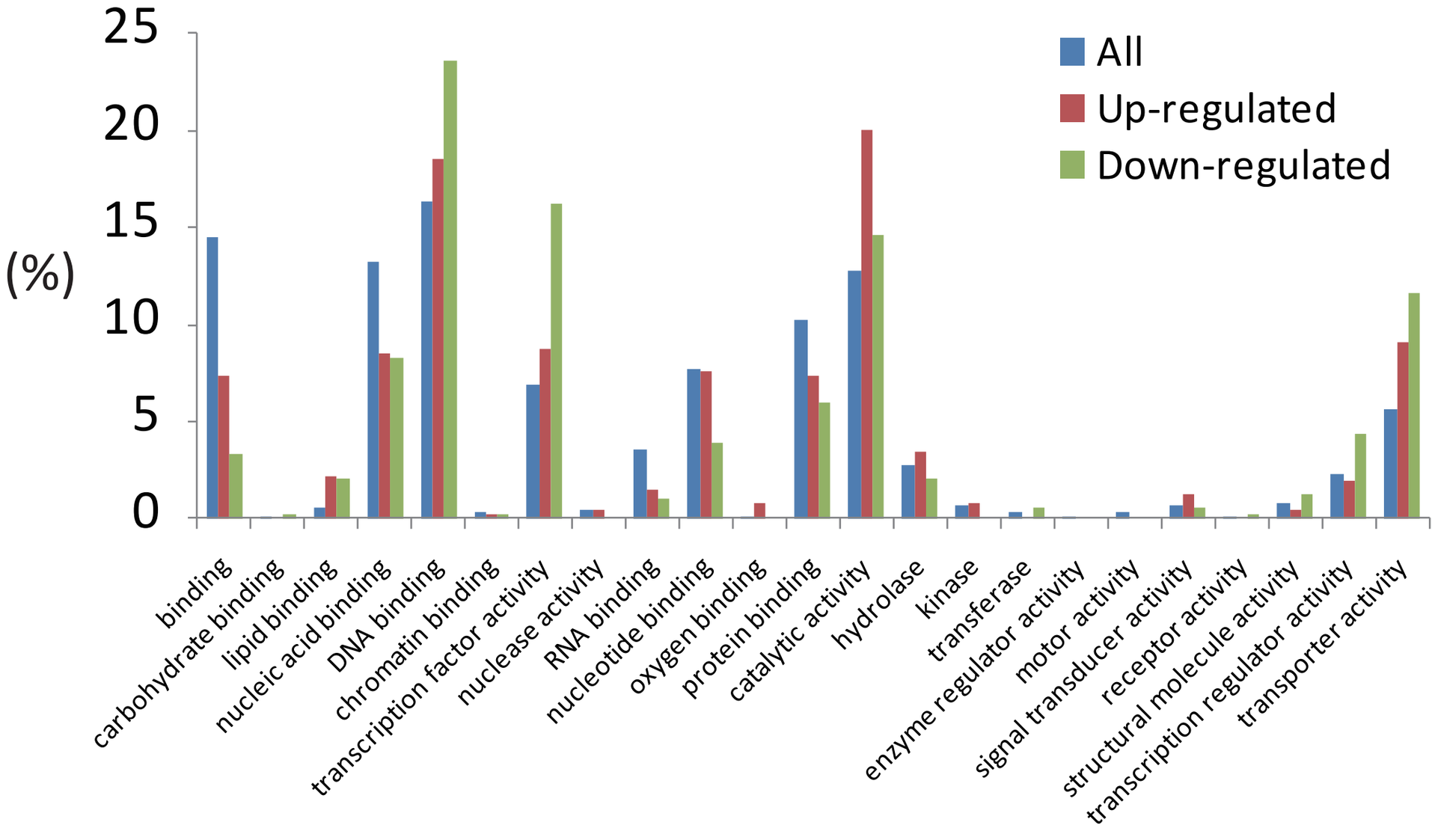


Fig. 2-８　OsTGAP1の下流候補遺伝子の分類（molecular function）

map2slimを用いて、gene ontologyのmolecular functionに基づいて機能分類を行った。
グラフの縦軸はそれぞれのontologyに含まれる遺伝子の割合を示した。

第 3 章　OsTGAP1 の結合領域の網羅的同定

3-1　緒言

第 2 章において、OsTGAP1 がジテルペン型ファイトアレキシンの生合成を制御するマスター転写因子であることが示された。本章においては、OsTGAP1 によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の転写制御機構を解明する足がかりとするため、ChIP-seq 解析によりこれらの遺伝子領域およびその周辺領域における OsTGAP1 の結合領域を解析することにした。また、ChIP-seq 解析の結果と第 2 章で行ったマイクロアレイ解析の結果とを合わせて議論することで、OsTGAP1 標的候補遺伝子の網羅的同定を行った。

3-2　材料と方法

3-2-1　イネの培養細胞の培養とキチンエリシター処理

イネの培養細胞の培養とキリンエリシター処理は 2-2-1 と同様に行った。

3-2-2　OsTGAP1 過剰発現株培養細胞

第 2 章でトランスクリプトーム解析に用いた OsTGAP1 過剰発現株培養細胞と同じものを用いた。

3-2-3　抗 OsTGAP1 抗体の作製

本章で用いた抗 OsTGAP1 抗体の作製は Sigma Aldrich に外注した。OsTGAP1 のアミノ酸配列のうち、特異性が高く、抗原性も高いと判断された 1 から 16 残基目までのペプチドを抗原とした。合成したペプチドをウサギ 1 羽に対して免疫し、免疫後 49 日目に採血を行った。得られた血清に対して、抗原ペプチドを保持させたカラムによるアフィニティー精製を行うことで、抗原ペプチドに結合する IgG を精製し、この IgG 溶液を抗体として用いた。なお、精製後の IgG 濃度は 1.9 mg/ml であった。

3-2-4　GST-OsTGAP1 の発現および精製

N 末端側に glutathione S-transferase (GST)を付加した OsTGAP1 (GST-OsTGAP1)の発現系は、当研究室の岡田により作製されたものを用いた(Okada et al., 2009)。pDEST15 (Invitrogen)に OsTGAP1 の ORF が組み込まれたプラスミド pDEST15-OsTGAP1 を用いて、*E. coli* Rosetta 2 (DE3)株 (Novagen)を形質転換した。得られた形質転換体を 50 μg/ml カルベニシリンおよび 25 μg/ml のクロラムフェニコールを含む LB 培地にて 37℃で一晩前培養した。前培養液 50 μl を 5 ml の 50 μg/ml カルベニシリンおよび 25 μg/ml のクロラムフェニコールを含む Overenight Express Instant TB medium (Novagen)に植菌した後、25℃で 24 時間培養した。培養後、3,300 *g*, 4℃で 10 分間遠心し、集菌を行った。集菌後の菌体を 1 ml の GST binding buffer (125 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl)に再懸濁し、Sonifier 250D (Branson)により power level:1, palse:1 sec, duty: 50%, total time: 1 min の条件で超音波破砕した。その後、20,000 *g*, 4℃で 15 分間遠心し、上清を可溶性画分とした。得られた可溶性画分から Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare)を用いて、付属のプロトコールに従ってバッチ法により GST-OsTGAP1 の精製を行った。溶出 buffer は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM reduced glutathione を用いた。得られた精製タンパク質溶液のタンパク質濃度は Protein Assay (BIO-RAD)を用いて付属のプロトコールに従って、bovine serum albumin (BSA)を標準タンパク質としたスタンダードアッセイ法により測定した。さらに、得られた精製タンパク質は、等量の 2×SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol (DTT), 4% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate), 0.2% (w/v) bromophenol blue, 20% (v/v) glycerol)と混合した後、96℃で 10 分間加熱した。その後、SDS-PAGE・ウェスタンブロッティング解析に供した。

3-2-5　イネ培養細胞からの核タンパク質および細胞質タンパク質の調製

実験の概要を Fig. 3-1 に示した。

実験に用いる培養細胞は液体培地からブフナー漏斗を用いて回収し、重量を測定した後、液体窒素で凍結させ、実験に用いるまで-80℃で保存した。

培養細胞からの核抽出の際に用いた buffer を以下に示す。

<u>High glycerol buffer (HGB)</u>

20 mM HEPES-NaOH (pH7.4)
5 mM $MgCl_2$
5 mM KCl
50 mM sucrose
70% (v/v) glycerol
1 mM DTT
200 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

<u>Low glycerol buffer (LGB)</u>

20 mM HEPES-NaOH (pH7.4)
5 mM $MgCl_2$
5 mM KCl
50 mM sucrose
10% (v/v) glycerol
1 mM DTT
200 μM PMSF

HGB および LGB は DTT, PMSF 以外のコンポーネントを混ぜた後、4℃で十分に冷やしておき、DTT, PMSF は実験を始める直前に加えた。

培養細胞（約 3 g）をガラス製乳鉢に移したのち、HGB を加えながら十分に破砕し、破砕した培養細胞を buffer ごと 50 ml チューブに移した。この際乳鉢を HGB で洗い、洗液と合わせて最終的に約 30 ml にした。その後、4℃で 20 分間穏やかに振とうした。さらに、ビーカーにかぶせた四つ折にした Miracrose (CALBIOCHEM)を用いて、氷上でろ過を行った。その際、ろ過後の Miracrose はしっかり絞った。そして、ろ液を 50 ml チューブに移した。この際ビーカーを HGB で洗い、洗液と合わせて最終的に約 40 ml にした。その後、遠心(4℃, 4,000 *g*)を 1 時間行い、上清の一部(1 ml)を細胞質タンパク質の調製用に回収した後、上清を捨て、ペレットを LGB 25 ml に懸濁した。さらに、遠心(4℃, 4,000 g)を 20 分間行った。遠心後、上清を捨て、ペレットを氷冷した TE (pH 8.0) 500 μl に懸濁し、これを核懸濁液とした。

核タンパク質の調製は以下のように行った。得られた核懸濁液を Sonifier 250D を用いて、power level:1, palse:1 sec, duty: 50%, total time: 1 min の条件で超音波破砕した後、遠心(4℃,

20,000 *g*)を 15 分間行い、上清を回収した。さらに回収した上清に対して、超遠心(4℃, 100,000 *g*)を 60 分間行い、得られた上清を核タンパク質溶液とした。核タンパク質溶液を SDS-PAGE に供する際には、サンプルの一部を用いて Protein Assay を用いて付属のプロトコールに従って、BSA を標準タンパク質としたスタンダードアッセイ法によりタンパク質濃度を測定した。その後、残ったサンプルを 20 倍量の氷冷アセトンと混合し、-20℃で一晩置いた。そして、遠心(4℃, 20,000 *g*)を 15 分間行い、上清を捨て、沈殿を減圧下で乾燥させた。その後、沈殿を 1×SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 0.1 % bromophenol blue, 10% glycerol)にタンパク質濃度が 0.5 mg/ml となるように溶解し、96℃で 10 分間加熱した後、SDS-PAGE に供するサンプルとした。

細胞質タンパク質の調製用に回収した上清については、10 mM Tris-HCl (pH8.0) 中で攪拌しながら透析を一晩行うことにより、buffer を交換した後、サンプルの一部を用いて、Protein Assay を用いて付属のプロトコールに従って、BSA を標準タンパク質としたスタンダードアッセイ法によりタンパク質濃度を測定した。その後、残ったサンプルを 20 倍量の氷冷アセトンと混合し、-20℃で一晩置いた。そして、遠心(4℃, 20,000 *g*)を 15 分間行い、上清を捨て、沈殿を減圧下で乾燥させた。その後、沈殿を 1×SDS sample buffer にタンパク質濃度が 0.5 mg/ml となるように溶解し、96℃で 10 分間加熱した後、SDS-PAGE に供するサンプルとした。

3-2-6　抗 OsTGAP1 抗体を用いた免疫沈降

実験の概要を Fig. 3-2 に示した。

まず、抗 OsTGAP1 抗体を Dynabeads Protein G (Invitrogen)に架橋剤を用いて、化学的に架橋させた。用いた試薬は以下の通りである。

Conjugation buffer: 20 mM sodium phosphate (pH8.0), 150 mM NaCl

Immunoprecipitation (IP) buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.4% (v/v) NP-40

また、IgG と Protein G の架橋には、bis[sulfosuccinimidyl] suberate (BS^3) (Thermo scientific)を用いた。BS^3 は終濃度 5 mM となるように conjugation buffer に溶解させて用いた。なお、BS^3 溶液は実験ごとに要時調製した。

