

研究紹介

植物免疫プライミング剤の単離と作用機序解明

能年義輝

(応用植物科学コース)

Isolation and characterization of plant immune-priming chemicals

Yoshiteru Noutoshi

(Course of Applied Plant Science)

Plant disease resistance inducers, so-called plant activators, are agrochemicals that protect crops from pathogens. They confer long-lasting resistance against a broad range of diseases by activating their immune system. Since plant activators impinge on host plants, unlike commonly-used pesticides which directly target pathogens, no drug-resistant microbes for plant activators have been found so far in the field. They originated from probenazole (Oryzemat[®]) and have been widely used over 30 years for the protection of paddy-field rice from blast fungus and bacterial leaf blight in East Asia. In spite of the advantages of plant activators, their application is still limited. The lack of both knowledge about their modes of action and an appropriate high-throughput screening system restrict the isolation of novel compounds. We established a high-throughput chemical screening procedure to identify plant immune-priming compounds which increase but do not directly induce immune responses in *Arabidopsis* suspension cells upon infection of the bacterial pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*. From the screening of a commercially available chemical library of 10,000 diverse small organic molecules, we identified seven compounds that prime the immune response and we designated them 'imprimatins' for immune-priming chemicals. The isolated compound, imprimatin C1 activates the expression of defense-related genes independent of pathogen and functions as a weak analog of salicylic acid (SA). Those originally-isolated three compounds and their four derivatives were classified into two groups with distinct molecular structures and they were named imprimatins A and B. We found that they conferred disease resistance in plants by inhibiting both a known and a previously unknown SA glucosyltransferase (SAGT). Imprimatins and their targets are useful for the development of practical plant activators and also their modes of action might give a clue for novel crop protection technology.

Key words : plant disease resistance, plant immunity, disease resistance inducer, plant activator, chemical biology

緒言

2011年のノーベル生理学・医学賞は自然免疫の活性化に関する発見に贈られた。高等植物も動物の自然免疫系に類似した防御機構を持っており、自然界に存在する多種多様な微生物やウイルスなどからの日和見感染を防いでいる^{1,2)}。しかしこれらの一部は動植物の自然免疫系を抑制する武器を備えており、宿主への感染を成し遂げて増殖して病徴を引き起こす³⁾。

動的な免疫細胞や抗体といった獲得免疫を持たない植物は、これらの病原性微生物に対して独自の仕組みで対抗する⁴⁾。植物は病原体が宿主免疫系をかく乱するため放出するエフェクタータンパク質やその振る舞いを免疫受容体によって特異的に感知し、免疫応答を司る内生の植物ホルモンであるサリチル酸 (SA) の生合成を誘導する。その後、感染細胞は急速なプログラム細胞死を引き起こして病原体を感染部位に封じ込め、さらにその周囲や全身において抗菌物質を合成・蓄積することによって感染拡大を防ぎ、抵抗性が発揮される。耐病性は農業上の重要形質として世界中で研究が進められてきたが、SA 合成が活性化される仕組み、SA 代謝系、SA シグナル伝達系には未解明な点も多い。

そこで我々は従来型の研究アプローチを補うケミカルバイオロジー手法を導入した研究を展開してきた。まず、植物免疫応答の1つであるプログラム細胞死を指標とした植物免疫かく乱剤のハイスループットスクリーニング系を確立し、化合物ライブラリーの探索から様々な生理活性物質を単離してきた。特に植物免疫を活性化する薬剤は病害抵抗性誘導剤(プラントアクチベーター)と呼ばれる植物保護剤としての応用展開が期待されるため⁵⁾、それらに焦点を絞って研究を進めてきた。結果として、我々は単離した植物免疫活性化剤を研究ツールとして利用する形で病害感染時に働くSA代謝系の詳細を明らかにすることができた。これは植物免疫機構に関する基礎的知見の発見に留まらず、新剤開発や薬剤作用を利用したこれまでにない植物保護手法を開発するための指針となる。

