

イネの病害抵抗性における転写因子
WRKY62 の機能解明

2016年1月

福島 説子

イネの病害抵抗性における転写因子
WRKY62 の機能解明

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（生物工学）学位論文

福島 説子

目次

緒言	1
第一章 病害応答における正の制御因子 WRKY62	4
1.1 目的	
1.2 材料および方法	
1.2.1 日本晴品種非形質転換イネ (NB) の BTH 処理による <i>WRKY45</i> および <i>WRKY62</i> の発現解析	
1.2.1.1 遺伝子	
1.2.1.2 植物	
1.2.1.3 ムラシゲ・スクーグ (MS) 寒天培地	5
1.2.1.4 100 mM BTH	
1.2.1.5 イネの BTH 処理	
1.2.2 噴霧によるイネの BTH 処理	6
1.2.3 <i>WRKY45</i> の一過的発現による <i>WRKY62</i> の転写活性化実験	
1.2.3.1 レポーター遺伝子 pGL4.7 および pGL4.7-W62 pro	
1.2.3.2 エフェクター遺伝子 35S- <i>WRKY45</i>	
1.2.3.3 パーティクルボンバードメント法による転写活性化実験	
1.2.4 イネのいもち病菌接種検定	7
1.2.5 イネの白葉枯病菌接種検定	
1.2.6 いもち病菌滴下接種実験	
1.2.6.1 植物	
1.2.6.2 いもち病菌滴下接種実験	8
1.2.7 マイクロアレイ法による <i>WRKY62</i> の下流遺伝子検索	
1.3 結果	
1.3.1 BTH 処理イネにおいて <i>WRKY45</i> と <i>WRKY62</i> は同時期に発現誘導される。	
1.3.2 SA シグナルによる <i>WRKY62</i> 遺伝子の発現誘導は <i>WRKY45</i> に依存している。	9
1.3.3 <i>WRKY45</i> は標的遺伝子 <i>WRKY62</i> の転写を制御する。	
1.3.4 <i>WRKY62</i> はいもち病抵抗性を正に制御する。	
1.3.5 <i>WRKY62</i> は白葉枯病抵抗性を正に制御する。	
1.3.6 <i>WRKY62</i> 過剰発現イネおよび <i>WRKY62</i> 抑制イネは両者ともいもち病抵抗性が低下する。	10

- 1.3.7 WRKY62 は病害応答遺伝子の発現を正に制御している。
- 1.3.8 DP 合成遺伝子群の調節転写因子 DPF は WRKY45 と WRKY62 両者によって 11
正に制御される。

1.4 考察

第二章 WRKY62 と WRKY45 による *DPF* 遺伝子の転写制御機構 13

2.1 目的

2.2 材料および方法

2.2.1 WRKY45 による *DPF* プロモーターの活性化

2.2.1.1 pGL4.7-ELI の作製

2.2.1.2 pGL4.7-CPS2 pro の作成

2.2.1.3 パーティクルガンによる転写活性化実験 14

2.2.2 WRKY45 による W-box 様配列を介した *DPF* プロモーターの活性化

2.2.2.1 pGL4.7-DPF pro および欠失シリーズ d4-d7

2.2.2.2 パーティクルガンによる転写活性化実験

2.2.3 *DPF* プロモーターの W-box 様配列の変異が及ぼす影響

2.2.3.1 pGL4.7-W2W3-ww、-wm、-mw、-mm の作成

2.2.3.2 パーティクルガンによる転写活性化実験

2.2.4 転写抑制活性の検出

2.2.4.1 レポーター遺伝子 35S-GAL4-TATA-LUC

2.2.4.2 エフェクター遺伝子 35S-GAL4DB および 35S-GAL4-WRKY62 15

2.2.4.3 セルラーゼ酵素液

2.2.4.4 KMC

2.2.4.5 EP3

2.2.4.6 R2P

2.2.4.7 転写活性化実験 16

2.2.5 Yest two hybrid 法によるタンパク質間相互作用の解析 17

2.2.5.1 pGBKT7-WRKY45N の作成

2.2.5.2 pGBKT7-WRKY62 および-WRKY76 の作製

2.2.5.3 pGADT7-WRKY62 および-WRKY76 の作製

2.2.5.4 形質転換選抜用 SD-LW 培地の作製

2.2.5.5 相互作用選抜用 SD-LWAH 培地の作製

2.2.5.6	酵母 2 ハイブリッドアッセイ	
2.2.6	共免疫沈降法によるタンパク質間相互作用の解析	18
2.2.6.1	pEU-myc-WRKYs および pEU-HA-WRKYs の作製	
2.2.6.2	小麦胚芽無細胞系発現システムによる myc-および HA-WRKY タンパク質の合成	
2.2.6.3	WRKY タンパク質の精製	
2.2.6.4	ウェスタンブロッティング	19
2.2.7	エフェクター WRKY45 と WRKY62 による転写活性化実験	
2.2.7.1	エフェクター 35S-WRKY62 の作成	
2.2.7.2	パーティクルガンによる転写活性化実験	
2.2.8	ゲルシフトアッセイによる DNA-タンパク質相互作用の解析	20
2.2.8.1	probe DNA	
2.2.8.2	ゲルシフトアッセイ	
2.3	結果	
2.3.1	WRKY45 は <i>DPF</i> 遺伝子の転写を活性化する。	
2.3.2	WRKY45 は W-box 様配列を介して <i>DPF</i> プロモーターを活性化する。	
2.3.3	<i>DPF</i> プロモーターの W-box 様配列の変異は WRKY45 による転写活性化に影響を及ぼす。	21
2.3.4	WRKY62 は転写抑制因子である。	
2.3.5	WRKY45 と WRKY62 は自分自身もしくは相互にタンパク質間相互作用する。	22
2.3.6	WRKY45 と WRKY62 は協調的に <i>DPF</i> プロモーターを活性化する。	
2.3.7	WRKY45 および WRKY62 のホモダイマーは W-box に結合する。	
2.3.8	WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマーは W-box に結合する。	23
2.4	考察	
第三章	外部ストレスがもたらす WRKY62 と WRKY45 の発現量比の変化と WRKY62 の低酸素ストレス応答への関与	26
3.1	目的	
3.2	材料および方法	
3.2.1	イネの BTH 処理	
3.2.2	NB の冠水処理および低温処理	
3.2.3	窒素置換処理	

3.3 結果	27
3.3.1 SA 経路は WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマー形成を誘導する。	
3.3.2 冠水処理は WRKY62 ホモダイマー形成を誘導する。	
3.3.3 窒素置換でも冠水処理と同様に WRKY62 のみが誘導される。	
3.4 考察	28
第四章 WRKY62 による低酸素応答性遺伝子の発現制御	29
4.1 目的	
4.2 材料および方法	
4.2.1 イネの窒素置換処理	
4.2.2 リーフディスク法による SA 処理	
4.2.3 マイクロアレイ解析	
4.3 結果および考察	
4.3.1 低酸素ストレス下において WRKY62 は低酸素応答性遺伝子の発現を正に制御する。	
4.3.2 SA 経路において WRKY62 は低酸素ストレス遺伝子の発現を負に制御する。	30
4.4 考察	
総合考察	32
要旨	35
引用文献	37
図表	44
謝辞	83

緒言

イネは世界3大穀物の一つ(1)としてアジアを中心に最も広く生産される作物の一つであるが、作物にとって最も危惧すべき事柄の一つに病害による収量の減少が挙げられる。毎年、世界のイネ生産の40%は感染病で失われていると推定されている(2)。イネには、いもち病、紋枯病、ごま葉枯病、白葉枯病といったいくつもの病害があり(3, 4)、これらの様々な病気にいかに強い作物をつくるか、ということが重要な課題となっている。植物は自身で移動することができない固着生物であるため、病原体感染や環境変化によるストレスに対応するためのシグナル伝達経路を高度に発達させてきた(5, 6)。その中の一つであるサリチル酸 (salicylic acid、SA) 伝達経路は、主に病害応答に重要な役割を担っており、通常、生物栄養性もしくは半生物栄養性の病原体に対する抵抗性反応に関わっていることが知られている(7, 8) (Figure 0A, 0C)。SA シグナル伝達が活性化されると、細胞に抗菌物質や Pathogenesis Related (PR) protein (9, 10) 等の防御タンパク質が蓄積し、病害防御反応が起こる(6, 11, 12) (Figure 0C)。この過程では、WRKY 転写因子を含む様々な転写因子の働きによって遺伝子発現の再プログラミングが起こる(13, 14) (Figure 0C)。

ファイトアレキシンは、微生物の接触によって植物で生産および蓄積される低分子量の抗菌物質(15)である。イネでは16種類が同定されており、うち15種類はジテルペン型ファイトアレキシン (diterpenoid-phytoalexin, DP) である(16, 17)。DP は (E,E,E) ゲラニルゲラニル2リン酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGDP) を経て合成され、最終産物であるモミラクトン (momilactone) A および B、ファイトカサン (phytocassanes) A-E、オリザレキシン (orizalexin) A-F、S へと分岐する(17) (Figure 0D)。これらはイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* (*M. Oryzae*) の感染によって蓄積し(17)、抗菌効果も複数報告されている(18-20)。しかしながら、momilactone については抗いもち病活性を否定する報告もある(21)。一連の DP 生合成酵素をコードする遺伝子群の発現は病害応答シグナルによって制御されていることが報告されてきている。キチン (chitin) エリクターシグナルによって活性化される MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase、MAPK) カスケード の構成要素であるイネ MAP キナーゼキナーゼ4 (OsMKK4) は、ほぼ全ての DP 合成遺伝子群の発現の誘導に関与している(22)。そして最近、*M. oryzae* 感染誘導性で、DP 合成遺伝子群の発現を直接制御する新規の basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子 Diterpenoid phytoalexin factor (DPF) が同定された(23)。

イネにおいて、WRKY45 は SA の機能的アナログとして知られる抵抗性誘導剤であるベンゾチアジアゾール (benzothiadiazole, BTH) 誘導性のグループ III の WRKY 型転写因子であり、抵抗性誘導剤による病害防御において中心的な役割を担う転写活性化因子の一つである(24)

(Figure 0A)。WRKY45 過剰発現イネは、イネの重要な病原体である *M. oryzae* や白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) に対し強力な病害抵抗性を示す(24, 25)(Figure 0B)。顕微鏡観察によると、WRKY45 過剰発現イネのいもち病抵抗性は、イネ細胞にカビの菌糸が侵入するのを防ぐ侵入前抵抗性 (pre-invasive defense) と、過敏感細胞死を伴う侵入後抵抗性 (post-invasive defense) の二段階から成っている(25)。また、ユビキチン-プロテアソーム分解による WRKY45 の二段階防御機構が WRKY45 によるいもち病抵抗性に重要な役割を担う(26)。DP 合成における WRKY45 の関与に関する我々の研究から、OsMKK4 の経路とは独立に、SA 経路中の WRKY45 が DP 合成制御に関与していることが明らかとなった(27)(Figure 0D)。BTH 処理した後のイネに *M. oryzae* を接種すると、DP 合成遺伝子群の発現が WRKY45 に依存して強く誘導される(27)。そして SA およびサイトカイニン伝達経路の相乗作用がこの過程で重要な役割を担っている(27)。

WRKY62 は、WRKY45 によって直接または間接的に転写レベルで制御されていることが推察されるグループ IIa の WRKY 型転写因子である(14) (Figure 0C)。 *M. oryzae* による感染過程において WRKY62 は、WRKY45 とほぼ同時期に発現誘導される(14)。これらのことは WRKY62 が病害応答の正の制御因子であることを示唆している。一方 WRKY62 は、*Xoo* に対する抵抗性反応の負の制御因子であるという報告がある(28)。この中で、WRKY62 は *Xoo* に対するパターン認識レセプターである Xa21 と相互作用し、WRKY62 過剰発現イネでは、*Xoo* に対する基礎的抵抗性も Xa21 依存性の抵抗性も低下する(28)。このように一見矛盾した報告がなされており、WRKY62 の機能が複雑であることを示唆している。インタラクトーム解析によると、WRKY62 は生物性ストレス応答と無生物性ストレス (低酸素ストレス) 応答の間をつなぐ所に位置しているようである(29)。他植物にも WRKY62 のオーソログに関する情報があり、やはり複雑である。オオムギの HvWRKY1,2 は、コムギうどん粉病菌 *Blumeria graminis* 感染に対する抵抗性反応の負の制御因子であると報告されている(30)。シロイヌナズナにおける 3 つの WRKY62 ホモログである AtWRKY18 および AtWRKY40、AtWRKY60 の三重欠損体はトマト班葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 やうどん粉病カビ菌 *Golovinomyces orontii* (*G. orontii*) の感染に対して強い抵抗性を示す(30, 31)。また、*G. orontii* 感染早期には AtWRKY18 と AtWRKY40 が、多くの病害応答性因子の発現を負に制御している(32, 33)。一方で AtWRKY18 は、単独では全身獲得抵抗性の正の制御因子であるという報告もある(34)。これら三種の WRKY 転写因子には自身とも他の二者ともタンパク質間相互作用がある(31)。

これらの背景を基に本研究では、イネにおける病害防御などの外部ストレス応答における WRKY62 の機能について WRKY45 との関係性を軸に詳細に解明することを目的とした。まず、BTH で処理したイネにおける WRKY45 および WRKY62 の発現解析、および一過的発現系にお

ける転写活性化実験によって、SA 経路での *WRKY62* の発現は *WRKY45* によって直接または間接的に転写レベルで制御されており、*WRKY62* が病害応答の正の制御因子として *WRKY45* による転写カスケードに組み込まれていることを示す。また、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析や一過的発現系による転写活性化実験などから、SA 経路において転写抑制因子 *WRKY62* が転写活性化因子 *WRKY45* とともに DP 合成遺伝子の転写因子 *DPF* の制御に深く関与するか否かを解析する。酵母ツーハイブリッド方や共免疫沈殿法、ゲルシフト法により *WRKY62* と *WRKY45* のタンパク質間相互作用や DNA 結合能を解析し、一過的発現系による転写活性化実験によって標的遺伝子 *DPF* の転写制御について詳細なメカニズムの解明を試みる。さらに、抵抗性誘導剤や低酸素ストレスなどの外部条件によって *WRKY62* と *WRKY45* が異なるパターンで転写誘導されるかを解析する。最後に、低酸素処理したイネにおける発現解析により、*WRKY62* はイネの低酸素応答において何らかの役割を担うか否かを解析する。以上の実験によって得られた結果を基に、*WRKY62* が病害応答と環境応答の間で行う切り替え制御の生物学的意義について考察する。

第一章 病害応答の正の制御因子 WRKY62

1.1 目的

所属研究室のこれまでの研究において、イネ *WRKY62* 遺伝子は *WRKY45* 遺伝子と同様 BTH 誘導性であり(24)、いもち病菌 *M. oryzae* 感染時に *WRKY45* 遺伝子とほぼ同時期に誘導されることが報告されている(14)。このことは、SA 経路において *WRKY62* が病害応答の正の制御因子として *WRKY45* と協調的に機能する可能性を示唆している。しかし、これまで *WRKY62* 過剰発現イネ (*WRKY62-ox*) を用いた研究において、*WRKY62* は白葉枯病菌 *Xoo* に対する病害応答の負の制御因子であるという、一見矛盾した結果が報告されている(28)。また、最近同定された bHLH 型の転写因子 DPF は、*M. oryzae* 感染誘導性で、DP 合成遺伝子群の発現を直接に転写制御することが報告されている(23)。DP 合成遺伝子群の発現は *WRKY45* に依存しているため(27)、*DPF* 遺伝子の発現もまた *WRKY45* や *WRKY62* に制御されている可能性が考えられる。そこで本章においては、*WRKY62* による病害応答への関与について解明することを目的とし、以下の解析を行った。はじめに、*WRKY62* の発現制御における *WRKY45* の関与を明らかにするため、SA 経路における *WRKY45* と *WRKY62* の誘導性の詳細と、SA 経路による *WRKY62* の発現制御における *WRKY45* の関与および、*WRKY45* による *WRKY62* の発現制御の可能性について解析した。次に、いもち病菌および白葉枯れ病菌による感染実験により、*WRKY62* 発現抑制イネ (*WRKY62-kd*) による病害抵抗性を詳細に解析し、*WRKY62* 過剰発現イネ (*WRKY62-ox*) の結果と比較した。また、病害抵抗性において *WRKY62* が担う役割をさらに解析するため、SA 経路において *WRKY62* の制御する下流遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。さらに、SA 経路による *DPF* 遺伝子の発現制御における *WRKY45* および *WRKY62* の関与を調べるため、BTH 処理した *WRKY45-kd* および *WRKY62-kd* における *DPF* 遺伝子の発現解析を行った。

1.2 材料および方法

1.2.1 日本晴品種非形質転換イネ (NB) の BTH 処理による *WRKY45* および *WRKY62* の発現解析

1.2.1.1 遺伝子

本研究で解析したイネの遺伝子のアクセッション番号を Table 4 に示した。

1.2.1.2 植物

非形質転換イネは日本晴品種 (*Oryza sativa* L. *japonica* cv. *Nipponbare*) を用いた。RNAi による *WRKY45* 抑制イネ (*WRKY45-kd*) 作製のためのコンストラクトは、pANDA ベクタ

ー(35, 36)中に *WRKY45* 遺伝子の 3'非翻訳領域塩基配列 (+1047-1353) を逆反復になるように含む。RNAi による *WRKY62* 抑制イネ (*WRKY62*-kd) 作製のためのコンストラクトは、同ベクター中に *WRKY62* 遺伝子の 3'非翻訳領域塩基配列 (+853-1159) を逆反復になるように含む。これらのコンストラクトをアグロバクテリウム法によって NB に導入して得られた形質転換イネを用いた。コンストラクト作製および形質転換は所属研究室の菅野正治博士により行われた(24)。

1.2.1.3 ムラシゲ・スクーグ (MS) 寒天培地(37)

30 g/l sucrose、×1 MS vitamin (Sigma)、4.6 g/l Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (日本製薬)、4 g/l Gerlite、pH5.8 を記載の終濃度になるように調製し、121℃、20 分間でオートクレーブ後シャーレに分注し、凝固させた。

1.2.1.4 100 mM BTH (ベンゾチアジアゾール、アシベンゾラル S メチル、和光)

記載の終濃度となるようにジメチルスルフォキシドに溶解し、-20℃に保存した。使用時必要に応じて水で希釈した。

1.2.1.5 イネの BTH 処理

NB 種子の種皮を除去後、70% エタノールおよび 50% 次亜塩素酸溶液 (約 5%塩素) にて順次滅菌した後、MS 固形培地に播種し、30℃で 4 日間保温して発芽させた。発芽後の幼苗は、2.5 ml/ plant となるよう液体肥料 1/1000 hyponex (ハイポネックスジャパン) 溶液を加え、30℃で 2 日間栄養補給および馴化した。3 葉期となったイネ植物の水耕液に、終濃度 30 μM となるように BTH を加えて 30℃に保温し、0、3、6、12、24 時間後にイネ地上部を切り取って 2 ml チューブ (ジルコニアビーズ入り) に採取した後直ちに液体窒素にて凍結後、超低温槽に保存した。

採取したイネ植物を粉砕機 (Retsch MM300) 中で 20 回/秒、2 分間粉砕し、TRIzol (ThermoFisher, www.thermofisher.com) 1 ml およびクロロホルム 250 μl を加えて 15 秒間激しく攪拌後、10,500×g、4℃で 15 分間遠心して上清を得た。これに 2-propanol 250 μl を加えて緩やかに混合し、室温にて 10 分間放置後 10,500×g、4℃で 15 分間遠心して RNA の沈殿物を得た。これを 70% エタノールにて洗浄後、室温で風乾してエタノールを除去した後、水に溶解させた。抽出した RNA はさらに RNeasy mini kit (QIAGEN, www.qiagen.com) にて精製した。

精製した total RNA 1 μg を 65℃で 5 分間加熱後、氷上で急冷することにより変性させ、37℃で 5 分の DNase 反応によってゲノム DNA を除去した後、ReverTra Ace qPCR RT

Master Mix (Toyobo, www.toyobo.co.jp) を用いて、37°Cで 15 分および 98°Cで 5 分間の逆転写反応により cDNA を得た。この cDNA 溶液の 1/6 希釈液 1 µl を用い、KAPA SYBER fast universal qPCR kit (KAPABIOSYSTEMS, www.kapabiosystems.com) もしくは Takara SYBR premix Ex Taq (Takara, www.takara-bio.co.jp) を用いた 12 µl の反応液で定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction、qRT-PCR) 法 (Thermal Cycler Dice TP800 system、Takara) を行うことにより、各遺伝子の発現量を定量した。内部標準として、*Rice ubiquitin 1* (*RUbq1*; Os06g0681400) を用いた。qRT-PCR に用いた primer DNA は Table 4 に記した。反応サイクルは、95°C、30 秒反応して DNA を変性した後、95°C、5 秒反応後 60°C、30 秒の反応を 40 回繰り返して伸長反応させた。

1.2.2 噴霧によるイネの BTH 処理

噴霧によるイネの BTH 処理は、4 葉期のイネの第 4 葉に対し、0.5 mM BTH、0.5% (v/v) アセトン、0.05% (v/v) Tween20 水溶液を噴霧して行った。

1.2.3 WRKY45 の一過的発現による WRKY62 の転写活性化実験

1.2.3.1 レポーター遺伝子 pGL4.7 および pGL4.7-W62 pro

WRKY62 遺伝子の上流 1 kb 領域をウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子 (*hrLUC*) コード領域の上流に含むレポーター遺伝子は、所属研究室松下茜博士が作製したものをを用いた。

1.2.3.2 エフェクター遺伝子 35S-WRKY45

pUC19 (TaKaRa) 内にカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと *WRKY45* をつないだエフェクタープラスミド 35S-WRKY45 は、所属研究室中山明博士が作製したものをを用いた。

1.2.3.3 パーティクルボンバードメント法による転写活性化実験

NB の葉鞘を 7 mm 長に切断し、0.4 M マンニトールを含む 0.5% 寒天プレートに並べた。特筆しない限り、700 µg の金粒子 (径 1 µm, Bio-Rad, www.bio-rad.com) と 3 µg のレポータープラスミド、0.12 µg のエフェクタープラスミド、0.5 µg の内部標準プラスミド *Ubi:LUC* (23) を、1.25 M CaCl₂ と 0.25 µg/µl 硫酸プロタミン存在下で混和することにより、金粒子にプラスミド DNA をコーティングさせ(38)、PDS-1000/He Biolistic particle delivery system (Bio-Rad) を用いて葉鞘片内に導入した。28°Cで 6 時間反応後、葉鞘片サンプルをジルコニアビーズ入り 2.0 ml チューブに入れ、直ちに液体窒素で凍結させた後、20 回/秒

で2分間粉碎(Retsch MM300)した。ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System によって測定 (Infinite M200、TECAN、www.tecan.co.jp) し、内部標準であるホタルルシフェラーゼ活性との比として算出した。

1.2.4 イネのいもち病菌接種検定

イネの種子を 70% エタノールおよび 50% 次亜塩素酸溶液 (約 5% 塩素) にて順次滅菌後、30°C で約 2 日浸水し、発芽させた。発芽直後のイネ植物を、土壌 (Bonsol No2; Sumitomo Chemical corp.、www.sumitomo-chem.co.jp) 入りのポット (キャネロンビーポット 5 cm × 5 cm × 5 cm/穴、25 穴) に移植し、組換え体用閉鎖系温室にて日中 28°C、夜間 23°C の条件で生育させた。NB に親和性のいもち病菌である *M. oryzae*, Ina86-137 (race #007) は、72.5 g/l オートミール寒天培地において 25°C で 10 日間培養した後、胞子を綿棒にてこすり取り、0.01% Tween20 溶水に懸濁して濾過後、顕微鏡下で孢子濃度を計測して 1.0×10^5 孢子/ml に調製した。この孢子溶液を、5 葉期になったイネ植物に噴霧接種し、20°C、湿度 90% の接種チャンバー (小沢製作所) にて 21 時間インキュベートした後、イネを組換え体用閉鎖系温室に戻して日中 28°C、夜間 23°C の条件で生育させ、6 日後に第 4 葉上の病班数を計測した。BTH 処理後のイネを用いていもち病接種検定する場合は、土壌に 30 μ M BTH 溶液を 3 ml/個体となるように加え、40 時間後に *M. oryzae* を接種した(27)。

1.2.5 イネの白葉枯病菌接種検定

イネの種子を 1.2.4 と同様に発芽させ、8 葉期まで生育させた。NB に親和性の白葉枯病菌である *Xoo* (race #T75373) は、PSB 寒天培地 (10 g/l Bacto Pepton、10 g/l Sucrose、1 g/l Monosodium Glutamate、16 g/l Bacto Agar) において 30°C で 3 日間培養した後、菌体ごま粒大を滅菌水に懸濁し、OD₆₀₀=0.03 に調製した。この孢子溶液につけたはさみで、第 7 および第 8 葉の先端約 2 cm を剪定し、2 週間後に剪定部からの病班伸長を測定した(39)。BTH 処理後のイネを用いて白葉枯病接種検定する場合は、土壌に 30 μ M BTH 溶液を 3 ml/個体となるように加え、40 時間後に *Xoo* を接種した(27)。

1.2.6 いもち病菌滴下接種実験

1.2.6.1 植物

WRKY62 過剰発現イネ (*WRKY62-ox*) および *WRKY45* 過剰発現イネ (*WRKY45-ox*) は、*WRKY62* および *WRKY45* の cDNA をそれぞれトウモロコシ・ユビキチン遺伝子プロモーターの制御下に発現するもので、所属研究室菅野正治博士により作製されたもの(24)を用いた。

