

和文題目：植物におけるジャスモン酸類の
受容体 COI-JAZ に関する研究

英文題目：Studies on jasmonate receptor
COI-JAZ in plants

帝京大学大学院理工学研究科
総合理工学専攻

2020 年度 博士課程進学

学籍番号： 20D101

氏 名： 稲垣 秀生

学 位 論 文 の 要 旨

帝京大学大学院理工学研究科 総合理工学専攻

2020 年度博士課程進学

氏 名 稲垣 秀生

指導教員 宮本 皓司

論文題名

植物におけるジャスモン酸類の受容体 COI-JAZ に関する研究

Studies on jasmonate receptor COI-JAZ in plants

研究の背景

植物は動物とは異なり自ら移動することができず、様々なストレスに対して独自の防御機構を獲得してきた。ジャスモン酸 (JA) は維管束植物において生長と防御応答を調節する植物ホルモンとして知られている。JA の活性型分子である (+)-7-*iso*-ジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile) の蓄積量が増加することで、受容体 COI1 に JA-Ile が受容される。すると、定常時はリプレッサーと MYC2 などの転写因子の機能を抑制していた JAZ と受容体複合体を形成する。そして、JAZ が分解されることで下流の転写因子が活性化し、JA 応答性遺伝子の転写が誘導される (Fig.1)。受容体である COI1 は、モデル植物であるシロイヌナズナでは 1 種のみがゲノムにコードされているが、主要穀物の 1 つであるイネ (*Oryza sativa*) では 3 種の COI ホモログ (*OsCOI1a*, *OsCOI1b*, *OsCOI2*) が存在する。しかし、イネにおける 3 種の COI の生理機能は詳細には解析されていない。そこで、本研究ではイネにおける COI-JAZ 受容体の機能解析を行った。

また、陸上植物の基部で分岐したコケ植物である苔類のゼニゴケにおいては JA の前駆体である 12-オキソ-*cis*-10,15-フィトジエン酸 (OPDA) とその類縁体が活性分子として機能することが知られている。一方、コケ植物の蘚類においては COI-JAZ の下流のシグナル伝達機構の知見は少ない。そこで、イネと同じ抗菌性二次代謝産物の生産能を持つ蘚類ハイゴケ (*Calohyphnum plumiforme*) に注目して、JAZ-MYC2 間の相互作用解析を行った。

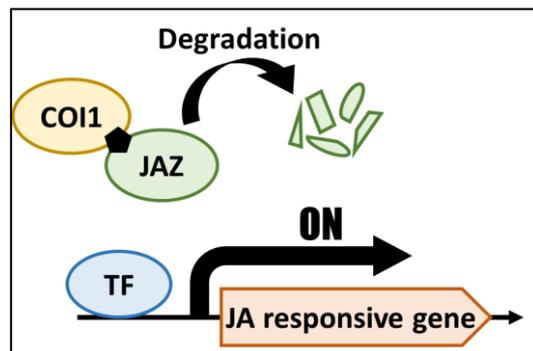


Fig.1 ジャスモン酸シグナル伝達のモデル

方法

イネ COI の生理機能の解析

アグロバクテリウム法を用いた CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集によって、日本晴野生型をバックグラウンドとして *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株を作出した。これら変異株をガラス温室において自然光で生育させて自殖させ、稔実率の測定を行った。次に、各変異株のリーフディスクに 500 μ M ジャスモン酸メチル (MeJA) で 72 時間処理を行った。その後、抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンを 80%メタノールで抽出し、その蓄積量を LC-MS/MS で定量した。また、JA を含む寒天培地に各変異株の種子を播種し、10 日間生育させた後の根と第二葉鞘の長さを測定することで伸長生長の抑制の評価を行った。

活性型 JA-Ile の精製と COI-JAZ 相互作用解析

Fonseca et al. (2009) と Takaoka et al. (2019) の方法を参考にして^{[1][2]}、4 種の構造異性体を含む JA-Ile から ODS カラムを用いた逆相 HPLC とシリカゲルカラムを用いた順相 HPLC によって、活性型である(+)-7-*iso*-JA-Ile を精製した。これをリガンドに用い、昆虫細胞で発現させた GST-OsCOI と人工合成した fluorescein (Fl) -OsJAZ ペプチドを混和して共免疫沈降した。このサンプルを SDS-PAGE でタンパク質を分離し、ウエスタンブロッティングに供して GST-OsCOI の化学発光を検出した。

OsJAZ2 および OsJAZ5 の生理機能の解析

トウモロコシユビキチンプロモーターの下流に OsJAZ2 および OsJAZ5 をそれぞれクローニングして、過剰発現用ベクターとした。これをアグロバクテリウム法によってイネへ導入し、過剰発現株を作出した。この植物体を用いて 500 μ M MeJA を 72 時間連続白色光下で処理した際のファイトアレキシン蓄積量の定量を行った。

ハイゴケ JAZ-MYC2 の相互作用解析

コムギ胚芽無細胞系によって発現させた FLAZ-CpJAZ と GST-CpMYC2 を用いて、「COI-JAZ 相互作用解析」と同様の手法で共免疫沈降と SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングを行った。

結果と考察

イネ COI の生理機能の解析

ゲノム編集によって作出した変異株について、T1 および T2 世代で変異がホモに導入されており、かつゲノム編集用に導入した外来遺伝子が脱落した個体の選抜を試みた。その結果、各ラインにおいてそれぞれ異なる変異が導入されたものが、*oscoi1a* 変異株では 2 ライン、*oscoi1b* 変異株では 3 ライン、*oscoi2* 変異株では 2 ライン取得しでき、これら植物体を用いて以降の解析を行った。

イネ *coi* 変異株における稔実率は、*oscoi2* 変異株でのみ顕著な低下を示した。*oscoi2* 変異

株における葯について卓上型電子走査顕微鏡によって観察を行うと、開花後に葯の開裂が起こっておらず、花粉が外へ放出されないことが分かった。次に、変異株のリーフディスクに MeJA 処理を行うと、*oscoi2* 変異株でのみファイトアレキシンの蓄積は顕著に抑制された (Fig.2)。JA を添加した培地にて変異株の種子を播種して生育させると、*oscoi2* 変異株では根の伸長生長の抑制が緩和したが、地上部の伸長生長は全ての変異株で抑制された。これらのことから、OsCOI2 は稔性と防御応答、地下部の伸長生長の抑制に関与することが分かった^[3]。一方で、3 つの COI すべてが地上部の伸長抑制に冗長的に関与し、地上部と地下部での抑制メカニズムが異なっていると共に、受容体の機能に差異があることも示された。

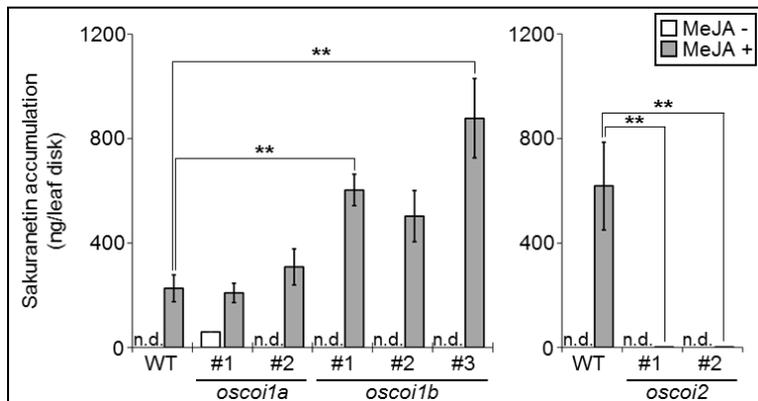


Fig.2 イネ *coi* 変異株のファイトアレキシンの蓄積量

活性型 JA-Ile の精製と COI-JAZ 相互作用解析

(+)-7-*iso*-JA-Ile をリガンドとし、OsJAZ2 と OsJAZ4、OsJAZ5 のペプチドとイネ COI との相互作用解析を行った。その結果、OsJAZ2 と OsJAZ5 は JA-Ile を介して OsCOI2 とのみ相互作用した (Fig.3)^[3]。一方、OsJAZ4 はすべての COI1 と相互作用することが分かった。OsJAZ2 と OsJAZ5 は、その他の JAZ と比較して COI1 結合ドメイン (Jas) のアミノ酸配列の保存性が低く、divergent Jas と呼ばれるドメインをもつ。Jas ドメインの構造の違いが COI1 との相互作用の選択性に関与することが考えられた。

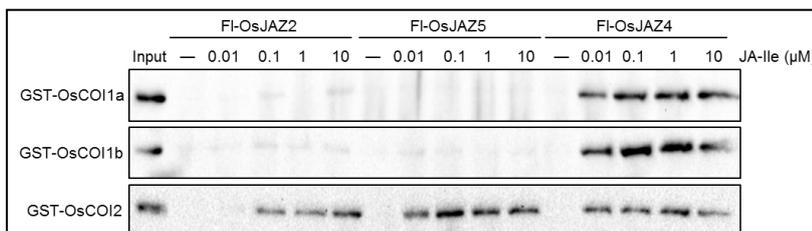


Fig.3 イネの COI1-JAZ 相互作用解析

OsJAZ2 および OsJAZ5 の生理機能の解析

過剰発現用ベクターへ OsJAZ2 と OsJAZ5 をクローニングし、それをアグロバクテリウム法により、日本晴野生型へと導入した。導入した *JAZ* 遺伝子が過剰発現していた植物体を用いて、MeJA 処理をした。その結果、*OsJAZ2* 過剰発現株ではファイトアレキシンの蓄積量は検出限界以下だった (Fig.4)。このことから、OsJAZ2 はファイトアレキシンの生産の抑制に関与

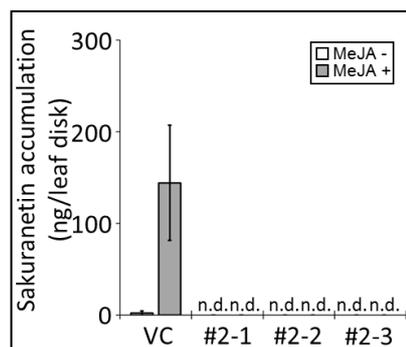


Fig.4 *OsJAZ2* 過剰発現株のファイトアレキシンの蓄積量

することが示唆された。一方で、*OsJAZ5* 過剰発現株を MeJA 処理しても、ファイトアレキシン蓄積量はベクターコントロール (VC) と同等の蓄積量であった。そこで、*OsJAZ5* の Jas ドメインを欠損させた *OsJAZ5 Δ Jas* を過剰発現させ、MeJA 処理をした。その結果、ファイトアレキシンの蓄積は顕著に抑制されることが分かった。これらのことから、*OsJAZ2* および *OsJAZ5* は JA 誘導的なファイトアレキシン生産を抑制する機能を持つことが明らかになった。また、*OsJAZ5* の Jas ドメインが *OsJAZ5* の機能の発現に関わることが示唆された。

ハイゴケ JAZ-MYC2 の相互作用解析

ハイゴケ JAZ-MYC2 のタンパク質間相互作用の解析を行うと、すべての JAZ と MYC2 の組み合わせで相互作用することが示された⁴。このことから、蘚類であるハイゴケにおいても、COI-JAZ-MYC2 を介したシグナル伝達機構が保存されており、防御応答の誘導において機能している可能性が考えられる。

総括と展望

本博士論文研究においては、イネとハイゴケにおける COI-JAZ を介したシグナル伝達機構の解明を行った。まず、イネでは *OsCOI2-OsJAZ2* と *OsCOI2-OsJAZ5* の受容体複合体が、JA 誘導的な防御応答や老化に関与することを示した (Fig.5)。また、*OsCOI2* が主要に関与する地下部の伸長抑制と稔性においてもこれらの JAZ が主要に関与し、3 つのイネ COI とその他の JAZ が地上部の伸長抑制に関与すると予想できる。そこで、今後は JAZ 過剰発現株を用いた稔性と地下部の伸長抑制の解析を行うことで、*OsCOI2-OsJAZ2* と *OsCOI2-OsJAZ5* の受容体複合体の生理機能の全容が明らかになることが期待できる。

次に、ハイゴケの JAZ-MYC2 の相互作用解析から、これらが物理的な相互作用をすることが示され、蘚類においても COI-JAZ-MYC2 を介したシグナル伝達機構が保存されていることが示唆された。今後は、ハイゴケの COI-JAZ のリガンドを同定することで、シグナル伝達機構の解明を進める必要がある。以上のように本博士論文研究は、陸上植物における JA 類の受容体の機能の解明に貢献した。

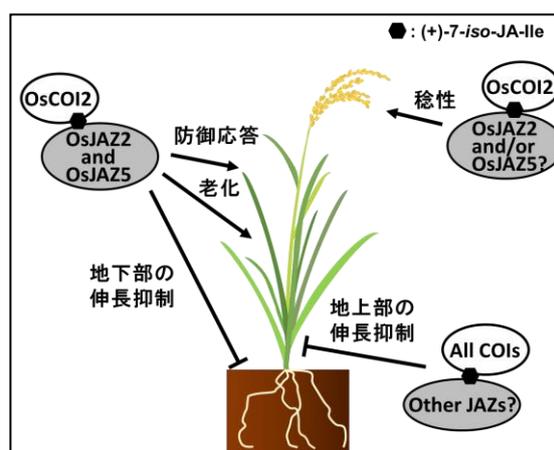


Fig.5 イネにおける JA の生理作用ごとのシグナル伝達機構のモデル

参考文献

- [1] Fonseca et al., *Nature Chemical Biology*, 5:344-350 (2009)
- [2] Takaoka et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 294:5074-5081 (2019)
- [3] Inagaki et al., *Plant & Cell Physiology*, doi:10.1093/pcp/pcac166 in press
- [4] Inagaki et al., *Frontiers in Plant Science*, 12:688565 (2021)

博士論文 目次

論文の内容の要旨

目次

略語表

第1章 序論	1
1-1 緒言	1
1-2 ジャスモン酸類とその生理作用	2
1-3 ジャスモン酸の生合成	3
1-4 ジャスモン酸のシグナル伝達	3
1-5 陸上植物における <i>COI</i> および <i>JAZ</i> のホモログ	4
1-6 イネにおけるジャスモン酸類の生理作用とシグナル伝達	6
1-7 蘚類におけるジャスモン酸類の生理作用とシグナル伝達	10
1-8 本研究の目的	11
第1章の図表	12
第2章 イネ <i>COI1</i> の機能解析	23
2-1 緒言	23
2-2 材料と方法	24
2-2-1 変異株の生育条件	24
2-2-2 ゲノム編集のターゲット領域のシーケンス解析	24
2-2-3 外来遺伝子の脱落したラインの選抜	26
2-2-4 二重変異株の作出	27
2-2-5 栄養成長期におけるイネ <i>COI</i> 変異株の成長の解析	27
2-2-6 出穂期における <i>oscoi2</i> 変異株における節間長の測定	27
2-2-7 イネ <i>COI</i> 変異株の稔性の解析	28
2-2-8 <i>oscoi2</i> 変異株ヘテロ個体の分離比の解析	28
2-2-9 ファイトアレキシン蓄積量の解析	28
2-2-10 qRT-PCR による JA 応答性遺伝子の発現解析	30
2-2-11 クロロフィル含有量の測定	32
2-2-12 JA を含む寒天培地での生育阻害実験	32
2-2-13 生理障害部位における MDA 蓄積量の定量	32
2-2-14 本章で扱った遺伝子の gene ID	34

2-3 結果と考察	35
2-3-1 イネ <i>COI</i> 変異株の作出と選抜	35
2-3-2 イネ <i>COI</i> 変異株の成長及び形態の観察	36
2-3-3 イネ <i>COI</i> 変異株の稔実率とヘテロ個体の分離比の解析	36
2-3-4 ファイトアレキシン蓄積量の解析	39
2-3-5 qRT-PCR による JA 応答性遺伝子の発現解析	39
2-3-6 JA 誘導性の老化の解析	40
2-3-7 伸長抑制の解析	41
2-3-8 <i>oscoi2</i> 変異株の生理障害部位における MDA の測定	42
第 2 章の図表	44
第 3 章 イネ COI-JAZ の相互作用解析	65
3-1 緒言	65
3-2 材料と方法	66
3-2-1 活性型ジャスモン酸イソロイシンの精製	66
3-2-2 共免疫沈降法によるタンパク質の相互作用解析	68
3-2-3 本章で扱った遺伝子の gene ID	70
3-3 結果と考察	71
3-3-1 活性型ジャスモン酸イソロイシンの精製	71
3-3-2 イネ COI-JAZ の共免疫沈降	71
第 3 章の図表	73
第 4 章 OsJAZ2 および OsJAZ5 の機能解析	83
4-1 緒言	83
4-2 材料と方法	84
4-2-1 大腸菌のコンピテントセルの作製	84
4-2-2 OsJAZ2 と OsJAZ5 の転写抑制能の解析	85
4-2-3 過剰発現用プラスミドの作製	87
4-2-4 過剰発現株の作出	88
4-2-5 過剰発現株のスクリーニングと導入遺伝子の発現量の解析	94
4-2-6 過剰発現株における JA 誘導的な表現型の解析	95
4-2-7 OsJAZ5 Δ Jas 過剰発現株の作出とその表現型の解析	95
4-2-8 過剰発現株の初期成育の測定	96
4-3 結果と考察	97
4-3-1 OsJAZ2 および OsJAZ5 の転写抑制能の解析	97
4-3-2 <i>OsJAZ2</i> および <i>OsJAZ5</i> 過剰発現株の作出	97

4-3-3 <i>OsJAZ2</i> 過剰発現株と <i>OsJAZ5</i> 過剰発現株のファイトアレキシン生産と老化の解析	98
4-3-4 <i>OsJAZ5ΔJas</i> 過剰発現株の作出と JA 誘導的な表現型の解析	98
4-3-5 イネ <i>JAZ</i> 過剰発現株の生理障害部位における MDA 蓄積量の定量	100
4-3-6 イネ <i>JAZ</i> 過剰発現株の初期成育の解析	100
第 4 章の図表	101
第 5 章 ハイゴケ JAZ-MYC2 の相互作用解析	115
5-1 緒言	115
5-2 材料と方法	116
5-2-1 コムギ胚芽無細胞系を用いたタンパク質の発現	116
5-2-2 共免疫沈降法による JAZ-MYC2 の相互作用解析	117
5-2-3 本章で扱った遺伝子の gene ID	117
5-3 結果と考察	118
第 5 章の図表	119
第 6 章 総合討論	121
第 6 章の図表	125
参考文献	130
謝辞	149

略語表

bHLH	Basic helix-loop-helix
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding sequence
CMID	Cryptic MYC2-interacting domain
CoA	Coenzyme A
COI1	Coronatine insensitive 1
cpm2	Coleoptile photomorphogenesis 2
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/ CRISPR associated proteins
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FLUC	Firefly LUC
gRNA	Guide RNA
GST	Glutathione <i>S</i> -transferase
HPLC	High performance liquid chromatography
HPT	Hygromycin phosphotransferase
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunoprecipitation
IP5	Inositol pentakisphosphate
JA	Jasmonic acid
JA-Ile	Jasmonoyl isoleucine
Jas	Jasmonate-associated
JAZ	jasmonate ZIM-domain
LC-MS/MS	Liquid chromatograph tandem mass spectrometry
LUC	Luciferase
MDA	Malondialdehyde
MeJA	Methyl jasmonate
mRNA	Messenger RNA
OD	Optical density
OPDA	12-oxo-phytodienoic acid
PCR	Polymerase chain reaction

PR	Pathogenesis-related
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptional- PCR
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RT	Retention time
RLUC	<i>Renilla</i> LUC
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PGE	SDS Polyacrylamide gel electrophoresis
T-DNA	Transfer-DNA
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UBQ	Ubiquitin
Y2H	Yeast-2-hybrid

第 1 章 序論

1-1 緒言

現在、世界人口の増加が続いており、それに比例するように食糧の需要も増加している。従来の農業は、化学農薬や化学肥料に頼ることで収量を増加させる方法が主であるが、今でもこの方法では十分な食糧を確保できない地域も存在する。さらに、人口増加に伴い耕地面積の減少が起り、化学農薬や化学肥料による環境への負荷も大きいため、今後も慢性的な食糧不足が容易に想像できる。そこで近年注目されている解決策のひとつに、「環境保全型農業」という考え方がある（平成 27 年度オーガニック・エコ農作物の理解増進方策に関する調査事業報告書 平成 27 年 12 月）。これは、植物が元から保有している病害抵抗性によって、農薬に頼らずに生育させる方法である。特に植物の病害抵抗性を制御するシグナル伝達機構の研究は、ここ 10 年で劇的な進歩を遂げており、多くの注目を集めている。この考えに基づき、ヨーロッパではアミノ酸やビタミン等によって病害抵抗性を活性化する、バイオステミュラント剤が大きな脚光を浴びている。また、この流れは日本にも浸透してきており、国内の農薬メーカーもバイオステミュラント剤に力を入れ始めているのが実状である。バイオステミュラント剤や様々なエリシターによる病害応答の誘導には、ジャスモン酸などの様々な植物ホルモンが関与する。ジャスモン酸は、防御応答と生長を制御するが、そのシグナル伝達機構についてはいまだ明らかになっていない点も多く残っており、早急に研究を進める必要のある課題のひとつであると考えられる。

1-2 ジャスモン酸類とその生理作用

ジャスモン酸 (JA) は 5 員環ケトンを持つオキシリピン類に含まれる化合物であり、ジャスミンの花の香りの成分としてメチルエステルの形で単離された (Fig.1-1)。生体内において、受容体と結合する活性型は、イソロイシンと縮合したジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) (Fig.1-1) である。これは高等植物において、植物ホルモンのひとつとして作用しており、特にストレス応答性の植物ホルモンとして機能する。植物が病害や虫害、紫外線を含む様々な環境ストレスを認識すると、生体内で JA が迅速に合成されることで、ディフェンシンや塩基性キチナーゼ、pathogenesis-related (PR) タンパク質と称される抗菌性タンパク質の生産、リグニンの生産誘導やファイトアレキシンの生産などの防御応答を誘導する (van Loon et al., 1994; Penninckx et al., 1998; Hamann et al., 2009; Yamane, 2013; Miyamoto et al., 2016)。

JA は茎葉と根の伸長生長の阻害作用も有している。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) にジャスモン酸メチル (MeJA) を外生的に処理することで、伸長生長の抑制が起こる (Staswick et al., 1992; Lorenzo et al., 2004)。さらに、種子の発芽や雄性生殖器官の形成や発達においても重要な機能を果たす (Yamane et al., 1980; Ellis et al., 2002)。JA 類の処理によって葉の老化が起こることも知られており、シロイヌナズナの JA-Ile 受容体変異株では、MeJA 処理によるクロロフィル含有量の低下が軽減したとの報告もある (Qi et al., 2015)。JA は防御応答と生長を制御するが、これらの trade-off について様々な植物ホルモンと相互作用しながら関与することが分かっている (Huot et al., 2014)。

JA の生合成前駆体である 12-オキソ-*cis*-10,15-フィトジエン酸 (OPDA) (Fig.1-1) も、高等植物において類似の生理作用を持つ例が示されている。さらに、OPDA が JA に変換されることなく、それ自身が植物のストレス応答を誘導する可能性が報告されている (Monte et al., 2020)。また、OPDA の外生投与によってシロイヌナズナの葉面積の減少や根の伸長が抑制されることが報告されている (Mueller et al., 2008; Zhang and Turner, 2008)。 *Bryonia dioica* の蔓の巻き付きの誘因活性が JA よりも高いなど、一部異なる生理作用を示す例もあり、JA とは異なる経路を活性化する可能性が高いがその全容は依然として未解明な部分が多い (Stelmach et al., 1999)。

JA 類の一種であるツベロン酸 (12-ヒドロキシ-JA; 12OH-JA) (Fig.1-1) は、ジャガイモの塊茎形成を誘導する物質として単離された (Yoshihara et al., 1989)。シロイヌナズナ葉身において傷害処理によってその内生量が増加する (Widemann et al., 2013)。JA-Ile の不活化誘導体だと考えられていた 12OH-JA-Ile は (Glauser et al., 2008; Miersch et al., 2008) (Fig.1-1)、近年ではアントシアニンの蓄積やトライコームの誘導など、JA-Ile と同様の活性を持つことが報告されており、*in silico* での結晶構造解析ではシロイヌナズナの JA-Ile 受容体である COI1-JAZ1 に結合しうる可能性も報告されている (Poudel et al., 2019)。

1-3 ジャスモン酸の生合成

植物が持つオキシリピンのひとつであるジャスモン酸は、葉緑体膜を構成する脂質に由来する α -リノレン酸から主に生合成される (Fig.1-2)。生物のおよび非生物的なストレスを認識すると、DAD1などのリパーゼの機能によって葉緑体のリン脂質や糖脂質から α -リノレン酸やヘキサデカトリエン酸が遊離する (Ishiguro et al., 2001)。 α -リノレン酸が lipoxygenase (LOX) によって過酸化されることで、13-ヒドロキシペルオキシリノレン酸 (13-HPOT) が生成される (Bell et al., 1995)。13-HPOT は allene oxide synthase (AOS) によってエポキシ化され、アレンオキシドへと変換される (Park et al., 2002)。さらに、allene oxide cyclase (AOC) によって OPDA に変換される (Hamberg and Fahlstadius, 1990)。一方で、ヘキサデカトリエン酸から dinor-OPDA が合成される。その合成酵素や環化酵素などは同定されていないが、AOS や AOC など同様の酵素が働いていると考えられている。

プラスチックで合成された OPDA と dinor-OPDA は、ペルオキシソームへと移行した後には 12-oxophytodienoate reductase (OPR) の作用で5員環の二重結合が還元され、3-オキソ-2-(*cis*-2'-ペンテニル)-シクロペンタン-1-オクタン酸 (OPC-8:0) と OPC-6:0 にそれぞれ変換される (Schaller et al., 1997a; Schaller et al., 1997b)。OPC-8:0 CoA thiolase 1 (OPCL1) によってアシル基に CoA が付加された OPC-8:0 は、acyl-CoA oxidase (ACX) と multifunctional protein (MFP)、3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT) による3回の β 酸化を受けて(+)-7-*iso*-JA が合成される (Cruz Castillo et al., 2004)。OPC-6:0 も ACX と MFP、KAT の酵素によって2回の β 酸化を受けて(+)-7-*iso*-JA が合成される。(+)-7-*iso*-JA は、7位の立体が熱力学的に安定なジアステレオマーである(-)-*trans*-JA に異性化する。

(+)-7-*iso*-JA は、GH3 酵素である jasmonate resistant 1 (JAR1) によってイソロイシンと縮合して、受容体と結合する活性型である(+)-7-*iso*-JA-Ile に変換される。JAR1 はゲノム上に複数コピーがコードされており、それらによって JA がバリンやロイシン、フェニルアラニンなどの様々なアミノ酸と縮合したのもも生体内に存在している (Staswick et al., 2004)。JA-バリンや JA-ロイシンは、伸長抑制と虫害への防御応答の誘導といった生理活性を有する (Fu et al., 2022)。JA-アミノ酸縮合体も7位の立体が反転した(-)-*trans* 体へと異性化する。(+)-7-*iso*-JA の一部は、メチル基がエステル結合することで MeJA となり、極性が低くかつ揮発性が高い性質を示す (Seo et al., 2001)。

1-4 ジャスモン酸のシグナル伝達

植物の生長と防御応答に大きな影響を及ぼす JA のシグナル伝達は、MYC2 タンパク質と jasmonate ZIM-domain protein (JAZ)、coronatine insensitive 1 (COI1) が中心的な役

割を果たすことが分かっている。特にシロイヌナズナでは研究が進んでおり、活性型 JA である JA-Ile の受容機構の詳細が明らかになりつつある (Li et al., 2021b)。

JA 応答のマスター転写因子として機能する MYC2 は、アブシジン酸シグナル伝達のレギュレーターとして機能解析が行われ、後に JA シグナル伝達においても機能することが明らかになった遺伝子である (Abe et al., 1997; Abe et al., 2003)。これは bHLH 型転写因子であり、プロモーター領域の G-box 配列 (5'-CACGTG-3') に結合する。生体内の JA-Ile 濃度が低い定常時では、JAZ-interaction domain (JID) を介して JAZ と物理的相互作用をする。その JAZ は、novel interactor of JAZ (NINJA) と TOPLESS (TPL) と結合し、このリプレッサーコンプレックスが MYC2 の標的遺伝子を抑制する (Chini et al., 2007; Pauwels et al., 2010)。

植物が傷害や病原菌感染などのストレスを受けると、生体内で JA-Ile 濃度が上昇する (Fig.1-3)。すると、JA-Ile は受容体である COI1 を含む E3 ユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{COI1} と結合する。この COI1 は、F-box タンパク質として suppressor of kinetochoreprotein 1 (Skp1) と足場タンパク質である Cullin、ring-box 1 (Rbx1) からなる複合体の構成因子のひとつであり、*Pseudomonas syringae* の生産する植物毒素であるコロナチンに対して非感受性を示すシロイヌナズナ変異株の原因遺伝子として単離された (Feys et al., 1994)。後に、pull down アッセイや yeast-2-hybrid 法 (Y2H)、結晶構造解析などによって、JAZ と COI1 が JA-Ile 受容体複合体として機能することが示された (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Katsir et al. 2008; Yan et al., 2009; Sheard et al. 2010)。COI1 と JAZ による JA-Ile の受容には、イノシトール 5 リン酸 (IP5) が補因子として重要な機能を果たす (Sheard et al., 2010)。JAZ は定常時は JA 応答のリプレッサーとして機能しており、JA 存在下で JAZ は SCF^{COI1} によってユビキチン化され、26S プロテアソーム系によって分解されることが分かっている (Thines et al., 2007)。シロイヌナズナでは JAZ は 13 種コードされており、JAZ1 は *Spodoptera exigua* の幼虫に対する虫害に関与すると報告されている (Chung et al., 2008)。JAZ3 はアントシアニンの蓄積やクロロフィルの分解に関与し、JAZ9 は *Alternaria brassicicola* に対する病害抵抗性に関与する (Boter et al., 2015; Takaoka et al., 2018)。この JAZ が分解されると、MYC2 はメディアーターコンプレックスと結合することで転写反応を開始する。この際、複合体のサブユニットのひとつである MED25 は、MYC2 の JID を介して相互作用しており、RNA ポリメラーゼ II との相互作用によって下流の JA 応答性遺伝子の転写を誘導すると考えられている (Chen et al., 2012; Zhai and Li, 2019)。また、下流の JA 応答性遺伝子には JAZ も含まれており、ネガティブフィードバック調節を受けることも分かっている。

1-5 陸上植物における COI および JAZ のホモログ

Fig. 1-4 に陸上植物における COI および JAZ の数を示した。陸上植物の基部で分岐した

苔類のモデル植物であるゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) においては、COI および JAZ ともに1つのみがゲノムにコードされている。このことから、陸上植物の共通祖先においては COI および JAZ が1つのみ存在し、進化の過程においてそれぞれの遺伝子が重複していったと考えられている (Monte et al., 2022)。コケ植物の蘚類であるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) やハイゴケ (*Calohypnum plumiforme*)、シダ植物であるイヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) においては、COI および JAZ ともに複数が存在する。しかし、双子葉類のモデル植物であるシロイヌナズナは、1種の COI と 13種の JAZ を保持している (Bai et al., 2011; Thireault et al., 2015) (Fig.1-4)。また、トマト (*Solanum lycopersicum*) やタバコ (*Nicotiana tabacum*) などにおいても COI は1つのみが存在している。一方、単子葉類のモデル植物であるイネ (*Oryza sativa*) は、3つの COI と 15種の JAZ を保持している (Ye et al., 2009; Lee et al., 2013)。また、トウモロコシでは6つの COI と 38種の JAZ が保存されている (Sun et al., 2021; Qi et al., 2022)。以上のように、植物種によって複数の COI を持つ植物と単一の COI を持つ植物が存在する。Fig.1-5 に COI の分子系統樹を示した。蘚類の COI は2系統に分かれており、蘚類の共通祖先の段階で COI の重複が生じたと考えられる。シダ植物であるイヌカタヒバの COI は単一のクレードに分類され、シダ植物の分岐以降に独自に重複が起きたことが示唆される。現生の被子植物において、最初に他と分岐したと考えられている *Amborella trichopoda* をはじめとする双子葉類は単一の COI を持つ。一方、単子葉類の COI は COI1 および COI2 の2つのクレードに分類され、単子葉植物の共通祖先において早い段階で COI の重複と分化が起きたと思われる。以上のように、植物の各系統によって、単一または複数の COI が存在しており、JA シグナルの制御機構が多様化していることが考えられる。

これまで COI の機能解析は双子葉類を中心に行われており、単子葉類における複数の COI の機能分化に注目した研究は少ない。世界ではイネをはじめ、コムギやトウモロコシ、ソルガムなど様々な穀物が生産されているが、その多くが単子葉類であり、複数の COI の生理機能の違いに注目した研究を行う必要がある。

さらに、植物の進化の過程で COI や JAZ の受容ポケットを構成するアミノ酸に変異が導入されることでリガンドが変わり、コケ植物では dinor-OPDA が、シダ植物以降では JA-Ile がリガンドとなった可能性が報告されている (Monte et al., 2022) (Fig1-6)。苔類のモデル植物であるゼニゴケでは、COI-JAZ のリガンドが JA-Ile ではなく、dinor-OPDA またはその異性体や Δ^4 -dinor-*cis*-OPDA (Fig.1-1) であることが明らかになっている (Monte et al., 2018; Kneeshaw et al., 2022)。このため、陸上植物の共通祖先においては dinor-OPDA が祖先的な植物ホルモンとして機能していたと予想されている。そして、コケ植物では COI1、JAZ、MYC2 といったシグナル伝達因子が保存されている。しかし、蘚類における COI および JAZ の機能やリガンドについては知見が不足している。蘚類の一種であるハイゴケは、抗菌性二次代謝産物であるモミラクトンを生産することが知られている (Nozaki et al., 2007; Okada et al., 2016; Li et al., 2020)。イネやイヌビエもモミラクトンを生産す

ることが知られており、系統的に離れた植物で同じ二次代謝産物を生産するように収斂進化したと考えられている (Mao et al., 2020)。このため、ハイゴケにおける JA 類のシグナル伝達機構を解析することで、陸上植物における化学防御物質の生産制御機構の進化の解明に貢献することが期待できる。

1-6 イネにおけるジャスモン酸類の生理作用とシグナル伝達

イネにおけるジャスモン酸類の生理作用

イネにおいては、JA 欠損変異株を用いてその生理作用の研究がなされてきた。JA 生合成遺伝子 *OsAOC* の変異株である *hebiba* や *coleoptile photomorphogenesis 2 (cpm2)* は、どちらも白色光下での発芽時に幼葉鞘が徒長する表現型を示す光形態形成に関与する変異株として単離された (Riemann et al., 2003; Riemann et al., 2013)。このことから、JA が幼葉鞘の伸長抑制などの光形態形成に関与することが報告されている。さらに、これらの JA 欠損変異株では、葉が捻じれた”*hebiba*”と呼ばれる形態が観察され、形態異常が起こることが知られている。これに加え、*cpm2* の花序が野生型よりも短いこと、内穎と護穎の間に野生型では観察できない異常な器官が生じること、内穎のみが徒長すること、開花後には穎が閉じない”*open husk*”と呼ばれる形態を示すことも報告されている (Riemann et al., 2013)。

また、*osjar1* 変異株では花の護穎の徒長と葯の形態異常が、JA シグナル伝達のリプレッサーの変異株では穎の形態異常と *open husk* が報告されていることから、ジャスモン酸が花の形態形成に重要な機能を果たすことが分かっている (Riemann et al., 2008; Xiao et al., 2014; Cai et al., 2014)。

さらに、JA 欠損変異株 *hebiba* や *cpm2* では、*Magnaporthe oryzae* の菌糸の侵入が促進され JA が病原菌に対する抵抗性に関与することが報告されている (Riemann et al., 2013)。JA によって抗菌性の PR タンパク質が発現することも分かっており、病害抵抗性に関与することが示された (Hashimoto et al., 2004)。防御応答に関与する抗菌性二次代謝産物ファイトアレキシンは、イネにおいてフラボノイド型のサクラネチンとジテルペン型のモミラクトン類、ファイトカサン類が主要なものとして知られており、その他にも様々な化合物がファイトアレキシンとして報告されている (Cartwright et al., 1981; Kodama et al., 1992; Koga et al., 1995; Koga et al., 1997) (Fig.1-7)。 *hebiba* や *cpm2* では *Magnaporthe oryzae* の感染によるサクラネチンの蓄積量が低下し、JA によって生産制御が行われると考えられている (Riemann et al., 2013)。

イネにおける JA-Ile 受容体 COI1 の機能

双子葉類であるシロイヌナズナのゲノム上には *COI* は 1 種コードされているが、単子葉類であるイネにおいては 3 種の *COI* (*OsCOI1a*, *OsCOI1b*, *OsCOI2*) がコードされてお

り、その他の単子葉類も複数の COI を有することが知られている。イネの 3 つの COI はその発現量に部位特異性はなく、公開されているマイクロアレイのデータベース RiceXpro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) でもその発現量に差がないことが分かっている (Sato et al., 2012; Lee et al., 2013)。シロイヌナズナ *coi1* 変異株を用いた相補実験では、OsCOI1a、OsCOI1b、点変異を導入した OsCOI2 のいずれかを導入することで、JA シグナル伝達が回復したことから、3 つのイネ COI はどれも JA-Ile 受容体として機能する (Lee et al., 2013)。イネ COI とコロナチンによる分子モデリングでは、OsCOI1a の 94 番目、OsCOI1b の 96 番目のアミノ酸残基がチロシンであるが、OsCOI2 と AtCOI1 ではフェニルアラニンになっており、リガンドの受容ポケットが広がっている (Lee et al., 2013)。また、RNAi 法によって OsCOI1a と OsCOI1b を同時に発現抑制した植物体では、JA 処理時の伸長抑制が緩和することや節間長が徒長すること、さらに 22°C ではいもち病菌に対する OsCOI1a と OsCOI1b を介した JA 応答による防御応答が誘導されなくなることから、OsCOI1a と OsCOI1b は伸長生長と防御応答に深く関与すると考えられている (Yang et al., 2012; Qiu et al., 2022)。

これに加え、OsCOI1a はコブノメイガによる虫害で発現量が増加し、発現抑制株では抵抗性が低下した (Ye et al., 2012)。土壌中に多く存在する元素であるケイ素の事前処理は通常プライミング効果によって抵抗性が上昇するが、コブノメイガに対するプライミングは OsCOI1a の発現抑制株では起こらず、虫害抵抗性の誘導が低下した (Ye et al., 2013)。このことから、コブノメイガに対するプライミングの誘導や防御応答には OsCOI1a が関与すると考えられている。さらに、世界中で広く使用されている除草剤の原体アトラジンに対してイネ科植物は耐性を持っているが、そのアトラジンの分解には OsCOI1a が中心的な役割を担う (Ma et al., 2021)。

OsCOI1b の非翻訳領域に T-DNA が挿入された変異株では、クロロフィル含有量の低下が抑制され稔実率も低下することから、老化促進と稔性には OsCOI1b が重要な機能を果たすと報告されている (Lee et al., 2015)。

イネにおける JA シグナル伝達系のリプレッサー JAZ の機能

JAZ は、花序分裂組織で発現する zinc-finger タンパク質 (ZIM) に特徴的なドメインと、jasmonate-associated (Jas) と呼ばれる JA-Ile の結合に関与するコンセンサス配列の両方を有するタンパク質であり (Vanholme et al., 2007; Yan et al., 2007)、イネにおいて 15 種がコードされている (Ye et al., 2009)。現在は ZIM ドメインを特徴付けるアミノ酸配列 (TIFY) の保存性が高いことから、TIFY ファミリータンパク質のひとつに数えられている。通常 TIFY を含む ZIM ドメインを介して NINJA や TPL とリプレッサーコンプレックスを形成するとともに、JAZ とホモもしくはヘテロダイマーを形成する。また、Jas ドメインは JA-Ile および COI1 と受容体複合体の形成に関与するとともに、MYC2 とも相互作用する重要なドメインである (Yan et al., 2007)。Ye et al. (2009) によるイネとシロ

イヌナズナの JAZ の分子系統解析の結果を Fig. 1-8 に示した。一部において bootstrap 値が低いものの、どのクレードでもイネとシロイヌナズナの双方の JAZ が含まれていた。このことから、被子植物の共通祖先の段階で JAZ が多様化していたことが考えられる (Fig.1-8)。イネの Jas ドメインは、通常 JAZ デグロン (X_2PXARR/KX) とコア配列 ($SLX_2FX_2KRX_2R$)、C 末端モチーフ (X_5PY) の 27 アミノ酸から構成される。また、シロイヌナズナ JAZ10.4 は、cryptic MYC2-interacting domain (CMID) と呼ばれる Jas モチーフ様のドメインが存在し、Jas ドメイン非依存的に MYC2 と相互作用することが報告されているが、イネの複数の JAZ においてもこの CMID ドメインを有することが分かっている (Moreno et al., 2013; Tian et al., 2019) (Fig.1-9)。

近年では、JA シグナル伝達機構の解明に向け JAZ に焦点が当てられており、その生理機能についても明らかになりつつある。イネの 15 種の JAZ のうち、JA シグナル伝達で機能することが報告されている JAZ について Table1-1 にまとめた。OsJAZ1 は、変異株の解析から、花の形態形成に関与し、さらに花序の発達に機能する転写因子の発現を制御する (Cai et al., 2014)。また、この Jas ドメインの、特に JAZ デグロンを構成するアミノ酸残基が、花の形態形成に関与することも報告されている (Tian et al., 2019)。さらに、OsJAZ1 は JA シグナル伝達と共にアブシジン酸シグナル伝達の制御をすることで、乾燥耐性を制御することも知られている (Fu et al., 2017)。

OsJAZ3 は、過剰発現株と変異株による解析から、OsbHLH148 の転写制御をしており、DELLA と相互作用することでジベレリン応答を促進し、JA とジベレリンのクロストークに関与する (Um et al., 2018)。サリチル酸シグナル伝達を介して誘導される PR 遺伝子の発現をする bHLH 型転写因子とも相互作用し、JA とサリチル酸のクロストークにも関与する可能性もあると考えられている (Wang et al., 2019)。OsJAZ4 は、NINJA と競合的に結合する因子と共に JA とブラシノステロイドとのクロストークに関与することが報告されている (He et al., 2020)。OsJAZ6 は、OsJAZ1 と共に JA が制御している花の形態形成に関与し、この発現量が花の発達の制御にも関わっている (Cao et al., 2021)。OsJAZ8 は、Jas ドメインを欠損させることでプロテアソームの分解を受けない OsJAZ8 を高発現する植物体による解析を行うと、この過剰発現株では JA 非感受性を示し、*Xanthomonas oryzae* の感染に抵抗性を示すとともに、イネの防御応答関連遺伝子の発現パターンが著しく変化したことが報告されている (Yamada et al., 2012)。これに加え、イネの JA による *Xanthomonas oryzae* への抵抗性には、揮発性物質であるリナロールの生合成を転写レベルで制御することで重要な役割を担っている (Yuan et al., 2008; Taniguchi et al., 2014)。このことから、OsJAZ8 が少なくとも *Xanthomonas oryzae* の感染に対して重要な因子として機能し、他の防御応答にも重要な役割を果たす機能を持つと考えられている。OsJAZ9 の過剰発現株を用いて塩ストレスと乾燥ストレスに対する抵抗性を示す報告もされている (Ye et al., 2009)。また、塩耐性に関与する遺伝子と共に bHLH 型転写因子と複合体を形成することから、OsJAZ9 は塩ストレスと乾燥ストレスを

制御するリプレッサーであることが分かっている (Toda et al., 2013)。OsJAZ11 は、無機リンのホメオスタシスを制御して根の伸長生長を制御し、種子サイズと花の発達の制御に関与する (Pandey et al., 2021; Mehra et al., 2022)。OsJAZ13 は複数のスプライシングバリエーションが存在し、それらが JA とエチレンの応答性遺伝子の発現を調節して生長を制御し、過敏性細胞死を活性化する (Feng et al., 2020)。

イネにおける JA シグナル伝達系に関与する転写因子

イネの JA シグナル伝達に関与する転写因子の報告について Table1-2 に概要をまとめた。シロイヌナズナと同様に、単子葉植物であるイネにおいても MYC2 のホモログである OsMYC2 がマスター転写因子として機能している。OsMYC2 の過剰発現株を用いた解析から、*Xanthomonas oryzae* に対する抵抗性を示し、28°Cでの *Magnaporthe oryzae* への抵抗性も示した (Uji et al., 2016; Qiu et al., 2022)。さらに葉の老化が著しく促進されたことから、JA による防御応答と老化促進は OsMYC2 を介して誘導されると考えられている (Uji et al., 2017)。また、OsMYC2 の発現抑制株を用いた RNA-seq の解析では、防御関連遺伝子の発現が低下していたことから、防御応答には OsMYC2 が重要な機能を果たすことが推測されている (Ogawa et al., 2017a)。OsMYC2 は胚軸の伸長と青色光による生長の制御に関与することも示されており、その機能は多岐にわたっている (Giri et al., 2017)。

OsMYC3/OsMYL1 は OsMYC2 のパラログであり、OsJAZ1 と OsJAZ3、OsJAZ5、OsJAZ6、OsJAZ7、OsJAZ8、OsJAZ9、OsJAZ11 と相互作用する (Li et al., 2021a)。また、OsJAZ8 と OsJAZ9 は OsMYC3/OsMYL1 の変異株において MeJA 処理後の発現誘導が抑制される (Li et al., 2021a)。この転写因子も、OsMYC2 と同様に COI-JAZ 受容体の下流で機能する転写因子として、防御応答の転写調節をする (Tan et al., 2022)。また、OsMYC2 と相互作用することで機能している可能性も考えられている (Ogawa et al., 2017a)。

bHLH 型転写因子である OsbHLH148 は、MeJA の外生投与や乾燥ストレス、塩ストレス、低温ストレスおよび傷害処理によって誘導される (Seo et al., 2011)。乾燥耐性に関与する遺伝子や OsJAZ1 の発現を制御する。また、OsJAZ1 と OsJAZ3 と強く相互作用し、OsJAZ2 と OsJAZ6、OsJAZ7 とは弱いながらも相互作用することが Y2H によって示されている。このため、JAZ と相互作用することで転写活性が抑制され、その下流にある JAZ によってネガティブフィードバック調節を受けていると予想され、OsMYC2 と同様に COI-JAZ 受容体のすぐ下流で機能する転写因子であると考えられる。

JA 処理によって早期に発現誘導を受ける遺伝子として、bHLH 型転写因子をコードする rice early responsive to jasmonate 1 (RERJ1/OsbHLH6) が単離されており、シュートの生長阻害に関与する (Kiribuchi et al., 2004)。RERJ1 遺伝子は傷害や乾燥ストレスによって転写が誘導され、傷害応答に対しては JA 依存的に発現が調節されることが報告され

ている (Kiribuchi et al., 2005; Miyamoto et al., 2013)。また、RERJ1 はサリチル酸シグナル伝達の調節を行うことで、病害抵抗性を制御することも報告されている (Meng et al., 2020)。また、モノテルペン化合物であるリナロールの生合成などの虫害抵抗性反応を誘導する。RERJ1 の下流で JAZ 遺伝子が発現誘導されること、OsMYC2 および複数のイネ JAZ と物理的に相互作用することから、RERJ1 も OsMYC2 と同様に COI-JAZ 受容体のすぐ下流で機能する (Valea et al., 2022)。

