

シロイヌナズナ本葉における恒常型 ER body の同定と
その食害抑止機能の解明

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系
植物分子細胞生物学分科

中崎 淳子

目次

目次	1
略語一覧	2
要旨	4
序論	6
結果	
1. leaf ER body の発見	11
2. leaf ER body に蓄積する β -グルコシダーゼの同定	12
3. leaf ER body の形成機構の解析	12
4. leaf ER body の防御機能の解明	16
考察	18
材料と方法	24
謝辞	31
引用文献	32
図表	40

略語一覽

ACT2: ACTIN2

BASTA: glufosinate ammonium

BGLU: BETA GLUCOSIDASE

bHLH: basic Helix Loop Helix

cDNA: complementary DNA

COI1: CORONATINE INSENSITIVE 1

Col-0: Columbia-0

DC: dilated cisternae

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

ER: endoplasmic reticulum

EtBr: ethidium bromide

GFP: green fluorescent protein

GUS: β -glucuronidase

Hyg: Hygromycin

JA: jasmonic acid

JAI3: JASMONATE-INSENSITIVE 3

JAZ: jasmonate ZIM-domain

JIN1: JASMONATE-INSENSITIVE 1

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass spectrometry

LC-QqQ-MS: liquid chromatography with triple-quadrupole mass spectrometry

MEB: MEMBRANE OF ENDOPLASMIC RETICULUM BODY

MS: Murashige and Skoog

PCR: polymerase chain reaction

PEN2: PENETRATION 2

qko: quadruple knockout

RT-PCR: reverse transcription-PCR

RFP: red fluorescent protein

SEM: Scanning Electron Microscope

TE: Tris-EDTA buffer

TGG: thioglucoside glucohydrolase

TSA1: TONSOKU-ASSOCIATING PROTEIN 1

X-Gluc: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -Dglucuronide

要旨

ER body は小胞体由来のオルガネラであり、アブラナ目植物に特異的に存在する。アブラナ目植物は進化の過程でグルコシノレート-ミロシナーゼ系と呼ばれる防御機構を獲得した。グルコシノレート-ミロシナーゼ系は、二次代謝産物であるグルコシノレートとグルコシノレートを加水分解する酵素であるミロシナーゼの酵素基質反応に基づく。グルコシノレートとミロシナーゼは平常時には別々の区画に蓄積されているが、昆虫による食害などで植物組織が崩壊するとグルコシノレートとミロシナーゼが出会い、グルコシノレートが加水分解されて、外敵に対して有害な揮発性の化合物が生成される。グルコシノレート-ミロシナーゼ系において、ER body はミロシナーゼの蓄積場所としての役割を担い、昆虫や病原菌に対する防御に働くと考えられている。ER body は一般的に恒常型と誘導型に分類される。シロイヌナズナにおいて、恒常型 ER body は幼植物体の全身の表皮細胞と成熟植物体の根の表皮細胞に存在する。一方で、誘導型 ER body はロゼット葉の表皮細胞で傷害により誘導される。本研究では、これまで恒常型 ER body が存在しないと考えられていたシロイヌナズナのロゼット葉において、特定の表皮細胞に ER body が恒常的に存在することを見出し、これを leaf ER body (L-ER body) と命名した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、L-ER body は BGLU18 と PYK10 の 2 種類のミロシナーゼを蓄積していることが判明した。 *bglu18 pyk10* 二重変異体では L-ER body が観察されなくなったことから、L-ER body の内容物が BGLU18 と PYK10 であることが支持された。BGLU18 は誘導型 ER body に、PYK10 は恒常型 ER body に蓄積するミロシナーゼである。つまり、L-ER body は恒常型 ER body と誘導型 ER body にそれぞれ特徴的なミロシナーゼの両方を蓄積していた。リアルタイム PCR 解析により、*PYK10* 遺伝子の発現は恒常型 ER body 形成に必須な bHLH 型転写因子である NAI1 により制御される一方で、*BGLU18* 遺伝子の発現は NAI1 による制御を受けないことが分かった。この結果は、先行研究で報告された恒常型 ER body や誘導型 ER body における *PYK10* および *BGLU18* 遺伝子のそれぞれの転写制御機構と一致した。以上のことから、L-ER body は、蓄積するミロシナーゼやそれらの遺伝子の転写制御の点において、恒常型 ER body と誘導型 ER body の両方の特徴を併せもつ第 3 の ER body であることが明らかになった。

シロイヌナズナのロゼット葉における限定的な L-ER body の分布と、恒常型 ER body の形成に働く bHLH 型転写因子である NAI1 の遺伝子発現パターンには類似性が見られた。また、顕微鏡解析により L-ER body は *nail* 変異体のロゼット葉では形成されない

ことが分かった。これらの結果から、L-ER body の形成には NAI1 が必要であることが示された。先行研究により、誘導型 ER body の形成には NAI1 は必須ではなく、植物ホルモンのジャスモン酸が関わることが知られている。ジャスモン酸シグナル伝達経路で中心的な役割を果たす因子の変異体のロゼット葉では、誘導型 ER body が形成されない一方で、L-ER body は野生型と同様に形成されることが顕微鏡観察により明らかになった。これらの結果から、L-ER body の形成機構には恒常型 ER body の形成機構と共通点があるのに対して、誘導型 ER body の形成機構とは異なることが示唆された。

L-ER body が関与するグルコシノレート-ミロシナーゼ系が果たす植食性生物に対する防御機能について、オカダンゴムシを用いた食害実験と LC-MS を用いたグルコシノレート加水分解能の解析により検証した。L-ER body を形成しない *bglu18 pyk10* 二重変異体は野生型に比べてオカダンゴムシによる食害を受けやすかった。また、*bglu18 pyk10* 二重変異体ではインドールグルコシノレートの一種である 4-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosylate (4MI3G) の加水分解が野生型に比べて著しく遅延していることが分かった。これらの結果から、L-ER body は 4MI3G の加水分解に関与しており、その分解産物がオカダンゴムシの摂食行動を抑制していることが示唆された。シロイヌナズナのロゼット葉の維管束沿いには、L-ER body に蓄積するミロシナーゼとは異なるミロシナーゼである TGG1 と TGG2 を蓄積する異形細胞であるミロシン細胞が存在することが知られている。*tgg1 tgg2* 二重変異体を用いて同様の食害実験と LC-MS 解析を行い、ミロシン細胞が関与するグルコシノレート-ミロシナーゼ系の防御機能を調べた。その結果、*tgg1 tgg2* 二重変異体におけるオカダンゴムシによる食害の程度は野生型と同等であり、4MI3G の加水分解にも異常がなかった。このことから、ミロシン細胞はオカダンゴムシの摂食行動に影響を与えず、4MI3G の加水分解にも関与していないことが示唆された。以上の結果より、シロイヌナズナのロゼット葉では、L-ER body とミロシン細胞がそれぞれ基質特異性の異なるミロシナーゼを異なる場所に蓄積することで、多様な外敵に対する防御を効果的に成立させていると考えられた。

序論

植物の防御機構

植物は3億5千万年以上にわたって植食性生物と共存してきた (Labandeira, 2013). 植食性生物との共進化の過程で、植物は植食性生物に対する様々な防御機構を進化させてきた。植物の植食性生物に対する防御機構は、直接的防御と間接的防御の2つに分けられる (Kessler and Baldwin, 2002; War et al., 2014). 直接的防御は、トゲや毛、葉の厚みなどの物理的な障壁や、植食性生物に対して忌避効果や毒性効果を及ぼす化合物による防御を指す。一方、間接的防御は、植食性生物の天敵を特異的に呼び寄せる揮発性有機化合物の放出や天敵の生育に有効な食べ物などの提供により、植食性生物による食害を間接的に防ぐ防御のことである。また、植物の防御機構は、常に効果を発揮する恒常的防御と、食害や病原菌の感染に応答して防御を高める誘導性防御に分けることもできる (Mithöfer and Boland, 2012). したがって、植物の防御は、恒常的直接防御、誘導的直接防御、恒常的間接防御、誘導的間接防御の4種類に分類される。上記の戦略は、独立に機能する場合もあれば、互いに協同して機能する場合もある。また、関与する化合物やタンパク質が共通していることもある。

グルコシノレート-ミロシナーゼ系

植物は様々な二次代謝産物 (特殊代謝産物ともいう) を生産することが知られている。二次代謝産物は一次代謝産物とは異なり植物体の成長や発生、繁殖には影響を与えないが、植物が自然環境に適応し生き残るために必要な化合物である。二次代謝産物は植物種において特異的に合成され、テルペノイドやアルカロイド、フラボノイド、グルコシノレートなどが含まれる。これらの多くは、植物において病原菌や植食性生物などの外敵に対する防御や花粉媒介昆虫の誘引などに利用される (Wink, 1988; Wink, 2003).

グルコシノレートはアブラナ目植物で広く合成される二次代謝産物である (Halkier and Gershenzon, 2006). グルコシノレートはミロシナーゼと呼ばれる酵素によって加水分解されるとイソチオシアネートやニトリルなどの揮発性化合物に変換され、これらが外敵に対する忌避物質として働く (図1, Halkier and Gershenzon, 2006). グルコシノレートとミロシナーゼは無傷な組織では別々の区画に蓄積されているが、食害を受けて植物組織が崩壊すると両者が混ざり合い、加水分解反応が起こる (Bones and Rossiter, 1996; Rask et al., 2000). この反応はグルコシノレート-ミロシナーゼ系あるいはマスタードオイルボムシステム (カラシ油爆弾) と呼ばれ、昆虫や線虫、軟体動物などの様々な植食性生物に対する防御として有効であることが報告されてきた (Borek et al., 1997; Buskov

et al., 2002; Lazzeri et al., 2004; Noret et al., 2005; Beekwilder et al., 2008; Falk et al., 2014).

グルコシノレートは、 β -D-グルコピラノース基と (Z)-N-ヒドロキシムイノスルホン酸エステル基、可変構造の R 基が硫黄原子を介して結合した基本構造をもつ (Fahey et al., 2001). これまでにアブラナ目植物で約 120 種類のグルコシノレートが同定されており、アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナ [*Arabidopsis thaliana*] は約 40 種類のグルコシノレートを合成する (Hogge, 1988; Haughn et al., 1991; Kliebenstein et al., 2001; Reichelt et al., 2002). グルコシノレートは由来するアミノ酸の違いによって 3 種類に大別される. アラニン, ロイシン, イソロイシン, メチオニン, バリンに由来するものは脂肪族グルコシノレート, トリプトファンに由来するものはインドールグルコシノレート, フェニルアラニンまたはチロシンに由来するものは芳香族グルコシノレートと呼ばれる (Halkier and Gershenzon, 2006). シロイヌナズナにおいて, 蓄積するグルコシノレートの濃度や種類は器官や発生段階によって異なることが報告されている (Brown et al., 2003). 例えば, ロゼット葉では脂肪族グルコシノレートが大部分を占め, 次いでインドールグルコシノレートが検出されるが, 発生が進むにつれてその割合は逆転する. グルコシノレートは構造中に硫黄原子を含むことから, グルコシノレートを蓄積する細胞は S 細胞と呼ばれている. S 細胞は, 葉や茎の脈管や葉の縁に沿って存在し, これらがグルコシノレート蓄積細胞として機能することが示唆されている (Koroleva et al., 2000; Koroleva et al., 2010). しかしながら, S 細胞がグルコシノレートの生合成機能をもつか否かは未だ議論の渦中である (Koroleva et al., 2010; Koroleva and Cramer, 2011).

一方, ミロシナーゼの蓄積場所としてはミロシン細胞と ER body が知られている (図 2). ミロシン細胞は, 葉の維管束沿いに発達する異形細胞であり, その液胞内にはミロシナーゼである THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 1 (TGG1) および TGG2 が大量に蓄積する (Ueda et al., 2006). ER body は小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) 由来のオルガネラであり, ミロシナーゼの PYK10 などが蓄積する (Matsushima et al., 2003b). したがって, シロイヌナズナでは細胞レベルおよびオルガネラレベルによる 2 つの機構でミロシナーゼをグルコシノレートから隔離していると考えられている.

ER body はアブラナ目植物に特異的なオルガネラである

ER body が最初に発見されたのは, ハツカダイコン [*Raphanus sativa* L.] の根の表皮であった. 当時, これらは ER body ではなく dilated cisternae (DC) と呼ばれており, 電子顕微鏡を用いた観察によって, DC は ER に連続した袋状の構造であり, 表面はリボソームで覆われていることが明らかになった (Bonnett and Newcomb, 1965). その後, 類似の形態を示す構造体がアブラナ科 [*Cruciferae*] に広く見出され (Iversen, 1970), フウ

チョウボク科 [Capparaceae] および一部のモクセイソウ科 [Resedaceae] とケシ科 [Papaveraceae] に存在することが報告された (Behnke and Eschlbeck, 1978; Bones, 1989). 一方, マメ科植物であるシロバナシナガワハギ [*Melilotus albus*] やインゲンマメ [*Phaseolus vulgaris*], キク科植物のヒマワリ [*Helianthus annuus*], イネ科植物のトウモロコシ [*Zea mays*] には存在しないことが報告されている (Bonnett and Newcomb, 1965; Iversen and Flood, 1969). 緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いた細胞内構造の観察が可能になると, 植物でも様々なオルガネラ移行シグナルを付加した GFP を発現させることで細胞内構造が可視化されるようになった (Haseloff and Amos, 1995; Köhler, 1998). シロイヌナズナにおける GFP を用いた ER の観察では, ER の網目状構造に加えて紡錘型の構造が観察された (Haseloff et al., 1997; Gunning, 1998; Ridge et al., 1999; Hawes et al., 2001; Hayashi et al., 2001). この紡錘型の構造が DC の特徴的な形態と類似していることから, これらが同一の構造体であることが示唆された (Gunning, 1998). この構造体はシロイヌナズナの幼植物体の表皮細胞に特異的に観察され, ER に由来することから ER body と命名された (Hayashi et al., 2001). このとき, 電子顕微鏡でも野生型のシロイヌナズナの子葉にも ER body が観察されており, 導入遺伝子の過剰発現によるアーティファクトではないことが確認されている (Hayashi et al., 2001; Matsushima et al., 2003b).

ER body には恒常型と誘導型が存在する (図 2). シロイヌナズナでは, 恒常型 ER body は幼植物体の子葉や胚軸, 根を含む全身の表皮細胞に恒常的に存在し, 植物体が成長するにしたがって消失する (Matsushima et al., 2002). 成熟植物体では根の表皮細胞には恒常的に存在するが, ロゼット葉には一般的には存在しないと考えられていた (Matsushima et al., 2003b). 一方で, 若いロゼット葉ではいくつかの細胞で ER body が見られるという記述もあるが (Nakano et al., 2012), その詳細は分かっていなかった. また, シロイヌナズナのロゼット葉では, 傷害ストレスやメチルジャスモン酸処理により ER body の形成が誘導されることが報告されている (Matsushima et al., 2002; Matsushima et al., 2003a). これらの ER body は幼植物体に見られる恒常型 ER body と区別して誘導型 ER body と呼ばれる. 恒常型 ER body と誘導型 ER body は蓄積するミロシナーゼが異なり, 恒常型 ER body が PYK10 を蓄積する一方で, 誘導型 ER body は BETA-GLUCOSIDASE 18 (BGLU18) を蓄積する (Ogasawara et al., 2009).

ミロシナーゼの基質特異性

ミロシナーゼは β -グルコシダーゼのうち, グルコシノレート加水分解活性をもつものを指す. シロイヌナズナにおいて, 47 種類の β -グルコシダーゼ (BGLU1~BGLU47) が存在し, これらはアミノ酸配列に基づいて 10 のサブグループに分けられる (Xu et al.,

2004). このうち、ミロシナーゼ活性を示す β -グルコシダーゼは主にサブグループ 7 および 3 に属すると考えられている。サブグループ 7 には TGG1~TGG6 の 6 種類が分類され、このうち TGG1 および TGG2 はミロシン細胞に蓄積する。TGG1 および TGG2 は複数の脂肪族グルコシノレートを一時的に加水分解する活性をもつ (Zhou et al., 2012). TGG4 および TGG5 はシロイヌナズナでは根でのみ発現しており, *in vitro* で TGG1 とは異なるミロシナーゼ活性を示すことが報告されている (Andersson et al., 2009). TGG3 と TGG6 は共に花で発現するが, ミロシナーゼ活性はもたないと考えられている (Zhang et al., 2002; Wang et al., 2009).

一方, サブグループ 3 には ER body に蓄積する BGLU18 や PYK10/BGLU23 などの ER 残留シグナルを有する BGLU18~BGLU25 までの 8 種類の β -グルコシダーゼが属する (Nakano et al., 2014). これらの β -グルコシダーゼはデータベースによる発現解析により様々な発現パターンを示すことが分かっている。最近, PYK10 はインドールグルコシノレート的一种である indole-3-ylmethyl glucosinolate (I3G) に対する加水分解活性をもつことが示された (Nakano et al., 2017). また, BGLU21 と BGLU22, PYK10 は脂肪族グルコシノレートであるシニグリンを加水分解できない (Ahn et al., 2010). このことから ER body に関連する β -グルコシダーゼは脂肪族グルコシノレートをを用いた防御戦略には関与していない可能性が示唆された (Yamada et al., 2011). こうした β -グルコシダーゼの多様性は, それらが各組織または異なる条件下で異なる特定の基質特異性を有することを示唆しており, この基質特異性により多様化したグルコシノレートに対応すると考えられている (Agerbirk and Olsen, 2012). 最近では, *in silico* でのタンパク質の 3 次元構造解析と系統学解析の結果から, TGGs と BGLUs は独立にミロシナーゼ活性を獲得したことが示唆された (Nakano et al., 2017). しかし, ミロシン細胞と ER body の外敵に対する防御機能の違いを検証した研究は未だない。

ER body の形成機構

これまでにシロイヌナズナにおいて, ER body の形成に関わる因子がいくつか同定された (図 3). basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である NAI1 は *PYK10* 遺伝子の発現を制御し, 恒常型 ER body の形成に必須である (Matsushima et al., 2003b; Matsushima et al., 2004). NAI1 は *NAI2* や *MEMBRANE OF ENDOPLASMIC RETICULUM BODY1 (MEB1)*, *MEB2* 遺伝子の発現も制御することが知られている。NAI2 は恒常型 ER body への PYK10 の蓄積に機能し, *nai2* 変異体では *nai1* 変異体と同様に恒常型 ER body が形成されない (Yamada et al., 2008). MEB1 および MEB2 は ER body 特異的な膜タンパク質である (Yamada et al., 2013). Nakano ら (2014) によって, これらの因子による恒常型 ER body

の形成機構モデルが次のように提唱されている。まず PYK10 と NAI2 が物理的に相互作用し、小胞体から ER body 構造を形成する。NAI2 は MEB1 や MEB2 と複合体を形成することでこれらの膜タンパク質を恒常型 ER body に局在させ、紡錘型の恒常型 ER body が形成される。

一方、誘導型 ER body の形成機構は恒常型 ER body とは異なると考えられている。誘導型 ER body は *nail* 変異体においても形成され、誘導型 ER body に特徴的な BGLU18 の遺伝子発現は NAI1 に非依存である (Ogasawara et al., 2009)。ただし、*nail* 変異体で形成される誘導型 ER body は典型的な紡錘型ではない糸状構造を示すことから、誘導型 ER body の形成には NAI1 が部分的に関与すると考えられている。また、恒常型 ER body の形成に関わる NAI2 には TONSOKU-ASSOCIATING PROTEIN 1 (TSA1) というホモログが存在し、最近、この TSA1 が誘導型 ER body の形成に関与することが報告された (Geem et al., 2018)。しかし、誘導型 ER body に蓄積する BGLU18 の遺伝子発現を制御する因子や誘導型 ER body の膜タンパク質については未だ明らかになっていない。

本研究の目的

本研究は、これまで恒常型 ER body の分布が不明であったシロイヌナズナのロゼット葉において、恒常的に ER body が存在することを見出したことに端を発する。先行研究から、ロゼット葉では主にミロシン細胞が恒常的な防御に機能すると考えられていた。しかし、本研究で ER body が恒常的にロゼット葉に存在することが判明したことから、ロゼット葉はミロシン細胞と ER body により恒常的に二重に守られている可能性が考えられた。そこで、本研究ではこの ER body を leaf ER body (L-ER body) と命名し、内部に蓄積する β -グルコシダーゼや形成機構などの L-ER body の特性やグルコシノレート-ミロシナーゼ系における機能、さらに、同じ組織に存在するミロシン細胞との役割の違いを明らかにすることを目的とした。

結果

1. L-ER body の発見

シロイヌナズナのロゼット葉には恒常的に ER body が存在する

ロゼット葉における ER body の分布を調べるため、GFP-h を用いた顕微鏡観察を行った。GFP-h はシグナルペプチド (SP) と ER 残留シグナルを付加した GFP である SP-GFP-HDEL を 35S プロモーター下で発現する形質転換シロイヌナズナであり、この植物体では ER の網目状構造とともに紡錘型の ER body が観察される (Hayashi et al., 2001)。GFP-h をプレートで無菌的に 2 週間生育し、第 1・2 葉の裏面を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、ER body は特定の表皮細胞にのみ存在した。すなわち、ER body は葉の 3 種類の表皮細胞 (周縁細胞、主脈を覆う表皮細胞、ジグソーパズル型の巨大な表皮細胞) に恒常的に存在し、その他の表皮細胞には存在しなかった (図 4)。これらの ER body を leaf ER body (L-ER body) と名付けた。L-ER body は既報の恒常型 ER body と同様に紡錘型の形態を示した (図 4B)。L-ER body を形成する表皮細胞は大部分のジグソーパズル型の表皮細胞に比べて、大きく伸張した形態を示した (図 5)。このような葉における L-ER body の限定的な分布は他の葉位の葉でも同様であった (図 6)。

L-ER body 形成細胞の分布は葉の発生の過程で決定される

ロゼット葉における L-ER body の限定的な分布が葉の発生過程でどのように獲得されるのかを明らかにするために、播種後 5 日目、7 日目、14 日目の第 1・2 葉における L-ER body の分布を観察した。播種後 5 日目は第 1・2 葉が出現したばかりであり、L-ER body は葉全体の表皮細胞で観察された (図 7)。播種後 5 日目では表皮細胞はジグソーパズル型を示さず、主脈を覆う表皮細胞と識別できなかった (図 7)。播種後 7 日目には、周縁細胞・主脈を覆う表皮細胞以外の表皮細胞では L-ER body がほぼ消失していた (図 7)。ただし、ジグソーパズル型の表皮細胞では、やや大きい細胞にのみ ER body が観察された (図 7)。この細胞が、播種後 14 日目では巨大なジグソーパズル型の表皮細胞になると思われる。播種後 14 日目には図 4 で観察されたのと同様に 3 種類の表皮細胞 (周縁細胞、主脈を覆う表皮細胞、巨大なジグソーパズル型の表皮細胞) にのみ L-ER body が観察された (図 7)。

2. L-ER body に蓄積する β -グルコシダーゼの同定

L-ER body は BGLU18 と PYK10 を蓄積する

本葉 ER body に蓄積する β -グルコシダーゼを特定するため、シロイヌナズナに 47 種類存在する β -グルコシダーゼのうち ER 残留シグナルをもつ BGLU18~BGLU25 の 8 種の β -グルコシダーゼに注目した。第 1・2 葉における 8 種の *BGLU* 遺伝子の発現を RT-PCR により調べた結果、*BGLU18* と *PYK10* の発現が確認された (図 8)。そこで、*BGLU18* および *PYK10* のそれぞれのプロモーター下で *BGLU18*-TagRFP あるいは *PYK10*-TagRFP を発現するコンストラクトを作成し、これらを GFP-h に導入して、*BGLU18* と *PYK10* タンパク質の葉内での分布と細胞内局在を調べた。その結果、*BGLU18*-TagRFP および *PYK10*-TagRFP の両蛍光は葉の周縁細胞、主脈を覆う表皮細胞、ジグソーパズル型の巨大な表皮細胞で観察され、GFP で可視化された L-ER body と共局在した (図 9)。

bglu18 変異体では誘導型 ER body が形成されなくなることが報告されている (Ogasawara et al., 2009)。このことから、L-ER body の形成にも β -グルコシダーゼの蓄積が必要である可能性が考えられた。そこで、L-ER body の形成における β -グルコシダーゼの蓄積が与える影響を調べるため、*bglu18* 変異体、*pyk10* 変異体、*bglu18 pyk10* 二重変異体のロゼット葉において L-ER body を観察した。その結果、*bglu18* 変異体、*pyk10* 変異体では野生型と同様にロゼット葉の周縁細胞、主脈を覆う表皮細胞、ジグソーパズル型の巨大な表皮細胞の 3 種類の表皮細胞で L-ER body が観察された (図 10)。一方、*bglu18 pyk10* 二重変異体では、まれに ER body 様の構造が見られることもあったが、L-ER body はほとんど観察されなかった (図 10)。次に、*bglu18 pyk10* 二重変異が ER body 形成に関わる因子である *NAI1*、*NAI2*、*TSA1*、*MEB1*、*MEB2* の遺伝子発現に与える影響をリアルタイム PCR により調べた。その結果、*bglu18 pyk10* 二重変異体では上記の全ての遺伝子の発現は野生型と有意な差はなかった (図 11)。この結果から、*bglu18 pyk10* 二重変異体で L-ER body が消失する現象は、*BGLU18* および *PYK10* タンパク質の欠損自体による可能性が高いと考えられる。以上の結果から、*BGLU18* と *PYK10* が L-ER body に蓄積する β -グルコシダーゼであることが支持された。

3. L-ER body の形成機構の解析

L-ER body の形成には *NAI1* が必要である

恒常型 ER body の形成には bHLH 型の転写因子である *NAI1* が必要である

(Matsushima et al., 2004). L-ER body の形成における *NAI1* の関与を調べるため, *nail* 変異体の L-ER body を観察した. *nail* 変異体では, 周縁細胞, 主脈を覆う表皮細胞, ジグソーパズル型の巨大な表皮細胞に L-ER body が存在しなかった (図 12). この結果から, L-ER body に形成には *NAI1* が必要であることが示唆された. 子葉に存在する恒常型 ER body において, *PYK10* 遺伝子の発現は *NAI1* によって制御されることが報告されている (Matsushima et al., 2004). そこで, ロゼット葉における *BGLU18* や *PYK10* 遺伝子の発現制御に *NAI1* が関与するか否かをリアルタイム PCR により調べた. その結果, *nail* 変異体では *PYK10* 遺伝子の発現が消失したのに対して, *BGLU18* 遺伝子の発現は野生型と同様であった (図 13). 次に, *nail* 変異体バックグラウンドで *ProBGLU18:BGLU18-TagRFP* または *ProPYK10:PYK10-TagRFP* を発現する形質転換植物体を用いて, *nail* 変異体における *BGLU18* および *PYK10* タンパク質の蓄積を調べた. *nail* 変異体では *PYK10-TagRFP* の蛍光が観察されなかったのに対し, *BGLU18-TagRFP* の蛍光は観察された (図 14). *BGLU18-TagRFP* は ER body に特徴的な紡錘形を示さず, ER の網目状構造に沿って伸長した凝集体に局在した (図 14). これらの結果から, ロゼット葉において *NAI1* は *PYK10* 遺伝子の発現を制御する一方で, *BGLU18* 遺伝子の発現は制御しないことが分かった. さらに, *nail* 変異体での ER body 形成因子の遺伝子発現を調べた結果, *nail* 変異体のロゼット葉では *NAI2* 遺伝子と *MEB2* 遺伝子の発現が野生型に比べて有意に低下していた (図 15). この結果から, ロゼット葉において *NAI1* は *NAI2* および *MEB2* 遺伝子の発現を制御することが分かった.

