



Title	イネにおけるトレハロース誘導抵抗性に関する分子生物学的研究
Author(s)	手塚, 大介
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第13587号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13587
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/77117">http://hdl.handle.net/2115/77117</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Daisuke_Tezuka.pdf



[Instructions for use](#)

# イネにおけるトレハロース誘導抵抗性 に関する分子生物学的研究

北海道大学 大学院農学院  
共生基盤学専攻 博士後期課程  
手塚 大介

## 目 次

### 第 1 章 序論

第 1 節 トレハロースの化学特性	1
第 2 節 トレハロースの生合成と生理機能	3
第 3 節 植物におけるトレハロース生合成	6
第 4 節 植物におけるトレハロース生合成経路の役割	8
第 5 節 トレハロースに誘導される病害抵抗性	10
第 6 節 本研究の目的および概要	12

### 第 2 章 TSR における植物ホルモンシグナルの解析

第 1 節 緒論	20
第 2 節 実験材料および方法	22
第 1 項 植物材料	22
第 2 項 種子滅菌	22
第 3 項 水耕および土耕栽培	22
第 4 項 水耕栽培イネへの糖処理	23
第 5 項 土耕栽培イネへの糖処理	23
第 6 項 RNA 抽出・cDNA 合成	24
第 7 項 半定量的 RT-PCR	24
第 8 項 胞子懸濁液の調整	24
第 9 項 イネいもち病菌を用いた病害抵抗性試験	25

第 10 項 植物ホルモンの抽出	25
第 11 項 UPLC-MS/MS による植物ホルモンの分析	26
第 12 項 リアルタイム PCR	26
第 3 節 実験結果	27
第 1 項 トレハロース特異的に誘導される遺伝子発現	27
第 2 項 トレハロース特異的に誘導される病害抵抗性	27
第 3 項 抵抗性獲得組織における防御関連遺伝子の発現	28
第 4 項 地上部トレハロース処理による病害抵抗性の獲得	28
第 5 項 TSR における植物ホルモン内生量の変動	29
第 6 項 根部での遺伝子発現誘導における植物ホルモンの関与	30
第 7 項 地上部での病害抵抗性誘導における植物ホルモンの関与	31
第 4 節 考察	33

### 第 3 章 トレハロース蓄積量改変株における防御応答の解析

第 1 節 緒論	51
第 2 節 実験材料および方法	53
第 1 項 主な培地および試薬の組成	53
第 2 項 植物材料	57
第 3 項 ゲノム編集コンストラクトの作成	57
第 4 項 種子滅菌	58
第 5 項 形質転換イネの作出	58
第 6 項 ゲノム DNA 抽出	59

第 7 項 ゲノム PCR およびシークエンス解析	59
第 8 項 水耕栽培	60
第 9 項 RNA 抽出・cDNA 合成	60
第 10 項 半定量的 RT-PCR	60
第 11 項 NaCl 処理	60
第 12 項 トレハラーゼ活性測定	61
第 13 項 可溶糖の抽出	61
第 14 項 可溶性糖の測定	62
第 15 項 リアルタイム PCR	62
第 3 節 実験結果	63
第 1 項 <i>OsTRE1</i> 変異株の作出	63
第 2 項 <i>OsTRE1</i> 変異株における <i>OsTRE1</i> の発現	63
第 3 項 <i>OsTRE1</i> 変異株のトレハラーゼ活性	64
第 4 項 <i>OsTRE1</i> 変異株における可溶性糖の蓄積	64
第 5 項 トレハロース高蓄積による防御関遺伝子の発現変動	65
第 4 節 考察	67

#### 第 4 章 トレハロース誘導性転写因子 *OsERF83* の機能解析

第 1 節 緒論	78
第 2 節 実験材料および方法	80
第 1 項 植物材料	80
第 2 項 種子滅菌	80

第 3 項 水耕および土耕栽培	80
第 4 項 胞子懸濁液の調整	80
第 5 項 イネいもち病菌のスプレー接種	80
第 6 項 化合物処理	81
第 7 項 RNA 抽出・cDNA 合成	81
第 8 項 半定量的 RT-PCR	81
第 9 項 細胞内局在解析	82
第 10 項 Transactivation activity 試験	82
第 11 項 組換えタンパク質の調整	83
第 12 項 ゲルシフト試験	84
第 13 項 <i>OsERF83</i> 過剰発現株の作出	84
第 14 項 イネいもち病菌を用いた病害抵抗性試験	84
第 15 項 リアルタイム PCR	85
第 3 節 実験結果	86
第 1 項 <i>OsERF83</i> の発現プロファイル	86
第 2 項 植物ホルモンによる <i>OsERF83</i> の発現誘導	86
第 3 項 <i>OsERF83</i> の細胞内局在	87
第 4 項 <i>OsERF83</i> の転写活性化能	87
第 5 項 <i>OsERF83</i> の GCC ボックスへの結合	88
第 6 項 <i>OsERF83</i> 過剰発現株の病害抵抗性	89
第 7 項 <i>OsERF83</i> の下流遺伝子	89
第 4 節 考察	91

## 第5章 トレハロースに誘導されるファイトアレキシン生合成遺伝子の解析

第1節 緒論	104
第2節 実験材料および方法	106
第1項 植物材料	106
第2項 種子滅菌	106
第3項 水耕栽培	106
第4項 トレハロース処理およびMeJA処理	106
第5項 RNA抽出・cDNA合成	106
第6項 半定量的RT-PCR	106
第7項 リアルタイムPCR	107
第8項 5'- and 3'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	107
第9項 全長cDNAの增幅	107
第10項 組換え酵素を用いた機能解析	108
第11項 プロトプラストの調整およびPEGによる遺伝子導入	108
第12項 細胞内局在解析	109
第3節 実験結果	110
第1項 トレハロース処理による <i>KS/KSL</i> 遺伝子の発現誘導	110
第2項 JAによる <i>OsKSL2</i> の発現誘導	110
第3項 JA生合成変異株における <i>KSL</i> 遺伝子の発現誘導	111
第4項 <i>OsKSL2</i> の全長cDNAの単離	111
第5項 既知KSLsと <i>OsKSL2</i> のアミノ酸配列の比較	112
第6項 組換えタンパク質を用いた <i>OsKSL2</i> の機能解析	112

第 7 項 OsKSL2 の細胞内局在

113

第 4 節 考察

114

第 6 章 総括

129

謝辞

引用文献

## 略号

ADP	Adenosine diphosphate
AP2	APETARA 2
BLB	blacklight blue
Cas	CRISPR-associated
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DAMP	damage-associated molecular patterns
ERF	ethylene response factor
ET	ethylene
GA	giberelide
GC	gas chromatography
GFP	green fluorescent protein
GGDP	geranylgeranyl diphosphate
ISR	induced systemic resistance
JA	jasmonic acid
JA-Ile	JA-isoleucine
KS	kaurene synthase
KSL	KS-like
MeJA	methyl jasmonate
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry

NMD	nonsense-mediated mRNA decay
PA	phytoalexin
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PR	pathogenesis-related
RACE	rapid amplification of cDNA ends
SA	salicylic acid
SAG	SA-glucoside
SAR	systemic acquired resistance
SGE	SA glucose ester
Tre6P	trehalose 6-phosphate
TDM	trehalose-dimycolate
TP	transit peptide
TPP	trehalose-6-phosphate phosphatase
TPS	trehalose-6-phosphate synthase
TSR	trehalose-induced systemic resistance
UDP	uridine diphosphate
WSR	wound-induced systemic resistance

## 第1章 序論

### 第1節 トレハロースの化学特性

トレハロースはグルコース2分子が $\alpha 1\text{-}1\alpha$ 結合した非還元性の二糖であり、天然の二糖としてはスクロースに次いで存在量が多い。微生物が多量に生産する糖として知られ、パンやビール、きのこなどの食品中に多く含まれる。また水和性等の優れた性質を利用して化粧品の添加物や、移植用臓器の保護液など医薬品としても用いられる。

トレハロースを形作る $\alpha 1\text{-}1\alpha$ グリコシド結合は、結合まわりの自由回転が出来ず、気相中 (Dowd et al., 1992; French et al., 2002) および水相中 (Kuttel et al., 2005; Peric-Hasselner et al., 2010)において、ただ一つのコンフォメーションをとる (Fig. 1-1A)。二糖を形成するグリコシド結合の多くは、複数のコンフォメーションを持つことが示されており (Peric-Hasselner et al., 2010)，コンフォメーションの单一性・剛直性はトレハロースが持つ特徴の一つである。トレハロースは、コンフォメーションが单一であること、また全てのOH基がエカルチリアル配向であることから、OH基と水分子が安定した水素結合ネットワークを形成する (Fig. 1-1B) (Choi et al., 2006)。そのためトレハロースは、スクロースやマルトースと比較して、より強固に水分子と相互作用する (Sakurai et al., 1997; Lerbret et al., 2005; Lerbret et al., 2005-2)。一方でトレハロースには、水分子と相互作用する面の反対側に、水和殻を持たない疎水ポケットが存在することも示されている (Choi et al., 2006)。従ってトレハロースは親水基だけ

でなく疎水基とも相互作用する、両親媒性分子として振る舞うと考えられる。実際にトレハロースは $-C=C-$ 二重結合と CH-O 型もしくは OH-π 型の弱い水素結合を介して安定な複合体を形成することが示されており (Oku et al., 2003 and 2005), 不飽和脂肪酸やベンゼンと複合体を形成することが明らかになっている (Fig. 1-1C) (Oku et al., 2003; Sakakura et al., 2011).

この様にトレハロースはその特徴的なコンフォメーションにより、他の糖には見られない化学特性を有する。これはトレハロースの生体中での生理機能を理解する上で重要な知見である。

## 第2節 トレハロースの生合成と生理機能

トレハロースは細菌、真菌、昆虫、無脊椎動物など多様な生物種に存在し、その生合成経路も広く保存されている。トレハロースの生合成経路はいくつか知られるが、最も普遍的に存在するのは TPS-TPP 経路である（今井、2011）。この経路では、グルコース 6-リン酸と UDP-グルコースを出発物質として、生合成中間体であるトレハロース 6-リン酸（trehalose 6-phosphate, Tre6P）の脱リン酸化反応を経てトレハロースが合成される。それぞれの反応は、Tre6P シンターゼ（trehalose-6-phosphate synthase, TPS）および Tre6P ホスファターゼ（trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP）により触媒される（Fig. 1-2）。またトレハロースはトレハラーゼ（trehalase, TRE）によって、2 分子のグルコースに加水分解される（Fig. 1-2）。大腸菌、出芽酵母、昆虫などでは、トレハロース生合成経路がもつ生理機能について詳細に解析されており、トレハロースがその特異的な物性から、ストレス保護物質として利用されることが示されている。

大腸菌の TPS と TPP は、それぞれ *otsA* と *otsB* にコードされ 1 つのオペロンを形成している（Giaever et al., 1988; Kaasen et al., 1994）。*otsA* と *otsB* の発現は、高浸透圧や低温等のストレス環境下および定常期に誘導され（Dinnbier et al., 1988; Hengge-Aronis et al., 1991; Kandror et al., 2002; Styrvold and Strom, 1991），それぞれの欠損変異株は、浸透圧ストレス感受性を示す（Giaever et al., 1988）。また出芽酵母の TPS と TPP はそれぞれ *TPS1* と *TPS2* にコードされる。出芽酵母のトレハロース生合成酵素は、酵素活性を担う *TPS1* と *TPS2*，

ならびに調節を担う TPS3 と TLS1 の 4 つのサブユニットからなる複合体を形成する (Bell et al., 1998). トレハロースを生産できない  $\Delta tps2$  株は、高温条件で野生株に比べて著しく生育が抑制される (De Virgilio et al., 1993; Reinders et al., 1997). これはトレハロースがタンパク質を熱変性から保護する機能を持つためであると考えられている (Singer and Lindquist, 1998). また Tre6P を生産できない  $\Delta tps1$  株は、グルコース存在下での生育が抑制される (Blázquez et al., 1993). Tre6P はヘキソキナーゼ II の活性を阻害することが報告されており (Blázquez et al., 1993), Tre6P による解糖系の制御機構が示唆されている (Thevelein and Hohmann, 1995). 昆虫においてもトレハロースは重要な機能を担っている. トレハロースは昆虫の血糖として利用されており、エネルギー代謝の中核において恒常的な役割を担っている. また熱帯アフリカに生息するネムリュスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) の幼虫は、体の水分がほとんど失われても水を添加することで生命活動を再開する. このような脱水による可逆的な代謝停止状態はクリプトビオシスと呼ばれ、細胞に蓄積されたトレハロースがガラス化することで、細胞膜とタンパク質が安定的に保護されることで生じる (Watanabe et al., 2002 and 2003).

マイコバクテリアやコリネ型細菌は、生体膜の構成成分として、糖脂質であるトレハロースジミコレート (trehalose-dimycolate, TDM) を利用する (Lederer, 1976). TDM は結核菌のコードファクターとして知られ、TDM を投与したマウスやウサギは急性炎症や肺胞肉芽腫形成などを引き起こす (Miyake et al., 2013). 近年 TDM の受容体がマウスから単離され、その認識には TDM 中のトレハロース基が不可欠であることが示されている (Ishikawa

et al., 2009; Miyake et al., 2013). また植物共生菌である根粒菌や菌根菌では、共生部位に高濃度のトレハロースを蓄積する (Brodmann et al., 2002). トレハロース生合成能を失った根粒菌は植物との共生が成立しないことも報告されている (Sugawara et al., 2010). 以上の知見から、ヒト-微生物、植物-微生物の相互作用においてもトレハロースが重要な役割を果たしていると考えられる.

### 第3節 植物におけるトレハロース生合成

高等植物では内生トレハロースの検出が困難であったことから、長らくトレハロース生合成能は否定されてきた (Eastmond and Graham, 2003). しかし1990年台後半に、モデル植物であるシロイヌナズナからトレハロース生合成遺伝子 (*AtTPS1*, *AtTPPA*, *AtTPPB*) が相次いで単離されたことをきっかけに (Blázquez et al., 1998; Vogel et al., 2001), トレハロース生合成経路の存在が明らかにされた。現在ではゲノム情報を基に、シロイヌナズナにおいて 11 種の TPS ホモログと 10 種の TPP ホモログが、イネにおいて 11 種の TPS ホモログと 9 種の TPP ホモログが見出されている (Fig. 1-3A). これらのタンパク質は比較的類似したアミノ酸配列を有しており、3 つのサブファミリー (Class I, Class II, Class III) に分類される (Fig. 1-3B) (Vandesteeene et al., 2010).

Class I には *AtTPS1-AtTPS4*, *OsTPS1* が分類される。Class I 型の TPS は、N 末端側に TPS ドメインを持ち、C 末端側に活性を持たない TPP ドメインを持つ。酵母を用いた相補試験等から、*AtTPS1*, *AtTPS2*, *AtTPS4*, および *OsTPS1* は TPS 活性を持つタンパク質であることが示されている (Blázquez et al., 1998; Delorge et al., 2015; Zang et al., 2011).

Class II には *AtTPS5-AtTPS11*, *OsTPS2-OsTPS11* が分類される。Class II 型の TPS は、N 末端側と C 末端側にそれぞれ機能欠失型の TPS ドメインと TPP 様ドメインを持っている。そのため、これらのタンパク質は TPS 活性および TPP 活性のいずれをも持たない (Zang et al., 2011; Ramon et al., 2009). またイネにおいては Class II 型 TPS が、Class II 型あるいは Class I 型の TPS と相互作

用することが示されており、Class I型 TPS の触媒反応を調節する機能があるのではないかと考えられている (Zang et al., 2011).

シロイヌナズナとイネに見出される TPP ホモログは、全て Class III に分類される。これらは N 末端側に TPS ドメインを持たず、TPP ドメインのみを持つ。酵母の相補試験や組換えタンパク質の活性試験から、AtTPPA-AtTPPJ, OsTPP1-OsTPP2 が、機能型のタンパク質であることが示されている (Vandesteeene et al., 2012; Pramanik et al., 2005; Shima et al., 2007).

モデル植物以外の植物種においてもゲノム情報の拡充に伴い、次々とトレハロース合成酵素が見出されている。そのため現在では高等植物におけるトレハロース生合成は普遍的なものとして考えられている。

#### 第4節 植物におけるトレハロース生合成経路の役割

植物におけるトレハロース生合成遺伝子の発見以降、欠損変異株や過剰発現株を用いたトレハロース生合成経路の機能解析が進んでいる。シロイヌナズナにおいては、*AtTPS1* の欠損変異株が胚性致死になることが示され (Eastmond et al., 2002)，トレハロース生合成経路が胚の成熟に必須であることが明らかにされているほか、*AtTPS1* のノックダウン株では、花成の遅延が観察される (Wahl et al., 2013)。ゲノム上の *AtTPS6* 領域に点変異を持ち、機能欠失型の *AtTPS6* を持つ *cell shape phenotype-1* 変異株は、表皮細胞の形態異常、気孔密度の上昇、およびトライコーム分枝数の低下などの表現型を示す (Chary et al., 2007)。そのため、*AtTPS6* は細胞形態の制御に関わると考えられる。これらの知見はトレハロース生合成経路が、植物の形態形成に重要な役割を持つことを示している。一方でトレハロース生合成遺伝子の発現が、種々のストレスにより誘導されることも示されている (Iordachescu and Imai, 2008)。高温誘導性の *AtTPS5* は、同じく高温に誘導される転写共役因子 MBF1c と複合体を形成することが報告されており、*AtTPS5* の欠損変異株は高温感受性を示す (Suzuki et al., 2008)。塩ストレスで誘導される葉緑体型 TPP である *AtTPPD* は、塩ストレス下での糖代謝を制御し、欠損変異株では塩ストレス感受性を、過剰発現株では塩ストレス耐性を示す (Krasensky et al., 2014)。トレハラーゼをコードする *AtTRE1* はアブシシン酸による気孔開閉の制御に関わり、過剰発現株は乾燥耐性を獲得する (Van Houtte et al., 2013)。従ってトレハロース生合成経路は、シロイヌナズナのストレス応答にも寄与すると考えられる。またシロイヌ

ナズナに外部からトレハロースを処理すると、ADP-グルコースピロホスホリラーゼ大サブユニットをコードする *ApL3* の発現が強く誘導される (Fritzius et al., 2001; Wingler et al., 2000). これはトレハロースが植物において、何らかのシグナル物質として機能する可能性を示唆している。

イネにおいては、トレハロース生合成経路とストレス応答の関係について詳細に研究されている。*OsTPS1* の過剰発現株が低温、乾燥、塩、または浸透圧ストレスに対する耐性を獲得するほか (Li et al., 2011), Class II型の TPS である *OsTPS2*, *OsTPS4*, *OsTPS5*, *OsTPS8*, および *OsTPS9* の過剰発現株も、低温ストレスと塩ストレスに対して耐性を獲得する (Deng et al., 2011). また *OsTPP1* と *OsTPP2* は低温、乾燥、塩ストレスに誘導され (Pramanik et al., 2005; Shima et al., 2007), *OsTPP1* の過剰発現株は塩ストレスと低温ストレスに対する耐性を獲得する (Ge et al., 2008).

これらの知見から、トレハロース生合成経路は植物における生長、形態形成、およびストレス応答に深く関与すると考えられる。

## 第5節 トレハロースにより誘導される病害抵抗性

トレハロース生合成経路が植物の生長やストレス応答に重要な役割をもつことが示されている。しかしトレハロース生合成経路が、どのようにしてこれらを制御するかについては不明な点が多い。トレハロース生合成の中間体である *Tre6P* は、*SnRK1* の活性を負に制御することが明らかにされている (Zhang et al., 2009)。*SnRK1* は酵母の *SNF1*、哺乳類の *AMPK* と類似した Ser/Thr キナーゼであり、糖代謝制御に関与する (Hardie, 2007; Polge and Thomas, 2006)。またシロイヌナズナでは、*Tre6P* の蓄積量がグルコース、フルクトース、およびスクロースの蓄積量と正の相関関係にあることが示されている (Yadav et al., 2014)。そのため、*Tre6P* は糖代謝を制御するシグナル物質である可能性が考えられる。

一方で、トレハロースがシグナル物質として機能する可能性も示されている。農業・食品産業技術総合研究機構の今井らは、イネ根部へのトレハロース処理により、根部でジャスモン酸 (jasmonic acid, JA) 生合成酵素、病害関連転写因子、感染特異的タンパク質 (pathogenesis-related protein, PR protein)、およびファイトアレキシン (phytoalexin, PA) 生合成酵素などをコードする防御関連遺伝子の発現が誘導されることを示している (Fig. 1-4) (今井ら、未発表データ)。また根部にトレハロースを処理されたイネの地上部では、トレハロースの濃度および処理日数に依存してイネいもち病抵抗性も誘導される (Fig. 1-5, 1-6) (今井ら、未発表データ)。従ってイネでは、根部へのトレハロース処理が、根部および地上部の病害抵抗性を誘導すると考えられる。トレハロースによって

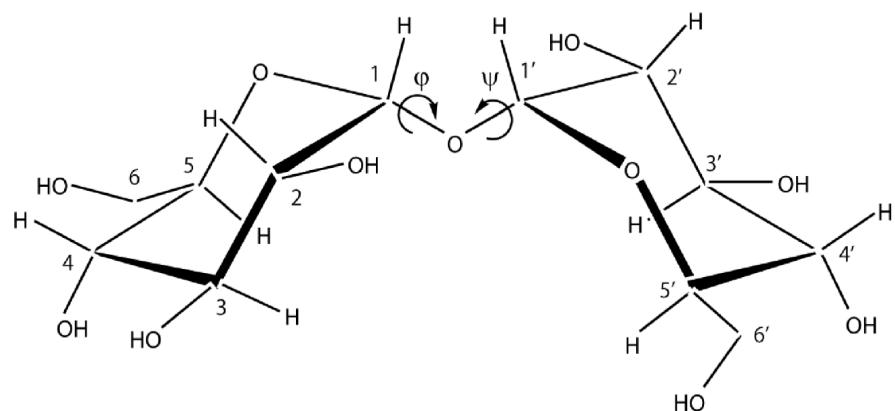
全身に病害抵抗性が誘導されるこの現象は、Trehalose-induced systemic resistance (TSR)と称される (Fig. 1-7).

## 第 6 節 本研究の目的および概要

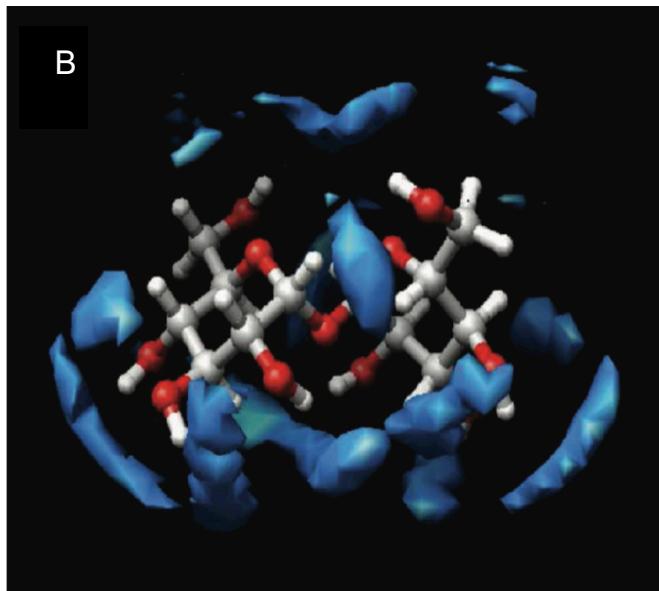
TSR はトレハロースという自然界に普遍的に存在する二糖が、植物の防御応答を誘導する現象である。これは植物において、トレハロースがシグナル物質として機能する可能性を示している。そのため TSR を理解することで、植物におけるトレハロースの生理機能について新たな知見が得られると期待される。本研究では TSR の分子機構を明らかにすることを目的に、TSR のシグナル伝達機構と、TSR の誘起様式について解析を行った。

第 2 章ではシグナル伝達機構を植物ホルモンに着目して解析した。トレハロース処理後のホルモン内生量を定量するとともに、植物ホルモン蓄積欠損株を用いて TSR を観察することで、TSR における植物ホルモンの関与を評価した。第 3 章では、トレハロースが TSR を誘起する様式について検討した。トレハロースの細胞内蓄積が TSR を誘起すると予想し、ゲノム編集により作出了したトレハロース高蓄積株において、TSR 様の現象が観察されるかを調べた。第 4 章では、TSR における JA シグナルの役割について、より詳細な解析を行った。トレハロース処理で JA 依存的に誘導される転写因子遺伝子 *OsERF83* について、過剰発現株を用いた機能解析を行った。*OsERF83* に制御される下流遺伝子を決定することで、TSR における JA 依存的なシグナル伝達経路の解明を目指した。第 5 章では、TSR における PA 生合成遺伝子群の発現誘導が JA シグナルに制御されるかを解析した。またトレハロースに誘導される新たな抗菌化合物合成酵素 *OsKSL2* についての機能解析も行った。

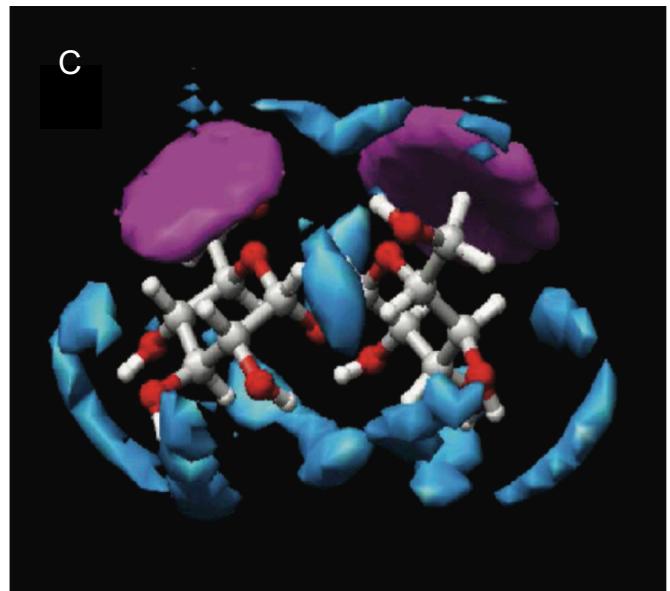
A



B



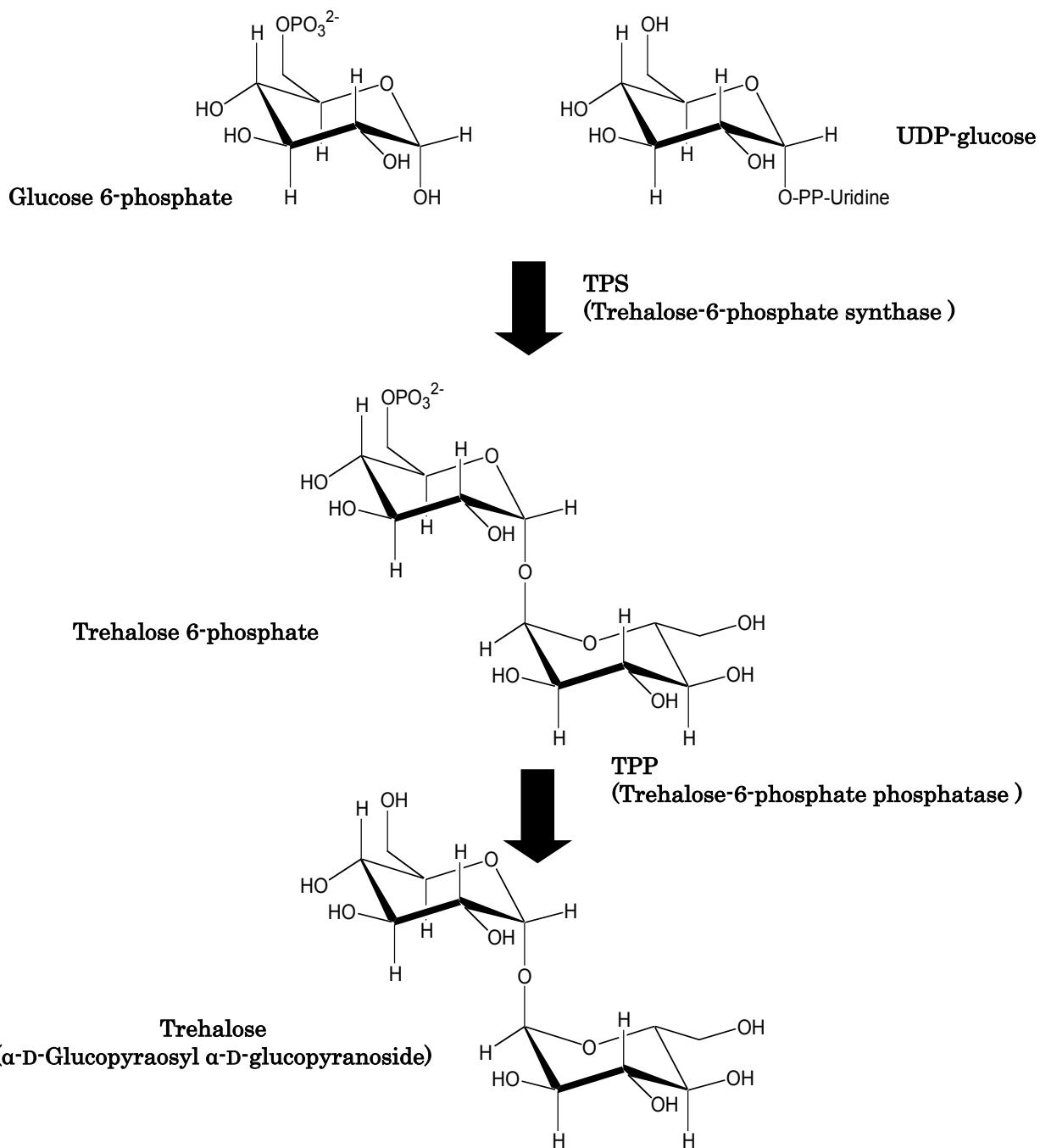
C



(Sakakura et al. 2011)

**Fig. 1-1. Theoretical study on the intermolecular complex formation of trehalose**

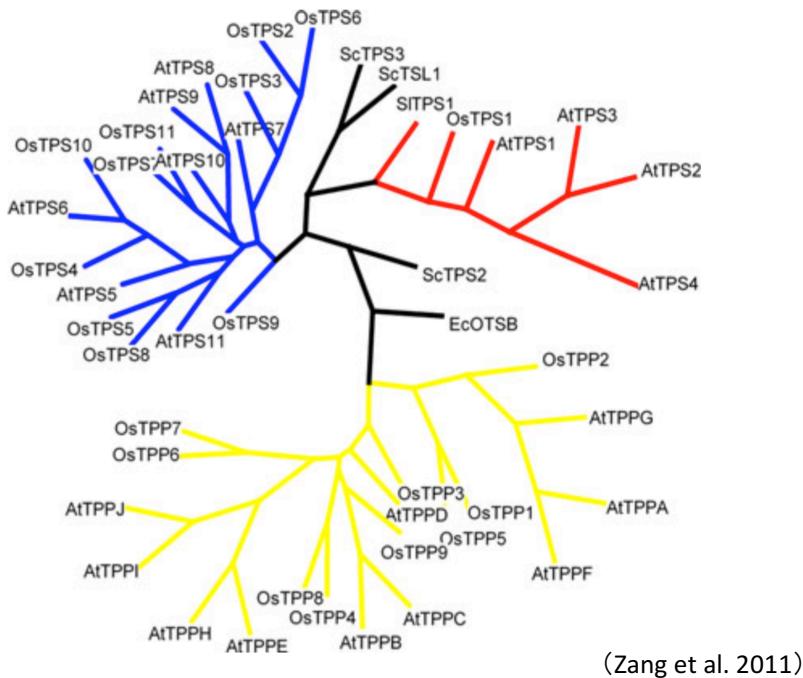
(A) Structure of trehalose. (B) Distribution of water molecules around trehalose. Cloud-like regions represent iso-probability surface of water oxygen atoms. (C) Superimposition of iso-probability surface of benzene on (B). Purple cloud-like regions represent iso-probability surface of benzene.



**Fig. 1-2. Trehalose biosynthesis pathway**

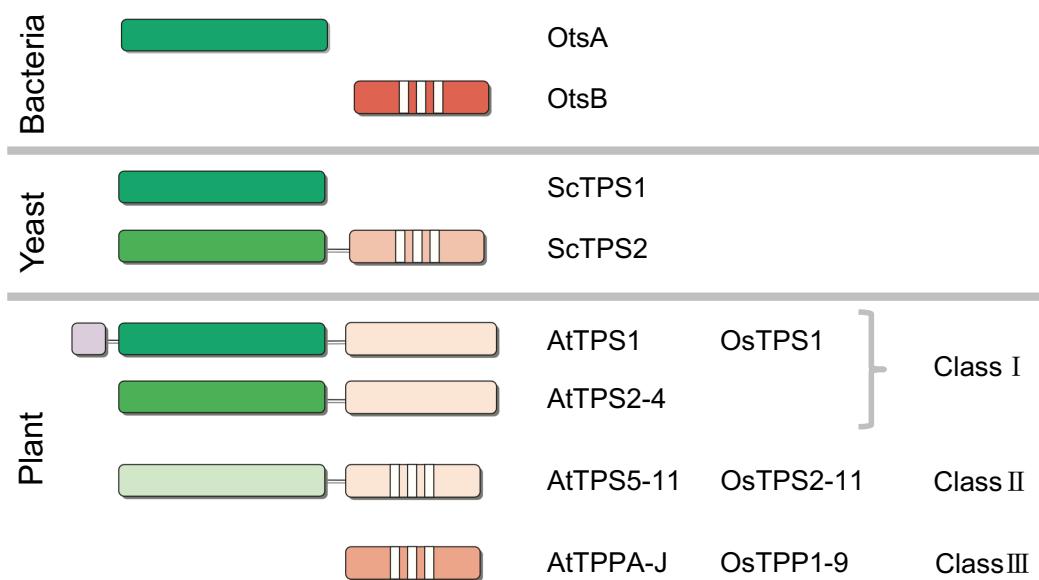
Trehalose 6-phosphate (Tre6P) is synthesized from UDP-glucose (the glucosyl donor) and glucose 6-phosphate (the acceptor) and subsequently converted to trehalose. These reactions are catalyzed by Tre6P synthase (TPS) and Tre6P phosphatase (TPP), respectively.

