

博士論文

論文題目

植物免疫としての活性酸素発生の制御機構に関する研究

2014年3月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科
バイオサイエンス専攻 バイオ科学技術領域

学籍番号 511303

氏名 神村 麻友

目次

目次	2
序論	3
第 1 章 <i>A. avenae</i> N1141 菌株のフラジェリン認識によって誘導される活性酸素発生の制御機構の解析	
1-1 緒言	12
1-2 材料および方法	13
1-3 結果	32
1-4 考察	55
第 2 章 OsCPK12 による活性酸素発生の制御機構の解析	
2-1 緒言	59
2-2 材料および方法	60
2-3 結果	79
2-4 考察	112
参考文献	116
謝辞	126

序論

日本の農業は危機的な状況にある。1960年に農作物の輸入自由化が始まることで、GDPに占める農業の割合は9%から今日では1%にまで減少した（農林水産省、2010）。現在、米や小麦などの重要品目に高い関税を掛けることで、日本農業の保護を行っているが、2013年のTPPへの参加表明によって今後農作物貿易の自由化が加速して、日本農業は深刻な打撃を被ると予想される。

農産物貿易の自由化から日本の農業を守るためには、日本の農産物に海外に対抗できる競争力をつけることであろう。しかし、日本の国土は狭く、大規模農業には向かないため、アメリカやオーストラリアなどの大規模農業を行う国に比べて生産コストが高くなる。さらに、日本では農家一戸当たりの面積がEUの9分の1、アメリカの99分の1、オーストラリアの1862分の1となっており、計画的な生産や集約的な生産が難しい（農林水産省、2013）。加えて、農業従事者の平均年齢は65.8歳であり、自営農業に投入される労働力は年々減少の一途を辿っている。このように生産性や生産コスト面では外国の農産物に対応できないので、日本では味や品質の良い農作物をブランド化し、付加価値を付けることで輸入農作物との差別化を進めている。そのブランド化の一つとして、無農薬や減農薬野菜が挙げられる。現在日本では、無農薬野菜や減農薬野菜は特別栽培農産物に分類され、無農薬野菜は農薬を使用せずに栽培した農産物、減農薬野菜は農薬の使用回数が当該地域で使用されている回数のおおむね5割以下で栽培された農産物として定義されている。これらの野菜は一般的な野菜に比べて3割～5割程度高いが、ここ数年、海外でも健康志向な消費者が増え、日本の無農薬野菜や減農薬野菜などを購入する人が増加している。

低農薬や減農薬栽培は日本の農産物にブランド力を付与するが、安易に農薬を減らした農産物栽培は新たな問題を引き起こすことが近年明らかになっている。低農薬や減農薬で栽培することにより、土壤中に存在する薬剤に対して比較的感受性の低い菌を完全に駆除出来ず、薬剤低感受性の菌が生き残る。これを、毎年繰り返すことにより、特定の薬剤に対して耐性を示す薬剤耐性菌が蔓延する。事実、減農薬や低農薬栽培等により、ナシ黒斑病菌に使用するポリオキシシンやイネいもち病に使用するカスガマイシンなど多くの薬剤耐性菌が見つかっており、これらの薬剤耐性菌によって農家は大きな被害を受けている。現在では、このような薬剤耐性菌の発生を抑えるために複数の薬剤を

ローテーションで散布することが奨励されている。しかし、この方法も、薬剤耐性菌の出現が遅れるのみで完全に薬剤耐性菌を駆除することは出来ない。そこで、このような薬剤耐性菌の発生を抑制することができる薬剤の開発が進められた。これまでの殺菌剤は RNA 合成やタンパク質合成などの一部の酵素や代謝系をピンポイントに狙った薬剤が多く開発されてきた。それ故に、菌側で標的酵素の構造に変異が生じて薬剤耐性を獲得することを防ぐことが出来なかった。そこで、植物が本来有している免疫機構を活性化する方法で病害抵抗性を付与することが出来れば、これは薬剤耐性菌の発生は無くなると思われる。世界初の免疫賦活剤として開発されたプロベナゾールは、植物の抵抗性誘導のシグナル伝達系に作用し、イネ本来の抵抗性反応を誘導することでいもち病などの真菌病のみならず、イネ白葉枯病、イネもみ枯れ細菌病などの細菌病害に対しても優れた効果を発揮するこの薬剤の発売から 30 年経った現在でもこの薬剤に対する薬剤耐性菌は検出されていないことから、低農薬や減農薬栽培による農産物のブランド化には重要な農薬となるであろう。しかし、このような免疫賦活剤には植物の成長阻害を引き起こし、収量の低下を招くことが知られている。農産物にブランド力を付加する場合、生産量も落とさないことも重要となるが、この様な薬剤は未だ報告されていない。収量の低下を引き起こさない免疫賦活剤の開発のためには、植物の免疫反応システムを分子レベルで詳細に理解することが必要となるであろう。

植物の免疫システムの中で、微生物に広く保存された病原体分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns; PAMP) を認識し、誘導される免疫反応を PAMP-triggered immunity (PTI) と呼ぶ。植物の PTI を誘導する PAMP としては、これまでに細菌の鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンや糸状菌の細胞壁の主成分であるキチン、翻訳伸長因子 EF-Tu、リポ多糖 (LPS)、ペプチドグリカンなどが報告されている (Zipfel *et al.*, 2004; Kunze *et al.*, 2004; Zeidler *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2002)。

植物はこれらの PAMP をパターン認識受容体で認識し、PTI を誘導することが知られている。シロイヌナズナでは、フラジェリンの N 末端にある保存された 22 残基のアミノ酸 (flg22) を認識するパターン認識受容体である Flagellin-sensitive 2 (FLS2) が同定されている (Gómez-Gómez *et al.*, 2000)。FLS2 は細胞外にリガンドと結合するロイシンリッチリピート領域 (LRR) を持ち、細胞質内にセリン/スレオニンキナーゼドメインを有する一回膜貫通型の受容体様キナーゼ

(LRR-RLK) である。FLS2 は flg22 を認識後、速やかに他の LRR-RLK である BRI1-associated kinase1 (BAK1) と複合体を形成する (Chinchilla *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2010)。BAK1 はブラシノステロイド受容体である Brassinosteroid insensitive 1 (BRI1) と相互作用する分子として同定され、ブラシノステロイドの情報伝達にも関与することが明らかになった分子である (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002)。FLS2/BAK1 複合体は BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1 (BIK1) によってリン酸化され、このリン酸化情報が細胞内に伝達されると考えられる (Lu *et al.*, 2010)。

パターン認識受容体のリン酸化情報がどの様に細胞内に伝達されているかについては未だ詳細な知見が得られていないが、少なくとも植物の Mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードが関与することは報告されている (Meng and Zhang, 2013)。シロイヌナズナでは、PAMP 認識シグナルの伝達に関与する 2 つの MAPK カスケードが報告されている。1 つは MEKK1 が MKK1/MKK2 をリン酸化し、これらがさらに MPK4 を活性化する経路である。MPK4 は通常時、MAP kinase4 substrate1 (MKS1) と AtWRKY33 からなる複合体を形成しているが、MPK4 がリン酸化されると、MKS1/AtWRKY33 複合体が解離し、遊離された AtWRKY33 によって、抗菌物質であるカマレキシンの生合成に必要とされている *Phytoalexin deficient3* (PAD3) などの免疫応答遺伝子の転写を誘導する (J.-L. Qiu *et al.*, 2008)。2 つ目は、MEKK1 が MKK4/MKK5 を活性化し、さらにこれらの MKK によって、リン酸化された MPK3/MPK6 が WRKY22 や WRKY29 を活性化することで、*Pathogenesis-related (PR)* 遺伝子等の免疫応答遺伝子の転写促進、活性酸素の発生、過敏感細胞死などの免疫反応を誘導すると考えられている (Asai T *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2006; Nakagami *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007)。

このような PAMP 認識シグナルによって発現誘導される PR タンパク質は、病原菌の感染時に植物体内で蓄積するタンパク質の総称である (van Loon LC *et al.*, 1999)。これまでに明らかになった PR タンパク質のうち、グルカナーゼやキチナーゼなどは *In vitro* で抗菌活性を有しており、病害抵抗性に寄与することが示されている (van Loon LC *et al.*, 1999)。これらの PR タンパク質の多くはシグナルペプチドを有しており、小胞輸送を介して細胞外に分泌されると予想されている。一般的に、分泌シグナルを持つタンパク質は翻訳された後、小胞体へ送られ、次に小胞体からゴルジ体へ輸送される。そして、ゴル

ジ体から分泌小胞として標的膜へと輸送される。小胞体-ゴルジ体輸送の分泌小胞の形成に関わる分子である ARF-GTP exchange factor (ARF-GEF) はコート小胞の形成に関わる ADP ribosylation factor (ARF) を不活性な GDP 型から活性型の GTP 型に変換し、ARF のコンフォメーション変化を引き起こす。これにより ARF の N 末端に存在するミリストイル基が露出し、小胞膜に会合するようになる。膜に会合した ARF はシスゴルジでは COPI 複合体、トランスゴルジネットワークでは AP-1 複合体や GGA のようなコートタンパク質をリクルートする。次にコートタンパク質が積み荷膜タンパク質の輸送シグナルを認識して集合させることで脂質二重膜が変形して、輸送小胞の出芽が起こる。この出芽のくびれた部分が切り取られて、輸送小胞が完成する。これまでに、シロイヌナズナの ARF-GEF である GNOM はうどんこ病菌である *Blumeria graminis* f. sp. *horidei* (*Bgh*) の植物細胞内へ侵入抵抗性へ関与することが報告されている (Henrik Böhlenius *et al.*, 2010)。また、オオムギの ADP ribosylation factor 1 A1b/1c (ARFA1b/1c) の一過的な遺伝子抑制では、*Bgh* の侵入の成功率の上昇や免疫反応の一種であるカロースの沈着の減少が報告されていることから (Böhlenius *et al.*, 2010)、輸送小胞の構成因子が侵入抵抗性に関与することが予想されている。さらに、ゴルジ体から分泌された小胞の標的膜への輸送に関わる vesicle-associated soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) の *AtSNAP33* は病原菌によって発現誘導され、*AtSNAP33* は *PR1a* と協調して発現していることから (Wick *et al.*, 2003)、病原菌認識後、免疫に関連した小胞輸送のためにこのような遺伝子の発現を誘導していると考えられている。さらに、別の SNARE タンパク質である PEN1-Syntaxin は SNAP33、VAMP721/722 と SNARE 複合体を形成することで、*Bgh* の侵入サイトに正確に局在し、病原菌の侵入の阻止に関与している。(Kwon *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2003; Assaad *et al.*, 2004; Bhat *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2008)。このように、小胞輸送が免疫に関与していることが明らかになりつつあるが、詳細なメカニズムや制御機構については未だ不明なままである。

パターン認識受容体からのシグナル伝達によって誘導される免疫反応の一つに一過的な活性酸素の発生がある。この活性酸素の発生は *rboh* (Respiratory burst oxidase homologue) と呼ばれる NADPH オキシダーゼを介して誘導されており、病原菌認識後、極めて早い段階

に認められるのが特徴である。この系では、細胞膜外の間隙であるアポプラストに活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) を発生させる。この発生した O_2^- は、すぐに Superoxide dismutase (SOD) によって、過酸化水素 (H_2O_2) に変換される。この H_2O_2 は直接的な殺菌作用、細胞壁でのヒドロキシプロリンに富む糖タンパク質の酸化的架橋反応の促進、PR タンパク質を誘導するサリチル酸生合成経路の活性化を引き起こし、病原菌の増殖および進入阻害に寄与していることが示されている (Bradley *et al.*, 1992; Leon *et al.*, 1995; Yoshioka *et al.*, 2004)。rboh はヒトの好中球にある NADPH オキシダーゼの活性中心である gp91^{phox} と相同性を有する分子であり、6ヶ所の膜貫通領域、FAD 結合部位および NADPH 結合部位、電子を受け渡すヘムとの結合に必要な4つのヒスチジン残基が保存されている。しかし、植物の rboh はヒト gp91^{phox} とは異なり、細胞質に存在すると考えられる N 末端親水性領域を持っており、この領域には Ca^{2+} と特異的に結合する2つの EF hand モチーフが存在する (Keller *et al.*, 1998)。動物の好中球やマクロファージに存在する NADPH オキシダーゼは、細胞膜に存在するシトクロム b_{558} (gp91^{phox}、p22^{phox}) と細胞質因子 (p67^{phox}、p47^{phox}、small GTPase Rac2) から構成される複合酵素体である。この酵素は p47^{phox} がある種の刺激に反応してリン酸化され、p67^{phox}、Rac2 と共に細胞膜に移行した後、細胞膜因子と複合体を形成して活性化する。活性化した NADPH オキシダーゼは、細胞質の NADPH の酸化と共役して、細胞外の酸素分子 (O_2) を1電子還元してスーパーオキシド (O_2^-) を生成する。好中球やマクロファージは病原菌をエンドサイトーシスにより取り込み、細胞内でこの活性酸素種を用いて殺菌を行っている (Babior, 2004)。一方、植物には Rboh と Rac2 とホモロジーを有する Rac/Rop GTPase、OsRac1 以外の活性化因子は存在しない (Torres *et al.*, 2005)。OsRac1 はコシャペロンである RAR1、SGT1、Hsp70、Hsp90、Hop/Sti1、足場タンパク質である OsRACK1、リグニン合成酵素である OsCCR1 のような様々なタンパク質と相互作用し、複合体を形成していることが報告されている (Kawasaki *et al.*, 2006, Thao *et al.*, 2007, Nakashima *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2010)。さらに、OsRac1 は活性酸素種のスキャベンジャーである MT2b の発現を抑制することから、活性酸素種の発生を調節していることが示唆されている (Wong *et al.*, 2007, Wong *et al.*, 2004)。また、Rboh の活性は N 末端部位のリン酸化と EF hand モチーフへの Ca^{2+} の結合によって制御されていることも示されている

(Ogasawara *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2012)。これらのことから、植物における NADPH oxidase を介した活性酸素の発生とその制御機構は、動物とは異なることが示されている。

当研究室では、褐条病細菌 *Acidovorax avenae* を用いて病原菌の認識及び免疫反応誘導機構について研究を行ってきた。*A. avenae* はイネ等の単子葉植物を宿主とするグラム陰性の植物病原細菌であり、本菌に感染したイネは葉鞘から葉身にかけて褐色の細長い条斑が現れ、個体の衰弱や成長抑制、葉鞘の屈曲や倒状、枯死といった病徴を示す (Kadota, 1990)。この菌の特徴は、それぞれの菌株の宿主特異性が植物の種レベルで厳密であり、一つの菌株が感染できる植物種はほぼ一種に限定されていることである。例えば、イネを宿主とする K1 菌は、イネには感染できるが、イネ以外の植物種には感染できず、また、シコクビエを宿主とする N1141 菌はシコクビエ以外の植物種に感染することはできない。これまでの研究で、*A. avenae* のイネに対して非病原性である N1141 菌株をイネに接種した場合、核 DNA のラダー化や細胞膜収縮といった動物のアポトーシス様の形態変化を伴う過敏感細胞死や活性酸素の発生、免疫反応に関与すると考えられている *EL2*、*EL3*、抗菌性物質であるファイトアレキシン合成に関与する *PAL*、キチナーゼをコードする *Cht-1*、ジャスモン酸の生成に関与するリポキシゲナーゼをコードする *LOX*、*PBZ-1* 等の抵抗性関連遺伝子の発現等の一連の免疫反応が誘導されることが示された。一方、イネに対して病原性である K1 菌株を接種した場合にはこのような免疫反応は誘導されないことから、この菌のイネに対する宿主特異性にはイネによる病原菌の認識と免疫反応誘導が関与することが明らかとなった (Che *et al.*, 1999; Iwano *et al.*, 2002)。さらに、非病原性 N1141 菌株と病原性 K1 菌株のイネによる特異的な認識に関わる物質として、鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンが同定された。非病原性 N1141 菌株のフラジェリンをイネ培養細胞に処理すると活性酸素種発生や、*EL2* や *EL3* 等の抵抗性関連遺伝子の発現が誘導されるが (Minami *et al.*, 1996)、病原性 K1 菌株のフラジェリンを処理してもこのような抵抗性反応は誘導されなかった (Che *et al.*, 2000)。このことから、この菌のフラジェリンはイネに対して特異的な免疫反応を誘導する物質であることが明らかになった。

シロイヌナズナではフラジェリンの N 末端共通部分から合成された 22 アミノ酸からなる flg22 が FLS2 によって認識され MAPK カスケードを介してその情報が伝達されることが知られている。興味深い

ことに、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンはシロイヌナズナに対して免疫反応を誘導するが、*flg22* はイネに対して顕著な免疫反応を誘導しないことが示された。さらに、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンの様々な部分を大腸菌で発現させ、それぞれのドメインにおける免疫誘導活性を調べたところ、イネはシロイヌナズナとは異なりフラジェリンの *flg22* 部位ではなく、C 末端部分を認識することが明らかになった。また、シロイヌナズナにおいて *flg22* の認識受容体である *FLS2* のイネオルソログは存在しているものの、実際のフラジェリン認識にはほとんど関与しておらず、イネには *FLS2* とは異なるフラジェリン受容体が存在していることが示された。さらに、イネに疑似リン酸化された *OsMKK^{DD}* を過剰発現させると活性酸素の発生は誘導されず、細胞死のみが誘導されるが、タバコに *OsMKK^{DD}* を過剰発現させると活性酸素の発生と細胞死の両方が誘導されることが報告された (Kishi-Kaboshi *et al.*, 2010)。以上のことは、イネはタバコやシロイヌナズナとは異なるフラジェリンの認識機構とその情報伝達機構を有することを示している。しかし、イネにおけるフラジェリンの認識とその情報伝達機構、および免疫反応誘導の機構についてはほとんど明らかになっていない。イネにおける耐病性機構を明らかにするためには、特に、病原菌の認識情報がどのように細胞内に伝達されるのかを明らかにすることが非常に重要となる。そこで本研究では、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン認識のイネ細胞内情報伝達機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

まず第 1 章では、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン認識によって誘導される活性酸素発生の制御機構を調べるため、様々な情報伝達阻害剤が活性酸素発生に与える影響を調べた。その結果、フラジェリン認識後の活性酸素の発生には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とタンパク質のリン酸化が関与していることが示唆された。さらに、 Ca^{2+} 依存的にタンパク質をリン酸化する Calcium-dependent protein kinase (CPK) を調べることにより、免疫反応誘導時に発現誘導される 6 つの *OsCPK* 遺伝子を明らかにすると共に、*OsCPK12* によって活性酸素の発生が制御されていることを示した。第 2 章では、*OsCPK12* の活性酸素発生の制御機構を明らかにするため、*OsCPK12* の基質を探索した。まず、キナーゼと基質のような一過的な相互作用を検出することが出来る検定系を構築した。この検定系を用いて *OsCPK12* の基質分子を探索したところ、*OsrbohA* と Syntaxin-like protein13b (*OsSYP13b*) を基質候補タンパク質として同定した。さらに、植物細

胞内において **OsCPK12** と **OsrbohA**、**OsSYP13b** との相互作用を **BiFC** 法により解析した結果を示すと共に、**OsCPK** はカルモジュリン様ドメインに Ca^{2+} が結合しないと活性化されないため、キナーゼ以降を欠損させた **OsCPK12** 恒常活性体や、活性中心のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した **OsCPK12** の変異体を用いて相互作用を解析した結果についても述べる。これらの結果を踏まえて、植物免疫における情報伝達機構について議論していきたい。

第 1 章

A. avenae N1141 菌株のフラジェリン認識によって誘導される
活性酸素発生の制御機構の解析

第 1 章 *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン認識によって誘導される活性酸素発生の制御機構の解析

1-1 緒言

A. avenae 非病原性 N1141 菌のフラジェリンは、イネに対して過敏細胞死や活性酸素種発生の誘導、*EL2* や *EL3* 等の抵抗性関連遺伝子の発現などの植物免疫反応を誘導する特異的なエリシターとして作用することが報告されている (Minami *et al.*, 1996)。N1141 菌株のフラジェリンが誘導するこのような免疫反応の中でも、活性酸素の発生はフラジェリン認識後、比較的早期に誘導され、直接的な殺菌作用、細胞壁でのヒドロキシプロリンに富む糖タンパク質の酸化的架橋反応の促進、PR タンパク質を誘導するサリチル酸生合成経路の活性化を引き起こすことで、病原菌の増殖および進入阻害に寄与することが示されている (Bradley *et al.*, 1992; Leon *et al.*, 1995; Yoshioka *et al.*, 2004)。そこで、第 1 章では、この活性酸素発生の制御機構を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

1-2 材料および方法

1. イネ培養細胞の培養と継代

イネ培養細胞は、Oc 細胞 (*Oryza sativa* L. C5924) を用いた (Baba *et al.*, 1986)。培養細胞は 100 ml 三角フラスコに R2S 培地 (39.6 mM KNO₃、2.5 mM (NH₄)₂SO₄、1.0 mM MgSO₄·7H₂O、1.0 mM CaCl₂·2H₂O、1.7 mM NaH₂PO₄·2H₂O、20.1 μM EDTA·2Na (DOJINDO)、19.8 μM FeSO₄·7H₂O、6.6 μM MnSO₄·4H₂O、7.7 μM ZnSO₄·4H₂O、0.5 μM CuSO₄·5H₂O、48.5 μM H₃BO₃、0.6 μM NaMoO₄·2H₂O、1% [w/v] Murashige and Skoog vitamin powder [Sigma]、18 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid、87.6 mM Sucrose、pH 5.6) 20 ml を入れ、そこに、培養後 7 日目の培養細胞液 2 ml を加え、培養温度 30°C、108 rpm、連続光下で振盪培養を行った。細胞は一週間ごとに植え継ぎ、継代から 4 日目のものを実験に用いた。

2. 細菌とその保存・培養条件

植物病原細菌の *Acidovorax avenae* イネから単離された K1 菌株 (MAFF 301755; イネ親和性) (Fukumoto *et al.*, 1997) と、シコクビエから単離された N1141 菌株 (MAFF 301141; イネ非親和性) (Che *et al.*, 2000; Kadota *et al.*, 1996) を用いた。菌体の保存のため、各菌株は *Pseudomonas* agar F 寒天培地 (1% [w/v] Bacto Tryptone [BD]、1% [w/v] Protease Peptone No. 3 [BD]、0.15% [w/v] K₂HPO₄、0.15% [w/v] MgSO₄、1.5% [w/v] Bact™ agar [BD]) 上で 30°C、一晩培養し、スキムミルク培地 (10% [w/v] Skim milk powder、1.5% [w/v] L-glutamic acid monosodium salt) 1 ml に懸濁した。これを 50 μl ずつ分注後、-80°C で凍結保存し、これをストック菌株とした。

3. イネ培養細胞への接種

A. avenae のストック菌株 50 μl を *Pseudomonas* F 寒天培地に塗布し、30°C で一晩培養した。この菌体を白金耳で掻き取り滅菌水中に懸濁し、分光光度計により波長 610 nm の吸光度を測定し、下記の式を用いて菌体数を概算した (Tsuge, 1997)。概算後、懸濁液を 1.0×10⁷ cfu/μl に調整し、イネ培養細胞へ終濃度 1.0×10⁸ cfu/ml になるように接種した。

$$[\text{cfu}/\mu\text{l}] = (\text{OD}_{610} - 0.0797) / 3.78 \times 10^8 \times (\text{希釈倍率}/50)$$

4. プラスミドの作製

1) *OsCPK* RNAi 形質転換体作製用のコンストラクトの作製

各 *OsCPK* の RNAi 株を作製するため、*OsCPK* ファミリー内で比較的保存性の低い ORF の 3'側と 3' UTR を含む領域を増幅するプライマーを設計した (Fig. 7)。また、作製したプライマーを用いて各遺伝子を増幅した場合、*Oriza sativa* 内の他の遺伝子と相同性がほとんどないことを NCBI のデータベースから Blast N で確認した (Data not shown)。この作製したプライマーを用いてイネ培養細胞の cDNA をテンプレートとして PCR 反応を行った。反応液 (10×PCR buffer for Blend Taq 2 µl、2 mM dNTPs 2 µl、Blend Taq [TOYOBO] 0.08 µl、滅菌水 13.2 µl、10 µM Primer F 1 µl、10 µM Primer R 1 µl、Total vol. 20 µl) を調製して、94°C 2分、(96°C 30秒、55°C 1分、72°C 1分30秒) ×30 サイクルで PCR を行った。PCR 後、PCR 反応液 3 µl を 1.25% TAE Agarose ゲルにアプライし、100 V で約 25 分電気泳動を行い、*OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK10*、*OsCPK12*、*OsCPK13*、*OsCPK19* の増幅断片が 522 bp、520 bp、490 bp、527 bp、515 bp、542 bp となることを確認した。増幅した PCR 産物を pENTR-D-TOPO cloning kit (Invitrogen) を用いて *pENTR-D-TOPO* vector へライゲーションした。DH5α コンピテントセル 50 µl に上記のライゲーション溶液を 2 µl 加え、緩やかに攪拌し氷上で 20 分間静置した後、42°C で 50 秒間ヒートショック、氷上で 2 分静置し、SOC 培地 (2% Bacto™ Tryptone、0.5% Bacto™ Yeast Extract、85 mM NaCl、20 mM Glucose、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、pH7.0) 950 µl を加えて 37°C で 1 時間振盪培養した。これを LB 寒天培地 (カナマイシン終濃度 50 µg/ml) に塗布し、37°C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。挿入断片が確認された PCR 産物 5 µl に ExoSAP-IT (GE Healthcare) を 2 µl 加え、37°C で 30 分反応させた後、80°C で 15 分間処理することで失活させた。サイクルシーケンス反応溶液 (BigDye Premix [Applied Biosystems] 2.5 µl、ExoSAP-IT 処理済み PCR 産物 2 µl、1 µM primer F 1 µl) を調製し、(96°C 10秒、50°C 5秒、60°C 4分) ×40 サイクルの条件でサイクルシーケンス反応を行った。反応終了後、反応液に 250 mM EDTA を含む 1.5M 酢酸ナトリウム溶液 (pH8.0) 1 µl、99.5% エタノール 25 µl 加え、Vortex でよく攪拌して 15 分静置した。15,300×g、室温、TOMY MX300 (TOMY) を用いて 15 分間遠心分離

を行った後、上清をデカントで取り除き、70%エタノール 100 μ l を加え、転倒混和し、15,300 \times g、室温で 10 分間 TOMY MX300 を用いて遠心分離を行った。上清を取り除き、沈殿を風乾した後、Hi-Di Formamide (ABI) を 25 μ l 加えた。この溶液を 96-well Reaction Plate に移し、MicroAmp Full Plate Cover (Applied Biosystems) で蓋をした。95 $^{\circ}$ C、2 分熱処理を行い、直ちに氷中で急冷した後、DNA シークエンサー (3130 genetic analyzer) で配列解析を行った。目的導入遺伝子の配列と完全一致する遺伝子を持つプラスミドをエントリークローンとした。作製したエントリークローン (*OsCPK7_RNAi/pENTR*、*OsCPK8_RNAi/pENTR*、*OsCPK10_RNAi/pENTR*、*OsCPK12_RNAi/pENTR*、*OsCPK13_RNAi/pENTR*、*OsCPK19_RNAi/pENTR* [100 ng/ μ l]) 1.5 μ l、デスティネーションベクター (*pANDA* [100 ng/ μ l]) 1.5 μ l、TE buffer 5 μ l に、LR clonase Enzyme Mix kit (Invitrogen) の LR clonase enzyme mix を 2 μ l 加え、室温で 1 時間静置した。その後 Proteinase K を 1 μ l 入れ、37 $^{\circ}$ C、10 分間静置することにより反応を停止させた。その反応液 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換後、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。生育してきたコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。目的遺伝子の増幅が見られたコロニーを LB 液体培地 (カナマイシン終濃度 50 μ g/ml) 3 ml で 37 $^{\circ}$ C 一晚振盪培養し、4,200 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心分離した。菌体を回収後、QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを単離した。これらのプラスミドをそれぞれ、DNA シークエンサーで配列解析し、目的導入遺伝子と完全一致する配列を有するプラスミドを *OsCPK RNAi* 形質転換体作製のコンストラクトとした。このようにして作製したコンストラクトを *OsCPK7_RNAi/pANDA*、*OsCPK8_RNAi/pANDA*、*OsCPK10_RNAi/pANDA*、*OsCPK12_RNAi/pANDA*、*OsCPK13_RNAi/pANDA*、*OsCPK19_RNAi/pANDA* と名付けた。

使用したプライマーセット

目的遺伝子断片を増幅するためのプライマーセット

< *OsCPK7* >

Forward : 5'-TGGAGAACATAACATGGAGG-3'
Reverse : 5'-GGAACGCAAGCATTGAGATT-3'

< *OsCPK8* >

Forward : 5'-AGAGCTTAGAGAGGCCTTGG-3'

Reverse : 5'-AGAATTTACGCCGCTTGTA-3'

< *OsCPK10* >

Forward : 5'-GGTGAGTTCATCGCTGCAA-3'

Reverse : 5'-CAATCGAACCAATGACCCAA-3'

< *OsCPK12* >

Forward : 5'-TCGGAGTTCCTCACAGCTAT-3'

Reverse : 5'-TGTCATTGACGCTTCAACTGA-3'

< *OsCPK13* >

Forward : 5'-AGAGGAACATCTTGTGGCAG-3'

Reverse : 5'-TACGAGCTAGTTCACCGAAC-3'

< *OsCPK19* >

Forward : 5'-GCAGGATTAGCCAAACTTGG-3'

Reverse : 5'-ATCACTACACCATACACGGG-3'

コロニーPCR用のプライマーセット

< *pENTR-D-TOPO* >

Forward : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

Reverse : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

< *pANDA* >

・ *GUS* linker

Forward : 5'-CATGAAGATGCGGACTTACG-3'

Reverse : 5'-ATCCACGCCGTATTCGG-3'

・ *HPT II*

Forward : 5'-GAGCCTGACCTATTGCATCTCC-3'

Reverse : 5'-CATGAAGATGCGGACTTACG-3'