NAI1 の発現パターンは L-ER body の分布と類似している

ロゼット葉における *NAI1* 遺伝子の発現パターンを明らかにするために, *NAI1* プロモーター下で sGFP-GUS を発現するコンストラクトが導入された形質転換植物体である *ProNAI1:sGFP-GUS* を作出した. 播種後 2 週間の *ProNAI1:sGFP-GUS* 植物体を GUS 染色した結果, 根と地上部の両方で GUS のシグナルが観察された (図 16A). 第 1・2 葉では, 葉の周縁部と主脈を覆う表皮細胞で GUS のシグナルが観察されたのに加えて, GUS のシグナルを示す表皮細胞が葉内に散在した (図 16A). 続いて, 共焦点レーザー顕微鏡で GFP の蛍光を観察した. その結果, GFP 蛍光は葉の周縁部で最も強く検出された (図 16B). 次に主脈を覆う表皮細胞, ジグソーパズル型の巨大表皮細胞で GFP の蛍光が強く検出された (図 16B). 以上の実験で示されたロゼット葉における *NAI1* の発現パターンは L-ER body の分布と類似していることから, L-ER body の形成に *NAI1* が関与することが示唆された. 一方, 播種後 1 週目の実生では植物体全体で GUS のシグナルが観察された (図 17). 子葉では葉全体で GUS のシグナルが観察され, 周縁部

が特に濃く染色された (図 17). この実生における *NAI1* の発現パターンは実生の全身の表皮細胞に存在する恒常型 ER body の分布とも類似する.

BGLU18 および PYK10 を蓄積する細胞では *NAI1* が発現する

前述の結果から, *NAI1* を発現する細胞で L-ER body が形成されることが推測された. そこで, *NAI1* 発現細胞と L-ER body 形成細胞の両方の分布を同時に観察するために, *ProBGLU18:BGLU18-TagRFP* あるいは *ProPYK10:PYK10-TagRFP* を発現する *ProNAI1:sGFP-GUS* 植物体を作成した.

ProBGLU18:BGLU18-TagRFP/ProNAI1:sGFP-GUS の第 1・2 葉の裏面を観察したところ, *BGLU18-TagRFP* の蛍光が観察される細胞で GFP の蛍光が観察された (図 18). 次に, *ProPYK10:PYK10-TagRFP/ProNAI1:sGFP-GUS* の第 1・2 葉を観察したところ, *BGLU18-TagRFP* と同様に, *PYK10-TagRFP* の蛍光が観察される細胞で GFP の蛍光が観察された (図 18). ただし, GFP の蛍光が観察される細胞では必ずしも *BGLU18-TagRFP* あるいは *PYK10-TagRFP* の蛍光が観察されなかった. また, トライコムで *BGLU18-TagRFP* の蛍光がしばしば観察されたが, GFP 蛍光は観察されなかった (図 19A). トライコムにおける *BGLU18-TagRFP* の蛍光の強度は様々であり, 強い蛍光を示すものもあれば全く蛍光を発しないものも見られた (図 19A). 一方, *PYK10-TagRFP* の蛍光は全てのトライコムで観察されず, GFP の蛍光も見られなかった (図 19A). この結果から, トライコムには *BGLU18* を蓄積する ER body が存在する可能性が浮上したが, GFP-h を用いた顕微鏡観察により, トライコムには ER body が存在しないことが判明した (図 19B).

L-ER body はジャスモン酸に非依存的に形成される

ロゼット葉では傷害やジャスモン酸に応答して誘導型 ER body が形成されることが知られている (Matsushima et al., 2002; Ogasawara et al., 2009). そこで, ロゼット葉に恒常的に存在する L-ER body の形成がジャスモン酸依存的か否かを検証するために, 誘導型 ER body を形成しないシロイヌナズナ変異体で L-ER body の有無を観察した. 実験にはジャスモン酸シグナル伝達経路に関わる因子の変異体である *jin1-2*, *jai3-1*, *myc2 myc3 myc4*, *coil-1* 変異体を用いた. *jin1-2* 変異体は, ジャスモン酸シグナル伝達経路で中心的な役割を果たす転写因子である MYC2 をコードする

MYC2/JASMONATE-INSENSITIVE1 (JIN1) 遺伝子の変異体である (Lorenzo et al., 2004; Pozo et al., 2008). *jai3-1* 変異体は, jasmonate ZIM-domain (JAZ) タンパク質のひとつである *JASMONATE-INSENSITIVE 3 (JAI3)* の変異体であり, ジャスモン酸応答性遺伝子

の転写が抑制される (Chini et al., 2007). *myc2 myc3 myc4* 三重変異体 (以後, *mycT* 変異体と表記する) は, ジャスモン酸応答の活性化に共に機能する 3 つの転写因子である MYC2, MYC3, MYC4 を欠損した変異体である (Fernández-Calvo et al., 2011). *coil-1* 変異体はジャスモン酸受容体である F-box タンパク質の CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) の変異体である (Yan et al., 2009). これらの因子を含むジャスモン酸シグナル伝達経路の概略を図 20 にまとめた. ジャスモン酸シグナル伝達経路で重要な MYC 転写因子は, 平常状態では転写抑制因子である JAZ タンパク質によって抑制されている. 活性型のジャスモン酸 (ジャスモン酸イソロイシン [JA-Ile]) が存在すると, JAZ タンパク質は COI1 と複合体を形成することで, ジャスモン酸共受容体として機能する. この複合体の形成がきっかけとなり JAZ タンパク質のユビキチン化と 26S プロテアソームによる分解が起こる. これにより, MYC2 転写因子が JAZ タンパク質による抑制から解放され, 下流因子の転写が促進される.

各変異体バックグラウンドで *Pro35S:SP-GFP-HDEL* を発現する形質転換植物体を作出した. それらの第 1・2 葉を爪楊枝で傷つけ, その直後と 25 時間後における誘導型 ER body の有無について共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた. 爪楊枝で傷つけた直後は, 全ての変異体のロゼット葉において誘導型 ER body が観察されなかった (図 21). 25 時間後には *jin1-2* 変異体, *jai3-1* 変異体のロゼット葉の傷害部位周辺に誘導型 ER body の形成が確認された (図 21). このことから, *jin1-2* 変異体, *jai3-1* 変異体では野生型と同様に誘導型 ER body を形成されることが明らかになった. 一方で, *mycT* 変異体および *coil-1* 変異体では傷害部位周辺に誘導型 ER body は形成されなかった (図 21). 本実験で得られた, *coil-1* 変異体では傷害を受けても誘導型 ER body が形成されないという結果は, *coil-1* 変異体のロゼット葉にメチルジャスモン酸処理を行っても誘導型 ER body が観察されないことを示した先行研究の結果とも一致する (Matsushima et al., 2002). 次に, 恒常型の L-ER body の有無を調べるため, GFP-h 形質転換植物体と *Pro35S:SP-GFP-HDEL* を発現する *jin1-2* 変異体, *jai3-1* 変異体, *mycT* 変異体, *coil-1* 変異体のロゼット葉を観察した. その結果, *jin1-2* 変異体, *jai3-1* 変異体, *mycT* 変異体, *coil-1* 変異体のすべてのロゼット葉で野生型と同様に L-ER body が観察された (図 22). 図 21 と図 22 の結果を合わせると, *mycT* 変異体および *coil-1* 変異体では傷害を受けた際に誘導型 ER body が形成されない一方で, 恒常的に L-ER body が形成されることが判明した. この結果から, シロイヌナズナのロゼット葉に恒常的に存在する L-ER body は, ジャスモン酸非依存的に形成されることが明らかになった. よって L-ER body は誘導型 ER body とは異なる経路で形成されていることが示唆された.

4. L-ER body の防御機能の解析

L-ER body をもたない植物体はオカダンゴムシによる食害を受けやすくなる

L-ER body の植食性生物に対する防御機能を調べるため、オカダンゴムシを用いた食害実験系を確立した (図 23)。この実験系は、野生型と変異体のオカダンゴムシに対する防御能を比べる一対比較試験である。1つのポットに播種後 10 日目の野生型と変異体を 4 個体ずつポットの左右に分けて土植えし、播種後 14 日目まで生育した。そこに、2 日間飢餓処理を施したオカダンゴムシを 10 匹投入し、24 時間摂食させた。オカダンゴムシを投入する前後で撮影した写真を用いて、摂食された葉面積の割合を算出した。摂食前後の葉面積は ImageJ (NIH) を用いて定量した (図 24)。*bglu18* 変異体、*pyk10* 変異体、*bglu18 pyk10* 二重変異体を食害実験に供した結果、*bglu18 pyk10* 二重変異体は野生型に比べて有意に食害面積が大きく、オカダンゴムシに食べられやすいことが判明した (図 25)。一方で、*bglu18* 変異体および *pyk10* 変異体ではオカダンゴムシによる食害面積は野生型と同程度であった (図 25)。これらの結果から、L-ER body がオカダンゴムシの摂食行動を抑止する機能をもつ可能性が考えられた。L-ER body のオカダンゴムシに対する摂食抑止能がグルコシノレート-ミロシナーゼ系として機能していることを確認するため、*myb28 myb29 cyp79b2 cyp79b3* 四重変異体 (Sun et al., 2009) (以後、*qko* と表記する) を用いて食害実験を行った。*qko* 変異体は脂肪族グルコシノレートおよびインドールグルコシノレートの合成が不全となる変異体である。その結果、*qko* 変異体は野生型に比べて著しくオカダンゴムシに食べられやすいことが分かった (図 25)。この結果から、シロイヌナズナにおいて L-ER body はグルコシノレートを基質としてオカダンゴムシによる食害を抑止する機能を持つことが示唆された。一方、ミロシン細胞に蓄積するミロシナーゼである TGG1 および TGG2 を欠損した *tgg1 tgg2* 二重変異体のオカダンゴムシによる食べられやすさは野生型と同程度だった (図 25)。このことから、ミロシン細胞はオカダンゴムシに対する食害抑止能をもたないことが示唆された。

bglu18 pyk10 二重変異体では 4MI3G の分解に異常が見られる

bglu18 pyk10 二重変異体では野生型に比べてオカダンゴムシによる食害を受けやすかったことから、*bglu18 pyk10* 二重変異体では食害を受けた際のグルコシノレートの加水分解に異常が生じている可能性が考えられた。そこで、植物体を人為的にすり潰し、LC-MS により植物体中のグルコシノレートの相対存在量を調べた。本研究で解析したグルコシノレートを表 1 にまとめた。LC-MS 解析の結果、*bglu18 pyk10* 二重変異体では、インドールグルコシノレートである 4-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate (4MI3G) が

野生型や *tgg1 tgg2* 二重変異体に比べて多く残存していることが判明した(図 26). 一方, *bglu18 pyk10* 二重変異体におけるその他のグルコシノレートの相対存在量は野生型と同程度であった(図 27, 図 28, 図 29). この結果から, BGLU18 と PYK10 あるいはそのどちらかが 4MI3G を特異的に加水分解することが示唆された. 4MI3G は PENETRATION2 (PEN2) によって加水分解されることが報告されている (Bednarek et al., 2009; Clay et al., 2009). このことから, *bglu18 pyk10* 二重変異体で意図せず *PEN2* 遺伝子に変異が入っている可能性が考えられた. しかし, *bglu18 pyk10* 二重変異体の *PEN2* 遺伝子についてシーケンス解析を行った結果, *bglu18 pyk10* 二重変異体の *PEN2* 遺伝子配列は野生型と同じであり, 変異が入っていないことが確認された (data not shown). また, *bglu18 pyk10* 二重変異体における *PEN2* 遺伝子の発現を調べた結果, 野生型と同程度であった(図 30). 以上の結果から, BGLU18 と PYK10 あるいはそのどちらかが 4MI3G の加水分解に機能し, この加水分解産物がオカダンゴムシの食害を抑止することが示唆された.

次に, 野生型と *bglu18 pyk10* 二重変異体の地上部から抽出したタンパク質を用いて, 2-Propenyl glucosinolate (sinigrin), 4-Methylsulphinylbutyl glucosinolate (4MSB), I3G に対する加水分解活性を測定した. 4MI3G については標品が購入できなかったため, 今回は分析できなかった. その結果, 4MSB と I3G の加水分解活性が *bglu18 pyk10* 二重変異体では野生型に比べて有意に減少していたものの, 3 種類のグルコシノレートの加水分解活性に野生型と *bglu18 pyk10* 二重変異体間で顕著な差は見られなかった(図 31). この結果から, BGLU18 および PYK10 はシロイヌナズナ地上部では sinigrin や 4MSB, I3G の加水分解にはあまり関与しない可能性が考えられた.

考察

ロゼット葉における L-ER body 形成細胞の分布

本研究により、シロイヌナズナのロゼット葉の特定の表皮細胞には恒常的に ER body が存在していることが明らかとなった (図 4)。この ER body には 2 種類の β -グルコシダーゼ、BGLU18 と PYK10 が蓄積していた (図 9)。これまで、BGLU18 と PYK10 はそれぞれロゼット葉の誘導型 ER body と幼植物体の恒常型 ER body に特徴的な β -グルコシダーゼであると考えられてきた (Yamada et al., 2009)。このことから、本研究で発見されたロゼット葉に恒常的に存在する ER body は、既報の ER body とは異なる性質をもつ第 3 の ER body であると考えられた。そこで、シロイヌナズナのロゼット葉に恒常的に存在する ER body を leaf ER body (L-ER body) と命名し、詳しい解析を行った。

L-ER body はシロイヌナズナのロゼット葉において、周縁細胞、主脈を覆う表皮細胞、巨大なジグソーパズル型の表皮細胞の 3 種類の特定の表皮細胞に存在していた (図 4)。こうした葉内における L-ER body 形成細胞の限定的な分布は、効率的に食害を抑止するのに重要なものかもしれない。シロイヌナズナにおいて、葉の周縁細胞にはグルコシノレートが多く蓄積していることが報告されている (Shroff et al., 2008; Koroleva et al., 2010; Sønderby et al., 2010)。セイヨウワサビ [*Armoracia lapathifolia*] やセイヨウアブラナ [*Brassica napus*] では液胞にグルコシノレートが蓄積することから、シロイヌナズナにおいてもグルコシノレートは液胞内に蓄積すると考えられている (Kissen et al., 2008)。これらの報告と葉の周縁細胞に L-ER body が存在することを合わせて考えると、周縁細胞では液胞内にグルコシノレートを、L-ER body 内に β -グルコシダーゼを蓄積することで、一細胞による防御機構を成立させていることが強く示唆された。これに対して、ミロシン細胞による防御は、グルコシノレートとミロシナーゼをそれぞれグルコシノレート蓄積細胞 (S 細胞) とミロシン細胞の液胞内に蓄積する二細胞から成る防御機構である (Shirakawa and Hara-Nishimura, 2018)。一細胞と二細胞による防御では防御物質の生成に必要な食害による組織崩壊の規模が異なることが想像される。したがって、周縁細胞の L-ER body は、葉の端から食べる比較的小さな外敵に対して効果的に働くと思われる。

主脈を覆う表皮細胞や巨大なジグソーパズル型の表皮細胞にグルコシノレートが蓄積するか否かは現時点では不明であるが、これらの細胞に L-ER body を形成することは以下のような理由で防御に効果的であると考えられる。脂肪族グルコシノレートやインドールグルコシノレートの生合成に参与する酵素群は維管束細胞に局在する (Nintemann et al., 2018)。このことから、維管束組織にはグルコシノレートが多く存在す

ると考えられる。したがって、主脈を覆う表皮細胞に存在する L-ER body は吸汁性の害虫から維管束組織を保護している可能性が考えられる。一方、ミロシン細胞は葉の維管束組織に沿って葉の内部に発達している (Ueda et al., 2006)。葉において、維管束組織は水分や養分の輸送や、植物体内でのシグナル伝達のために重要な役割を果たす (Sack and Scoffoni, 2013)。そのため、L-ER body とミロシン細胞を維管束組織を覆う表皮細胞と葉内の維管束付近にそれぞれ配置することで、外敵による食害から維管束組織を二重に保護していると考えられる。一方、巨大なジグソーパズル型の表皮細胞はロゼット葉全体に散在しており、通常の表皮細胞よりも大きい (図 5)。大きな表皮細胞は通常の表皮細胞よりも容易に外敵による食害で崩壊しやすいと推測されることから、表皮細胞の中でも特に大きい表皮細胞に L-ER body を形成することで効率的に葉を外敵の食害から防御するのに役立っていると考えられる。

L-ER body の形成機構

ジャスモン酸シグナル伝達経路で働く因子の変異体を用いた顕微鏡観察の結果、L-ER body の形成はジャスモン酸に非依存的であることが分かった。このことから、ロゼット葉における L-ER body の形成は誘導型 ER body の形成とは異なる機構によるものと考えられた。一方で、L-ER body の形成には NAI1 が必要であることが明らかになった。NAI1 は恒常型 ER body の形成に必須であることから、L-ER body の形成は恒常型 ER body の形成と共通の機構を利用していると考えられる。しかしながら、L-ER body に蓄積する BGLU18 および PYK10 の遺伝子発現は NAI1 によって異なる制御を受けることが判明した。PYK10 遺伝子は NAI1 による転写制御を受け一方で、BGLU18 遺伝子は NAI1 による転写制御を受けなかった。この結果から、BGLU18 の発現を制御する未知の転写因子 X が存在することが示唆された。BGLU18 は誘導型 ER body に特徴的な β -グルコシダーゼである。誘導型 ER body の形成機構については、ジャスモン酸が関与すること以外はほとんど分かっていない (Yamada et al., 2009)。子葉を針で傷つけると BGLU18 遺伝子の発現が上昇する (Ogasawara et al., 2009) ことから、誘導型 ER body において BGLU18 遺伝子の発現制御に働く未知の転写因子 Y はジャスモン酸経路の下流に存在することが想定される。L-ER body と誘導型 ER body において BGLU18 の発現制御に関与する転写因子 X と Y が同一である否かについては現時点では不明である。L-ER body の形成はジャスモン酸に非依存的であるが、L-ER body における BGLU18 の発現がジャスモン酸に非依存的か否かは明らかになっていない。bglu18 変異体では L-ER body が正常に形成されたことを考えると、mycT 変異体や coil-1 変異体などのジャスモン酸シグナル伝達経路に関わる因子の変異体で観察された L-ER body には

PYK10 しか蓄積していなかったのかもしれない。したがって、未知の転写因子 X と Y が同じものであり、ジャスモン酸シグナル伝達経路の下流にある可能性も十分に考えられる。特定の表皮細胞で恒常的に *BGLU18* が発現することを考慮すると、周縁部や主脈上の表皮細胞、巨大なジグソーパズル型の表皮細胞では他の表皮細胞に比べてジャスモン酸濃度が恒常的に高くなっているのかもしれない。葉が傷害を受けてから全身でのジャスモン酸量が上昇するまでにかかる時間は 1.6 分以内と非常に短い (Heyer et al., 2018)。最近、Heyer ら (2018) によって、組織切断時に起こる非常に速いジャスモン酸量上昇の影響を受けないサンプル回収法が考案され、葉一枚あたりのジャスモン酸量について測定が行われたものの、葉内における恒常的なジャスモン酸の分布を調べた研究は未だない。

L-ER body 形成における *NAI1* の重要性は、*NAI1* が *PYK10* 遺伝子の発現制御を担うだけでなく、*NAI2* 遺伝子や *MEBs* 遺伝子の発現制御にも関わる点である。*bglu18* 変異体、*pyk10* 変異体、*bglu18 pyk10* 二重変異体における L-ER body の観察結果から、L-ER body が形成されるには *BGLU18* あるいは *PYK10* のどちらかの蓄積だけで十分であることが示された。ただし、これは *NAI1* が存在しているときのみで成立する。実際に、*nail* 変異体では *BGLU18* タンパク質は存在するが、L-ER body は形成されない。*nail* 変異体では、*PYK10* の蓄積に必要な *NAI2* や ER body 特異的な膜タンパク質である *MEBs* がなくなるため、*BGLU18* タンパク質が存在しても L-ER body を形成できないと考えられる。*NAI1* が発現しないトライコムにおいて *BGLU18* タンパク質が蓄積するにも関わらず L-ER body が存在しなかったことも、*nail* 変異体と同様の原因であると考えられる。

ロゼット葉における *NAI1* の発現パターンは L-ER body 形成細胞の分布と類似していた。一方で、興味深いことに *NAI1* 発現細胞と *BGLU18* あるいは *PYK10* の発現パターンは完全には一致しなかった (図 18)。本研究では、*NAI1* 発現細胞と L-ER body 形成細胞の分布は直接比較していない。しかしながら全ての L-ER body には *BGLU18* と *PYK10* が蓄積することから、*BGLU18* あるいは *PYK10* の発現細胞を L-ER body 形成細胞と見なすことができる。したがって、*NAI1* 発現細胞では必ずしも L-ER body が形成されないと考えられる。L-ER body には *BGLU18* と *PYK10* の両方が蓄積することから、両者が同じ細胞で発現するように統合する何らかの仕組みがあると考えられる (図 32)。この仕組みが存在するため、*NAI1* 発現細胞と L-ER body 形成細胞の両者が完全に一致しないのかもしれない。

L-ER body の防御機能

シロイヌナズナのロゼット葉におけるグルコシノレート-ミロシナーゼ系ではミロシン細胞が中心的な役割を果たしていると考えられてきた (Ueda et al., 2006). 実際には、ミロシン細胞に蓄積するミロシナーゼである TGG1 および TGG2 を欠損した *tgg1 tgg2* 二重変異体は野生型に比べて、鱗翅目のイラクサギンウワバ [*Trichoplusia ni*] やタバコスズメガ [*Manduca sexta*] による食害を受けやすくなる (Barth and Jander, 2006). 一方で、同翅目のモモアカアブラムシ [*Myzus persicae*] やダイコンアブラムシ [*Brevicoryne brassicae*] では *tgg1 tgg2* 二重変異体と野生型で摂食行動に差が見られないことも報告されていた (Barth and Jander, 2006). *bglu18 pyk10* 二重変異体を用いた食害実験から、L-ER body がオカダンゴムシによる食害を抑止するのに重要な役割を果たしていることが示唆された (図 25). グルコシノレート合成不全変異体である *qko* 変異体を用いた食害実験により、グルコシノレートがオカダンゴムシの摂食行動に影響を与えることが示されたことを考慮すると、L-ER body がグルコシノレート-ミロシナーゼ系の一部として機能することが強く示唆された. 一方で、*tgg1 tgg2* 変異体を用いた食害実験の結果、ミロシン細胞はオカダンゴムシに対して摂食抑止能をもたないことが分かった. L-ER body とミロシン細胞がオカダンゴムシに対して異なる影響を与えた原因の一つとして、グルコシノレートの分布が植物体の組織や器官間で異なることが考えられる. グルコシノレートの分布は組織や器官、発達ステージによって異なることが知られている. シロイヌナズナでは、インドールグルコシノレートは根に多く蓄積しているのに対して、脂肪族グルコシノレートは根に比べて葉により多く蓄積している (Brown et al., 2003). こうした器官ごとのグルコシノレートの分布の違いは、様々な外敵に対して効率的に防御する上で重要であると考えられている. 実際、インドールグルコシノレートと脂肪族グルコシノレートでは、同一の外敵に与える影響が異なることが分かっている. 例えば、前述の *T. ni* や *M. sexta* の摂食行動は、脂肪族グルコシノレートにより影響を受けるのに対して、インドールグルコシノレートには影響を受けない (Müller et al., 2010).