これら遺伝子だけでなく、イネの R2R3 型 MYB 転写因子である OsJAmyb/OsMYB21 も JA を介したストレス応答性遺伝子の転写調節を行う転写因子である (Yokotani et al., 2013)。塩耐性や活性酸素の除去、浸透圧調節などのストレス応答だけでなく、JA を介したストレス応答に関与する転写因子も JAmyb/OsMYB21 によって制御されている。JAZ と相互作用するかなどの知見がないが、JA を介した生物学的および非生物学的ストレス応答に関与していると予想される。

1-7 蕨類におけるジャスモン酸類の生理作用とシグナル伝達

ヒメツリガネゴケにおいて、*Pythium irregulare* や *Pythium debaryanum* といった卵菌類の一種であるカビに対して OPDA や JA を蓄積し、OPDA の内生量は 20 倍以上多く蓄積する (Oliver et al., 2009)。一方で、*Botrytis cinerea* の感染による JA 類の内生量を定量すると、OPDA の内生量は上昇したものの JA は検出限界以下であり、さらに MeJA 処理をすることで成長阻害が誘導された (Ponce De León et al., 2012)。それに対して、JA の外生投与ではヒメツリガネゴケの生長阻害を示さないとの報告もある (Luo et al., 2016)。このことから、ヒメツリガネゴケにおいて JA が内生に存在するのか、JA の生合成能を有しているのか、シグナル伝達がどのように行われているのかなど未知な点は多く残っているが、JA よりも OPDA の内生量が多く、9 位と 13 位の炭素が二重結合した異性体である *iso*-OPDA も多く含まれている (Mukhtarova et al., 2020) (Fig.1-1)。OPDA 処理後のプロテオーム解析では、光合成や代謝、タンパク質合成に関与するものの多くが抑制されており、ヒメツリガネゴケにおいて葉緑体の機能の調節に OPDA が関与する可能性も示されている (Toshima et al., 2014)。さらに、ヒメツリガネゴケは維管束植物と同様に、OPDA の生合成に機能する AOC や AOS のホモログが保存されていることが報告されている (Stumpe et al., 2010; Luo et al., 2020)。

ハイゴケにおいては、傷害処理をすることで OPDA と *iso*-OPDA、*dinor*-OPDA と *dinor-iso*-OPDA (Fig.1-1) と JA の内生量が増加する (Inagaki et al., 2021)。ハイゴケでは OPDA の方が *iso*-OPDA よりも 10 倍程度内生量が多く、*dinor*-OPDA と *dinor-iso*-OPDA は OPDA と *iso*-OPDA と比較してそれぞれ 10 倍程度内生量が少ない。さらに、JA は OPDA の 100 倍程度少ないごく微量しか検出されない (Inagaki et al., 2021)。受容体複合体の構成因子は、ヒメツリガネゴケは 4 種の COI と 8 種の JAZ がコードされているが、ハイゴケには 2

種の COI と 3 種の JAZ がコードされている (Monte et al., 2018; Inagaki et al., 2021)。

1-8 本研究の目的

以上に述べたように、植物における JA の受容シグナル伝達機構について様々な知見が蓄積している。しかし、COI-JAZ 受容体複合体を形成する組み合わせによる機能の違いについては未解明な点が多い。シロイヌナズナでは COI が 1 種、JAZ が 13 種あることから、これら 13 種の組み合わせによって JA の生理作用を制御していることが推察できる。一方で、イネでは COI が 3 種、JAZ が 15 種あることから、理論的に考えられる 45 通りの組み合わせのうち、どの組み合わせが生理作用に主要に関与するかを特定することが重要な課題である。これまでに RNAi 法による OsCOI1a と OsCOI1b の発現抑制株の解析は報告されているが、その実験では 2 種もしくは 3 種の COI が同時にサイレンシングされている可能性を排除できないため、OsCOI1a と OsCOI1b の個々の生理機能は未知であった。さらに、OsCOI2 については、イネ生体内における機能は明らかになっていなかった。

これに加え、イネと同様にモミラクトンの生産能を有するハイゴケでは、同じ蘚類のヒメツリガネゴケが OPDA の内生量が高く、かつ維管束植物と類似の生合成経路が保存されていることが明らかとなりつつある。収斂進化によってモミラクトンの生合成能を手に入れたと考えられるハイゴケでは、どのようなシグナル伝達によってその生合成が行われており、真の生理活性分子が何なのかなど、陸上植物の JA シグナル伝達の詳細を理解する上でその進化について理解することも重要だと考えられる。

そこで、本研究ではまずイネの JA-Ile 受容体複合体の機能を明らかにするために、以下の解析を行った。第 2 章においてゲノム編集によりイネの 3 つの COI の変異株を作成し、それぞれの機能解析を行った。第 3 章では共免疫沈降法による相互作用解析から、イネ COI と JAZ の間の相互作用の選択性について解析した。さらに、これらの結果から OsJAZ2 および OsJAZ5 に注目し、第 4 章において過剰発現株を用いた機能解析を行った。第 5 章ではハイゴケの JAZ-MYC2 の相互作用解析を行い、コケ植物においても JAZ と MYC2 による JA シグナル伝達の調節が行われているのかを調べた。

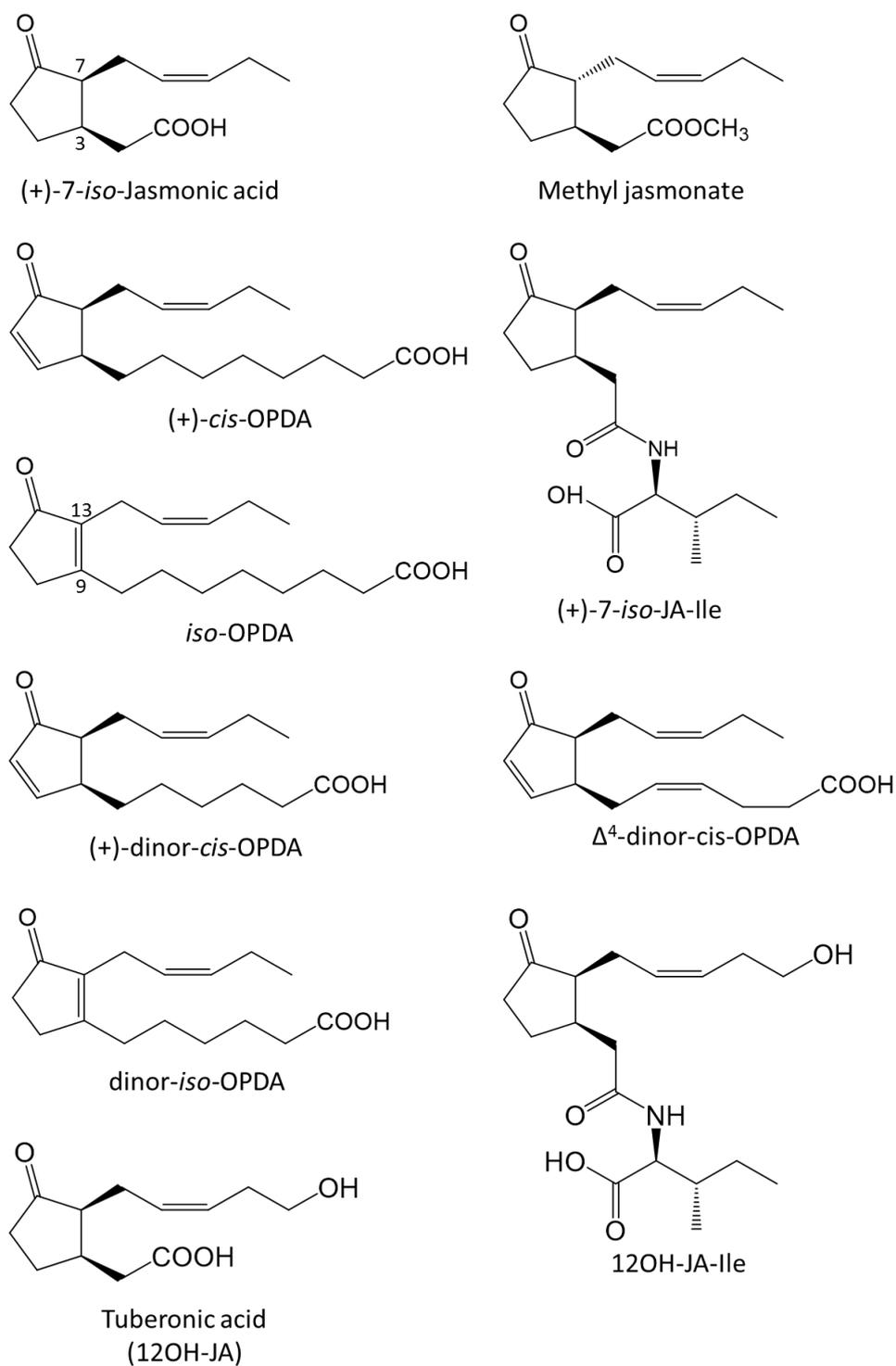


Figure 1-1 ジャスモン酸とその類縁体

様々な維管束植物やコケ植物の内生に存在することが知られている JA とその類縁体を示した。数字は脂肪酸の炭素の番号を示す。

OPDA: 12-oxo-phytodienoic acid

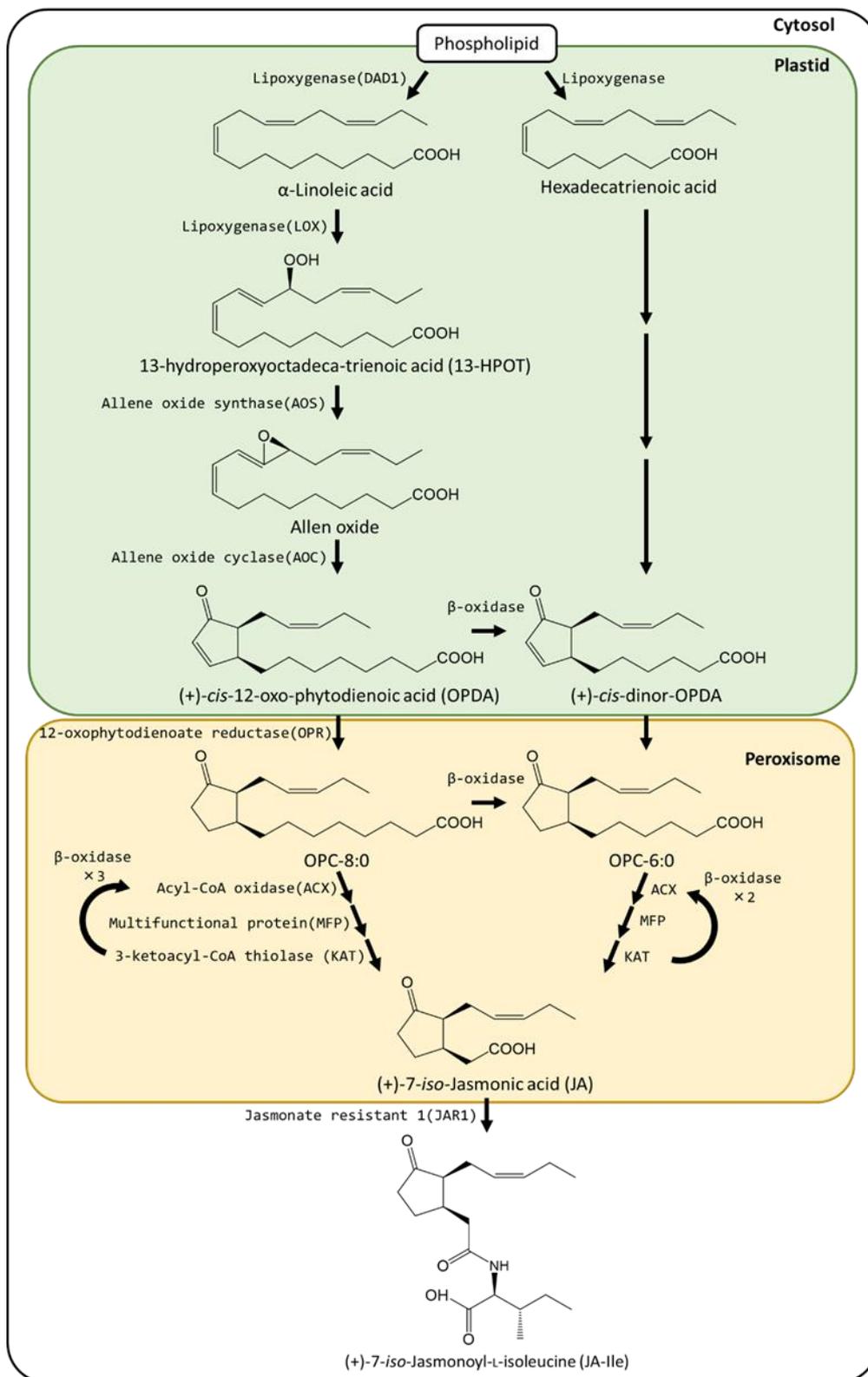


Figure 1-2 ジャスモン酸の生合成経路

リン脂質が様々な環化酵素や酸化還元酵素による変換を受けることで、JA が合成される。また、JA はイソロイシンと縮合して JA-Ile となる。

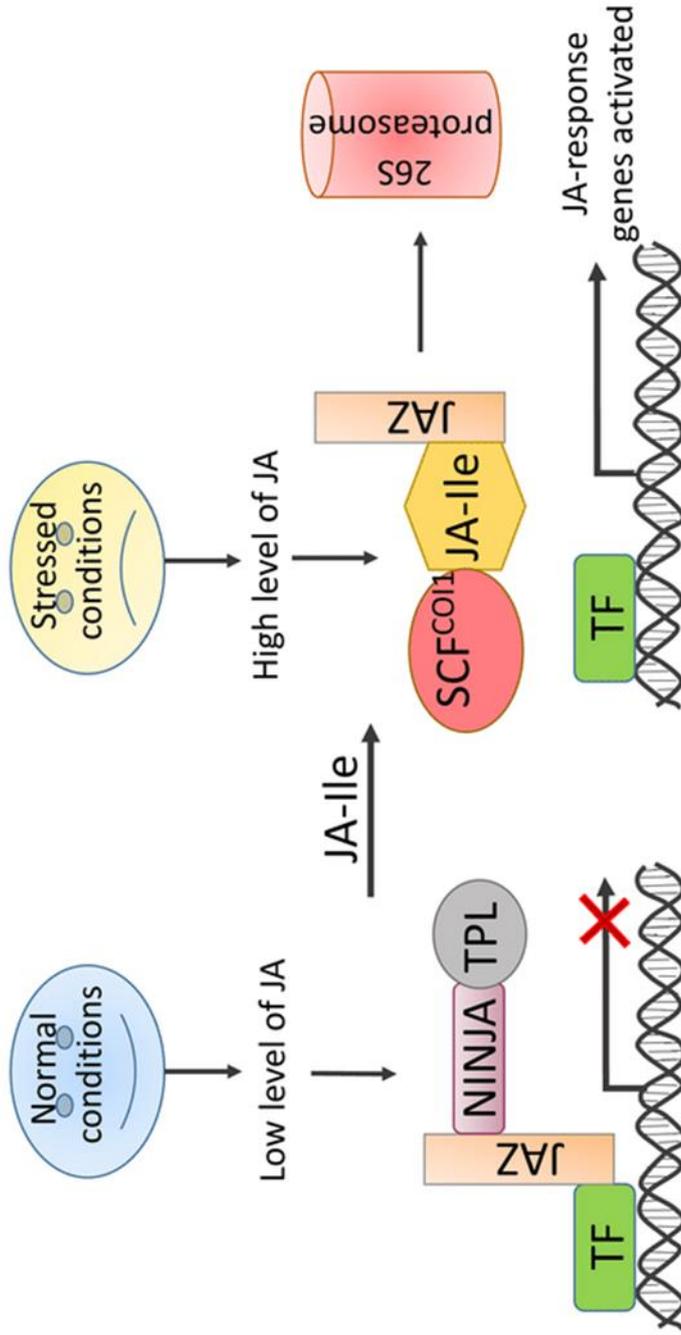


Figure 1-3 ジャスモン酸のシグナル伝達機構のモデル (Ullah et al. (2018)より引用)
 生体内の JA レベルが低いときは、JAZ と NINJA、TOPLESS からなるリプレッサーコンプレックによって転写が抑制されている。生体内の JA レベルが上昇すると、SCF^{COI1} と JAZ によって JA-Ile が認識されると、26S プロテアソームによる JAZ の分解を介して転写が誘導される。

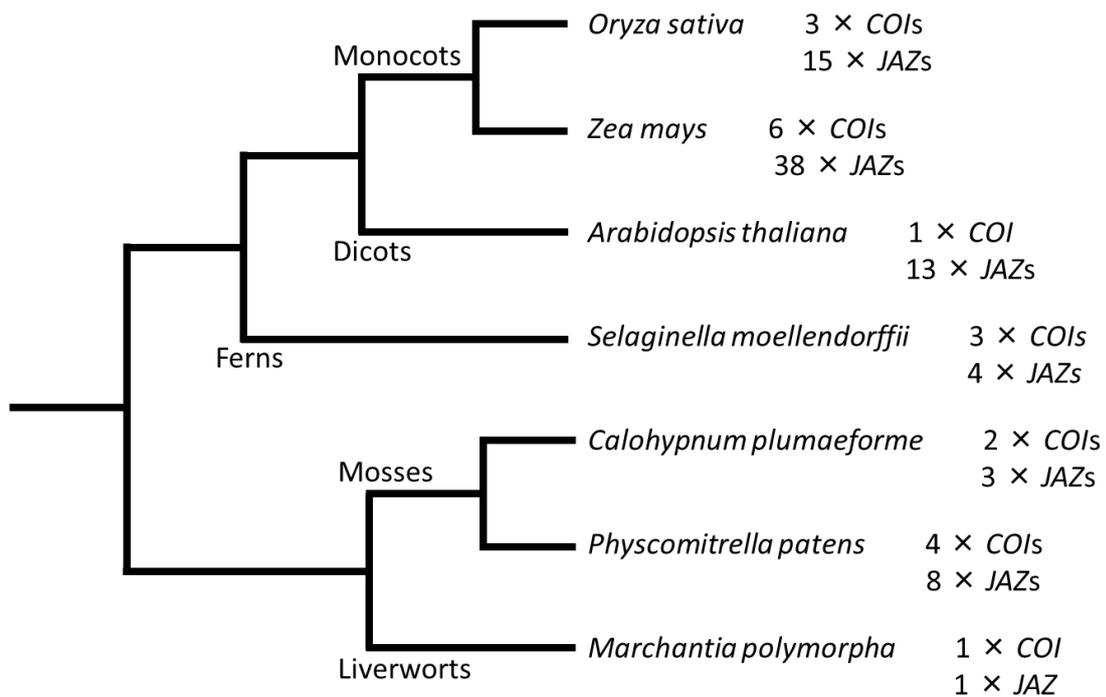


Figure 1-4 代表的な陸上植物における COI と JAZ の数

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) とヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、ハイゴケ (*Calohypnum plumaeforme*)、イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、イネ (*Oryza sativa*) における、現在明らかになっている COI と JAZ の数を示す。

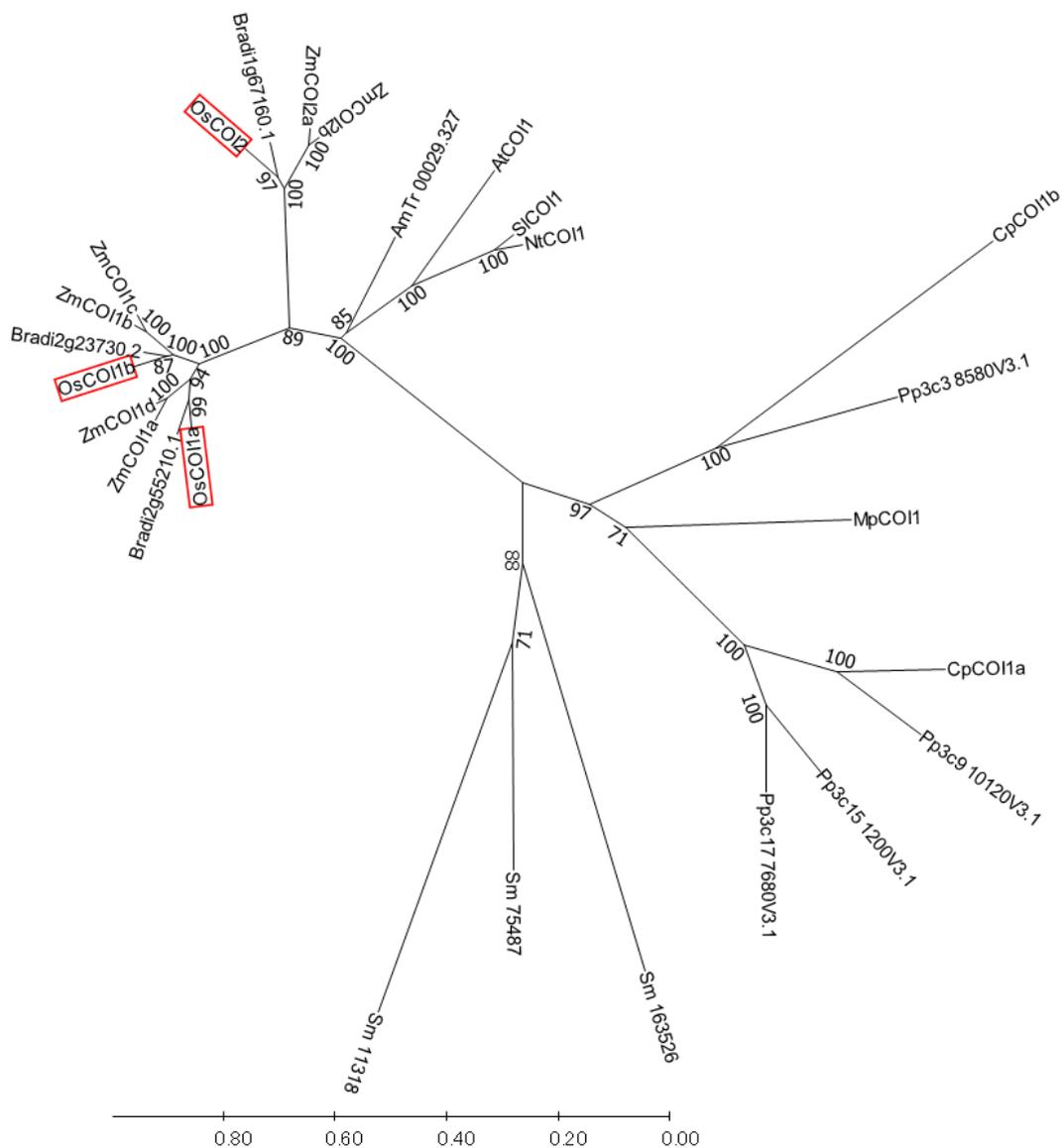


Figure 1-5 様々な生物種が有する COI1 の系統樹

Monte et al. (2018) を参考に分子系統樹を作製した。分子系統解析および分子系統樹の作製には MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/>) を使用し、muscle 法でアライメントを取った。トリミングを行った後、maximum likelihood 法で分子系統樹を作製した。イネ COI は赤枠で囲った。数字は bootstrap value を示す。

AtCOI1: NP_565919、ZmCOI1a: NP_001147900、ZmCOI1b: NP_001150429、ZmCOI1c: XP_023156041、ZmCOI1d: NP_001339225、ZmCOI2a: NP_001169230、ZmCOI2b: XP_020399501、NtCOI1: XP_016501313、SI COI1: NP_001234464、MpCOI1: PTQ43322

At: シロイヌナズナ、SI: トマト、Nt: タバコ、AmTr: アンボレラ、Os: イネ、Zm: トウモロコシ、Bradi: ミナトカモジグサ、Sm: イヌカタヒバ、Cp: ハイゴケ、Mp: ゼニゴケ、Pp: ヒメツリガネゴケ

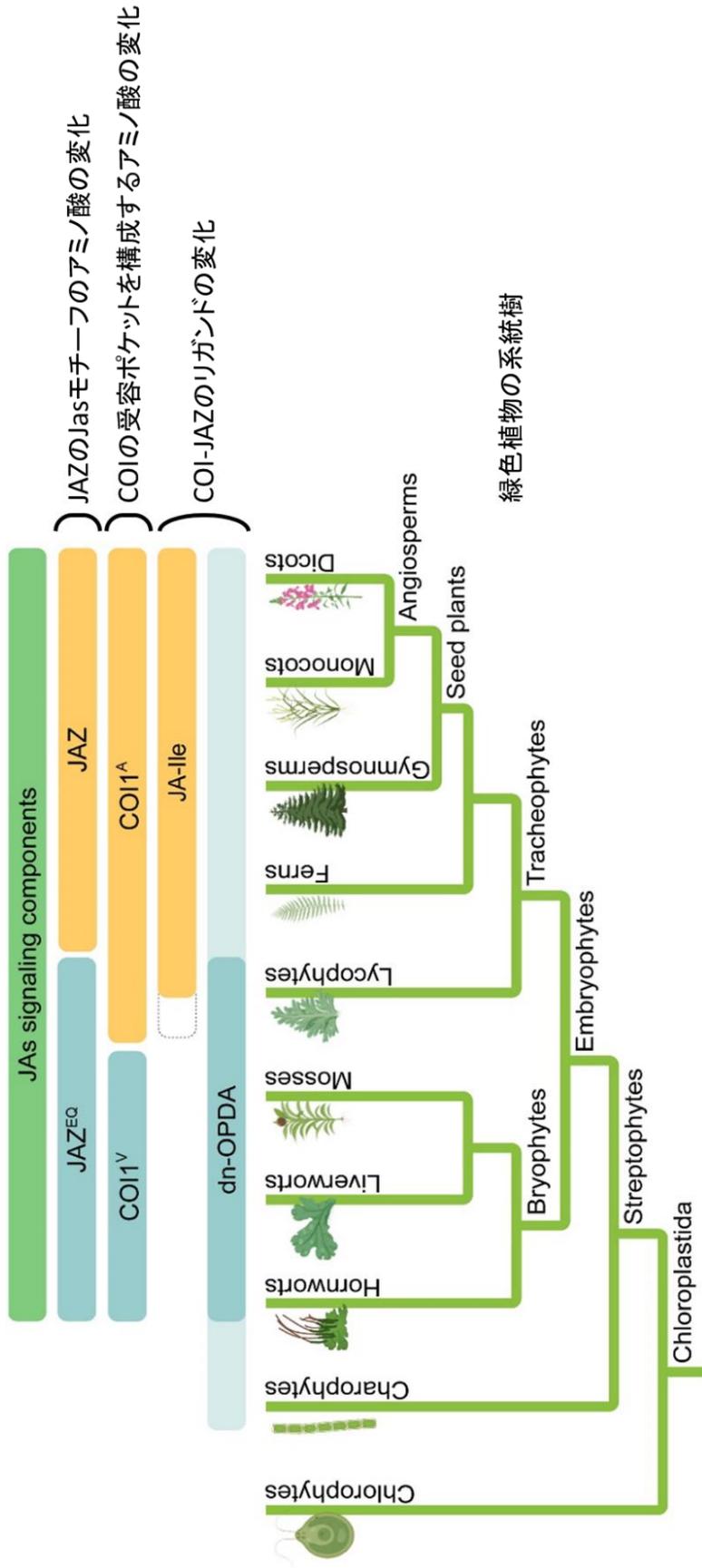
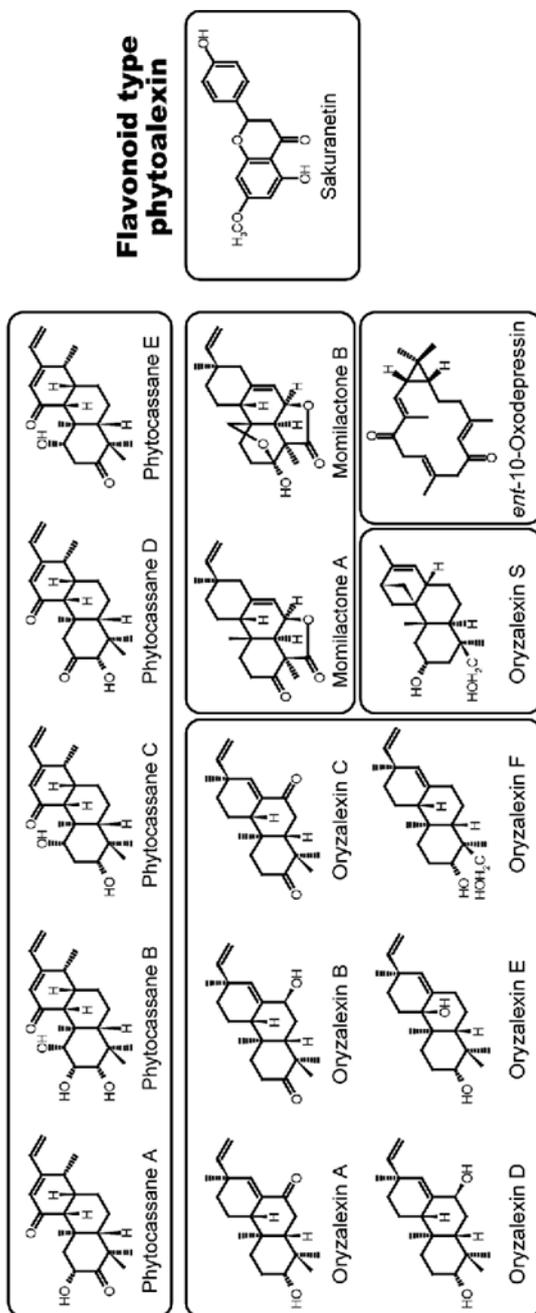


Figure 1-6 JA 類の生合成と COI1-JAZ の共進化 (Monte et al. (2022) を改変)

JAZ の Jas モチーフのうち、N 末端側の loop を形成して COI と共に受容ポケットを形成するアミノ酸残基と、COI のリガンドと接するアミノ酸残基に変異が導入されることで受容する化合物の選択性を生み出すことが提唱されている。

Diterpenoid type phytoalexins



Flavonoid type phytoalexin

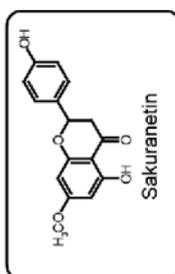


Figure 1-7 イネの主要ファイトアレキシンの構造式 (Miyamoto et al. (2014)より引用)
 ジテルペン型のファイトカサン類及びモミラクソン類、オリザレキシニン類と共に、フラボノイド型のサクラネチンが存在する。

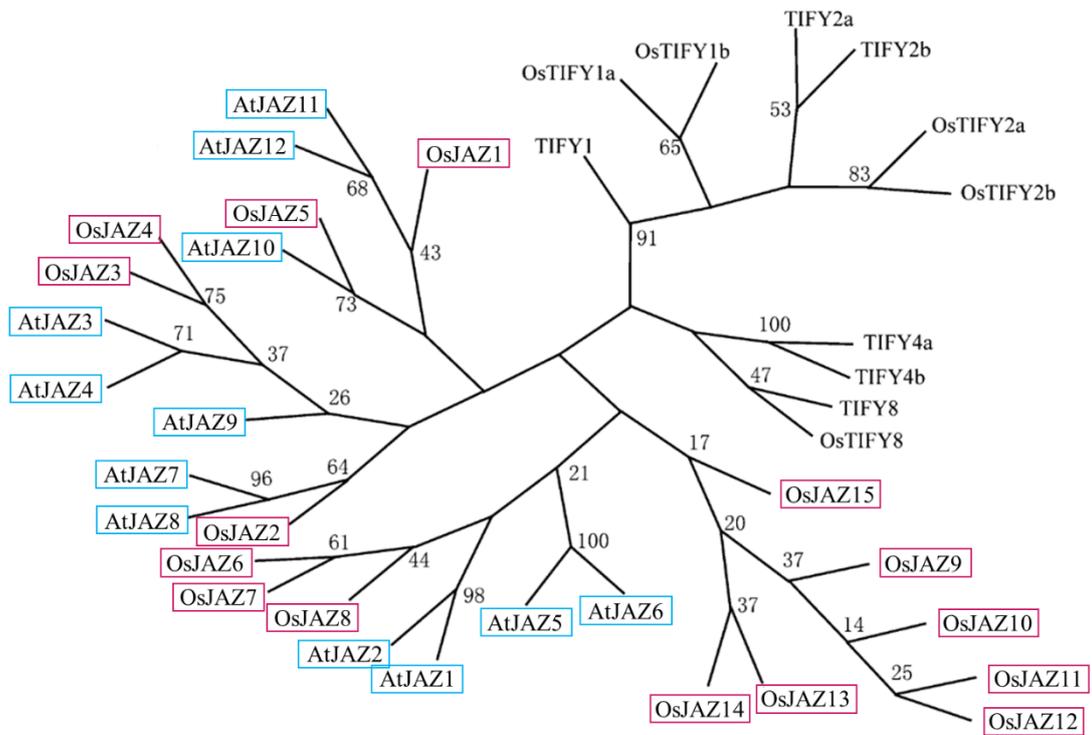


Figure 1-8 JAZ の分子系統樹 (Ye et al. (2009) を改変)

イネとシロイヌナズナの TIFY について作製した分子系統樹である。マゼンタの枠はイネ JAZ を、シアン色の枠はシロイヌナズナ JAZ を示し、数字は bootstrap value を示す。

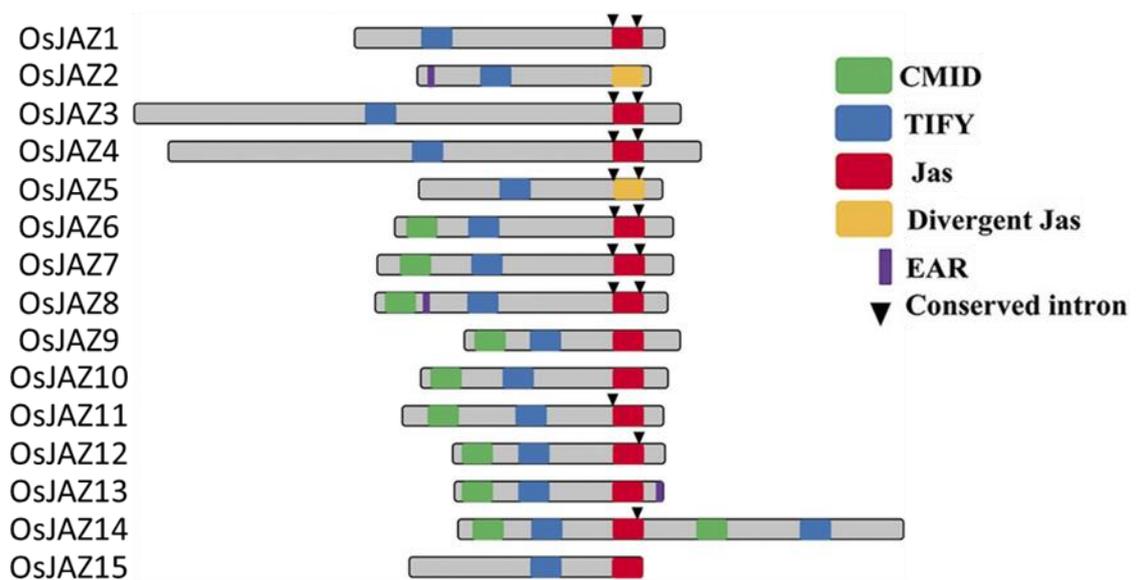


Figure 1-9 イネ JAZ のドメイン (Tian et al. (2019) を改変)

OsJAZ2 および OsJAZ5 は Jas ドメインが divergent Jas になっている。

CMID: cryptic MYC2-interacting domain

Jas: Jasmonate-associated

EAR: Ethylene response factor-associated amphiphilic repression

Table 1-1 ジャスモン酸シグナル伝達で機能するイネ JAZ の生理機能

Gene name	Locus ID	Physiological function	References
OsJAZ1	Os04g0653000	花の形態形成 乾燥耐性に関与	Cai et al., 2014 & Tian et al., 2019 Fu et al., 2017
OsJAZ3	Os08g0428400	JA とジベレリンのクロストークに関与 JA とサリチル酸のクロストークに関与	Um et al., 2018 Wang et al., 2019
OsJAZ4	Os09g0401300	JA とブラスチノステロイドとのクロストークに関与	He et al., 2020
OsJAZ6	Os03g0402800	花の形態形成	Cao et al., 2021
OsJAZ8	Os09g0439200	<i>Xanthomonas oryzae</i> への抵抗性 リナロールの生合成	Yamada et al., 2012 Taniguchi et al., 2014
OsJAZ9	Os03g0180800	塩ストレスと乾燥ストレスを制御	Toda et al., 2013
OsJAZ11	Os03g0180900	根の伸長生長の制御 種子サイズと花の発達の制御	Pandey et al., 2021 Mehra et al., 2022
OsJAZ13	Os10g0391400	過敏性細胞死の活性化	Feng et al., 2020

Table 1-2 ジャスモン酸の下流で機能する転写因子の生理機能

Gene name	Locus ID	Physiological function	References
OsMYC2	Os10g0575000	<i>Xanthomonas oryzae</i> への抵抗性	Uji et al., 2016
		<i>Magnaporthe oryzae</i> への抵抗性	Qui et al., 2022
	防御関連遺伝子の発現	Ogawa et al., 2017a	
	生長の制御	Giri et al., 2017	
OsMYC3/OsMYL1	Os01g0705700	JAZ と相互作用	Li et al., 2021a
		転写調節によって防御応答に関与	Tan et al., 2022
		OsMYC2 と相互作用	Ogawa et al., 2017a
OsHHLH148	Os03g0741100	環境ストレス応答に関与	Seo et al., 2011
RERJ1	Os04g0301500	シユートの生長阻害	Kiribuchi et al., 2004
		傷害や乾燥ストレス応答に関与	Kiribuchi et al., 2005 & Miyamoto et al., 2013
		病害抵抗性の制御	Meng et al., 2020
		リナロールの生合成の制御	Valea et al., 2022
OsJAmyb	Os11g0684000	ストレス応答性遺伝子の転写調節	Yokotani et al., 2013

第2章 イネ COI1 の機能解析

2-1 緒言

JA-Ile の受容体複合体 (Fig1-3) を形成する構成因子のうち、JA-Ile を直接に結合する重要な構成因子である COI1 は、双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナのゲノムでは1種のみがコードされているが、単子葉植物のモデル植物であるイネのゲノムには3種がコードされている。本研究の開始時点では、前任者によって CRISPR/Cas9 法により、イネの3つの COI それぞれをターゲットとしたゲノム編集が行われ、形質転換体当代 (T₀ 世代) が得られていた (下里ら、2016 年度帝京大学バイオサイエンス学科卒業論文)。

そこで本研究では、OsCOI1a と OsCOI1b、OsCOI2 の生理機能を明らかにするため、T₁ 世代において各遺伝子の変異株のスクリーニングを行った。さらに、得られた単独変異株の交配を行うことで二重変異株を作出した。そして、これらの変異株を用いて、稔性や、JA 誘導的なファイトアレキシンの生産誘導、老化の誘導、伸長生長の抑制の解析を行った。

2-2 材料と方法

2-2-1 変異株の生育条件

帝京大学理工学部バイオサイエンス学科植物化学研究室にて作成されていた *oscoi1a* 変異株と *oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株の種子を用いた。イネ種子の播種は、まず籾を除去し、蒸留水で 5 倍希釈したブリーチ（ミツエイ；有効塩素濃度の終濃度 1% (v/v)）で 20 min 振盪して殺菌処理をした。その後、クリーンベンチ内にて滅菌蒸留水で種子を洗浄し、0.8% 寒天培地に播種した。これを、連続白色蛍光灯下 ($918 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、25°C で生育させた。発芽 6 日齢の幼植物体を、合成培土ボンソル 2 号（住友化学）へ移植を行った。この培土はオートクレーブ滅菌を行ったもので、移植後は特定網室で自然光の下で生育させた。

試薬の組成

○0.8%寒天培地

寒天末（ナカライテスク） 0.8 g

蒸留水 fill up to 100 mL

オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌した。

2-2-2 ゲノム編集のターゲット領域のシーケンス解析

Crude DNA の抽出と遺伝子の増幅

200 μL の溶解 buffer とジルコニアビーズ ($\phi 2.3 \text{ mm}$) 3 つを、2 mL のスクリュウキャップチューブ (WATSON) に入れた。ここに 1 cm 程度の第二葉の切片をサンプリングした。FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) を用いて、4.5 m/s、10 sec の条件で破砕した。その後、25°C、14,000 rpm、5 min 遠心し、上清を PCR の template DNA とした。PCR の DNA polymerase は KOD FX (TOYOBO) を使用し、付属のプロトコールに従って PCR を行った。

アガロースゲル電気泳動とシーケンス解析用サンプルの調製

PCR 産物うち 5 μL を 0.5 μL の Midori Green Direct (日本ジェネティクス) と混ぜ、Mupid-exU (ADVANCE) を用いて 2%アガロースゲルで泳動を行った。予想される長さの断片が増幅されていたことを確認した後に、Exo-SAP-IT™ (ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いて未反応のプライマーや dNTP の除去を行った。Exo-SAP-IT™ 処理後の PCR 産物 1.5 μL に対して、9.6 pmol のプライマーを加え、分子生物学用純水を用いて 21 μL に fill up した。このサンプルのシーケンス解析は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。

試薬の組成

○溶解 buffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris; ナカライテスク)	1.21 g
Ethlenediaminetetraacetic Acid (EDTA; ナカライテスク)	0.292 g
KCl (関東化学)	7.45 g
蒸留水	fill up to 100 mL

0.5 M KOH (関東化学) で pH5.8 に調整し、オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌した。滅菌後は常温で保存した。

○50×TAE

Tris	121 g
EDTA	7.3 g
酢酸 (関東化学)	28.55 mL
蒸留水	fill up to 500 mL

○2%アガロースゲル

Agarose S (ニッポンジーン)	0.8 g
50×TAE	0.8 mL
蒸留水	39.2 mL

電子レンジで加熱して Agarose S を溶解させた。60°C程度に冷めた後に、ゲルメーカーに流し入れた。

Primer

OsCOI1a sequence 解析用プライマー

Forward 5'-GCGCCACTTTGAGTTCAGTC-3'	(20 bp)
Reverse 5'-TGGAATGCATGTATGGGATG-3'	(20 bp)

OsCOI1b sequence 解析用プライマー

Forward 5'-CATGACCGAACTCACAGTGG-3'	(20 bp)
Reverse 5'-TTGGCAGTGATCTTCAGTGG-3'	(20 bp)

OsCOI2 sequence 解析用プライマー

Forward 5'-CAACTTCCGCTTTTTCCTTG-3'	(20 bp)
Reverse 5'-CCTTGAGGAAGTGGAACGAG-3'	(20 bp)

シーケンス解析には、*OsCOI1a* と *OsCOI1b* は forward primer を、*OsCOI2* は reverse

primer を用いた。

2-2-3 外来遺伝子の脱落の脱落したラインの選抜

100 mg 程度のイネ葉身を、液体窒素で予冷したセラミックビーズ ($\Phi 1$ cm) の入った 13 mL のツーポジションチューブにサンプリングした。ボルテックスミキサーで葉身を破碎し、DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて付属のプロトコールに従い、ゲノム DNA を抽出した。2-2-2 と同様に KOD FX を用いて guide RNA (gRNA) と *hygromycin phosphotransferase (HPT)* の遺伝子の増幅を行った。ただし、*Cas9* 遺伝子の増幅は以下に記す組成で行った。なお、増幅のポジティブコントロールとして、*OsUBQ* 遺伝子を用いた。

○Cas9 用 PCR 反応液 (1 反応あたり)

Ex Taq (TaKaRa)	0.1 μ L
10 \times Ex Taq buffer	2 μ L
dNTP Mix	1.6 μ L
Forward primer (50 pmol/ μ L)	0.4 μ L
Reverse primer (50 pmol/ μ L)	0.4 μ L
Template	1 μ L
分子生物学用純水	14.5 μ L
<hr/>	
total	20 μ L

(98°C 10 sec→55°C 30 sec→72°C 30sec) \times 35 cycle→4°Cの条件で PCR を行った。

Primer

OsUBQ

Forward 5'-TCCGAGAGATGGGTTTCATC-3' (20 bp)
Reverse 5'-GCCAAGATTGCCAAGAAGAC-3' (20 bp)

oscoi1a gRNA

Forward 5'-TGCTGGAATTGCCCTTGGATCATGAA-3' (26 bp)
Reverse 5'-AAACTATTACTGATAAGGGTGGTG-3' (24 bp)

oscoi1b gRNA

Forward 5'-TGCTGGAATTGCCCTTGGATCATGAA-3' (26 bp)
Reverse 5'-AAACTACTTAGTGAGCTCCCCTTG-3' (24 bp)

oscoi2 gRNA

Forward 5'-TGCTGGAATTGCCCTTGGGATCATGAA-3' (26 bp)

Reverse 5'-AAACCTGGTGCAGGGTTCGACGCGC-3' (24 bp)

HPT

Forward 5'-GATGTTGGCGACCTCGTATT-3' (20 bp)

Reverse 5'-GATGTAGGAGGGCGTGGATA-3' (20 bp)

Cas9

Forward 5'-GCGGACTCTCTGAACTGGAC-3' (20 bp)

Reverse 5'-TGCAGTCGCCTTTCCTATCT-3' (20 bp)

2-2-4 二重変異株の作出

温湯除雄法による交配

温湯除雄法 (高牟禮 2005) により交配を行うため、2-2-3 でスクリーニングしたイネ *COI* 変異株の T₂ 種子を用いて、開花の時期が揃うように播種して生育させた。交配前日の夕方に、開花済みの穎花を切り落とした。当日の早朝に交配に用いる穂を 45°C で 7 min 湯煎し、花粉のみを不稔化させた。ここに花粉親となる花から花糸をピンセットで摘んで葯を取り出し、除雄した穎花の柱頭に擦り付けて受粉させた。受粉後は交配袋 (リーズ) を被せて登熟させ、十分に登熟した種子を採取した。

イネ *COI* 二重変異株のジェノタイプピング

採取した種子は、2-2-1 の手順で寒天培地に播種して生育させ、2-2-2 の方法で DNA 抽出、PCR 反応、シーケンス解析を行い、二重変異株の作製の対象とした二つのイネ *COI* 遺伝子のヘテロ接合体が得られているかどうかを解析した。さらにこのヘテロ接合体を自殖させ、得られた種子を 2-2-1 の方法で生育させ、2-2-2 の方法でホモ接合体の選抜をした。

2-2-5 栄養成長期におけるイネ *COI* 変異株の成長の解析

2-2-1 の条件で播種および生育したイネについて、5.5 葉期である約 1.5 か月の植物体を用いて、第 5 葉までの地上部の長さを測定した。

2-2-6 出穂期における *oscoi2* 変異株における節間長の測定

2-2-1 の条件で播種および生育した野生型株および *oscoi2* 変異株について、登熟後の固体を用いて地上部の長さを測定した。また、穂首節と第 1 節、第 2 節、第 3 節、第 4 節、第 5 節の長さも同時に測定した。