2) *OsCPK12* 過剰発現体のコンストラクトの作製

OsCPK12 とカルモジュリン様ドメインをトランケートとした *OsCPK12CA* の ORF 領域を増幅するために *OsCPK12* (J075191E21) のイネ完全長 cDNA クローン (独立行政法人 農業生物資源研究所から分与) をテンプレートに用いて PCR 反応液 (PrimeSTAR buffer 4 μ l、2 mM dNTPs 2 μ l、PrimeSTAR Taq [Takara] 0.1 μ l、滅菌水 13.1 μ l、10 μ M Primer F 0.4 μ l、10 μ M Primer R 0.4 μ l、Total vol. 20 μ l) を調製して、98°C 5分、(98°C 30秒、55°C 15秒、72°C 2分30秒) \times 30 サイクル、72°C 5分の条件で PCR を行い、目的の断片が増幅しているかを確認した。増幅した PCR 産物を pENTR-D-TOPO cloning kit (Invitrogen) を用いて *pENTR-D-TOPO* vector へライゲーションした。上記のライゲーション反応液 3 μ l を DH5 α に加えて、ハナハン法で形質転換した後、LB 寒天培地 (カナマイシン終濃度 50 μ g/ml) に塗布し、37°C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。確認出来た PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認し、エントリークローンとした。作製したエントリークローン (*OsCPK12_sc/pENTR*、*OsCPK12CA_sc/pENTR*) とデステイネーションベクター (*pMDC32*) を用いて LR clonase 反応を行い、その反応液を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換後、37°C で一晩培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。目的断片の増幅が見られたコロニーを LB 液体培地 (カナマイシン終濃度 50 μ g/ml、ハイグロマイシン終濃度 50 μ g/ml) 3 ml で 37°C 一晩振盪培養し、4°C、4200 \times g、5分間遠心分離した。菌体を回収後、QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを単離した。これらのプラスミドの配列を DNA シークエンサーで解析し、目的導入遺伝子と完全一致する配列を有するプラスミドを過剰発現体作製のコンストラクトとした。このようにして作製したコンストラクトを *OsCPK12_sc/pMDC32*、*OsCPK12CA_sc/pMDC32* と名付けた。

使用したプライマーセット

目的遺伝子断片を増幅するためのプライマーセット

< *OsCPK12* >

Forward : 5'-CACCATGGGCAACTGCTTCACCAA-3'

Reverse : 5'-TCAGGTTTGTATTCCTTTCCTCATCA-3'

< *OsCPK12CA* >

Forward : 5'-CACCATGGGCAACTGCTTCACCAA-3'

Reverse : 5'-TCAGAGCCATCGATGTTCTAAGGCCT-3'

コロニーPCR用のプライマーセット

< *pENTR-D-TOPO* >

Forward : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

Reverse : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

< *pMDC32* >

Forward : 5'-ATTATCGAACCACCTTTGTACAAGAAA-3'

Reverse : 5'-GCCAAGCTATCAAACAAGTTTGTACA-3'

5. フラジェリンの精製

LB 液体培地を 350 ml 分注した三角フラスコ 3 本に、それぞれ *A. avenae* のストック菌株を接種し、30℃で 36 時間振盪培養した。培養後、各培養液を 250 ml 遠心管に入れ、6,000×g、4℃、30 分間、himac CR 20G (HITACHI) を用いて遠心分離し、培地を取り除いて菌体を回収した。菌体に、氷冷 25 mM TBS (137 mM NaCl、8.1 mM Na₂HPO₄、2.68 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄) を遠心管 1 本につき 50 ml ずつ加え懸濁し、菌体を洗浄し、再度上記の条件で遠心分離した。得られた菌体を、遠心管 1 本につき氷冷 TBS 10 ml で懸濁し、あらかじめ冷やしておいた MX-X57-P ファイバーミキサー (National) に全量移した。1 分間の切断処理後、5 分間の氷上静置を 7 回繰り返すことにより、菌体から鞭毛を分離した。菌体破砕液を 50 ml チューブ 4 本に移し、6,000×g、4℃で 30 分間 TOMY MX300 を用いて遠心分離した後、上清を 100 ml 遠心管 2 本に移し、16,000×g、4℃で 60 分間、himac CR 20G を用いて遠心分離した。得られた上清を超遠心分離用 10 ml 遠心管 4 本に移し 182,000×g、4℃で 60 分間 himac CP 70MX を用いて超遠心分離した。沈殿物を氷冷滅菌水で洗浄した後、遠心管 1 本につき氷冷滅菌水 500 μl に懸濁し、20,000×g、4℃で 20 分間 TOMY MX300

で遠心分離し、上清をフラジェリン画分として回収した。フラジェリン画分のタンパク質量は Quick start Bradford Dye Reagent (BIO-RAD) を用いて BSA で作製した検量線より濃度を算出した後、SDA-PAGE により純度を確認した。

6. 活性酸素の定量

1) GENE LIGHT GL-200 による測定

24 穴プレートに 1 ml の R2S 培地を入れ、継代 4 日目のイネ培養細胞をろ紙上で水分を除き、9.5~10.5 mg を量り取った。30℃で 1.5 時間振盪培養し、阻害剤 (2 mM EGTA、1 mM Nifedipine、5 μM Staurosporine、5 μM K252a、10 μM DPI [終濃度]) をそれぞれ加え、30 分間振盪培養後、さらに非親和性 N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM になるように処理した。コントロールとして純水を等量加えたものを用いた。培地 10 μl を測定チューブに量り取り、50 mM KH₂PO₄ (pH 7.9) 160 μl、1.1 mM ルミノール 10 μl、14 mM K₃ [Fe (CN)₆] 20 μl を加え Vortex 後、すぐに GENE LIGHT 55 (マイクロテック・ニチオン) の RLU MODE で 10 秒間化学発光を測定した。フラジェリンを加える前を 0 時間とし、フラジェリンを加えてから 30 分毎に 3 時間まで測定した。

2) PHELIOS による測定

24 穴プレートに 1 ml の R2S 培地を入れ、継代 4 日目のイネ培養細胞をろ紙上で水分を除き、9.5~10.5 mg を量り取った。30℃、2 時間振盪培養、非親和性 N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM になるように処理した。コントロールとしては純水を等量加えたものを用いた。10 μl の培地を PHELIOS (ATTO) 用 96 穴プレートに量り取り、そこに 1.1 mM ルミノール を 10 μl 加え、このプレートを PHELIOS にセットし、50 mM KH₂PO₄ (pH 7.9) 160 μl と 14 mM K₃ [Fe (CN)₆] 20 μl の混合溶液を自動分注し、10 秒間化学発光を測定した。フラジェリンを加える前を 0 時間とし、フラジェリンを加えてから 30 分毎に 3 時間まで測定した。

7. パーティクルボンバードメント法によるイネ培養細胞の形質転換

継代 4 日目のイネ培養細胞 (100 ml 容三角フラスコ 1 本分) をシャ

ーレに移して培地のみを除去し、20 ml の R2O 液体培地 (R2S 培地、165mM Mannitol、165 mM Sorbitol、pH 5.6) を加えて懸濁した。先切りチップを用いて 500 μ l の細胞懸濁液を取り、7 mm 径のろ紙の中央に細胞が重ならないように広げた。このろ紙を R2O 寒天培地 (R2O 培地、0.3% Ager) のプレート上に乗せ、30 $^{\circ}$ C、3 時間、遮光して静置培養した。次に、分注した金粒子 50 μ l に YC 3.6/pAHC17 プラスミド (藤原博士より供与) 5 μ g、2.5 M CaCl₂ 50 μ l、0.1 M Spermidine 20 μ l を加えて 3 分間攪拌した。その後、10,000 \times g で 10 秒間遠心分離して上清を除去し、99.5%エタノール (HPLC グレード) 250 μ l を加えて懸濁した。同条件で再度遠心分離し上清を除去した。上清を除去後、99.5%エタノール 50 μ l を加えて懸濁した。Macro carrier を Macro carrier holder にセットし、上記で調製した溶液をよく懸濁し Macro carrier の中央に 10 μ l 分注した。乾燥させた後、パーティクルガン Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad) 内に、1,100 psi の Rupture disk、Stopping screen と共にセットし、プラスミドを付着させた金粒子を減圧装置とヘリウムガスの圧力を利用して、イネ培養細胞に打ち込むことにより目的遺伝子を導入した。これを 30 $^{\circ}$ C、遮光して 16 時間静置し、イネ培養細胞に YC3.6 を発現させた。

8. Yellow cameleon 3.6 による細胞内 Ca²⁺動態の解析

ごく少量の YC 3.6 導入細胞を 24 \times 40 mm の Micro cover glass (Matsunami) 上に移し、N1141 菌株、K1 菌株の精製フラジェリン懸濁液 (終濃度 200nM) を加えて 18 \times 24 mm の Micro cover glass (Matsunami) を上から被せた。カバーガラスの上からやさしく押さえて細胞を均一にし、ペーパーボンドでカバーガラスを固定し、すばやく共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 (Olympus) による測定を開始した。なお、それぞれのフラジェリンは、急な浸透圧変化の影響を除くため、R2S 培地に懸濁したものを用いた。また、測定中は常に焦点がずれないように微調整し、蛍光強度が擬似的に変化するのを防いだ。YC 3.6 のスペクトルは、458 nm の励起波長で 468 nm から 548 nm の蛍光波長領域を 10 nm 間隔で、5 秒間隔で取得した。得られたデータを CFP 像と YFP 像にスプリットし、ECFP と EYFP の蛍光強度の値をそれぞれ得た。この値から EYFP/ECFP の Ratio 値を算出した。

9. イネ培養細胞のリン酸化タンパク質の検出

継代 4 日目のイネ培養細胞に EGTA (終濃度 2mM) または滅菌水を

加え、30分間振盪培養後、*A. avenae*のN1141菌株のフラジェリン（終濃度 200 nM）を加え、経時的に培養細胞を回収した。回収した培養細胞に液体窒素を加え、乳棒と乳鉢を用いてパウダー状になるまで磨砕した。予め4°Cに冷やしておいた Extraction buffer (50 mM HEPES、pH7.4、5 mM EDTA、5 mM EGTA、5mM DTT、10 mM NaF、10 mM Na₃VO₄、50 mM β-glycerophosphate、1 mM AEBSF、Protease inhibitor cocktail for plant cell and tissue extracts [SIGMA]、1% Triton-100X) 1 mlに磨砕したサンプルを全量加え、懸濁後、20,400×g、4°Cで40分間 TOMY MX300 を用いて遠心分離した。遠心分離後の上清を Elution buffer (20 mM HEPES、pH7.4、1 mM MgCl₂、1 mM NaF、11 mM Na₃VO₄、5 mM β-glycerophosphate、Protease inhibitor cocktail for plant cell and tissue extracts) で平衡化した NAP-5 カラム (GE Healthcare) に加え、その後 Elution buffer 1 ml で溶出した。この溶出画分を Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo) を用いてタンパク質定量し、タンパク質 10 μg に、等量の 2×Sample buffer (125 mM Tris-HCl、pH 6.8、4% SDS、β-mercaptoethanol、20% Glycerol、0.01% BPB) を加えた。ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO) に少量の泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1%SDS) を浸し、ミニスラブゲル作製キット (ATTO) で作製したゲル (10%分離ゲル: 10%SDS 40 μl、1.5 M Tris-HCl、pH 8.8、2.25 ml、30%Acrylamide/Bis Solution 3 ml、超純水 3.75 ml、10% APS 90 μl、TEMED 5 μl、濃縮ゲル: 10%SDS 10 μl、0.5 M Tris-HCl、pH 6.8、0.75 ml、30%Acrylamide/Bis Solution 0.45 ml、超純水 1.8 ml、10% APS 36 μl、TEMED 5 μl) をセットし、サンプルをアプライ後、100 V 定電圧で2時間 SDS-PAGE を行った。泳動後、アクリルアミドゲルの濃縮ゲルを取り除き、転写バッファー (25mM Tris、192 mM Glycine、0.05% [v/v] SDS、20%Methanol) で30分間振盪した。同様に、ゲルより一回り大きく切ったニトロセルロース膜 (PROTRAN BA85 [Whatman]) 1枚、濾紙6枚も別の転写バッファーに浸しておいた。セミドライプロッター (TRANS-BROT SD CELL [Bio-Rad]) に、転写バッファーに浸しておいたゲルや濾紙を、下から濾紙3枚、ニトロセルロース膜、アクリルアミドゲル、濾紙3枚の順に重ね、セミドライプロッターの蓋を閉め、10 V 定電圧で2時間転写を行った。転写後、TBST (20 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、0.05% [v/v] Tween 20) に移し、5分間振盪後、TBSTを捨て、ブロッッキングバッファー (TBST、5%PhosphoBLOCKER Blocking Reagent [CELL

BIOLABS, INC.]) を加え、1 時間振盪させた。ブロッキング後、TBST でニトロセルロース膜を 5 分間 5 回洗浄した。洗浄後、ブロッキングバッファーで抗リン酸化セリン抗体 (abcam) を 1/2000 に希釈した一次抗体溶液を加え、1 時間振盪後、4°C で一晩静置した。ニトロセルロース膜を 5 分間 5 回洗浄後、ブロッキングバッファーで IgG Mouse 抗体を 1/2000 に希釈した二次抗体溶液を加え、1 時間振盪した。ニトロセルロース膜を TBST で 5 分間 5 回洗浄した。洗浄液をよくきったニトロセルロース膜に ECL-prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) の A 液と B 液が 1 : 1 になるように加え、遮光して 5 分間静置後、ルミノ・イメージアナライザー LAS-4000 (FUJI FILM) を用いてバンドを検出した。すべてのレーンにタンパク質が等量アプライ出来ているかを確認するため、同様の条件で SDS-PAGE を行い、そのゲルを CBB 染色液 (0.25% CBB-250R、50% Methanol、5% CH₃COOH) に浸し、1 時間振盪後、脱色液 (25% Methanol、10% CH₃COOH) で脱色した。

10. Real time RT-PCR 法による mRNA の定量

1) SYBR green を用いた定量

A. avenae の K1 菌株、N1141 菌株それぞれをイネ培養細胞に接種後、経時的に細胞を回収し、これらイネ培養細胞から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出した。各目的遺伝子の発現確認のため、150 bp 程度の PCR 産物が得られるようにプライマーを設計し、QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて反応液 (2×Quanti Tect SYBR Green PCR Master Mix 10 μl、10 mM Primer F 0.6 μl、10 mM Primer R 0.6 μl、Total RNA 100 ng、滅菌水 6.8 μl、Total vol. 20 μl) を調製後、ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) にて 50°C 30 分、95°C 15 分、(94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分) ×40 サイクルの反応条件で Real time RT-PCR 反応を行った。反応終了後、得られた増幅曲線データより、指数関数的増幅域に閾値を設定し、閾値と増幅曲線が交わる点を Ct 値として算出した。水処理 0 時間後のサンプルより得られた Ct 値をコントロールとして、 $\Delta\Delta Ct$ 法により各遺伝子の発現量比算定を行った。なお、蛍光検出方法にはインターカレーター法 (SYBR Green) を用い、PCR 反応終了後、融解曲線分析を行うことで正しい増幅が行われていることを確認した。用いたプライマーは以下に記述

する。

使用したプライマーセット

< *OsCPK1* >

Forward : 5'-GACAATGCACATGAACAGATTGGAG-3'

Reverse : 5'-GTTGGGAGCAATCTCAGGGTT-3'

< *OsCPK2* >

Forward : 5'-AGCAAGCGCTGAGGGAGAAAGG-3'

Reverse : 5'-CGTCCCGTCGCTTCTTGGGATT-3'

< *OsCPK3* >

Forward : 5'-TGGCAAGATTAGCTATGACGAA-3'

Reverse : 5'-CACTCATTGACCAGTTTTACGG-3'

< *OsCPK4* >

Forward : 5'-GCATGCAGATAAAGTTTCGGT-3'

Reverse : 5'-CAGGCAACTTTATTGCGATGA-3'

< *OsCPK5* >

Forward : 5'-AGAATTCATTGCTGCTACTCTG-3'

Reverse : 5'-ACGTCATCGAGAAAAGCATC-3'

< *OsCPK6* >

Forward : 5'-TCAATTCACAACCTCCGACTCAC-3'

Reverse : 5'-GGTACCCACATATACAAATTGCTTC-3'

< *OsCPK7* >

Forward : 5'-CTATGGAGACAATAGCATGAG-3'

Reverse : 5'-TAGAGTTACGCAAACATGAC-3'

< *OsCPK8* >

Forward : 5'-CACGCAATAGACTGGACAGAGA-3'

Reverse : 5'-ATCGCTGCTGGTAAGCACAA-3'

< *OsCPK9* >

Forward : 5'-TTGGGTTTTCCATTTTCGTCCAA-3'
Reverse : 5'-CCACCGTTACCACATAATTACACC-3'

< *OsCPK10* >

Forward : 5'-CTTGAGGATGTCTTGGGAAAC-3'
Reverse : 5'-CTCTACGCCTGTACGTACAC-3'

< *OsCPK11* >

Forward : 5'-ATGAGCTTCAAAAGGCATGT-3'
Reverse : 5'-CTATGCTGACCCATTTTACCC-3'

< *OsCPK12* >

Forward : 5'-GATTACTCGGAGTTCCTCACA-3'
Reverse : 5'-TGTCTTTGTCAACTTCATCCAG-3'

< *OsCPK13* >

Forward : 5'-TTCCTGCCCAACGAACTCCT-3'
Reverse : 5'-AGAGTTGAGCAATGGCGTACGA-3'

< *OsCPK14* >

Forward : 5'-ACCTCTACACCGCGTTCCAGT-3'
Reverse : 5'-AGCGCTTGCTCGAGCTCTTC-3'

< *OsCPK15* >

Forward : 5'-TGGTTCCATCTTAGGGAAGTGAG-3'
Reverse : 5'-AACATATGGCCAGAAAGCACAA-3'

< *OsCPK16* >

Forward : 5'-ACCCACTAAGCAGAGACCTT-3'
Reverse : 5'-CAACAAGCATGGGTACAGTGA-3'

< *OsCPK17* >

Forward : 5'-ACACAAGAAAGCCACGTACT-3'
Reverse : 5'-GTCAAAGCTTCACCGTCTCA-3'

< *OsCPK18* >

Forward : 5'-GCAAGCATGAGTTCACGCAA-3'
Reverse : 5'-CTAGCTTCAGTCCTACATGTCCA-3'

< *OsCPK19* >

Forward : 5'-CCTATGAGGCTCAAATAGTCTG-3'
Reverse : 5'-AGGACATTCAAATCACTACACC-3'

< *OsCPK20* >

Forward : 5'-AGCATTAGGTGATTGTTGGAAG-3'
Reverse : 5'-CGTGTGTTGTAAGTTCAGTCTC-3'

< *OsCPK21* >

Forward : 5'-AGCAGGAGGCTCTGCAAGGATAC-3'
Reverse : 5'-CGCATCGTGTTGCCACTCCAA-3'

< *OsCPK22* >

Forward : 5'-TCAGTTGCATAGATGACAAGGTTCA-3'
Reverse : 5'-ACATTTGGTAAGTGGATTGCATGTC-3'

< *OsCPK23* >

Forward : 5'-CACCCCAAGTATACTGAACTC-3'
Reverse : 5'-GCTATTAGGTACTAAGAGAGTCTTC-3'

< *OsCPK24* >

Forward : 5'-CGCTGAAGAATTTTCGTAGCAGT-3'
Reverse : 5'-CCCCAACTATCAACAATGTTTCAGTC-3'

< *OsCPK25, 26* >

Forward : 5'-GCACATGAACAAAATGGATCGAG-3'
Reverse : 5'-AATCTATCCGCCCATCCTACA-3'

< *OsCPK27* >

Forward : 5'-GACATGATAGGCGAAGTAGATCAGG-3'
Reverse : 5'-AAGGCATCCCTAAAACCGCTAA-3'

< *OsCPK28* >

Forward : 5'-CTGCGAACAGTTTGGCCTTT-3'
Reverse : 5'-CAAACCTCGCTGTAATCAATTTGTCC-3'

< *OsCPK29* >

Forward : 5'-AGATGTCAAAGAGCAGGCTT-3'
Reverse : 5'-AATATGAGATTTCGGCCTACCTC-3'

< *PAL* >

Forward : 5'-GGCGAGGACTGCAACAAGGTGTT-3'
Reverse : 5'-TGGGTGTATGGCAATGGCAATGA-3'

※*OsCPK25*、*OsCPK26*は ORF の塩基配列が 99.6%一致しており、特異的なプライマーの設計が出来なかった。アミノ酸配列では 100%同じ配列であるので、2つの CPK は同じものと考え、同一のプライマーで mRNA を定量した。

2) TaqMan Probe を用いた mRNA の定量

N1141 菌株のフラジェリンを処理したイネ培養細胞や RNAi 形質転換培養細胞、過剰発現培養細胞などから RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出した。プライマーは Universal Probe Library (Roche) のアッセイデザインセンターで目的遺伝子を特異的に増幅するように設計したものをを用いた。Total RNA (100 ng) をテンプレートとし、Super script III (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとし、Fast Start Universal Probe kit (Roche) を用いて反応液 (Fast Start Universal Probe [Roche] 12.5 μ l、25 mM 加水分解プローブ 0.25 μ l、10 mM Primer F 2.25 μ l、10 mM Primer R 2.25 μ l、cDNA 2 μ l、滅菌水 5.75 μ l、Total vol. 25 μ l) を調製し、ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) にて 95°C 15 分、(94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分) \times 40 サイクルの反応条件で Real time RT-PCR 反応を行った。なお、PCR 反応終了後、アガロースゲル電気泳動で正しい増幅が行われていることを確認した。用いた加水分解プローブ、プライマーは以下に記述する。

使用した加水分解プローブ

OsCPK7	: #118
OsCPK8	: #113
OsCPK10	: #92
OsCPK12	: #38 または#113
OsCPK13	: #165
OsCPK19	: #165
EDS1	: #146
Act-1	: #9

RNAi 形質転換体の確認用のプライマーセット

< *OsCPK7* >

Forward	: 5'-GGAAGCGGCACACAACG-3'
Reverse	: 5'-GCTCGTTGAAGCTTGTCAACT-3'

< *OsCPK8* >

Forward	: 5'-ATATTTGTCAGTCAGGCGGC-3'
Reverse	: 5'-CCAAGTTTACGTATGCCAGCC-3'

< *OsCPK12* >

Forward	: 5'-CAGAAGTGGCACAATCACGG-3'
Reverse	: 5'-GCTGCCACTCTTGTCTACGT-3'

< *OsCPK19* >

Forward	: 5'-GTTCTCCAACATCCCTGGCT-3'
Reverse	: 5'-CGCTGTTGTCTGTGTCCATG-3'

各 *OsCPK* 遺伝子の発現量確認用のプライマーセット

< *OsCPK7* >

Forward	: 5'-GGAGTTGCCACTGATCAAGC-3'
Reverse	: 5'-CCTCTGAAAGACGCTCAGCTA-3'

< *OsCPK8* >

Forward : 5'-CTTTGCGGTGTACCACCAT-3'
Reverse : 5'-CGTATAATTGCCTGCGCTACT-3'

< *OsCPK10* >

Forward : 5'-TTGACAGCTCATGAAGTTTAAAGG-3'
Reverse : 5'-CGAGATAGAACAGCAGAATCCA-3'

< *OsCPK12* >

Forward : 5'-TTAGTGAAGCCGAGGTTTCAGA-3'
Reverse : 5'-TGCTGCCACTCTTGTCTACG-3'

< *OsCPK13* >

Forward : 5'-TCTCGCTCAAGGCCATAGAT-3'
Reverse : 5'-CAACAACACTTCTGGAGCTACG-3'

< *OsCPK16* >

Forward : 5'-CCATCTTCTTCAAGCCTGGT-3'
Reverse : 5'-CAGGTCCATAGTTTCTCTTCAGC-3'

< *OsCPK19* >

Forward : 5'-TCTCGCTCAAGGCCATAGAT-3'
Reverse : 5'-CAACAACACTTCTGGAGCTACG-3'

< *OsEDS1* >

Forward : 5'-CAGGGGTTCTTGAGGCTGT-3'
Reverse : 5'-AACACTACTGCCTTGCCTCTG-3'

OsCPK12 過剰発現体の発現量確認用のプライマーセット

< *OsCPK12* >

Forward : 5'-TTAGTGAAGCCGAGGTTTCAGA-3'
Reverse : 5'-TGCTGCCACTCTTGTCTACG-3'

< *OsCPK12CA* >

Forward : 5'-TGGGGTGATATTGTATATCCTTCTATG-3'

Reverse : 5'-AGCATCGAATATGCCTTTCTCT-3'

11. 各形質転換イネの作製

1) アグロバクテリウムのコンピテントセル作製

Agrobacterium tumefaciens EHA105 株を YEP 液体培地 (1%Bacto Peptone、1%Bacto Yeast extract、85 mM NaCl) 100 ml に植菌し、28°Cで振盪培養を行った。OD₆₀₀が 0.6 付近になった時点で培養を終了し、氷冷した 50 ml チューブ 4 本に回収した。3,300×g、4°C、5 分間遠心分離を行い、上清を除去し、ペレットに 10%グリセロールを 2.5 ml ずつ加えた。穏やかに懸濁した後、1 本にまとめ、3,300×g、5 分、4°Cで遠心分離を行い、上清を除去した。ペレットに 10%グリセロールを 10 ml ずつ加え、穏やかに懸濁した後、3,300×g、4°C、5 分間遠心分離を行い、上清を除去した。この操作をさらに繰り返した後、10%グリセロール 500 μl に懸濁し、1.5ml チューブに 50 μl ずつ分注し、液体窒素で凍結させ-80°Cで保存した。

2) アグロバクテリウムへのプラスミド導入

A. tumefaciens EHA105 株のコンピテントセル 50 μl にプラスミドを 0.1 μg 加え、穏やかに攪拌した。これをあらかじめ冷やしておいた 1 mm Pluser Cuvette (Bio-Rad) に移し、Gene Pulser Xcell (BIORAD) を用いて Voltage : 1.25 kV、Capacitance : 25 μF、Resistance (LOW RANGE) : 200 Ω、Cuvette でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後、SOC 培地 1 ml をキューベットに注ぎ懸濁し、1.5 ml チューブに移した。30°C、1.5 時間振盪培養を行った後、LB 寒天培地 (カナマイシン終濃度 50 μg/ml、ハイグロマイシン終濃度 50 μg/ml) に塗布し、遮光下 30°Cで 2 日間静置した。生育してきたコロニーに各プラスミドが導入されていることを確認した後、LB 液体培地 (カナマイシン終濃度 50 μg/ml、ハイグロマイシン終濃度 50 μg/ml) 30 ml で 28°C一晩振盪培養し、800×g、4°C、5 分間遠心分離を行い、菌体ペレットを回収後、HMFM (3.6 mM K₂HPO₄、1.1 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O、1 mM MgSO₄ · 7H₂O、4.4%Glycerine、2.2 mM Na-citrate) 5 ml に懸濁した。1.5 ml チューブに 500 μl ずつ分注し、液体窒素中で凍結させ、-80°Cで保存し、HMFM ストック菌

体保存液とした。

3) イネカルスの作製

イネ（金南風、*Oriza sativa* L. sp. *japonica* cv. *kinmaze*）種子の籾殻を取り除き、50 ml チューブへ移し、純水で3回洗浄した。次に、70%エタノールに浸し10分振盪した後、1%次亜塩素酸ナトリウムに浸し、30分振盪し種子表面の殺菌を行った。滅菌水で5回洗浄した後、胚が上向きになるようにMS寒天培地（MS培地用混合塩類 [Wako] 1 pack、2% Sucrose、2 mg/l 2,4-Dichloro-Phenoxyacetic Acid、1% KM Vitamin Solution [SIGMA]、0.9% Agarose type I [SIGMA]）に留置した。30℃、連続光下で1週間静置培養した後、新しいMS寒天培地に留置し、さらに2週間同条件で静置培養した。

4) アグロバクテリウムのイネカルスへの感染

感染3日前にMS寒天培地上のカルスを前培養培地（MS寒天培地、10%イネ培養細胞）に移し30℃で静置培養した。またプラスミドを導入したアグロバクテリウム HMF_M ストック菌体保存液を AB 培地（17.2 mM K₂HPO₄、19.2 mM NaH₂PO₄・2H₂O、18.7 mM NH₄Cl、18.7 mM MgSO₄・7H₂O、2 mM KCl、91 μM CaCl₂・2H₂O、9 μM FeSO₄・7H₂O）に塗布し、遮光下22℃で3日間静置培養した。

感染当日、前培養培地上のカルスを手で50 ml チューブに移した。また AB 培地で生育したアグロバクテリウムを一部掻き取り、アグロバクテリウム感染液体培地に OD₆₀₀ が 0.01~0.04 になるように懸濁した。これをカルスの入った50 ml チューブに5~6 ml 加え軽く攪拌し、室温で5分静置した。カルスを濾紙の敷いたシャーレに移し、培地を取り除いた後、感染培地に移し遮光下、25℃で3日間静置培養した。

5) 形質転換カルスの選抜

感染から3日後のカルスを手で50 ml チューブに移し、クラフォラン（Wako）の濃度が250 μg/ml になるように調製した滅菌水で数回洗浄を行った。カルスを濾紙に敷いたシャーレに移し、滅菌水を取り除いた後、細かくほぐしながら一次選抜培地（MS寒天培地、クラフォラン終濃度500 μg/ml、ハイグロマイシン終濃度50 μg/ml）に移し、連続光下、30℃、3週間静置培養した。一次選抜培地上で生育してきたカルスを二次選抜培地（39.6 mM KNO₃、2.5 mM (NH₄)₂SO₄、1.0 mM MgSO₄・7H₂O、1.0 mM CaCl₂・2H₂O、1.7 mM NaH₂PO₄・2H₂O、20.1