A



(Zang et al. 2011)

B



(Vandesteeene et al. 2010)

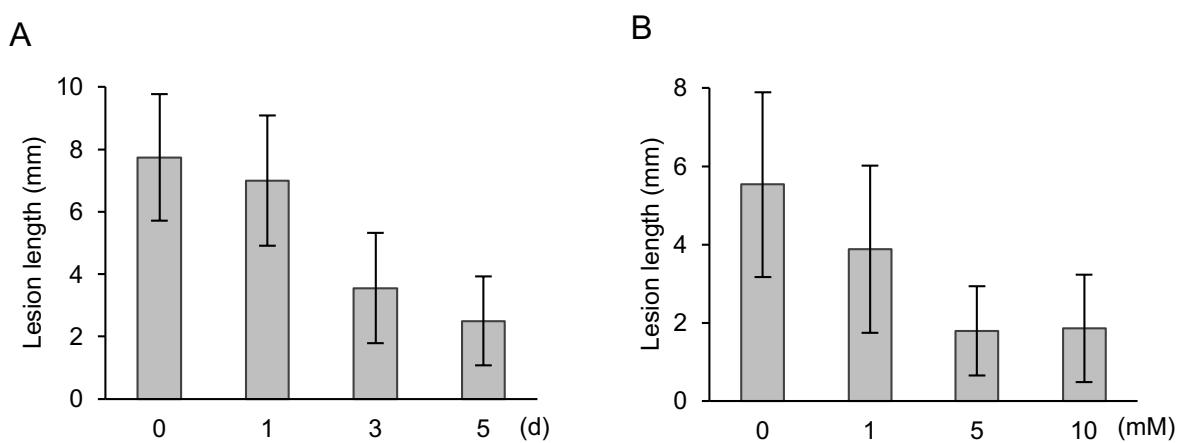
### Fig. 1-3. Classification of TPS and TPP

(A) Phylogenetic analysis of TPS and TPP proteins. The proteins used are: AtTPS1–11 and AtTPPA-J from *A. thaliana*; OsTPS1–11 and OsTPP1–9 from *O. sativa*; SITPS1 from *S. lepidophylla*; ScTPS1–3 and ScTSL1 from *S. cerevisiae*; EcotsA and EcotsB from *E. coli*. The clades colored by red, blue, and yellow indicates subfamilies of Class I, Class II, and Class III, respectively. (B) Domain structure of bacterial, yeast, and plant trehalose metabolism proteins. In bacteria, TPP and TPS activity are located on different TPS (green) and TPP (red) proteins. The TPP catalytic site is characterized by three conserved motifs (indicated by the white boxes). In yeast ScTPS2, the active TPP domain has fused with an inactive TPS-like domain. In plants, AtTPS1–11 and OsTPS1–11 all consist of fused TPS- and TPP-like domains. In AtTPS1–4 and OsTPS1 (Class I), the TPP motifs are not conserved. In addition, plant has a family of smaller proteins (Class III), lacking the N-terminal TPS-like domain and with conserved TPP catalytic site motifs. Different shades of colors reflect different levels of sequence similarity.

	Name	Description	RAP ID	0 h	2 h	6 h	10 h	24 h
JA biosynthesis Transcription factor	<i>NAC4</i>	NAC-domain containing protein 2 (ANAC002).	Os01g0816100	1.00	26.09	12.41	4.14	1.87
	<i>JAmyb</i>	Myb, DNA-binding domain containing protein.	Os11g0684000	1.00	11.56	25.54	8.65	9.47
	<i>TGAP1</i>	Basic leucine zipper protein (Liguleless2).	Os04g0637000	1.00	0.97	49.90	0.84	0.92
	<i>DPF</i>	bHLH domain containing protein.	Os01g0196300	1.00	4.78	3.20	2.52	2.25
	<i>OsERF83</i>	Ethylene responsive element binding factor 2.	Os03g0860100	1.00	57.20	58.45	3.56	3.15
	<i>ZFP36</i>	Zn-finger, C2H2 type domain containing protein.	Os03g0437200	1.00	32.32	0.66	3.19	1.35
	<i>MYB30</i>	MYB1 protein.	Os02g0624300	1.00	13.66	0.66	3.94	2.56
	<i>LOX8</i>	Lipoxygenase (EC 1.13.11.12).	Os08g0509100	1.00	11.35	4.41	1.62	1.34
	<i>LOX11</i>	Lipoxygenase (EC 1.13.11.12).	Os12g0559200	1.00	20.18	7.76	1.22	1.74
	<i>AOS1</i>	Allene oxide synthase (EC 4.2.1.92).	Os03g0767000	1.00	5.39	2.36	1.31	1.15
PR protein	<i>AOC</i>	Allene oxide cyclase precursor (EC 5.3.99.6).	Os03g0438100	1.00	2.40	1.14	0.98	0.87
	<i>PR1#072</i>	PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a) precursor.	Os07g0127500	1.00	20.98	16.90	5.38	2.92
	<i>PR1#073</i>	Allergen V5/Tpx-1 related family protein.	Os07g0127600	1.00	18.93	19.53	8.38	3.31
	<i>Gns5</i>	Beta-1,3-glucanase (Fragment).	Os01g0940700	1.00	7.74	64.34	143.59	36.67
	<i>Gns6</i>	Beta-1,3-glucanase precursor.	Os01g0940800	1.00	1.34	5.32	6.17	2.41
	<i>cht3</i>	Endochitinase precursor (EC 3.2.1.14).	Os06g0726100	1.00	10.53	11.25	6.06	1.96
	<i>cht8</i>	Chitinase (EC 3.2.1.14) (Fragment).	Os10g0542900	1.00	3.57	7.96	10.79	7.94
	<i>TLP</i>	Thaumatin, pathogenesis-related family protein.	Os03g0663500	1.00	2.85	111.65	160.58	64.90
	<i>PR10a</i>	Probenazole-inducible protein PBZ1.	Os12g0555500	1.00	1.17	9.35	12.59	9.39
	<i>PR10b</i>	Probenazole-inducible protein PBZ1.	Os12g0555200	1.00	1.21	7.95	7.79	6.07
Phytoalexin biosynth	<i>RIR1b</i>	RIR1a protein precursor.	Os10g0569400	1.00	0.69	1.48	3.77	4.99
	<i>RIR1b-like</i>	RIR1b protein precursor.	Os10g0569600	1.00	1.24	2.73	4.80	6.32
	<i>CPS2</i>	Terpene synthase.	Os02g0571100	1.00	1.10	6.09	51.18	45.64
	<i>CPS4</i>	Copalyl diphosphate synthetase.	Os04g0178300	1.00	4.59	14.01	8.90	4.61
	<i>KSL4</i>	Terpene synthase.	Os04g0179700	1.00	47.04	53.84	19.79	7.75
	<i>KSL7</i>	Terpene synthase.	Os02g0570400	1.00	1.14	10.89	32.31	9.30
	<i>KSL8</i>	Terpene synthase-like domain containing protein.	Os11g0474800	1.00	1.13	1.94	2.38	11.37
	<i>KSL10</i>	Terpene synthase-like domain containing protein.	Os12g0491800	1.00	3.63	35.61	29.34	19.23

**Fig. 1-4. Microarray analysis of thehalose treated rice roots**

Hydroponically-grown rice seedlings were treated with 5 mM trehalose. Total RNA was extracted from roots and used for microarray analysis. Rice 44k microarray (Agilent Technologies) was analyzed with one color detection method.



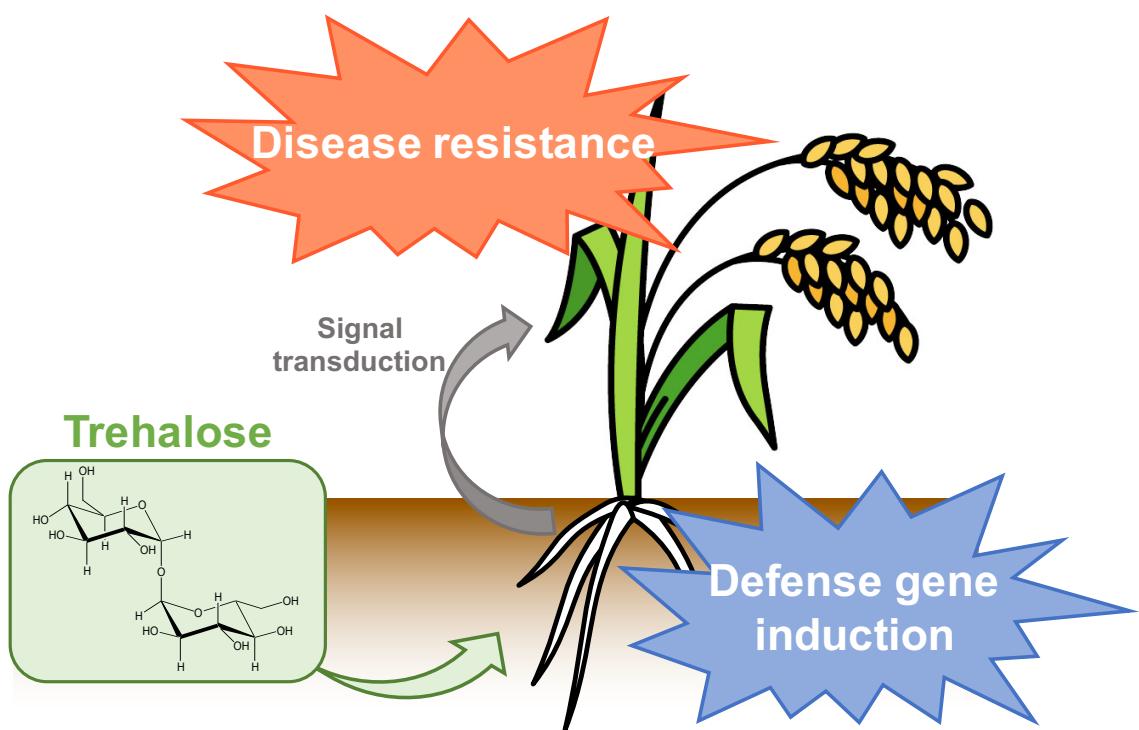
**Fig. 1-5. The disease resistance depending on duration or concentration of trehalose treatment.**  
 (A) The roots of the 21-d-old plants were treated with 5 mM trehalose for 0-5 days. The 5th leaves were spotted with the spore suspension of rice blast fungus. After co-cultured for 5 days, the lesion length were measured. (B) Twenty one-d-old rice plants were treated with 0-10 mM trehalose for 5 d. The 5th leaves were used for the disease resistance assay.



(島, 2008)

**Fig. 1-6. Rice blast resistance of trehalose treated rice**

Rice plants were treated with 5 mM trehalose for 5 days. The fifth leaves were inoculated with rice blast fungus by the spot inoculation method. After 5 days, lesions were observed.



**Fig. 1-7. The schematic model of trehalose-induced systemic resistance**

Trehalose treatment on rice roots induces the expression of defense related genes in roots. Disease resistance in shoots are regulated by an unknown signal transduction from roots.

## 第2章 TSRにおける植物ホルモンシグナルの解析

### 第1節 緒論

植物は病原菌の感染や傷害などの外的刺激を受けると、全身へシグナルを伝達し、非刺激部位における病害抵抗性を誘導する。このような全身誘導型の病害抵抗性としては、全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR)，傷害誘導全身抵抗性 (wound-induced systemic resistance, WSR)，および誘導全身抵抗性 (induced systemic resistance, ISR) の3つが詳細に研究されている。

SAR は病原菌の感染により、地上部の感染葉から非感染葉に誘導される抵抗性である (Fu et al., 2013)。SAR では、感染部位において植物ホルモンであるサリチル酸 (salicylic acid, SA) が生合成される。SA は PR タンパク質や PA の生産を誘導するとともに、過敏反応死を引き起こし、生きた細胞を栄養源とする biotrophic な病原菌の感染拡大を防ぐ (Fu et al., 2013)。また SA は、揮発性物質である SA メチルに変換されることで空気中に拡散し、個体内の非感染葉、あるいは周辺の個体に抵抗性を誘導する (Shulaev et al., 1997)。WSR は病傷害を受けた葉から非病傷害葉へ誘導される抵抗性であり、そのシグナルは JA およびエチレン (ethylene, ET) に制御されると考えられている。WSR では塩基性 PR タンパク質の蓄積が誘導され、壊死細胞を栄養源とする necrotrophic な病原菌の感染拡大が抑制される。一方で ISR は、根圏に生息する非病原性微生物との相互作用が刺激となり、根部から地上部へ誘導される抵抗性である (Choudhary et al., 2007)。ISR は SA に非依存的な抵抗性であり、JA および ET シグナルを介して制御される (van Loon et al., 1998)。ISR が誘

導された植物では、JA や ET に対する感受性が上昇するため、病原菌感染時の防御応答が通常よりも早く、あるいは強く発動される (Verhagen et al., 2004).

TSR は根部へのトレハロース処理が、根部での防御応答と地上部での病害抵抗性を誘導する現象である。そのため TSR のシグナル伝達も SAR, WSR, および ISR と同様に植物ホルモンに制御されている可能性が高い。本章では TSR がトレハロースに特異的な現象であるかを検討するとともに、TSR のシグナル伝達に植物ホルモンが関与するかを解析した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 第 1 項 植物材料

野生型株として、イネ (*Oryza sativa L.*) 品種「ゆきひかり」を使用した。イネの JA 生合成変異株 (*hebiba*) およびその原品種「ニホンマサリ」は首都大学東京の小柴共一教授より分与頂いた。「日本晴」を原品種とする SA 分解酵素過剰発現株 (*NahG*) は、農業・食品産業技術総合研究機構の西澤洋子博士より分与頂いた。ゆきひかり、ニホンマサリ、および日本晴は、イネいもち病真性抵抗性遺伝子座 *Pia* を持ち、イネいもち病菌 (race 007) に罹病する。

### 第 2 項 種子滅菌

種子は 70%エタノール中で 5 分間、続いて 2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で 30 分間振盪することで滅菌した。滅菌後の種子は純水を用いて洗浄した。

### 第 3 項 水耕および土耕栽培

滅菌種子を、純水を入れたシャーレ上に播種し 25°C、暗所で 3 日間吸水させた。吸水開始日を 0 日齢とした。発芽した 3 日齢の種子をプラスチックメッシュ上に均一に広げ、これをオートクレーブ滅菌した水道水で満たされたバットに固定した。バットは 25°C、連続光に設定された人工気象器内に設置した。水耕栽培中はバクテリアやカビの繁殖を防ぐため、滅菌水道水を毎日交換した。

土耕栽培に使用する土は、北海道農業研究センター内圃場由来の土壤 2.5 kg に対して硫酸アンモニウム 4.3 g、過リン酸石灰 5.0 g、塩化カリウム 1.5 g

を加えたものを用いた。発芽した3日齢の種子をセルトレー（42 mm × 42 mm × 46 mm）中の土壤に1cmの深さで埋めた。セルトレーを、水を張ったバット中に設置することで、底面から水道水を供給した。生育は自然光温室で行い、イネが14日齢に達したところで追肥として2,000倍希釀したハイポネクス（HYPONeX）水溶液を与えた。温室内の温度は昼25°C／夜20°Cとした。

#### 第4項 水耕栽培イネへの糖処理

水耕栽培した14日齢の幼苗を用いた。幼苗をプラスチックメッシュごと5 mMの糖水溶液で満たされたバットへ移し、根部のみを糖水溶液に浸した。根部を糖水溶液に浸した時を処理0時間とし、処理24時間まで根部を糖水溶液中に保持した。糖試薬には、スクロース（Wako）、D(+)マルトース一水和物（Wako）、トレハロース二水和物（Wako）、およびD(-)マンニトール（Wako）を用いた。

#### 第5項 土耕栽培イネへの糖処理

根部への糖処理には、21日齢のイネを用いた。セルトレーを5 mM糖水溶液を張ったバット中に移し、底面から糖水溶液を供給した。供給開始日を処理0日とし、5日間糖水溶液を供給した。糖試薬には、スクロース、D(+)マルトース一水和物、およびトレハロース二水和物を用いた。

地上部へのトレハロース処理には、21日齢のイネを用いた。地上部全体に、0.05% Tween 20で調整した5 mMトレハロース5 mLを噴霧した。噴霧した日を処理0日とし、5日間イネを馴化させた。

## 第6項 RNA抽出・cDNA合成

全RNAの抽出は、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用い、マニュアルに準じて行った。一本鎖cDNAの合成はPrimeScript RT reagent kit (Takara)を用いて行った。方法はマニュアルに準じ、プライマーにはoligo dTとrandom hexamerの混合プライマーを用いた。

## 第7項 半定量的RT-PCR

第6項の方法に準じて調製した1本鎖cDNA反応液を5倍希釈し、これを鑄型としてPCRを行った。PCR酵素にはEx taq (Takara)を用い、サーマルサイクラーはVeriti 96-well サーマルサイクラー (Applied Biosystems)を使用した。用いたプライマー配列とPCR条件をTable 2-1に示す。

## 第8項 胞子懸濁液の調製

イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*, race 007)の菌糸をポテトデキストロース培地 (Difco)に置床し、暗所、25°Cで3週間培養した。培養後プレートに滅菌水を注ぎ入れ、コンラージ棒で菌糸を搔き取ることで菌糸懸濁液を調製した。菌糸懸濁液をオートミール培地 (Difco)に広げ、暗所、25°Cで3日間培養し、その後BLBランプ (Toshiba: FL15S, BLB 15W)照射下、25°Cにて2日間培養した。プレートに0.05% Tween 20溶液を注ぎ入れ、絵筆を用いて分生胞子を搔き取ることで胞子懸濁液を調製した。胞子懸濁液の濃度は、 $1.0 \times 10^5$  spore/mLとした。

## 第9項 イネいもち病菌を用いた病害抵抗性試験

土耕栽培した 21 日齢のイネを、第 5 項の方法に準じて 5 日間糖処理した。第 5 葉の葉身を切り取り、水で浸したペーパータオルを敷いた蓋付きプラスチックケース ( $25\text{ cm} \times 35\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ ) 中に並べた。プラスチックチップの先端で、葉身に軽く傷をつけながら胞子懸濁液を  $3\text{ }\mu\text{L}$  ずつ滴下した。1 枚の葉身に対して  $3\text{ cm}$  の間隔で 4 箇所に滴下した。プラスチックケースを  $25^{\circ}\text{C}$ , 暗所に 24 時間静置し、その後  $25^{\circ}\text{C}$ , 連続光下で 4 日間静置した。接種後 5 日目に罹病性病斑を画像データとして取り込み、画像編集ソフト (Image J) を用いて病斑長を測定した。

## 第10項 植物ホルモンの抽出

水耕栽培した 14 日齢の幼苗を、第 4 項の方法に準じてトレハロース処理した。根部および地上部 (各 200-300 mg) を回収し、マルチビーズショッカー (安井器械) を用いて凍結破碎した。エタノール  $20\text{ mL}$  を加え攪拌し、 $4^{\circ}\text{C}$ , 暗所に 24 時間静置した。粗抽出液に重水素ラベルされた内部標準物質混合液 (Table 2-2) を  $20\text{ }\mu\text{L}$  加え、ろ紙を用いて組織残渣を取り除き、ろ液を SpeedVac 減圧濃縮器 (Thermo Scientific) で乾固した。乾固物を 80% メタノール  $6\text{ mL}$  で溶解し、これを Bond Elut C18 column (Agilent) に供することで、疎水性不純物を除去した。溶出液を乾固したのち、80% メタノール  $0.5\text{ mL}$  に再溶解し UPLC-MS/MS による分析に用いた。

## 第 11 項 UPLC-MS/MS による植物ホルモンの定量

植物ホルモンの定量は松浦らの方法 (Matsuura et al., 2009) に準じた.

UPLC-MS/MS には, Acquity UPLC system (Waters) と Micromass Quattro Premier tandem quadruple mass spectrometer (Waters) を使用し, カラムには Acquity ethylene-bridged (BEH) C18 column (1.7  $\mu\text{m}$ ,  $\phi 2.1 \times 100 \text{ mm}$ , Waters) を用いた. UPLC-MS/MS の分析条件および各化合物の検出条件を Table 2-3 に示す.

## 第 12 項 リアルタイム PCR

cDNA の調製は第 6 項の方法に準じた. PCR 酵素には SYBR Premix Ex taqII (Takara) を用い, 反応液はマニュアルに準じて調製した. 反応条件は 94°C, 30 秒間の熱変性後, 94°C, 5 秒間の熱変性, 60°C, 31 秒間の伸長反応を 40 サイクル行った. サーマルサイクラーは ABI7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用いた. 内部標準遺伝子として *OsACT1* を用い, 各遺伝子の発現量を補正した. 反応に用いたプライマーの配列を Table 2-4 に示す.

### 第3節 実験結果

#### 第1項 トレハロース特異的に誘導される遺伝子発現

根部へのトレハロース処理は、根部での防御関連遺伝子の発現を誘導する (Fig. 1-4). そこで、この防御関連遺伝子の発現誘導がトレハロース以外の糖でも観察されるかを検討した。水耕栽培した 14 日齢の幼苗の根部にトレハロース、スクロース、マルトース、またはマンニトール（浸透圧コントロール）を処理し、トレハロース誘導性遺伝子 4 種の発現を半定量的 RT-PCR により観察した。その結果、トレハロース処理区では JA 生合成遺伝子 *LOX8*, 病害関連転写因子遺伝子 *NAC4*, *JAmyb*, および PR タンパク質遺伝子 *PR1#073* の発現誘導が観察された (Fig. 2-1)。スクロース処理区、マルトース処理区、およびマンニトール処理区では、水処理区と比較して遺伝子発現に差が見られなかった (Fig. 2-1)。従って、これら防御関連遺伝子 4 種の発現誘導はトレハロースでのみ観察されることが示された。

#### 第2項 トレハロース特異的に誘導される病害抵抗性

根部へのトレハロース処理は、地上部でのイネいもち病抵抗性を誘導する (Fig. 1-5)。そこで、この地上部抵抗性が他の二糖でも誘導されるかを検討した。土耕栽培した 21 日齢のイネの根部にトレハロース、スクロース、またはマルトースを 5 日間処理し、地上部でのイネいもち病抵抗性を観察した。その結果、スクロース処理区とマルトース処理区では、無処理区と比較してイネいもち病の病斑長に有意な差は見られなかった (Fig. 2-2)。一方で、トレハロース

処理区では病徵の進展が抑えられ、病斑長が短くなっていた (Fig. 2-2)。この結果から TSR における地上部でのイネいもち病抵抗性は、トレハロースでのみ誘導されることが示された。

### 第3項 抵抗性獲得組織における防御関連遺伝子の発現

TSR により病害抵抗性を獲得した葉では、防御関連遺伝子の発現が誘導されると予想された。そこでこの点を明らかにするため、土耕栽培した 21 日齢のイネの根部をトレハロース処理し、地上部での防御関連遺伝子の発現を経時的に観察した。TSRにおいて根部で発現誘導される遺伝子 7 種を選定し、半定量的 RT-PCR により発現解析を行った。その結果、PR タンパク質をコードする *PR1#073*, *Gns5*, *cht1*, *TLP*, および PA 生合成酵素をコードする *OsKSL7* の発現は、トレハロース処理区において上昇していた (Fig. 2-3)。またこの発現誘導は、トレハロース処理 4 日から 5 日にかけて最も高く (Fig. 2-3), トレハロース処理が地上部での病害抵抗性を誘導するタイミング (Fig. 1-5) と一致した。従ってこれらの防御関連遺伝子の発現誘導が、TSR における地上部での病害抵抗性に寄与していると考えられた。一方で PR タンパク質をコードする *PR10b* および *PR10* の発現は、未処理区とトレハロース処理区の間で差は見られなかった (Fig. 2-3)。この結果から、根部と地上部ではトレハロースに誘導される遺伝子に違いがあることが示唆された。

### 第4項 地上部トレハロース処理による病害抵抗性の獲得

根部へのトレハロース処理は、地上部での防御関連遺伝子の発現と病害抵抗

性を誘導することが明らかとなった。そこで地上部へのトレハロース処理でも、病害抵抗性が誘導されるかを検討した。土耕栽培したイネの地上部全体に 5 mM トレハロース水溶液を噴霧し、5 日間イネを馴化させた。地上部を用いて病害抵抗性試験を行った結果、トレハロース処理区と参照区の間に病斑長の有為な差は観察されなかった (Fig. 2-4)。従って地上部へのトレハロース処理は病害抵抗性を誘導しないことが示唆された。

## 第 5 項 TSR における植物ホルモン内生量の変動

トレハロースを処理された根部では、JA 生合成遺伝子 *LOX*, *AOS*, *AOC*, および JA 応答性遺伝子 *JAmyb* (Lee et al., 2001) の発現が誘導される (Fig. 1-4, 2-1)。また SA 応答性遺伝子 *WRKY45*, *WRKY76* (Shimono et al., 2007) も、トレハロース処理により発現誘導される (Fig. 1-4)。従ってトレハロースを処理された根部では、JA および SA の内生量が増加すると予想された。そこで水耕栽培した 14 日齢の幼苗の根部にトレハロースを処理し、根部と地上部における JA 類と SA 類の内生量を定量した。

JA とその活性型である JA イソロイシン (JA-isoleucine, JA-Ile) の内生量は、根部で処理 2 時間以内の一過的な増加を示した後、定常レベルにまで減少した (Fig. 2-5)。また地上部では、JA および JA-Ile の内生量に大きな変化は観察されなかった (Fig. 2-6)。SA の内生量は、根部において処理 8 時間をピークとする緩やかな増加を示した (Fig. 2-6)。その後、根部の SA 内生量は減少に転じたが、処理 24 時間まで比較的高い値を維持した (Fig. 2-6)。一方で、地上部における SA 内生量には有意な差は観察されなかった (Fig. 2-6)。また SA の貯蔵型

である SA グルコシド (SA-glucoside, SAG) の内生量は、根部および地上部において大きな変化は観察されなかった (Fig. 2-6). 以上の結果から根部へのトレハロース処理は、根部での JA, JA-Ile, および SA の内生量を増加させることが明らかとなった。また一般にイネの SA 内生量は、根部において低く、地上部において高いことが知られる (Chen et al., 1997). 本解析における SA 内生量は、トレハロース処理前の根部で 0.17 nmol/gFW, 地上部で 45.9 nmol/gFW であった (Fig. 2-6). 従ってこの結果は、既知の知見とよく一致していた。

#### 第 6 項 根部での遺伝子発現誘導における植物ホルモンの関与

前項の結果から、トレハロースを処理された根部では JA, JA-Ile, および SA の内生量が増加することが示された。そこで TSR における根部での防御関連遺伝子の発現誘導が、これらの植物ホルモンシグナルに制御されるかを検討した。水耕栽培した 14 日齢の JA 生合成変異株 *hebiba*, および SA 分解酵素過剰発現株 *NahG* の根部に、トレハロースを処理し遺伝子発現を観察した。

トレハロース処理 30 分以内に根部で発現誘導される転写因子遺伝子 10 種を選定し、リアルタイム PCR を用いて発現を観察した。その結果 *hebiba* においては、*OsERF83*, *ZFP36*, *WRKY28*, *MYB30*, *OsERF91*, および *WRKY40* のトレハロースによる発現誘導が消失した (Fig. 2-7)。従ってこれらの発現誘導には JA 生合成経路が不可欠であることが示された。また *NahG*においては、*MYB30*, *OsERF91*, *WRKY40*, *WRKY45*, *WRKY62*, および *WRKY76* の発現誘導が消失した (Fig. 2-8)。この結果は、これら遺伝子の発現誘導に SA の蓄積が不可欠であることを示している。また *MYB30*, *OsERF91*, および *WRKY40*

の発現誘導は *hebiba* と *NahG* のいずれにおいても消失した (Fig. 2-7, 2-8). これはトレハロース処理根部で, JA シグナルと SA シグナルが相乗的に機能している可能性を示している. 一方で *DREB1A* の発現誘導は, *hebiba* および *NahG* のいずれにおいても観察された (Fig. 2-7, 2-8). 従って TSR における根部での防御関連遺伝子の発現誘導には, JA および SA 以外のシグナルも関与することが示唆された.

## 第 7 項 地上部での病害抵抗性誘導における植物ホルモンの関与

前項の結果から, TSR における根部での防御関連遺伝子の発現誘導が, JA および SA に制御されることが示された. そこで, 地上部でのイネいもち病抵抗性も, JA および SA に制御されるかを検討した. 土耕栽培した 21 日齢の *hebiba* および *NahG* の根部にトレハロースを 5 日間処理し, 地上部でのイネいもち病抵抗性を解析した. *hebiba* を用いた解析から, 野生型株と *hebiba* のいずれにおいてもトレハロース処理による病斑長の有意な減少が観察された (Fig. 2-9). またトレハロース処理後の病斑の大きさは, 各参照区と比較して野生型株で 72%, *hebiba* で 59% であった. 従って *hebiba* では, 野生型株と同程度, あるいはそれ以上の病害抵抗性が誘導されていた. 以上の結果より, TSR の地上部における病害抵抗性には, JA シグナルが必須ではないことが明らかとなった. 一方で *NahG* を用いた解析では, 野生型株および *NahG* でトレハロース処理による病斑長の減少が観察されたものの, *NahG* においては, 病斑長の減少幅の程度が野生型株よりも小さくなっていた (Fig. 2-10). これは *NahG* において, トレハロースによる病害抵抗性誘導が減少すること示しており, TSR の地上部

における病害抵抗性には SA シグナルが重要な役割を果たす可能性を示された。

#### 第4節 考察

トレハロースと他の二糖を用いた解析から、スクロース処理およびマルトース処理は、根部での防御関連遺伝子の発現、および地上部での病害抵抗性を誘導しないことが明らかとなった (Fig. 2-1, 2-2). この結果は、TSR がトレハロース特異的に引き起こされる現象であることを示している。しかしトレハロースがどのようにして TSR を引き起こしているのかは未だ明らかにされていない。

第1章第1節でも触れたように、トレハロースは他の糖には見られない特徴的なコンフォメーションを持っており (Kuttel et al., 2005)，これはトレハロースに両親媒的な特性を与え、水分子や脂肪酸との安定的な複合体形成を可能にする (Lerbret et al., 2005-2; Oku et al., 2005). また *in vitro*においては、トレハロースがリン脂質二重膜に結合するという報告もなされており (Luzardo et al., 2000; Lambruschini et al., 2000)，トレハロースが細胞膜に物理的に干渉することが TSR の引き金である可能性も考えられる。一方でトレハロースは自然界に広く存在する二糖であり、昆虫や微生物に比較的高濃度に蓄積される (Watanabe et al., 2002; Brodmann et al., 2002). そのため食害部位や感染部位においては、植物細胞が高濃度のトレハロースに曝露されていると考えられ、植物が細胞膜上の受容体を介してトレハロースを認識している可能性も考えられる。受容体に認識され、植物の防御応答を引き起こす分子としては、Damage-associated molecular patterns (DAMP) や Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) と呼ばれる分子群が詳細に研究されている。DAMP は植物細胞壁の構成成分であるオリゴガラクトロン酸などが知られ、菌の侵入

時に生じる DAMP を認識することで、植物は防御応答を活性化させる (Ferrari et al., 2013)。また PAMP は病原微生物に普遍的に存在する分子であり、かつ植物が産生しない分子である。鞭毛タンパク質由来のペプチドである flg22 (Felix et al., 1999) や、糸状菌の細胞壁構成単位であるキチンオリゴマー (Shibuya and Minami, 2001) などが知られ、植物は PAMP を認識することでも防御応答を活性化させる (Gómez-Gómez and Boller, 2000; Kaku et al., 2006)。トレハロースは植物自身が合成する糖であるとともに、微生物が合成する糖でもある。そのためトレハロースは DAMP と PAMP の二つの役割を担う新たなシグナル分子であるかもしれない。一方、ヒトの肝細胞ではトレハロース処理が細胞のオートファジーを誘導することが示されている (Mayer et al., 2016)。これは細胞内に取り込まれたトレハロースが、細胞内からグルコーストランスポーターを阻害することで誘導されると考えられている (DeBosch et al., 2016)。高等植物におけるトレハローストランスポーターの存在は明らかにされていないが、TSRにおいても細胞内へのトレハロースの取り込みが、一連の防御応答の起点である可能性も考えられる。

根部へのトレハロース処理により、SA および JA 類の内生量が増加することが明らかとなった (Fig. 2-5, 2-6)。SA はコリヌミ酸を出発物質に生合成され、SAG および SA グルコースエステル (SA glucose ester, SGE) として細胞内に蓄積される (Dempsey et al., 2011)。これらの配糖体は、それ自身では活性を示さない貯蔵型であり、ストレス応答時に加水分解されることで *de novo* 経路を介さずに SA の内生量を調節する (Dempsey et al., 2011)。TSRにおいては、SA 内生量が増加した根部において SAG 内生量の減少は観察されなかった (Fig.

2-6). そのためトレハロース処理は、SGE の加水分解を介して SA 内生量を調節しているのかもしれない。また TSR での JA および JA-Ile の蓄積は、処理後短時間で一過的に観察された (Fig. 2-5)。このような JA 類の迅速な蓄積は、傷害ストレス等によっても誘導されるが (Wakuta et al., 2011)，その詳しい生成経路は不明である。JA の貯蔵体はこれまでに明らかにされていないが、TSR では未知の JA 貯蔵体から JA 類を合成する経路が働いている可能性が考えられる。また興味深いことに、これら植物ホルモンの蓄積は根部においてのみ観察された (Fig. 2-5, 2-6)。JA-Ile などは移動性シグナルとして機能することが示されているが (Matsuura et al., 2012)，TSR における根部から地上部へのシグナル伝達は、JA や SA とは異なる移動性シグナル物質によって制御される可能性が考えられる。

植物の全身誘導型の防御応答としては、SA シグナルを介して感染葉から非感染葉へ抵抗性が誘導される SAR, JA/ET シグナルを介して病傷害葉から非病傷葉へ抵抗性が誘導される WSR, および JA/ET シグナルを介して根部から地上部に抵抗性が誘導される ISR という現象が知られている (Fu et al., 2013; Choudhary et al., 2007)。TSR では、根部にトレハロースを処理することが、地上部での抵抗性獲得に重要であることが示された (Fig. 2-4)。そのため、根部から地上部へのシグナル伝達という点において、TSR と ISR は類似した現象であると言える。しかし TSR における地上部での病害抵抗性は、JA シグナル非存在下においても獲得され (Fig. 2-9)，SA シグナル非存在下において大きく損なわれた (Fig. 2-10)。そのため TSR は、WSR や ISR でなく、SAR と類似の全身抵抗性であると考えるのが妥当である。一方で根部においては、JA シグ

ナルが複数の転写因子遺伝子の発現制御に関わることが示されており (Fig. 2-7, 2-8), JA シグナルの根部局所的な機能に興味が持たれる。TSR における JA シグナルの役割について、さらに踏み込んだ解析を行う必要がある。

Table 2-1-1. Primers used in RT-PCR

Gene name	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')	PCR condition <sup>a</sup>
<i>OsACT1</i>	TCCATCTGGCATCTCTCAG	GTACCCCTCATCAGGCATCTG	1
<i>LOX8</i>	CATGGAGAGGTTCCCTGG	CCATCAGATGGATGTGC	2
<i>NAC4</i>	GGCTGTACAACAAGAAG	CATCACTCCTATTTCCG	3
<i>JAmyb</i>	AGCTCATCTTCCGATTC	CTAGACATCTAGAACCG	3
<i>PR1#073</i>	ATCAACTGCGAGCTTGC	CGCTTGATCATGATGTT	2
<i>Gns5</i>	CACTGGCATTGGTCCTTG	CACCTTGATGTTGCCGAG	4
<i>TLP</i>	AACACGCTGGCGGAGTTC	GTGAAGGTGCTCGTCTGG	2
<i>OsKSL7</i>	CAAAGGCTTCCCGCTTAC	ATAGGGCCTTCCTGTTCG	2
<i>PR10b</i>	TGTGGAAGGTCTGCTTGG	GTACGCCCTCGATCATCTG	2
<i>PR10</i>	TCCAGGCACCATCTACAC	AGGTACGCCCTCCATCATC	2

a: The numbers indicate PCR condition in Table 2-1-2.