まず、50 μl の Dynabeads Protein G を magnetic stand を用いて 200 μl の IP buffer で 2 回洗浄した後、200 μl の IP buffer に懸濁した。懸濁した Dynabeads Protein G と 1 μg の抗 OsTGAP1 抗体または normal rabbit IgG (Santa Cruz)と混合した後、4℃で転倒混和しながら 1 時間インキュベートした。その後、magnetic stand を用いて 250 μl の conjugation buffer で 2 回洗浄した後、250 μl の 5 mM BS^3 溶液に懸濁した。さらに室温で転倒混和しながら 30 分間インキュベートした。その後、12.5 μl の Tris-HCl (pH 7.5)を加えた後、室温で転倒混和しながら 15 分間インキュベートし、架橋反応を停止させ」た。そして、magnetic stand を用いて 200 μl の IP buffer で 3 回洗浄した後、200 μl の 1 M glycine-HCl (pH 3.0)に懸濁した。懸濁液を室温で転倒混和しながら 10 分間インキュベートし、架橋されなかった IgG を溶出した。その後、さらに magnetic stand を用いて 200 μl の IP buffer で 3 回洗浄した後、50 μl の IP buffer に懸

濁し、これをその後の免疫沈降に用いた。

次に、超遠心後の核タンパク質 100 ng に対して、Dynabeads Protein G と非特異的に結合するタンパク質を除去するため pre-clear を行った。核タンパク質溶液に対して、終濃度 100 mM NaCl, 0.4% (v/v) NP-40 となるように、5 M NaCl および NP-40 を加えた。そして、IP buffer で 2 回洗浄した 50 μl の Dynabeads Protein G を加え、4℃で転倒混和しながら 1 時間インキュベートした。その後、magnetic stand を用いて上清を回収し、一部を Input 画分としてサンプリングし、等量の 2×SDS sample buffer を加え、96℃で 10 分間加熱した後、SDS-PAGE に供するまで-20℃で保存した。残りのサンプルを二つに分け免疫沈降に供した。一方に normal IgG を架橋させた Dynabeads Protein G を、もう一方に抗 OsTGAP1 抗体を架橋させた Dynabeads Protein G を加えた後、4℃で転倒混和しながら一晩インキュベートした。そして、magnetic stand を用いて 1 ml の IP buffer で 5 回洗浄した後、20 μl の 0.2 M glycine-HCl (pH 2.5) に縣濁し、室温で 5 分間静置し、タンパク質を溶出した。溶出は 2 回行った。溶出画分はすぐに 5 ul の 1 M Tris (pH 11)を加えることで中和した。その後、溶出画分を 20 倍量の氷冷アセトンと混合し、-20℃で一晩置いた。その後、遠心(4℃, 20,000 *g*)を 15 分間行い、上清を捨て、沈殿を減圧下で乾燥させた。その後、沈殿を 20 μl の 1×SDS sample buffer に溶解し、96℃で 10 分間加熱した後、SDS-PAGE に供するサンプルとした。

3-2-7　SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング解析

SDS-PAGE は Mini-Protean 3 (BIO-RAD)を用いて、タンパク質実験プロトコール（大野・西村、1997）に従って行った。SDS-PAGE ゲルのアクリルアミド濃度は、目的タンパク質の分子量に合わせて、8%・10%・12%のいずれかで行った。泳動後のゲルの染色は、Simply Blue Safe Stain (Invitrogen)を用い、付属のプロトコールに従って行った。

メンブレンへのブロッティングは、ミニトランスブロットセル(BIO-RAD)を用いて行った。ブロッティングには、泳動 buffer として 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS, 20% (v/v) methanol を用い、100 V で 1 時間泳動を行うことで、Hybond-ECL (GE Healthcare)へのタンパク質の転写を行った。抗体反応は ECL Plus ウェスタンブロッティング検出プロトコール(GE Healthcare)に従って行った。ただし、抗体溶液の希釈には、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO)を付属のプロトコールに従って用いた。抗体の希釈倍率は、抗 OsTGAP1 抗体については 2,500 倍希釈で、horseradish peroxidase (HRP) 結合抗 rabbit IgG 抗体については 25,000 倍希釈で行った。また、抗 OsTGAP1 抗体を用いた抗体反応は 37℃、1 時間の条件で行った。検出試薬には、Immobilon Western (MILLIPORE) を用いた。化学発光の検出は、バイオイメージングアナライザーLAS2000 (富士フィルム) を用いた。

3-2-8　クロマチン免疫沈降(ChIP)

実験の概要を Fig. 3-3 に示した。

まず、培養細胞の固定を行った。37%ホルムアルデヒド溶液を終濃度 1%となるように液体培地に加えた後、室温で 7 分間インキュベートした。その後、1 M glycine を終濃度 0.1 M

となるように液体培地に加え、室温で 5 分間インキュベートした。そして、培養細胞を液体培地からブフナー漏斗を用いて回収し、重量を測定した後、液体窒素で凍結させた後、実験で用いるまで-80℃で保存した。

培養細胞からの核抽出から核縣濁液の調製までは 3-2-4 と同様に行った。ただし、細胞質タンパク質の調製用のサンプリングは行わなかった。

次に、核縣濁液に対して超音波破砕を行うことで、ゲノム DNA の断片化を行った。ゲノム DNA の断片化にはバイオラプターUCW-201 (コスモバイオ)を用いた。核縣濁液を 250 μl ずつ 1.5 ml チューブに分注し、氷水中で冷やしながら power : 5, 30 sec ON / 60 sec OFF, 30 cycle の条件で超音波破砕を行った。超音波破砕後、遠心(4℃, 20,000 *g*)を 15 分間行い、上清を回収した。さらに回収した上清に対して、超遠心(4℃, 100,000 *g*)を 60 分間行い、得られた上清を以降の実験に用いた。上清の一部(50 μl)を断片化の確認用にサンプリングし、残りの上清は液体窒素で凍結後、-80℃で保存した。

断片化のチェックは以下のように行った。まず、50 μl のサンプルに 450 μl の TE (pH 8.0), 20 μl の 5 M NaCl を加えた後、65℃で一晩インキュベートした。その後、RNase (WAKO)を 1 μl 加え、65℃でさらに 30 分間インキュベートした。さらに、10 μl の 0.5M EDTA, 20 μl の 1 M Tris-HCl (pH6.5), 2 μl の Proteinase K (New England Biolabs)を加えて 45℃で 1 時間インキュベートした。そして、フェノール・クロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿を行った。ただし、イソプロパノール沈殿は Ethachinmate (WAKO)を用いて、付属のプロトコールに従って行った。イソプロパノール沈殿後、回収された DNA を 20 μl の TE (pH 8.0)に溶解した。得られた DNA 溶液の濃度を測定し、元の溶液の DNA 濃度を計算した。また、1 μg 分の DNA を 2%アガロースゲル電気泳動により泳動し、ゲノム DNA の断片化の確認を行った。断片化においては、100 bp から 500 bp において DNA 量がピークとなることを確認した。

断片化の確認後、-80℃で保存しておいたサンプルを用いて免疫沈降を行った。免疫沈降には、DNA 100 μg 分のサンプルを用いた。サンプル溶液に溶液の組成が 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.4% (v/v) NP-4 となるように 5 M NaCl と NP-40 を加え、さらに 2.5 ml に fill up した。

次に、Dynabeads Protein G と非特異的に結合するタンパク質を除去するため pre-clear を行った。Dynabeads Protein G を 250 μl とり、magnetic stand を用いて IP buffer で 2 回洗浄した後にサンプルに加えた。そして、4℃で転倒混和しながら 1 時間インキュベートした。その後、DynaMag-15 (Invitrogen)を用いて上清を回収し、500 μl を Input 画分としてサンプリングし、液体窒素で凍結した後に-80℃で保存した。残りのサンプルを二つに分け、一方に 2.5 μg の rabbit normal IgG を、もう一方に 2.5 μg の抗 OsTGAP1 抗体を加えた。その後、4℃で転倒混和しながら一晩インキュベートした。そして、Dynabeads Protein G を 25 ul とり、IP buffer で 2 回洗浄した後にそれぞれの画分に加え、4℃で転倒混和しながら 1 時間インキュベートした。その後、DynaMag-15 を用いて Dynabeads Protein G を IP buffer 10 ml で 7 回洗浄した。洗浄後、Dynabeads Protein G に 500 μl TE (pH 8.0), 20 μl 5M NaCl を加えた後、65℃で一晩インキュベートした。また、保存しておいた Input 画分についても 10 μl 5 M NaCl を加えた後、同様に 65℃で一晩インキュベートした。その後、全てのサンプルに RNase を 1 μl 加え、65℃

でさらに 30 分間インキュベートした後、IP 画分については magnetic stand を用いて、Dynabeads Protein G を除去し、上清を回収した。その後、10 μl の 0.5M EDTA, 20 μl の 1 M Tris-HCl (pH 6.5), 2 μl の Proteinase K を加えて 45℃で 1 時間インキュベートした。そして、フェノール・クロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿を行った。ただし、イソプロパノール沈殿には Ethachinmate を用いた。イソプロパノール沈殿後、回収された DNA を IP 画分については 100 μl の TE (pH 8.0)に、Input 画分については 500 μl の TE (pH 8.0)に溶解し、ChIP DNA および Input DNA をそれぞれ得た。

3-2-9　定量的 PCR による ChIP-PCR

定量的 PCR は、2-2-6 と同様に SYBR Green PCR Master Mix を用いて行った。検量線用サンプルの調製は、下記の各プライマーを用いて、Input DNA をテンプレートとして PCR を行い、2-2-6 と同様に検量線用サンプルとした。Input DNA および normal IgG、抗 OsTGAP1 抗体でそれぞれ免疫沈降して得た ChIP DNA のそれぞれについて、各プライマーを用いて定量 PCR を行った。そして、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 DNA に対する回収率を計算し、抗 OsTGAP1 抗体による濃縮が見られるかを検討した。

回収率 (%) = ChIP DNA の定量値 / (Input DNA の定量値 × Input DNA の希釈倍率) ×100

本実験の場合、Input DNA の希釈倍率は 10 である。

（Input 画分は IP 画分の 1/2 の液量を用い、最終的に 5 倍の液量に溶解しているため）

以下に用いたプライマーを示す。

Primer

OsKSL4 上流域のエリシター応答性シスエレメント付近

Forward	5’-GCAGACTCGCACTGATTTGA-3’	(20 bases)
Reverse	5’-TCCAGCTTTATTTGCCGACT-3’	(20 bases)

Os KSL4 転写開始点上流 200 bp 付近

Forward	5’-CCTATGTCACAGGGATGCAA-3’	(20 bases)
Reverse	5’-GTAGCAGCCTGGTAGGTCCA-3’	(20 bases)

*OsDXS3*転写開始点付近

Forward	5’-CTCCCGCTAAAACTTGCTTG-3’	(20 bases)
Reverse	5’-TGGGAGGAGAAGCAGAGAATG-3’	(21 bases)

OsCPS4 転写開始点上流約 3 kbp

Forward	5’-TAAAAATAACGGGGCCAATG-3’	(20 bases)
Reverse	5’-AAGCATACTCCCTCCGTCCT-3’	(20 bases)

CYP99A2 転写開始点上流約 3 kbp

Forward	5’-ACTGATCTTTGTCGCATCCA-3’	(20 bases)
Reverse	5’-CATGCGTGGGAGACCATTAT-3’	(20 bases)

Momilactone 生合成酵素遺伝子クラスター領域の外側

Forward	5’-CAACAAACAAGGTTGGGTCA-3’	(20 bases)
Reverse	5’-CGGGAGTCATCATCTCCTGT-3’	(20 bases)

3-2-10　ChIP-seq 解析

高速シークエンスのためのライブラリ作製・高速シークエンス・得られたシークエンスデータのイネゲノムへのマッピングは、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの吉川博文教授・松本貴嗣博士に依頼して行った。

Input DNA および抗 OsTGAP1 抗体により免疫沈降した ChIP DNA を ChIP-seq 解析に供した。キチンエリシター処理後 0 時間および 6 時間の OsTGAP1 過剰発現株培養細胞を用いて ChIP を行い、それぞれ ChIP-seq に用いるサンプルを調製した。ChIP-seq はそれぞれのサンプルについて 2 連で行い、キチンエリシター処理からそれぞれサンプル調製を繰り返した。

高速シークエンスに供するライブラリの作製は、Paired End DNA Sample Prep Kit (illumina) と Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit (illumina)を用いて、付属のプロトコールに従って行った。ライブラリの作製に用いる ChIP DNA および Input DNA は Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent)を用いて、DNA 量の定量を行い、150 bp から 250 bp の DNA 濃度が揃うように Input DNA の希釈を行った。まず、サンプル DNA の末端平滑化を行った後、Adapter のライゲーションを行った。その後、E-Gel SizeSelect 2% (Invitrogen)を用いて電気泳動を行い、350 bp 付近の DNA を回収した。その後、PCR により Adapter が付加された DNA を増幅した後に精製し、これをライブラリとした。得られたライブラリを Agilent 2100 バイオアナライザを用いて、DNA 量の定量を行った後に、DNA 量を揃えて Genome Analyzer II (illumina)による高速シークエンスに供した。なおシークエンスは pair end で行い、DNA 断片の両末端 100 bp の配列をシークエンスした。