μM EDTA \cdot 2Na (DOJINDO)、19.8 μM FeSO $_4$ \cdot 7H $_2$ O、6.6 μM MnSO $_4$ \cdot 4H $_2$ O、7.7 μM ZnSO $_4$ \cdot 4H $_2$ O、0.5 μM CuSO $_4$ \cdot 5H $_2$ O、48.5 μM H $_3$ BO $_3$ 、0.6 μM NaMoO $_4$ \cdot 2H $_2$ O、1% [w/v] Murashige and Skoog vitamin powder、1.8 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid、87.6 mM Sucrose、165 mM Sorbitol、1% Agarose、pH 5.6) に移し、連続光下、30°C、2 週間静置培養した。2 週間後、新しい二次選抜培地に移し、連続光下、30°Cで 2 週間静置培養した。培養後、生育した形質転換体カルスの一部を 1.5 ml チューブに移し、液体窒素で凍結し、ペッスルと電気ドリルを用いて破砕した。破砕後、DNA 抽出 buffer (200 mM Tris-HCl、pH7.5、250 mM NaCl、25 mM EDTA、0.5% SDS) 50 μl を加え、上清 1 μl をテンプレートとしてコロニーPCR 行い、遺伝子が導入されていることを確認した。

1-3 結果

1. N1141 菌株のフラジェリンによって誘導される活性酸素発生への様々な情報伝達阻害剤の影響

イネに対して非病原性である *A. avenae* N1141 菌株の精製フラジェリンをイネ培養細胞に処理すると、免疫反応の一つである活性酸素の発生が誘導される。この活性酸素発生の機構を分子レベルで調べるため、様々な情報伝達阻害剤を用いて活性酸素発生への影響を検討した。

動植物のセカンドメッセンジャーである Ca^{2+} はホルモン、病原菌、非生物学的ストレスなどの様々な刺激に応答して、多くのシグナル伝達経路で機能していることが知られている。N1141 菌株およびそのフラジェリンによって誘導される遺伝子を詳細に調べたところ、 Ca^{2+} シグナルに関与するタンパク質をコードする遺伝子が多く含まれることが示されたことから (Fujiwara, 2007)、フラジェリンによって誘導される活性酸素発生にも Ca^{2+} シグナルが関与しているのではないかと考えた。30°C で 2 時間培養したイネ培養細胞に Ca^{2+} キレート剤である EGTA (終濃度 2 mM) や Ca^{2+} チャネル阻害剤である Nifedipine (終濃度 1 mM) を処理し、30 分間培養した後、N1141 菌株から精製したフラジェリンを終濃度 200 nM となるようにイネ培養細胞に処理し、1 時間毎に培地中の活性酸素量を測定した。その結果、N1141 菌株のフラジェリンのみを処理した場合、処理後 1~2 時間をピークとする活性酸素の発生が認められたが、EGTA や Nifedipine を処理すると、この活性酸素の発生がコントロールとして用いた水処理と同程度まで阻害されることが明らかになった (Fig. 1A)。

次に、高等植物の細胞内情報伝達にはタンパク質のリン酸化が関与することが報告されている。そこで、イネ培養細胞における N1141 菌株の精製フラジェリンによって誘導される活性酸素の発生にタンパク質リン酸化が関与するかどうかを調べるために、この活性酸素の発生へのプロテインキナーゼ阻害剤の影響を調べた。30°C で 2 時間培養したイネ培養細胞に、広範囲のプロテインキナーゼを強力に阻害する細胞浸透性プロテインキナーゼ阻害剤 Staurosporine、および K252a を終濃度 5 μM となるように加え、30 分間培養した後に、N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM となるように処理し、1 時間毎に培地中の活性酸素量を測定した。その結果、N1141 菌株のフラジェリンを処理した場合に認められる活性酸素の発生は Staurosporine 処理では 5 分の 1 程度まで阻害され、K252a 処理では水と同程度まで阻害さ

れていることが明らかになった (Fig. 1B)。

また、免疫反応の一つである活性酸素の発生は植物の NADPH oxidase である Rboh を介して起きていることが知られている。そこで、NADPH oxidase の特異的阻害剤である DPI によりフラジェリンによる活性酸素の発生誘導が阻害されるかどうかについて調べた。30°C で 2 時間培養したイネ培養細胞に DPI を終濃度 10 μM となるように加え、30 分間培養した後に N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM となるように処理し、処理後、1 時間毎に培地中の活性酸素量を測定した。その結果、N1141 菌株の精製フラジェリンの処理によって認められる処理後 1~2 時間後をピークとした活性酸素の発生が DPI 処理によって約 4 分の 1 まで阻害されることが明らかとなった (Fig. 1C)。これらのことから、N1141 菌株のフラジェリンによって誘導される活性酸素の発生は Rboh を介して起きていること、その活性制御には細胞内への Ca^{2+} の流入とタンパク質のリン酸化が関与していることが示唆された。

2. イネ培養細胞における細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の動態解析

阻害剤を用いた研究で、フラジェリン認識情報の伝達に Ca^{2+} シグナルが関与している可能性が示唆されたことから、N1141 菌株のフラジェリン認識後にイネ細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) の変化が起きている可能性が考えられた。そこで、Yellow cameleon 3.6 を用いて、*A. avenae* の N1141 菌株及び K1 菌株の精製フラジェリン処理後のイネ培養細胞内における Ca^{2+} 動態を詳細に解析した。Yellow cameleon は、ECFP、Calmodulin、M13、EYFP からなる Ca^{2+} センサータンパク質である。 Ca^{2+} 存在下で Calmodulin が構造変化を生じ、励起された ECFP (Donor) から EYFP (Acceptor) に蛍光エネルギーの共鳴移動 FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) が起こり、ECFP の強度が減少し、EYFP の強度が上昇する。この ECFP と EYFP の蛍光強度比 (Ratio) をモニターすることで、細胞内の Ca^{2+} の変動を可視化することが出来る (Miyawaki, 1999)。Ubiquitin プロモーター下に制御された Yellow cameleon 3.6 遺伝子をパーティクルボンバードメント法によりイネ培養細胞に導入した。約 12 時間静置培養した後、イネ培養細胞に各フラジェリンを処理し、その直後より共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 を用いて FRET の測定を開始した。Yellow cameleon 3.6 発現イネ培養細胞に N1141 菌株のフラジェリン、K1 菌株のフラジェリン、それぞれを 300 nM となるように処理し、

[Ca²⁺]_{cyt}の動態解析を行った。その結果、N1141 菌株フラジェリン処理では、測定開始直後である約 20 秒後から [Ca²⁺]_{cyt}の上昇が認められ、処理後 3 分には 2.5 倍まで上昇することが明らかとなった (Fig. 2A)。また、この [Ca²⁺]_{cyt}の上昇は測定を終了した 6 分後まで続いた。一方、K1 菌株のフラジェリン処理では、このような [Ca²⁺]_{cyt} 上昇は認められなかったことから (Fig. 2B)、イネ培養細胞は N1141 菌株のフラジェリンを認識し、特異的に [Ca²⁺]_{cyt} の上昇を引き起こしていることが示された。このことから、N1141 菌株のフラジェリン処理後のイネ培養細胞における [Ca²⁺]_{cyt} 上昇は、フラジェリン認識に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

3. イネ培養細胞内でのリン酸化タンパク質の検出

N1141 菌株のフラジェリンによって誘導される活性酸素の発生はプロテインキナーゼ阻害剤によって抑制されることから (Fig. 1B)、フラジェリン認識後の細胞内情報伝達にはタンパク質リン酸化が関与している可能性が示唆された。そこで、N1141 菌株のフラジェリン処理後のイネ培養細胞内のリン酸化タンパク質の動態について解析した。イネ培養細胞に N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM となるように処理し、0、15、30、60 分後に細胞を回収し、この培養細胞からタンパク質を抽出し、抗リン酸化セリン抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、N1141 菌株のフラジェリン処理後 15 分で約 75 kDa、60 kDa、50 kDa、45kDa、40 kDa タンパク質のリン酸化が増加することが示された。これらの中で、75 kDa、60 kDa、50 kDa、45 kDa タンパク質のリン酸化はフラジェリン処理後 15 分で一過的に増加し、30 分後にはフラジェリン処理前と同程度のレベルに戻っていた。また、40 kDa タンパク質のリン酸化はフラジェリン処理 15 分後からその蓄積が認められ、その後 60 分にかけて徐々に増加する蓄積パターンを示した。このことから、フラジェリン処理によって 75 kDa、60 kDa、50 kDa、45kDa、40 kDa のタンパク質が一過的にリン酸化されるが、そのリン酸化の最大値と時間はそれぞれ異なることが示された (Fig. 3)。さらに、フラジェリン処理後に起こるこのようなリン酸化タンパク質の蓄積が Ca²⁺によって制御されているかを明らかにするため、フラジェリン処理 30 分前に終濃度 2 mM となるように EGTA をイネ培養細胞に処理し、同様にリン酸化タンパク質を検出した。その結果、EGTA 処理によって 40 kDa タンパク質のリン酸化は影響されなかったが、50 kDa、60 kDa、75 kDa タンパク質

のリン酸化は阻害されることが示された (Fig.3)。これらのことから N1141 菌株のフラジェリン処理後、50 kDa、60 kDa、75 kDa タンパク質は Ca^{2+} 依存的にリン酸化されることが明らかになった。

4. イネに存在する全 *OsCPK* 遺伝子の発現解析

これまでに、N1141 菌株のフラジェリン処理によって、 Ca^{2+} 依存的なリン酸化タンパク質の蓄積が認められることが明らかになった。植物には、 Ca^{2+} 依存的にタンパク質のリン酸化を行う植物特有のカルシウム依存性プロテインキナーゼ (CPK) が存在することが知られている。さらに、フラジェリンを処理したイネ培養細胞において、いくつかの *OsCPK* 遺伝子が発現誘導されることがマイクロアレイ解析によって明らかとなっている (Fujiwara, 2007)。このことから、これら *OsCPK* が N1141 菌株のフラジェリン認識後の情報伝達に関与している可能性が考えられた。*CPK* は大きな遺伝子ファミリーを構成しており、イネのゲノム上には 29 個の *CPK* 遺伝子が存在する (Fig. 4)。そこで、N1141 菌株接種時のイネに存在する全ての *OsCPK* の発現パターンを Real time RT-PCR によって解析した。非病原性 N1141 菌株と病原性 K1 菌株を 1×10^8 cfu/ml になるようにイネ培養細胞に接種し、0、1、3、6 時間後の細胞より Total RNA を抽出した。これを鋳型として用い、それぞれの *CPK* 遺伝子を特異的に増幅するようなプライマーを作製して Real time RT-PCR を行い、経時的な遺伝子の発現を解析した。その結果、29 種類の *OsCPK* の発現パターンを N1141 菌株接種のみで発現の上昇を示したグループ (*OsCPK7*, *8*, *10*, *12*, *13*, *19*)、N1141 菌株接種と K1 菌株接種で同じ発現パターンを示したグループ (*OsCPK2*, *5*, *9*, *15*, *27*)、K1 菌株のみで発現の低下を示した遺伝子グループ (*OsCPK4*, *20*)、N1141 菌株接種のみで発現の低下を示したグループ (*OsCPK16*, *23*, *25*, *26*)、発現量に変化がなかった遺伝子グループ (*OsCPK24*, *28*)、その他のグループ (*OsCPK14*, *OsCPK4*) の 6 つに分類することが出来た。特に、N1141 菌株のみで発現上昇が見られたグループの中で、*OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK12* は N1141 菌株接種後 1 時間から 6 時間まで経時的に発現量が上昇するのに対し、*OsCPK10*、*OsCPK13* は 3 時間をピークとした発現パターンを示した (Fig. 5)。

この 6 つの *OsCPK* がイネの免疫反応誘導に関与すると考え、これら *OsCPK* が N1141 菌株のフラジェリン処理によっても発現誘導されるのか Real time RT-PCR によって解析した。N1141 菌株のフラジェ

リンを終濃度 200 nM となるように加えたイネ培養細胞における 0、1、3、6 時間後の各遺伝子の発現を調べた結果、*OsCPK7* は N1141 菌株のフラジェリン処理によって発現誘導されなかったが、*OsCPK8*、*OsCPK10*、*OsCPK12*、*OsCPK13*、*OsCPK19* の 5 つの *OsCPK* は発現誘導されることが明らかになった。興味深いことに、*OsCPK8*、*OsCPK12*、*OsCPK13* は N1141 菌株接種時と同様の発現パターンを示したが、*OsCPK10* は N1141 菌株接種では 3 時間をピークとした発現パターンであったが、N1141 菌株のフラジェリン処理では処理 6 時間後も発現量が上昇するという異なる発現パターンを示していた。また、*OsCPK10* の発現量は、N1141 菌株接種では最大約 3 倍であったのに対してフラジェリン処理では最大約 15 倍とフラジェリン処理によってその発現量が大きく増加することが明らかとなった。また、*OsCPK19* の発現パターンは N1141 菌株接種では 1 時間で一度、発現量が低下していたのに対し、フラジェリン処理では約 6 倍まで上昇していた。さらに、N1141 菌株接種で最大約 15 倍まで発現量が上昇していた *OsCPK12* はフラジェリン処理では最大約 8 倍であった。この様に、N1141 菌株のみで発現上昇が見られたグループに属する 6 つの *OsCPK* は、そのほとんどが N1141 菌株のフラジェリン処理でも発現上昇するが、その発現パターンと最大発現量は菌接種とフラジェリン処理で異なることが示された (Fig. 6)。

5. *OsCPK* RNAi 形質転換体の作製

イネに存在する 29 個の *OsCPK* のうち、N1141 菌株接種により発現誘導された *OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK10*、*OsCPK12*、*OsCPK13*、*OsCPK19* の 6 つの *OsCPK* についてさらなる機能解析を行うために、各 *OsCPK* の RNAi 抑制形質転換体の作製を試みた。まず、*CPK* ファミリー内で保存性の低い領域を探索するため、6 つの *OsCPK* 配列のマルチプルアライメント解析を行ったところ、3' UTR を含む ORF の 3' 末端付近の相同性が低いことが分かった (Fig. 7)。そこで、この領域で約 500 bp の配列になるようにプライマーを設計した。*OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK10*、*OsCPK12*、*OsCPK13*、*OsCPK19* のそれぞれのターゲット部位は 522 bp、520 bp、490 bp、527 bp、515 bp、542 bp となる。この選択した配列を元に NCBI のデータベースを BlastN で検索し、それぞれのターゲット部位が *Oriza sativa* ゲノム内の他の遺伝子と相同性が低いことを確認した (Data not shown)。作製した 6 種類のプラスミドをそれぞれエレクトロポレーションで A.

tumefaciens EHA105 株のコンピテントセルに形質転換し、このアグロバクテリウムを 1 種類につき約 15 粒のキンマゼ種子から誘導したカルスに感染させた。感染直後に、約 600 個存在した各 *OsCPK* の形質転換カルスから一次選抜でそれぞれ約 400 個を選抜し、一回目の二次選抜で 300 個、二回目の二次選抜で 100 個を選抜した。二次選抜終了後に生育してきた RNAi 形質転換カルスは *OsCPK7* RNAi 形質転換体が 72 株、*OsCPK8* RNAi 形質転換体が 48 株、*OsCPK10* RNAi 形質転換体が 48 株、*OsCPK12* RNAi 形質転換体が 24 株、*OsCPK13* RNAi 形質転換体が 50 株、*OsCPK19* RNAi 形質転換体が 36 株であった。各カルスから DNA を抽出し、*GUS*、*HPT* をターゲットとして導入遺伝子の確認を行った。その結果、*OsCPK7* RNAi 形質転換体として 15 株、*OsCPK8* RNAi 形質転換体として 13 株、*OsCPK12* RNAi 形質転換体として 6 株、*OsCPK19* RNAi 形質転換体として 2 株の形質転換体を得た。一方、*OsCPK10* RNAi 形質転換体、*OsCPK13* RNAi 形質転換体については導入遺伝子を保持した株を選抜することができなかった。次に、得られたカルスを液体培養したところ、*OsCPK7* RNAi 形質転換培養細胞は 3 株、*OsCPK8* RNAi 形質転換培養細胞は 2 株、*OsCPK12* RNAi 形質転換培養細胞は 2 株、*OsCPK19* RNAi 形質転換培養細胞は 2 株得た。これら株における *OsCPK* の mRNA の発現量を Real time RT-PCR で確認したところ、キンマゼ野生株のカルスの各 *OsCPK* の発現量を 100% としたとき、*OsCPK7* RNAi 形質転換培養細胞では 12.67%、25.35%、24.49%、*OsCPK8* RNAi 形質転換培養細胞では 11.03%、13.21%、*OsCPK12* RNAi 形質転換培養細胞では 1.73%、2.38%、*OsCPK19* RNAi 形質転換培養細胞では 52.43%、26.72% という発現量であることが分かった (Fig. 8)。そこで、*OsCPK* の mRNA 発現量が 25% 以下の株をそれぞれの抑制株とし、それぞれ *cpk7-1*、*cpk7-2*、*cpk7-3*、*cpk8-1*、*cpk8-2*、*cpk12-1*、*cpk12-2* と名付けた。*OsCPK19* RNAi 形質転換培養細胞では、最大に抑制された株が 26% 以上だったために、これらの株を用いた解析は行わなかった。

5. 各 *OsCPK* RNAi 抑制形質転換培養細胞における活性酸素発生の測定

次に、得られた各 *OsCPK* RNAi 抑制形質転換培養細胞における免疫反応としての活性酸素発現能について調べた。継代 4 日目の *OsCPK7* RNAi 抑制形質転換培養細胞 (*cpk7-1*、*cpk7-2*、*cpk7-3*)、*OsCPK8* RNAi 抑制形質転換培養細胞 (*cpk8-1*、*cpk8-2*)、*OsCPK12*

RNAi 抑制形質転換培養細胞 (*cpk12-1*、*cpk12-2*)、コントロールとして形質転換時に目的遺伝子が挿入されていなかった形質転換カルス (Control line) を R2S 培地で 2 時間培養後、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 400 nM となるように処理し、30 分毎に 3 時間まで培地中の活性酸素量を測定した。*OsCPK7* RNAi 抑制形質転換培養細胞に N1141 菌株のフラジェリンを処理したところ、*cpk7-1*、*cpk7-2*、*cpk7-3* は、処理後 3 時間で約 3 倍の活性酸素量となった。これは Control line に N1141 菌株のフラジェリンを処理した場合とほぼ同様の活性酸素量であった (Fig. 9)。このことから、*cpk7-1*、*cpk7-2*、*cpk7-3* は Control line と比べて、活性酸素の発生量に差がないことが明らかになった。

次に、*OsCPK8* RNAi 抑制形質転換培養細胞に N1141 菌株のフラジェリンを処理したところ、*cpk8-1* は Control line と比べて、処理後 2 時間で約 1.5 倍活性酸素発生量が高いことを示された。また、*cpk8-2* も Control line と比べて、処理 2 時間後で約 1.2 倍高いことが明らかとなった。このことから *OsCPK8* RNAi 抑制形質転換培養細胞では、N1141 菌株のフラジェリン処理によって誘導される活性酸素量は減少するのではなく、むしろ増加することが示された (Fig. 10)。

次に、*OsCPK12* RNAi 抑制形質転換培養細胞に N1141 菌株のフラジェリンを処理したところ、*cpk12-1* は Control line に比べて、処理後 2.5 時間で 50% に活性酸素発生量が減少していた。また、*cpk12-2* も同様に 2.5 時間後の活性酸素発生量が Control line と比べて約 70% に減少していた (Fig. 11)。これらのことから、*OsCPK12* はイネのフラジェリン認識によって誘導される活性酸素発生を正に制御する可能性が示された。

6. *OsCPK12* 過剰発現体の作製

OsCPK12 RNAi 抑制形質転換培養細胞においてフラジェリン処理によって誘導される活性酸素の発生が抑制された。そこで *OsCPK12* について詳細に解析を行った。イネの KOME データベースより得られた *OsCPK12* は cDNA が 1868 bp の長さであり、533 残基のアミノ酸をコードしていた。また、このタンパク質の分子量は 59,561、pI は 6.24 であった (Fig. 12)。このアミノ酸配列を基に、アミノ酸ドメイン・モチーフデータベースである Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) を用いて解析したところ、*OsCPK12* は N 末端側にセリン/スレオニンキナーゼドメインを持ち、C 末端側には 4 つの EFhand モチーフから

なるカルモジュリン様ドメインを有していることが明らかになった。また、OsCPKのセリン/スレオニンキナーゼドメインとEFhandモチーフとの連結部は自己阻害領域として機能していると考えられている。事実、CPKのキナーゼドメイン以降を欠損させると、Ca²⁺が存在しない状態でもプロテインキナーゼ活性を持つことが報告されている (Sheen, 1996)。このことから、CPKはCa²⁺が存在しない状態では接続部が活性部位を覆うことで活性を持たないものと予想されている (Harmon *et al.*, 1994)。そこで、CPKのキナーゼドメイン以降を欠損させた恒常活性化型のOsCPK12CAと全長OsCPK12の過剰発現により、N1141菌株のフラジェリンによって誘導される活性酸素発生が増強されるかについて、OsCPK12、OsCPK12CA過剰発現体を作製して調べることにした。OsCPK12_sc/pMDC32、OsCPK12CA_sc/pMDC32、pMDC32をそれぞれエレクトロポレーションで*A. tumefaciens* EHA105株のコンピテントセルに形質転換し、このアグロバクテリウムを1種類につき約30粒のキンマゼ種子から誘導したカルスに感染させた。感染直後にそれぞれ約100個存在したOsCPK12形質転換体、OsCPK12CA形質転換体、pMDC32形質転換体カルスから一次選抜で約80個ずつ選抜し、一回目の二次選抜で60個ずつ、二回目の二次選抜で50個ずつ選抜した。二次選抜終了後、OsCPK12形質転換体は40株、OsCPK12CA形質転換体は26株、pMDC32形質転換体は12株生育した。選抜したカルスからそれぞれRNAを抽出し、Real time RT-PCRによりOsCPK12のmRNAの発現量を確認したところ、pMDC32形質転換体に比べて2倍以上の発現量を示したOsCPK12形質転換体は6株、OsCPK12CA形質転換体は7株であった。次に、得られたカルスを液体培養し、pMDC32形質転換培養細胞を1株、OsCPK12過剰発現培養細胞を2株、OsCPK12CA過剰発現培養細胞を1株得た。これらの過剰発現培養細胞をそれぞれControl line、OsCPK12-1OX、OsCPK12-2OX、OsCPK12CAOXと名付けた。これらの細胞におけるOsCPK12のmRNAの発現量を確認したところ、Control lineを1とした時のそれぞれの発現量は、OsCPK12-1OXは28倍、OsCPK12-2OXは17倍、OsCPK12CAOXは115倍であった (Fig. 13)。N1141菌株のフラジェリンを処理したControl lineでは、処理6時間後にOsCPK12のmRNA量が18倍まで増加するので、これら過剰発現培養細胞は十分なOsCPK12の発現量を有していると判断した。この確立した過剰発現培養細胞を以降の実験に用いた。

7. OsCPK12 過剰発現培養細胞を用いた活性酸素発生の測定

次に、得られた OsCPK12 過剰発現培養細胞における、N1141 菌株のフラジェリン処理によって誘導される活性酸素発生について調べた。継代 4 日目の OsCPK12 過剰発現培養細胞をそれぞれ R2S 培地で 2 時間培養後、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM となるように処理し、30 分毎に 3 時間まで活性酸素量を測定した。その結果、OsCPK12 過剰発現培養細胞 (OsCPK12-1OX、OsCPK12-2OX) は *pMDC32* 形質転換体 (Control line) と比べてフラジェリン処理前の活性酸素量に変化は無かった。また、OsCPK12-1OX は処理後 2 時間で約 9 倍の活性酸素量となった。同様に、OsCPK12-2OX は処理後 2 時間で 8 倍となった。これら OsCPK12 過剰発現培養細胞の活性酸素の発生パターンは Control line と同様の発生パターンを示しており、活性酸素量についても有意差は認められなかった。さらに、恒常活性型である OsCPK12CAOX についても同様に活性酸素量を測定したところ、Control line と比べてフラジェリン処理前の活性酸素量に変化は無く、フラジェリン処理後も Control line と同様の活性酸素発生パターンを示した (Fig. 14)。以上のことから、OsCPK12 の発現量が増加しても、フラジェリンによって発生する活性酸素量に差は無いことが示された。

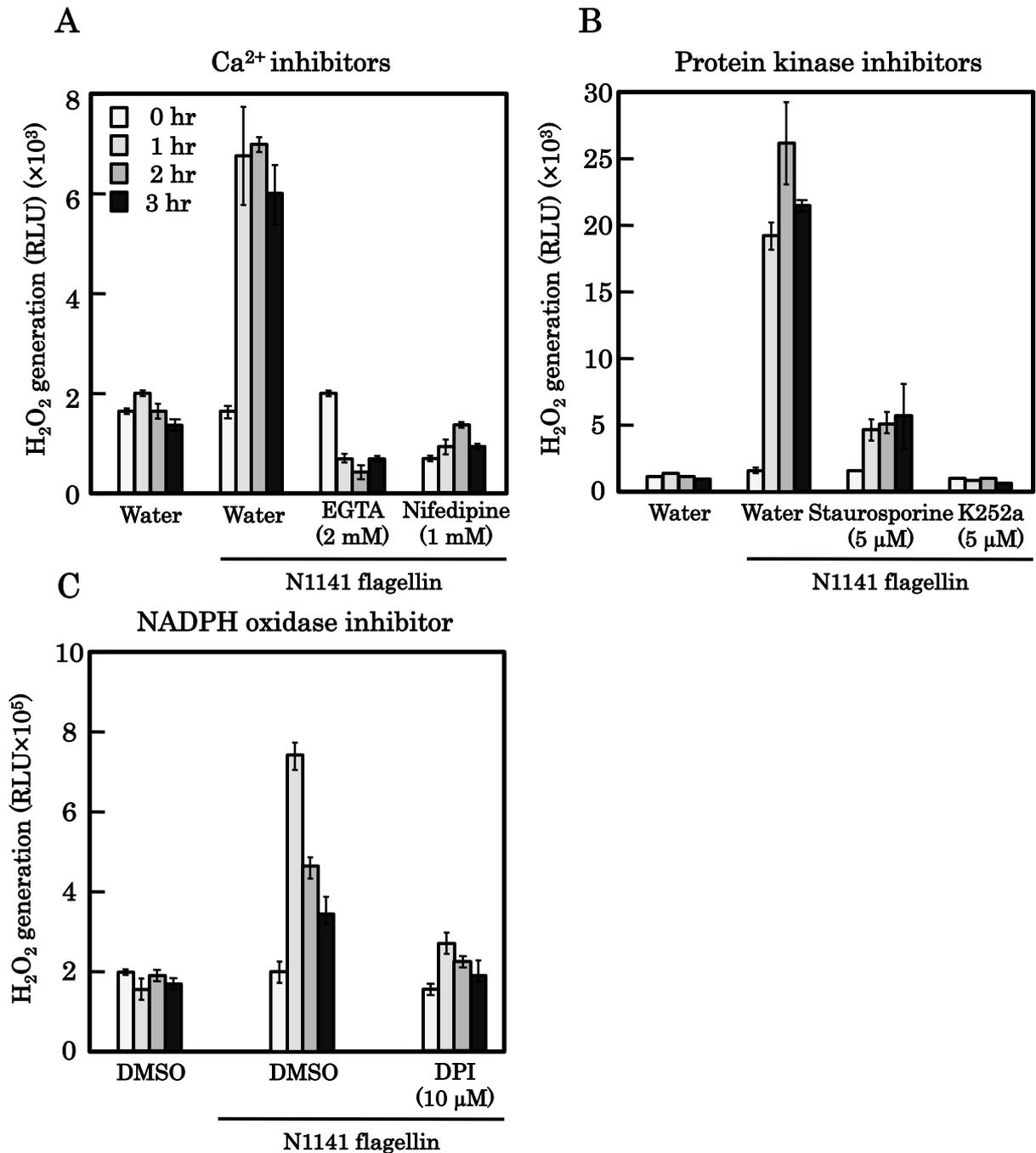
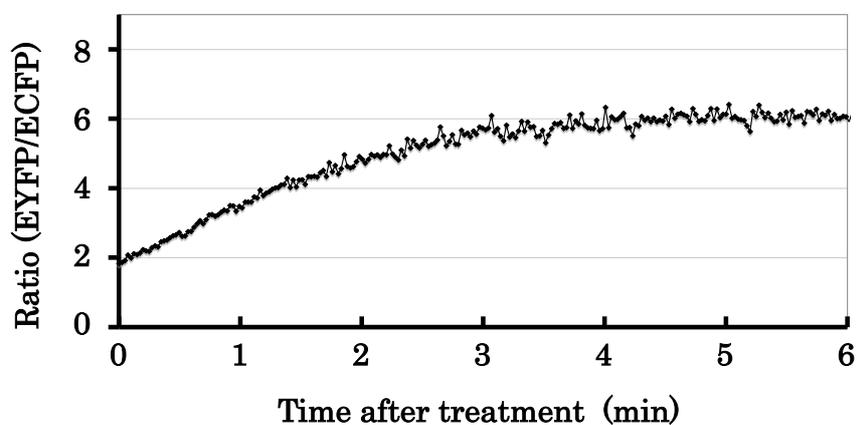


Fig. 1 活性酸素発生へのCa²⁺阻害剤、キナーゼ阻害剤、NADPH oxidase阻害剤の影響

N1141菌株の精製フラジェリン処理により誘導される活性酸素発生への (A) Ca²⁺阻害剤、(B) キナーゼ阻害剤、(C) NADPH oxidase阻害剤の影響を調べた。各種阻害剤はフラジェリン処理の30分前に加え、イネ培養細胞にN1141菌株のフラジェリンを終濃度200 nMとなるように処理し、処理後、0~3時間の培地上清を経時的に取り、ルミノールを用いた化学発光によって活性酸素の発生量を定量した。