Table 2-1-2. PCR condidion for RT-PCR

	Denature		Annealing		Elongation		Cycle
	°C	sec	°C	sec	°C	sec	
1	98	10	50	30	72	30	26
2	98	10	50	30	72	30	32
3	98	10	50	30	72	30	28
4	98	10	50	30	72	30	30

Table 2-2. The composition of the internal standard

Component	Concentration (ng/μL)	Final conc. (pg/μL)
JA- <i>d</i> <sub>6</sub>	5	5
[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]JA-Ile	0.625	0.625
SA- <i>d</i> <sub>4</sub>	1.25	1.25
SAG- <i>d</i> <sub>4</sub>	10	10

Table 2-3-1. The analytical condition for MS

Capillary voltage (kV)	3.5
Desolvation temperature (°C)	300
Source temperature (°C)	120
Cone gas (L/h)	50
Desolvation gas (L/h)	350

Table 2-3-2. The analytical condition for UPLC

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
0	0.25	100	0
0.2	0.25	100	0
17	0.25	20	80
17.1	0.25	0	100
18.5	0.25	0	100
19	0.25	100	0
20	0.25	100	0

Buffer A, methanol : water : acetic acid = 20 : 20 : 0.5, v/v

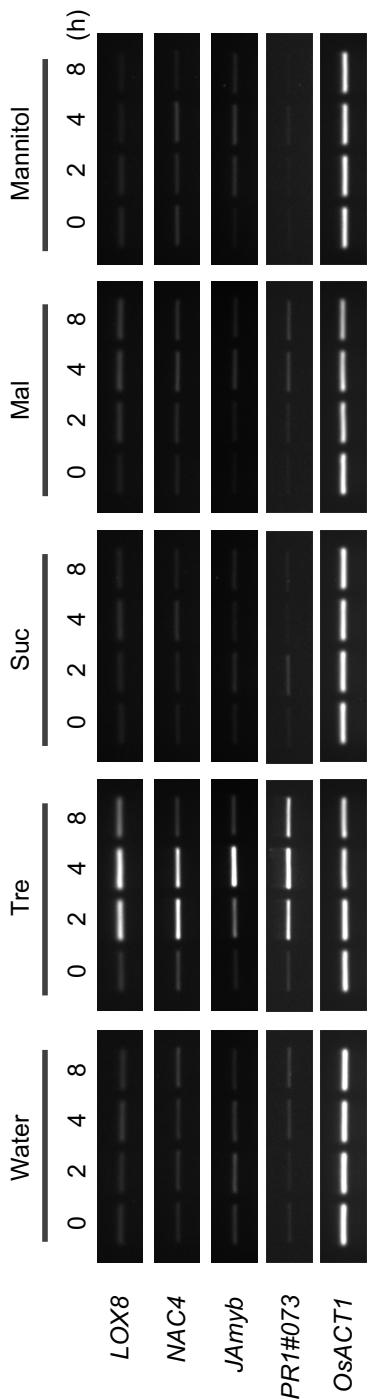
Buffer B, methanol : acetic acid = 100 : 0.5, v/v

Table 2-3-3. The condition of MS optimization for MRM mode

Entry	[M-H] <sup>-1</sup> (m/z)	Transition ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
JA	209	58.71	24	16
JA-d <sub>6</sub>	215	58.71	24	16
JA-Ile	322.03	129.68	45	24
[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]JA-Ile	328.03	129.68	45	24
SA	136.83	92.5	26	16
SA-d <sub>4</sub>	140.83	96.63	26	16
SAG	262.9	152.62	26	12
SAG-d <sub>4</sub>	268.9	155.62	26	12

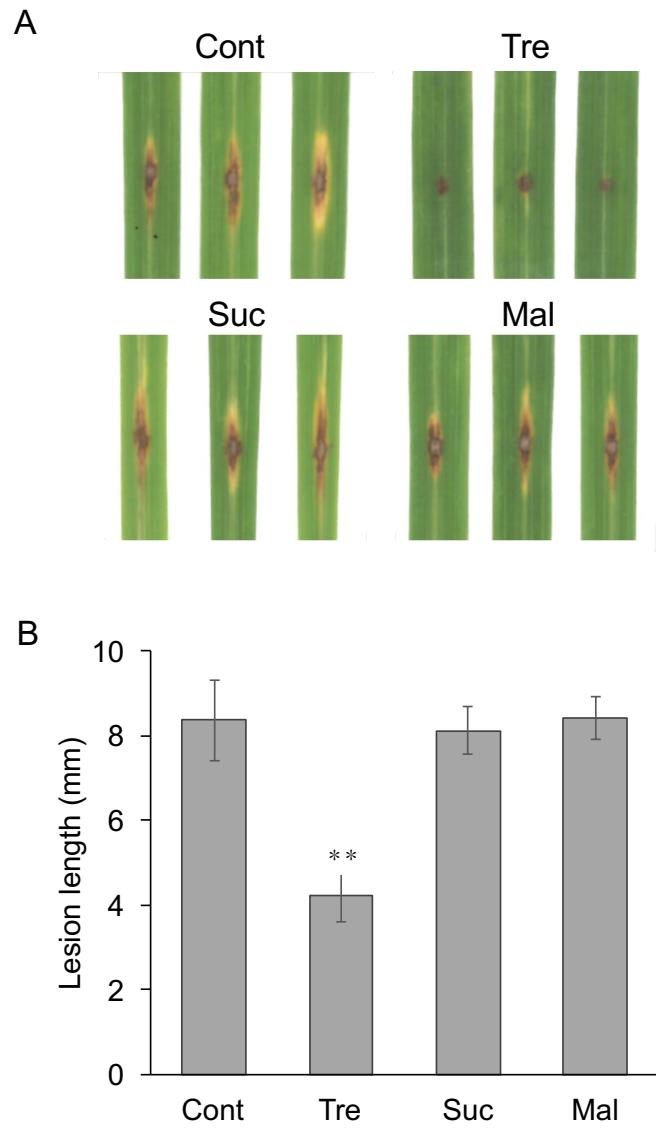
Table 2-4. Primers used in qRT-PCR

Gene name	RAP ID	MSU ID	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
OsACT1	Os03g0718100	LOC_Os03g50890	TCTCTCTGTATGCCAGTGGTCG	GTCGAGACGAAGGATAGCATGG
OsERF83	Os03g0860100	LOC_Os03g64260	AGCCACCACCTCCATCTGATC	TCAGAGCATGGAACCGGATC
OsERF91	Os02g0654700	LOC_Os02g43790	TGGTGAGCTAAGTGGCGATG	CGACCCCATCAAGCAGCAATC
MYB30	Os02g0624300	LOC_Os02g41510	ACTCCGGATGGAGATGAG	GATGAACAGCTTGAGCCAGA
WRKY28	Os06g0649000	LOC_Os06g44010	GAGTTGATCGATTGATGG	GCACGTGTAGAGCAGCTAA
WRKY40	Os11g0117500	LOC_Os11g02530	AACTCCAAACACCCAAGGAG	GTGATGCCATTGAGCTGT
WRKY64	Os12g0116700	LOC_Os12g02450	TCTTCTGATTCTCCGATGA	TCTCTTGTGTTGGCGAAGAG
WRKY45	Os05g0322900	LOC_Os05g25770	CGGGTAAAACGATCGAAAGA	TTTCGAAAGCGGAAGAACAG
WRKY62	Os09g0417800	LOC_Os09g25070	TCCCACACATTCTGTTCAT	CTTGCAAGCATTGGGATA
WRKY76	Os09g0417600	LOC_Os09g25060	AAAACATCGAGGCGCATTTCA	AAGCAGCAGAAAAGCATTG
DREB1A	Os09g0522200	LOC_Os09g35030	ACCTGTACTACGCGAGCTTG	TAGTAGCTCCAGAGTGGGAC



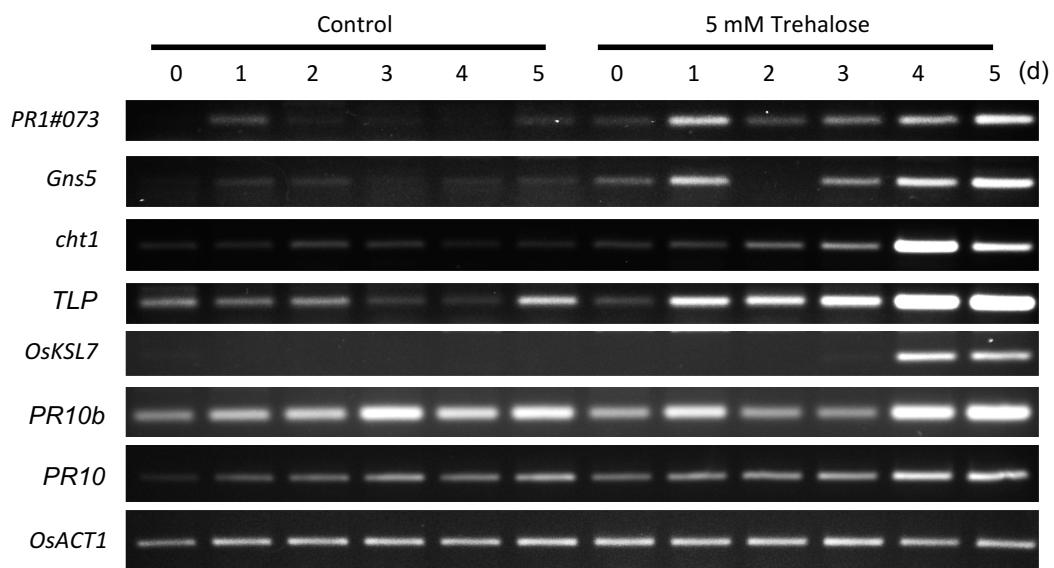
**Fig. 2-1. Trehalose treatment induces expression of defense-related genes.**

Hydroponically grown 14-day-old seedlings were treated with trehalose, sucrose, maltose, or mannitol solutions. Total RNA was extracted from roots of the seedlings after indicated periods. Semi-quantitative RT-PCR was performed for trehalose-inducible genes. *OsACT1* was used as a house-keeping control.



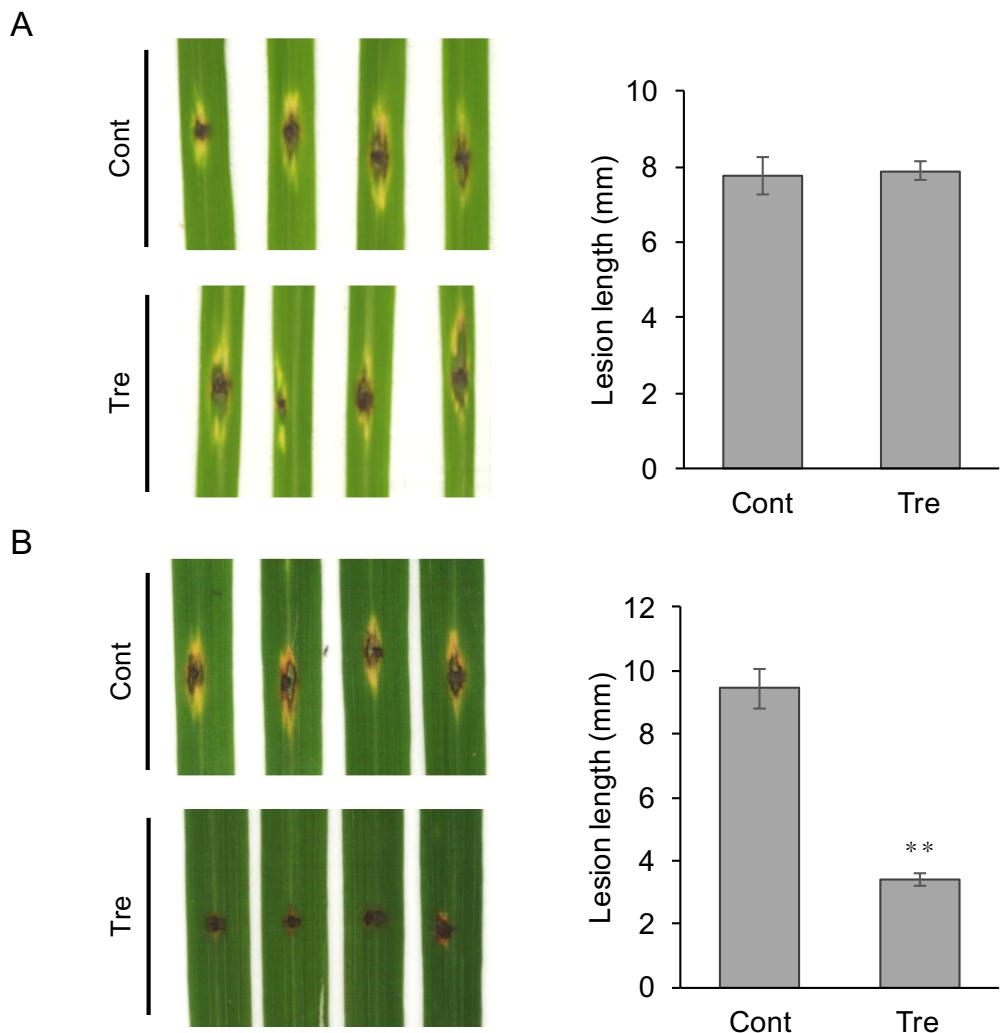
**Fig. 2-2. Blast resistance of sugar treated rice plants**

(A,B) Twenty one-d-old plants were treated with 5 mM of trehalose, sucrose, or maltose for 5 d. Blast resistnace was detected using the 5th leaf tissue. Data represents means  $\pm$ SE (n=24). Asterisks indicate significant differences compared with values without trehalose (t test, p < 0.01).



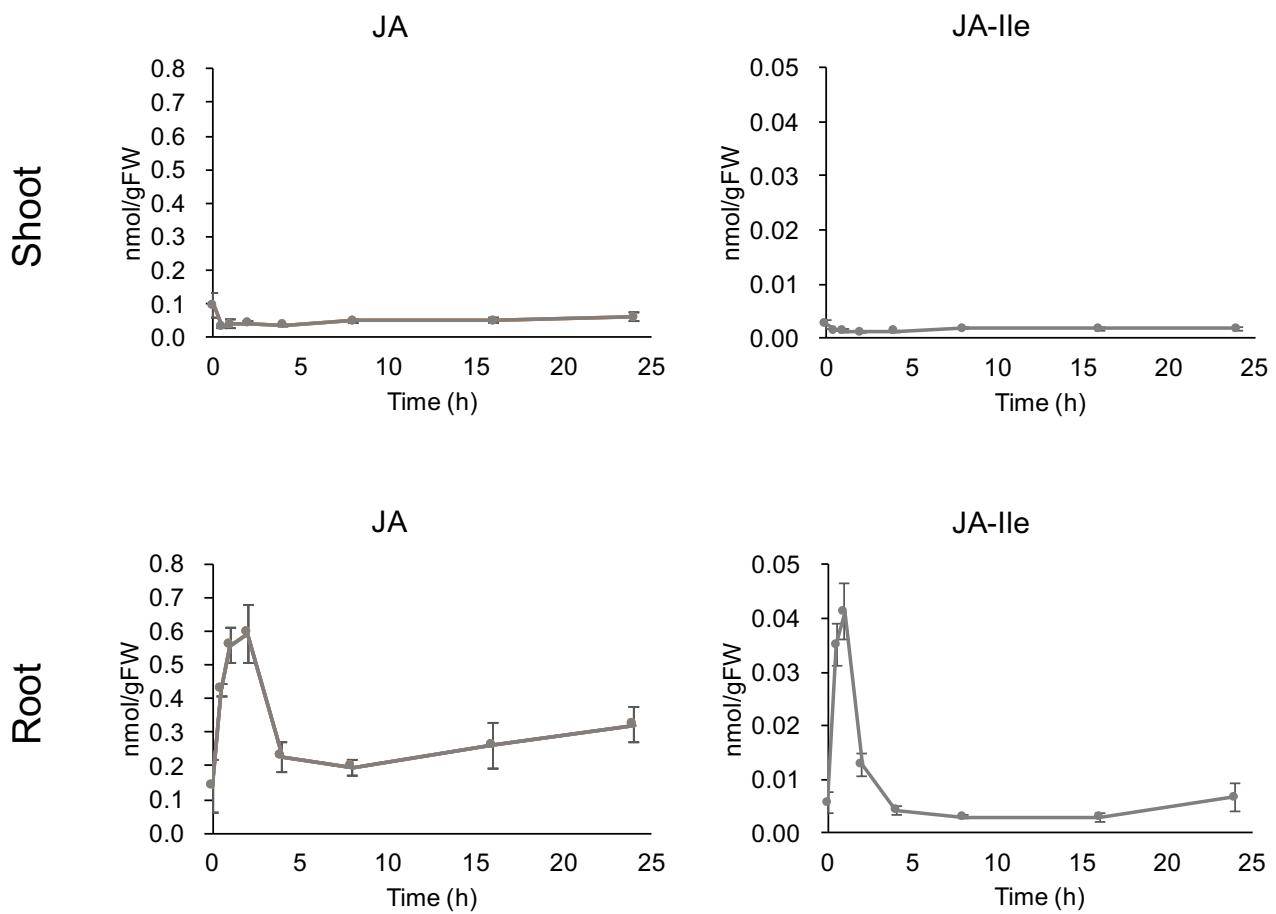
**Fig. 2-3. Soil trehalose treatment induces defense genes**

Twenty one-d-old rice plants grown on soil were supplied with 5 mM of trehalose from bottom of the pots. Total RNA was extracted from shoots and used for semi quantitative RT-PCR.



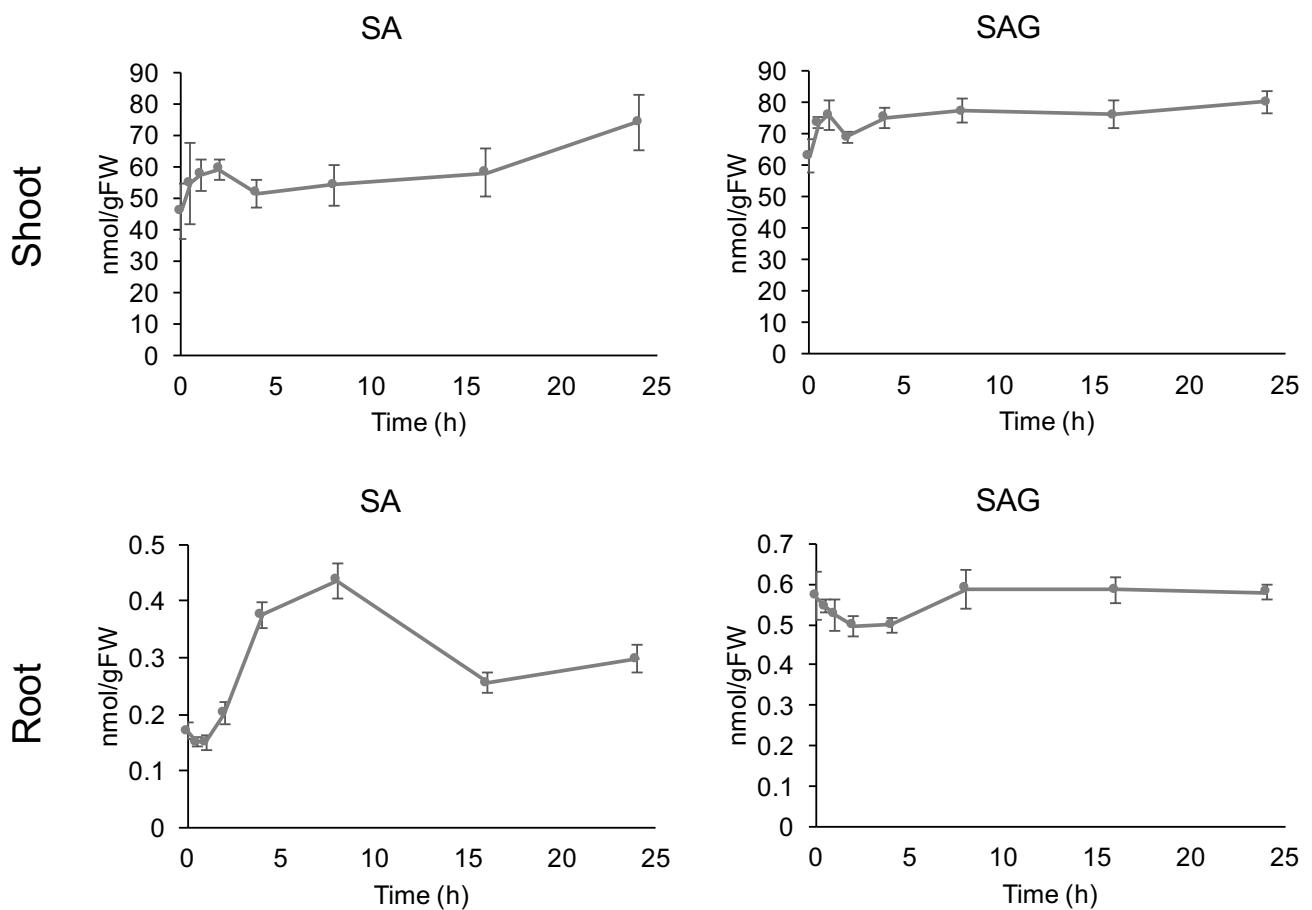
**Fig. 2-4. Tissue specificity of trehalose recognition**

Twenty one-d-old soil grown plants were treated with 5 mM trehalose either by spraying aerial part (A) or soaking pots to the solution (B). Five days after the treatments, the 5th leaf tissue was detached and spotted with the blast spore suspension. After 5days of inoculation, lesion length was measured. Data represents mean  $\pm$  SE ( $n=24$ ). Asterisks indicate statistically significant differences compared with values without trehalose (t test,  $p < 0.01$ ).



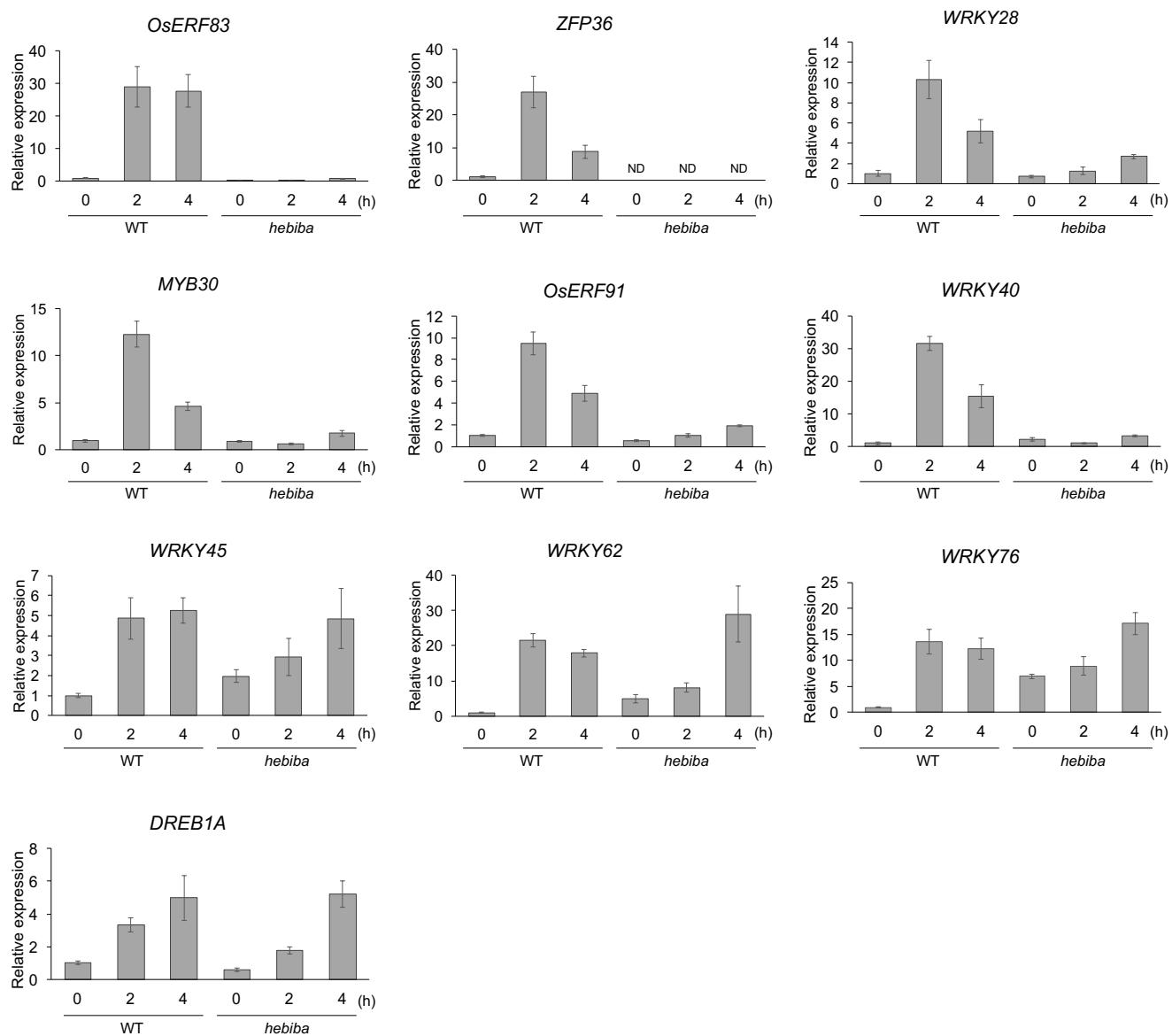
**Fig. 2-5. Jasmonate accumulation in roots and shoots during TSR**

Hydroponically grown 14-d-old seedlings were treated with trehalose by replacing water with 5 mM trehalose solution. Hormones were extracted from roots and shoots of the seedlings at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 24 h after initiation of the treatment. Data represents means  $\pm$  SE ( $n=4$ ).



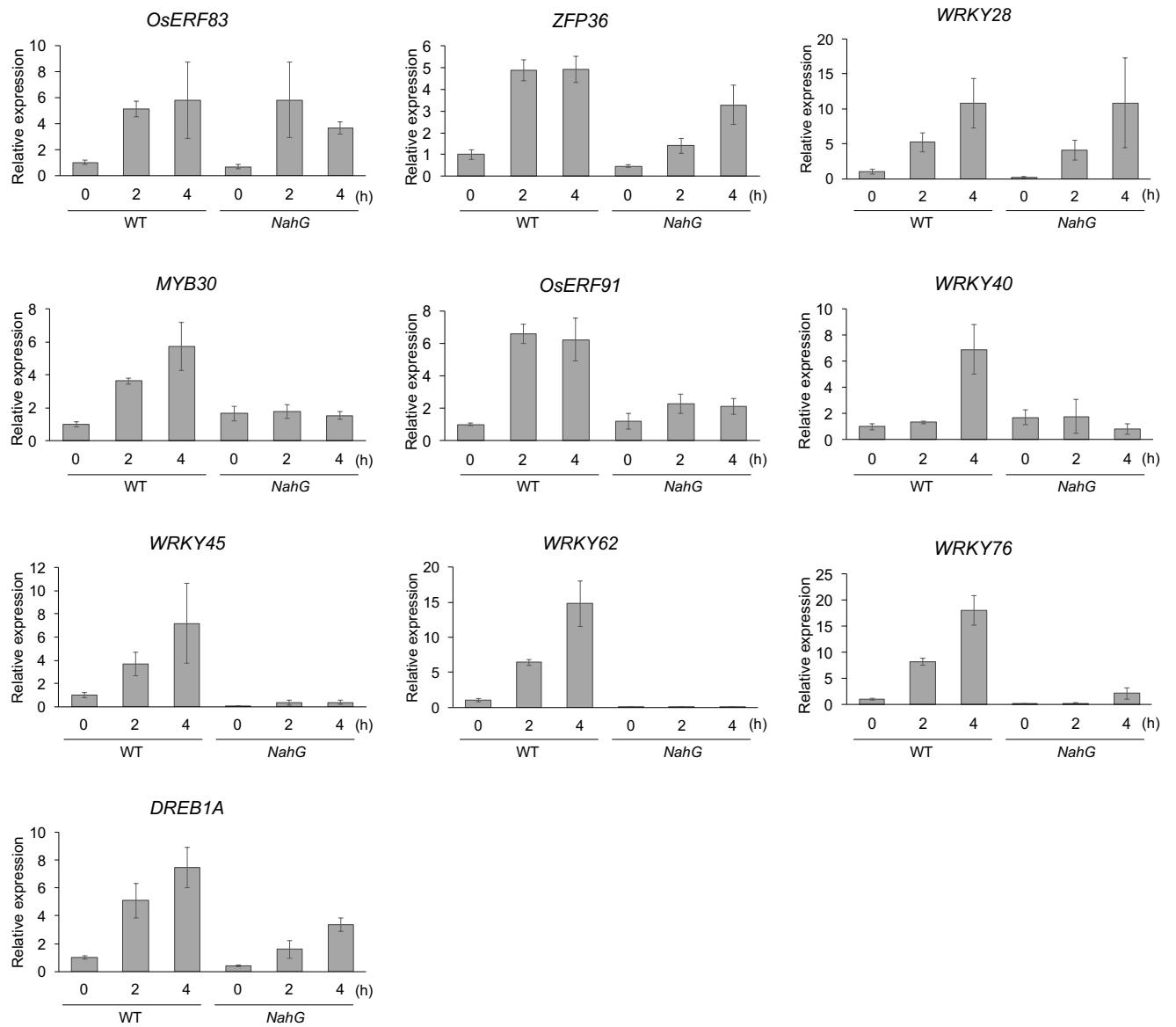
**Fig. 2-6. Salicylate accumulation in roots and shoots during TSR**

Hydroponically grown 14-d-old seedlings were treated with trehalose by replacing water with 5 mM trehalose solution. Hormones were extracted from roots and shoots of the seedlings at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 24 h after initiation of the treatment. Data represents means  $\pm$  SE (n=4).



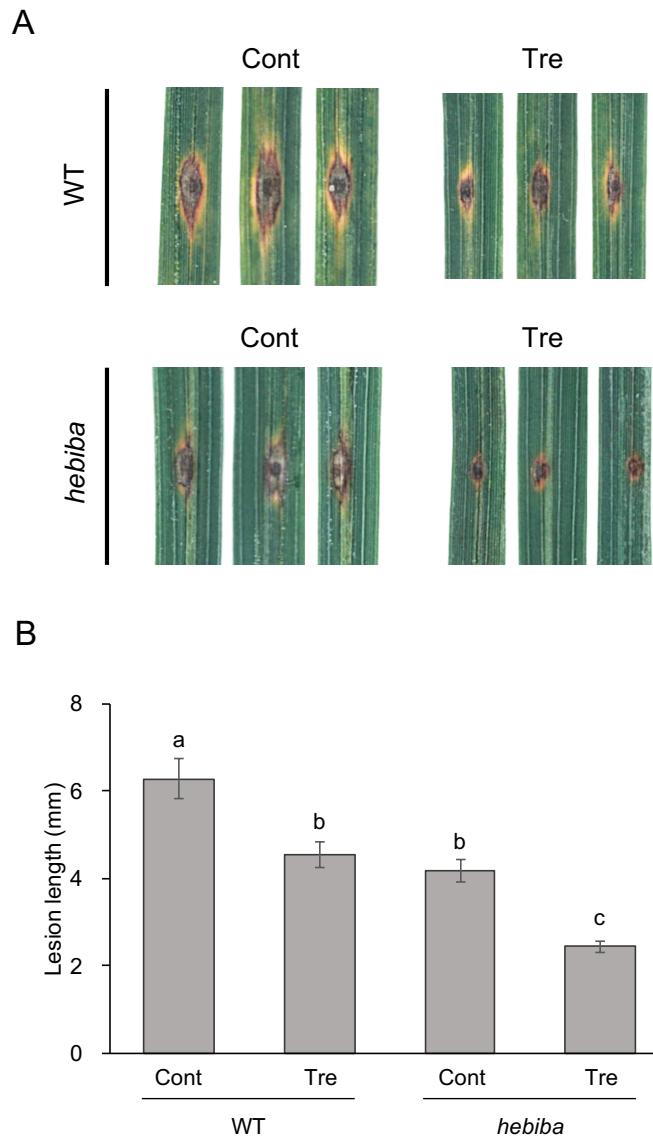
**Fig. 2-7. Expression analysis of trehalose inducible transcription factors using *hebiba***

Hydroponically grown 12-d-old seedlings were treated with 5 mM trehalose in roots. Total RNA was extracted from the roots and used for qRT-PCR. Wild-type plants (WT) and the JA biosynthesis mutant plants (*hebiba*) were used. Data represents means  $\pm$  SE (n=3) and ND means not detectable.



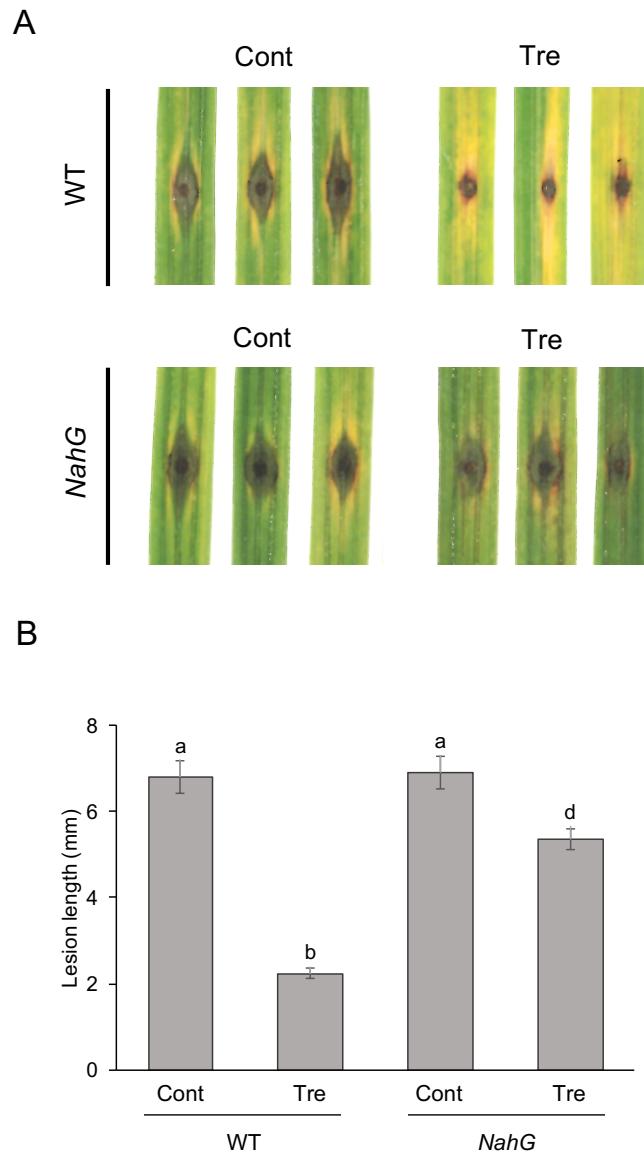
**Fig. 2-8. Expression analysis of trehalose inducible transcription factors using *NahG***

Hydroponically grown 12-d-old seedlings were treated with 5 mM trehalose in roots. Total RNA was extracted from the roots and used for qRT-PCR. Wild-type plants (WT) and the SA deficient transgenic plants (*NahG*) were used. Data represents means  $\pm$  SE (n=3).



**Fig. 2-9. Disease resistance of trehalose-treated rice using *hebiba***

(A,B) Twenty one-d-old wild-type and *hebiba* plants were treated with 5 mM of trehalose for 5 d. Blast resistnace was analyzed using the 5th leaf tissue. Data represents mean  $\pm$  SE (n=24). Different letters indicate the statistically differences (tukey test, p < 0.05).



**Fig. 2-10. Disease resistance of trehalose-treated rice using *NahG***

(A,B) Twenty one-d-old wild-type and *NahG* plants were treated with 5 mM of trehalose for 5 d. Blast resistnace was analyzed using the 5th leaf tissue. Data represents mean  $\pm$  SE (n=30). Different letters indicate the statistically differences (tukey test, p < 0.05).