1.2.6.2 いもち病菌滴下接種実験

イネは 1.2.4 と同様に生育させた。6 葉期になったイネ葉を切断し、角形シャーレに並べて水を含ませたキムワイプで切り口を湿らせた状態で室温にて 4 時間放置した。2.3.1 と同様に培養した *M. oryzae*, Ina86-137 (race #007) は、 1.0×10^6 孢子/ ml になるように調製した。この孢子溶液 10 μ l を葉表面に滴下し、遮光下で 26°C、40 時間反応後、明条件で生育させ、6 日後に病班面積を比較した。BTH 処理後のイネを用いていもち病接種検定する場合は、いもち菌接種 4 日前の土壌に 500 mM BTH 溶液が 3 ml/plant となるように加えた。

1.2.7 マイクロアレイ法による WRKY62 の下流遺伝子の探索

NB および *WRKY62*-kd を BTH 処理した後、0、12、24 時間後に採取を行い、RNA を精製した。精製した RNA は Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., www.home.agilent.com) によって分解されていないことを確認した。各 400 ng の RNA から Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (ThermoFisher) による 40°C、2 時間の逆転写反応により二本鎖 cDNA を合成し、さらに T7 RNA polymerase (ThermoFisher) を用いて 40°C、2 時間反応させて Cy3 ラベルされた cRNA を合成した。この cRNA を RNeasy mini kit (QIAGEN) により精製し、Fragmentation buffer (Agilent Technologies) を加えて 60°C、30 分反応させて断片化した後、Agilent Rice Oligo Microarray スライドガラス (44K、custom-made、Agilent Technologies) に滴下し、65°C で 17 時間ハイブリダイズした。その後スライドガラスを洗浄し、スキャン (scanner model G2505B、Agilent Technologies) した後、解析データを Feature Extraction software (Agilent Technologies) によって抽出した。解析データは、全遺伝子の発現量の平均値に対して標準化し、Subio program (Subio Inc., www.subio.jp) によって解析した。12 時間および 24 時間のデータの平均を算出し、0 時間のデータに対する差の有無を Student の *t* 検定により危険率 5% 以内で算出した。各遺伝子の qRT-PCR による発現解析は、1.2.1.5 と同様に行った。

1.3 結果

1.3.1 BTH 処理イネにおいて WRKY45 と WRKY62 は同時期に発現誘導される。

SA シグナルによる *WRKY45* 遺伝子と *WRKY62* 遺伝子の誘導パターンを比較するため、BTH 処理した後の日本晴品種非形質転換イネ (NB) における *WRKY45* および *WRKY62* の発現を経時的に解析した (Figure 1A、1B)。すると、両者の発現は共に BTH 処理後 3 時間後に誘導され、12 時間後には最大に達しており、互いに酷似した発現パターンであった。この

ことは、SA 経路による病害応答反応において、WRKY62 が WRKY45 とほぼ同時期に機能することを示唆している。

1.3.2 SA シグナルによる *WRKY62* 遺伝子の発現誘導は WRKY45 に依存している。

次に、SA シグナルによる *WRKY62* 遺伝子の発現誘導と WRKY45 との関係をさらに調べるため、NB および *WRKY45* 抑制イネ (*WRKY45*-kd) を BTH 処理し、*WRKY62* の発現解析を行った (Figure 2A、2B)。その結果、NB では BTH によって *WRKY62* の発現が誘導されたが、*WRKY45*-kd ではこの発現誘導が認められなかった。これにより、SA 経路による *WRKY62* 遺伝子の発現誘導は WRKY45 に依存していることが明らかとなった。

1.3.3 WRKY45 は *WRKY62* 遺伝子の転写を制御する

続いて、WRKY45 が *WRKY62* 遺伝子の転写を制御しているか調べるため、イネ葉鞘を用いたパーティクルボンバードメント法による一過的発現系解析を行った。*WRKY62* の転写開始点上流の DNA 配列約 1k 塩基をウミシイタケ *Luciferase* 遺伝子 (*hrLUC*) のコード領域の上流につないだレポーター遺伝子を用い、フェクター遺伝子 *WRKY45* による転写活性化能を測定した (Figure 3)。その結果、*WRKY62* 上流領域 (*W62*pro) を含まないレポーター遺伝子では WRKY45 によるレポーター活性が認められなかったのに対し、*W62*pro を含むレポーター遺伝子においては高いレポーター活性が認められた。このことから *WRKY62* 遺伝子の転写は WRKY45 に直接制御されていることが明らかとなった。

1.3.4 *WRKY62* はいもち病抵抗性を正に制御する

WRKY62 がイネの病害抵抗性に果たす役割を調べるため、*WRKY62*-kd を用いていもち病菌 (*M. oryzae*) 噴霧感染実験を行った。接種前に何も処理を行わない場合、*M. oryzae* を接種すると、*WRKY62*-kd では対照の NB より多くの病斑が観測され、*WRKY62*-kd ではいもち病に対する基礎的抵抗性が低下していることが分かった (Figure 4A)。また、抵抗性誘導剤 BTH で前処理した後に *M. oryzae* を感染させた場合、NB では BTH の作用によりいもち病抵抗性が誘導されるが、この BTH 誘導性抵抗性が *WRKY62*-kd においては低下していることが分かった (Figure 4B)。これら結果は、*WRKY62* が防御応答を正に制御していることを示している。

1.3.5 *WRKY62* は白葉枯病抵抗性を正に制御する

WRKY62 が複数の病原菌に対する病害防御応答に果たす役割を調べるため、*WRKY62*-kd を用いて白葉枯病菌 (*Xoo*) 剪定感染実験を行った。接種前に何も処理を行わない場合、*Xoo*

を接種すると、*WRKY62*-kd では対照の NB より長い病斑長が観測され、*WRKY62*-kd では白葉枯病に対する基礎的抵抗性が低下していることが分かった (Figure 5A)。また、BTH で前処理した後に *Xoo* を感染させた場合も、*WRKY62*-kd においてより長い病斑長が確認され、BTH 誘導性抵抗性が低下していることが分かった (Figure 5B)。これらの結果は、*WRKY62* による防御応答への正の制御が、複数の病原体に対する抵抗性発現に及ぶことを示している。

1.3.6 *WRKY62* 過剰発現イネおよび *WRKY62* 抑制イネは両者ともいもち病抵抗性が低下する。

WRKY62 の病害応答への関与をより詳細に調べるため、*WRKY62*-ox および *WRKY62*-kd の病害抵抗性をいもち病菌 (*M. oryzae*) 滴下接種法によって解析した (Figure 6)。コントロールとして用いた *WRKY45*-ox は NB よりも病班が小さく強いいもち病抵抗性を示し、*WRKY45*-kd では広範囲な病班が観測され抵抗性の低下を示した。このことは *WRKY45* がいもち病感染の強力な正の制御因子であることを裏付けている。一方 *WRKY62*-ox と *WRKY62*-kd では両者ともに基礎的抵抗性においても BTH 誘導性抵抗性においても NB よりも広範囲な病班が認められ、抵抗性が低下していた。これらの結果は、本実験結果 (Figure 4、5) と Peng らの報告(28)の両者と一致している。

1.3.7 *WRKY62* は病害応答遺伝子の発現を正に制御している。

WRKY62 依存的に BTH に応答して発現誘導される遺伝子を探索するため、根から 30 μ M BTH 溶液を吸収させた NB と *WRKY62*-kd を用い、マイクロアレイによって網羅的な遺伝子発現解析を行った。まず BTH 処理および mock 処理の NB について遺伝子発現を比較した結果、726 遺伝子が BTH 応答性遺伝子として同定された (p-value <0.05、>2-fold)。次に、BTH 処理した NB と *WRKY62*-kd における遺伝子発現を比較し、*WRKY62* 依存的な発現を示す 415 遺伝子が同定された (p-value <0.05、>2-fold change)。これら両者に重複して含まれるのは 164 遺伝子であった (p-value <0.05、>2-fold、Table 1)。これらの *WRKY62* 依存的な BTH 応答性遺伝子のうち 91%は、*WRKY62* によって正に制御されていた。この中には、BTH 応答性としてよく知られる PR 遺伝子 *PR1a*、*PR1b* および *PBZ1* が含まれており、定量 RT-PCR 法によって発現パターンが確認された (Figure 7A、7B)。加えて、モミラクトン、オリザレキシンおよびファイトカサンの全ての DP 合成に関わる 10 の生合成酵素の遺伝子群が PR 遺伝子と同様の結果を示し、これらが *WRKY62* 依存的に BTH に応答して誘導されることが分かった (Figure 7A、8C、7D、Table1)。これらの結果から、*WRKY62* は多くの病害防御因子の正の制御因子であると結論づけられた。

1.3.8 DP 合成遺伝子群を制御する転写因子 DPF は WRKY45 と WRKY62 両者によって正に制御される

最近同定された bHLH 型の転写因子 DPF は、*M. oryzae* 感染誘導性で、DP 合成遺伝子群の発現を直接に転写制御することが報告されている(23)。DP 合成遺伝子群の発現は WRKY45 に依存しているため(27)、*DPF* 遺伝子の発現もまた WRKY45 に制御されている可能性が考えられる。加えてマイクロアレイ解析からも、*DPF* の発現が WRKY62 によって制御されている可能性が示唆された (Table 1)。そこで、SA 経路において *DPF* の発現がどのように制御されているかを調べるため、NB および *WRKY45*-kd、*WRKY62*-kd を BTH 処理し、*DPF* 遺伝子の発現解析を行った (Figure 8)。その結果、NB においては BTH によって *DPF* の発現が誘導されたが、*WRKY45*-kd および *WRKY62*-kd のいずれにおいても発現誘導がほとんど認められなかった。これにより、*DPF* の発現は SA 経路によって制御されており、その制御は WRKY45 および WRKY62 の両者に依存していることが明らかとなった。

1.4 考察

WRKY45 は SA シグナル伝達による病害応答の主要な制御因子であり(24)、その過剰発現体は複数の病気に対して強い抵抗性を示す(24, 25)。WRKY45 の下流には転写カスケードが形成され、イネの抗菌物質 DP の生合成遺伝子を含む多くの病害応答性遺伝子が制御されている(14, 27)。WRKY62 も BTH 誘導性である(24)ことから、WRKY45 と同様、病害応答への関与が推察された。いもち病感染時には、WRKY62 と WRKY45 が互いに類似した発現パターンを示す(14)が、本実験では NB を BTH 処理した場合においても両者が互いにとてもよく似た発現パターンを示した (Figure 1A, 1B)。このことは、SA 経路による病害応答において、WRKY62 が WRKY45 とほぼ同時期に機能することを示唆しており、WRKY62 と WRKY45 との関係性が推察される。また、Figure 2 および 3 の結果から、WRKY62 は SA 経路において WRKY45 転写カスケードの下流に位置し、*WRKY62* 遺伝子の転写は WRKY45 によって直接制御されていると考えられる。以上の結果は、WRKY62 が WRKY45 と共に病害応答の正の制御に関わっている可能性を強く示唆している。

しかし、Peng らによる *WRKY62*-ox を用いた白葉枯病抵抗性実験の報告(28)から、WRKY62 は病害応答の負の制御因子であると考えられており、ここまでの結果とは矛盾している。一般に転写因子の過剰発現体では、生体内での標的遺伝子以外の遺伝子の転写制御や、転写制御の二次的影響を観察してしまう懸念がある。そのため、*WRKY62*-kd を用いて病原菌抵抗性検定を行ったところ、糸状菌であるいもち病菌 *M. oryzae* および細菌である白葉枯病菌 *Xoo* のいずれに対しても基礎的抵抗性および BTH 誘導性抵抗性の両者の低下を示した (Figure 4, 5)。このことは、WRKY62 が SA 経路による病害応答の正の制御因子であることを示しており、

その制御が WRKY45 同様(24)、複数の病原体に対する抵抗性発現にまで及ぶことを示唆している。しかし、*WRKY62-ox* および *WRKY62-kd* に *M. oryzae* を滴下接種すると、いずれも抵抗性の低下を示した (Figure 6)。この結果は、本実験における *WRKY62-kd* を用いた抵抗性検定の結果 (Figure 4、5) と、Peng らによる *WRKY62-ox* を用いた結果(28)の両者と一致していることから、WRKY62 は病害応答の正の制御に関わりながらもその機能は単純なものではないと推測される。シロイヌナズナにおける 3 つの WRKY62 オーソログである AtWRKY18、AtWRKY40 および AtWRKY60 においても、病害応答の負の制御への関与を示す報告(30-33)と、正の制御への関与を示す報告(34)の両者が存在し、病害応答の複雑な制御に関わる可能性がうかがえる。

BTH 処理した *WRKY62-kd* を用いて行われたマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析からは、WRKY62 が抗菌物質である DP の生合成酵素群の遺伝子を制御していることが明らかとなった (Table 1、Figure 7)。DP 合成遺伝子群は WRKY45 によっても正に制御されており、*WRKY45* の発現誘導によって DP 産生が増加し、いもち病抵抗性が強まることが示されている(27)。そのためこの結果 (Figure 7) は、SA 経路による病害応答において、WRKY62 は WRKY45 の下流で DP 合成遺伝子群の発現を正に制御することで、病害応答に関与することを示している。また、Yamamura らにより同定された新規の転写因子 DPF はいもち病感染に応答して DP 合成遺伝子群を直接制御する(23)が、本実験において NB で見られる BTH による *DPF* 遺伝子の発現誘導は *WRKY45-kd* および *WRKY62-kd* のいずれにおいても認められなかった (Figure 8)。このことは、SA 経路による *DPF* 遺伝子の発現が WRKY45 と WRKY62 の両者に依存していることを示しており、SA 経路において WRKY45 と WRKY62 はいずれも下流に位置する DPF を介して DP 合成遺伝子群を制御すると考えられる。またこれらの結果はさらに、WRKY45 や WRKY62 が *DPF* 遺伝子の転写制御に関与しているのではないかという新たな疑問を生じさせる。

第二章 WRKY62 と WRKY45 による *DPF* 遺伝子の転写制御機構

2.1 目的

第一章の結果から、SA 経路において WRKY45 と WRKY62 による DP 合成遺伝子群の発現は下流の転写因子 *DPF* を介して制御されると考えられる。このことから、WRKY45 と WRKY62 が *DPF* 遺伝子の転写制御にも関与するのではないかという新たな疑問が生じた。そこで、本章においては WRKY45 と WRKY62 による *DPF* 遺伝子の転写制御メカニズムについて詳細に解析した。はじめに、転写活性化因子である WRKY45 が *DPF* 遺伝子の転写を直接制御するかを、一過的発現系による転写活性化実験により解析した。WRKY 型転写因子は W-box と呼ばれるシスエレメントに作用する(40)ことが知られている。WRKY45 もタバコ由来の W-box (ELI 配列) (41)に作用し高い転写活性化を示す(24)。そこで、WRKY45 による *DPF* プロモーターの活性化に関するプロモーター欠失解析およびシスエレメントの変異解析を行った。一方、*DPF* 遺伝子の発現は WRKY62 によっても正に制御される (Figure 8) ため、WRKY62 の転写因子としての特性を決定した。WRKY62 は C 末端近傍に能動的リプレッサードメインである EAR-like モチーフ様の配列を含んでいる。これらのことから、WRKY62 は転写抑制因子であることが予想された。そこで、転写抑制活性を調べるレポーター遺伝子を用いた解析を行った。さらに、*DPF* 遺伝子の転写が WRKY45 と WRKY62 の両者によって制御される可能性とそのメカニズムについて、一過的発現系による転写活性化実験およびタンパク質間相互作用解析、タンパク質-DNA 相互作用解析によって詳細に解析した。

2.2 材料および方法

2.2.1 WRKY45 による *DPF* プロモーターの活性化

2.2.1.1 pGL4.7-ELI の作製

ウミシイタケ・ルシフェラーゼ *hrLUC* 遺伝子上流にタバコ由来の WRKY 型転写因子の結合配列 (ELI 配列) (24, 41)を含むレポーターを作製するには、まず、+ELI(24)を鋳型として 35S minimal promoter (-46) 領域を含むフラグメントを PCR 増幅し、In-fusion kit (Takara) を用いて pGL4.7 vector (Promega, www.promega.com) に挿入した (pGL4.7-35Smp-46)。その後、ELI 配列を含むオリゴヌクレオチドを合成し、35S minimal promoter (-46) 領域の上流に In-fusion kit を用いて挿入した。

2.2.1.2 pGL4.7-CPS2 pro の作成

CPS2 プロモーターを含むレポーター遺伝子を作製するには、イネのゲノム DNA を鋳型として *CPS2* 遺伝子の転写開始点上流 2k 塩基領域を PCR にて増幅し、In-fusion kit を用いて

pGL4.7 vector に挿入した。

2.2.1.3 パーティクルボンバードメント法による転写活性化実験

上記レポーター遺伝子およびエフェクター遺伝子 35-WRKY45 を用いた一過的発現系における転写活性化実験は、1.2.3.3 と同様に行った。

2.2.2 WRKY45 による W-box 様配列を介した *DPF* プロモーターの活性化

2.2.2.1 pGL4.7-*DPF* pro および欠失シリーズ d4-d7

DPF プロモーターおよびその欠失変異体を含むレポーター遺伝子を作成するため、イネのゲノム DNA を鋳型として *DPF* 遺伝子の転写開始点上流の 2k 塩基領域 (*DPF* pro) およびその 5'末端から順次欠失させた領域 (d4-d7) を PCR にて増幅させ、In-fusion kit を用いて pGL4.7 vector に挿入した。

2.2.2.2 パーティクルボンバードメント法による転写活性化実験

上記レポーター遺伝子およびエフェクター遺伝子 35-WRKY45 を用いた一過的発現系における転写活性化実験は、1.2.3.3 と同様の方法で行った。

2.2.3 *DPF* プロモーターの W-box 様配列の変異が及ぼす影響

2.2.3.1 pGL4.7-W2W3-ww、-wm、-mw、-mm の作成

pNL3.1 (Promega) 由来の minimal promoter 領域の forward 鎖と reverse 鎖 DNA を合成し、95°C、3 分間反応後、氷中で急冷してアニーリングした後、In-fusion kit を用いて pGL4.7 vector に挿入した (pGL4.7-MP)。その後、*DPF* pro 領域の転写開始点直近の W-box 様配列 W2W3 領域と W-box に変異を導入した配列を持つオリゴヌクレオチドをアニーリングした後、In-fusion kit を用いて pGL4.7-MP に挿入した (pGL4.7-W2W3 シリーズ、ww、wm、mw、mm)。

2.2.3.2 パーティクルボンバードメント法による転写活性化実験

上記レポーター遺伝子およびエフェクター遺伝子 35-WRKY45 を用いた一過的発現系における転写活性化実験は、1.2.3.3 と同様の方法で行った。

2.2.4 転写抑制活性の検出

2.2.4.1 レポーター遺伝子 35S-GAL4-TATA-LUC

レポーター遺伝子として 35S-GAL4-TATA-LUC (国立研究開発法人 産業技術総合研究所

高木優博士より譲渡) (42)を用いた。

2.2.4.2 エフェクター遺伝子 35S-GAL4DB および 35S-GAL4DB-WRKY62

エフェクター遺伝子 35S-GAL4DB-WRKY62 は、*WRKY62* cDNA 中の *WRKY62* コード配列を PCR にて増幅し、35S-GAL4DB vector (国立研究開発法人 産業技術総合研究所 高木優博士より譲渡) (42)の制限酵素サイト *Sma* I と *Sal* I の間に挿入することにより得た。本研究に於いてプラスミド構築に用いた合成 DNA プライマーの配列は Table 5 に記した。

2.2.4.3 セルラーゼ酵素液

4% (w/v) セルラーゼ “オノヅカ” RS (ヤクルト)、0.2% (w/v) ペクトリアーゼ、1% (w/v) マセロザイム R10 (ヤクルト)、5 mM MES pH5.5、0.4 M マンニトールを記載の終濃度となるように混合し、pH5.5 に調製後、濾過滅菌し、25 ml ずつ分注して-80℃で保存した。

2.2.4.4 KMC

117 mM KCl、82 mM MgCl₂、85 mM CaCl₂を記載の終濃度となるように調製した。

2.2.4.5 EP3

70 mM KCl、5 mM MgCl₂、20 mM MES pH5.8、0.4 M D-マンニトールを記載の終濃度となるように調製し、pH5.8 に調整後、濾過滅菌した。

2.2.4.6 R2P

R2P 培養液(43)は、以下の組成となるように各試薬を混合し、pH5.8 に調整後、濾過滅菌した。

試薬	終濃度
KNO ₃	40 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 mM
MgSO ₄ · 2H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mM
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2 mM
MnSO ₄ · 5H ₂ O	7.2 μM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7.7 μM

CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.5 μM
H ₃ BO ₃	48.5 μM
Na ₂ Mo ₄ · 2H ₂ O	0.5 μM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	20 μM
Na ₂ EDTA	20 μM
2,4-dichlorophenoxy acid	2 μg/ml
MS ビタミン	×1
Sucrose	0.4 M

2.2.4.7 転写活性化実験

イネ培養細胞 (Oc cell) ストック 2 ml を 25 ml の R2P 培地に加え、26°C で 4 日間振とう培養した。5 ml ピペットを用いて培養液から R2P 溶液をほぼ完全に吸い上げ、取り除いた。培養細胞に室温にて融解させたセルラーゼ酵素液 25 ml を加え、30°C で 2 時間静置した後、ナイロンメッシュ布 (孔径 20 μm) を敷いた漏斗を用いて細胞懸濁液を 50 ml チューブに濾過した。濾液を室温、100×g で 10 分間遠心し (スイングローター 5100、Kubota)、緩やかに上清を除いた後の沈殿画分にプロトプラストを得た。KMC を全容 40 ml となるように加え、緩やかに転倒混和した後、室温、100×g で 10 分間遠心し (Kubota)、緩やかに上清を除いて沈殿画分にプロトプラストを得た。この洗浄を 2 回行った後、3 回目の遠心後にプロトプラスト画分を 20 ml の EP3 溶液に懸濁した。血球計算板を用いてプロトプラスト濃度を計測し、再び遠心して上清を除いた後、10⁷ プロトプラスト/ml となるように EP3 で調製した。キュベットにプロトプラスト 400 μl およびエフェクター、レポーター、内部標準プラスミドを加え、350 V、550 μF でエレクトロポレーションした (Electro Cell Manipulator 600、BTX Electroporation system)。5 μg のレポーター遺伝子に対し、0、1.5、3、5、10 μg のエフェクター遺伝子と、内部標準遺伝子として 0.1 μg の *35S: hrLUC* (24) を導入した。プロトプラストを 6 cm シャーレにのせたフィルターシャーレ (Millicell-HA、0.45 μl、30 mm diameter、Millipore、www.merckmillipore.com) に入れ、プロトプラスト化していないごま粒大の Oc 細胞をナース細胞としてフィルターシャーレの外側に加えて、遮光環境、30°C で 20 時間保温した後、フィルターシャーレから、KMC 1000 ml で Oc 細胞を回収し、1.5 ml チューブに移した。次に、4°C、300×g で 5 分間遠心後、上清を完全に除去し、300 μl の passive lysis buffer (Promega) を加えた後、細胞を 5 秒間で 2 回音波破碎 (Handy Sonic UR-20、TOMY、bio.tomys.co.jp) した。Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega) にてホタルルシフェラーゼ活性を測定 (GENE LIGHT 55、マイクロテック・ニチオン) し、内部標準のウミシイタケルシフェラーゼ活性との比活性を算出した。

2.2.5 酵母ツーハイブリッド法によるタンパク質間相互作用の解析

2.2.5.1 pGBKT7-WRKY45N の作成

WRKY45 の N 末端領域配列 (WRKY45N) を含む prey プラスミド、pGADT7-WRKY45N(44) は所属研究室松下茜博士が作製したものをを用いた。さらに WRKY45N のコード領域を *Sfi*I and *Bam* HI サイトを用いて pGBKT7 vector (Clontech, www.clontech.com) に挿入し、prey プラスミド pGBKT7-WRKY45N を得た。

2.2.5.2 pGBKT7-WRKY62 および-WRKY76 の作製

WRKY62 遺伝子および WRKY76 遺伝子を含む bait プラスミドを作製するには、WRKY62 遺伝子および WRKY76 遺伝子のコード配列を各 cDNA より PCR にて増幅し、In-fusion kit を用いて pGBKT7 vector に挿入した。

2.2.5.3 pGADT7-WRKY62 および-WRKY76 の作製

WRKY62 遺伝子および WRKY76 遺伝子を含む prey プラスミドを作製するには、pGBKT7-WRKY62 および-WRKY76 より WRKY62 遺伝子および WRKY76 遺伝子のコード配列を切り出し、*Sfi*I and *Bam* HI サイトを用いて pGADT7 vector に挿入した。

2.2.5.4 形質転換選抜用 SD-LW 培地の作製

6.7 g/l Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids (Gibco)、20 g/l Bact Agar、0.64 g/l DO-LW (Clontech)、20 g/l Glucose を記載の終濃度となるように加え、pH5.8 に調整後オートクレーブし、液体状態のうちにシャーレに加え室温に放置して凝固させた。液体培養液は、上記組成から Bact Agar を除外して作成した。