A

N1141 flagellin



B

K1 flagellin

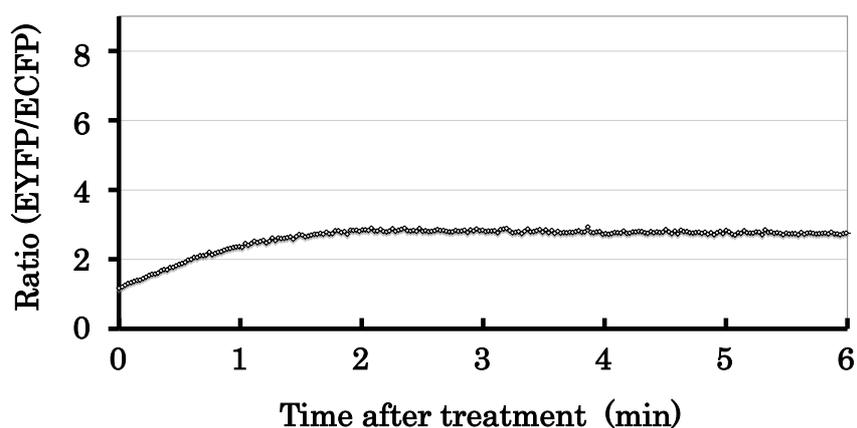


Fig. 2 Yellow cameroon 3.6を発現させたイネ培養細胞における細胞内 $[Ca^{2+}]$ の動態

Yellow cameroon 3.6を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、A. avenae N1141菌株、またはK1菌株のフラジェリン処理時の細胞内 Ca^{2+} 動態の解析を行った。(A) N1141菌株のフラジェリン、(B) K1菌株のフラジェリンを終濃度300 nM となるように処理したイネ細胞内における $[Ca^{2+}]$ の変動をそれぞれ示している。なお、YC 3.6の蛍光スペクトルは、458 nmの励起波長で468 nmから548 nmの蛍光波長領域を10 nmずつ、5秒間隔で取得し、Ratioは観察細胞の全領域をROIとしてRatio値を算出した。

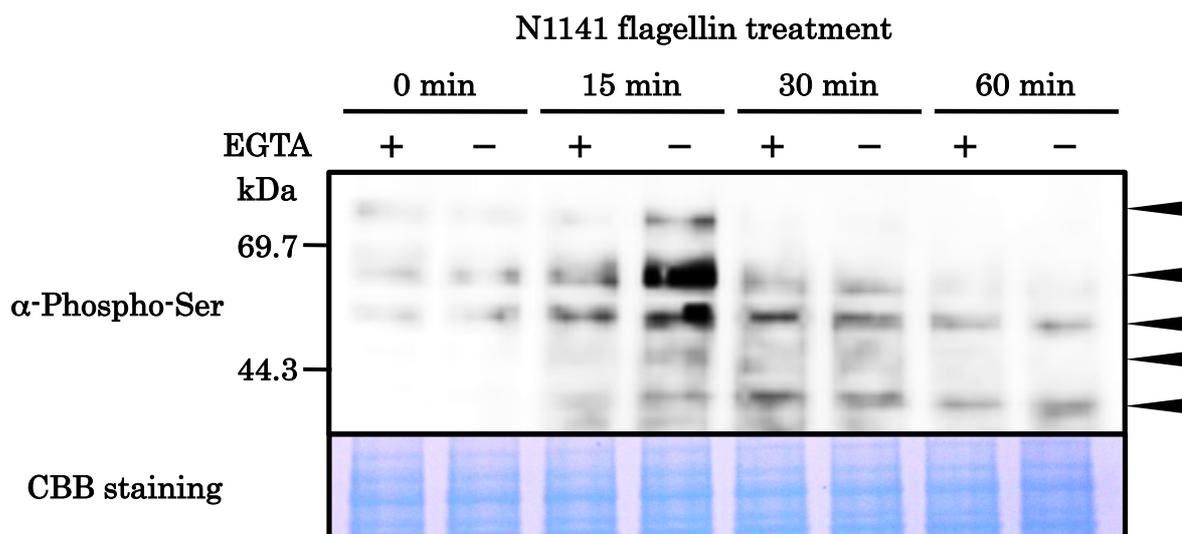


Fig. 3 イネ培養細胞のリン酸化タンパク質の検出

A. avenae N1141菌株のフラジェリン処理後のイネ培養細胞における Ca^{2+} 依存的なリン酸化タンパク質の蓄積を検出した。終濃度2 mM となるようにEGTAを処理したイネ培養細胞とコントロールとして滅菌水を処理したイネ培養細胞を30分間振盪培養し、それぞれN1141フラジェリンを終濃度200 nM になるように処理後、0、15、30、60分の細胞からタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質10 μg 分をSDS-PAGEで分離後、ウエスタンブロット解析によりリン酸化タンパク質を抗リン酸化セリン抗体で検出している。同様の条件でSDS-PAGEを行い、すべてのレーンにタンパク質が等量アプライ出来ているかをCBB染色で確認した。

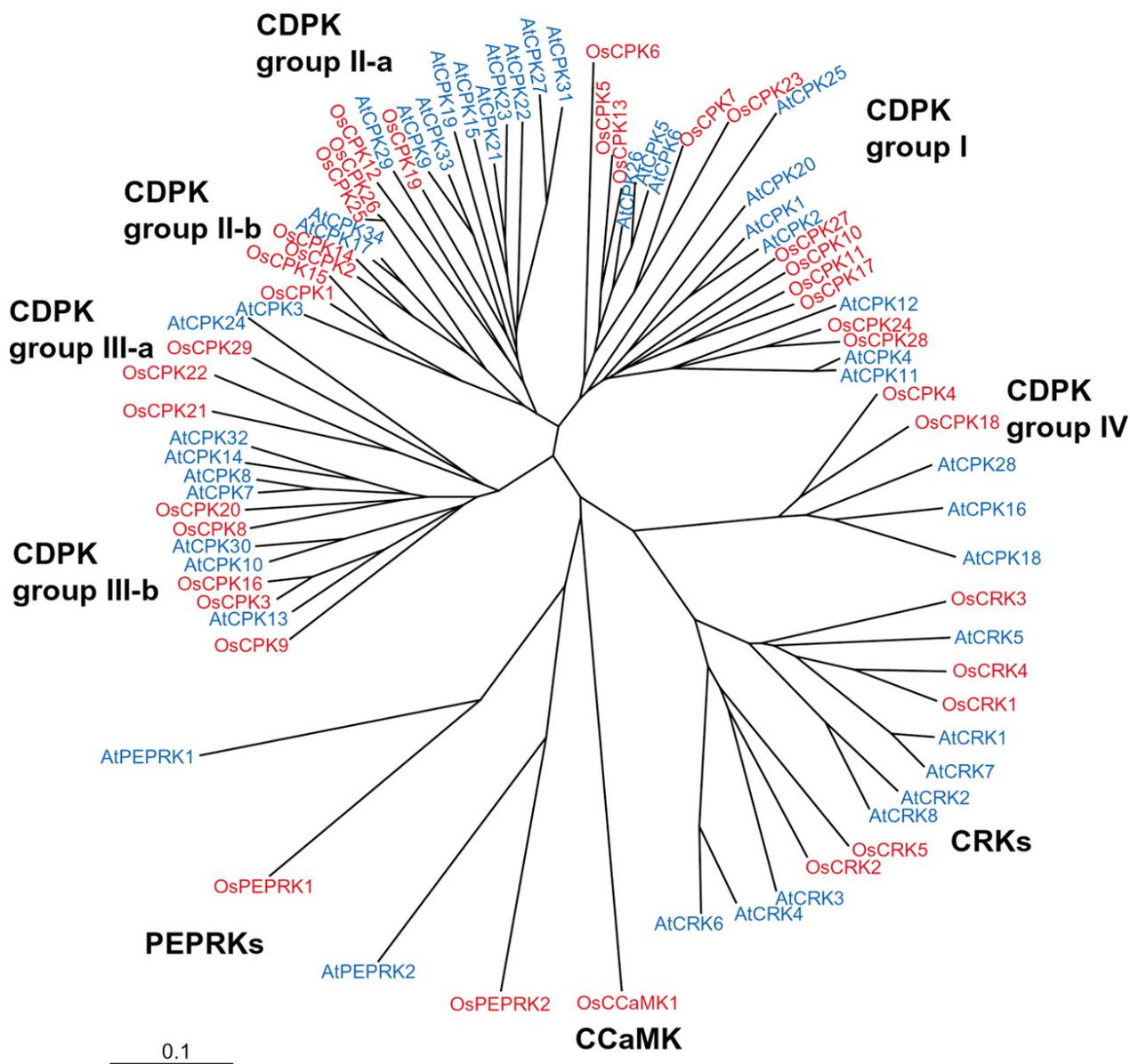


Fig. 4 CDPK (CPK) ファミリーの系統樹
 Asano et al., 2005より抜粋

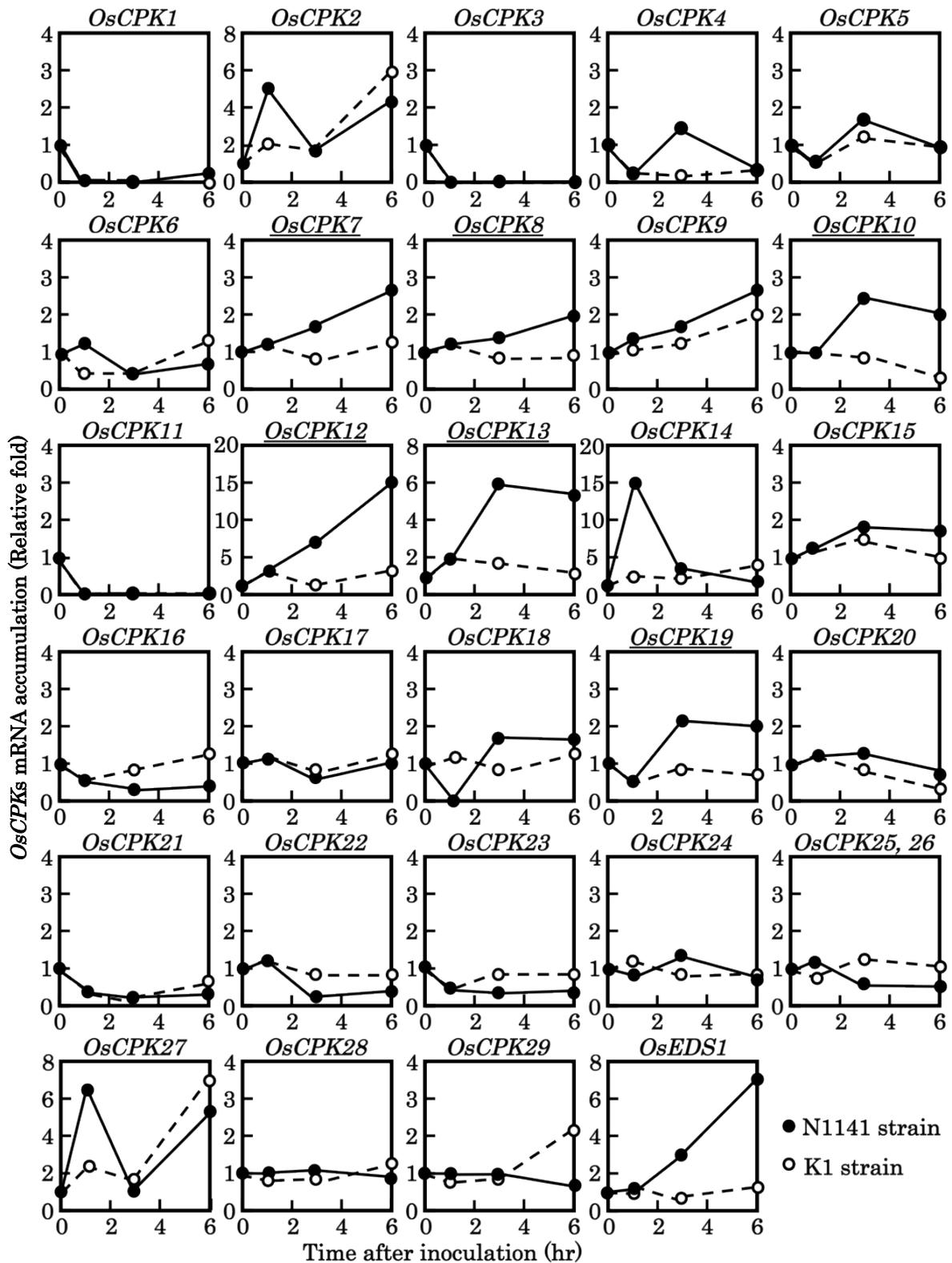


Fig. 5 Real time RT-PCRによるイネの全*OsCPK*の発現解析

イネのゲノムに存在する全29個の*OsCPK*遺伝子の発現について各*OsCPK*に特異的なプライマーを用いたReal time RT-PCRにより確認した。グラフの縦軸と横軸はそれぞれ菌体接種後0時間のイネ培養細胞における各*OsCPK*遺伝子の発現量を1としたときのRelative foldと菌体接種後の時間 (hr) を表している。また、これらの各*OsCPK*遺伝子の発現量は全て*Act-1*で補正しており、アンダーラインが引いてある*OsCPK*遺伝子はN1141菌株とK1菌株接種で発現量に差が出たものを示す。さらに、抵抗性反応の指標として*OsEDS1*の発現誘導を確認した。

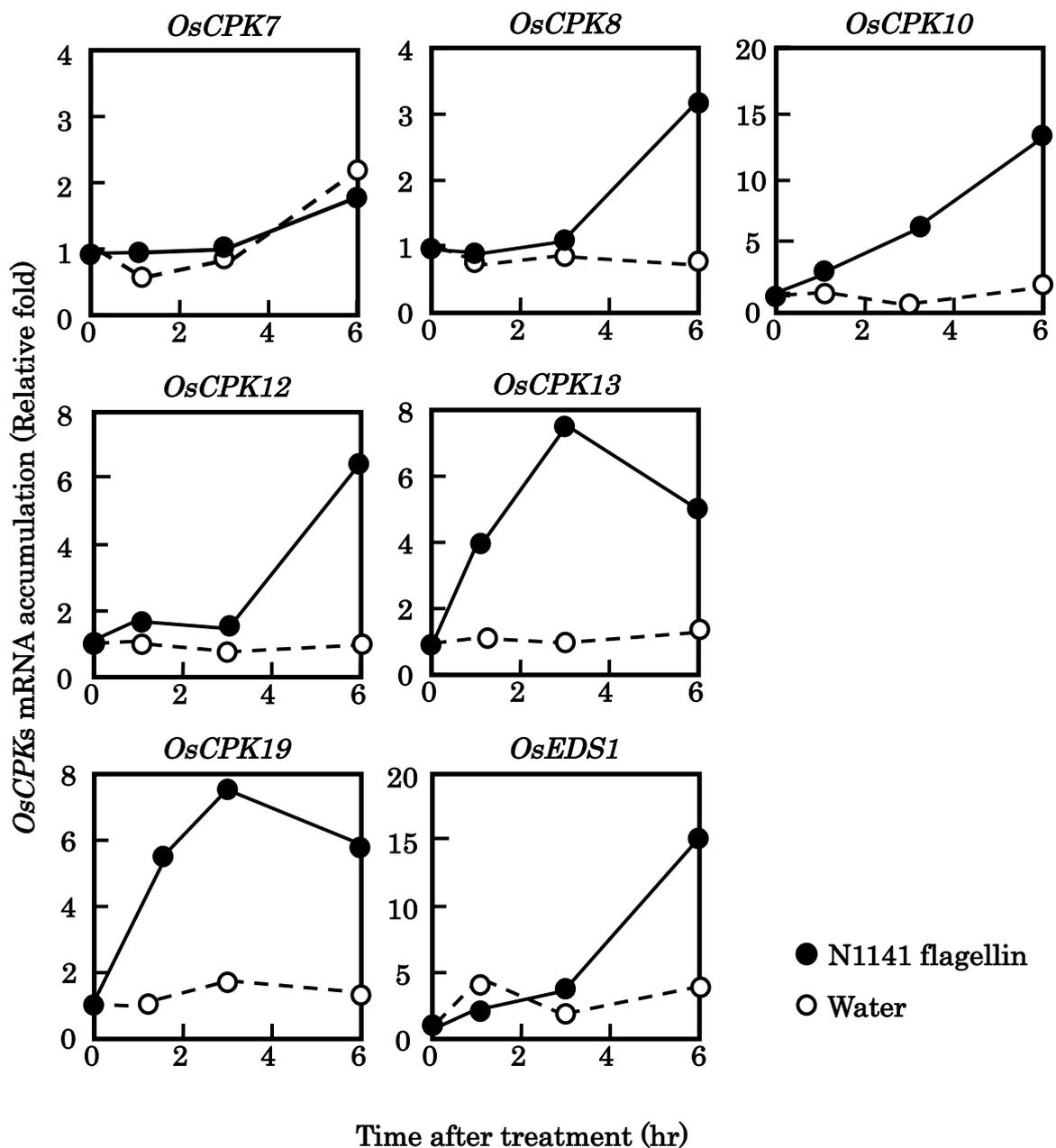


Fig. 6 Real time RT-PCRによる *OsCPK7*, *8*, *10*, *12*, *13*, *19*の発現解析

A. avenae N1141菌株接種後、特異的に発現誘導される *OsCPK*について、N1141菌株から精製したフラジェリンを処理後、0、1、3、6時間の *OsCPK*遺伝子の発現を各 *OsCPK*に特異的なプライマーを用いてReal time RT-PCRにより確認した。グラフの縦軸と横軸はそれぞれ、0時間のイネ培養細胞における各 *OsCPK*遺伝子の発現量を1としたときのRelative foldとフラジェリン処理後の時間 (hr) を表している。抵抗性反応の指標として *EDS1*の発現誘導を確認した。

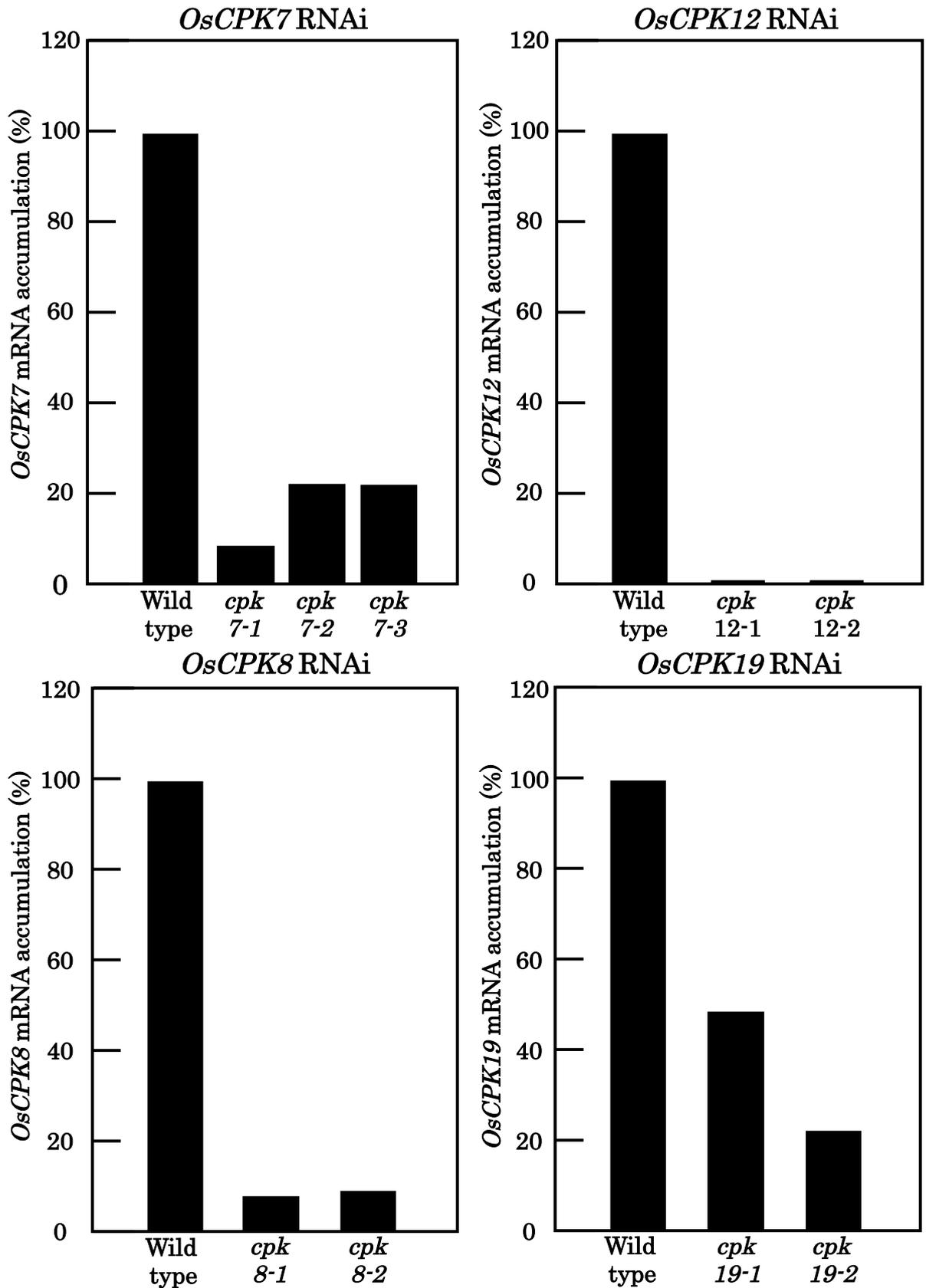


Fig. 8 *OsCPK* RNAi形質転換培養細胞のmRNAの発現量

それぞれの*OsCPK* RNAi形質転換体において抑制している*OsCPK*の発現量をReal time RT-PCRで確認した。キンマゼ野生株のカルスの*OsCPK*のmRNA量を100%としたときの各*OsCPK* RNAi形質転換培養細胞における*OsCPK*のmRNAの発現量を表している。

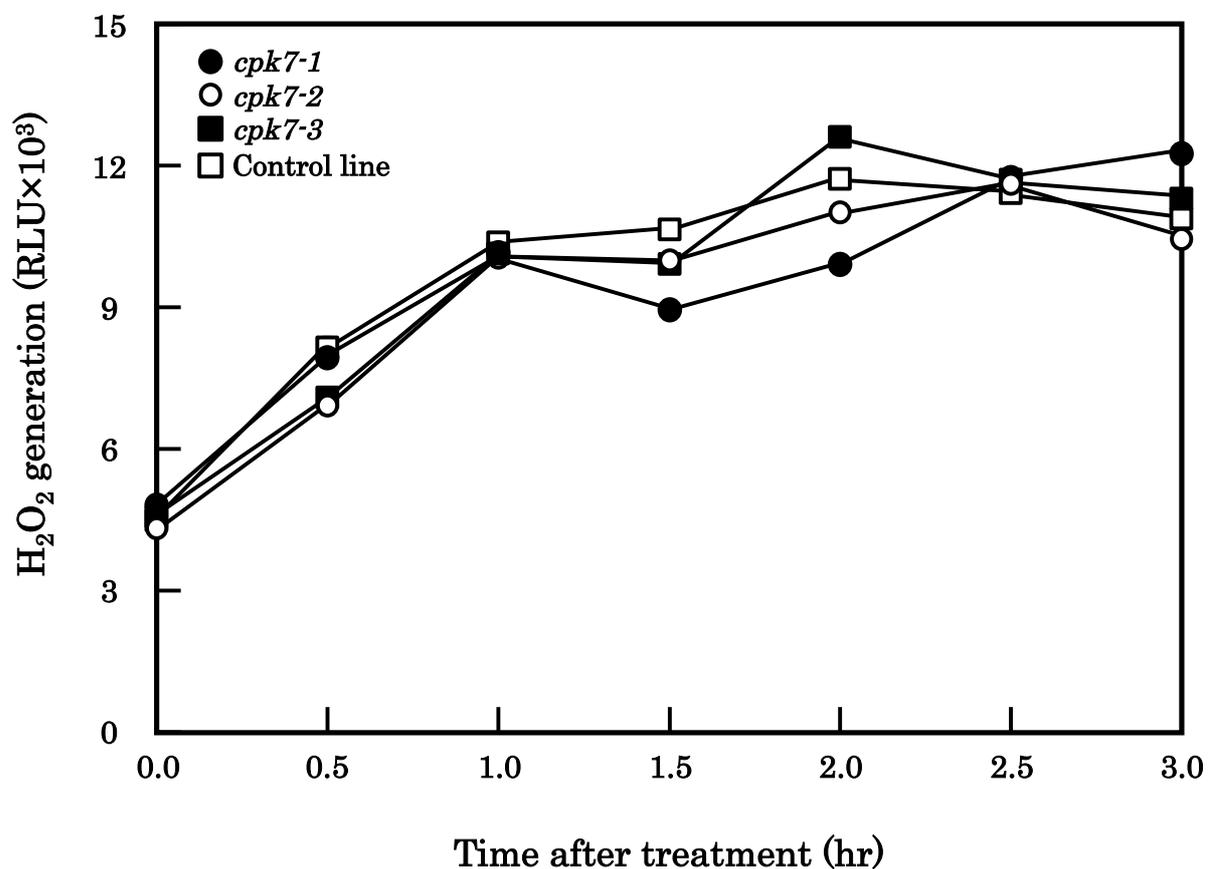


Fig. 9 *OsCPK7* RNAi抑制形質転換培養細胞を用いた活性酸素発生量測定

各 *OsCPK7* RNAi抑制形質転換培養細胞に *A. avenae* N1141菌株のフラジェリンを終濃度400 nMとなるように処理後、30分毎に培地上清を経時的に取り、ルミノールを用いた化学発光によって活性酸素の発生量を測定した。

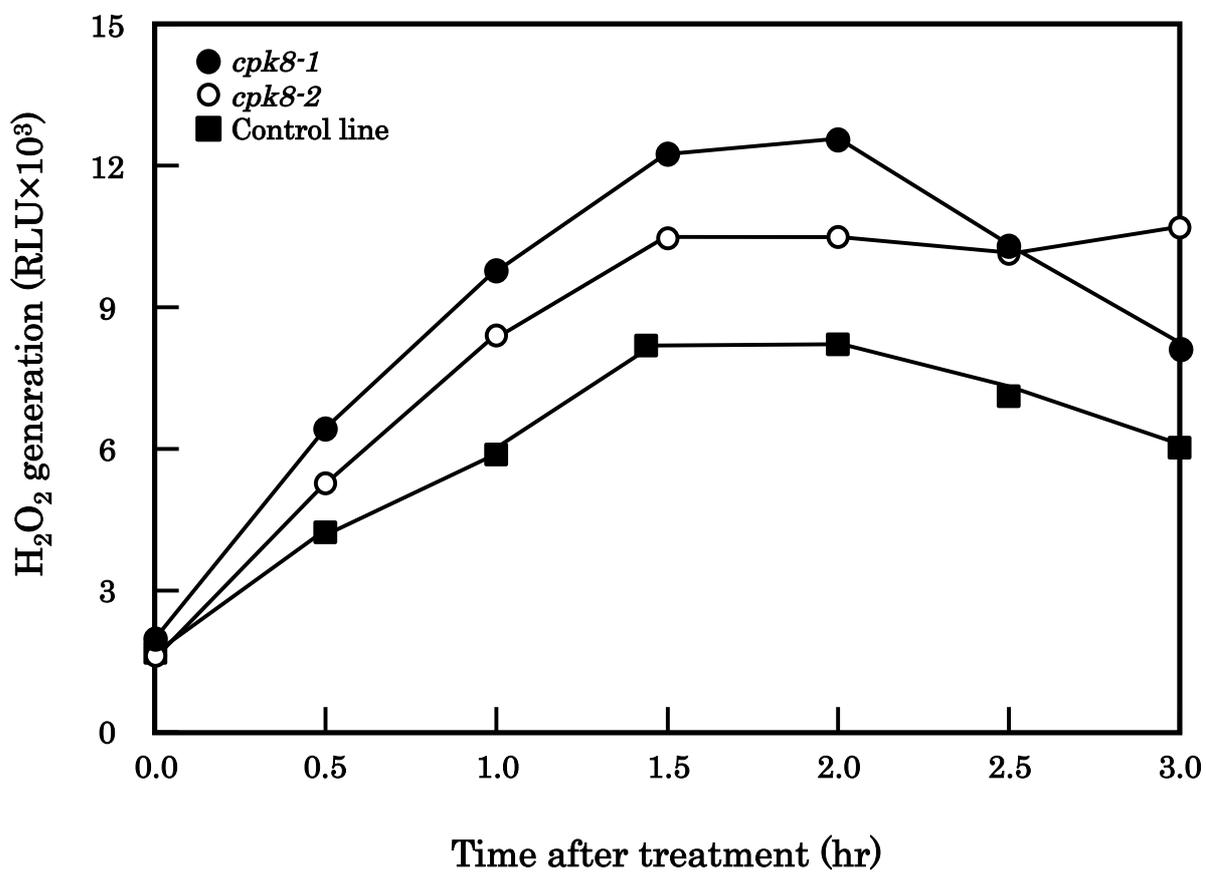


Fig. 10 *OsCPK8* RNAi抑制形質転換培養細胞を用いた活性酸素発生量測定

各 *OsCPK8* RNAi抑制形質転換培養細胞に *A. avenae* N1141菌株のフラジェリンを終濃度400 nMとなるように処理後、30分毎に培地上清を経時的に取り、ルミノールを用いた化学発光によって活性酸素の発生量を測定した。