## 第3章 トレハロース蓄積量改変株における防御応答の解析

### 第1節 緒論

TSR はトレハロース特異的に引き起こされる現象であるが、トレハロースがどのようにして TSR を誘起するかは不明である。TSR の誘起様式としては、以下の 3 つの可能性が考えられる。すなわち、細胞外のトレハロースが細胞膜に物理的に干渉することで TSR を引き起こす可能性、細胞外のトレハロースが細胞膜上の受容体に認識されることで TSR を引き起こす可能性、細胞外から取り込まれたトレハロースが細胞内に蓄積することで TSR を引き起こす可能性である。このうち 3 つの可能性を検証するためには、細胞内のトレハロース蓄積量を増加させた株を用いて、防御関連遺伝子の発現や、イネいもち病抵抗性の解析を行うことが有効である。

高等植物におけるトレハロースの蓄積量は、TPS および TPP に触媒される生合成反応と、トレハラーゼに触媒される加水分解反応によって制御される。高等植物に保存されるトレハラーゼは、アミノ酸配列の類似性から糖質加水分解酵素ファミリー (glycoside hydrolase family, GH family) 37 に分類される。興味深いことに、2 つの生合成酵素遺伝子がそれぞれ多重コピーで保存されているのに対し、トレハラーゼ遺伝子はゲノム中に 1 コピーしか存在しない。そのため高等植物でのトレハロース分解は単一の遺伝子によって制御されると考えられる。またイネのトレハラーゼ OsTRE1 は細胞質に局在することが示されており

(Islam et al., 2018) , トレハロースの蓄積と分解を行う場は、細胞内の細胞質である可能性が高い。

本章では TSR の誘起様式を検討するため, *OsTRE1* 遺伝子を破壊したトレハロース高蓄積株を作出し、作出された変異株において TSR 様の現象が観察されるかを調べた。

## 第2節 実験材料および方法

### 第1項 主な培地および試薬の組成

#### N6D 培地

CHU N6 salts (Sigma)	4 g
N6 vitamin ( $\times 100$ )	10 mL
<i>myo</i> -Inositol	100 mg
Casamino acid	300 mg
Proline	2.8 g
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2 mg
Sucrose	30 g

NaOH で pH 5.8 に合わせた後, gellan gum 3 g を加え, 1000 mL に調整した.

121°C, 20 分間オートクレーブした.

#### N6 vitamin ( $\times 100$ )

Glycine	20 mg
Nicotinic acid	5 mg
Pyridoxine, hydrochloride	5 mg
Thiamine, hydrochloride	20 mg
H <sub>2</sub> O	to 100 mL

#### AB 培地

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	150 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	12 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.5 mg

Glucose 5 g

NaOH で pH 7.2 に合わせた後, agar 15 g を加え, 1000 mL に調整した.

121°C, 20 分間オートクレーブし, 1 M MgSO<sub>4</sub> を 1.22 mL 加えた.

#### AAM 液体培地

1000×AA1	1 mL
1000×AA2	1 mL
1000×AA3	1 mL
1000×AA4	1 mL
1000×AA5	1 mL
200×AA6	5 mL
100×AA sol.	10 mL
Casamino acid	0.5 g
Sucrose	68.5 g
Glucose	36 g
L-glutamine	900 mg
L-aspartate	300 mg
KCl	3 g

NaOH で pH 5.2 に合わせた後, 1000 mL に調整した. 121°C, 20 分間オートクレーブし, 10 mg/mL アセトシリソノン (3', 5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone, in DMSO) を 1 mL 加えた.

#### AA stock solutions (10 mL)

##### 1000×AA1

MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	30 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.25 mg

CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.25 mg
KI	7.5 mg
H <sub>2</sub> O	to 10 mL

## 1000×AA2

CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5 g
H <sub>2</sub> O	to 10 mL

## 1000×AA3

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.5 g
H <sub>2</sub> O	to 10 mL

## 1000×AA4

Fe-EDTA	0.4 g
H <sub>2</sub> O	to 10 mL

## 1000×AA5

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5 g
H <sub>2</sub> O	to 10 mL

## 1000×AA6

<i>myo</i> -Inositol	10 g
Nicotinic acid	100 mg
Pyridoxine, hydrochloride	100 mg
Thiamine, hydrochloride	1 g
H <sub>2</sub> O	to 500 mL

100×AA sol.

L-arginine	1.6 g
Glycine	75 mg
H <sub>2</sub> O	to 100 mL

2N6AS 培地

CHU N6 salts (Sigma)	4 g
N6 vitamin (×100)	10 mL
<i>myo</i> -Inositol	100 mg
Casamino acid	300 mg
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2 mg
Sucrose	30 g
Glucose	10 g

NaOH で pH 5.2 に合わせた後, gellan gum 4 g を加え 1000 mL に調整した。

121°C, 20 分間オートクレーブし, 10 mg/mL アセトシリソゴンを 1 mL 加えた。

MSNK 培地

MS salts (Sigma)	4.3 g
MS vitamin (×100)	10 mL
<i>myo</i> -Inositol	100 mg
Casamino acid	2 g
Kinetin (0.1 mg/mL)	20 mL
NAA (0.2 mg/mL)	1 mL
Sucrose	30 g
Sorbitol	30 g

NaOH で pH 5.8 に合わせた後, gellan gum 3 g を加え 1000 mL に調整した.  
121°C, 20 分間オートクレーブし, 250 mg/mL カルベニシリン, 50 mg/mL ハイグロマイシンを 1 mL ずつ加えた.

#### MS vitamin (×100)

Glycine	20 mg
Nicotinic acid	50 mg
Pyridoxine, hydrochloride	100 mg
Thiamine, hydrochloride	100 mg
H <sub>2</sub> O	to 100 mL

#### 第 2 項 植物材料

野生型株として, イネ (*Oryza sativa L.*) 品種「ゆきひかり」を使用した.

#### 第 3 項 ゲノム編集コンストラクトの作製

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行うため, ガイド RNA および Cas9 タンパク質をコードするコンストラクトを作製した. ゲノム編集標的部位をコードする相補な 1 本鎖オリゴマーセットを超純水に溶解し, 95°C で熱処理した後, 室温で 20 分間静置することで 2 本鎖オリゴマーとした. 調製された 2 本鎖オリゴマーを *Bbs I* で切断された pU6gRNA に導入した. この pU6gRNA を *Pac I* および *Asc I* で切断し, 発現ベクター pZDgRNA\_Cas9\_ver.2\_HPT に導入することでゲノム編集コンストラクトとした. 作製したコンストラクトは *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株に導入し, イネ形質転換に用いた. ゲ

ノム編集標的部位は *OsTRE1* のエキソン中に 2箇所設定し、オリゴマーセットには以下の配列を用いた。Target2, 5'-GTTGACCTGGGCAGGAACCCGGG-3' および 5'-AAACCCGGTTCCTGCCAGGGT-3'; Target3, 5'-GTTGGCAGGTGACGTAGAGCTTG-3' および 5'-AACCAAGCTCTACGTCGACCTGC-3'. pU6gRNA および pZDgRNA\_Cas9 ver.2\_HPT は、農業・食品産業技術総合研究機構の遠藤真咲博士よりご提供いただいた。

#### 第 4 項 種子滅菌

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。

#### 第 5 項 形質転換イネの作出

形質転換イネの作出は *A. tumefaciens* を用いた標準的な方法で行った (Hiei et al., 1994)。第 4 項の方法に準じて調製した滅菌種子を N6D 培地に播種し、3 週間培養することでカルスを誘導した。誘導されたカルスは AAM 液体培地で調製した *A. tumefaciens* 懸濁液に浸することで、*A. tumefaciens* に感染させた。感染後のカルスを 2N6AS 培地上で 3 日間共存培養した。共存培養後、カルスを滅菌水でよく洗い、50 µg/mL ハイグロマイシンおよび 250 µg/mL カルベニシリンを含む N6D 培地上に置床し、さらに 3 週間培養した。増殖してきたカルスは MSNK 培地に移すことで再分化させ、再生した植物体は 3 日間水耕栽培で馴化させた後、土へ移植した。

## 第 6 項 ゲノム DNA 抽出

ゲノム DNA の抽出は塩化ベンジルを用いて行った。地上部を液体窒素で急速凍結させ、マルチビーズショッカーを用いて破碎した。破碎組織に緩衝液[100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM EDTA, 1.67% SDS] 300 µL, 塩化ベンジル(Wako) 150 µL を加え、50°C で 15 分間熱処理した。熱処理後、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 150 µL を加え、氷上に 15 分間静置した。その後混合液を 12,000×g, 15 min の遠心分離に供し上清を回収した。上清に 2 倍量のエタノールを加え 12,000×g, 15 min で遠心分離することでゲノム DNA を沈殿させた。沈殿した DNA は 70%エタノールで洗浄し、超純水に溶解することでゲノム DNA 溶液とした。

## 第 7 項 ゲノム PCR およびシークエンス解析

PCR 酵素には EX Taq を用いた。反応液はマニュアルに準じて調製し、ゲノム編集標的部位を含む *OsTRE1* の部分配列を、以下のプライマーセットを用いて增幅した。5'-CTCCTCGTCCTCACAAAC-3' および 5'-TAGTAGACCTCCCCGGAAC-3'. PCR 条件は 98°C, 3 分間の熱変性後、98°C, 10 秒間の熱変性、55°C, 30 秒間のアニーリング、72°C, 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル行った。增幅された断片を pGEM-T Easy Vector (Promega) に導入した。シークエンス解析は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

## 第 8 項 水耕栽培

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。ただし人工気象器内の光条件は 16 時間明期／8 時間暗期とした。

## 第 9 項 RNA 抽出・cDNA 合成

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。

## 第 10 項 半定量的 RT-PCR

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。*OsTRE1* の部分配列の增幅は、プライマー 5'-GGGTATTCCCTCACTGCTG-3' と 5'-GCGCGGTTCTGTGAGATAG-3' を用い、PCR 条件は 98°C, 3 分間の熱変性後、98°C, 10 秒間の熱変性、55°C, 30 秒間のアニーリング、72°C, 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル行った。また *OsACT1* の部分配列の增幅は、プライマー 5'-TCCATCTGGCATCTCTCAG-3' と 5'-GTACCCTCATCAGGCATCTG-3' を用い、PCR 条件は 98°C, 3 分間の熱変性後、98°C, 10 秒間の熱変性、55°C, 30 秒間のアニーリング、72°C, 30 秒間の伸長反応を 26 サイクル行った。

## 第 11 項 NaCl 処理

NaCl 処理は、水耕栽培した 12 日齢の幼苗をプラスチックメッシュごと、150 mM NaCl (Wako) で満たされたバットへ移し、根部を NaCl 水溶液中に 24 時間保持することで行った。

## 第 12 項 トレハラーゼ活性測定

第 11 項の方法に準じて, NaCl 処理前 (12 日齢) および NaCl 処理後 (13 日齢) の幼苗の根部を回収した。回収した組織を液体窒素で急速凍結させ, マルチビーズショッカーを用いて破碎した。破碎した組織に 50 mM MES-KOH (pH 5.7) を加えて攪拌し, 12,000×g, 20 分間の遠心分離を行った。得られた上清をさらに 14,000×g, 10 分間の遠心分離に供することで, 残渣を完全に除去した。得られた粗タンパク質溶液は, Amicon Ultra-0.5, 10 kDa (Merck) を用いて濃縮した。タンパク質濃度の測定は Takara Bradford Protein Assay Kit (Takara) を用いて行い, 標準物質には付属のウシ血清アルブミンを用いた。

トレハラーゼ活性は, トレハロース加水分解により生じる遊離のグルコースを定量することで評価した。反応液 [50 mM MES-KOH (pH 5.7), 10 mM trehalose 999 (Hayashibara), crude protein 20 µg] 100 µL を 30°C で 60 分間反応させ, その後 100°C, 10 分間の熱処理で反応を停止させた。反応液中のグルコース量は, グルコース CII-テストワコー (Wako) により発色反応を行った後, 505 nm における吸光度を測定することで算出した。本条件で 1 分間に 2 nmol のグルコースを与える酵素量を 1 U とした。

## 第 13 項 可溶性糖の抽出

水耕栽培した12日齢の幼苗を用いた。根部および地上部をそれぞれ回収し, 液体窒素で急速凍結させ, マルチビーズショッカーを用いて破碎した。破碎した組織に0.1 mM ラクトース水溶液をサンプル100 mgに対し1 mL加え, 30分間煮沸した。その後氷上で急冷し12,000×g, 5分間の遠心分離を行った。上清を回収

し、さらに $14,000 \times g$ 、10分間の遠心分離を行い残渣を除去した。得られた溶液は $0.45 \mu\text{m}$ 孔フィルターで濾過することで測定用サンプルとした。

#### 第 14 項 可溶性糖の測定

可溶性糖の測定は、イオンクロマトグラフィー (DIONEX ICS-5000+) と、パルスドアンペロメトリー検出器を用いて行った。カラムには CarboPac PA1 を用い、溶出は  $40 \text{ mM NaOH}$  で 40 分間行った。グルコース、フルクトース、スクロース、トレハロース、およびラクトースの同定は標準品の保持時間との比較により行い、各糖濃度は標準品を用いて作成した検量線をもとに算出した。得られた濃度を内部標準物質 (ラクトース) の濃度で補正することで、生重量当たりの糖蓄積量を算出した。

#### 第 15 項 リアルタイム PCR

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。反応に用いたプライマーの配列は Table 3-1 に示す。

### 第3節 実験結果

#### 第1項 *OsTRE1* 変異株の作出

*OsTRE1* 変異株を作出するため、当該遺伝子の第1エキソンに2箇所のゲノム編集標的部位（Target 2 および Target 3）を設定した（Fig. 3-1A）。CRISPR/Cas9を用いて各標的部位からそれぞれ1系統の*OsTRE1*変異株（2.15-2 系統および 3.4-2 系統）を作出した。各変異株からゲノム DNA を抽出し、*OsTRE1* 遺伝子の配列を解析したところ、2.15-2 系統では野生型*OsTRE1* 遺伝子と比較して2塩基の欠失、3.4-2 系統では7塩基の欠失と1塩基の置換が観察された（Fig. 3-1B）。得られた遺伝子型から、各変異株の*OsTRE1*がコードするタンパク質を推定したところ、2.15-2 系統では100番目のグリシン、3.4-2 系統では40番目のリシン以降のアミノ酸配列が、野生型*OsTRE1*と異なっていた（Fig. 3-2）。また各変異株では、推定タンパク質の全長も野生型*OsTRE1*と比較して短くなっていた（Fig. 3-2）。

#### 第2項 *OsTRE1* 変異株における*OsTRE1* の発現

ゲノムへの変異導入が、*OsTRE1* の発現に影響を与えるかを検討した。水耕栽培した12日齢の幼苗の根部からRNAを抽出し、半定量的RT-PCRを用いて*OsTRE1*の発現を観察した。またこの時、增幅する部分断片は変異導入箇所より下流の3'末端側とした。発現解析の結果、2.15-2 系統および 3.4-2 系統では野生型株と比較して*OsTRE1*の発現が低下していた（Fig. 3-3）。従ってゲノムへの変異導入により、*OsTRE1*のmRNA蓄積量が減少することが示された。

### 第3項 *OsTRE1* 変異株のトレハラーゼ活性

第1項および第2項の結果から、*OsTRE1* 変異株ではトレハラーゼ活性が低下していると予想された。そこで水耕栽培した12日齢の幼苗の根部から粗タンパク質を抽出し、*in vitro* でのトレハラーゼ活性を測定した。その結果、*OsTRE1* 変異株のトレハラーゼ活性は、野生型株と比較して2.15-2系で29%、3.4-2系で18%まで低下していた（Fig. 3-4）。また *OsTRE1* は NaCl 処理により発現誘導され、根部でのトレハラーゼ活性を上昇させる（Islam et al., 2018）。そこで NaCl 処理を施した根部においても、同様のトレハラーゼ活性測定を行った。水耕栽培した12日齢の幼苗の根部を 150 mM NaCl で 24 時間処理した。処理後の根部から粗タンパク質を抽出し、トレハラーゼ活性を測定した。野生型株では、NaCl 処理により根部でのトレハラーゼ活性が2.3倍に上昇したのに対し、各変異株では NaCl 処理によるトレハラーゼ活性の上昇が観察されなかつた（Fig. 3-4）。以上の結果より、*OsTRE1* 変異株の根部ではトレハラーゼ活性が低下することが示された。

### 第4項 *OsTRE1* 変異株における可溶性糖の蓄積

トレハラーゼ活性の低下による糖蓄積量の変化を調べるために、水耕栽培した12日齢の幼苗の根部および地上部を用いて、トレハロース、グルコース、フルクトース、およびスクロースの蓄積量を定量した。根部でのトレハロース蓄積量は、野生型株が 64 µg/gFW であったのに対し、2.15-2 系統は 178 µg/gFW、3.4-2 系統は 240 µg/gFW であった（Fig. 3-5）。これは野生型株のトレハロース蓄積量の2.8倍および3.8倍であり、*OsTRE1* 変異株の根部ではトレハロースが

高蓄積することが明らかとなった。また根部におけるグルコースとフルクトースの蓄積量は、野生型株と *OsTRE1* 変異株の間で差は見られなかった。スクロース蓄積量については 2.15-2 系統でのみ減少が観察された (Fig. 3-5)。

地上部でのトレハロース蓄積量は、野生型株が 52 µg/gFW であったのに対し、2.15-2 系統は 192 µg/gFW、3.4-2 系統は 247 µg/gFW であった (Fig. 3-6)。これは野生型株のトレハロース蓄積量の 3.7 倍および 4.8 倍であり、*OsTRE1* 変異株では地上部においてもトレハロースが高蓄積していた。また地上部におけるフルクトースとスクロースの蓄積量は、野生型株と比較して *OsTRE1* 変異株で増加していた。グルコース蓄積量については 2.15-2 系統でのみ増加が観察された (Fig. 3-6)。

## 第 5 項 トレハロース高蓄積による防御関遺伝子の発現変動

ここまで結果から、*OsTRE1* 変異株ではトレハラーゼ活性が低下し、根部および地上部にトレハロースが高蓄積することが明らかとなった。そこで *OsTRE1* 変異株において、TSR に見られる根部での防御関連遺伝子の発現誘導が観察されるかを調べた。水耕栽培した 12 日齢の幼苗の根部を用いて、トレハロース誘導性遺伝子、*PR1#073*, *LOX8*, *JAmyb*, *OsKSL4*, および *OsKSL7* の発現を観察した。その結果、*LOX8* および *OsKSL4* の発現は、野生型株と *OsTRE1* 変異株の間で差は観察されなかった (Fig. 3-7)。一方で、*PR1#073*, *JAmyb*, および *OsKSL7* の発現は、2.15-2 系統でのみ上昇した (Fig. 3-7)。従って *OsTRE1* 変異株の根部では、2.15-2 系統でのみ、一部のトレハロース誘

導性遺伝子 (*PR1#073*, *JAmyb*, *OsKSL7*) の発現が誘導されるが、2つの系統に共通する、トレハロース誘導性遺伝子の発現誘導は観察されなかった。

#### 第4節 考察

根部へのトレハロース処理は TSR を誘起する。しかしトレハロースがどのようにして TSR を誘起するかは不明である。本章では、細胞内のトレハロース蓄積が TSR を引き起こす可能性について検証した。CRISPR/Cas9 を用いて作出した *OsTRE1* 変異株では、トレハラーゼ活性の低下と、根部および地上部でのトレハロース高蓄積が観察された。*OsTRE1* 変異株の根部では、2.15-2 系統のみ、一部のトレハロース誘導性遺伝子の発現誘導が観察されたが、2 つの系統に共通する、トレハロース誘導性遺伝子の発現誘導は観察されなかった。

mRNA の読み枠の途中に新たな終止コドンを生じさせる変異をナンセンス変異という。真核生物では、ナンセンス変異を持つ mRNA による異常タンパク質の蓄積を防ぐため、変異型 mRNA を選択的に分解する経路 (Nonsense-mediated mRNA decay, NMD) が存在する (Maquat, 2002)。作出了 2 系統の *OsTRE1* 変異株では、*OsTRE1* の mRNA にフレームシフトに起因する新たな終始コドンが生じると推定された (Fig. 3-2)。そのため変異株における *OsTRE1* の mRNA 蓄積量の減少は (Fig. 3-3)，NMD による分解機構が働いたためであると考えられる。

粗タンパク質を用いた解析から、*OsTRE1* 変異株ではトレハラーゼ活性の低下が観察されたが、活性の完全な消失は見られなかった (Fig. 3-4)。*OsTRE1* の mRNA についても蓄積の完全な消失は見られず (Fig. 3-3)，これが変異株の残存トレハラーゼ活性の原因にも見える。しかし遺伝子型解析から、各変異株において *OsTRE1* が機能を保持している可能性は考えにくい (Fig. 3-1, 3-2)。

そのため変異株で検出されたトレハラーゼ活性は *OsTRE1* と異なるタンパク質に由来する可能性がある。トレハラーゼは一般的に GH15, 37, および 65 に分類されるが (Shukla et al., 2015), イネにおいては GH15 および 65 をコードする遺伝子は見出されていない。従ってイネには、未知のトレハロース分解酵素が存在する可能性が考えられる。

*OsTRE1* 変異株における可溶性糖の解析から、地上部ではトレハロース蓄積量が増加するだけでなく、フルクトースおよびスクロースの蓄積量も増加することが明らかとなった (Fig. 3-6)。シロイヌナズナでは、トレハロース生合成の中間体である Tre6P の蓄積量が、グルコース、フルクトース、およびスクロースの蓄積量と、正の相関関係にあることが示されている (Yadav et al., 2014)。そのためトレハロース蓄積量も、他の糖蓄積量と正の相関関係にある可能性は十分に考えられる。一方で根部においては、地上部で観察されるような、トレハロース蓄積量と他の糖蓄積量との関係は見出されなかった (Fig. 3-5)。根部は一般にシンク器官であると考えられ、炭水化物の多くは緑葉などのソース器官から転流してくるスクロースに由来する (Ward et al., 1998)。従ってこの結果は、トレハロースの高蓄積が糖転流に影響を与えない可能性を示唆している。

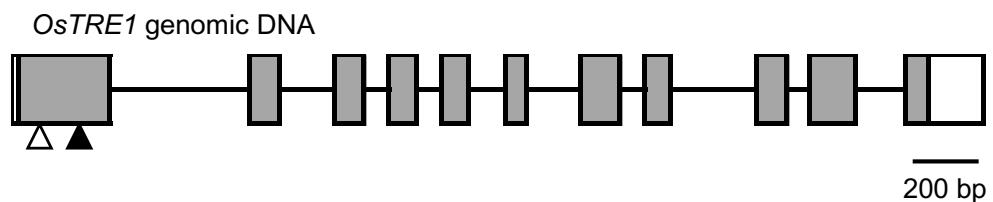
*OsTRE1* 変異株の根部を用いて、TSR で誘導される遺伝子 5 種の発現を解析した結果、2.15-2 系統でのみ *PR1#073*, *JAmyb*, および *OsKSL7* の発現誘導が観察された (Fig. 3-7)。2.15-2 系統と 3.4-2 系統は、いずれも根部にトレハロースを高蓄積している。そのため、この発現誘導の原因がトレハロース蓄積であるとは考えにくく、スクロース蓄積量など他の原因を考える必要がある。また *LOX8* および *OsKSL4* の発現は、野生型株と *OsTRE1* 変異株の間で差は見られ

なかつた (Fig. 3-7) . 以上のことから, *OsTRE1* 変異株では, 2 つの系統に共通するトレハロース誘導性遺伝子の発現誘導は観察されず, トレハロース高蓄積が TSR 様の現象を引き起こす可能性は低いと考えられる. TSR は細胞外のトレハロースによって誘起される可能性が高い.

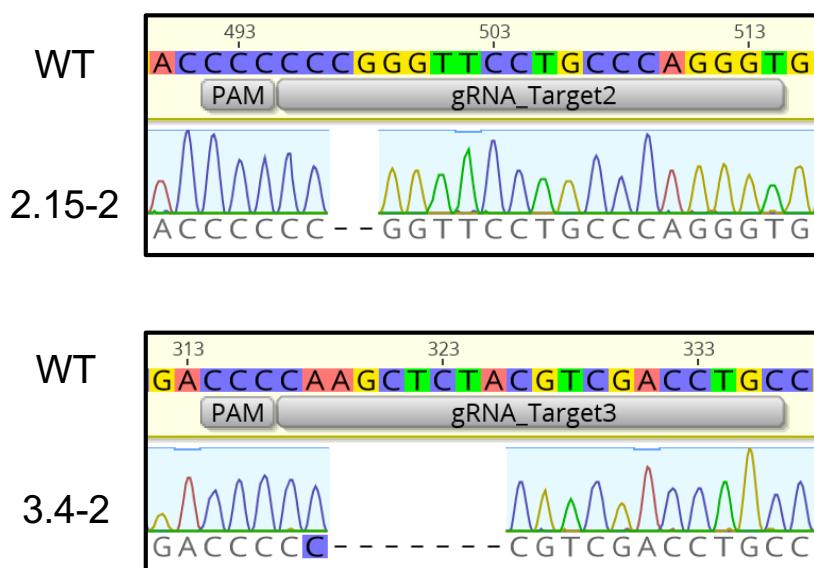
Table 3-1. Primers used in qRT-PCR

Gene name	RAP ID	MSU ID	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
OsACT1	Os03g0718100	LOC_Os03g50890	TCTCTCTGTATGCCAGTGGTCG	GTCGAGACGAAGGATAGCATGG
PR1#073	Os07g0127600	LOC_Os07g03590	TTATATATGTATGTTCGTATGTATGTATGC	TGATGTAATTCCATCCGACAC
LOX8	Os08g0509100	LOC_Os08g39850	TGGGAGGACATCTACTTGC	AACATCAACAACAACCACCTTC
JAmyb	Os11g0684000	LOC_Os11g45740	GCAAGAGGTTCAAGGATGCCA	AGCTAGTCACCATGCTCGGA
KSL4	Os04g0179700	LOC_Os04g10060	CGCCTTGTAACTCTAAGGTA	ACGTAAAAGGCTTGTATATC
KSL7	Os02g0570400	LOC_Os02g36140	TTCATCTCTGTCACTTTCTTTT	ATCCCAACGAAGTCATCCAC

A

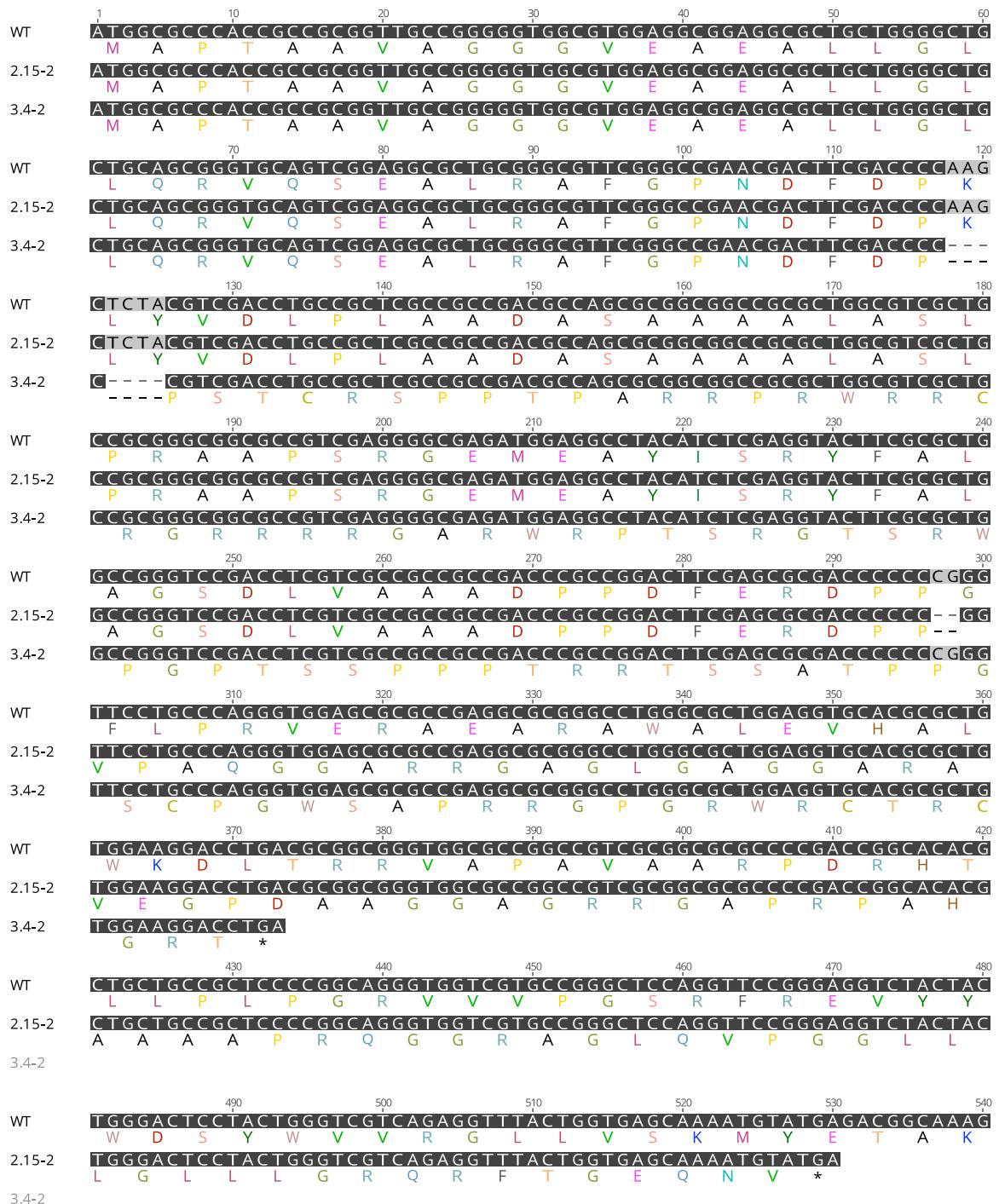


B



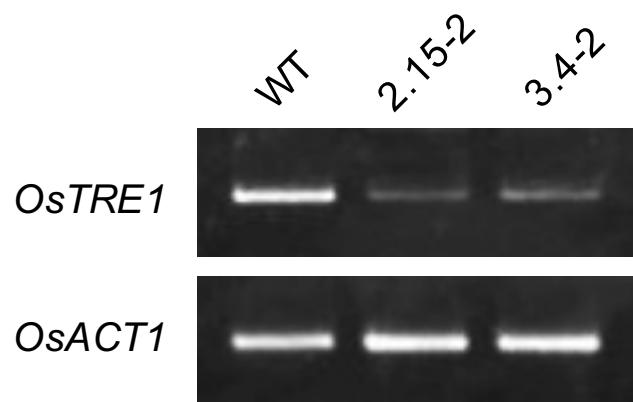
**Fig. 3-1 . Creation of the *ostre1* mutants**

(A) Structure of the *OsTRE1* gene. UTR, exon, and intron were indicated by white box, gray box, and black horizontal line, respectively. Edited genome site of two independent lines, 2.15-2 and 3.4-2, locate on black and white triangle, respectively. (B) Edited genome sequence of line 2.15-2 and line 3.4-2.



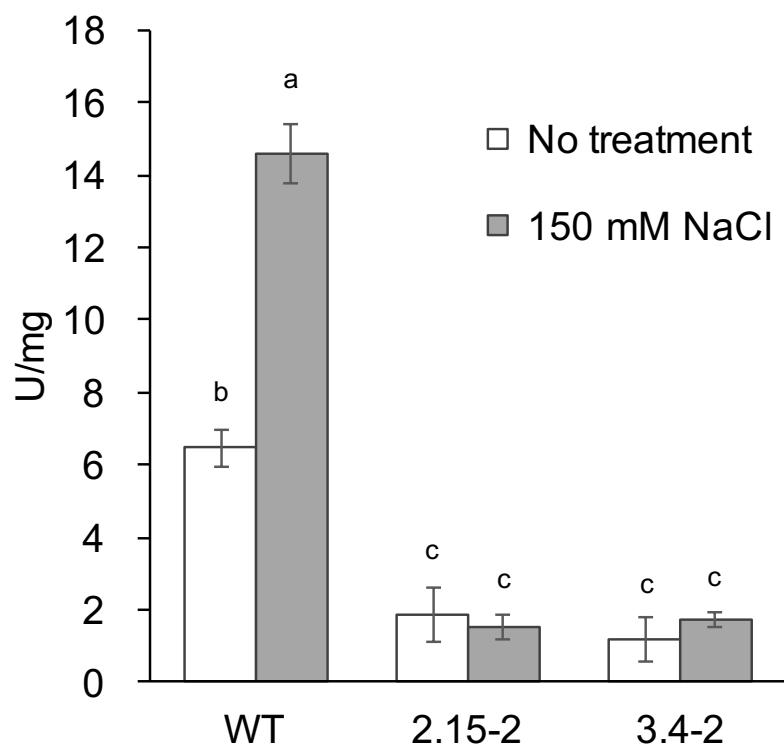
**Fig. 3-2 . Alignment of the cDNA sequences encoded by *OsTRE1*.**

The cDNA sequences of *OsTRE1* derived from wild-type (AK108163), 2.15-2, and 3.4-2 were aligned. Deduced amino acid sequences were indicated below nucleotide sequence.



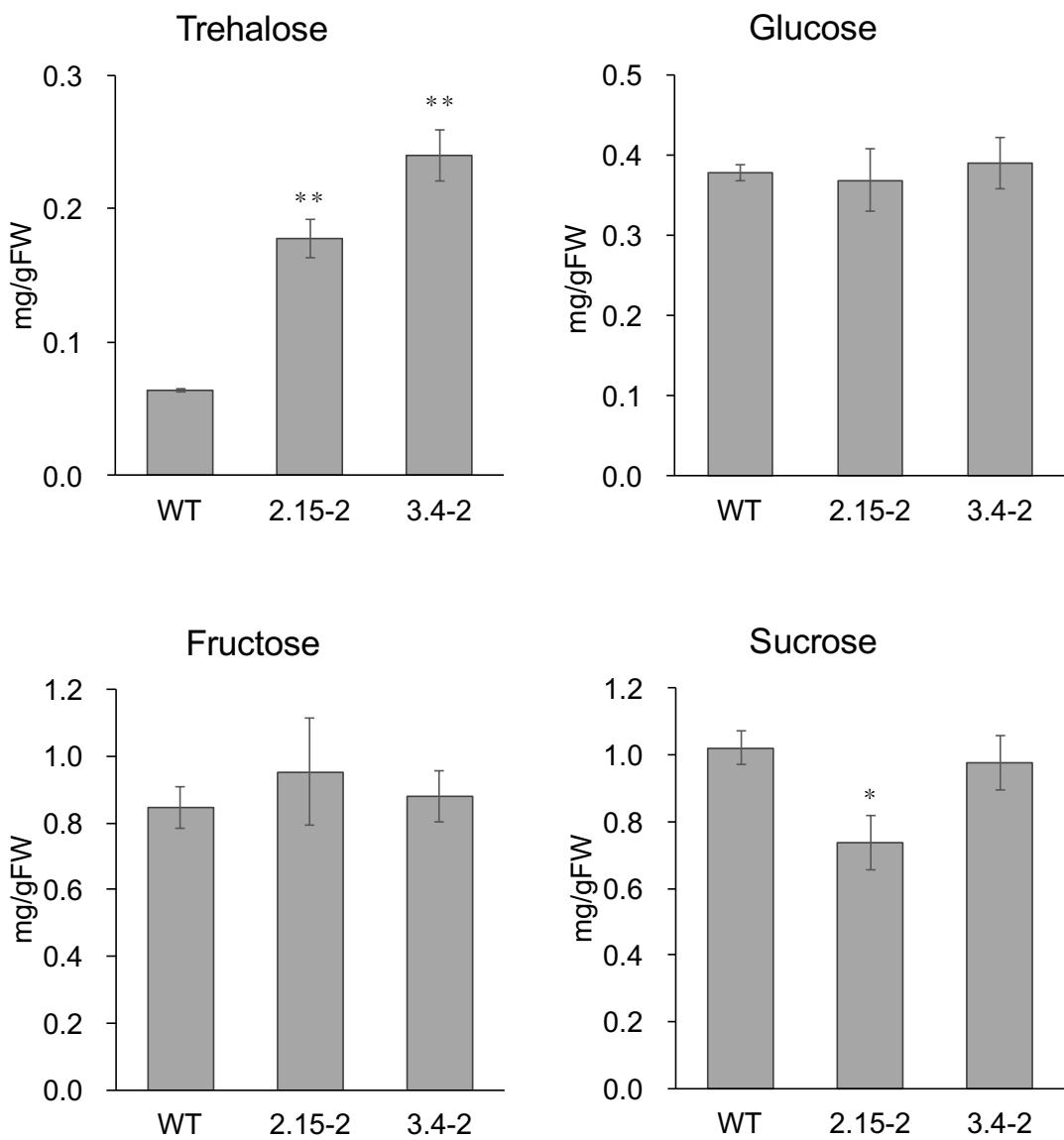
**Fig. 3-3. The expression of *OsTRE1* in the *ostre1* mutants**

Total RNA was extracted from the roots of 12-d-old seedlings. Semi-quantitative RT-PCR was performed using *OsTRE1*-specific primers. *OsACT1* expression was used as the endogenous control.



