

イネのファイトアレキシン生合成とその制御

はじめに

ファイトアレキシンとは、植物が病原菌などの生物ストレス、あるいはUV処理などの非生物ストレスにさらされたときに、植物が生合成・蓄積する低分子の抗菌性化合物である (Ahuja *et al.* 2012)。免疫系がない植物にとっては、ファイトアレキシン生産は重要な病害抵抗機構の一つである。植物の病害抵抗性には、細胞壁の厚さや硬さなどの静的抵抗性もあるが、ファイトアレキシン生産は動的抵抗性に含まれる。ジベレリンやアブシジン酸など全ての植物に普遍的に存在する植物ホルモンとは異なり、ファイトアレキシンは植物種ごとに異なり、フラボノイド、アルカロイド、ジテルペノイドなど様々な低分子化合物が同定されてきている。その中でも栽培イネ (*Oryza sativa*) は、多様なジテルペノイドのファイトアレキシンを生産することが知られており、これまでにファイトカサン A~F (Koga *et al.* 1995; Koga *et al.* 1997; Yajima and Mori, 2000; Horie *et al.* 2015)、モミラクトン A, B (Cartwright *et al.* 1981)、オリザレキシン A~F (Kono *et al.* 1984; Akatsuka *et al.* 1985; Sekido *et al.* 1986; Kato *et al.* 1993; Kato *et al.* 1994)、オリザレキシン S (Tamogami *et al.* 1993)、*ent*-10-oxodepressin (Inoue *et al.* 2013) が

単離・構造決定されている (図-1)。本稿では、これらイネのファイトアレキシンの生合成に関与する酵素遺伝子、さらにそれらの遺伝子発現調節機構について紹介する。

1. イネのラブダン関連ジテルペン系ファイトアレキシン生合成遺伝子

テルペノイドの一種であるジテルペノイドは、炭素数5個のイソプレン単位から生合成されるが、イソプレン単位4個分 (正確には、スターター基質の dimethylallyl diphosphate にその異性体である isopentenyl diphosphate が連続的に3個縮合したもの)、即ち炭素数20個の鎖状基質