ケミカルバイオロジー手法とは

ケミカルバイオロジーは有機化学と生物学の融合から生まれた学際的研究手法で、ケミカルツールや生理活性物質を用いて生命現象を解明・操作しようとする方法論である⁶⁾。タンパク質・核酸・代謝物質といった生体を構成する成分は有機化合物であり、化学合成による新た

な機能分子の創成，新規生体機能の付加，生体反応をモニターできるツールの開発研究などが盛んに行われている。抗生物質や内生ホルモンの働きとして自明のように低分子化合物はタンパク質に結合することでその機能を変換しうするため，生理活性物質を利用した生命現象の解明・制御・改変・利用などの研究も含まれる。特に生物学者にとってケミカルバイオロジーは分子遺伝学に代わる研究手法として大きく位置づけられる。遺伝学的手法では解析対象となる生命現象をかく乱するDNAの変異を探索することによって関連遺伝子群を同定するのに対し，ケミカルバイオロジー手法では生命現象をかく乱する生理活性物質を探索することによって関連タンパク質群を同定する。化合物は機能重複した類似タンパク質群を同時に機能抑制しうるポテンシャルがあり，また濃度や生育ステージを変えて作用させることによって遺伝子の致死性を回避することができる。つまり，遺伝学的手法では得られなかった新たな遺伝子や生命現象の発見が期待される。

この手法を用いるには各人が研究対象とする生命現象をかく乱する都合の良い薬剤が必要となる。近年になり，計算科学をベースとしたコンビナトリアルケミストリーと呼ばれる化学合成手法が確立し，多様性に富んだ低分子有機化合物をセットにした化合物ライブラリーが利用できるようになった⁷⁾。この多様性化合物ライブラリーの登場により，任意の生命現象に影響を与える薬剤を単離できる可能性が高まった。医薬創薬分野で利用が進められてきたが，価格低下に伴ってアカデミアにおける様々な生物学研究にもケミカルバイオロジー手法が適用されるようになってきた。一般に生理活性物質の標的タンパク質の同定には薬剤架橋ビーズを用いた結合タンパク質の精製という生化学的アプローチが利用され，多くの技術が開発されている^{8,9)}。ゲノム情報と質量分析技術により昨今ではそのハードルは下がりつつあるものの，未だ困難な工程である。一方，植物科学では変異体が容易に使えるため，薬剤に対する感受性が変化した突然変異体を単離し，その原因遺伝子から薬剤標的や関連遺伝子群を同定するという化学遺伝学的アプローチが利用できる^{5,10,11)}。これが植物研究でケミカルバイオロジーを用いる大きな利点となっている。ただし化合物ライブラリーとして提供される個々の薬剤の量は少ないため，本手法を用いるには小容量で多検体をアッセイすることができるハイスループットな薬剤探索系が必須条件となる。

ケミカルバイオロジー手法による植物免疫研究

我々は植物免疫応答をかく乱する生理活性物質を単離することを目的として，モデル植物であるシロイヌナズナの懸濁培養細胞と斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 (*Pst*)) を用いたアッセイ系を開発した。シロイヌナズナは本菌に感染して罹病性を示

すが，*avrRpm1* エフェクター遺伝子を持つ特定のレース菌株 (*Pst-avrRpm1*) に対しては，AvrRPM1 タンパク質を免疫受容体で認識して防御応答を誘導することで抵抗性を示す¹²⁾。本研究で用いた懸濁培養細胞は植物体での反応を保持しており，病原細菌と混合すると感染して *avrRpm1* 遺伝子依存的に免疫応答としてのプログラム細胞死を誘導した。そこでこの培養細胞を96穴深型プレートのウェルに分注し，*Pst-avrRpm1* と混合して感染させ，免疫反応として誘導されるプログラム細胞死をエバンスブルー色素によって染色して定量検出するというアッセイ系を構築した^{13,14)} (Fig. 1)。これにより，100 μ L という小容量かつ約1日という短時間で薬剤が植物の免疫応答に及ぼす影響を定量評価できるようになり，化合物ライブラリーの探索が可能になった。特筆すべきは，病原細菌を添加しない実験を平行的に行う工夫により，「単に免疫応答を誘導する免疫誘導剤や細胞毒性を示す