高速シークエンスにより得られたリードは BWA (Li and Durbin, 2009)を用いて、イネゲノムに対してマッピングを行った。マッピングにおいては、The Rice Annotation Project Database (http:// rapdb.dna.affrc.go.jp)より入手した IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) genome sequence (build5) をリファレンスとして用いた。各リードの 100 bp の配列全てをマッピングに用いた。マッピングにおいては、5 bp までのミスマッチを許容し、イネゲノムにマッピングした。さらに、PCR により生じたと考えられる duplication (他のリードと全く同一の位置にマッピングされたリード)を除いた。OsTGAP1 の結合領域の同定には、両末端のリードが適切な距離に向かい合うようにマッピングされたアラインメントを用いた。

OsTGAP1 の結合領域の同定は、当研究室において Partek Genomics Suite 6.5 を用いて行った。また、結合領域の遺伝子領域に対する距離の分布の解析や標的候補遺伝子の絞り込みは Microsoft Office Excel (Microsoft)を用いて行った。また、本解析においては、The Rice Annotation Project Database より入手した IRGSP genome sequence (build5)にアノテーションされている遺伝子を対象とした。

3-2-11　本章で扱った遺伝子の gene ID

OsTGAP1: Os04g0637000; *OsDXS1*: Os05g0408900; *OsDXS2*: Os06g0142900; *OsDXS3*: Os07g0190000; *OsDXR*: Os01g0106900; *OsCMS*: Os01g0887100; *OsCMK*: Os01g082100; *OsMCS*: Os02g0680600; *OsHDS*: Os02g0603800; *OsHDR*: Os03g0731900; *OsCPS2*: Os02g0571100; *OsCPS4*: Os04g0178300; *OsKSL4*: Os04g0179700; *OsKSL7*: Os02g0570400; *CYP71Z6*: Os02g0570500; *CYP71Z7*: Os02g0570700; *CYP76M5*: Os02g0569000; *CYP76M6*: Os02g0571900; *CYP76M7*: Os02g0569900; *CYP76M8*: Os02g0569400; *CYP99A2*: Os04g0180400; *CYP99A3*: Os04g0178300; *OsMAS*: Os04g0179200; *OsWRKY45*: Os05g0322900; *OsOPR1*: Os06g0216300

3-3　結果および考察

3-3-1　ウェスタンブロッティング解析による抗 OsTGAP1 抗体の特異性の評価

OsTGAP1 の結合領域を明らかにするため、ChIP-seq 解析を行った。ChIP-seq 解析を行うにあたり、OsTGAP1 の 1 から 16 残基目までのペプチドを抗原とした抗 OsTGAP1 抗体を作製した。まず、作製した抗体の力価を評価するため、組み換え GST-OsTGAP1 タンパク質を用いたウェスタンブロッティング解析を行った。以前に当研究室の岡田により構築された大腸菌発現系を用いて、組み換え GST-OsTGAP1 タンパク質の発現・精製を行った。精製した GST-OsTGAP1 を 10 ng から 0.01 ng まで段階希釈した後、SDS-PAGE に供した。その後、メンブレンに転写し、抗 OsTGAP1 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析に供した。その結果、GST-OsTGAP1 の予想分子量(約 71 k)と一致する位置にバンドが検出され、このバンドは 0.1 ng まで検出可能であった(Fig. 3-4)。また、ウェスタンブロッティング解析において、GST-OsTGAP1 の予想分子量(約 71 k)より下の位置にバンドが検出されているが(Fig. 3-4)、これらは過去に抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析においても検出されたバンドパターン(岡田、2006)とよく一致しており、GST-OsTGAP1 の翻訳が途中で停止したものもしくは GST-OsTGAP1 の分解物と考えられる。これらのことから、作製した抗体はウェスタンブロッティング解析において、GST-OsTGAP1 を認識し、0.1 ng まで検出可能であることが明らかになった。

次に、イネ由来のサンプルから OsTGAP1 を認識することが可能であるかを検討した。野生型株培養細胞および OsTGAP1 過剰発現株培養細胞から、核タンパク質および細胞質タンパク質を調製し、それに対してウェスタンブロッティング解析を行った。その結果、野生型株および OsTGAP1 過剰発現株の核タンパク質および OsTGAP1 過剰発現株の細胞質タンパク質において、OsTGAP1 の予想分子量(約 45 k)と一致する位置に単一のバンドが検出された(Fig. 3-5)。このバンドが OsTGAP1 と考えられ、イネ由来のサンプルから OsTGAP1 を検出することが可能であることが明らかになった。また、OsTGAP1 過剰発現株 において細胞質タンパク質と比較して核タンパク質の方がバンドの強度が強いこと、また野生型株においては核タンパク質においてのみバンドが検出されたことから、OsTGAP1 はイネ生体内において大部分が核内に存在することが示された(Fig. 3-5)。過去に行われたタマネギ表皮細胞を用いた細胞内局在性解析の結果から、OsTGAP1-GFP 融合タンパク質は核に局在することが示されており(Okada et al., 2009)、今回の結果と一致する。

さらに、抗 OsTGAP1 抗体を用いてキチンエリシター処理後の OsTGAP1 タンパク質量の変化を解析した。野生型株培養細胞に対してキチンエリシター処理を行い、処理後 0, 6, 12, 24 時間で培養細胞を回収し、核タンパク質および細胞質タンパク質を調製した。そしてそれらをウェスタンブロッティング解析に供した。その結果、エリシター処理後のどの経時点においても核タンパク質画分においてのみ OsTGAP1 が検出された(Fig. 3-6)。このことから、エリシター処理により OsTGAP1 の局在性が変化することはないと考えられる。また、エリシター処理後 6 時間で OsTGAP1 タンパク質量が微増し、それが 24 時間後まで維持されることが明らかになった (Fig. 3-6)。エリシター処理により、*OsTGAP1* の mRNA 量が処理後 4 時間をピークとして一過的に増加されることが示されており(Okada et al., 2009)、OsTGAP1

のタンパク質量も mRNA と同調的もしくは少し遅れて増加すると考えられる。さらに、mRNA 量が定常状態に戻った処理後 12, 24 時間後においても、タンパク質量は増加したまま維持されており、OsTGAP1 タンパク質がイネ生体内において、そのまま存在していると考えられる。

3-3-2　免疫沈降による抗 OsTGAP1 抗体の特異性の評価

ChIP を行うにあたり、抗 OsTGAP1 抗体を用いた免疫沈降により OsTGAP1 を濃縮することが可能であるかを検討することにした。野生型株培養細胞から調製した核タンパク質に対して、OsTGAP1 抗体および rabbit normal IgG を用いて免疫沈降を行った。その後、免疫沈降画分および Input 画分に対し、抗 OsTGAP1 抗体を用いてウェスタン解析を行った。その結果、rabbit normal IgG を用いて免疫沈降を行った画分ではバンドは検出されなかったが、抗 OsTGAP1 抗体を用いて免疫沈降を行った画分において、OsTGAP1 と思われるバンドが検出された(Fig. 3-7)。このことから、抗 OsTGAP1 抗体を用いて OsTGAP1 を免疫沈降できることが明らかになった。

3-3-3　ChIP-PCR による *OsKSL4* 上流域の濃縮の確認

抗 OsTGAP1 抗体を用いて ChIP を行うにあたり、OsTGAP1 の結合領域の DNA が濃縮できているか確認を行うことにした。OsTGAP1 の結合領域のポジティブコントロールとして、これまでに *in vitro* において OsTGAP1 が結合することが確認されている momilactone 生合成酵素遺伝子 *OsKSL4* の転写開始点上流約 1100 bp に存在するエリシター応答性シスエレメントである TGACG-motif を含む領域を用いることにした(Okada et al., 2009)。

キチンエリシター処理後 0, 6 時間の野生型株および OsTGAP1 過剰発現株の培養細胞をホルムアルデヒドで固定し、固定後のサンプルから核を抽出し、ゲノム DNA の断片化を行った。まず、サンプルの一部から DNA を精製し、2%アガロースゲル電気泳動に供し、断片化の確認を行った。電気泳動の結果を Fig. 3-8 に示す。10 kbp から 100 bp まで DNA がスメアに検出され、100 bp から 500 bp において DNA 量がピークになるような泳動パターンが得られたことから、断片化が十分に行われていると判断した。以後の実験においても、毎回断片化が十分に行われていることを同様に確認した。

次に、OsTGAP1 抗体および rabbit normal IgG を用いて免疫沈降を行った。Input DNA および ChIP DNA を精製し、得られた DNA を用いて定量的 PCR を行うことで、それぞれのサンプルに含まれる *OsKSL4* 上流域の DNA 量を定量した。

ChIP-PCR の結果を Fig. 3-9 に示す。OsTGAP1 過剰発現株を用いた場合にエリシター処理の有無に関わらず、rabbit normal IgG で免疫沈降を行った ChIP DNA と比較して抗 OsTGAP1 抗体で免疫沈降を行った ChIP DNA において、*OsKSL4* 転写開始点上流約 1100 bp に存在する TGACG-motif を含む領域が顕著に濃縮されていた(Fig. 3-9)。このことから、少なくとも OsTGAP1 過剰発現株において OsTGAP1 が *in vivo* においてもこの領域に結合していることが明らかになった。さらに、エリシター処理により *OsKSL4* 上流域の濃縮に変化が見られなかったことから、エリシター処理の有無に関わらず OsTGAP1 は *OsKSL4* 上流域に結合して

いると考えられた。第 2 章において示したように、OsTGAP1 過剰発現株においてもエリシター未処理時においては*OsKSL4*などのジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現は微弱にしか誘導されず、エリシター処理によりその発現が顕著に誘導されることがわかっている。しかし、ChIP-PCR の結果から、OsTGAP1 はエリシター未処理時から *OsKSL4* 上流域に結合していると考えられ、*OsKSL4* 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。また、*OsKSL4* 転写開始点上流約 200 bp 付近の領域を増幅するプライマーセットを用いた場合にも、*OsKSL4* 転写開始点上流約 1100 bp よりも濃縮度は低いものの、抗 OsTGAP1 抗体で免疫沈降を行った ChIP DNA において濃縮が認められた(Fig. 3-9)。これは、Fig. 3-8 に示すように断片化後の DNA においても 1 kbp 以上の長さのフラグメントが残っていることが原因であると考えられる。

一方、野生型株を用いた場合には、抗 OsTGAP1 抗体で免疫沈降を行った ChIP DNA において rabbit normal IgG で免疫沈降を行った ChIP DNA と比較して、*OsKSL4* 転写開始点上流約 1100 bp に存在する TGACG-motif を含む領域の顕著な濃縮は認められなかった(Fig. 3-9)。しかし、は野生型株を用いた免疫沈降実験(3-3-1)においては、免疫沈降による OsTGAP1 の濃縮が確認されている。このことから、野生型株を用いた場合においても抗 OsTGAP1 抗体を用いて、OsTGAP1 を免疫沈降することが可能であると考えられる。しかし、ChIP においては、タンパク質-DNA 複合体を免疫沈降することが必要であり、ホルマリンによる固定条件や免疫沈降後条件の洗浄などの条件検討が必要であると考えられ、野生型株において OsTGAP1 が *OsKSL4* 上流域に結合しているかどうかについては今後の解析が必要と考えられる。

3-3-4　ChIP-seq 解析

本論文においては、OsTGAP1 の結合領域を明らかにするために、OsTGAP1 過剰発現株を用いて、ChIP-seq 解析を行うことにした。また、第 2 章において行ったトランスクリプトーム解析の結果と合わせて議論する上でも、同じ OsTGAP1 過剰発現株を用いる利点があると考えられる。

キチンエリシター処理後 0 時間および 6 時間の OsTGAP1 過剰発現株培養細胞から調製した Input DNA および抗 OsTGAP1 抗体により免疫沈降した ChIP DNA を ChIP-seq 解析に供した。ChIP-seq 解析はそれぞれのサンプルについて 2 連で行い、キチンエリシター処理からそれぞれサンプル調製を繰り返した。高速シークエンスから得られたリードをイネゲノムにマッピングした結果、Table 3-1 に示す数のリードがイネゲノムにマッピングされた。

さらに、PCR により生じたと考えられる duplication (他のリードと全く同一の配列を持つリード)を除いたところ、Table 3-2 に示す数のリードが得られた。Duplication の除去前と除去後のリード数を比較すると、60%から 80%のリードが除去後においても残った(Table 3-3)。このことから、今回の ChIP-seq 解析においては、サンプル調製時の PCR によって DNA 配列の多様性が失われていないと考えられた。OsTGAP1 の結合領域の同定には、duplication の除去を行った後、適切な距離に両末端のリードが向かい合うようにマッピングされたアラ

Table 3-1 ChIP-seq解析により得られたリードの数

エリシター未処理 1st experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	8,280,961	8,297,441	16,578,402
Multi hit[b]	1,201,861	1,152,826	2,354,687
No hit[c]	369,750	402,305	772,055
Total	9,852,572	9,852,572	19,705,144