2.2.5.5 相互作用選抜用 SD-LWAH 培地の作製

6.7 g/l Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids (Gibco)、20 g/l Bact Agar、0.64 g/l DO-LWAH (Clontech)、20 g/l Glucose を記載の終濃度となるように加え、pH5.8 に調整後オートクレーブし、液体状態のうちにシャーレに加え室温に放置して凝固させた。

2.2.5.6 酵母ツーハイブリッド解析

Saccharomyces cerevisiae AH109 competent cell (Clontech) の形質転換は Frozen Yeast Transformation kit II (ZYMO research、www.zymoresearch.com) を用いて行った。各 1 µg の bait プラスミドと prey プラスミドとを 10 µl の AH109 competent cell に加え、ポリエチレングリコール存在下で 30°C、45 分反応させて形質転換した。その後、細胞液を

SD-LW 培地に塗布し、30°Cで 3-7 日間培養した。形質転換したコロニーは、一個ずつさらに SD-LWAH 培地に塗布した。相互作用があることを示すコロニーは、SD-LW 液体培液に植菌し、30°Cで 24 時間培養後、OD₆₀₀=0.02 に調製した菌培養液を 5 µl ずつ SD-LW 培地および SD-LWAH 培地にスポットし、30°Cで 5 日間培養した。

2.2.6 共免疫沈降法によるタンパク質間相互作用の解析

2.2.6.1 pEU-myc-WRKYS および pEU-HA-WRKYS の作製

V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (myc) 由来抗原ペプチド配列 EQKLISEEDL (myc-tag) の 3 回反復ペプチドをコードする合成 DNA 配列(27)を鋳型として PCR によって増幅した断片を *Eco*RV および *Bam*HI を用いて pEU-01 ベクター (CellFree Sciences, www.cfsiences.com) に挿入し、pEU-myc を得た。同様に Human influenza hemagglutinin (HA) 由来抗原ペプチド配列 YPYDVPDYA (HA-tag) の 3 回反復ペプチドをコードする合成 DNA 配列(44)を pEU-01 vector (CellFree Sciences) に挿入し、pEU-HA を得た。myc タグおよび HA タグを付加した WRKY 遺伝子を作製するには、WRKY45 および WRKY62、WRKY76 のコード配列を各 cDNA より PCR にて増幅し、In-fusion kit を用いて pEU-myc および pEU-HA に挿入した。

2.2.6.2 コムギ胚芽無細胞系発現システムによる myc-および HA-WRKY タンパク質の合成

myc タグおよび HA タグを付加した WRKY45、WRKY62、WRKY76 タンパク質は、ENDTEXT technology WEPRO1240 Expression kit (CellFree Sciences) を用いてコムギ胚芽無細胞系タンパク質発現システムにより合成した。全容 30 µl の反応液中、pEU-myc-WRKY および pEU-HA-WRKY プラスミド各 1 µg を 2.5 mM NTP mix、1U RNase inhibitor 存在下で 1U SP6 RNA polymerase と混合し、37°Cで 6 時間、転写反応を行った。その後、この反応液 5 µl を 1% アガロースゲル電気泳動による転写物の確認に用い、残り 20 µl を 40 ng/µl creatin kinase 存在下で 120 OD/µl の小麦胚芽細胞液 WEPRO1240、20 µl と混合し、96 well plate (平底) 内で 200 µl の反応安定剤 SUB-AMIX の下に 20 µl/well となるように重層し、15°Cで 20 時間タンパク質合成反応を行った。

2.2.6.3 WRKY タンパク質の精製

合成した WRKY タンパク質は、c-myc-tagged protein Mild Purification Kit (MBL, www.mbl.co.jp) によって精製した。タンパク質溶液 440 µl 中 20 µl を Input 画分としてタンパク質発現の確認に用いた。スピнкаラムに残り 420 µl のタンパク質溶液と 20 µl (5 µl ビーズ) の抗 myc-tag 抗体カラムビーズを加え、4°Cで 1 時間穏やかに転倒混和した。その

後、スピнкаラムを 1.5 ml のチューブにセットし、4°C、2,500×g で 15 秒間遠心した後、上清を除去した。次に、キット付属の洗浄液 200 µl を加えて 4°C、2,500×g で 15 秒間遠心し、懸濁液を除去する操作を 3 回繰り返す、ビーズを洗浄した。さらに、1 mg/ml の myc-tag elution peptide 20 µl をビーズに加え、4°C で 5 分間静置後、4°C、10,000×g rpm で 15 分間遠心する操作を 2 回繰り返す、40 µl (約 1 µM) のタンパク質溶出液を得た。

2.2.6.4 ウェスタンブロッティング

溶出されたタンパク質は、抗 myc 抗体によるウェスタンブロッティングのため、供試画分 (Input) を全発現量の 1/800、溶出画分を全溶出量の 1/100 となるよう 12.5% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ミニプロテイン II、Bio-Rad) に供し分離した。また、抗 HA 抗体によるウェスタンブロッティングのため、供試画分を全発現量の 1/4000、溶出画分を全溶出量の 1/1500 となるように SDS ゲルポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。100V で 10 分間、150 V で 70 分間の泳動後、ゲルをポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (Bio-Rad) にのせ、Extra thick blot paper filter paper (Bio-Rad) ではさみ、定電流 0.08 A/gel、25 V で 80 分間転写 (Bio-Rad) を行った。メンブレンフィルターは、50 mM Tris-HCl (pH7.6)、150 mM NaCl、0.05% Tween20 (TBST) 存在下で 5% スキムミルクによりブロッキングした後、0.1 mg/ml となるよう TBST で希釈した抗 myc マウスモノクローナル抗体 (my3、MBL)、もしくは抗 HA 抗マウスモノクローナル抗体 (3F10 Anti-HA-peroxidase、Roche、www.roche.com) 溶液 6 ml に浸し、4°C で 20 時間抗原抗体反応させた。PVDF 膜を TBST で洗浄後、抗 myc 抗体で反応させた PVDF 膜については、さらにホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG モノクローナル抗体 (MBL) により 2 次抗体反応を行った。抗体に標識されたペルオキシダーゼ活性により、目的のタンパク質バンドを Amersham ECL Prime (GE) を用いて化学発光させ、Image Quant LAS-4000 (GE) によって検出した。

2.2.7 エフェクター WRKY45 と WRKY62 による転写活性化実験

2.2.7.1 エフェクター 35S-WRKY62 の作成

35S-WRKY45 の *WRKY45* 領域を *Xho* I および *Asc* I を使って除き、*WRKY62* cDNA より *WRKY62* のコード配列を PCR にて増幅した後、これを挿入することにより入れ替えた (35S-WRKY62)。

2.2.7.2 パーティクルボンバードメント法による転写活性化実験

レポーター遺伝子 *DPF pro* に対するエフェクター遺伝子 35S-WRKY62 および

35S-WRKY45による転写活性化実験は1.2.3.3と同様の方法で行った。各サンプルにおいて、導入するプラスミド DNA の総量を pUCAP(45)を用いて一定にした。

2.2.8 ゲルシフトアッセイによる DNA-タンパク質相互作用の解析

2.2.8.1 プローブ DNA

ゲルシフトアッセイに用いたプローブ DNA およびコンペティター DNA は合成 (Fasmac oligo) した。配列は Table 6 に記した。

2.2.8.2 ゲルシフトアッセイ

タンパク質は c-myc-tagged protein Mild Purification Kit により、2.2.6.3 および 2.2.6.4 と同様の方法で発現および精製した。DNA-タンパク質結合反応は、25 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、40 mM KCl、0.1% (v/v) Nonidet P-40、10 μ M ZnCl₂、1 mg/mL bovine serum albumin、10% glycerol、10 μ g/mL double-stranded poly dI-dC (Thermo Fisher)、1 mM dithiothreitol を含む 15 μ l の反応液中で、5'末端を 5 (6) -carboxyfluorescein (FAM) で標識したプローブ DNA (終濃度 1×10^{-7} M) と精製タンパク質 (終濃度 $< 1 \times 10^{-7}$ M) を混合した。遮光条件下において 20°C で 25 分間反応後、反応液を 0.7% (w/v) アガロース、3% γ -ポリアクリルアミド (29:1) コンポジットゲルに供し、遮光条件下、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、3 mM Na acetate の泳動バッファーを用い 100V で 2 時間泳動した(46)。泳動後、LAS-3000 system (GE) を用いて 460 nm の励起蛍光を照射し、バンドを視覚化した。

2.3 結果

2.3.1 WRKY45 は *DPF* 遺伝子の転写を活性化する。

DPF(23)および DP 合成遺伝子の一つである *CPS2* の転写開始点より上流の DNA 配列約 2k 塩基をウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (*hrLUC*) の上流につないだレポーター遺伝子を用い、エフェクターとして *WRKY45* を用いて転写活性化能を測定した (Figure 9)。その結果、*DPF* プロモーター (*DPFpro*) においては、*WRKY45* によって ELI 配列と同程度の高いレポーター活性が認められた。しかし、*CPS2* プロモーター (*CPS2pro*) においては、低いレポーター活性しか認められなかった。この結果からイネ生体内においては、*WRKY45* が *DPF* 遺伝子の転写を活性化し、*DPF* が *CPS2* 等の DP 合成遺伝子の転写を制御していると考えられる。

2.3.2 *WRKY45* は W-box 様配列を介して *DPF* プロモーターを活性化する。

2k 塩基からなる *DPFpro* 領域には、6 塩基のうち少なくとも中央の 4 塩基は ELI 配列と一

致している W-box 様配列が 11 個存在する (Figure 10、11)。そこで、*DPF pro* を 5'側から順次欠失させた DNA 断片を *hrLUC* 遺伝子につないだレポーター遺伝子 (d4-d7) を用い、エフェクター遺伝子 *WRKY45* による転写活性化能を測定した (Figure 10)。すると、*WRKY45* は W-box 様配列を三個含む d4 に対して ELI と同程度のレポーター活性を示した。W-box 様配列を 2 個含む d5 および 1 個含む d6 に対しては、W-box 様配列が一個ずつ減る毎にレポーター活性が減少した。そして、W-box 様配列を含まない d7 に対しては活性化が認められなくなった。このことから *WRKY45* は、これらの W-box 様配列を介して *DPF* プロモーターを活性化することが強く示唆された。

2.3.3 *DPF* プロモーターの W-box 様配列の変異は *WRKY45* による転写活性化に影響を及ぼす。

DPF プロモーターの転写開始点直近にある二つの W-box (Figure 11、W3 および W2) は、TTGACC と ATGACT が 5 塩基離れて逆鎖に並んでいる。そこで、この領域のみを抜き出し、W2 および W3 をそれぞれ、もしくは両者とも W-box とは別の配列に置換したレポーター遺伝子に対する *WRKY45* の転写活性化能を測定した (Figure 11)。野生型レポーター *ww* と比較すると、W3 もしくは W2 の一方のみを置換した *wm* および *mw* に対する *WRKY45* のレポーター活性は減少しているが有意な差ではなかった。しかし、W2 と W3 の両者を置換した *mm* に対するレポーター活性は *ww* や *wm* と比べて顕著に減少しており、二つの W-box の置換によって *WRKY45* による転写活性化が失われたことが分かった。以上の結果から、*WRKY45* は *DPF* 遺伝子を標的遺伝子とし、*DPF* プロモーター中の W2 および W3 を含む複数の W-box を介して転写を活性化していることが明らかとなった。

2.3.4 *WRKY62* は転写抑制因子である。

一方、*WRKY62* の転写因子としての特性を明らかにするため、*WRKY62* を一過的に発現させ、転写活性を解析した (Figure 12)。転写抑制活性を調べるレポーター遺伝子として、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (35S プロモーター) の下流に Gal4 DNA 結合配列を含んだホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Luciferase*, *LUC*) を用いた(42)。Gal4-DNA 結合ドメインペプチド (Gal4DB) のみを含むエフェクター遺伝子を用いたときにはレポーター遺伝子由来のルシフェラーゼ活性に有意な変化は認められなかった。しかし、Gal4DB と *WRKY62* の融合タンパク質 (Gal4DB-*WRKY62*) のエフェクター遺伝子を用いたところ、エフェクター量依存的に有意なレポーター活性の減少が認められた。このことから、*WRKY62* は転写抑制因子であることが明らかとなった。

2.3.5 WRKY45 と WRKY62 は自分自身もしくは相互にタンパク質間相互作用する。

酵母ツーハイブリッド法によりタンパク質間相互作用を解析し、WRKY45 および WRKY62 の自己間および相互間のタンパク質間相互作用を調べた。その結果、WRKY45 と WRKY62 にはそれぞれ、自分自身および両者相互の間での相互作用が認められた (Figure 13)。対照実験として、WRKY62 と同じくグループ IIa に属する WRKY76 を用いたが、WRKY76 に対して WRKY45 は弱い相互作用しか示さなかった。同様の相互作用のパターンは共免疫沈降法を用いた解析でも得られた (Figure 14)。以上の結果から、WRKY45 と WRKY62 はそれぞれのホモダイマー、および両者間のヘテロダイマーを形成し得ることが示された。

2.3.6 WRKY45 と WRKY62 は協調的に *DPF* プロモーターを活性化する。

DPF 遺伝子の転写制御における WRKY62 の関与を明らかにするため、*DPF* pro レポーター遺伝子に対して *WRKY45* 遺伝子および *WRKY62* 遺伝子の両者をエフェクターとして用いた転写活性化実験をおこなった (Figure 15)。*WRKY45* を単独で同入した場合、*DPF* プロモーターが活性化されたが、転写抑制因子である *WRKY62* を単独で導入しても活性化されなかった。ところが、*WRKY45* とともに *WRKY62* をエフェクターとして共導入すると、*WRKY45* を単独で導入するよりも強く転写が活性化された。*WRKY62* エフェクターを順次増やしていくと、レポーター活性は、*WRKY62* と *WRKY45* とがほぼ同量のときに最大となった。しかしながら、*WRKY62* が *WRKY45* に対して過剰になると転写活性が減少した。同様の結果は、W2W3 領域のレポーターを用いた場合にも得られ (Figure 16)、転写活性化因子 WRKY45 と転写抑制因子 WRKY62 が W2W3 領域を介して、協調的に *DPF* 遺伝子の転写を制御することが明らかとなった。

2.3.7 WRKY45 および WRKY62 のホモダイマーは W-box に結合する。

次に、WRKY45 および WRKY62 が *DPF* プロモーターの W-box に結合するかを、W2W3 配列をプローブとしたゲルシフト法により解析した。myc-タグを付加した WRKY45 および WRKY62 をそれぞれ単独でコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法によって合成した後、抗 myc 抗体カラムによって精製した (Figure 17)。これらのタンパク質を用いたゲルシフトアッセイにおいて、コンペティター DNA 非存在下では、WRKY62 および WRKY45 はどちらも単独で 2 本のシフトバンドを形成した (Figure 18A、18B)。2 本のバンドは、それぞれプローブ中の 1 個または 2 個の W-box に WRKY タンパク質が結合したものと考えられる。これらのシフトバンドはいずれも、プローブ DNA と同配列のコンペティター (ww) をプローブの 20 倍量加えた時には消失し、二つの W-box を変異させたコンペティター (mm) は結合にほとんど影響しなかった。また、W2 もしくは W3 の一方を置換した wm および mw を加えると ww

と比較して穏やかにシフトバンドが減少した。以上より、WRKY45 および WRKY62 はどちらも単独で（ホモダイマーとして）*DPF* プロモーター中の二つの W-box に特異的に結合することが分かった。

2.3.8 WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマーは W-box に結合する。

さらに、myc-タグを付加した WRKY45 と HA-タグを付加した WRKY62 をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系で共発現させた後、抗 myc 抗体カラムに結合する画分を調製した。この画分を抗 myc 抗体および抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロッティング解析したところ、いずれの抗体によってもバンドが検出され、画分には myc-WRKY45 および HA-WRKY62 が含まれていることが確認された（Figure 17）。この画分を用いたゲルシフトアッセイでも2本のシフトバンドが認められた（Figure 19）。この時、DNA-タンパク質複合体にさらに抗 myc 抗体を加えるとスーパーシフトが認められたことから、このタンパク質-DNA 複合体に myc-WRKY45 が含まれることが確認できた（Figure 19、myc）。一方、この DNA-タンパク質複合体に抗 HA 抗体を加えても、スーパーシフトは認められなかった（Figure 19、HA）。ところが DNA 結合反応前にタンパク質溶出液と抗 HA 抗体を反応させるとシフトバンドが形成されなくなった（Figure 19、HA*）。この結果は、HA-WRKY62 が抗 HA 抗体と先に結合することによって、DNA-タンパク質結合反応が阻害される、すなわち、DNA-HA-WRKY62 複合体と抗 HA 抗体との相互作用においては HA タグが立体障害を受けることを示している。このことは、観察されたシフトバンドが WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマーを含むことを強く示唆している。コンペティター-DNA を用いた場合のシフトバンドの変化は WRKY45 および WRKY62 を単独の場合と同様であった。以上の結果は、WRKY45 と WRKY62 が両者の複合体でも *DPF* プロモーターにある W-box 配列に結合し得ることを示している。

2.4 考察

転写活性化実験の結果、WRKY45 は *DPF* プロモーターを活性化したが、*CPS2* プロモーターは活性化しなかった（Figure 9）。このことから、WRKY45 の直接の標的遺伝子は *DPF* であり、*CPS2* の転写は *DPF* によって間接的に制御されると考えられる。WRKY 転写因子群は WRKYGQK 配列からなる WRKY ドメインが *cis*-element 上の W-box (TTGACT もしくは TTGACC) に結合することで転写因子として機能する(47-49)。*DPF* 遺伝子上流配列を観察すると、約 1.7k 塩基内に NTGACN (N は任意の 1 塩基) からなる W-box 様配列が 11 個存在し、このうち転写開始点より 200 塩基内に 3 つの W-box 様配列が含まれている。一方、*CPS2* 遺伝子上流には約 2k 塩基内に 8 個の W-box 様配列が存在するが、転写開始点より 400 塩基上流までは一つも見られない。このことから、WRKY45 は W-box 様配列に作用することで *DPF* 遺

伝子の転写を制御する可能性が高いと考えられる。*DPF* プロモーターの欠失解析の結果、*WRKY45* による転写活性化は *W-box* 様配列の減少に伴って減少し、全ての *W-box* 様配列を欠失させると転写活性化が失われた (Figure 10)。この結果は、*DPF* プロモーターにある複数の *W-box* 様配列がシスエレメント *W-box* として機能していることを裏付けている。また、転写開始点付近の二つの *W-box* に変異を導入したレポーター遺伝子を用いると、*WRKY45* による転写活性化は減少し、両方の *W-box* への変異導入によりほぼ完全に消滅した (Figure 11)。このことは、*WRKY45* が *DPF* プロモーターの *W-box* を介して *DPF* 遺伝子の転写を直接制御し、特に転写開始点付近の *W2* および *W3* は必須の配列であることを示している。*W3* (GGTCAA/TTGACC) は典型的な *W-box* である(40)が、*W1* および *W2* (AGTCAT/ATGACT) はこれまでの報告には見られない配列である。そのため、*W1* および *W2* 型 *W-box* はイネ *WRKY45* に特有のシスエレメントかもしれない。

WRKY45 は *DPF* 遺伝子の転写活性化因子であったが、*DPF* の発現は *WRKY62* によっても正に制御されている (Figure 8)。*WRKY62* は *C* 末端近傍に能動的リプレッサードメインである *EAR-like* モチーフ(42)様の配列を含んでいる。また、Peng らも *WRKY62* 過剰発現イネが防御応答を抑制することなどから、*WRKY62* が転写抑制因子であると推測していた(28)。そこで、*WRKY62* の転写因子としての特性を一過的発現系において解析した結果、*WRKY62* は転写抑制因子であることが明らかとなった (Figure 12)。*SA* 経路において、*WRKY45* と *WRKY62* は下流に位置する *DPF* を介して *DP* 合成遺伝子群の発現を誘導すると考えられる。しかし、*WRKY62* は転写抑制因子である (Figure 12) ため、まず *WRKY45* が *WRKY62* の発現を誘導し、*WRKY62* が *DPF* の発現を誘導するというような単純なカスケードであるとは考えられない。加えて、*WRKY45* と *WRKY62* は *SA* 経路においてほぼ同時期に発現誘導される (Figure 1A、1B) ため、*WRKY62* が *WRKY45* の発現をフィードバック制御するということ仮説も成り立たない。これらのことから、*WRKY62* は *WRKY45* とヘテロダイマーを形成した場合に、*DPF* 遺伝子の転写活性化因子として機能するのではないかと推測された。

この推測に基づき、まず *WRKY45* と *WRKY62* がホモダイマーやヘテロダイマーを形成するかを酵母ツーハイブリッド法および共免疫沈降法によって解析した結果、*WRKY45* と *WRKY62* はそれぞれのホモダイマーを形成するとともに両者間のヘテロダイマーを形成することが明らかとなった (Figure 13、14)。つづいて、*DPF pro* レポーター遺伝子に対して *WRKY45* および *WRKY62* の両者をエフェクターとして用いた転写活性化実験をおこなった (Figure 15)。ここで得られた結果から、*WRKY45*-*WRKY62* ヘテロダイマーは *WRKY45* ホモダイマーよりも強く *DPF* の転写を活性化し、*WRKY62* ホモダイマーは *DPF* の転写を抑制するという仮説を導き出した。この仮説では、*WRKY45* と *WRKY62* がほぼ同量の条件ではヘテロダイマーが主に形成されるため転写が強く活性化され、*WRKY62* が過剰の条件では *WRKY62* ホモダイマーが

主に形成されるため転写が弱くなると考えられるため、先の推測および実験結果 (Figure 15) を矛盾無く説明できる。実際、ゲルシフト解析では、WRKY45 と WRKY62 がホモダイマーでもヘテロダイマーでも *DPF* プロモーターにある二つの W-box に特異的に結合する事が示された (Figure 18、19)。このことは、WRKY45 と WRKY62 が、両者の存在比によって異なる構成比の複合体を形成し、それによって *DPF* 遺伝子の転写を正負両方向に制御し得ることを裏付けている。また、WRKY45 や WRKY62 のホモダイマーとヘテロダイマーはいずれも W2 および W3 の両者に対してほぼ同等の結合活性を示した (Figure 18、19)。このことから、WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマーが WRKY45 ホモダイマーよりも強く転写を活性化する理由として、ヘテロダイマーの形成により、WRKY45 ホモダイマーの場合とは別のより強力なコアクティベーターをリクルート出来るようになったのではないかと推測される。また、WRKY62 ホモダイマーはコリプレッサーをリクルートするため転写抑制活性を有すると推測される。

第三章 外部ストレスがもたらす WRKY62 と WRKY45 の発現量比の変化と WRKY62 の低酸素ストレス応答への関与

3.1 目的

第二章では、転写活性化因子 WRKY45 と転写抑制因子 WRKY62 がホモダイマーや両者間のヘテロダイマーを形成し、そのいずれもが *DPF* 上流に存する W-box に結合することによって、協調して *DPF* の転写を制御していることを示した。ではなぜ、そのような複雑な制御機構が存在しているのか。これまでの結果より得られたモデルに基づくと、この疑問に対する最も考えやすい仮説は、異なる（環境）条件下では異なる転写因子複合体が形成されることにより、*DPF* の転写が正もしくは負に制御される可能性である。ヘテロダイマー形成においては、誘導される両転写因子の量比が重要である。そこで本章では、異なる外部ストレスによって誘導される *WRKY45* と *WRKY62* の量比を把握するため、BTH 処理を含むストレス処理を行ったイネにおける *WRKY45* と *WRKY62* の転写物の発現量比を定量的に解析した。

3.2 材料および方法

3.2.1 イネの BTH 処理

イネの BTH 処理は 1.2.1.5 と同様の方法で行った。

3.2.2 NB の冠水処理および低温処理

NB の葉鞘を 7 mm 長に切断し、0.4 M マンニトールを含む 0.5% 寒天プレートに並べた。冠水処理は、葉鞘片が浮かないように濾紙で覆い、プレートを水で満たし、遮光条件下で 28°C に保温した。低温処理は、プレートを遮光条件下で 10°C に保冷した。いずれも 6 時間反応後、葉鞘 10 片を採取し、RNA を精製して qRT-PCR 法により各遺伝子の発現解析を行った。

3.2.3 イネの窒素置換処理

イネ植物は、BTH 処理と同条件で生育させた。3 葉期となったイネ植物体を脱酸素剤およびインジケータータブレット (AS ONE、www.as-1.co.jp) と共にジッパー付きプラスチック袋 (AS ONE) に入れ、電動エアポンプ (AIR PUMPAP-115、IWAKI、www.ieakipumps.jp) を用いて脱気した。その後、窒素ガスを注入し、袋内を充満させた。遮光条件にて、30°C で 6 時間反応後、イネ植物を採取し、RNA を精製して qRT-PCR 法により各遺伝子の発現解析を行った。

3.3 結果

3.3.1 SA 経路は WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマー形成を誘導する。

NB を BTH 処理した後の *WRKY45* 遺伝子および *WRKY62* 遺伝子、*DPF* 遺伝子の転写物発現解析を行った (Figure 20)。その結果、BTH 処理によって *WRKY45* と *WRKY62* の転写物量が増加しており、それにとまって *DPF* 遺伝子の転写物量も強く誘導された。このときの、*WRKY45* と *WRKY62* の転写物量を定量的に把握するため、BTH 処理した NB における両者の mRNA のコピー数を検量線法によって測定した (Table 2)。その結果、*WRKY45* に対する *WRKY62* の発現コピー数の比はおよそ 0.6 となっており、BTH 処理によって両者がほぼ同程度の発現量で誘導されていることが明らかとなった。