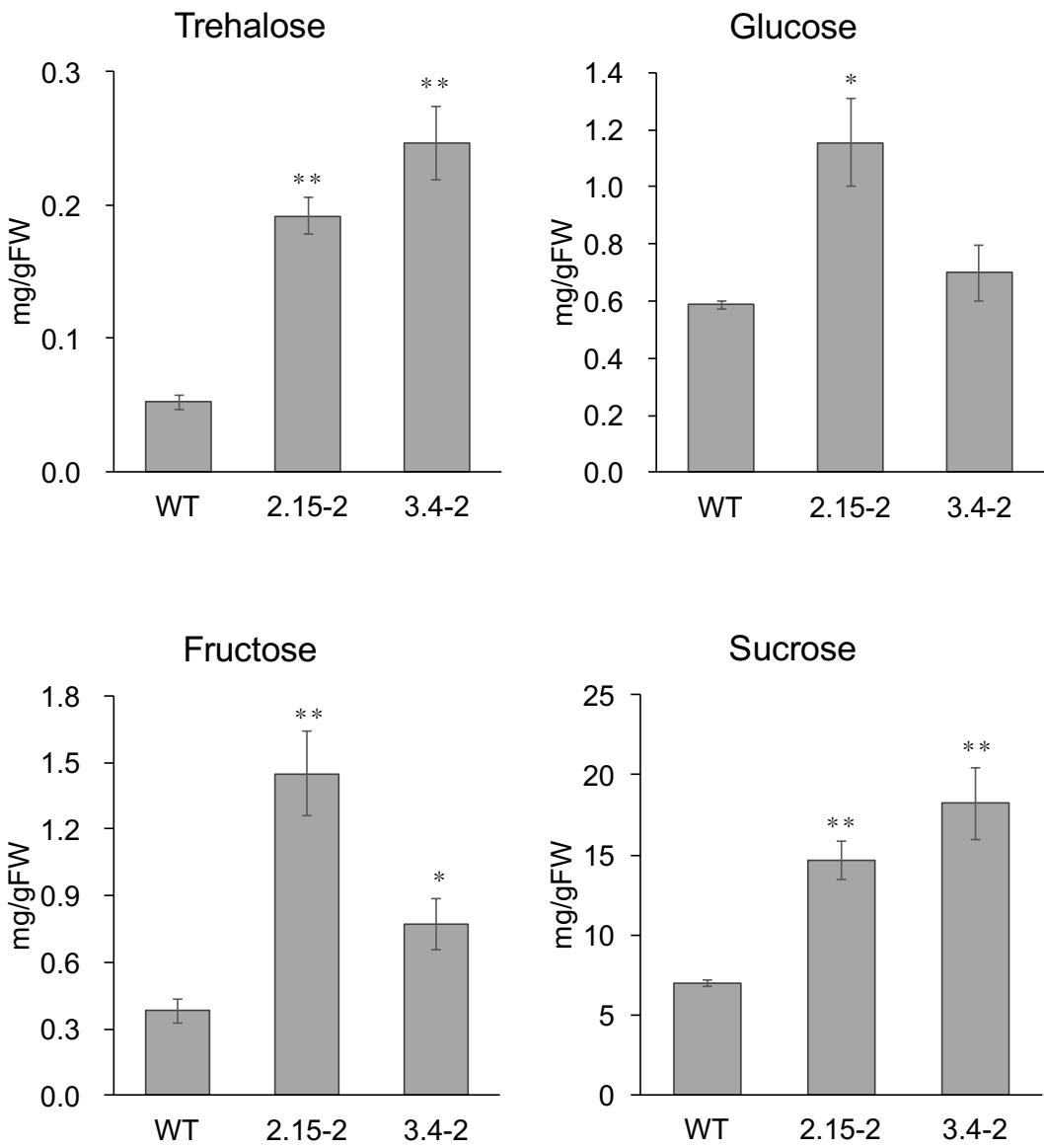
**Fig. 3-4 . Trehalase activity of the *ostre1* mutants**

Hydroponically grown 12-d-old seedlings were treated with 150 mM NaCl for 24 h. Crude protein was extracted from roots tissue collected before the treatment (No treatment) and after the treatment. Trehalose hydrolyzing activity was measured from the amount of glucose released from trehalose. Data represent means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Different letters indicate statistically significant differences with  $P < 0.05$  (Tukey test).



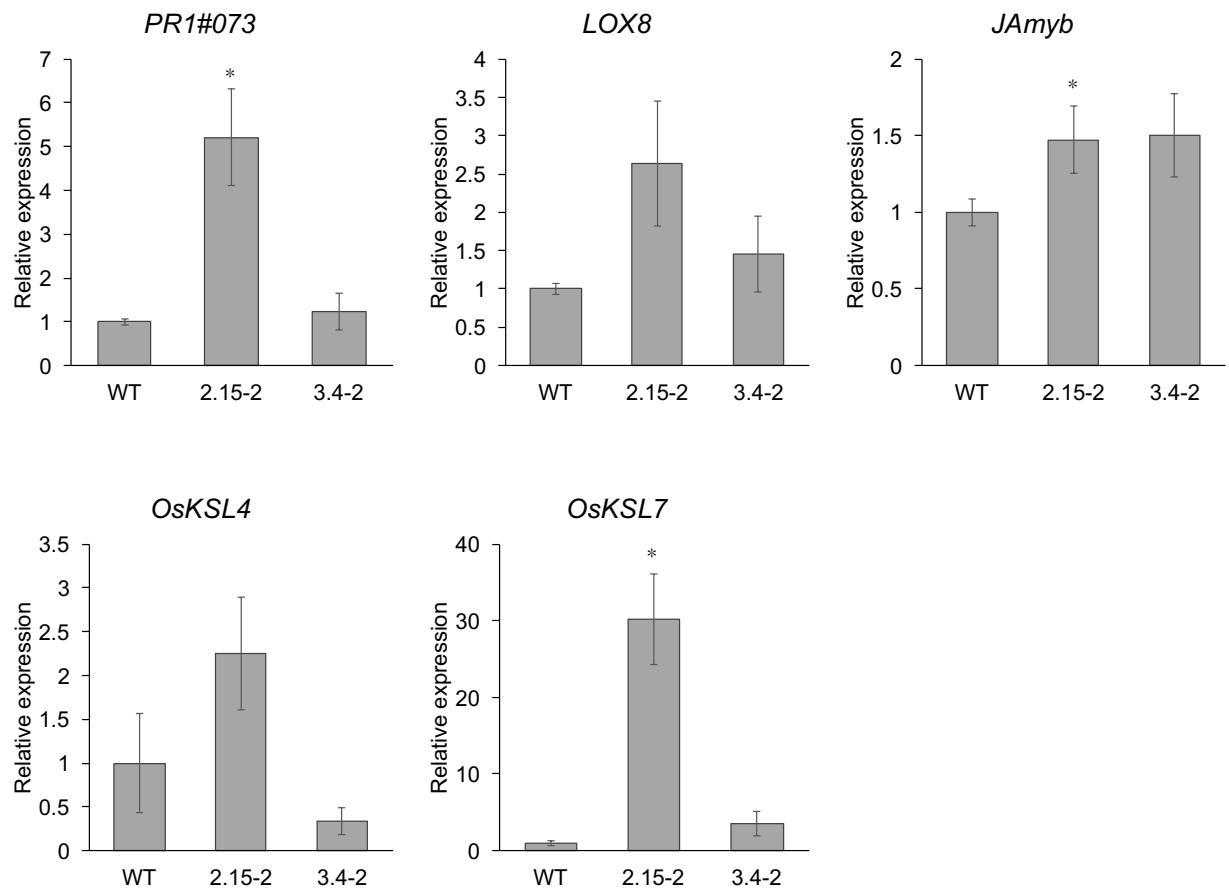
**Fig. 3-5. Soluble sugar contents of roots in the *ostre1* mutants**

Seedlings were grown under hydroponic conditions for 12 d. Soluble sugars were then extracted from the roots and quantified using HPAEC-PAD. The data represent means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate statistically significant differences compared with the wild-type (t test, \*:  $0.01 < p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).



**Fig. 3-6. Soluble sugar contents of shoots in the *ostre1* mutants**

Seedlings were grown under hydroponic conditions for 12 d. Soluble sugars were then extracted from the shoots and quantified using HPAEC-PAD. The data represent means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate statistically significant differences compared with the wild-type (t test, \*:  $0.01 < p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).



**Fig. 3-7. Expression analysis of trehalose-inducible genes in the *ostre1* mutants**

qRT-PCR was performed using total RNA isolated from wild type (WT) and mutants (lines 2.15-2 and 3.4-2) grown under hydroponic conditions. The expression level of each defense-related gene was normalized to the expression of *OsACT1*. The data represents mean  $\pm$  SE (n = 3). Asterisks indicate statistically significant differences compared with the wild-type (t test, p < 0.05).

## 第4章 トレハロース誘導性転写因子 OsERF83 の機能解析

### 第1節 緒論

Ethylene response factor (ERF) は、APETALA 2 (AP2)/ERF スーパーファミリーを構成するサブファミリーの 1 つであり、アミノ酸配列中に DNA 結合ドメインである AP2/ERF ドメインを 1 つ持つことによって特徴付けられる (Nakano et al., 2006; Riechmann et al., 2000). ERF はエチレン誘導性遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質として、タバコ (*Nicotiana tabacum*) において初めて報告された (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995). これまでに多くの植物種で ERF の機能解析が行われ、植物ホルモンのシグナル伝達 (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995), 生物・非生物ストレスへの応答 (Gu et al., 2000; Liu et al., 1998; Dubouzet et al., 2003), 二次代謝産物の生合成調節 (van der Fits and Memelink, 2000; Broun et al., 2004; Zhang et al., 2005), 葉や花芽の形態形成 (van der Graaff et al., 2000; Chuck et al., 1998) に関与することが示されている。

イネにおいては、ゲノム上に 77 コピーの *ERF* 遺伝子が見出されている (Sharoni et al., 2011). これまでの研究から、いくつかの *OsERF* 遺伝子が、乾燥、塩、および冠水ストレスなどの非生物ストレス耐性に関与すること (Hattori et al., 2009; Jung et al., 2010; Lee et al., 2016; Schmidt et al., 2013; Wan et al., 2011; Yu et al., 2017; Zhang et al., 2013)，また小穂の形態形成を制御することが明らかとなっている (Komatsu et al., 2003; Ren et al., 2013).

TSR を解析する過程で、トレハロース処理により早期に誘導される転写因子遺伝子として *OsERF83* を見出した。*OsERF83* のトレハロースによる発現誘導は、JA 生合成変異株において消失することから (Fig. 2-7)，*OsERF83* は TSR における JA 依存的なシグナル伝達経路に関与していると考えられる。本章では、TSR における JA シグナルの役割をさらに検討するため、*OsERF83* の機能解析を行い、*OsERF83* が制御する下流遺伝子を決定した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 第 1 項 植物材料

野生型株として、イネ (*Oryza sativa L.*) 品種「ゆきひかり」を使用した。ゆきひかりはイネいもち病真性抵抗性遺伝子座 *Pia* を持ち、イネいもち病菌 (race 007) に罹病する。

### 第 2 項 種子滅菌

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。

### 第 3 項 水耕および土耕栽培

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。

### 第 4 項 胞子懸濁液の調製

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。

### 第 5 項 イネいもち病菌のスプレー接種

水耕栽培した 12 日齢の幼苗の地上部に、第 4 項で調製した胞子懸濁液 3 mL をスプレーを用いて噴霧処理した。処理後の幼苗を生育バットごと密閉可能な透明プラスチックボックスへ入れ、25°C、暗所で 1 日培養した。その後プラスチックボックスを 25°C、連続光に設定された人工気象器内に移し、さらに 5 日間培養した。噴霧処理後は、イネいもち病菌の病斑形成を促すため、プラスチッ

クボックス内を高湿度に保った。

## 第 6 項 化合物処理

水耕栽培した 14 日齢の幼苗を用いた。幼苗の地上部へ、0.05% Tween 20 溶液で調製した、100 μM methyl jasmonate (MeJA) (Wako), 5 mM SA (nacalai tesque)，または 1 mM ethephon (Sigma-Aldrich) を 3 mL 噴霧した。また Mock として、0.05% Tween 20 溶液 3 mL を噴霧した区画も設けた。

## 第 7 項 RNA 抽出・cDNA 合成

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。

## 第 8 項 半定量的 RT-PCR

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。*OsERF83* の部分配列の增幅は、プライマー 一 5'-CATGTCGCTTCATCCTCACCC-3' と 5'-AGGTAGTCAGGTCCCAGGTC-3' を用い、PCR 条件は 98°C, 3 分間の熱変性後、98°C, 10 秒間の熱変性、55°C, 15 秒間のアニーリング、68°C, 30 秒間の伸長反応を 33 サイクル行った。また *OsACT1* の部分配列の增幅は、プライマー 一 5'-TCCATCTTGGCATCTCTCAG-3' と 5'-GTACCCTCATCAGGCATCTG-3' を用い、PCR 条件は 98°C, 3 分間の熱変性後、98°C, 10 秒間の熱変性、55°C, 15 秒間のアニーリング、68°C, 30 秒間の伸長反応を 26 サイクル行った。

## 第9項 細胞内局在解析

細胞内局在解析に用いる発現ベクター pUC-GWGFP を調製した。pGWB5 (Nakagawa et al., 2007) に含まれる 35S プロモーター領域と *sGFP* コード領域を, *Hind* III および *Sac* I を用いて切り出し, pUC19 (Takara) に導入した。続いて pAct-ZH2 (Sentoku et al., 2000) に含まれるノパリンシンターゼターミネーター領域を, *Sac* I および *Eco* RI を用いて切り出し, 先ほどの pUC19 に導入することで pUC-GWGFP とした。

ストップコドンを除く *OsERF83* の ORF を以下のプライマーセットを用いて増幅した。5'-AAAAAAGCAGGCTATGCATTGCTGCATGTCG-3' および 5'-AGAAAGCTGGTAGATGGAGTGTTGGCTTG-3'。增幅された断片を pDONR221 (Thermo Fisher Scientific) に導入し, つづいて LR 反応により発現ベクター pUC-GWGFP に導入した。作製したコンストラクトを 1.0 μm Gold particle (Bio-Rad) の表面にコーティングし, PDS-1000 biostatic delivery system (Bio-Rad) を用いて, タマネギ表皮細胞に導入した。タマネギ表皮細胞には, 市販のタマネギから取り外した鱗茎葉の内側の表皮細胞を用いた。形質転換細胞の観察は, GFP フィルターおよび Texas Red フィルターを備えた蛍光顕微鏡 (Leica DM6000B) を用いて行った。

## 第10項 Transactivation activity 試験

*OsERF83* の ORF を以下のプライマーセットを用いて増幅し, pEG202 (Gyuris et al., 1993) に導入した。5'-GAATTCATGCATTGCTGCATGTCGC-3' および 5'-CTCGAGTCAGATGGAGTGTTGGCTTG-3'。またコントロール用

コンストラクトとして、転写活性化ドメイン (*B42AD*) または *OsACT1* の ORF を pEG202 に導入した。作製したコンストラクトを酢酸リチウム法 (Schiestl and Gietz, 1989) を用いて酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) EGY48 株 (*MATa, ura3, his3, trp1, LexA(op(x6))-LEU2*) に導入した。形質転換された酵母をウラシル、ヒスチジン、トリプトファンを除いた SD 培地上で生育させた。転写活性化能は形質転換酵母のロイシン要求性および  $\beta$ -galactosidase 活性で評価した。

## 第 11 項 組換えタンパク質の調製

*OsERF83* の ORF を以下のプライマーセットを用いて増幅した。5'-GGATCCATGCATTGCTGCATGTCGC-3' (下線部は制限酵素 *BamH I* の認識配列を示す) および 5'-CTCGAGAAGATCAGATGGAGTGGTGG-3' (下線部は制限酵素 *Xho I* の認識配列を示す)。増幅した配列を *BamH I* および *Xho I* を用いて pET28b (Novagen) に導入し、これを用いて大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)株を形質転換した。得られた組換え大腸菌を LB 液体培地で前培養した後、培養液 100  $\mu$ L を 100 mL の LB 液体培地に植菌し、37°C で 3 時間振盪培養した。終濃度 0.4 mM の IPTG を加えさらに 16°C で 16 時間培養することで組換えタンパク質を誘導した。遠心分離により回収した菌体を緩衝液 [50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0), 0.5 M NaCl] に懸濁し、超音波破碎することで無細胞抽出液を得た。これを Ni-NTA 担体 (Qiagen) に通し、His-tag 融合 *OsERF83* を吸着させた。250 mM イミダゾール溶液を Ni-NTA 担体に通すことによって目的タンパク質を溶出した。

## 第 12 項 ゲルシフト試験

GCC プローブ (5'-TAAGAGCCGCCTAAGAGGCCGCC-3') と変異型 GCC (mGCC) プローブ (5'-TAAGATCCTCCTAAGATCCTCC-3') は、相補的な DNA オリゴマーセットを 98°C で 5 分間熱変性させた後、25°C で 15 分アニールさせることで調製した。タンパク質とプローブの結合反応は、プローブ 2.5 μg と精製タンパク質 1 μg を結合 Buffer [20 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 1 mM EDTA, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM dithiothreitol, 2% Tween 20, 30 mM KCl] 50 μL 中で 4°C, 1 時間静置させて行った。反応液中のタンパク質-プローブ複合体は 8% TBE-PAGE で遊離プローブと分離し、プローブを臭化エチジウム染色することで検出した。

## 第 13 項 *OsERF83* 過剰発現株の作出

*OsERF83* の ORF を以下のプライマーセットを用いて増幅した。5'-TCTAGATCTATTATTCGGCGGCCGGC-3' (下線部は制限酵素 *Xba*I の認識配列を示す) および 5'-GGTACCACATGTTAACCACTGCTAG-3' (下線部は制限酵素 *Kpn*I の認識配列を示す)。増幅した配列を *Xba*I および *Kpn*I を用いてバイナリーベクター pAct-ZH2 (Sentoku et al., 2000) に導入した。形質転換イネは、第 3 章、第 2 節の方法に準じて作出了した (Hiei et al., 1994)。

## 第 14 項 イネいもち病菌を用いた病害抵抗性試験

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。ただし病害抵抗性試験に用いるイネは土耕栽培 25 日齢のものとし、トレハロース処理は行わなかった。

## 第 15 項 リアルタイム PCR

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。反応に用いたプライマーの配列を Table 4-1 に示す。

### 第3節 実験結果

#### 第1項 *OsERF83* の発現プロファイル

*OsERF83* は AP2/ERF ドメインを 1 つ持つ 24 kDa のタンパク質をコードし, 分子系統解析の結果からシロイヌナズナの病害応答性 ERF である AtERF15, ORA59, および ERF1 と高い相同意を示した (Fig. 4-1). そこで *OsERF83* も病害応答性の遺伝子であるかを検討した. 水耕栽培した幼苗の地上部にイネいもち病菌を噴霧し, 感染葉における *OsERF83* の発現を経時的に観察した. その結果, *OsERF83* の発現は非感染葉において低いレベルに保たれているのに対し, 感染葉では接種後 2 日目から顕著に誘導されることが明らかとなった (Fig. 4-2A). 従って, *OsERF83* は病害応答性の ERF であることが示された. 次に *OsERF83* の通常生育時における各器官での発現を調べた. 土耕栽培したイネの根部, 葉鞘, 葉身, 幼穂, 薢, 内穎, 外穎, および子房を用いて, *OsERF83* の発現を観察した. その結果, *OsERF83* は葉鞘, 葉身, および幼穂で発現量が低かったのに対し, 根部, 内穎, および外穎では高発現していることが明らかとなった (Fig. 4-2B).

#### 第2項 植物ホルモンによる *OsERF83* の発現誘導

JA, SA, ET などの植物ホルモンは植物の病害応答に関与する. そこで *OsERF83* の発現が植物ホルモンにより制御されるかを検討した. 水耕栽培した 14 日齢の幼苗の地上部に MeJA, SA, または ethephon を噴霧し, *OsERF83* の発現を解析した (Fig. 4-3). MeJA 処理されたイネでは, *OsERF83* の発現量

が処理後 2 時間から上昇し、8 時間でピークに達した。またこの発現上昇は、処理後 16 時間まで比較的高いまま維持された。一方で SA 処理されたイネでは、処理後 4 時間までに *OsERF83* の発現が迅速に誘導され、その後 8 時間までに基底レベル近くにまで低下した。*ethephon* 処理イネにおいても、SA 処理と同じパターンの発現変動が観察された。これらの結果から、はイネいもち病感染時における *OsERF83* の発現誘導は、複数の植物ホルモンによって制御される可能性が示唆された。

### 第 3 項 *OsERF83* の細胞内局在

*OsERF83* は ERF ファミリーに属する転写因子として核に局在すると考えられた。また核局在シグナル予測プログラム（cNLS Mapper, <http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/>）によると、*OsERF83* は AP2/ERF ドメインの近傍に核局在配列を含み、核に局在することが予測された。この可能性を検証するため、GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在解析を行った。パーティクルポンバードメント法を用いて、タマネギ表皮細胞に遊離 GFP または *OsERF83*-GFP を一過発現させた。遊離 GFP の蛍光シグナルが細胞中の細胞質および核全体に均一に分布していたのに対し (Fig. 4-4A-C), *OsERF83*-GFP の蛍光シグナルは、細胞内の核のみで観察された (Fig. 4-4D-F)。従って、*OsERF83* が核タンパク質であることが示唆された。

### 第 4 項 *OsERF83* の転写活性化能

ERF ファミリーは、転写を正に制御する調節因子と、負に制御する調節因子

を含む。OsERF83 が正の調節因子であるか、あるいは負の調節因子であるかを明らかにするため、酵母ツーハイブリッド系を用いて、転写活性化能の解析を行った。DNA 結合ドメイン LexA の C 末端に OsERF83 を融合したキメラタンパク質を酵母に発現させ、LexA オペレーター下流のレポーター遺伝子 (*LEU2* および *lacZ*) の発現を、組換え酵母の栄養要求性および X-gal 分解能で評価した (Fig. 4-5A)。その結果、LexA-OsERF83 を発現する酵母細胞は、陽性対照である LexA-B42<sub>AD</sub> と同様に、ロイシン非存在下で良好な生育を示すとともに β-ガラクトシダーゼ活性に由来する青色呈色を示した (Fig. 4-5B)。この結果から、OsERF83 が正の転写調節因子として機能することを示された。

## 第 5 項 OsERF83 の GCC ボックスへの結合

AP2/ERF ドメインは、GCC ボックスに特異的に結合する (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995)。そこで OsERF83 も GCC ボックスを認識するかを検討した。大腸菌を用いて產生した組換え His-OsERF83 を (Fig. 4-6A)、GCC ボックスプローブ (TAAGAGCCGCC) または mGCC ボックスプローブ (TAAGATCCTCC) と反応させ、TBE-PAGE を用いてタンパク質-プローブ複合体を分離した。プローブとして GCC ボックスを用いた場合、タンパク質-プローブ複合体に由来するシフトバンドが観察されたのに対し、プローブに mGCC ボックスを用いた場合には、シフトバンドは観察されなかった (Fig. 4-6B)。従ってこの結果から、OsERF83 が GCC ボックスと結合することが示された。

## 第 6 項 *OsERF83* 過剰発現株の病害抵抗性

*OsERF83* が病害抵抗性を制御するかどうかを調べるため, *OsACT1* プロモーター制御下で *OsERF83* を過剰発現する形質転換イネ (*OsERF83ox*) を作出した。独立 3 系統の *OsERF83ox* を選択し (Fig. 4-7A), 第 5 葉の葉身にイネいもち病菌を接種した。形成された病斑を観察した結果, すべての形質転換系統において, 野生型株と比較した病斑長の減少が観察され (Fig. 4-7B), その程度は 6-3 系統, 20-6 系統, および 24-3 系統で 52%, 49%, および 67% であった (Fig. 4-7C)。またイネいもち病菌に対する抵抗性獲得の程度は, 各形質転換系統における *OsERF83* の発現レベルに関連しているようであった (Fig. 4-7A, C)。従って, *OsERF83* がイネいもち病に対する抵抗性を正に制御することが示された。

## 第 7 項 *OsERF83* の下流遺伝子

*OsERF83* を介した防御応答は, 過剰発現株において恒常に活性化されると推測された。そこで *OsERF83* の下流遺伝子を同定するため, 第 5 葉の葉身から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。*OsERF83ox* (20-6 系統) および野生型株の転写産物を比較し, *OsERF83ox* において発現上昇している防御関連遺伝子を明らかにした (Table 4-2)。このうち PR タンパク質をコードする遺伝子に着目し, 同様に調製した RNA を用いてリアルタイム PCR により発現解析を行った。その結果, 過剰発現株では PR1 (LOC\_Os07g03710: *PR1*#074), PR2 (LOC\_Os01g71350: *Gns6*), PR3 (LOC\_Os04g41680: *cht5*, LOC\_Os01g18400: *cht10*), PR5 (LOC\_Os03g46070: *TLP*), PR10

(LOC\_Os12g36850: *PR10b*) をコードする遺伝子, および病害抵抗性に関与することが知られている他の防御関連遺伝子, *RIR1b* (LOC\_Os10g41980) , *RIR1b-like* (LOC\_Os10g41999) (Schaffrath et al., 2000) の発現量が上昇していた (Fig. 4-8) . 従って, *OsERF83* はこれらの防御関連遺伝子の発現を調節することでイネいもち病に対する抵抗性を制御している可能性が考えられた.

#### 第4節 考察

ERFは植物の成長および環境適応に関わる転写因子であり、シロイヌナズナ、トマト (*Solanum lycopersicum*)、タバコ、およびイネにおける病害抵抗性獲得にも寄与する (Berrocal-Lobo et al., 2002; Gu et al., 2002; Guo et al., 2004; Liu et al., 2012)。本研究では、トレハロース処理により JA 依存的に誘導される *OsERF83* の機能解析を行った。*OsERF83* はシスエレメントとして GCC ボックスを認識し、PR タンパク質遺伝子の発現を正に調節する転写活性化因子として機能した。また *OsERF83* 過剰発現株では、イネいもち病に対する抵抗性が獲得された。

シロイヌナズナおよびイネの ERF は、AP2/ERF ドメインのアミノ酸配列に基づき 15 のグループに分けられる (Nakano et al., 2006)。グループ IXc ERF は、8 コピーのシロイヌナズナ ERF と 11 コピーのイネ ERF を含み、*OsERF83* もこのグループに属する。分子系統解析から、*OsERF83* は 3 つのシロイヌナズナ ERF (ERF1, AtERF15, および ORA59) とクレードを形成する (Fig. 4-1)。これらの *AtERF* はいずれも、病原菌の感染により発現が誘導され、過剰発現株は PR タンパク質遺伝子の発現誘導を介して病害抵抗性を獲得する (Berrocal-Lobo et al., 2002; Pre et al., 2008; Solano et al., 1998; Zarei et al., 2011; Zhang et al., 2015)。従ってグループ IXc ERF は、シロイヌナズナやイネを含む高等植物全般において、病害抵抗性に重要な役割を果たす可能性が考えられる。また近年の研究から、グループ IXc ERF の異なるクレードに属する *OsERF87* および *OsERF136* が、PR タンパク質遺伝子、*RSoSPR10* のプロモ

ーター領域に直接結合し、その発現を活性化することが示された (Yamamoto et al., 2018)。Yamamoto らは OsERF83 についても同様の実験を行い、これが *RSOsPR10* の発現を活性化しないことも示している。従ってイネのグループ IXc ERF は、進化の過程で病害抵抗性を制御する機能に多様性を獲得していると考えられる。

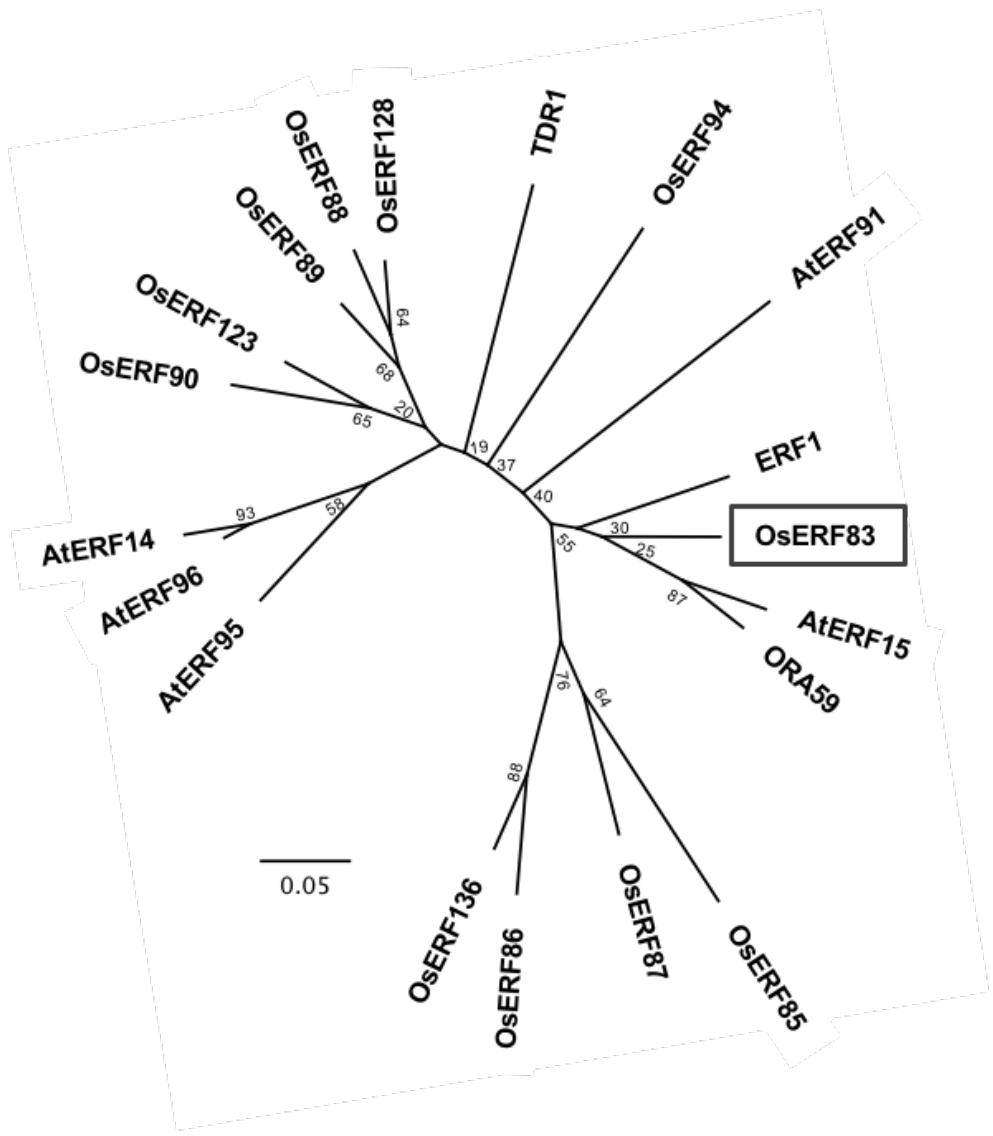
グループ IXc ERF は、C 末端側に保存された EDLL モチーフを介して転写複合体に結合し、転写活性化因子として機能する (Huang et al., 2016)。これは本章で示した、転写活性化能試験の結果 (Fig. 4-5B) ともよく一致している。過剰発現株を用いて OsERF83 が制御する下流遺伝子を探索したところ、8 個の防御関連遺伝子が見出された (Fig. 4-8)。ゲノム情報を用いて、これら 8 遺伝子のプロモーター領域を調べてみると、*PR1 #074*, *Gns6*, *cht5*, および *RIR1b* のプロモーター領域 ( $\sim 1000 \text{ bp}$  まで) に GCC ボックスが存在することが明らかとなった。従って OsERF83 は *PR1 #074*, *Gns6*, *cht5*, および *RIR1b* のプロモーター領域に直接結合することで、その発現を調節している可能性が考えられる。対照的に *cht5*, *TLP*, *PR10b*, および *RIR1b-like* の遺伝子上流 ( $\sim 3000 \text{ bp}$  まで) には GCC ボックスが存在していなかった。マイクロアレイ解析の結果から、いくつかの非 ERF 型 TF が *OsERF83ox* において発現上昇することが示されている (Table 4-2)。従って OsERF83 は、これらの非 ERF 型 TF を介して *cht5*, *TLP*, *PR10b*, および *RIR1b-like* の発現制御をおこなっていると考えられる。

イネ根部へのトレハロース処理は、*Gns6*, *TLP*, *PR10b*, *RIR1b*, および *RIR1b-like* の発現を誘導する (Fig. 1-4)。またこれら遺伝子の発現誘導のピークはト

レハロース処理 10 時間から 24 時間であり, *OsERF83* の発現誘導のピークである処理 6 時間よりも後である. 従ってトレハロース処理された根部においては, *OsERF83* を介して, *Gns6*, *TLP*, *PR10b*, *RIR1b*, および *RIR1b-like* の発現制御が行われる可能性が考えられる.