エリシター未処理 1st experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	6,678,645	6,642,532	13,321,177
Multi hit[b]	1,170,308	1,068,445	2,238,753
No hit[c]	517,888	655,864	1,173,752
Total	8,366,841	8,366,841	16,733,682

エリシター未処理 2nd experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	5,412,541	5,401,464	10,814,005
Multi hit[b]	723,088	698,995	1,422,083
No hit[c]	322,245	357,415	679,660
Total	6,457,874	6,457,874	12,915,748

エリシター未処理 2nd experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	3,872,292	3,841,786	7,714,078
Multi hit[b]	545,590	421,100	966,690
No hit[c]	329,430	484,426	813,856
Total	4,747,312	4,747,312	9,494,624

エリシター処理後6時間 1st experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	7,025,622	7,036,243	14,061,865
Multi hit[b]	1,253,783	1,162,253	2,416,036
No hit[c]	401,355	482,264	883,619
Total	8,680,760	8,680,760	17,361,520

エリシター処理後6時間 1st experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	8,242,720	8,199,694	16,442,414
Multi hit[b]	1,173,702	849,925	2,023,627
No hit[c]	496,234	863,037	1,359,271
Total	9,912,656	9,912,656	19,825,312

エリシター処理後6時間 2nd experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	4,938,014	4,925,272	9,863,286
Multi hit[b]	587,779	567,688	1,155,467
No hit[c]	245,716	278,549	524,265
Total	5,771,509	5,771,509	11,543,018

エリシター処理後6時間 2nd experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	6,405,930	6,341,078	12,747,008
Multi hit[b]	870,397	732,342	1,602,739
No hit[c]	710,688	913,595	1,624,283
Total	7,987,015	7,987,015	15,974,030

[a] イネゲノムに1箇所にマッピングされたリード
[b] イネゲノムに2箇所以上にマッピングされたリード
[c] イネゲノムにマッピングされなかったリード
[d] Pair endによるシークエンスで得られた両端のシークエンスをそれぞれ表した

Table 3-2 Duplicaitonを除去した後のリードの数

エリシター未処理 1st experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	6,024,816	6,031,847	12,056,663
Multi hit[b]	763,438	723,766	1,487,204
No hit[c]	369,750	402,305	772,055
Total	7,158,004	7,157,918	14,315,922

エリシター未処理 1st experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	4,554,164	4,554,404	9,108,568
Multi hit[b]	1,151,207	1,012,702	2,163,909
No hit[c]	517,888	655,864	1,173,752
Total	6,223,259	6,222,970	12,446,229

エリシター未処理 2nd experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	4,110,319	4,096,073	8,206,392
Multi hit[b]	462,679	441,538	904,217
No hit[c]	322,245	357,415	679,660
Total	4,895,243	4,895,026	9,790,269

エリシター未処理 2nd experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	2,691,516	2,660,016	5,351,532
Multi hit[b]	413,970	290,108	704,078
No hit[c]	329,430	484,426	813,856
Total	3,434,916	3,434,550	6,869,466

エリシター処理後6時間 1st experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	5,366,855	5,369,057	10,735,912
Multi hit[b]	824,952	741,587	1,566,539
No hit[c]	401,355	482,264	883,619
Total	6,593,162	6,592,908	13,186,070

エリシター処理後6時間 1st experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	6,410,495	6,408,401	12,818,896
Multi hit[b]	1,006,095	641,310	1,647,405
No hit[c]	496,234	863,037	1,359,271
Total	7,912,824	7,912,748	15,825,572

エリシター処理後6時間 2nd experiment ChIP DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	4,052,999	4,039,302	8,092,301
Multi hit[b]	429,331	410,072	839,403
No hit[c]	245,716	278,549	524,265
Total	4,728,046	4,727,923	9,455,969

エリシター処理後6時間 2nd experiment Input DNA

	Read1[d]	Read2[d]	Total
Unique hit[a]	5,927,773	5,862,367	11,790,140
Multi hit[b]	792,710	654,845	1,447,555
No hit[c]	710,688	913,595	1,624,283
Total	7,431,171	7,430,807	14,861,978

[a] イネゲノムに1箇所にマッピングされたリード
[b] イネゲノムに2箇所以上にマッピングされたリード
[c] イネゲノムにマッピングされなかったリード
[d] Pair endによるシークエンスで得られた両端のシークエンスをそれぞれ表した

Table 3-3 Duplication除去後に残ったリードの割合

エリシター未処理 1st experiment ChIP DNA

	Read1[c]	Read2[c]	Total
Unique hit[a]	73%	73%	73%
Multi hit[b]	64%	63%	63%

エリシター未処理 1st experiment Input DNA

	Read1[c]	Read[c]	Total
Unique hit[a]	68%	69%	68%
Multi hit[b]	98%	95%	97%

エリシター未処理 2nd experiment ChIP DNA

	Read1[c]	Read2[c]	Total
Unique hit[a]	76%	76%	76%
Multi hit[b]	64%	63%	64%

エリシター未処理 2nd experiment Input DNA

	Read1[c]	Read2[c]	Total
Unique hit[a]	70%	69%	69%
Multi hit[b]	76%	69%	73%

エリシター処理後6時間 1st experiment ChIP DNA

	Read1[c]	Read2[c]	Total
Unique hit[a]	76%	76%	76%
Multi hit[b]	66%	64%	65%

エリシター処理後6時間 1st experiment Input DNA

	Read1[c]	Read2[c]	Total
Unique hit[a]	78%	78%	78%
Multi hit[b]	86%	75%	81%

エリシター処理後6時間 2nd experiment ChIP DNA

	Read1[c]	Read2[c]	Total
Unique hit[a]	82%	82%	82%
Multi hit[b]	73%	72%	73%

エリシター処理後6時間 2nd experiment Input DNA

	Read1[c]	Read2[c]	Total
Unique hit[a]	93%	92%	92%
Multi hit[b]	91%	89%	90%

[a] イネゲノムに1箇所にマッピングされたリード

[b] イネゲノムに2箇所以上にマッピングされたリード

[c] Pair endによるシークエンスで得られた両端のシークエンスをそれぞれ表した

インメントを用いた。以後の解析に用いたアラインメントの数を Table 3-4 に示す。

Table 3-4　結合領域の同定に用いたアラインメントの数

	Input DNA	ChIP DNA
エリシター未処理 1st experiment	5,849,796	6,860,423
エリシター未処理 2nd experiment	3,170,605	4,644,959
エリシター処理後 6 時間 1st experiment	7,527,227	6,283,600
エリシター処理後 6 時間 2nd experiment	6,906,377	4,527,796

3-3-5　ChIP-seq 解析のデータの再現性の確認

以後の解析は Partek Genomics Suite 6.5 および Microsoft Office Excel を用いて行った。まず、2 連のデータを比較するとともに、エリシター未処理時および処理時のデータを比較することにした。データの比較は、イネゲノムを 2000 bp ごとに区切り、その後各データにおいて、それぞれのセグメントに含まれるリード数を用いて scatter plot を描くとともに、それぞれの組み合わせにおける相関係数（ピアソンの積率相関係数）を計算することにより行った(Fig. 3-10)。Fig. 3-11 に scatter plot および相関係数を示した。エリシター未処理時および処理時ともに、1 連目と 2 連目のサンプルにおいて強い相関が見られた(Fig. 3-11)。このことから、ChIP-seq 解析において再現性の高いデータが得られていると考えられる。次に、エリシター未処理時と処理時のデータを比較すると、どのデータの組み合わせにおいても、強い相関が見られた(Fig. 3-11)。これらの組み合わせにおける相関係数は、1 連目と 2 連目の比較における相関係数と同等の数値を示したことから、エリシター処理によって ChIP-seq のデータはほとんど変化しなかったと考えられる。

3-3-6　OsTGAP1 結合領域の同定

Partek Genomics Suite 6.5 を用いて、ChIP DNA において Input DNA と比較して有意に濃縮されているピークの検出を行った。用いたパラメーターは以下の通りである。

Window Size: 100, Peak Cut off FDR < 0.001, Strand separation FDR < 0.05

ChIP vs Input significant with FDR < 0.05, Peaks in ChIP, Peaks not in Input

それぞれのサンプルから得られたピークの数は以下の通りである。

	ピークの数
エリシター未処理 1st experiment	3,760
エリシター未処理 2nd experiment	3,522
エリシター処理後 6 時間 1st experiment	4,817
エリシター処理後 6 時間 2nd experiment	3,447

エリシター未処理および処理後のデータそれぞれについて、1 連目・2 連目において共通に検出されたピークを、エリシター未処理時および処理後 6 時間の OsTGAP1 の結合領域と

した。その結果、エリシター未処理時において 2,763 箇所を、エリシター処理後 6 時間において 2,777 箇所を、それぞれ OsTGAP1 の結合領域として同定した(Fig. 3-12)。さらに、エリシター未処理時およびエリシター処理後 6 時間の OsTGAP1 の結合領域を比較したところ、2,003 箇所 (約 75%)が共通していた(Fig. 3-12)。このこととエリシター未処理時と処理時の ChIP-seq のデータが強い相関を示したことから、エリシター処理によって OsTGAP1 の結合領域は大きくは変化しないと考えられた。本研究において同定した OsTGAP1 の結合領域を補表 1 および補表 2 に示した。

OsTGAP1 の結合領域と遺伝子領域との位置関係を解析した。エリシター未処理時およびエリシター処理後 6 時間の OsTGAP1 の結合領域について結合領域の中心が、遺伝子領域内に存在するもの (gene region)、転写開始点上流 2 kbp 以内に存在するもの (upstream region)、転写終結点下流 2 kbp 以内に存在するもの (downstream region)、これら 3 つのどれにも属さないもの (intergenic region)の 4 種類に分別した。解析の結果、エリシター未処理時・処理時のどちらについても、intergenic region への結合が約 40%、upstream region への結合が約 30%、downstream region への結合が約 20%、gene region への結合が約 10%の割合で見られた(Fig. 3-13)。さらに、upstream region および downstream region における OsTGAP1 の結合領域について、遺伝子領域との距離をヒストグラムとして表した。その結果、OsTGAP1 の結合は転写開始点上流 500 bp 以内に集中していることが明らかになった(Fig. 3-13)。これらの転写開始点近傍の領域に OsTGAP1 が結合し、下流遺伝子の転写制御を行っていると予想されるが、OsTGAP1 の結合領域は intergenic region においても多く見出されており、これらの結合が OsTGAP1 の機能においてどのような意味を持つのかは興味深い。

3-3-7　OsTGAP1 結合領域におけるコンセンサス配列

同定した OsTGAP1 の結合領域において濃縮されているコンセンサス配列を Partek Genomics Suite 6.5 を用いて解析した。 解析においては、6 から 16 bp の配列を探索した。

解析の結果、得られたコンセンサス配列を Fig. 3-14 に示す。エリシター未処理時および処理時どちらのデータにおいても TGACGT を含む配列がコンセンサス配列として得られた。OsTGAP1 の属する group D の bZIP 型転写因子は TGACG motif (TGACG(T/G))という配列を認識し、DNA に結合することが知られている(Jakoby et al., 2002)。しかし、この結果から、OsTGAP1 は TGACG motif の中でも TGACGT という配列を認識し、DNA に結合すると考えられる。また、以前に行われたゲルシフトアッセイの結果から、OsTGAP1 は *OsKSL4* 上流域の TGACGT 配列を認識して、DNA に結合することが明らかになっており、これは今回の結果と一致する。さらに、OsTGAP1 の結合領域において、TGACGT 配列がどのような位置に分布しているかを解析した。結合領域の中心から 5’側・3’側のそれぞれ 1000 bp の領域について、50 bp ごとに区切り、各 50 bp に存在する TGACGT 配列の数をヒストグラムで表した。その結果、TGACGT 配列が OsTGAP1 結合領域の中心に集中して存在することが明らかになった(Fig. 3-14)。このことから、今回得られた結合領域については、OsTGAP1 が TGACGT 配列を認識し DNA に結合したと考えられた。

また、イネゲノム中において TGACGT 配列は多数存在しているが、OsTGAP1 は全ての

TGACGT 配列には結合していなかった。このことから、TGACGT の配列以外にも OsTGAP1 の結合位置の認識に寄与している要素があると考えられる。TGACGT 配列の周辺配列には、TGACGT 配列の 2 塩基前にグアニン(G)が存在する確率が高かった(Fig. 3-14)。この G が OsTGAP1 の結合位置の認識において何らかの意味を持っている可能性が考えられる。しかし、この事実だけでは OsTGAP1 の結合位置の認識機構を説明できない。OsTGAP1 の結合位置の認識に関与するその他の因子としては、クロマチン構造の違いや相互作用タンパク質の存在が考えられ、OsTGAP1 の DNA 結合様式を理解するためには、今後の解析が必要であると考えられる。