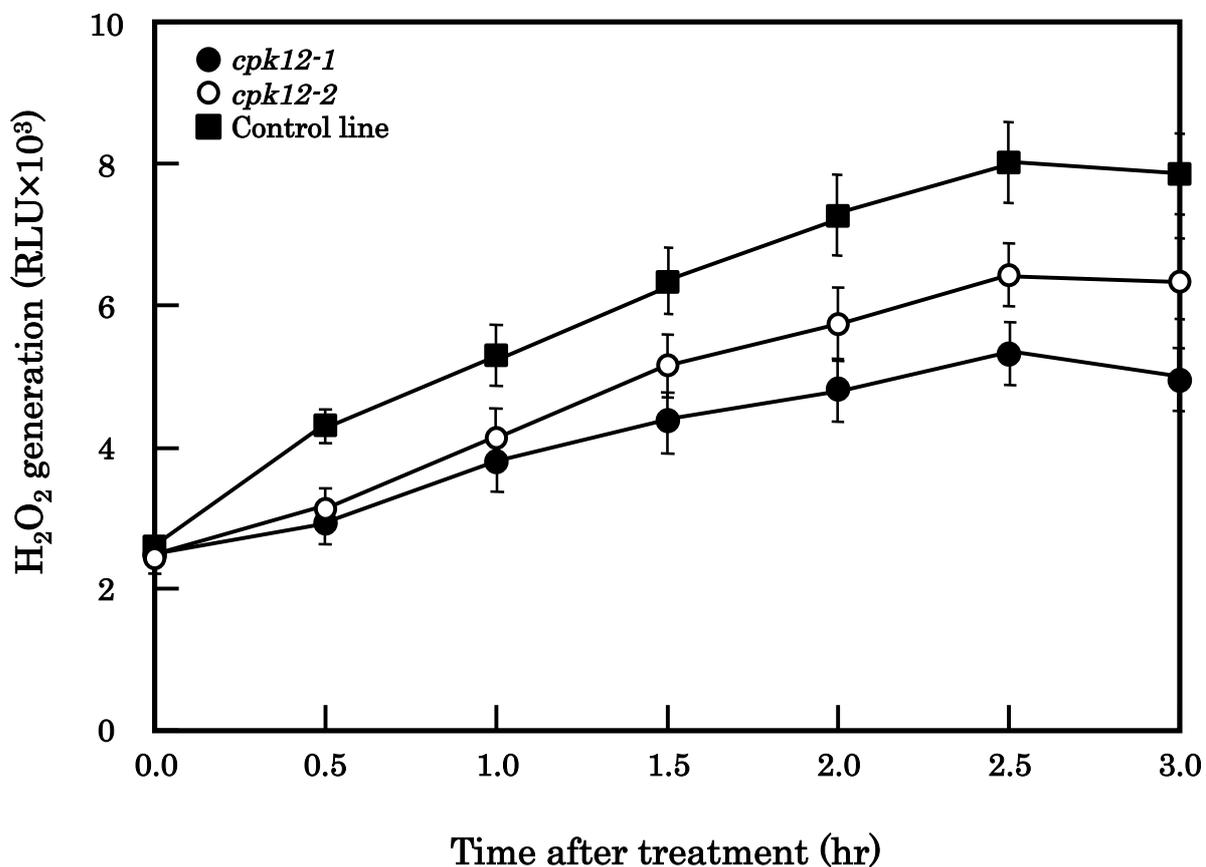
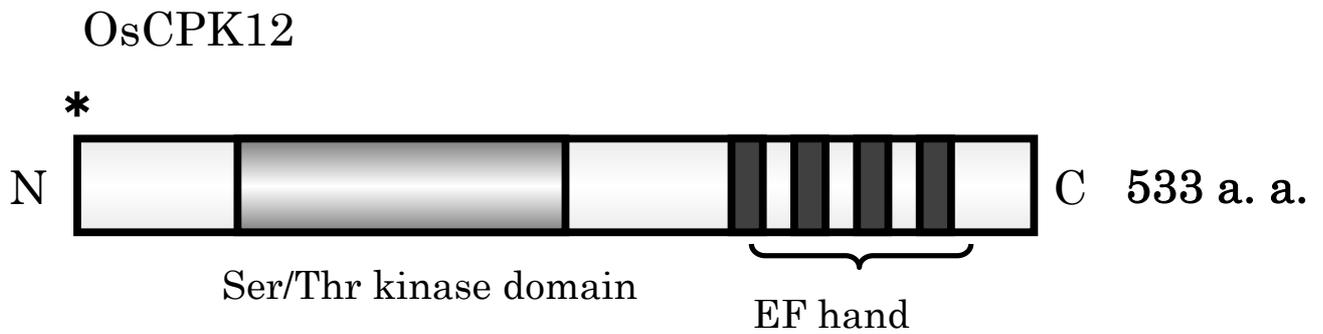


Fig. 11 *OsCPK12* RNAi抑制形質転換培養細胞を用いた活性酸素発生量測定

各*OsCPK12* RNAi抑制形質転換培養細胞に*A. avenae* N1141菌株のフラジェリンを終濃度400 nMとなるように処理後、30分毎に培地上清を経時的に取り、ルミノールを用いた化学発光によって活性酸素の発生量を測定した。



* : Myristoylation site

Fig. 12 OsCPK12の模式図

OsCPK12は、cDNAが1868 bp、533残基のアミノ酸をコードしており、N末端領域に *N*-myristoylation (*N*-ミリストイル化) モチーフ、セリン/スレオニンキナーゼドメイン、C末端には4つのCa²⁺が結合するEF handモチーフを有する。

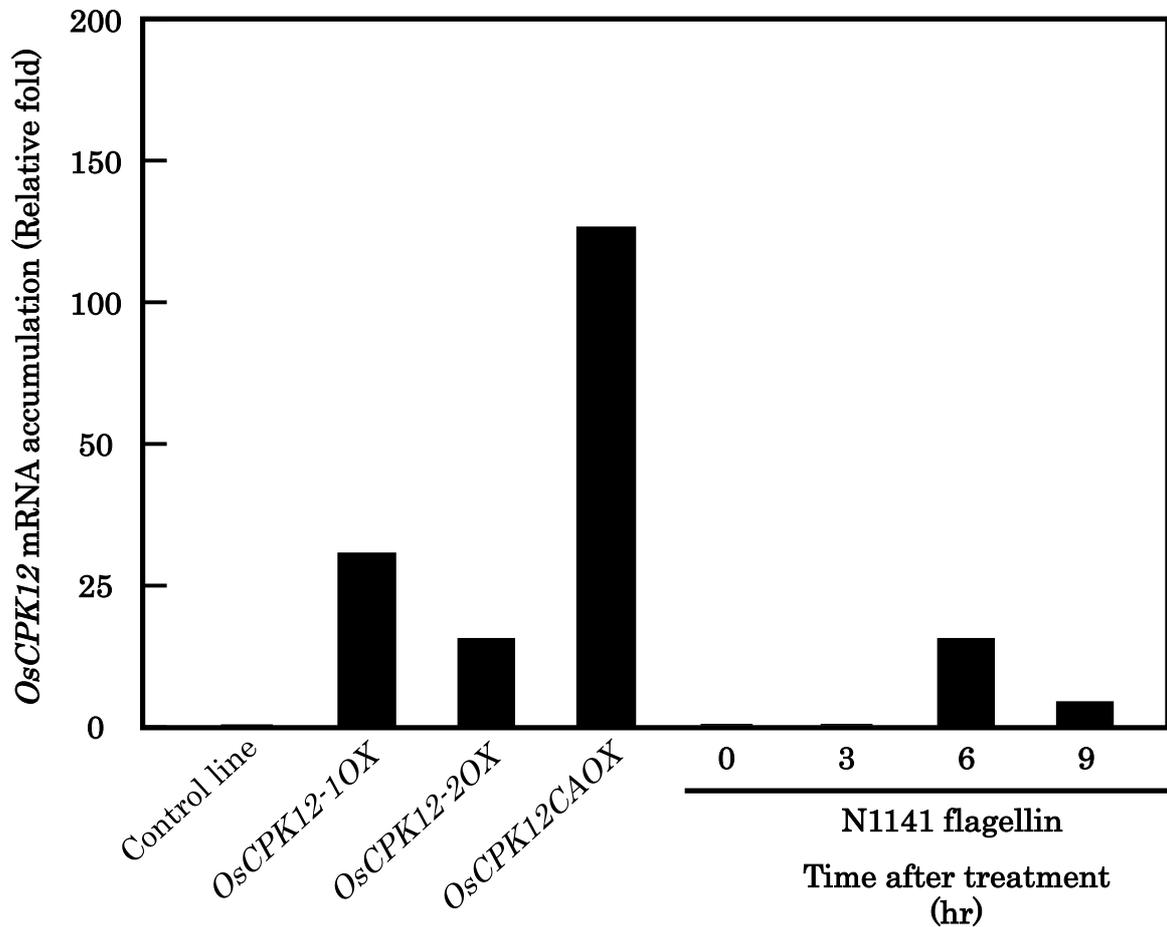


Fig. 13 *OsCPK12*過剰発現培養細胞および*OsCPK12CA*過剰発現培養細胞のmRNAの発現量
 それぞれの*OsCPK12*過剰発現培養細胞、*OsCPK12CA*過剰発現培養細胞における*OsCPK12*の発現量をReal time RT-PCRで確認した。*Empty vector*を形質転換したカルス (Control line) の*OsCPK12*のmRNA量を1とした時の*OsCPK12*の発現量を示している。*OsCPK12*遺伝子の発現量は全て*Act-1*で補正している。また、N1141菌株のフラジェリンを接種した時に発現誘導される*OsCPK12*のmRNA量と比較し、*OsCPK12*が免疫反応誘導時と同程度以上発現されているかを確認した。

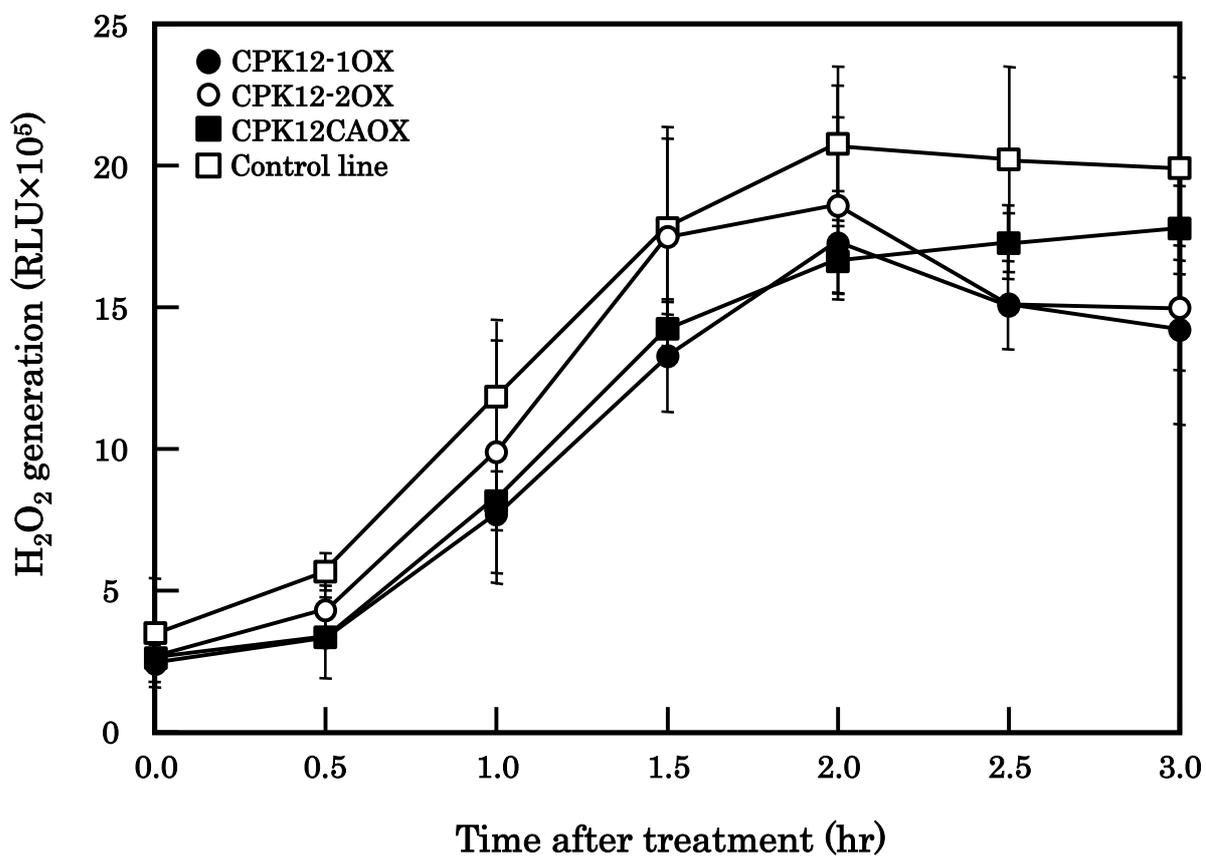


Fig. 14 *OsCPK12*過剰発現培養細胞を用いた活性酸素量測定

各*OsCPK12*過剰発現培養細胞に*A. avenae* N1141菌株のフラジェリンを終濃度200 nMとなるように処理後、30分毎に培地上清を経時的に取り、ルミノールを用いた化学発光によって活性酸素の発生量を測定した。

1-4 考察

A. avenae N1141 菌株から精製したフラジェリン処理によって誘導される活性酸素発生の制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

N1141 菌株のフラジェリンによって誘導される活性酸素の発生は Ca^{2+} キレート剤である EGTA および L 型 Ca^{2+} チャンネル遮断剤である Nifedipine の存在下で顕著に抑制された (Fig. 1A)。このような PAMP によって引き起こされる免疫反応の誘導に Ca^{2+} シグナルが必要であることは他の植物とエリシターにおいても数多く報告されている。例えば、イネ苗立枯病菌 *Trichoderma viride* 由来の Xylanase タンパク質 (TvX) がイネ培養細胞において誘導する過敏感細胞死、活性酸素種の生成、MAPK の活性化、*PBZ1*、*Cht* 等の防御応答遺伝子の発現誘導などの一連の防御応答が、培地中の Ca^{2+} を除くことによって抑制される (Kurusu *et al.*, 2005)。また、ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* 由来の菌体壁成分処理によって誘導されるジャガイモ塊茎での一過的な活性酸素の発生も、EGTA および、Verapamil、Nifedipine、Diltiazem、 CoCl_2 等のカルシウムチャンネル遮断剤により阻害される (Doke *et al.*, 1996)。このように様々なエリシターで誘導される活性酸素発生の Ca^{2+} が関与することから、 Ca^{2+} は病原菌認識シグナル伝達において普遍的に関与する因子である可能性が高いと考えられる。

次に、Yellow cameleon 3.6 を使った実験では、非病原性 N1141 菌株のフラジェリン処理後、約 1 分からイネ培養細胞内における $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇が認められる。これまでに、タバコの BY-2 細胞にトマト根腐疫病菌 *Phytophthora cryptogea* 由来のタンパク質性エリシター Cryptogein を処理すると、約 1 分後から一過的な $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の変化が誘導されるが、 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA 処理を行うと、Cryptogein エリシター処理後の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の変化が抑制されることが報告されている (Kadota *et al.*, 2004)。このことから Cryptogein エリシター処理後の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の変化は細胞外からの Ca^{2+} 流入によるものだと結論づけている。このようなことから、一過的な $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ が液胞などのオルガネラから流入しているわけではなく、細胞外から Ca^{2+} 流入が起きていることを支持する。フラジェリン認識後に起こる $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の上昇が細胞外からの Ca^{2+} 流入によるものなのかどうかは現時点では結論が付かないが、 Ca^{2+} キレート剤である EGTA を処理する

と活性酸素発生が抑制されたことから、フラジェリン処理による細胞内 Ca^{2+} の上昇も、細胞外からの Ca^{2+} の流入によるものと考えられる。フラジェリン処理後の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の上昇が、細胞外からの Ca^{2+} の流入によるものかを明確にするためには、EGTA や Nifedipine 処理によってこのような $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の上昇が認められなくなるかを確かめる必要があるだろう。

フラジェリン処理後 15 分で一過的に Ca^{2+} 依存的な 45~75 kDa のリン酸化タンパク質の蓄積が認められた (Fig. 3)。これまでに、一般的な基質として使われているヒストンを用いて flg22 処理後の内在性の Ca^{2+} 依存的なリン酸化活性を in-gel Kinase assay で検出したところ、flg22 処理後 15 分で 60 kDa と 72 kDa にリン酸化活性が見られた。また、これらのバンドは EGTA 処理によって消失することが報告されている (Boudsocq *et al.*, 2010)。Boudsocq らはこのリン酸化活性が認められた 60 kDa のタンパク質は CPK だと結論づけている。イネとシロイヌナズナにおいて CPK は 50~70 kDa のタンパク質であり、 Ca^{2+} の存在下では自己リン酸化が観察される (Ludwig *et al.*, 2004)。このことから 60 kDa の Ca^{2+} 依存的に蓄積したリン酸化タンパク質は CPK ではないかと推察する。このタンパク質が CPK であるかについては一般的な CPK を認識する抗 CPK 抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認する必要があるだろう。

OsCPK12 RNAi 抑制形質転換培養細胞の mRNA の発現量が 1% 程度だったにも関わらず、フラジェリン処理によって誘導される活性酸素量が 50% 程度しか抑制されなかった。*OsCPK* は 6 つのサブファミリーに分けられ (Asano *et al.*, 2005)、それぞれ同じグループに属している CPK は同じ基質をターゲットにしている (Boudsocq *et al.*, 2010)。N1141 菌株接種後特異的に発現誘導される 6 つの *OsCPK* はそれぞれ、*OsCPK7*、*OsCPK10*、*OsCPK13* はグループ I、*OsCPK12*、*OsCPK19* はグループ II-a、*OsCPK8* はグループ III-b に分類される。今回発現誘導された *OsCPK* はほとんどがグループ I、グループ II-a に分類された。このことから同じ基質をターゲットにしている可能性が高いため、*OsCPK12* だけを抑制しても完全に活性酸素の発生が抑えられないと考える。そのため、同じグループである *OsCPK19* も同時に抑制した形質転換培養細胞を作製し、活性酸素の発生量を測定する必要がある。

OsCPK12 の過剰発現培養細胞ではフラジェリン処理前、処理後においても活性酸素発生量は Control line と比べて変化は無かったこと

から、OsCPK12 の発現量によって制御されているわけではないことが示された (Fig. 14)。これはシロイヌナズナの CPK5 でも同様の結果が得られており、CPK5 を過剰発現しても flg22 処理によって誘導される活性酸素の発存量は野生株と比べて変化がないことが報告されている (Dubiella *et al.*, 2012)。このことを踏まえると、フラジェリンによって誘導される活性酸素の発生はすでに存在している OsCPK12 が Ca^{2+} の結合によって活性化され、活性酸素の発生を制御していると推察できる。一度、活性化された OsCPK は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を下げるか、CPK 自身を分解しないとシグナルがオフにならない。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ は急激に上昇した後、一時間ほどで元の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ まで戻り (Fujiwara, 2007)、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇により活性化されていた OsCPK は元に戻り、活性酸素の発生制御に関わった OsCPK は分解される。こうして分解された OsCPK を補完するための OsCPK の供給が必要ではないかと考えると、今回 N1141 菌株接種またはフラジェリン処理で発現誘導される OsCPK はすべて 6 時間後でその発現量の上昇が顕著だということに納得がいく。

OsCPK12 の N 末端にはミリストイル化モチーフが存在している。いくつかの OsCPK は N 末端領域のミリストイル化、もしくはパルミトイル化モチーフを有していることが知られている (Ellard-Ivey *et al.*, 1999; Martin and Busconi, 2000; Rutschmann *et al.*, 2002)。N-ミリストイル化は、タンパク質の N 末端に炭素数 14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸が共有結合する脂質修飾である。N-ミリストイル化されたタンパク質は細胞膜やオルガネラ膜との結合に関わるため、OsCPK12 は膜にアンカーされると考えられる。OsCPK12 は細胞膜に局在することで、フラジェリン認識後、細胞外から流入する Ca^{2+} によって素早く活性化され、Osrboh のような膜タンパク質をリン酸化し、活性酸素の発生を制御していると考えられる。

第 2 章

OsCPK12 による活性酸素発生の制御機構の解析

第 2 章 OsCPK12 による活性酸素発生の制御機構の解析

2-1 緒言

第 1 章では、フラジェリンによって誘導される活性酸素発生には細胞内 Ca^{2+} シグナリングとタンパク質のリン酸化が関与していることを明らかにした。さらに、活性酸素の発生に関わる分子として OsCPK12 を同定した。そこで、本章では、OsCPK12 による活性酸素発生の制御機構について明らかにすることを目的として研究を行った。

2-2 材料および方法

1. プラスミドの作製

1) プロトプラスチド発現用コンストラクトの作製

プロトプラスチドでタンパク質を一過的に発現させるためのベクターを作製するために、イネの cDNA をテンプレートにして *OsMEK1* (AF216315)、*OsMAP1* (AF216314)、*OsMAP2* (AF216316)、*OsSYP13b* (AK100316.1) の ORF 領域を増幅した。反応液 (2×KODFX buffer 5 μ l、2.5 mM dNTPs 2 μ l、KODFX Taq [Toyobo] 0.05 μ l、滅菌水 2.35 μ l、10 mM Primer F 0.3 μ l、10 mM Primer R 0.3 μ l、cDNA 1 ng、Total vol. 10 μ l) を調製し、98°C 2分、(98°C 10秒、55°C 30秒、68°C 2分) ×30 サイクル、68°C 5分の条件で PCR を行い、目的遺伝子が増幅しているかを確認した。*OsCPK12*、*OsCPK12CA* の ORF 領域の増幅は、*OsCPK12/pENTR* をテンプレートとして PrimeSTAR Taq を用いた PCR で行った。各 *Osrboh* 遺伝子の細胞内ドメイン (*OsrbohAN*: ²³⁷Met-⁴¹⁹Ala、*OsrbohAC*: ⁵⁷⁷Val-⁹⁴³Phe、*OsrbohBN*: ¹Met-⁴⁷⁰Ala、*OsrbohBC*: ⁶⁴⁰Ala-⁸⁸⁶Ile、*OsrbohDN*: ¹Met-⁴²⁷Ala、*OsrbohDC*: ⁵⁸⁵Ile-⁹⁵¹Phe) は、それぞれ *OsrbohA-N/pGEX* (奈良先端大学大学院 藤原博士から分与)、*OsrbohA* (J033138P16)、*OsrbohB* (J023003N01)、*OsrbohD* (J0223031D09) のイネ完全長 cDNA クローン (独立行政法人 農業生物資源研究所から分与) をテンプレートとして KODFX Taq を用いた PCR を行った。*Osrboh* は 6 回膜貫通タンパク質であり、相互作用に関係しているのは細胞内ドメインであると考えたので、Pfam を用いてタンパク質の構造を予測し、膜貫通領域より N 末端側を *Osrboh* の N 末端領域、膜貫通領域より C 末端側を *Osrboh* の C 末端領域として、それぞれをコードする領域を増幅した (Fig. 25)。また、ネガティブコントロールとして用いた *GUS* (*β -glucuronidase*) は、pBI221 をテンプレートとして Blend taq を用いた PCR で増幅した。増幅が確認出来た PCR 産物を pENTR-D-TOPO cloning kit を用いて *pENTR-D-TOPO* vector へライゲーションした。上記のライゲーション反応液 3 μ l を DH5 α に加えて、ハナハン法で形質転換後、LB 寒天培地 (カナマイシン終濃度 50 μ g/ml) に塗布し、37°C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。目的導入遺伝子の挿入が確認出来た PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝

子と完全一致することを確認し、エントリークローンとした。このようにして作製したエントリークローンはそれぞれ *OsMEK1/pENTR*、*OsMAP1/pENTR*、*OsMAP2/pENTR*、*OsCPK12/pENTR*、*OsCPK12CA/pENTR*、*OsSYP13b/pENTR*、*OsrbohAN/pENTR*、*OsrbohAC/pENTR*、*OsrbohBN/pENTR*、*OsrbohBC/pENTR*、*OsrbohDN/pENTR*、*OsrbohDC/pENTR*、*GUS/pENTR* と名付けた。

使用したプライマーセット

< *OsMEK1* >

Forward : 5'-CACCATGAGGGGGAAGAAGCCG-3'
Reverse : 5'-CTCGGATATATTCATTGGAG-3'

< *OsMAP1* >

Forward : 5'-CACCATGGACGGGGCGCCGGT-3'
Reverse : 5'-GTACCGGATGTTTGGGTTCA-3'

< *OsMAP2* >

Forward : 5'-CACCATGGCGATGATGGTGAGAC-3'
Reverse : 5'-CATATTCACTCCTGCAACAACCTCTGG-3'

< *OsCPK12* >

Forward : 5'-CACCATGGGCAACTGCTTCACCAA-3'
Reverse : 5'-GGATCCGGTTTGTATTCCTTTCCTCAT-3'

< *OsCPK12CA* >

Forward : 5'-CACCATGGGCAACTGCTTCACCAA-3'
Reverse : 5'-GAGCCATCGATGTTCTAAGGCCTGCG-3'

< *OsrbohAN* >

Forward : 5'-CACCATGAAGGTGGACACATTA -3'
Reverse : 5'-TTTCCAGTTGTCCTCGAAATAGT -3'

< *OsrbohAC* >

Forward : 5'-CACCATGATTGCATGGAGTG -3'

Reverse : 5'-GAAATGCTCCTTATGGAATT-3'

< *OsrbohBN* >

Forward : 5'-CACCATGTGGACGCCGTCG-3'

Reverse : 5'-CGCCGTCGGGAGGCAGTACC-3'

< *OsrbohBC* >

Forward : 5'-CACCATGGCCCATGGGTACTTCCT-3'

Reverse : 5'-AATGACAATGGCTCCCGGGT-3'

< *OsrbohDN* >

Forward : 5'-CACCATGAGGGCGGGAATC-3'

Reverse : 5'-TGCAGTTGTTACACAGTAGC-3'

< *OsrbohDC* >

Forward : 5'-CACCATGATTCATGGAGAGTGGCT-3'

Reverse : 5'-GAAATGCTCCTTGTGAAACT-3'

< *GUS* >

Forward : 5'-CACCATGTTACGTCCTGTAGAAAC-3'

Reverse : 5'-TTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3'

< *OsSYP13b* >

Forward : 5'-CACCATGAGGAACCTTCTCACGGAT-3'

Reverse : 5'-CTACTTAGACCACGGCTTTAAGGAG-3'

OsCPK12 の活性中心と予測される 215 番目と 236 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した変異体 (*OsCPK12CAD215N/pENTR*、*OsCPK12CAD236N/pENTR*) を作製するために、*OsCPK12CA/pENTR* をテンプレートとして KOD-Plus-mutagenesis kit (Toyobo) を用いて Inverse PCR を行い、*OsCPK12CAD215N/pENTR*、*OsCPK12CAD236N/pENTR* を作製した。

使用したプライマーセット

< *OsCPK12CAD215N* >

Forward : 5'-AACCTCAAGCCGGAGAACTTCCTGC-3'
Reverse : 5'-GCGGTGTATGACCCCATGAAGTGG-3'

< *OsCPK12CAD236N* >

Forward : 5'-AACTTCGGACTCTCCGTCTTCATCG-3'
Reverse : 5'-GATGGCCTTGAGCGGCGCGTCGTCG-3'

次に *pBI221* の *Sma*I と *Sac*I サイトに *Venus* (DQ092360.1)、*Vn* (*Venus* の ¹Met~¹⁵⁴Thr)、*Vc* (*Venus* の ¹⁵⁵Ala~²³⁹Lys) を保持したベクター (*Venus/pBI221*、*Vn/pBI221*、*Vc/pBI221*) の *Sma*I サイトに Gateway cassette をライゲーションし、それぞれ、*GW-Venus/pBI221*、*GW-Vn/pBI221*、*GW-Vc/pBI221* と名付けた。さらに *Venus/pBI221* の *Sac*I サイトに Gateway cassette をライゲーションしたベクターを *Venus-GW/pBI221* と名付けた。

使用したプライマーセット

< *Venus* >

Forward : 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
Reverse : 5'-TACTTGTACAGCTCGTCCA -3'

< *Vn* 断片 >

Forward : 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
Reverse : 5'-GGTGATATAGACGTTGTGGC-3'

< *Vc* 断片 >

Forward : 5'-GCCGACAAGCAGAAGAACGG-3'
Reverse : 5'-TACTTGTACAGCTCGTCCA-3'

N 末端側に *Venus* を融合したタンパク質を発現するベクターを製作するために、エントリークローン (*OsSYP13b/pENTR*) とDESTINY ネーションベクター (*Venus-GW/pBI221*) を用いて LR clonase 反応を行った。

C末端側に Venus を融合したタンパク質を発現するベクターを作製するために、それぞれのエントリークローン (*OsMEK1/pENTR*、*OsMAP1/pENTR*、*OsMAP2/pENTR*、*OsCPK12/pENTR*、*OsCPK12CA/pENTR*、*OsCPK12CAD215N/pENTR*、*OsCPK12CAD236N/pENTR*、*OsrbohAN/pENTR*、*OsrbohAC/pENTR*、*OsrbohBN/pENTR*、*OsrbohBC/pENTR*、*OsrbohDN/pENTR*、*OsrbohDC/pENTR*、*GUS/pENTR*) とデスティネーションベクター (*GW-Venus/pBI221*) を用いて LR clonase 反応を行った。また、Vn 融合ベクターを作製するためにエントリークローン (*OsMEK1/pENTR*、*OsrbohAN/pENTR*、*OsrbohAC/pENTR*、*OsrbohBN/pENTR*、*OsrbohBC/pENTR*、*OsrbohDN/pENTR*、*OsrbohDC/pENTR*、*GUS/pENTR*) とデスティネーションベクター (*GW-VN/pBI221*) を用いて LR clonase 反応を行った。Vc 融合ベクターを作製するためにエントリークローン (*OsMAP1/pENTR*、*OsMAP2/pENTR*、*OsCPK12/pENTR*、*OsCPK12CA/pENTR*、*OsCPK12CAD215N/pENTR*、*OsCPK12CAD236N/pENTR*) とデスティネーションベクター (*GW-Vn/pBI221*) を用いて LR clonase 反応を行った。それぞれの反応液を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換し、一晚培養後、生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニーPCR で確認した。目的導入遺伝子が確認されたコロニーを LB 液体培地 (アンピシリン終濃度 50 μ g/ml) 3 ml に植菌し、37 $^{\circ}$ C 一晚振盪培養し、4,200 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心分離した。菌体を回収後、QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを単離した。これらのプラスミドをそれぞれ、DNA シークエンサーで配列解析し、目的導入遺伝子と完全一致することを確認し、プロトプラスト発現用コンストラクトとした。これらのコンストラクトを *OsMEK1-Venus/pBI221*、*OsMAP1-Venus/pBI221*、*OsMAP2-Venus/pBI221*、*OsCPK12-Venus/pBI221*、*OsCPK12CA-Venus/pBI221*、*OsCPK12CAD215N-Venus/pBI221*、*OsCPK12CAD236N-Venus/pBI221*、*Venus-OsSYP13b/pBI221*、*OsrbohAN-Venus/pBI221*、*OsrbohAC-Venus/pBI221*、*OsrbohBN-Venus/pBI221*、*OsrbohBC-Venus/pBI221*、*OsrbohDN-Venus/pBI221*、*OsrbohDC-Venus/pBI221*、*GUS-Venus/pBI221*、*OsMEK1-VN/pBI221*、*OsMAP1-Vc/pBI221*、*OsMAP2-Vc/pBI221*、*OsCPK12-Vc/pBI221*、*OsCPK12CA-Vc/pBI221*、*OsCPK12CAD215N-Vc/pBI221*、