3.3.2 冠水処理は WRKY62 ホモダイマー形成を誘導する。

一方、これまでのいくつかの予備実験から、*WRKY62* が低酸素ストレスに関与する可能性を見出している。また、*WRKY45* の転写カスケードはアブシジン酸 (ABA) 経路によって阻害されることが報告されている (50, 51)。そこで、これらの環境条件で *WRKY62* ホモダイマーが主に形成され得るかについて調べるため、NB を冠水状態もしくは低温状態に置き、*WRKY45* 遺伝子および *WRKY62* 遺伝子、*DPF* 遺伝子の発現解析を行った (Figure 21)。すると冠水処理をした場合に *WRKY45* は誘導されずに *WRKY62* の発現量のみが増加し、それに伴って *DPF* の発現は mock 処理の状態から減少していた。このときの *WRKY62* の発現コピー数は、*WRKY45* の 40 倍以上になっていた (Table 2)。なお、低温処理では *WRKY45* 遺伝子も *WRKY62* 遺伝子もほとんど発現せず、*DPF* 遺伝子の発現誘導も起こらなかった (Figure 21)。

3.3.3 窒素置換でも冠水処理と同様に WRKY62 のみが誘導される。

イネは冠水により低酸素ストレスを被ると考えられる。そこで冠水による *WRKY62* のみの発現誘導が低酸素ストレスによることを確かめるため、NB を窒素置換によって低酸素処理した。その結果、窒素置換したイネでは冠水処理の時と同様、*WRKY62* の発現量のみが増加しており ($WRKY62/WRKY45 \approx 20$; Table 3)、*DPF* の発現は減少していた (Figure 22)。このことから、冠水における *WRKY62* の誘導は低酸素ストレスによることが明らかとなった。Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) で公開されているイネの発芽時における遺伝子発現 (嫌気条件／好気条件) (E-MEXP-2267) 遺伝子発現データによると、低酸素状態における *DPF* の発現抑制と同様に、嫌気条件下では DP 合成遺伝子の発現も抑制されていた。このことは、DP 合成遺伝子の発現が *DPF* の制御下にあることと矛盾しない。

3.4 考察

第二章で得られた仮説から、*DPF* 遺伝子の転写が誘導される条件、すなわち SA 経路が活性化される条件下では *WRKY45* および *WRKY62* のヘテロダイマー形成が促進されているのではないか、という新たな疑問が生じた。そこで、NB を BTH 処理し、*WRKY45* と *WRKY62* の発現量比を定量的に解析した。その結果、BTH 処理時には *WRKY45* と *WRKY62* がほぼ同程度の発現量で誘導されていることが明らかとなった (Figure 20、Table 2)。このことは、BTH 処理によって *WRKY45*-*WRKY62* ヘテロダイマーが主に形成され、その結果 *DPF* 遺伝子の転写が強く誘導されることを裏付けている。SA 経路において *WRKY45* は自己制御され(14)、*WRKY62* は *WRKY45* に正に制御されている (Figure 2、3) ことから、BTH によって SA 経路が活性化すると *WRKY45* と *WRKY62* の両者が同時に誘導されると推測される。

一方で *WRKY62* ホモダイマーを主に形成する環境要因があり、その条件下では *DPF* の発現が抑制されるのではないかと、という疑問が生じた。実際、冠水条件下では *WRKY62* の発現のみが誘導され、*DPF* の発現は mock 処理の状態から減少していた (Figure 21、Table 2)。この結果は、冠水処理によって *WRKY62* ホモダイマーが主に形成され、その結果 *DPF* 遺伝子の発現が抑制される事を裏付けている。これらのことから、異なる環境下では *WRKY45* と *WRKY62* の発現が異なる量比で誘導され、異なるダイマーが形成されることによって *DPF* 遺伝子の転写が正もしくは負に制御されるメカニズムが明らかとなった。この冠水による *WRKY62* のみの発現誘導は、窒素置換処理実験によって低酸素ストレスによるものであることが示された (Figure 22、Table 3)。このことから、*DPF* の転写制御においては病原菌感染と低酸素ストレスが互いにトレードオフの関係にあると考えられる。*WRKY62* はトレードオフの関係にある二つの環境のいずれにおいても発現することによって、*DPF* の転写の強弱を強調するスイッチのような役割を果たしているのかもしれない。転写因子によるこのような制御は知りうる限り他に類を見ない。

第四章 WRKY62 による低酸素応答性遺伝子の発現制御

4.1 目的

低酸素ストレス誘導性遺伝子の発現制御に WRKY62 は何らかの役割を担っているか。この疑問に答えるため本章においては、WRKY62 が低酸素応答性遺伝子の発現を制御するか否かを *WRKY62-kd* を用いた発現解析によって検討した。また、WRKY62 によるそれらの遺伝子の発現制御について低酸素ストレス時と SA 経路活性化時とで比較し、変化があるか否かを検討した。これまで種々の予備的実験の中で、WRKY62 が冠水条件下でいくつかの低酸素ストレス応答性遺伝子の発現制御に関わる可能性を見出している。そのため、その中から WRKY62 の影響および低酸素ストレス応答性の明確な、*Alcohol dehydrogenase 2* (*ADH2*, Os11g0210500)、*Acyl [acyl-carrier-protein] desaturase* (Os01g0880800) および *OsERF068* (Os01g0313300) を発現解析に用いる低酸素応答性遺伝子として選抜した。WRKY62 によるこれらの遺伝子発現の制御が示されることにより、WRKY62 による低酸素ストレスへの関与の可能性が期待される。

4.2 材料および方法

4.2.1 イネの窒素置換処理

イネの窒素置換処理は 3.2.3 と同様に行った。

4.2.2 リーフディスク法による SA 処理

NB および *WRKY62-kd* の種子を、1.2.4 と同様の方法で 4 葉期まで生育させた。各系統につき 5 個体から完全展開第 4 葉を採取して 5 mm 長に断片化し、0.01% SILWET L77、1mM SA ナトリウム溶液に浸した。対照として、同様の葉断片を 0.01% SILWET L77 溶液に浸した。

4.2.3 マイクロアレイ解析

30°C で 0、1、3 時間後に葉断片を各処理区につき 2 サンプル分採取した。RNA 抽出は 1.2.1.5 と同様に行った。また、マイクロアレイによる発現解析は 1.2.7 と同様に行った。

4.3 結果

4.3.1 低酸素ストレス下において WRKY62 は低酸素応答性遺伝子の発現を正に制御する。

NB および *WRKY62-kd* を窒素置換処理によって低酸素条件に置き、低酸素応答性遺伝子の発現を解析した。(Figure 23)。その結果、NB においては窒素置換処理によってこれらの遺伝子全てが誘導されたが、*WRKY62-kd* ではその誘導の程度が低下していた。この結果は、WRKY62 が低酸素ストレス応答の制御に関与し、低酸素ストレス時には低酸素ストレス誘導

性遺伝子の発現を正に制御することを示している。

4.3.2 SA 経路において WRKY62 は低酸素ストレス遺伝子の発現を負に制御する。

NB および *WRKY62*-kd を SA 処理し、低酸素応答性遺伝子の発現をマイクロアレイ解析した。(Figure 24)。その結果、NB においてはこれらの遺伝子は全て SA 処理によって抑制されていたが、*WRKY62*-kd ではその発現が上昇していた。この結果は、WRKY62 が病害応答時には低酸素ストレス誘導性遺伝子の発現を負に制御することを示している。以上の結果をこれまでの結果と合わせて考えると、WRKY62 が異なるストレスに応答して遺伝子発現を正にも負にも制御することを示している。

4.4 考察

WRKY62 による低酸素ストレス応答性遺伝子の発現制御への関与を調べるため、本章では 3 種類の低酸素ストレス応答性遺伝子について発現解析を行った。*Alcohol dehydrogenase 2* (*ADH2*, Os11g0210500) は、嫌気条件下における解糖および ATP 産生に関与しており(52)、低酸素ストレス応答の典型的なマーカー遺伝子である。また、シロイヌナズナでは冠水などの低酸素状態において、脂肪鎖の不飽和化が植物を保護するために働くことが知られている(53)。この制御に関与している Stearoyl-acyl carrier protein Δ 9-desaturase6 (*AtS-ACP-DES6*(54), *AtSAD6*) の遺伝子は低酸素ストレスによって転写誘導される(55)。イネの *Acyl [acyl-carrier-protein] desaturase* (Os01g0880800) (56)は、この遺伝子のオーソログである。そして最近、シロイヌナズナにおいて VII 型の Ethylene-responsive factor (ERF) が低酸素応答性遺伝子発現のマスター制御因子として働くという報告が相次いでいる(57-59)。*OsERF068* (Os01g0313300) はイネの VIIa 型 ERF の一つをコードしている。WRKY62 がこれらの遺伝子発現を制御することは、低酸素ストレスに対するあらゆる応答反応に WRKY62 が関与する可能性を示唆している。

これら 3 種の低酸素ストレス応答性遺伝子の発現は、低酸素ストレス処理をした NB では全て誘導されたが、*WRKY62*-kd では誘導の程度が低下した (Figure 23)。このことは、低酸素条件下では WRKY62 が低酸素ストレス応答性遺伝子の発現を正に制御することを示している。一方、SA 処理をした *WRKY62*-kd では NB と比較してこれらの遺伝子の発現が上昇していた (Figure 24)。このことは、病害応答時には WRKY62 が低酸素ストレス応答性遺伝子の発現を負に制御することを示している。以上の結果から、先の章で述べた WRKY62 によるスイッチング制御は、病害応答性遺伝子に対してだけでなく低酸素ストレス応答性遺伝子に対しても行われる可能性を示唆している。すなわち、SA 誘導時には WRKY62 が低酸素ストレスを抑制して病害応答を促進し (Figure 25C)、低酸素条件下では病害応答を抑制して低酸素ストレス応答を

促進する (Figure 25D)。

今後、低酸素処理したイネの発現ライブラリーを用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニングによる低酸素ストレス応答性の WRKY62 の相互作用因子の探索や、低酸素処理した *WRKY62*-kd のトランスクリプトーム解析などによる低酸素条件下における WRKY62 の下流遺伝子の網羅的探索が行われることにより、低酸素ストレス応答における WRKY62 の関与についてメカニズムの全貌が明らかになると期待される。また、*WRKY62*-kd イネの低酸素ストレス応答性や低酸素ストレス後の病原菌感染処理に対する抵抗性の表現系解析などにより、WRKY62 によるスイッチング制御についてさらに深い理解が得られると期待される。

総合考察

本研究では、これまでその機能への示唆に関し矛盾する報告が存在する転写因子 WRKY62 における真の機能解明を目指し、特に WRKY45 との関係性から種々の解析を行った。WRKY62 本研究で得られた結果を基に、外部条件によって *DPF* 等の病害応答遺伝子や低酸素応答遺伝子の転写が異なる制御をうけるモデルを提唱する (Figure 25)。抵抗性誘導剤などによって SA 経路が活性化されると、ほぼ同程度の量の WRKY45 および WRKY62 が生産される。そのため、WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマーが優先的に形成され、*DPF* 遺伝子等の病害応答遺伝子の転写をシスエレメントである W-box を介して強く活性化する (Figure 25A)。一方低酸素条件下では、WRKY45 はほとんど産生されず WRKY62 のみが産生される。このため WRKY62 ホモダイマーが優先的に形成され、*DPF* 遺伝子や他の病害応答性遺伝子の発現をも同じシスエレメントを介して抑制すると考えられる (Figure 25B)。さらに、WRKY62 は低酸素応答性遺伝子の発現制御や低酸素ストレス耐性の正の制御に関わっていると考えられる。これらの制御は次のようなモデルで説明できる。すなわち、WRKY62 は、低酸素応答遺伝子のプロモーターに共に結合することのできる未知の転写因子と相互作用することによって低酸素応答遺伝子を制御する、というものである (Figure 25A、25B)。このモデルによる、環境の変化に応じて病害応答性遺伝子と低酸素応答性遺伝子の間でスムーズに遺伝子発現を切り替える仕組みが説明できる。

病害応答における IIa 型の WRKY 型 TF の機能はシロイヌナズナで広く研究され、いくつかの相反する知見が報告されていた。*AtWRKY18* および *AtWRKY40* 二重欠損体を用いた解析により、これら二つの転写因子はうどん粉病菌 *G. orontii* の感染初期に病害応答遺伝子の発現を負に制御することが示されている(32, 33)。一方、*AtWRKY18* は全身獲得性抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) の正の制御因子であるという報告もある(34)。この矛盾は本研究で提唱するモデルによって十分に説明することができる。すなわち、WRKY62 と同様、*AtWRKY18* もまたホモダイマーや別の WRKY 型転写因子とのヘテロダイマーを形成する。*AtWRKY18* ホモダイマーは、WRKY62 ホモダイマー同様、病害応答性遺伝子の転写を抑制し、*AtWRKY18* を含むヘテロダイマーは、WRKY62-WRKY45 ヘテロダイマー同様、病害応答遺伝子の転写を活性化すると考察できる。*AtWRKY18* が過剰な条件では病害応答が抑制され、*AtWRKY18* とその相互作用因子の WRKY 型転写因子がほぼ同程度の量で存在するときには病害応答が活性化される。イネでは、Peng らによる過剰発現体を用いた研究により、WRKY62 は *Xoo* に対する病害応答の負の制御因子として機能することが示されている(28)。本研究におけるモデルを基にすれば、*WRKY62-ox* イネに於いては常に WRKY62 ホモダイマーが形成されるため、病害応答が抑制され、罹病性の表現形を示すと説明することができる。

本研究で提唱されたモデルと類似し、ホモダイマーやヘテロダイマー形成によって異なる転写制御が可能になるという事例が、動物の細胞核内に局在するがん遺伝子産物（nuclear oncoprotein）を中心として報告されている。例として、転写因子である Jun や Fos は TPA-responsive element（TRE）に対し、ホモダイマーでは転写活性可能性が低いが、Fos-Jun ヘテロダイマーは高い親和性で結合し、強力に転写を活性化する(60)。bHLH-zipper（bHLH-Z）ドメインを持つ c-Myc は、単独では転写抑制因子として働く Max とヘテロダイマーを形成し、転写活性化因子として機能する(61)。同じく bHLH-Z 型の USF1 と USF2 は共に、ラットの *rRNA* 遺伝子のプロモーターに対して、ホモダイマーでは転写抑制因子だが、USF1-USF2 ヘテロダイマーは転写活性化因子として働く(62)。植物では、WRKY62 のシロイヌナズナのオーソログである *Ila* 型 WRKY の AtWRKY18、AtWRKY40 および AtWRKY60 については三者がアブシジン酸（ABA）経路で複雑な転写制御を行うことを示す報告がある(63)。その中で、三者がタンパク質間相互作用すると共に、AtWRKY18-AtWRKY40 ヘテロダイマーが AtWRKY60 の転写活性化因子として機能する可能性が提唱されている。

植物は絶えず生物性および非生物性のストレスにさらされ、これにより作物の生産性が減少する。植物は、様々な分子メカニズムを含む複雑な制御を行うことでこれらのストレスに応答している。このようなメカニズムはおそらく、その時々で最も深刻なストレスに対しての応答を優先することにより、限りあるリソースを有効に配分するために進化してきたものと考えられる。病害抵抗性が誘導されると、WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマーが *DPF* 等の病害応答遺伝子の転写を強力に活性化させる (Figure 25C)。これとは対照的に、低酸素ストレス存在下では、WRKY62 のみが発現して WRKY62 ホモダイマーを形成し、*DPF* 等病害応答遺伝子の転写を抑制するため病害応答を低下させる一方で、直接的もしくは間接的に低酸素応答遺伝子の転写を活性化し、低酸素耐性をもつに至る (Figure 25D)。このメカニズムによって WRKY62 は病害応答と低酸素応答の切り替えを厳密にコントロールできるようになると考えられる。例えば、*DPF* 等の病害応答遺伝子は、病原体の感染時には最大限誘導され、強力かつ迅速な病害応答をする必要があるが、病害応答は植物の生育に負の影響を及ぼすため、冠水等の低酸素ストレス下においては、生育を阻害しないよう不要な病害応答は適切に抑制されていなければならない。一度に両方のストレスにさらされた時、ストレス応答の切り替えが緩慢であると、各ストレスに応答する遺伝子の転写の正と負の制御が相殺しあい、どちらのストレスに対しても十分な応答ができなくなると考えられる。WRKY62 によって病害応答と低酸素応答を厳密に切り替えられれば、植物はたとえ複数のストレスにさらされても、より深刻なストレスに応答を集中させ、克服できたら次のストレス応答に切り替える、その切り替えを繰り返すことで複合的なストレスに対して適切にリソースが分配されて適切な応答が可能になると考えられる。このように WRKY62 は病害応答と低酸素応答の間でのリソースのトレードオフを可能にする調節因子とし

での役割を担っているのかもしれない。

イネが大規模に冠水した直後にはいもち病や白葉枯病に罹病しやすくなると言われている。本モデルをもとにすれば、この現象は WRKY62 が冠水時に低酸素ストレス応答を優先してリソースを振り分け、病害応答を抑制するために起こると考えると説明ができる。農業において富栄養条件で作物を栽培する上ではこのようなリソースの分配は必要無いのかもしれない、むしろ病原菌感染と低酸素とのトレードオフは、作物の生産性を低下させ、冠水後に作物が病害を受けやすくする要因となる可能性がある。しかし、今後 WRKY62 の機能解明についてさらなる研究が進むならば、WRKY62 が病害応答と低酸素応答との間で転写制御を切り替える役割を担うという知見に基づき、トレードオフを最適化するような遺伝子操作によって、あらゆる環境条件下で作物の生産性を最大化することが可能になると期待できる。

要旨

植物は、自身で移動することができない固着生物であるため、病原体感染や環境変化によるストレスに対応するためのシグナル伝達経路を高度に発達させてきた。その中の一つで、主に病害応答に重要な役割を担うサリチル酸 (SA) シグナル伝達経路が活性化されると、WRKY 型転写因子を含む様々な転写因子の働きによって、抗菌物質であるジテルペン型ファイトアレキシン (DP) や Pathogenesis Related protein 等の防御タンパク質が細胞に蓄積し、病害防御反応が起こる。所属研究室によるこれまでの研究から、グループ IIa の WRKY 型転写因子 WRKY62 はイネにおいて SA 経路により発現を誘導され、いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) の感染によって SA 経路における病害応答の中心的な働きをする転写因子 WRKY45 と同時期に誘導されることが示されている。これらの知見は、WRKY62 が WRKY45 と同調して病害に応答する可能性を示唆する。しかし一方で、過剰発現体を用いた解析によって、WRKY62 は病害応答反応の負の制御因子であることが示されている。本研究では、病害防御などの外部ストレス応答における WRKY62 の真の機能について WRKY45 との関係性を軸に詳細に解明することを目的とした。

日本晴品種非形質転換体イネ (NB) を SA 経路に作用する抵抗性誘導剤であるベンゾチアジアゾール (BTH) で処理すると、*M. oryzae* 感染時と同様、WRKY62 遺伝子は WRKY45 遺伝子と同時期に誘導された。また、NB と WRKY45 抑制イネを BTH 処理すると、認められる WRKY62 遺伝子の発現誘導が抑制された。加えて、WRKY62 遺伝子上流プロモーター領域に対する WRKY45 の転写活性が認められ、WRKY62 は SA 経路において WRKY45 転写カスケードの下流に位置し、WRKY45 によって発現を制御されていることが分かった。WRKY62 抑制イネを用いた *M. oryzae* 噴霧接種による抵抗性検定から WRKY62 は病害応答の正の制御因子であることが明らかとなった。また *M. oryzae* 滴下接種による抵抗性検定では、WRKY62 過剰発現イネと WRKY62 抑制イネの両者がいもち病抵抗性の低下を示したことから、WRKY62 による病害応答は複雑なメカニズムであることが推察された。そこで WRKY62 に制御される下流遺伝子を探索するため、WRKY62 抑制イネを用いたトランスクリプトーム解析を行った結果、DP 生合成遺伝子群やそれらの直接的な転写制御因子 DPF 等、病害応答性遺伝子の発現を WRKY62 が正に制御することが見いだされた。酵母ツーハイブリッド法、共免疫沈降法、ゲルシフト法による解析からは、WRKY45 と WRKY62 が自身とのホモダイマーと共に相互のヘテロダイマーを形成し、それらが DPF プロモーター内の認識配列 W-box に結合しうることが分かった。イネ葉鞘を用いた一過性発現による転写活性化実験に於いて、WRKY62 は単独では転写抑制因子であること、また WRKY45 は単独では DPF 上流域にある W-box を介して DPF の転写を活性化することが分かった。そして、エフェクターとして WRKY45 遺伝子と WRKY62

遺伝子を共導入すると、レポーター遺伝子である *DPF promoter: hrLUC* の転写は *WRKY45* 遺伝子単独で導入するよりも強く活性化されたが、*WRKY62* 遺伝子過剰の条件では低下した。このように、*WRKY45*-*WRKY62* ヘテロダイマーは強力な転写活性化因子として機能する一方、*WRKY62* ホモダイマーは転写抑制因子として機能することが分かった。転写物の定量の結果、*BTH* は *WRKY45* 遺伝子と *WRKY62* 遺伝子とをほぼ同程度の発現量で誘導し、*WRKY45*-*WRKY62* ヘテロダイマーによる *DPF* 遺伝子の転写活性化を裏付けた。また、冠水および窒素置換等の低酸素ストレス条件下では *WRKY62* 遺伝子の発現のみを誘導し、*WRKY62* ホモダイマーによる *DPF* 発現の抑制を裏付けた。さらに、*WRKY62* は、低酸素ストレス条件下では低酸素応答性遺伝子の発現を正に制御したが、*SA* 経路活性条件下ではそれらの遺伝子の発現を負に制御した。これらの結果から、*WRKY62* は病害応答と低酸素応答の間のトレードオフを可能にする調節因子であるということが明らかとなった。

引用文献

1. 国連食糧農業機関. (2000) *Statistical Database*
2. Oerke, E. C., and Dehne, H. W. (2004) Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* **23**, 275–285
3. Gnanamanickam, S. S., Brindha Priyadarisini, V., Narayanan, N. N., Vasudevan, P., and Kavitha, S. (1999) An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. *Curent Science* **77**, 1435-1443
4. Ou, S. H. (1987) Rice Diseases. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute.
5. Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J. D. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 317-343
6. Takatsuji, H. (2014) Development of disease-resistant rice using regulatory components of induced disease resistance. *Frontiers in Plant Science* **5**, 630
7. Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., and Broekaert, W. F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 15107-15111
8. McDowell, J. M., and Dangl, H. L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 79-82
9. Agrawal, G. K., Jwa, N. S., and Rakwal, R. (2000) A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Reserch Communications* **274**, 157-165
10. Agrawal, G. K., Rakwal, R., and Jwa, N. S. (2000) Rice (*Oryza sativa* L.) OsPR1b gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochemical and Biophysical Reserch Communications* **278**, 290-298
11. Bari, R., and Jones, J. D. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**, 473-488
12. van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135-162

13. Eulgem, T. (2005) Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science* **10**, 71-78
14. Nakayama, A., Fukushima, S., Goto, S., Matsushita, A., Shimono, M., Sugano, S., Jiang, C. J., Akagi, A., Yamazaki, M., Inoue, H., and Takatsuji, H. (2013) Genome-wide identification of WRKY45-regulated genes that mediate benzothiadiazole-induced defense responses in rice. *BMC Plant Biology* **13**, 150
15. Paxton, J. D. (1980) A New Working Definition of the Term "Phytoalexin". *Plant Disease* **64**, 734
16. Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A. M. (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* **17**, 73-90
17. Schmelz, E. A., Huffaker, A., Sims, J. W., Christensen, S. A., Lu, X., Okada, K., and Peters, R. J. (2014) Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins. *The Plant Journal* **79**, 659-678
18. Koga, J., Shimura, M., Oshima, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., and Ogasawara, N. (1995) Phytocassanes A, B, C and D, novel diterpene phytoalexins from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron* **51**, 7907-7918
19. Hasegawa, M., Mitsuhara, I., Seo, S., Imai, T., Koga, J., Okada, K., Yamane, H., and Ohashi, Y. (2010) Phytoalexin Accumulation in the Interaction Between Rice and the Blast Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **23**, 1000-1011
20. Toyomasu, T., Usui, M., Sugawara, C., Otomo, K., Hirose, Y., Miyao, A., Hirochika, H., Okada, K., Shimizu, T., Koga, J., Hasegawa, M., Chuba, M., Kawana, Y., Kuroda, M., Minami, E., Mitsuhashi, W., and Yamane, H. (2014) Reverse-genetic approach to verify physiological roles of rice phytoalexins: characterization of a knockdown mutant of OsCPS4 phytoalexin biosynthetic gene in rice. *Physiologia Plantarum* **150**, 55-62
21. Xu, M., Galhano, R., Wiemann, P., Bueno, E., Tiernan, M., Wu, W., Chung, I. M., Gershenzon, J., Tudzynski, B., Sesma, A., and Peters, R. J. (2012) Genetic evidence for natural product-mediated plant-plant allelopathy in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* **193**, 570-575
22. Kishi-Kaboshi, M., Okada, K., Kurimoto, L., Murakami, S., Umezawa, T., Shibuya, N., Yamane, H., Miyao, A., Takatsuji, H., Takahashi, A., and Hirochika, H. (2010) A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *The Plant Journal* **63**, 599-612