3-3-8　OsTGAP1 標的候補遺伝子の同定

本論文では、以下の 2 つの条件を満たす遺伝子を OsTGAP1 標的候補遺伝子とした。

①OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp 以内に結合している遺伝子

②エリシター処理後 0, 6, 24 時間の少なくとも 1 つの経時点で野生型株と比較して OsTGAP1 過剰発現株において発現量が変動する遺伝子

①については、ChIP-seq 解析の結果から転写開始点上流 2 kbp 以内に OsTGAP1 が結合する遺伝子を探索したところ、エリシター未処理時のデータから 1,183 遺伝子が、エリシター処理時のデータから 1,180 遺伝子が同定された。

②については、第 2 章において行ったトランスクリプトーム解析の結果を用いて、遺伝子の探索を行った。第 2 章の結果から、エリシター処理後 0, ,6 24 時間の少なくとも 1 つの経時点で野生型株と比較して OsTGAP1 過剰発現株において発現量が上昇する遺伝子が 2,268 遺伝子存在し、OsTGAP1 過剰発現株において発現量が低下する遺伝子が 2,276 遺伝子存在することが明らかになっている。

①と②のどちらの条件にも当てはまる遺伝子を探索したところ、エリシター未処理時に OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp 以内に結合している遺伝子のうち、OsTGAP1 過剰発現株において 136 遺伝子の発現量が上昇し、72 遺伝子の発現量が低下することが明らかになった(Fig. 3-15)。エリシター処理時に OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp 以内に結合している遺伝子については、OsTGAP1 過剰発現株において 145 遺伝子の発現量が上昇し、77 遺伝子の発現量が低下することが明らかになった(Fig. 3-15)。さらに、これらの遺伝子を重ね合わせたところ、エリシター未処理時もしくは処理時に OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp 以内に結合していて、かつ OsTGAP1 過剰発現株において発現量が上昇する遺伝子は 161 遺伝子存在していた(Fig. 3-15 および Table 3-5)。また、エリシター未処理時もしくは処理時に OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp 以内に結合していて、かつ OsTGAP1 過剰発現株において発現量が低下する遺伝子は 88 遺伝子存在していた(Fig. 3-15 および Table 3-6)。トランスクリプトーム解析の結果から同定された OsTGAP1 下流遺伝子のうち、上流域への OsTGAP1 の結合が観察された遺伝子は 10%未満であった。上流域への OsTGAP1 の結合が見られなかった遺伝子については、OsTGAP1 により直接転写制御を受けるのではなく、OsTGAP1 により発現が誘導された転写因子により転写制御を受けるなどの間接的な制御を受けていると

Table 3-5 OsTGAP1過剰発現株で発現が上昇していた標的候補遺伝子

							Fold change[e]				
Gene ID	Chr. No.	Start[a]	End[b]	Description	E- binding[c]	E+ binding[d]	WT 6h / WT 0 h	WT 24 h/ WT 0 h	OX 0 h/ WT 0 h	OX 6 h/ WT 6 h	OX 24 h/ WT 24 h
Os01g0133200	1	1837282	1838194	Conserved hypothetical protein.	Yes	No	0.07	0.53	0.90	**4.52**	0.93
Os01g0160100	1	3135320	3139217	Pyruvate decarboxylase isozyme 2 (EC 4.1.1.1) (PDC) (Fragment).	Yes	Yes	**2.69**	**2.25**	**2.44**	1.39	1.35
Os01g0176000	1	3916918	3919432	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.	Yes	Yes	0.87	1.84	**3.28**	**2.08**	1.12
Os01g0179600	1	4152189	4153643	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.	Yes	No	0.34	1.49	**2.19**	1.23	1.15
Os01g0186900	1	4645434	4647130	Hypothetical protein.	Yes	Yes	1.09	1.92	**2.09**	2.00	0.99
Os01g0190500	1	4825590	4827733	IQ calmodulin-binding region domain containing protein.	Yes	Yes	0.50	0.66	1.95	**3.03**	**2.09**
Os01g0191800	1	4908990	4912696	Serine/threonine-protein kinase 12 (EC 2.7.1.37) (Aurora-B) (Fragment).	Yes	Yes	0.13	0.67	1.17	**2.44**	1.20
Os01g0209500	1	5944633	5953315	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif) domain containing protein.	Yes	No	0.93	0.97	**2.47**	**2.42**	**2.65**
Os01g0217100	1	6393270	6394665	Conserved hypothetical protein.	No	Yes	0.61	0.51	1.23	1.58	**2.16**
Os01g0241400	1	7816704	7817394	Glutaredoxin domain containing protein.	Yes	Yes	1.12	1.30	**2.09**	1.43	1.63
Os01g0730400	1	30459290	30461373	Hypothetical protein.	No	Yes	1.36	0.93	**2.95**	**4.46**	**3.82**
Os01g0803200	1	34026417	34028182	Cysteine proteinase inhibitor-I (Oryzacystatin-I).	Yes	Yes	**2.49**	**3.79**	**2.53**	**2.12**	1.63
Os01g0839100	1	35994501	35995360	Zn-finger, C2H2 type domain containing protein.	No	Yes	**4.83**	**5.30**	**4.46**	**3.06**	1.32
Os01g0915200	1	39869717	39870502	Cystatin.	Yes	Yes	**3.21**	1.06	**44.98**	**27.66**	**29.06**
Os01g0929200	1	40779336	40781249	Protein kinase domain containing protein.	Yes	No	1.39	0.99	1.70	1.36	**2.10**
Os01g0935400	1	41049644	41051168	2OG-Fe(II) oxygenase domain containing protein.	Yes	Yes	0.68	1.69	**2.97**	**3.50**	1.87
Os01g0945100	1	41541475	41543708	Amino acid/polyamine transporter I family protein.	Yes	Yes	**2.62**	1.76	1.79	1.92	**2.34**
Os01g0955100	1	42066551	42067225	Regulator of gene silencing.	No	Yes	1.19	**2.12**	1.62	**3.37**	0.76
Os01g0969300	1	44526544	44523761	Hypothetical gene.	Yes	Yes	0.99	1.15	1.60	**2.69**	1.83
Os02g0108700	2	487511	488525	Hypothetical protein.	Yes	Yes	1.45	1.16	1.66	**2.20**	**2.87**
Os02g0131000	2	1610886	1611567	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.86	1.07	**2.37**	1.50	**2.91**
Os02g0188000	2	4888508	4890269	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.	Yes	No	0.88	**2.24**	**2.82**	1.30	1.19
Os02g0193600	2	5209231	5212359	Conserved hypothetical protein.	Yes	No	0.06	0.61	1.38	**5.33**	1.23
Os02g0202700	2	5748604	5749500	Serine acetyltransferase.	Yes	Yes	**6.69**	0.85	**2.10**	0.42	**2.01**
Os02g0204400	2	5835517	5838694	6-4 photolyase.	Yes	No	0.41	1.35	**2.72**	**4.25**	1.97
Os02g0205500	2	5930298	5933077	Naringenin-chalcone synthase family protein.	No	Yes	**5.47**	**5.86**	**2.69**	**3.37**	1.15
Os02g0209300	2	6145213	6145778	Non-protein coding transcript, unclassifiable transcript.	Yes	Yes	**3.40**	**3.07**	**2.98**	**3.05**	1.41
Os02g0216300	2	6507974	6523686	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.71	1.74	**2.01**	1.39	1.11
Os02g0258200	2	8934291	8935321	HMG1/2 (high mobility group) box family protein.	Yes	Yes	0.08	0.64	1.63	**5.43**	1.62
Os02g0466400	2	15797625	15798933	Inositol phosphate kinase.	Yes	Yes	**4.98**	1.40	**3.01**	1.44	**2.71**
Os02g0484200	2	16801943	16803731	Transferase family protein.	Yes	Yes	1.30	**2.88**	**4.74**	**2.69**	1.78
Os02g0506500	2	18138910	18149636	UBA/THIF-type NAD/FAD binding fold domain containing protein.	Yes	Yes	1.06	1.16	1.53	1.84	**2.21**
Os02g0571300	2	21872974	21882985	Terpene synthase-like domain containing protein.	Yes	No	1.20	1.29	1.02	1.57	**4.82**
Os02g0575000	2	22084359	22084985	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.35	**2.43**	**5.47**	**2.16**	1.44
Os02g0637000	2	25557975	25560386	Barwin-related endoglucanase domain containing protein.	Yes	Yes	**8.23**	**3.58**	**12.10**	**4.24**	**6.66**
Os02g0705400	2	29131935	29135663	Pathogen induced protein 2-4.	Yes	Yes	1.85	**2.84**	**2.06**	1.83	0.85
Os02g0724100	2	30117665	30118673	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.00	0.62	1.41	1.91	**3.06**
Os02g0753800	2	31716697	31718931	Annexin p34.	No	Yes	1.95	1.41	**6.92**	**3.38**	**3.16**
Os02g0766600	2	32292364	32293734	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.33	1.40	**2.90**	**2.73**	**2.26**
Os02g0770800	2	32532237	32535648	Nitrate reductase [NAD(P)H] (EC 1.7.1.2).	Yes	Yes	0.39	0.52	**2.98**	**3.29**	**3.40**
Os02g0803600	2	34282476	34284256	Synaptobrevin family protein.	Yes	Yes	1.23	1.16	1.08	**2.12**	1.67
Os02g0812500	2	34812738	34815128	Cyclin-like F-box domain containing protein.	Yes	Yes	1.56	1.81	**2.95**	**5.91**	**4.61**
Os02g0813300	2	34852378	34854475	Cyclin-like F-box domain containing protein.	Yes	No	1.14	1.08	**2.23**	1.65	1.63