2-2-7 イネ *COI*変異株の稔性の解析

稔実率の計測

4月上旬に野生型と変異株の種子を水道水に浸し、30°Cの連続白色光下の条件にした人工気象機において1週間生育させた。この幼植物体をオートクレーブ滅菌した合成培土ボンソル2号へ移植して、特定網室にて自然光の長日条件下で生育させた。1つの個体から出穂した穂をすべて回収し、結実しているものとそうでないものの数を計測し、結実している種子の割合を算出した。

電子顕微鏡を用いた葯の観察

特定網室にて自然光下(4月~10月)で生育させた *oscoi2* 変異株の開花した当日の葯を、卓上電子走査顕微鏡(TM3030 Miniscope; 日立ハイテクノロジー; 加速電圧は15 kV)を使用して撮影した。また、*oscoi2* 変異株の葯はマイクロナイフで切断して葯の内部の観察も行った。

イネ *COI*変異株の種子の大きさと花の観察

採取した種子を用いて、それぞれの変異株の種子の大きさを計測した。また、特定網室にて自然光で生育させた *oscoi2* 変異株の開花後の花の写真を撮影し、観察を行った。

2-2-8 *oscoi2*変異株ヘテロ個体の分離比の解析

2-2-4の方法で *oscoi2* #1 と日本晴野生型株との戻し交配を行った。得られた種子から、2-2-2と同様の方法で *OsCOI2* 遺伝子中のゲノム編集のターゲット領域を増幅した。アガロースゲル電気泳動で遺伝子が増幅していることを確認した後、*Bsr* I (NEW ENGLAND BioLabs) を用いて切断し、2%のアガロースゲルによる電気泳動で確認された切断パターンで遺伝子型を決定した。

2-2-9 ファイトアレキシン蓄積量の解析

播種後約1か月のイネ植物体における最大展開葉から、 $\Phi 6$ mm のリーフディスクを作製した。これを蒸留水に浮かべ、連続白色蛍光灯下、25°Cで一晩静置し、ストレス除去をした。その後、4 mL の 500 μ M MeJA 溶液を分注した $\Phi 3$ cm のシャーレに移し、同様の条件で72 h 静置した。これを1 mL の 80%メタノールに浸漬し、一晩ファイトアレキシンの抽出を行った。抽出液の一部を LC-MS/MS に供し、ファイトアレキシンを定量した。Shimizu et al. (2008) の方法を参考に、LC-MS/MS で分析を行った条件を以下に記す。

<HPLC の条件>

HPLC: Agilent Technologies 1200 series

カラム: SHISEIDO CAPCELL CORE C18 2.1×50 mm

移動相: A 0.05% CH₃COOH in water

B 0.05% CH₃COOH in CH₃CN

Time (min)	%B	Flow (mL/min)
0	40	0.2
10	60	0.2
10.1	98	0.2
15	98	0.2
15.1	3	0.2
20	3	0.2
20.1	40	0.2
25	40	0.2

<MS/MS の条件>

MS/MS: Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS

Ion source: ESI

イオン化条件

共通パラメーター

Gas Temp.	300°C
Gas Flow	5 L/min
Nebulizer	45 psi
Sheath Gas Temp.	350°C
Seath Gas Flow	11 L/min
Capillary	3500 V
Nozzle Voltage	500 V

固有パラメーター

Compound Name	Transition	CE	Polarity
Phytocassane B	335.2 > 317.2	21	Posirive
Phytocassane C	319.2 > 147.2	17	Posirive
Sakuranetin	287.1 > 167.1	37	Posirive
Momilactone B	331.2 > 269.1	25	Posirive
Phytocassane A, D, E	317.2 > 299.1	15	Posirive
Momilactone A	315.2 > 271.1	25	Posirive

2-2-10 qRT-PCR による JA 応答性遺伝子の発現解析

イネ葉身からの total RNA の抽出

播種後約 1 か月のイネ植物体における最大展開葉から、 $\Phi 6$ mm のリーフディスクを製作した。これを蒸留水に浮かべ、白色蛍光灯下、 25°C の条件で一晩静置した。その後、4 mL の $500\ \mu\text{M}$ MeJA 溶液を分注した $\Phi 3$ cm のシャーレに移し、同様の条件で 24 h 静置した。リーフディスク 10 枚を 1 サンプルとして液体窒素で凍結・破碎を行った。RNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、付属のプロトコールに従って total RNA を抽出し、電気泳動によって分解していないことを確認した。

試薬の組成

○10×MOPS buffer (pH7)

MOPS (ナカライテスク)	41.852 g
EDTA	1.46125 g
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業)	6.804 g
蒸留水	fill up to 500 mL

NaOH で pH 7 に調整し、オートクレーブで 121°C 、20 min 滅菌した。滅菌後は常温で保存した。

○RNA 泳動用ゲル

10×MOPS buffer	3 mL
Agarose S	0.3 g
ホルムアルデヒド (関東化学)	5.4 mL
蒸留水	21.6 mL

total 30 mL

電子レンジで加熱し、アガロースを溶かしてゲルメーカーに流し入れる直前にホルムアルデヒドを加えた。

逆転写反応による cDNA の合成

PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて、付属のプロトコールに従って total RNA から cDNA の合成を行った。

qRT-PCR

合成した cDNA を 10 倍希釈したものをテンプレートとして、以下の条件で qRT-PCR を行った。反応には 7500 Fast (Applied Biosystems) を使用した。なお、各遺伝子の転写量は、内在性コントロールである *OsUBQ* 遺伝子の転写量との比率で表した。

qRT-PCR の反応液の組成

Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems)	10 µL
分子生物学用純水	8.84 µL
Forward Primer (50 pmol/µL)	0.08 µL
Reverse Primer (50 pmol/µL)	0.08 µL
10 倍希釈した cDNA	1 µL
<hr/>	
total	20 µL

PCR の条件

95°C 20 sec → (95°C 3 sec → 60°C 30 sec) × 40 cycle

解離反応の条件

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

Primer

OsUBQ

Forward 5'-TCCGAGAGATGGGTTTCATC-3' (20 bp)

Reverse 5'-GCCAAGATTGCCAAGAAGAC-3' (20 bp)

OsCPS2

Forward 5'-TTTTGCTACGTCGCTCATTG-3' (20 bp)

Reverse 5'-GAGCCATGCTGGTAGACACA-3' (20 bp)

OsCPS4

Forward 5'-TGACGAGGCTGGGCATATC-3' (19 bp)

Reverse 5'-TCTGGAGTCCAGTTCCTGAAA-3' (21 bp)

OsKSL4

Forward 5'-TACTCTCAGGCCGATGGATT-3' (20 bp)

Reverse 5'-TCGCGATACCGTAGGAAAAC-3' (20 bp)

OsKSL7

Forward 5'-TTCATCTCTGTCACTTTTTCTTTT-3' (24 bp)

Reverse 5'-ATCCCAACTAAGTCATCCAC-3' (20 bp)

OsNOMT

Forward 5'-CTAGCCGGATGCATGAAAGT-3' (20 bp)

Reverse 5'-TGCACGTATAGGCACACACA-3' (20 bp)

OsMYC2

Forward 5'-CGCCCGGTAACCTCAACTCTA-3' (20 bp)

Reverse 5'-TTGATCATCGTCTCGTCGTG-3' (20 bp)

2-2-11 クロロフィル含有量の測定

播種後約 1 か月のイネ植物体における最大展開葉から、 $\Phi 6$ mm のリーフディスクを製作した。これを蒸留水に浮かべ、連続白色蛍光灯下、25°Cで一晩静置し、ストレス除去をした。その後、4 mL の 200、500 μ M MeJA 溶液を分注した $\Phi 3$ cm のシャーレに移し、同様の条件で 72 h 静置した。ジルコニアビーズ 3 つと、500 μ L の *N,N*-dimethylformamid (関東化学) が入った 2 mL のスクリュウキャップチューブに、MeJA 処理後のリーフディスクを回収した。FastPrep-24 5G を用いて、4.5 m/s、10 sec で破碎してクロロフィルを抽出し、25°C、14,000 rpm、5 min 遠心した。上清を別のチューブに回収し、その抽出液を NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer (ThermoFisher SCIENTIFIC) を使用して、664 nm および 647 nm の吸光度を測定した。クロロフィル a は 664 nm の吸光波長を、クロロフィル b は 647 nm の吸光波長を持つことから、Porra et al. (1989) を参考にリーフディスク 1 枚当たりのクロロフィル含有量を以下の式で求めた。

$$Chl\ a + b = \frac{1}{2}(19.43 \times A_{647} + 8.05 \times A_{664}) [nmol/leaf\ disk]$$

2-2-12 JA を含む寒天培地での生育阻害実験

籾を除去した野生型株と変異株の種子を、2-2-1 と同様に殺菌、洗浄した。オートクレーブ滅菌後に 5、10、20 μ M となるように JA を加えた 0.8%寒天培地に、滅菌した種子を播種した。その後、連続白色蛍光灯下、25°Cで生育させ、10 日後に根と第二葉鞘の長さを測定した。

2-2-13 生理障害部位における MDA 蓄積量の定量

TBA 溶液の調整

Yamauchi and Sugimoto (2010) を参考に、malondialdehyde (MDA) と反応させるための TBA を調製した。まず、HPLC グレードの蒸留水を溶媒とした 200 mg/mL trichloroacetic acid (TCA; 和光純薬) を 100 mL 調製した。これに 2-thiobarbituric acid (TBA; 関東化学) を 650 mg 溶解し、0.65% (w/v) TBA in 20% (w/v) TCA を調製した。

MDA の調整

11 mg の 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane (TMP; 東京化成工業) を、0.1 M HCl 溶液 5 mL で 1 h 攪拌して溶解させた。1 M NaOH で pH6 程度に調整し、一部は冷凍保存した。残りは酸性条件下で 200 倍希釈し、加水分解を促して MDA を生成させた。NanoDrop 2000c で λ_{\max} 245 nm の吸光度を測定し、MDA の 245 nm におけるモル吸光係数 ($\epsilon=14,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) から濃度を決定した。

MDA-TBA adduct の標品の調製

TBA 溶液 500 μL と、80%エタノールで 10 μM に希釈した MDA 500 μL を試験管 ($\Phi 1.5 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$) 内でよく混和させた。アルミホイルで蓋をして 96°C、25 min 反応させた。反応後は氷上で 10 min 急冷し、蒸発した分は 80%エタノールを足して 1 mL にした。

イネ葉身における生理障害部位の MDA 測定サンプルの調製

イネ葉身の生理障害部位と健全部位をサンプリングし、液体窒素で凍結・破碎した。2 mL の 80%エタノールで懸濁し、2 mL チューブに移して 25°C、3,000 $\times g$ 、10 min 遠心した。試験管内にて上清 500 μL と TBA 溶液 500 μL を混和して、アルミホイルで蓋をして 96°C、25 min 反応させ、氷上で 10 min 急冷した。蒸発した分は 80%エタノールを足して 1 mL にし、標品と合わせて LC-MS/MS に供した。

<HPLC の条件>

HPLC: Agilent Technologies 1200 series

カラム: Agilent ZORBAX SD-Phenyl

移動相: A 0.05% CH_3COOH in water

B 0.05% CH_3COOH in CH_3CN

Time (min)	%B	Flow (mL/min)
0	3	0.2
10	70	0.2
10.1	98	0.3
15	98	0.3
15.1	3	0.2
25	3	0.2

<MS/MS の条件>

MS/MS: Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS

Ion source: ESI+Agilent Jet Stream

イオン化条件

共通パラメーター

Gas Temp.	300°C
Gas Flow	5 L/min
Nebulizer	45 psi
Sheath Gas Temp.	350°C
Seath Gas Flow	11 L/min
Capillary	3500 V
Nozzle Voltage	500 V

Scan Segments

Compound Name	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor (V)	Collision Energy	Polarity
MDA-1	323	Unit	220	Unit	400	135	15	Negative
MDA-2	323	Unit	58	Unit	400	135	30	Negative

2-2-14 本章で扱った遺伝子の gene ID

OsCOI1a : Os01g0853400, *OsCOI1b* : Os05g0449500, *OsCOI2* : Os03g0265500,
OsUBQ : Os10g0542200, *OsCPS2* : Os02g0571100, *OsCPS4* : Os04g0178300, *OsKSL4* :
Os04g0179700, *OsKSL7* : Os02g0570400, *OsNOMT* : Os12g0240900, *OsMYC2* :
Os10g0575000

2-3 結果と考察

2-3-1 イネ *COI*変異株の作出と選抜

本研究で用いたイネ *COI* 変異株は、前任者によって以下の手順で形質転換体の当代 (T_0 世代) が作製されていた。まず、CRISPR-P (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR/>) によって (Lei et al., 2014)、それぞれの *COI* 遺伝子のコーディング領域内で、イネゲノムのその他の領域に相同性の高い部位がない配列をゲノム編集のターゲット領域とした (帝京大学理工学部バイオサイエンス学科 平成 28 年度卒業論文 下里ら) (Fig.2-1)。ゲノム編集は、pU6_ccaB_gRNA および pZH_gYSA_MM Cas9 のプラスミドを用いて Mikami et al. (2015) の方法に従って行われた。ゲノム編集に用いるプラスミド pZH_gYSA_MM Cas9 は、標的遺伝子についてゲノム編集を行うための gRNA 配列と、DNA 切断酵素である *Cas9* 遺伝子、形質転換の選抜マーカーである HPT を T-DNA 領域に持っている (Fig.2-2)。日本晴野生型株 (*Oryza sativa* ‘Nipponbare’) の胚から誘導したカルスに対して、アグロバクテリウム法 (Toki et al., 2006) で T-DNA 領域を導入し、ゲノム編集が行われた。Fig.2-1 示したそれぞれの *COI* 遺伝子について特異的な gRNA が結合すると、PAM 配列 (5'-NGG-3') から 3 塩基離れた場所を Cas9 ヌクレアーゼが切断する。切断されたゲノム DNA は修復されるが、その際に塩基の挿入や欠失が起こった場合にフレームシフトが起こって遺伝子が破壊される。

本研究では、前任者が作出した *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株の T_1 種子を用いて、変異がホモに挿入されおり、かつ導入した遺伝子カセットが脱落した植物体の選抜を行った。シーケンス解析によって選抜した変異株において、導入されていた変異を Fig.2-3 および Table2-1 に示した。*oscoi1a*#1 ライン (以下#1 と表記する) では 1 塩基 (T) の欠失が、*oscoi1a*#2 では 1 塩基 (T) の挿入が起こっていた (Fig.2-3、Table2-1)。*oscoi1b* #1 では大規模な領域の挿入や欠失が起こっており、その結果、すぐ後ろに終止コドンが生じていた (Fig.2-4)。また、*oscoi1b*#2 は 4 塩基の欠失が、*oscoi1b*#3 では 16 塩基の欠失が起こっていた (Fig2-3)。*oscoi2*#1 は 1 塩基 (G) の欠失が、*oscoi2* #2 では 1 塩基 (G) の挿入が起こっていた。さらに、これらの変異株において翻訳されるアミノ酸配列のアライメントを行うと、シロイヌナズナ COI1 で JA-Ile を認識するのに重要な、アラニンに相当するアミノ酸残基よりも前で *oscoi1a* 変異株と *oscoi1b* 変異株では翻訳が終結していた (Monte et al., 2018) (Fig.2-5、2-6)。また、*oscoi2* 変異株ではフレームシフトにより、JA-Ile の認識に重要なアラニンに相当するアミノ酸残基がなくなっていた (Fig.2-7)。そこで、これら植物体の後代 (T_2 および T_3 世代) を用いて JA に関わる様々な表現型の解析を行うこととした。

また、遺伝子の機能が重複している可能性を考え、イネ COI の二重変異株と三重変異株の作出を試みた。温湯除雄法によって花粉を不活化し、交配によって多重変異株の作出を行った。その結果、*oscoi1a* #2 と *oscoi1b* #3 の交配が成功し、*OsCOI1a* および *OsCOI1b* の

二つの遺伝子のヘテロ接合体 (*OsCOI1a/oscoi1a/OsCOI1b/oscoi1b*) を F₁ 世代において得た。さらに、F₂ 世代において *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株のホモ接合体を選抜した。この後の実験には、F₂ 世代もしくはその後代を使用した。一方で、交配を行い標的遺伝子がヘテロ接合体になった植物体は得られたものの、そこから *oscoi1a oscoi2* 二重変異株および *oscoi1b oscoi2* 二重変異株、*oscoi1a oscoi1b oscoi2* 三重変異株のホモ接合体を得ることはできなかった。

2-3-2 イネ *COI*変異株の成長及び形態の観察

作出したイネ *COI* 変異株において、栄養成長期と生殖成長期における植物体の成長や形態を観察した。既知の JA 欠損変異株では“*hebiba*”と呼ばれる葉が捻じれた形態が観察されるが、イネ *COI* 変異株では栄養成長期（播種後 1.5 か月）において、そのような形態は見られなかった (Fig.2-8A)。播種後 1.5 か月の 5.5 葉期における植物体の高さを測定したところ、野生型では 40 cm 程度であるのに対して、*oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株、*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株は 40 から 50 cm であり、徒長する傾向が見られた (Fig.2-8B)。

次に、*oscoi2* 変異株を用いて生殖成長期の地上部と節間の長さを測定した。出穂期の *oscoi2* 変異株は野生型よりも有意に長い傾向を示した (Fig2-9A、B)。個々の節間長においては、穂首節は野生型と *oscoi2* 変異株の長さはほとんど差がなかった (Fig.2-9C)。しかし、第 1 節では野生型よりも *oscoi2* 変異株の 2 ライン共に長かった。また、第 2 節、第 3 節、第 4 節は野生型と *oscoi2* 変異株での長さは同等であったが、第 5 節は *oscoi2* 変異株が顕著に長い傾向を示した。さらに、*oscoi2* 変異株では野生型ではほとんど見られない第 6 節も観察された。

oscoi1a oscoi1b RNAi 株において、野生型と比較して伸長が徒長し、すべての節間が徒長することが報告されている (Yang et al., 2012)。本解析より全体の長さが徒長する傾向は *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株でも見られたものの、RNAi 株ほど顕著なものではなかった。この原因として、*OsCOI1a* と *OsCOI1b* を同時にノックダウンされていることや、これらと相同性の高い *OsCOI2* に対するオフターゲットの影響などが考えられる。このことから、植物の徒長にはすべての *COI* が冗長的に機能していることが考えられる。また、*oscoi2* 変異株において野生型よりも第 1 節と第 5 節が徒長していたことから、この節間伸長には *OsCOI2* が主要に関与することが考えられる。しかし、第 2 節、第 3 節、第 4 節は *oscoi2* 変異株では徒長しなかったことから、他の *COI* の関与が考えられる。今後は、この節間ごとに伸長が起こるシグナル伝達機構を明らかにするために、*oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株、*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株でも節間の長さを計測していく必要がある。

2-3-3 イネ *COI*変異株の稔実率とヘテロ個体の分離比の解析

野生型株および *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株を同時期に播種し、ステ

ージをそろえて生育させて稔実率を解析した。野生型では約 98%の稔実率であるのに対して、*oscoi1a#1*では約96%、*oscoi1a#2*では約95%と若干の減少が認められた (Fig.2-10A)。また、*oscoi1b#1*では約93%、*oscoi1b#2*では約94%、*oscoi1b#3*では約95%と減少していたものの、高い割合を維持していた (Fig.2-10A)。*oscoi1a oscoi1b*二重変異株は、約90%の稔実率を示した。一方、野生型と比較して稔性が低下しているものの、*oscoi1a#2*と*oscoi1b#3*とは同等の稔実率であった。以上のことから、OsCOI1aとOsCOI1bは稔性にほとんど関与しないことが示唆された (Fig.2-10B)。一方で、*oscoi2#1*では約5%、*oscoi2#2*では約4%の稔実率であり、野生型と比較して*oscoi2*変異株の2つのラインで大きく稔実率が低下していた (Fig.2-10A)。このことから、イネの稔性においてOsCOI2が主要に関与することが示唆された。

OsCOI1bにT-DNAが挿入された変異株を用いた先行研究では、*oscoi1b*変異株において稔実率が低下するとともに、小穂の数が減少し、1,000粒当たりの重量が軽減したことから、OsCOI1bが稔性や種子の形成におけるプロセスにおいて主要に関与することが報告されている (Lee et al., 2015)。この報告は、*oscoi1b*変異株の稔実率は野生型と同等であり、*oscoi2*変異株で顕著に稔実率が低下した本研究の結果と齟齬が生じるものである。考えられる1つの要因としては、先行研究で使用したT-DNA挿入変異株は、*OsCOI1b*の3'非翻訳領域にT-DNAの挿入されている影響で、*OsCOI1b*の転写量の低下が部分的だったことが考えられる。また、他のイネCOIの影響や他のゲノム領域へのT-DNA挿入の可能性については考慮されていない。今後は、OsCOI2およびOsCOI1bの下流シグナルを明らかにしていくことで、イネの花や種子の形成におけるイネCOIの機能を明らかにしていく必要がある。

次に、*oscoi2*変異株において稔性が低下する原因を解明するために、卓上走査型電子顕微鏡を用いて開花直後の花を観察した。野生型では開花直後に葯が開裂して花粉が外に放出されていたが、*oscoi2*変異株では2ライン共に開花しても葯が開裂していなかった (Fig.2-10C)。そこで*oscoi2*変異株の葯をマイクロナイフで切断し、葯の内部を観察することとした。すると葯の中には花粉が観察されたことから、*oscoi2*変異株で稔性が顕著に低下する原因として葯が開裂しないことで雄性不稔になり、自家受粉できない可能性が示された (Fig.2-10D, E)。

OsCOI2のトウモロコシにおけるオルソログとして、ZmCOI2aおよびZmCOI2bが同定されている。*zmcoi2a*変異株と*zmcoi2b*変異株では稔性が低下する。また、花粉管の発芽が顕著に低下し、短く、紆曲する (Qi et al., 2022)。これらの結果から、ZmCOI2aおよびZmCOI2bは花粉管の発芽と正常な花粉管の形態形成に関与することが示されている。今後は、*oscoi2*変異株において形成されている花粉について、正常な発芽や花粉管の伸長が見られるかの解析を行う必要がある。

次に、イネCOI変異株の花と種子の形態観察を行った。イネのJA欠損変異株である*hebiba*や*cpm2*、JA-Ile欠損変異株の*osjar1*変異株では、稔性が低く、“open husk”と呼ばれる開花後に穎が閉じない形態を示すことが知られている (Riemann et al., 2008;

Riemann et al., 2013; Xiao et al., 2014)。また、これら変異株の種子は通常よりも丸みを帯びた形態になる。しかし、イネのどの *COI* 変異株でも花と種子の形態異常は観察されなかった (Fig.2-11A)。種子の長さを測定すると、*oscoi1a#2* で野生型よりも種子が長い傾向だったが、他の変異株は野生型と種子のサイズに差はなかった (Fig.2-11B)。さらに、稔実率が顕著に低下した *oscoi2* 変異株の花の形態を観察すると、野生型と同様に正常な形態を示した (Fig.2-11C)。ことから、稔性と花や種子の形態形成は異なる調節機構で制御されていることが考えられる。

oscoi2 変異株は稔性が低く、この植物体を多数得ることが困難なことから、野生型と戻し交配することでヘテロ接合体の植物体を作成してこの変異株を維持していくことを目指した。ヘテロ接合体を自殖させて得られた種子から発芽させた植物体を用いて、*OsCOI2* の変異導入箇所付近の遺伝子を増幅し制限酵素によって切断することで、バンドの出現パターンによって遺伝子型を判別した。野生型株において変異導入部位を含む 500 bp の増幅断片を *Bsr* I で切断すると、2 か所で切断されて 287 bp、156 bp、57 bp の 3 つの断片が生じる。*oscoi2 #1* では *Bsr* I で 1 か所で切断されることで 442 bp と 57 bp の 2 つの断片が生じる (Fig.2-12A)。このことからヘテロ接合体になると 442 bp、287 bp、156 bp、57 bp の 4 つのバンドが生じる。制限酵素による切断パターンの違いを用いて、自殖させた *oscoi2#1* のヘテロ接合体由来の種子から発芽した植物体の選抜を行うと、野生型: ヘテロ接合体: ホモ接合体の割合が 41: 26: 5 となり、野生型が非常に多くなっていた (Fig.2-12B)。*OsCOI1a* と *OsCOI1b* はそれぞれの別の染色体上に存在するため、メンデル遺伝の法則に従い、野生型: ヘテロ接合体: ホモ接合体が 1: 2: 1 の割合になることが予想される。しかし、この結果はその割合とは大きく乖離したものだだった。

同様の分離比の乖離は、トウモロコシの *zmcoi2a* および *zmcoi2b* 変異株においても観察されている (Qi et al., 2022)。花粉 (精細胞) や卵細胞は半数体であるために、*oscoi2* 変異株のヘテロ接合体で生じた花粉 (精細胞)、卵細胞の半分は変異型の遺伝子のみを持つことが予想される。分離比が乖離する原因として、変異型の *oscoi2* 遺伝子を持つ花粉 (精細胞) や卵細胞の発達に異常が生じ、成熟しない可能性が考えられる。また、受精後に *oscoi2* 変異のホモ接合体となった胚が一定の確率で致死となり、種子を形成しない可能性も考えられる。*OsCOI2* を介した稔性の制御メカニズムの解明には、花粉 (精細胞)、卵細胞および胚の形成や発生初期の生育過程を解析していくことが必要となる

上記の結果から、*oscoi2* 変異株をヘテロ接合体として維持することは困難であると判断し、*oscoi2* 変異株のホモ接合体から得られる少数の種子を用いて以降の実験を行った。また、2-3-1 に記述したように *oscoi1a oscoi2* 二重変異株と *oscoi1b oscoi2* 二重変異株、*oscoi1a oscoi1b oscoi2* 三重変異株が得られなかった原因は、*oscoi2* 変異株における稔性の低下と分離比の異常による可能性が考えられる。

2-3-4 ファイトアレキシン蓄積量の解析

植物は JA を介して様々な防御応答を誘導しているが、その代表的なものとして抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシン生産が挙げられる。本研究ではイネの JA 誘導的な防御応答の代表例であるファイトアレキシンの蓄積量を指標として、その制御におけるイネ COI の関与を検討した。野生型と *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株に MeJA 処理をし、ファイトアレキシンの蓄積量を定量した。その結果、サクラネチンとモミラクトン、ファイトカサンは MeJA 未処理時には野生型と *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株はほとんど蓄積しないが、MeJA を 72 h 処理すると野生型と比較してこれら 2 つの変異株は同等かあるいはそれ以上の蓄積量だった (Fig.2-13A、B、C)。一方で、*oscoi2* 変異株では MeJA 処理時にファイトアレキシンがほとんど蓄積されず、その蓄積量は野生型よりも顕著に低下していた。*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株においては、MeJA を処理すると野生型と同程度のファイトアレキシンが蓄積した。このことから、OsCOI2 がファイトアレキシン生産において主要に関与することが示唆された。

2-3-5 qRT-PCR による JA 応答性遺伝子の発現解析

野生型と変異株の葉身から作出したリーフディスクを、50 μ M または 500 μ M MeJA で処理して抽出した total RNA より合成した cDNA を用いて遺伝子発現解析を行った。ターゲットとしてはイネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成に関与する *OsCPS2* と *OsCPS4*、*OsKSL4*、*OsKSL7* と、フラボノイド型ファイトアレキシンであるサクラネチンの生合成に関与する *OsNOMT* に加え、JA のマスター転写因子として機能することが知られている *OsMYC2* の発現量を解析した。

OsCPS2 は MeJA 未処理時においてすべてのイネで転写量が低かったが、500 μ M MeJA で処理したイネ *COI* 変異株の cDNA を用いて遺伝子発現解析を行うと、MeJA 処理時には野生型と *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株では 100 倍から 300 倍に転写量が上昇していた (Fig.2-14)。一方で *oscoi2* 変異株では MeJA 処理時にも発現誘導がほとんど起こらず、野生型と比較して顕著に低下していた。野生型と *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株は 500 μ M MeJA 処理時に *OsCPS4* は 20 倍から 40 倍程度、*OsKSL4* では 5 倍から 15 倍程度、*OsKSL7* は 20 倍から 80 倍程度、*OsNOMT* は 100 倍から 200 倍程度まで発現量が上昇した。一方で、*oscoi2* 変異株では 2 ライン共に 500 μ M MeJA 処理時に *OsCPS2* と *OsCPS4*、*OsKSL4*、*OsKSL7* の発現量は、野生型と比較して顕著に低下した。*OsMYC2* は MeJA 未処理時に *oscoi2#2* で野生型よりも発現量が上昇していたが、他の変異株は野生型と同等の 2 倍から 3 倍ほどの発現量であった (Fig.2-14)。500 μ M MeJA 処理時には *oscoi1a* 変異株と *oscoi1b* 変異株は野生型と同等の発現量だったのに対して、*oscoi2* 変異株では発現量が低下していた。

500 μ M よりも低濃度の JA に対する応答においても、OsCOI2 が主要に関与するのかを検討するため、50 μ M MeJA で処理したイネから合成した cDNA を用いた遺伝子発現解析

を行った。*OsCPS2*はMeJA未処理時に*oscoi2#2*で発現量が上昇していたものの、*oscoi2#1*では発現上昇は起こらず、ほかの変異株でも野生型と同等の発現量だった (Fig.2-15)。50 μ M MeJAで処理すると、野生型と*oscoi1a*変異株、*oscoi1b*変異株では50倍から100倍程度の発現量を示した。それに対して*oscoi2*変異株では野生型と比較して発現量が低下する傾向だった。野生型と*oscoi1a*変異株、*oscoi1b*変異株では50 μ M MeJA処理時に*OsCPS4*は3倍から10倍程度、*OsNOMT*は50倍から100倍程度まで発現量が上昇したが、*oscoi2*変異株ではこれら遺伝子の発現量は野生型と比較して顕著に低下していた。しかし、*OsKSL4*と*OsKSL7*は*oscoi1b#3*ではMeJA処理による発現量が上昇していたが、他の変異株と野生型では発現誘導は起こっていなかった。これは、*oscoi1b#3*のMeJAに対する感受性が他のイネよりも高かった可能性が考えられるが、その原因は不明である。また、これら遺伝子は500 μ M MeJA処理で発現誘導が起こったが、50 μ M MeJAで発現誘導が起こらなかったことから、JA-Ileに対する応答性は他のファイトアレキシン生合成遺伝子と比較して低いことが考えられる。*OsMYC2*は50 μ M MeJA処理をすることで野生型と*oscoi1a*変異株、*oscoi1b*変異株は3倍ほどまで発現量が上昇したが、*oscoi2*変異株では2倍程度の発現量であり、野生型よりも低下していた。また、*OsMYC2*は500 μ M処理時と50 μ M MeJA処理時の相対発現量がほぼ同等であり、*OsMYC2*は低濃度のJAに対しても鋭敏に応答すると考えられる。

イネにおいて、フラボノイド型ファイトアレキシンであるサクラネチンは、*OsMYC2*を介して生合成されることが報告されている (Ogawa et al., 2017b)。一方で、ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成における上流のシグナル伝達機構は明らかになっていない。遺伝子発現解析の結果を踏まえると、*oscoi2*変異株でファイトアレキシンが蓄積しない理由として、*OsMYC2*の発現量が低下することで、その下流にある*CPS*や*KSL*などのファイトアレキシンの生合成に主に機能する酵素の発現量が低下し、生合成されるファイトアレキシンも低下するものと考えられる。

2-3-6 JA誘導性の老化の解析

植物にJAを処理すると老化が促進することが知られており、イネ葉身にJAを処理するとクロロフィルが分解することで葉が黄色に変化して老化が誘導される。そこでイネ *COI*変異株のリーフディスクを用いてMeJAを処理し、老化促進の指標としてクロロフィル含有量を定量することでJA誘導的な老化の解析を行うこととした。

*oscoi1a*変異株において、MeJA未処理時に野生型よりもクロロフィル含有量が多かった (Fig.2-16A)。これを200 μ M MeJAで72 h処理すると、MeJA未処理時のクロロフィル含有量の半分程度まで減少した。500 μ M MeJAで72 h処理することでさらにクロロフィル含有量はその半分程度となり、*oscoi1a*変異株は野生型と同等にMeJAの濃度依存的にクロロフィルが分解された。*oscoi1b*変異株でもMeJAを処理することで、その濃度依存的にクロロフィルが分解されていた (Fig.2-16B)。*oscoi2*変異株ではMeJAを処理してもクロロ

フィル含有量は低下せず、JA に対する抵抗性を示した (Fig.2-16C)。 *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株は MeJA の濃度依存的にクロロフィル含有量が低下したことから、クロロフィルの分解が起こっていた (Fig.2-16D)。以上の結果より、OsCOI2 が JA 誘導的に引き起こされる老化について主に機能することが示唆された。

本研究では連続白色光下において、JA 誘導的な老化には OsCOI2 が主要に関与することを示したが、*OsCOI1b* の 3'非翻訳領域に T-DNA が挿入された変異株を用いた先行研究では、暗黒条件下における *oscoi1b* 変異株のクロロフィル含有量が低下し、OsCOI1b が暗黒下誘導的なクロロフィルの分解に主要に関与することが報告されている (Lee et al., 2015)。本研究で用いた *oscoi1b* 変異株では、MeJA 処理ではクロロフィルの分解が野生型と同様に起こった (Fig.2-16B)。これらの結果の違いが生じた理由として、老化を誘導するシグナル伝達が MeJA 処理と暗黒処理の間で異なることが挙げられる。葉の老化には、JA をはじめとして、エチレンやアブシジン酸、サイトカイニンなど様々な植物ホルモンが協調的または拮抗的に作用している (Zhang and Zhou, 2013; Zhu et al., 2017)。このように暗黒下によって誘導されるシグナル伝達には、複雑な機構が存在する可能性が考えられる。

また、OsMYC2 の過剰発現株を JA 処理すると、野生型と比較して *OsMYC2* 過剰発現株のクロロフィル含有量は半分程度に低下することが報告されている (Uji et al., 2016)。このことから、JA-Ile の受容体として OsCOI2 が、その下流の転写因子として OsMYC2 が老化に関与することが考えられるが、老化に関与するリプレッサーである COI と共に受容体複合体を形成する JAZ はまだ明らかになっていない。イネ JAZ の変異株や過剰発現株を用いた解析によって、JA による老化が誘導されるシグナル伝達機構の全容を明らかにしていく必要がある。

2-3-7 伸長抑制の解析

JA 処理によって伸長生長の抑制の解析を行うために、JA を含む寒天培地にイネの種子を播種し、芽生えの各部位のサイズを計測する方法を用いた。これは、シロイヌナズナにおいて JA の感受性を解析するために広く知られた方法であり、イネにおいても同様の実験が行われた例が存在する (Yang et al., 2012)。本研究では、JA を含む寒天培地に播種した野生型株および変異株の第二葉鞘および根の長さを測定した。

その結果、*oscoi1a* 変異株は JA 未処理時に第二葉鞘が野生型よりも長い傾向があった (Fig.2-17A)。この変異株は JA の濃度依存的に伸長が抑制され、20 μ M では未処理時の半分程度まで伸長が抑制された。*oscoi1b* 変異株も JA 未処理時の第二葉鞘は野生型株よりも長い傾向があった (Fig.2-17B)。JA の濃度が高くなるにつれ伸長が抑制され、20 μ M JA 処理時には未処理時の半分程度まで第二葉鞘の伸長が抑制されるが、野生型と比較すると JA 処理時にも *oscoi1b* 変異株は JA に対する抵抗性を示しているように見えた感受性が、若干低下していた。*oscoi2* 変異株はラインごとに差異はあるものの、JA 未処理時に野生型よりも第二葉鞘が徒長していた (Fig2-17C)。これに JA を処理すると伸長が抑制され、*oscoi1a*

変異株や *oscoi1b* 変異株と同様に未処理時の半分程度まで抑制がかかっていた。*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株は顕著な第二葉鞘の徒長が見られた (Fig2-17D)。それぞれの単独変異株においても JA 未処理時に第二葉鞘が徒長しており、遺伝子変異の影響が相加的に見られた。*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株もそれぞれの単独変異株と同様に JA の濃度依存的に第二葉鞘の伸長が抑制されたが、伸長抑制に対して若干の抵抗性を示していた (Fig.2-18)。この結果から、第二葉鞘の伸長抑制には OsCOI1a と OsCOI1b が冗長的に関与すること示された。一方で、*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株でも JA によって伸長が抑制されていることから、OsCOI2 が関与する可能性も考えられる。また、JA 未処理時に *oscoi1a* 変異株と *oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株の第二葉鞘は野生型よりも徒長していたことから、JA の外生投与による伸長抑制だけでなく、生体内の JA による伸長生長の制御に OsCOI1a と OsCOI1b、OsCOI2 が関与する可能性も示唆された。

次に根の伸長抑制の測定を行うと、*oscoi1a* 変異株と *oscoi1b* 変異株では野生型と同等に伸長が抑制された (Fig.2-19A、B)。一方で、*oscoi2* 変異株では 5 μ M と 10 μ M、20 μ M の JA に対して顕著な抵抗性を示し、根の伸長生長が抑制されなかった (Fig.2-19C)。*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株は、JA 未処理時に根が顕著に徒長する表現型を示したが、JA の濃度依存的に野生型と同程度まで伸長が抑制された (Fig.2-19D)。このことから、OsCOI1a と OsCOI1b が生体内における JA 依存的な根の伸長抑制に関与するとともに、JA の外生投与による伸長抑制には OsCOI2 が関与することを示唆する結果となった。さらに先ほどの結果を受けると、地上部と地下部における伸長抑制の制御メカニズムが異なっている可能性が考えられた。

先行研究では、RNAi 法を用いて *OsCOI1a* と *OsCOI1b* の転写量を約 20%に抑制した植物体の解析では、20 μ M MeJA 処理時に第二葉鞘の伸長生長の抑制が野生型よりも緩和することが報告されていた (Yang et al., 2012)。この実験では OsCOI1a と OsCOI1b を同時に発現抑制していることから、このどちらかがもしくは両方が伸長抑制に関与するかは明確にされていなかった。また、RNAi 法によって *OsCOI2* の転写量が抑制されているのかどうかは報告されておらず、伸長抑制に対して OsCOI2 の関与は不明であった。本研究では *oscoi1a* 変異株と *oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株、*oscoi1a oscoi1b* 二重変異株を用いた解析により、地上部の伸長における OsCOI2 単独での部分的な関与の可能性を見いだした。

地上部の伸長抑制については、寒天培地の JA を根から吸収した後に地上部で作用する際に、根で吸収された JA が地上部へ移行して作用する可能性と、吸収した JA を根で受容した後に地上部へとシグナルが伝達される可能性が考えられる。本研究によって第二葉鞘と根の伸長生長の抑制に関与するイネ COI は異なっていることから、今後地上部と地下部の JA シグナル伝達の全容解明に向けた手掛かりとなることが予想される。

2-3-8 *oscoi2* 変異株の生理障害部位における MDA の測定

温室で生育させた *oscoi2* 変異株は、播種後 2 か月から 3 か月ほど経過すると葉身の中央

付近から先端部にかけて病斑のようなものが観察される (Fig.2-20A)。この部位と、その下部を健全部位としてサンプリングし、細胞内の酸化ストレスの指標として用いられる MDA の蓄積量を測定した。すると、この生理障害部位では有意差はないものの、*oscoi2* 変異株の 2 ライン共に生理障害部位での蓄積量が増加していた (Fig.2-20B)。これは、OsCOI2 が生育過程で暴露される何かしらのストレスの消去に重要な機能を果たしていることが考えられる。また、ジテルペン型ファイトアレキシン生産におけるマスター転写因子 *DPF* の過剰発現株では、小さな褐色の擬似病斑が観察されるが、*oscoi2* 変異株で生じるものとは異なっている (Yamamura et al., 2015)。今後は、この生理障害の出現メカニズムの詳細を目指し、その足掛かりとなるであろう JA シグナル伝達に関与する遺伝子に注目して解析を行って、必要があると考えられる。

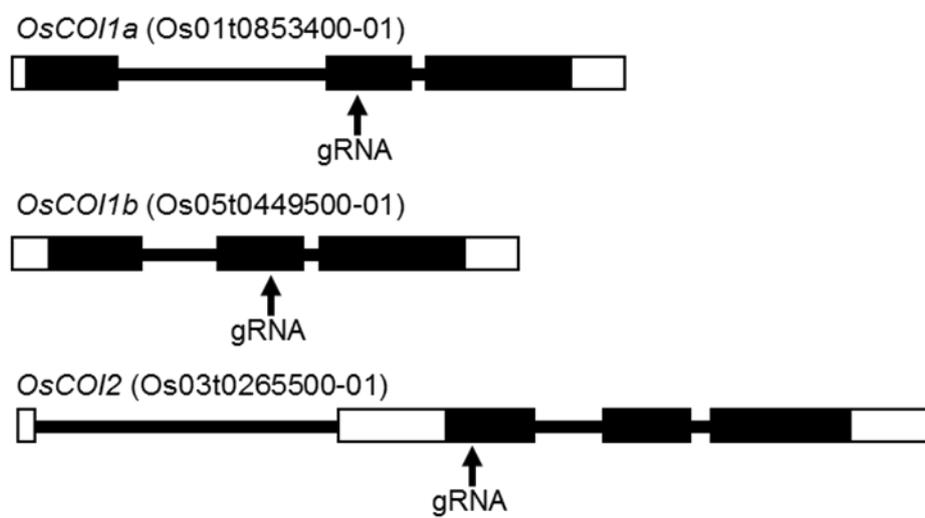


Figure 2-1 イネ *COI*遺伝子における変異株作出のためのターゲット領域 (Inagaki et al. (2022) より引用)

非翻訳領域を白抜きのバーで、翻訳領域を黒塗りのバーで、ターゲット領域として gRNA を作った箇所を矢印で示した。



Figure 2-2 ゲノム編集に用いた遺伝子カセット

OsU6::gRNA: OsU6 プロモーターにそれぞれの COI 特異的な gRNA を連結したもの

2×35S::Cas9: カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターのエンハンサー領域を 2 つ連結したプロモーターに連結させた *Cas9* 遺伝子

35S::HPT: カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターにハイグロマイシン耐性遺伝子を連結させたもの

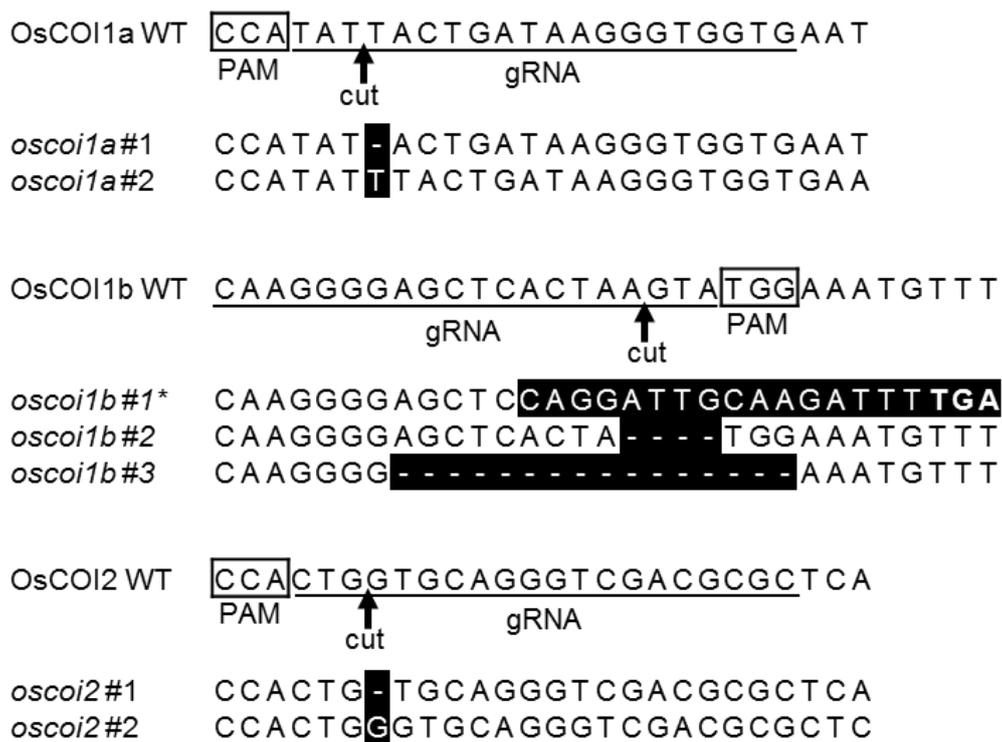


Figure 2-3 本研究で特定した変異株の変異導入部位およびその配列 (Inagaki et al. (2022) より引用)

枠で囲った配列が PAM 配列、下線で示した配列が gRNA 配列であり、変異の導入された配列を白抜きで示した。

```

OsCOI1b WT ATCAGTGACTGTGACTTTTCAGATTTAATTGGATTTTCCGGATGGCTGCATCATTGCAA
oscoi1b#1 ATCAGTGACTGTGACTTTTCAGATTTAATTGGATTTTCCGGATGGCTGCATCATTGCAA

OsCOI1b WT GAGTTTGCGGGAGGGGCATTCATTGAGCAAGGGGAGCTCACT - - - - - AAGTA TGG A
oscoi1b#1 GAGTTTGCGGGAGGGGCATTCATTGAGCAAGGGGAGCTCCAGGACATTGCAAGATTT TGA

OsCOI1b WT AATGTTAAATTCCCTTCAAGACTGTGCTCCTTAGGACTTACGTACATGGGGACAAACGAG
oscoi1b#1 AATGTTAAATTCCCTTCAAGACTGCAAGAGTTTG - - - - - CGGG

OsCOI1b WT ATGCCATTATCTTCCCTTCTCTGCATTACTCAAGAAGCTGGACTTGCAGTACACTTTT
oscoi1b#1 AGGGGCAT - - - - -

OsCOI1b WT CTCACCACTGAAGATCACTGCCAACTCATTGCAAAATGTCCCAACTTACTAGTTCTTGCG
oscoi1b#1 - - - - TCACTGAAGATCACTGCCAACTCATTGCAAAATGTCCCAACTTACTAGTTCTTGCG

OsCOI1b WT GTGAGGAATGTGATTGGAGATAGAGGATTAGGGGTGTTGCAGACACATGCAAGAAGCTA
oscoi1b#1 GTAATGTCT - - - - -

OsCOI1b WT CAAAGACTCAGAGTTGAGCGAGGAGATGATGATCCAGGTTTGCAAGAAGAACAAGGAGGA
oscoi1b#1 - - - - - CCTTTATATATGCATTATGAAGATATTCAATTTAT - - - - -

OsCOI1b WT GTCTCTCAAGTCGGGTGACAACCTGTAGCCGTAGGATGCCGTGAACTGGAATACATAGCT
oscoi1b#1 - - - - - TAGTTAACCTATGACATGG - - - - - TAACT

OsCOI1b WT GCCTATGTGTCTGATATCACAAATGGGGCCCTGGAGTCTATTGGGACTTTCTGCAAAAAT
oscoi1b#1 AACATTGTAATGCAATCTACAGGTGAGGAATG - - - - -

```

Figure 2-4 *oscoi1b* 変異株#1 の塩基配列 (Inagaki et al. (2022) より引用)

野生型と *oscoi1b*#1 の塩基配列について、CLUSTALW で配列を比較した。CLUSTALW には GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を使用した。枠で囲った配列が PAM 配列、下線で示した配列が gRAN は配列、終止コドンは白抜きで示した。