グルコシノレートの分布パターンに加えて、ミロシナーゼの基質特異性も多様な外敵に対する防御に重要である. 最近、PYK10 が indole-3-ylmethyl グルコシノレート (I3G) を加水分解することが示された (Nakano et al., 2017). BGLU18 はそのタンパク質構造からミロシナーゼとして機能すると考えられている (Xu et al., 2004; Nakano et al., 2017) が、BGLU18 の基質特異性については未だ明らかになっていない. LC-MS 解析の結果から、*bglu18 pyk10* 二重変異体は野生型や *tgg1 tgg2* 二重変異体に比べて、インドールグルコシノレートの一種である 4MI3G が加水分解されにくいことが明らかとなった (図 26). この結果は、BGLU18 と PYK10 あるいはそのどちらかが 4MI3G を加水分解する

ことを示唆している。先行研究において、4MI3G は生細胞中で PEN2 により加水分解され、その分解産物が病原性微生物に対する防御として機能することが報告された (Lipka et al., 2005; Bednarek et al., 2009; Clay et al., 2009)。4MI3G の最終的な加水分解産物は、生細胞中で PEN2 により加水分解される場合と、食害による組織の崩壊を伴って加水分解される場合で異なると考えられている (Bednarek et al., 2009)。 *bglu18 pyk10* 二重変異体では PEN2 遺伝子の発現は野生型と同程度であることが確認された。このことから、BGLU18 と PYK10 あるいはそのどちらかが、食害を受けた際の 4MI3G の加水分解に機能していることが示唆された (図 33)。一方、 *tgg1 tgg2* 二重変異体では複数の脂肪族グルコシノレートの加水分解が抑制されていた (図 27-1)。この結果は、TGG1 および TGG2 がインドールグルコシノレートに比べて脂肪族グルコシノレートを優先的に加水分解することを示した先行研究とも一致する (Barth and Jander, 2006)。

加水分解活性測定の結果、BGLU18 および PYK10 はシロイヌナズナ地上部では sinigrin や 4MSB、I3G の加水分解にはほとんど関与しないことが示唆された。一方で、この結果は PYK10 が I3G に対して加水分解活性をもつことを示した先行研究とは異なる (Nakano et al., 2017)。この原因の 1 つとして、試験に使用した組織の違いが考えられる。先行研究では根から抽出したタンパク質を用いているのに対して、本実験では地上部から抽出したタンパク質を用いた。葉では TGG1 および TGG2 が多く蓄積するのに対して、PYK10 の蓄積量は少ない (Nakano et al., 2014)。TGG1 および TGG2 は脂肪族グルコシノレートに対する活性ほどではないが、インドールグルコシノレートに対してもある程度ミロシナーゼ活性を示す (Barth and Jander, 2006)。そのため、今回の実験では TGG1 および TGG2 の影響が強く反映されたことで PYK10 の加水分解活性を検出できなかった可能性がある。また、PYK10 の I3G に対する加水分解活性は pH5.5 で最適になることが先行研究によって報告されている (Nakano et al., 2017)。この報告を考慮すると、今回のミロシナーゼ活性試験では反応 pH 条件が適正ではなかった可能性も考えられる。

L-ER body の防御機能を理解するために、今後は BGLU18 および PYK10 の 4MI3G に対する加水分解活性を調べる必要がある。また、4MI3G の生合成に関わる CYP81F2 タンパク質の欠損変異体を用いた食害実験を行い、 *bglu18 pyk10* 二重変異体と同様の結果が得られるか検証することで、4MI3G の加水分解産物がオカダンゴムシの摂食行動を抑制する効果をもつことを確認したい。本研究により、シロイヌナズナのロゼット葉では L-ER body とミロシン細胞が異なる外敵に対する防御機能を担う可能性が支持されたが、同じ外敵を用いて ER body とミロシン細胞の防御機能を検証した研究は本研究が初めてである。しかし、今回の研究で検証したのは 1 種類の外敵の摂食行動に対する影

響のみである。オカダンゴムシの場合とは反対に、ER body による防御が効果を発揮せず、ミロシン細胞が効果を発揮する場合があることも十分予想される。今後は、多様な外敵を用いて ER body とミロシン細胞の防御機能の効果の差を検証する必要がある。

材料と方法

試薬は特に記述しない場合、ナカライテスクもしくは和光純薬工業から購入したものを
用いた。

植物材料

Pro35S:SP-GFP-HDEL 遺伝子をもつ形質転換植物体 GFP-h は、Col-0 を形質転換して
作出された (松島良博士・嶋田知生博士による)。本文中で特に断りなく GFP-h と書い
た場合は GFP-h (Col-0) を指すものとする。*bglu18* 変異体, *pyk10* 変異体, *myc2 myc3 myc4*
三重変異体バックグラウンドの GFP-h 植物体は山田健志博士 (ヤギエウオ大 マウオポ
ルスカ生物工学研究所) より分与された。*jin1-2* 変異体, *jai3-1* 変異体は野元美佳博士
(名古屋大学 遺伝子実験施設) より分与された。

育成条件

植物体は特に記載のない限り、以下の条件で生育した。固形培地は MS 培地用混合塩
類, sucrose (終濃度 1%) と Mes-KOH [pH5.7] (終濃度 0.05%), Gellan Gum (最終濃度 0.5%
[w/v]) を混合して調整した。種子は 70%エタノールで滅菌した後、99%エタノールで脱
水・乾燥させ、クリーンベンチ内で無菌的に固形培地上に播種した。固形培地に播種し
た植物体は連続明条件・22°Cで育成した。育成にはグロースチャンバーMLR-350 (三洋
電機バイオメディカ) および白色蛍光灯 FHF32EX-D-HX-S (NEC) を使用した。成長し
た植物体はパーミキュライト (GS, ニツタイ) を入れたプラントポットに移植した後、
16 時間明/8 時間暗条件・22°Cで育成した。

形質転換植物の作出

1) コンストラクトの作製

以下のコンストラクト作製に用いたプライマーを表 2 に記載した。

Pro BGLU18:BGLU18-TagRFP および *Pro PYK10:PYK10-TagRFP* コンストラクトを構
築するため、2kb の上流領域を含む *BGLU18* および *PYK10* の各ゲノム断片を増幅した。
増幅断片を In-Fusion HD cloning kit (Clontech) を用いて pENTR 1A プラスミドにサブク
ローニングした。バイナリーベクターには pGWB659 (Nakamura et al., 2010) を用いた。
BGLU18 および *PYK10* タンパク質の細胞内局在を正確に反映するために、以下の手順
で TagRFP の後ろに ER 残留シグナルを付与した改変 pGWB659 を作製した。制限酵素

処理によりワンカットを入れた pGWB659 を鋳型にインバース PCR 法を用いて TagRFP の直後に GGSG-HDEL-Stop 配列をもつベクターを作製した。この改変バイナリーベクターを pGWB659-HDEL と呼ぶことにする。Gateway LR clonase II™ Enzyme mix (Invitrogen) を用いた LR 反応により、それぞれの DNA 断片を pGWB659-HDEL に導入した。

ProNAI1:sGFP-GUS コンストラクトは國枝正博士（奈良先端科学技術大学院大学）によって以下の手順で作製された。PCR 産物を C 末端融合タグとインフレームで融合するために、pENTR1A_modF1 および pENTR1A_modR1 プライマーを用いた部位特異的突然変異誘発によって pENTR1A ベクター (Invitrogen) を改変した。得られたベクター (pENTR1Axe と称する) は、多重クローニング部位の EcoRV 部位に続く 2 つのヌクレオチド (TA) を欠く。ProNAI1:sGFP-GUS エントリーベクターを作製するために、NAI1 プロモーターの DNA 断片 (開始コドンの直前からの 3,223bp の上流領域, sGFP, GUS, およびそれに続く 1,365bp の下流領域の NAI1 ターミネーターを含む) を以下のプライマーを用いて増幅した。NAI1 プロモーターについては pENTR1Axe-ProNAI1_3k_F1 および ProNAI1-sGFP_R1, sGFP については ProNAI1-sGFP_F1 および mCherry-GGSG_R1, GUS については GGSG-GUS_F1 および GUS-TerNAI1_R1, NAI1 ターミネーターについては GUS-TerNAI1_F1 および TerNAI1-pENTR1Axe_R1 を用いた。これらの増幅断片を In-Fusion クローニング反応により XmnI と EcoRV で二重に制限酵素処理した pENTR1Axe に導入した。得られたクローンを、Gateway システムを使用して LR 反応を介して pGWB501 ベクターに導入し、NAI1 プロモーターの制御下で sGFP-GUS を発現させた。

2) 植物体への形質転換

ベクタープラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株) に導入し、(Clough and Bent, 1998) の方法を用いてシロイヌナズナに形質転換を行った。*ProBGLU18:BGLU18-TagRFP* および *ProPYK10:PYK10-TagRFP* コンストラクトは GFP-h, *nai1-1* 変異体, ProNAI1:sGFP-GUS 植物体に導入した。これらの形質転換植物体の T1 種子は、10 µg/mL BASTA を含む培地上で選抜し、TagRFP の蛍光を確認した。*ProNAI1:sGFP-GUS* コンストラクトは Col-0 に導入した。この形質転換植物体 T1 種子は、10 µg/mL Hyg を含む培地上で選抜した。

ゲノム DNA の調整

子葉1枚を200 µlのDNA抽出バッファー (1M Tris-HCl [pH7.5], 5M NaCl, 0.5 M EDTA, 10% SDS) 中で破碎した。破碎したサンプルを15,000 rpm, 室温, 5分で遠心した後, 上清100 µLを新しいチューブに移し, 100 µLのイソプロパノールと混合した。15,000 rpm, 室温, 5分で遠心した後, 上清を捨てた。沈殿に70%エタノールを加え, 混合した後, 15,000 rpm, 室温, 5分で遠心した。上清を捨てた後, 2時間程度風乾してエタノールを完全に除去した。得られたDNAは30 µLのTEに溶解し, 以下の実験に用いた。

coil-1 変異体のジェノタイピング

coil-1 変異体のジェノタイピングは Xie ら (1998) の方法を参考に行った。抽出したゲノム DNA から *geno_coil-1_F* プライマー (5'-GGTTCTCTTTAGTCTTTAC-3') と *geno_coil-1_R* プライマー (5'-CAGACAACACTATTTCGTTACC-3') を用いて, *COII* 遺伝子断片増幅した。PCR反応はゲノム DNA 1 µL に対して10 µLの反応系で Go Taq[®] DNA polymerase (プロメガ) を用い, 添付のプロトコルに従って行った。反応条件は次の通りである。95°C・3 min による鋳型の熱変性の後, 95°C・15 sec, 55°C・15 sec, 72°C・1 min の3ステップを35サイクル行った。反応液8 µLに1 unitの制限酵素 Xcm I (NEB) を加え, 37°Cで1 h 処理した後, 65°Cで20 min インキュベートして酵素を失活させた。制限酵素処理後の反応液を4 mg/mLのEtBrを加えた1%アガロースゲルを用いて電気泳動した後, FASシステム (TOYOBO) で撮影し DNA のバンドを検出した。バンドパターンから塩基置換をホモにもつと考えられる個体を観察に用いた。

RNA の抽出と cDNA 合成

RNA 抽出は, 播種後2週間の植物体の第1・2葉から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて添付のプロトコルに従って行った。第1・2葉は10個体の植物体から計20枚回収してRNAを抽出した。抽出したRNAはReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行ってcDNAとした。逆転写反応は葉から抽出したtotal RNA 500 ng に対して10 µLの反応系で行い, 合成されたcDNAはTEで5倍に希釈してRT-PCR およびリアルタイム PCR に用いた。

RT-PCR

RT-PCR反応は, 上記の通りに希釈した逆転写反応液1 µL に対して10 µLの反応系で, GoTaq[®] DNA polymerase (プロメガ) を用いて, 添付のプロトコルに従って行った。反応条件は次の通りである。95°C・3 min による鋳型の熱変性の後, 95°C・15 sec, 55°C・

15 sec, 72°C・1 min の 3 ステップを 30 サイクル行った。PCR 反応液に loading dye を混合し、4 mg/mL の EtBr を加えた 2%アガロースゲルを用いて電気泳動した。泳動後のゲルを LAS-3000 (富士フイルム) を用いて撮影し、cDNA のバンドを検出した。

リアルタイム PCR

定量的リアルタイム PCR には StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) および TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用いた。標的 cDNA の相対量を *ACT2* を標準とした比較 Ct 法で計算して示した。

RT-PCR およびリアルタイム PCR に用いたプライマーは表 3 にまとめた。

共焦点レーザー顕微鏡観察および画像解析

植物体をスライドガラスとカバーガラスの間に水でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780 META [Carl Zeiss]) で観察した。画像の処理・解析には ImageJ (NIH) を用いた。

細胞面積の定量解析

播種後 2 週間の *ProBGLU18:BGLU18-TagRFP* を発現する GFP-h 植物体の第 1・2 葉の裏の 6 箇所 (葉の左右の上, 中央, 下) において、0.18 mm² の正方形の範囲を観察した。細胞の面積は ImageJ (NIH) を用いて測定した。

SEM を用いた観察

野生型シロイヌナズナの第 1・2 葉を固定溶液 (2.5% (v/v) ホルマリン, 2.5% (v/v) 酢酸, 45% (v/v) エタノール) に浸し、室温で一晩インキュベートして固定した。固定した葉を 50% (2 回), 60%, 70%, 80%, 90%, 99.5%, 100% エタノール中で、各ステップで 20 分間段階的に脱水した後、100%エタノールに浸して一晩脱水した。脱水した葉を臨界点乾燥機 (JCPD-5; JOEL) で乾燥し、JEOL Fine Coater (JFC-1200; JOEL) を用いて金コーティングした。試料を卓上型 Miniscope (TM-1000; Hitachi) で観察した。

GUS 染色と GUS 染色した植物体の観察

播種後 1 週間目および 2 週間目の *ProNAI1:sGFP-GUS* 植物を以下の手順で GUS 染色した。試料を氷冷した 90%アセトンに 15 分間浸した。取り出した植物試料を GUS 染色液 (0.5 mg/ml X-Gluc, 0.1 MNaH₂PO₄ [pH 7.0], 10 mM EDTA [pH 8.0], 0.5-1 mM

$K_3[Fe(CN)_6]$, 0.5-1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 0.1% TritonX-100) に移した。GUS 染色液中の植物試料を真空中で 37°C で 13.5 時間インキュベートした。染色した植物試料を 70% エタノールに移し、30 分間振盪した。その後、植物試料を抱水クロラール溶液 (抱水クロラール-グリセロール-水, 6:2:1) に浸し 30 分間振盪して透明化した後、60% グリセロール溶液中で保管した。GUS 染色試料はスライドガラス上に載せ、立体顕微鏡 (SteREO Lumar V12, Carl Zeiss) で観察した。

爪楊枝を用いた傷害処理

播種後 2 週間の植物体の第 1・2 葉を用いて、葉の右半身と左半身の L-ER body が少ないと思われる主脈と周縁部の中間部分 2 箇所を爪楊枝で穴を開けた。固形培地に植わったままの植物体を人工気象器に戻し、25 h 後に蛍光顕微鏡で傷害部位を観察した。

オカダンゴムシを用いた食害実験

オカダンゴムシの飼育と植物体の生育は、人工気象器 LH-350S (日本医化器械製作所) および白色蛍光灯 FL40SEX-N-HG (NEC) を使用し、16 時間明/8 時間暗条件・23°C で行った。植物体は固形培地上で播種後 10 日目まで生育した後、バーミキュライトを入れたプラントポットに移植し、播種後 14 日目まで生育した。1 つのプラントポットにつき 2 日間絶食させたオカダンゴムシ 10 匹を投入し、24 時間放置した。ダンゴムシ投入前と投入して 24 時間後の植物体をデジタルカメラ STYLUS TG-4 Tough (オリンパス) を用いて撮影した。

LC-MS を用いたグルコシノレート定量解析

1) 試料の凍結乾燥

植物体は人工気象器 LH-350S (日本医化器械製作所) および白色蛍光灯 FL40SEX-N-HG (NEC) を使用し、固形培地上で 16 時間明/8 時間暗条件・23°C で生育した。植物体は以下の 3 つの条件で処理し、それぞれを①コントロールサンプル・②すり潰し直後サンプル・③すり潰し後 5 分放置サンプルとした。コントロールサンプルは播種後 14 日目の植物体の地上部を切り取り、液体窒素で凍結した後、フリーズトラップ (VA-140S, TAITEC) で乾燥させた。すり潰し直後サンプルは播種後 14 日目の植物体の地上部を Mixer Mill MM300 (Retsch) を用いて 30 Hz・4°C で 5 分間破碎した後、凍結乾燥させた。すり潰し後 5 分放置サンプルは、すり潰し直後サンプルと同様の方法で破碎した後、シェイキングインキュベータ (SI-300C, アズワン) を用いて 500 rpm・23°C で 5 分間インキュベートし、凍結乾燥させた。

2) LC-MS 解析

グルコシノレートの LC-MS 分析を, Sawada ら (2017) の方法に若干の変更を加えて行った. 約 3.3 mg の乾燥サンプル (各サンプルにつき 6~8 反復) を使用した. 抽出溶媒 (80%メタノール, 0.1%ギ酸, 8.4 nmol/L リドカイン, 210 nmol/L 10-カンファースルホン酸を内部標準として 4 mgDW / mL) を加えた後, Mixer Mill MM300 (Retsch) を用いて 20 Hz で 10 分間破碎し, 8,000 g で 3 分間遠心分離した. 上清 (100 μ L) を新しいチューブに移し乾燥させた後, 1000 μ L の超純水に溶解し, MultiScreen HTS 384-Well フィルタープレート (Merck Millipore) を用いて濾過した. Nexera MP システム (島津製作所) を用いて LCMS-8050 上で 2 μ L の溶液抽出物 (最終濃度: 約 400 μ gD/mL) を LC-QqQ-MS に付した. 最適化された反応モニタリング条件および LC 保持時間に基づいて, 抽出溶液中に 20 種のグルコシノレートおよび 2 種の内部標準が検出された.

ミロシナーゼ活性試験

解析は Travers-Martin ら(2008) の方法を参考に行った.

1) 試料の準備

植物体は人工気象器 LH-350S (日本医化器械製作所) および白色蛍光灯 FL40SEX-N-HG (NEC) を使用し, 固形培地上で 16 時間明/8 時間暗条件・23°C で生育した. 播種後 14 日目の野生型, *bglu18 pyk10* 二重変異体の地上部約 100 mgFW をジルコニアビーズとともに 2 mL チューブに入れて凍結した. 液体窒素で冷却した Mixer Mill MM300 (Retch) で粉碎し (20Hz, 3 分), 氷上で抽出溶媒 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 \times cOmplete Protease Inhibitor Cocktail) 500 μ L を添加後, Mixer Mill MM300 を用いて抽出した (20Hz, 10 分, 4°C). チューブを 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心後, 上清を限外ろ過スピンカラム (amicon ultra-0.5, 30kDa) に移した. 15,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心濃縮してろ液を捨て, 抽出溶媒 450 μ L を加えて混和する操作を 3 回繰り返すことで, 内在低分子化合物を除去した粗タンパク質抽出液約 500 μ L を得た. タンパク質濃度は BSA を標準物質として Bradford 法で測定した.

2) ミロシナーゼ活性測定

ミロシナーゼ活性は, 抽出液に添加したグルコシノレートが分解する際に生じるグルコースを比色法で経時的に定量することで算出した. 96 穴プレートに抽出液 75 μ L, 5 \times グルコース定量用酵素ミックス (ラボアッセイ グルコース, 和光純薬) 20 μ L, 5 mM

グルコシノレート水溶液 5 μL を順に加え、マイクロプレートリーダー (iMark, BIO-RAD) で OD 490nm を 1 分毎に 60 分間測定した。グルコース標準溶液の希釈系列を同時に測定し、その OD 値をもとに作成した検量線から、サンプル溶液中のグルコース濃度を算出した。グルコースから色素が生成される速度はグルコシノレートの分解速度と比べて十分速いため、単位時間あたりのグルコース増加量をミロシナーゼ活性とみなし、その比活性 ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) を比較した。

謝辞

本研究は、平成 28 年 4 月より京都大学大学院 理学研究科 植物分子細胞生物学研究室にてはじめられました。指導教員を引き受けてくださった嶋田知生講師には、素晴らしい研究環境と多くの助言をいただき、心から感謝申し上げます。嶋田講師には研究の進め方や実験手法だけでなく、研究内容の伝え方や論文の書き方について、本当にたくさんのご教授いただきました。また、嶋田講師にはいつも快く多くの議論に付き合っていていただき、その中でご教示いただいた幅広い知識は本研究を始める重要な契機にもなりました。本研究で用いた GFP-h 植物体は嶋田知生講師によって作製されたものです。心より深く感謝申し上げます。田村謙太郎准教授（現・静岡県立大学 食品栄養科学部）には日々様々な実験技術を教えていただきました。また、研究内容についても多くの助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

西村いくこ教授（現・甲南大学理学部）には丁寧で温かいご指導と多くの励まし言葉をいただきました。篤く御礼申し上げます。同じ ER body を研究する山田健志グループリーダー（現・ヤギェウォ大 マウオポルスカ生物工学研究所）には多くの議論に付き合っていていただき、最新の研究成果をご教示いただきました。オカダンゴムシを用いた食害実験は山田グループリーダーの発案であり、確立にあたって多くのご指導をいただきました。L-ER body の防御機能を証明することができたのも山田グループリーダーのご協力があったからこそです。さらに、*Pro35S:SP-GFP-HDEL* を発現する *bglu18* 変異体、*pyk10* 変異体、*myc2 myc3 myc4* 変異体を分与していただきました。心より感謝申し上げます。國枝正助教（奈良先端科学技術大学院大学）には様々な議論をしていただき、多くの助言をいただきました。*ProNAIL:sGFP-GUS* コンストラクトは國枝正博士によって作製されました。心より感謝申し上げます。

本研究における LC-MS 解析は、杉山龍介研究員と平井優美チームリーダー（理化学研究所 環境資源科学研究センター）によって行われました。両氏による解析結果が L-ER body の防御機能の理解において重要な示唆を与えたことは言うまでもありません。沼田英治教授（京都大学大学院 理学研究科）にはオカダンゴムシの生態や飼育方法について詳しくご教示いただき、オカダンゴムシの餌も分与していただきました。心より感謝申し上げます。本研究で用いた *jin1-2*, *jai3-1* 変異体は野元美佳助教（名古屋大学 遺伝子実験施設）より分与していただきました。感謝申し上げます。

植物分子細胞生物学研究室の皆様、植物学教室の皆様には多くの様々な議論に付き合っていていただき、多くのアドバイスをいただきました。このような充実した環境で思い切り研究に打ち込めたことは大変幸せなことで、本当に有難いことと思います。心より感謝申し上げます。

最後に、いつも温かく支え励ましてくれた家族と友人たちに心から感謝いたします。ありがとうございました。

引用文献

- Agerbirk N, Olsen CE** (2012) Glucosinolate structures in evolution. *Phytochem* **77**: 16–45
- Ahn YO, Shimizu B-I, Sakata K, Gantulga D, Zhou C, Zhou Z, Bevan DR, Esen A** (2010) Scopolin-hydrolyzing beta-glucosidases in roots of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **51**: 132–143
- Andersson D, Chakrabarty R, Bejai S, Zhang J, Rask L, Meijer J** (2009) Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochem* **70**: 1345–1354
- Barth C, Jander G** (2006) *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J* **46**: 549–562
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatoš A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, et al** (2009) A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science* **323**: 101–106
- Beekwilder J, van Leeuwen W, van Dam NM, Bertossi M, Grandi V, Mizzi L, Soloviev M, Szabados L, Molthoff JW, Schipper B, et al** (2008) The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **3**: e2068
- Behnke HD, Eschlbeck G** (1978) Dilated cisternae in *Capparales*—an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum. *Protoplasma* **97**: 351–363
- Bones AM, Rossiter JT** (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol Plant* **97**: 194–208
- Bones AM, Evjen K, Iversen TH** (1989) Characterization and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in intact plants, protoplasts, and calli of Brassicaceae. *Isr J Bot* **38**: 177-192
- Bonnett HT Jr., Newcomb EH** (1965) Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish. *J Cell Biol* **27**: 423–432
- Borek V, Elberson LR, McCaffrey JP, Morra MJ** (1997) Toxicity of rapeseed meal and methyl isothiocyanate to larvae of the black vine weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J Econ Entomol* **90**: 109–112

- Brown PD, Tokuhiya JG, Reichelt M, Gershenzon J** (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem* **62**: 471–481
- Buskov S, Serra B, Rosa E, Sørensen H, Sørensen JC** (2002) Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Cv. Woll). *J Agric Food Chem* **50**: 690–695
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, et al** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM** (2009) Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* **323**: 95–101
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P** (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem* **56**: 5–51
- Falk KL, Kästner J, Bodenhausen N, Schramm K, Paetz C, Vassão DG, Reichelt M, Knorre von D, Bergelson J, Erb M, et al** (2014) The role of glucosinolates and the jasmonic acid pathway in resistance of *Arabidopsis thaliana* against molluscan herbivores. *Mol Ecol* **23**: 1188–1203
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico J-M, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, et al** (2011) The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701–715
- Geem KR, Kim DH, Lee DW, Kwon Y, Lee J, Kim JH, Hwang I** (2018) Jasmonic acid-inducible TSA1 facilitates ER body formation. *Plant J* **51**: 1–14
- Gunning BES** (1998) The identity of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP. *Trends Plant Sci* **3**: 417
- Halkier BA, Gershenzon J** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 303–333