23. Yamamura, C., Mizutani, E., Okada, K., Nakagawa, H., Fukushima, S., Tanaka, A., Maeda, S., Kamakura, T., Yamane, H., Takatsuji, H., and Mori, M. (2015) Diterpenoid Phytoalexin Factor, a bHLH Transcription Factor, Plays a Central Role in the Biosynthesis of Diterpenoid Phytoalexins in Rice. *The Plant Cell*
24. Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C. J., Ono, K., Toki, S., and Takatsuji, H. (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *The Plant Cell* **19**, 2064-2076
25. Shimono, M., Koga, H., Akagi, A., Hayashi, N., Goto, S., Sawada, M., Kurihara, T., Matsushita, A., Sugano, S., Jiang, C. J., Kaku, H., Inoue, H., and Takatsuji, H. (2012) Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Molecular Plant Pathology* **13**, 83-94
26. Matsushita, A., Inoue, H., Goto, S., Nakayama, A., Sugano, S., N., H., and Takatsuji, H. (2013) Nuclear ubiquitin proteasome degradation affects WRKY45 function in the rice defense program. *The Plant Journal* **73**, 302-313
27. Akagi, A., Fukushima, S., Okada, K., Jiang, C. J., Yoshida, R., Nakayama, A., Shimono, M., Sugano, S., Yamane, H., and Takatsuji, H. (2014) WRKY45-dependent priming of diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and the role of cytokinin in triggering the reaction. *Plant Molecular Biology* **86**, 171-183
28. Peng, Y., Bartley, L. E., Chen, X., Dardick, C., Chern, M., Ruan, R., Canlas, P. E., and Ronald, P. C. (2008) OsWRKY62 is a negative regulator of basal and Xa21-mediated defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Molecular Plant* **1**, 446-458
29. Seo, Y. S., Chern, M., Bartley, L. E., Han, M., Jung, K. H., Lee, I., Walia, H., Richter, T., Xu, X., Cao, P., Bai, W., Ramanan, R., Amonpant, F., Arul, L., Canlas, P. E., Ruan, R., Park, C. J., Chen, X., Hwang, S., Jeon, J. S., and Ronald, P. C. (2011) Towards establishment of a rice stress response interactome. *PLoS Genetics* **7**, e1002020
30. Shen, Q. H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., and Schulze-Lefert, P. (2007) Nuclear Activity of MLA Immune Receptors Links Isolate-Specific and Basal Disease-Resistance Responses. *Science* **315**, 1098-1103
31. Xu, X., Chen, C., Fan, B., and Chen, Z. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *The Plant Cell* **18**, 1310-1326

32. Pandey, S. P., Roccaro, M., Schon, M., Logemann, E., and Somssich, I. E. (2010) Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. *The Plant Journal* **64**, 912-923
33. Schon, M., Toller, A., Diezel, C., Roth, C., Westphal, L., Wiermer, M., and Somssich, I. E. (2013) Analyses of wrky18 wrky40 plants reveal critical roles of SA/EDS1 signaling and indole-glucosinolate biosynthesis for Golovinomyces orontii resistance and a loss-of resistance towards Pseudomonas syringae pv. tomato AvrRPS4. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **26**, 758-767
34. Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens* **2**, e123
35. Miki, D., and Shimamoto, K. (2004) Simple RNAi Vectors for Stable and Transient Suppression of Gene Function in Rice. *Plant and Cell Physiology* **45**, 490-495
36. Miki, D., Itoh, R., and Shimamoto, K. (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiology* **138**, 1903-1913
37. Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497
38. Sivamani, E., DeLong, R. K., and Qu, R. (2009) Protamine-mediated DNA coating remarkably improves bombardment transformation efficiency in plant cells. *Plant Cell Reports* **28**, 213-221
39. Goto, S., Sasakura-Shimoda, F., Yamazaki, M., Hayashi, N., Suetsugu, M., Ochiai, H., and Takatsuji, H. (2015) Development of disease-resistant rice by pathogen-responsive expression of WRKY45. *Plant Biotechnology Journal*
40. Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**, 199-206
41. Yamamoto, S., Nakano, T., Suzuki, K., and Shinshi, H. (2004) Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochemica et Biophysica Acta* **1679**, 279-287
42. Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2001) Repression Domains of Class II ERF Transcriptional Repressors Share an Essential Motif for Active Repression. *The Plant Cell* **13**, 1959-1968
43. Ohira, K., Ojima, K., and Fujiwara, A. (1973) Studies on the nutrition of rice cell

- culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant and Cell Physiology* **14**, 1113-1121
44. Inoue, H., Hayashi, N., Matsushita, A., Xinqiong, L., Nakayama, A., Sugano, S., Jiang, C. J., and Takatsuji, H. (2013) Blast resistance of CC-NB-LRR protein Pb1 is mediated by WRKY45 through protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9577-9582
 45. van Engelen, F. A., Molthoff, J. W., Conner, A. J., Nap, J. P., Pereira, A., and Stiekema, W. J. (1995) pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research* **4**, 288-290
 46. Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J. (1986) Identification of a Cellular Transcription Factor Involved in EIA Tram-Activation. *Cell* **45**, 219-228
 47. Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I. E. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO journal* **15**
 48. Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., and Somssich, I. E. (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *The EMBO journal* **18**
 49. Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. (2005) Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain. *The Plant Cell* **17**, 944-956
 50. Yazawa, K., Jiang, C. J., Kojima, M., Sakakibara, H., and Takatsuji, H. (2012) Reduction of abscisic acid levels or inhibition of abscisic acid signaling in rice during the early phase of Magnaporthe oryzae infection decreases its susceptibility to the fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**, 1-7
 51. Ueno, Y., Yoshida, R., Kishi-Kaboshi, M., Matsushita, A., Jiang, C. J., Goto, S., Takahashi, A., Hirochika, H., and Takatsuji, H. (2015) Abiotic stresses antagonize the rice defense pathway through the tyrosine-dephosphorylation of OsMPK6. *PLoS Pathogens* **11**, e1005231
 52. Xie, Y., and Wu, R. (1989) Rice alcohol dehydrogenase genes: anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones. *Plant Molecular Biology* **13**, 58-68

53. Xie, L. J., Chen, Q. F., Chen, M. X., Yu, L. J., Huang, L., Chen, L., Wang, F. Z., Xia, F. N., Zhu, T. R., Wu, J. X., Yin, J., Liao, B., Shi, J., Zhang, J. H., Aharoni, A., Yao, N., Shu, W., and Xiao, S. (2015) Unsaturation of very-long-chain ceramides protects plant from hypoxia-induced damages by modulating ethylene signaling in Arabidopsis. *PLoS Genetics* **11**, e1005143
54. Kachroo, A., Shanklin, J., Whittle, E., Lapchyk, L., Hildebrand, D., and Kachroo, P. (2007) The Arabidopsis stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Molecular Biology* **63**, 257-271
55. Klinkenberg, J., Faist, H., Saupe, S., Lambertz, S., Krischke, M., Stingl, N., Fekete, A., Mueller, M. J., Feussner, I., Hedrich, R., and Deeken, R. (2014) Two fatty acid desaturases, STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN Delta9-DESATURASE6 and FATTY ACID DESATURASE3, are involved in drought and hypoxia stress signaling in Arabidopsis crown galls. *Plant Physiology* **164**, 570-583
56. Jiang, C. J., Shimono, M., Maeda, S., Inoue, H., Mori, M., Hasegawa, M., Sugano, S., and Takatsuji, H. (2009) Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene OsSSI2 enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **22**, 820-829
57. Gibbs, D. J., Lee, S. C., Isa, N. M., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G. W., Correia, C. S., Corbineau, F., Theodoulou, F. L., Bailey-Serres, J., and Holdsworth, M. J. (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479**, 415-418
58. Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D. A., Giuntoli, B., Giorgi, F. M., Voesenek, L. A., Perata, P., and van Dongen, J. T. (2011) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**, 419-422
59. Sasidharan, R., and Mustroph, A. (2011) Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. *The Plant Cell* **23**, 4173-4183
60. Ransone, L. J., and Verma, I. M. (1990) NUCLEAR PROTO-ONCOGENES *FOS* AND *JUN* *Annual Review of Cell Biology* **6**, 539-557
61. Kretzner, L., Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1992) Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature* **359**, 426-429
62. Ghosh, A. K., Datta, P. K., and Jacob, A. T. (1997) The dual role of helix - loop -

- helix-zipper protein USF in ribosomal RNA gene transcription in vivo. *Oncogene* **14**, 589-594
63. Chen, H., Lai, Z., Shi, J., Xiao, Y., Chen, Z., and Xu, X. (2010) Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biology* **10**, 281

図表

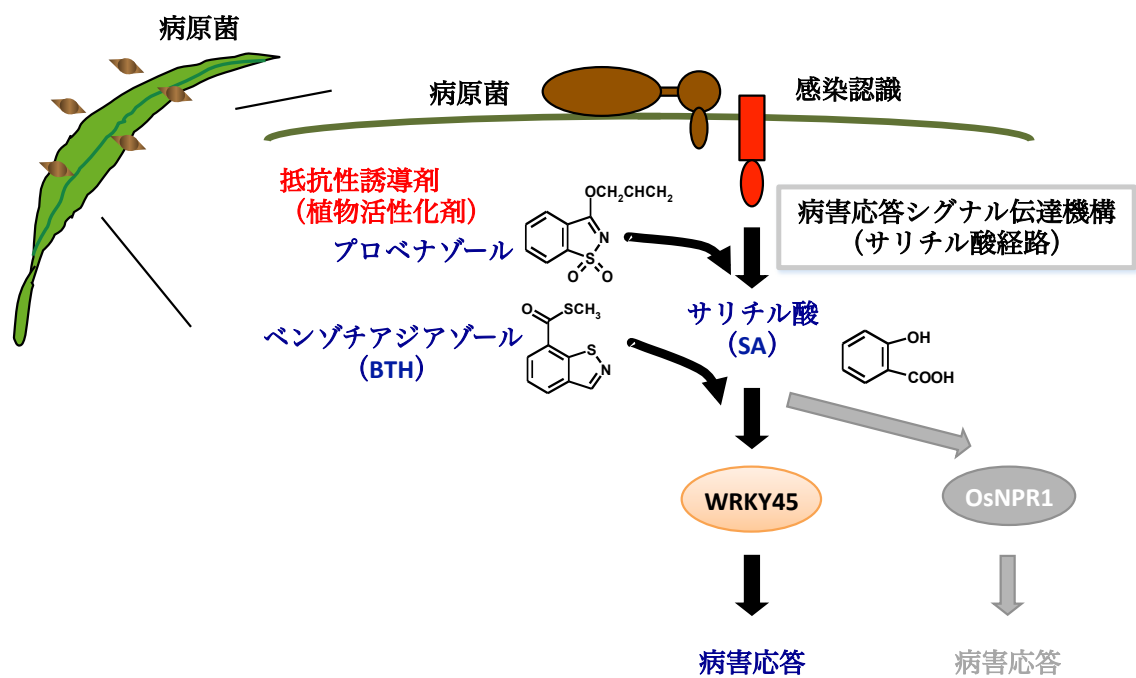


Figure 0A: 抵抗性誘導剤はSA経路を活性化し、病害防御応答を誘導する。WRKY45は植物のSA経路による病害応答の鍵となる転写因子である。(shimono et al, 2007)

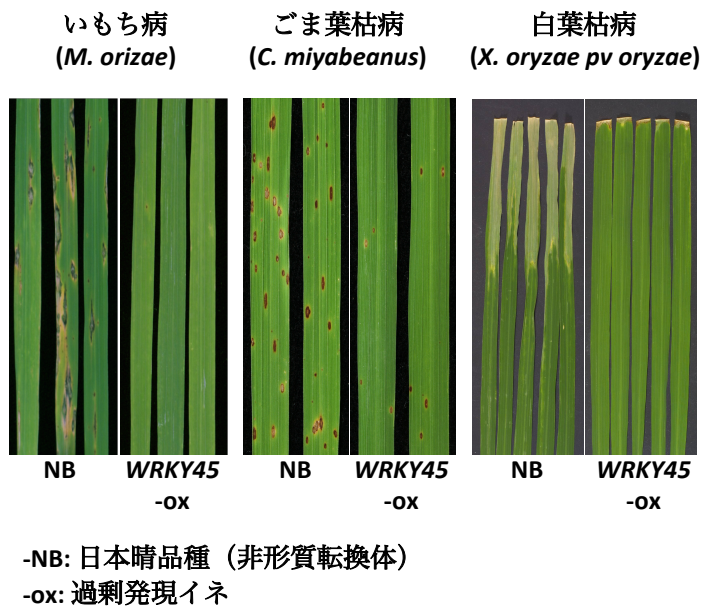


Figure 0B: WRKY45-過剰発現イネは複数の病原体に対して強力な抵抗性を示す。(shimono et al, 2007 and 2012)

Figure 0

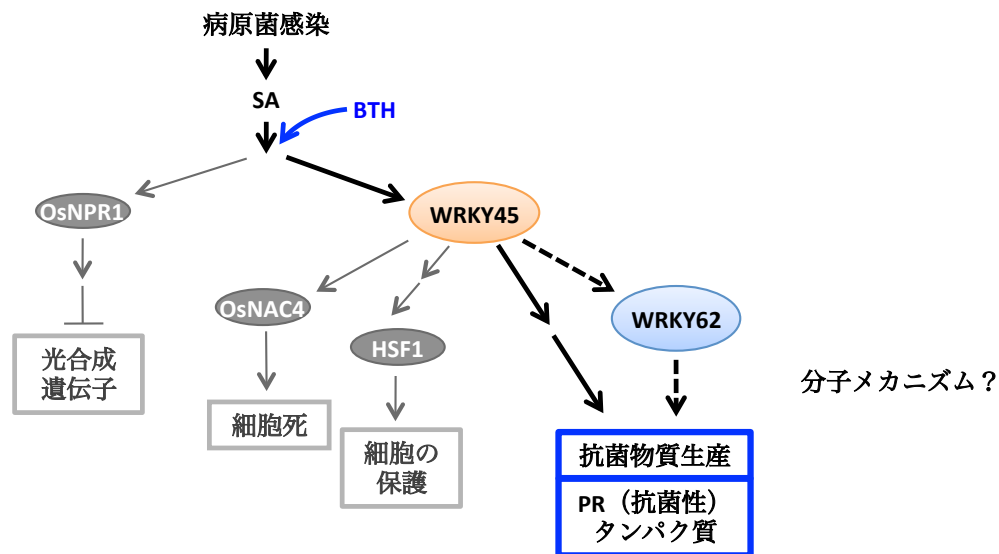


Figure 0C: WRKY45はSA経路による病害応答において転写カスケードを構成している。点線はこれまでの知見(Nakayama et al.,2013、Akagi et al, 2014)に基づいた推測および本研究の範囲を指す。

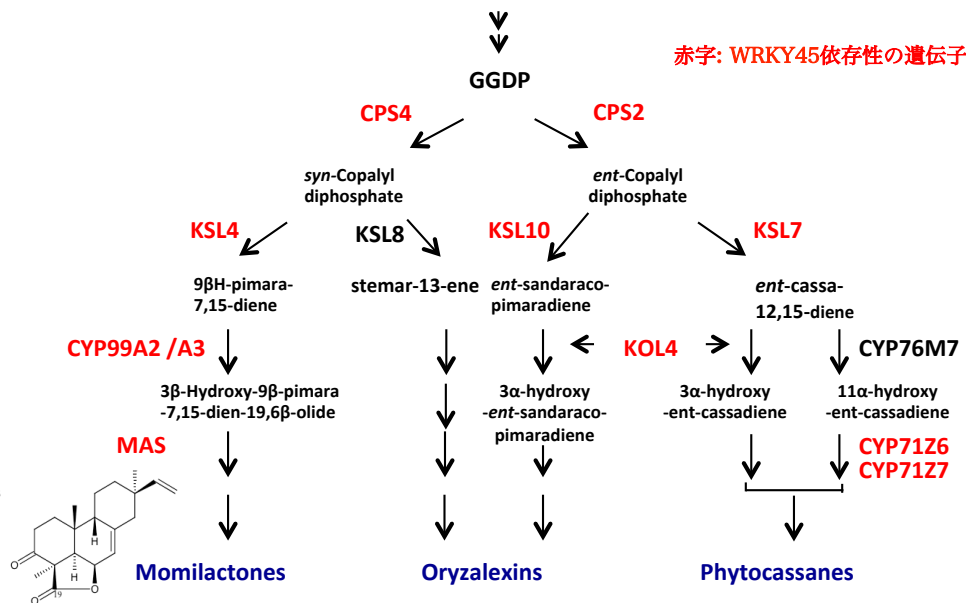


Figure 0D: ジテルペン型ファイトアレキシン (DP) 合成経路。ほぼ全てのDP合成遺伝子群のBTHによる誘導がWRKY45に依存している。(Akagi et al, 2014)

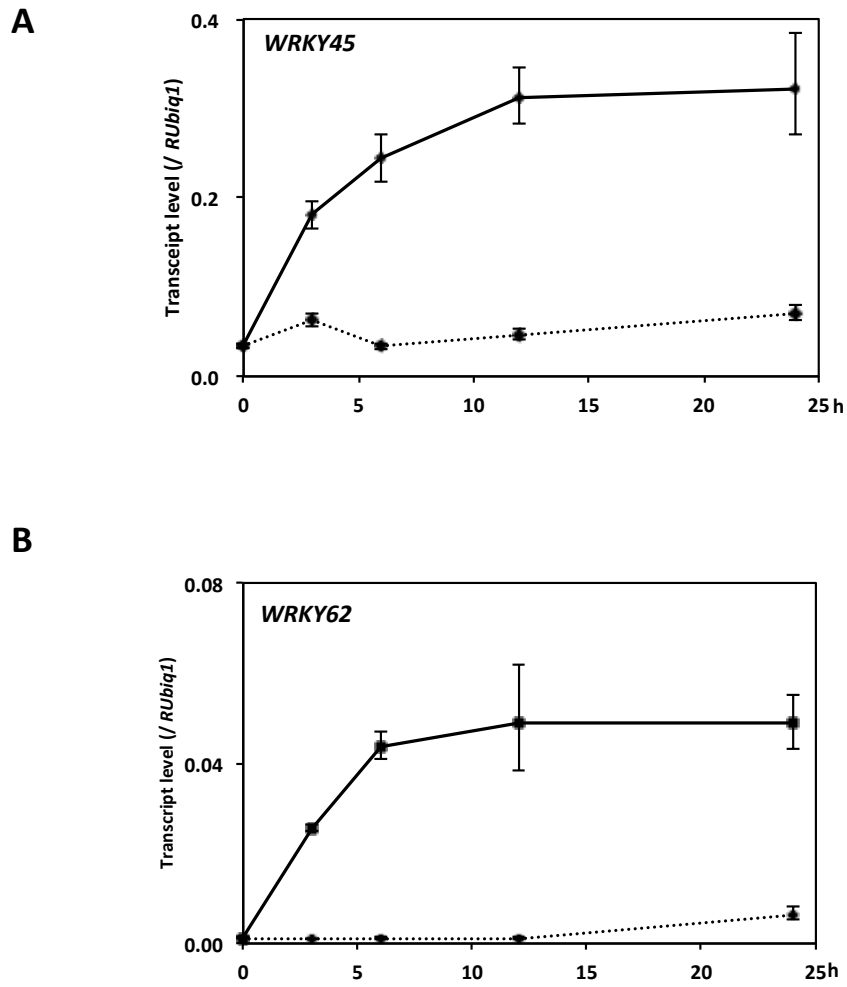
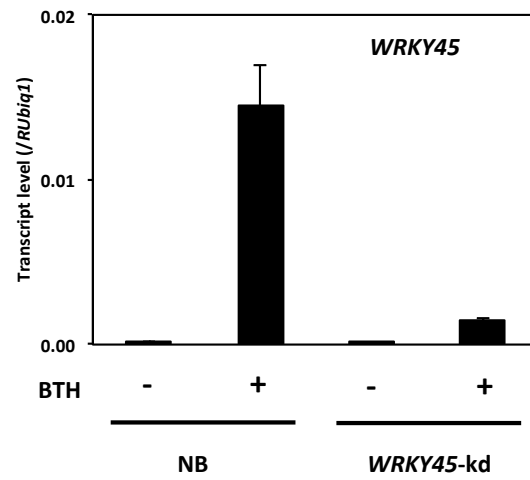


Figure 1. *WRKY62*はSA経路において*WRKY45*と同時期に発現誘導される。
 A. BTH処理した非形質転換型日本晴イネ (NB) における*WRKY45*の発現をqRT-PCRで定量した。
 B. BTH処理したNBにおける*WRKY62*の発現をqRT-PCRで定量した。
 各処理に於いて3個体を1サンプルにまとめた。発現量は3回測定し、その平均値を標準偏差 (SD) と共に示した。点線はmock処理区、実線はBTH処理区の結果を示している。

A



B

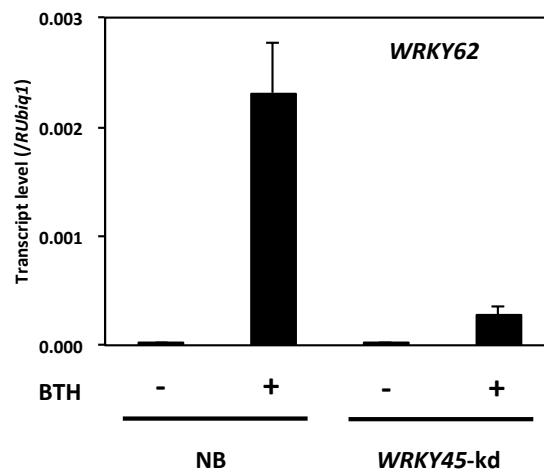


Figure 2. WRKY62はサリチル酸経路においてWRKY45の下流因子として機能する。

A. BTH処理したNBおよびWRKY45抑制イネ (WRKY45-kd) におけるWRKY45遺伝子の発現をqRT-PCRで定量した。

B. BTH処理したNBおよびWRKY45-kdにおけるWRKY62遺伝子の発現をqRT-PCRで定量した。

各処理に於いて3個体を1サンプルにまとめた。発現量は3回測定し、その平均値をSDと共に示した。

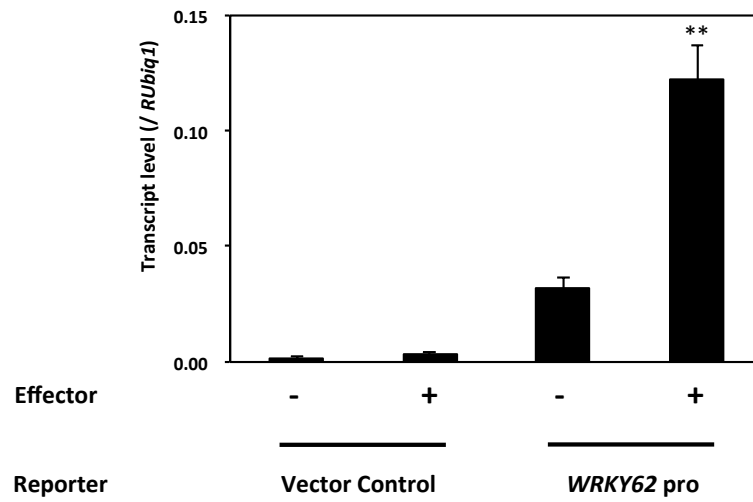
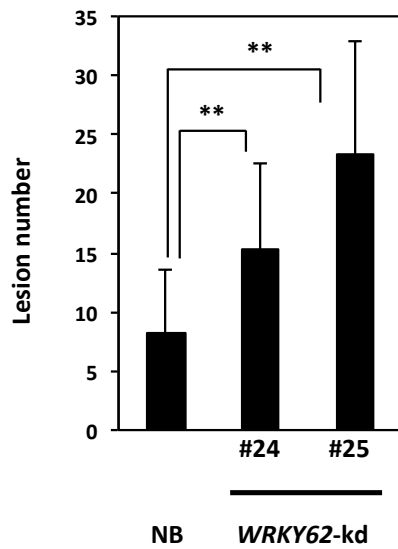


Figure 3. イネ葉鞘を用いたWRKY45遺伝子一過的発現系におけるルシフェラーゼ・レポーター遺伝子の転写活性化実験。
7片の葉鞘を1サンプルにまとめ、3サンプルの測定値の平均をSDと共に示した。エフェクターとして、35S-WRKY45導入時の測定値を非導入時と比較し統計計算した。**はStudentのt-testで $p < 0.01$ を表す。

A



B

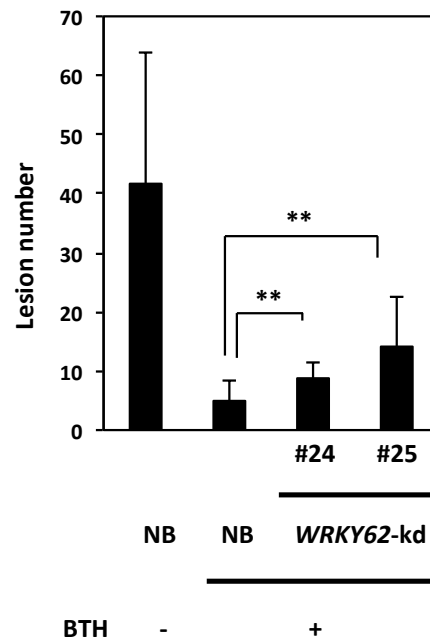


Figure 4. イネのいもち病抵抗性検定。

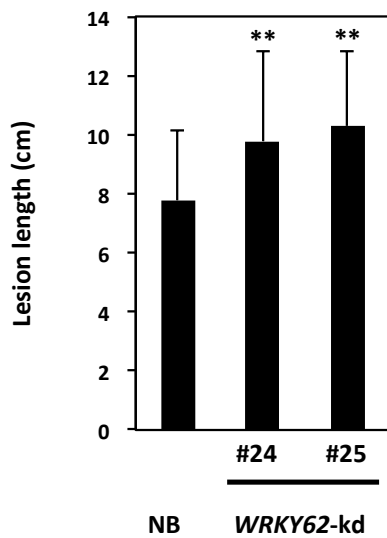
A. いもち病菌接種検定。NBおよびWRKY62-kdに*M. oryzae*を噴霧接種し、6日後に病班数を測定した。NBにおける病班数とWRKY62-kd #24および#25における病班数の差について有意差を検定した。