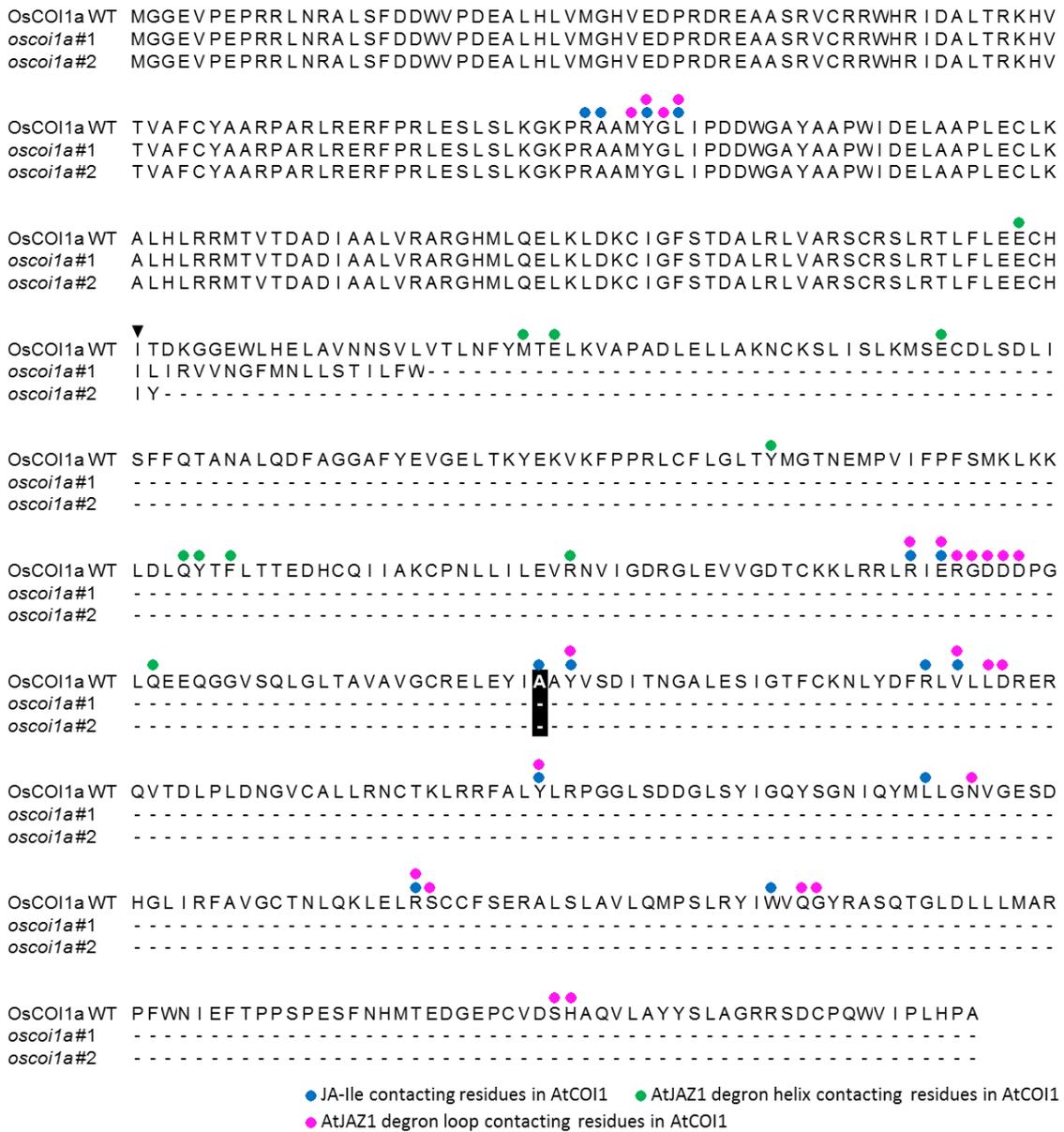


Figure 2-5 *oscoi1a* 変異株のアミノ酸配列のアライメント (Inagaki et al. (2022) より引用)

野生型と *oscoi1a* 変異株のアミノ酸配列について、CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) で配列を比較した。JA-Ile の認識に重要なアミノ酸残基を白抜きで示した。青丸は AtCOI1 に対応する JA-Ile と接する残基を、緑丸は AtCOI1 において AtJAZ1 デグロンのヘリックスと接する残基に対応するものを、赤丸は AtCOI1 において AtJAZ1 デグロンのヘリックスと接する残基に対応するものを示した。矢頭は Cas9 のターゲットを示した。

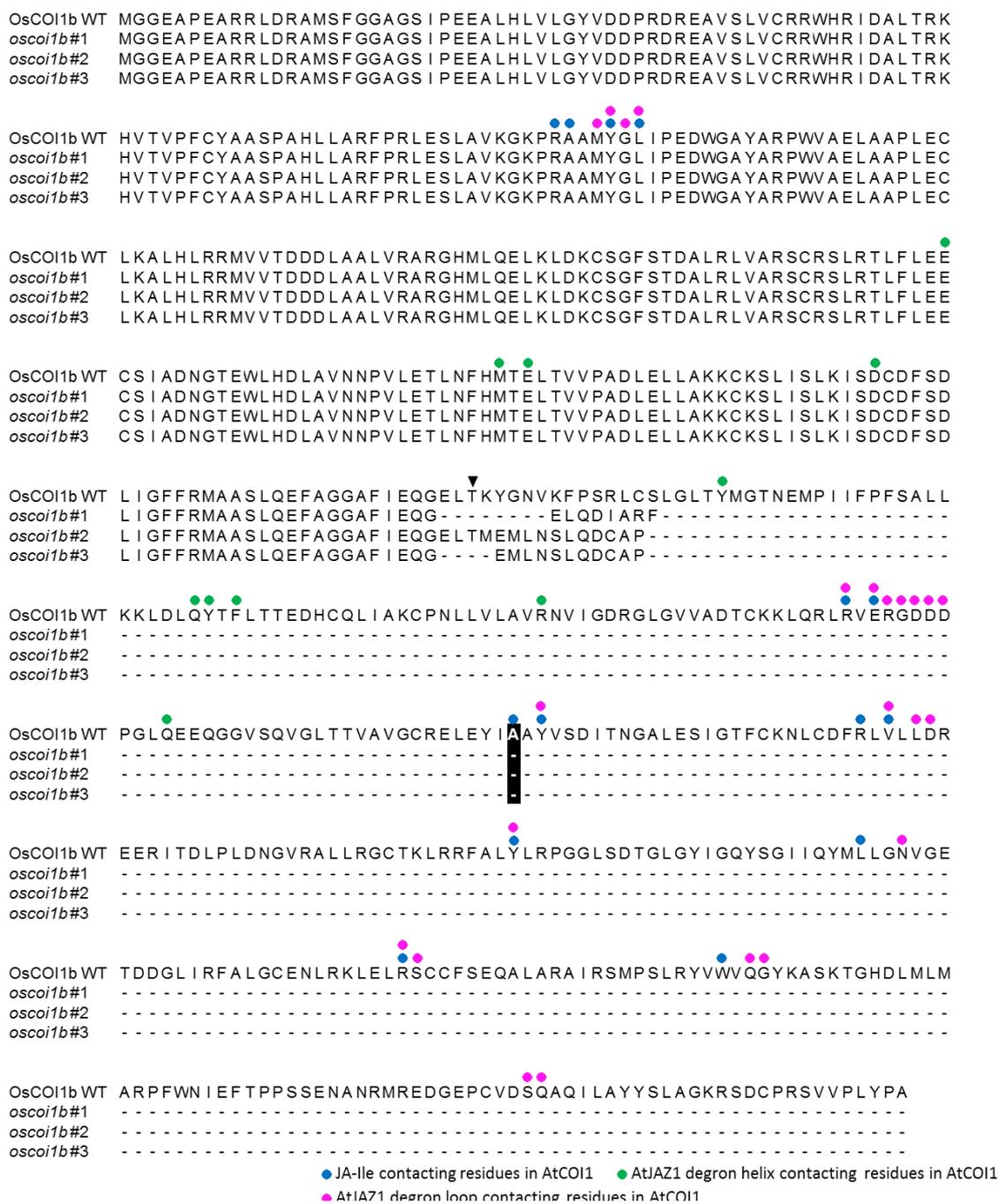


Figure 2-6 *oscoi1b* 変異株のアミノ酸配列のアライメント (Inagaki et al. (2022) より引用)

野生型と *oscoi1b* 変異株のアミノ酸配列について、CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) で配列を比較した。JA-Ile の認識に重要なアミノ酸残基を白抜きで示した。青丸は AtCOI1 に対応する JA-Ile と接する残基を、緑丸は AtCOI1 において AtJAZ1 デグロンのヘリックスと接する残基に対応するものを、赤丸は AtCOI1 において AtJAZ1 デグロンのヘリックスと接する残基に対応するものを示した。矢頭は Cas9 のターゲットを示した。

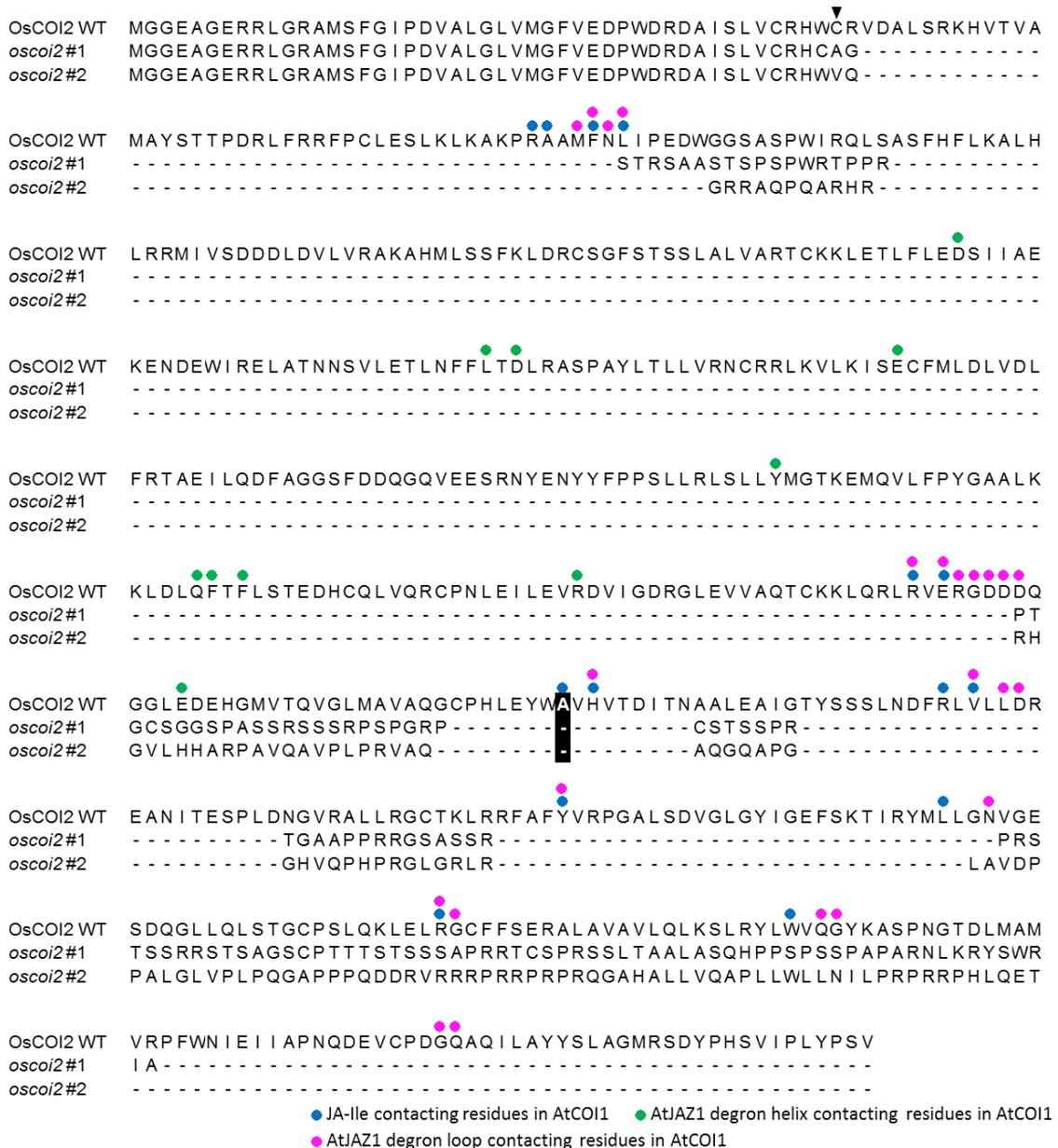
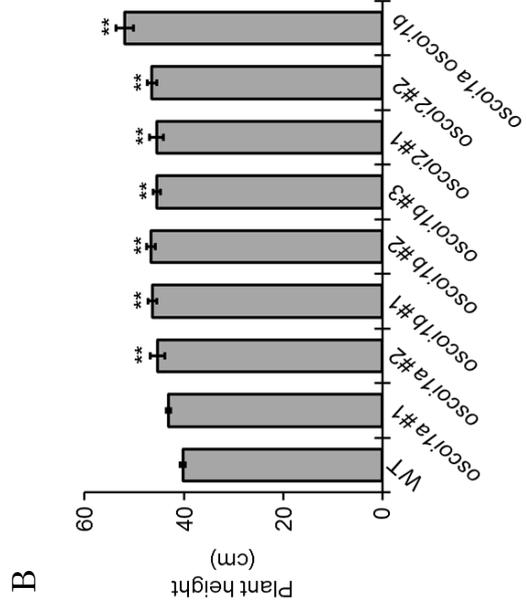


Figure 2-7 *oscoi2* 変異株のアミノ酸配列のアライメント (Inagaki et al. (2022) より引用)

野生型と *oscoi2* 変異株のアミノ酸配列について、CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) で配列を比較した。JA-Ile の認識に重要なアミノ酸残基を白抜きで示した。青丸は AtCOI1 に対応する JA-Ile と接する残基を、緑丸は AtCOI1 において AtJAZ1 デグロンのヘリックスと接する残基に対応するものを、赤丸は AtCOI1 において AtJAZ1 デグロンのヘリックスと接する残基に対応するものを示した。矢頭は Cas9 のターゲットを示した。



A



B

Figure 2-8 栄養生長期のイネ *COI* 変異株とその長さ (Inagaki et al. (2022) より引用)

A: 5.5 葉期のイネ *COI* 変異株

スケールバーは 10 cm を示す。

B: 変異株における地上部の長さ

means ± S.E. (n=6), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

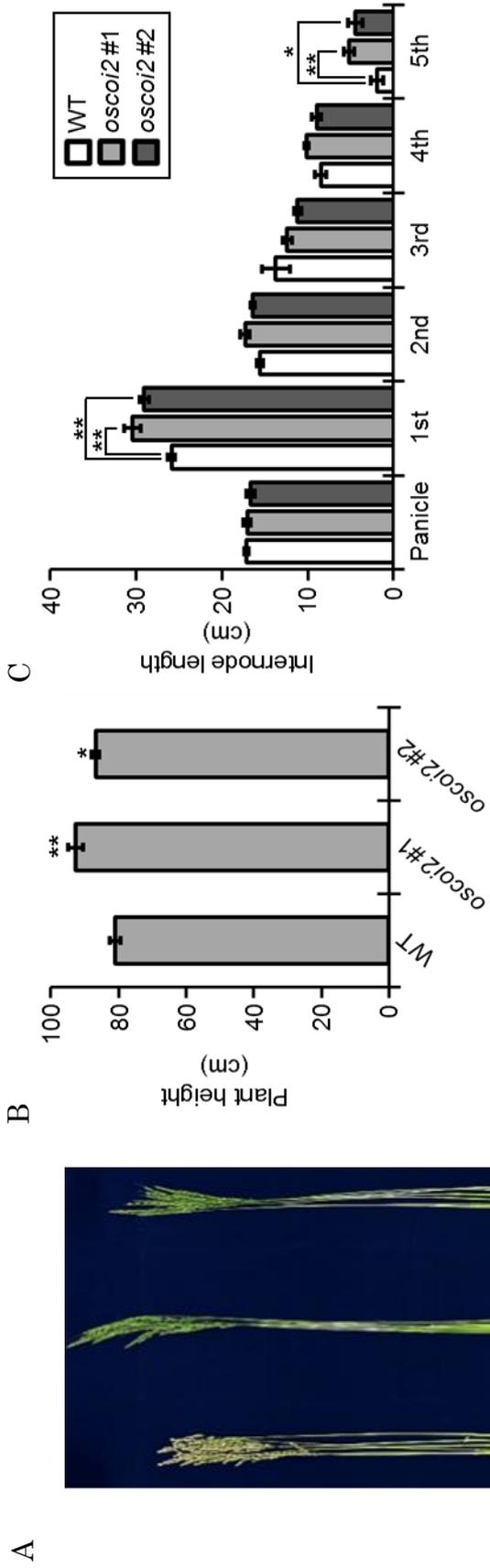


Figure 2-9 生殖生長期のイネ *COI* 変異株とその長さ (Inagaki et al. (2022) より引用)

A: 出穂期のイネ *COI* 変異株

スケールバーは 10 cm を示す。

B: *oscoi2* 変異株における地上部の長さ

means ± S.E. (n=6), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

C: *oscoi2* 変異株の節間長

means ± S.E. (n=6), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

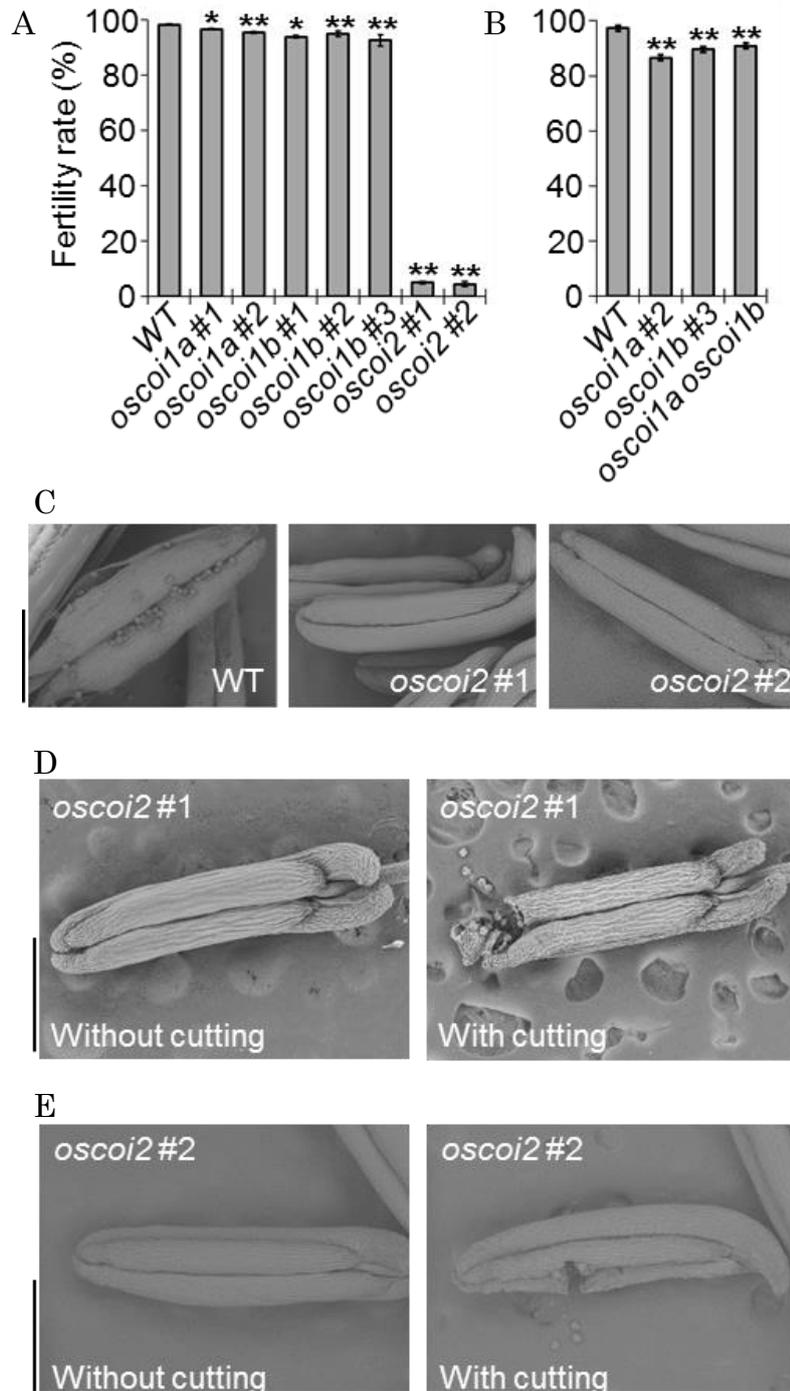


Figure 2-10 イネ *COI* 変異株の稔実率と *oscoi2* 変異株の葯の形態 (Inagaki et al. (2022) より引用)

A: イネ *COI* 単独変異株の稔実率 means±S.E. (n=6), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

B: *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株の稔実率 means±S.E. (n=6), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

C: *oscoi2* 変異株の開花後の葯 スケールバーは 500 μ m を示す。

D: *oscoi2* #1 の葯の内部と花粉 スケールバーは 1 mm を示す。

E: *oscoi2* #2 の葯の内部と花粉 スケールバーは 1 mm を示す。

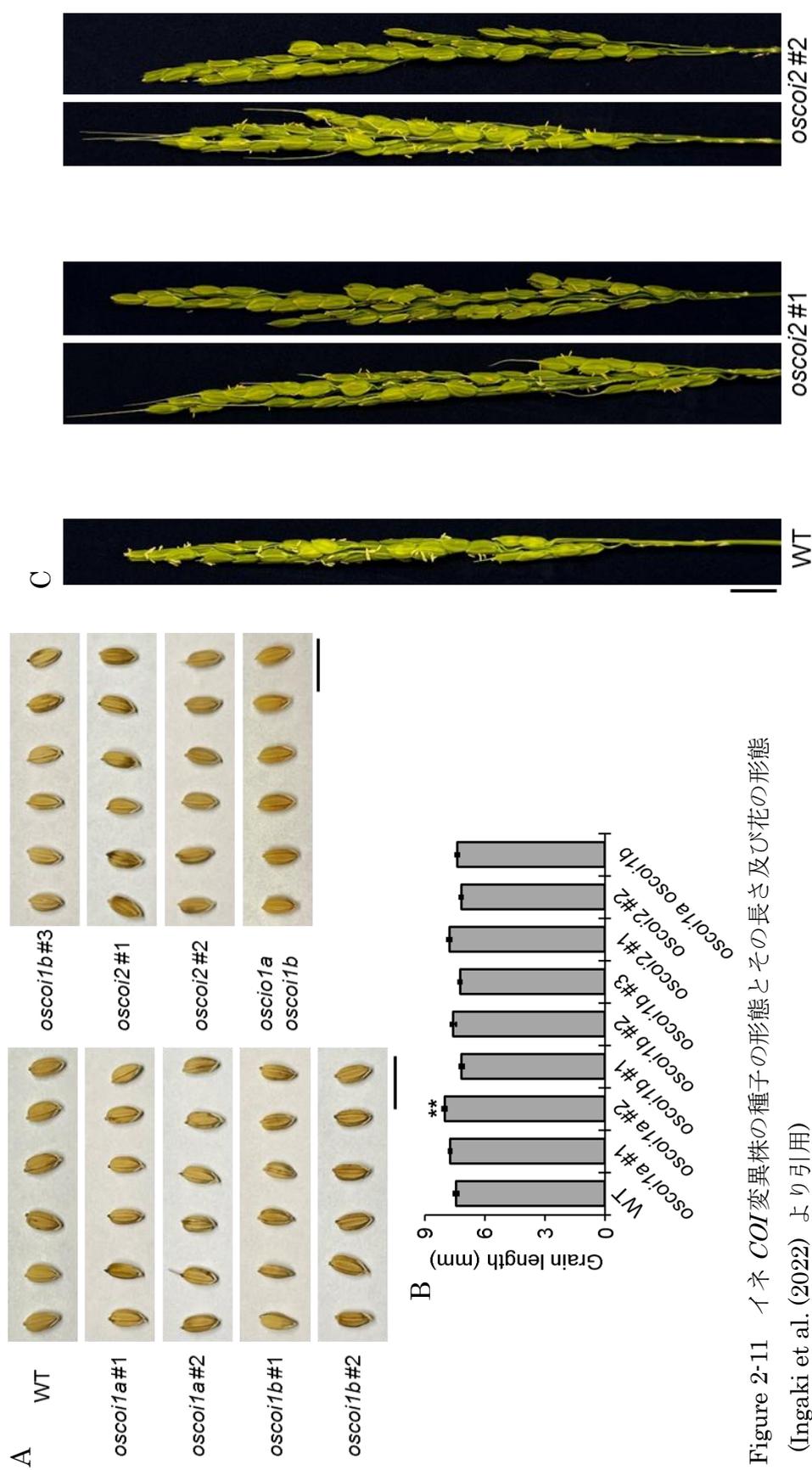


Figure 2-11 イネ *COI* 変異株の種子の形態とその長さ及び花の形態 (Ingaki et al. (2022) より引用)

A: イネ *COI* 変異株の種子の形態 スケールバーは 1 cm を示した。

B: イネ *COI* 変異株の種子の長さ means ± S.E. (n=10), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

C: *oscoi2* 変異株の花序の形態 スケールバーは 10 cm を示す。

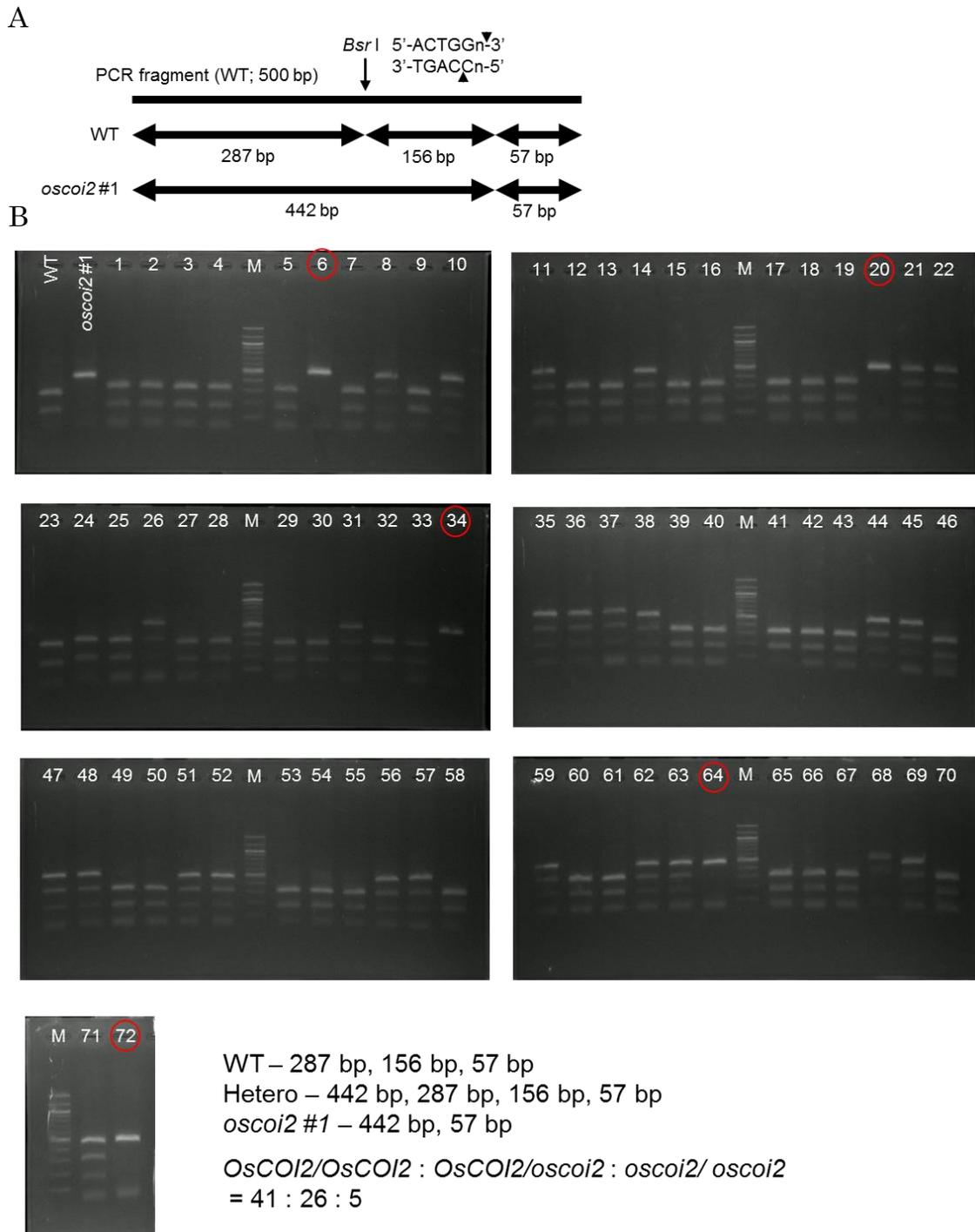


Figure 2-12 制限酵素による *OsCOI2/oscoi2* の分離比の解析 (Inagaki et al. (2022) より引用)

A: *Bsr*I によるジェノタイピングのモデル

B: *OsCOI2/oscoi2* の分離比

M: 100 bp マーカー

WT は野生型を、赤丸は *oscoi2*#1 のホモ接合体を示した。

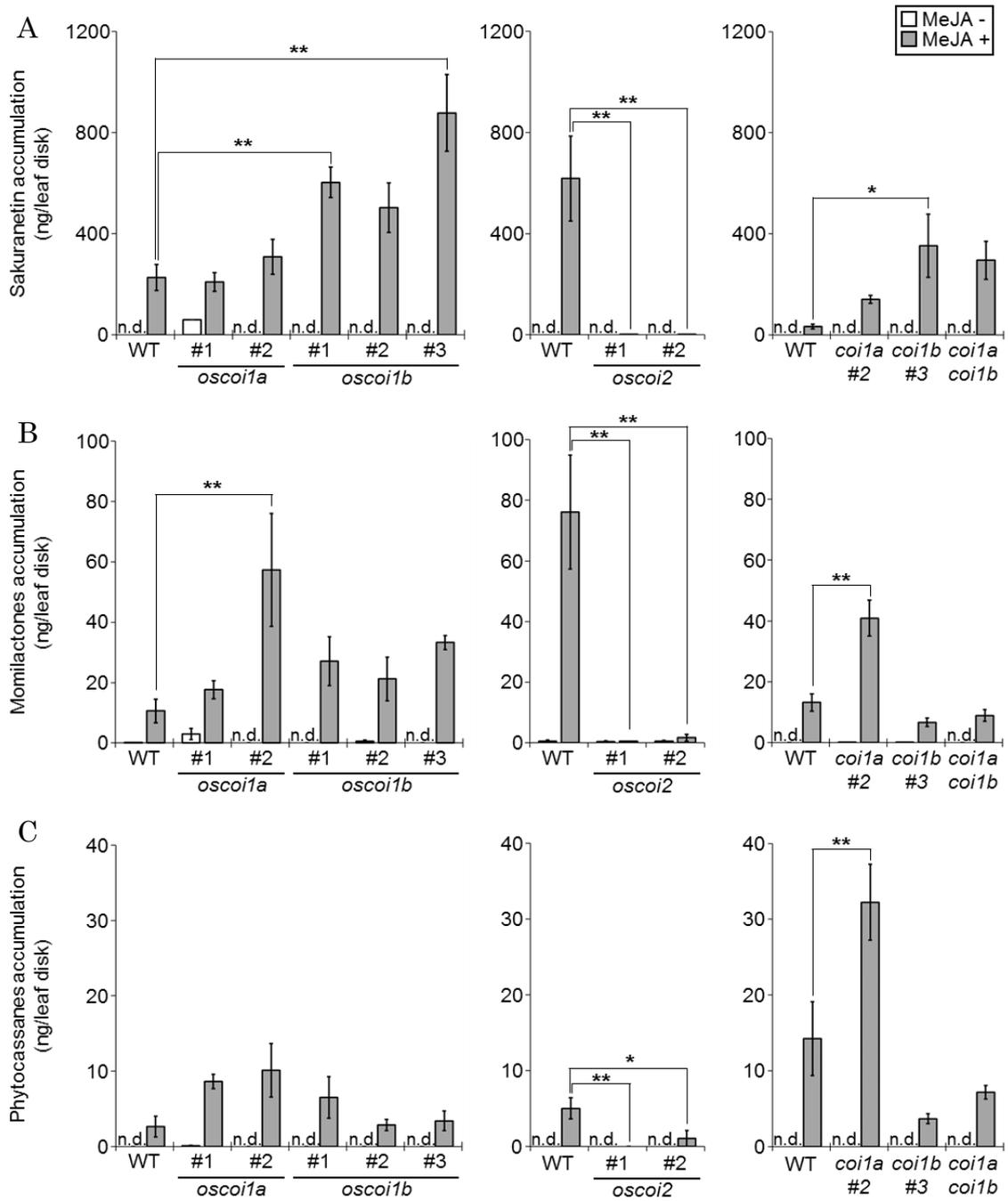


Figure 2-13 イネ *COI* 変異株のファイトアレキシン蓄積量 (Inagaki et al. (2022) より引用)

白は MeJA 未処理を、グレーは 500 μ M MeJA 処理の結果を示した。

A: 変異株におけるサクラネチンの蓄積量

B: 変異株におけるモミラクトンの蓄積量

C: 変異株におけるファイトカサンの蓄積量

means \pm S.E. (n=5), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

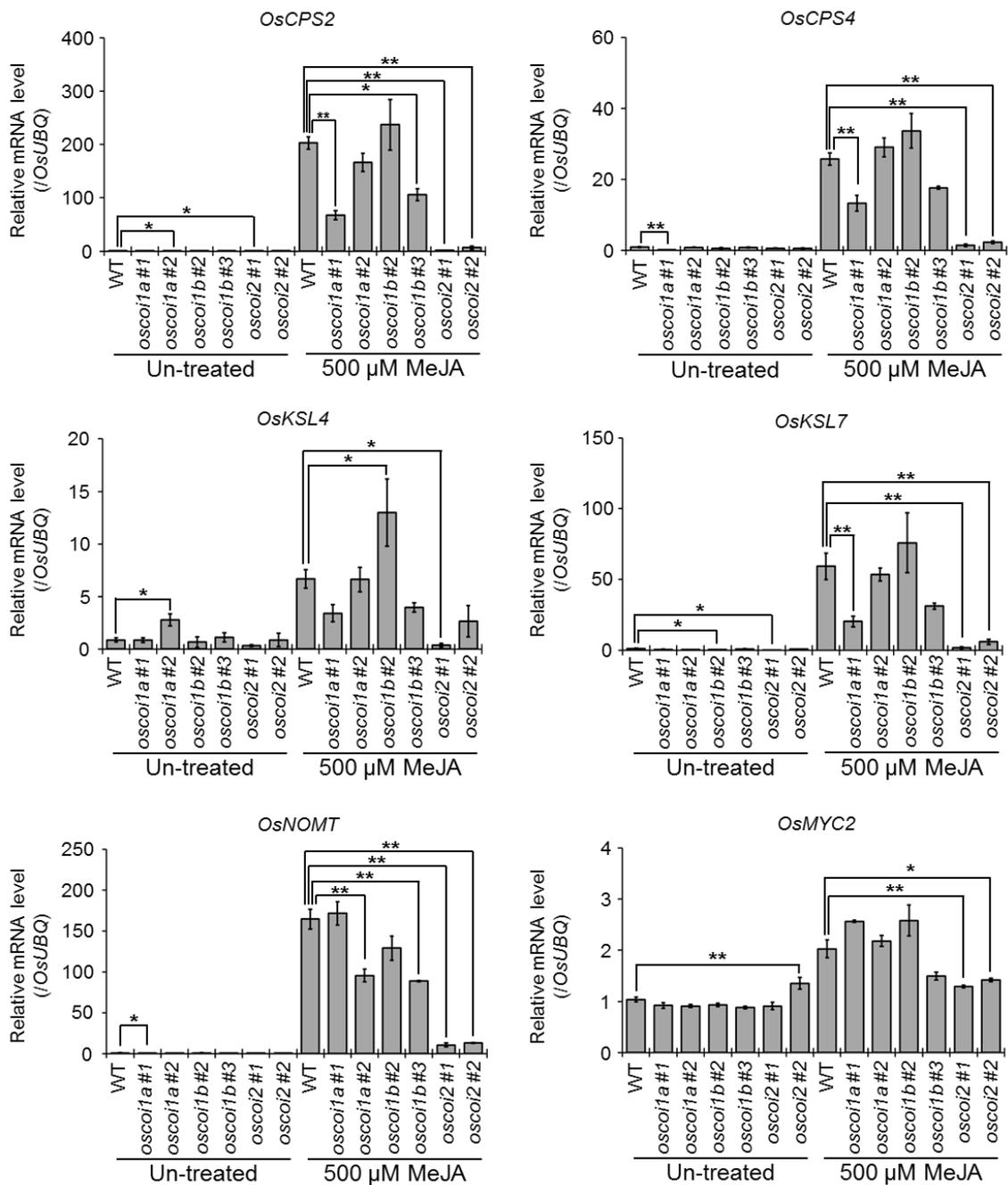


Figure 2-14 500 μM MeJA 処理による JA 応答性遺伝子の発現量 (Inagaki et al. (2022) より引用)

グラフの縦軸は各遺伝子の発現量をユビキチンの発現量で補正し、野生型株の値に対する変異株の発現量の相対値を示した。横軸はイネの種類と MeJA の処理濃度を記した。means±S.E. (n=3), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

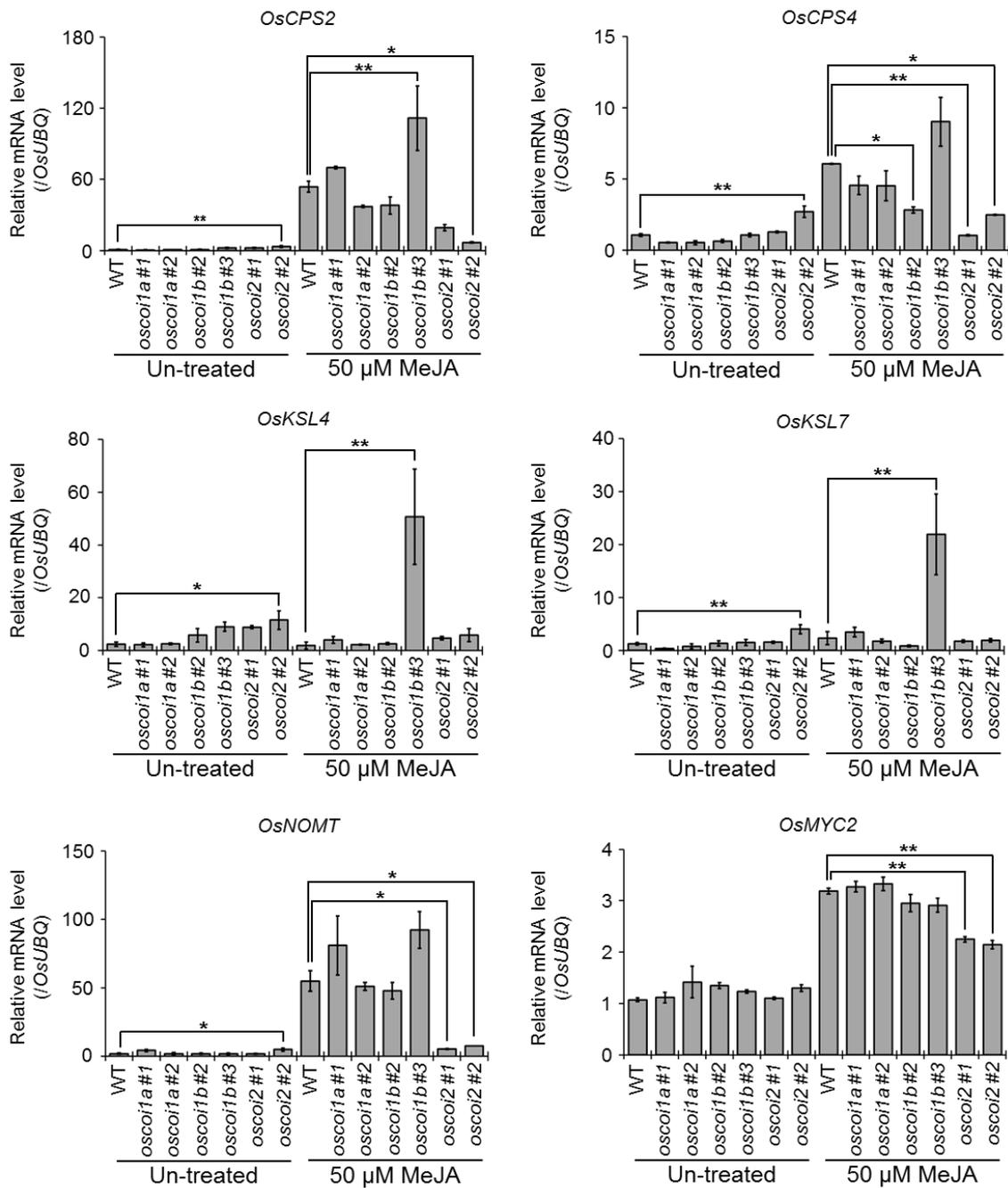


Figure 2-15 50 μ M MeJA 処理による JA 応答性遺伝子の発現量 (Inagaki et al. (2022) より引用)

グラフの縦軸は各遺伝子の発現量をユビキチンの発現量で補正し、野生型株の値に対する変異株の発現量の相対値を示した。横軸はイネの種類と MeJA の処理濃度を記した。

means \pm S.E. (n=3), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

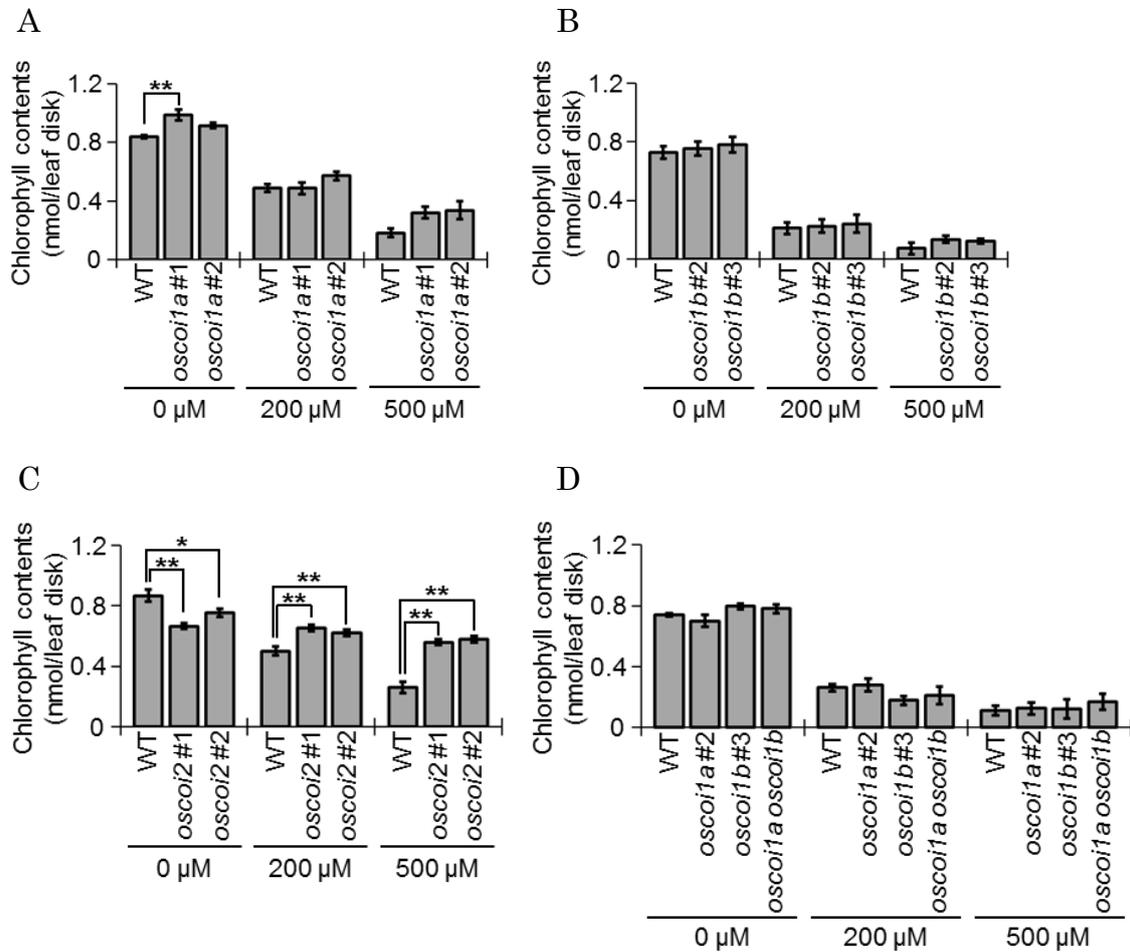


Figure 2-16 イネ *COI*変異株のクロロフィル含有量 (Inagaki et al. (2022) より引用)
 横軸はイネの種類と MeJA の処理濃度を記した。