- Haseloff J, Amos B** (1995) GFP in plants. *Trends Genet* **11**: 328–329
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2122–2127
- Haughn GW, Davin L, Giblin M, Underhill EW** (1991) Biochemical Genetics of Plant Secondary Metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **217**–226
- Hawes C, Saint-Jore C, Martin B, Zheng HQ** (2001) ER confirmed as the location of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP! *Trends Plant Sci* **6**: 245–246
- Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa NK, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2001) A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **42**: 894–899
- Heyer M, Reichelt M, Mithöfer A** (2018) A Holistic Approach to Analyze Systemic Jasmonate Accumulation in Individual Leaves of *Arabidopsis* Rosettes Upon Wounding. *Front Plant Sci* **9**: 1569
- Hogge LR** (1988) HPLC Separation of Glucosinolates from Leaves and Seeds of *Arabidopsis thaliana* and Their Identification Using Thermospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **26**: 551–556
- Iversen T-H** (1970) The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the *Cruciferae*. *Protoplasma* **71**: 467–477
- Iversen TH, Flood PR** (1969) Rod-shaped accumulations in cisternae of the endoplasmic reticulum in root cells of *Lepidium sativum* seedlings. *Planta* **86**: 295–298
- Kessler A, Baldwin IT** (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 299–328
- Kissen R, Rossiter JT, Bones AM** (2008) The “mustard oil bomb”: not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochem Rev* **8**: 69–86

- Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T** (2001) Genetic Control of Natural Variation in Arabidopsis Glucosinolate Accumulation. *Plant Physiol* **126**: 811–825
- Koroleva OA, Cramer R** (2011) Single-cell proteomic analysis of glucosinolate-rich S-cells in *Arabidopsis thaliana*. *Methods* **54**: 413–423
- Koroleva OA, Davies A, Deeken R, Thorpe MR, Tomos AD, Hedrich R** (2000) Identification of a New Glucosinolate-Rich Cell Type in Arabidopsis Flower Stalk. *Plant Physiol* **124**: 599–608
- Koroleva OA, Gibson TM, Cramer R, Stain C** (2010) Glucosinolate-accumulating S-cells in Arabidopsis leaves and flower stalks undergo programmed cell death at early stages of differentiation. *Plant J* **64**: 456–469
- Köhler RH** (1998) GFP for in vivo imaging of subcellular structures in plant cells. *Trends Plant Sci* **3**: 317–320
- Labandeira CC** (2013) A paleobiologic perspective on plant–insect interactions. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 414–421
- Lazzeri L, Curto G, Leoni O, Dallavalle E** (2004) Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) chitw. *J Agric Food Chem* **52**: 6703–6707
- Lipka V, Dittgen J, Bednarek P, Bhat R, Wiermer M, Stein M, Landtag J, Brandt W, Rosahl S, Scheel D, et al** (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science* **310**: 1180–1183
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez Serrano JJ, Solano R** (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1938–1950
- Matsushima R, Fukao Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2004) *NAIL* gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* **16**: 1536–1549

- Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**: 1807–1814
- Matsushima R, Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003a) The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **44**: 661–666
- Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003b) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J* **33**: 493–502
- Mithöfer A, Boland W** (2012) Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 431–450
- Müller R, de Vos M, Sun JY, Sønderby IE, Halkier BA, Wittstock U, Jander G** (2010) Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores. *J Chem Ecol* **36**: 905–913
- Nakamura S, Mano S, Tanaka Y, Ohnishi M, Nakamori C, Araki M, Niwa T, Nishimura M, Kaminaka H, Nakagawa T, et al** (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a selection marker for plant transformation. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 1315–1319
- Nakano RT, Matsushima R, Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2012) ERMO3/MVP1/GOLD36 is involved in a cell type-specific mechanism for maintaining ER morphology in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **7**: e49103
- Nakano RT, Pislewska-Bednarek M, Yamada K, Edger PP, Miyahara M, Kondo M, Böttcher C, Mori M, Nishimura M, Schulze-Lefert P, et al** (2017) PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **89**: 204–220
- Nakano RT, Yamada K, Bednarek P, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2014) ER bodies in plants of the *Brassicales* order: biogenesis and association with innate immunity. *Front Plant Sci* **5**: 73

- Nintemann SJ, Hunziker P, Andersen TG, Schulz A, Burow M, Halkier BA** (2018) Localization of the glucosinolate biosynthetic enzymes reveals distinct spatial patterns for the biosynthesis of indole and aliphatic glucosinolates. *Physiol Plant* **163**: 138–154
- Noret N, Meerts P, Tolrà R, Poschenrieder C, Barceló J, Escarre J** (2005) Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinolates. *New Phytol* **165**: 763–772
- Ogasawara K, Yamada K, Christeller JT, Kondo M, Hatsugai N, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2009) Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases. *Plant Cell Physiol* **50**: 480–488
- Pozo MJ, Van der Ent S, Van Loon LC, Pieterse CMJ** (2008) Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **180**: 511–523
- Rask L, Andréasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J** (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* **42**: 93–113
- Reichert M, Brown PD, Schneider B, Oldham NJ, Stauber E, Tokuhisa J, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Gershenzon J** (2002) Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem* **59**: 663–671
- Ridge RW, Uozumi Y, Plazinski J, Hurley UA, Williamson RE** (1999) Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. *Plant and Cell Physiology* **40**: 1253–1261
- Sack L, Scoffoni C** (2013) Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New Phytol* **198**: 983–1000
- Sawada Y, Tsukaya H, Li Y, Sato M, Kawade K, Hirai MY** (2017) A novel method for single-grain-based metabolic profiling of *Arabidopsis* seed. *Metabolomics* **13**: 1–8
- Shirakawa M, Hara-Nishimura I** (2018) Specialized Vacuoles of Myrosin Cells: Chemical Defense Strategy in Brassicales Plants. *Plant Cell Physiol* **59**: 1309–1316

- Shroff R, Vergara F, Muck A, Svatoš A, Gershenzon J** (2008) Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 6196–6201
- Sun JY, Sønderby IE, Halkier BA, Jander G, de Vos M** (2009) Non-volatile intact indole glucosinolates are host recognition cues for ovipositing *Plutella xylostella*. *J Chem Ecol* **35**: 1427–1436
- Sønderby IE, Burow M, Rowe HC, Kliebenstein DJ, Halkier BA** (2010) A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **153**: 348–363
- Travers-Martin N, Kuhlmann F, Müller C** (2008) Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 506–516
- Ueda H, Nishiyama C, Shimada T, Koumoto Y, Hayashi Y, Kondo M, Takahashi T, Ohtomo I, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2006) AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells. *Plant Cell Physiol* **47**: 164–175
- Wang M, Sun X, Tan D, Gong S, Meijer J, Zhang J** (2009) The two non-functional myrosinase genes *TGG3* and *TGG6* in *Arabidopsis* are expressed predominantly in pollen. *Plant Science* **177**: 371–375
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC** (2014) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav* **7**: 1306–1320
- Wink M** (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* **75**: 225–233
- Wink M** (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem* **64**: 3–19
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG** (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091–1094
- Xu Z, Escamilla-Treviño L, Zeng L, Lalgondar M, Bevan DR, Winkel BSJ, Mohamed A, Cheng C-L, Shih M-C, Poulton JE, et al** (2004) Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol* **55**: 343–367

- Yamada K, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2011) Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants. *Plant Cell Physiol* **52**: 2039–2049
- Yamada K, Nagano AJ, kimi O, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2009) The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific β -glucosidases . *Plant Signal Behav* **4**: 849–852
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2008) NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 2529–2540
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2013) Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *Plant Physiol* **161**: 108–120
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, et al** (2009) The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *THE PLANT CELL ONLINE* **21**: 2220–2236
- Zhang J, Pontoppidan B, Xue J, Rask L, Meijer J** (2002) The third myrosinase gene TGG3 in *Arabidopsis thaliana* is a pseudogene specifically expressed in stamen and petal. *Physiol Plant* **115**: 25–34
- Zhou C, Tokuhisa JG, Bevan DR, Esen A** (2012) Properties of β -thioglucoside hydrolases (TGG1 and TGG2) from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **191-192**: 82–92

图表

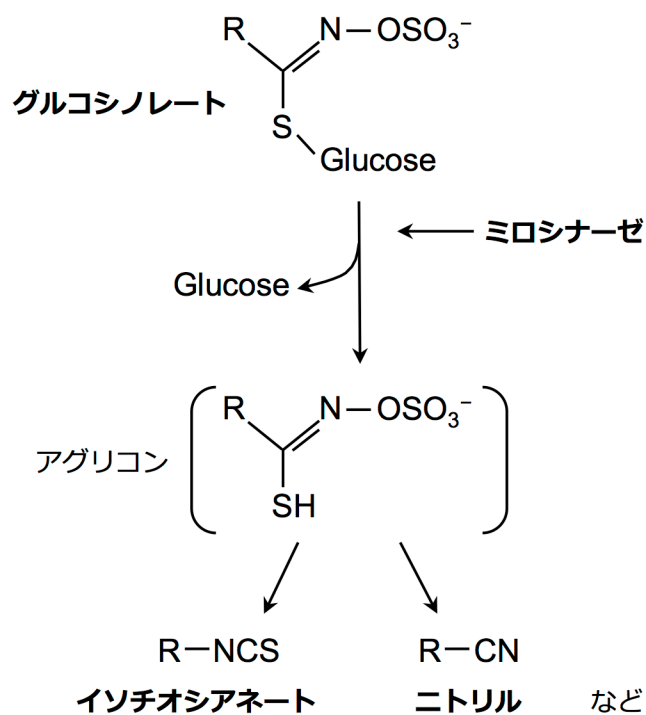
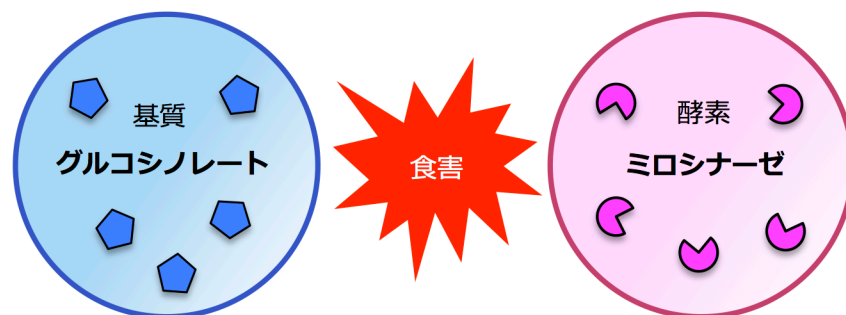


図1. アブラナ目植物に特異的なグルコシノレート-ミロシナーゼ系。

グルコシノレートとミロシナーゼは平常時は別々の場所に蓄積される。昆虫などによる食害を受けて植物組織が崩壊すると、グルコシノレートとミロシナーゼが出会う。グルコシノレートはミロシナーゼによって加水分解され、不安定なアグリコンが生成される。アグリコンはイソチオシアネートやニトリルなどの揮発性の化合物に変換され、これらが外敵に対する忌避物質として機能する。

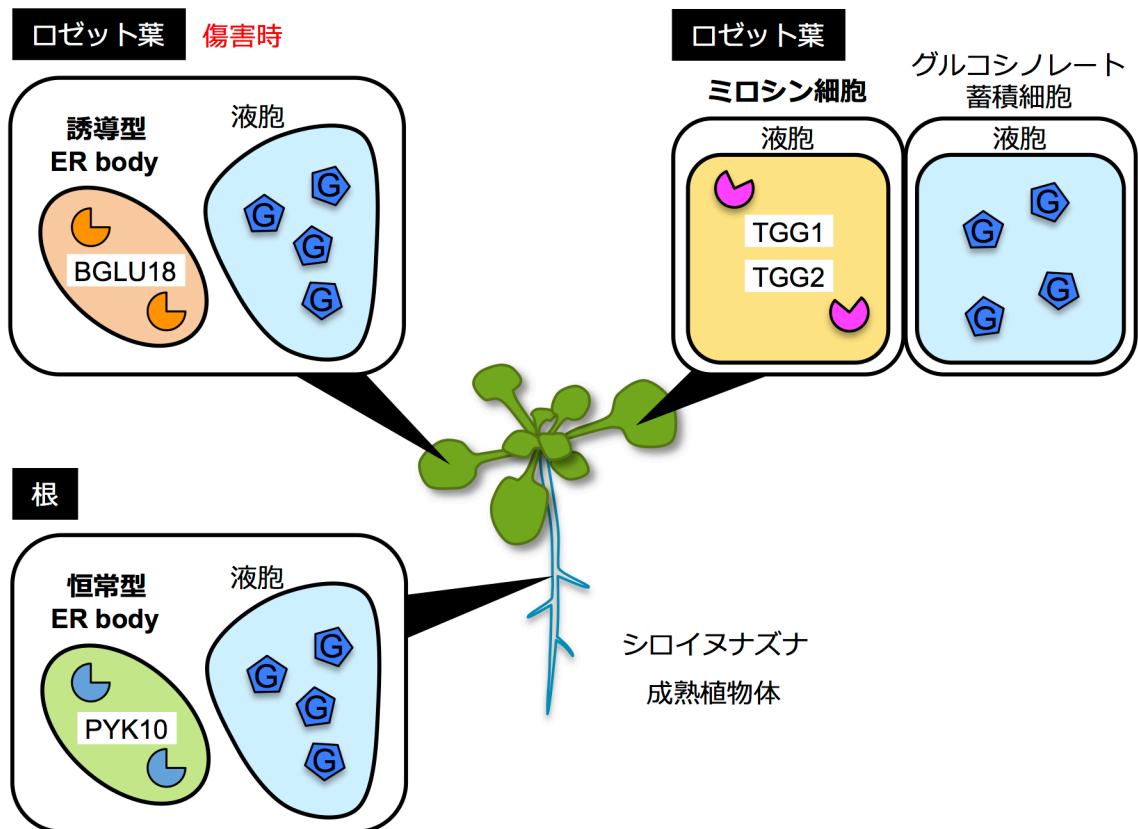


図2. シロイヌナズナにおけるグルコシノレート-ミロシナーゼ系.

これまでに報告されたシロイヌナズナの成熟植物体におけるグルコシノレート-ミロシナーゼ系. 根の表皮細胞にはPYK10を蓄積する恒常型ER bodyが存在する. ロゼット葉では傷害時にBGLU18を蓄積する誘導型ER bodyの形成が誘導される. ロゼット葉ではTGG1およびTGG2を蓄積するミロシン細胞が維管束沿いに存在する. 図中の"G"はグルコシノレート (glucosinolate) を示す. グルコシノレートの細胞内局在は詳細には分かっていないが, 液胞内に蓄積すると想定されている.

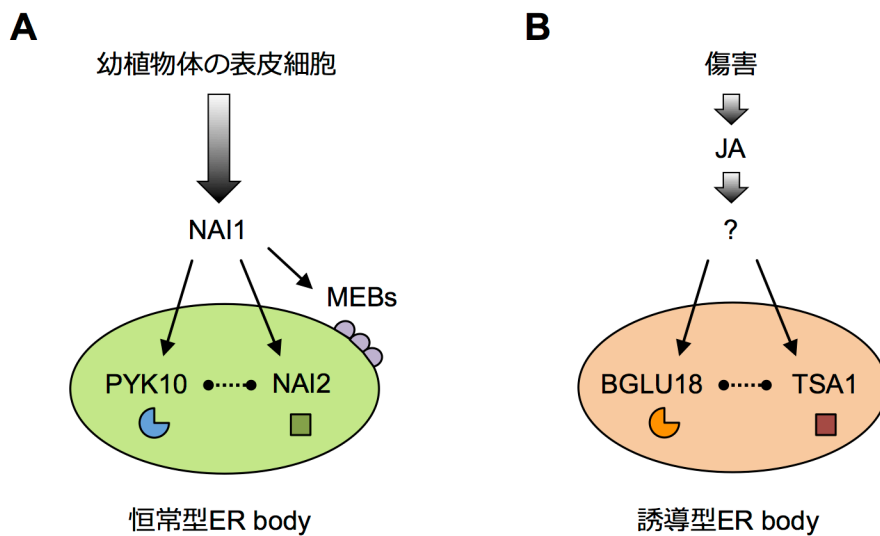


図3. 恒常型ER bodyと誘導型ER bodyの形成機構.

恒常型ER bodyと誘導型ER bodyの形成機構モデル. 山田ら (2009, 2011) による図を元に一部改変して作成した. A, 恒常型ER bodyの形成機構モデル. bHLH型の転写因子であるNAI1は恒常型ER body形成において中心的な役割を果たす. 恒常型ER bodyにはPYK10が蓄積する. NAI2はPYK10と相互作用し, ERから恒常型ER bodyを形成するのに機能する. MEBsは恒常型ER bodyの膜タンパク質である. NAI1はPYK10, NAI2, MEBsの発現を制御する. B, 誘導型ER bodyの形成機構モデル. 誘導型ER bodyの形成は傷害や傷害に応答して生合成される植物ホルモンのジャスモン酸 (JA) により誘導される. 誘導型ER bodyにはBGLU18が蓄積する. NAI2のホモログであるTSA1は誘導型ER bodyの形成に関与する. TSA1はBGLU18と相互作用すると考えられている. BGLU18やTSA1の発現を制御する転写因子はまだ同定されていない.

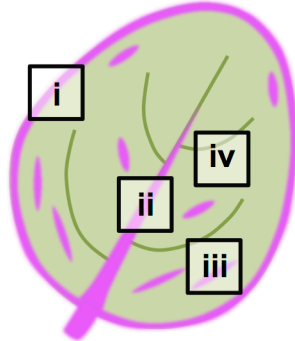
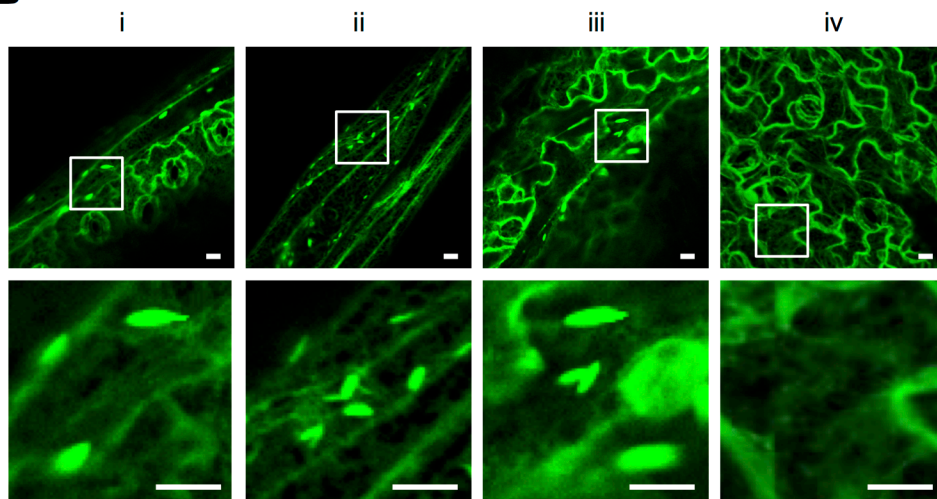
A**B**

図4. シロイヌナズナのロゼット葉におけるL-ER bodyの分布.

A, シロイヌナズナのロゼット葉におけるL-ER bodyの分布を表す模式図. L-ER bodyは図中のマゼンタで示す領域, すなわち周縁細胞 (i), 主脈を覆う表皮細胞 (ii), 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞 (iii) に存在した. L-ER bodyはその他のジグソーパズル型の表皮細胞 (iv) には存在しなかった. B, 播種後2週間の形質転換シロイヌナズナGFP-hの第1・2葉の裏側の表皮を共焦点レーザー顕微鏡で観察した. 画像上部にあるローマ字 (i-iv) はAの模式図に示した4種類の表皮細胞を指す. 下段は上段の白い四角で囲まれた部分の拡大図. (iv) の画像はimageJ (NIH) のZprojectプログラム処理を用いてZ軸方向に画像スタックを投影し取得した. Bars = 10 μ m.

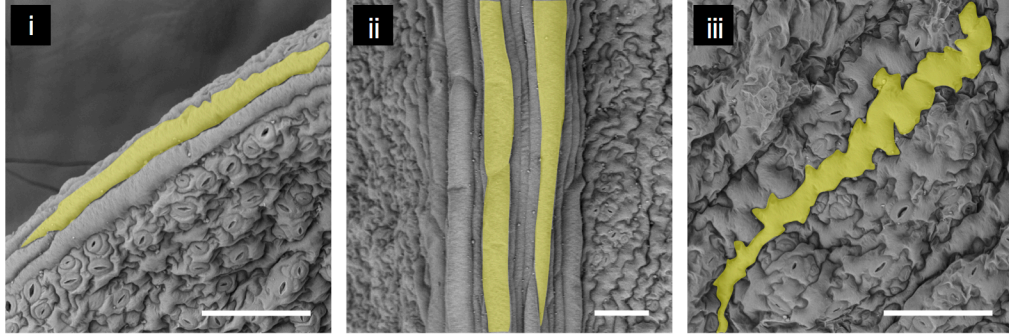
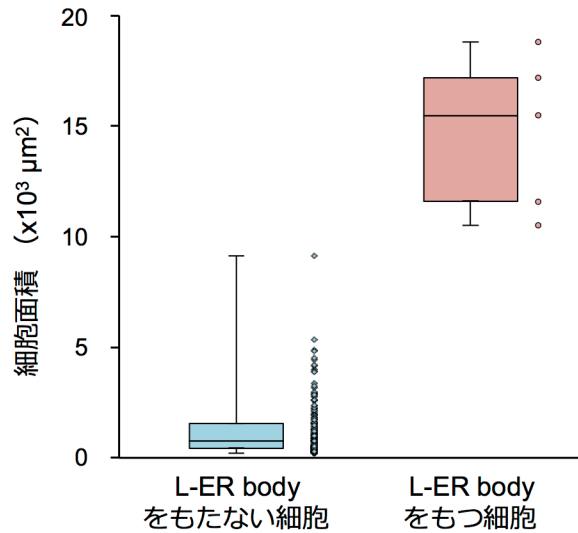
A**B**

図5. L-ER bodyをもつ表皮細胞はL-ER bodyをもたない表皮細胞よりも大きい。

A, L-ER bodyを有すると思われる3種類の表皮細胞のSEM画像。播種後2週間のシロイヌナズナの第1・2葉の裏面を観察した。左上のローマ字はロゼット葉の3種類の表皮細胞 (i, 周縁細胞; ii, 主脈を覆う表皮細胞; iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞) を指す。1つの細胞を黄色で塗りつぶした。Bars = 100 μm。B, L-ER bodyをもたない細胞ともつ細胞の面積の定量解析結果。ジグソーパズル型の表皮細胞 (iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞を含む) に注目して解析した。播種後2週間の*ProBGLU18:BGLU18-TagRFP*を発現するGFP-h植物体の第1・2葉を用いて解析した。観察した細胞の総数はn = 192 (L-ER bodyをもたない細胞), n = 5 (L-ER bodyをもつ細胞)。独立した6枚の観察画像を用いて解析した。

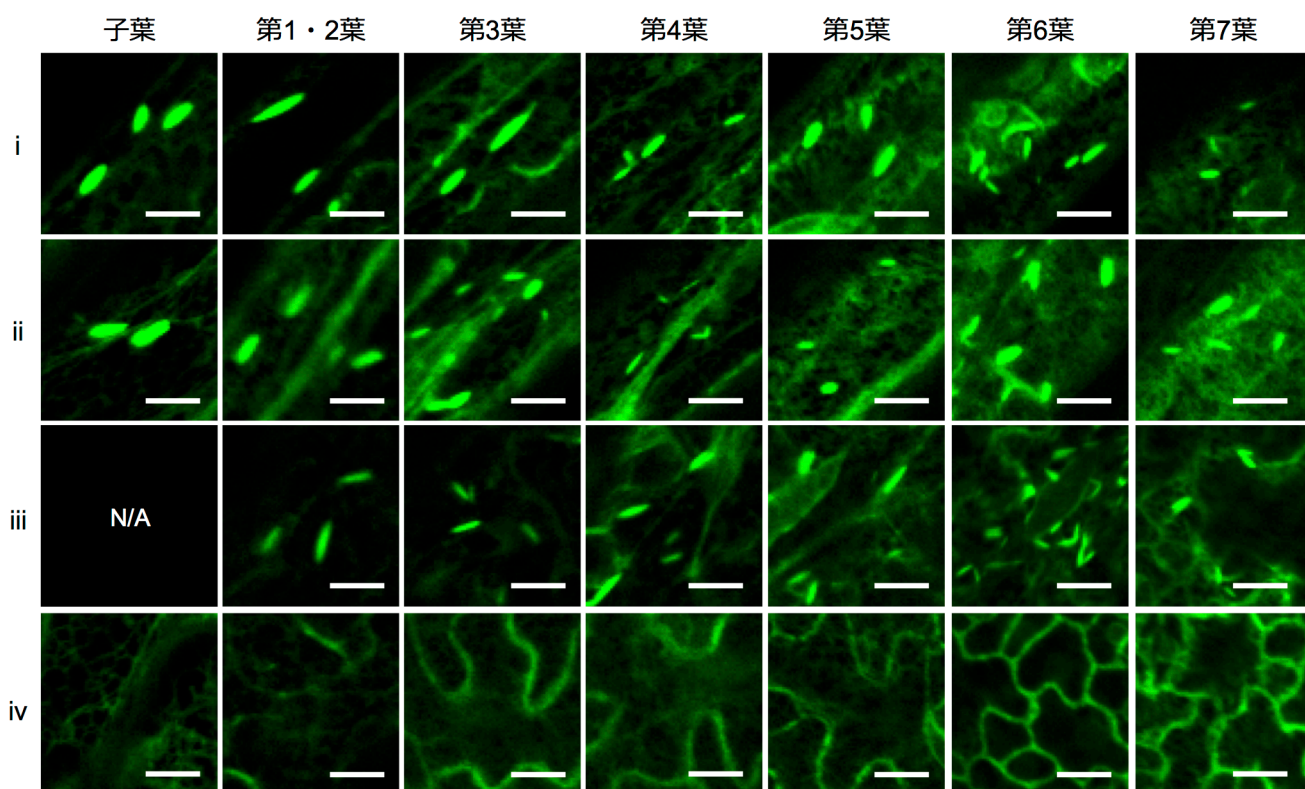


図6. 各葉位の葉におけるL-ER bodyの分布.