B. B.BTH処理後のいもち病菌接種検定。NBおよびWRKY62-kdを30 μ M BTH で処理した後、*M. oryzae*を噴霧接種し、病班数を計測した。

各系統において10-22個体の平均値をSDと共に示した。

**はStudentの*t*-testで $p < 0.01$ を表す。

A



B

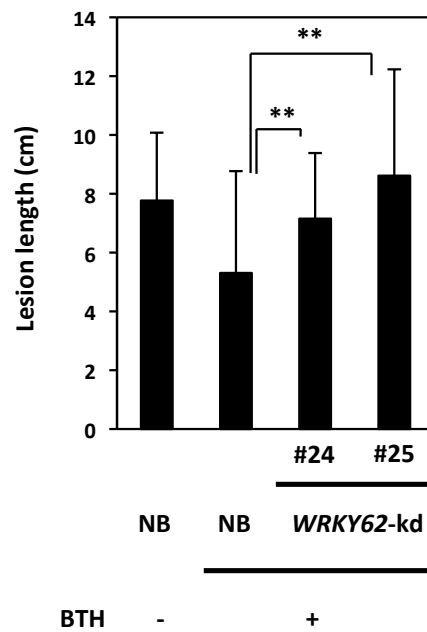


Figure 5. イネの白葉枯病抵抗性検定。

A. 白葉枯病菌接種検定。NBおよびWRKY62-kdにXooを剪定接種し、14日後の病班長を測定した。NBにおける病班長とWRKY62-kd #24および#25における病班長の差について有意差を検定した。

B. BTH処理後の白葉枯病菌接種検定。NBおよびWRKY62-kdを30 μ M BTH で処理した後、Xooを剪定接種し、病班長を計測した。

各系統において49-78個体の平均値をSDと共に示した。

**はStudentのt-testで $p < 0.01$ を表す。

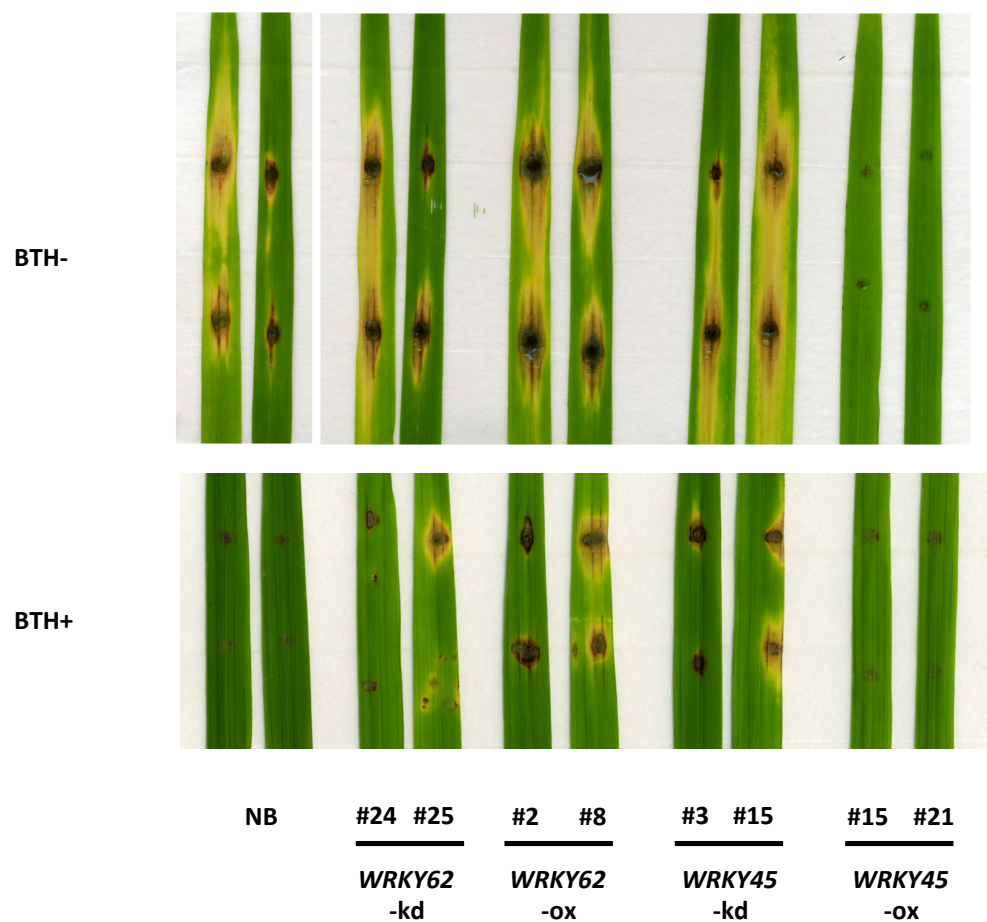


Figure 6. イネのいもち病抵抗性検定。

NB、*WRKY62*-kd、*WRKY62*-ox、*WRKY45*-kd、*WRKY45*-oxに*M. oryzae*を滴下接種した。7日後(BTH-)または6日後(BTH+)の病徴を示す。

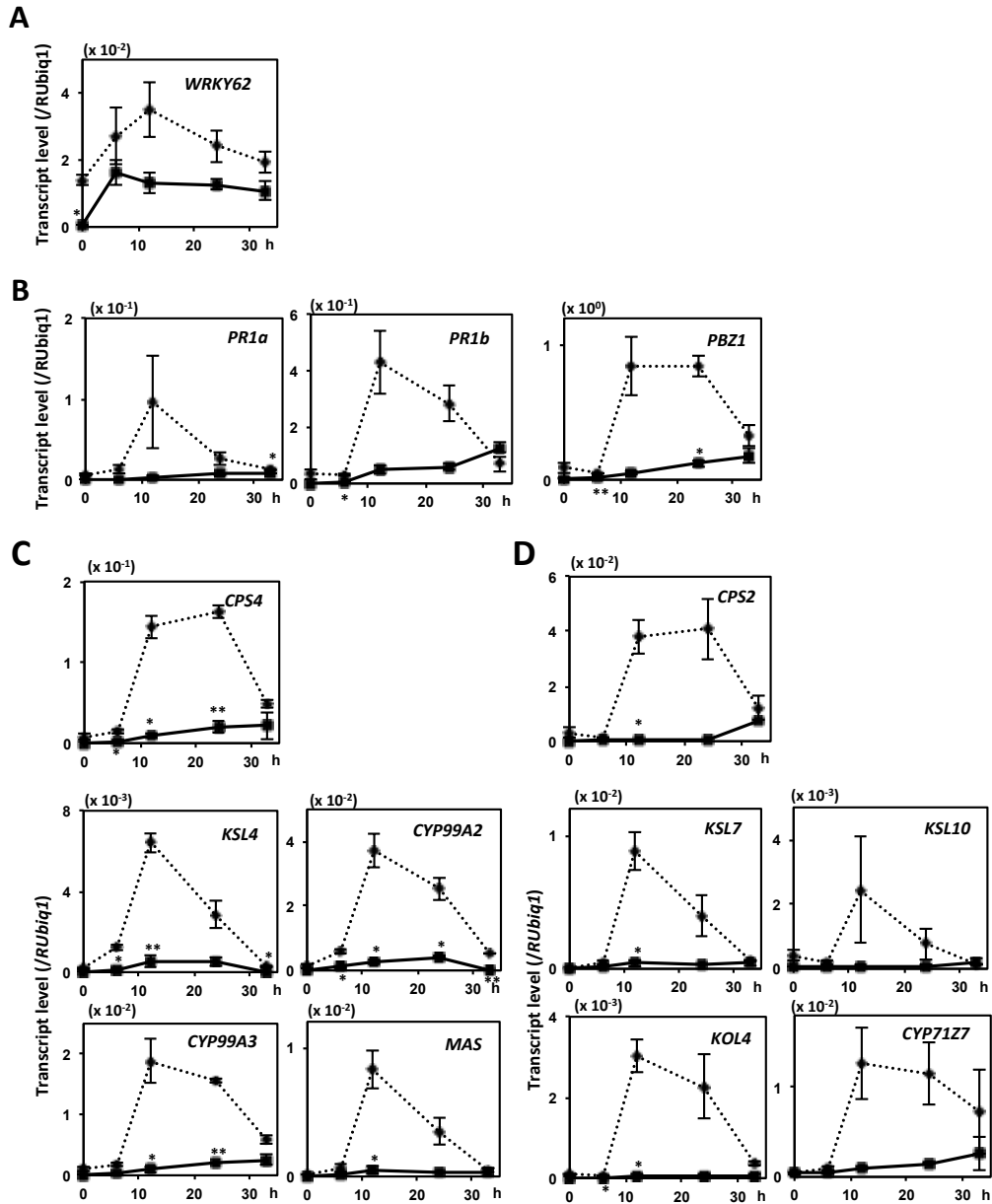


Figure 7. WRKY62はBTH処理により 病害応答関連遺伝子やDP合成遺伝子群の発現を正に制御する。NB (点線) およびWRKY62-kd (実線) におけるBTH誘導性遺伝子発現の経時変化。BTH処理後0、6、12、24、33時間後の植物を採取した。

A. WRKY62の発現。

B. Pathogenesis-Related遺伝子、PR1a、PR1b、PBZ1の発現。

C. モミラクトン合成遺伝子群の発現。

D. ファイトカサンおよびオリザレキシン合成遺伝子群の発現。

3個体を1サンプルにまとめ、各系統2サンプルずつの測定値の平均をSDと共に示した。Studentのt-testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

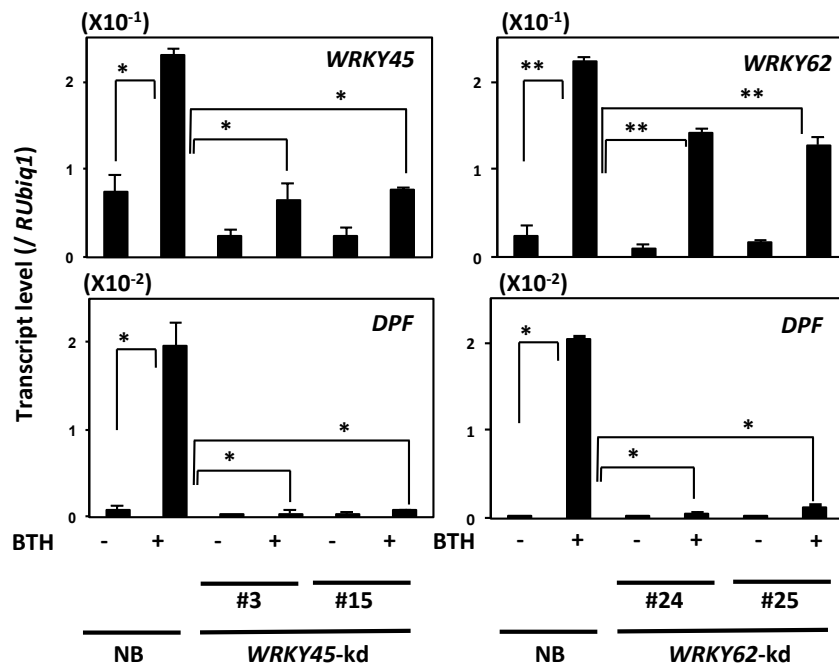


Figure 8. BTH処理したNBおよび *WRKY62-kd* における *DPF* 遺伝子の発現。
BTH処理後12時間後の植物をサンプリングした。3個体を1サンプルにまとめ、各系統2サンプルの測定値の平均をSDと共に示した。Studentの *t*-testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

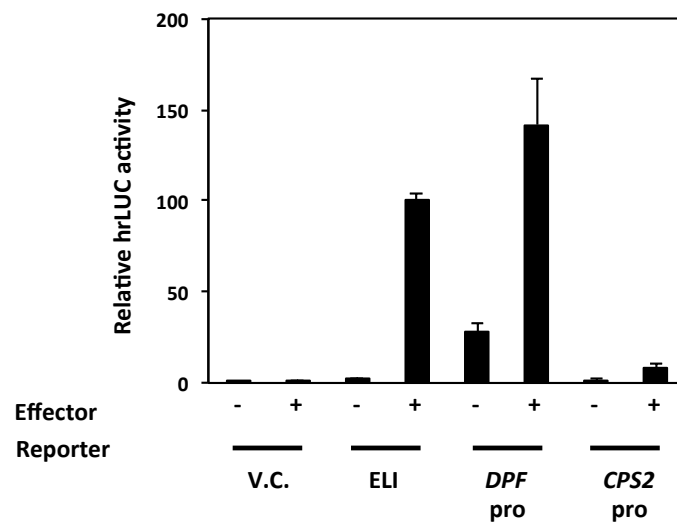


Figure 9. *DPF*および*CPS2*プロモーターに対する*WRKY45*の転写活性化能。
レポーター遺伝子として*DPF*遺伝子もしくは*CPS2*遺伝子上流配列および*ELI*配列を、エフェク
ター遺伝子として35S-*WRKY45*を、パーティクルボンバードメント法によりイネ葉鞘に導入した。
各処理区3サンプルのルシフェラーゼ活性の平均値をレポーター*ELI*における活性との相対値とし
てSDと共に示した。

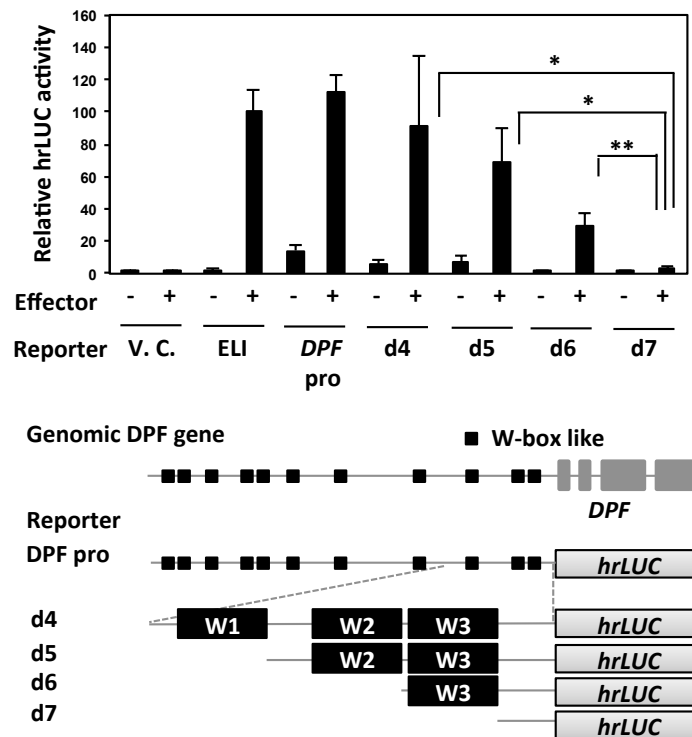


Figure 10. *DPF*プロモーターのW-box欠失に対するWRKY45の転写活性化能。
*DPF*遺伝子上流配列およびその欠失シリーズを含むレポーター遺伝子と、エフェクター遺伝子
 35S-WRKY45とを、パーティクルボンバードメント法によりイネ葉鞘に導入した。各処理区3サン
 プルのルシフェラーゼ活性の平均値をレポーター-ELIにおける活性との相対値としてSDと共に示し
 た。Studentのt-testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

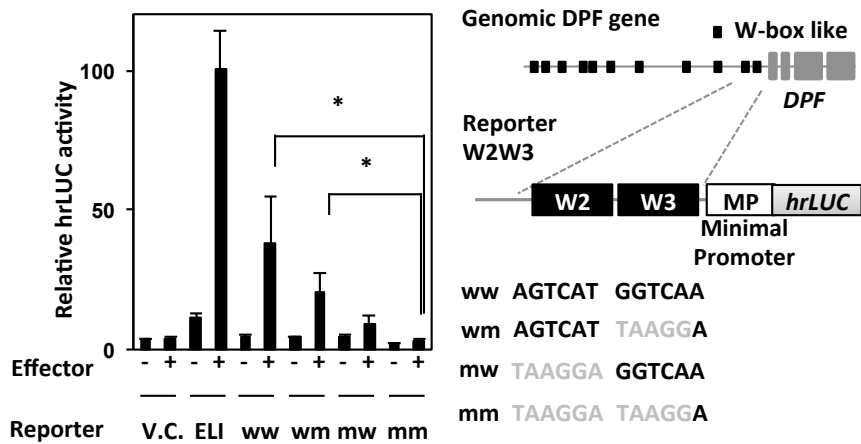


Figure 11. *DPF*プロモーター由来W-boxへの変異導入に対するWRKY45の転写活性化能。
W2W3およびその変異配列を含むレポーター遺伝子と、エフェクター遺伝子35S-WRKY45とを、イネ葉鞘にパーティクルボンバードメント法により導入した。各処理区3サンプルのルシフェラーゼ活性の平均値をレポーターELIにおける活性との相対値としてSDと共に示した。Studentの*t*-testで、*は $p < 0.05$ を表す。

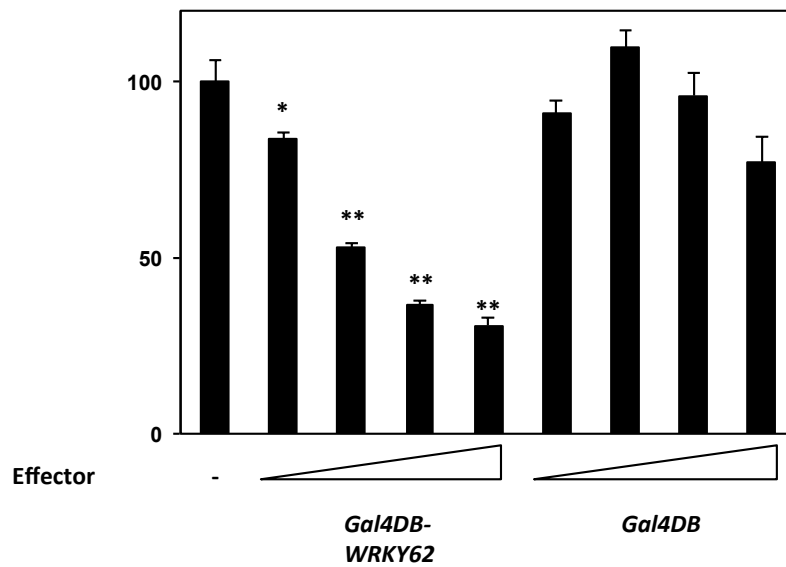


Figure 12. イネプロトプラストにおけるWRKY62の転写抑制活性。
レポーター遺伝子として35S-GAL4-TATA-LUCを、エフェクター遺伝子として、35S-GAL4DBおよび35S-GAL4DB-WRKY62を、エレクトロポレーションでイネプロトプラストに導入した。各処理区3サンプルのルシフェラーゼ活性の平均値をエフェクター非導入の測定値との相対値としてSDと共に示した。エフェクター非導入の測定値と比較したStudentの t -testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

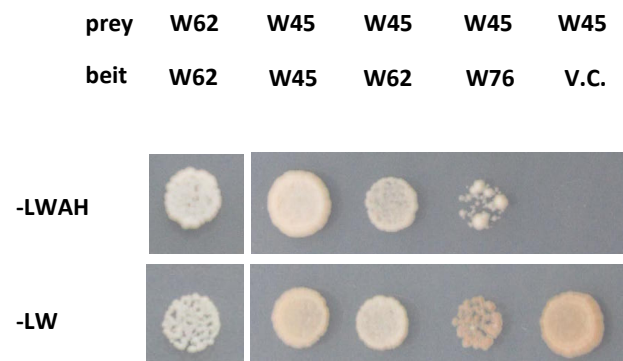


Figure 13. 酵母ツーハイブリッド法によるWRKY45およびWRKY62のタンパク質間相互作用解析。WRKY45のN末領域ペプチド、全長WRKY62およびWRKY76を用いてそれぞれのタンパク質間相互作用を解析した。上部のパネルはロイシン、トリプトファン、アラニン、ヒスチジンを欠損させたSD培地での酵母の生育により相互作用の有無を検定した。下部のパネルは、ロイシン、トリプトファンを欠損させたSD培地により形質転換の有無を検定した対照実験区である。

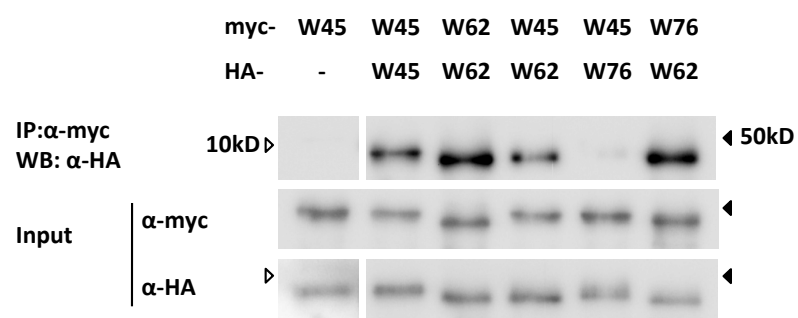


Figure 14. 共免疫沈降法によるWRKY45およびWRKY62のタンパク質間相互作用解析。
myc-タグおよびHAタグを付加した全長のWRKY45、WRKY62、WRKY76をそれぞれ小麦胚芽抽出液で発現させ、myc-WRKY45との相互作用を調べた。対照区として、HAペプチドのみを発現させ、myc-WRKY45との相互作用を解析した。

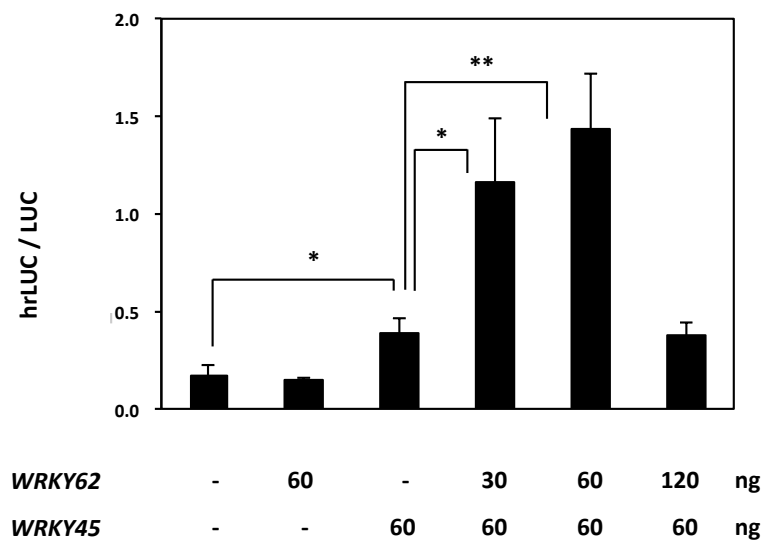


Figure 15. WRKY45とWRKY62の単独および両者共存による転写活性。
*DPF*遺伝子上流配列を含むレポーター遺伝子と、エフェクター遺伝子35S-WRKY45および35S-WRKY62とを、パーティクルボンバードメント法によりイネ葉鞘に導入した。各処理区3サンプルのルシフェラーゼ活性の平均値をSDと共に示した。Studentの*t*-testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

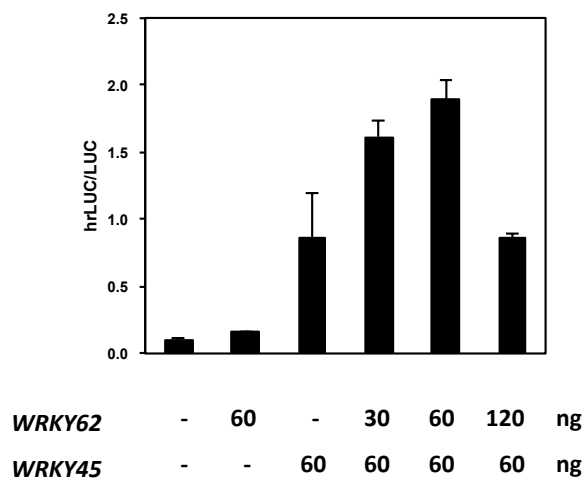


Figure 16. WRKY45とWRKY62の単独および両者によるW2W3領域を含むレポーター遺伝子に対する転写活性。
*DPF*遺伝子上流配列中の二つのW-boxのみを含む領域W2W3を含むレポーター遺伝子と、エフェクター遺伝子35S-WRKY45および35S-WRKY62とを、パーティクルボンバードメント法によりイネ葉鞘に導入した。各処理区3サンプルのルシフェラーゼ活性の平均値をSDと共に示した。