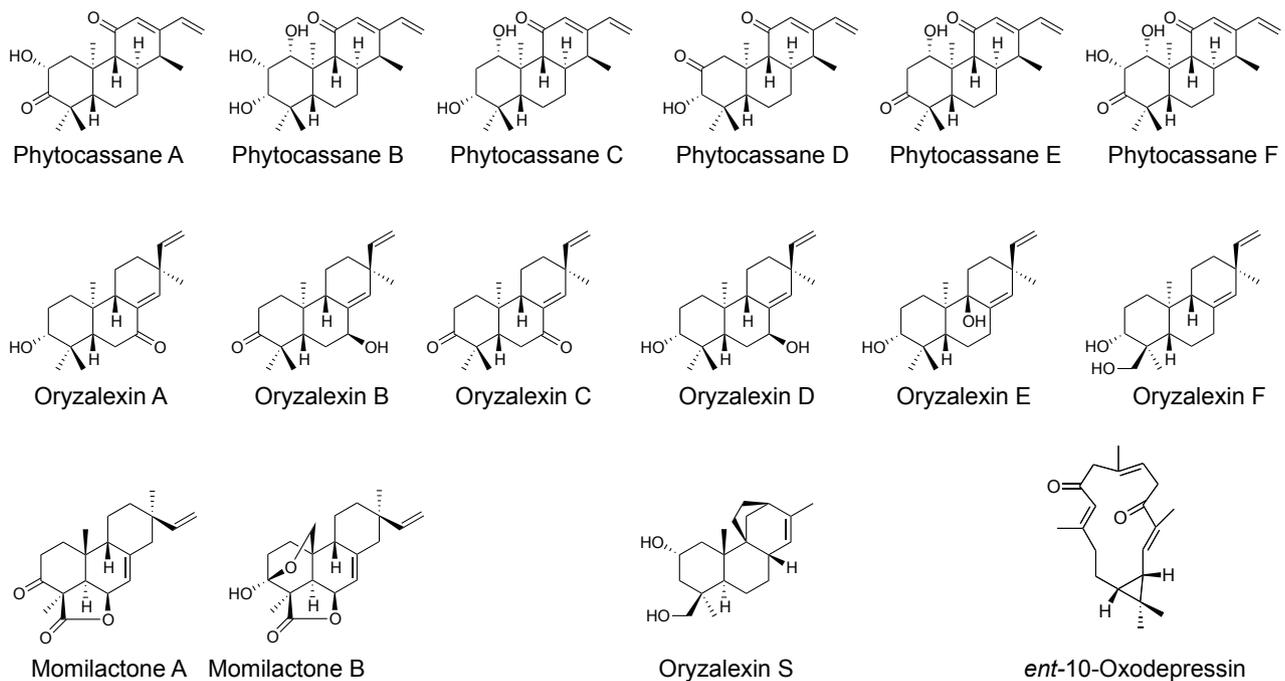


図-1 イネのジテルペン系ファイトアレキシン

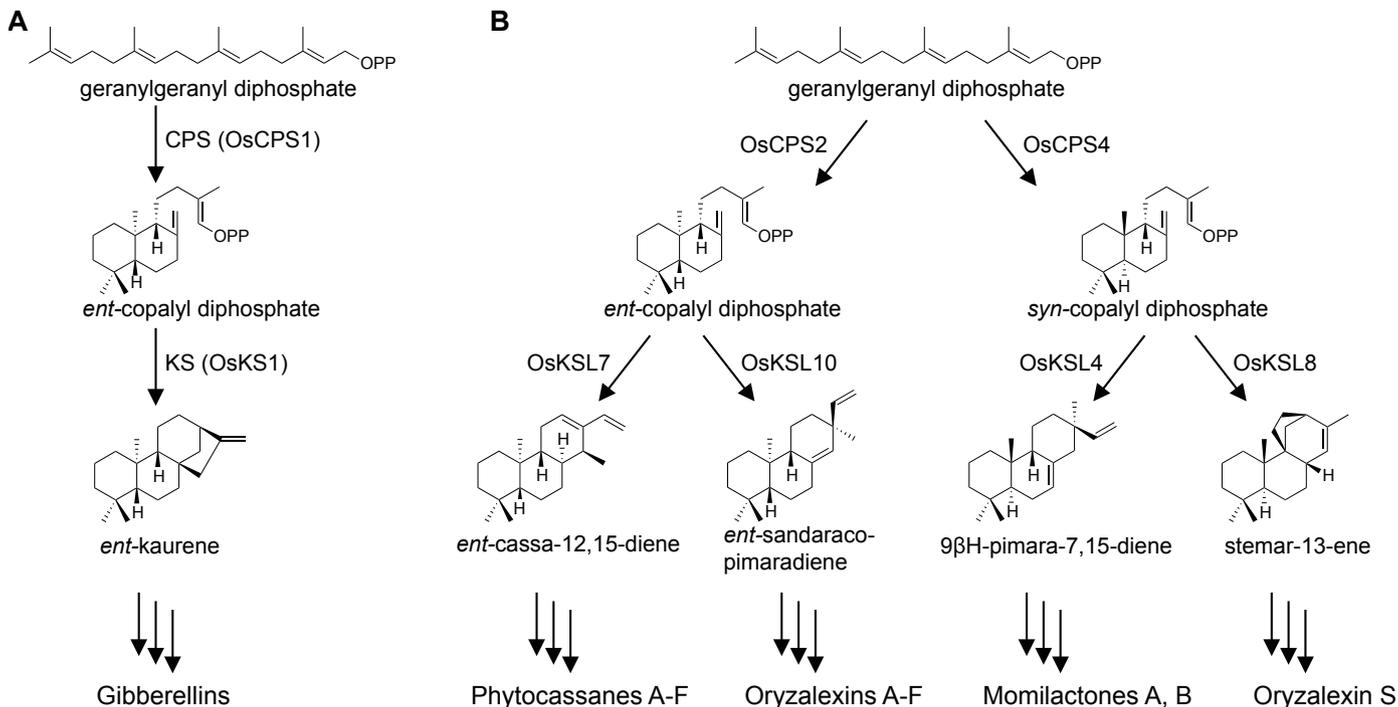


図-2 ジベレリンとイネのラブダン関連ファイトアレキシンの生合成

それぞれの生合成の初期段階について、関連する環化酵素とともに詳細に記した。化学修飾酵素やその他の生合成中間体の詳細は割愛した。(A) ジベレリンの生合成。高等植物での *ent*-copalyl diphosphate 合成酵素 (CPS) と *ent*-kaurene 合成酵素 (KS) に該当するイネの酵素は、それぞれ括弧内に示した OsCPS1 と OsKS1 である。(B) イネのラブダン関連ファイトアレキシンの生合成。CPS と KSL のパラログの名前を記した。