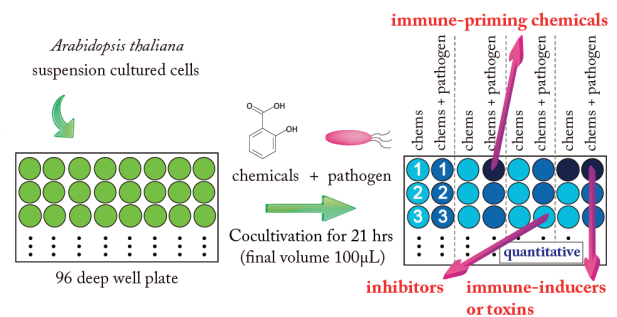


Fig. 1 The established high-throughput screening system for plant immune inhibitors and plant immune-priming chemicals

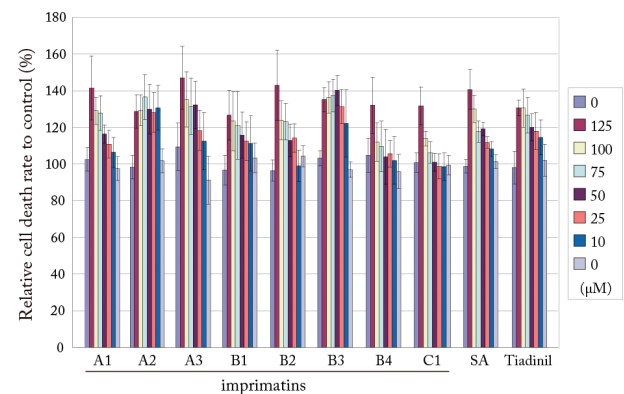


Fig. 2 Effects of several originally-isolated imprimatins and their derivative compounds on cell death of *Arabidopsis* suspension cultures upon inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*. Indicated concentrations of the chemicals and bacteria were applied for each imprimatin. DMSO was added as a control treatment. Cell death intensity measured by Evans blue dye is represented as relative value to the mean of two controls for each compound.

薬剤」と「感染時に発動される免疫応答を増強する免疫プライミング剤」とを区別して選抜できるようにした点である。植物免疫を活性化する薬剤は植物の防御力を向上させることで病害防除効果を発揮するプラントアクティベーターとしての応用が期待される⁵⁾。恒常的な防御応答の誘導は生長阻害効果を伴い易いが、免疫プライミング型の薬剤はその被害を回避できる可能性が高い。免疫プライミング剤を選択的に得ることができる手法は他に例が無い。

これまでに Chembridge 社の多様性低分子有機化合物ライブラリー (10,000個) の探索を実施し、インプリマチン (imprimatin: immune-priming chemicals) と名付けた7個の免疫プライミング剤を単離することに成功した¹⁴⁾。インプリマチンはシロイヌナズナ培養細胞が *Pst-avrRpm1* に対して示す細胞死を濃度依存的に活性化した (Fig. 2)。

サリチル酸の働きを模倣する植物免疫プライミング剤

単離された各種インプリマチンをシロイヌナズナ幼苗に投与し、防御応答のマーカー遺伝子である *PR1* (*Pathogenesis-Related protein 1*) の転写を調べた。その結果、インプリマチン C1 が SA 同様に *PR1* を発現誘導し、弱い SA アナログ活性を持つことが示された¹⁷⁾ (Fig. 3)。インプリマチン C1 を投与したシロイヌナズナ植物体に *Pst* を感染させて抵抗性を評価したところ、耐病性の向上が認められた¹⁷⁾。また、インプリマチン C1 の類縁体群を用いた構造活性相関解析から、活性の発揮には分子内のイミン結合が必要であることがわかった¹⁷⁾。植物ホルモンであるオーキシンの活性を持つ薬剤である sirtinol は分子内にインプリマチン C1 と類似したイミン結合を持つが、これは植物体内に吸収された後に分解され、その分解産物が活性を発揮する¹⁵⁾。このアナロジーから、インプリマチン C1 は生体内で 4-クロロ安息香酸になると予想され、実際にその推定活性本体も病害感染時の細胞死を増強すると共に SA アナログ活性を示した (Fig. 3)¹⁵⁾。以上の結果、インプリマチン C1 は植物体内での代謝を受けて活性化する前駆物質であり、イミン構造は薬剤の滞留時間を制御するためのプロドラッグ化に利用できる可能性が示された。