Os03g0119100	3	1007273	1011123	Phospholipase D beta 2.	Yes	Yes	1.04	1.00	1.00	1.82	**2.22**
Os03g0155000	3	2992994	2994347	Hypothetical gene.	Yes	Yes	1.65	1.68	**2.43**	**2.25**	1.81
Os03g0159600	3	3166283	3167723	Rab28 protein.	Yes	Yes	1.50	1.28	**2.95**	**3.45**	**4.16**
Os03g0283100	3	9682330	9685026	Glutathione S-transferase, C-terminal domain containing protein.	Yes	Yes	1.84	**3.07**	**6.89**	**3.05**	**2.89**
Os03g0287100	3	9874737	9877114	Phosphatidylinositol transfer protein family protein.	Yes	Yes	1.65	**2.23**	**2.18**	1.22	1.18
Os03g0610900	3	22869627	22872037	Protein kinase, 41K (EC 2.7.1.-).	No	Yes	0.74	0.65	**2.57**	**3.38**	**3.51**
Os03g0802500	3	33268877	33270729	AAA ATPase, central region domain containing protein.	Yes	Yes	**2.05**	**3.31**	**2.70**	1.46	0.74
Os03g0820300	3	34210766	34211616	ZPT2-14.	Yes	Yes	1.43	**3.14**	**7.04**	**3.52**	1.00
Os03g0820400	3	34214290	34214984	ZPT2-13.	Yes	Yes	1.35	**2.46**	**4.20**	**3.54**	1.03
Os03g0838500	3	35028259	35029097	Proteinase inhibitor I9, subtilisin propeptide domain containing protein.	Yes	Yes	0.53	1.11	1.46	**3.44**	1.04
Os03g0848200	3	35450546	35453342	Phytase.	Yes	Yes	1.85	1.51	**5.27**	**4.89**	**6.41**
Os04g0149400	4	3402902	3403644	Hypothetical protein.	Yes	Yes	1.81	**2.48**	**9.16**	**4.35**	**2.17**
Os04g0451700	4	22505579	22506166	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**2.42**	1.17	**2.32**	**2.25**	1.96
Os04g0475600	4	23770925	23772863	2OG-Fe(II) oxygenase domain containing protein.	Yes	Yes	0.79	1.24	**2.64**	1.65	1.54
Os04g0524500	4	26210148	26214091	Oligopeptide transporter OPT superfamily protein.	Yes	Yes	**2.33**	**4.51**	**2.45**	**2.39**	1.03
Os04g0531400	4	26546189	26548455	Receptor like protein kinase.	Yes	Yes	1.00	1.43	1.78	**2.27**	1.50
Os04g0531500	4	26549690	26552142	Protein kinase family protein.	Yes	Yes	1.60	1.70	**2.02**	**2.13**	1.68
Os04g0573900	4	28865735	28868006	Cytochrome P450-like protein.	Yes	Yes	**2.78**	**2.27**	**5.66**	**3.29**	**4.24**
Os04g0676400	4	34569032	34571233	Conserved hypothetical protein.	Yes	No	0.47	1.33	1.75	**2.22**	1.76
Os04g0677300	4	34632782	34633889	Harpin-induced 1 domain containing protein.	Yes	Yes	**12.30**	**9.50**	**4.27**	**2.33**	1.69
Os04g0679400	4	34729500	34731232	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**2.96**	0.97	**3.39**	**2.26**	**3.26**
Os05g0119200	5	937141	938769	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**4.61**	**5.98**	**4.95**	**2.31**	1.16
Os05g0128900	5	1634848	1637283	Trehalose-phosphatase domain containing protein.	Yes	No	1.01	0.59	1.65	1.99	**2.18**
Os05g0142600	5	2410587	2410832	Hypothetical protein.	No	Yes	**2.00**	**2.94**	**3.17**	**2.27**	0.97
Os05g0145100	5	2545049	2545867	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**4.01**	**2.23**	**3.47**	0.94	1.32
Os05g0198200	5	6004240	6004656	Glutaredoxin domain containing protein.	Yes	Yes	1.61	**2.45**	**5.54**	**2.59**	**2.31**
Os05g0321900	5	14977974	14982160	DNA-binding WRKY domain containing protein.	Yes	Yes	1.86	1.04	1.00	**4.35**	0.65
Os05g0322900	5	14858124	14860269	WRKY transcription factor 45.	Yes	Yes	**6.21**	**6.87**	**2.01**	0.25	0.14
Os05g0368000	5	17526545	17529486	Conserved hypothetical protein.	No	Yes	**6.84**	**3.44**	**2.37**	0.87	0.58
Os05g0368700	5	17577758	17578882	Subtilase family protein.	No	Yes	1.00	1.00	**14.81**	**6.58**	**15.42**
Os05g0438600	5	21350418	21351315	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (EC 3.1.3.11) (D-fructose-1,6- bisphospha	Yes	Yes	0.93	1.63	**4.20**	1.63	1.64
Os05g0442400	5	21509038	21510235	Transcription factor MYBS3.	No	Yes	**10.31**	1.00	1.00	**3.13**	1.69
Os05g0494200	5	24135326	24136538	Cysteine proteinase inhibitor-II (Oryzacystatin-II).	Yes	Yes	0.71	**2.30**	**2.09**	1.44	0.60
Os05g0495900	5	24226027	24229471	Beta-1,3-glucanase precursor (Fragment).	Yes	Yes	**11.24**	**4.00**	**3.03**	**3.79**	**3.25**
Os05g0522600	5	25822006	25825497	Leucine-rich repeat, plant specific containing protein.	Yes	Yes	**3.32**	**2.72**	**2.35**	1.97	1.75
Os05g0560100	5	27659742	27662516	Protein of unknown function DUF315 domain containing protein.	Yes	Yes	1.36	0.94	1.42	**7.92**	**3.15**
Os05g0560200	5	27663415	27664086	Hypothetical protein.	Yes	Yes	1.36	1.29	**3.41**	**2.88**	**2.80**
Os05g0563900	5	27847502	27848243	Non-protein coding transcript, uncharacterized transcript.	Yes	Yes	**3.10**	**2.18**	**4.99**	**3.57**	**2.16**
Os05g0571200	5	28251476	28252724	WRKY transcription factor 19.	Yes	Yes	0.49	1.31	0.43	**5.50**	0.22
Os05g0576600	5	28489994	28490915	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**12.76**	**6.78**	**4.05**	1.78	1.90
Os05g0588700	5	29097324	29104548	Paired amphipathic helix repeat containing protein.	Yes	Yes	0.93	1.09	1.85	1.38	**2.31**
Os06g0127800	6	1464501	1467584	GRAS transcription factor domain containing protein.	Yes	Yes	0.08	0.86	1.29	**5.11**	1.28
Os06g0132600	6	1753344	1759876	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.45	0.59	1.44	**2.09**	1.80
Os06g0133500	6	1784498	1784770	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**3.41**	**2.76**	**3.23**	**3.83**	1.40
Os06g0216300	6	5928935	5930502	Oxo-phytodienoic acid reductase (12-oxophytodienoic acid reductase).	Yes	Yes	**3.67**	**2.76**	**3.07**	1.50	1.25
Os06g0275800	6	9406954	9409884	Amino acid/polyamine transporter II family protein.	Yes	Yes	**3.82**	**2.90**	**2.32**	1.24	1.47
Os06g0320000	6	12274721	12275240	Eukaryotic protein of unknown function DUF953 family protein.	Yes	Yes	0.66	1.05	**3.71**	**2.85**	**2.44**
Os06g0323100	6	12447621	12449437	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase.	Yes	Yes	**2.93**	**10.92**	**5.46**	1.04	**2.26**

Os06g0335900	6	13218393	13233205	Xyloglucan endotransglycosylase XET2 (Fragment).	Yes	No	1.00	1.00	**5.54**	**10.20**	**4.90**
Os06g0555900	6	20837086	20837784	Non-protein coding transcript, putative npRNA.	Yes	Yes	**2.09**	1.05	1.84	1.53	**2.06**
Os06g0566300	6	21477073	21484055	Zinc transporter ZIP family protein.	Yes	Yes	1.19	0.74	1.45	**2.12**	**2.70**
Os06g0574700	6	21970457	21971158	Non-protein coding transcript, unclassifiable transcript.	Yes	Yes	1.07	1.23	1.53	**2.26**	1.82
Os06g0675600	6	27653916	27658228	GRAB2 protein.	Yes	Yes	**4.18**	**3.59**	**4.97**	**2.03**	2.00
Os06g0683900	6	28111625	28113678	Hypothetical protein.	Yes	Yes	0.07	0.64	1.39	**5.26**	1.54
Os06g0696500	6	28753584	28755597	Xyloglucan endo-transglycosylase precursor.	Yes	Yes	0.14	0.31	0.95	**2.55**	1.92
Os07g0112600	7	696413	697927	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.98	0.88	1.14	1.48	**2.05**
Os07g0154100	7	2902838	2904981	Viviparous-14.	Yes	Yes	1.00	1.00	**2.77**	**5.98**	**4.74**
Os07g0168600	7	3700989	3704408	Glycoside hydrolase, family 17 protein.	Yes	Yes	1.04	1.01	**2.92**	1.93	1.87
Os07g0186000	7	4606471	4608381	Thioredoxin H-type (TRX-H) (Phloem sap 13 kDa protein-1).	Yes	Yes	1.82	1.88	**3.17**	**2.36**	**2.03**
Os07g0190000	7	4853359	4856817	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 precursor.	Yes	Yes	**84.01**	**46.59**	**5.48**	1.18	**2.80**
Os07g0410300	7	12772781	12773738	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**2.82**	1.20	**2.04**	**2.96**	**2.33**
Os07g0418500	7	13270352	13272663	Cytochrome P450.	Yes	Yes	1.43	**4.46**	**3.80**	1.98	0.91
Os07g0421300	7	13481192	13495119	Glycoside hydrolase, family 31 protein.	No	Yes	**3.46**	1.11	**4.38**	1.90	**3.39**
Os07g0456900	7	15845852	15848567	No apical meristem (NAM) protein domain containing protein.	Yes	No	0.14	0.64	1.71	**4.07**	**2.56**
Os07g0481300	7	17470508	17474517	Disease resistance protein family protein.	Yes	Yes	1.80	1.48	**2.17**	1.86	1.77
Os07g0529000	7	20637552	20639942	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1) (Isocitrase) (Isocitratase) (ICL).	Yes	Yes	0.96	0.90	**18.04**	**5.57**	**23.60**
Os07g0550600	7	21801148	21803313	Transferase family protein.	Yes	Yes	1.06	0.53	**4.15**	**39.80**	**9.05**
Os07g0569100	7	22835739	22837360	Remorin, C-terminal region domain containing protein.	Yes	No	1.76	1.37	**3.32**	1.82	1.82
Os07g0584100	7	23624284	23626340	MAP kinase-like protein.	Yes	Yes	**3.89**	**2.41**	**2.09**	1.30	1.18
Os07g0614000	7	25233961	25236551	Strictosidine synthase family protein.	No	Yes	1.17	1.42	1.02	0.36	**2.07**
Os07g0631300	7	26134583	26136368	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.95	1.70	**2.29**	1.78	1.65
Os07g0633400	7	26234394	26237485	IQ calmodulin-binding region domain containing protein.	Yes	Yes	0.18	0.49	0.91	**2.76**	1.15
Os07g0638400	7	26498096	26499398	Peroxiredoxin (Rehydrin homolog) (B15C).	Yes	Yes	**2.25**	**2.24**	**3.16**	1.66	0.94
Os07g0663600	7	27942376	27943647	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR family protein.	Yes	Yes	**19.58**	**12.33**	**10.25**	**2.23**	**4.35**
Os07g0690900	7	29329163	29331444	Phytochelatin synthetase-like conserved region family protein.	Yes	Yes	1.25	**2.14**	1.36	**2.08**	0.56
Os08g0126300	8	1519066	1522847	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment).	Yes	Yes	1.08	1.33	**2.03**	1.73	1.53
Os08g0159500	8	3454421	3457414	Zinc-finger protein Lsd1.	Yes	Yes	1.24	1.21	**2.92**	**2.45**	1.94
Os08g0185900	8	5028491	5029381	Ubiquitin domain containing protein.	Yes	Yes	1.03	1.34	**3.08**	**2.80**	1.34
Os08g0249000	8	9092142	9093535	Zn-finger, B-box domain containing protein.	Yes	Yes	**4.86**	**2.07**	**2.52**	1.26	1.17
Os08g0332100	8	14681672	14688292	Hypothetical protein.	Yes	Yes	**2.89**	1.53	**4.13**	**3.52**	**6.16**
Os08g0406500	8	19428817	19430229	MATH domain containing protein.	Yes	Yes	0.80	**2.45**	**3.37**	**3.03**	**2.45**
Os08g0469500	8	23070388	23072188	Hypothetical protein.	Yes	Yes	0.18	0.73	1.56	**3.15**	1.68
Os08g0508700	8	25204276	25207479	ETHYLENE-INSENSITIVE3-like 3 protein.	Yes	Yes	1.18	1.10	**2.03**	1.76	**2.09**
Os09g0243200	9	3182097	3182795	Zn-finger, RING domain containing protein.	Yes	Yes	**7.02**	1.89	**2.60**	1.39	1.72
Os09g0332700	9	9917723	9926499	PDR-type ABC transporter 2 (Fragment).	Yes	Yes	1.24	1.78	**2.87**	1.51	1.07
Os09g0365900	9	11976529	11981310	L-ascorbate oxidase precursor (EC 1.10.3.3) (Ascorbase) (ASO).	No	Yes	**3.87**	1.78	**3.01**	**2.38**	1.99
Os09g0417600	9	14921546	14923078	DNA-binding WRKY domain containing protein.	Yes	Yes	**8.61**	**6.42**	**2.19**	0.20	0.28
Os09g0425500	9	15376202	15376719	Non-protein coding transcript, unclassifiable transcript.	Yes	Yes	**2.30**	0.83	**2.70**	**2.64**	**3.01**
Os09g0483800	9	18506258	18506639	Hypothetical protein.	Yes	Yes	**2.73**	**2.38**	**2.21**	**2.26**	1.12
Os09g0484900	9	18546866	18549778	Sodium-dicarboxylate cotransporter-like.	No	Yes	**9.22**	**6.03**	1.79	**2.76**	**2.78**
Os09g0511600	9	19587584	19593058	Glycoside hydrolase, family 1 protein.	No	Yes	1.57	1.88	**2.31**	1.64	1.35
Os09g0535500	9	20755152	20756043	Zn-finger, RING domain containing protein.	Yes	Yes	0.39	0.84	**9.49**	**7.88**	**6.11**
Os10g0112100	10	803843	805317	Uncharacterized Cys-rich domain containing protein.	Yes	Yes	**3.41**	**5.06**	**2.42**	1.73	0.81
Os10g0154500	10	3372952	3380223	Protein kinase domain containing protein.	Yes	Yes	0.30	0.70	1.01	**2.43**	1.45
Os10g0157400	10	3619292	3620580	Serine/threonine protein kinase domain containing protein.	Yes	Yes	0.51	0.70	1.88	**3.37**	**2.14**
Os10g0189600	10	5859343	5864500	Aminotransferase, class I and II domain containing protein.	Yes	Yes	**5.72**	1.85	1.21	**2.19**	**2.43**