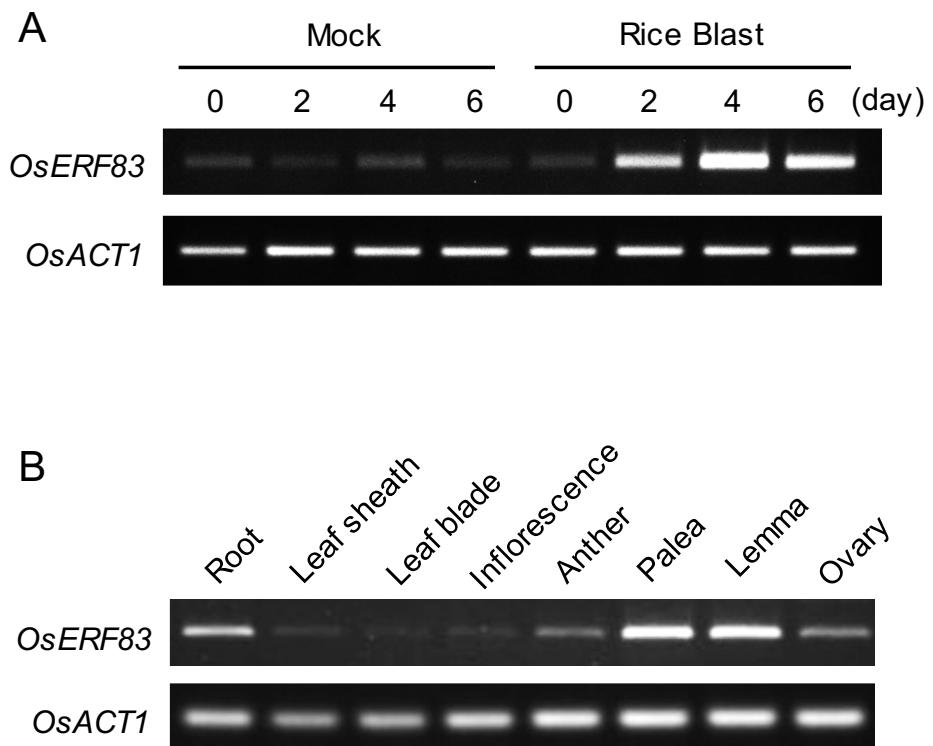
Table 4-1. Primers used in qRT-PCR

Gene name	RAP ID	MSU ID	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
<i>OsACT1</i>	Os03g0718100	LOC_Os03g50890	TCTCTCTGTATGCCAGTGGTCG	GTCGAGACGAAGGATAGCATGG
<i>PR1#074</i>	Os07g0129200	LOC_Os07g03710	GTATGCTATGCTACGTGTTATGC	GCAAATACGGCTGACAGTACAG
<i>Gns6</i>	Os01g0940800	LOC_Os01g71350	GAACGTACGGCCAGCATATAAGT	CAAAGTGCCAAGGCAGAGTT
<i>cht5</i>	Os04g0494100	LOC_Os04g41680	CAGCGGCGTGTCTGTAGAGA	ACGACTGTCTGTGTAAAGTTCTTG
<i>cht10</i>	Os01g0287600	LOC_Os01g18400	ACAACCGCATTGGCTTCTAC	AGCAGCGACATGAGAACGA
<i>TLP</i>	Os03g0663500	LOC_Os03g46070	AGACGAGCACCTTCACTTGC	TGCCAGCTAACAAAGTCATCG
<i>PR10b</i>	Os12g0555200	LOC_Os12g36850	TGTGGAAGGTCTGCTTGG	GTACGCCTCGATCATCTG
<i>RIR1b</i>	Os10g0569400	LOC_Os10g41980	CTCATCTGCACCCCTGGAAAC	CTCTCCGGCCTATGTAAGGTTTC
<i>RIR1b-like</i>	Os10g0569600	LOC_Os10g41999	AGAGCAGGAGCAGCAGATG	CATCCGTATGCAACGGTG



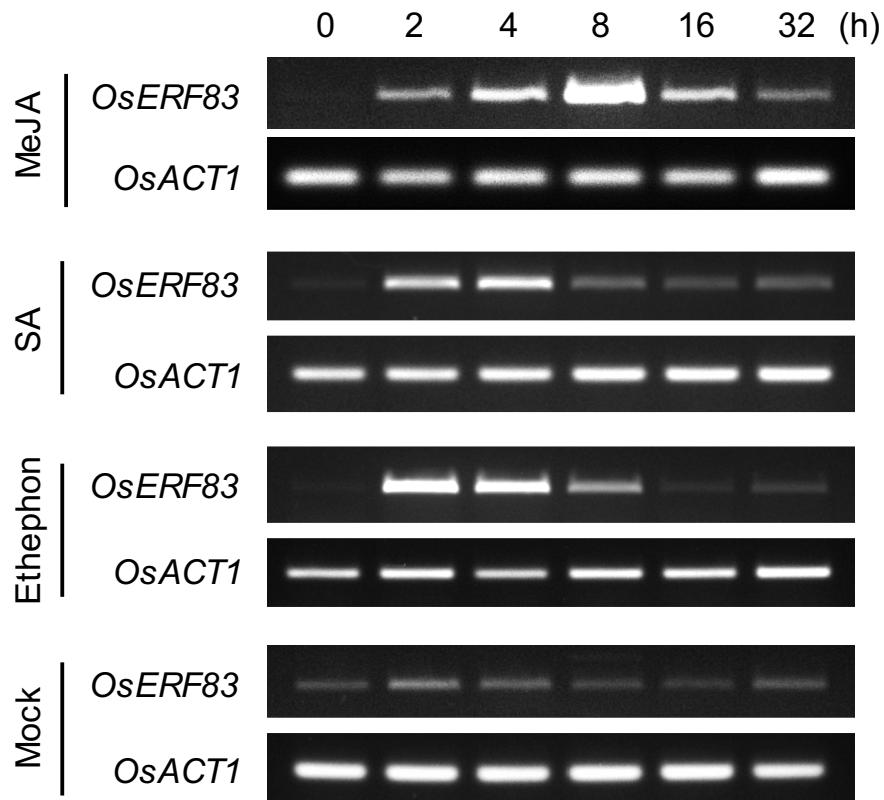
**Fig. 4-1. Phylogenetic analysis of the subgroup IXc ERFs in *Arabidopsis* and rice.**

The amino acid sequences of the AP2/ERF domains were aligned using ClustalW, and the phylogenetic tree was created using the neighbor-joining method. The bar represents the evolutionary distance between the proteins expressed as the number of substitutions per amino acid residue. The bootstrap values (1000 replicates) are shown in percentage.



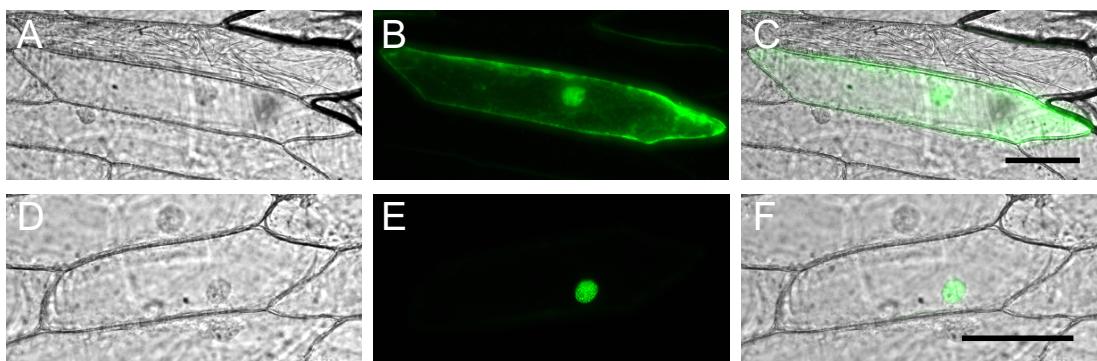
**Fig. 4-2. Expression profile of *OsERF83*.**

(A) Expression of *OsERF83* under rice blast infection. Hydroponically grown seedlings were sprayed with a rice blast spore suspension (in 0.05% Tween 20) or 0.05% Tween 20 (mock). The total RNA was extracted from the shoots at the indicated time points after inoculation. (B) Organ-specific expression of *OsERF83*. Total RNA was isolated from the root, leaf sheath, leaf blade, inflorescence, anther, palea, lemma, and ovary. For (A) and (B), semi-quantitative RT-PCR was performed using *OsERF83*-specific primers. *OsACT1* expression was used as the endogenous control.



**Fig. 4-3. Induction of *OsERF83* in response to exogenous phytohormones.**

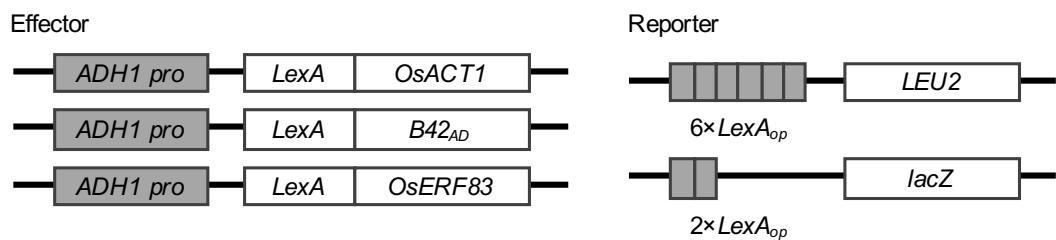
Hydroponically grown 14-d-old seedlings were sprayed with methyl jasmonate (MeJA; 100 µM), salicylic acid (SA; 5 mM), ethephon (1 mM), or a mock solution (0.05% Tween 20). Total RNA was extracted from the shoot tissue at the indicated time points. Semi-quantitative RT-PCR was performed using *OsERF83*-specific primers. *OsACT1* was used as the endogenous control.



**Fig. 4-4. Subcellular localization of OsERF83 in onion epidermal cells.**

Micrographs of onion epidermal cells transiently expressing free GFP (A, B) or *OsERF83*-GFP (D, E). (C, F) Merged bright field and fluorescence images. Scale bars represent 50  $\mu$ m.

A

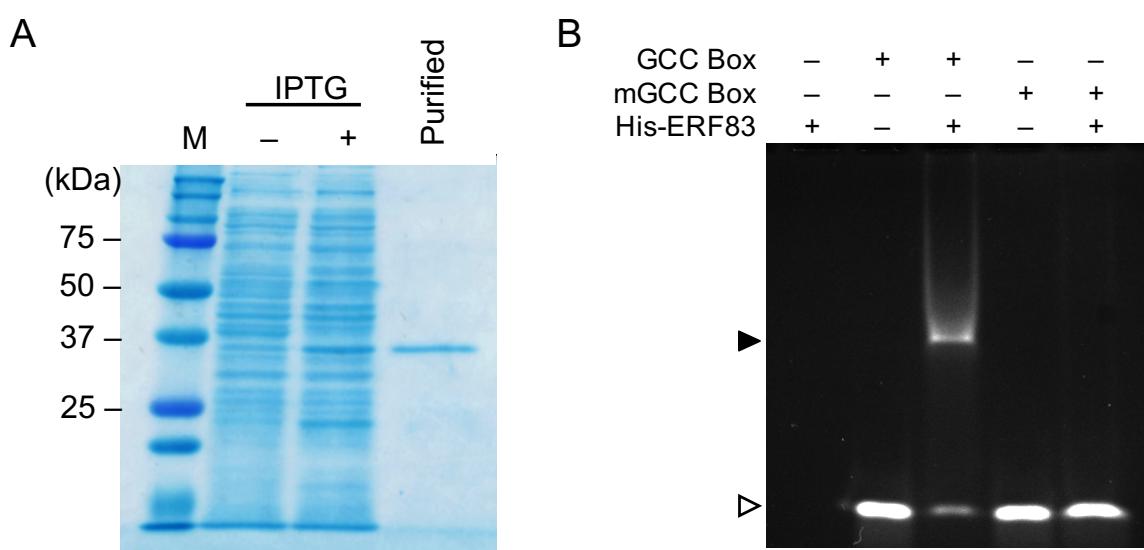


B



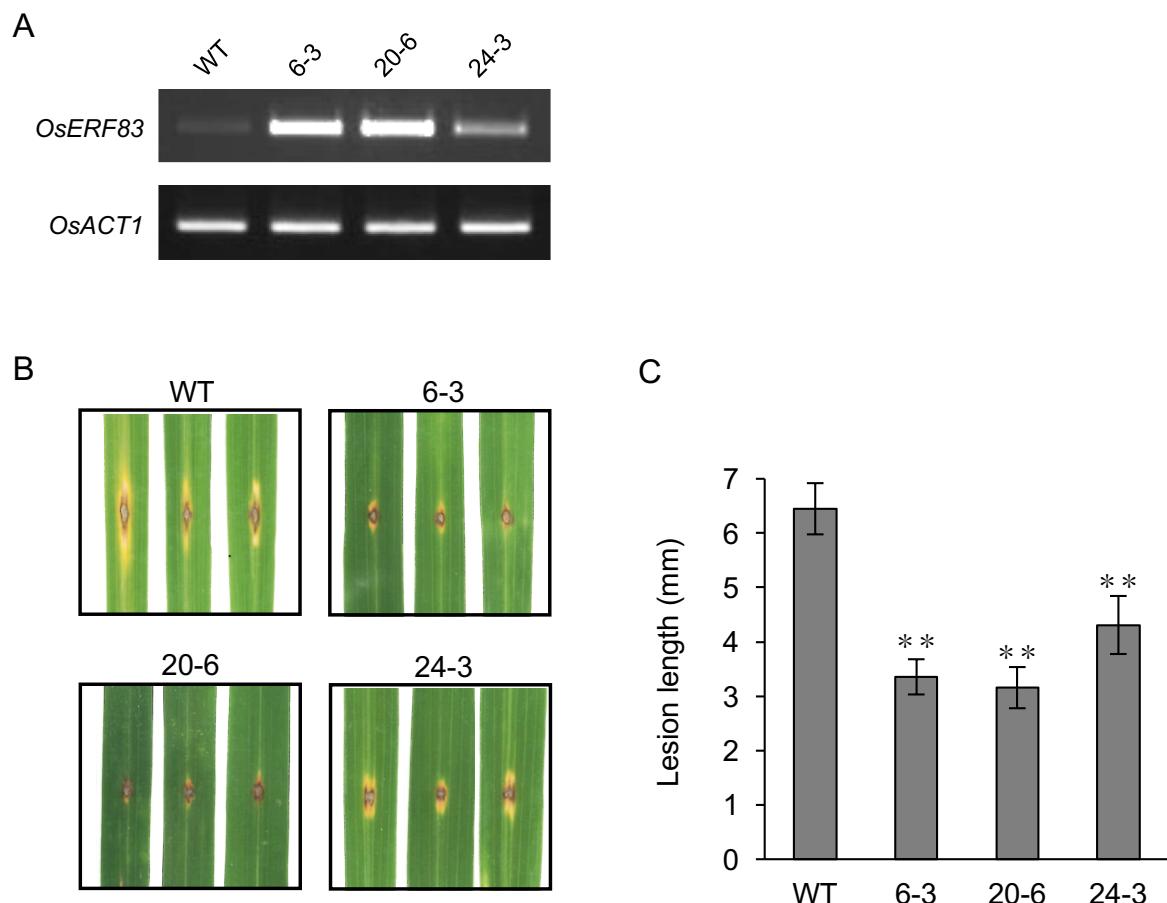
**Fig. 4-5. Transactivation activity of OsERF83.**

(A) Schematic models of the effector and reporter genes. LexA was used as a DNA-binding domain. *OsACT1* and *B42<sub>AD</sub>* were used as negative and positive controls, respectively. (B) Transactivation activity of OsERF83, performed using a yeast two-hybrid system. Yeast cells carrying each effector plasmid were grown on SD medium lacking uracil, histidine, and leucine. The β-galactosidase activity was evaluated in yeast cells grown on SD medium supplemented with X-gal.



**Fig. 4-6. Electrophoretic mobility shift assays using recombinant OsERF83.**

(A) SDS-PAGE analysis of the purified His fusion OsERF83. The molecular masses of standard proteins were shown on the left. (B) Purified His-OsERF83 was incubated with GCC or mGCC probes. Protein-probe complexes were detected using TBE-PAGE followed by ethidium bromide staining. The shifted band and free-probe band are indicated by the black and white triangles, respectively.

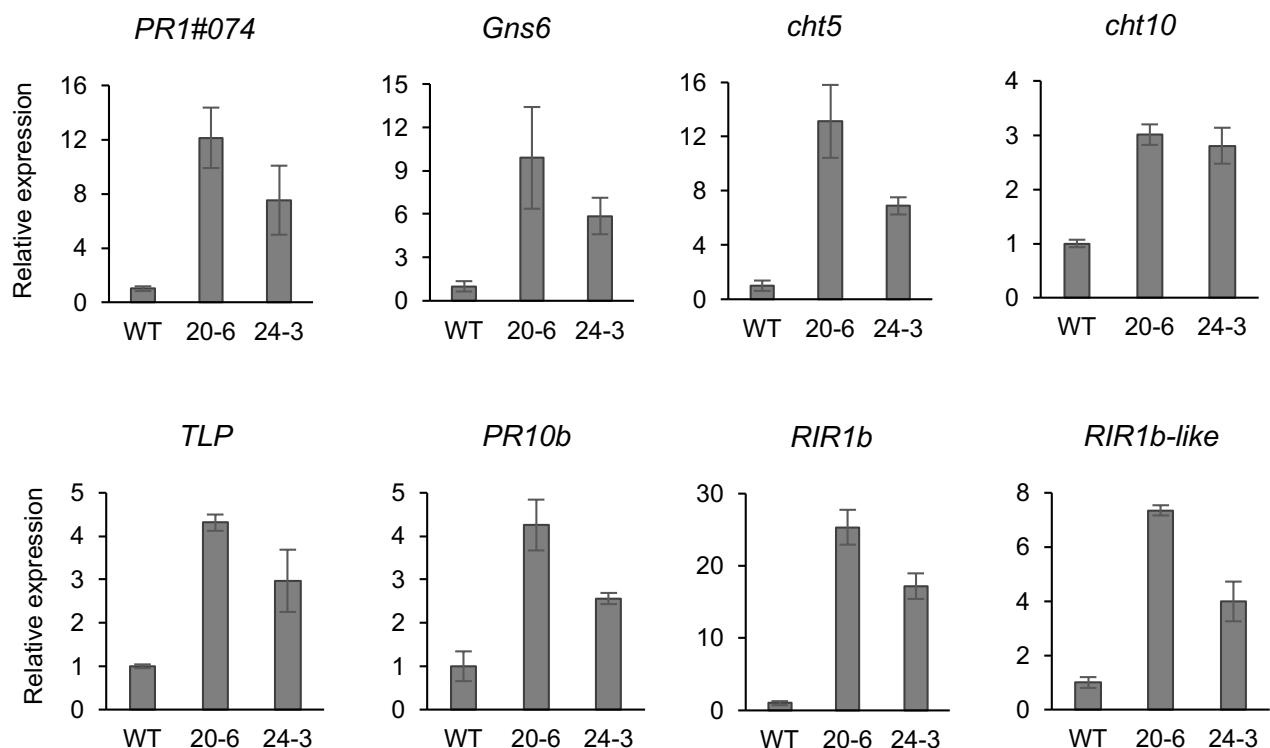


**Fig. 4-7. *M. oryzae* resistance in *OsERF83*-overexpressing (*OsERF83ox*) plants.**

(A) The expression levels of *OsERF83* in the transgenic overexpression plants (lines 6-3, 20-6, and 24-3). Three independent lines were analyzed. Semi-quantitative RT-PCR was performed using *OsERF83*-specific primers. *OsACT1* was used as an endogenous control. Total RNA was extracted from 5<sup>th</sup> leaves of wild type (WT) and transgenic lines. (B) Disease resistance assay against *M. oryzae*. The 5<sup>th</sup> leaves of the wild-type and *OsERF83ox* plants were inoculated with a spore suspension and incubated for 5 d, after which the disease lesions were observed. (C) Measurement of the lesion lengths shown in (B). The data represent the mean  $\pm$  SE ( $n = 24$ ). Asterisks indicate statistically significant differences compared with the wild-type (t test,  $p < 0.01$ ).

Table 4-2. Transcriptome comparison of WT versus transgenic plants

RAP ID	MSU ID	Description	Fold change (#20-6/ WT)	
<i>Hormone associated gene</i>				
Os10g0419400	LOC_Os10g28350	Submergence induced protein 2	17.18	13.74
Os01g0757200	LOC_Os01g55240	Gibberellin 2-oxidase	19.22	19.30
Os08g0508700	LOC_Os08g39830	EIN3-like protein	7.34	8.70
Os06g0216300	LOC_Os06g11290	OPDA reductase	8.03	7.24
Os03g0180900	LOC_Os03g08320	ZIM domain containing protein	3.33	2.28
Os03g0402800	LOC_Os03g28940	ZIM domain containing protein	4.34	3.59
Os07g0153000	LOC_Os07g05830	ZIM domain containing protein	69.93	72.52
Os10g0392400	LOC_Os10g25290	ZIM domain containing protein	4.30	6.14
<i>Transcription factor</i>				
Os04g0301500	LOC_Os04g23550	bHLH domain containing protein	10.56	4.63
Os03g0327800	LOC_Os03g21060	NAC domain containing protein	8.97	5.50
Os07g0683200	LOC_Os07g48450	NAC domain containing protein	8.84	5.46
Os07g0684800	LOC_Os07g48550	NAC domain containing protein	8.97	6.37
Os08g0200600	LOC_Os08g10080	NAC domain containing protein	17.56	21.35
Os11g0126900	LOC_Os11g03300	NAC domain containing protein	5.49	8.36
Os01g0734000	LOC_Os01g53260	WRKY transcription factor	3.36	2.51
Os03g0657400	LOC_Os03g45450	WRKY transcription factor	8.25	3.86
<i>PR gene</i>				
Os07g0129200	LOC_Os07g03710	PR1/ Pathogenesis-related protein/ OsPR1#074	3.98	3.66
Os01g0940800	LOC_Os01g71350	PR2/ Beta-1,3-glucanase/ Gns6	8.20	2.69
Os01g0287600	LOC_Os01g18400	PR3/ Chitinase/ cht10	3.14	3.27
Os01g0860500	LOC_Os01g64110	PR3/ Chitinase	4.78	4.91
Os04g0494100	LOC_Os04g41680	PR3/ Chitinase/ cht5	7.19	2.60
Os03g0663500	LOC_Os03g46070	PR5/ Thaumatin/ TLP	4.58	3.35
Os03g0300400	LOC_Os03g18850	PR10/ Pathogenesis-related protein	10.74	15.30
Os12g0555200	LOC_Os12g36850	PR10/ Pathogenesis-related protein/ PR10b	3.47	3.91
<i>Other defence-related gene</i>				
Os04g0112100	LOC_Os04g02120	NB-ARC domain containing protein	5.50	5.89
Os12g0281600	LOC_Os12g18374	NB-ARC domain containing protein	3.57	3.42
Os08g0155900	LOC_Os08g05960	Pathogen-induced defense-responsive protein	5.79	3.09
Os02g0626400	LOC_Os02g41650	Phenylalanine ammonia-lyase	3.49	4.45
Os02g0627100	LOC_Os02g41680	Phenylalanine ammonia-lyase	3.28	3.27
Os04g0518400	LOC_Os04g43800	Phenylalanine ammonia-lyase	4.11	11.62
Os05g0427400	LOC_Os05g35290	Phenylalanine ammonia-lyase	11.40	14.87
Os10g0398100	LOC_Os10g25870	Plant disease resistance response protein family	8.35	5.77
Os11g0214400	LOC_Os11g10800	Plant disease resistance response protein family	3.68	4.51
Os10g0569400	LOC_Os10g41980	Rice pathogen-related protein/ RIR1b	6.45	16.74
Os10g0569600	LOC_Os10g41999	Rice pathogen-related protein/ RIR1b-like	5.84	12.43
Os10g0569800	LOC_Os10g42020	Rice pathogen-related protein	6.18	2.08
Os11g0559200	LOC_Os11g35500	Xanthomonas oryzae pv. oryzae resistance 21	3.83	2.51



**Fig. 4-8. Expression analysis of defense-related genes in *OsERF83*-overexpressing (*OsERF83ox*) plants.**

qRT-PCR was performed using total RNA isolated from the 5<sup>th</sup> leaves of the wild-type (WT) and transgenic (overexpression lines 20-6 and 24-3) plants grown under non-stress conditions. The expression level of each defense-related gene was normalized to the expression of *OsACT1*. The data represent the means of three independent experiments  $\pm$  SE.

## 第5章 トレハロースに誘導されるファイトアレキシン生合成遺伝子の解析

### 第1節 緒論

植物は、病原菌の感染や植食昆虫による食害など、常に様々な生物ストレスに晒されている。そのため植物は、これらのストレスから身を守るために他の生物には見られない独自の防御応答を発達させている。化学的抵抗性は植物が持つ防御応答の一つであり、抗菌性の二次代謝産物を蓄積させる事により、病原菌の感染を防ぐメカニズムである。PAは化学的抵抗性に関与する化合物であり、病原菌の感染やUV照射、塩化銅などのエリシター処理を受けて動的に生産される低分子抗菌化合物の総称である（Peters, 2006; Toyomasu, 2008）。

イネは、植物ホルモンであるジベレリン（giberelinel, GA）と構造的に類似したジテルペン型PAを生産する。これまでに16種類のジテルペン型PAが単離されており（Peters, 2006; Horie et al., 2015），これらは基本骨格の構造からビマラジエン型のモミラクトンA・B，カサジエン型のファイトカサンA・F，サンダラコピマラジエン型のオリザレキシンA・F，ステマレン型のオリザレキシンS，カスベン型のエント-10-オキソデプレッシンに分類される。GAおよびPAはゲラニルゲラニル二リン酸（geranylgeranyl diphosphate, GGDP）を共通の出発物質として、B型ジテルペン環化酵素（copalyl diphosphate synthase, CPS）およびA型ジテルペン環化酵素（kaurene synthase, KS; KS-like, KSL）による二段階の環化反応によって生合成される（Fig. 5-1A）（Peters, 2006; Toyomasu, 2008）。これまでにイネゲノム上には4コピーのCPS遺伝子と11

コピーの *KS/KSL* 遺伝子が存在することが示されている (Peters, 2006; Toyomasu, 2005).

*OsCPS1* と *OsKS1* は GA 生合成に関わり, 何れも欠失すると極矮性形質を示す (Sakamoto et al., 2004; Xu et al., 2004). UV 照射やエリシター処理により発現が誘導される *OsCPS2*, *OsCPS4*, *OsKSL4*, *OsKSL7*, *OsKSL8*, *OsKSL10* は, それぞれ *ent*-CDP, *syn*-CDP, *syn*-pimara-7,15-diene, *ent*-cassa-12,15-diene, *syn*-stemar-13-ene, *ent*-sandaraco-pimaradiene 合成酵素をコードしており, PA 生合成に関与する (Xu et al., 2007; Cho et al., 2004; Nemoto et al., 2004; Otomo et al., 2004; Wilderman et al., 2004). また UV 照射やエリシター処理で発現誘導されない *OsKSL5*, *OsKSL6* および *OsKSL11* はそれぞれ, *ent*-pimara-8,15-diene, *ent*-isokaurene, *syn*-stemod-13(17)-ene 合成酵素をコードするが (Kanno et al., 2006; Morrone et al., 2005), これら化合物の生理機能は十分に明らかにされていない. *OsKSL2* は, 通常生育条件で発現がほぼ検出されず, 地上部への UV 照射および培養細胞へのエリシター処理によっても発現が誘導されないことから, 全長 cDNA が取得出来ず偽遺伝子であると考えられている (Fig. 5-1B) (Hilwig et al., 2011; Sakamoto et al., 2004; Xu et al., 2007).

トレハロースを処理された根部では, PA 生合成に関わる *KSL* 遺伝子と偽遺伝子と考えられる *OsKSL2* の発現が誘導される (Fig. 5-2). 本章では, この PA 生合成遺伝子の発現誘導が JA シグナルに制御されるかを検討するとともに, *OsKSL2* が PA 生合成に関わる機能型のジテルペン環化酵素であると予想し, 全長 cDNA の取得と酵素活性の解析を行った.

## 第 2 節 実験材料および方法

### 第 1 項 植物材料

第 2 章, 第 2 節に準じた.

### 第 2 項 種子滅菌

第 2 章, 第 2 節の方法に準じて行った.

### 第 3 項 水耕栽培

第 2 章, 第 2 節の方法に準じて行った.

### 第 4 項 トレハロース処理および MeJA 処理

トレハロース処理は第 2 章, 第 2 節の方法に準じて行った. MeJA 処理は, 水耕栽培した 14 日齢の幼苗をプラスチックメッシュごと, 100  $\mu\text{M}$  MeJA 水溶液で満たされたバットへ移し, 根部を MeJA 水溶液中に保持することで行った.

### 第 5 項 RNA 抽出・cDNA 合成

第 2 章, 第 2 節の方法に準じて行った.

### 第 6 項 半定量的 RT-PCR

第 2 章, 第 2 節の方法に準じて行った. 反応に用いたプライマーの配列と PCR 条件を Table 5-1 に示す.

## 第 7 項 リアルタイム PCR

第 2 章、第 2 節の方法に準じて行った。反応に用いたプライマーの配列は Table 5-2 に示す。

## 第 8 項 5'- and 3'- Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

RACE 法には、GeneRacer kit (Invitrogen) を用いた。全 RNA を GeneRacer RNA oligo adapter とライゲーションさせ、GeneRacer oligo dT primer と Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。*OsKSL2* cDNA の 5'末端の増幅には、GeneRacer 5'-nested primer と gene specific primer 1: 5'-AGAGGTCGCGCTCGGTGACGATCT-3'を用いた。また 3'末端の増幅には GeneRacer 3'-nested primer と gene specific primer 2: 5'-GAGGCGCCGTTCCAAGGCCATGCA-3'を用いた。PCR 産物をアガロース ゲルで分離後、最もサイズの大きい主要バンドを最長クローンと考え 5', 3'末端を決定した。

## 第 9 項 全長 cDNA の増幅

RACE 法により得られた cDNA 末端の情報から、新たにプライマーを設計し、*OsKSL2* の全長 cDNA を増幅した。PCR 酵素には PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) を用い、サーマルサイクラーは Veriti 96-well サーマル サイクラーを使用した。用いたプライマーセットと PCR 条件を Table 5-1 に示す。

## 第 10 項 組換え酵素を用いた機能解析

*OsKSL2* の全長 ORF を pGEX-4T-3 (GE Healthcare) に導入し, pGEX-OsKSL2 を作製した. これを大腸菌株 BL21(DE3)に導入した. 形質転換株は 37°C, 2×YT 液体培地で培養し, OD<sub>600</sub> が 0.7 になったところで終濃度 1 mM の IPTG を添加した. その後 17°C で 24 時間培養し, 組換えタンパク質を誘導した. 15,000 × g, 4°C で集菌し, 菌体は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し超音波破碎した. 組換え OsKSL2 タンパク質は, Glutathione Sepharose 4B カラム (GE Healthcare) を用いて精製した. 反応基質である *ent*-CDP および *syn*-CDP は, 組換え OsCPS2 および組換え OsCPS4 を用いて GGDP から酵素的に生産, 調製した. 生成物の決定には, Agilent 6890N GC-5973N MSD を使用し, GC-MS 分析条件は大友らの方法 (Otomo et al., 2004-2) に準じた. また生成物の推定には, 質量スペクトルデータライブラリ (Wiley Registry 7th) を使用した.

## 第 11 項 プロトプラストの調製および PEG による遺伝子導入

プロトプラストの調製および PEG による遺伝子導入は Yoo らの方法 (Yoo et al., 2007) に準じた. 水耕栽培した 12 日齢の幼苗から第 3 葉と第 4 葉を切り取り, サージカルメスを用いて細かく切断した. これを 0.02 g/mL のセルラーゼ R-10 (ヤクルト) と 0.02 g/mL のマセロザイム R-10 (ヤクルト) を含む 20 mM MES-KOH(pH 5.7) 溶液に浸し, 24°C, 暗所, 40 rpm で 4 時間消化した. 細胞を 77 μm 孔のナイロンメッシュを用いて濾過したのち, 100 × g で遠心分離し上清を取り除いた. 得られたプロトプラストは, 73 mg/mL のマンニトール

(Wako) を含む 10 mM MES-KOH(pH 5.7)に懸濁し、細胞数が  $2.0 \times 10^5$  個/mL になるように調製した。プロトプラスト溶液 100  $\mu\text{L}$  にプラスミド溶液 10  $\mu\text{L}$  と 0.4 g/mL の PEG4000 水溶液 110  $\mu\text{L}$  を添加し、25°Cで 10 分間静置した。その後  $100 \times g$  で遠心分離し上清を除いた。得られた形質転換細胞を、73 mg/mL のマンニトール (Wako) を含む 10 mM MES-KOH(pH 5.7)に懸濁し、24°C、暗所で 16 時間培養した。

## 第 12 項 細胞内局在解析

OsKSL2 の葉緑体移行シグナルペプチド(TPksl2)領域を以下のプライマーを用いて增幅した。5'-GTCGACGATGCTGCCGTGCTTGTCC-3'（下線部は *Sal* I 認識配列を示す）および 5'-CCATGGAGCTGCAGTGCCGCATGGC-3'（下線部は *Nco* I 認識配列を示す）。増幅された断片を発現ベクターpUC-sGFP に挿入し、pUC-TPksl2-GFP を作製した。このコンストラクトを第 10 項の方法に準じてイネプロトプラストに導入し、得られた形質転換細胞に由来する蛍光を観察した。プロトプラストの観察は、GFP フィルターおよび Texas Red フィルターを備えた蛍光顕微鏡 (Leica DM6000B) を用いて行った。

### 第3節 実験結果

#### 第1項 トレハロース処理による *KS/KSL* 遺伝子の発現誘導

マイクロアレイ解析から、トレハロースを処理された根部では、PA生合成に関わる *KSL* 遺伝子と *OsKSL2* の発現が誘導されることが示されている (Fig. 5-2)。そこで半定量的 RT-PCR を用いて、この結果を再確認した。水耕栽培した 14 日齢の幼苗の根部にトレハロースを処理し、根部における *KS/KSL* 遺伝子の発現を観察した。その結果 PA 生合成に関わらない *OsKS1*, *OsKSL5*, および *OsKSL6* の発現に変化が見られなかったのに対し、PA 生合成に関わる *OsKSL4*, *OsKSL7*, *OsKSL8*, および *OsKSL10* の発現は、トレハロース処理 8 時間以内に上昇した (Fig. 5-3)。また *OsKSL2* の発現もトレハロース処理 2 時間以内に、一過的に上昇した (Fig. 5-3)。従って、トレハロース処理による根部での *KSL* 遺伝子の発現誘導が再確認された。

#### 第2項 JA による *OsKSL2* の発現誘導

*OsKSL4* および *OsKSL7* の根部での発現は、JA により誘導される (Yoshida et al., 2017)。そこで *OsKSL2* の発現も JA に誘導されるかを検討した。水耕栽培した 14 日齢の幼苗の根部に MeJA を処理し、根部および地上部での *OsKSL2* の発現を観察した。その結果、地上部での *OsKSL2* の発現が検出限界以下であったのに対し、根部での *OsKSL2* の発現は、処理 2 時間以内に一度上昇し、処理 8 時間以降に再び上昇した (Fig. 5-4)。この結果から、根部での *OsKSL2* の発現も JA に誘導されることが示された。

### 第3項 JA生合成変異株における *KSL* 遺伝子の発現誘導

トレハロース処理による *KSL* 遺伝子の発現誘導が、JA シグナルに制御されるかを検討した。水耕栽培した JA 生合成変異株 *hebiba* の根部にトレハロースを処理し、根部における *KSL* 遺伝子の発現を観察した。その結果 *OsKSL2*, *OsKSL4*, および *OsKSL7* のトレハロースによる発現誘導は、*hebiba*において消失した (Fig. 5-5)。従って、トレハロースによる *OsKSL2*, *OsKSL4*, および *OsKSL7* の発現誘導は JA シグナルに制御されることが示された。

### 第4項 *OsKSL2* の全長 cDNA の単離

*OsKSL2* は、全長 cDNA が取得できないことから偽遺伝子であると考えられている。しかし根部へのトレハロースまたは MeJA 処理が、*OsKSL2* の発現を誘導することが示された。そこで、MeJA 処理された根部を用いることで、*OsKSL2* の全長 cDNA を取得出来るのではないかと考えた。MeJA 処理 1 時間の根部から RNA を抽出し、5'-および 3'-RACE により *OsKSL2* の cDNA 末端を決定した。決定された配列をもとに新たにプライマーを設計し、全長 cDNA の增幅を試みた結果、2,460 bp の ORF を含む全長 cDNA を単離した (Fig. 5-6A)。

ゲノムアノテーションプロジェクト (MSU-RGAP:  
<http://rice.plantbiology.msu.edu/>, IRGSP-RAP: <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) から、*OsKSL2* のエキソン/インtron構造および cDNA 配列が理論的に推定されている。推定される cDNA 配列と実際に単離した全長 cDNA 配列と比較したことろ、いくつかの相違点が見出された (Fig. 5-6B)。すなわち、新たな第 1 エキソンの有無、第 7 エキソンのスプライシング位置、第 11-12 エキソンの構造

が異なっていた。また *OsKSL2* のゲノム配列についても、データベース上の塩基情報に誤りがあることを明らかにした (Fig. 5-7)。

## 第 5 項 既知 KSLs と *OsKSL2* のアミノ酸配列の比較

*OsKSL2* のアミノ酸配列を既知の KS/KSL タンパク質群のアミノ酸配列と比較した。その結果、*OsKSL2* は既知の KS/KSL と 45-63% の相同性を示した。

また植物のジテルペン環化酵素群に高度に保存される SAYDTAW, QXXDGSW モチーフが *OsKSL2* においても保存されていること、触媒部位である DDXXD モチーフが保存されていることが示された (Fig. 5-8)。そのため *OsKSL2* は機能型の A 型ジテルペン環化酵素をコードすると考えられた。

## 第 6 項 組換えタンパク質を用いた *OsKSL2* の機能解析

*OsKSL2* の機能を解析するため、組換えタンパク質を用いて *in vitro* における酵素活性試験を行った。A 型ジテルペン環化酵素の基質である *ent*-CDP および *syn*-CDP を組換え *OsKSL2* と反応させ、反応液を GC-MS により解析した。その結果 *syn*-CDP を基質とした場合には、反応液中にジテルペン様化合物のピークが観察されなかったのに対し (データ未掲載), *ent*-CDP を基質とした場合には、反応液中にジテルペン様化合物と考えられる 2 つのピークが観察された (Fig. 5-9A)。標準物質との比較から、ピーク B の保持時間とマススペクトルは *ent*-kaurene と一致した。そのためピーク B は *ent*-kaurene であると考えられた (Fig. 5-9A,B,D,E)。一方ピーク A については、質量スペクトルデータライブラリ (Wiley Registry 7th) との比較から、17-noukaure-15ene 13-methyl

(beyerene) であると推測された (Fig. 5-9C). 以上の結果から, OsKSL2 は *in vitro*において, *ent*-CDP を基質として *ent*-kaurene と *ent*-beyerene を生成する酵素であることが示された (Fig. 5-9F).