SA は植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) に対する拮抗阻害作用を持つ¹⁶⁾。JA 誘導性遺伝子である *LOX2* のプロモーター:: *GUS* レポーターを導入した植物を用いた解析において、インプリマチン C1 は JA への拮抗作用を示さなかった¹⁷⁾。つまり、インプリマチン C1 は SA 機能の一部のみを模倣するアゴニストであることが示された。また、インプリマチン C1 と SA とを同時に植物体に添加したところ、防御遺伝子発現に対して相加的に作用せず、インプリマチン C1 は SA のパーシャルアゴニストとして機能することが明らかとなった¹⁷⁾。本研究

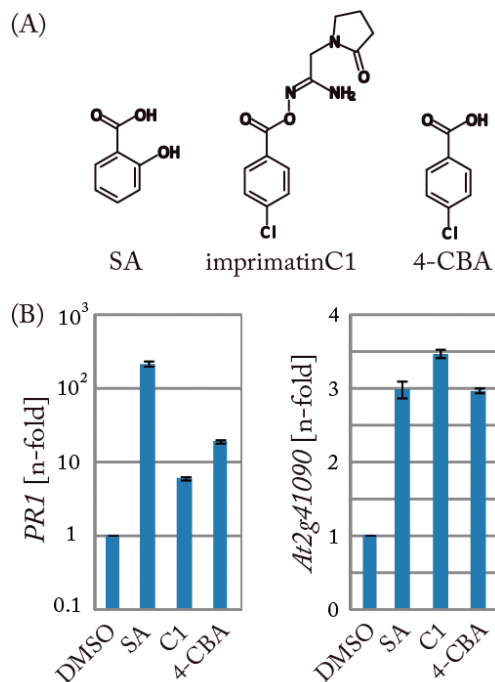


Fig. 3 SA analogous activity of imprimatinC1 and its potential metabolite. (A) Molecular structure of SA, imprimatinC1 and 4-chlorobenzoic acid (4-CBA). (B) Activity regarding expression of defense genes. The *PR1* and *At2g41090* mRNA transcript levels were determined by qRT-PCR with cDNAs prepared from 10-day-old *Arabidopsis* seedlings treated with liquid media containing 100 μ M of the compounds for 24 hours. The expression values were normalized to *Actin2* as an internal standard. These results are representative of three independent replicates.

はプロドラッグ化されたユニークな分子構造を持つ SA のパーシャルアゴニストを発見した初めての例である。

サリチル酸代謝を標的とする植物免疫プライミング剤

獲得したインプリマチンとその類縁体群の構造活性相関解析から分類された2つの免疫プライミング剤 imprimatin A群とB群の解析を進めた (Fig. 4)。これらをシロイヌナズナ植物体に投与すると、スクリーニングに用いた非病原性の *Pst-avrRpm1* だけでなく病原性の *Pst* に対する抵抗性をも向上させ、本剤の病害抵抗性誘導剤への応用の可能性とスクリーニング手法の有効性が示された¹⁴⁾。薬剤処理した植物体に *Pst-avrRpm1* を接種して SA 内生量を測定したところ、薬剤処理によって有意に上昇していることがわかり、これが免疫賦活化の直接的要因と考えられた (Fig. 5)¹⁴⁾。病害感染時に大量に産生される SA の主たる代謝産物は SA 配糖体 (SA 2-O- β -D-glucoside : SAG) であることが知られているが¹⁸⁾、我々はインプリマチン A, B の処理によって SAG 量が減少していることを見出した (Fig. 5)。この結果から、

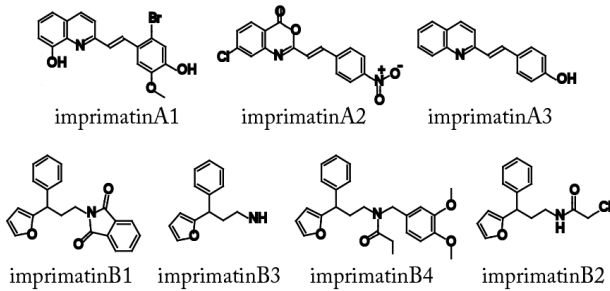


Fig. 4 Molecular structures of imprimatins A and B.