geranylgeranyl diphosphate (GGDP) より組み立てられる (Toyomasu and Sassa 2010)。鎖状の GGDP は、ジテルペン環化酵素 (あるいはジテルペン合成酵素) とよばれる酵素によって環状化され炭素骨格が形成されるが、様々な炭素骨格構造の形成にはそれぞれ特異的な環化酵素が関わる。高等植物においてはここまでの酵素は色素体内で機能すると考えられており、N 末端には色素体移行シグナルがみられる。できあがった炭素骨格は、小胞体膜のシトクロム P450 酸化酵素による水酸化などの化学修飾を受け、様々な生理活性を有するジテルペノイドが生合成される。他の高等植物と比べて、イネからは多くのジテルペン系ファイトアレキシンの単離されてきているが、それらは炭素骨格の構造の違いから、ラブダン型とマクロ環型に大別される。とはいえ、マクロ環型は最近単離された *ent*-10-oxodepressin の

みで、他のファイトカサン、モミラクトンなどは全てラブダン型である (図-1)。*ent*-10-oxodepressin の生合成遺伝子はこれまで同定されていないが、ラブダン型については多くの情報が蓄積してきているので、ここではそれを詳しく述べる。ラブダン型のジテルペノイドの代表例は、植物ホルモンのジベレリンであり (Yamaguchi 2008)、その基本炭素骨格である *ent*-kaurene は GGDP から *ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CDP) を経て 2 段階の環化反応で生成し、その 2 段階の反応は異なる 2 種のジテルペン環化酵素 *ent*-CDP 合成酵素 (CPS) と *ent*-kaurene 合成酵素 (KS) により連続的に触媒されることが知られている (図-2A)。CPS と KS はよく似たホモログであるが、特徴的な活性中心のアスパラギン酸 (D) リッチモチーフで見分けがつく (CPS は N 末端側に DxxDD, KS は C 末端側に DDxxD)。

ent-CDP は、不斉炭素が 2 個あることから、自身も含めて理論上 4 種の立体異性体が考えられるが、これらを経て生合成される一群がラブダン関連ジテルペノイドとよばれる。イネのラブダン関連ファイトアレキシンにおいては、ファイトカサン A ~ F とオリザレキシン A ~ F は *ent*-CDP を経て、モミラクトン A, B とオリザレキシン S は *ent*-CDP のジアステレオマーである *syn*-CDP を経て生合成される (図-2B)。これらの炭素骨格は、ジベレリン生合成酵素 CPS と KS (イネの場合は OsCPS1 と OsKS1) のホモログによる GGDP の 2 段階の環化反応で生成することが示されている (OsCPS2, OsCPS4, OsKSL4, OsKSL7, OsKSL8, OsKSL10 (Peters 2006; Toyomasu 2008)) (図-2B)。ジベレリン生合成遺伝子 *OsCPS1* と *OsKS1* とは異なり、これらファイトアレキシン生合成ジテルペン環化酵素

遺伝子の発現は、UV 処理、キチンエリシター処理、病原菌接種後などに著しく誘導される。イネとは対照的に、モデル双子葉植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、CPS と KS 関連の遺伝子はジベレリン生合成遺伝子 *AtCPS* と *AtKS* のみである。これまでの研究で、多様な CPS と KSL ホモログは、イネに限らずコムギやトウモロコシなどイネ科植物全般に存在することが示されてきている (Harris *et al.* 2007; Wu *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2012; Fu *et al.* 2015)。

環化酵素遺伝子の発見を引き金にして以降の化学修飾酵素遺伝子も発見されてきた。特に、ファイトカサン生合成に関与する遺伝子 *OsCPS2* と *OsKSL7* のゲノム上の近い周辺にはシトクロム P450 酸化酵素 CYP71Z6, CYP71Z7, CYP76M5, CYP76M6, CYP76M7, CYP76M8 をコードする遺伝子が集中して座乗し、同様にモミラクトン生合成関連の *OsCPS4* と *OsKSL4* の周辺には P450 の CYP99A2 と CYP99A3, 脱水素酵素の一種 *Oryza sativa* Momilactone A Synthase 1 (*OsMAS1*) と *OsMAS2* をコードする遺伝子がみられ、それぞれ 2 番染色体と 4 番染色体で遺伝子クラスターをなすことも示されている (Shimura *et al.* 2007; Okada, 2011; Miyamoto *et al.* 2016)。これら化学修飾酵素がファイトカサン、モミラクトン生合成に関与することも大腸菌体内発現組換え酵素を用いた変換実験などにより示されてきている (Kitaoka