播種後2週間の形質転換シロイヌナズナGFP-hを用いて各葉位の葉の裏面を観察し、L-ER bodyの分布を調べた。左端のローマ字は葉の4種類の表皮細胞 (i, 周縁細胞; ii, 主脈を覆う表皮細胞; iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞; iv, i-iii以外のジグソーパズル型の表皮細胞) を指す。L-ER bodyは各葉位の葉において同様の分布を示した。図中の「N/A」は子葉では巨大なジグソーパズル型の表皮細胞が見られなかったことを表す。Bars = 10 μ m.

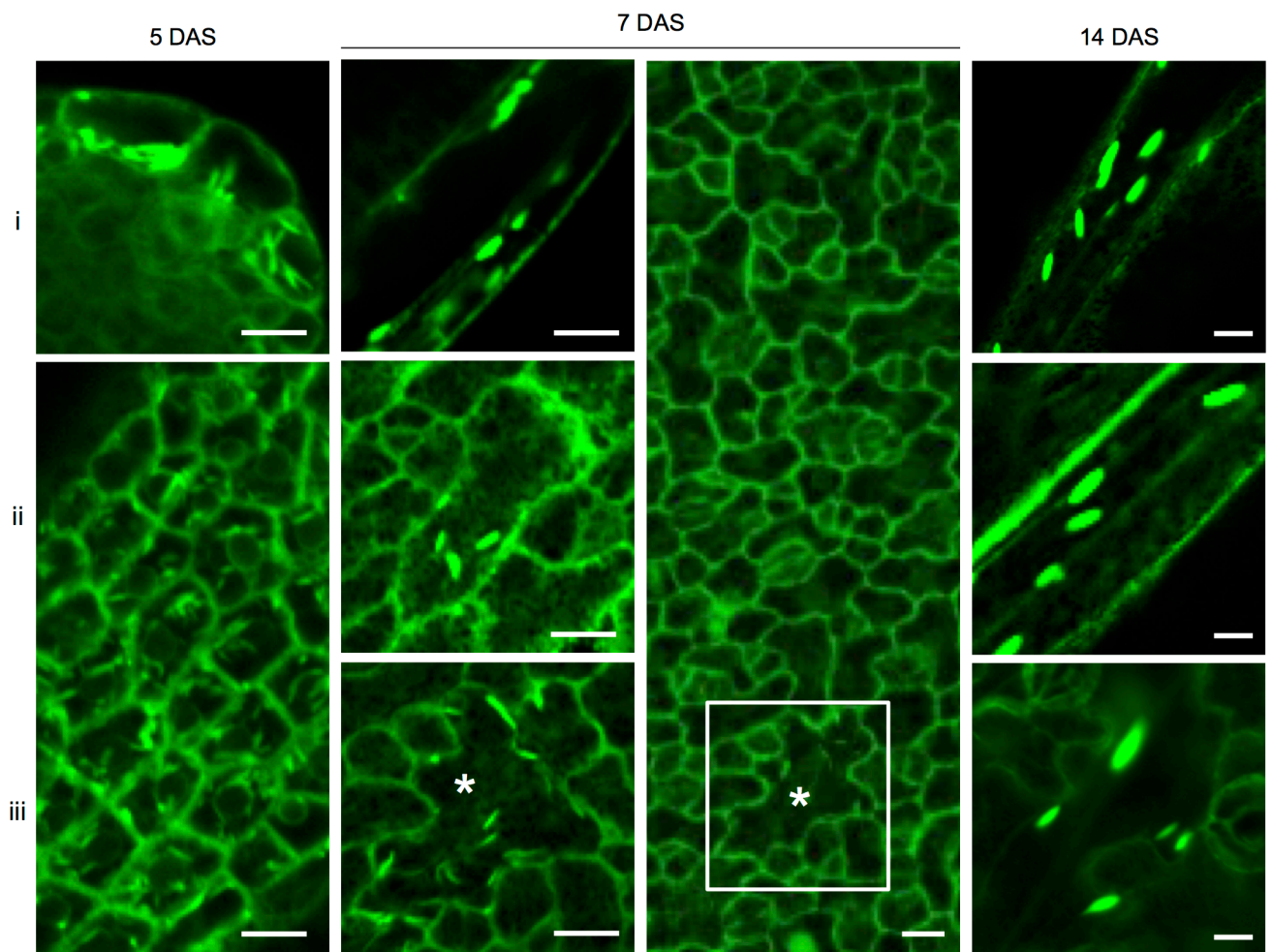


図7. ロゼット葉におけるL-ER bodyの分布は葉の発生に伴って決定される。

播種後2週間の形質転換シロイヌナズナGFP-hを用いて、第1・2葉の発生に伴うL-ER bodyの分布の変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。左端のローマ字は第1・2葉における3種類の表皮細胞 (i, 周縁細胞; ii, 主脈を覆う表皮細胞; iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞) を指す。画像上部に播種後日数 (days after sowing [DAS]) を記載した。播種後5日目ではL-ER bodyは葉全体の表皮細胞に観察された。播種後7日目では、L-ER bodyは2種類の表皮細胞 (i, ii) 以外の表皮細胞ではほとんど見られなくなった。ただし、比較的大きいジグソーパズル型の表皮細胞にのみL-ER bodyが観察された。アスタリスクは同じ細胞を示す。播種後14日目ではL-ER bodyは3種類の表皮細胞 (i-iii) に存在した。Bars = 10 μ m.

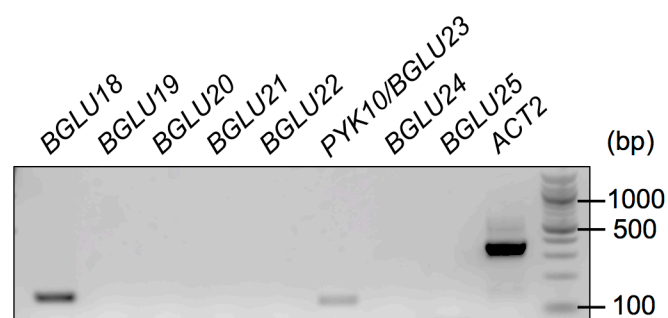


図8. ロゼット葉ではBGLU18とPYK10が発現する。

ロゼット葉における8種類のBGLU遺伝子（BGLU18, BGLU19, BGLU20, BGLU21, BGLU22, PYK10/BGLU23, BGLU24, BGLU25）の発現についてRT-PCR解析を行った。播種後2週間の野生型シロイヌナズナの第1・2葉から抽出したRNAを逆転写してcDNAを合成し、解析に用いた。ACTIN2（ACT2）は内部標準として使用した。

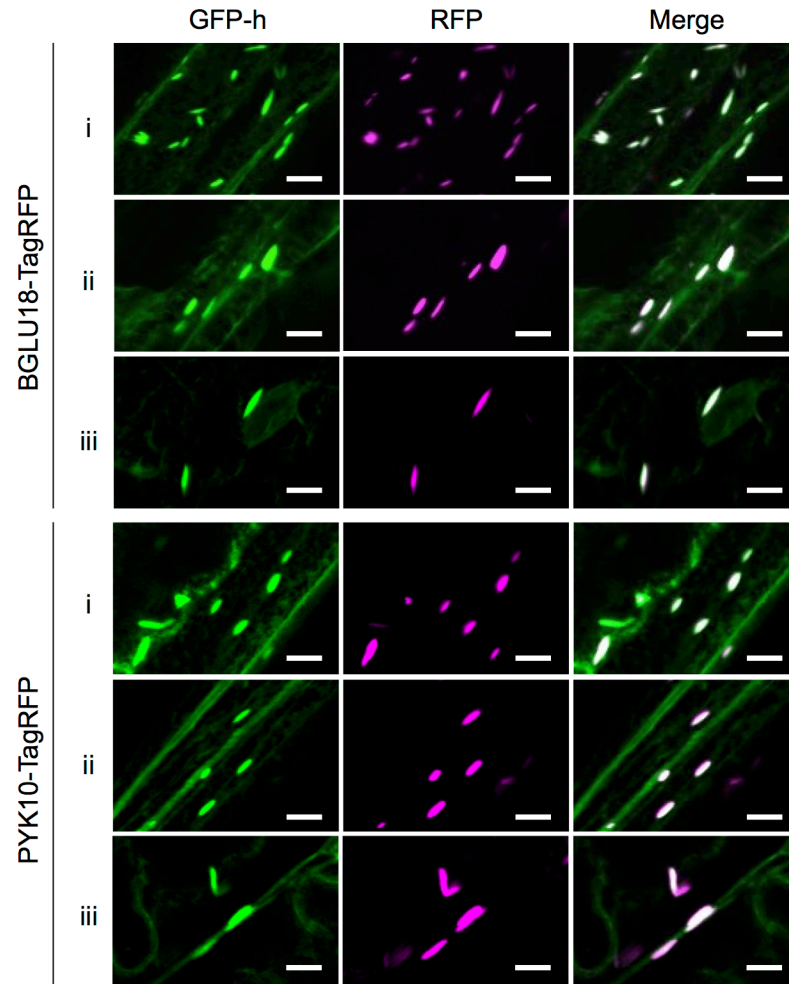


図9. L-ER bodyにはBGLU18とPYK10が蓄積する。

播種後2週間の*ProBGLU18:BGLU18-TagRFP*あるいは*ProPYK10:PYK10-TagRFP*を発現するGFP-hにおける第1・2葉の裏側におけるL-ER bodyの分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。左端のローマ字はロゼット葉の3種類の表皮細胞 (i, 周縁細胞; ii, 主脈を覆う表皮細胞; iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞) を示す。Bars = 10 μ m.

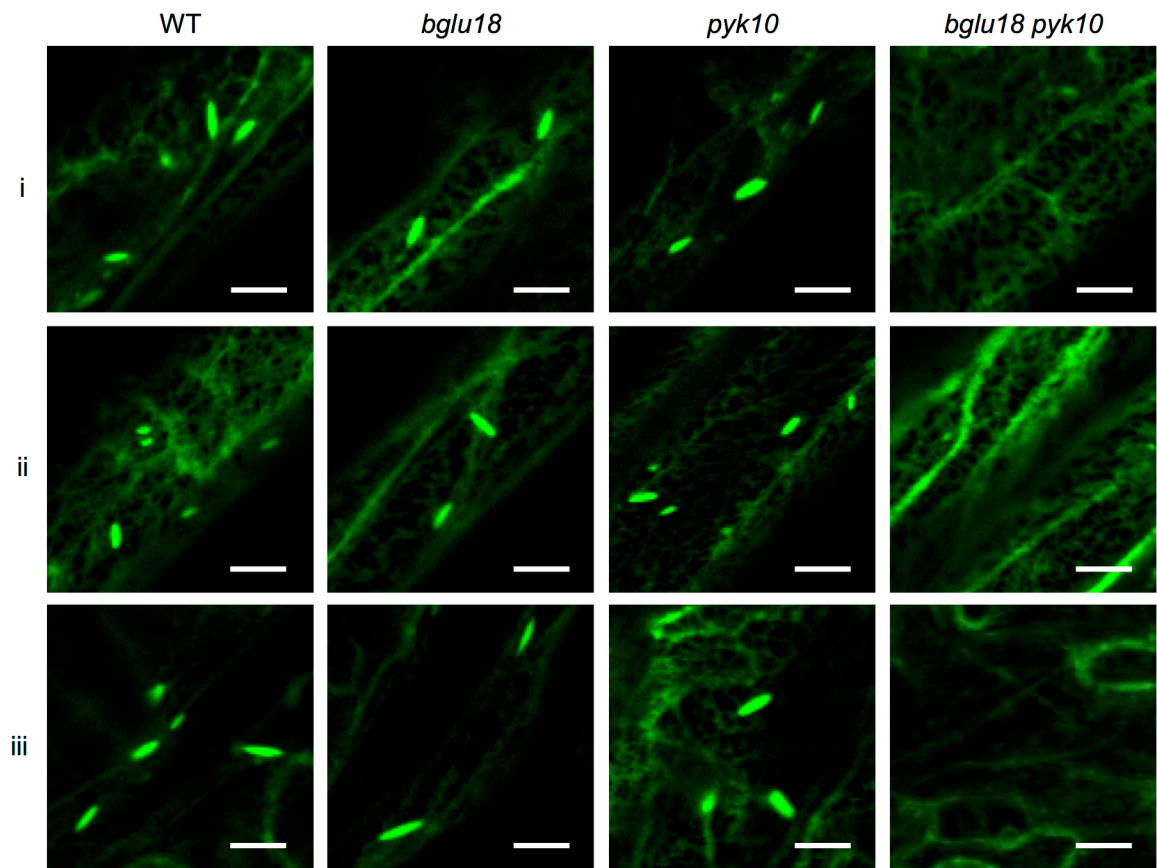


図10. *bglu18 pyk10*二重変異体ではL-ER bodyが形成されない。

播種後2週間のGFP-hおよび、*Pro35S:SP-GFP-HDEL*を発現する*bglu18*変異体、*pyk10*変異体、*bglu18 pyk10*二重変異体の第1・2葉において、L-ER bodyを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。左端のローマ字はロゼット葉の3種類の表皮細胞 (i, 周縁細胞; ii, 主脈を覆う表皮細胞; iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞)を示す。*bglu18*変異体、*pyk10*変異体では野生型と同様にL-ER bodyが観察された一方で、*bglu18 pyk10*二重変異体ではL-ER bodyはほぼ観察されなかった。Bars = 10 μ m.

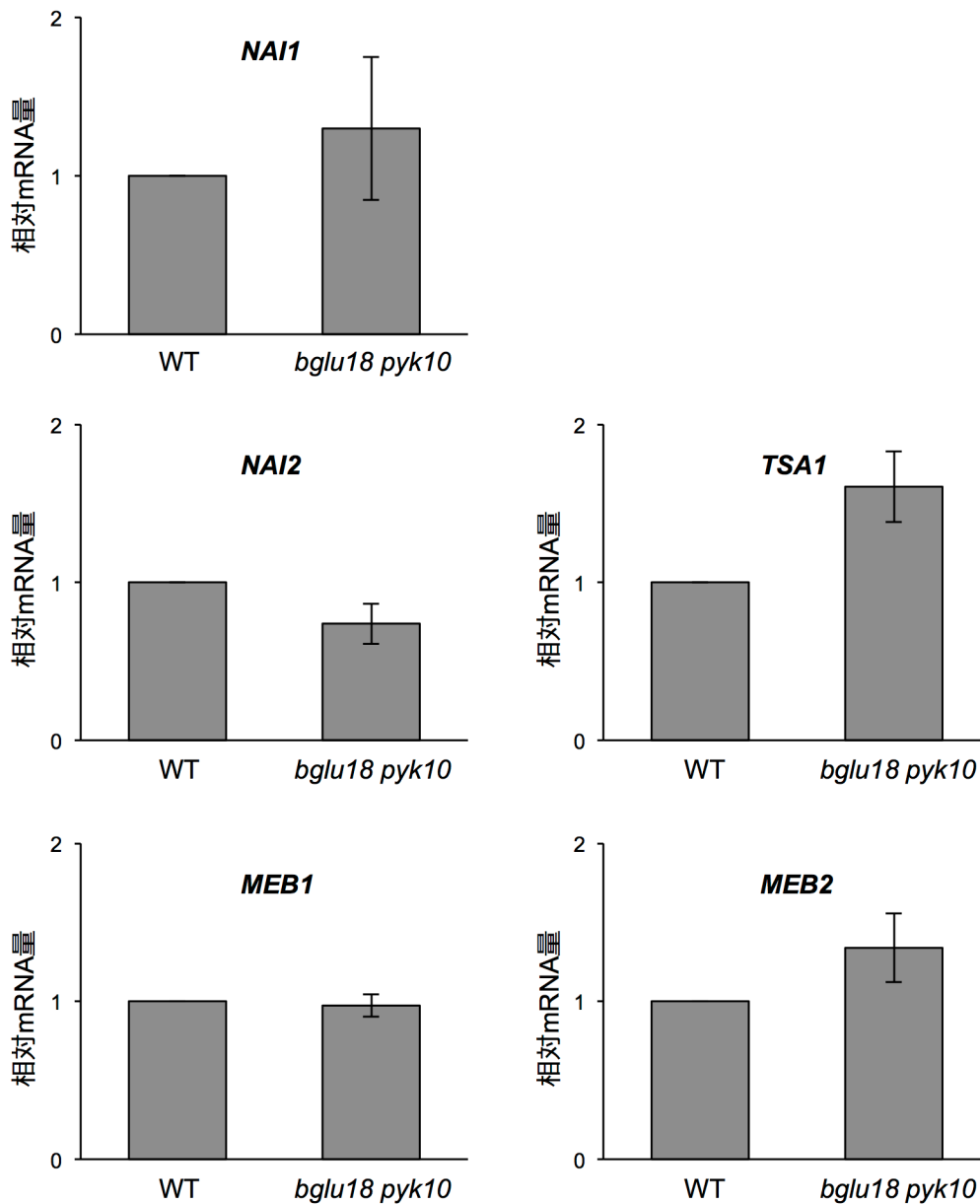


図11. *bglu18 pyk10*二重変異体におけるER body形成因子の遺伝子発現。

*bglu18 pyk10*二重変異体のロゼット葉におけるER body形成因子 (NAI1, NAI2, TSA1, MEB1, MEB2) の遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。野生型における各遺伝子のmRNA量を1としたときの*bglu18 pyk10*二重変異体における各遺伝子の相対mRNA量を調べた。播種後2週間の野生型と*bglu18 pyk10*二重変異体のロゼット葉から抽出したRNAを逆転写してcDNAを合成し解析に用いた。*bglu18 pyk10*二重変異体におけるNAI1, NAI2, TSA1, MEB1, MEB2遺伝子のmRNA量は野生型と同程度であった。Studentのt-testを用いて野生型と*bglu18 pyk10*二重変異体間の有意差を調べた結果、有意な差はなかった ($p > 0.05$)。相対mRNA量の値は平均 ± 標準誤差を表す。n = 3。

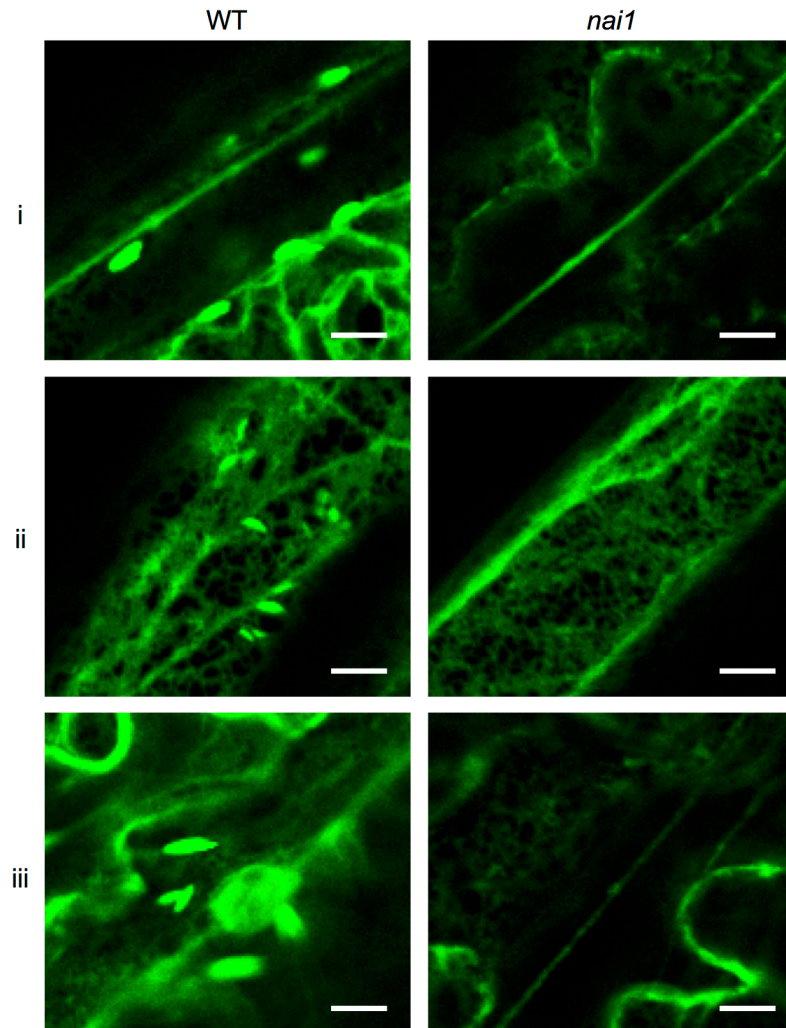


図12. *nai1*変異体ではL-ER bodyが形成されない。

播種後2週間の*Pro35S:SP-GFP-HDEL*を発現する野生型と*nai1*変異体の第1・2葉において、共焦点レーザー顕微鏡を用いてL-ER bodyを観察した。左端のローマ字はロゼット葉における3種類の表皮細胞 (i, 周縁細胞; ii, 主脈を覆う表皮細胞; iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞) を示す。*nai1*変異体では3種類の表皮細胞のすべてでL-ER bodyが観察されなかった。Bars = 10 μ m.

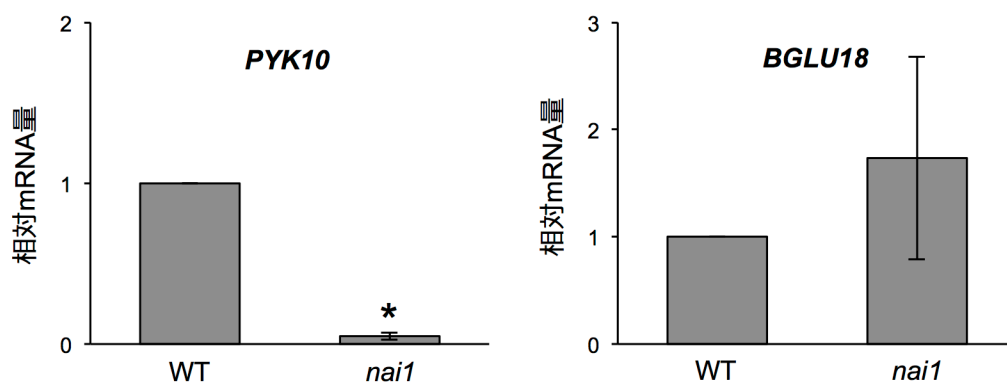


図13. *nai1*変異体のロゼット葉ではPYK10の発現は減少するのに対してBGLU18の発現は変化しない。

*nai1*変異体のロゼット葉におけるBGLU18とPYK10遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより解析した。縦軸は野生型における両遺伝子のmRNA量を1としたときの相対mRNA量を示す。播種後2週間の野生型と*nai1*変異体の第1・2葉から抽出したRNAを逆転写してcDNAを合成し解析に用いた。*nai1*変異体におけるPYK10遺伝子のmRNA量は野生型に比べて有意に減少していたのに対して、BGLU18遺伝子のmRNA量は野生型と有意な差はなかった。有意差検定にはStudentの*t*-testを用いた (* $p < 0.05$)。相対mRNA量の値は平均 ± 標準誤差を表す。n = 4。

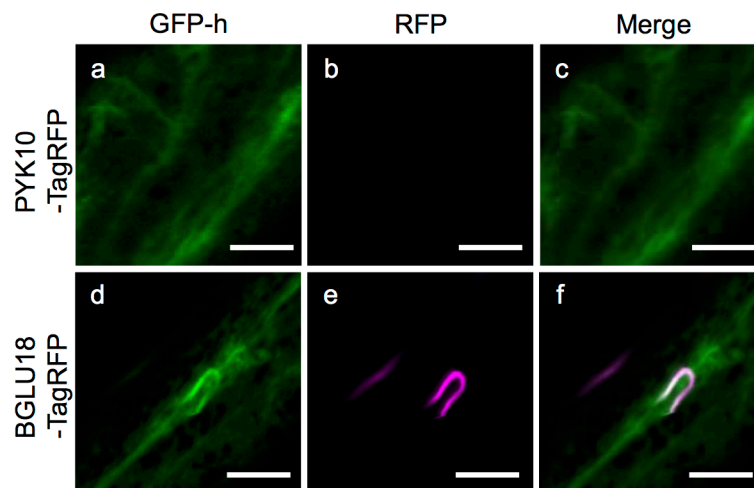


図14. *nai1*変異体ではPYK10は蓄積しないがBGLU18は蓄積する。

ProPYK10:PYK10-TagRFP (a-c) あるいは *ProBGLU18:BGLU18-TagRFP* (d-f) を発現する播種後2週間の *nai1* 変異体の第1・2葉を観察した。 *nai1* 変異体ではPYK10-TagRFPの蛍光が観察されなかった一方で、 BGLU18-TagRFPの蛍光は観察された。 Bars = 10 μ m.