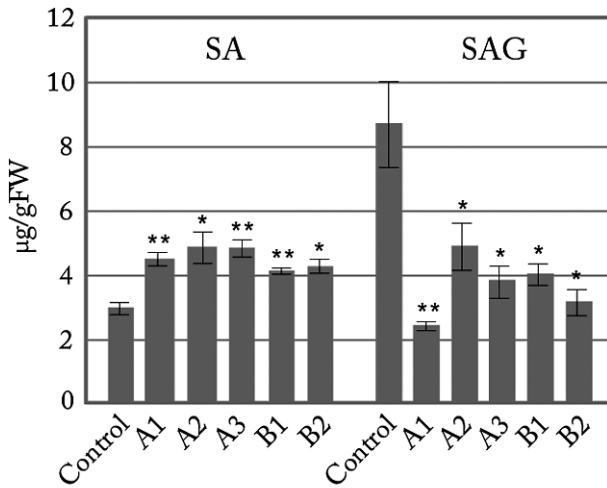


Fig. 5 Endogenous SA and SAG levels after pathogen inoculation in the imprimatin-treated *Arabidopsis* plants. SA and SAG contents were measured by HPLC using samples extracted from *Arabidopsis* plants inoculated with *Pst-avrRpm1*. Error bars represent SE (n=3). **P < 0.01 and *P < 0.05; two-tailed Student's t test. FW, fresh weight.

インプリマチン A, B は SA 代謝を標的にすると仮定された。生体内の有機化合物は配糖化による活性調節を受ける場合が多く、ウリジン二リン酸 (UDP)-糖から基質に糖を転移する働きを持つ酵素によって制御される。そこでシロイヌナズナゲノムに推定されるグルコース転移酵素遺伝子群から SA を基質にしうるものを探索した。その結果、強い SA 配糖化活性を持つ酵素 (SA glucosyltransferase : SAGT) として既に知られていた UGT74F1 に加え¹⁹⁾, 新たに UGT76B1 を発見した¹⁴⁾。これら両酵素には発現パターンに違いがあり, 前者は弱く恒常的に発現しているのに対し, 後者は病害感染などの環境ストレスに応答して強く発現誘導される。インプリマチン A, B 群は *in vitro* において両 SAGT の酵素活性を阻害し, その有効濃度はこれらの薬剤が植物培養細胞に対して免疫活性化能を示す濃度範囲と一致した¹⁴⁾。また, 詳細な酵素反応速度論解析によって各インプリマチンの阻害定数を決定し, 供試した全てのインプリマチンが基質であ

る SA と競合する形で SAGT を阻害するという阻害様式を明らかにした¹⁴⁾。以上の結果から, インプリマチン A, B 群は SA 代謝を遮断することによって, 感染時に生合成される SA の蓄積速度を早めることで病害応答を強めていることがわかった。UGT74F1 と UGT76B1 を各々欠損したシロイヌナズナ変異体およびそれらの二重破壊株の解析を行ったところ, これらの植物体は病原性および非病原性の *Pst* に対する抵抗性の向上を示した¹⁴⁾。耐病性は *ugt74f1*, *ugt76b1*, *ugt74f1/ugt76b1* の順で強くなっており, 病害感染時の SA 配糖化には UGT74F1 より UGT76B1 の寄与度が高いことが示された¹⁴⁾。これらの植物体の病害感染時における SA および SAG の内生量を測定したところ, SA 量増加と SAG 量の減少が認められた¹⁴⁾。以上のように, SAGT 変異体は野生型植物体をインプリマチン A, B 群で処理した時の状態をフェノコピーしており, これらの薬剤が SA 配糖化を標的とするという作用機序が支持された。