et al. 2015)。

2. イネにおける *ent*-CDP 生合成

前述のように、イネのファイトアレキシンのファイトカサン A~F と オリザレキシシン A~F の生合成は *ent*-CDP を経るが、植物ホルモンのジベレリンも同じ *ent*-CDP を経て生合成される (図-2)。ところが、試験管内で同じ機能を有する *OsCPS1* と *OsCPS2* について、前者がジベレリン生合成に、後者がファイトアレキシシン生合成に関与すると記したが、その根拠は、*OsCPS1* 遺伝子が機能喪失した突然変異体ではジベレリン欠損極矮性形質を示すこと (Sakamoto *et al.* 2004)、キチンエリシター処理や UV 処理後に *OsCPS2* は著しく発現量が増加することがあげられた (Otomo *et al.* 2004)。*OsCPS1* 機能喪失突然変異体の極矮性形質には *OsCPS2* による機能重複がない原因を解明するため、それぞれの遺伝子発現部位を検討した (Toyomasu *et al.* 2015)。イネ日本晴の第 2 葉鞘をパラフィン包埋後に切片化し、レーザーマイクロダイセクションによりその切片から維管束組織、表皮組織を切り取り、残りを葉肉組織として採取し、それらを材料として定量 RT-PCR により *OsCPS1* と *OsCPS2* 転写物蓄積量を定量した。その結果、*OsCPS1* 転写物は維管束組織において、*OsCPS2* 転写物は表皮組織において主に蓄積していた。シロイ

ヌナズナのジベレリン生合成遺伝子 *AtCPS* も維管束系で発現していたことから *OsCPS1* 発現組織と良い一致を示し、外界ストレスに応答して発現誘導される *OsCPS2* が表皮組織で主に発現することも合目的であった。さらに、*OsCPS1* 機能喪失突然変異体の極矮性形質は、*OsCPS2* を *OsCPS1* のプロモーター配下で発現させることで相補され、遺伝学的にも裏付けられた。このように、イネにおいて *ent*-CDP 合成という同じ触媒能を有する酵素遺伝子、即ち、生長制御に関与する植物ホルモンのジベレリン生合成遺伝子 *OsCPS1* と病害抵抗に関与するファイトアレキシシン生合成遺伝子 *OsCPS2* は、生物学的役割に応じて発現組織が異なることが示された。論文未発表ながら *OsCPS4* 転写物も *OsCPS2* と同様に表皮組織で主に蓄積していることも明らかになり、ファイトアレキシシン生合成遺伝子は表皮近辺で主に発現することが示唆された。しかしながら、*OsKSL4* などその他のファイトアレキシシン生合成遺伝子の発現組織も同様かどうか、さらにストレスにさらされた場合の発現組織など検討すべき課題は残されている。