## 第 7 項 OsKSL2 の細胞内局在

*ent*-CDP は, 細胞内で葉緑体に局在する. そのため *ent*-CDP を基質とする OsKSL2 も葉緑体に局在することが予想された. また葉緑体局在タンパク質予測ツール (ChloroP 1.1)を用いた解析からも, OsKSL2 が葉緑体に局在し, N 末端側の 58 残基が葉緑体輸送ペプチド (transit peptide, TP) として機能すると推定された. そこでこの点を明らかにするため, GFP の N 末端に OsKSL2 の TP を融合したタンパク質 (TPksl2-GFP) を, イネプロトプラストに一過発現させ, その細胞内局在を観察した. その結果 TPksl2-GFP を発現させた形質転換細胞では, GFP シグナルが葉緑体の自家蛍光と重なって観察された (Fig. 5-10D,E,F). 従って OsKSL2 は葉緑体に局在していることが示された. 一方, ゲノムアノテーションプロジェクトにより推定された配列 (NP\_001053842) の TP を GFP に融合したタンパク質をプロトプラストに一過発現させると, GFP 蛍光は細胞質に観察された (Fig. 5-10G,H,I). この結果から, 本研究で得られた cDNA は *OsKSL2* の全長クローンであることが支持された.

#### 第4節 考察

ジテルペノ型 PA は、GGDP を出発物質として CPS と KSL による二段階の環化反応を経て生合成される (Peters, 2006; Toyomasu, 2008)。トレハロースを処理された根部では、PA 生合成に関わる *KSL* 遺伝子と偽遺伝子と考えられる *OsKSL2* の発現が誘導されることが示されていた。本研究では、トレハロースによる *KSL* 遺伝子の発現誘導が JA シグナルにより制御されることを示すとともに、*OsKSL2* の機能解析を試みた。*OsKSL2* は、*ent*-CDP を基質として *ent*-beyerene を合成する機能型のタンパク質をコードしていることを明らかにした。

PA とは「健全な組織には存在せず、病原感染時に *de novo* で合成される低分子抗菌化合物」と理解される (長谷川, 2017)。トレハロースまたは MeJA を用いた、*OsKSL2* の発現パターン解析から、*OsKSL2* は通常生育時には極めて微弱にしか発現しないこと、トレハロースまたは MeJA 処理により顕著に発現誘導されることが明らかとなった (Fig. 5-3, 5-4)。このような発現パターンの特徴は、PA 生合成の特徴とよく合致していると考えられる。また *OsKSL2* の発現パターンは、既知の PA 生合成遺伝子である *OsCPS2*, *OsCPS4*, *OsKSL4*, *OsKSL7*, *OsKSL8*, および *OsKSL10* の発現パターンとも類似している (Xu et al., 2004; Cho et al., 2004; Nemoto et al., 2004; Wilderman et al., 2004)。従つてこれらの結果は、*OsKSL2* がイネの PA 生合成に関与する可能性を強く示唆している。

*OsKSL2* の酵素活性を *in vitro* で解析したところ、*ent*-CDP を基質として

*ent*-beyerene を生成することが明らかとなった (Fig. 5-9A,C,F). *ent*-beyerene はジテルペンの一つであり、様々な植物から天然物質として単離されている (Robinson et al., 1969; Bohlmann et al., 1982; Rudloff et al., 1988). コムギやトウゴマにおいては、KSL タンパク質が *ent*-beyerene を生合成することが示されており (Zhou et al., 2012; Jacson et al., 2014), イネにおいても KSL タンパク質を介した beyerene 生合成経路が存在することは十分に考えられる。また *ent*-beyerene およびその誘導体である *ent*-beyene-19-ol, *ent*-beyerene-19-oic acid, *ent*-beyerene-18-O-oxalate, および *ent*-beyerene-18-O-succinate は、抗菌活性を示す化合物としても報告されている (Drewes et al., 2006; Tsiri et al., 2009)。そのためイネでは、既知の PA に加えて beyerene 型 PA も生産している可能性が考えられる。

OsKSL2 のもう一つの生成物である *ent*-kaurene は GA の生合成中間体である。しかし先行研究からイネにおける GA の主要な生合成経路は、OsCPS1 と OsKS1 を介した経路であると考えられており、実際にこれらの遺伝子の欠損変異株は、GA 欠失による極矮性形質を示す (Sakamoto et al., 2004; Xu et al., 2004)。そのため OsKSL2 は GA 生合成の主経路とは異なる、副経路として機能する可能性が考えられる。OsKSL2 が GA 生合成にどのように関与するかを明らかにするためには、OsKSL2 変異株を用いて GA 内生量を測定するなど、より詳細な解析を行う必要がある。

本章では、トレハロース処理による根部での OsKSL2, OsKSL4, および OsKSL7 の発現誘導が、JA シグナルに制御されることを明らかにした (Fig. 5-5)。OsKSL4 と OsKSL7 は、それぞれモミラクトン A-B とファイトカサン A-F の

生合成に関わる。モミラクトン類とファイトカサン類は抗菌活性が強く、組織に高蓄積するため、イネの主要な PA であると考えられている (Yoshida et al., 2017)。そのため TSR における JA シグナルは、PA 生合成を介して、根部局所的な病害抵抗性を制御している可能性が考えられる。

Table 5-1-1. Primers for RT-PCR

Primers	Sequence (5' to 3')	PCR condition <sup>a</sup>
OsKS1 Fw	CAGTGAACCAGCTGGAG	1
OsKS1 Rv	ACCCCTGTTCTCCAAGGAC	1
OsKSL2 Fw	CTGGGTGAAAGAGAGCAGG	1
OsKSL2 Rv	TCTGCCCTCACTCTACCTC	1
OsKSL4 Fw	CAATGGCTTCCGCAGTAC	2
OsKSL4 Rv	CCAACCGTAGCAACTCTC	2
OsKSL5 Fw	GGAAGAGGTTTCAGGAGCA	3
OsKSL5 Rv	CTGCTGATGCCATCATCCCA	3
OsKSL6 Fw	TGCCGTGGACTCCTTGCTG	4
OsKSL6 Rv	CCTCTGCCGTGAAATACCTA	4
OsKSL7 Fw	CAAAGGCTTCCCGCGTTAC	2
OsKSL7 Rv	ATAGGGCCTCCTGTTCG	2
OsKSL8 Fw	ACATCCC GGCAACAATGG	2
OsKSL8 Rv	GGAATGATGCTGCTGCTG	2
OsKSL10 Fw	TTCTCGGGCTGAAACTGTCT	4
OsKSL10 Rv	CTTCACTGTAGTAGAAC	4
Actin1 Fw	TCCATCTGGCATCTCTCAG	5
Actin1 Rv	GTACCCCTCATCAGGCATCTG	5
OsKSL2-full Fw	CGCTACGTAACCGCGATGACAGTG	6
OsKSL2-full Rv	GCCTCTGTCGTTAGTTAGTCAC	6

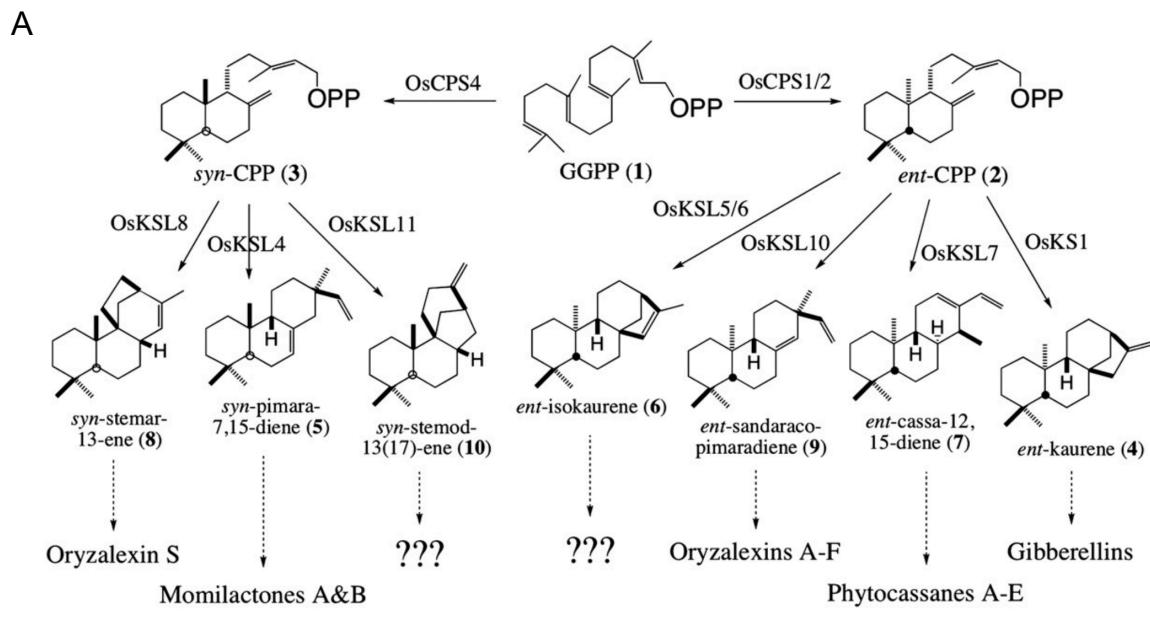
a : The numbers indicate PCR condition in Table 5-1-2.

Table 5-1-2. PCR condition for RT-PCR

Condition	Denature		Annealing		Elongation		Cycle
	°C	sec	°C	sec	°C	sec	
1	98	10	50	30	72	30	30
2	98	10	50	30	72	30	28
3	98	10	50	30	72	30	34
4	98	10	50	30	72	30	38
5	98	10	50	30	72	20	26
6	98	10	55	15	68	180	30

Table 5-2. Primers used in qRT-PCR

Gene name	RAP ID	MSU ID	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
OsACT1	Os03g0718100	LOC_Os03g50890	TCTCTCTGTATGCCAGTGGTCG	GTCGAGACGAAGGATAGCATGG
OsKSL2	Os04g0612000	LOC_Os04g52240	TGCATTCCAGCCTCTGTCG	GGTCTGCCACTTCTTCTACTCC
OsKSL4	Os04g0179700	LOC_Os04g10060	CGCCTTGTAACTCTAAGGTA	ACGTAAAAGGCTTGTATATC
OsKSL7	Os02g0570400	LOC_Os02g36140	TTCATCTCTGTCACTTTCTTTT	ATCCAACGAAGTCATCCAC



(Xu et al. 2007)

**B**

Name	Locus	Substrate	Product
OsKS1	LOC_Os04g52230	ent-CDP	ent-Kaurene
OsKSL2	LOC_Os04g52240	pseudo-gene ?	
OsKSL3	LOC_Os04g52210	pseudo-gene	
OsKSL4	LOC_Os04g10060	syn-CDP	syn-Pimaradiene
OsKSL5	LOC_Os02g36220	ent-CDP	ent-iso-Kaurene
OsKSL6	LOC_Os02g36264	ent-CDP	ent-iso-Kaurene
OsKSL7	LOC_Os02g36140	ent-CDP	ent-Cassadiene
OsKSL8	LOC_Os11g28530	syn-CDP	syn-Stemarene
OsKSL9	LOC_Os11g28500	pseudo-gene	
OsKSL10	LOC_Os12g30824	ent-CDP	ent-Pimaradiene
OsKSL11	LOC_Os12g30800	syn-CDP	syn-Stemodene

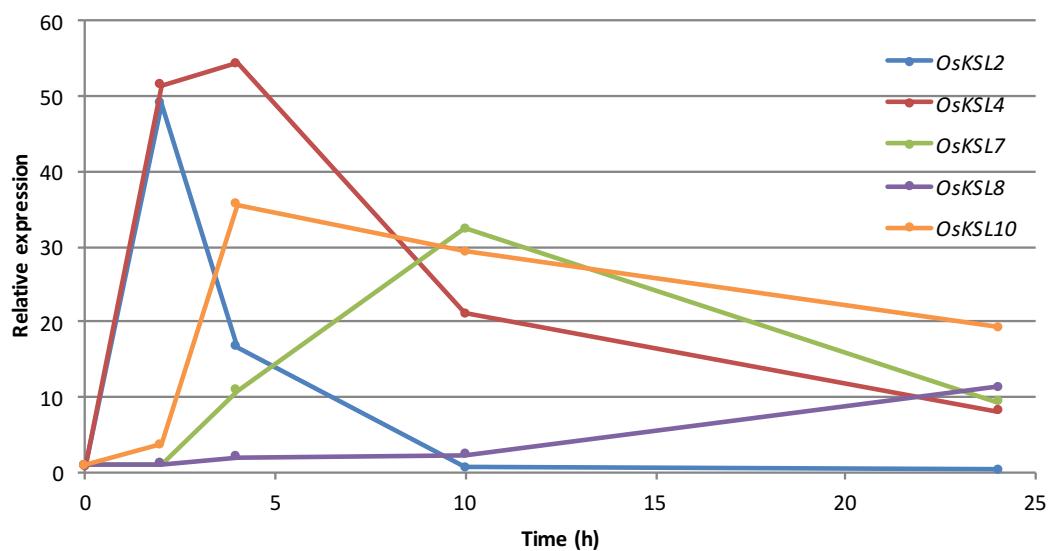
**Fig. 5-1. Function of the kaurene synthase-like gene family in rice**

(A) Biosynthesis pathway for diterpene phytoalexins and gibberellins in rice. (B) A list of kaurene synthase-like gene in rice.

A

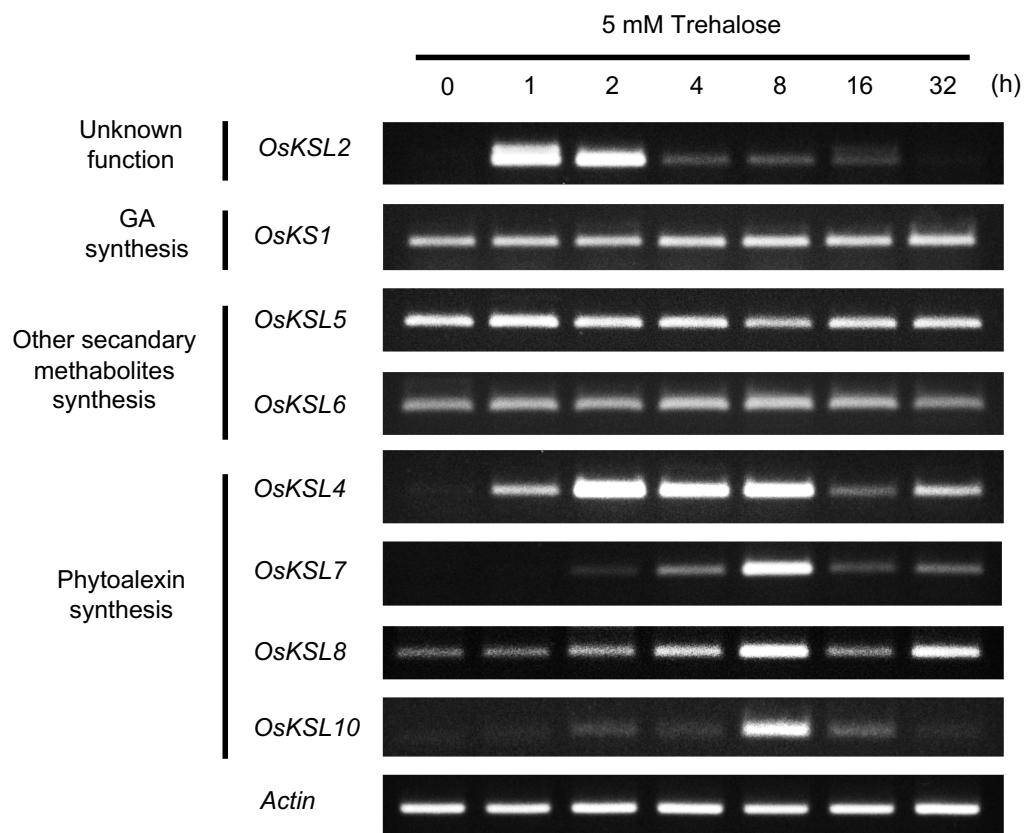
Name	Accession	Relative expression				
		0	2	4	10	24 (h)
<i>OsKSL2</i>	Os04g0612000	1.00	49.06	16.68	0.70	0.36
<i>OsKSL4</i>	Os04g0179700	1.00	51.42	54.30	21.03	8.13
<i>OsKSL7</i>	Os02g0570400	1.00	1.14	10.89	32.31	9.30
<i>OsKSL8</i>	Os11g0474800	1.00	1.13	1.94	2.38	11.37
<i>OsKSL10</i>	Os12g0491800	1.00	3.63	35.61	29.34	19.23

B



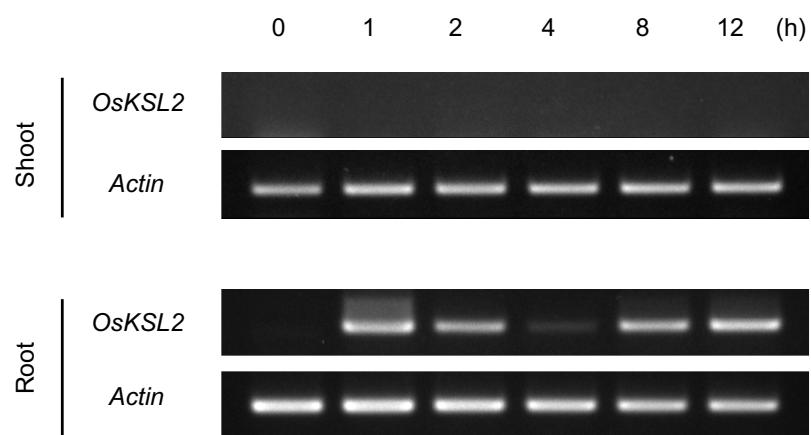
**Fig. 5-2. Trehalose up-regulates several OsKSL gene**

Hydroponically grown seedlings were treated with 5 mM trehalose. Total RNA was extracted from roots and used for microarray analysis. Rice 44k microarray (Agilent Technologies) with one-color detection method was utilized to perform a transcriptional analysis for trehalose-induced changes in gene expression. (A) The relative expression of the OsKSL genes during the trehalose treatment are indicated. (B) A graph showing the data in (A).



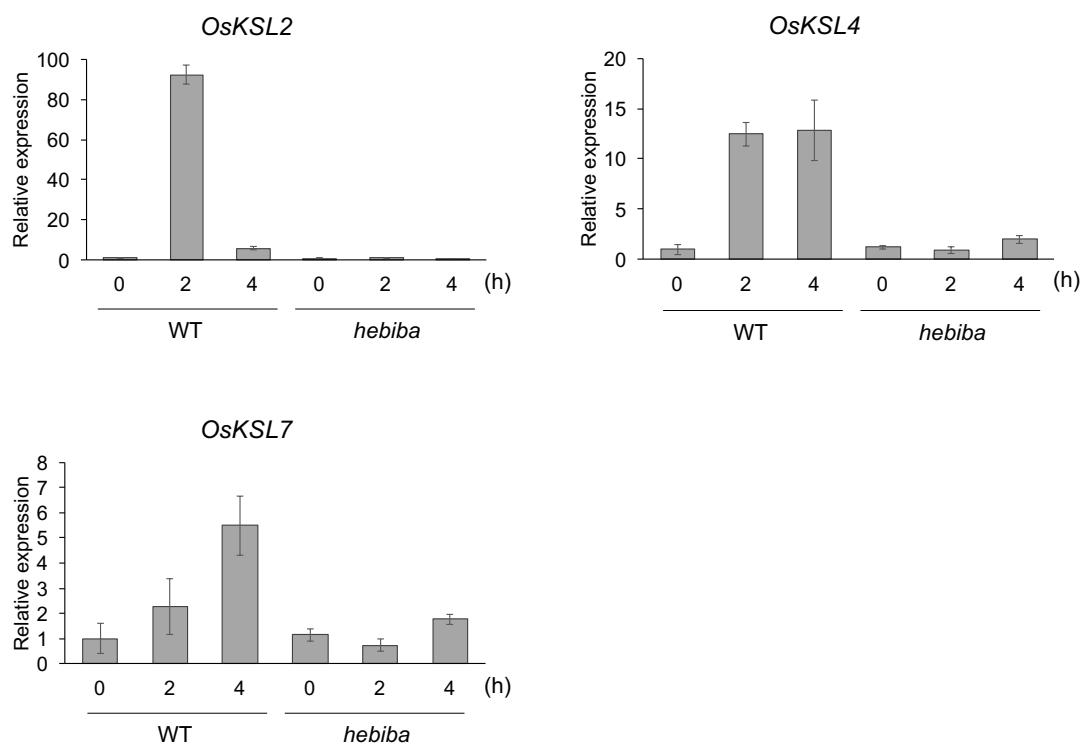
**Fig. 5-3. Expression of *KS/KSL* genes in response to trehalose**

Hydroponically grown 14-d-old seedlings were treated with 5 mM trehalose. Total RNA was extracted from roots at 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 h after initiation of the treatment. Semi-quantitative RT-PCR was performed for the *KS/KSL* family genes including *OsKSL2*.



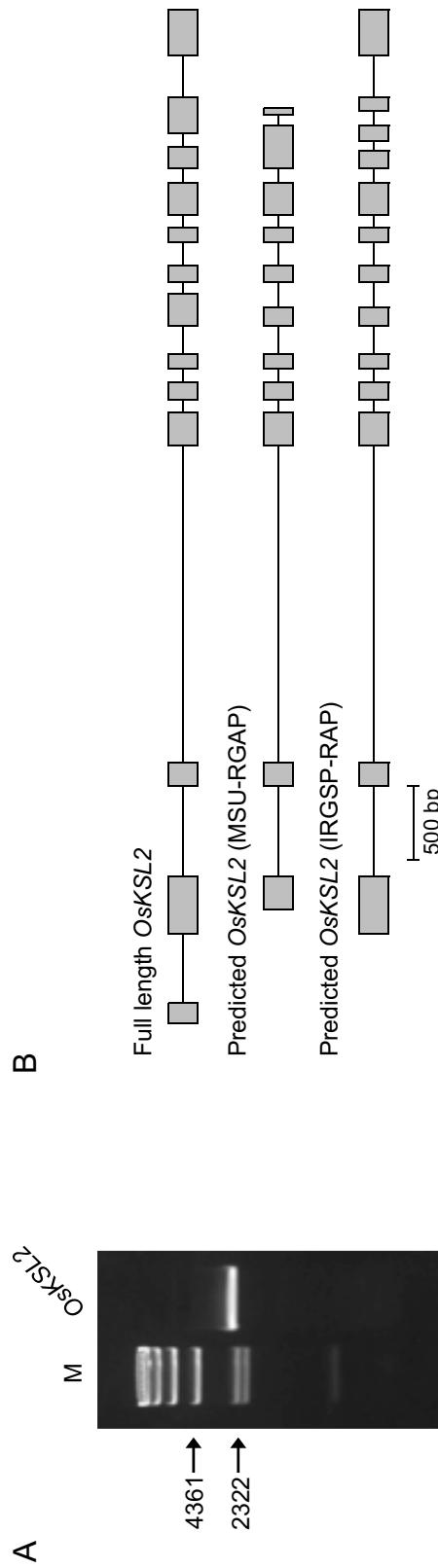
**Fig. 5-4. Expression of *OsKSL2* during MeJA treatment**

Total RNA was extracted from shoot and root tissues of 14-d-old seedlings. Semi-quantitative RT-PCR was performed with primers designed to amplify partial sequence with in the *OsKSL2* cording region.

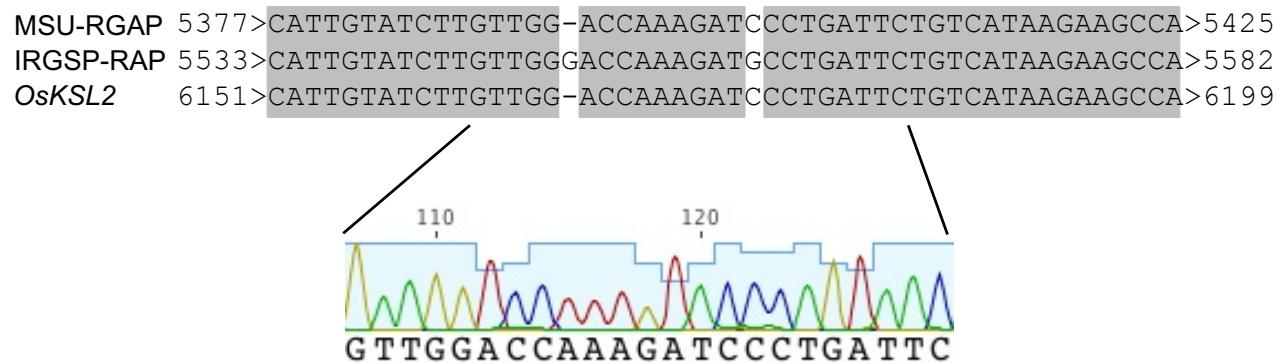


**Fig. 5-5. Expression analysis of *KSL* genes in *hebiba***

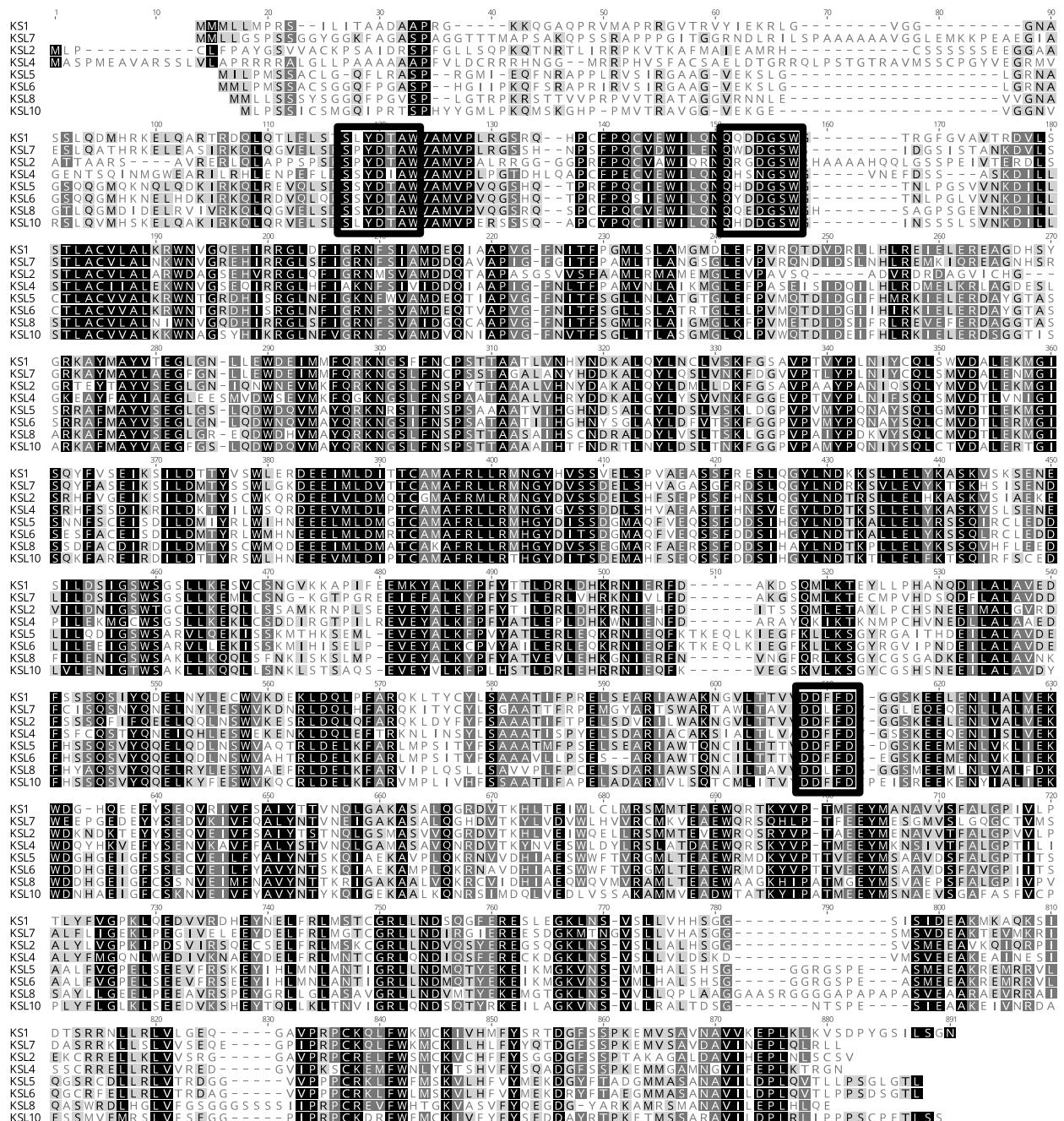
Hydroponically grown 12-d-old seedlings were treated with 5 mM trehalose in roots. Total RNA was extracted from the roots and used for qRT-PCR. Wild-type plants (WT) and the JA biosynthesis mutant plants (*hebiba*) were used. Data represents mean  $\pm$  SE (n=3).



**Fig. 5-6. Determination of the precise coding sequence for *OsKSL2***  
 (A) Isolation of a full length *OsKSL2* cDNA. MeJA-treated root RNA was used as a template for PCR reaction. (B) Genomic organization of *OsKSL2* exons. The *OsKSL2* sequence revealed by this study is aligned with two previously predicted sequences annotated by MSU-RGAP and IRGSP-RAP, respectively.

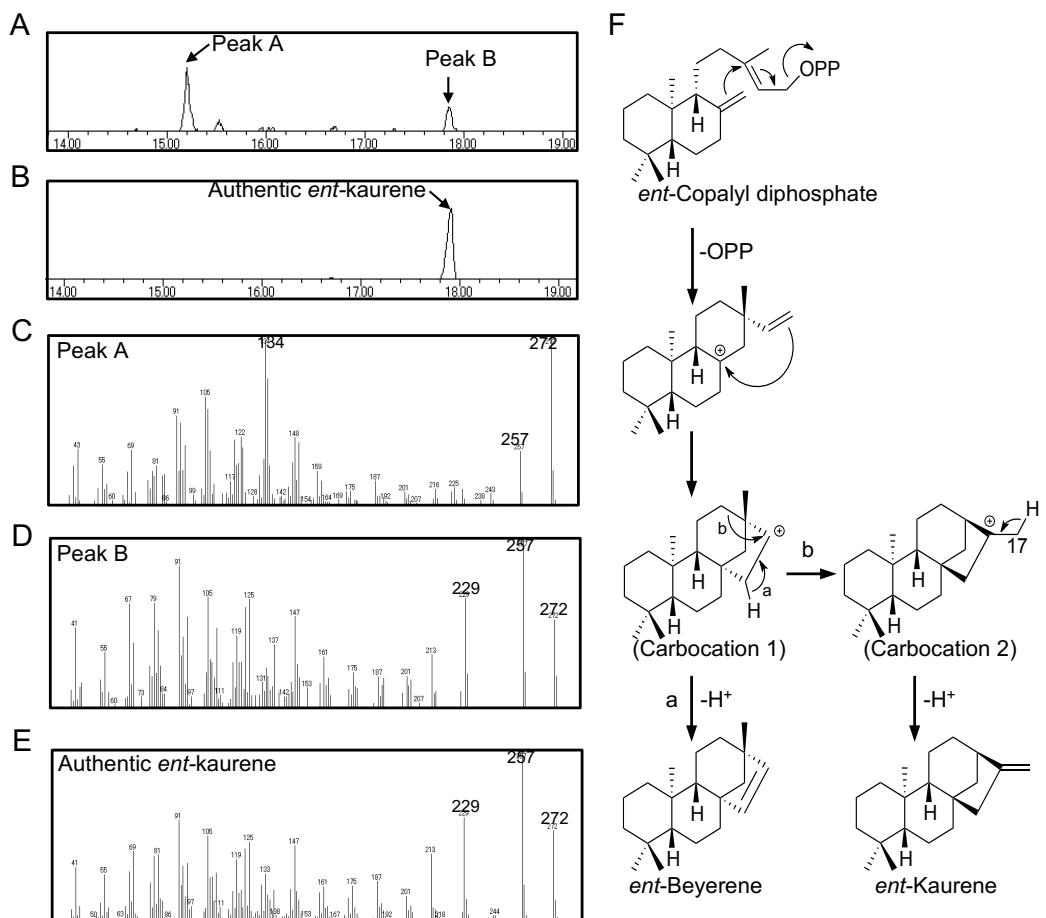


**Fig. 5-7. Possible errors in *OsKSL2* sequence from the rice genome database IRGSP-RAP**  
 Alignment of the genome sequence for *OsKSL2* from rice genome databases, MSU-RGAP (LOC\_Os04g52240) and IRGSP-RAP (NP\_001053842), are aligned with the Nipponbare genomic sequence determined in this study.



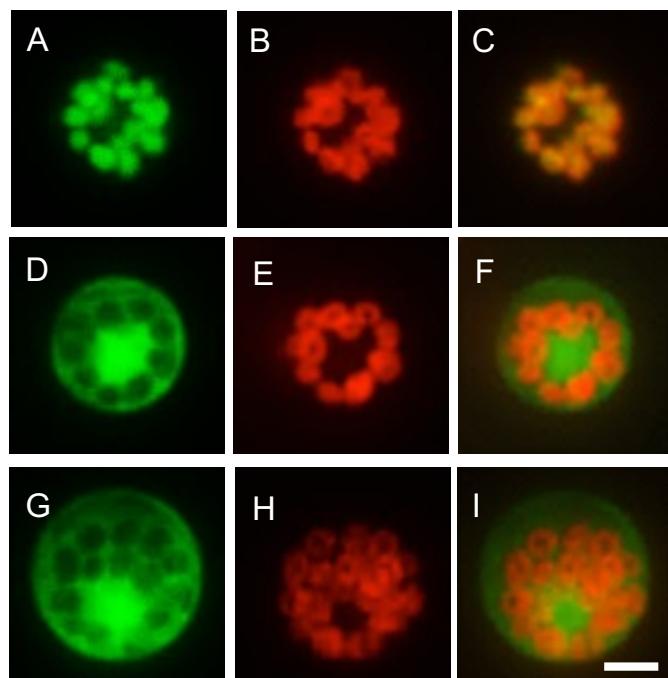
**Fig. 5-8. Alignment of OsKSL2 and representative rice KSL sequences**

Amino acid sequences of OsKSL1(AB126933.1), OsKSL4(Q0JEZ8), OsKSL7 (Q0E088), OsKSL8 (Q6BDZ9), OsKSL10 (Q2QQJ5), and OsKSL2 (LC033788) are aligned using ClustalW software (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>). The regions conserved in diterpene cyclases, SAYDTAW, QXXDGSW, and DDXXD motifs, are boxed.