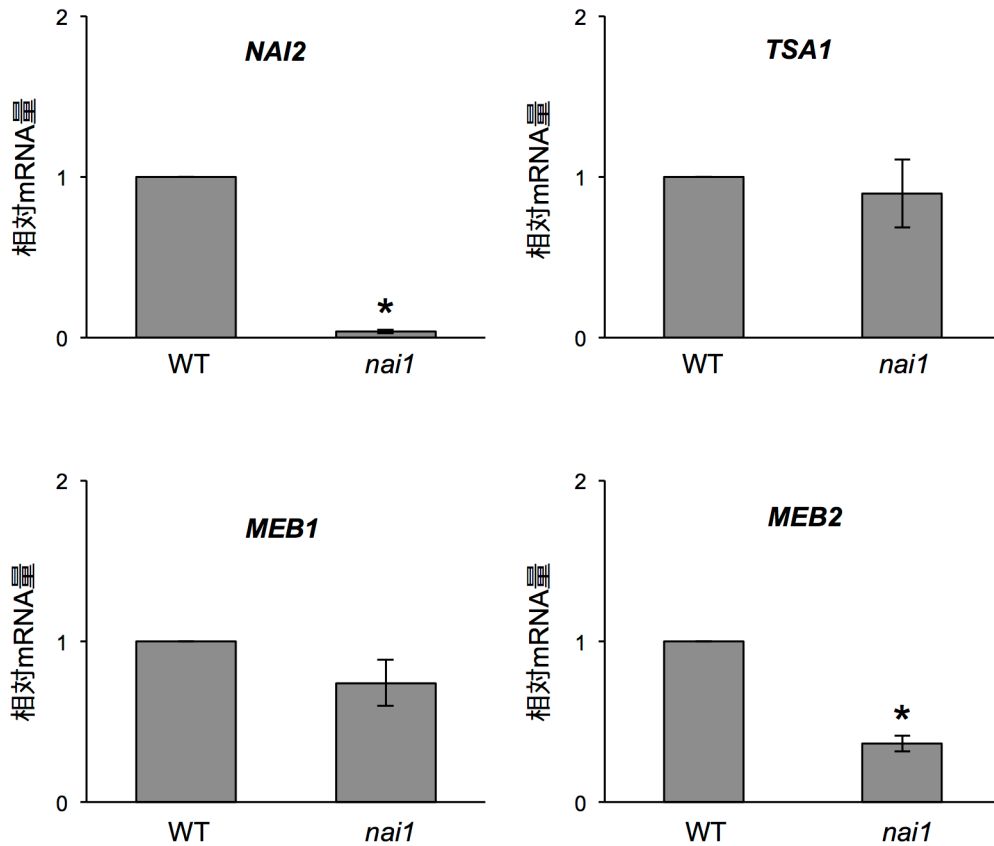


図15. *nai1*変異体におけるER body形成因子の遺伝子発現。

*nai1*変異体の第1・2葉におけるER body形成因子 (NAI2, TSA1, MEB1, MEB2) の遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。野生型における各遺伝子のmRNA量を1としたときの*nai1*変異体における各遺伝子の相対mRNA量を調べた。播種後2週間の野生型と*nai1*変異体のロゼット葉から抽出したRNAを逆転写してcDNAを合成し解析に用いた。*nai1*変異体におけるNAI2, MEB2遺伝子のmRNA量は野生型に比べて有意に減少していたのに対して, TSA1, MEB1遺伝子のmRNA量は野生型と有意差はなかった。相対mRNA量の値は平均 ± 標準誤差を表す。有意差検定にはStudentの*t*-testを用いた (* $p < 0.05$). $n = 3$.

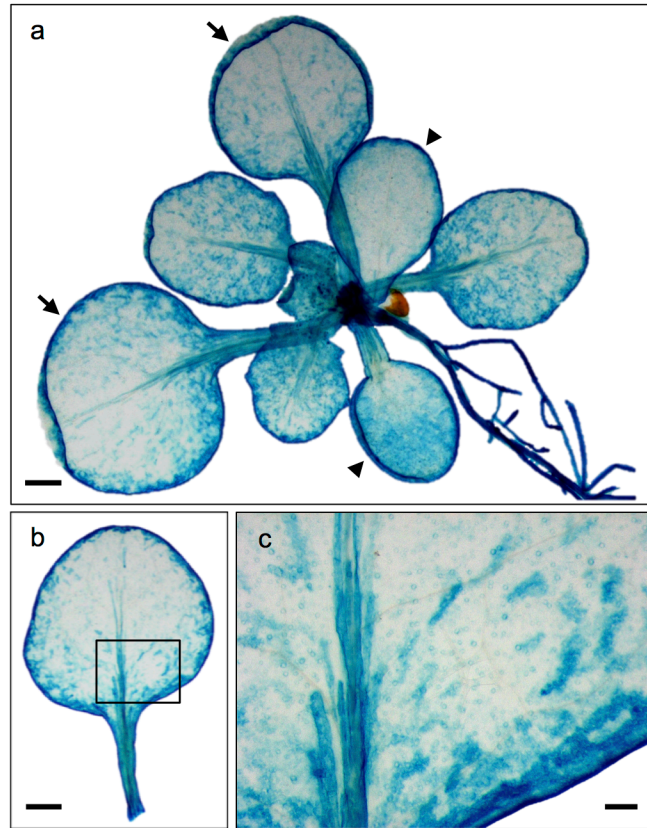
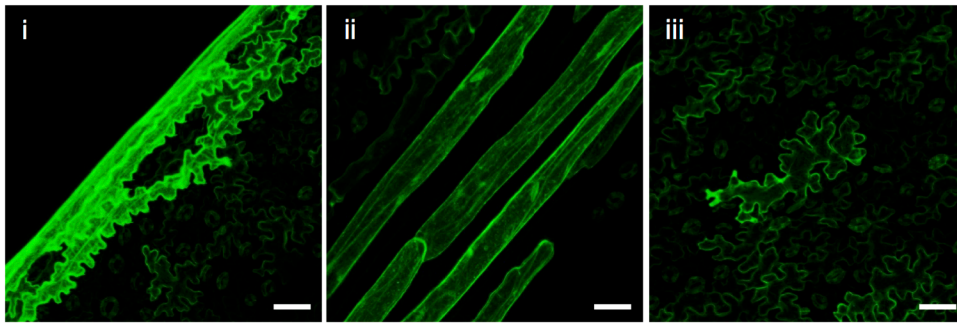
A**B**

図16. ロゼット葉におけるNAI1の発現パターン.

A, *ProNAI1:sGFP-GUS*を発現する形質転換シロイヌナズナをGUS染色した. a, 播種後2週間の*ProNAI1:sGFP-GUS*植物体. 矢じりと矢印はそれぞれ子葉と第1・2葉を指す. Bar = 0.5 mm. b, 播種後2週間の*ProNAI1:sGFP-GUS*植物体の第1・2葉. Bar = 0.5 mm. c, Bの四角で囲まれた領域の拡大写真. Bar = 0.1 mm. B, 播種後2週間の*ProNAI1:sGFP-GUS*植物体の第1・2葉におけるNAI1の発現を示す共焦点レーザー顕微鏡写真. GFPのシグナルは葉の周縁細胞 (i), 主脈を覆う表皮細胞 (ii), 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞 (iii) で観察された. 蛍光顕微鏡写真はImageJ (NIH) のZprojectプログラム処理を用いてZ軸方向に画像スタックを投影して作成した. Bars = 50 μ m.

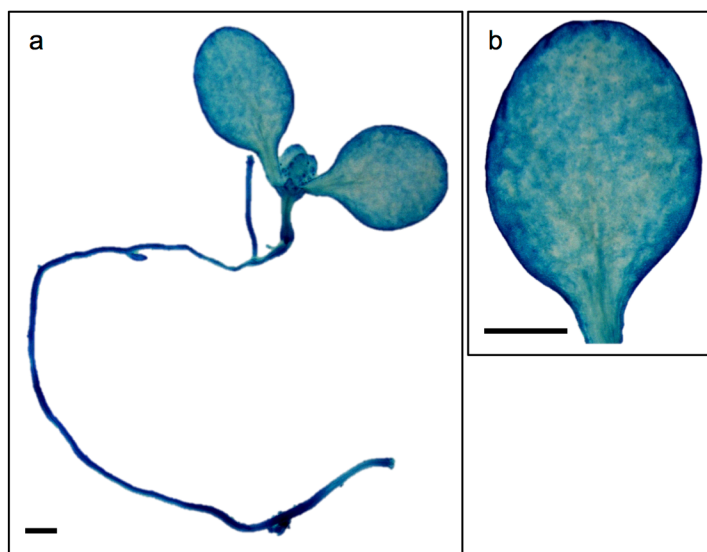


図17. 子葉におけるNAI1の発現パターン.

*ProNAI1:sGFP-GUS*を発現する形質転換シロイヌナズナをGUS染色した。a, 播種後1週間の*ProNAI1:sGFP-GUS*植物体をGUS染色した。子葉と根を含む植物体全体が染色された。b, 播種後1週間の*ProNAI1:sGFP-GUS*植物体の子葉。子葉全体が染色された。Bars = 0.5 mm.

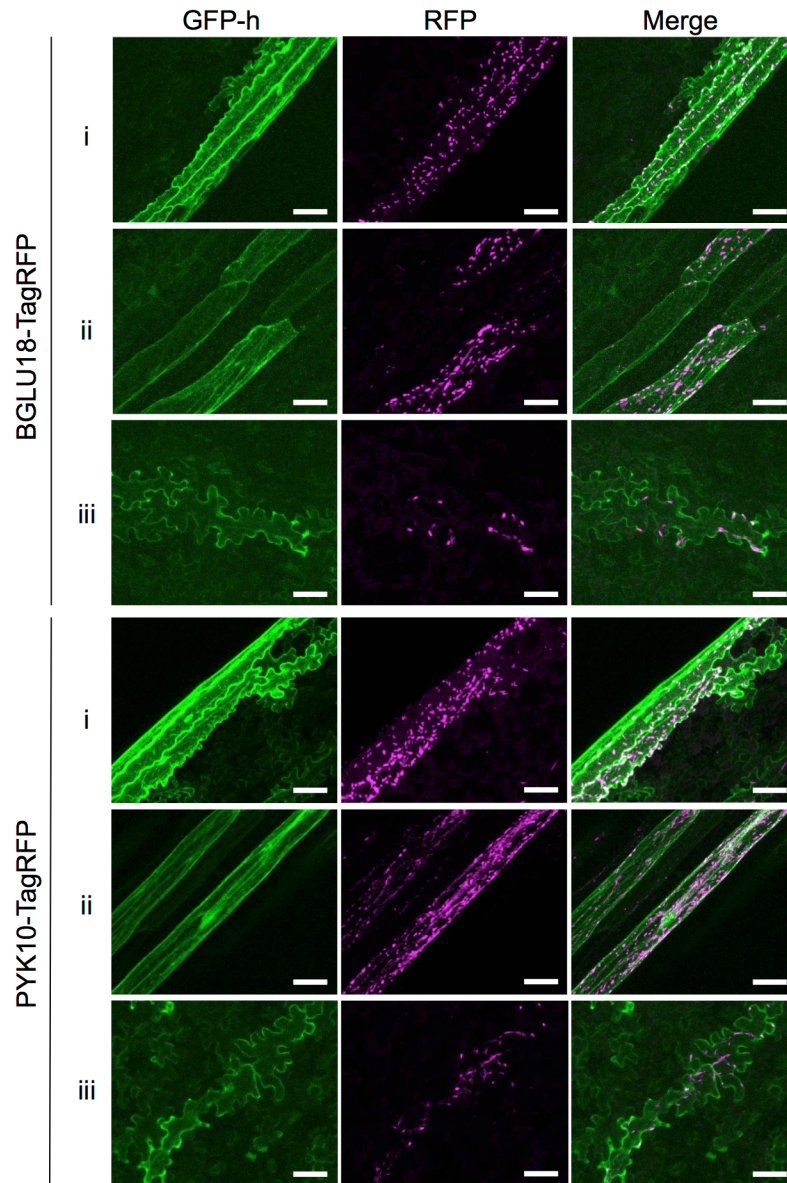


図18. *NAI1*を発現する細胞にはBGLU18とPYK10が蓄積する。

播種後2週間の*ProBGLU18:BGLU18-TagRFP*あるいは*ProPYK10:PYK10-TagRFP*を発現する*ProNAI1:sGFP-GUS*植物体の第1・2葉を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。左端のローマ字はロゼット葉の3種類の表皮細胞 (i, 周縁細胞; ii, 主脈を覆う表皮細胞; iii, 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞) を示す。蛍光顕微鏡写真はImageJ (NIH) のZprojectプログラム処理を用いてZ軸方向に画像スタックを投影して作成した。Bars = 50 μ m.

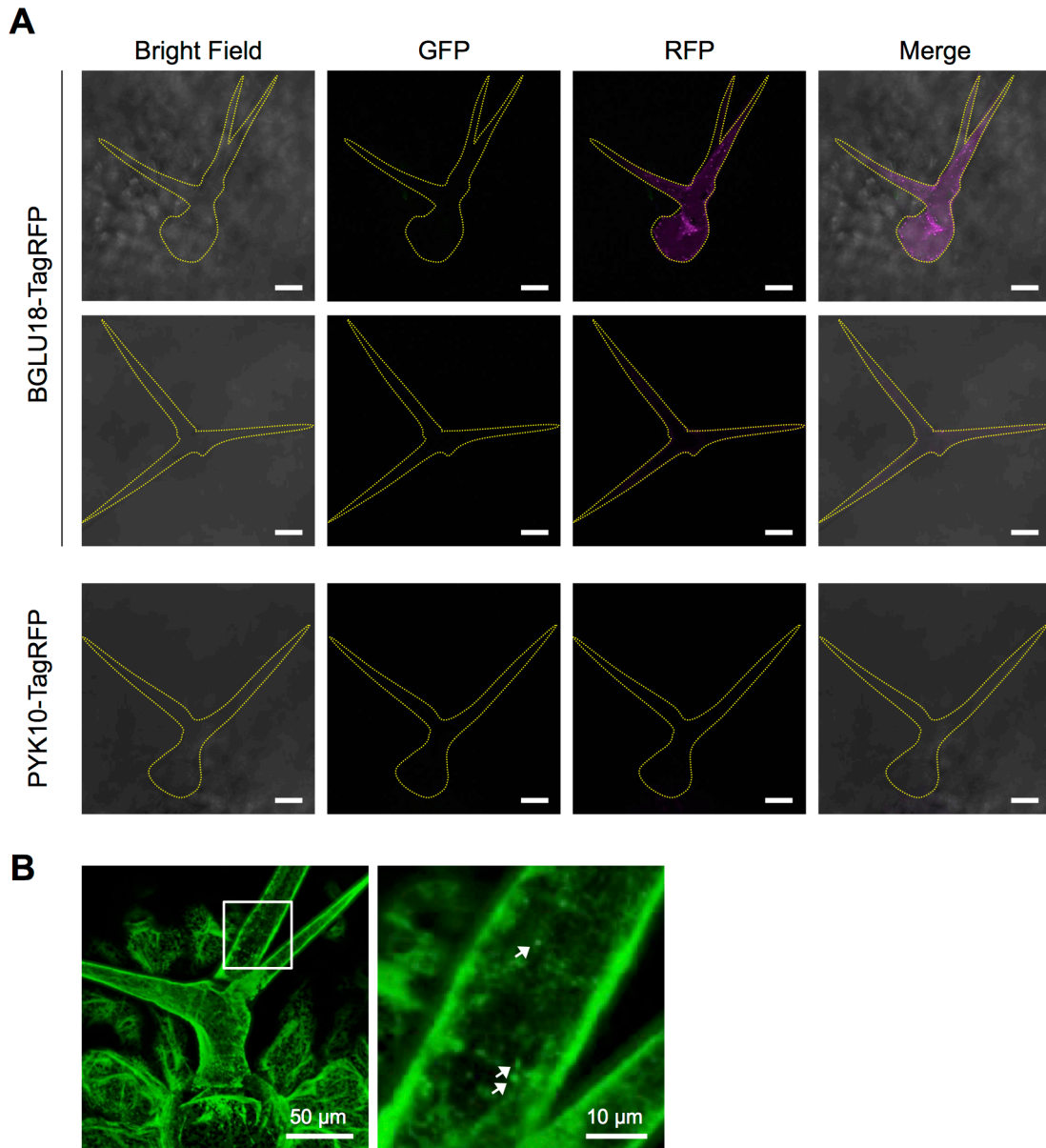


図19. トライコムではL-ER bodyを形成せずNAI1も発現しない一方で、BGLU18が蓄積することがある。

A, 播種後2週間の*ProBGLU18:BGLU18-TagRFP*あるいは*ProPYK10:PYK10-TagRFP*を発現する*ProNAI1:sGFP-GUS*植物体の第1・2葉の表側にあるトライコムを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。BGLU18-TagRFP蛍光の強度にはばらつきがあり、強く検出される場合(上段)と弱い場合(下段)、検出されない場合(データなし)があった。PYK10-TagRFPの蛍光は観察した全てのトライコムで検出されなかった。Bars = 50 μm. B, 播種後2週間のGFP-h植物体のトライコムを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。右の画像は、左の画像の四角で囲まれた領域の拡大図。網目状のERが観察された。まれに矢印で示したERの凝集体が観察されたが、ER bodyは観察されなかった。蛍光顕微鏡写真はImageJ (NIH) のZprojectプログラム処理を用いてZ軸方向に画像スタックを投影して作成した。

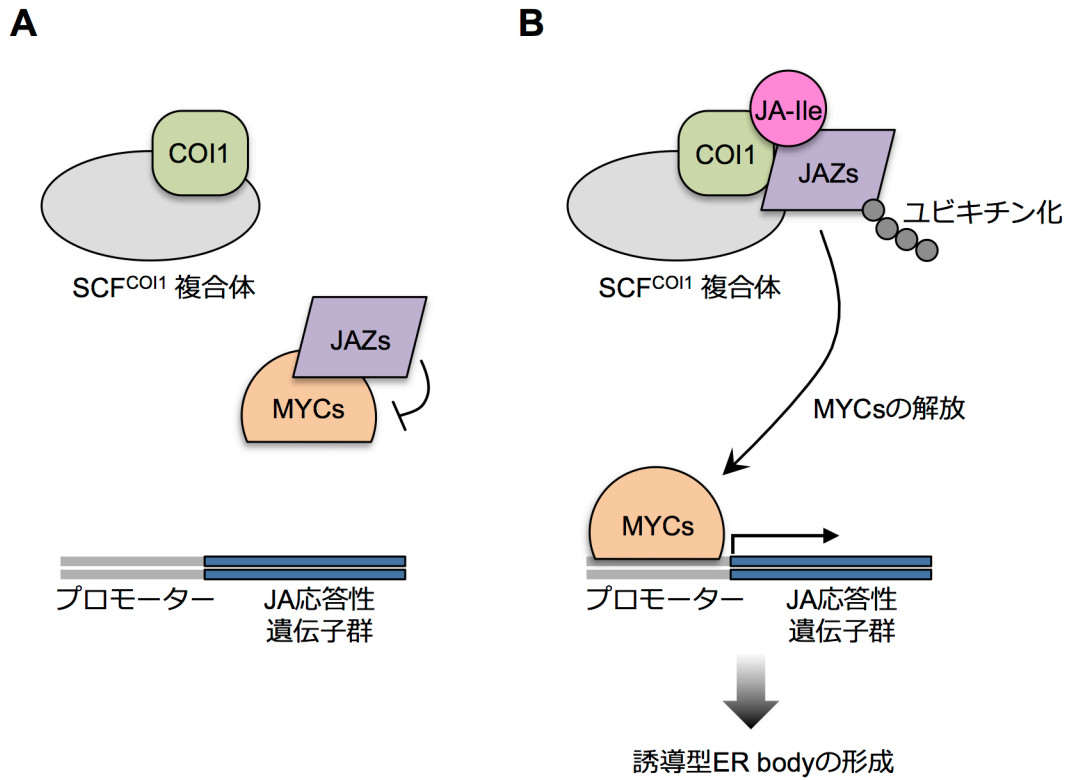


図20. ジャスモン酸シグナル伝達経路の模式図.

A, 平常状態ではMYC転写因子は転写抑制因子であるJAZタンパク質によって抑制されている。B, ジャスモン酸イソロイシン [JA-Ile] が存在すると, JAZタンパク質はCOI1と複合体を形成することで, ジャスモン酸共受容体として機能する。この複合体の形成がきっかけとなりJAZタンパク質のユビキチン化と26Sプロテアソームによる分解が起こる。これにより, MYC転写因子が抑制から解放され, 下流のJA応答性遺伝子群の転写が促進される。誘導型ER bodyはジャスモン酸シグナル伝達経路を介して形成されると考えられているが, その詳細は不明である。

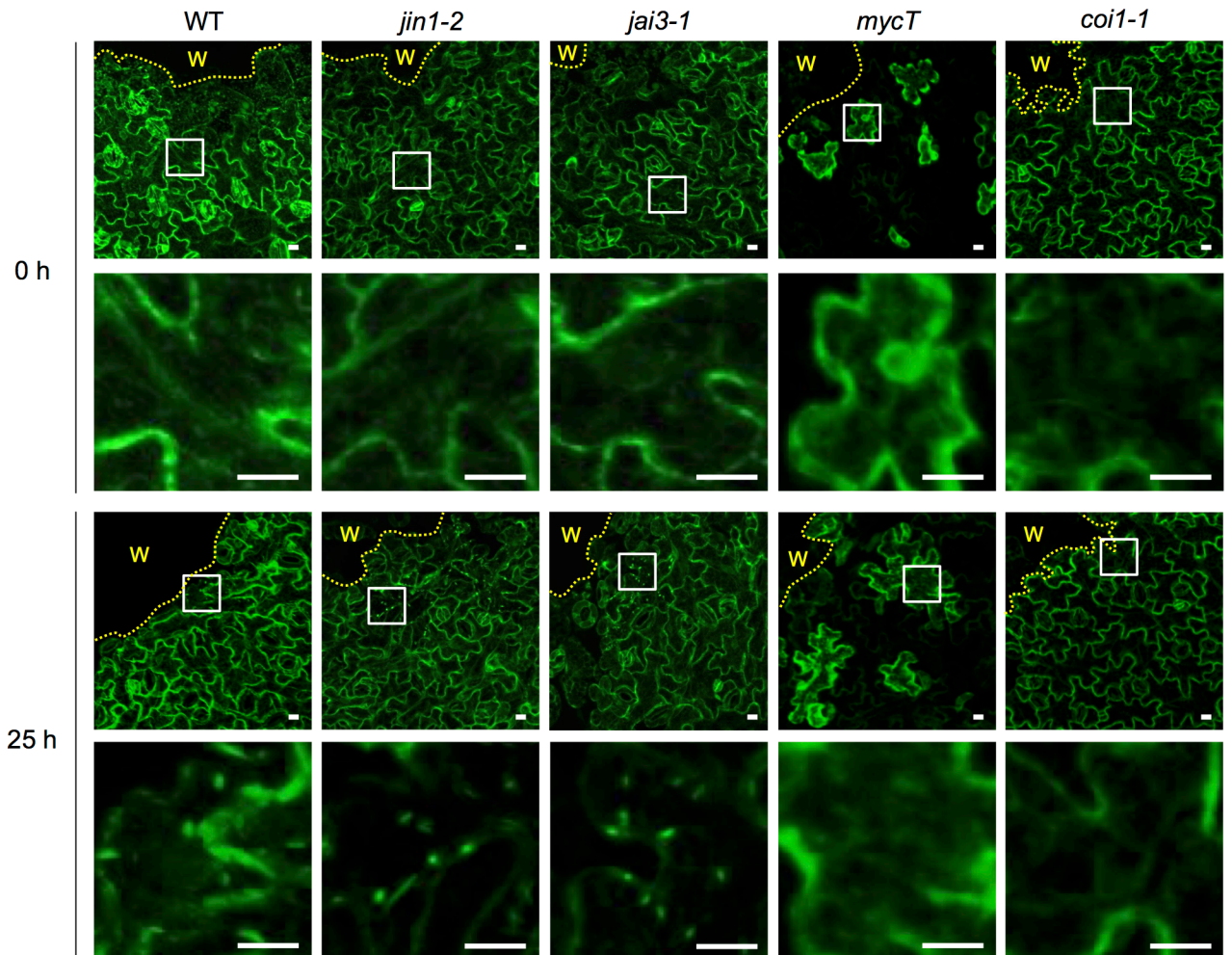


図21. 誘導型ER bodyは*jin1-2*, *jai3-1*変異体では形成される一方で, *mycT*, *coi1-1*変異体では形成されない。

播種後2週間のGFP-hおよび, *Pro35S:SP-GFP-HDEL*を発現するジャスモン酸シグナル伝達経路で働く因子の変異体 (*jin1-2*, *jai3-1*, *mycT*, *coi1-1*変異体) の第1・2葉を用いて, 爪楊枝で穴を開けた直後および25時間後に傷害部位 (W) 周辺における誘導型ER bodyの有無を共焦点レーザー顕微鏡により観察した. 下段は上段の四角で囲んだ部分の拡大図. 画像中の黄色点線で囲まれた領域 (W) が爪楊枝で穴を開けた傷害部位を指す. *mycT*変異体ではGFP蛍光を発する細胞と発しない細胞が混在した. Bars = 10 μ m.