3. モミラクトンの生物学的役割

イネのファイトアレキシシンの一つモミラクトンは、元々はイネのモミ殻に存在する植物生長抑制物質として単離され (Kato *et al.* 1973)、その後、葉

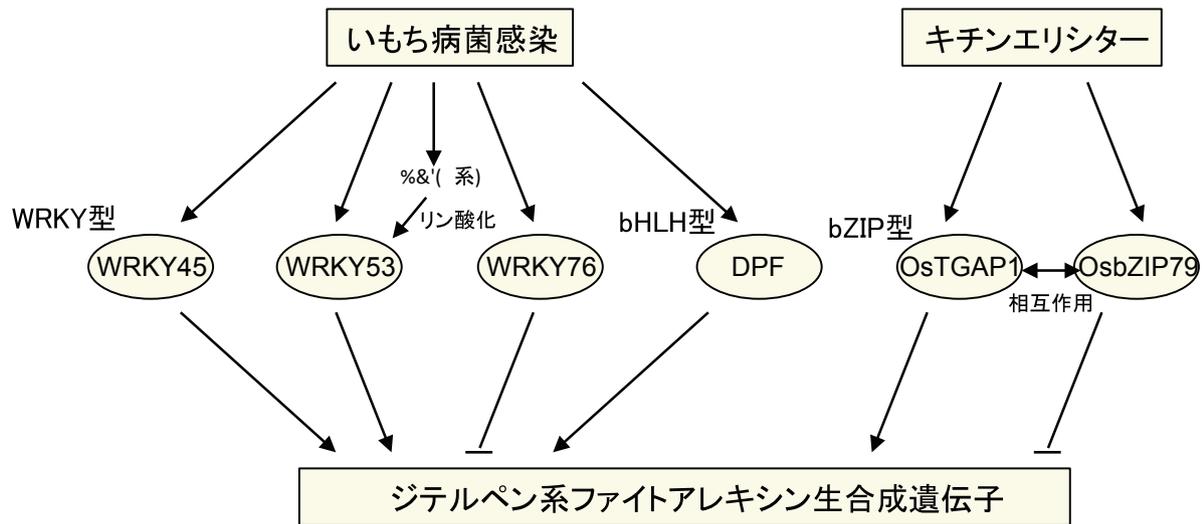


図-3 イネのファイトアレキシン生合成遺伝子発現の制御に関わる転写因子

身などで蓄積量がストレス応答的であるファイトアレキシンとして認識され、最近ではイネの根から土壤中に放出されて周辺植物の生長を抑制するアレロパシー物質として再同定された (Kato-Noguchi *et al.* 2002)。もう一種のイネの主要ファイトアレキシンであるファイトカサンもイネの根から浸出するものの、植物生長抑制活性はみられず、おそらく土壤中の病原菌に対する抵抗に関与すると考えられる (Toyomasu *et al.* 2008)。病原菌と周辺植物の両方の生物ストレスに対峙するモミラクトンはイネの生存戦略上重要な化合物といえる。例えば、モミラクトンがイネの病害抵抗に重要ということは、イネが病原菌感染されるとモミラクトンが誘導的に生産される、モミラクトンは試験管内でいもち病菌に対して抗菌活性がある、という三段論法で示唆されていたが、筆者らは生合成遺伝子を利用して逆遺伝学的手法でそのことを示すことを試みた (Toyomasu *et al.* 2014)。生合成遺伝子の中でも生合成初期の *OsCPS4* と *OsKSL4* に着目し、野外実験が可能な *Tos17* ミュータントパネルから PCR スクリーニングしたところ *OsCPS4* について第3イントロンに内在性レト

ロトランスポゾン *Tos17* が挿入されたラインを探し出すことに成功した。このラインは *Tos17* がイントロンに挿入されていたことから、残念ながらノックアウト体ではなかったが、成熟型 mRNA の蓄積量が野生型の 10～20% になったノックダウン体であった。この *OsCPS4* ノックダウン体を用いて、いもち病接種試験と水田雑草共栽培試験を行った。いもち病試験は葉身を用いた孢子懸濁液の点滴法と噴霧法で行ったが、両アッセイとも 10^5 孢子/mL 懸濁液でノックダウン体は野生型日本晴よりもいもち病に罹病した。罹病葉身におけるファイトアレキシン分析を行ったところ、*ent*-CDP 由来のファイトカサン類はノックダウン体と野生型でほぼ同レベル蓄積していたが、*OsCPS4* が生合成に関わる *syn*-CDP 由来のモミラクトン A、B とオリザレキシン S の蓄積量はノックダウン体で低下していた。以上のことはこれらファイトアレキシン生産がいもち病抵抗性に関与する可能性を示唆した。また、いもち病接種後に、そのレースのいもち病菌に抵抗性のイネ品種では、罹病性イネ品種よりも早い時間でモミラクトンやファイトカサン生産が誘導されること、さらにはモミラクト

ン投与によりイネ葉身のいもち病耐性が強まることも報告され (Hasegawa *et al.* 2010)、モミラクトンなどイネのジテルペン型ファイトアレキシンはイネ病害抵抗に深く関わると考えられてきている。一方、水田雑草共栽培試験においては、モミラクトンの根からの浸出量が低下したノックダウン体の周辺では野生型よりもコナギやミゾハコベなどの雑草が多く生えていた (乾燥重、本数で評価)。また、別の研究グループは T-DNA 挿入の *OsCPS4* あるいは *OsKSL4* ノックアウトイネの根からの浸出液を含む寒天では野生型根浸出液の場合よりもレタス芽生えの生長がよいことを報告した (Xu *et al.* 2012)。以上のことからモミラクトンがアレロパシー物質として働いていることも逆遺伝学的手法で示唆された。