A: MeJA 処理による *oscoi1a* 変異株のクロロフィル含有量

B: MeJA 処理による *oscoi1b* 変異株のクロロフィル含有量

C: MeJA 処理による *oscoi2* 変異株のクロロフィル含有量

D: MeJA 処理による *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株のクロロフィル含有量

means±S.E. (n=5), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

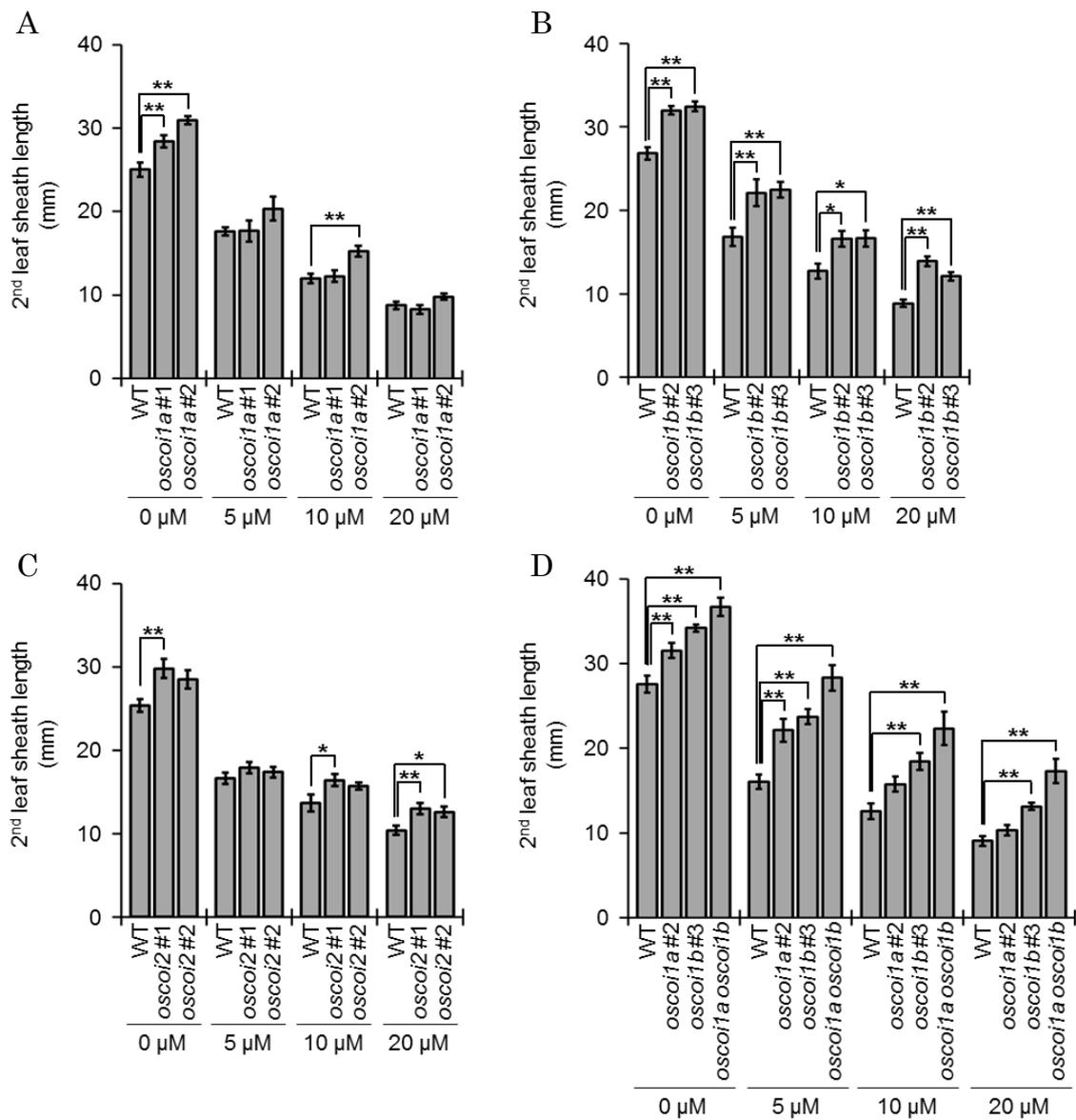


Figure 2-17 イネ *COI* 変異株の第二葉鞘の伸長抑制解析 (Inagaki et al. (2022) より引用)

5、10、20 μM JA を含む寒天培地にて 10 日間生育させた後、第二葉鞘の長さを測定した。横軸はイネの種類と MeJA の処理濃度を記した。

A: JA 処理時の *oscoi1a* 変異株の第二葉鞘長

B: JA 処理時の *oscoi1b* 変異株の第二葉鞘長

C: JA 処理時の *oscoi2* 変異株の第二葉鞘長

D: JA 処理時の *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株の第二葉鞘長

means±S.E. (n=9~10), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

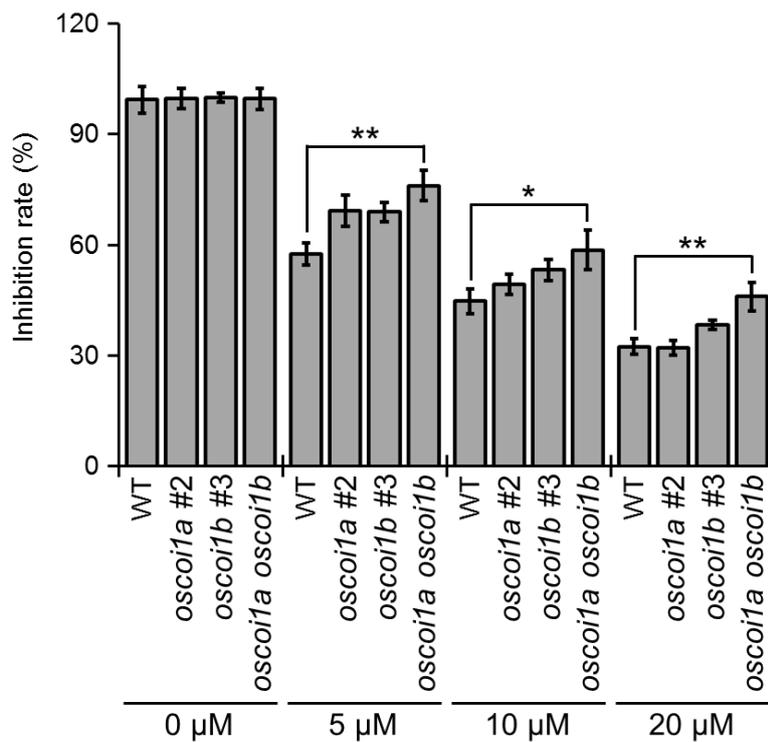


Figure 2-18 *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株の第二葉鞘の抑制割合

実測値の幾何平均値でグラフを作成した。各イネにおける JA 未処理時の値を 100 とした時の各割合を示した。横軸はイネの種類と MeJA の処理濃度を記した。

means±S.E. (n=9~10), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

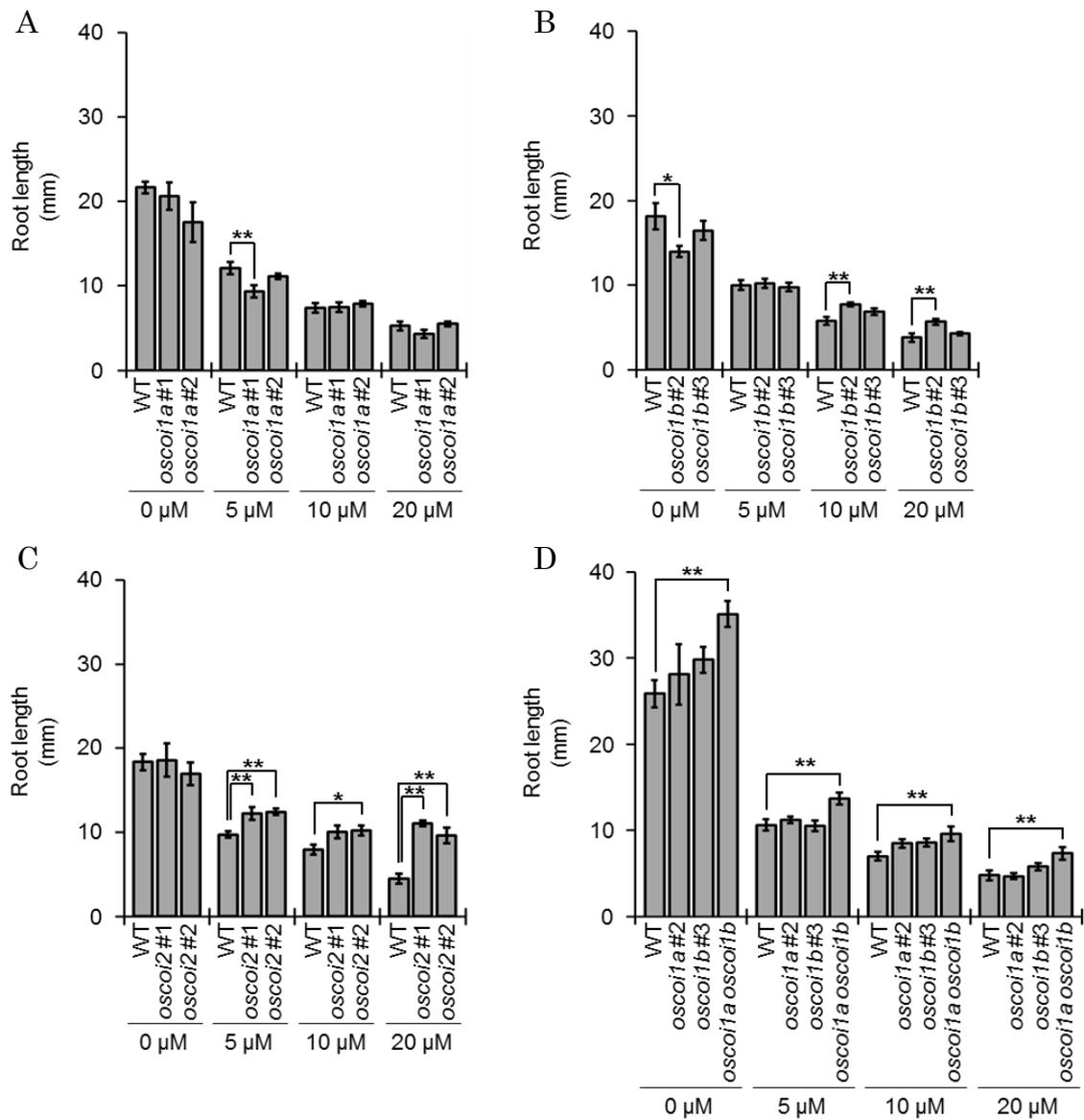


Figure 2-19 イネ *COI*変異株の根の伸長抑制解析 (Inagaki et al. (2022) より引用)

5、10、20 μM JA を含む寒天培地にて 10 日間生育させた後、根の長さを測定した。横軸はイネの種類と MeJA の処理濃度を記した。

A: JA 処理時の *oscoi1a* 変異株の根の長

B: JA 処理時の *oscoi1b* 変異株の根の長

C: JA 処理時の *oscoi2* 変異株の根の長

D: JA 処理時の *oscoi1a oscoi1b* 二重変異株の根の長

means±S.E. (n=9~10), Dunnett's test (* $p<0.05$; ** $p<0.01$)

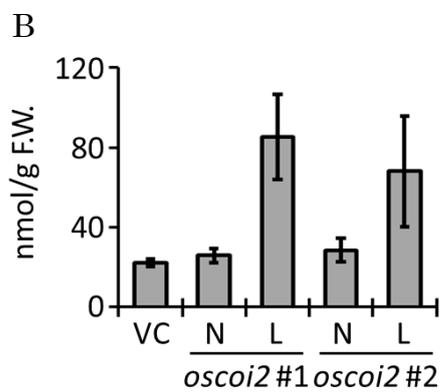


Figure 2-20 *oscoi2*変異株のMDA蓄積量

A: *oscoi2*変異株で観察される生理障害

スケールバーは1 cmを示す。

B: *oscoi2*変異株の生理障害部位におけるMDA蓄積量

VC: ベクターコントロール

N: 健全部位

L: 生理障害部位

means±S.E. (n=3), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

Table 2-1 本研究において検出したイネ *COI*変異株の遺伝子型一覧

mutant	genotype
<i>oscoi1a</i> #1	1 bp deletion
<i>oscoi1a</i> #2	1 bp insertion
<i>oscoi1b</i> #1	大規模変異
<i>oscoi1b</i> #2	4 bp deletion
<i>oscoi1b</i> #3	16 bp deletion
<i>oscoi2</i> #1	1 bp deletion
<i>oscoi2</i> #2	1 bp insertion

第3章 イネ COI-JAZ の相互作用解析

3-1 緒言

第2章の解析から、OsCOI2 が稔性や JA 誘導的な防御応答と老化、根の伸長抑制などに主要に関与する一方で、OsCOI1a と OsCOI1b、OsCOI2 の機能が重複して地上部の伸長抑制に関与することが明らかとなった。このことから、イネの COI は機能分化していると考えられる。COI1 は JAZ と複合体を形成して JA-Ile 受容体として機能する。そこで、本章では、イネ COI と JAZ の間の相互作用の選択性について解析を行い、OsCOI2 とのみ特異的に相互作用する JAZ を明らかにすることを試みた。

3-2 材料と方法

3-2-1 活性型ジャスモン酸イソロイシンの精製

天然型 JA-Ile の精製

JA-Ile 平衡混合物 (化合物 1、2、3、4) (Fig. 3-1) は、Ogawa and Kobayashi (2008) の方法に従ってラセミ体の JA と L-イソロイシンを縮合することによって合成した。この化学合成は、帝京大学工学部バイオサイエンス学科 内田健一教授に依頼して行って頂いた。次に、Jikumaru et al. (2004) の方法に従い、逆相 HPLC にて天然型 JA-Ile (化合物 1、2) を精製した。HPLC の条件を以下に記す。約 30 min 平衡化をした後、メタノールで溶解した 25 mg/mL JA-Ile 平衡混合物を 500 μ L インジェクションし、約 30 min と約 40 min のピークをそれぞれ分取した。分取したサンプルはロータリーエバポレーターで濃縮し、ヘキサンを用いて酢酸を共沸させた。LC-MS/MS に供し精製の確認を行った。

<分取用逆相 HPLC の条件>

HPLC: LC-20AD (SHIMADZU)

カラム: ODS-4253-D 10 ϕ \times 250 mm (センシユウ科学)

移動相: A 0.1% CH₃COOH in water

B 0.1% CH₃COOH in CH₃OH (A: B = 43: 57)

流速: 3 mL/min

検出波長: 210 nm

<分析用 HPLC の条件>

HPLC: Agilent Technologies 1200 series

カラム: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18

移動相: A 0.05% CH₃COOH in water

B 0.05% CH₃COOH in CH₃CN

Time (min)	%B	Flow (mL/min)
0	10	0.2
10	98	0.2
10.1	98	0.3
15	98	0.3
15.1	10	0.2
25	10	0.2

<分析用 MS/MS の条件>

MS/MS: Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS

Ion source: ESI

イオン化条件

共通パラメーター

Gas Temp.	300°C
Gas Flow	5 L/min
Nebulizer	45 psi
Sheath Gas Temp.	350°C
Seath Gas Flow	11 L/min
Capillary	3500 V
Nozzle Voltage	500 V

Scan Segments

JA-Ile	¹³ C ₆ -JA-Ile	CE	Polarity
322 > 130	328 > 136	16	Negative
322 > 172	328 > 178	8	

活性型 JA-Ile の精製

上記で精製した天然型 JA-Ile (化合物 1、2) を用いて、順相 HPLC にて活性型 JA-Ile (化合物 1) を精製した。Fonseca et al. (2009) と Takaoka et al. (2019) の手法を参考に、溶出溶媒とカラムを下記の通りに変更した。約 30 min 平衡化した後、エタノールで溶解した 100 mM の天然型 JA-Ile (化合物 1、2) を 100 μL と溶出溶媒 400 μL を混合した計 500 μL のサンプルをインジェクションし、約 30~32 min のピークを分取した。この際、化合物 1 以外の JA-Ile 異性体が入ってこないよう、可能な限りピークのみを回収するようにした。分取したサンプルは熱による異性化の可能性があるので、加熱せずにロータリーエバポレーターで濃縮し、トルエンを用いて酢酸を共沸した。これに窒素ガスを吹き付けて乾固し、エタノールで溶解して 10 mM のストックとして -80°C で保存し、一部を LC-MS/MS に供した。条件は上に記したものと同様の条件で検出した。

<順相 HPLC の条件>

HPLC: LC-20AD

カラム: NUCLEOSIL 50-5 10×250 (W) (ケムコプラス)

移動相: A 0.15% CH₃COOH in CH₃(CH₂)₄CH₃

B 0.15% CH₃COOH in CH₃CH₂OH (A: B = 96: 4)

流速: 3 mL/min

検出波長: 220 nm、254 nm

3-2-2 共免疫沈降法によるタンパク質の相互作用解析

免疫沈降

本実験の概要は Fig.3-2 に記した。本解析で用いる組み換えタンパク質である OsCOI-GST は昆虫細胞発現系で発現・精製したものを、fluorescein を結合した OsJAZ ペプチドは人工合成したものを東北大学大学院生命科学研究科 上田実教授に分与して頂いた。OsJAZ ペプチドは、Jas モチーフのアミノ酸配列に対応する (Fig. 3-7)。リガンドには 3-2-1 で精製した活性型 JA-Ile (化合物 1) を使用した。サンプル当たりの反応液の組成は Table3-1 に記した。

反応液の調製に際しては、タンパク質の安定性を考慮して 1×IP buffer、cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Merck)、IP5、GST-OsCOI、リガンド、fluorescein-OsJAZ の順にチューブに加えていった (Table 3-1)。これを 4°C で 1 h インキュベートし、抗 fluorescein 抗体 (GeneTex) を 0.2 μL ずつ加えて、4°C で 1 h ローテーターで転倒混和した。ここに、あらかじめ 1×IP buffer で洗浄した Surebeas™ Protein G Magnetic Beads (BIO-RAD) を 10 μL ずつ添加し、さらに 4°C で 1 h ローテーターで転倒混和した。その後、magnetic stand で bead を回収し、1×PBS-T で 3 回洗浄した。これを 1×sample buffer (100 mM DTT+) で懸濁し、60°C で 10 min 処理することでタンパク質の変性を行った。

SDS-PAGE

免疫沈降にて回収し、変性させたサンプルを 8% のアクリルアミドゲルに 5 μL ずつアプライして、ゲル 1 枚当たり 0.03 A の電圧で約 1 h 泳動した。

試薬の組成

○2×IP buffer

Tris	1.212 g (100 mM)
NaCl (関東化学)	1.16 g (200 mM)
Glycerol (関東化学)	20 mL (20% v/v)
Tween 20 (関東化学)	0.2 mL (0.2% v/v)
超純水	fill up to 100 mL

4°C で保存し、使用前に超純水と 1:1 となるよう希釈してから、2-mercaptoethanol (ナカライテスク) を 20 mM となるよう加えて、HCl で pH7.8 に調整して 1×IP buffer とした。

○10×SDS 泳動 buffer

Tris	15.1 g
ラウリル硫酸ナトリウム (SDS; 関東化学)	5 g
グリシン (関東化学)	72.1 g
蒸留水	fill up to 500 mL

SDS-PAGE の泳動には蒸留水で 10 倍希釈してから使用した。

○転写用 buffer

10×SDS 泳動 Buffer	10 mL
メタノール (関東化学)	20 mL
蒸留水	70 mL
<hr/>	
total	100 mL

○20×PBS

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄ (関東化学)	11.5 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄ (和光純薬)	2 g
蒸留水	fill up to 500 mL

上記の試薬を蒸留水で溶解し、オートクレーブで滅菌した。これを蒸留水で 20 倍希釈して pH7.4 に調整し、tween20 を 0.1% になるよう加えて 1×PBS-T としたものを使用した。

SDS-PAGE 用ゲルの組成

○濃縮ゲル (2 枚分の組成)

濃縮ゲル buffer (0.5 M Tris pH6.8)	1 mL
30(w/v)%-アクリルアミド/ビス (ナカライテスク)	667 μL
分子生物学純水	2.23 mL
10%SDS 溶液 (ナカライテスク)	40 μL
N,N,N',N'-テトラメチルエタン-1,2-ジアミン (TEMED; ナカライテスク)	6.6 μL
10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS; ナカライテスク)	66 μL

○10%分離ゲル (2 枚分の組成)

分離ゲル buffer (1.5 M Tris pH8.8)	2.5 mL
30(w/v)%-アクリルアミド/ビス	3.33 mL
分子生物学純水	4.03 mL
10%SDS 溶液	100 μL
TEMED	20 μL
10%APS	75 μL

○8%分離ゲル (2枚分の組成)

分離ゲル buffer (1.5 M Tris pH8.8)	2.5 mL
30(w/v)%-アクリルアミド/ビス	2.66 mL
分子生物学純水	4.64 mL
10%SDS 溶液	100 μ L
TEMED	20 μ L
10%APS	75 μ L

ウェスタンブロットティング

ブロットティング装置 (Trans-Blot SD Cell 221BR 41285; BIO-RAD) を用いて、SDS-PAGE で分離したタンパク質を、転写用 buffer に浸したニトロセルロースメンブレン (BIO-RAD) へ 15 V で 30 min 転写した。転写後のメンブレンは、10 倍希釈した Blocking One (ナカライテスク) で 1 h 振盪してブロッキングした。その後、1×PBS-T で 2 min×2 回洗浄し、iBind™ Flex Western Device (ThermoFisher SCIENTIFIC) を使用して、抗体反応を行った。抗体には、抗 GST HRP conjugate 抗体 (GE ヘルスケア ライフサイエンス) を 25,000 倍希釈して使用した。

抗体反応終了後は、1×PBS-T で 2 min×2 回洗浄し、発光試薬として Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck) を使用して、ChemiDoc™ XRS+ (BIO-RAD) で化学発光を検出した。

3-2-3 本章で扱った gene ID

OsJAZ2: Os07g0153000, *OsJAZ4*: Os09g0401300, *OsJAZ5*: Os04g0395800

3-3 結果と考察

3-3-1 活性型ジャスモン酸イソロイシンの精製

JA-L-Ile は構造中に不斉炭素 (3 位および 7 位) が 2 つ存在しており、4 種の異性体が存在する。7 位については、ケトン基と隣接していることからケト-エノール互変異性によって立体が反転し、より熱力学的に安定な *trans* 型に変換される。その結果、7 位については *cis* 型: *trans* 型の存在比が 5: 95 の平衡混合物として水溶液中で存在する (Fig.3-1)。このため、JA-Ile は天然型の平衡混合物 (化合物 1、2) と非天然型の平衡混合物 (化合物 3、4) として考えることができる。生体内においては化合物 1 が生合成され、これが受容体と結合する活性型の分子である。細胞内でも、化合物 1 は時間経過とともに化合物 2 へと自然に変換される。

ラセミ体の JA と L-イソロイシンから化学合成された JA-Ile は天然型 (化合物 1、2) と非天然型 (化合物 3、4) の混合物であることから、まずは逆相 HPLC によって天然型 JA-Ile (化合物 1、2) と非天然型 JA-Ile (化合物 3、4) に分離した。約 30 min の RT に検出されるピークが非天然型 JA-Ile (化合物 3、4) であり、約 40 min の RT で検出されるピークが天然型の JA-Ile (化合物 1、2) であった (Fig.3-3)。これを濃縮して再度逆相 HPLC で精製を行うことで、非天然型 JA-Ile (化合物 3、4) の含量が 0.5%以下である天然型 JA-Ile の平衡混合物 (化合物 1、2) を得た (Fig.3-4)。

次に、天然型 JA-Ile (化合物 1、2) から *cis* 型 (化合物 1) と *trans* 型 (化合物 2) の JA-Ile の精製を順相 HPLC にてシリカゲルカラムを用いて行った。Fonseca et al. (2009) と Takaoka et al. (2019) の手法から、溶出溶媒とカラムを検討することで活性型 JA-Ile (化合物 1) の分離が向上した (Fig.3-5)。活性型 JA-Ile (化合物 1) は約 30~32 min の RT で検出され、非活性型 JA-Ile (化合物 2) は約 33 min にピークが検出された。これを濃縮し、酢酸を共沸させたものを活性型 JA-Ile (化合物 1) として得た。得られた活性型 JA-Ile (化合物 1) を LC-MS/MS に供して、標品である天然型 JA-Ile (化合物 1、2) と非天然型 JA-Ile (化合物 3、4) と比較すると、RT の異なるピークが検出され、活性型である (+)-7-*iso*-JA-Ile (化合物 1) を精製した (Fig.3-6)。

3-3-2 イネ COI-JAZ の共免疫沈降

本解析において、昆虫細胞系によって発現させた GST-OsCOI と人工合成した fluorescein-OsJAZ の相互作用解析を行った。JAZ は安定性が低いものが多いことから、発現させたタンパク質がすぐに失活してしまう。そこで JAZ の Jas ドメインのペプチドを用いることで、安定して COI との相互作用解析を行うことができる手法が確立されている (Takaoka et al., 2018; Saito et al., 2021) (Fig.3-7a)。この手法を用いて、divergent-Jas を含む OsJAZ2 と OsJAZ5 (Tian et al., 2019)、典型的な Jas ドメインを保持する JAZ として OsJAZ4 のそれぞれの Jas ドメインのペプチドとイネ COI の相互作用解析を行った

(Fig.3-8)。

活性型である(+)-7-*iso*-JA-Ile (化合物 1) の存在下で、OsCOI1a および OsCOI1b は、OsJAZ4 と共免疫沈降されたことから、OsCOI1a-OsJAZ4 と OsCOI1b-OsJAZ4 の組み合わせが相互作用することが示された (Fig.3-7B, Table3-2)。一方で、OsJAZ2 と OsJAZ5 のペプチドは、OsCOI1a と OsCOI1b のどちらとも共免疫沈降されなかった。このことから、OsCOI1a および OsCOI1b は OsJAZ2 および OsJAZ5 とは相互作用しないことが示唆された。

OsCOI2 と OsJAZ2 の組み合わせは、0.01 μ M (+)-7-*iso*-JA-Ile (化合物 1) の存在下では共免疫沈降されなかったが、0.1 μ M (+)-7-*iso*-JA-Ile (化合物 1) 存在下では共免疫沈降された (Fig.3-7B, Table3-2)。一方で、OsCOI2 と OsJAZ5 の組み合わせは、低濃度である 0.01 μ M (+)-7-*iso*-JA-Ile (化合物 1) の存在下でも共免疫沈降された。OsCOI2 と OsJAZ4 の組み合わせも、OsJAZ5 と同様に 0.01 μ M (+)-7-*iso*-JA-Ile (化合物 1) の存在下で共免疫沈降された。このことから、OsJAZ2 と OsJAZ5 は相互作用する COI に選択性があり、OsCOI2 とのみ相互作用することが示唆された。一方で、OsJAZ4 は OsCOI1a と OsCOI1b、OsCOI2 の全てのイネ COI と相互作用した。

さらに、OsJAZ2 と OsJAZ5 が OsCOI2 と相互作用する(+)-7-*iso*-JA-Ile (化合物 1) の濃度に差があり、COI と JAZ の組み合わせによって JA-Ile に対する親和性に差があることが示唆された。第 2 章の結果から、イネの COI が機能分化しており、OsCOI2 がイネの JA 応答において主に機能することが示されている。このイネ COI の生理機能の差異が JAZ に対する選択性や JA-Ile に対する親和性の違いによって生じている可能性が考えられる。

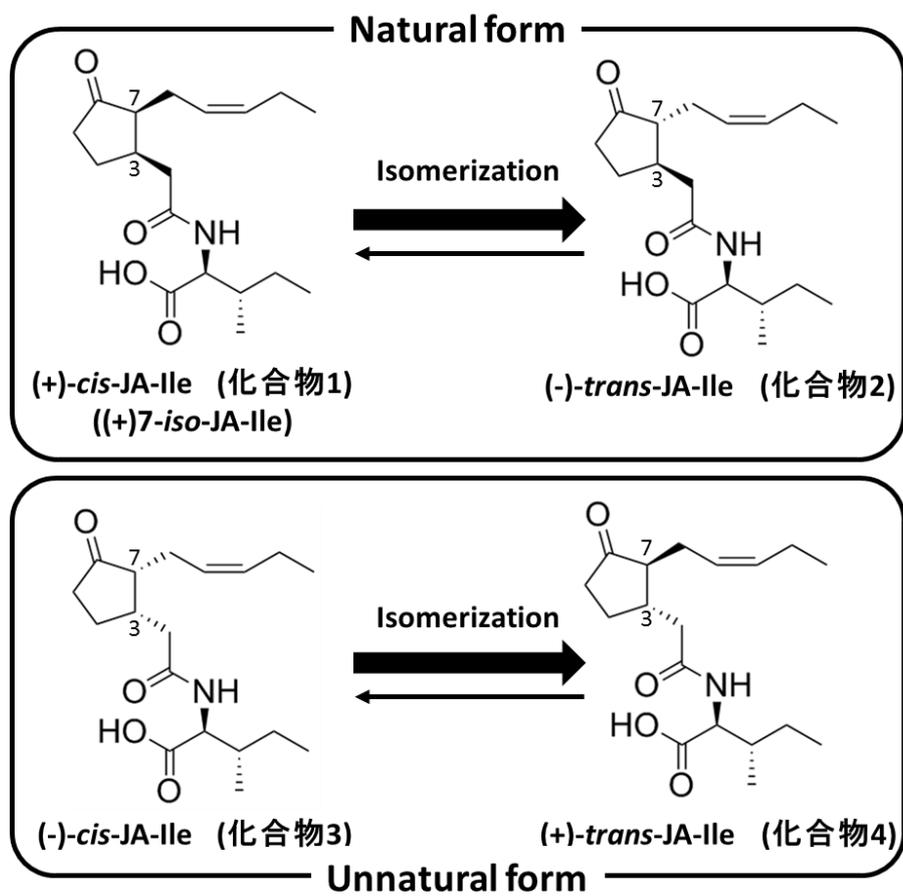


Figure 3-1 JA-Ile の異性体

受容体に結合する活性型は(+)-7-*iso*-JA-Ile である。また、水溶液中において *cis*-体と *trans*-体は 5: 95 の割合の平衡混合物として存在する。

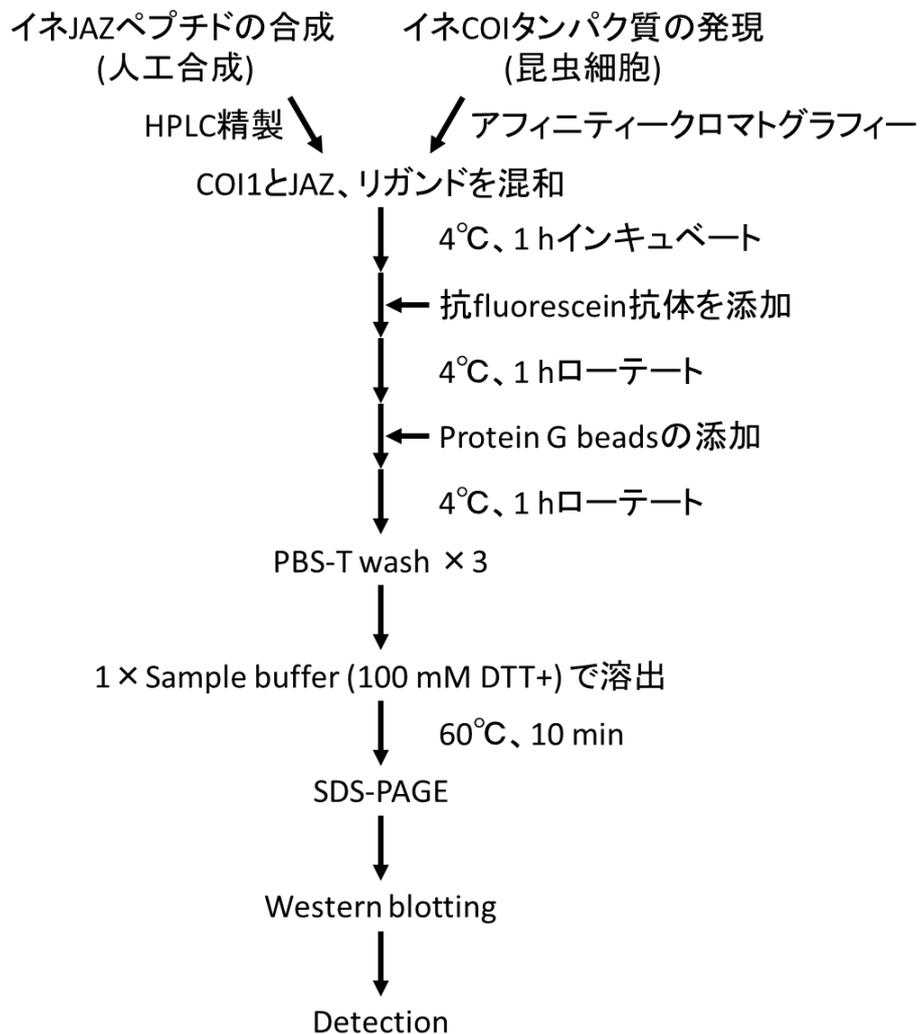


Figure 3-2 共免疫沈降法による COI1-JAZ の相互作用解析の概要

Takaota et al. (2018) と Saito et al. (2021) の方法に従って共免疫沈降を行った。

Table 3-1 共免疫沈降の組成

Sample	Concentration	Final concentration	Volume
Fluorescein-OsJAZ	10 μ M	10 nM	0.35 μ L
GST-OsCOI	each	5 nM	each
IP5	100 μ M	100 nM	0.35 μ L
1 \times IP Buffer			350 μ M
25 \times cOmplete			14 μ L
JA-Ile	0.01、0.1、1、10 mM	0.01、0.1、1、10 μ M	0.35 μ L

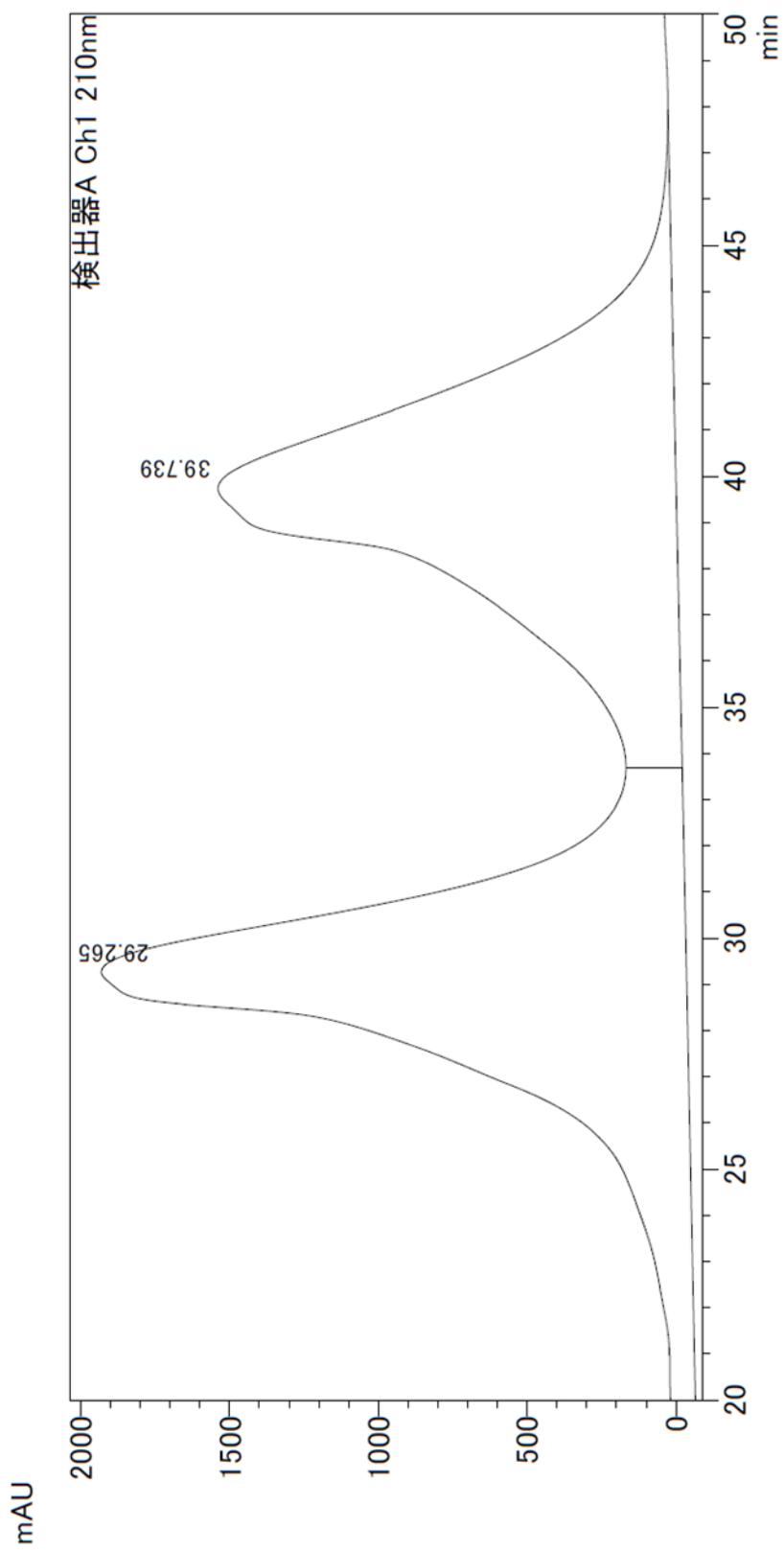
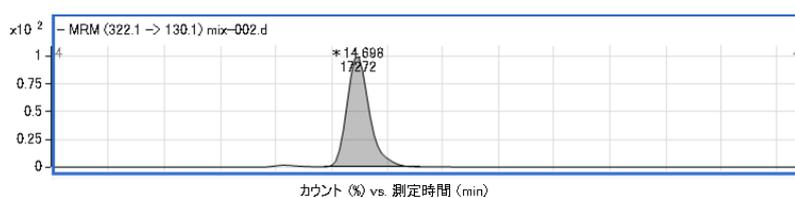
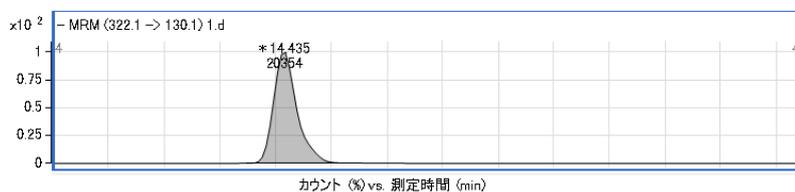


Figure 3-3 逆相 HPLC による天然型 JA-IIe のクロマトグラム
RT29.265 min のピークが非天然型 JA-IIe、RT39.739 min のピークが天然型 JA-IIe のピークである。

天然型JA-Ile (1, 2) 標品
(322>130)



非天然型JA-Ile (3, 4)
(322>130)



天然型JA-Ile (1, 2)
(322>130)

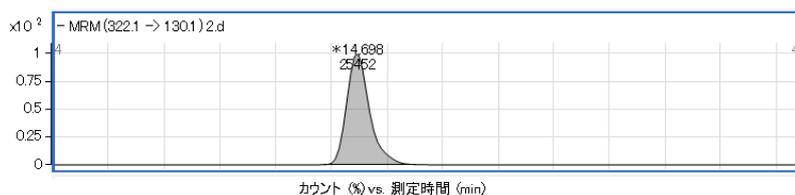


Figure 3-4 LC-MS/MSによる天然型JA-Ileのクロマトグラフィー
A: 100 pg/ μ Lの天然型JA-Ileの標品
B: 逆相HPLCで精製した非天然型JA-Ile
C: 逆相HPLCで精製した天然型JA-Ile

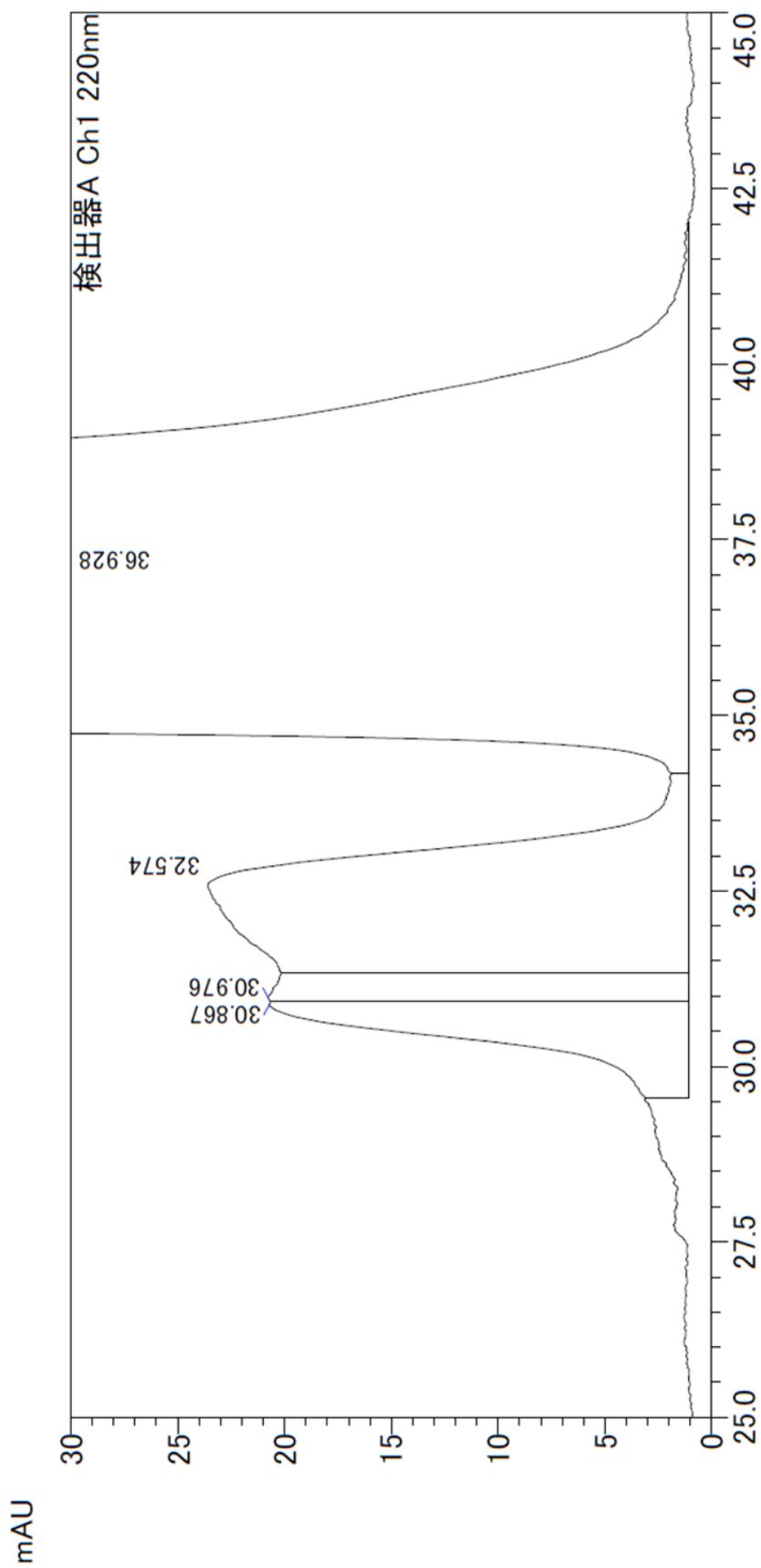


Figure 3-5 順相 HPLC による活性型 JA-IIe のクロマトグラム
 RT30~32 min のピークが活性型 JA-IIe、RT36.928 min のピークが非活性型 JA-IIe のピークである。

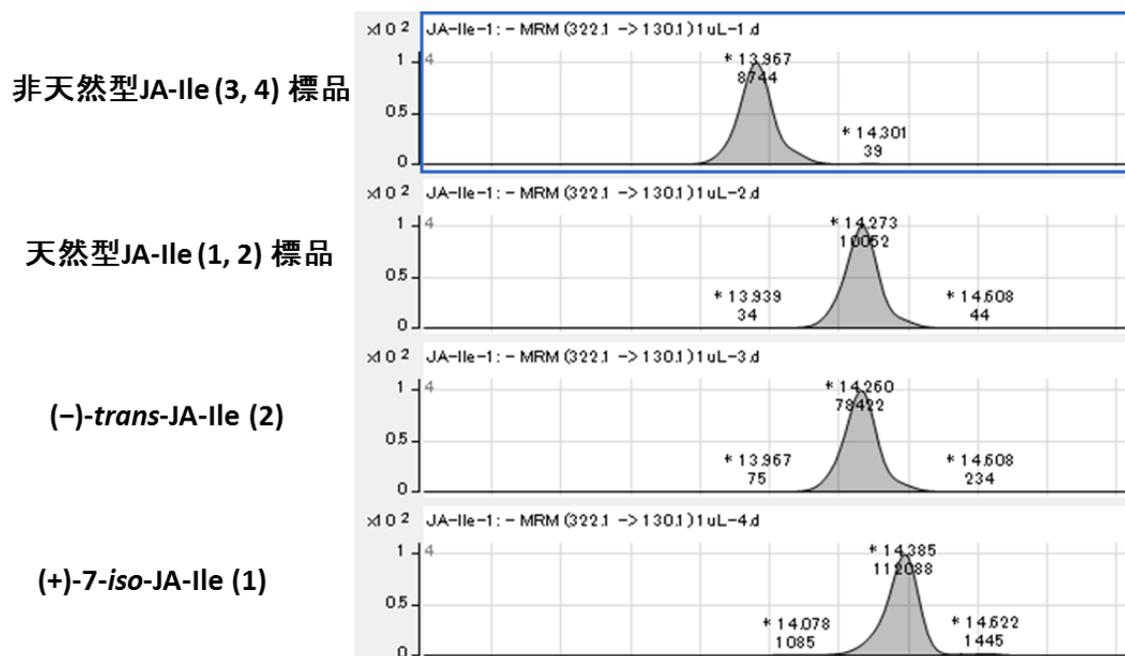


Figure 3-6 LC-MS/MSによる活性型JA-Ileのクロマトグラフィー
 逆相HPLCに複数回供し、分離したものを非天然型JA-Ile(化合物3、4)と天然型JA-Ile(化合物1、2)の標品として用いた。

Table 3-2 COI1-JAZ 相互作用解析のまとめ

	OsJAZ2					OsJAZ5					OsJAZ4				
	-	0.01	0.1	1	10	-	0.01	0.1	1	10	-	0.01	0.1	1	10
OsCOI1a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	○	○	○	○
OsCOI1b	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	○	○	○	○
OsCOI2	X	X	○	○	○	X	○	○	○	○	X	○	○	○	○

－はリガンドなしを、数字はリガンドの濃度 (μM) を示す。×は相互作用しないことを、○は相互作用することを示す。

```

OsJAZ2  - - - - - MAEERRRDD - - - - - GG - - - - -
OsJAZ4  - - - - - MERDFLGAIGKDEEQRRHAEERKESDYFGAGGGAAAAAMDWSFASRAALMSFRS
OsJAZ5  MSTRAPVELDFLGL - - - - - RAAAADADDRHAKSGG - - - - -

OsJAZ2  - DVEVELSLRLRT - - - - - GDDS - - - - -
OsJAZ4  SSSAAAAAREETRELAFPFHSALDGAKMQQASHVLARQKSFGAESHGIPQYAAAAVHG
OsJAZ5  SSASSSSIR - - - - - GMETSAIARIG - - - - -

OsJAZ2  - - - - - TSADPAPATVAAEA - - - - -
OsJAZ4  AHRGQPPHVLNGARVIPASSP FNPNNPMFRVQSSPNLPNAV GAGGGAFKQPPFAMGNAVA
OsJAZ5  - - - - - PHL LR - - RVIAAAGPPP - - - - - PSTAPVPEEMPAAAA - - - - -

OsJAZ2  - - - - - RRNL TIFY NGRMCAV - NVTELQARTII SMASQGNFGKQQQQIQ
OsJAZ4  GSTVG VYGT RDMPKAKAAQL TIFY AGSVNVFN NVSPEKAQELMFLASRGLPSAPTTVAR
OsJAZ5  - - - - - AAPMT LIFY NGSVAVF - DVSHDKAEAIMRMATEAT - - - - -
TIFY
motif

OsJAZ2  GRDDHHYHQGESS - - - - - SGGGVSTAAARHCDVAGS
OsJAZ4  MPEAHVFPPAKVTVPEVSPTKPMMLKQPQLVSSPVPAISKPSVVSQATSLPRSASSSNV
OsJAZ5  - - - - - KAKGLARGNAIVGN

OsJAZ2  SSSHSGSGSGSATPPRPALVSPRAGLQAAAAAPT MNQPPAASGLSMKRSLQRFLEKRKT
OsJAZ4  DSNVTKSSGPLVVPPTSLPPPAQPETLATT TAAAIM - - - PRAVPQARKASLARFLEKRKE
OsJAZ5  - - - - - FAKEPLTRTKSLQRFLSKRKE
JAZ degron Core sequence

OsJAZ2  R - - AAAPLYARR* - - - - -
OsJAZ4  RVTTVAPYPLAKSPLESSDTMG SANDNKSSCTDIALSSNRDESLSLGQPRTISFCEESPS
OsJAZ5  RL TSLGPYQVGGP - - - - - AAVGATTSTTTKSFLAKEEHTAS* - - - - -
C-terminal motif

OsJAZ2  - - - - -
OsJAZ4  TKLQI*
OsJAZ5  - - - - -
● JA-Ile contacting residues in AtJAZ1
● AtCOI1 contacting residues in AtJAZ1