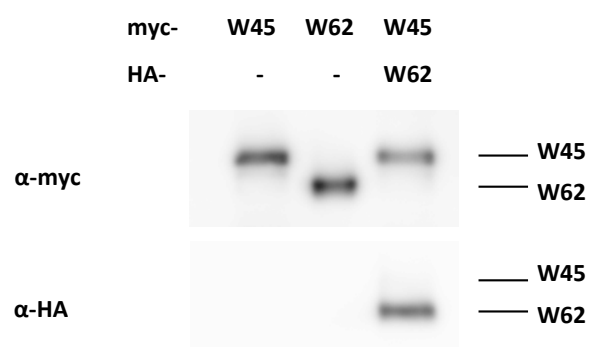


Figure 17. ウェスタンブロッティングによるWRKY45およびWRKY62の発現確認。
 Figure 18および19で用いた抗myc抗体カラムの溶出液を、抗myc抗体および抗HA抗体を用いて
 ウェスタンブロッティング法により解析した。

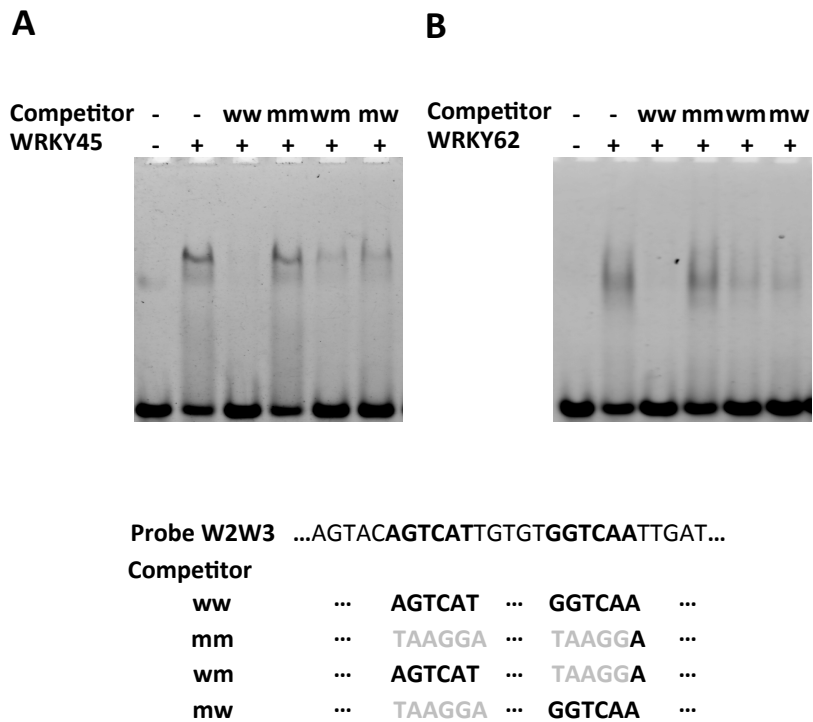


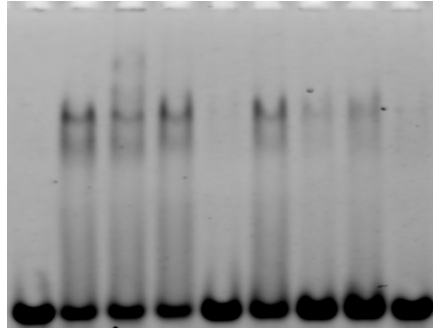
Figure 18. WRKY45とWRKY62のホモダイマーはどちらもDPFプロモーター由来の二つのW-boxに特異的に結合する。

A. WRKY45のゲルシフトアッセイ。myc-WRKY45とW2W3配列との結合を解析した。

B. WRKY62のゲルシフトアッセイ。myc-WRKY62とW2W3配列との結合を解析した。

プローブDNAに対し、20倍量のW2W3 (ww) およびその変異配列 (mm、wm、mw) をコンペティターとして用いた。

Antibody	-	-	myc	HA	HA	HA	HA	HA	HA*
Competitor	-	-	-	-	ww	mm	wm	mw	-
WRKY45-WRKY62	-	+	+	+	+	+	+	+	+



Probe W2W3	...AGTACAGTCATTGTGTGGTCAATTGAT...				
Competitor					
ww	...	AGTCAT	...	GGTCAA	...
mm	...	TAAGGA	...	TAAGGA	...
wm	...	AGTCAT	...	TAAGGA	...
mw	...	TAAGGA	...	GGTCAA	...

Figure 19. WRKY45-WRKY62ヘテロダイマーによるゲルシフトアッセイ。
myc-WRKY45とHA-WRKY62を共発現させ、抗myc抗体カラムで精製した後、その抽出液を用いてW2W3配列との結合反応を解析した。プローブDNAに対し、20倍量のW2W3 (ww) およびその変異配列 (mm、wm、mw) をコンペティターとして用いた。

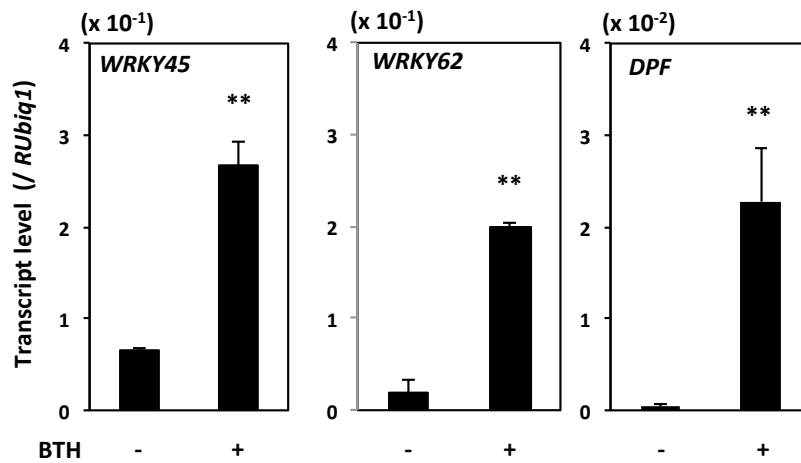


Figure 20. BTH処理後のNBにおける *WRKY45*、*WRKY62*、*DPF*遺伝子の転写物量の変化。BTH処理後12時間の植物をサンプリングし、qRT-PCRで解析した。3個体を1サンプルにまとめ、各処理区3サンプルの測定値の平均をSDと共に示した。BTH処理区における測定値をmock処理区と比較し統計計算した。Studentの*t*-testで、**は $p < 0.01$ を表す。

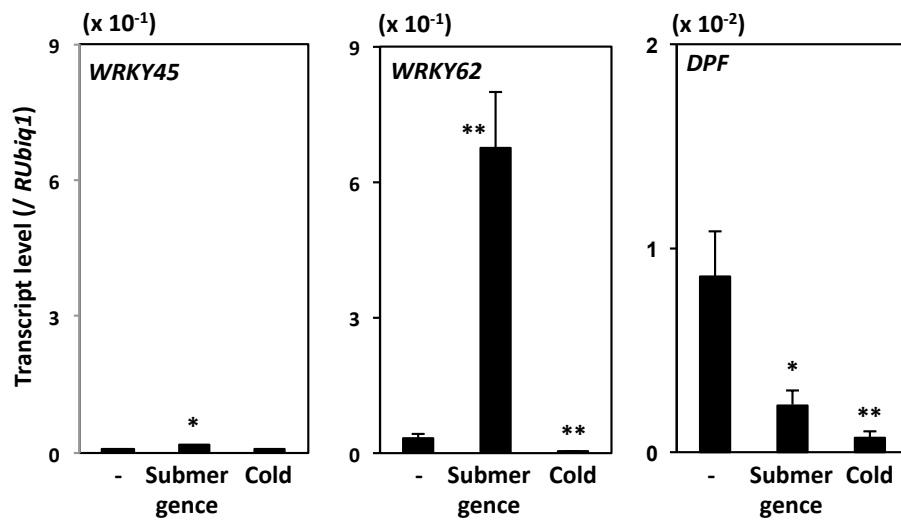


Figure 21. 冠水 (Submergence) もしくは低温 (Cold) 処理後のNBにおける *WRKY45*、*WRKY62* および *DPF* 遺伝子の転写物量の変化。
各処理後6時間の植物をサンプリングし、qRT-PCRで解析した。3個体を1サンプルにまとめ、各処理区3サンプルの測定値の平均をSDと共に示した。各処理区における測定値をmock処理区と比較し統計計算した。Studentのt-testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

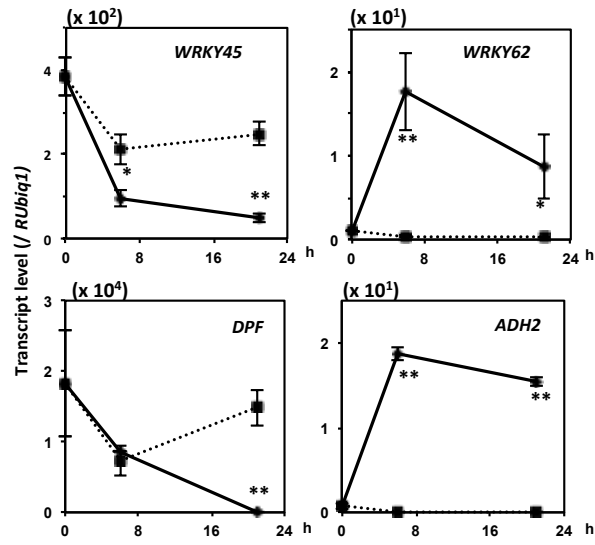


Figure 22. 窒素置換処理による *WRKY45*、*WRKY62* および *DPF* 遺伝子の転写物量の変化。NBを窒素置換処理（低酸素ストレス処理、実線）およびmock処理（点線）し、*WRKY45*、*WRKY62*、*DPF*の各遺伝子の転写物量の経時変化をqRT-PCRで解析した。3個体を1サンプルにまとめ、各処理区3サンプルの測定値の平均をSDと共に示した。Studentの*t*-testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

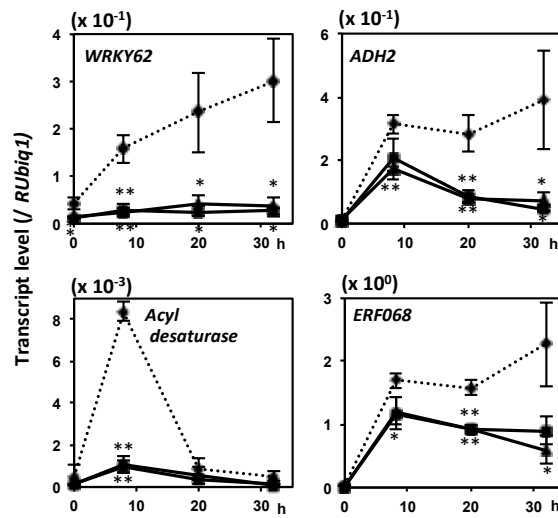


Figure 23.低酸素処理後のWRKY62による低酸素応答性遺伝子の制御の経時変化。
窒素置換処理後、0、8、20、32時間後の植物をサンプリングし、転写物量の経時変化をqRT-PCRにて測定した。NB（点線）およびWRKY62-kd（実線、▲ #24、■ #25）の結果を表す。3個体を1サンプルにまとめ、各処理区3サンプルの測定値の平均をSDと共に示した。Studentの*t*-testで、**は $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ を表す。

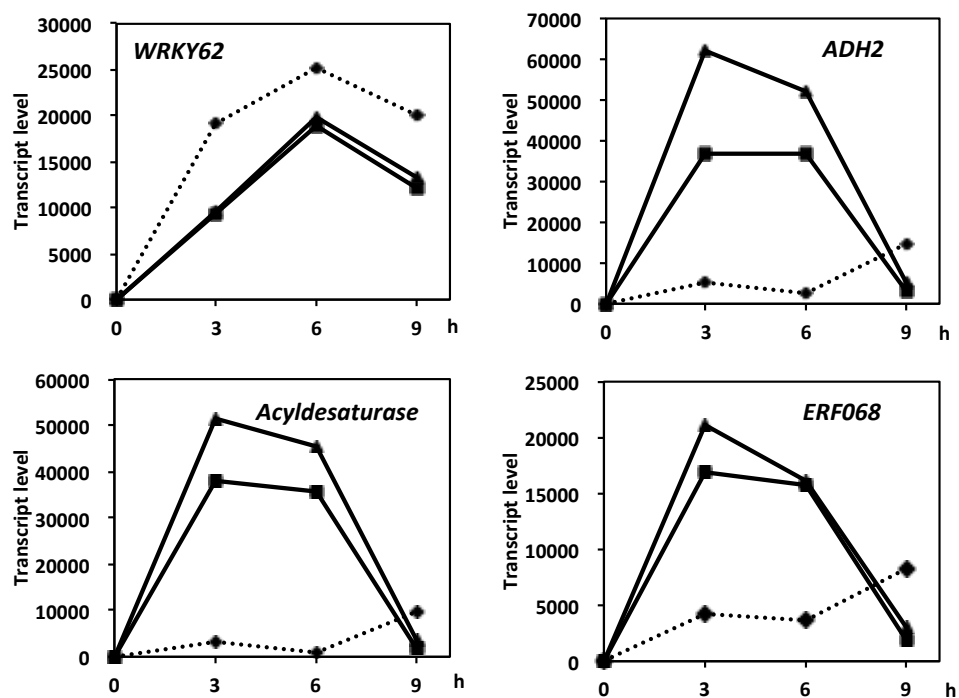


Figure 24. サリチル酸処理後のWRKY62-kdにおける低酸素応答性遺伝子の転写物量の経時変化。各系統の葉断片を1 mMサリチル酸溶液中に浸し、0、3、6、9時間後の植物を採取し、転写物量の経時変化をマイクロアレイ法にて測定した。NB (点線) およびWRKY62-kd (実線、▲ #24、■ #25) の結果を表す。5個体を1サンプルにまとめ、2サンプルの測定値の平均値を示した。

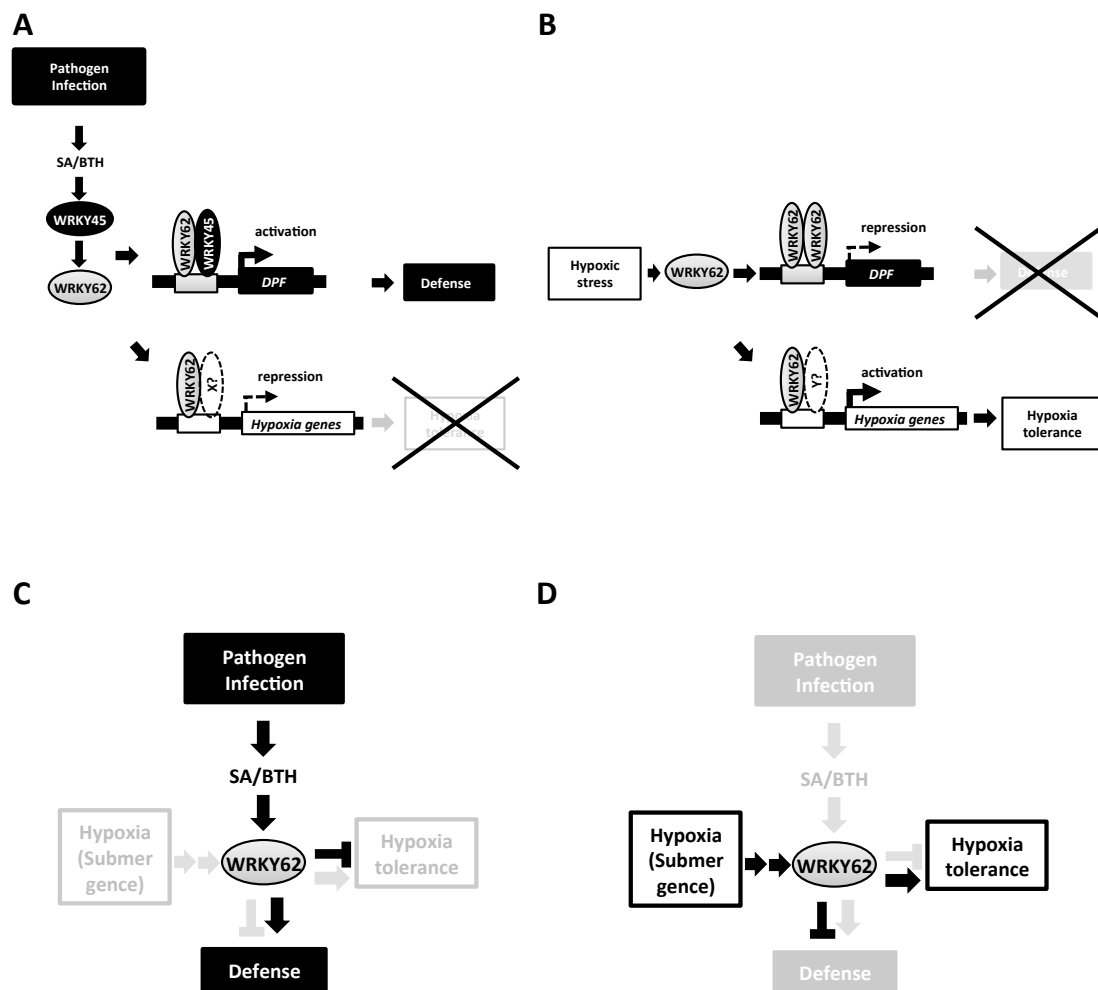


Figure 25. WRKY62の機能に関するモデル。

- A. サリチル酸経路が活性化されると, WRKY45-WRKY62 ヘテロダイマーが形成され, DPF等の病害応答遺伝子の転写が強力に活性化される。一方, 低酸素応答性遺伝子の発現はWRKY62により抑制される。この時, WRKY62はサリチル酸誘導性の未知の転写因子Xとダイマーを形成すると推測される。
- B. 低酸素ストレス条件下では, WRKY45ではなくWRKY62のみが生産されるため, WRKY62ホモダイマーが主に形成され, DPFの転写抑制および低酸素応答性遺伝子の転写活性化が起こる。この転写活性化には, 低酸素ストレス応答性でWRKY62と複合体を形成する未知の転写因子Yが関わりと推測される。
- C. 病原体感染時には, WRKY62が低酸素応答を抑制し, 病害応答を促進する。
- D. 低酸素ストレス条件下では, WRKY62が病害応答を抑制し, 低酸素ストレス応答を促進する。

Table 1. マイクロアレイ解析によるWRKY62依存のBTH誘導性遺伝子のリスト。

ProbeName	Accession	Description (Blue: DP genes, Red: Other genes analyzed in this paper.)	Fold Change		p-value	
			BTH+	BTH+/-	BTH+	BTH+/-
			NB/WRKY62-kd	NB	NB/WRKY62-kd	NB
Os2g0571100	AK072928	Terpene synthase, metal-binding domain containing protein. CPS2	56.138	108.337	0.002	0.003
Os01g0237500	AK110682	Hypothetical protein.	34.278	16.737	0.013	0.019
Os07g0136800	AK101929	Hypothetical protein.	31.775	21.841	0.005	0.005
Os07g0416900	AK070559	Omega-6 fatty acid desaturase, endoplasmic reticulum isozyme 2 (EC 1.14.19.-).	25.494	58.313	0.008	0.003
Os10g0439800	Os10g0439800	Cytochrome P450 family protein.	22.222	79.513	0.027	0.012
Os07g0417200	AK105371	Delta-12 oleate desaturase.	22.196	71.640	0.031	0.010
Os07g0635200	Cl392738	E-class P450, group I family protein.	18.654	32.314	0.036	0.021
Os07g0663700	AK104614	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR family protein.	17.963	48.970	0.006	0.007
Os06g0517700	Cl534914	Thionin Osth1.	17.836	12.307	0.016	0.029
Os02g0571900	AK101003	Cytochrome P450 family protein.	17.145	48.332	0.024	0.015
Os11g0587600	AK121517	PDR11 ABC transporter.	16.741	29.927	0.026	0.016
Os02g0570700	AK070167	Cytochrome P450 family protein. CYP71Z7	16.212	56.995	0.006	0.005
Os02g0570400	AB089272	Terpene synthase, metal-binding domain containing protein. KSL7	15.064	98.340	0.002	0.020
Os03g0803300	AK061608	Non-protein coding transcript, uncharacterized transcript.	14.564	9.914	0.013	0.016
Os06g0707300	AK101481	Cyclin-like F-box domain containing protein.	13.813	9.164	0.003	0.004
Os11g0582000	Cl201971	(No Hit)	13.630	69.456	0.014	0.028
Os07g0604100	Cl453930	(No Hit)	13.240	8.715	0.004	0.005
Os06g0313200	CB669700	SAM dependent carboxyl methyltransferase family protein.	13.173	30.937	0.008	0.004
Os06g0568600	AY660664	Ent-kaurene oxidase (EC 1.14.13.78) (AKO1) (Cytochrome P450 701A3). KOL5	12.713	25.431	0.024	0.008
Os04g0178400	AK071864	Cytochrome P450 CYP99A1 (EC 1.14.-.-) (Fragment). CYP99A3	12.674	32.734	0.012	0.013
Os11g0474800	AB118056	Terpene synthase-like domain containing protein. KSL8	12.436	32.912	0.010	0.012
Os04g0458600	AK106058	Non-cell-autonomous protein pathway2.	11.673	14.250	0.018	0.009
Os07g0451300	AK111468	Cytochrome P450 family protein.	11.426	57.265	0.021	0.006
Os06g0569500	AF088220	Ent-kaurene oxidase (EC 1.14.13.78) (AKO1) (Cytochrome P450 701A3). KOL4	10.126	55.975	0.000	0.004
Os04g0371000	Cl162628	Conserved hypothetical protein.	10.029	2.501	0.005	0.003
Os01g0209800	AK099094	Cationic amino acid transporter (Fragment).	9.882	8.367	0.001	0.022
Os07g0687400	AU101352	VQ domain containing protein.	9.840	67.900	0.024	0.007
Os09g0304400	AU096598	Conserved hypothetical protein.	9.814	8.836	0.040	0.007
Os04g0179700	AY347880	Terpene synthase. KSL4	9.651	47.538	0.035	0.024
Os11g0601700	AK068017	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein.	9.565	3.513	0.017	0.040
Os09g0368900	Cl474656	Protein of unknown function DUF630 domain containing protein.	9.214	6.112	0.033	0.048
Os04g0179100	Cl027926	Glucose/ribitol dehydrogenase family protein.	9.015	60.705	0.003	0.020
Os12g0555200	AK070762	Probenazole-inducible protein PBZ1 .	8.980	76.709	0.020	0.033

Os01g0196300	AK102964	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein. DPF	8.927	41.494	0.007	0.015
Os04g0178300	AY530101	Copalyl diphosphate synthetase (Fragment). CPS4	8.884	42.192	0.022	0.015
Os02g0569900	AK105913	Cytochrome P450 family protein.	8.787	25.818	0.004	0.002
Os02g0569400	AK060722	Cytochrome P450 family protein.	8.528	13.804	0.030	0.009
Os12g0555000	AK061606	Bet v 1 allergen family protein.	8.516	45.772	0.042	0.012
Os06g0323100	AK100029	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase.	8.270	35.645	0.007	0.018
Os04g0180400	AK071546	Cytochrome P450 CYP99A1 (EC 1.14.-.-) (Fragment). CYP99A2	8.221	46.537	0.003	0.027
Os06g0569300	C1419495	(No Hit)	7.781	21.990	0.019	0.019
Os03g0594100	AK1111441	Cytochrome P450 family protein.	7.542	9.450	0.037	0.007
Os08g0507100	AF488521	E-class P450, group I family protein.	7.510	25.674	0.015	0.025
Os04g0339000	Os04g0339000	Cytochrome P450 family protein.	7.356	21.457	0.012	0.004
Os04g0127500	AK102639	EGF-like calcium-binding domain containing protein.	7.334	8.683	0.024	0.030
Os12g0486900	AK109689	Protein kinase domain containing protein.	7.287	5.810	0.048	0.049
Os04g0179200	AK120852	Stem secololactin dehydrogenase (Fragment). MAS	7.187	43.036	0.048	0.027
Os02g0572000	AK105571	Conserved hypothetical protein.	7.092	6.215	0.024	0.021
Os07g0190000	AK100909	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 precursor. DXS3 (DXPS)	6.976	26.706	0.017	0.005
Os04g0664600	Os04g0664600	Agmatine coumaroyltransferase.	6.948	12.109	0.029	0.016
Os04g0104900	AK069960	Caffeic acid 3-O-methyltransferase (EC 2.1.1.68) (COMT) (CAOMT).	6.663	8.117	0.030	0.018
Os04g0162800	C1197491	(No Hit)	6.303	7.587	0.048	0.028
Os01g0727600	C1550945	(No Hit)	6.010	3.360	0.005	0.020
Os06g0322400	Os06g0322400	Hypothetical protein.	5.881	8.739	0.003	0.009
Os05g0278500	AK067851	Transferase family protein.	5.741	6.091	0.009	0.019
Os01g0382000	AK107926	Pathogenesis-related protein 1 precursor (PR-1b).	5.741	20.788	0.025	0.012
Os02g0529800	Os02g0529800	Cytochrome P450 family protein.	5.514	13.303	0.006	0.009
Os04g0288500	AK062593	Protein kinase domain containing protein.	5.498	6.320	0.014	0.025
Os10g0543500	AK106264	Mucin-like protein.	5.172	15.806	0.007	0.013
Os12g0431300	AK110931	Quinoprotein amine dehydrogenase, beta chain-like domain containing protein.	4.950	10.579	0.021	0.013
Os05g0145100	AK107957	Conserved hypothetical protein.	4.941	6.076	0.046	0.032
Os07g0683200	AK068606	NAC-domain containing protein 19 (ANAC019) (ANAC) (Abscicic-acid- responsive NAC).	4.837	3.129	0.036	0.030
Os11g0488100	C1197875	Hypothetical protein.	4.811	4.134	0.032	0.016
Os06g0548200	AK105176	FAD linked oxidase, N-terminal domain containing protein.	4.789	6.738	0.026	0.018
Os07g0116900	AK065960	Conserved hypothetical protein.	4.770	8.059	0.018	0.013
Os05g0104200	Os05g0104200	Disease resistance protein.	4.562	5.139	0.013	0.011
Os02g0546600	AK107852	AP2-domain DNA-binding protein.	4.525	3.377	0.010	0.047
Os07g0522500	AK105311	PDR6 ABC transporter.	4.516	7.415	0.039	0.028
Os07g0130200	AK068307	Protein kinase domain containing protein.	4.482	4.505	0.048	0.041
Os06g0599200	C1544445	Cytochrome P450 family protein.	4.419	3.883	0.011	0.010