4. イネのファイトアレキシン生合成遺伝子の制御

イネのファイトアレキシン生合成遺伝子群の発現は、生物ストレスとなるいもち病菌などの病原菌接種やその際のエリシター成分として知られるキチンオリゴ糖処理、非生物ストレスである UV 処理、塩化銅処理、植物抵抗

性を司る植物ホルモンのジャスモン酸処理などにより著しく促進される。また、*OsCPS2* などのように表皮組織で主に発現すること、あるいは根において発現することなど遺伝子発現は組織レベル、器官レベルで制御される。それらの発現制御機構については、特にそのストレス誘導性に着目し、遺伝子発現を制御する転写制御因子の探索が進められた(図-3)。これまでに報告された代表的な転写因子としては、キチンエリクター処理時のイネ培養細胞においてファイトアレキシン生産誘導を増加させる塩基性ロイシンジッパー (bZIP) 転写因子ファミリーに属する *Oryza sativa* TGA factor for Phytoalexin production 1 (*OsTGAP1*) をはじめとして、*OsTGAP1* と相互作用する *OsbZIP79*、イネ葉身のいもち菌処理時に誘導を受ける塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス (bHLH) 転写因子ファミリーの Diterpenoid Phytoalexin Factor (DPF) 等が知られている (Okada *et al.* 2009; Miyamoto *et al.* 2014a; Yamamura *et al.* 2015)。その他、いもち菌感染時の病害抵抗性発現で機能する WRKY 型転写因子の中には、ファイトアレキシン生産を亢進する WRKY45 と抑制的に働く WRKY76 が報告されている (Yokotani *et al.* 2013; Akagi *et al.* 2014)。また、いもち菌感染からファイトアレキシン生産誘導につながるシグナル伝達では、MAP キナーゼカスケードの関与も示唆されており、MAP キナーゼの MPK3、MPK6 とそれらをリン酸

化する MAPK キナーゼの MKK4 からなるリン酸化カスケードがファイトアレキシン生産に重要な役割を果たすことがわかっている (Kishi-Kaboshi *et al.* 2010)。上記以外の WRKY 型転写因子で病害抵抗性に関与する分子として WRKY53 が知られており、遺伝子発現レベルではあるがファイトアレキシン生合成に対し正の影響を持つことが報告されている。WRKY53 は *in vitro* において *OsMKK4-OsMPK3/OsMPK6* によりリン酸化を受けることも示されていることから、いもち菌感染を引き金としてリン酸化による転写因子の活性化を介したファイトアレキシン生産誘導のシグナル伝達経路の存在を示す例となっている (Chujo *et al.* 2014)。*OsTGAP1* はイネ培養細胞におけるジテルペン系ファイトアレキシン生合成遺伝子発現のキチンエリクター誘導に主に関与すると考えられてきたが、最近の研究により主にイネの根において機能し (未発表データ)、ジテルペンの基質を与えるメチルエリスリトールリン酸経路の初発酵素遺伝子 *OsDXS3* のプロモーターに結合し発現誘導を促すことが明らかになった (Miyamoto *et al.* 2014b)。*OsTAGP1* と相互作用する *OsbZIP79* はその過剰発現がファイトアレキシン生産に抑制的に働くことから、*OsTGAP1* の活性調節を通じてファイトアレキシン生産制御を行う因子であると考えられているが、その分子メカニズムについては未だ明らかにされておらず、現在研究が進められている。DPF は病原菌

接種などの生物ストレスだけでなく、UV 処理や塩化銅処理などの非生物ストレス処理によっても植物体全体で発現が誘導されるが、特に根での恒常的発現など、器官別発現といった広範囲の発現制御に関与することが最近報告された。*DPF* を過剰発現させた組換えイネではジテルペン系ファイトアレキシンは野生型より蓄積し、逆に *DPF* ノックダウン体では野生型より著しく低下した。このように *DPF* はイネのジテルペン系ファイトアレキシン内生量調節に重要な働きをすることが示されている。しかし *OsTGAP1* と *DPF* がどのようにしてゲノム上でクラスターを形成し存在する全てのファイトアレキシン生合成遺伝子の発現誘導を可能にしているのかについてはわかっていない。最近、*OsTGAP1* の相互作用因子として取得されたタンパク質因子の中には、ゲノムレベルでの遺伝子発現制御機構として知られるクロマチンリモデリングの関連因子も含まれることが明らかになってきた。このようにここ数年の間に数多くの転写制御因子がファイトアレキシン生産制御に関わるものがわかってきており、これらの因子を介したファイトアレキシン生合成遺伝子群のクラスターレベルの発現誘導機構の解明に向け、今後の研究の進展が期待される。