OsCPK12CAD236N-Vc/pBI221 、 *OsrbohAN-Vn/pBI221* 、
OsrbohAC-Vn/pBI221 、 *OsrbohBN-Vn/pBI221* 、
OsrbohBC-Vn/pBI221 、 *OsrbohDN-Vn/pBI221* 、
OsrbohDC-Vn/pBI221、 *GUS-Vn/pBI221* と名付けた。

さらに、*Vn-SYP13b/pBI221* を作製するために、*Venus-OsSYP13b/pBI221* をテンプレートに KOD-Plus-mutagenesis kit を用いて Inverse PCR を行い、*Vn-OsSYP13b/pBI221* を作製した。

使用したプライマーセット

Forward : 5'-GGAGGATCTGGAGGATCAACAAGTT-3'
Reverse : 5'-GGTGATATAGACGTTGTGGCTGTTG-3'

2) 大腸菌 Rosetta-gamiB 発現用プラスミドの作製

大腸菌 Rosetta-gamiB は、カナマイシンに対して耐性があるため、発現用ベクター *pET28b* (Merck) にトリメトプリム耐性遺伝子を組み込んだ。*pBBR1Tp* をテンプレートとして Blend Taq を用いてトリメトプリム耐性遺伝子を増幅した。その PCR 産物を In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて、*pET28b* の *NruI* サイトにライゲーションし、DH5 α へ形質転換後、LB 寒天培地 (トリメトプリム終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$) に塗布し、37°C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。得られた PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認した。このプラスミドを *pETTp* と名付けた。

使用したプライマーセット

Forward : 5'-TCAACGGGAAACGTCTTGCTCTA-3'
Reverse : 5'-TTTCAGAAACAACACTCTGGCGCAT-3'

大腸菌内で Venus タンパク質、Vn タンパク質、OsMEK1-Vn タンパク質を発現するためのベクターを作製するため、Venus、Vn、OsMEK1-Vn は *Venus/pBI221* または *OsMEK1-Vn/pBI221* をテンプレートとして Blend Taq を用いた PCR で、目的導入遺伝子を増幅した。その PCR 産物を *NcoI* と *XhoI* で制限酵素処理し、*pETTp* へラ

イゲーションした。上記のライゲーション反応液を 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換した後、LB 寒天培地（トリメトプリム終濃度 50 μ g/ml）に塗布し、37°Cで一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニーPCR で確認した。目的導入遺伝子の挿入が確認出来た PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認した。この様にして作製したプラスミドをそれぞれ、*Venus/pETTp*、*Vn/pETTp*、*OsMEK1-Vn/pETTp* と名付けた。

OsCPK12-Vn タンパク質を発現するためのベクターを作製するため、*OsCPK12-Vn/pET28b* をテンプレートとして KODFX Taq を用いた PCR で、目的導入遺伝子を増幅した。その PCR 産物を *XbaI* で制限酵素処理し、*pETTp* へライゲーションした。上記のライゲーション反応液を 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換した後、LB 寒天培地（トリメトプリム終濃度 50 μ g/ml）に塗布し、37°Cで一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニーPCR で確認した。目的導入遺伝子の挿入が確認出来た PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認した。この様にして作製したプラスミドを *OsCPK12-Vn/pETTp* と名付けた。

使用したプライマーセット

< *Venus* >

Forward : 5'-CCATGGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
Reverse : 5'-CTCGAGGTACAGCTCGTCCATGCCCA-3'

< *Vn* >

Forward : 5'-CCATGGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
Reverse : 5'-CTCGAGGGTGATATACACGTTGTGGC-3'

< *OsMEK1-Vn* >

Forward : 5'-CATGCCATGGCTATGAGGGGGAAGAAGCCG-3'
Reverse : 5'-CTCGAGGGTGATATACACGTTGTGGC-3'

< *OsCPK12-Vn* >

Forward :
5'-CAATTCCCCTCTAGAATGGGCAACTGCTTCACCAA -3'
Reverse :
5'-AAAATTATTTCTAGATCAGGTGATATACACGTTGT -3'

次に、Vc 融合タンパク質を発現するベクターを作製するために、*Venus/pBI221* をテンプレートとして Blend Taq を用いた PCR で、*Venus* の Vc 断片を増幅した。その PCR 産物を *NcoI* と *XhoI* で制限酵素処理し、*pCDF-Duet* (Novagen) へライゲーションした。上記のライゲーション反応液 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換した後、LB 寒天培地 (スペクチノマイシン終濃度 50 μ g/ml) に塗布し 37°C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。Vc 断片の挿入が確認された PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認し、このプラスミドを *NcoI-Vc/pCDF* と名付けた。*NcoI-Vc/pCDF* の *NcoI* サイトを KOD-Plus-mutagenesis kit を用いた Inverse PCR で *EcoRV* サイトに変更し、得られたプラスミドを *pCDF-Vc* と名付けた。

使用したプライマーセット

< *Vc* 断片 >

Forward : 5'-CCATGGCAGCCGACAAGCAGAAGAACGG-3'
Reverse : 5'-CTCGAGGTACAGCTCGTCCATGCCCA-3'

< Inverse PCR >

Forward : 5'-TGAGCAATAACTAGCATAACCCCTT-3'
Reverse :
5'-GTCAGTCAGTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA-3'

大腸菌内で *OsMAP1-Vc*、*OsMAP2-Vc*、*OsMAP3-Vc* タンパク質を発現させるためのベクターを作製するために、イネの cDNA をテンプレートとして Blend Taq で PCR を行った。また、*GUS-Vc* を発現させるためのベクターを作製するために、*pBI221* をテンプレートとして Blend Taq で PCR を行った。目的導入遺伝子が増幅しているかを

確認し、それぞれの PCR 産物を *EcoRV* で制限酵素処理後、*pCDF-Vc* ヘライゲーションした。上記のライゲーション反応液を 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換後、LB 寒天培地（スペクチノマイシン終濃度 50 μ g/ml）に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。目的導入遺伝子の挿入が確認出来た PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認した。これらのプラスミドをそれぞれ *OsMAP1-Vc/pCDF*、*OsMAP2-Vc/pCDF*、*OsMAP3-Vc/pCDF*、*GUS-Vc/pCDF* と名付けた。

使用したプライマーセット

< *OsMAP1* >

Forward : 5'-CACCATGGAGGGGGCGCCGGT-3'

Reverse : 5'-GTACCGGATGTTTGGGTTCA-3'

< *OsMAP2* >

Forward : 5'-GATATCATGGCGATGATGGTGGAC-3'

Reverse : 5'-GATATCCATATTCACCTCCTGCAACAACAACC-3'

< *OsMAP3* >

Forward : 5'-GATATCATGGCGATCATGGTGGATC-3'

Reverse : 5'-GATATCTCGGGCACTCATTGCTG-3'

< *GUS* >

Forward : 5'-TTTAAAATGTTACGCCTGTAGAAACCCC-3'

Reverse : 5'-TTTAAATTGTTTGCCTCCCTGCTG-3'

3) cDNA ライブラリー用のベクター作製

読み枠の異なる 6 種類の *pCDF-Vc* を作製するために、KOD-Plus-mutagenesis kit を用いて、*pCDF-Vc* をテンプレートとして 3 種類のプライマーセットで Inverse PCR を行った。それぞれの PCR 産物をセルフライゲーションさせ、その反応液 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換した後、LB 寒天培地（スペクチノマイシン終濃度 50 μ g/ml）に撒き、37 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロ

ニーPCRで確認し、確認出来たPCR産物の配列解析を行い、それぞれ設計した読み枠であることを確認した。この3種類の読み枠のベクターをそれぞれ *pCDF-T7A-Vc*、*pCDF-T7B-Vc*、*pCDF-T7C-Vc* と名付けた。

さらに、*pCDF-T7A-Vc*、*pCDF-T7B-Vc*、*pCDF-T7C-Vc* のそれぞれをテンプレートとして2種類のプライマーセットを用いた Inverse PCR を行った。それぞれのPCR産物をセルフライゲーションさせ、その反応液 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換した後、LB寒天培地（スペクチノマイシン終濃度 50 μ g/ml）に塗布し、37°Cで一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニーPCRで確認した。確認出来たPCR産物の配列解析を行い、それぞれ設計した読み枠であることを確認した。それらプラスミドをそれぞれ *pCDF-T7A-Vc1*、*pCDF-T7A-Vc2*、*pCDF-T7B-Vc1*、*pCDF-T7B-Vc2*、*pCDF-T7C-Vc1*、*pCDF-T7C-Vc2* と名付けた。これら6種類のプラスミドを混ぜて、*pCDF-Vc-mix* とした (Fig. 18)。

使用したプライマーセット

< *pCDF-T7A-Vc* >

Forward : 5'-GATATCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA-3'
Reverse : 5'-CATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACA-3'

< *pCDF-T7B-Vc* >

Forward : 5'-GATATCCAGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT-3'
Reverse : 5'-CATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACA-3'

< *pCDF-T7C-Vc* >

Forward : 5'-GATATCAGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC-3'
Reverse : 5'-CATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACA-3'

< 1 >

Forward : 5'-GATATCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA-3'
Reverse : 5'-GCCATGGTATATCTCCTTATTAAAGTT-3'

認した。目的導入遺伝子の挿入が確認された PCR 産物を配列解析し、目的導入遺伝子と完全一致することを確認し、これらのプラスミドをそれぞれ *OsCPK12-Flag/PCR-Blunt*、*OsCPK12CA-Flag/PCR-Blunt* と名付けた。*OsCPK12-Flag/PCR-Blunt*、*OsCPK12CA-Flag/PCR-Blunt* をテンプレートとして KODFX Taq を用いた PCR で目的導入遺伝子を増幅した。その PCR 産物を *SmaI* で制限酵素処理し、TA-Blunt Ligation kit (Nippon gene) を用いて *pGEX* vector へライゲーションした。上記のライゲーション反応液 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換した後、LB 寒天培地（アンピシリン終濃度 50 μ g/ml）に塗布し、37°C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニー PCR で確認した。*SmaI-OsCPK12-Flag-SmaI*、*SmaI-OsCPK12CA-Flag-SmaI* の挿入が確認された PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認し、これらのプラスミドをそれぞれ *GST-OsCPK12-Flag/pGEX*、*GST-OsCPK12CA-Flag/pGEX* と名付けた。

使用したプライマーセット

< *SmaI-OsCPK12-Flag-SmaI*, *SmaI-OsCPK12CA-Flag-SmaI* >

Forward :

5'-ATTCCCGGGATATGGGCAACTGCTTCACCAA-3'

Reverse :

5'-TAACCCGGGTCACTTATCATCATCATCCTTGTAAT-3'

コロニー PCR 用のプライマーセット

< *pGEX* >

Forward : 5'-TATAGAATTCCGACGTGTCCTCGCAGACC-3'

Reverse : 5'-TATAGAATTCACGCAGCAGGGACAGCAC-3'

OsCPK12 の活性中心を Pfam で予測したところ、215 番目と 236 番目のアスパラギン酸が活性中心であることが予測された。そこで、*OsCPK12* の予測活性中心をアスパラギンに置換した変異体を作製するために、*GST-OsCPK12CA-Flag/pGEX* をテンプレートに KOD-Plus-mutagenesis kit を用いて Inverse PCR を行った。PCR 産

物を *DpnI* で制限酵素処理し、*Ligation* 反応を行った。上記のライゲーション反応液 3 μ l を DH5 α に加え、ハナハン法で形質転換した後、LB 寒天培地（アンピシリン終濃度 50 μ g/ml）に塗布し、37°C で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニーPCR で確認した。目的遺伝子の挿入が確認された PCR 産物の配列解析を行い、目的導入遺伝子と完全一致することを確認し、これらのプラスミドをそれぞれ *GST-OsCPK12CAD215N/pGEX*、*GST-OsCPK12CAD236N/pGEX* と名付けた。

2. イネプロトプラスト内における局在解析と BiFC 法による相互作用の解析

1) イネプロトプラスト単離

継代 4 日目のイネ培養細胞をプラスチックシャーレに移し、R2S 培地を取り除いた。そこに、Millipore GS 0.22 μ m のフィルター (MILLIPORE) で滅菌濾過した Enzyme solution (1.0% [w/v] Cellulase Onozuka RS [Yakult]、0.5% [w/v] Macerozyme R10 [Yakult]、0.1% [w/v] Pectolyase Y23 [Kyowa Chemical Products]、0.6 M Mannitol、5 mM MES-KOH、pH 5.7、10 mM CaCl₂、0.1% [w/v] Bovine serum albumin) を加え、遮光下、30°C で 3 時間静置し、酵素処理を行った。酵素処理後、培養細胞を 100 μ m セルストレイナー (BD falcon) で濾過し、50 ml チューブに回収し、200 \times g、室温で 3 分間、CAX-370 (TOMY) を用いて遠心分離を行った。上清を除去し、KMC solution (117 mM KCl、82 mM MgCl₂、85 mM CaCl₂) を 3 ml 加えて緩やかに混合し、再度上記の条件で遠心分離を行った。上清を除去し、KMC solution を 1 ml 加えて緩やかに混合し、上記の条件で遠心分離を行った。上清を除去し、あらかじめ氷冷しておいた MMg solution (0.3 M Mannitol、15 mM MgCl₂、4 mM MES-KOH、pH 5.7) を 1 ml 加え、緩やかに混合した後、血球計算版を用いて、細胞密度を算出した。

2) プロトプラストへの遺伝子導入

回収したプロトプラストを 5.0×10^5 cells/ml になるように MMg solution に懸濁し、1.5 ml チューブにプロトプラスト溶液を 200 μ l 加えた。上記のチューブに導入遺伝子のプラスミドを 5 μ g 分注し、

PEG solution (40%PEG 4000 [Fluka]、0.2 M Mannitol、0.1 M CaCl₂) を 210 μ l 添加後、先切チップを用いて 1 分間、20 回穏やかにピペッティングし、15 分間静置した。その後、KMC solution を 800 μ l 加え、転倒混和することで反応を停止させ、200 \times g、室温で 5 分間 CAX-370 を用いて遠心分離を行った。上清を除去し、500 μ l の KMC solution を加え、緩やかに懸濁後、24 穴プレートに移し、遮光下、30 $^{\circ}$ C で 12 ~16 時間静地培養した。

3) 顕微鏡によるタンパク質の局在解析

イネプロトプラスト内での Venus 融合タンパク質の局在を確認するために、それぞれの Venus 融合タンパク質発現ベクターをイネプロトプラストに導入し、暗所、30 $^{\circ}$ C で 12~16 時間静置培養した後、共焦点レーザー走査型電子顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000 [OLYMPUS]) で Venus 由来の蛍光を観察した。次に、BiFC 法による相互作用解析を行うため、それぞれ Vn 融合タンパク質発現ベクターと Vc 融合タンパク質発現ベクターをイネプロトプラストに導入した。30 $^{\circ}$ C、暗所で 12~16 時間静置培養した後のプロトプラストを共焦点レーザー走査型電子顕微鏡で BiFC 由来の蛍光を観察した。また、観察は 60 \times 対物レンズ (水浸レンズ) を用い、473 nm で励起させ、Dye は EYFP を使用した。

3. 大腸菌 Rosetta-gamiB を用いた BiFC 法による相互作用タンパク質の検出

1) 大腸菌 Rosetta-gamiB のコンピテントセルの作製

大腸菌 Rosetta-gamiB を LB 寒天培地にプレーティングし 37 $^{\circ}$ C、16 時間静置培養した。生育してきたシングルコロニーを LB 液体培地 3 ml に植菌し 180 rpm、37 $^{\circ}$ C で 16 時間振盪培養した。その培養液 100 μ l を無菌的に 2 \times YT 培地 100 ml に加え、OD₆₁₀ が 0.4~0.8 になるまで 180 rpm、37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。その培養液を 50 ml チューブに 25 ml ずつ分注し、2,400 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間 TOMY MX300 で遠心分離し、上清を除去し、そこに滅菌水 10 ml 加え懸濁し、2,400 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間の遠心操作により集菌した。この滅菌水の洗浄を 3 回繰り返した。次に集菌した菌体に 20% (v/v) グリセロールを 5 ml 加え、懸濁後 1 本にまとめた。2,400 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間 TOMY MX300 で遠心分離後、上清を除去し、20% (v/v) グリセロールを 20 ml 加えた。

この操作を 2 回繰り返す、最後に上清を除去した。その菌体に 10% (v/v) グリセロールを 2 ml 加え懸濁し、1.5 ml チューブに 50 μ l ずつ分注し、それぞれのチューブを液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。

2) タンパク質発現と BiFC 法による蛍光観察

作製したコンピテントセル 50 μ l に大腸菌発現用ベクターを 1 ng それぞれ加え、氷上に 5 分間静置後、氷上で冷やした 1 mm キュベットに全量入れ、Gene Pluser Xcell™ (BIO RAD) を用いて 2,000 v、25 mF、200 Ω でプラスミドを導入した。キュベット内の菌懸濁液を 37°C に加温した 950 μ l の SOC 培地に入れ、180 rpm、37°C で 1 時間振盪培養した。LB 寒天培地 (スペクチノマイシン終濃度 50 μ g/ml、トリメトプリム終濃度 50 μ g/ml) 上に Magna Nylon Transfer Membrane (MSI、ポアサイズ ϕ 0.45 mm、メンブレン直径 ϕ 82 mm) を乗せ、菌体培養液をガラスビーズ Bac' n' Roll Beads (NIPPON GENE) で塗布し、37°C で 20 時間静置培養した。コロニーが生育したメンブレンをピンセットで持ち上げ、その下に 1 μ M IPTG 溶液 500 μ l を染みこませ、遮光して 25°C に静置し、3 時間おきに FLA-3000 (FUJIFILM) で BiFC 由来の蛍光を観察した。

3) 大腸菌内でのタンパク質の発現確認

IPTG 誘導後 6 時間のコロニーからカミソリを用いて集菌し、10 mM MgSO₄ 溶液に懸濁した。この菌懸濁液の OD₆₁₀ が 0.75 になるように希釈した。この菌懸濁液 5 μ l に、等量の 2×Sample buffer を加えた。このサンプルを 95°C で 5 分熱処理後、12.5% アクリルアミドゲルに全量アプライし、100 V 定電圧で 120 分間 SDS-PAGE を行った。泳動後、セミドライプロッターを用いて、10 V 定電圧で 2 時間転写を行った。転写後、ニトロセルロース膜を TBST に移し、5 分間振盪後、TBST を捨て、ブロッキングバッファー (TBST、5% スキムミルク) を加え、1 時間振盪した。ブロッキング後、TBST でニトロセルロース膜を 5 分間、5 回洗浄した。洗浄後、TBST で抗 GFP 抗体 (MBL) を 1/5000 に希釈した一次抗体溶液を加え、1 時間振盪後、4°C で一晩静置した。ニトロセルロース膜を 5 分間、5 回洗浄後、TBST で IgG Rabbit 抗体を 1/5000 に希釈した二次抗体溶液を加え、1 時間振盪した。ニトロセルロース膜を TBST で 5 分間、5 回洗浄した。洗浄液をよくきったニトロセルロース膜に ECL-prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) の A 液と B 液が 1 : 1 になるように加え、

遮光して 5 分間静置後、ルミノ・イメージアナライザーLAS-4000 (FUJI FILM) を用いてバンドを検出した。すべてのレーンにタンパク質が等量アプライ出来ているかを確認するため、同様の条件で SDS-PAGE を行い、銀染色キットワコー (Wako) を用いてタンパク質量を確認した。SDS-PAGE 後のゲルに固定液 I (50% Methanol、10% CH₃COOH) を加え、15 分間振盪後、固定液 I を除去した。次に、固定液 II (50% Methanol、7.5% CH₃COOH、20% [v/v] 固定原液) を加え 15 分間振盪した。純水で 3 回洗浄後、0.5% [v/v] 増感液を加え 10 分間振盪した。溶液を除去後、純水で 5 分間洗浄した。純水を除去後、染色液 (5% 染色液 A、5% 染色液 B) を加え 15 分間振盪した。染色液を除去し、純水で 5 分間、3 回洗浄した。洗浄後、ゲルを現像液に浸し、タンパク質の検出を行った。検出後、CH₃COOH 250 μ l を加え、現像を停止した。溶液を除去し、純水で 2 分間、3 回洗浄した。

4. ランダムプライマーを用いたイネ cDNA ライブラリーの作製

Pseudomonas F 寒天培地に *A. avenae* N1141 菌株のスキムミルクストックを 50 μ l 塗布し、30°C で 20 時間静置培養した。クリーンベンチ内で滅菌水 1 ml を寒天培地に加え、コンラージ棒で N1141 菌株を掻き取り、菌体懸濁液を 1.5 ml チューブに回収した。その菌体懸濁液を 100 倍希釈して OD₆₁₀ を測定し、 1.0×10^7 cfu/ μ l となるように調製した。この菌体懸濁液をイネ培養細胞に 1.0×10^8 cfu/ml となるように接種後、108 rpm、30°C、連続光下で振盪培養した。菌接種後、0 ~ 9 時間のイネ培養細胞を 1 ml ずつ経時的にサンプリングし、PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O、1.76 mM KH₂PO₄、pH7.4) 1 ml で 3 回洗い、液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。また、過敏感細胞死が起きていることを確認するため、菌接種後 0、3、6、9 時間のイネ培養細胞を 24 穴プレートに 1 ml ずつサンプリングした。培地を取り除き、0.05% エバンスブルー染色液を 500 μ l 加え、遮光して、室温で 15 分間静置した。純水で 3 回洗浄後、脱色液 (50% Methanol、1% SDS) を 1 ml 加え、一晩静置後、595 nm の吸光度を測定した。

-80°C で保存したイネ培養細胞に液体窒素を加え、乳棒と乳鉢を用いてパウダー状になるまで磨砕し、このパウダー状にしたイネ培養細胞を 50 ml チューブに移し、ウォーターバス (TAITEC) で予め 50°C に温めた ISOGEN (NIPPON GENE) を 15 ml を加え、Vortex で 30 秒間混合後、50°C で 10 分間加熱した。室温で 5 分間静置後、クロロ

ホルムを 3 ml 加え、Vortex で混合し、室温で 2 分間静置後、8,600×g、4°C で 15 分間遠心分離した。上清を 50 ml チューブに回収し、上清と等量の 4 M LiCl を加え、Vortex で混合した。この混合溶液を液体窒素中で 15 分間静置した。完全に溶液が溶けるまで 4°C で静置し、8,600×g、4°C で 20 分間遠心分離後、上清を除去し、滅菌水 400 μ l を加えた。この溶液と等量の 2-プロパノールを加え、4°C で 30 分間静置後、8,600×g、4°C で 20 分間遠心分離した。上清を除去し、70%エタノールを 1 ml 加え、8,600×g、4°C で 20 分間遠心分離した。上清を除去し、10 分間熱を加えずに乾燥させ、滅菌水 150 μ l を加えて Total RNA 溶液とした。抽出した Total RNA 溶液から OligotexTM-dT30 mRNA Purification Kit (Takara) を用いて mRNA のみを精製した。精製した mRNA は滅菌水で 99 μ l に調製し、2.5 mM dNTPs 40 μ l、500 μ M Random primer 1 μ l を加え、65°C で 5 分間、ヒートブロックで反応させ、氷上で 1 分間静置した。その反応液に 5×First-strand buffer (Takara) 40 μ l、0.1 M DTT (Invitrogen) 10 μ l、Super script III RT (Invitrogen) 10 μ l を加え、室温で 5 分間、50°C で 1 時間、70°C で 15 分間加熱後、2-プロパノール沈殿を行い、滅菌水 91.5 μ l に溶解した。サンプルを氷上に静置し、5×Second-strand buffer (Takara) 30 μ l、2.5 mM dNTPs (Takara) 12 μ l、T4 DNA ligase (Promega) 3.5 μ l、DNA polymerase I (Takara) 12 μ l、RNaseH (Takara) を 1 μ l 加え、16°C で 2 時間静置した。その後、2-プロパノール沈殿を行い、滅菌水 6 μ l を加えて溶解させた。この cDNA 溶液に 10×T4 DNA polymerase buffer 1 μ l、0.1%BSA 1 μ l、2.5 mM dNTPs 1 μ l を加え、70°C で 5 分間加熱後、T4 DNA polymerase (Takara) を 1 μ l 加え、37°C で 5 分間、ヒートブロックで静置した。反応後、滅菌水で 100 μ l にメスアップし、CHROMA SPINTMColumns (Clontech) を用いて 400 bp 以上になるように cDNA のサイズセレクションを行った。この cDNA を TA-Blunt Ligation kit (Nippon gene) を用いて *pCDF-Vc-mix* ベクターにライゲーションした。このライゲーション液を NEB 10-beta Electrocompetent *E.coli* (BioLabs) に 2 μ l 加え、氷上に 5 分以上静置した後、氷上で冷やした 1 mm キュベットに全量加え、Gene Pluser XcellTM を用いて 2,000 V、25 μ F、200 Ω でプラスミドを導入した。キュベット内の菌体懸濁液を 37°C に加温した 950 μ l の SOC 培地に入れ、180 rpm、37°C で 1 時間振盪培養した。LB 寒天培地 (スペクチノマイシン終濃度 50 μ g/ml) に塗布し、37°C で一晩静置培養した。生育したコロニーを LB 液体培地 2 ml でコンラージ棒を用

いて掻き取るように回収し、Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche) を用いてプラスミド単離した。このようにして作製したイネ cDNA ライブラリーを *cDNA-Vc/pCDF-mix* と名付けた。

5. 大腸菌 Rosetta-gamiB を用いた BiFC 法による OsCPK12 と相互作用するタンパク質のスクリーニング

大腸菌 Rosetta-gamiB コンピテントセル 50 μ l に *OsCPK12-Vn/pETTP* と *cDNA-Vc/pCDF* を 1 ng 分それぞれ加え、氷上に 5 分以上静置した後、氷上で冷やした 1 mm キュベットに全量加え、Gene Pluser Xcell™ を用いて 2,000 V、25 μ F、200 Ω でプラスミドを導入した。キュベット内の菌懸濁液を 37°C に加温した 950 μ l の SOC 培地に入れ、180 rpm、37°C で 1 時間振盪培養した。LB 寒天培地 (スペクチノマイシン終濃度 50 μ g/ml、トリメトプリム終濃度 50 μ g/ml) 上に Magna Nylon Transfer Membrane を乗せ、菌体培養液をガラスビーズでプレーティングし、37°C で 20 時間静置培養した。コロニーが生育したメンブレンをピンセットで持ち上げ、その下に 1 μ M IPTG 溶液 500 μ l を染みこませ、遮光、25°C で静置し、0、3、6、9 時間後に実体顕微鏡 (LEICA MZFLIII) を用いて BiFC 由来の蛍光を観察した。蛍光の観察できたコロニーは cDNA 領域を挟むように作製したプライマーを用いてコロニー PCR を行い、cDNA を保持することが確認できた PCR 産物の配列解析を行った。得られた塩基配列と相同性を示す遺伝子を NCBI のデータベースから Blast N を用いて相同性検索を行い、検索結果のトップに出てきた塩基配列を取得した。取得した塩基配列と cDNA の塩基配列とを比較し、cDNA の読み枠を確認した。正しい読み枠であった cDNA についてはアミノ酸配列に変換後、Pfam を用いてドメイン検索を行い、相互作用したドメインについて調べた。

使用したプライマーセット

Forward : 5'-CCGGCATACTCTGCGACATCGTATA-3'
Reverse : 5'-CTCGTCCATGCCGAGAGTGA-3

6. 大腸菌内での OsCPK12 の自己リン酸化の解析

大腸菌内での OsCPK12 の自己リン酸化能を調べるため、Rosetta-gami2 コンピテントセルに OsCPK12 発現プラスミドを加え、

ハナハン法でに形質転換した後、LB 寒天培地（アンピシリン終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ ）に塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置培養した。生育してきたそれぞれのコロニーが導入したプラスミドを保持しているかコロニーPCRで確認した。目的のプラスミドの保持が確認できたシングルコロニーを、LB 液体培地（0.1%Glucose、アンピシリン終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ ）3 ml に植菌し、180 rpm、37 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間振盪培養した。その培養液 3 μl を無菌的に LB 培地（0.1% Glucose、アンピシリン終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ ）500 ml に加え、180 rpm、37 $^{\circ}\text{C}$ で振盪培養した。OD₆₁₀ が 0.6~0.8 になった時点で IPTG を終濃度 1 μM となるように加え、180 rpm、18 $^{\circ}\text{C}$ で 8 時間振盪培養した。その培養液を 250 ml の遠心管 4 本に分注し、6,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間 himac CR 20G で遠心分離し、上清を除去し、そこに氷冷した Lysis buffer（50 mM Tris-HCl、pH7.4、100 mM NaCl、5 mM EDTA、1 mM EGTA）30 ml を加え懸濁し、6,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間遠心分離して集菌した。Lysis buffer を 10 ml 加え懸濁し、クラッシュアイス中で冷却しながら超音波破碎機（ULTRASONIC DISRUPTOR）で OUT PUT を 6 に設定し、菌体液が半透明になるまで破碎した。破碎液に終濃度 1%となるように TritonX-100 を加え、氷上で 1 時間静置後、10,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間 TOMY MX300 で遠心し、上清と沈殿を分離した。上清 10 μl に等量の 2 \times Sample buffer を加え、サンプルとした。同様に、沈殿に上清と等量となるように Lysis buffer-2（1%Triton-X、Lysis buffer）を加え、再懸濁し、等量の 2 \times Sample buffer を加えた。両サンプルを 10%アクリルアミドゲルに全量アプライし、100 V 定電圧で SDS-PAGE を行った。泳動後、セミドライプロッターを用いて 10 V 定電圧で 2 時間転写を行った。転写後、ニトロセルロース膜を TBST に移し、5 分間振盪後、TBST を捨て、ブロッキングバッファー（TBST、5%スキムミルク）を加え、1 時間振盪させた。ブロッキング後、TBST でニトロセルロース膜を 5 分間、5 回洗浄した。洗浄後、TBST で抗 GST 抗体（MBL）を 1/5000 に希釈した一次抗体溶液を加え、1 時間振盪後、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。ニトロセルロース膜を 5 分間、5 回洗浄後、TBST で IgG Rabbit 抗体を 1/5000 に希釈した二次抗体溶液を加え、1 時間振盪した。ニトロセルロース膜を TBST で 5 分間、5 回洗浄した。洗浄液をよくきったニトロセルロース膜に ECL-prime Western Blotting Detection Reagent（GE Healthcare）の A 液と B 液が 1 : 1 になるように加え、遮光して 5 分間静置後、ルミノ・イメージアナライザーLAS-4000（FUJI FILM）を用いてバンドを検出した。