Os03g0838400	AK100411	Ammonium transporter.	4.296	12.071	0.029	0.036
Os09g0357400	Os09g0357400	Disease resistance protein family protein.	4.238	2.251	0.003	0.007
Os06g0671300	AK108697	Cytochrome P450 family protein.	3.960	27.027	0.004	0.011
Os01g0628900	AK06213	Cytochrome P450 family protein.	3.950	10.960	0.041	0.027
Os04g0633200	Os04g0633200	S-locus glycoprotein family protein.	3.935	4.166	0.011	0.025
Os11g0453900	AK109096	Dehydrin RAB 16D.	3.920	5.016	0.010	0.006
Os01g0727700	CI209896	(No Hit)	3.894	2.450	0.032	0.033
Os10g0450900	AK064310	Glycine-rich cell wall structural protein 2 precursor.	3.844	6.744	0.040	0.023
Os06g0671600	AK111011	Non-protein coding transcript, putative npRNA.	3.755	30.406	0.010	0.050
Os12g0129700	AK068675	Cyclin-like F-box domain containing protein.	3.755	2.209	0.017	0.012
Os06g0147200	AK070059	Hypothetical protein.	3.717	8.790	0.032	0.013
Os01g0666000	AK070670	Lipid phosphate phosphatase 2 (EC 3.1.3.-) (AILPP2) (Phosphatidic acid phosphatase 2) .	3.709	4.721	0.013	0.002
Os03g0363100	Os03g0363100	ARM repeat fold domain containing protein.	3.552	3.802	0.017	0.017
Os10g0535800	CI542003	Conserved hypothetical protein.	3.513	13.313	0.035	0.030
Os08g0428200	A1311051	Typical P-type R2R3 Myb protein (Fragment).	3.501	4.167	0.031	0.029
Os03g0407900	AK068330	Protein kinase APK1B (EC 2.7.1.-).	3.470	3.514	0.045	0.034
Os01g0721400	AK063472	NB-ARC domain containing protein.	3.467	4.791	0.003	0.009
Os08g0174100	CI312431	Transferase family protein.	3.405	7.021	0.026	0.012
Os07g0635300	CI434094	E-class P450, group I family protein.	3.363	3.554	0.012	0.013
Os04g0438600	AK065524	Conserved hypothetical protein.	3.363	2.229	0.022	0.029
Os01g0214500	AK062484	Conserved hypothetical protein.	3.344	3.509	0.035	0.026
Os01g0930400	Os01g0930400	K+ potassium transporter family protein.	3.306	11.045	0.044	0.020
Os05g0576600	AK107732	Conserved hypothetical protein.	3.209	15.231	0.034	0.040
Os01g0159800	AK106292	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein.	3.061	2.099	0.042	0.013
Os02g0536500	AK073251	Conserved hypothetical protein.	2.954	6.000	0.003	0.016
Os06g0313500	CI428898	Hypothetical protein.	2.930	5.437	0.047	0.026
Os02g0718100	AK109216	Conserved hypothetical protein.	2.908	4.121	0.049	0.027
Os07g0124100	AK063647	Phytosulfolines 4 precursor.	2.803	2.360	0.022	0.013
Os08g0230800	CI560765	(No Hit)	2.798	4.195	0.012	0.003
Os08g0500400	AK111024	Conserved hypothetical protein.	2.795	3.770	0.007	0.023
Os02g0209400	AK108109	Conserved hypothetical protein.	2.788	7.305	0.034	0.027
Os08g0102800	AK120363	Conserved hypothetical protein.	2.771	2.499	0.044	0.039
Os09g0561000	CI447383	(No Hit)	2.768	3.060	0.031	0.033
Os01g0289600	CI551338	DNA-binding WRKY domain containing protein.	2.734	5.497	0.006	0.015
Os11g0106100	CI444008	CDPK substrate protein 1.	2.697	2.621	0.003	0.010
Os03g0326000	AK059185	Phospholipid-transporting ATPase 1 (EC 3.6.3.1) (Aminophospholipid flippase 1).	2.688	4.566	0.023	0.018
Os10g0485800	CI554302	(No Hit)	2.674	3.953	0.042	0.011

Os02g0649800	AK066861	Cytochrome b5 isoform 1.	2.667	5.576	0.007	0.006
Os02g0705400	AK070986	Pathogen induced protein 2-4.	2.660	5.749	0.036	0.013
Os07g0580900	AK121529	GGDP synthase. GGPS (GGPPS , GGDP synthase)	2.645	3.171	0.005	0.000
Os04g0531900	AK071069	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR family protein.	2.632	4.872	0.036	0.032
Os09g0532000	AK105810	Conserved hypothetical protein.	2.587	3.422	0.034	0.022
Os05g0399800	Cl466826	(No Hit)	2.568	17.441	0.023	0.039
Os11g0490900	AK108860	WRKY transcription factor 72.	2.544	5.265	0.045	0.029
Os07g0187900	AK062594	Nodule-specific protein-like.	2.520	3.566	0.006	0.003
Os07g0654700	Cl272657	(No Hit)	2.458	2.376	0.019	0.015
Os03g0179400	AK107046	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 264.	2.425	2.216	0.013	0.001
Os02g0465600	Cl562093	(No Hit)	2.416	2.574	0.007	0.006
Os06g0185300	Os06g0185300	Transferase family protein.	2.397	2.828	0.008	0.015
Os12g0468000	Cl315280	(No Hit)	2.394	2.017	0.034	0.049
Os07g0654400	Cl272657	BLE2 protein.	2.392	2.355	0.025	0.016
Os06g0482500	Cl124328	(No Hit)	2.389	4.767	0.021	0.001
Os06g0474800	AK099499	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain containing protein.	2.365	2.222	0.005	0.027
Os09g0320100	Cl124328	(No Hit)	2.338	4.520	0.033	0.002
Os06g0200800	AK111302	Conserved hypothetical protein.	2.332	5.217	0.006	0.006
Os11g0179100	Os11g0179100	Plant disease resistance response protein family protein.	2.325	2.893	0.040	0.026
Os07g0601100	AK062499	NADPH HC toxin reductase (Fragment).	2.316	2.242	0.031	0.028
Os02g0442000	Cl124328	(No Hit)	2.306	4.502	0.016	0.001
Os08g0111200	AK073257	Protein of unknown function DUF608 domain containing protein.	2.302	2.067	0.012	0.016
Os08g0111200	AK072300	Protein of unknown function DUF608 domain containing protein.	2.296	2.055	0.011	0.010
Os05g0335800	AK108393	TGF-beta receptor, type I/II extracellular region family protein.	2.288	2.521	0.039	0.049
Os06g0584400	AK072622	Hypothetical protein.	2.268	2.369	0.011	0.021
Os01g0926800	U88068	Cellular retinaldehyde-binding/triple function, N-terminal domain containing protein.	2.258	2.849	0.001	0.001
Os12g0635700	AK108161	Conserved hypothetical protein.	2.243	3.446	0.040	0.025
Os01g0639600	AK067056	Conserved hypothetical protein.	2.232	4.793	0.003	0.014
Os05g0459000	AK106756	C-myb-like transcription factor (Fragment).	2.220	5.688	0.011	0.008
Os05g0112800	AK108350	Pectin lyase-like family protein.	2.196	2.759	0.008	0.015
Os09g0547500	AK062595	Lysine decarboxylase-like protein.	2.189	2.782	0.016	0.002
Os05g0242000	AK107141	Plant protein of unknown function family protein.	2.181	5.031	0.029	0.033
Os01g0704100	AK109776	Membrane transporter.	2.149	2.726	0.026	0.014
Os04g0524600	AK069437	Oligopeptide transporter OPT superfamily protein.	2.128	2.761	0.010	0.026
Os11g0160900	Cl554347	(No Hit)	2.101	2.314	0.045	0.028
Os07g0493800	Os07g0493800	Protein kinase domain containing protein.	2.093	2.190	0.018	0.003
Os12g0464400	AK121922	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR family protein.	2.082	5.654	0.048	0.010

Os05g0530400	AK100412	Heat shock factor protein 1 (HSF 1) (Heat shock transcription factor 1) (HSTF 1), (No Hit)	2.068	5.670	0.004	0.042
Os05g0565900	CI250565		2.064	3.793	0.034	0.013
Os06g0614100	AK119909	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor domain containing protein.	2.042	2.048	0.012	0.019
Os03g0189600	AK061930	Alcohol dehydrogenase.	2.035	2.777	0.014	0.018
Os09g0419600	AK109320	Zn-finger, cysteine-rich C6HC domain containing protein.	2.010	5.926	0.048	0.012
Os11g0536800	AK102704	Amidase family protein.	2.010	2.126	0.042	0.029
Os05g0582200	Os05g0582200	Retrotransposon gag protein family protein.	0.490	0.270	0.030	0.007
Os10g0552800	AK062381	RCC3 protein.	0.486	0.348	0.025	0.028
Os04g0419900	AK110836	Protein kinase family protein.	0.451	0.391	0.037	0.020
Os07g0674100	AB183706	UDP-glucuronic acid decarboxylase.	0.434	0.396	0.027	0.025
Os09g0546300	Os09g0546300	Auxin responsive SAUR protein family protein.	0.388	0.350	0.029	0.018
Os07g0281200	AK121421	Conserved hypothetical protein.	0.388	0.259	0.042	0.046
Os01g0198900	AK099171	Conserved hypothetical protein.	0.385	0.258	0.017	0.045
Os03g0409600	CI432711	(No Hit)	0.348	0.403	0.037	0.032
Os06g0683800	AK110639	Hypothetical protein.	0.339	0.328	0.048	0.045
Os12g0541300	CI480228	Respiratory burst oxidase homolog.	0.313	0.396	0.035	0.050
Os12g0150200	AK064287	Cytochrome P450 family protein.	0.308	2.603	0.024	0.028
Os11g0154500	AK106277	No apical meristem (NAM) protein domain containing protein.	0.297	0.437	0.016	0.043
Os07g0422100	AK063592	AWPM-19-like family protein.	0.282	0.243	0.047	0.040
Os03g0843800	CI427545	Methyl chloride transferase.	0.092	0.045	0.004	0.001

Table 2. BTH および冠水処理によって誘導された *WRKY62* 遺伝子および *WRKY45* 遺伝子の転写物量の定量。Figure 20 および 21 で用いたサンプルについて、0.01 μ g 全 RNA あたりの *WRKY62* 遺伝子および *WRKY45* 遺伝子の mRNA のコピー数を qRT-PCR を用いて標準曲線法により定量した。3 個体を 1 サンプルにまとめ、各処理区 3 サンプルの測定値の平均を標準偏差 (SD) と共に示した。**は Student の *t* test で、 $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ をそれぞれ表す。

Treatment	Repeat	Copy#		WRKY62 /WRKY45	Mean	SD
		WRKY62	WRKY45			
BTH 0 μ M	R1	9,645	56,595	0.17	0.23	0.15
	R2	4,437	50,914	0.09		
	R3	23,717	53,221	0.45		
BTH 30 μ M	R1	158,256	290,285	0.55	0.59	0.04
	R2	127,358	218,723	0.58		
	R3	147,340	231,187	0.64		
-	R1	25,435	9,255	2.75	4.62	1.32
	R2	23,440	4,274	5.48		
	R3	15,048	2,675	5.63		
冠水	R1	114,736	2,704	42.44	40.66	2.02
	R2	145,669	3,850	37.84		
	R3	43,159	1,035	41.71		
低温	R1	2,716	4,920	0.55	0.37	0.18
	R2	1,836	4,420	0.42		
	R3	1,102	8,527	0.13		

Table 3. 窒素置換処理によって誘導された *WRKY62* 遺伝子および *WRKY45* 遺伝子の転写物量の定量。Figure 22 で用いたサンプルについて、0.01 μg 全 RNA あたりの *WRKY62* 遺伝子および *WRKY45* 遺伝子の発現 mRNA のコピー数を qRT-PCR を用いて標準曲線法により定量した。3 個体を 1 サンプルにまとめ、各処理区 3 サンプルの測定値の平均を標準偏差 (SD) と共に示した。**は Student の *t* test で $p < 0.01$ を、*は $p < 0.05$ をそれぞれ表す。

Time (h)	Oxygen	Rep.	Copy#	Copy#	WRKY62	Mean	SD
			WRKY62	WRKY45	/WRKY45		
6	+	R1	2,884	10,757	0.27	0.16	0.07
		R2	1,457	11,832	0.12		
		R3	775	7,808	0.10		
	-	R1	54,458	4,162	13.08	17.27	5.87
		R2	97,331	7,404	13.15		
		R3	77,869	3,046	25.57		
21	+	R1	1,943	12,792	0.15	0.13	0.04
		R2	1,037	15,423	0.07		
		R3	1,157	6,871	0.17		
	-	R1	7,494	557	13.44	19.13	6.45
		R2	20,952	744	28.14		
		R3	8,159	517	15.79		

Table 4: qRT-PCR 解析に用いたプライマーと解析した遺伝子の ID (RAP-DB)。

Locus ID	Gene	Forward	Reverse
Os06g0681400	<i>Rubiq1</i>	GGAGCTGCTGCTGTTCTAGG	TTCAGACACCATCAAACCAGA
Os09g0417800	<i>WRKY62</i>	ACCCCTACCCTAGAGCTTACTTCC	GACCTATCCTCCGCACATCTTT
Os05g0322900	<i>WRKY45</i>	TGTCACGTCCTCCCTGCACT	TCGTCCAGATCGAAGACAACC
Os01g0196300	<i>DPF</i>	CGCCTCGTGCAAACCTAAC	CACTGATGGCACCTCCCTTT
Os04g0178300	<i>CPS4</i>	TGGATTTGGAGATGCAGGAA	TGAGCAGTAGGCGACATAGCA
Os04g0179700	<i>KSL4</i>	ATGGGTTGCTGGTCAGGTAG	GTTCCAGCGTGGCATAAAAT
Os04g0180400	<i>CYP99A2</i>	GCGAGTGTTGACAACAAGA	GGCAACACTGGATTCAACCT
Os04g0178400	<i>CYP99A3</i>	CAACGGCGAGGAGAAAGAA	CACAGTCACACACATCCATCAAC
Os04g0179200	<i>MAS</i>	TACGTGAGCGGCCAGAA	GATGGAATGTCCTCGCAAAC
Os02g0571100	<i>CPS2</i>	CATTGCTCGCCCGAAAC	GCCATGCTGGTAGACACAACCTC
Os02g0570400	<i>KSL7</i>	TCATCAACGAGCCACTTCAAC	ACGACGACCATCCTCTACTCTCT
Os02g0570700	<i>CYP71Z7</i>	GCTGTTTCGTCTCCTCTCCA	ATGATGGGGCCGTGCTT
Os12g0491800	<i>KSL10</i>	CTTGCTGATGCCCCGAATG	CGCGATGTAGTTCTCCTTCTCTT
Os06g0569500	<i>KOL4</i>	CATGGACGAGAAGGTGTGG	TGAACTGCATGGTGTCTCCTCCT
Os07g0129200	<i>PR1a</i>	TCGTATGCTATGCTACGTGTTTATG	TCGGATTTATTCTCACCAGCA
Os01g0382000	<i>PR1b</i>	ACGGGCGTACGTACTGGCTA	CTCGGTATGGACCGTGAAG
Os12g0555500	<i>PBZ1</i>	GAGCCGCAGAAATGTCCAA	AGGCACATAAACACAACCACAAAC
Os01g0880800	<i>Acyl desaturase</i>	AAGCTGGAGACCCTGGAGACTG	CCTTCCTCTGCTCATCCTTCTT
Os11g0210500	<i>ADH2</i>	GGATGAGAAGTTTGAGGTTTTCC	AAGCCATGAAAGGAGGGAGT
Os01g0313300	<i>ERF068</i>	TGCTTCCCTCCCTTGTTT	CGGGATGTAGTCGTAGATGATTG

Table 5. プラスミド構築に用いたプライマー。

Name	Sequence
35S-GAL4DB-W62 F	CGGCCCGGGGATGGACGACGACGGCGACGGCTC
35S-GAL4DB-W62 R	GCCCTCGAGGCTACAAATGAACAGGAATGTGTG
pGL4.7-35Smp(-46) F	CTCGGCGGCCAAGCTTGCATGCGCGCCGCGATATCG
pGL4.7-35Smp(-46) R	CCGGATTGCCAAGCTGTAATTGTAAATAGTAATTGTA
pGL4.7-ELI F	TCGGCGGCCAAGCTTGGTCAGAAAGTCAGTCGTCGAGTTGGTCAGAAAGTCAGTCAGCTTGCATGCGCGG
pGL4.7-ELI R	CCGCGCATGCAAGCTGACTGACTTTCTGACCAACTCGACGACTGACTTTCTGACCAAGCTTGGCCGCCGA
pGL4.7-DPFpro F	CTCGGCGGCCAAGCTTTTGAGGCGGAAGGAATAGA
pGL4.7-DPFpro R	CCGGATTGCCAAGCTGGTAGCTAGGCAGTGAGCACATATC
pGL4.7-CPS2pro F	CTCGGCGGCCAAGCTTCCTTCGTTCCACACAAACTCC
pGL4.7-CPS2pro R	CCGGATTGCCAAGCTTTCGGCGTAGTAGCTCGGACT
pGL4.7-DPFd4 F	CTCGGCGGCCAAGCTTCAAGGAACATTTCCCAATTGTC
pGL4.7-DPFd4 R	CCGGATTGCCAAGCTGGTAGCTAGGCAGTGAGCACATATC
pGL4.7-DPFd5 F	CTCGGCGGCCAAGCTTATGCTAGTTGATCTGCACGCTG
pGL4.7-DPFd5 R	CCGGATTGCCAAGCTGGTAGCTAGGCAGTGAGCACATATC
pGL4.7-DPFd6 F	CTCGGCGGCCAAGCTTATTGTGTGGTCAATTGATCGAC
pGL4.7-DPFd6 R	CCGGATTGCCAAGCTGGTAGCTAGGCAGTGAGCACATATC
pGL4.7-DPFd7 F	CTCGGCGGCCAAGCTTGATCGACTGATCTGTTGCTCCCC
pGL4.7-DPFd7 R	CCGGATTGCCAAGCTGGTAGCTAGGCAGTGAGCACATATC
pGL4.7-MP F	CTCGGCGGCCAAGCTTAGACACTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTTGGAATCCGG
pGL4.7-MP R	CCGGATTGCCAAGCTGGAAGTCGAGCTTCCATTATATACCCTCTAGTGTCTAAGCTTGGCCGCCGAG
pGL4.7-DPFW2W3ww F	CTCGGCGGCCAAGCTTGTACAAGTCATTGTGTGGTCAATTGATCAAGCTTAGACACTAGA
pGL4.7-DPFW2W3ww R	TCTAGTGTCTAAGCTTGATCAATTGACCACACAATGACTTGTACAAGCTTGGCCGCCGAG
pGL4.7-DPFW2W3wm F	CTCGGCGGCCAAGCTTGTACAAGTCATTGTGTTAAGGATTGATCAAGCTTAGACACTAGA
pGL4.7-DPFW2W3wm R	TCTAGTGTCTAAGCTTGATCAATCCTTAACACAATGACTTGTACAAGCTTGGCCGCCGAG
pGL4.7-DPFW2W3mw F	CTCGGCGGCCAAGCTTGTACATAAGGATGTGTGGTCAATTGATCAAGCTTAGACACTAGA
pGL4.7-DPFW2W3mw R	TCTAGTGTCTAAGCTTGATCAATTGACCACACATCCTTATGTACAAGCTTGGCCGCCGAG
pGL4.7-DPFW2W3mm F	CTCGGCGGCCAAGCTTGTACATAAGGATGTGTTAAGGATTGATCAAGCTTAGACACTAGA
pGL4.7-DPFW2W3mm R	TCTAGTGTCTAAGCTTGATCAATCCTTAACACATCCTTATGTACAAGCTTGGCCGCCGAG
35S-W62 F	CGGCTCGAGATGGACGACGACGGCGACGGCTC
35S-W62 R	CGGGGCGGCCCTACAAATGAACAGGAATGTGTG

Name	Sequence
pGBKT7-W62 R	GCAGGTTCGACGGATCCCTACAAATGAACAGGAATGTG
pGBKT7-W76 F	ACCTGCATATGGCCATGGAGGCCATGGACGCGGCGTGGCGCGGC
pGBKT7-W76 R	GCAGGTTCGACGGATCCCTAGAATTTCGGGCAGCTTCTG
pEU-myc F	ATGGAGCAAAAGCTGATCAGTGAGGAAG
pEU-myc R	ATATATGGATCCGATATCGAGCAGGTCTTCCTCCGAGATG
pEU-HA F	ATGGCGGCCGTGTACCCGTAC
pEU-HA R	ATATATGGATCCGATATCGGCCGGGGCGTAATCCG
pEU-myc-W45 F	GAAGACCTGCTCGATATCATGACGTCATCGATGTCGCC
pEU-myc-W45 R	ATATATGGATCCGATATCTCAAAAGCTCAAACCCATAA
pEU-myc-W62 F	GAAGACCTGCTCGATATCATGGACGACGACGGCGACGG
pEU-myc-W62 R	ATATATGGATCCGATATCCTACAAATGAACAGGAATGT
pEU-myc-W76 F	GAAGACCTGCTCGATATCATGGACGCGGCGTGGC
pEU-myc-W76 R	ATATATGGATCCGATATCCTAGAATTTCGGGCAGCTTCT
pEU-HA-W45 F	TACGCCCCGGCCGATATCATGACGTCATCGATGTCGCC
pEU-HA-W45 R	ATATATGGATCCGATATCTCAAAAGCTCAAACCCATAA
pEU-HA-W62 F	TACGCCCCGGCCGATATCATGGACGACGACGGCGACGG
pEU-HA-W62 R	ATATATGGATCCGATATCCTACAAATGAACAGGAATGT
pEU-HA-W76 F	TACGCCCCGGCCGATATCATGGACGCGGCGTGGC
pEU-HA-W76 R	ATATATGGATCCGATATCCTAGAATTTCGGGCAGCTTCT

Table 6. ゲルシフトアッセイに用いたプローブおよびコンペティターDNA。

Name	Sequence
W2W3wwF	AGTTGGCAAAAGCTAAGTACAAGTCATTGTGTGGTCAATTGATCGACTGATCTGTTGCTC
W2W3wwR	GAGCAACAGATCAGTCGATCAATTGACCACACAATGACTTGTACTTAGCTTTTGCCAACT
W2W3wmF	AGTTGGCAAAAGCTAAGTACAAGTCATTGTGTTAAGGATTGATCGACTGATCTGTTGCTC
W2W3wmR	GAGCAACAGATCAGTCGATCAATCCTTAACACAATGACTTGTACTTAGCTTTTGCCAACT
W2W3mwF	AGTTGGCAAAAGCTAAGTACATAAGGATGTGTGGTCAATTGATCGACTGATCTGTTGCTC
W2W3mwR	GAGCAACAGATCAGTCGATCAATTGACCACACATCCTTATGTACTTAGCTTTTGCCAACT
W2W3mmF	AGTTGGCAAAAGCTAAGTACATAAGGATGTGTTAAGGATTGATCGACTGATCTGTTGCTC
W2W3mmR	GAGCAACAGATCAGTCGATCAATCCTTAACACATCCTTATGTACTTAGCTTTTGCCAACT

謝辞

本研究に当たり、筑波大学生命環境科学科教授（国立研究開発法人 農業生物資源研究所 耐病性作物研究開発ユニット長）高辻博志博士には、終始御指導、御助言を賜りました。ここに謹んで厚く御礼申し上げます。

また、筑波大学生命環境科学科教授、松本宏博士、小松節子博士、春原由香里博士にはアドバイザー・コミティー教員および予備審査検討委員として、本稿作成に御指導、御助言を頂きました。謹んで御礼申し上げます。

農業生物資源研究所の森昌樹博士および菅野正治博士には、投稿論文の共同執筆者としてご参加頂き、実験材料を供与頂くと共に御指導、ご助言を賜りましたことに深く感謝いたします。

また、農業生物資源研究所、耐病性作物研究開発ユニット、中山明博士、井上晴彦博士、松下茜博士、後藤新悟博士、赤城文博士、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 高木優博士におきましては、本研究の実験材料を御供与頂くと共に、有用なご助言を賜りました。謹んで御礼申し上げます。

農業生物資源研究所 耐病性作物研究開発ユニットの研究員、研究支援者、研究補助員の皆さまには、研究活動全般にわたり多大なご支援を頂きました。深く感謝いたすと共に、厚く御礼申し上げます。