おわりに

例えばアブシジン酸では生合成酵素の一つ 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase

が内生量調節の律速と考えられていることからわかるように、植物ホルモンの場合は内生量を増加させるためには全ての酵素を増加させる必要はないことが多い。ところが、ストレス誘導性のイネのファイトアレキシン生合成では前述のように全ての生合成遺伝子の発現が増加するので、人為的にそれらファイトアレキシン内生量を調節するにはDPFのような転写因子を操ることが大事となる。では、モミラクトンなどファイトアレキシンを高蓄積するイネを作出できれば、いもち病や水田雑草に強いイネとなるのであろうか？モミラクトンは、他の植物や病原菌など多くの生物に対して生育阻害活性を有するが、イネ自身に対してはある濃度範囲では無害であり、その耐性機構は不明である。筆者らはモミラクトン排出に関するトランスポーターが耐性機構の一つであるという可能性を考え、その遺伝子同定を目指して探索しているが未だ成功していない。非常事態に生産誘導されるファイトアレキシンを常時蓄積させることはイネにとって病害抵抗は上がるものの、生長には悪い影響があるかもしれない。一般的に、病害抵抗と生長は拮抗的な生理現象と考えられている。どのようなストレスに対しても素早く大量にファイトアレキシン生合成遺伝子を発現（ファイトアレキシン生産）誘導できるシステムの構築が期待される。そのためにはまだ解明しなければならない機構は山積みであり、我々はその頂きを目指す登山を始めたばかりである。

引用文献

- Ahuja, I. *et al.* 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.*, 17, 73-90.
- Akagi, A. *et al.* 2014. WRKY45-dependent priming of diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and the role of cytokinin in triggering the reaction. *Plant Mol. Biol.*, 86, 171-183.
- Akatsuka, T. *et al.* 1985. Novel phytoalexins (oryzaalexins A, B and C) isolated from rice blast leaves infected with *Piricularia oryzae*. Part I. isolation, characterization and biological activities of oryzaalexins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 49, 1689-1694.
- Cartwright, D. W. *et al.* 1981. Isolation and characterization of two phytoalexins from rice as momilactones A and B. *Phytochemistry*, 20, 535-537.
- Chujo, T. *et al.* 2014. Overexpression of phosphomimic mutated OsWRKY53 leads to enhanced blast resistance in rice. *PLOS ONE*, 9, e98737.
- Fu, J. *et al.* 2015. A tandem array of *ent*-kaurene syntheses in maize with roles in gibberellin and more specialized metabolism. *Plant Physiol.*, 170, 742-751.
- Harris, L. J. *et al.* 2007. The maize An2 gene is induced by *Fusarium* attack and encodes an *ent*-copalyl diphosphate synthase. *Plant Mol. Biol.*, 59, 881-894.
- Hasegawa, M. *et al.* 2010. Phytoalexin accumulation in the interaction between rice and the blast fungus. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 23, 1000-1011.
- Horie, K. *et al.* 2015. Identification of UV-induced diterpenes including a new diterpene phytoalexin, phytocassane F, from rice leaves by complementary GC/MS and LC/MS approaches. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4050-4059.
- Inoue, Y. *et al.* 2013. Identification of a novel casbene-type diterpene phytoalexins, *ent*-10-oxodepressin, from rice leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 760-765.
- Kato, H. *et al.* 1993. Oryzaalexin E, a diterpene phytoalexin from UV-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, 33, 79-81.
- Kato, H. *et al.* 1994. Oryzaalexin F, a diterpene phytoalexin from UV-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, 36, 299-301.
- Kato, T. *et al.* 1973. Momilactones, growth inhibitors from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron Lett.*, 14, 3861-3864.
- Kato-Noguchi, H. *et al.* 2002. Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. *Physiol. Plant.*, 115, 401-405.
- Kishi-Kaboshi, M. 2010. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant J.*, 63, 599-612.
- Kitaoka, N. *et al.* 2015. The application of synthetic biology to elucidation of plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. *Mol. Plant*, 8, 6-16.
- Koga, J. *et al.* 1995. Phytocassanes A, B, C and D, novel diterpene phytoalexins from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron*, 51, 7907-7918.
- Koga, J. *et al.* 1997. Functional moiety for the antifungal activity of phytocassane E, a diterpene phytoalexin from rice. *Phytochemistry*, 44, 249-253.
- Kono, Y. *et al.* 1984. Absolute configuration of oryzaalexin A and structures of its related phytoalexins isolated from rice blast leaves infected with *Piricularia oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 253-255.
- Miyamoto K. *et al.* 2014a. Overexpression of the bZIP transcription factor OsbZIP79 suppresses the production of diterpenoid phytoalexin in rice cells. *J. Plant Physiol.*, 173C, 19-27.
- Miyamoto K. *et al.* 2014b. Identification of