我々はインプリマチン B の類縁体としてインプリマチン B3, B4 も得ている (Fig. 4)。これらはインプリマチン B1, B2 と同様に培養細胞の *Pst-avrRpm1* 依存的細胞死を活性化し, また植物体に耐病性を付与するものの, *in vitro* における SAGT 阻害活性は他の薬剤に比して弱かった²⁰⁾。従って, インプリマチン B3, B4 は植物に吸収された後に代謝され, その代謝物が活性体として薬効を発揮していると推測された。

本研究で発見した UGT76B1 はイソロイシン酸を基質とすることが報告されており, 変異体の表現型やイソロイシン酸の大量投与実験によって耐病性が向上することから, イソロイシン酸が SA シグナル経路を正に制御する内生物質であると結論付けられていた²¹⁾。しかし我々は UGT76B1 が SA も基質とすることを明らかにし, イソロイシン酸の大量投与によって SA の配糖化が阻害されることを示した¹⁴⁾。つまりイソロイシン酸の投与によって引き起こされた耐病性の向上は, イソロイシン酸自体が直接的に与えたものでは無く, UGT76B1 の SA 配糖化能が競合阻害された結果として増加した内生 SA の影響に依るものであることを意味している。イソロイシン酸の生理機能についてはよくわかっていないが, シロイヌナズナでは根に多く含まれることから²¹⁾, UGT76B1 は根におけるイソロイシン酸の代謝と地上部における病害感染時の SA 配糖化という両方の役割を持つと考えられる。冒頭で述べたように, ケミカルバイオロジーは化合物を使って生命現象を解明することが本質であり, 本研究ではインプリマチン A, B 群を分子プローブとして利用することで, UGT76B1 の機能と病害感染時の SA 配糖化機構の詳細を明らかにすることができた。

植物免疫プライミング剤の応用展開

これまで人類は農薬と耐病性品種によって作物を病害

から守ってきた。しかし、これらの方法論は特定の病原体を対象とするため、すぐに耐性菌が出現してしまう。膨大な時間・労力・コストを掛けた製品や品種の効力がすぐに失われるため、農業現場、農業会社、育種機関で大きな問題となっている。一方、作物の免疫力を活性化することで防除効果を発揮する薬剤として病害抵抗性誘導剤が実用化されている。これは明治製菓株が見出したプロベナゾールに端を発する日本発祥のものづくり技術であり、アジア地域の水稲栽培においてももち病や白葉枯病の防除剤として30年以上も利用されている²²⁾。宿主である植物側に作用するので、薬剤耐性病原体が出現しない効果の持続性が最大の特徴である。また複数種の病原体に対する防除効果や、従来型農薬と併用することによってその散布量や回数を低減することができるという環境負荷低減効果も併せ持つ。チアジニルやイソチアニルといった新剤も上市された程にその需要は高いが、それらの主たる適用もまた水稲であり、適用拡大はあまり進んでいない。もし他の作物に利用拡大できれば、殺菌剤の適用が難しい難防除土壌病害や薬剤耐性菌への新たな対処法になるとともに、環境負荷や現場の労力の低減、食糧・バイオマスの増産という社会的要請にも大きく貢献しうる。

プロベナゾールは殺菌剤開発過程において、イネ植物体に薬剤投与してその病害防除効果を評価する「ぶっかけ法」から偶然単離された²³⁾。医薬創薬と同様、農業開発においても新たな骨格と薬効を有する新剤を獲得するには網羅的探索が有効だが、ぶっかけ法には大量の薬剤と管理された大きなスペースを要するため化合物ライブラリーの利用には適さない。他方、植物の防御関連遺伝子のプロモーターレポーター系を導入した組換え植物を利用して薬剤の免疫誘導能を評価する手法も存在する^{5, 24)}。しかしSAアナログのような免疫誘導型薬剤に付随する生育抑制効果は特に双子葉作物において顕著で、実用利用を阻む一因ともなっている。我々が開発した手法は化合物ライブラリーの探索が可能で、かつ副作用の低さが期待される免疫プライミング型薬剤が単離できる。実際にインプリマチンが単離できており、それらは双子葉作物に適用可能な実用化剤を開発するためのリード化合物としての利用が期待される。また、我々は多様な化合物ライブラリーとは質の異なる薬理物天然物化合物ライブラリーの探索も既に実施して様々な薬剤を単離しており、一部について報告している^{25, 26)}。