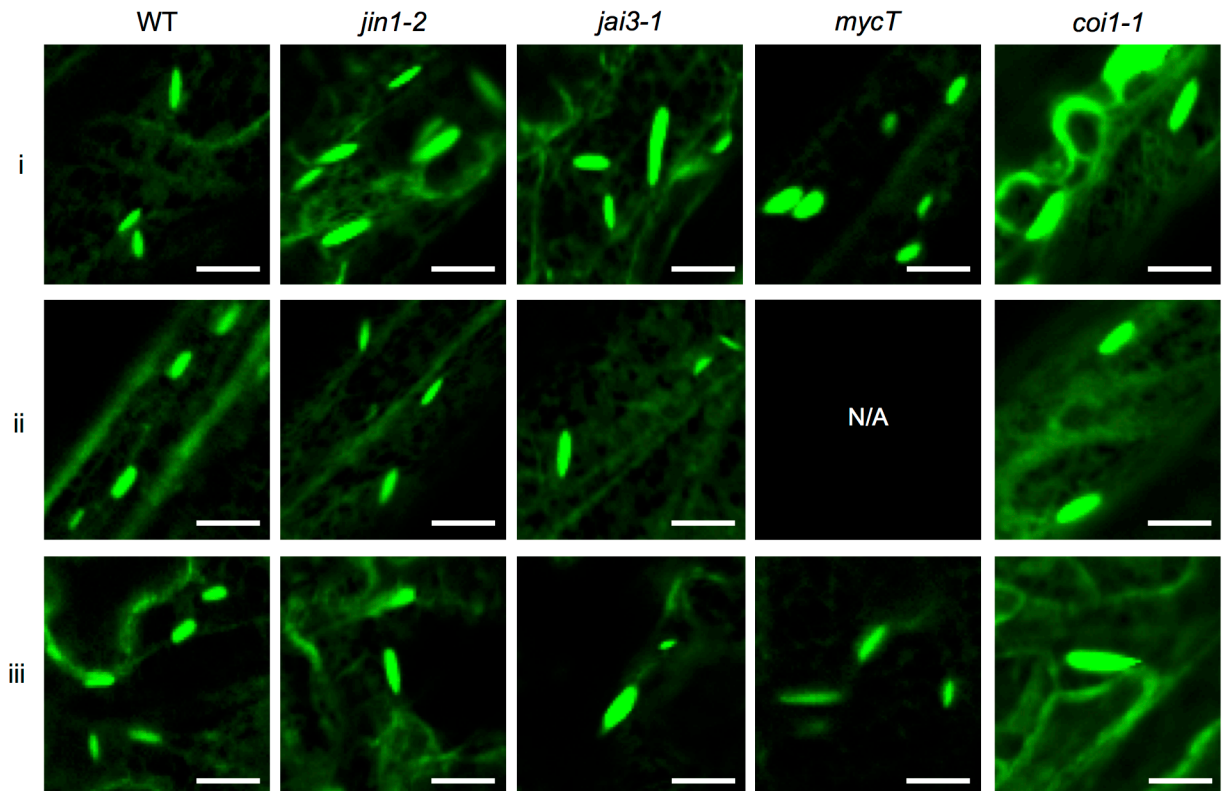


図22. ジャスモン酸シグナル伝達経路関連因子の変異体はL-ER bodyを形成する。

播種後2週間のGFP-hおよび、*Pro35S:SP-GFP-HDEL*を発現するジャスモン酸シグナル伝達経路で働く因子の変異体 (*jin1-2*, *jai3-1*, *mycT*, *coi1-1*変異体) の第1・2葉を用いて、周縁細胞 (i), 主脈を覆う表皮細胞 (ii), 巨大なジグソーパズル型の表皮細胞 (iii) を観察した。図中の「N/A」は、*mycT*変異体ではGFP蛍光を発する細胞と発しない細胞が混在しており、主脈を覆う表皮細胞はすべて蛍光を発しなかったため観察できなかったことを表す。Bars = 10 μ m.

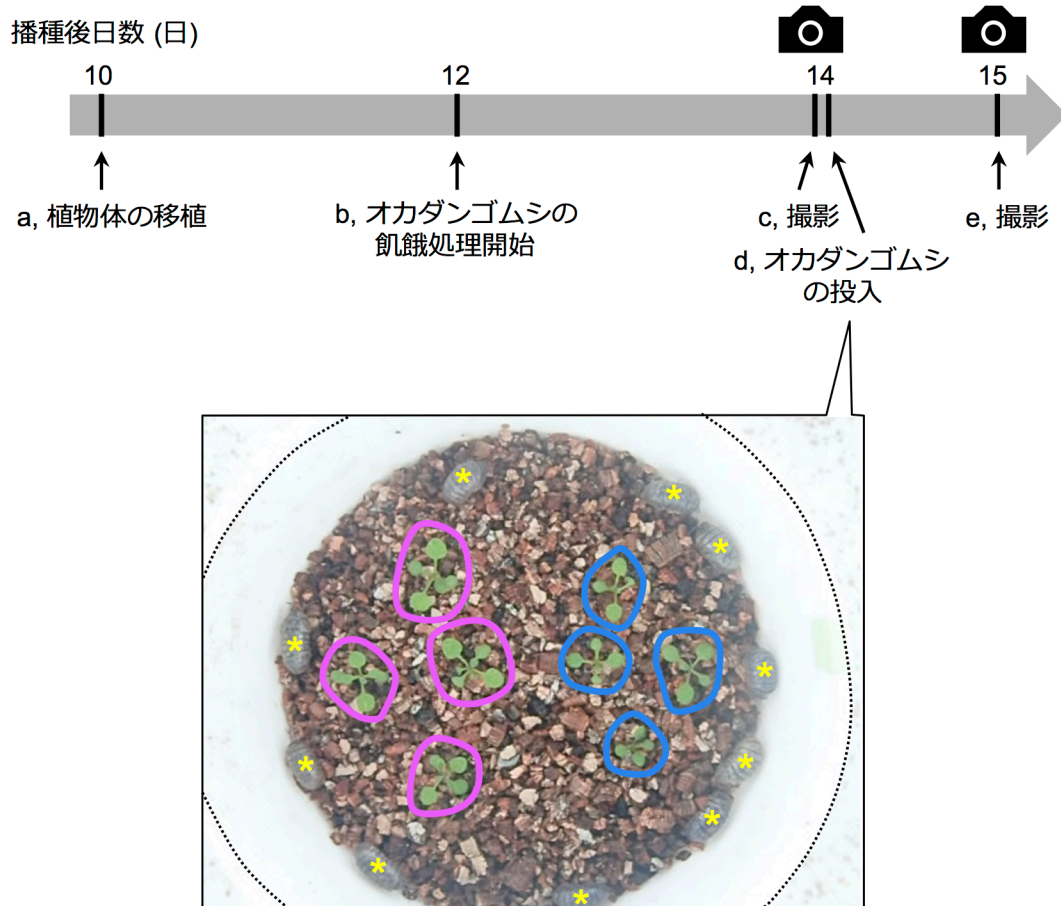
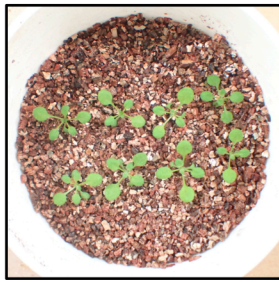


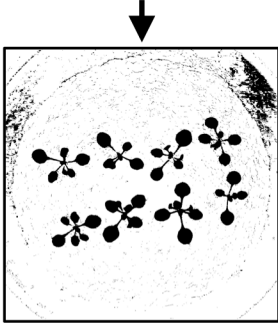
図23. オカダンゴムシを用いた食害実験.

オカダンゴムシを用いた食害実験の手順をまとめた。プレートで播種後10日目まで生育した野生型と変異体を4個体ずつ1つのポットに土植えた (a)。食害実験に供する2日前にオカダンゴムシの飢餓処理を開始した (b)。播種後14日目まで生育した植物体を撮影した (c)。その直後に、1つのポットに飢餓状態のオカダンゴムシを10匹投入した (d)。24時間放置後、植物体を撮影した (e)。写真はオカダンゴムシ投入直後のポットの様子。黄色のアスタリスクはオカダンゴムシを示す。野生型をマゼンタの線で、変異体を青色の線で囲んだ。



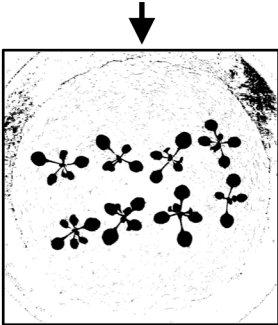
1. 画像を取得する。スケールを設定する。

Analyze > Set Scale...



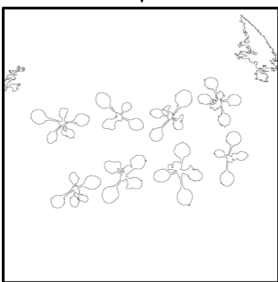
2. 緑色の領域を抽出する。

Image > Adjust > Threshold... > Hue: 45-100,
Saturation: 0-255, Brightness: 0-255 に設定する。
> Threshold color: B&W



3. 8-bit に変換する。

Image > Type > 8-bit



4. 0.1 cm² 以上の黒色領域の面積を測定する。

Analyze > Analyze Particles > Size (cm²): 0.10-
Infinity, Circularity: 0.00-1.00, Show: Bare Outlines
に設定する。

図24. ImageJを用いた葉面積自動定量システム。

食害実験で取得した画像に対してImageJを用いて1-4の処理を行い、葉面積を自動的に定量した。

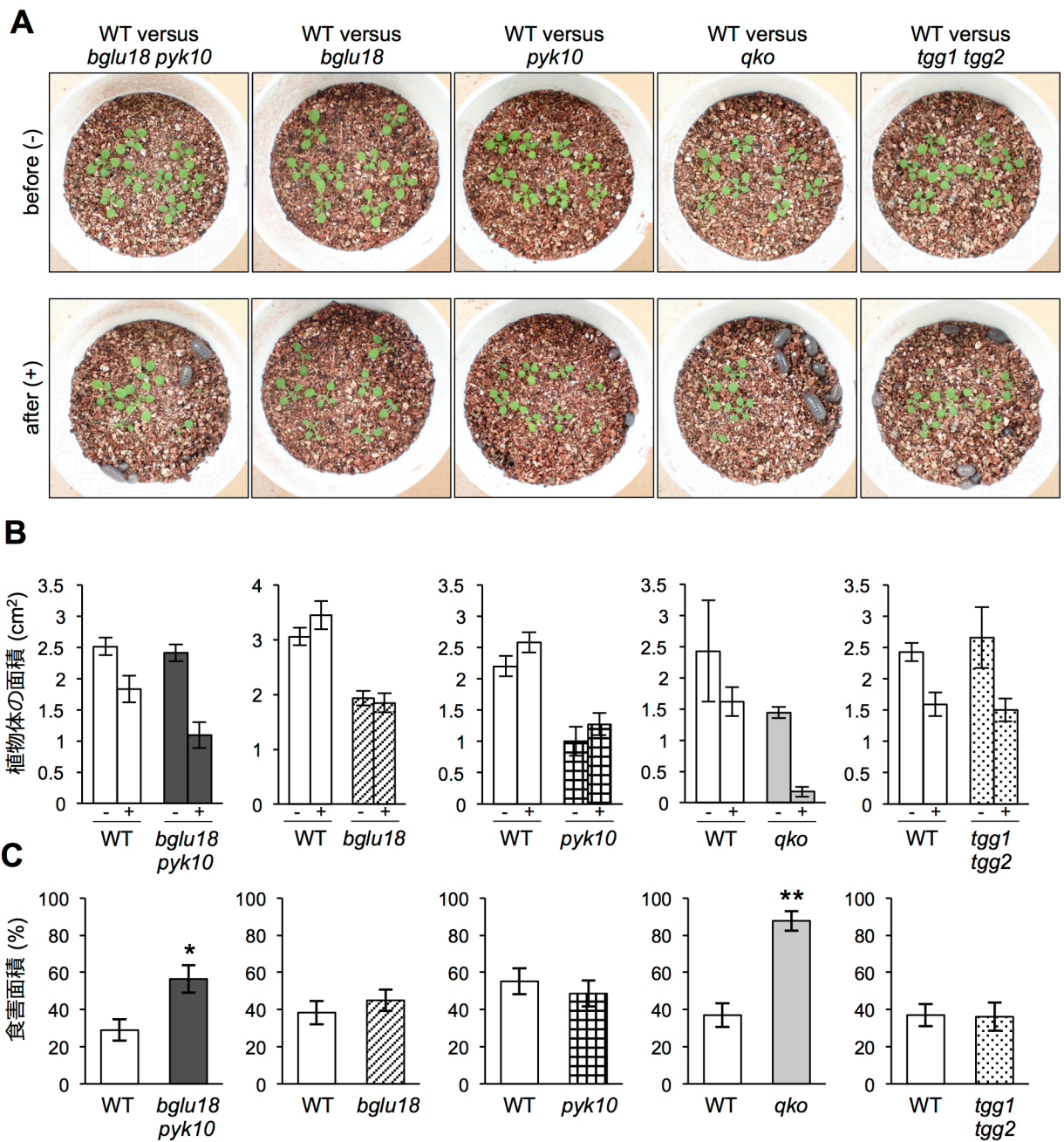


図25. *bglu18 pyk10*二重変異体はオカダンゴムシに食べられやすい。

WTと*bglu18 pyk10*二重変異体, *bglu18*変異体, *pyk10*変異体, *qko*変異体, *tgg1 tgg2*二重変異体をオカダンゴムシを用いた食害実験系に供し, 各変異体の防御能を検証した. A, 野生型と変異体を4個体ずつ1つのポットに土植えし, オカダンゴムシ投入前 (-) と24時間後 (+) に撮影した写真の一例. B, オカダンゴムシ投入前 (-) と24時間後 (+) の植物体の面積. $n = 11$ (WT versus *bglu18 pyk10*), $n = 12$ (WT versus *pyk10*). $n = 13$ (WT versus *bglu18*), $n = 14$ (WT versus *qko*, WT versus *tgg1 tgg2*). C, オカダンゴムシ投入前の植物体の面積のうち食べられた植物体の面積の割合を食害面積 (%) として算出した. 値は平均 \pm 標準誤差を表す. $n = 11$ (WT versus *bglu18 pyk10*), $n = 12$ (WT versus *pyk10*). $n = 13$ (WT versus *bglu18*), $n = 14$ (WT versus *qko*, WT versus *tgg1 tgg2*). Studentの*t*-testを用いて野生型と各変異体間の有意差を調べた. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

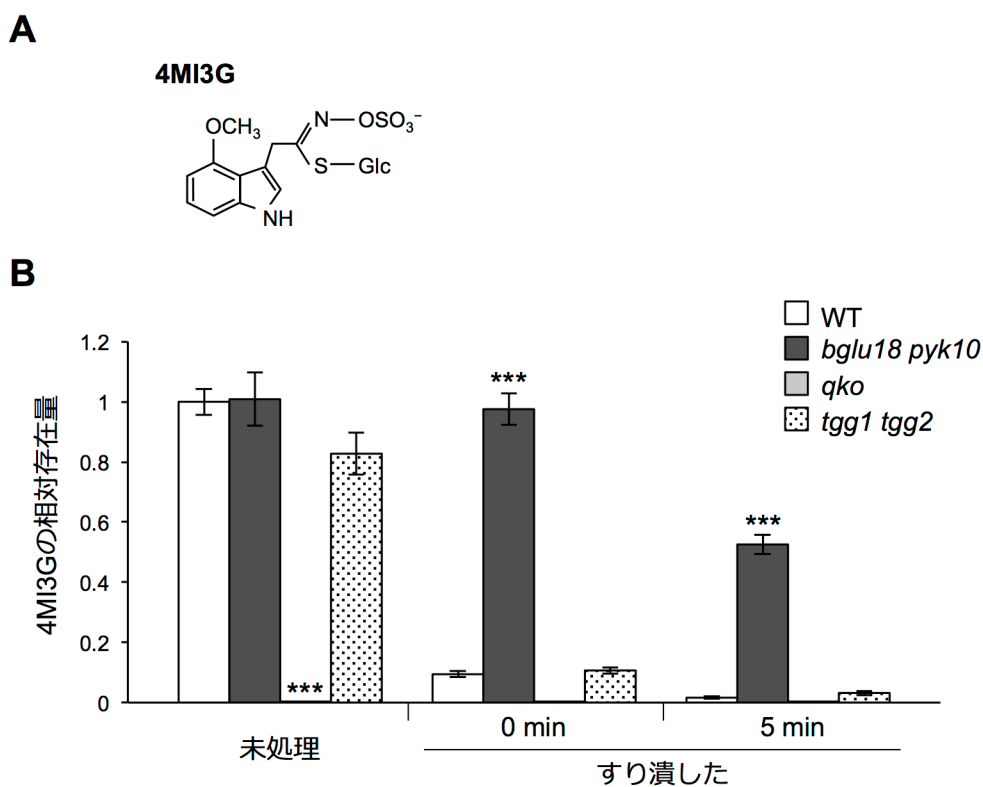


図26. *bglu18 pyk10*二重変異体では4MI3Gの加水分解が抑制される。

播種後2週間の野生型、*bglu18 pyk10*二重変異体、*qko*変異体、*tgg1 tgg2*二重変異体の地上部における4MI3Gの相対量をLC-MSを用いて解析した。地上部組織を未処理，すり潰し直後（0 min），すり潰し後5分放置（5 min）の3つの条件で回収し，抽出したグルコシノレートを解析に用いた。A，4-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate（4MI3G）の構造式。B，縦軸は未処理の野生型における4MI3Gの存在量を1としたときの相対存在量を表す。相対存在量の値は平均 ± 標準誤差を示す。Dunnett検定を用いて，各条件における野生型と各変異体を比較して有意差を調べた。*** $p < 0.001$ 。n = 6-8。

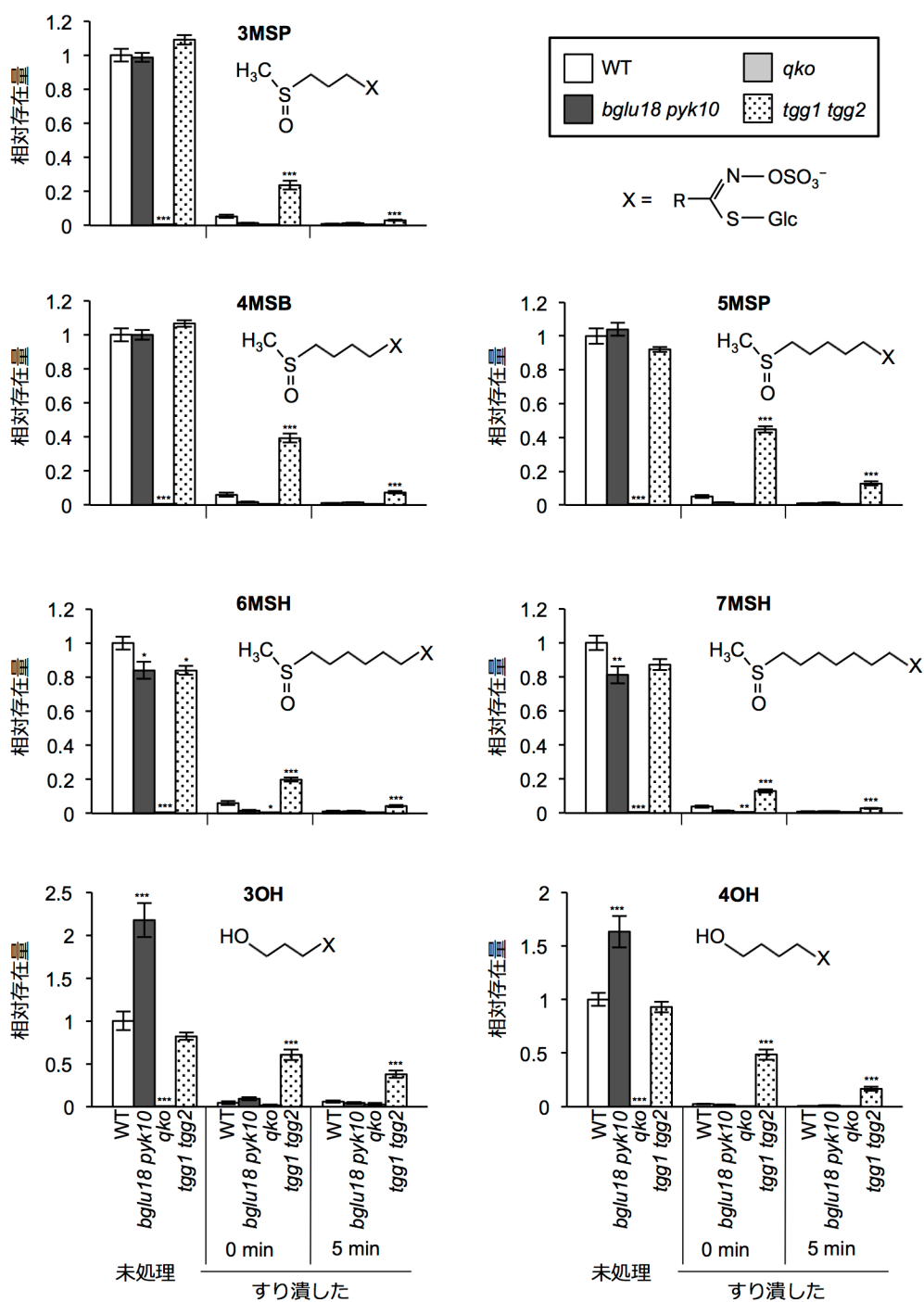


図27-1. 脂肪酸グルコシノレートの加水分解.

播種後2週間の野生型, *bglu18 pyk10*二重変異体, *qko*変異体, *tgg1 tgg2*二重変異体の地上部における脂肪酸グルコシノレートの相対量をLC-MSを用いて解析した. 地上部組織を, 未処理, すり潰し直後 (0 min), すり潰し後5分放置 (5 min) の3つの条件で回収し, 抽出したグルコシノレートを解析に用いた. グルコシノレートの基本構造を右上に示す. 各グルコシノレートの略称とR鎖の構造式をそれぞれのグラフの上に記載した. 各グルコシノレートの正式名称は表1にまとめた. 縦軸は未処理の野生型における各グルコシノレートの存在量を1としたときの相対存在量. 相対存在量の値は平均 ± 標準誤差を示す. Dunnett検定を用いて, 各条件における野生型と各変異体を比較して有意差を調べた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 6-8$.

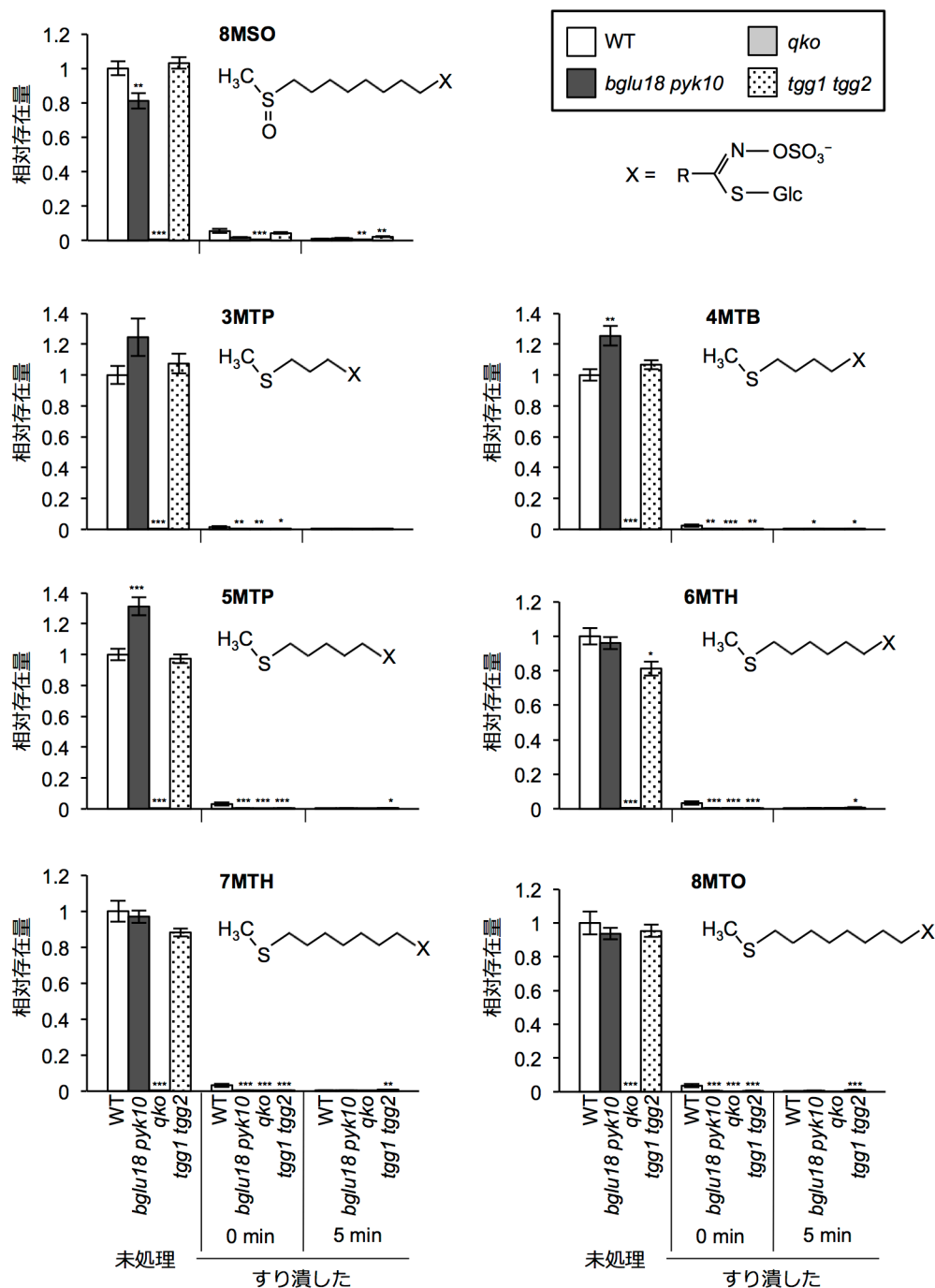


図27-2. 脂肪酸グルコシノレートの加水分解 (続き).