```

Figure3-8 イネ JAZ のアミノ酸配列のアライメント

OsJAZ2 と OsJAZ4、OsJAZ5 のアミノ酸配列について、CLUSTALW で配列を比較した。CLUSTALW には GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を使用した。TIFY motif はグレーで、JAZ degron を黄色で、Core sequence をピンクで、C-terminal motif を青で示す。また、シロイヌナズナ JAZ1 において JA-Ile と接するアミノ酸残基に対応するものを緑の丸で、COI1 と結合するアミノ酸残基に対応するものを橙の丸で示す。

第 4 章 OsJAZ2 および OsJAZ5 の機能解析

4-1 緒言

第 3 章までの結果から、OsCOI2 がイネの JA 応答において主要な機能を持つこと、OsJAZ2 および OsJAZ5 が OsCOI2 と特異的に相互作用することが明らかになった。このことから、OsJAZ2 および OsJAZ5 が OsCOI2 の下流の様々な JA 応答性遺伝子の制御に関与していると考えられた。

OsJAZ2 および OsJAZ5 は OsCOI2 とのみ相互作用したことから、*oscoi2* 変異株においては JA-Ile 存在下でも OsJAZ2 および OsJAZ5 が分解されず、下流遺伝子を抑制していることが予想される。そこで、OsJAZ2 と OsJAZ5 についてそれぞれ過剰発現株を作出し、その表現型の解析を行うことで、OsJAZ2 および OsJAZ5 の機能解析を行うことにした。

4-2 材料と方法

4-2-1 大腸菌のコンピテントセルの作製

大腸菌のコンピテントセルは Inoue et al. (1990) を参考に作製した。まず、ガラス試験管 ($\Phi 25$ mm \times 200 mm) と、500 mL 三角フラスコをオートクレーブで滅菌した。以降の操作は、クリーンベンチにて無菌的に操作を行った。*Escherichia coli* DH5 α のグリセロールストックを、白金耳を用いて抗生物質を含まない LB 寒天培地に植菌して、37°C で 16 h 培養した。得られたシングルコロニーを、SOB 培地 2 mL を分注した試験管へ植菌して 37°C で 16 h 振盪培養した。この菌液のうち、1 mL を滅菌済みの三角フラスコへ分注した SOB 培地 500 mL へ植え継いだ。室温で振盪培養を行い、OD₆₀₀ が約 0.4 の時点で水中において急冷した。

培養した菌液は、50 mL チューブへ移して、4°C、3,000 $\times g$ 、10 min で遠心することで集菌した。上清を取り除き、大腸菌のペレットへ氷冷した transformation buffer を 5 mL 吹き付け、ピッペッティングで懸濁した。その後、4°C、3,000 $\times g$ 、10 min で遠心分離を行い、上清を除去した。大腸菌のペレットは、氷冷した transformation buffer 5 mL で再懸濁し、氷上にて DMSO を 350 μ L 加え、よく攪拌した。その後、予冷した 1.5 mL チューブに大腸菌懸濁液を 100 μ L ずつ分注し、すぐに液体窒素で凍結させてから -80°C のフリーザーで保存した。

試薬の組成

○LB 液体培地

LB 培地, Miller (ナカライテスク)	2.5 g
蒸留水	fill up to 100 mL

オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌して、常温で保存した。抗生物質は使用前に適宜必要量を加えた。

○LB 寒天培地

LB 培地, Miller	2.5 g
Bacto™ Ager (Becton, Dickinson and Company)	1.5 g
蒸留水	fill up to 100 mL

オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌した。約 60°C まで冷えたら、浅型プラスチックシャーレ ($\Phi 90$ mm \times 15 mm) に約 15 mL ずつ分注し、平板培地とした。培地は冷蔵庫で保存した。抗生物質は、シャーレへ流し入れる前に、適宜必要量を加えた。

○SOB 培地

Tryptobne (和光純薬)	4 g
Yeast extract (和光純薬)	1 g
NaCl	116.88 mg
KCl	37.34 mg
蒸留水	fill up to 200 mL

オートクレーブで滅菌し、常温で保存した。

○Transformation buffer (50 mL の組成)

Piperazin-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (ナカライテスク)	0.15 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O (関東化学)	0.11 g
KCl	0.93 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O (関東化学)	0.545 g
蒸留水	fill up to 45 mL

MnCl₂ · 4H₂O を除く試薬を蒸留水で溶解し、0.5 M KOH で pH6.7 に調整した。最後に MnCl₂ · 4H₂O を加えて攪拌後、0.22 μm のフィルター (ADVANTEC) で濾過滅菌し、4°C で保存した。

○100×Mg solution

MgSO ₄ · 7H ₂ O (関東化学)	2.465 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O (関東化学)	2.033 g
蒸留水	fill up to 10 mL

オートクレーブで滅菌し、常温で保存した。使用時は、SOB 培地の使用量の 1/100 となるよう事前に加えた。

4-2-2 OsJAZ2 と OsJAZ5 の転写抑制能の解析

レポータージーンアッセイ用プラスミドの作製

レポーターとなる *DPF* 遺伝子上流域 0.4 kbp の配列にホタルルシフェラーゼ遺伝子が連結されたコンストラクト (pGL4-DPF0.4k-FLUC) と、インターナルコントロールとなるユビキチンプロモーターとウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を発現するコンストラクト (pUbi-RLUC)、エフェクターとなるユビキチンプロモーターの下流に OsMYC2 を連結したコンストラクト (pUbi-OsMYC2) は東京大学アグロバイオテクノロジー研究センター 岡田憲典准教授に分与して頂いた (Fig.4-1A)。本解析では、エフェクターとしてユビキチンプロモーターを連結した OsJAZ2 と OsJAZ5 のコンストラクトの作製を行った。

OsJAZ2 と OsJAZ5 の coding sequence (CDS) の増幅とシームレスクローニング用配列を連結することを目的に、KOD FX を用いて付属のプロトコールに従い、PCR を行った。

アガロースゲル電気泳動で目的のバンドのみを切り出して精製することで、インサート DNA の調製を行った。ベクターには pUCAP/Ubi-NT を使用し (Shimono et al., 2007)、*Kpn*I のよって線状化した。これらを用いて、Motohashi (2015) に従い SLiCE 反応によってシームレスクローニングを行った。

Primer

OsJAZ2 pUCAP クローニング用プライマー

Forward 5'-TGGCCAAATCGGCCGATGGCGGAGGAGCGGAGG-3' (34 bp)

Reverse 5'-GCGGCCGCGGATCCGCTATGGCCGGGCGTACAG-3' (33 bp)

OsJAZ5 pUCAP クローニング用プライマー

Forward 5'-TGGCCAAATCGGCCGATGTTCGACGAGGGCGCCC-3' (33 bp)

Reverse 5'-GCGGCCGCGGATCCGCTAGGACGCCGTGTGCTC-3' (33 bp)

大腸菌の形質転換

4-2-1 で作製した大腸菌のコンピテントセルと、SLiCE 反応後のプラスミドを混和し、氷上で 30 min インキュベートした。42°C で 30 sec ヒートショックをし、再度氷上に戻して急冷した。その後、LB 液体培地を 200 μ L 加え、37°C で 30 min 前培養を行った。これを、pUCAP/Ubi-NT の選抜マーカーであるアンピシリン (ナカライテスク) を 50 μ g/mL の濃度で加えた LB 寒天培地にストリークした。37°C で 16 h 培養し、得られたシングルコロニーを、アンピシリンを含む 3 mL の LB 液体培地に植菌した。これを 37°C で 16 h 振盪培養し、集菌後に FastGene™ Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を用いて大腸菌からプラスミドを精製した。プラスミドは、ユーロフィンジェノミクス株式会社にシークエンス解析を依頼して、目的の塩基配列がプラスミドに組み込まれていることかを解析した。

プラスミド DNA のタングステンへの吸着

99.5%エタノールおよび 70%エタノールによって洗浄したタングステンを滅菌蒸留水で懸濁し、60 mg/mL のタングステン懸濁液を調製した。これを用いてを Table4-1 に示す組成でプラスミドを吸着させ、70%エタノールで洗浄後、99.5%エタノールで再懸濁した。

イネ葉身の切片の作製

2-2-1 と同様の方法で、日本晴野生型株の種子を 0.8%寒天培地へ播種・生育させた。播種後 14 日の植物体の第 3 葉を用いて、5 mm 幅の切片を作製した。これを蒸留水に浮かべて連続白色光下で一晩馴化させた。

パーティクルガンによる遺伝子導入

IDERA GIE-Ⅲ型 (タナカ) を使用してタングステンの打ち込みを行った。打ち込みの条件は以下に示す。イネ切片 4 枚を、蒸留水で浸した濾紙に並べて打ち込みをした。打ち込みをした切片は、蒸留水に浮かべて一晩静置した。

He の噴出時間: 0.025 sec

チャンバーの圧力: -60 kPa

He の圧力: 0.4 MPa

ルシフェラーゼ活性の測定

遺伝子導入したイネ切片を、2 枚で 1 サンプルとしてジルコニアビーズの入ったスクリーキャップの 2 mL チューブへ回収した。液体窒素で凍結後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) の付属のプロトコールに従い、100 μ L の溶解用 buffer 中で Fast Prep-24 5G を用いて破碎した。25°C、14,000 rpm、10 min の条件で遠心後、上清を 96 well プレートに 20 μ L ずつ分注した。その後、TriStar² LB942 Multimode Reader (BERTHOLD TECHNOLOGIES) を用いて、基質を加えながら化学発光を測定した。測定の条件は Fig.4-2 に示す。

4-2-3 過剰発現用プラスミドの作製

過剰発現用ベクターへの遺伝子の導入

過剰発現用プラスミドの作製に際しては、まずそれぞれの JAZ について CDS の増幅を行った。本実験では、FLAG タグを連結させた OsJAZ5 を過剰発現させることとした。研究室に保管されていた OsJAZ2 と OsJAZ5 のテンプレートに用いたプラスミドは、同じ FLAG タグだが塩基配列が異なっていたために、OsJAZ5 が導入されたプラスミドの FLAG タグと配列をそろえることを目的に、OsJAZ2 については 2 段階の PCR を行った。PCR の DNA polymerase には KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を使用し、付属のプロトコールに従い PCR 反応を行い、アガロースゲル電気泳動で目的のバンドのみを切り出して精製した。過剰発現用ベクターである p2KG ベクターは (Kitagawa et al., 2010)、*Kpn* I と *Sac* I のユニークサイトを有していることから、これらの制限酵素によって線状化した (Fig.4-3)。PCR の増幅断片と線状化したベクターは、In-fusion[®] HD Cloning kit (TaKaRa) を用いて付属のプロトコール通りにシームレスクローニングを行った。

Primer

OsJAZ2 1st PCR 用プライマー

Forward 5'-GACTACAAGGATGACGATGACAAGGATATGGCGGAGGAGC-3' (40 bp)

Reverse 5'-GATCGGGGAAATTCGCTATCGCCGGGCGTACAG-3' (33 bp)

OsJAZ2 2nd PCR 用プライマー

Forward 5'-GAGGATCCCCCGGGGATGGATTACAAGGATGACG-3' (34 bp)

Reverse 5'-GATCGGGGAAATTCGCTATCGCCGGGCGTACAG-3' (33 bp)

OsJAZ5 p2KG クローニング用プライマー

Forward 5'-GAGGATCCCCCGGGGATGGACTACAAGGATGACG-3' (34 bp)

Reverse 5'-GATCGGGGAAATTCGATAGGACGCCGTGTGCTC-3' (33 bp)

FLAG タグ由来の配列を下線で示した。

大腸菌の形質転換

4-2-1 で作製した大腸菌のコンピテントセルと、In-fusion 反応後のプラスミドを用いて、4-2-2 と同様の方法で大腸菌の形質転換を行い、シーケンス解析を行った。選抜用の抗生物質には 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハイグロマイシン (ナカライテスク) とカナマイシン (ナカライテスク) を使用した。

4-2-4 過剰発現株の作出

アグロバクテリウムのコンピテントセルの作製

植物への遺伝子導入効率を向上させるため、pSuperAgro (インプラントイノベーションズ) を保持した *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株を用いた (Nonaka et al., 2008)。リファンピシン (終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ナカライテスク) およびゲンタマイシン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ナカライテスク) を含む LB 寒天培地に EHA105/pSuperAgro 株のグリセロールストックをストリークし、暗黒下 28°C で 2 日間培養した。得られたシングルコロニーを 2 mL のリファンピシンとゲンタマイシンを含む LB 液体培地に植菌し、28°C で 1 日振盪培養した。この前培養液を、新しい液体培地に全量植菌し、28°C で OD₆₀₀ が 0.5 になるまで振盪培養した。

培養した菌液を 10 min 以上氷冷し、4°C、3,500 rpm、15 min 遠心し、上清を除去した。1 mL の滅菌済みの氷冷した 20 mM CaCl₂ で、ペレットを懸濁した。この懸濁液を 100 μL ずつ分注し、液体窒素で凍結後、-80°C で保存し、コンピテントセルとした。

アグロバクテリウムの形質転換

コンピテントセルを室温で溶解し、15 mL チューブの中でプラスミド DNA を 1 μg 加えてよく混和した。その後、液体窒素中で急冷して凍結させた。37°C で 5 min インキュベートした後に、直ちに LB 液体培地を 1 mL 加え、28°C で 3 h 振盪培養した。培養液を 4°C、10,000 rpm、1 min 遠心し、上清を 100 μL 残して除去した。残った上清でペレットを懸濁し、リファンピシン (終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とゲンタマイシン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ハイグロマイシン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、カナマイシン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む LB 寒天培地に植菌し、暗黒下にて 28°C で 2 日間培養した。

得られたシングルコロニーをリファンピシンとゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシンを含む LB 液体培地の植菌し、28°C で 1 日間振盪培養した後、菌液は 50% グリセロールと混合し、グリセロールストックとした。

イネ種子のカルス誘導

形質転換では、日本晴野生型由来の種子を 1 回あたり 200 粒用いた。籾を取り除き、20 mL の 70% エタノールで 10 sec ほど予洗浄し、滅菌蒸留水ですすいだ。次に、0.1% (v/v) の tween20 を含む次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度 1%; 関東化学) で 15 min 転倒混和した。滅菌蒸留水で洗浄し、再度 0.1% (v/v) の tween20 を含む次亜塩素酸ナトリウムで 15 min 転倒混和した。滅菌蒸留水で洗浄し、滅菌した濾紙で水分を除去した。表面殺菌した種子は N6D 培地に播種し、連続白色光下で 7 日間培養し、カルス形成を誘導した。

試薬

○N6D 培地

Chu (N6) Medium Salt Mixture (日本製薬)	1 袋
Murashige and Skoog Vitamin Solution (SIGMA)	1 mL
Sucrose (関東化学)	30 g
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸水溶液 (2 mg/mL; 関東化学)	1 mL
Casamino Acids (Becton, Dickinson and Company)	0.3 g
L-Proline (東京化成工業)	2.876 g
蒸留水	fill up to 1 L

0.5 M KOH で pH5.8 に調整し、ゲルライト (関東化学) 4 g を加えてよく攪拌した後、オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌した。深型シャーレ ($\Phi 90 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$) に 50 mL ずつ分注し、4°C で保存した。

アグロバクテリウムの前培養

カルスの感染に用いるアグロバクテリウムのグリセロールストックを、リファンピシン (終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とゲンタマイシン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ハイグロマイシン (終濃度 50

μg/mL)、カナマイシン (終濃度 50 μg/mL) を含む AB 寒天培地にスプレッドした。これを暗黒下にて 23°C で 2 日間培養した。

試薬の組成

○AB 寒天培地

K ₂ HPO ₄ (和光純薬)	300 mg
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (和光純薬)	130 mg
NH ₄ Cl (関東化学)	100 mg
KCl	15 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O (関東化学)	0.25 mg
D(+)-Glucose (関東化学)	500 mg
蒸留水	fill up to 100 mL

以上を溶解し、Bacto™ Ager を 1.5 g 加え、オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌した。浅型シャーレに約 15 mL ずつ分注して平板培地とし、冷蔵庫で保存した。

アグロバクテリウムの感染と共存培養

50 mL チューブに AAM 培地を 40 mL 分注し、100 mg/mL アセトシリンゴン (3',5'-dimethoxy-4'hydroxy-acetophenone; SIGMA) を 8 μL 加えた。次に、2N6-AS 培地に滅菌した濾紙を乗せ、アセトシリンゴン入りの AAM 培地を 500 μL 広げた。その後、前培養したアグロバクテリウムを白金耳でかき取り、50 mL チューブ内の AAM 培地に懸濁した。

7 日間培養した種子から、シュートと胚乳をピンセットで取り除き、カルスを新しい 50 mL チューブに回収した。カルスが入ったチューブへアグロバクテリウムを懸濁した AAM 培地を加え、1.5 min 転倒混和した。カルスを落とさないように懸濁液を捨て、滅菌済みの濾紙の上に広げて水分を除去した。これを AAM 培地を広げた 2N6-AS 培地に、カルスが接触しないように置き、暗黒下にて 23°C、3 日間培養した。

試薬の組成

○AAM 培地

AA-1	1mL
AA-2	1mL
AA-3	1mL
AA-4	1mL
AA-5	1mL
AA-6	1mL
AA-Sol	10 mL
AA-KCl	20 mL
Sucrose	20 g
L-グルタミン酸 (関東化学)	900 mg
L-アスパラギン酸 (関東化学)	300 mg
蒸留水	fill up to 1 L

オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌し、常温で保存した。この培地に使用したストックの組成は以下に記す。

○AA-1

MnSO ₄ · 5H ₂ O (関東化学)	50 mg
H ₃ BO ₃ (和光純薬)	15 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O (関東化学)	10 mg
KI (関東化学)	3.75 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (関東化学)	1.25 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O (関東化学)	0.125 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O (関東化学)	0.125 mg
蒸留水	fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○AA-2

CaCl ₂ · 2H ₂ O	750 mg
蒸留水	fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○AA-3

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.25 g
蒸留水	fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○AA-4

Fe-EDTA (同仁化学研究所) 200 mg

蒸留水 fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○AA-5

NaH₂PO₄ · 2H₂O 750 mg

蒸留水 fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○AA-6

ニコチン酸 (和光純薬) 1 mg

ビタミン B1 塩酸塩 (ナカライテスク) 10 mg

ピリドキシン塩酸塩 (ナカライテスク) 1 mg

myo-イノシトール (ナカライテスク) 100 mg

蒸留水 fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○AA-Sol

L-アルギニン (和光純薬) 88.35 mg

グリシン 3.75 mg

蒸留水 fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○AA-KCl

KCl 750 mg

蒸留水 fill up to 50 mL

調製後は 4°C で保存した。

○共存培養培地 (2N6-AS)

Chu (N6) Medium Salt Mixture	1 袋
Murashige and Skoog Vitamin Solution	1 mL
Sucrose	30 g
D(+)-Glucose	10 g
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸水溶液 (2 mg/mL)	1 mL
Casamino Acids	0.3 g
蒸留水	fill up to 1 L

0.5 M KOH で pH5.8 に調整し、ゲルライト 4 g を加えてよく攪拌した後、オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌した。60°C くらいに冷めたら、DMSO で溶解した 100 mg/mL アセトシリンゴンを 100 μ L 加え、深型シャーレに 50 mL ずつ分注して平板培地とし、4°C で保存した。

アグロバクテリウムの除去と選抜

共存培養後のカルスを 50 mL チューブに集め、滅菌蒸留水で 3 回洗浄した。さらに、50 μ g/mL のメロペネム (和光純薬) を含む滅菌蒸留水で、1 回洗浄した。洗浄後のカルスを滅菌した濾紙に広げ、水分を除去した。これを終濃度 50 μ g/mL ハイグロマイシンと 12.5 μ g/mL のメロペネムを含む N6D 培地に、カルス同士が接触しないように置き、連続白色光下にて 30°C で 2 週間程度培養した。

再分化

ハイグロマイシンによって N6D 培地上で選抜され、増殖しているカルスを RE-III 培地に移植し、さらに連続白色光下にて 30°C で 2 週間程度培養した。緑化してきたカルスは新しい RE-III 培地に移植し、植物体が再生し、シュート長が 1 cm 程度になったものを HF 培地に移植した。再分化個体がシャーレ全体に成長した後、土に移植して特定網室で栽培した。

試薬の組成

○再分化培地 (RE-III)

Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (日本製薬)	1 袋
Murashige and Skoog Vitamin Solution	1 mL
Sucrose	30 g
D-Sorbitol (関東化学)	30 g
Casamino Acids	0.3 g
L-Proline	2.876 g
蒸留水	fill up to 1 L

0.5 M KOH で pH5.8 に調整し、ゲルライト 4 g を加えてよく攪拌した後、オートクレー

ブで 121°C、20 min 滅菌した。60°C くらいに冷めたら、1 mg/mL 1-naphthylacetic acid (SIGMA) を 20 µL と 1 mg/mL kinetin (SIGMA) を 2 mL 加えた。さらに、終濃度 50 µg/mL のハイグロマイシンと 12.5 µg/mL のメロペネムを加え、深型シャーレに 50 mL ずつ分注して平板培地とし、4°C で保存した。

○ホルモンフリー培地

Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	1 袋
Murashige and Skoog Vitamin Solution	1 mL
Sucrose	30 g
蒸留水	fill up to 1 L

0.5 M KOH で pH5.8 に調整し、ゲルライト 4 g を加えてよく攪拌した後、オートクレーブで 121°C、20 min 滅菌した。60°C くらいに冷めたら、終濃度 50 µg/mL のハイグロマイシンと 12.5 µg/mL のメロペネムを加え、深型シャーレに 50 mL ずつ分注して平板培地とし、4°C で保存した。

4-2-5 過剰発現株のスクリーニングと導入遺伝子の発現量の解析

作出した過剰発現株は、Fig.4-4 のベクターを保持していると考えられるため、*HPT* の PCR を行うことで過剰発現用ベクターを有している植物体のみを選抜した。次に、導入した *JAZ* 遺伝子の発現量を解析するため、2-2-10 と同様の方法で RNA の抽出と cDNA の合成を行い、qRT-PCR によって遺伝子発現量の解析を行った。

PCR の条件

KOD FX を用いて以下に示す 3 ステップの温度条件とプライマーで反応を行った。

94°C 2 min → (98°C 10 sec → 60°C 30 sec → 68°C 30 sec) × 30 cycle

HPT

Forward 5'-GATGTTGGCGACCTCGTATT-3'	(20 bp)
Reverse 5'-GATGTAGGAGGGCGTGATA-3'	(20 bp)

qRT-PCR の反応液の組成

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)	10 µL
分子生物学用純水	8.84 µL
Forward Primer (50 pmol/µL)	0.08 µL
Reverse Primer (50 pmol/µL)	0.08 µL
10 倍希釈した cDNA	1 µL
total	20 µL

PCR の条件

95°C 20 sec→(95°C 3 sec→58°C 5 sec→72°C 30 sec)×40 cycle

解離反応の条件

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

Primer

OsJAZ2 qRT-PCR 用プライマー

Forward 5'-CGAGGAGGAACTTGACCATC-3' (20 bp)

Reverse 5'-ACCCTGTATTTGCTGCTGCT-3' (20 bp)

OsJAZ5 qRT-PCR 用プライマー

Forward 5'-GCTCCGATGACGCTCTTCTA-3' (20 bp)

Reverse 5'-ACGAGCGAGTCCTTTTGCT-3' (19 bp)

4-2-6 過剰発現株における JA 誘導的な表現型の解析

OsJAZ2 過剰発現株および OsJAZ5 過剰発現株を用いて、2-2-9 と 2-2-11、2-2-13 と同様の方法でファイトアレキシン蓄積量と老化の解析を行った。

4-2-7 OsJAZ5 Δ Jas 過剰発現株の作出とその表現型の解析

OsJAZ5 の C 末端側に存在する Jas ドメインの欠損した OsJAZ5 Δ Jas の機能解析を目的に、まずは 4-2-2 と同様の方法でプラスミドのクローニングを行い、レポータージーニアッセイで転写抑制解析を行った。次に、4-2-3 と 4-2-4 と同様の方法で過剰発現用ベクターへクローニングを行い、アグロバクテリウム法を用いた形質転換によって過剰発現株を作出した。これを、2-2-10 の方法で RNA の抽出を行い、逆転写によって合成した cDNA を用いて 4-2-5 のプライマーセットで目的遺伝子が高発現していることを確認した。さらに、この植物体を用いて 2-2-9 と 2-2-11、2-2-13 と同様の方法でファイトアレキシン蓄積量と老化、生理障害部位における MDA の蓄積量の解析を行った。

Primer

OsJAZ5 Δ Jas pUCAP クローニング用プライマー

Forward 5'-TGGCCAAATCGGCCGATGTGACGAGGGCGCCC-3' (33 bp)

Reverse 5'-GCGGCCGCGGATCCGCTAGGCAAAATTGCCTACAA-3' (35 bp)

OsJAZ5 Δ Jas p2KG クローニング用プライマー

Forward 5'-GAGGATCCCCCGGGGATGGACTACAAGGATGACG-3' (34 bp)

Reverse 5'-GATCGGGGAAATTCGCTAGGCAAAATTGCCTACAA-3' (35 bp)

FLAG タグ由来の配列を下線で示した。

4-2-8 過剰発現株の初期成育の測定

2-2-1 と同様に、滅菌した過剰発現株およびベクターコントロールの種子を殺菌してから寒天培地へ播種・生育させた。10 日後に、ノギスを用いて根と第一葉、第二葉鞘、第二葉の長さを測定した。

4-3 結果と考察

4-3-1 OsJAZ2 および OsJAZ5 の転写抑制能の解析

東京大学 岡田憲典准教授らの研究グループによって、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産を制御するマスター転写因子である *DPF* の上流域 0.4 kbp の下流に *FLUC* 遺伝子を連結したレポーターに対して、エフェクターとして *OsMYC2* を発現させることによりレポーターの活性が上昇することが明らかになっている（私信）。このことから、*OsMYC2* が *DPF* プロモーターを活性化する（Fig.4-1A）。そこで、この実験系に *JAZ* を共発現することで、*OsMYC2* による *DPF* プロモーターの活性化を *JAZ* が抑制するかを検討した（Fig.4-1B）。

レポーターとともに *OsMYC2* を発現することで、*LUC* の相対活性値が上昇した（Fig.4-4）。さらに *OsJAZ2* と *OsJAZ5* とをそれぞれ共発現すると、ルシフェラーゼの相対活性値が低下し、ネガティブコントロール（エフェクターの導入なし）と同程度の値になった。このことから、イネ葉身内において、*OsJAZ2* と *OsJAZ5* はそれぞれ *OsMYC2* による *DPF* プロモーターの活性化を抑制することが分かった。*OsJAZ2* および *OsJAZ5* は、*OsMYC2* と相互作用することが報告されている（Uji et al., 2016）。本実験においても、*OsMYC2* と *OsJAZ2* または *OsJAZ5* が結合することで活性を抑制していると考えられる。

4-3-2 OsJAZ2 および OsJAZ5 過剰発現株の作出

OsJAZ2 と *OsJAZ5* は、*Jas* ドメインが他の *JAZ* と大きく異なるアミノ酸残基を有する divergent *Jas* を持っている（Tian et al., 2019）。*JAZ* の変異株においては、機能が重複した類似遺伝子の存在によって単独変異株では表現型が出ない、もしくは表現型が不明瞭なことが考えられる。また、変異の導入のされ方によっても表現型に差が生じた例もある（Cai et al., 2014; Cao et al., 2021）。そこで、*OsJAZ2* と *OsJAZ5* の過剰発現株を作出して解析することを目指した。過剰発現株作出に向けて、過剰発現用ベクターへそれぞれの遺伝子をクローニングした。このベクターは、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターと、*attR1-ccdB-attR2* を含む Gateway RfA カセットを有するプラスミドである（Fig.4-3）。*Kpn I* と *Sac I* をユニークサイトとして持っており、これらの制限酵素を利用して Gateway RfA カセットを切り出し、そこへ目的の遺伝子を導入した。これをアグロバクテリウム法による形質転換によって、日本晴野生型由来のカルスに導入し、再分化個体を得ることで過剰発現株とした。次に、*HPT* について PCR で遺伝子の増幅を行い、バンドが検出できた植物体は過剰発現用ベクターを保持している個体であると判断し、qRT-PCR によってその遺伝子の発現量の解析を行った。その結果、*OsJAZ2* 過剰発現株では、ベクターコントロールと比較して 30,000~50,000 倍程度、*OsJAZ5* 過剰発現株では 500~1,000 倍程度の過剰発現が見られた（Fig.4-5A、B）。この植物体を用いて、以降の表現型の解析を行うこととした。

4-3-3 *OsJAZ2* 過剰発現株と *OsJAZ5* 過剰発現株のファイトアレキシン生産と老化の解析

OsJAZ2 過剰発現株と *OsJAZ5* 過剰発現株を用いて、MeJA 処理によるファイトアレキシン蓄積量と、クロロフィル含有量の定量を行った。*OsJAZ2* 過剰発現株は、ベクターコントロールと比較して3ラインの過剰発現株すべてでサクラネチンとモミラクトン、ファイトカサンの蓄積量は顕著に低下していた (Fig.4-6A)。*OsJAZ5* 過剰発現株では、MeJA 処理することですべてのファイトアレキシンはベクターコントロールと同等の蓄積量であり、有意差はなかった (Fig.4-6B)。このことから、*OsJAZ2* はファイトアレキシン生産の抑制に関与することが示された。

次に、これら過剰発現株を用いて MeJA 処理時のクロロフィル含有量の定量をした。*OsJAZ2* 過剰発現株では、MeJA 未処理時にベクターコントロールと比較してクロロフィルの含有量が多い傾向を示し、MeJA 処理をするとベクターコントロールは濃度依存的にクロロフィル含有量が低下したのに対し、過剰発現株ではほとんどクロロフィル含有量が低下しなかった (Fig.4-7A)。*OsJAZ5* 過剰発現株では、ベクターコントロールと比較してクロロフィル含有量の低下が部分的に抑制されており、JA 誘導的に葉が黄色く変化する老化への抵抗性を示した (Fig.4-7B)。この結果より、*OsJAZ2* と *OsJAZ5* が JA-Ile 受容体複合体として、またリプレッサーとして老化の促進の抑制に関与することが考えられる。

以上のように、*OsJAZ2* と *OsJAZ5* のどちらも葉における JA 応答を抑制することが示されたが、*OsJAZ2* が *OsJAZ5* よりも強く下流の JA 応答を抑制する可能性が考えられた。*OsJAZ2* と *OsJAZ5* の機能の差異は、*OsCOI2* との結合に必要な JA-Ile の濃度の違いによる可能性が考えられる。Fig.3-7 で示したように、*OsJAZ5* は *OsJAZ2* と比較してより低濃度の JA-Ile の存在下で *OsCOI2* と結合している。このため、過剰発現株において *OsJAZ5* タンパク質がより分解を受けやすく、部分的にしか JA 応答を抑制できない可能性がある。このため、過剰発現株における *OsJAZ2* と *OsJAZ5* のタンパク質の存在量を解析していく必要がある。

4-3-4 *OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株の作出と JA 誘導的な表現型の解析

OsJAZ5 過剰発現株を MeJA 処理した際に、ファイトアレキシンがベクターコントロールと同程度蓄積しており、クロロフィル含有量の低下に対する抵抗性も部分的であった (Fig.4-6A、4-6B、4-7A、4-7B)。そこで、*OsJAZ5* の JA-Ile の受容に重要な *Jas* ドメインを欠損させた *OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株を作出した。*OsJAZ5* Δ *Jas* は *OsCOI2* と相互作用しないことで分解されず、リプレッサーとして機能し続けることが期待される。

過剰発現用ベクターである p2KG へ *OsJAZ5* Δ *Jas* をクローニングした。これをアグロバクテリウム法でイネの日本晴野生型由来のカルスへ感染させて、形質転換を行った。*HPT* の PCR でスクリーニングを行い、RNA の抽出と cDNA の合成を行って、目的遺伝子が高発現していることを確認した (Fig.4-8)。この選抜を行った植物体を用いて、まずは

MeJA 処理によるファイトアレキシン蓄積量を定量した。ベクターコントロールにおいて、サクラネチンは MeJA 処理をすることで蓄積した (Fig.4-9A)。また、*OsJAZ5* 過剰発現株#11-1 はベクターコントロールと比較してその蓄積量が有意に低下して 3 分の 1 程度になっていたが、*OsJAZ5* 過剰発現株#14-1 では半分程度の蓄積量であり有意差はなかった。ところが、*OsJAZ5 Δ Jas* 過剰発現株#1-4 と#3-1 では、MeJA 処理をしてもサクラネチンの蓄積は起こらず、検出限界以下であった。モミラクトンやファイトカサンの蓄積量も同様であり、ベクターコントロールと比較して *OsJAZ5* 過剰発現株#11-1 と#14-1 はライン間の差はあるが多少の低下を見せたもののその低下は部分的であり、*OsJAZ5 Δ Jas* 過剰発現株#1-4 と#3-1 は顕著な低下を示した。

次にクロロフィル含有量の測定を行った。MeJA 未処理時に *OsJAZ5* 過剰発現株#14-1 のクロロフィル含有量がベクターコントロールと比較して低下していたが、*OsJAZ5 Δ Jas* 過剰発現株#3-1 はその含有量が高い傾向を示した (Fig.4-9B)。これらを 200 μM MeJA 処理すると、*OsJAZ5* 過剰発現株#11-1 はベクターコントロールよりもクロロフィル含有量の低下の緩和が見られたが、#14-1 では有意差はなく、ライン間の差が見られた。*OsJAZ5 Δ Jas* 過剰発現株#1-4 と#3-1 はクロロフィル含有量の低下が起こらず、JA に対する有意な抵抗性を示した。MeJA を 500 μM で処理すると、*OsJAZ5* 過剰発現株#11-1 と#14-1 も JA 誘導的なクロロフィル含有量の低下が軽減されたが、*OsJAZ5 Δ Jas* 過剰発現株#1-4 と#3-1 はそれ以上の極めて強い JA への抵抗性を示した。

以上のことから、全長の *OsJAZ5* を過剰発現させた場合と比較して、*Jas* ドメインを欠損させた *OsJAZ5 Δ Jas* を過剰発現させると、葉における JA 応答が強く抑制されることが明らかになった。

そこで、*OsJAZ5 Δ Jas* が *OsMYC2* の活性を抑制できるかどうかをレポータージーンアッセイによって検討することにした。全長の *OsJAZ5* は、*OsMYC2* と共に導入した *DPF* プロモーターの下流に連結した *FLUC* の活性を抑制する傾向を示した (Fig.4-10)。一方で、*OsJAZ5 Δ Jas* は *OsMYC2* によって上昇した *FLUC* の活性を抑制しなかった。このことから、*OsJAZ5 Δ Jas* は *OsMYC2* による *DPF* プロモーターの活性化を抑制できないことが示唆された。これは *OsJAZ5 Δ Jas* を過剰発現させると葉における JA 応答が強く抑制される結果と矛盾する。今後は、*OsJAZ5 Δ Jas* 過剰発現株において *DPF* よりも下流のファイトアレキシン生合成遺伝子の転写が抑制されている可能性を検討することにより、*OsJAZ5 Δ Jas* による JA 応答の抑制の作用点を明らかにしていく必要がある。また、多くの JAZ は *Jas* モチーフを介して *MYC2* と相互作用するが、シロイヌナズナ *JAZ10.4* は *CMID* ドメインを介して *MYC2* と相互作用することも知られている (Moreno et al., 2013)。*OsJAZ5* に *CMID* ドメインは存在していないが、*Jas* モチーフ以外の未知のドメインを介して *MYC2* などの転写因子と相互作用する可能性も検討していく必要がある。さらに、JAZ は *ZIM* ドメインを介して他の JAZ とヘテロダイマーを形成する (Chini et al.,

2009; Chung and Howe, 2009)。OsJAZ5 Δ Jas が他の OsJAZ とダイマーを形成して下流転写因子を抑制している可能性も考えられる。

4-3-5 イネ JAZ過剰発現株の生理障害部位における MDA 蓄積量の定量

OsJAZ2 過剰発現株と *OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株において、播種後 2~3 か月後に葉身の中央部分から先端部を中心に、病斑のような生理障害が起こっていることが観察される (Fig.4-11A)。この生理障害部位と、その下部を健全部位としてサンプリングして MDA を測定すると、これら過剰発現株の生理障害部位では MDA の蓄積量が増加していた (Fig.4-11B、C)。これは、OsJAZ2 が大量に生体内に存在することで温度や光、湿度などの何かしらの環境ストレスに対して、敏感に反応していると考えられる。また、OsJAZ5 は Jas ドメインを欠損することでこの生理障害が起こることから、OsJAZ5 が分解されるかどうかは生理障害の出現に関与する可能性が考えられる。

4-3-6 イネ JAZ過剰発現株の初期成育の解析

イネ JAZ過剰発現株の形質転換体当代より採取した T₁ 種子を用いて、その初期成育を解析した。発芽した植物体の根と第一葉、第二葉鞘、第二葉をノギスで測定し、その後 HPT の PCR によって遺伝子が増幅した個体のデータのみを用いて解析した。その結果、*OsJAZ2* 過剰発現株ではベクターコントロールと比較してライン間の差はあるものの、主根と第一葉が徒長する傾向を示した (Fig.4-12A、B)。一方で、第二葉と第二葉鞘はベクターコントロールと比較して有意な差はなく、同程度の長さであることが分かった (Fig.4-12C、D)。*OsJAZ5* 過剰発現株と *OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株の根は、*OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株の 1 つのラインでベクターコントロールと比較して有意に長い傾向を示したが、*OsJAZ5* 過剰発現株の 2 ラインと *OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株の 1 ラインでは差はなかった (Fig.4-13A)。第一葉は、*OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株の 1 つのラインでベクターコントロールと大きな差はなかったが、*OsJAZ5* 過剰発現株の 2 ラインと *OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株の 1 ラインでは徒長していた (Fig.4-13B)。第二葉鞘は、*OsJAZ5* 過剰発現株の 1 つのラインで有意差はあるものの、他の形質転換体ではベクターコントロールと同等の長さであった (Fig.4-13C)。第二葉は、*OsJAZ5* 過剰発現株ではベクターコントロールよりも徒長していたが、*OsJAZ5* Δ *Jas* 過剰発現株では同等の値であった (Fig.4-13D)。

このことから、OsJAZ2 は根と第一葉の伸長生長の抑制に関与している可能性が示された。一方で、OsJAZ5 は全長と Δ Jas の過剰発現株ではベクターコントロールと比較して差の生じた部位が一致せず、各部位の伸長生長の抑制における関与については不明な点が多く残った。

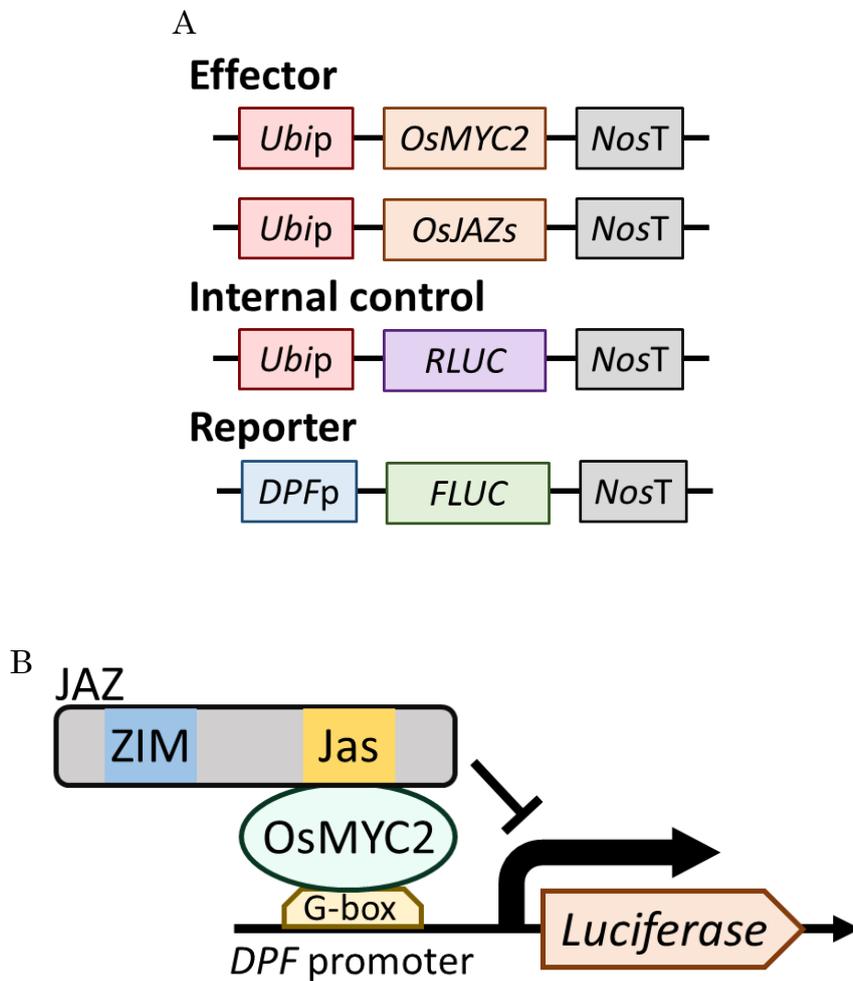


Figure4-1 レポータージーンアッセイのモデル

A: 遺伝子導入を行ったプラスミドの構造

B: 一過的な過剰発現による遺伝子のシグナル伝達のモデル

Table4-1 プラスミドを吸着させたタングステン懸濁液の組成 (1 回分)

Name	Volume	Concentration
pGL4-DPF0.4k-FLUC	a μ L	(2 ng 分)
pUbi-OsMYC2	b μ L	(2 ng 分)
pUCAP-OsJAZ	c μ L	(2 ng 分)
pUbi-RLUC	d μ L	(1 ng 分)
60 mg/mL タングステン懸濁液	10 μ L	
2.5 M CaCl ₂ (関東化学)	10+a+b+c+d μ L	
1 M スペルミジン (SIGMA)	0.08×(10+a+b+c+d) μ L	

プラスミドとタングステン懸濁液をボルテックスでしっかりと混和した後に、2.5 M CaCl₂と 1 M スペルミジンを加えて再度ボルテックスで混和した。その後、70%エタノールで洗浄した後に 99.5%エタノール 10 μ L に再懸濁した。

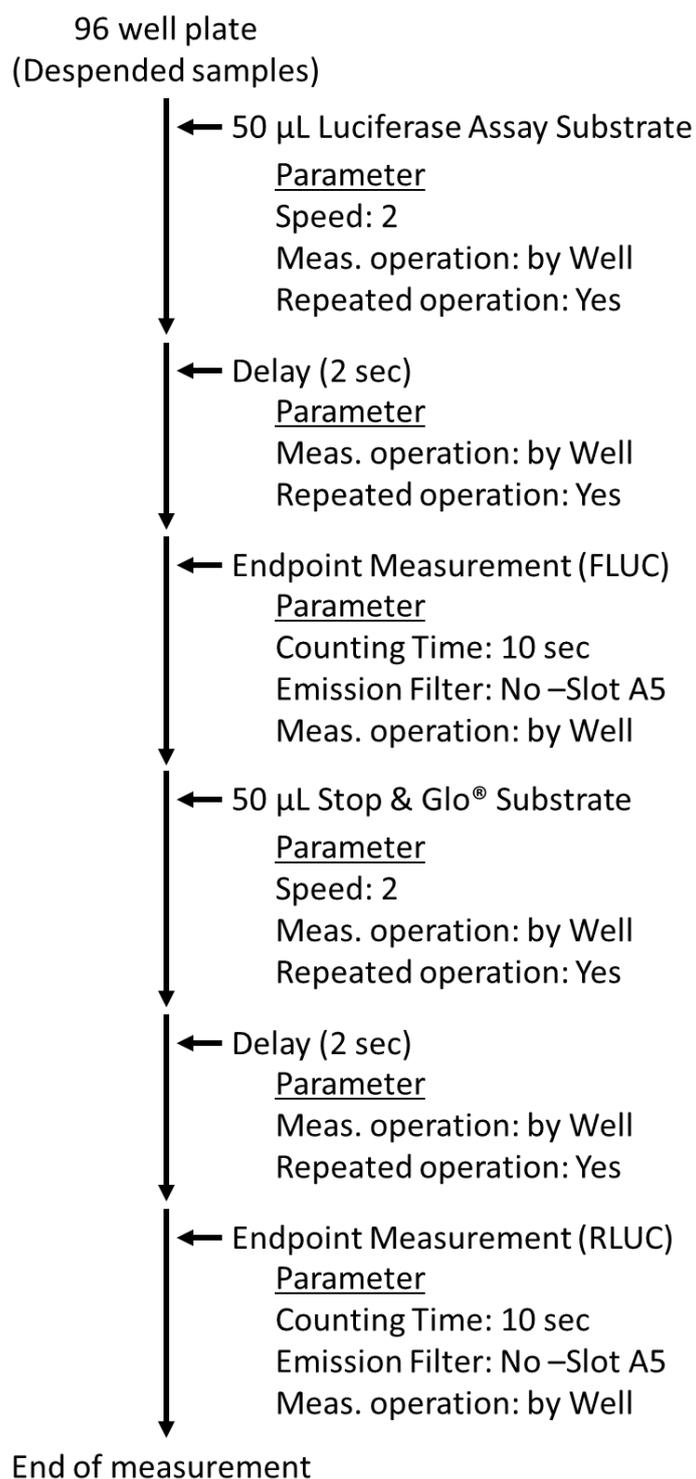


Figure4-2 ルシフェラーゼの化学発光の測定条件

基質として Dual-Luciferase Reporter Assay System を使用し、検出には TriStar² LB942 Multimode Reader を使用した。パラメーターはプレートリーダーにおける詳細な検出条件を示す。