実は現在圃場で利用されている抵抗性誘導剤はその作用機序がわかっていない。我々はインプリマチンの一部の標的分子としてSA配糖化酵素を同定した^{14, 20, 27)}。これは植物免疫活性化剤の標的分子を明らかにした初めての例である。ただし既存の抵抗性誘導剤はSA配糖化酵素を阻害しないため、実用剤の作用メカニズムとは異なる¹⁴⁾。植物体や探索系を変えることで新たな作用機序を

持つ薬剤を単離できたことは当初の目論見通りであったと言える。単子葉植物は元来内生SA量が多く、その含有量に病害抵抗性が依存する²⁸⁾。一方、双子葉植物では非感染時のSA量が低く、感染時に大量に生合成されるSAが主たるシグナルとして機能する¹⁸⁾。このためSAに対する感受性が高く、生長抑制を示しやすい。SAGT阻害は非感染時には大きな作用は示さず感染時のSA蓄積を強める形でのみ寄与するので、双子葉植物で免疫プライミング効果を発揮させるための理に適った方法論と言える。

SA配糖化酵素は病害感染時に細胞内に高濃度に存在するSAを代謝するために働いており、基質であるSAとの親和性は低い。一方、低濃度のSAの代謝にはメチル化酵素などが働いておりそれらのSAとの親和性は高い¹⁸⁾。インプリマチンA, BはSAと競合する形で作用するが、SA配糖化の阻害にはSAと同程度の濃度を要する。この事実から、おそらく単なる構造ベースの派生物展開で強力な阻害剤を得ることは難しいと推察される。ただし今回は標的分子が同定されたので、医薬創薬で多用される標的ベース探索が利用できる。現在SAGTの酵素活性を指標とした*in vitro*スクリーニング系を用いた網羅的探索を進めており、実用化に耐える効果を持つSAGT阻害剤の同定を目指している。

また、インプリマチンの作用機序に習った耐病性付与手法の開発も進めている。具体的には、病害感染に応答してSAGTを機能抑制する仕組みをカセットとして導入した組換え植物の作出を目指している。この技術が確立すれば、複数種の病害に対する持続的な抵抗性を様々な作物に付与することが可能となる。薬剤の利用には費用・手間・使用技術を要するが、その効果を品種として置き換えることにより全世界的な普及が期待される。私はこのような植物保護技術の開発研究を通じて、日本の農業はもとより食糧安全保障やバイオマス資源の確保にも貢献していきたいと考えている。

引用文献

- 1) Chisholm S. T., G. Coaker, B. Day and G. J. Staskawicz : Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814 (2006)
- 2) Tsuda, K. and F. Katagiri : Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 459-465 (2010)
- 3) 八丈野孝・白須 賢 : 病原体による免疫抑制化と植物の免疫戦略. *細胞工学*, **30**, 155-160 (2011)
- 4) 能年義輝・市村和也・白須 賢 : 植物病害抵抗性R蛋白質の分子制御機構. *蛋白質核酸酵素*, **51**, 408-418 (2006)
- 5) 鳴坂義弘・平塚和之・能年義輝 : プラントアクティベーターによる植物免疫の活性化と化学遺伝学への利用. *化学と生物*, **48**, 706-712 (2010)
- 6) 長野哲雄 : ケミカルバイオロジー概論. *蛋白質核酸酵素*, **52**, 1519-1523 (2007)
- 7) Mario Geysen, H., F. Schoenen, D. Wagner and R.