2-3 結果

1. 大腸菌 Rosetta-gamiB 内での BiFC 法によるタンパク質相互作用検出系の構築

第1章で *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン処理によって誘導される活性酸素の発生は Rboh を介して起きており、Ca²⁺シグナリングとタンパク質のリン酸化によって制御されることが示された。また、この活性酸素の発生には OsCPK12 が関与することも示された。そこで本章では、OsCPK12 による活性酸素発生の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的として、まず、OsCPK12 のターゲットとなる基質分子を探索することにした。

キナーゼと基質のような一過的な相互作用を検出する方法として、近年、BiFC (Bi-molecular fluorescent complementation) 法が開発された。BiFC 法では結合能を調べようとする 2 つのタンパク質に、蛍光タンパク質の GFP や YFP、またはその改変型の Venus を N 末端半分と C 末端半分に分けてそれぞれ融合させる。この融合タンパク質において、タンパク質同士の相互作用が認められた場合、蛍光タンパク質の再構築が生じ、蛍光を発する様になるというものである (He *et al.*, 2006)。本実験では、蛍光タンパク質の中でも比較的その蛍光が強い Venus を N 末端側 154 アミノ酸 (Vn) と、C 末端側 84 アミノ酸 (Vc) に分割して用いることにした。これまでに、イネの MAPKK の一つである OsMEK1 は MAPK である OsMAP1 と相互作用するが、OsMAP2、OsMAP3 とは相互作用しないことが明らかになっている (Wen *et al.*, 2002)。そこで、OsMEK1 と OsMAP1、OsMAP2、OsMAP3 を用いて、キナーゼの基質タンパク質を検出するための系の構築を試みた。

まず、OsMEK1 と OsMAP1 との特異的な相互作用が BiFC 法によって観察出来るかどうかをイネプロトプラストで確認した。イネ細胞内で OsMEK1-Vn、OsMAP1-Vc、OsMAP2-Vc をそれぞれ発現させるベクター (*OsMEK1-Vn/pBI221*、*OsMAP1-Vc/pBI221*、*OsMAP2-Vc/pBI221*) をベクターの導入確認用の *DsRed/pHAC17* ベクターとともにイネプロトプラストに PEG 法で導入し、12 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、OsMEK1-Vn、OsMAP1-Vc、OsMAP2-Vc だけを発現させたプロトプラストは、DsRed の蛍光が確認できたイネプロトプラストにおいて、BiFC 由来の蛍光が観察されなかった。次に、相互作用が確認されている

OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc を発現させたところ、DsRed の蛍光が確認できたプロトプラストにおいて核と細胞質で BiFC 由来の蛍光が観察された。一方、相互作用しないことが明らかとなっている OsMEK1-Vn と OsMAP2-Vc を発現させたプロトプラストでは DsRed の蛍光のみが観察され、BiFC 由来の蛍光は観察されなかった (Fig. 15)。以上のことから、BiFC 法によって OsMEK1 と OsMAP1 の特異的な相互作用を検出することが可能であることが明らかになった。

次に、相互作用タンパク質を簡便にスクリーニング可能な検出系を構築するために、大腸菌 Rosetta-gamiB 内でも OsMEK1 と OsMAP1 の特異的な相互作用が BiFC 法で観察されるかを検討した。Rosetta-gamiB は、真核生物タンパク質の発現を高めるために、7 種のレアコドン (AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、CGG、GGA) に対応する tRNA をプラスミドで導入している。また、ジスルフィド結合の形成を助け、生体内のタンパク質フォールディングを促進する *trxB/gor* 変異を保有するため、真核生物により近いタンパク質フォールディングを可能としている。まず、Rosetta-gamiB はカナマイシン耐性を有するため、発現用ベクター *pET28b* の選択マーカーをカナマイシン耐性遺伝子からトリメトプリム耐性遺伝子に入れ換えた。このベクターを *pETTp* と名付け、この *pETTp* に *Venus*、*Vn*、*OsMEK1-Vn* をそれぞれ挿入し、*Venus/pETTp*、*Vn/pETTp*、*OsMEK1-Vn/pETTp* を作製した (Fig. 16ABC)。また、*Vc/pCDF-Duet* に *OsMAP1*、*OsMAP2*、*OsMAP3*、*GUS* を挿入し、それぞれ *OsMAP1-Vc/pCDF*、*OsMAP2-Vc/pCDF*、*OsMAP3-Vc/pCDF*、*GUS-Vc/pCDF* を作製した (Fig. 16D)。これらのベクターを各組み合わせ (*Venus/pETTp*、*Vn/pETTp* と *OsMAP1-Vc/pCDF*、*OsMEK1-Vn/pETTp* と *OsMAP1-Vc/pCDF*、*OsMEK1-Vn/pETTp* と *OsMAP2-Vc/pCDF*、*OsMEK1-Vn/pETTp* と *OsMAP3-Vc/pCDF*、*OsMEK1-Vn/pETTp* と *GUS-Vc/pCDF*) で、Rosetta-gamiB にエレクトロポレーション法で導入し、生育してきたシングルコロニーを白金耳で掻き取り、メンブレンを敷いた別の LB 寒天培地 (トリメトプリム終濃度 50 µg/µl、スペクチノマイシン終濃度 50 µg/µl) に画線した。そのメンブレンの下に IPTG を添加し、FLA-3000 で BiFC 由来の蛍光を検出したところ、IPTG 添加後、3 時間から OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc を発現させた Rosetta-gamiB で BiFC 由来の蛍光が認められた。一方、Vn と OsMAP1-Vc、これまでに相互作用しないことが報告されている OsMEK1-Vn と OsMAP2-Vc、OsMEK1-Vn と OsMAP3-Vc、生物種の

異なるタンパク質同士の組み合わせである OsMEK1-Vn と GUS-Vc を発現させた Rosetta-gamiB では BiFC 由来の蛍光は認められなかった (Fig. 17A)。この様な、OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc に特異的な BiFC 蛍光は IPTG 添加後 9 時間まで認められたが、12 時間以上経過すると全ての組み合わせで BiFC 蛍光が認められた (Data not shown)。

次に、上記の Rosetta-gamiB における各タンパク質の発現を確認するために、IPTG 添加後 6 時間の菌体を破砕し、SDS-PAGE で分離し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、Venus を発現させたコロニーでは約 30 kDa、Vn と OsMAP1-Vc を発現させたコロニーでは約 17.2 kDa と約 55 kDa、OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc を発現させたコロニーでは約 60 kDa と約 55 kDa、OsMEK1-Vn と OsMAP2-Vc を発現させたコロニーでは約 60 kDa と約 55 kDa、OsMEK1-Vn と OsMAP3-Vc を発現させたコロニーでは約 60 kDa と約 55 kDa にそれぞれバンドが認められた。これは、それぞれのタンパク質の予想分子量 (Venus: 27 kDa、Vn: 18 kDa、OsMEK1-Vn: 60 kDa、OsMAP1-Vc: 55 kDa、OsMAP2, 3-Vc: 52 kDa、GUS-Vc: 78 kDa) と一致している (Fig. 17B)。この時、全てのレーンに等量のタンパク質がアプライ出来ていることを、同様に SDS-PAGE で分離し、銀染色することで確認した。BiFC 蛍光が認められなかった組み合わせにおいてもそれぞれのタンパク質が発現していることから、大腸菌 Rosetta-gamiB 内でも OsMEK1-Vn と OsMAP1-Vc の特異的な相互作用を BiFC で検出できることが示された。

2. 構築したスクリーニング系を用いた OsCPK12 相互作用タンパク質の同定

次に、構築した大腸菌スクリーニング系を用いて、OsCPK12 と特異的に相互作用するタンパク質の同定を試みた。まず、スクリーニングに使用するイネ cDNA ライブラリーを構築するためのベクターを作製した。cDNA ライブラリーはランダムプライマーを用いて作製したため、ベクターに cDNA を挿入する際に 9 種類の読み枠が考えられる。そこで、9 種類の読み枠の中でセルフライゲーションにより、Vc を発現する 3 種類の読み枠を除いた 6 種類の読み枠のベクターを作製した (Fig. 18A)。A. avenae N1141 菌株を 1×10^8 cfu/ml となるように接種した細胞から Total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて cDNA を合成した。合成した cDNA は 400 bp 以上となるようにサイズセレクションを行った後、この cDNA を 6 種類の読み枠を持つ

pCDF-mix ベクターに挿入し、cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーを *OscDNA-Vc/pCDF-mix* と名付けた (Fig. 18A)。また、Bait とするためのベクターは、*OsCPK12-Vn* を *pETTp* の *XbaI* サイトに挿入した *OsCPK12-Vn/pETTp* を用いた (Fig. 18B)。*OsCPK12-Vn/pETTp* と *OscDNA-Vc/pCDF-mix* を Rosetta-gamiB にエレクトロポレーション法で導入し、IPTG 添加後、3~6 時間のプレート蛍光実体顕微鏡で観察した (Fig. 19)。約 25,000 個体について検討を行ったところ、514 個体が BiFC 由来の蛍光を示した。そこで、これらのコロニーについて、コロニーPCR で cDNA の挿入を確認した結果、514 個体中 74 個体で cDNA の挿入が確認出来た。これらの挿入が確認できた cDNA について配列解析を行った結果、74 個体中 66 個体がインフレームで cDNA を持つことが明らかになった。そこで、これらの配列を比較検討したところ、66 個体中 64 個体が 842bp の同じ塩基配列であったため、これを *Candidate-1* と名付けた。また、66 個体中の 1 個体に挿入されていた cDNA のサイズは 426 bp であり、これを *Candidate-2*、同様に 429 bp の配列を *Candidate-3* と名付けた。これら 3 つの遺伝子配列と相同性を示す遺伝子を NCBI のデータベースから BLAST N で検索した結果、*Candidate-1* は Syntaxin-like protein である *OsSYP13b* (AK100316.1)、*Candidate-2*、*Candidate-3* は NADPH oxidase である *OsrbohA* (NM_001050700.1) ということが明らかになった。これらことから、*OsCPK12* と相互作用するタンパク質として *OsSYP13b* と *OsrbohA* が同定された。

さらに、*Candidate-1*、*2*、*3* がそれぞれのタンパク質のうち、どのような機能ドメインをコードしているかを明らかにするために、*OsSYP13b* と *OsrbohA* のアミノ酸配列をデータベースから取得した。それぞれの配列を得られた配列と比較したところ、*Candidate-1* は *OsSYP13b* の Syntaxin ドメイン、SNARE ドメインをコードしていた。また、*Candidate-2* は *OsrbohA* の N 末端側にある親水領域であり、*Candidate-3* は *OsrbohA* の N 末端側にある EF hand モチーフを含む親水領域であることが明らかになった。また、それぞれのこの部分における配列相同性は、*Candidate-1* は 99.2%、*Candidate-2*、*3* は *OsrbohA* と 100%であった (Fig. 20)。

3. イネプロトプラスト内での *OsCPK12* と基質候補タンパク質の相互作用解析

1) OsCPK12 と OsSYP13b の相互作用解析

次に、大腸菌内で相互作用することが確認された基質候補タンパク質 OsSYP13b がイネプロトプラスト内でも OsCPK12 と相互作用するののかについて調べた。この実験には、Candidate-1 の断片ではなく、OsSYP13b 全長を用いて行うことにした。

まず、OsCPK12 が植物細胞内のどこに局在するのかを確認した。OsCPK12 は N 末端領域に *N*-myristoylation (*N*-ミリスチル化) モチーフ (Met-Gly-X-X-X-Ser/Cys-X) である MGNCFTKT という配列が存在するため、局在性に影響がないように N 末端ではなく、OsCPK12 の C 末端側に Venus を融合させた (Fig. 21)。作製した *OsCPK12-Venus/pBI221* をイネプロトプラストに PEG 法により導入したところ、Venus 由来の蛍光は細胞膜と一部細胞質で認められた。このことから、OsCPK12 は主に細胞膜に局在しており、一部は細胞質に局在していることが明らかとなった (Fig. 22)。

次に、OsCPK12 の基質候補タンパク質として同定された OsSYP13b の細胞内局在を解析した。OsSYP13b の C 末端は膜貫通ドメインであるため、局在性に与える影響を極力小さくするため OsSYP13b の N 末端側に Venus を融合させたベクター (*Venus-OsSYP13b/pBI221*) を作製した。このベクターをイネプロトプラストに PEG 法で導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞膜で Venus 由来の蛍光が観察された。このことから、OsSYP13b も細胞膜に局在することが明らかとなった (Fig. 23)。

OsCPK12 と OsSYP13b がイネプロトプラスト内でも相互作用するかどうかを調べるため、*Vn-OsSYP13b/pBI221* と *OsCPK12-Vc/pBI221* を作製し、両ベクターをイネプロトプラストに導入した。導入した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞膜上で BiFC 由来の蛍光が認められた。このことから、OsCPK12 と OsSYP13b はイネプロトプラスト内では細胞膜上で相互作用することが明らかとなった (Fig. 24)。

2) OsCPK12 と OsrbohA との相互作用解析

大腸菌内で相互作用することが確認されたもう一つの基質候補タンパク質 OsrbohA がイネプロトプラスト内でも OsCPK12 と相互作用するののかについて調べた。イネ細胞内での OsCPK12 と OsrbohA との相互作用を解析するため、OsrbohA 全長のクローニングを試みた。しかし、OsrbohA は N 末端側親水性領域に Ca²⁺ が結合する EF hand モチ

ープを持ち、C末端側の親水性領域に NADPH 結合ドメイン、FAD 結合ドメイン、6つの膜貫通領域を有する長鎖のタンパク質であるため、全長のクローニングが出来なかった。そこで、大腸菌で相互作用が認められている膜貫通領域から N 末端側の細胞内ドメイン (OsrbohAN)を解析に用いることにした。また、比較対象として膜貫通領域から C 末端側の細胞内ドメイン (OsrbohAC) についても同時に解析することとした (Fig. 25)。

まず、OsrbohA の細胞内ドメインである OsrbohAN (²³⁷Met-⁴¹⁹Ala) と OsrbohAC (⁵⁷⁷Val-⁹⁴³Phe) C 末端側に Venus を融合させたベクター (OsrbohAN-Venus/pBI221, OsrbohAC-Venus/pBI221) を作製し、それぞれの細胞内局在を解析した。各ベクターを導入したプロトプラストを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、OsrbohAN-Venus、OsrbohAC-Venus を発現させたプロトプラストは、ともに細胞質で Venus 由来の蛍光が観察された。このことから、OsrbohAN と OsrbohAC は細胞質に局在することが示された (Fig. 26)。

次に、OsCPK12 と OsrbohAN、OsrbohAC がイネプロトプラスト内でも相互作用するかどうかを調べるため、各ベクター (OsrbohAN-Vn/pBI221 と OsrbohAC-Vn/pBI221) を作製し、OsCPK12-Vc/pBI221 とともにイネプロトプラストに導入した。導入した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、OsrbohAN-Vn/OsCPK12-Vc、OsrbohAC-Vn/OsCPK12-Vc を発現させたプロトプラストは、ともに細胞膜と細胞質で BiFC 由来の蛍光が認められた。このことから、OsCPK12 はイネ細胞内において、OsrbohA の N 末端側細胞内ドメインだけでなく、C 末端側細胞内ドメインとも相互作用することが明らかとなった (Fig. 27)。

4. イネプロトプラスト内での OsCPK12 と OsrbohA のホモログである OsrbohB、OsrbohD との相互作用解析

OsCPK12 と OsrbohA の N 末端細胞内ドメインと C 末端細胞内ドメインとの相互作用が OsrbohA 特有であるのかを明らかにするために、OsrbohA のホモログである OsrbohB、OsrbohD と OsCPK12 との相互作用解析を行った。まず、OsrbohA、B、D のアミノ酸配列の相同性を調べるために、OsrbohA、OsrbohB、OsrbohD のマルチプルアライメント解析を行った。その結果、OsrbohB、D の N 末端細胞内ドメイン (OsrbohBN [¹Met-⁴⁷⁰Ala]、OsrbohDN [¹Met-⁴²⁷Ala]) における相同性は、OsrbohAN と OsrbohBN では 90.7%、OsrbohAN

と OsrbohDN では 59.0%であることがわかった (Fig. 28A)。また、Osrboh の C 末端細胞内ドメイン (OsrbohBC [640Ala-886Ile]、OsrbohDC [585Ile-951Phe]) における相同性は、OsrbohAC と OsrbohBC で 92.1%、OsrbohAC と OsrbohDC では 51.9%、OsrbohBC と OsrbohDC では 52.3%であることが示された (Fig. 28B)。

次に、これら Osrboh の細胞内局在を明らかにするために、イネ細胞内で OsrbohBN-Venus、OsrbohBC-Venus、OsrbohDN-Venus、OsrbohDC-Venus を発現するベクター (*OsrbohBN-Venus/pBI221*、*OsrbohBC-Venus/pBI221*、*OsrbohDN-Venus/pBI221*、*OsrbohDC-Venus/pBI221*) を作製し、それぞれイネプロトプラストに導入した。その結果、OsrbohBC-Venus、OsrbohDN-Venus、OsrbohDC-Venus を発現させたプロトプラストは細胞質で Venus 由来の蛍光が確認された (Fig. 29)。

そこで、OsCPK12 と OsrbohBN、OsrbohBC、OsrbohDN、OsrbohDC が相互作用するかどうかを明らかにするため、各タンパク質の C 末端側に Vn を融合させたタンパク質を発現させるベクター (*OsrbohBN-Vn/pBI221*、*OsrbohBC-Vn/pBI221*、*OsrbohDN-Vn/pBI221*、*OsrbohDC-Vn/pBI221*) を作製し、*OsCPK12-Vc/pBI221* とともにイネプロトプラストに導入した。導入した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、*OsrbohBN-Vn/OsCPK12-Vc*、*OsrbohBC-Vn/OsCPK12-Vc*、*OsrbohDN-Vn/OsCPK12-Vc*、*OsrbohDC-Vn/OsCPK12-Vc* を発現させたプロトプラストは全て細胞膜と細胞質で BiFC 由来の蛍光が認められた (Fig. 30)。このことから、OsCPK12 は OsrbohA のホモログである OsrbohB、OsrbohD の N 末端細胞内ドメインと C 末端細胞内ドメインとも相互作用することが明らかとなった。

5. OsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N と基質候補タンパク質との相互作用解析

1) 大腸菌内での OsCPK12 の自己リン酸化活性の解析

OsCPK12 と OsSYP13b、Osrboh との相互作用に OsCPK12 のリン酸化活性が必要かどうかを明らかにするため、恒常活性型の OsCPK12CA、プロテインキナーゼドメインの予測活性中心であるアスパラギン酸をアスパラギンに置換した OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N を用いて相互作用解析を試みた (Fig. 31)。まず、

これらがリン酸化活性を有しているかを OsCPK12 の自己リン酸化活性を測定することで調べることにした。Ca²⁺非存在下では自己阻害領域により CPK の自己リン酸化活性は抑制されているが、Ca²⁺により活性化された CPK は自己リン酸化することが知られている (Oh *et al.*, 2012)。そこで、OsCPK12、OsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N を大腸菌に発現させ、それぞれのリコンビナントタンパク質のバンドシフトにより自己リン酸化活性を確認した。GST-OsCPK12-flag、GST-OsCPK12CA-Flag、GST-OsCPK12CAD215N-Flag、GST-OsCPK12CAD236N-Flag をタンパク質合成させた大腸菌 Rosetta-gami2 の菌体を破碎し、遠心分離によって可溶性画分と不溶性画分に分画した。これらのサンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、GST-OsCPK12-Flag を発現させた菌体からは、可溶性画分と不溶性画分に予想分子量と一致する約 80 kDa に一本のバンドが確認された。次に、GST-OsCPK12CA-Flag を発現させた菌体からは予想分子量と一致する約 70 kDa 付近に二本のバンドが確認された。一方、GST-OsCPK12CAD215N-Flag や GST-OsCPK12CAD236N-Flag を発現させた菌体からは約 70 kDa 付近に 1 本のバンドしか認められなかった (Fig. 32)。このことから、OsCPK12CA は自己リン酸化活性を有しているが、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N はリン酸化活性を失っている可能性が示唆された。

2) OsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N の細胞内局在性の解析

OsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N が細胞内のどこに局在するかを明らかにするため、それぞれの C 末端側に Venus を融合したタンパク質を発現させる各ベクター (*OsCPK12CA-Venus/pBI221*、*OsCPK12CAD215N-Venus/pBI221*、*OsCPK12CAD236N-Venus/pBI221*) を作製し、イネプロトプラストに導入した。その結果、OsCPK12CA-Venus、OsCPK12CAD215N-Venus、OsCPK12CAD236N-Venus を発現させたプロトプラストでは OsCPK12-Venus と同様に、主に細胞膜で Venus 由来の蛍光が認められたが、一部は細胞質で認められた (Fig. 33)。このことから、OsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N は細胞膜と細胞質に局在することが明らかになった。

3) OsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N と OsSYP13b との相互作用解析

次に、OsCPK12 と OsSYP13b との相互作用に OsCPK12 のリン酸化活性が必要であるかを明らかにするため、Vn-OsSYP13b と OsCPK12CA-Vc、OsCPK12CAD215N-Vc、OsCPK12CAD236N-Vc を発現する各発現ベクター (*OsCPK12CA-Vc/pBI221*、*OsCPK12CAD215N-Vc/pBI221*、*OsCPK12CAD236N-Vc/pBI221*) をイネプロトプラストに導入した。その結果、Vn-OsSYP13b と OsCPK12CA-Vc、OsCPK12CAD215N-Vc、OsCPK12CAD236N-Vc のそれぞれを発現したプロトプラストにおいて細胞膜上で BiFC 由来の蛍光が観察された (Fig. 34)。このことから、Vn-OsSYP13b は OsCPK12CA-Vc、OsCPK12CAD215N-Vc、OsCPK12CAD236N-Vc のそれぞれと相互作用することが示された、OsSYP13b と OsCPK12 との相互作用に OsCPK12 のリン酸化活性は必須ではないことが明らかになった。

4) OsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236N と Osrboh との相互作用解析

次に、OsCPK12 と Osrboh との相互作用にリン酸化活性が必要であるかを明らかにするため、OsCPK12CA-Vc、OsCPK12CAD215N-Vc、OsCPK12CAD236N を発現する各 Vc 発現ベクター (*OsCPK12CA-Vc/pBI221*、*OsCPK12CAD215N-Vc/pBI221*、*OsCPK12CAD236N-Vc/pBI221*) と OsrbohAN-Vn、OsrbohAC-Vn、OsrbohBN-Vn、OsrbohBC-Vn、OsrbohDN-Vn、OsrbohDC-Vn を発現する各 Vn 発現ベクター (*OsrbohAN-Vn/pBI221*、*OsrbohAC-Vn/pBI221*、*OsrbohBN-Vn/pBI221*、*OsrbohBC-Vn/pBI221*、*OsrbohDN-Vn/pBI221*、*OsrbohDC-Vn/pBI221*) を組み合わせてイネプロトプラストに導入した。その結果、OsrbohAN-Vn/OsCPK12CA-Vc を発現させたプロトプラストにおいて細胞膜で BiFC 由来の蛍光が観察された。この時の蛍光は、細胞膜で均等に認められるのではなく、不均一であることが特徴であった。(Fig. 35)。また、OsCPK12CAD215N-Vc、OsCPK12CAD236N-Vc についても同様に相互作用解析を行ったところ、どの Osrboh との組み合わせを発現させたプロトプラストにおいても BiFC 由来の蛍光は観察出来なかった (Fig. 36、37)。以上のことから、OsCPK12 と OsrbohB、OsrbohD の N 末端領域、Osrboh の C

末端領域との相互作用には **OsCPK12** のキナーゼドメイン以降の自己阻害領域と **EF hand** モチーフからなるカルモジュリン様ドメインが必要である。また、**OsCPK12** と **OsrbohAN** との相互作用にはリン酸化活性が必要であることが明らかになった。

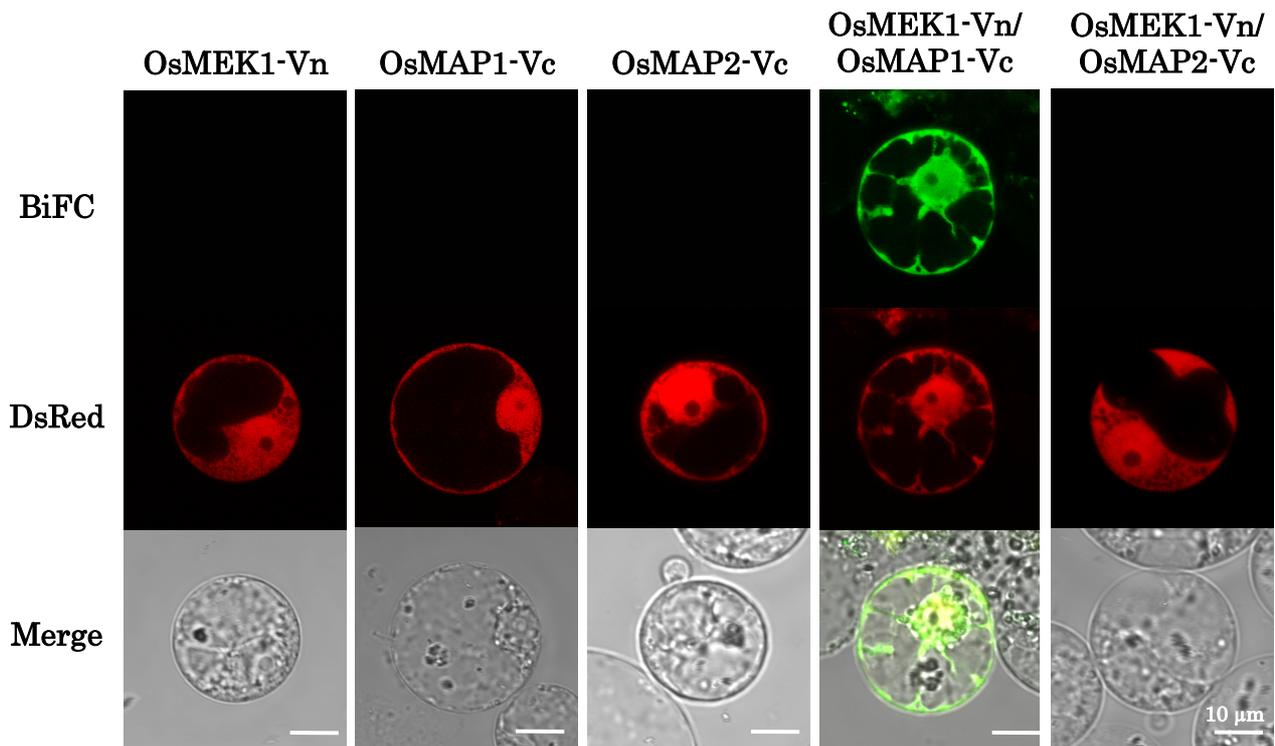


Fig. 15 イネプロトプラストにおけるBiFC法を用いたOsMEK1とOsMAP1、OsMAP2のタンパク質間相互作用の解析

各ベクター (*OsMEK1-Vn/pBI221*、*OsMAP1-Vc/pBI221*、*OsMAP2-Vc/pBI221*) をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃遮光下で静置培養した。導入後12時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡により各タンパク質の単体では蛍光を示さないことを確認した。*OsMEK1-Vn/pBI221*と*OsMAP1-Vc/pBI221*、*OsMEK1-Vn/pBI221*と*OsMAP2-Vc/pBI221*の組み合わせでPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃遮光下で静置培養した。これらのプロトプラスト導入には全て、形質転換確認のために*DsRed/pHAC17*も共に導入されている。導入後12時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、OsMEK1とOsMAP1、OsMEK1とOsMAP2の相互作用を確認した。