Os10g0348900	10	10024635	10029508	Hypothetical protein.	No	Yes	**5.57**	1.25	**4.78**	0.69	**2.45**
Os10g0415300	10	13991537	13994616	Glutathione reductase (EC 1.6.4.2) (Fragment).	No	Yes	0.53	0.93	**2.00**	**2.12**	1.51
Os10g0481300	10	17631077	17634473	Glutathione S-transferase GSTU31 (Fragment).	No	Yes	1.29	1.63	**2.88**	0.72	1.54
Os10g0513900	10	19291085	19292872	E-class P450, group I family protein.	No	Yes	2.00	**3.13**	**2.48**	1.41	1.14
Os10g0515900	10	19362225	19364095	E-class P450, group I family protein.	No	Yes	**266.24**	**21.02**	**39.41**	**3.97**	**30.02**
Os10g0519800	10	19579212	19580878	Cyclin-like F-box domain containing protein.	No	Yes	1.05	1.00	1.27	**3.21**	1.26
Os10g0550500	10	21075104	21080317	Pectinacetylesterase.	Yes	Yes	0.67	0.70	**2.98**	0.71	**2.69**
Os11g0135000	11	1627767	1632692	Major facilitator superfamily antiporter.	Yes	Yes	0.44	0.81	**3.09**	**3.34**	**2.99**
Os11g0140600	11	1861987	1865030	Calcium-binding EF-hand domain containing protein.	Yes	Yes	1.45	1.06	1.88	**2.04**	1.63
Os11g0245100	11	7793036	7795733	Similar to Glutathione S-transferase 2.	Yes	Yes	1.37	1.13	**2.60**	1.43	1.79
Os11g0445300	11	14159674	14162516	Protein kinase domain containing protein.	No	Yes	0.80	1.06	**3.92**	**3.74**	**3.33**
Os11g0506800	11	17472120	17483136	IQ calmodulin-binding region domain containing protein.	Yes	Yes	0.98	1.92	**4.00**	**2.36**	1.43
Os11g0558400	11	19919224	19922304	Leucine-rich repeat, plant specific containing protein.	Yes	Yes	1.55	1.02	**2.43**	**2.58**	**2.07**
Os11g0599200	11	22072143	22074000	Hypothetical protein.	Yes	Yes	**4.04**	1.21	1.05	**2.58**	1.51
Os11g0605500	11	22500411	22504217	Acyl-CoA oxidase.	Yes	Yes	**4.12**	**2.99**	**4.93**	**2.04**	**2.43**
Os11g0696900	11	27884947	27887193	Laccase (EC 1.10.3.2).	No	Yes	**2.04**	1.28	**3.36**	**2.63**	**2.63**
Os12g0181500	12	4119933	4121861	Amino acid carrier (Fragment).	Yes	Yes	0.97	1.26	**3.67**	**5.77**	**3.74**
Os12g0278700	12	10416689	10424849	Cystinosin homolog.	No	Yes	1.91	1.40	**2.14**	1.16	**2.35**
Os12g0440300	12	14680703	14683594	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	**2.50**	1.47	**4.02**	1.07	1.83
Os12g0599800	12	25268470	25269425	Hypothetical protein.	Yes	Yes	0.41	0.74	1.54	**2.48**	**2.01**
Os12g0614600	12	26088777	26090536	Protein kinase domain containing protein.	Yes	No	1.15	1.19	**3.92**	**3.77**	**4.30**
Os12g0639500	12	27462557	27463612	Conserved hypothetical protein.	Yes	No	**5.08**	**5.58**	**3.26**	1.75	1.72

[a]各遺伝子の転写開始点
[b]各遺伝子の転写終結点
[c]エリシター未処理時に上流域にOsTGAP1が結合している遺伝子を"Yes"、結合していない遺伝子を"No"
[d]エリシター処理時に上流域にOsTGAP1が結合している遺伝子を"Yes"、結合していない遺伝子を"No"
[e]OsTGAP1過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析におけるfold changeを示し、2以上のものを赤字で示した。

Table 3-6 OsTGAP1過剰発現株で発現が低下していた標的候補遺伝子

							Fold change[e]				
Gene ID	Chr. No.	Start[a]	End[b]	Description	E- binding[c]	E+ binding[d]	WT 6h / WT 0 h	WT 24 h/ WT 0 h	OX 0 h/ WT 0 h	OX 6 h/ WT 6 h	OX 24 h/ WT 24 h
Os01g0136700	1	1970228	1974465	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.95	1.01	0.97	0.63	0.50
Os01g0138400	1	2052583	2056636	Receptor protein kinase-like protein.	Yes	Yes	7.37	3.68	0.38	0.83	0.28
Os01g0194600	1	5084833	5085504	Glutaredoxin domain containing protein.	Yes	Yes	1.75	1.81	0.70	0.52	0.46
Os01g0508500	1	17794375	17795113	Hypothetical protein.	Yes	Yes	6.07	2.17	0.95	0.17	0.21
Os01g0888800	1	38630679	38631444	Conserved hypothetical protein.	No	Yes	4.54	2.18	0.21	0.44	0.37
Os02g0177600	2	4280499	4285926	4-coumarate--CoA ligase 1 (EC 6.2.1.12) (4CL 1) (4-coumaroyl-CoA synthase 1).	Yes	Yes	4.14	1.96	0.50	1.14	0.48
Os02g0202700	2	5748604	5749500	Serine acetyltransferase.	Yes	Yes	6.69	0.85	2.10	0.42	2.01
Os02g0211200	2	6207784	6211310	Protein kinase domain containing protein.	Yes	No	2.21	2.76	0.26	1.04	0.29
Os02g0262800	2	9257096	9261712	NBS-LRR protein (Fragment).	Yes	No	1.34	1.41	0.35	0.25	0.27
Os02g0318100	2	12644719	12646777	Alternative oxidase 1a (Fragment).	Yes	No	0.87	1.67	1.01	0.59	0.35
Os02g0596000	2	23146318	23149291	Rhodanese-like domain containing protein.	Yes	No	0.29	0.63	0.50	0.75	0.64
Os02g0707900	2	29277058	29283990	Universal stress protein (Usp) family protein.	Yes	Yes	2.63	0.91	0.91	0.50	0.88
Os02g0725900	2	30209978	30210974	Transcription factor CBF/NF-Y/archaeal histone domain containing protein.	Yes	No	0.64	0.83	0.65	0.30	0.44
Os02g0744900	2	31264718	31267294	Geranylgeranyl hydrogenase.	Yes	No	0.26	0.77	0.23	0.28	0.31
Os02g0791400	2	33626138	33628200	Cytochrome oxidase c, subunit VIb family protein.	No	Yes	1.52	2.96	0.96	0.87	0.50
Os03g0122300	3	1215143	1224615	Flavanone 3-hydroxylase-like protein.	Yes	Yes	1.52	1.11	1.07	0.50	0.58
Os03g0129400	3	1646929	1647580	Hypothetical protein.	Yes	Yes	0.95	0.79	0.39	0.41	0.45
Os03g0140300	3	2204892	2206826	Hypothetical protein.	Yes	Yes	2.52	1.83	0.81	0.49	1.36
Os03g0146100	3	2544595	2546433	Tonoplast intrinsic protein (Tonoplast water channel).	No	Yes	0.57	1.18	0.56	0.32	0.29
Os03g0154000	3	2943533	2946082	Aromatic-ring hydroxylase family protein.	Yes	Yes	0.27	1.22	0.49	0.53	0.30
Os03g0180100	3	4181638	4182522	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.85	1.38	0.51	0.29	0.27
Os03g0183000	3	4330523	4332318	AP2 domain containing protein RAP2.6 (Fragment).	Yes	Yes	2.33	1.90	0.34	0.34	0.21
Os03g0196600	3	5025767	5032614	Serine acetyltransferase (EC 2.3.1.30).	Yes	Yes	0.56	1.50	0.92	1.27	0.38
Os03g0285300	3	9880682	9881181	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	3.65	2.55	0.52	0.43	0.32
Os03g0335200	3	12364463	12366777	WRKY DNA binding protein.	Yes	Yes	1.12	2.70	0.40	0.62	0.10
Os03g0371000	3	14392482	14395004	Cytochrome P450.	Yes	No	2.66	1.01	0.51	0.20	0.45
Os03g0667100	3	26064666	26072185	BTB/POZ domain containing protein.	Yes	Yes	4.37	4.56	1.64	0.43	0.40
Os03g0785900	3	32405830	32406792	Glutathione S-transferase GST 19 (EC 2.5.1.18).	Yes	Yes	1.09	1.73	0.41	0.32	0.26
Os03g0793800	3	32809602	32810528	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor domain containing protein.	No	Yes	0.69	1.59	0.07	0.44	0.18
Os03g0853200	3	35708958	35710033	CD9/CD37/CD63 antigen family protein.	Yes	Yes	1.48	1.82	1.06	0.42	0.13
Os04g0556500	4	27821874	27823592	Cis-zeatin O-glucosyltransferase.	Yes	Yes	1.75	1.81	0.57	0.24	0.43
Os04g0581100	4	29312661	29314354	Isopenicillin N synthase family protein.	Yes	Yes	35.16	24.95	1.88	0.27	0.44
Os04g0598900	4	30249084	30251712	Wall-associated kinase-like protein.	Yes	Yes	3.74	1.55	0.40	0.23	0.50
Os04g0627300	4	31966790	31967557	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.08	0.52	0.09	0.94	0.10
Os04g0650700	4	33195437	33198410	L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase).	Yes	No	1.53	1.14	0.40	0.70	0.65
Os04g0671900	4	34312283	34319651	Auxin response factor 8.	Yes	Yes	0.84	0.72	0.49	0.48	0.50
Os05g0183100	5	4940591	4941908	WRKY transcription factor 67.	No	Yes	13.37	4.55	0.41	0.21	0.18
Os05g0228000	5	7675086	7680610	Purine and other phosphorylases, family 1 protein.	No	Yes	17.57	5.58	0.35	0.41	0.50
Os05g0322900	5	14858124	14860269	WRKY transcription factor 45.	Yes	Yes	3.02	2.21	1.49	0.46	0.44
Os05g0366600	5	17450728	17456256	Glycoside hydrolase, family 1 protein.	Yes	Yes	1.99	2.85	0.67	0.42	0.38
Os05g0421600	5	20534332	20535914	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.09	1.51	0.41	0.30	0.35
Os05g0480400	5	23461642	23467194	Protein kinase domain containing protein.	Yes	Yes	0.38	0.64	0.47	0.59	0.56
Os05g0503500	5	24880632	24881078	Non-protein coding transcript.	Yes	Yes	0.75	1.13	0.56	0.59	0.40
Os05g0566200	5	27956251	27961491	NLI interacting factor domain containing protein.	Yes	Yes	0.82	0.87	0.44	0.51	0.51
Os05g0571200	5	28251476	28252724	WRKY transcription factor 19.	Yes	Yes	0.49	1.31	0.43	5.50	0.22
Os06g0154500	6	2805535	2811930	Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase 6).	Yes	Yes	1.17	0.91	0.53	0.43	0.54
Os06g0172800	6	3674787	3677587	Seed imbibition protein (Fragment).	Yes	Yes	2.59	1.54	0.54	0.46	0.55
Os06g0215600	6	5895385	5896958	Oxo-phytodienoic acid reductase (12-oxophytodienoic acid reductase).	No	Yes	2.91	1.69	0.54	0.50	0.49
Os06g0683000	6	28084331	28087501	Zn-finger, C2H2 type domain containing protein.	No	Yes	1.55	1.20	0.47	0.36	0.46
Os06g0687200	6	28269140	28270470	Zn-finger, RING domain containing protein.	Yes	Yes	0.33	1.13	0.77	0.60	0.48