- Wagner : Combinatorial compound libraries for drug discovery : an ongoing challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 222-230 (2003)
- 8) 加部泰明・半田 宏 : アフィニティー磁性ナノビーズを用いたケミカルバイオロジー戦略. 蛋白質核酸酵素, **52**, 1637-1642 (2007)
- 9) 細谷孝充 : 新しい non-RI 光親和性標識法の開発と標的タンパク質探索. *Annu. Rep. Inst. Biomater. Bioeng.*, **43**, 52-55 (2009)
- 10) Blackwell, H. E. and Y. Zhao : Chemical genetic approaches to plant biology. *Plant Physiol.*, **133**, 448-455 (2003)
- 11) Xuan, W., E. Murphy, T. Beeckman, D. Audenaert and I. De Smet : Synthetic molecules: helping to unravel plant signal transduction. *J. Chem Biol.*, **6**, 43-50 (2013)
- 12) Debener, T., H. Lehnackers, M. Arnold, J. L. Dangl : Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J.*, **1**, 289-302 (1991)
- 13) Noutoshi, Y. and K. Shirasu, PLANT DISEASE RESISTANCE INDUCER, PCT/JP2009/056922
- 14) Noutoshi, Y., M. Okazaki, T. Kida, Y. Nishina, Y. Morishita, T. Ogawa, H. Suzuki, D. Shibata, Y. Jikumaru, A. Hanada, Y. Kamiya and K. Shirasu : Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 3795-3804 (2012)
- 15) Dai, X., K. Hayashi, H. Nozaki, Y. Cheng, Y. Zhao : Genetic and chemical analyses of the action mechanisms of sirtinol in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 3129-3134 (2005)
- 16) Noutoshi, Y., Y. Jikumaru, Y. Kamiya and K. Shirasu : ImprimatinC1, a novel plant immune-priming compound, functions as a partial agonist of salicylic acid. *Sci. Rep.*, **2**, 705 (2012)
- 17) Derksen, H., C. Rampitsch and F. Daayf : Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.*, **207**, 79-87 (2013)
- 18) Dempsey, D. A., A. C. Vlot, M. C. Wildermuth and D. F. Klessig : Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*, **9**, e0156 (2011)
- 19) Lim E. K., C. J. Doucet, Y. Li, L. Elias, D. Worrall, S. P. Spencer, J. Ross and D. J. Bowles : The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J. Biol. Chem.*, **277**, 586-592 (2002)
- 20) Noutoshi, Y., M. Okazaki and K. Shirasu : Isolation and characterization of the plant immune-priming compounds Imprimatin B3 and -B4, potentiators of disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sig. Behav.*, **7**, 1526-1528 (2012)
- 21) von Saint Paul V., W. Zhang, B. Kanawati, B. Geist, T. Faus-Kessler, P. Schmitt-Kopplin and A. R. Schäffner : The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell*, **23**, 4124-4145 (2011)
- 22) 岩田道顕 : Dr. 岩田の『植物防御機構講座』. pp. 44-56, オリゼメート普及会, 東京 (2009)
- 23) Watanabe, T., H. Igarashi, K. Matsumoto, S. Seki, Y. Sekizawa and S. Mase : The characteristics of probenazole (Oryzemat[®]) for the control of rice blast. *J. Pestic. Sci.*, **2**, 291-296 (1977)
- 24) Knoth, C., M. S. Salus, T. Girke and T. Eulgem : The synthetic elicitor 3,5-dichloroanthranilic acid induces *NPRI*-dependent and *NPRI*-independent mechanisms of disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **150**, 333-347 (2009)
- 25) Noutoshi, Y., M. Ikeda and K. Shirasu : Diuretics prime plant immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, **7**, e48443 (2012)
- 26) Noutoshi, Y., M. Ikeda, T. Saito, H. Osada and K. Shirasu : Sulfonamides identified as plant immune-priming compounds in a high-throughput chemical screening increase disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, **3**, 245 (2012)
- 27) Noutoshi, Y., M. Okazaki and K. Shirasu : Imprimatins A and B : Novel plant activators targeting salicylic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sig. Behav.*, **7**, 1715-1717 (2012)
- 28) Silverman, P., M. Seskar, D. Kanter, P. Schweizer, J. P. Metraux and I. Raskin : Salicylic Acid in Rice (Biosynthesis, Conjugation, and Possible Role). *Plant Physiol.*, **108**, 633-639 (1995)