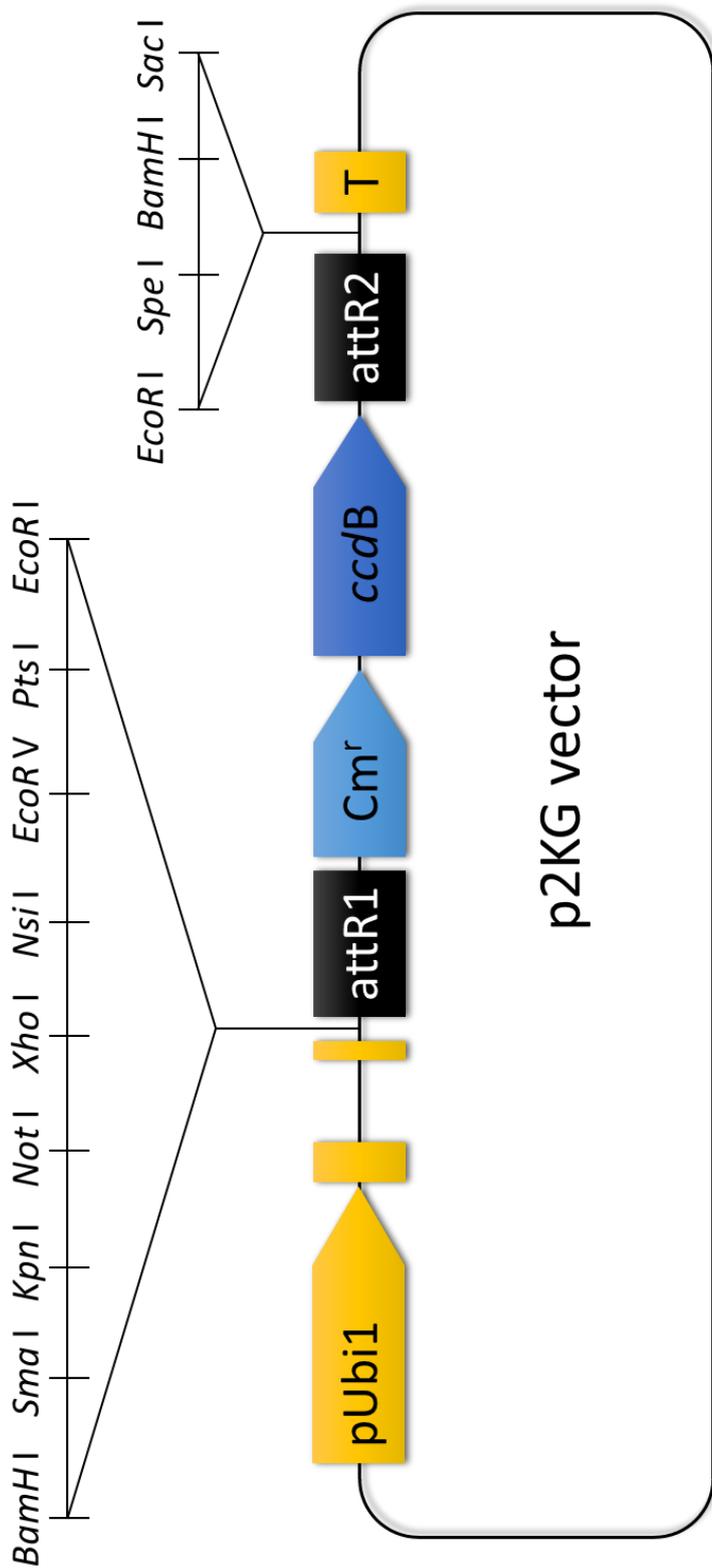


Figure4-3 p2KGベクターの制限酵素サイト

Maize 由来のユビキチンプロモーターと、Gateway用カセットを有するプラスミドである。制限酵素のユニークサイトとして、*KpnI*と*SacI*のサイトが存在する。選抜マーカーとして、カナマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子を保持している。

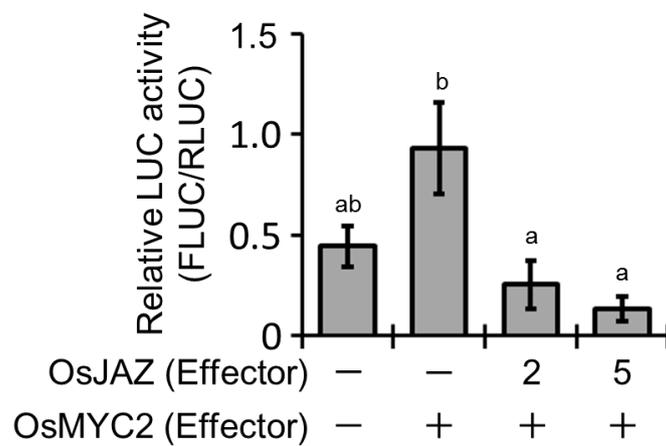


Figure4-4 OsJAZ2 および OsJAZ5 の転写抑制活性

遺伝子の導入効率の補正を目的として、FLUC の活性値を RLUC の活性値で割った値をレポーターの相対活性とした。

means ± S.E. (n=4), Tukey-kramer test ($p < 0.05$)

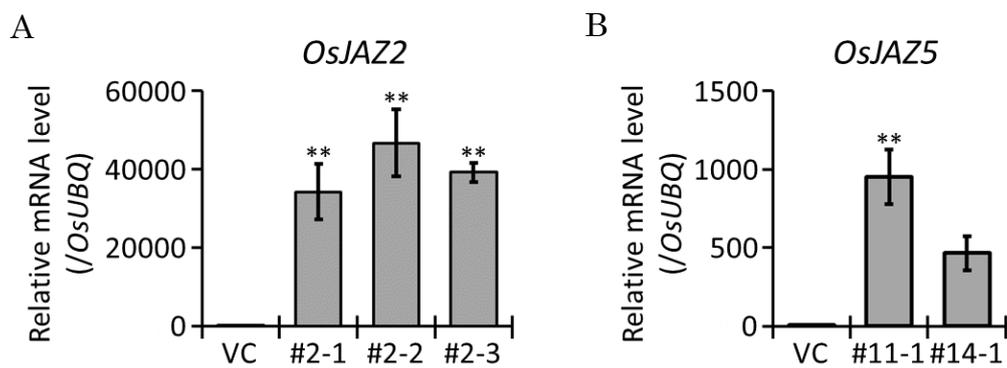


Figure4-5 *OsJAZ2* および *OsJAZ5* 過剰発現株の遺伝子発現量

VC: ベクターコントロール

A: *OsJAZ2* 過剰発現株の遺伝子発現量

means±S.E. (n=3), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

B: *OsJAZ5* 過剰発現株の遺伝子発現量

means±S.E. (n=4), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

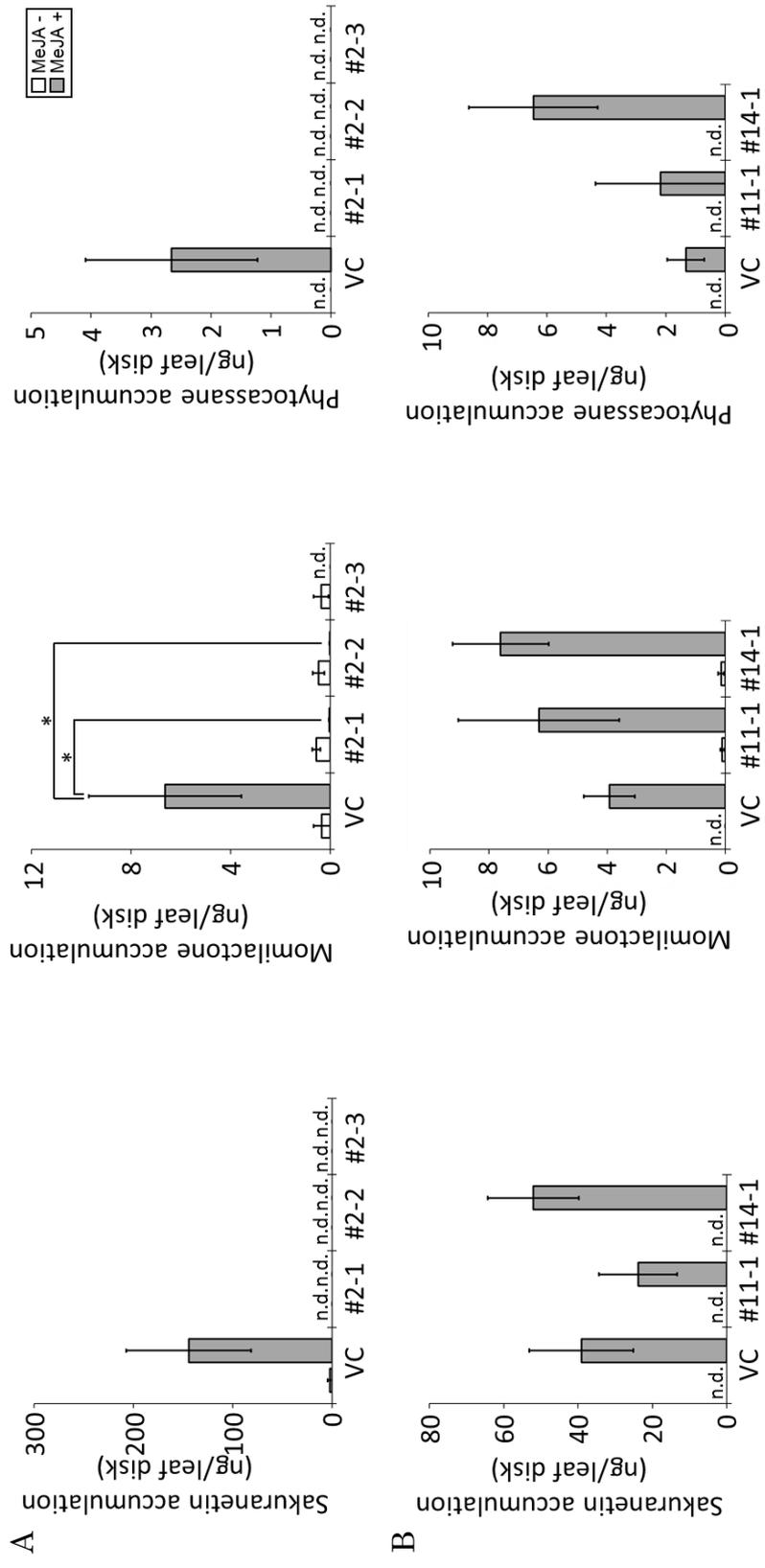


Figure 4-6 *OssJAZ2* および *OssJAZ5* 過剰発現株のファイトアレキシン蓄積量は MeJA 未処理を、グレーは 500 μ M MeJA 処理の結果を示した。

VC: ベクターコントロール

A: MeJA 処理による *OssJAZ2* 過剰発現株のファイトアレキシン蓄積量

B: MeJA 処理による *OssJAZ5* 過剰発現株のファイトアレキシン蓄積量

means \pm S.E. (n=5), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01), n.d.= not detected

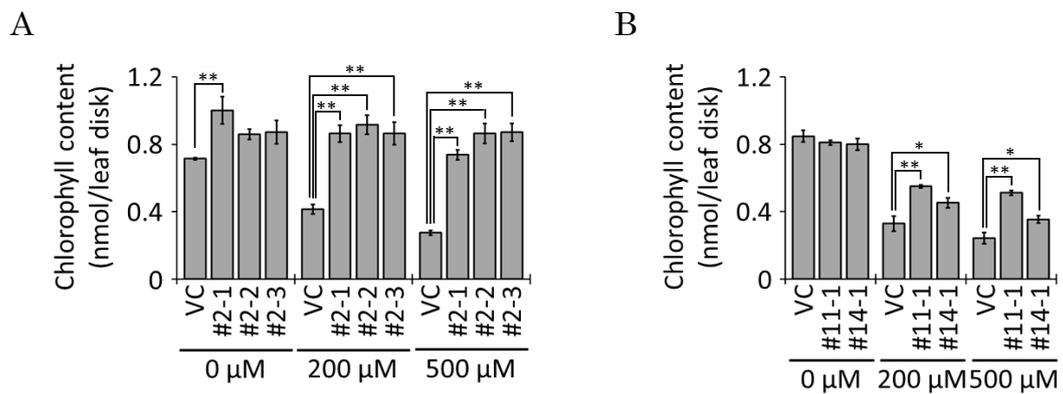


Figure4-7 *OsJAZ2*および*OsJAZ5*過剰発現株のクロロフィル含有量
横軸はイネの種類と MeJA の処理濃度を記した。

VC: ベクターコントロール

A: MeJA 処理による *OsJAZ2*過剰発現株のクロロフィル含有量

B: MeJA 処理による *OsJAZ5*過剰発現株のクロロフィル含有量

means±S.E. (n=5), Dunnett's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

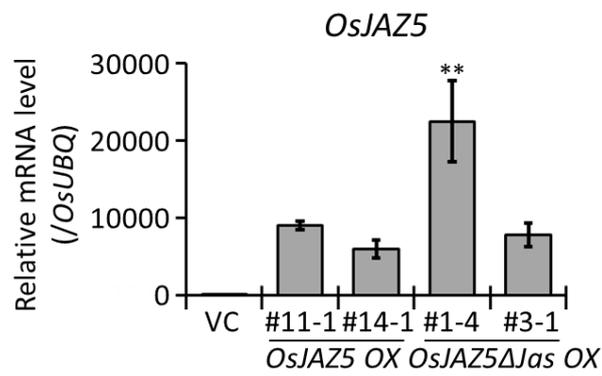


Figure4-8 *OsJAZ5ΔJas* 過剰発現株の遺伝子発現量
 VC: ベクターコントロール
 means±S.E. (n=3), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

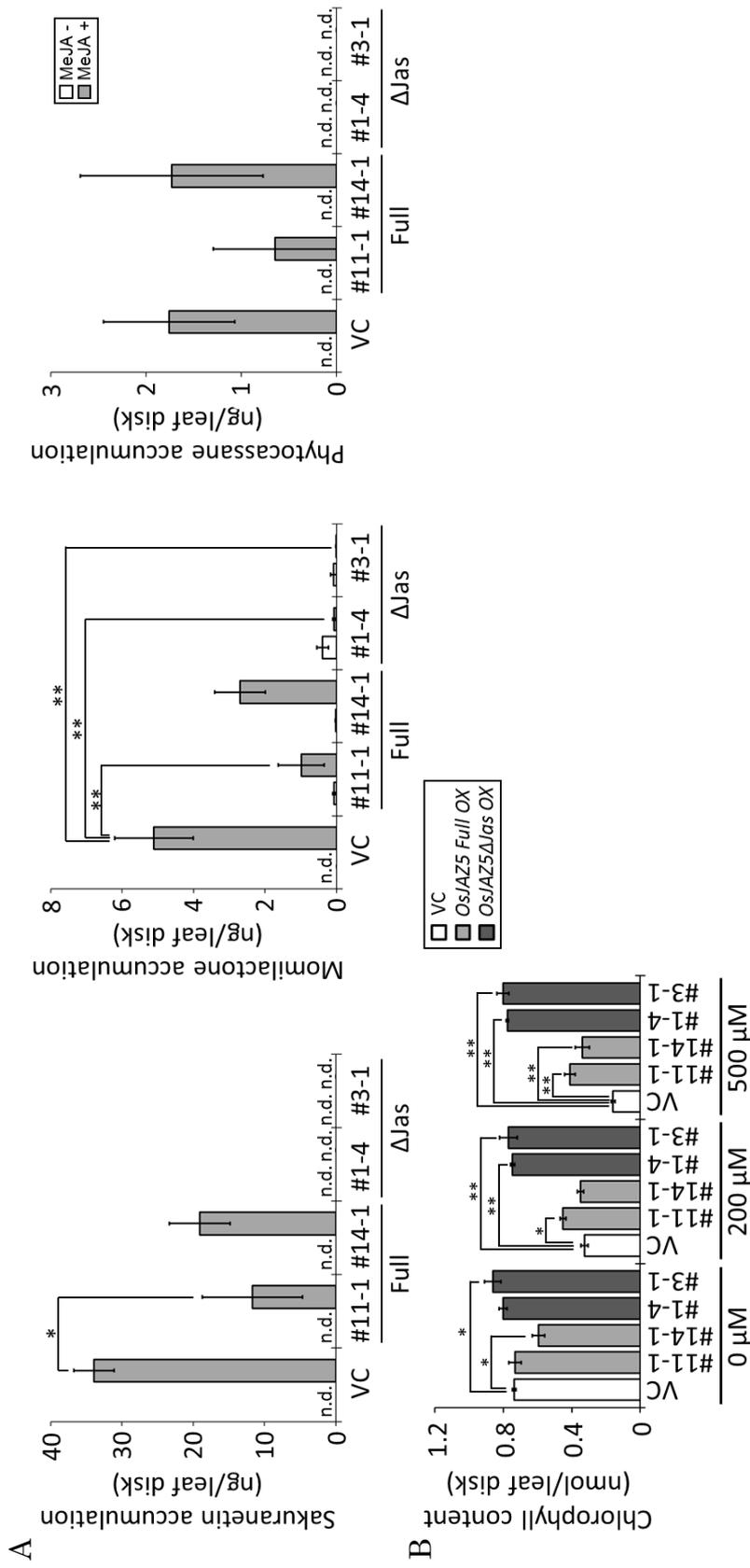


Figure 4-9 *OsJAZ5ΔJas* 過剰発現株のファイトアレキシン蓄積量とクロロフィル含有量

VC: ベクターコントロール

A: MeJA 処理による *OsJAZ5ΔJas* 過剰発現株のファイトアレキシン蓄積量

B: MeJA 処理による *OsJAZ5ΔJas* 過剰発現株のクロロフィル含有量

Full: *OsJAZ5* 過剰発現株、Δ*Jas*: *OsJAZ5ΔJas* 過剰発現株

means±S.E. (n=5), Dunnett's test (* $p<0.05$; ** $p<0.01$), n.d.= not detected

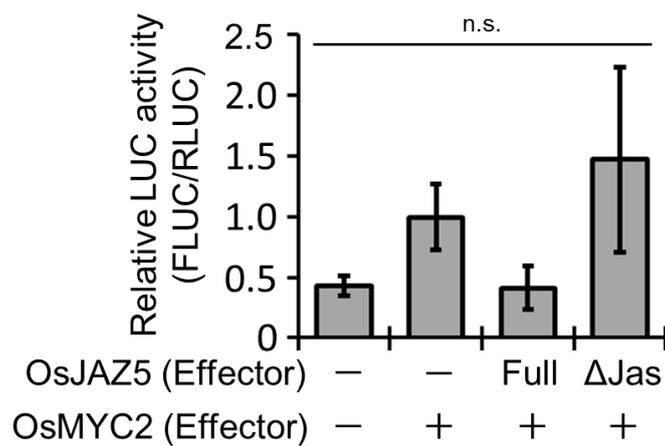


Figure4-10 OsJAZ5 ΔJas の転写抑制活性

遺伝子の導入効率の補正を目的として、FLUC の活性値を RLUC の活性値で割った値をレポーターの相対活性とした。

Full: 全長の OsJAZ5、ΔJas: OsJAZ5 ΔJas

means ± S.E. (n=4), Tukey-kramer test ($p < 0.05$), n.s.= not significant

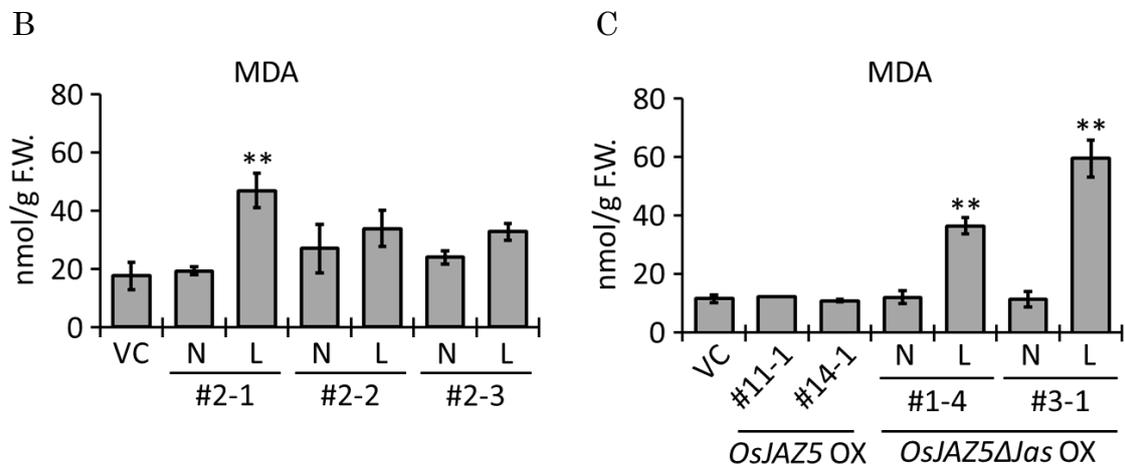


Figure4-11 *OsJAZ2* および *OsJAZ5* 過剰発現株の MDA 蓄積量

A: *OsJAZ5ΔJas* 過剰発現株で観察される生理障害

ΔJ: *OsJAZ5ΔJas* 過剰発現株

B: *OsJAZ2* 過剰発現株の生理障害部位における MDA 蓄積量

C: *OsJAZ5* 過剰発現株の生理障害部位における MDA 蓄積量

means±S.E. (n=3), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

VC: ベクターコントロール、N: 健全部位、L: 生理障害部位

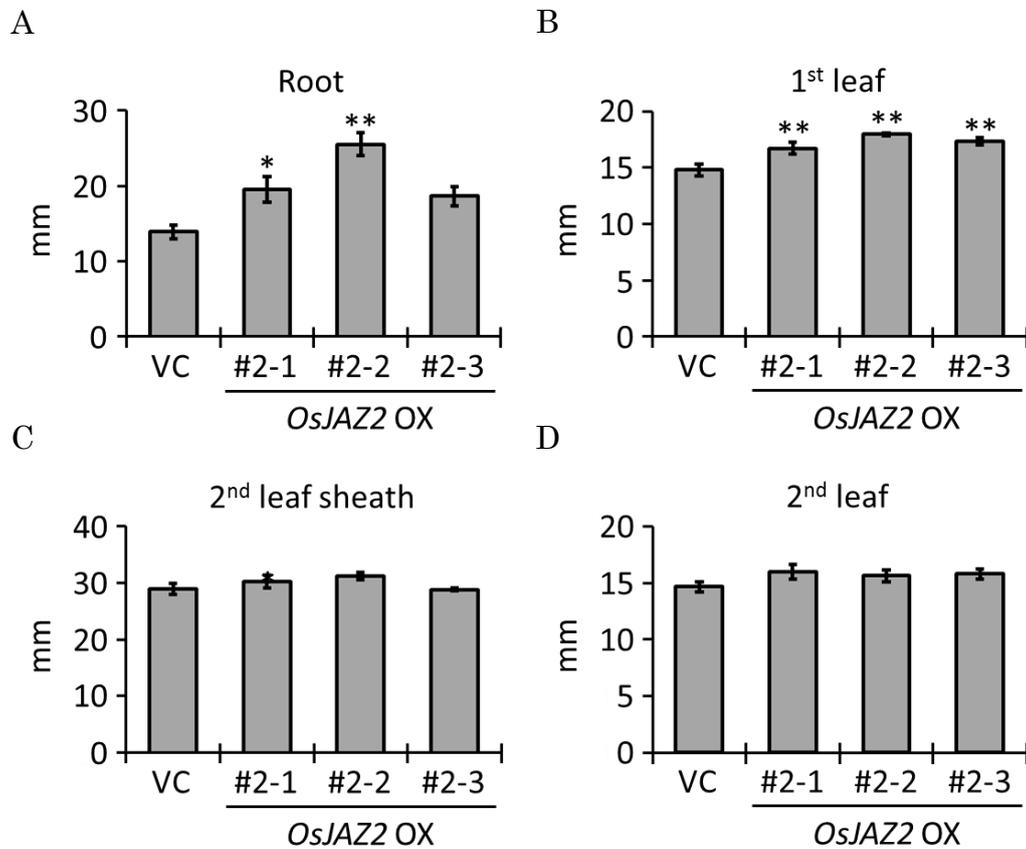


Figure4-12 *OsJAZ2* 過剰発現株の初期成育の測定結果

VC: ベクターコントロール

A: 根の測定結果

B: 第一葉の測定結果

C: 第二葉鞘の測定結果

D: 第二葉測定結果

means \pm S.E. (n=6~7), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

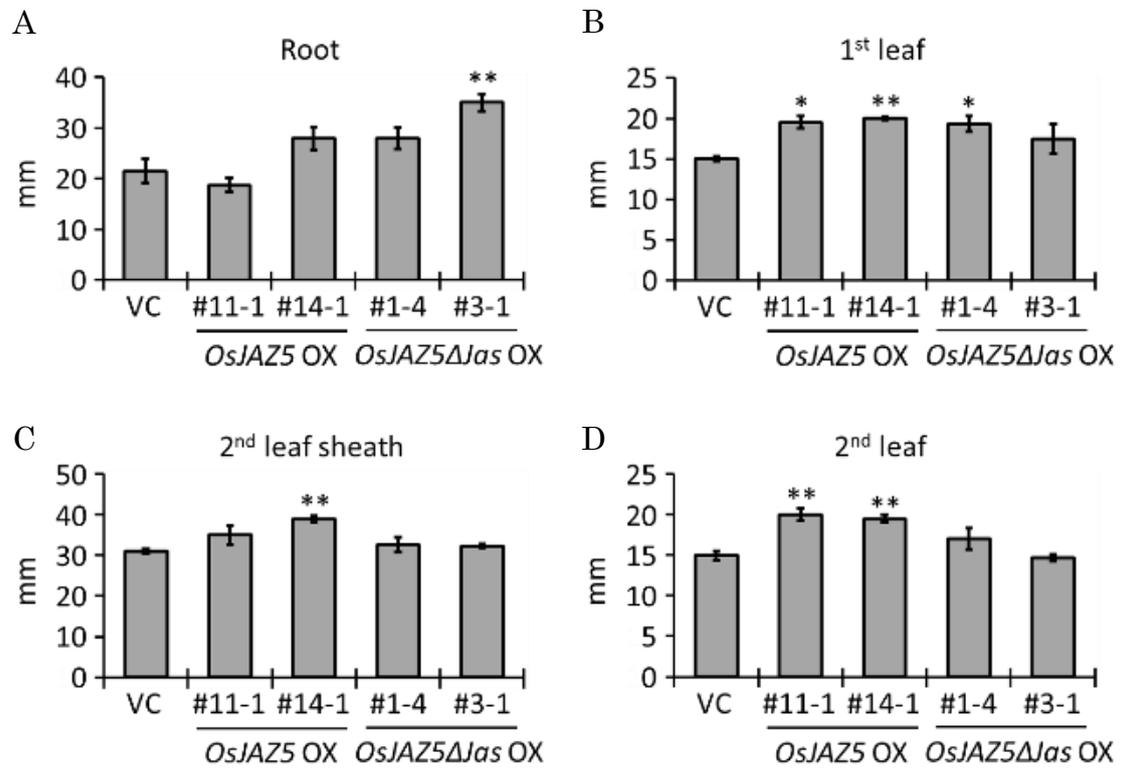


Figure4-13 *OsJAZ5*過剰発現株の初期成育の測定結果

VC: ベクターコントロール

A: 根の測定結果

B: 第一葉の測定結果

C: 第二葉鞘の測定結果

D: 第二葉測定結果

means ± S.E. (n=7~9), Dunnett's test (* p <0.05; ** p <0.01)

第5章 ハイゴケ JAZ-MYC2 の相互作用解析

5-1 緒言

本論文で述べたように、シロイヌナズナやイネといった被子植物において、JA シグナル伝達機構の詳細が明らかになりつつある。一方で、非維管束植物であるコケ植物において、JA および JA-Ile は微量しか含まれておらず、これらは活性分子の本体ではないと考えられている。コケ植物のモデル生物である苔類ゼニゴケにおいては、dinor-OPDA が COI-JAZ 受容体と結合する活性型分子であり、下流には MYC2 転写因子が機能していることが明らかになっている (Monte et al., 2018; Peñuelas et al., 2019)。ハイゴケは、イネと同じくモミラクトンを生産することが知られており (Nozaki et al., 2007; Li et al., 2020)、植物における化学防御システムの進化の解明において重要な研究材料である。本章では、関連研究として蘚類ハイゴケにおける COI1-JAZ-MYC2 シグナル伝達機構の解明の一環として、JAZ-MYC2 間の相互作用解析を行った。

5-2 材料と方法

5-2-1 コムギ胚芽無細胞系を用いたタンパク質の発現

本解析に用いたタンパク質発現用プラスミドは、当研究室において作成されたものを使用した（2020 年度帝京大学卒業論文 安藤、村上）。ハイゴケ JAZ (CpJAZ1-3) は pEU-E01-DYKDDDK-MCS-N1 (セルフリースイエンシス) にクローニングされており、FLAG タグ融合タンパク質として発現する。ハイゴケ MYC2 (CpMYC2a, CpMYC2b) は pEU-E01-GST-PS-MCS-N1 (セルフリースイエンシス) にクローニングされており、GST 融合タンパク質として発現する。

タンパク質の発現

タンパク質の発現には、WEPRO7240 Expression Kit (セルフリースイエンシス) を用いた。

<転写>

Transcription mixture を調製し、37°C で 6 h インキュベートして転写反応を行った。転写後は、mRNA のサンプルを室温に戻した。mRNA が合成できたことを確認するために、サンプル 5 μ L を 1% アガロースゲルを用いて電気泳動した。

<翻訳>

最初に translation mixture の調製をした。次に、SUB-AMIX SGC を氷上で融解し、それらを等量ずつ混和して、滅菌蒸留水で 40 倍希釈することで 1×SUB-AMIX SGC を作製した。これは毎回使用の直前に調整した。1×SUB-AMIX SGC を底がフラットな 96 well プレートに 103 μ L ずつ分注した。そこへ translation mixture を静かに加え、重層させた。プレートシールで密閉し、15°C で 20 h インキュベートして翻訳反応を行った。反応終了後は、反応液をピペティングで混和してから 1.5 mL チューブに回収し、4°C、14,000 rpm、5 min 遠心した。可溶性分画である上清のみを回収し、凍結融解による失活を避けるために、使用まで 4°C で保存した。

試薬の組成

○Transcription mixture (1 反応あたり)

Nuclease-Free water	4.25 μ L
5×Transcription Buffer LM	2 μ L
NTP Mix	1 μ L
RNase Inhibiter	0.125 μ L
SP6 RNA Polymerase	0.125 μ L
Plasmid (1 μ g/ μ L)	2.5 μ L
<hr/>	
	Up to 10 μ L

低温を保つよう操作は氷上で行った。

○Translation mixture (1 反応あたり)

mRNA	5 μ L
Creatine kinase	0.4 μ L
WEPRO7240	5 μ L
<hr/>	
	10.4 μ L

WEPRO7240 は流水解凍し、解凍後はすぐに氷上に移した。creatine kinase は氷上で解凍した。これらはピペティングで静かに混和し、泡を立てないようにした。

タンパク質の発現確認

発現させたタンパク質の一部を 2×sample buffer により 96°C で 10 min 加熱して変性させた。3-2-2 の方法で SDS-PAGE を行い、1 枚のゲルはウェスタンブロッティングに供し、もう 1 枚は Q-stain (日本ジェネティクス) を用いて CBB 染色した。15 min 室温で振盪して染色し、蒸留水に移して 1 h 以上振盪して脱色した。これは、ChemiDoc™ XRS+ を用いて写真を撮影した。

残りのゲルは、3-2-2 の手順に沿ってニトロセルロースメンブレンへ転写を行い、抗体反応および化学発光の検出を行った。その際、ハイゴケ JAZ は 1 次抗体に抗 FLAG 抗体を 1,000 倍希釈で、2 次抗体に抗マウス IgG HRP 抗体 (GE ヘルスケア ライフサイエンス) を 25,000 倍希釈したもので抗体反応を行った。ハイゴケ MYC2 は、抗 GST HRP conjugate 抗体 (GE ヘルスケア ライフサイエンス) を 25,000 倍希釈して使用した。

5-2-2 共免疫沈降法による JAZ-MYC2 の相互作用解析

共免疫沈降およびその後の検出までの操作は 3-2-2 と同様の方法で行った。ただし、JAZ と MYC2 の相互作用には JA-Ile などのリガンドを必要としないため、リガンドは加えずに免疫沈降を行った。

5-2-3 本章で扱った遺伝子の gene ID

CpJAZ1: MW775562, *CpJAZ2*: MW775563, *CpJAZ3*: MW775564, *CpMYC2a*: MW775565, *CpMYC2b*: MW775566

5-3 結果と考察

ハイゴケは、RNA-seq およびゲノムシーケンスの結果から、少なくとも 3 つの JAZ ホモログと 2 つの MYC2 ホモログを持つことが明らかになっていた。ハイゴケの JAZ および MYC2 の機能が保存されているかを検討するため、被子植物と同様に JAZ-MYC2 間の相互作用が見られるかを解析した。

コムギ胚芽無細胞系によって発現させた FLAG タグで標識したハイゴケ JAZ と GST で標識したハイゴケ MYC2 の組み換えタンパク質および、GST を CBB 染色とウェスタンブロットティングに供した (Fig.5-1A、B、C)。すると、これらのタンパク質はすべて発現していることが確認でき、特に CpJAZ2 は他の JAZ と比較して極めて高発現していた (Fig.5-1C)。そこで、共免疫沈降の際には大まかな JAZ の濃度をそろえる目的で、CpJAZ2 は 5 倍希釈したものを以降の操作に使用した。

これらタンパク質を混和し、共免疫沈降法によって相互作用解析を行った結果を Fig.5-2 に示す。ネガティブコントロールとして用いた GST は、抗 GST 抗体で検出をするとすべてのハイゴケ JAZ とは共免疫沈降されず、相互作用を示すバンドは検出されなかった。CpMYC2a と共に CpJAZ1 と CpJAZ2、CpJAZ3 をそれぞれ共免疫沈降すると、これらすべての JAZ が CpMYC2a と共免疫沈降され、すべての JAZ と相互作用する能力を有していることが示された。特に、CpMYC2a-CpJAZ2 の組み合わせは相互作用を示すバンドが濃く検出されており、このペアは他の組み合わせよりも強く相互作用する可能性が考えられた。また、CpMYC2b と CpJAZ1、CpJAZ2、CpJAZ3 をそれぞれ共免疫沈降すると、これらもすべて共免疫沈降され、相互作用することが示された。さらに、これらのサンプルを抗 FLAG 抗体で検出をすると、すべての JAZ が検出でき、共免疫沈降中に JAZ の分解は起きていなかった。

高等植物であるシロイヌナズナやイネにおいて、JA のマスター転写因子として MYC2 および OsMYC2 が機能することが知られている (Kazan and Manners, 2013; Ogawa et al., 2017a)。これらは JAZ を介してリプレッサーコンプレックスを形成することで転写の調節が行われている (Chini et al., 2007; Pauwels et al., 2010)。本研究より、非維管束植物であるハイゴケにおいても、JA シグナル伝達においてこの機構が保存されており、JAZ が MYC2 の転写抑制に重要な機能を持つことが示唆された。ゼニゴケでは、1 種保存されている JAZ が、MYC2 と相互作用することが報告されている (Peñuelas et al., 2019)。今後は、ハイゴケの OPDA シグナル伝達機構を解明することで、モミラクトンの生合成の制御機構を明らかにするため、OPDA シグナル伝達系のリガンドや受容体の同定、JAZ と MYC2 の下流やその他の転写因子についての解析など、課題は多く残されている。

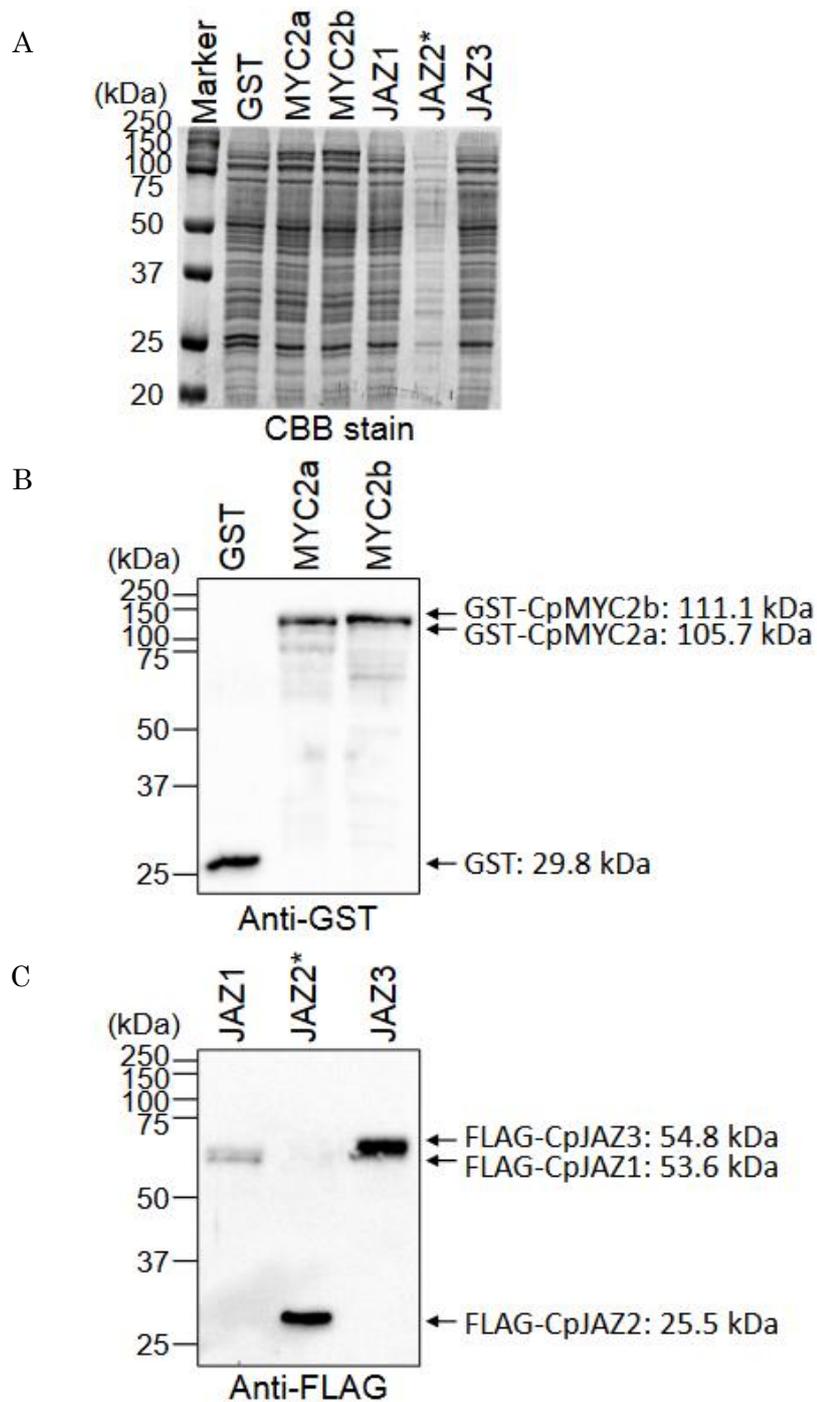


Figure 5-1 コムギ胚芽無細胞系によって発現させたタンパク質の発現確認 (Inagaki et al., 2021 を一部改変)

A: CBB によるタンパク質の染色

B: ハイゴケ MYC2 と GST の化学発光の検出

C: ハイゴケ JAZ の化学発光の検出

*: CpJAZ2 は発現効率が非常に高いため、おおよその量を他の JAZ に揃えるために 5 倍希釈したものを使用した。

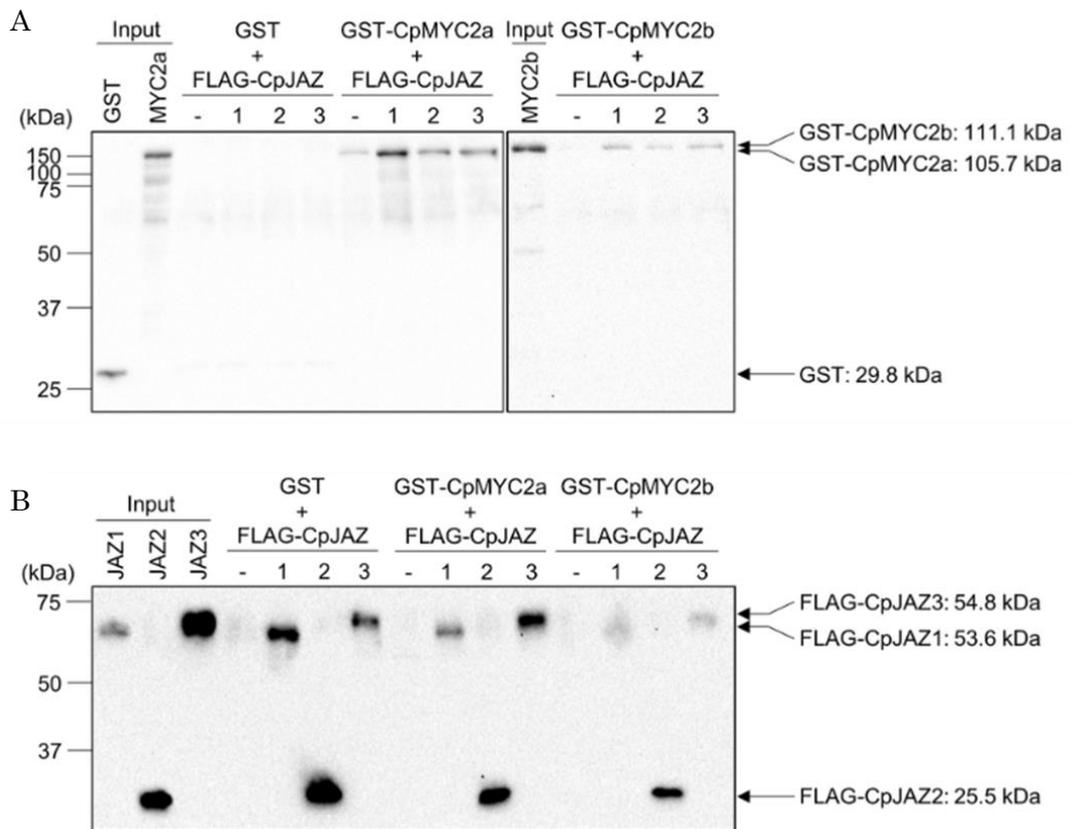


Figure 5-2 ハイゴケ JAZ-MYC2 の相互作用解析 (Inagaki et al., 2021 を一部改変)

A: 抗 GST 抗体による MYC2 タンパク質の検出

B: 抗 FLAG 抗体による JAZ タンパク質の検出

第6章 総合討論

本博士論文研究では、イネとハイゴケにおける JA シグナル伝達機構の解明に向け、JA シグナル伝達機構において重要な COI と JAZ、MYC2 の生理機能について解析を行った。

第2章においては、イネで3種コードされている COI について、それらの生理機能の解析を行った。ゲノム編集によってそれぞれのイネ COI の変異株を2ライン以上取得した。これらの変異株の表現型を解析した結果、*oscoi2* 変異株では稔性が低下するとともに、蒴の開裂が見られなかった。このことから、OsCOI2 は蒴の開裂などを通して稔性の制御に関与することが示された。次に、葉における MeJA 処理時の応答を解析した。*oscoi2* 変異株では、ファイトアレキシンの蓄積量が顕著に低下するとともに、ファイトアレキシンの生合成遺伝子の発現量も低下していた。さらに、イネの JA シグナル伝達のマスター転写因子 OsMYC2 の発現も低下していた。また、MeJA 処理後のクロロフィル含有量の定量を行うと、*oscoi2* 変異株でのみクロロフィルの分解が軽減され、MeJA に対する抵抗性を示した。このことから、葉における MeJA 誘導的なファイトアレキシン生産と老化にも OsCOI2 が主要に関与すること、OsCOI2 の下流では OsMYC2 が機能していることが明らかとなった。JA を含む寒天培地で変異株を生育させ、幼苗における伸長生長の抑制を解析すると、地上部の伸長の抑制には OsCOI1a と OsCOI1b、OsCOI2 が重複して関与するのに対して、地下部の伸長の抑制には OsCOI2 が主要に関与することが示された。また、播種後2~3か月後に *oscoi2* 変異株では葉身の一部が褐変化する生理障害が観察された。その生理障害部位には酸化ストレスのマーカーである MDA が蓄積しており、環境ストレスに対する応答や抵抗性の変化が関与している可能性が考えられた。

先行研究においては、3つのイネ COI の変異株を同時に比較した例はなかった。本研究では、ゲノム編集によってイネ COI の変異株を作製して表現型の解析を行うことによって、OsCOI2 が多くの JA 応答において主要な役割を担っていること、イネ COI 分子種が機能分化していることが示された。

第3章では、OsCOI2 がイネの JA 応答において主要な機能を果たす機構を明らかにする手がかりを得るために、イネの COI と JAZ の間の相互作用の解析を行った。まず、生体内における活性型分子である(+)-7-*iso*-JA-Ile の精製を行った。得られた(+)-7-*iso*-JA-Ile をリガンドとして、共免疫沈降法を用いて GST-OsCOI と fluorescein 標識した OsJAZ ペプチドの相互作用の解析を行った。その結果、OsJAZ2 と OsJAZ5 のペプチドは OsCOI2 とのみ特異的に相互作用することが示された。

第4章では、第3章で見出した OsCOI2 と特異的に相互作用する OsJAZ2 および OsJAZ5 の機能解析を行った。これらの遺伝子の過剰発現株を作出し、MeJA 処理時のファイトアレ

キシシン蓄積量の解析を行った。*OsJAZ2*過剰発現株と*OsJAZ5ΔJas*過剰発現株では、顕著にその蓄積量が低下した。次にMeJA処理時のクロロフィル含有量を定量すると、*OsJAZ2*過剰発現株と*OsJAZ5ΔJas*過剰発現株でクロロフィルの分解に対する顕著な抑制性を示した。これらのことから、*OsJAZ2*と*OsJAZ5*は葉におけるJA誘導的なファイトアレキシン生産および老化を抑制することが示された。

第5章は、ハイゴケのJAZ-MYC2の相互作用解析を行った。ハイゴケにおいて3種コードされているJAZと、2種コードされているMYC2との相互作用解析を行うと、すべてのJAZ-MYC2の組み合わせで相互作用することが示された。このことから、陸上植物として最も古いと考えられているコケ類においても、JAZとMYC2によるJAシグナル伝達機構が保存されていることが示唆された。

以上の結果を総合し、推測されるイネのJAシグナル伝達機構の全体像をFig.6-1に示す。*OsCOI2*と*OsJAZ2*または*OsJAZ5*の受容体複合体がイネの葉におけるJA誘導的なファイトアレキシンの生産や老化の促進に関与する。一方、幼苗の地上部の伸長抑制には複数のイネCOIが冗長的に関与しており、すべてのCOIと相互作用する*OsJAZ4*などが相互作用因子として受容体複合体を形成していると考えられる。

シロイヌナズナのCOI1とJAZ1ペプチドを用いた結晶構造解析から、リガンドと接するアミノ酸残基やそれぞれが接するアミノ酸残基がすでに明らかとなっている(Sheard et al., 2010)。COI1のArg85とArg348、Tyr386、Arg409、Tyr444、Arg496がリガンドと結合する(Fig.6-2)。JAZ1ペプチドにおいては、Ala204とArg206がリガンドと結合する。さらに、COI1のTyr472とJAZペプチドのPro202、およびArg496とIle203、Arg348とArg206、Arg351とAla204が結合することでリガンドの受容ポケットを形成している(Fig.6-2)。

*OsCOI1a*と*OsCOI1b*、*OsCOI2*においては、そのほとんどで高い保存性を示すが、*OsCOI2*でのみリガンドのアミノ基と水素結合するTyrがHisに置換されていた(Fig.6-2、Table6-1)。Tyrはリガンドのシクロペンタノンに接近することで受容ポケットの入り口を狭め、その下に疎水性の空洞を形成するが、塩基性であるHisになることでJA-Ileの結合の様式が変わっている可能性が考えられる。