**Fig. 5-9. Functional analysis of OsKSL2**

Gas chromatograms (*m/z* 272) of the products converted from *ent*-CDP by recombinant GST-OsKSL2 (A) and authentic *ent*-kaurene (B). Mass spectra of peak A (C), peak B (D), and authentic *ent*-kaurene (E). Scheme of biosynthetic pathway for the synthesis of *ent*-beyerene and *ent*-kaurene from *ent*-CDP (F).



**Fig. 5-10. Subcellular localization of KSL2 in rice protoplasts**

Fluorescence microscopic images of transformed rice protoplast cells. Images of a cell expressing GFP fused with a putative transit peptide from the full length OsKSL2 (A to C), free GFP (D to F), and GFP fused to a putative transit peptide from IRGSP-RAP-based OsKSL2 (NP\_001053842) (G to I).

Fluorescent signals of GFP (A, D, and G) and chlorophylls (B, E, and H) are merged (C, F, and I). Scale bar is 5  $\mu\text{m}$ .

## 第6章 総括

トレハロースは微生物や無脊椎動物など広範囲の生物群に見出される二糖であり、貯蔵糖やストレス保護物質として機能する (Wyatt, 1967; Singer and Lindquist, 1998)。高等植物においてもトレハロースは内生糖として存在するが、その蓄積量は極微量であり、植物中でどのような生理機能を持つかについては不明な点が多い。イネでは、根部へのトレハロース処理が、根部での防御関連遺伝子の発現を誘導すること (Fig. 1-4)，地上部でのイネいもち病抵抗性を誘導することが示されている (Fig. 1-5, 1-6)。このトレハロースに誘導される植物体全身での防御応答は Trehalose-induced systemic resistance (TSR) と称される (Fig. 1-7)。TSR は、トレハロースという自然界に普遍的に存在する二糖が、植物におけるシグナル物質として機能する可能性を示している。そのため TSR を理解することで、植物におけるトレハロースの生理機能について新たな知見を得られると期待される。本研究では TSR の分子機構の解明を目的に、TSR における植物ホルモンの関与を解析するとともに、トレハロースがどのように TSR を誘起するのかを検討した。

### TSR における植物ホルモンの関与

植物が持つ全身誘導型の防御応答としては、SA シグナルを介して制御される SAR と、JA/ET シグナルを介して制御される WSR, ISR の 3 つが知られる (Fu et al., 2013; van Loon et al., 1998)。TSR は根部から地上部に抵抗性が誘導される新規の全身抵抗性である。そのため TSR のシグナル伝達も、植物ホルモン

に制御されることが予想された。そこで TSR における植物ホルモンの関与を調べるために、トレハロース処理後のホルモン内生量を定量した。トレハロース処理された根部では、病害関連の植物ホルモンである JA, JA-Ile, および SA の蓄積が観察された (Fig. 2-5, 2-6)。またこれらの蓄積が TSR を制御するかを検討するため、JA 生合成変異株 *hebiba* および SA 分解酵素過剰発現株 *NahG* を用いて、植物ホルモン欠損状態での TSR を観察した。その結果、TSR における根部での防御関連遺伝子の発現は JA シグナルと SA シグナルに制御されること (Fig. 2-7, 2-8)，地上部での病害抵抗性は SA シグナルに制御されることが明らかとなった (Fig. 2-9, 2-10)。

一般に JA シグナルと SA シグナルは拮抗的に作用すると考えられている。しかし各ホルモン濃度が低い場合には、両シグナルが相乗的に遺伝子発現などを制御することが示されている (Mur et al., 2006)。TSR における根部での JA および JA-Ile の内生量は (Fig. 2-5)，傷害ストレス時などの内生量と比較して少なかった (Wakuta et al., 2011)。また根部では、SA 内生量の基底レベルも低いことから (Chen et al., 1997)，TSR における根部では防御関連遺伝子の発現の一部は、JA シグナルと SA シグナルが相乗的に制御していると考えられる。根部における JA シグナルと SA シグナルの相互作用について、解析を続けていく必要がある。一方で、TSR における地上部の病害抵抗性が SA シグナルに制御されることから、TSR は SAR と類似の現象である可能性が考えられる。しかし SAR の移動性シグナル物質が SA 類であることが示されているのに対し (Shulaev et al., 1997)，TSR の移動性シグナル物質は明らかにされていない。TSR の全容を明らかにするためには、今後この点を明らかにする必要がある。

## トレハロースによる TSR の誘起

トレハロースと他の二糖を用いた解析から、スクロースやマルトースは TSR を誘導しないことが明らかとなった (Fig. 2-1, 2-2). そのため、TSR はトレハロースに特異的な現象であると考えられる。しかし、トレハロースがどのようにして TSR を誘起するのかは明らかでない。TSR の誘起様式として、以下の 3 つの可能性が考えられる。すなわち、細胞外のトレハロースが細胞膜に物理的に干渉することで TSR を引き起こす可能性、細胞外のトレハロースが細胞膜上の受容体に認識されることで TSR を引き起こす可能性、細胞外から取り込まれたトレハロースが細胞内に蓄積することで TSR を引き起こす可能性である。このうち 3 つ目の可能性を検証するため、根部にトレハロースを高蓄積する変異株を作出し (Fig. 3-1, 3-5)，TSR 様の現象が観察されるか調べた。その結果、変異株の根部では、トレハロース誘導性遺伝子の発現に大きな変化は観察されなかった (Fig. 3-7)。従って、細胞内のトレハロース高蓄積が TSR を誘導する可能性は低いと考えられる。受容体に認識されることで植物の防御応答を誘導する PAMP には、キチンや  $\beta$ -グルカンなどの糖質が含まれる (Cheong et al., 1991; Kaku et al., 2006)。そのため植物がトレハロース特異的な受容体を持つ可能性は十分に考えられる。一方で、PAMP は nM レベルで植物の防御応答を誘導するのに対し (Cheong et al., 1991; Kaku et al., 2006)，トレハロースは mM レベルで TSR を誘導する。そのためトレハロース受容体が存在するという仮説に、多少の疑問も生じる。トレハロースが細胞膜に物理的に干渉する可能性についても、十分な検討を行う必要がある。

## TSRにおけるJAシグナルの詳細な解析

TSRにおけるJAシグナルは、根部での防御応答に関与すると予想された。そこでこの点について、より詳細な解析を行った。トレハロース処理された根部において、JA依存的に発現誘導される転写因子遺伝子 *OsERF83*に着目し、その機能解析を行った。細胞内局在解析、転写活性化能の評価、核酸結合能の評価から、*OsERF83*がGCCボックスを認識する正の転写調節因子であることが示された（Fig. 4-4, 4-5, 4-6）。*OsERF83*の過剰発現株を作出し、遺伝子発現解析から *OsERF83*が制御する下流遺伝子を決定したところ、トレハロース処理により根部で発現が誘導されるPRタンパク質遺伝子 *Gns6*, *TLP*, *PR10b*, *RIR1b*, および *RIR1b-like*が見出された（Fig. 1-4, 4-8）。従ってトレハロース処理された根部では、JAシグナルが *OsERF83*を介して、一部のPRタンパク質の発現制御を行う可能性が示された。一方で、トレハロースによりJA依存的に誘導される転写因子遺伝子は、*OsERF83*以外にも見出された（Fig. 2-7）。

TSRにおけるJAシグナルの全容を明らかにするためには、これらの転写因子についても機能解析を行う必要がある。

トレハロース処理された根部では、PA生合成遺伝子の発現が上昇する（Fig. 1-4, 5-3）。そこでPA生合成遺伝子の発現誘導が、JAシグナルに制御されるかを解析した。その結果、PA生合成遺伝子 *OsKSL4*および*OsKSL7*のトレハロースによる発現誘導には、JAシグナルが不可欠であることが示された（Fig. 5-5）。*OsKSL4*と*OsKSL7*は、イネの主要なPAであるモミラクトン類とファイトカサン類の生合成酵素である（Toyomasu, 2008）。従ってTSRにおけるJAシグナルは、PA生合成を介することで、根部局所的な病害抵抗性を制御している

可能性が考えられた。またトレハロース処理された根部では、*OsKSL2* の発現が JA 依存的に誘導されることも明らかとなった (Fig. 5-5)。*OsKSL2* は全長 cDNA が得られないことから、偽遺伝子であると考えられていたが (Xu et al., 2007)，本研究により全長 cDNA が初めて単離された (Fig. 5-6)。*OsKSL2* は *ent*-CDP を基質に *ent*-beyerene を合成する機能型のタンパク質をコードしていた (Fig. 5-9)。*ent*-beyerene とその誘導体は抗菌活性を持つことが報告されており (Drewes et al., 2006; Tsiri et al., 2009)，TSR における JA シグナルは、根部における beyerene 型 PA の生産も制御している可能性がある。

### TSR の推定分子機構

本研究の結果から、TSR の分子機構が推定された。すなわち、根部に処理されたトレハロースは、細胞膜に物理的に干渉することで、あるいは細胞膜上の受容に認識されることで、細胞内にシグナルを伝達する。このシグナルは、根部での JA 類と SA の蓄積を誘導することで、それぞれのホルモンシグナルに変換され防御応答を制御する。JA シグナルは根部局所的な防御応答に関わり、PA 生合成や、*OsERF83* を介した PR タンパク質の生産を制御する。一方 SA シグナルは、根部での防御関連遺伝子の発現誘導に寄与するだけでなく、地上部のイネいもち病抵抗性を制御することで、TSR の全身誘導型の病害抵抗生に関わる。

## 謝　　辞

本研究を行うにあたり，博士後期課程から北海道大学大学院農学院共生基盤学専攻食品安全・機能性開発学講座に暖かく迎え入れていただき，その後も懇切な御指導と御鞭撻を賜りました，北海道大学大学院農学研究院 森春英 教授に深く感謝申し上げます。

また本論文の御校閲をはじめ，研究の場を提供してくださるとともに，暖かい御指導と御鞭撻を賜りました，農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 主席研究員 今井亮三 博士に深く感謝申し上げます。

本論文の御校閲を賜り，多くの御助言とご協力を頂きました北海道大学大学院農学研究院 松浦英幸 教授，同研究院 佐分利亘 助教，に感謝申し上げます。

北海道大学農学部 生物機能化学科 生物化学講座への移行時，教授として暖かく迎え入れて下さるとともに，研究生活の心得など多くの御助言を賜りました，北海道大学大学院農学研究院 松井博和 名誉教授に感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり多大な御協力および貴重なデータあるいは試料の提供を頂きました，山形大学農学部 豊増知伸 教授，首都大学東京生命科学科 小柴共一 客員教授，農業・食品産業技術総合研究機構 遠藤真咲 博士，同機構 西澤洋子 博士，に感謝申し上げます。

研究や私生活の面でも良き相談相手になって頂きました，株式会社カネカ研究員 柳楽洋三 博士，濱田晴康 博士，ならびに農業・食品産業技術総合研究機構 佐々木健太郎 博士，金明姫 博士，松平洋明 博士，宇梶慎子 博士，Dr. Zornitsa Lanzhova，Dr. Liu Yuelin に感謝致します。

最後に、学生生活を暖かく見守り経済的、精神的に支えて下さった両親、家族に深く感謝致します。

2018年12月

手塚 大介

## 引用文献

- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinder, A., Virgilio, C. De, Wiemken, A., Thevelein, J.M., 1998. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* 273, 33311–33319.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R., 2002. Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* 29, 23–32.
- Blázquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M., 1993. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.* 329, 51–54.
- Blázquez, M.A., Santos, E., Flores, C.L., Martínez-Zapater, J.M., Salinas, J., Gancedo, C., 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13, 685–689.
- Bohlmann, F., Wegner, P., 1982. *Ent*beyer-15-ene derivatives from *Nidorella anomala*. *Phytochemistry* 21, 1175–1177.
- Brodmann, A., Schuller, A., Ludwig-Müller, J., Aeschbacher, R. a, Wiemken, A., Boller, T., Wingler, A., 2002. Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol. plant-microbe Interact.* 15, 693–700.
- Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C.-Z., Riechmann, J.L., 2004. WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4706–4711.
- Chary, S.N., Hicks, G.R., Choi, Y.G., Carter, D., Raikhel, N. V., 2007. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell Shape and plant architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146, 97–107.
- Chen, Z., Iyer, S., Caplan, A., Klessig, D.F., Fan, B., 1997. Differential Accumulation of Salicylic Acid and Salicylic Acid-Sensitive Catalase in Different Rice Tissues. *Plant Physiol.* 114, 193–201.
- Cheong, J., Birberg, W., Füged, P., Pilotti, A., Garegg, P.J., Hong, N., Ogawa, T., Hahn, M.G., 1991. Structure-activity relationships of oligo- $\beta$ -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Cell* 3, 127–136.
- Cho, E., Okada, A., Kenmoku, H., Otomo, K., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., 2004. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding *ent*-cassa-12, 15-diene synthase, a

- putative diterpenoid phytoalexin biosynthetic enzyme, from suspension-cultured rice cells treated with a chitin elicitor. *Plant J.* 37, 1–8.
- Choi, Y., Cho, K.W., Jeong, K., Jung, S., 2006. Molecular dynamics simulations of trehalose as a “dynamic reducer” for solvent water molecules in the hydration shell. *Carbohydr. Res.* 341, 1020–1028.
- Choudhary, D.K., Prakash, A., Johri, B.N., 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47, 289–297.
- Chuck, G., Meeley, R.B., Hake, S., 1998. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene *indeterminate spikelet1*. *Genes Dev.* 12, 1145–1154.
- De Virgilio, C., Burckert, N., Bell, W., Jeno, P., Boller, T., Wiemken, A., 1993. Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase / phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase act. *Eur. J. Biochem.* 212, 315–323.
- DeBosch, B.J., Heitmeier, M.R., Mayer, A.L., Higgins, C.B., Crowley, J.R., Kraft, T.E., Chi, M., Newberry, E.P., Chen, Z., Finck, B.N., Davidson, N.O., Yarasheski, K.E., Hruz, P.W., Moley, K.H., 2016. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci. Signal.* 9, ra21.
- Delorge, I., Figueroa, C.M., Feil, R., Lunn, J.E., Van Dijck, P., 2015. Trehalose-6-phosphate synthase 1 is not the only active TPS in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 466, 283–90.
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., Klessig, D.F., 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *Arab. B.* 9, e0156.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R., Bakker, E.P., 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* 150, 348–357.
- Dowd, M.K., Reilly, P.J., 1992. Conformational Analysis of Trehalose Disaccharides and Analogues Using MM3. *J. Comput. Chem.* 13, 102–114.
- Drewes, S.E., Mudau, K.E., Vuuren, S.F. Van, Viljoen, A.M., 2006. Antimicrobial monomeric and dimeric diterpenes from the leaves of *Helichrysum tenax* var *tenax*. *Phytochemistry* 67, 716–722.
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L.,

- encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33, 751–763.
- Eastmond, P.J., Graham, I.A., 2003. Trehalose metabolism: A regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 231–235.
- Eastmond, P.J., Van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C., Graham, I.A., 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* 29, 225–235.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T., 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265–276.
- Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., Lorenzo, G. De, 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4, 1–9.
- French, A.D., Johnson, G.P., Kelterer, A.M., Dowd, M.K., Cramer, C.J., 2002. Quantum mechanics studies of the intrinsic conformation of trehalose. *J. Phys. Chem. A* 106, 4988–4997.
- Fritzius, T., Aeschbacher, R., Wiemken, A., Wingler, A., 2001. Induction of *ApL3* expression by trehalose complements the starch-deficient *Arabidopsis* mutant *adg2-1* lacking ApL1, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 126, 883–889.
- Fu, Z.Q., Dong, X., 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 839–863.
- Ge, L.F., Chao, D.Y., Shi, M., Zhu, M.Z., Gao, J.P., Lin, H.X., 2008. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta* 228, 191–201.
- Giaever, H.M., Styrvold, O.B., Kaasen, I., Strøm, A., 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 2841–2849.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T., 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5, 1003–1011.
- Gu, Y., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y., Yang, C., He, X., Han, Y., Martin, G.B., 2002. Tomato transcription factors PtI4, PtI5, and PtI6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 817–831.
- Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., Martin, G.B., 2000. *PtI4* is induced by ethylene and

- salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12, 771–786.
- Guo, Z.J., Chen, X.J., Wu, X.L., Ling, J.Q., Xu, P., 2004. Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 55, 607–618.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., Brent, R., 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75, 791–803.
- Hardie, D.G., 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774–785.
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X.J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H., Ashikari, M., 2009. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460, 1026–1030.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M., Boos, W., 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 7918–7924.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271–282.
- Hillwig, M.L., Xu, M., Toyomasu, T., Tiernan, M.S., Wei, G., Cui, G., Huang, L., Peters, R.J., 2011. Domain loss has independently occurred multiple times in plant terpene synthase evolution. *Plant J.* 68, 1051–1060.
- Horie, K., Inoue, Y., Sakai, M., Yao, Q., Tanimoto, Y., Koga, J., Toshima, H., Hasegawa, M., 2015. Identification of UV-induced diterpenes including a new diterpene phytoalexin, phytocassane F, from rice leaves by complementary GC/MS and LC/MS approaches. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4050–4059.
- Huang, P.Y., Catinot, J., Zimmerli, L., 2016. Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *J. Exp. Bot.* 67, 1231–1241.
- Iordachescu, M., Imai, R., 2008. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1223–1229.
- Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamasaki, S., 2009. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J. Exp. Med.* 206, 2879–2888.

- Islam, M.O., Kato, H., Shima, S., Tezuka, D., Matsui, H., Imai, R., 2019. Functional identification of a rice trehalase gene involved in salt stress tolerance. *Gene* 685, 42–49.
- Jackson, A.J., Hershey, D.M., Chesnut, T., Xu, M., Peters, R.J., 2014. Biochemical characterization of the castor bean *ent*-kaurene synthase (-like) family supports quantum chemical view of diterpene cyclization. *Phytochemistry* 103, 13–21.
- Jung, K.-H., Seo, Y.-S., Walia, H., Cao, P., Fukao, T., Canlas, P.E., Amonpant, F., Bailey-Serres, J., Ronald, P.C., 2010. The submergence tolerance regulator *Sub1A* mediates stress-responsive expression of *AP2/ERF* transcription factors. *Plant Physiol.* 152, 1674–1692.
- Kaasen, I., McDougall, J., Strøm, A.R., 1994. Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* 145, 9–15.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N., 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11086–11091.
- Kandror, O., DeLeon, A., Goldberg, A.L., 2002. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9727–9732.
- Kanno, Y., Otomo, K., Kenmoku, H., Mitsuhashi, W., Yamane, H., Oikawa, H., Toshima, H., Matsuoka, M., Sassa, T., Toyomasu, T., 2006. Characterization of a Rice Gene Family Encoding Type-A Diterpene Cyclases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1702–1710.
- Komatsu, M., Chujo, A., Nagato, Y., Shimamoto, K., Kyozuka, J., 2003. *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development* 130, 3841–3850.
- Krasensky, J., Broyart, C., Rabanal, F. a, Jonak, C., 2014. The redox-sensitive chloroplast trehalose-6-phosphate phosphatase AtTPPD regulates salt stress tolerance. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1289–1304.
- Kuttel, M.M., Naidoo, K.J., 2005. Ramachandran free-energy surfaces for disaccharides: Trehalose, a case study. *Carbohydr. Res.* 340, 875–879.
- Lambruschini, C., Relini, A., Ridi, A., Cordone, L., Gliozzi, A., 2000. Trehalose interacts with phospholipid polar heads in Langmuir monolayers. *Langmuir* 16, 5467–5470.
- Lederer, E., 1976. Cord factor and related trehalose esters. *Chem. Phys. Lipids* 16, 91–106.
- Lee, D.-K., Jung, H., Jang, G., Jeong, J.S., Kim, Y.S., Ha, S.-H., Do Choi, Y., Kim, J.-K., 2016.

- Overexpression of the *OsERF71* transcription factor alters rice root structure and drought resistance. *Plant Physiol.* 172, 575–588.
- Lee, M.-W., Qi, M., Yang, Y., 2001. A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 527–535.
- Lerbret, A., Bordat, P., Affouard, F., Descamps, M., Migliardo, F., 2005. How homogeneous are the trehalose, maltose, and sucrose water solutions? an insight from molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* 109, 11046–11057.
- Lerbret, A., Bordat, P., Affouard, F., Guinet, Y., Hedoux, A., Paccou, L., Prevost, D., Descamps, M., 2005. Influence of homologous disaccharides on the hydrogen-bond network of water: complementary raman scattering experiments and molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.* 340, 881–887.
- Li, H.W., Zang, B.S., Deng, X.W., Wang, X.P., 2011. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234, 1007–1018.
- Liu, D., Chen, X., Liu, J., Ye, J., Guo, Z., 2012. The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 63, 3899–3912.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low- temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1391–1406.
- Luzardo, M. del C., Amalfa, F., Nuñez, A.M., Díaz, S., Biondi de Lopez, A.C., Disalvo, E.A., 2000. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers. *Biophys. J.* 78, 2452–2458.
- Maquat, L.E., 2002. Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr. Biol.* 12, 196–197.
- Matsuura, H., Aoi, A., Satou, C., Nakaya, M., Masuta, C., Nabeta, K., 2009. Simultaneous UPLC MS/MS analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds. *Plant Growth Regul.* 57, 293–301.
- Matsuura, H., Takeishi, S., Kiatoka, N., Sato, C., Sueda, K., Masuta, C., Nabeta, K., 2012. Transportation of de novo synthesized jasmonoyl isoleucine in tomato. *Phytochemistry* 83, 25–33.
- Mayer, A.L., Higgins, C.B., Heitmeier, M.R., Kraft, T.E., Qian, X., Crowley, J.R., Hyrc, K.L., Beatty, W.L., Yarasheski, K.E., Hruz, P.W., Debosch, B.J., 2016. SLC2A8 (GLUT8) is a

mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy. *Sci. Rep.* 6, 1–15.

Miyake, Y., Toyonaga, K., Mori, D., Kakuta, S., Hoshino, Y., Oyamada, A., Yamada, H., Ono, K.I., Suyama, M., Iwakura, Y., Yoshikai, Y., Yamasaki, S., 2013. C-type lectin MCL is an FcRγ-coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor. *Immunity* 38, 1050–1062.

Morrone, D., Jin, Y., Xu, M., Choi, S.Y., Coates, R.M., Peters, R.J., 2006. An unexpected diterpene cyclase from rice: Functional identification of a stemodene synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 448, 133–140.

Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., Wasternack, C., 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140, 249–262.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T., 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 34–41.

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi, H., 2006. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family. *Plant Physiol.* 140, 411–432.

Nemoto, T., Cho, E., Okada, A., Okada, K., Otomo, K., Kanno, Y., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Minami, E., 2004. Stemar-13-ene synthase, a diterpene cyclase involved in the biosynthesis of the phytoalexin oryzalexin S in rice. *FEBS Lett.* 571, 182–186.

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

Oku, K., Kurose, M., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Okabe, A., Sakurai, M., 2005. Combined NMR and quantum chemical studies on the interaction between trehalose and dienes relevant to the antioxidant function of trehalose. *J. Phys. Chem. B* 109, 3032–3040.

Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Komori, M., Inoue, Y., Sakurai, M., 2003. NMR and quantum chemical study on the OH···π and CH···O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12739–12748.

Otomo, K., Kanno, Y., Motegi, A., Kenmoku, H., Yamane, H., Mitsuhashi, W., Oikawa, H.,

- Toshima, H., Itoh, H., Matsuoka, M., Sassa, T., Toyomasu, T., 2004a. Diterpene cyclases responsible for the biosynthesis of phytoalexins, momilactones A, B, and oryzalexins A–F in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2001–2006.
- Otomo, K., Kenmoku, H., Oikawa, H., König, W. a., Toshima, H., Mitsuhashi, W., Yamane, H., Sassa, T., Toyomasu, T., 2004b. Biological functions of *ent*- and *syn*-copalyl diphosphate synthases in rice: Key enzymes for the branch point of gibberellin and phytoalexin biosynthesis. *Plant J.* 39, 886–893.
- Peric-Hassler, L., Hansen, H.S., Baron, R., Hunenberger, P.H., 2010. Conformational properties of glucose-based disaccharides investigated using molecular dynamics simulations with local elevation umbrella sampling. *Carbohydr. Res.* 345, 1781–1801.
- Peters, R.J., 2006. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. *Phytochemistry* 67, 2307–2317.
- Polge, C., Thomas, M., 2006. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* 12, 20–28.
- Pramanik, M.H.R., Imai, R., 2005. Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Mol. Biol.* 58, 751–762.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M.J., Memelink, J., 2008. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *PLANT Physiol.* 147, 1347–1357.
- Ramon, M., De Smet, I., Vandesteene, L., Naudts, M., Leyman, B., Van Dijck, P., Rolland, F., Beeckman, T., Thevelein, J.M., 2009. Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the Class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Environ.* 32, 1015–1032.
- Reinders, A., Bürckert, N., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Boller, T., Wiemken, A., De Virgilio, C., 1997. Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock. *Mol. Microbiol.* 24, 687–695.
- Ren, D., Li, Y., Zhao, F., Sang, X., Shi, J., Wang, N., Guo, S., Ling, Y., Zhang, C., Yang, Z., He, G., 2013. *MULTI-FLORET SPIKELET1*, which encodes an AP2/ERF protein, determines spikelet meristem fate and sterile lemma identity in rice. *Plant Physiol.* 162, 872–884.

- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G.-L., 2000. *Arabidopsis* transcription factors: Genome wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. 290, 2105–2110.
- Robinson, D.R., West, C.A., 1969. Biosynthesis of cyclic diterpenes in extracts from seedlings of *Ricinus communis* L. I. identification of diterpene hydrocarbons formed from mevalonate. *Biochemistry* 9, 70–79.
- Rudloff, E.V.O.N., Lapp, M.S., Yeh, F.C., 1988. Chemosystematic study of *Thuja plicata*: multivariate analysis of leaf oil terpene composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 16, 119–125.
- Sakakura, K., Okabe, A., Oku, K., Sakurai, M., 2011. Experimental and theoretical study on the intermolecular complex formation between trehalose and benzene compounds in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* 115, 9823–9830.
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G.K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M., 2004. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.* 134, 1642–1653.
- Sakurai, M., Murata, M., Inoue, Y., Hino, A., Kobayashi, S., 1997. Molecular-dynamics study of aqueous solution of trehalose and maltose: implication for the biological function of trehalose. *Chem. Soc. Japan* 70, 847–858.
- Schaffrath, U., Mauch, F., Freydl, E., Schweizer, P., Dudler, R., 2000. Constitutive expression of the defense-related *Rir1b* gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol. Biol.* 43, 59–66.
- Schiestl, R.H., Gietz, R.D., 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339–346.
- Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H.M., Obata, T., Hoefgen, R., Fernie, A.R., Fisahn, J., San Segundo, B., Guiderdoni, E., Schippers, J.H.M., Mueller-Roeber, B., 2013. SALT- RESPONSIVE ERF1 regulates reactive oxygen species-dependent signaling during the initial response to salt stress in rice. *Plant Cell* 25, 2115–2131.
- Sentoku, N., Sato, Y., Matsuoka, M., 2000. Overexpression of rice *OSH* genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants. *Dev. Biol.* 220, 358–364.
- Sharoni, A.M., Nuruzzaman, M., Satoh, K., Shimizu, T., Kondoh, H., Sasaya, T., Choi, I.R., Omura, T., Kikuchi, S., 2011. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol.* 52, 344–360.

- Shibuya, N., Minami, E., 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59, 223–233.
- Shima, S., Matsui, H., Tahara, S., Imai, R., 2007. Biochemical characterization of rice trehalose-6-phosphate phosphatases supports distinctive functions of these plant enzymes. *FEBS J.* 274, 1192–1201.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.-J., Ono, K., Toki, S., Takatsuji, H., 2007. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* 19, 2064–2076.
- Shukla, E., Thorat, L.J., Nath, B.B., Gaikwad, S.M., 2015. Insect trehalase: Physiological significance and potential applications. *Glycobiology* 25, 357–367.
- Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I., 1997. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385, 718–721.
- Singer, M.A., Lindquist, S., 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16, 460–468.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., Ecker, J.R., 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* 12, 3703–3714.
- Styrvold, O.B., Strom, A.R., 1991. Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: Influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J. Bacteriol.* 173, 1187–1192.
- Sugawara, M., Cytryn, E.J., Sadowsky, M.J., 2010. Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1071–1081.
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V., Mittler, R., 2008. The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 283, 9269–9275.
- Thevelein, M., Hohmann, S., 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.* 20, 3–10.
- Toyomasu, T., 2008. Recent advances regarding diterpene cyclase genes in higher plants and fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1168–1175.
- Tsiri, D., Graikou, K., Krauze, M., Spyropoulos, C., Chinou, I., 2009. Chemosystematic value of the essential oil composition of *Thuja* species cultivated in poland—antimicrobial activity. *Molecules* 14, 4707–4715.

- van der Fits, L., Memelink, J., 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*. 289, 295–297.
- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A.D.D., Hooykaas, P.J.J., Keller, B., van der, G.E., 2000. Activation tagging of the *LEAFY PETIOLE* gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127, 4971–4980.
- Van Houtte, H., Vandesteene, L., Lopez-Galvis, L., Lemmens, L., Kissel, E., Carpentier, S., Feil, R., Avonce, N., Beeckman, T., Lunn, J.E., Van Dijck, P., 2013. Overexpression of the trehalase gene *AtTRE1* leads to increased drought stress tolerance in *Arabidopsis* and is involved in abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.* 161, 1158–1171.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483.
- Vandesteene, L., Lopez-Galvis, L., Vanneste, K., Feil, R., Maere, S., Lammens, W., Rolland, F., Lunn, J.E., Avonce, N., Beeckman, T., Van Dijck, P., 2012. Expansive evolution of the TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160, 884–896.
- Vandesteene, L., Ramon, M., Le Roy, K., Van Dijck, P., Rolland, F., 2010. A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 3, 406–419.
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 895–908.
- Vogel, G., Fiehn, O., Jean-Richard-Dit-Bressel, L., Boller, T., Wiemken, A., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., 2001. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *J. Exp. Bot.* 52, 1817–1826.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn, J.E., Stitt, M., Schmid, M., 2013. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 339, 704–708.
- Wakuta, S., Suzuki, E., Saburi, W., Matsuura, H., Nabeta, K., Imai, R., Matsui, H., 2011. OsJAR1 and OsJAR2 are jasmonyl-L-isoleucine synthases involved in wound- and pathogen-induced jasmonic acid signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 634–639.
- Wan, L., Zhang, J., Zhang, H., Zhang, Z., Quan, R., Zhou, S., Huang, R., 2011. Transcriptional

- activation of OsDERF1 in *OsERF3* and *OsAP2-39* negatively modulates ethylene synthesis and drought tolerance in rice. PLoS One 6, e25216.
- Ward, J.M., Kuhn, C., Tegeder, M., Frommer, W.B., 1998. Sucrose transport in higher plants. Int. Rev. Cytol. 178, 41–71.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F., Okuda, T., 2002. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. J. Exp. Biol. 205, 2799–2802.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Okuda, T., 2003. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. J. Exp. Biol. 206, 2281–2286.
- Wilderman, P.R., Xu, M., Jin, Y., Coates, R.M., Peters, R.J., 2004. Identification of *syn*-pimara-7,15-diene synthase reveals functional clustering of terpene synthases involved in rice phytoalexin/allelochemical biosynthesis. Plant Physiol. 135, 2098–2105.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., Aeschbacher, R.A., 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in Arabidopsis. Plant Physiol. 124, 105–114.
- Wyatt, G.R., Kalf, G.F., 1957. The chemistry of insect hemolymph: II. Trehalose and other carbohydrates. J. Gen. Physiol. 40, 833–847.
- Xu, M., Hillwig, M.L., Prsic, S., Coates, R.M., Peters, R.J., 2004. Functional identification of rice *syn*-copalyl diphosphate synthase and its role in initiating biosynthesis of diterpenoid phytoalexin/allelopathic natural products. Plant J. 39, 309–318.
- Xu, M., Ross Wilderman, P., Morrone, D., Xu, J., Roy, A., Margis-Pinheiro, M., Upadhyaya, N.M., Coates, R.M., Peters, R.J., 2007. Functional characterization of the rice kaurene synthase-like gene family. Phytochemistry 68, 312–326.
- Yadav, U.P., Ivakov, A., Feil, R., Duan, G.Y., Walther, D., Giavalisco, P., Piques, M., Carillo, P., Hubberten, H.M., Stitt, M., Lunn, J.E., 2014. The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: Specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. J. Exp. Bot. 65, 1051–1068.
- Yamamoto, T., Yoshida, Y., Nakajima, K., Tominaga, M., Gyohda, A., Suzuki, H., Okamoto, T., Nishimura, T., Yokotani, N., Minami, E., Nishizawa, Y., Miyamoto, K., Yamane, H., Okada, K., Koshiba, T., 2018. Expression of *RSoSPR10* in rice roots is antagonistically regulated by jasmonate/ethylene and salicylic acid via the activator OsERF87 and the repressor OsWRKY76, respectively. Plant Direct 2, e00049.

- Yoo, S., Cho, Y., Sheen, J., 2013. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1573.
- Yoshida, Y., Miyamoto, K., Yamane, H., Nishizawa, Y., Minami, E., Nojiri, H., Okada, K., 2017. OsTGAP1 is responsible for JA-inducible diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice roots with biological impacts on allelopathic interaction. *Physiol. Plant.* 161, 532–544.
- Yu, Y., Yang, D., Zhou, S., Gu, J., Wang, F., Dong, J., Huang, R., 2017. The ethylene response factor OsERF109 negatively affects ethylene biosynthesis and drought tolerance in rice. *Protoplasma* 254, 401–408.
- Zang, B., Li, H., Li, W., Deng, X.W., Wang, X., 2011. Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice. *Plant Mol. Biol.* 76, 507–522.
- Zarei, A., Körbes, A.P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., Memelink, J., 2011. Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 75, 321–331.
- Zhang, H., Huang, L., Dai, Y., Liu, S., Hong, Y., Tian, L., Huang, L., Cao, Z., Li, D., Song, F., 2015. *Arabidopsis* AtERF15 positively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Botrytis cinerea*. *Front. Plant Sci.* 6, 686.
- Zhang, H., Zhang, J., Quan, R., Pan, X., Wan, L., Huang, R., 2013. EAR motif mutation of rice OsERF3 alters the regulation of ethylene biosynthesis and drought tolerance. *Planta* 237, 1443–1451.
- Zhang, J.Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W., Wang, Z.Y., 2005. Overexpression of *WXP1*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J.* 42, 689–707.
- Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurreea, D., Andraloje, P.J., Mitchell, R.A.C., Powers, S.J., Schluemann, H., Delatte, T., Wingler, A., Paul, M.J., 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149, 1860–1871.
- Zhang, Z., Li, J., Li, F., Liu, H., Yang, W., Chong, K., Xu, Y., 2017. OsMAPK3 phosphorylates OsbHLH002/OsICE1 and inhibits its ubiquitination to activate *OsTPP1* and enhances rice chilling tolerance. *Dev. Cell* 43, 731–743.
- Zhou, K., Xu, M., Tiernan, M., Xie, Q., Toyomasu, T., Sugawara, C., Oku, M., Usui, M.,

Mitsuhashi, W., Chono, M., Chandler, P.M., Peters, R.J., 2012. Functional characterization of wheat *ent*-kaurene (-like) synthases indicates continuing evolution of labdane-related diterpenoid metabolism in the cereals. *Phytochemistry* 84, 47–55.

今井亮三, 島周平, 藤内威志, 加藤英樹, 松井博和, 2011. 植物におけるトレハロース代謝とその機能. 応用糖質化学 1, 147–152.

長谷川守史, 2017. 植物の自己防御物質フィトアレキシンの多様性・植物は自ら作る多様な抗菌性物質で病原菌に対抗する- . 化学と生物 55, 547–552.