播種後2週間の野生型, *bglu18 pyk10*二重変異体, *qko*変異体, *tgg1 tgg2*二重変異体の地上部における脂肪酸グルコシノレートの相対量をLC-MSを用いて解析した. 地上部組織を, 未処理, すり潰し直後 (0 min), すり潰し後5分放置 (5 min) の3つの条件で回収し, 抽出したグルコシノレートを解析に用いた. グルコシノレートの基本構造を右上に示す. 各グルコシノレートの略称とR鎖の構造式をそれぞれのグラフの上に記載した. 各グルコシノレートの正式名称は表1にまとめた. 縦軸は未処理の野生型における各グルコシノレートの存在量を1としたときの相対存在量. 相対存在量の値は平均 ± 標準誤差を示す. Dunnett検定を用いて, 各条件における野生型と各変異体を比較して有意差を調べた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 6-8$.

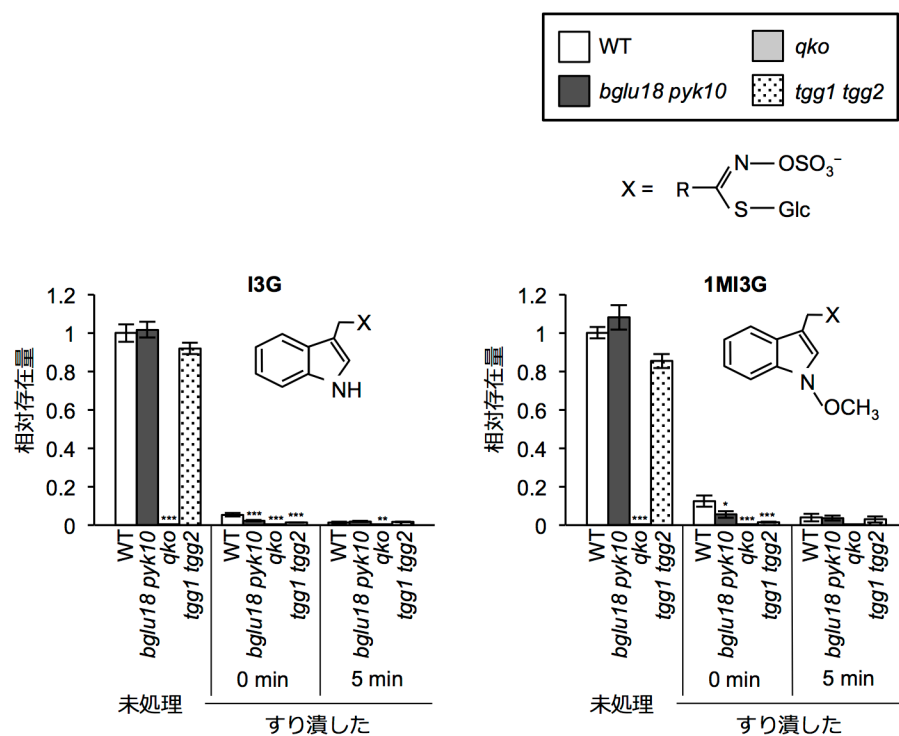


図28. インドールグルコシノレートの加水分解.

播種後2週間の野生型, *bglu18 pyk10*二重変異体, *qko*変異体, *tgg1 tgg2*二重変異体の地上部におけるインドールグルコシノレートの相対量をLC-MSを用いて解析した. 地上部組織を, 未処理, すり潰し直後 (0 min), すり潰し後5分放置 (5 min) の3つの条件で回収し, 抽出したグルコシノレートを解析に用いた. グルコシノレートの基本構造を右上に示す. 各グルコシノレートの略称とR鎖の構造式をそれぞれのグラフの上に記載した. 各グルコシノレートの正式名称は表1にまとめた. 縦軸は未処理の野生型における各グルコシノレートの存在量を1としたときの相対存在量. 相対存在量の値は平均 ± 標準誤差を示す. Dunnett検定を用いて, 各条件における野生型と各変異体を比較して有意差を調べた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 6-8$.

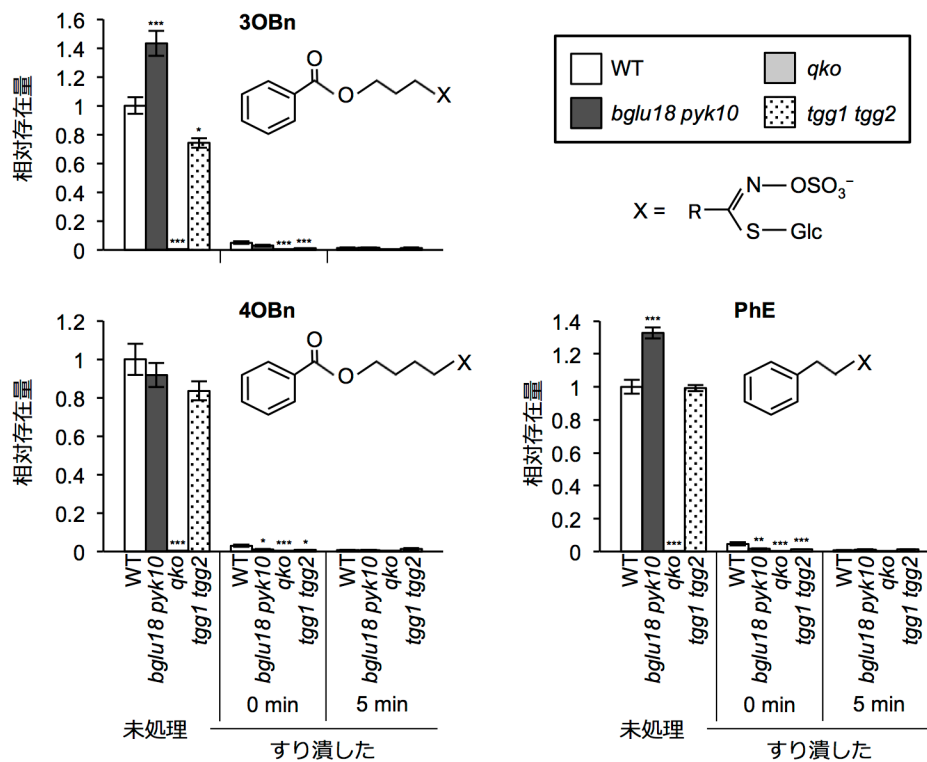


図29. 芳香族グルコシノレートの加水分解.

播種後2週間の野生型, *bglu18 pyk10*二重変異体, *qko*変異体, *tgg1 tgg2*二重変異体の地上部における芳香族グルコシノレートの相対量をLC-MSを用いて解析した. 地上部組織を, 未処理, すり潰し直後 (0 min), すり潰し後5分放置 (5 min) の3つの条件で回収し, 抽出したグルコシノレートを解析に用いた. グルコシノレートの基本構造を右上に示す. 各グルコシノレートの略称とR鎖の構造式をそれぞれのグラフの上に記載した. 各グルコシノレートの正式名称は表1にまとめた. 縦軸は未処理の野生型における各グルコシノレートの存在量を1としたときの相対存在量. 相対存在量の値は平均 ± 標準誤差を示す. Dunnett検定を用いて, 各条件における野生型と各変異体を比較して有意差を調べた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 6-8$.

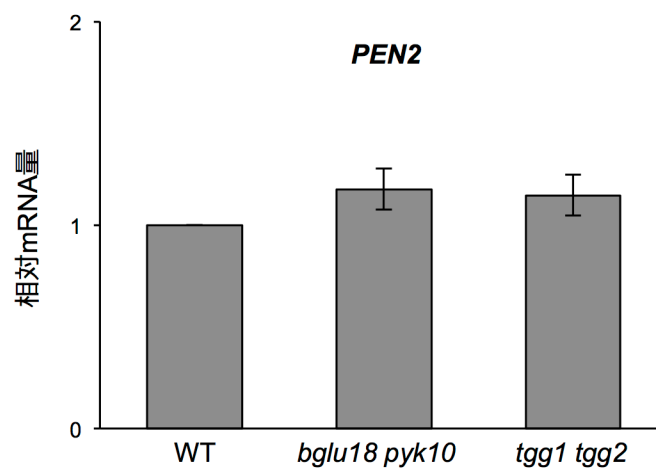


図30. *bglu18 pyk10*変異体における*PEN2*遺伝子の発現は野生型と同程度である。

*bglu18 pyk10*二重変異体、*tgg1 tgg2*二重変異体における*PEN2*遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより解析した。縦軸は野生型の*PEN2*遺伝子のmRNA量を1としたときの相対mRNA量を表す。播種後2週間の各植物体の第1・2葉から抽出したmRNAを逆転写してcDNAを合成して解析に用いた。相対mRNA量の値は平均 ± 標準誤差を表す。Studentの*t*-testを用いて野生型と各変異体間の有意差を調べた結果、*PEN2*遺伝子のmRNA量は各変異体で野生型と有意差はなかった ($p > 0.05$). $n = 3$.

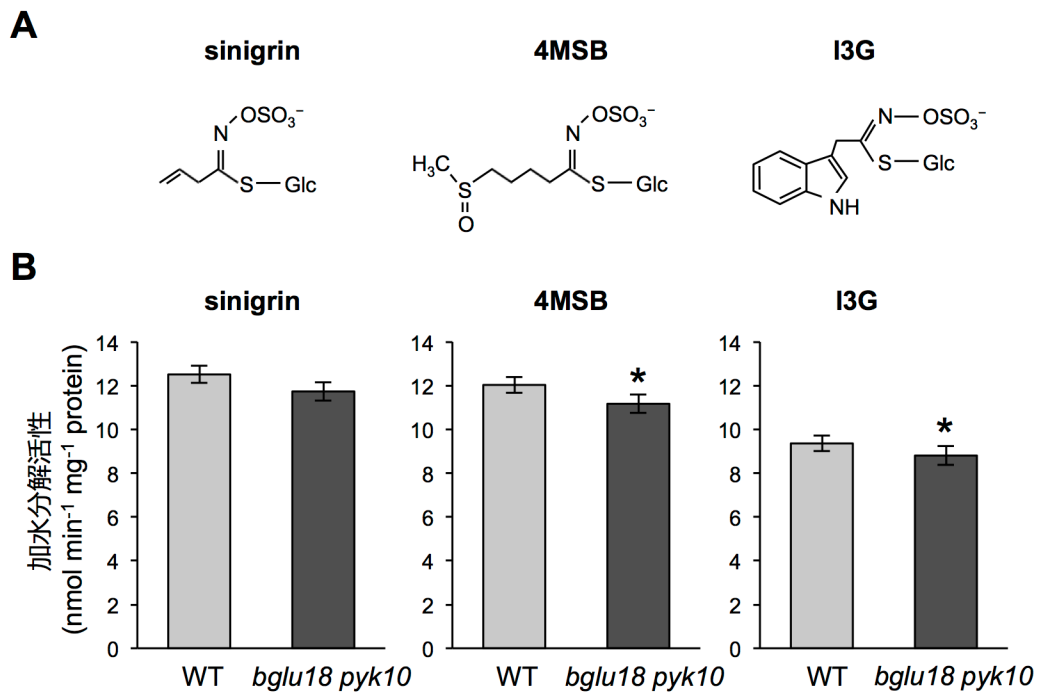


図31. *bglu18 pyk10*二重変異体における加水分解活性の測定.

野生型と*bglu18 pyk10*二重変異体の地上部から抽出したタンパク質のsinigrin, 4MSB, I3Gに対する加水分解活性を測定した。A, 各グルコシノレート構造式。B, 値は平均 ± 標準誤差を表す。有意差検定にはStudentの *t*-testを用いた (**p* < 0.05). *n* = 3.

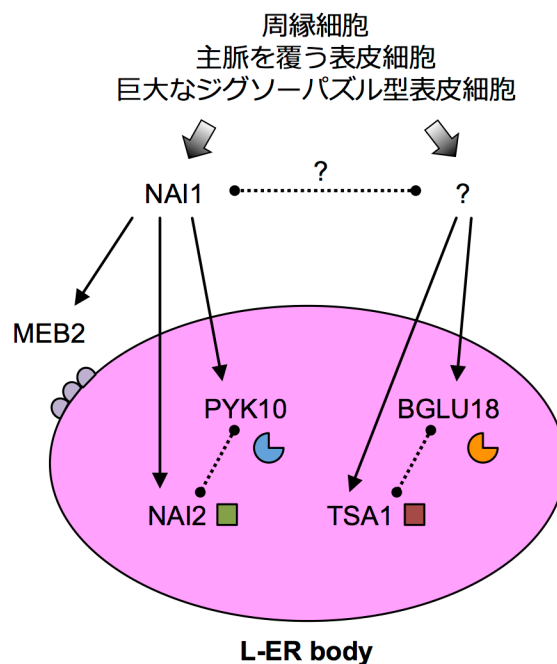


図32. L-ER bodyの形成機構モデル.

L-ER bodyにはPYK10とBGLU18が蓄積する。シロイヌナズナのロゼット葉において、NAI1は周縁細胞、主脈を覆う表皮細胞、巨大なジグソーパズル型の表皮細胞で発現する。NAI1はPYK10やNAI2、MEB2の遺伝子発現を制御する。BGLU18の発現を制御する未知の転写因子が想定される。この未知の転写因子をコードする遺伝子はNAI1と同様に周縁細胞、主脈を覆う表皮細胞、巨大なジグソーパズル型の表皮細胞に発現し、未知の転写因子とNAI1が相互作用することで、1つのL-ER bodyにPYK10とBGLU18を蓄積させているのかもしれない。PYK10とBGLU18はそれぞれNAI2、TSA1と相互作用してL-ER bodyの形成に関与する可能性がある。

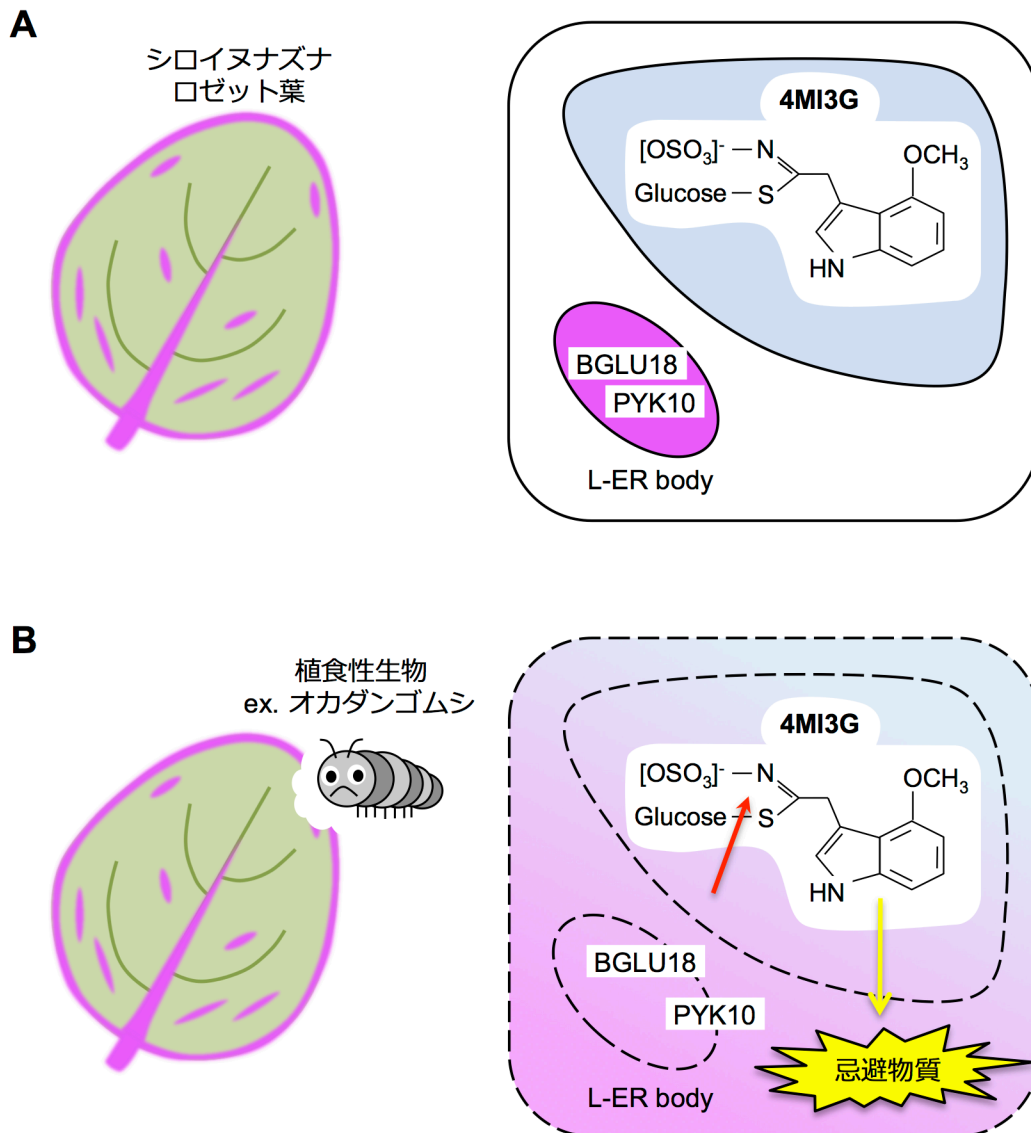


図33. L-ER bodyによるグルコシノレート-ミロシナーゼ系のモデル。

A, 無傷の状態のシロイヌナズナのロゼット葉におけるL-ER body形成細胞では, BGLU18およびPYK10をL-ER body内に4MI3Gを液胞内に蓄積する。B, 植食性生物による食害を受けて細胞が崩壊すると, BGLU18およびPYK10がER body内から, 4MI3Gが液胞内からそれぞれ流出して混ざり合う。BGLU18およびPYK10あるいはそのどちらかによって4MI3Gのグルコシド結合が切断され, その加水分解産物が植食性生物に対する食害抑止効果を発揮する。

表1. 本研究で解析したグルコシノレート.

グループ	No.	グルコシノレート (略称)	通称名
脂肪族 GLS	1	3-Methylsulfinyl-n-propyl GLS (3MSP)	Glucoiberin
	2	4-Methylsulfinyl-n-butyl GLS (4MSB)	Glucoraphanin
	3	5-Methylsulfinyl-n-pentyl GLS (5MSP)	Glucoalyssin
	4	6-Methylsulfinyl-n-hexyl GLS (6MSH)	Glucohesperin
	5	7-Methylsulfinyl-n-heptyl GLS (7MSH)	Glucoibarin
	6	3-Hydroxy-n-propyl GLS (3OH)	なし
	7	4-Hydroxy-n-butyl GLS (4OH)	なし
	8	8-Methylsulfinyl-n-octyl GLS (8MSO)	Glucohirsutin
	9	3-Methylthio-n-propyl GLS (3MTP)	Glucoiberverin
	10	4-Methylthio-n-butyl GLS (4MTB)	Glucoerucin
	11	5-Methylthio-n-pentyl GLS (5MTP)	Glucoberteroin
	12	6-Methylthio-n-hexyl GLS (6MTH)	Glucolesquerellin
	13	7-Methylthio-n-heptyl GLS (7MTH)	なし
	14	8-Methylthio-n-octyl GLS (8MTO)	なし
	15	2-Propenyl	sinigrin, allyl glucosinolate
インドール GLS	16	Indol-3-ylmethyl GLS (I3G)	Glucobrassicin
	17	1-Methoxyindol-3-ylmethyl GLS (1MI3G)	Neoglucobrassicin
	18	4-Methoxyindol-3-ylmethyl GLS (4MI3G)	4-Methoxyglucobrassicin
芳香族 GLS	19	3-Benzoyloxy-n-propyl GLS (3OBn)	Glucomalcomiin
	20	4-Benzoyloxy-n-butyl GLS (4OBn)	なし
	21	Phenylethyl GLS (PhE)	Gluconasturtiin, phenethyl

表2. 形質転換植物体の作成に用いたプライマー.

Name	Sequence (5' > 3')	Note
if_ProAt1g52400_F	GGAACCAATTCAGTCGACACAATTAACATATAAT	For cloning of ProBGLU18:B GLU18
if_At1g52400(Stop-)_R	GAAAGCTGGGTCTAGATATCTGAGTTCTTCCCTCAGC	
if_ProAt3g09260_F	GGAACCAATTCAGTCGACCGAGAAAATAATTCG	For cloning of ProPYK10:PYK 10
if_At3g09260(Stop-)_R	GAAAGCTGGGTCTAGATATCTAAGCTCATCCTTCTTG	
pGWB659_GGSG-HDEL-Stop_F	GGAGGCTCAGGTCATGACGAGCTGTAAGCTTAGAGC TCGAATTTCCC	For modifying pGWB659 vector
pGWB659_GGSG-HDEL-Stop_R	TTACAGCTCGTCATGACCTGAGCCTCCTCAATTAAGTT TGTGCCCA	
pENTR1A_modF1	GAGATATCGACCCAGCTTTCTTGTAC	For modifying pENTR1A vector
pENTR1A_modR1	GCTGGGTCGATATCTCGAGTGCGGCC	
pENTR1Axe-ProNAI1_3k_F1	GGAACCGTAAGGAGTAACATGGAGGGTGGAG	For cloning of the NAI1 promoter
ProNAI1-sGFP_R1	CTTGCTCACCATTACAAGAACTCTTTTCTC	
ProNAI1-sGFP_F1	AGAGTTCTTGTAAATGGTGAGCAAGGGCGAG	For cloning of sGFP
mCherry-GGSG_R1	CATTCCAGATCCTCCCTTGACAGCTCGTCC	
GGSG-GUS_F1	GGAGGATCTGGAATGTTACGTCCTGTAGAAACC	For cloning of GUS
GUS-TerNAI1_R1	TTTTTTAAATATCATTGTTGCTCCCTGC	
GUS-TerNAI1_F1	GGCAAACAATGATATTTTAAAAACGTTTATG	For cloning the NAI1 terminator
TerNAI1-pENTR1Axe_R1	GAAAGCTGGGTGATGTGGGTCACAATTGTGTC	

表3. RT-PCRおよびリアルタイムPCRに用いたプライマー.

Name	Sequence (5' > 3')	Gene	Amplicon length (bp)
qRT_BGLU18_f01	GCAAAGTGGGAGTCCAATTCTACCA	At1g52400	144 (exon5-exon6)
qRT_BGLU18_r01	GCACGATGCGACCACTTAAGAAAC		
qRT_BGLU19_f01	GGTTTGAACCCGAAGATGTG	At3g21370	157 (exon8-exon9)
qRT_BGLU19_r01	TGGGCTTTGGTAAATCTTGCAAC		
qRT_BGLU20_f01	CAAGGTATGTGGATAAATCAATGCT	At1g75940	172 (exon10-exon12)
qRT_BGLU20_r01	GTGTCTTGCTCACCTAGATCCTCT		
qRT_BGLU21_f01	GATGATCCTGTTTGCCCGG	At1g66270	116 (exon1-exon2)
qRT_BGLU21_r01	CAAGTTTCATTAATGCACCTTCG		
qRT_BGLU22_f01	GTCGTCTCTTCGACAATAGCCG	At1g66280	140 (exon1-exon2)
qRT_BGLU22_r01	CAAGTTTCATTAATGCACCTTCA		
qRT_BGLU23_f01	AGAGGTGCAATAACGATAACGG	At3g09260	124 (exon3-exon4)
qRT_BGLU23_r01	ATTCTTGCCATGCGATAGACATTC		
qRT_BGLU24_f01	GGTCCGCTGGTAAATGCCGATG	At5g28510	158 (exon1-exon2)
qRT_BGLU24_r01	CATACGGATGGTCCACGA		
rt_BGLU25_f01	ATGGCACTCAAAGCGATTCTCTTTTTG G	At3g03640	1596 (exon1-exon13)
rt_BGLU25_r01	TTATAACTCTTTCCTTGAATCCGAATCT AC		
RT_NAI1_F03	TTTGGCTGAACGAAAACGTC	At2g22770	152 (exon1-exon2)
RT_NAI1_R03	CCAGCTTCTTTACCCGCTCTT		
RT_NAI2_F01	TGCAAAGAATCCATCAACCA	At3g15950	214 (exon25-exon28)
RT_NAI2_R01	GAGCCGAGAGGTCCCTGAGCC		
RT_MEB1_F01	CCTCGATGTTTTGCTTGGT	At4g27860	174 (exon3)
RT_MEB1_R01	AGAGAAGCAACACCGCAGAT		
RT_MEB2_F01	GGAGAAAGATTCGCCATTGA	At5g24290	174 (exon4-exon5)
RT_MEB2_R01	GTTTTGAGCGAGGACGATGAGC		
RT_TSA1_F01	TTCAAGGCAAGGACGATGAA	At1g52410	159 (exon3-exon5)
RT_TSA1_R01	CCAACAGACTCGAACGTCCA		
seq_PEN2_middle02.5	GCGTGTGGGATCATTCTCC	At2g44490	242 (exon3-exon5)
seq_PEN2_middle03.5_R	GGCTAAGAGTTCATCAATAACATC		
ACT2_F	AGAGATTCAGATGCCAGAAGTCTTG TTCC	At3g18780	353 (exon2-exon3)
ACT2_R	AACGATTCCTGGACCTGCCTCATCA		
ACT2_realF	TATGTCGCCATCCAAGCTGT	At3g18780	159 (exon1-exon2)
ACT2_realR	AAGGTCACGTCCAGCAAGGT		