*OsJAZ2*と*OsJAZ4*、*OsJAZ5*のうち、canonical Jas motifを持つ*OsJAZ4*はシロイヌナズナJAZ1のJasドメインと比較した際には高い保存性を示したが、divergent Jasを持つ*OsJAZ2*と*OsJAZ5*では性質の異なるアミノ酸に置換されていることが多かった(Table6-2)。特に、JA-IleやCOI1との結合に重要な残基が置換されており、*OsCOI2*に対する選択性が生じていることが考えられる。先行研究として、イネCOIとcoronatine、シロイヌナズナJAZ1ペプチドを用いた分子モデリングから、シロイヌナズナCOI1と*OsCOI2*は*OsCOI1a*と*OsCOI1b*よりも受容ポケットが広がっていることも報告されて

いる (Lee et al., 2013)。

現在では AlphaFold2 をはじめとして、簡便にタンパク質の立体構造の分子モデリングを行う技術が普及しつつある。しかしながら、低分子化合物とタンパク質間の相互作用を AlphaFold2 で解析することは現状ではできない。COI と JAZ のみでのモデリングを試みたが、リガンドなしではシロイヌナズナ COI1-JAZ1 の結晶構造を再現することは出来なかった。

本研究で扱ったイネやハイゴケは複数の COI 遺伝子を保持しているのに対し、モデル植物であるシロイヌナズナや苔類のゼニゴケは単一の COI 遺伝子を持つ。特にイネを含む単子葉植物では、双子葉植物との分岐以降の早い段階で COI1 と COI2 に遺伝子重複が起こっていることが分子系統解析から示唆された。本研究によって、イネの稔性、JA 誘導的な老化や防御応答の誘導においては OsCOI2 が主要な機能を担うことが示された。トウモロコシにおいても ZmCOI2a および ZmCOI2b が稔性に関与することが明らかになっており、単子葉植物においては COI2 が主要な JA-Ile 受容体であることが予想される。一方で、葉鞘の伸長生長制御や花の形態形成においては OsCOI1a, OsCOI1b および OsCOI2 の機能が重複していることが示唆された。このことから、栄養生長や生殖といったイネの生存に必須な JA の作用については、複数の COI が重複して機能をすることで redundancy を持たせている可能性が考えられる。また、本研究において、他のイネ COI-JAZ の組み合わせと比較して、OsCOI2-OsJAZ2 の相互作用にはより高濃度の JA-Ile が必要であることが示唆された (Fig.3-7)。花の形態形成や伸長生長の制御には定常的に存在している低濃度の JA-Ile で制御される一方で、ストレス応答時には高濃度の JA-Ile が細胞内に蓄積する。COI-JAZ 受容体複合体の組み合わせによって JA-Ile との親和性が異なることが、JA-Ile の濃度の違いによる下流応答の変化を生み出している可能性も考えられる。

JAZ はほとんどの生物種で複数保持しており、数は異なっているもののそのほとんどの JAZ は重複して機能していると考えられる。生物種によっては、COI1 だけでなく受容体複合体を形成する JAZ や、下流のマスター転写因子 MYC の数も異なっていることから、植物は COI1 や JAZ、MYC のいずれかを複数有することで JA の多彩な生理作用を制御していることが予想できる。OsJAZ2 や OsJAZ5 などの divergent Jas を持つ JAZ は双子葉植物には存在しない一方で、トウモロコシやミナトカモジグサなどの単子葉植物には存在する (Fig.6-3)。単子葉植物は共通して COI2 を持つことから、COI の重複と機能分化の過程で COI2 と特異的に相互作用する divergent Jas を持つ JAZ が共進化してきたことが予想される。

今後は、イネ JAZ の変異株を用いてその表現型を解析することにより、より詳細な OsJAZ2 や OsJAZ5 の生理機能を明らかになることが期待される。また、OsJAZ2 や OsJAZ5 と共にリプレッサーコンプレックスを形成する NINJA と TPL の同定と解析や、OsJAZ2

やOsJAZ5の標的となる転写因子を明らかにしていく必要がある。これらの解析によって、イネにおけるJAの受容メカニズムの全容が解明されることが期待される。一般的に、植物の生長と防御応答はtrade-offの関係にあり、JAはその制御に関与する。本研究から得られた結果は、植物の生長と防御応答を独立して制御して、生育に負荷を与えずに抵抗性を賦与する技術の開発などへの応用が期待される。

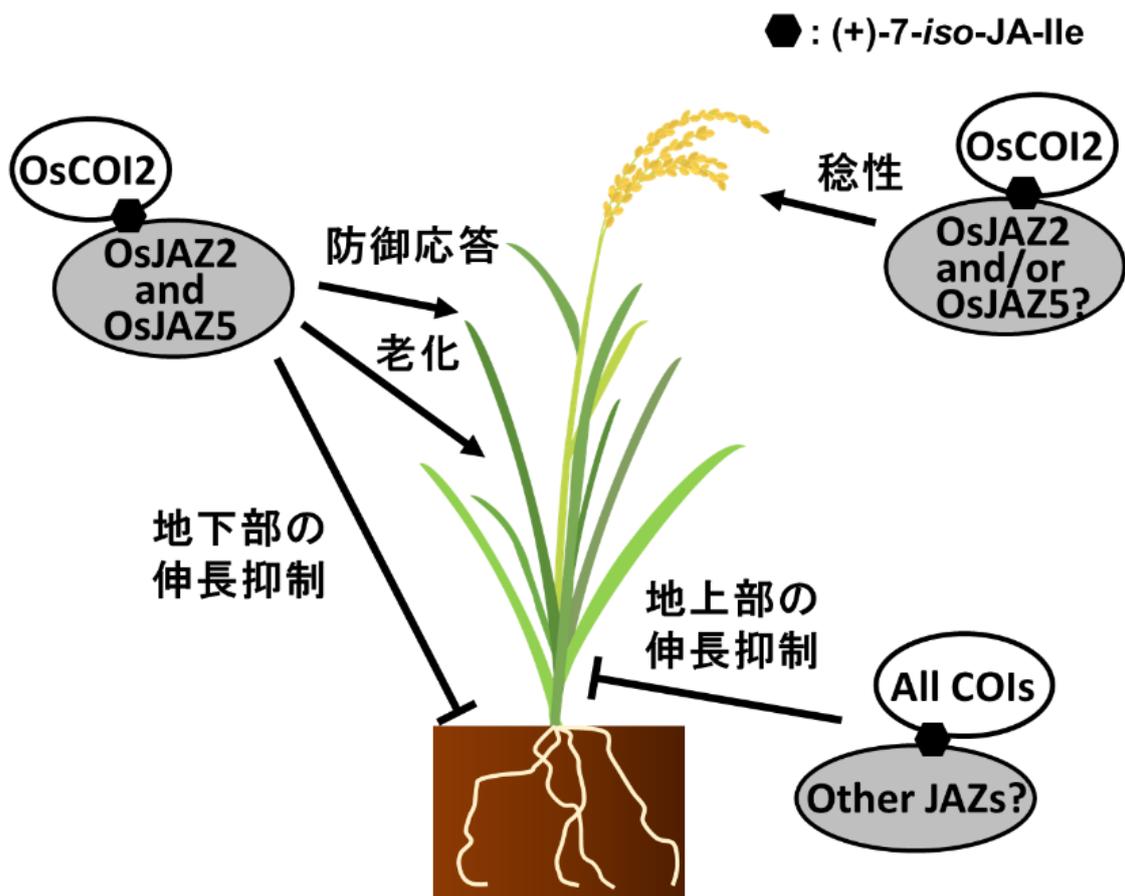


Figure 6-1 イネにおける JA の生理作用ごとのシグナル伝達機構
 OsCOI2-OsJAZ2 と OsCOI2-OsJAZ5 によって防御応答と老化を制御すると考えられる。

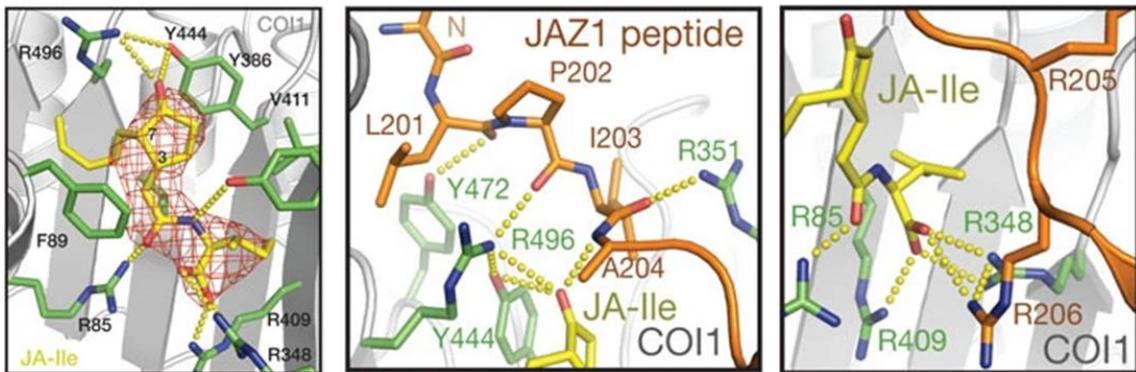


Figure 6-2 シロイヌナズナ COI1 と JAZ1 ペプチドの結晶構造解析 (Sheard et al. (2010) figure3 および 4 より引用)

緑が COI1 を、オレンジが JAZ1 ペプチドを、黄色が JA-Ile を示す。

Table6-1 シロイヌナズナ COI1 の重要なアミノ酸残基とイネ COI に対応する残基

	JA-Ile contacting residues				JAZ1 contacting residues		JA-Ile and JAZ1 contacting residues	
COI1	Arg85	Tyr386	Arg409	Tyr444	Arg351	Tyr472	Arg348	Arg496
OsCOI1a	Arg90	Tyr389	Arg412	Tyr447	Arg354	Asn475	Arg351	Arg499
OsCOI1b	Arg92	Tyr391	Arg414	Tyr449	Arg356	Asn477	Arg353	Arg501
OsCOI2	Arg87	His391	Arg414	Tyr449	Arg355	Asn477	Arg352	Arg501

シロイヌナズナの COI1 と比較して置換が起こっていたアミノ酸残基を黄色で示す。

Table6-2 シロイヌナズナ JAZ1 の重要なアミノ酸残基とイネ JAZ で対応する残基

	COI1 contacting residues		JA-Ile and COI1 contacting residues	
JAZ1	Pro202	Ile203	Ala204	Arg206
OsJAZ2	Gly159	Leu160	Ser161	Lys163
OsJAZ4	Pro335	Gln337	Ala337	Lys339
OsJAZ5	Pro135	Thr138	Thr137	Thr139

	JAZ degnon	core sequence										C-terminal motif		
OsJAZ2	A S G L S M K R	S	L	Q	R	F	L	E	K	R	K	T	R	- - - A A A P L Y
BdJAZ2	P A G L S M K R	S	L	Q	R	F	L	Q	K	R	K	A	R	- - - A A A A P Y
Zm00001d018811	D A G L S M K R	S	L	Q	L	F	L	Q	K	R	K	A	R	T A A A A A P P Y
consensus	- - P - A R K	S	L	-	-	F	-	-	K	R	-	-	R	- - - - - P Y

	JAZ degnon	core sequence										C-terminal motif		
OsJAZ5	K E P L T R T K	S	L	Q	R	F	L	S	K	R	K	E	R	L T S L G P Y
BdJAZ5	D I P L A R T K	S	L	Q	Q	F	L	V	K	R	K	E	R	L T H L G P Y
ZmJAZ9	D M P L T R T K	S	L	Q	Q	F	L	Q	K	R	K	E	R	L S G P G P Y
consensus	- - P - A R K	S	L	-	-	F	-	-	K	R	-	-	R	- - - - - P Y

Figure 6-3 イネ科植物における divergent Jas のアライメント
 イネにおける divergent Jas を有する OsJAZ2 と OsJAZ5 をクエリとして、ミナトカモジグサおよびトウモロコシで相同遺伝子の探索を BLAST 解析で行った (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。得られたミナトカモジグサおよびトウモロコシの JAZ の divergent Jas と、OsJAZ2 および OsJAZ5 との比較には clustalw (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を使用した。

A: OsJAZ2 とイネ科植物における類似のアミノ酸配列

BdJAZ2: Bradi1g58490.1 (Wang et al. (2017))

B: OsJAZ5 とイネ科植物における類似のアミノ酸配列

BdJAZ5: Bradi5g08650.1 (Wang et al. (2017))、ZmJAZ9: Zm00001d003903 (Sun et al. (2021))

参考文献

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., & Shinozaki, K. (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant cell*, *9*(10), 1859–1868.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant cell*, *15*(1), 63–78.
- Bai, Y., Meng, Y., Huang, D., Qi, Y., & Chen, M. (2011). Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics*, *98*(2), 128–136.
- Bell, E., Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(19), 8675–8679.
- Boter, M., Golz, J. F., Giménez-Ibañez, S., Fernandez-Barbero, G., Franco-Zorrilla, J. M., & Solano, R. (2015). FILAMENTOUS FLOWER Is a Direct Target of JAZ3 and Modulates Responses to Jasmonate. *The Plant cell*, *27*(11), 3160–3174.
- Cai, Q., Yuan, Z., Chen, M., Yin, C., Luo, Z., Zhao, X., Liang, W., Hu, J., & Zhang, D. (2014). Jasmonic acid regulates spikelet development in rice. *Nature communications*, *5*, 3476.
- Cao, L., Tian, J., Liu, Y., Chen, X., Li, S., Persson, S., Lu, D., Chen, M., Luo, Z., Zhang, D., & Yuan, Z. (2021). Ectopic expression of OsJAZ6, which interacts with OsJAZ1, alters JA signaling and spikelet development in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *108*(4), 1083–1096.
- Cartwright, D.W., Langcake, P.W., Pryce, R.J., Leworthy, D.P. & Ride, J.P. (1981). Isolation and characterization of two phytoalexins from rice as momilactones A and B. *Phytochemistry*, *20*(3), 535–537.
- Chen, R., Jiang, H., Li, L., Zhai, Q., Qi, L., Zhou, W., Liu, X., Li, H., Zheng, W., Sun, J., & Li, C. (2012). The Arabidopsis mediator subunit MED25 differentially

- regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *The Plant cell*, *24*(7), 2898–2916.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., & Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 666–671.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J. M., Fernández-Calvo, P., & Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *59*(1), 77–87.
- Chung, H. S., Koo, A. J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2008). Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant physiology*, *146*(3), 952–964.
- Chung, H. S., & Howe, G. A. (2009). A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *The Plant cell*, *21*(1), 131–145.
- Cruz Castillo, M., Martínez, C., Buchala, A., Métraux, J. P., & León, J. (2004). Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. *Plant physiology*, *135*(1), 85–94.
- Ellis, C., & Turner, J. G. (2002). A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in Arabidopsis thaliana seeds and young seedlings. *Planta*, *215*(4), 549–556.
- Feng, X., Zhang, L., Wei, X., Zhou, Y., Dai, Y., & Zhu, Z. (2020). OsJAZ13 Negatively Regulates Jasmonate Signaling and Activates Hypersensitive Cell Death Response in Rice. *International journal of molecular sciences*, *21*(12), 4379.
- Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., & Turner, J. G. (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *The Plant cell*, *6*(5), 751–759.

- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., & Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology*, *5*(5), 344–350.
- Fu, J., Wu, H., Ma, S., Xiang, D., Liu, R., & Xiong, L. (2017). OsJAZ1 Attenuates Drought Resistance by Regulating JA and ABA Signaling in Rice. *Frontiers in plant science*, *8*, 2108.
- Fu, W., Jin, G., Jiménez-Alemán, G. H., Wang, X., Song, J., Li, S., Lou, Y., & Li, R. (2022). The jasmonic acid-amino acid conjugates JA-Val and JA-Leu are involved in rice resistance to herbivores. *Plant, cell & environment*, *45*(1), 262–272.
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E. E., & Wolfender, J. L. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in Arabidopsis in response to wounding. *The Journal of biological chemistry*, *283*(24), 16400–16407.
- Giri, M. K., Gautam, J. K., Rajendra Prasad, V. B., Chattopadhyay, S., & Nandi, A. K. (2017). Rice MYC2 (OsMYC2) modulates light-dependent seedling phenotype, disease defence but not ABA signalling. *Journal of biosciences*, *42*(3), 501–508.
- Hamann, T., Bennett, M., Mansfield, J., & Somerville, C. (2009). Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *57*(6), 1015–1026.
- Hamberg, M., & Fahlstadius, P. (1990). Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics*, *276*(2), 518–526.
- Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S., & Koshiba, T. (2004). A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant & cell physiology*, *45*(5), 550–559.
- He, Y., Hong, G., Zhang, H., Tan, X., Li, L., Kong, Y., Sang, T., Xie, K., Wei, J., Li, J., Yan, F., Wang, P., Tong, H., Chu, C., Chen, J., & Sun, Z. (2020). The OsGSK2 Kinase

- Integrates Brassinosteroid and Jasmonic Acid Signaling by Interacting with OsJAZ4. *The Plant cell*, *32*(9), 2806–2822.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*, *7*(8), 1267–1287.
- Inagaki, H., Miyamoto, K., Ando, N., Murakami, K., Sugisawa, K., Morita, S., Yumoto, E., Teruya, M., Uchida, K., Kato, N., Kaji, T., Takaoka, Y., Hojo, Y., Shinya, T., Galis, I., Nozawa, A., Sawasaki, T., Nojiri, H., Ueda, M., & Okada, K. (2021). Deciphering OPDA Signaling Components in the Momilactone-Producing Moss *Calohyphnum plumiforme*. *Frontiers in plant science*, *12*, 688565.
- Ingaki, H., Hayashi, K., Takaoka, Y., Ito, H., Fukumoto, Y., Yajima-Nakagawa, A., Chen, X., Shimosato-Nonaka, M., Hassett, E., Hatakeyama, K., Hirakuri, Y., Ishitsuka, M., Yumoto, E., Sakazawa, T., Asahina, M., Uchida, K., Okada, K., Yamane, H., Ueda, M. & Miyamoto, K. (2022). Genome Editing Reveals both the Crucial Role of OsCOI2 in Jasmonate Signaling, and the Functional Diversity of COI1 Homologs in Rice. *Plant and Cell Physiology*, in press
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, *96*(1), 23–28.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *The Plant cell*, *13*(10), 2191–2209.
- Jikumaru, Y., Asami, T., Seto, H., Yoshida, S., Yokoyama, T., Obara, N., Hasegawa, M., Kodama, O., Nishiyama, M., Okada, K., Nojiri, H., & Yamane, H. (2004). Preparation and biological activity of molecular probes to identify and analyze jasmonic acid-binding proteins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *68*(7), 1461–1466.
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: the master in action. *Molecular plant*, *6*(3), 686–703.

- Katsir, L., Schilmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y., & Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(19), 7100–7105.
- Kiribuchi, K., Sugimori, M., Takeda, M., Otani, T., Okada, K., Onodera, H., Ugaki, M., Tanaka, Y., Tomiyama-Akimoto, C., Yamaguchi, T., Minami, E., Shibuya, N., Omori, T., Nishiyama, M., Nojiri, H., & Yamane, H. (2004). RERJ1, a jasmonic acid-responsive gene from rice, encodes a basic helix-loop-helix protein. *Biochemical and biophysical research communications*, *325*(3), 857–863.
- Kiribuchi, K., Jikumaru, Y., Kaku, H., Minami, E., Hasegawa, M., Kodama, O., Seto, H., Okada, K., Nojiri, H., & Yamane, H. (2005). Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *69*(5), 1042–1044.
- Kitagawa, K., Kurinami, S., Oki, K., Abe, Y., Ando, T., Kono, I., Yano, M., Kitano, H., & Iwasaki, Y. (2010). A novel kinesin 13 protein regulating rice seed length. *Plant & cell physiology*, *51*(8), 1315–1329.
- Kneeshaw, S., Soriano, G., Monte, I., Hamberg, M., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., Franco-Zorrilla, J. M., Kato, N., Ueda, M., Rey-Stolle, M. F., Barbas, C., Michavila, S., Gimenez-Ibanez, S., Jimenez-Aleman, G. H., & Solano, R. (2022). Ligand diversity contributes to the full activation of the jasmonate pathway in *Marchantia polymorpha*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(36), e2202930119.
- Kodama, O., Miyakawa, J., Akatsuka, T., & Kiyosawa, S. (1992). Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, *31*(11), 3807–3809.
- Koga, J., Shimura, M., Oshima, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., & Ogasawara, N. (1995). Phytocassanes A, B, C and D, novel diterpene phytoalexins from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron*, *51*(29), 7907–7918.

- Koga, J., Ogawa, N., Yamauchi, T., Kikuchi, M., Ogasawara, N., & Shimura, M. (1997). Functional moiety for the antifungal activity of phytocassane E, a diterpene phytoalexin from rice. *Phytochemistry*, 44(2), 249–253.
- Lee, H. Y., Seo, J. S., Cho, J. H., Jung, H., Kim, J. K., Lee, J. S., Rhee, S., & Do Choi, Y. (2013). *Oryza sativa* COI homologues restore jasmonate signal transduction in *Arabidopsis coi1-1* mutants. *PLoS one*, 8(1), e52802.
- Lee, S. H., Sakuraba, Y., Lee, T., Kim, K. W., An, G., Lee, H. Y., & Paek, N. C. (2015). Mutation of *Oryza sativa* CORONATINE INSENSITIVE 1b (OsCOI1b) delays leaf senescence. *Journal of integrative plant biology*, 57(6), 562–576.
- Lei, Y., Lu, L., Liu, H. Y., Li, S., Xing, F., & Chen, L. L. (2014). CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular plant*, 7(9), 1494–1496.
- Li, J. L., Wie, L. L., Chen, C., Liu, D., Gu, Y. Q., Duan-Mu, J. X., Chen, G. T., & Song, Y. (2020). Bioactive Constituents from the Bryophyta *Hypnum plumaeforme*. *Chemistry & biodiversity*, 17(12), e2000552.
- Li, L., Zhang, H., Chen, C., Huang, H., Tan, X., Wei, Z., Li, J., Yan, F., Zhang, C., Chen, J., & Sun, Z. (2021a). A class of independently evolved transcriptional repressors in plant RNA viruses facilitates viral infection and vector feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(11), e2016673118.
- Li, M., Yu, G., Cao, C., & Liu, P. (2021b). Metabolism, signaling, and transport of jasmonates. *Plant communications*, 2(5), 100231.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 16(7), 1938–1950.
- Luo, W., Nanjo, Y., Komatsu, S., Matsuura, H., & Takahashi, K. (2016). Proteomics of *Physcomitrella patens* protonemata subjected to treatment with 12-oxo-

- phytodienoic acid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(12), 2357–2364.
- Luo, W., Komatsu, S., Abe, T., Matsuura, H., & Takahashi, K. (2020). Comparative Proteomic Analysis of Wild-Type *Physcomitrella Patens* and an OPDA-Deficient *Physcomitrella Patens* Mutant with Disrupted *PpAOS1* and *PpAOS2* Genes after Wounding. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1417.
- Ma, L. Y., Zhai, X. Y., Qiao, Y. X., Zhang, A. P., Zhang, N., Liu, J., & Yang, H. (2021). Identification of a novel function of a component in the jasmonate signaling pathway for intensive pesticide degradation in rice and environment through an epigenetic mechanism. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 268(Pt A), 115802.
- Mao, L., Kawaide, H., Higuchi, T., Chen, M., Miyamoto, K., Hirata, Y., Kimura, H., Miyazaki, S., Teruya, M., Fujiwara, K., Tomita, K., Yamane, H., Hayashi, K. I., Nojiri, H., Jia, L., Qiu, J., Ye, C., Timko, M. P., Fan, L., & Okada, K. (2020). Genomic evidence for convergent evolution of gene clusters for momilactone biosynthesis in land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(22), 12472–12480.
- Mehra, P., Pandey, B. K., Verma, L., Prusty, A., Singh, A. P., Sharma, S., Malik, N., Bennett, M. J., Parida, S. K., Giri, J., & Tyagi, A. K. (2022). *OsJAZ11* regulates spikelet and seed development in rice. *Plant direct*, 6(5), e401.
- Meng, F., Yang, C., Cao, J., Chen, H., Pang, J., Zhao, Q., Wang, Z., Qing Fu, Z., & Liu, J. (2020). A bHLH transcription activator regulates defense signaling by nucleocytoplasmic trafficking in rice. *Journal of integrative plant biology*, 62(10), 1552–1573.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., & Wasternack, C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *The New phytologist*, 177(1), 114–127.
- Mikami, M., Toki, S., & Endo, M. (2015). Comparison of CRISPR/Cas9 expression

- constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant molecular biology*, *88*(6), 561–572.
- Miyamoto, K., Shimizu, T., Mochizuki, S., Nishizawa, Y., Minami, E., Nojiri, H., Yamane, H., & Okada, K. (2013) Stress-induced expression of the transcription factor RERJ1 is tightly regulated in response to jasmonic acid accumulation in rice. *Protoplasma*, *250*:241–249
- Miyamoto, K., Shimizu, T., & Okada, K. (2014). Transcriptional regulation of the biosynthesis of phytoalexin: A lesson from specialized metabolites in rice. *Plant Biotechnology*, *31*, 377–388
- Miyamoto, K., Enda, I., Okada, T., Sato, Y., Watanabe, K., Sakazawa, T., Yumoto, E., Shibata, K., Asahina, M., Iino, M., Yokota, T., Okada, K., & Yamane, H. (2016). Jasmonoyl-l-isoleucine is required for the production of a flavonoid phytoalexin but not diterpenoid phytoalexins in ultraviolet-irradiated rice leaves. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *80*(10), 1934–1938.
- Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A. M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J. M., García-Casado, G., Gouhier-Darimont, C., Reymond, P., Takahashi, K., García-Mina, J. M., Nishihama, R., Kohchi, T., & Solano, R. (2018). Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nature chemical biology*, *14*(5), 480–488.
- Monte, I., Franco-Zorrilla, J. M., García-Casado, G., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., Nishihama, R., Kohchi, T., & Solano, R. (2019). A Single JAZ Repressor Controls the Jasmonate Pathway in *Marchantia polymorpha*. *Molecular plant*, *12*(2), 185–198.
- Monte, I., Kneeshaw, S., Franco-Zorrilla, J. M., Chini, A., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2020). An Ancient COI1-Independent Function for Reactive Electrophilic Oxylinins in Thermotolerance. *Current biology : CB*, *30*(6), 962–971.e3.
- Monte, I., Caballero, J., Zamarreño, A. M., Fernández-Barbero, G., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2022). JAZ is essential for ligand specificity of the COI1/JAZ co-

- receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(49), e2212155119.
- Moreno, J. E., Shyu, C., Campos, M. L., Patel, L. C., Chung, H. S., Yao, J., He, S. Y., & Howe, G. A. (2013). Negative feedback control of jasmonate signaling by an alternative splice variant of JAZ10. *Plant physiology*, *162*(2), 1006–1017.
- Motohashi K. (2015). A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC biotechnology*, *15*, 47.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M. J., & Berger, S. (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, *20*(3), 768–785.
- Mukhtarova, L. S., Lantsova, N. V., Khairutdinov, B. I., & Grechkin, A. N. (2020). Lipoxygenase pathway in model bryophytes: 12-oxo-9(13),15-phytodienoic acid is a predominant oxylipin in *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry*, *180*, 112533.
- Nonaka, S., Sugawara, M., Minamisawa, K., Yuhashi, K., & Ezura, H. (2008). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase enhances *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer into plant cells. *Applied and environmental microbiology*, *74*(8), 2526–2528.
- Nozaki, H., Hayashi, K., Nishimura, N., Kawaide, H., Matsuo, A., & Takaoka, D. (2007). Momilactone A and B as allelochemicals from moss *Hypnum plumaeforme*: first occurrence in bryophytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *71*(12), 3127–3130.
- Ogawa, N., & Kobayashi, Y., (2008) Strategy for synthesis of the isoleucine conjugate of epi-jasmonic acid. *Tetrahedron Letters*, *49*, 7124–7127
- Ogawa, S., Kawahara-Miki, R., Miyamoto, K., Yamane, H., Nojiri, H., Tsujii, Y., & Okada, K. (2017a). OsMYC2 mediates numerous defence-related transcriptional

- changes via jasmonic acid signalling in rice. *Biochemical and biophysical research communications*, *486*(3), 796–803.
- Ogawa, S., Miyamoto, K., Nemoto, K., Sawasaki, T., Yamane, H., Nojiri, H., & Okada, K. (2017b). OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability. *Scientific reports*, *7*, 40175.
- Okada, K., Kawaide, H., Miyamoto, K., Miyazaki, S., Kainuma, R., Kimura, H., Fujiwara, K., Natsume, M., Nojiri, H., Nakajima, M., Yamane, H., Hatano, Y., Nozaki, H., & Hayashi, K. (2016). HpDTC1, a Stress-Inducible Bifunctional Diterpene Cyclase Involved in Momilactone Biosynthesis, Functions in Chemical Defence in the Moss *Hypnum plumaeforme*. *Scientific reports*, *6*, 25316.
- Oliver, J. P., Castro, A., Gaggero, C., Cascón, T., Schmelz, E. A., Castresana, C., & Ponce de León, I. (2009). Pythium infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta*, *230*(3), 569–579.
- Pandey, B. K., Verma, L., Prusty, A., Singh, A. P., Bennett, M. J., Tyagi, A. K., Giri, J., & Mehra, P. (2021). OsJAZ11 regulates phosphate starvation responses in rice. *Planta*, *254*(1), 8.
- Park, J. H., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T., Feldmann, K. A., & Feyereisen, R. (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *31*(1), 1–12.
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., Chico, J. M., Bossche, R. V., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, G., Witters, E., Inzé, D., Long, J. A., De Jaeger, G., Solano, R., & Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, *464*(7289), 788–791.
- Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Métraux, J. P., & Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant cell*,

10(12), 2103–2113.

- Peñuelas, M., Monte, I., Schweizer, F., Vallat, A., Reymond, P., García-Casado, G., Franco-Zorrilla, J. M., & Solano, R. (2019). Jasmonate-Related MYC Transcription Factors Are Functionally Conserved in *Marchantia polymorpha*. *The Plant cell*, 31(10), 2491–2509.
- Ponce De León, I., Schmelz, E. A., Gaggero, C., Castro, A., Álvarez, A., & Montesano, M. (2012). *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Molecular plant pathology*, 13(8), 960–974.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), 384–394
- Poudel, A. N., Holtsclaw, R. E., Kimberlin, A., Sen, S., Zeng, S., Joshi, T., Lei, Z., Sumner, L. W., Singh, K., Matsuura, H., & Koo, A. J. (2019). 12-Hydroxy-Jasmonoyl-l-Isoleucine Is an Active Jasmonate That Signals through CORONATINE INSENSITIVE 1 and Contributes to the Wound Response in Arabidopsis. *Plant & cell physiology*, 60(10), 2152–2166.
- Qi, T., Wang, J., Huang, H., Liu, B., Gao, H., Liu, Y., Song, S., & Xie, D. (2015). Regulation of Jasmonate-Induced Leaf Senescence by Antagonism between bHLH Subgroup IIIe and IIIId Factors in Arabidopsis. *The Plant cell*, 27(6), 1634–1649.
- Qi, X., Guo, S., Wang, D., Zhong, Y., Chen, M., Chen, C., Cheng, D., Liu, Z., An, T., Li, J., Jiao, Y., Wang, Y., Liu, J., Zhang, Y., Chen, S., & Liu, C. (2022). ZmCOI2a and ZmCOI2b redundantly regulate anther dehiscence and gametophytic male fertility in maize. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 110(3), 849–862.
- Qiu, J., Xie, J., Chen, Y., Shen, Z., Shi, H., Naqvi, N. I., Qian, Q., Liang, Y., & Kou, Y.

- (2022). Warm temperature compromises JA-regulated basal resistance to enhance *Magnaporthe oryzae* infection in rice. *Molecular plant*, *15*(4), 723–739.
- Riemann, M., Muller, A., Korte, A., Furuya, M., Weiler, E. W., & Nick, P. (2003). Impaired induction of the jasmonate pathway in the rice mutant hebiba. *Plant physiology*, *133*(4), 1820–1830.
- Riemann, M., Riemann, M., & Takano, M. (2008). Rice JASMONATE RESISTANT 1 is involved in phytochrome and jasmonate signalling. *Plant, cell & environment*, *31*(6), 783–792.
- Riemann, M., Haga, K., Shimizu, T., Okada, K., Ando, S., Mochizuki, S., Nishizawa, Y., Yamanouchi, U., Nick, P., Yano, M., Minami, E., Takano, M., Yamane, H., & Iino, M. (2013). Identification of rice Allene Oxide Cyclase mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *74*(2), 226–238.
- Saito, R., Hayashi, K., Nomoto, H., Nakayama, M., Takaoka, Y., Saito, H., Yamagami, S., Muto, T., & Ueda, M. (2021). Extended JAZ degron sequence for plant hormone binding in jasmonate co-receptor of tomato SICO11-SIJAZ. *Scientific reports*, *11*(1), 13612.
- Sato, Y., Takehisa, H., Kamatsuki, K., Minami, H., Namiki, N., Ikawa, H., Ohyanagi, H., Sugimoto, K., Antonio, B. A., & Nagamura, Y. (2013). RiceXPro version 3.0: expanding the informatics resource for rice transcriptome. *Nucleic acids research*, *41*(Database issue), D1206–D1213.
- Schaller, F., & Weiler, E. W. (1997a). Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants-- 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *European journal of biochemistry*, *245*(2), 294–299.
- Schaller, F., & Weiler, E. W. (1997b). Molecular cloning and characterization of 12-oxo-phytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*. Structural and functional relationship to yeast old yellow enzyme. *The Journal of biological chemistry*, *272*(44), 28066–28072.

- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Lee, J. S., & Choi, Y. D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(8), 4788–4793.
- Seo, J. S., Joo, J., Kim, M. J., Kim, Y. K., Nahm, B. H., Song, S. I., Cheong, J. J., Lee, J. S., Kim, J. K., & Choi, Y. D. (2011). OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *65*(6), 907–921.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., & Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, *468*(7322), 400–405.
- Shimizu, T., Jikumaru, Y., Okada, A., Okada, K., Koga, J., Umemura, K., Minami, E., Shibuya, N., Hasegawa, M., Kodama, O., Nojiri, H., & Yamane, H. (2008). Effects of a bile acid elicitor, cholic acid, on the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in suspension-cultured rice cells. *Phytochemistry*, *69*(4), 973–981.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C. J., Ono, K., Toki, S., & Takatsuji, H. (2007). Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *The Plant cell*, *19*(6), 2064–2076.
- Staswick, P. E., Su, W., & Howell, S. H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(15), 6837–6840.
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, *16*(8), 2117–2127. *Phytochemistry*, *51*(2), 187–192
- Stelmach, B. A., Müller, A., & Weiler, E. W., (1999). 12-Oxo-phytodienoic acid and indole-3-acetic acid in jasmonic acid-treated tendrils of *Bryonia dioica*.

- Stumpe, M., Göbel, C., Faltin, B., Beike, A. K., Hause, B., Himmelsbach, K., Bode, J., Kramell, R., Wasternack, C., Frank, W., Reski, R., & Feussner, I. (2010). The moss *Physcomitrella patens* contains cyclopentenones but no jasmonates: mutations in allene oxide cyclase lead to reduced fertility and altered sporophyte morphology. *The New phytologist*, *188*(3), 740–749.
- Sun, P., Shi, Y., Valerio, A. G. O., Borrego, E. J., Luo, Q., Qin, J., Liu, K., & Yan, Y. (2021). An updated census of the maize TIFY family. *PLoS one*, *16*(2), e0247271.
- Takaoka, Y., Iwahashi, M., Chini, A., Saito, H., Ishimaru, Y., Egoshi, S., Kato, N., Tanaka, M., Bashir, K., Seki, M., Solano, R., & Ueda, M. (2018). A rationally designed JAZ subtype-selective agonist of jasmonate perception. *Nature communications*, *9*(1), 3654.
- Takaoka, Y., Nagumo, K., Azizah, I. N., Oura, S., Iwahashi, M., Kato, N., & Ueda, M. (2019). A comprehensive *in vitro* fluorescence anisotropy assay system for screening ligands of the jasmonate COI1-JAZ co-receptor in plants. *The Journal of biological chemistry*, *294*(13), 5074–5081.
- Tan, X., Zhang, H., Yang, Z., Wei, Z., Li, Y., Chen, J., & Sun, Z. (2022). NF-YA transcription factors suppress jasmonic acid-mediated antiviral defense and facilitate viral infection in rice. *PLoS pathogens*, *18*(5), e1010548.
- Taniguchi, S., Hosokawa-Shinonaga, Y., Tamaoki, D., Yamada, S., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2014). Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice. *Plant, cell & environment*, *37*(2), 451–461.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., & Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 661–665.
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St Aubin, B., Campos, M. L., & Howe, G. A. (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *82*(4), 669–679.

- Tian, J., Cao, L., Chen, X., Chen, M., Zhang, P., Cao, L., Persson, S., Zhang, D., & Yuan, Z. (2019). The OsJAZ1 degron modulates jasmonate signaling sensitivity during rice development. *Development (Cambridge, England)*, *146*(4), dev173419.
- Toda, Y., Tanaka, M., Ogawa, D., Kurata, K., Kurotani, K., Habu, Y., Ando, T., Sugimoto, K., Mitsuda, N., Katoh, E., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Hattori, T., & Takeda, S. (2013). RICE SALT SENSITIVE3 forms a ternary complex with JAZ and class-C bHLH factors and regulates jasmonate-induced gene expression and root cell elongation. *The Plant cell*, *25*(5), 1709–1725.
- Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S., & Tanaka, H. (2006). Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *47*(6), 969–976.
- Toshima, E., Nanjo, Y., Komatsu, S., Abe, T., Matsuura, H., & Takahashi, K. (2014). Proteomic analysis of *Physcomitrella patens* treated with 12-oxo-phytodienoic acid, an important oxylipin in plants. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *78*(6), 946–953.
- Uji, Y., Taniguchi, S., Tamaoki, D., Shishido, H., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2016). Overexpression of OsMYC2 Results in the Up-Regulation of Early JA-Responsive Genes and Bacterial Blight Resistance in Rice. *Plant & cell physiology*, *57*(9), 1814–1827.
- Uji, Y., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2017). Identification of OsMYC2-regulated senescence-associated genes in rice. *Planta*, *245*(6), 1241–1246.
- Ullah, A., Manghwar, H., Shaban, M., Khan, A. H., Akbar, A., Ali, U., Ali, E., & Fahad, S. (2018). Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental science and pollution research international*, *25*(33), 33103–33118.
- Um, T. Y., Lee, H. Y., Lee, S., Chang, S. H., Chung, P. J., Oh, K. B., Kim, J. K., Jang, G., & Choi, Y. D. (2018). Jasmonate Zim-Domain Protein 9 Interacts With Slender

Rice 1 to Mediate the Antagonistic Interaction Between Jasmonic and Gibberellic Acid Signals in Rice. *Frontiers in plant science*, 9, 1866.

Valea, I., Motegi, A., Kawamura, N., Kawamoto, K., Miyao, A., Ozawa, R., Takabayashi, J., Gomi, K., Nemoto, K., Nozawa, A., Sawasaki, T., Shinya, T., Galis, I., Miyamoto, K., Nojiri, H., & Okada, K. (2022). The rice wound-inducible transcription factor RERJ1 sharing same signal transduction pathway with OsMYC2 is necessary for defense response to herbivory and bacterial blight. *Plant molecular biology*, 109(4-5), 651–666.

van Loon LC., Pierpoint WS., Boller T., & Conejero V. (1994). Recommendations for Naming Plant Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12(3):245–264.

Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., & Gheysen, G. (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends in plant science*, 12(6), 239–244.

Wang, Y., Qiao, L., Bai, J., Wang, P., Duan, W., Yuan, S., Yuan, G., Zhang, F., Zhang, L., & Zhao, C. (2017). Genome-wide characterization of JASMONATE-ZIM DOMAIN transcription repressors in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*, 18(1), 152.

Wang, M., Yang, D., Ma, F., Zhu, M., Shi, Z., & Miao, X. (2019). OsHLH61-OsbHLH96 influences rice defense to brown planthopper through regulating the pathogen-related genes. *Rice (New York, N.Y.)*, 12(1), 9.

Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., Miesch, M., Pinot, F., & Heitz, T. (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *The Journal of biological chemistry*, 288(44), 31701–31714.

Xiao, Y., Chen, Y., Charnikhova, T., Mulder, P. P., Heijmans, J., Hoogenboom, A., Agalou, A., Michel, C., Morel, J. B., Dreini, L., Kater, M. M., Bouwmeester, H., Wang, M., Zhu, Z., & Ouwkerk, P. B. (2014). OsJAR1 is required for JA-regulated floret opening and anther dehiscence in rice. *Plant molecular biology*, 86(1-2), 19–33.

- Yamada, S., Kano, A., Tamaoki, D., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2012). Involvement of OsJAZ8 in jasmonate-induced resistance to bacterial blight in rice. *Plant & cell physiology*, *53*(12), 2060–2072.
- Yamamura, C., Mizutani, E., Okada, K., Nakagawa, H., Fukushima, S., Tanaka, A., Maeda, S., Kamakura, T., Yamane, H., Takatsuji, H., & Mori, M. (2015). Diterpenoid phytoalexin factor, a bHLH transcription factor, plays a central role in the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *84*(6), 1100–1113.
- Yamane, H., Sugawara J., Suzuki Y., Shimamura E., & Takahashi N. (1980). Syntheses of Jasmonic Acid Related Compounds and Their Structure-Activity Relationships on the Growth of Rice Seedlings. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2857–2864.
- Yamauchi, Y., & Sugimoto, Y. (2010). Effect of protein modification by malondialdehyde on the interaction between the oxygen-evolving complex 33 kDa protein and photosystem II core proteins. *Planta*, *231*(5), 1077–1088.
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., & Farmer, E. E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant cell*, *19*(8), 2470–2483.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., & Xie, D. (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant cell*, *21*(8), 2220–2236.
- Yang, D. L., Yao, J., Mei, C. S., Tong, X. H., Zeng, L. J., Li, Q., Xiao, L. T., Sun, T. P., Li, J., Deng, X. W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z., & He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(19), E1192–E1200.
- Ye, H., Du, H., Tang, N., Li, X., & Xiong, L. (2009). Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses

- in rice. *Plant molecular biology*, 71(3), 291–305.
- Ye, M., Luo, S. M., Xie, J. F., Li, Y. F., Xu, T., Liu, Y., Song, Y. Y., Zhu-Salzman, K., & Zeng, R. S. (2012). silencing COI1 in rice increases susceptibility to chewing insects and impairs inducible defense. *PloS one*, 7(4), e36214.
- Ye, M., Song, Y., Long, J., Wang, R., Baerson, S. R., Pan, Z., Zhu-Salzman, K., Xie, J., Cai, K., Luo, S., & Zeng, R. (2013). Priming of jasmonate-mediated antiherbivore defense responses in rice by silicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), E3631–E3639.
- Yokotani, N., Ichikawa, T., Kondou, Y., Iwabuchi, M., Matsui, M., Hirochika, H., & Oda, K. (2013). Role of the rice transcription factor JAmyb in abiotic stress response. *Journal of plant research*, 126(1), 131–139.
- Yoshihara, T., Omer E. A., Koshino H., Sakamura S., Kikuta Y., & Koda Y., (1989) Structure of a Tuber-inducing Stimulus from Potato Leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 53(10), 2835–2837
- Yuan, J. S., Köllner, T. G., Wiggins, G., Grant, J., Degenhardt, J., & Chen, F. (2008). Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 55(3), 491–503.
- Zhai, Q., & Li, C. (2019). The plant Mediator complex and its role in jasmonate signaling. *Journal of experimental botany*, 70(13), 3415–3424.
- Zhang, Y., & Turner, J. G. (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PloS one*, 3(11), e3699.
- Zhang, H., & Zhou, C. (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant molecular biology*, 82(6), 539–545.
- Zhu, X., Chen, J., Qiu, K., & Kuai, B. (2017). Phytohormone and Light Regulation of Chlorophyll Degradation. *Frontiers in plant science*, 8, 1911.

農林水産省 「平成 27 年度オーガニック・エコ農作物の理解増進方策に関する調査事業
報告書」 平成 27 年 12 月

https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/pdf/27itaku_organic.pdf

(2022 年 12 月 5 日)

高牟禮逸朗著 (2005) 「改訂 3 版モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・
ミヤコグサ編」 島本功、岡田清孝、田畑哲之監修、秀潤社

安藤緑子、村上航平 2020 年度帝京大学工学部バイオサイエンス学科卒業論文

下里美由紀、ハセツト絵美、畠山幸大、平栗優子 2016 年度帝京大学バイオサイエンス
学科卒業論文

謝辞

本博士論文の執筆にあたり、修士課程・博士課程において指導教員として自由に実験ができる環境を提供して頂き、熱心にご指導を下さりました帝京大学理工学部バイオサイエンス学科宮本皓司講師に心より御礼申し上げます。また、学部生の卒業研究において素晴らしい研究テーマを設定して頂き、研究者としてだけでなく人としても成長をさせて下さった東京大学山根久和名誉教授（元帝京大学理工学部バイオサイエンス学科教授）に心より御礼申し上げます。

COI-JAZ 相互作用解析に用いたジャスモン酸イソロイシンの平衡混合物を譲渡して下さった帝京大学理工学部バイオサイエンス学科内田健一教授に厚く御礼申し上げます。また、ナノドロップや qRT-PCR の提供、および電子顕微鏡での観察方法をご教授頂きました帝京大学理工学部バイオサイエンス学科朝比奈雅志准教授に厚く御礼申し上げます。パーティクルガンの提供およびイネの栽培スペースを提供して下さいました帝京大学理工学部バイオサイエンス学科篠村知子教授に厚く御礼申し上げます。ファイトカサンの標品を提供して下さいました帝京大学理工学部バイオサイエンス学科古賀仁一郎教授に厚く御礼申し上げます。また、博士論文の審査委員として査読して下さいました、篠村先生と内田先生、古賀先生、朝比奈先生に重ねて御礼申し上げます。LC-MS/MS で多くのサンプルを測定して頂きました帝京大学先端機器分析センター湯本絵美様に厚く御礼申し上げます。HPLC などの機器の使用法から温室の管理、日々のバイオサイエンス学科棟での生活など様々な点でサポートして下さいました帝京大学理工学部バイオサイエンス学科酒澤智子様、柴田恭美様に深く感謝いたします。

本研究において、COI-JAZ 相互作用解析に用いるタンパク質やペプチドの分与、並びにプロトコールをご教授頂きました東北大学大学院理学研究科上田実教授、高岡洋輔准教授、加治拓哉助教、林謙吾様に厚く御礼申し上げます。研究のご助言や多くのプラスミドの分与をして下さいました東京大学アグロバイオテクノロジー研究センター岡田憲典准教授に厚く御礼申し上げます。イネのゲノム編集用プラスミド pU6gRNA および pZH_gYSA_MMCas9 を譲渡して頂いた農研機構生物機能利用部門遠藤真咲博士、横浜市立大学三上雅史博士に厚く御礼申し上げます。

精神的に支えて頂いた友人、公私にわたり日々の研究を支えて頂いた植物化学研究室の皆様並びに卒業生の皆様、経済的にたくさんの支援を頂いた両親に深く感謝致します。

最後になりましたが、本博士論文研究において非常に多くの方のご助力を賜りました。私に携わって頂いた皆様、本当にありがとうございました。

2023 年 1 月 27 日