- target genes of the bZIP transcription factor OsTGAP1, whose overexpression causes elicitor-induced hyperaccumulation of diterpenoid phytoalexins in rice cell. *PLOS ONE*, 9, e105823.
- Miyamoto, K. *et al.* 2016. Evolutionary trajectory of phytoalexin biosynthetic gene clusters in rice. *Plant J.*, 87, 293-304.
- Okada, A. *et al.* 2009. OsTGAP1, a bZIP transcription factor, coordinately regulates the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice. *J. Biol. Chem.*, 284, 26510-26518.
- Okada, K. 2011. The biosynthesis of isoprenoids and the mechanisms regulating it in plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1219-1225.
- Otomo, K. *et al.*, 2004. Biological functions of *ent*- and *syn*-copalyl diphosphate synthases in rice: key enzymes for the branch point of gibberellin and phytoalexin biosynthesis. *Plant J.*, 39, 886-893.
- Peters, R. J. 2006. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. *Phytochemistry*, 67, 2307-2317.
- Sakamoto, T. *et al.* 2004. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.*, 134, 1642-1653.
- Sekido, H. *et al.* 1986. Oryzalexin D (3,7-dihydroxy(+)-sandaracopimaradiene), a new phytoalexin isolated from blast infected rice leaves. *J. Pestic. Sci.*, 11, 369-372.
- Shimura, K. *et al.* 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster in rice for momilactones. *J. Biol. Chem.*, 282, 34013-34018.
- Tamogami, S. *et al.* 1993. Oryzalexin S structure: a new stemarane-type rice plant phytoalexin and its biogenesis. *Tetrahedron*, 49, 2025-2032.
- Toyomasu, T. 2008. Recent advances regarding diterpene cyclase genes in higher plants and fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1168-1175.
- Toyomasu, T. *et al.* 2008. Diterpene phytoalexins are biosynthesized in and exuded from roots of rice seedlings. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 562-567.
- Toyomasu, T. and Sassa, T. 2010. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, Vol. 1. Oxford: Elsevier, pp. 643-672.
- Toyomasu, T. *et al.* 2014. Reverse-genetic approach to verify physiological roles of rice phytoalexins: characterization of a knockdown mutant of *OsCPS4* phytoalexin biosynthetic gene in rice. *Physiol. Plant.* 150, 55-61.
- Toyomasu, T. *et al.* 2015. Transcripts of two *ent*-copalyl diphosphate synthase genes differentially localize in rice plants according to their distinct biological roles. *J. Exp. Bot.* 66, 369-376.
- Wu, Y. *et al.* 2012. Functional characterization of wheat copalyl diphosphate synthases sheds light on the early evolution of labdane-related diterpenoid metabolism in the cereals. *Phytochemistry*, 84, 40-46.
- Xu, M. *et al.* 2012. Genetic evidence for natural product-mediated plant-plant allelopathy in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.*, 193, 570-575.
- Yajima, A. and Mori, K. 2000. Diterpenoid total synthesis. XXXII. Synthesis and absolute configuration of (-)-phytocassane D, a diterpene phytoalexin isolated from the rice plant, *Oryza sativa*. *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 4079-4091.
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 59, 225-251.
- Yamamura, C. *et al.* 2015. Diterpenoid phytoalexin factor, a bHLH transcription factor, plays a central role in the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in rice. *Plant J.*, 84, 1100-1113.
- Yokotani, N. *et al.* 2013. OsWRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *J. Exp. Bot.*, 64, 5085-5097.
- Zhou, K. *et al.* 2012. Functional characterization of wheat *ent*-kaurene(-like) synthases indicates continuing evolution of labdane-related diterpenoid metabolism in the cereals. *Phytochemistry*, 84, 47-55.