Os07g0187900	7	4729389	4731683	Nodule-specific protein-like.	Yes	Yes	2.58	2.09	0.98	0.66	0.43
Os07g0412100	7	12862908	12870623	Granule-bound starch synthase I, chloroplast precursor (EC 2.4.1.21) (GBSS I).	Yes	Yes	0.35	0.62	0.48	0.73	0.59
Os07g0516300	7	19833770	19834704	Protein of unknown function DUF584 family protein.	Yes	Yes	2.30	0.99	0.37	0.65	0.55
Os07g0605400	7	24756070	24756774	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	0.86	2.01	1.36	0.73	0.50
Os07g0614000	7	25233961	25236551	Strictosidine synthase family protein.	No	Yes	1.17	1.42	1.02	0.36	2.07
Os07g0617100	7	25393012	25393530	Plant disease resistance response protein family protein.	Yes	Yes	0.31	1.03	0.68	0.83	0.41
Os07g0635500	7	26329004	26331062	Cytochrome P450.	Yes	Yes	0.88	2.86	1.41	1.62	0.44
Os07g0671400	7	28328979	28330545	Heavy metal transport/detoxification protein domain containing protein.	Yes	Yes	0.22	0.81	0.47	0.54	0.56
Os08g0109200	8	452186	454957	Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily protein.	Yes	No	1.34	1.18	0.77	0.48	0.52
Os08g0390700	8	18501541	18502077	2-oxoglutarate-dependent oxygenase.	Yes	Yes	10.25	9.84	1.11	0.66	0.47
Os08g0519400	8	25791897	25797092	Apolipoprotein A/E/C3 family protein.	Yes	Yes	0.91	1.15	0.82	0.90	0.28
Os09g0417600	9	14921546	14923078	DNA-binding WRKY domain containing protein.	Yes	Yes	4.89	3.69	1.56	0.30	0.36
Os09g0417800	9	14938292	14940237	DNA-binding WRKY domain containing protein.	Yes	Yes	16.96	10.98	0.38	0.05	0.05
Os09g0456900	9	17180075	17190125	Nucleic acid-binding OB-fold domain containing protein.	Yes	Yes	0.46	0.54	0.45	0.99	0.61
Os09g0457700	9	17248236	17249887	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.17	1.08	0.51	0.36	0.29
Os09g0484800	9	18538809	18541240	Pirin.	Yes	Yes	4.01	1.56	0.62	1.43	0.47
Os09g0492900	9	18797317	18797868	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.83	4.32	1.03	0.83	0.37
Os09g0493000	9	18802038	18802881	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	1.26	2.34	0.97	0.60	0.32
Os09g0509100	9	19454019	19455872	No apical meristem (NAM) protein domain containing protein.	Yes	Yes	0.25	1.14	0.14	0.23	0.23
Os10g0390600	10	12460734	12467202	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase family protein.	No	Yes	1.51	1.84	0.42	0.30	0.28
Os10g0469700	10	16850061	16851845	Leucine-rich repeat, cysteine-containing type containing protein.	No	Yes	1.76	2.09	0.70	0.77	0.44
Os10g0517500	10	19481965	19485444	Cys/Met metabolism pyridoxal-phosphate-dependent enzymes family protein.	No	Yes	6.99	1.35	0.29	0.14	0.45
Os10g0524400	10	19857858	19866923	Phospholipase D (EC 3.1.4.4).	No	Yes	3.18	1.08	0.87	0.49	0.74
Os10g0525500	10	19915480	19916476	Glutathione S-transferase.	No	Yes	1.09	1.02	0.55	0.47	0.40
Os10g0536400	10	20367233	20372935	Conserved hypothetical protein.	Yes	Yes	4.77	5.87	1.27	0.43	0.19
Os10g0539600	10	20508293	20513042	Protein kinase domain containing protein.	No	Yes	0.84	0.88	0.38	0.41	0.41
Os10g0575600	10	22390489	22396222	Homeobox domain containing protein.	Yes	Yes	0.19	0.43	0.32	0.33	0.31
Os11g0117500	11	786547	788033	DNA-binding WRKY domain containing protein.	Yes	No	47.05	7.46	0.55	0.17	0.23
Os11g0156600	11	2664557	2669222	TB2/DP1 and HVA22 related protein family protein.	Yes	Yes	2.30	3.76	0.79	0.65	0.31
Os11g0249000	11	7991777	7997326	Disease resistance protein family protein.	Yes	Yes	0.41	1.03	0.64	0.36	0.34
Os11g0672300	11	26291538	26293885	Hypothetical protein.	Yes	Yes	5.19	2.08	0.44	0.41	0.31
Os11g0684000	11	26793536	26796552	Myb, DNA-binding domain containing protein.	Yes	Yes	2.18	1.88	0.63	0.49	0.90
Os11g0687100	11	26952123	26958639	von Willebrand factor, type A domain containing protein.	Yes	Yes	1.07	4.30	0.20	0.09	0.29
Os11g0702400	11	28134987	28135830	Zn-finger, C2H2 type domain containing protein.	Yes	Yes	0.94	2.80	0.31	0.20	0.18
Os12g0116700	12	823302	833226	WRKY transcription factor 64.	Yes	Yes	29.18	6.16	0.68	0.17	0.24
Os12g0257700	12	8879972	8881420	Zinc finger, CCHC-type domain containing protein.	No	Yes	10.47	7.56	1.00	0.20	0.23
Os12g0568700	12	23432681	23433348	Protein of unknown function DUF588 family protein.	Yes	No	1.33	0.64	0.62	0.46	0.65
Os12g0583700	12	24271003	24272006	Zn-finger, C2H2 type domain containing protein.	Yes	Yes	7.91	4.38	0.53	0.50	0.31

[a]各遺伝子の転写開始点

[b]各遺伝子の転写終結点

[c]エリシター未処理時に上流域にOsTGAP1が結合している遺伝子を"Yes"、結合していない遺伝子を"No"

[d]エリシター処理時に上流域にOsTGAP1が結合している遺伝子を"Yes"、結合していない遺伝子を"No"

[e]OsTGAP1過剰発現株を用いたトランスクリプトーム解析におけるfold changeを示し、1/2以下のものを青字で示した。

考えられる。また、上流域に OsTGAP1 が結合している遺伝子のうち、OsTGAP1 過剰発現株において発現が変動していた遺伝子は約 20%しか存在しなかった。過去にシロイヌナズナにおいて、ChIP-seq 解析による転写因子の標的遺伝子の網羅的同定が数例行われているが(Kaufmann et al., 2009, Kaufmann et al 2010, Yant et al., 2010, Ouyang et al., 2011)、転写因子が上流域に結合している遺伝子の大多数が、その転写因子の変異株などにおいても発現量に変化が見られないことが報告されており、今回の ChIP-seq 解析と矛盾しない。このような遺伝子の上流域への OsTGAP1 の結合がどのような意味を持つのかについて今後解析していく必要がある。

過去に GAL4 DNA binding domain との融合タンパク質を用いたレポータージーンアッセイの結果から OsTGAP1 は転写活性化能を有することが明らかになっている(Okada et al., 2009)。今回の結果において、上流域に OsTGAP1 が結合している遺伝子のうちで、OsTGAP1 過剰発現株において発現量が上昇する遺伝子の数は発現量が低下する遺伝子の数よりも多かったことは、OsTGAP1 が転写活性化因子として働くという知見と一致していると考えられる。しかし、88 遺伝子が OsTGAP1 過剰発現株において発現量が低下しており、これらの遺伝子の転写制御に OsTGAP1 がどのように関与しているかは興味深い。

得られた OsTGAP1 標的候補遺伝子について予想される機能から分類を行った。機能分類においては、代謝関連酵素遺伝子 (metabolism)、防御応答に関連する遺伝子(defense response)、転写因子遺伝子(transcription factor)、プロテインキナーゼ遺伝子(protein kinase)、トランスポーター遺伝子(transporter)、機能未知(unknown)、その他の機能(other)に分類した。結果を Fig. 3-16 に示す。OsTGAP1 過剰発現株において発現量が上昇する遺伝子においては、代謝関連酵素遺伝子が多く含まれていた。これらのうちには、*OsOPR1* が含まれていた。*OsOPR1* はジャスモン酸生合成酵素である 12-oxo-phytodienoic acid reductase と相同性の高いタンパク質をコードしているが、ジャスモン酸生合成には関与しないことが明らかになっている(Sobajima et al., 2003)。*OsOPR1* 遺伝子領域周辺における OsTGAP1 の結合領域および野生型株と OsTGAP1 過剰発現株における *OsOPR1* のエリシター処理後の発現プロファイルを Fig. 3-17 に示す。*OsOPR1* は過去にプロモーター解析が行われており、ジャスモン酸応答性に必要なシスエレメントとして TGACGT 配列が同定されている(Sobajima et al., 2007)が、今回得られた *OsOPR1* の上流域における OsTGAP1 の結合領域のうち一方はこのジャスモン酸応答性シスエレメントを含んでいる。過去に我々の研究グループにおいて行われたイネ培養細胞を用いたジャスモン酸処理後の経時的なトランスクリプトーム解析(Miyamoto et al., 2012)において、*OsTGAP1* の発現はジャスモン酸によっても誘導されていた。このことから、ジャスモン酸応答的な *OsOPR1* の発現誘導に OsTGAP1 が関与している可能性も考えられる。

防御応答に関連する遺伝子には、proteinase inhibitor 遺伝子・chitinase 遺伝子・glucanase 遺伝子が含まれていた。このことから、OsTGAP1 がファイトアレキシン生合成の制御以外にも、これらの遺伝子の転写制御を介して、病虫害に対する抵抗性反応に関与していると考えられる。

OsTGAP1 過剰発現株において発現量が低下する遺伝子においては、転写因子遺伝子の割合が高かった。これらの中には特に WRKY 型転写因子をコードする遺伝子が多く含まれて

おり、*OsWRKY45* が存在した。*OsWRKY45* 遺伝子領域周辺における OsTGAP1 の結合領域および野生型株と OsTGAP1 過剰発現株における *OsWRKY45* のエリシター処理後の発現プロファイルを Fig. 3-18 に示す。OsWRKY45 はサリチル酸を介した防御応答において中心的な役割を担っており、いもち病菌や白葉枯病菌に対する抵抗性反応に関与することが報告されている(Shimono et al., 2007, Shimono et al., 2012)。今回、*OsWRKY45* を含む WRKY 型転写因子遺伝子が OsTGAP1 により負に転写制御を受けることが示唆された。このことから、イネの防御応答において WRKY 型転写因子を介したシグナル伝達経路と OsTGAP1 を介したシグナル伝達経路のクロストークが存在する可能性が考えられる。

3-3-9　ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子近傍における OsTGAP1 の結合

ChIP-seq 解析の結果から、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子近傍における OsTGAP1 の結合位置を解析した。まず、MEP 経路遺伝子について解析したところ、*OsDXS3* の転写開始点近傍にエリシター未処理時・処理時のどちらにおいても OsTGAP1 の結合領域が見出された(Fig. 3-19)。さらに、抗 OsTGAP1 抗体で免疫沈降を行った ChIP DNA において、*OsDXS3* の転写開始点近傍の領域が濃縮されていることが、ChIP-PCR により確認された(Fig. 3-19)。このことから、エリシター未処理時・処理時のどちらにおいてもこの領域に OsTGAP1 が結合していることが明らかになった。この領域の中央付近には TGACGT 配列が存在しており、OsTGAP1 がこの TGACGT 配列に結合し、*OsDXS3* の転写制御を行っていると考えられる。エリシター応答性を持たない *OsDXS1, OsDXS2* については近傍に OsTGAP1 の結合は見出されなかった(Fig. 3-20)。他の MEP 経路遺伝子(*OsDXR, OsCMS, OsCMK, OsMCS. OsHDS, OsHDR*)についても、近傍に OsTGAP1 の結合は見出されなかった(Fig. 3-21, 22, 23)。このことから、*OsDXR, OsCMS, OsCMK, OsMCS, OsHDS, OsHDR* のエリシター応答的な発現誘導には、OsTGAP1 が直接は関与していないと考えられる。しかし、これらの遺伝子は、OsTGAP1 過剰発現株における発現量がキチンエリシター処理後 24 時間後において野生型株と比較して上昇していたことから、OsTGAP1 の下流で間接的に転写制御を受けていると考えられる。

次に momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターにおける OsTGAP1 の結合領域を解析した。その結果、*CYP99A2* の転写開始点上流約 3 kbp に OsTGAP1 の結合が認められた(Fig. 3-24 中の①の結合領域)。また、*OsKSL4* 上流のエリシター応答性シスエレメント付近の領域は、3-3-3 で OsTGAP1 が結合することが示されているにも関わらず、3-3-6 の ChIP-seq 解析で設定した threshold では結合領域として同定されなかった。しかし、エリシター応答性シスエレメント付近にエリシター未処理時・処理時どちらにおいても微弱ながらピークが認められた(Fig. 3-25)。また、*OsCPS4* の転写開始点上流約 2.5 kbp にもエリシター未処理時・処理時どちらにおいても微弱なピークが認められた(Fig. 3-26)。さらに、抗 OsTGAP1 抗体で免疫沈降を行った ChIP DNA において、これらの領域が濃縮されていることが、ChIP-PCR により確認された(Fig. 3-27)。また、これらの領域の濃縮はエリシター未処理時・処理時どちらにおいても認められた(Fig. 3-27)。しかし、*CYP99A3, OsMAS* の上流域には OsTGAP1 の結合領域は認められなかった(Fig. 3-28)。このことから、OsTGAP1 は全ての momilactone 生合成酵素遺伝子の上流域それぞれに結合して転写制御を行っているのではなく、未知の制御機構が存

在することが示唆された。また、クラスター領域の外側において、OsTGAP1 の強い結合が認められ(Fig. 3-24 中の②の結合領域)、ChIP-PCR においても OsTGAP1 の結合が確認できた(Fig. 3-27)。この結合が momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターの転写制御においてどのような意味を持つのかは大変興味深く、今後解明すべき課題と考えている。

さらに、phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスターにおいても、phytocassane 生合成酵素遺伝子の上流域に OsTGAP1 の結合は見出されず、遺伝子間領域やクラスターの外側において、エリシター未処理時・処理時どちらにおいても OsTGAP1 の結合が認められた(Fig. 3-29)。このことから、OsTGAP1 は phytocassane 生合成酵素遺伝子についても、それぞれの遺伝子の上流域に結合して転写制御を行っているのではないと考えられる。

以上のように、ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成酵素遺伝子には上流域への OsTGAP1 の結合が見られる遺伝子と見られない遺伝子が存在した。また、momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターや phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスターにおいては、遺伝子間領域やクラスター領域の外側に OsTGAP1 の結合が見られた。これらのことは、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の上流域それぞれに結合して転写制御を行っているのではなく、未知の制御機構が存在することを示唆するものである。今後は、遺伝子間領域やクラスター領域の外側における OsTGAP1 の結合の意義の解明も含め、さらなる解析を行っていくことが必要である。

また、OsTGAP1 が上流域に結合しているジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子についてはエリシター未処理時・処理時どちらにおいても OsTGAP1 の結合が認められた。しかし、OsTGAP1 過剰発現株において、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現は微弱にしか誘導されず、エリシター処理によりその発現が顕著に誘導されることがわかっている。このことから、これらの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。