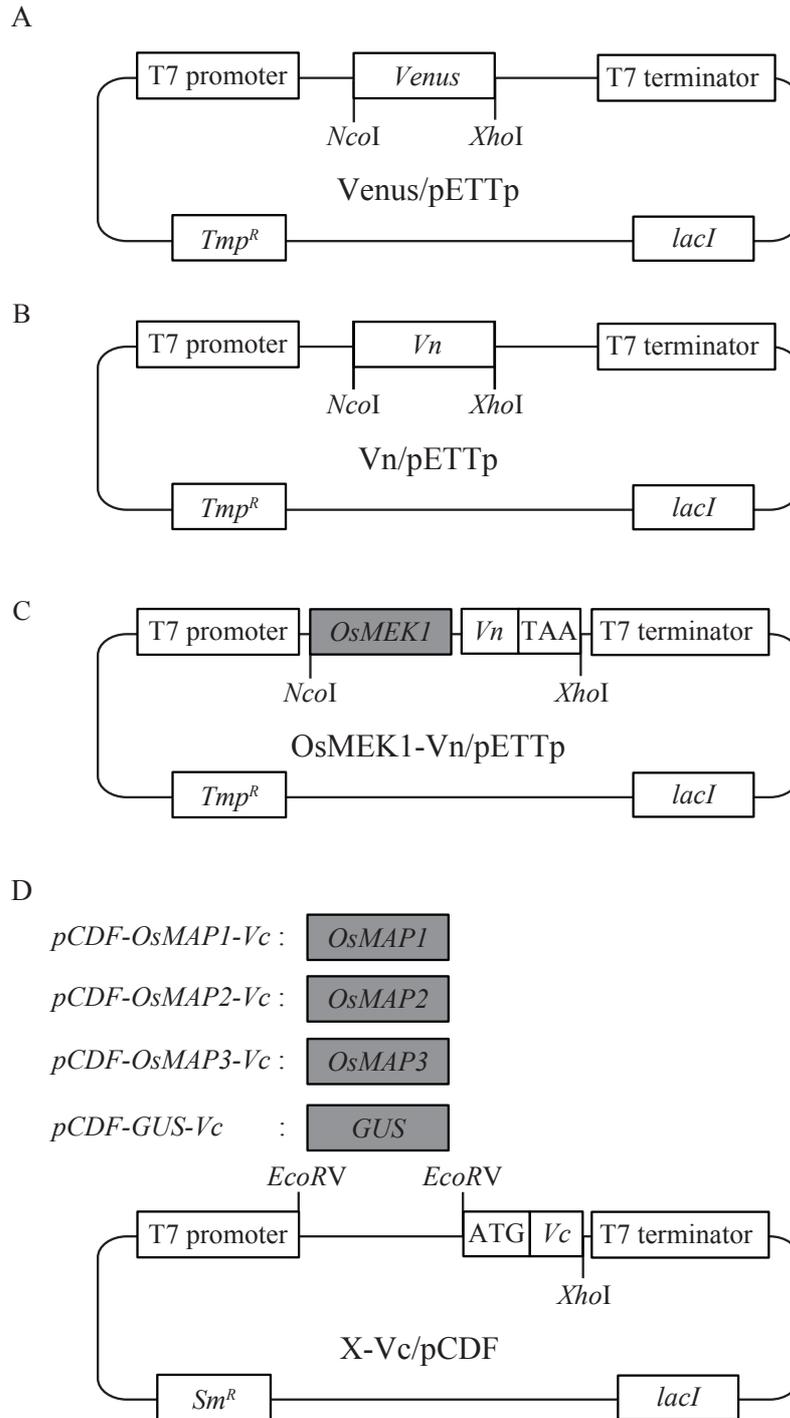
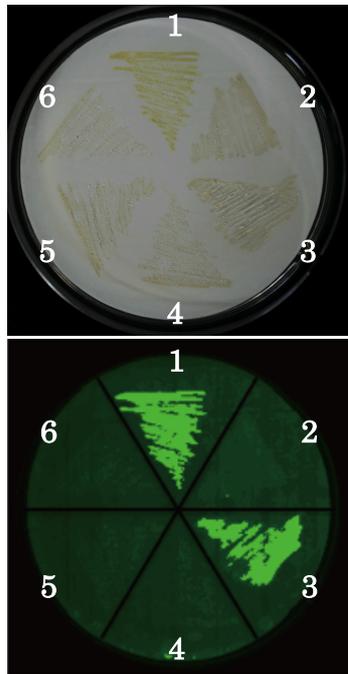


Fig. 16 大腸菌Rosetta-gamiBを用いたスクリーニング系の構築に使用したベクター

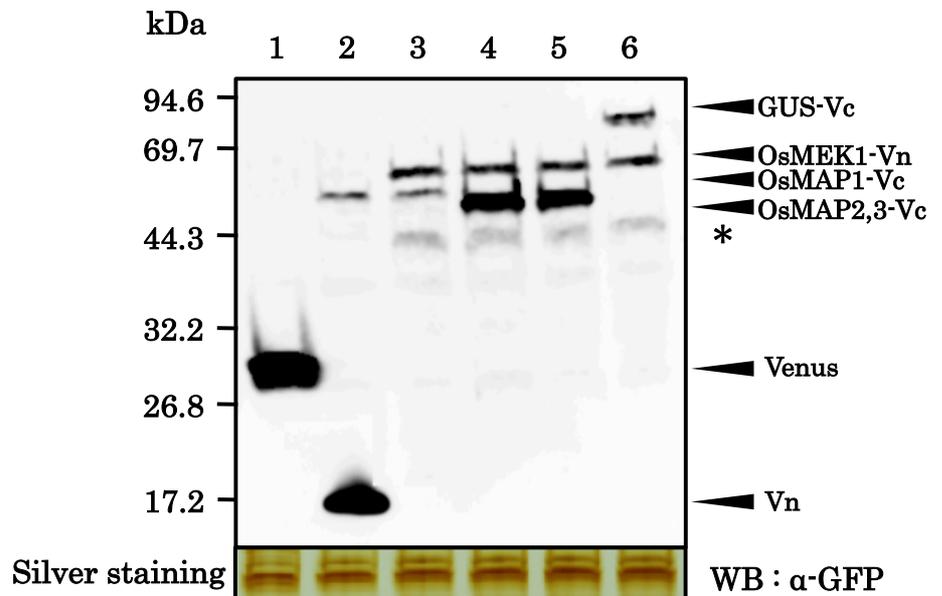
(A) Venus発現ベクターは*pETTp*の*NcoI*と*XhoI*サイトに*Venus*遺伝子を保持するベクターである。(B) *Vn*発現ベクターは*pETTp*の*NcoI*と*XhoI*サイトに*Venus*遺伝子N末端側断片(*Vn*)を保持するベクターである。(C) *OsMEK1-Vn*発現ベクターは*pETTp*の*NcoI*と*XhoI*サイトに*OsMEK1*に*Vn*が融合した遺伝子を保持するベクターである。(D) *OsMAP1-Vc*、*OsMAP2-Vc*、*OsMAP3-Vc*、*GUS-Vc*発現ベクターは*pCDF*ベクターの*EcoRV*サイトに*OsMAP1*、*OsMAP2*、*OsMAP3*、*GUS*遺伝子をそれぞれ保持するベクターである。*Tmp^R*: トリメトプリム耐性遺伝子、*Sm^R*: ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子、*GUS*: β -glucuronidase

A



6 hours after IPTG induction

B



- 1: Venus
 2: Vn/OsMAP1-Vc
 3: OsMEK1-Vn /OsMAP1-Vc
 4: OsMEK1-Vn /OsMAP2-Vc
 5: OsMEK1-Vn /OsMAP3-Vc
 6: OsMEK1-Vn /GUS-Vc

Fig. 17 大腸菌Rosetta-gamiBを用いたBiFC法による特異的な相互作用の検出

(A) LB寒天培地 (スペクチノマイシン終濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トリメトプリム終濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に画線した大腸菌Rosetta-gamiBのBiFC蛍光を検出した。各ベクター (1: Venus/*pETTp*、2: Vn/*pETTp*とOsMAP1-Vc/*pCDF*、3: OsMEK1-Vn/*pETTp*とOsMAP1-Vc/*pCDF*、4: OsMEK1-Vn/*pETTp*とOsMAP2-Vc/*pCDF*、5: OsMEK1-Vn/*pETTp*とOsMAP3-Vc/*pCDF*、6: OsMEK1-Vn/*pETTp*とGUS-Vc/*pCDF*) を大腸菌Rosetta-gamiBに導入し、生育してきたコロニーをメンブレンを敷いたLB寒天培地に画線した。37°C、16時間培養後、メンブレンの下に1 mM IPTG溶液500 μl を添加し、遮光して25°C、6時間静置し、FLA-3000でBiFC由来の蛍光を観察した。(B) 形質転換したRosetta-gamiB内で目的タンパク質が発現しているかを確認した。各コロニーからOD₆₁₀が0.75となるように10 mM MgSO₄溶液に懸濁し、SDS-PAGEで分離後、抗GFP抗体でVenus融合タンパク質の蓄積を検出した。また、同量のサンプルを用いてSDS-PAGEを行い、銀染色でタンパク質が等量アプライ出来ていることを確認した。*は非特異的なバンドである。

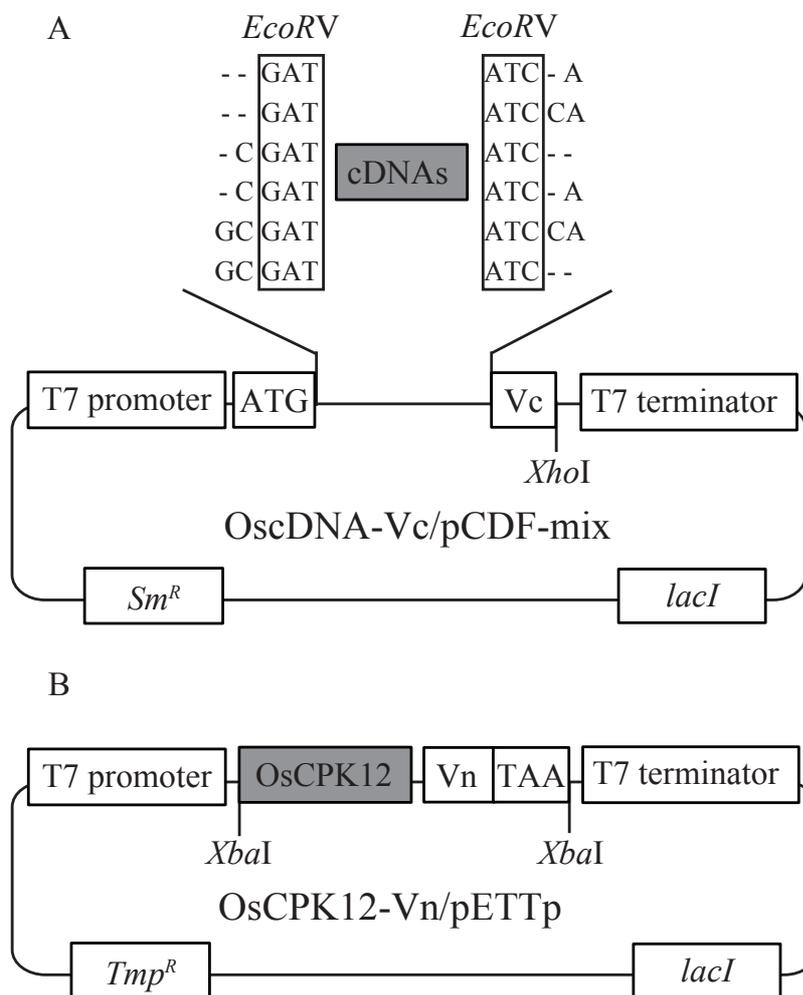
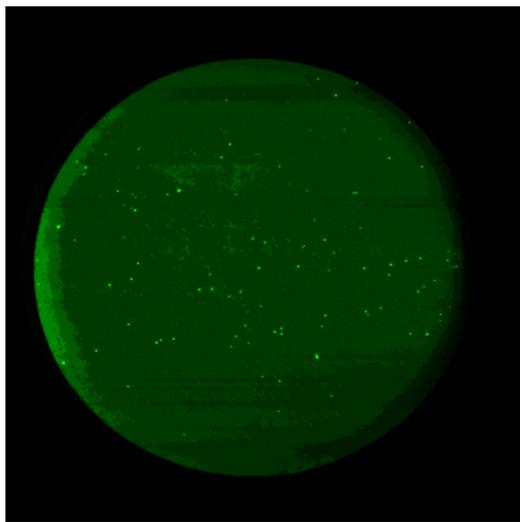


Fig. 18 大腸菌Rosetta-gamiBを用いたスクリーニングに使用したベクター

(A) cDNAライブラリーの作製に用いたベクターである。様々な読み枠のcDNAに対応できるように6種類の読み枠のpCDF-Vc-mixベクターの*EcoRV*サイトにcDNAを挿入した。(B)はpETTpの*XbaI*サイトにOsCPK12にVenusのN末端断片(Vn)が融合した遺伝子を保持するベクターである。*Tmp^R*: トリメトプリム耐性遺伝子、*Sm^R*: ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子、*GUS*: β -glucuronidase



BiFC



B.F.

Fig. 19 大腸菌Rosetta-gamiBを用いたスクリーニングの一例

*OsCPK12-Vn/pETT_p*と*cDNA-Vc/pCDF-mix*を大腸菌Rosetta-gamiBに導入し、生育してきたコロニーをメンブレンを敷いたLB寒天培地にカラスビーズでプレーティングした。37°C、16時間培養後、メンブレンの下に1 mM IPTG溶液500 μ lを添加し、遮光して25°C、6時間後にFLA-3000でBiFC由来の蛍光を観察した。B. F. : Bright field

A

[GENETYX-MAC: Multiple-Alignment]
Date : 2014.01.05

AK100316.1AA.seq	1	MRLLTDSFELSKVDQAPANVDIELGLQGGMSSSAQPGFEGFQVREIEKLETLTKLLKDLQNSNEESKIVTKASAMKEIKKRMEKDVNEVTKARLA	100
Candidate-1AA.seq	1	MLLTDSFELSKVDQAPANVDIELGLQGGMSSSAQPGFEGFQVREIEKLETLTKLLKDLQNSNEESKIVTKASAMKEIKKRMEKDVNEVTKARLA	99
AK100316.1AA.seq	101	KSKVEKLNKDNAANREKPGFGKSGVDRSRTTTTIVSLTKRLRERISEFQTLREAIQKEYRVDVVERRVFTVTGERADEETIDKLIETGDSEQIFQRAIQEQ	200
Candidate-1AA.seq	100	KSKVEKLNKDNAANREKPGFGKSGVDRSRTTTTIVSLTKRLRERISEFQTLREAIQKEYRVDVVERRVFTVTGERADEETIDKLIETGDSEQIFQRAIQEQ	199
AK100316.1AA.seq	201	GRGRVLDTLQEIQRHDAVKEIEQKLELQIIFLDMSVLVEAQGEILDNIESQVSGAAEHITGTNLLQKARFLQKNTRKWTCTIGIVILLIILIVVLSL	300
Candidate-1AA.seq	200	GRGRELDTLQEIQRHDAVKEIEQKLELQIIFLDMSVLVEAQGEILDNIESQVSGAAEHITGTNLLQKARFLQKNTRKWTCT-----	282
AK100316.1AA.seq	301	KPWSK	305
Candidate-1AA.seq	282	----	282

B

[GENETYX-MAC: Multiple-Alignment]
Date : 2014.01.05

CQ771338_P.nuc	1	MRGGASSGPQRWGSAGTTPRSLSTGSSPRGSDDRSSDDGEELVEVTLDLQDDTIVLRSVEPAAAAAGVGAGAGAASARGELTGGPSSSSRSRSPSIR	100
Candidate-2AA.seq	1	-----	1
Candidate-3AA.seq	1	-----	1
CQ771338_P.nuc	101	RSSSHRLLDQSQELKAEAMARARQFSQDLTKRFRGRSHSRSEAQAPSGLESALAAARAARRQRAQLDRTRSGAHKALRGLRFISSNKANNAMVEVQANFDRLL	200
Candidate-2AA.seq	1	-----	1
Candidate-3AA.seq	1	-----DQSQELKAEAMARARQFSQDLTKRFRGRSHSRSEAQAPSGLESALAAARAARRQRAQLDRTRSGAHKALRGLRFISSNKANNAMVEVQANFDRLL	92
CQ771338_P.nuc	201	ARDGYLSRSDFAECIGMTESKEFALFLFDLTSRRRQMKVDTINKDELREIQQITDNSFDSRLQIFFEMVDKNADGRITEAEVKEIIMLSASANKLSRLK	300
Candidate-2AA.seq	1	-----MKVDTINKDELREIQQITDNSFDSRLQIFFEMVDKNADGRITEAEVKEIIMLSASANKLSRLK	64
Candidate-3AA.seq	93	ARDGYLSRSDFAECIGMTESKEFALFLFDLTSRRRQMKVDTINKDELREI-----	142
CQ771338_P.nuc	301	EQAEYYAALIMEELDPEGLGYIELWQLETLLQKDTYMNYSQALSQALSQNLAGLRKKSSIRKISTLSYFFEDNWKRLVWLALWIGIMAGLFTWKF	400
Candidate-2AA.seq	65	EQAEYYAALIMEELDPEGLGYIELWQLETLLQKDTYMNYSQALSQALSQNLAGLRKKSSIRKISTLSYFFEDNW-----	143
Candidate-3AA.seq	142	-----	142
CQ771338_P.nuc	401	MQRNRYVDFVMGYCVTTAKGAAETLKLNAIILLPVCRTITWLRSTRAARALPFDDNINFHKITAAAVVGIILHAGNHLVCFPRLLKSSDEKYAPL	500
Candidate-2AA.seq	143	-----	143
Candidate-3AA.seq	142	-----	142
CQ771338_P.nuc	501	GQYFGEIKPTYFTLVKGVGEGITGVIMVCMIIAFTLATRWFRSLVKLPRPFDKLTGFNAFWYSHHLFIIVYIALIVHGECLYLIHVYRRTTWMYLSVP	600
Candidate-2AA.seq	143	-----	143
Candidate-3AA.seq	142	-----	142
CQ771338_P.nuc	601	VCLYVGERILRFRSGSYSVRLKVAIYPGNVLTLMQSKPPTFRYKSGQYMFVQCPAVSPFEWHPFSITSAPGDDYLSIHRQLGDWTRELKRVFAAAACE	700
Candidate-2AA.seq	143	-----	143
Candidate-3AA.seq	142	-----	142
CQ771338_P.nuc	701	PPAGGKSGLLRADETTKKILPKLLIDGPGYSPAQDYSKYDVLVLLVGLGIGATPFISILKDLLNIIKMEEEEDASTDLYPPMGRNKPVDLGTMLTISR	800
Candidate-2AA.seq	143	-----	143
Candidate-3AA.seq	142	-----	142
CQ771338_P.nuc	801	PKKILKTTNAYFYVWTRREQSDFWFKGMVNEIADLDQRNIIEMHNYLTSVYEEGDARSALITMLQALNHAKNGVDIVSGTKVRTHFARPNWRKVLKISS	900
Candidate-2AA.seq	143	-----	143
Candidate-3AA.seq	142	-----	142
CQ771338_P.nuc	901	KHPYAKIGVFYCGAPVLAQELSKLCHEFNKGCTTKFEFHKEHF	943
Candidate-2AA.seq	143	-----	143
Candidate-3AA.seq	142	-----	142

Fig. 20 OsCPK12相互作用タンパク質として同定された候補タンパク質の機能ドメイン解析

OsCPK12と相互作用するタンパク質をコードするとして同定された *Candidate-1*、*Candidate-2*、*Candidate-3*の遺伝子配列と相同性を示す遺伝子をNCBIのデータベースからBlast Nで相同性検索を行い、相同性の高い配列をそれぞれ取得した。これはそれぞれの塩基配列をアミノ酸配列に変換後のマルチプルアライメントを示している。(A) AK100316.1と *Candidate-1*のマルチプルアライメントを示す。(B) CQ771338、*Candidate-2*、*Candidate-3*のマルチプルアライメントを示す。赤色で示した枠は保存されているアミノ酸を示し黄色線はEF handモチーフ、緑線は膜貫通領域、青線はSyntaxinドメイン、橙線はSNAREドメインをそれぞれ示している。

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGNCFTKTYE	IPITSGTMRR	PASTAERSKA	RGGDEPGTWR	RPSFPRHGAP	PHRPPTGSSS	AAGALSRRAS	GGGGEMGPVL	QRAMVSVRSL	YQLDRKLGSG
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
QFGTTYLCTE	RATGNRYACK	SVSKRKLVR	TOVDDVRREI	TILQHLGQP	NIAEFRGAYE	DNDHVHLVME	FCSGGELFDR	ITAKGSYSER	QAAAVCRDIL
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
TVVHVCHFMG	VIHF ^D LKPEN	FLLASADDDA	PLKA ^D FGLS	VFIEEGKVYK	DIVGSAYYVA	PEVLQRNYGK	EADIWSAGVI	LYILLCGTTP	FWAETEKGIF
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
DAILVNQVDF	STSPWPSISE	SAKDLIRQML	HRDPQKRITA	SQALEHRWLK	EGGASDRPID	SAVLSRMKQF	KAMNKLKQLA	LKVIAENLSP	EEIKGLKQMF
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
NNMDTDRSGT	ITVEELKVGL	TKLGSRISEA	EVQKLMEAVD	VDKSGSIDYS	EFLTAMINKH	KLEKEEDLLR	AFQHFDKDNS	GYITRDELEQ	AMAEGMGDE
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
ANIKQVLDEV	DKDKDGRIDY	EEFVEMMRKG	IQT						

Fig. 21 OsCPK12のアミノ酸配列におけるミリストイル化モチーフ

OsCPK12のアミノ酸配列を示した。赤い枠は存在するミリストイル化モチーフ (Met-Gly-X-X-X-Ser/Cys-X) を示している。また、青い枠はPfamで予測したキナーゼ活性中心である。

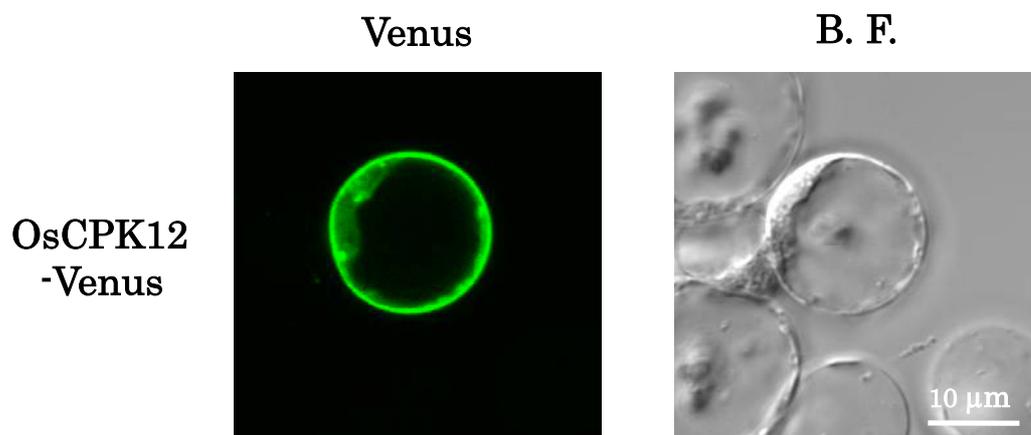


Fig. 22 イネプロトプラストにおけるOsCPK12の細胞内局在の解析

*OsCPK12-Venus/pBI221*をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30°C遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりVenus蛍光を観察し、OsCPK12の細胞内局在を確認した。B. F.: Bright field

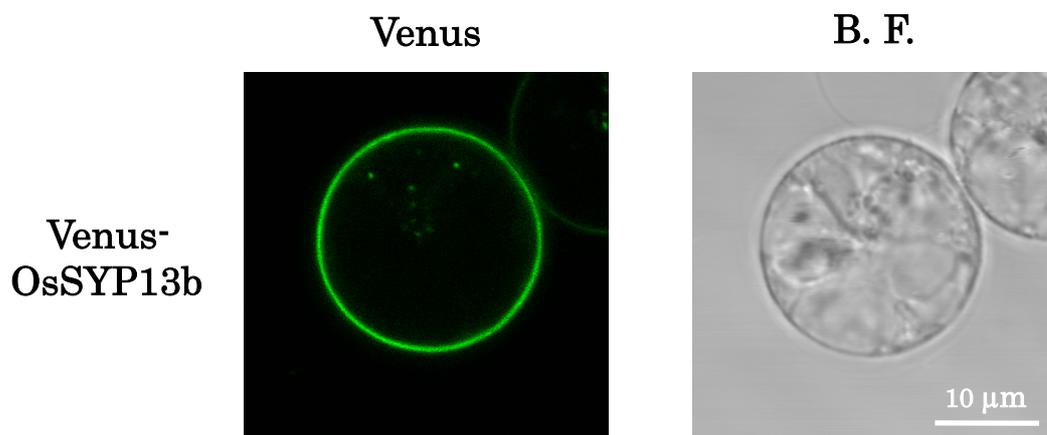


Fig. 23 イネプロトプラストにおけるOsSYP13の細胞内局在の解析

*Venus-OsSYP13/pBI221*をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりVenus蛍光を観察し、OsSYP13bの細胞内局在を確認した。B. F.: Bright field

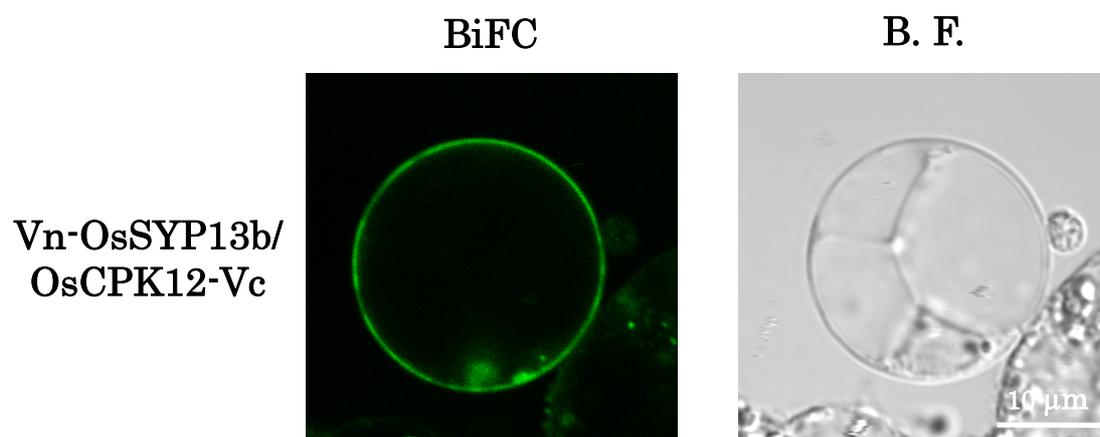


Fig. 24 BiFC法を用いたOsSYP13bとOsCPK12のタンパク質間相互作用の解析

Vn-OsSYP13b/pBI221、*OsCPK12-Vc/pBI221*をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、OsCPK12とOsSYP13bの相互作用を解析した。B. F. : Bright field

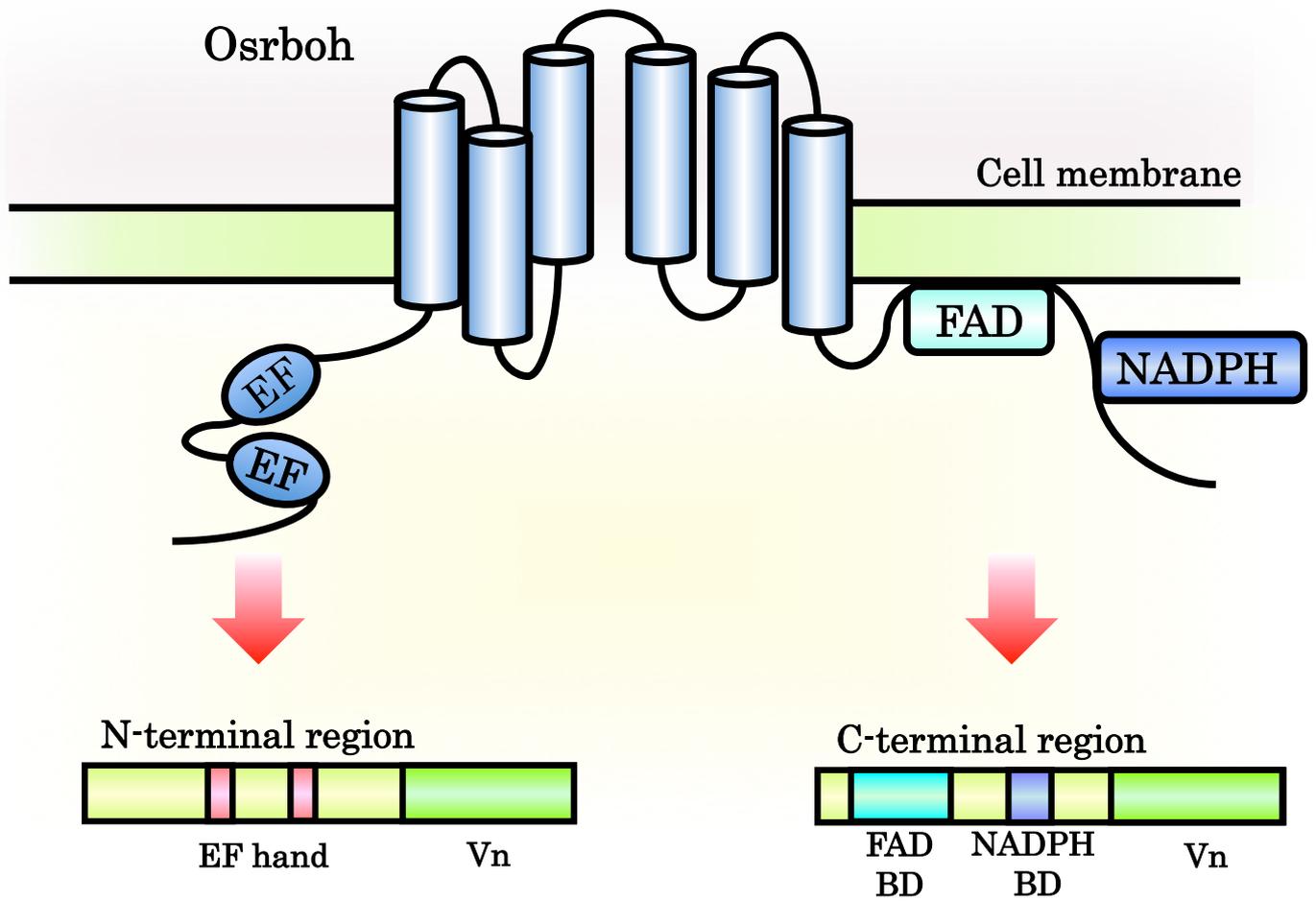


Fig. 25 Osrbohの模式図およびコンストラクトの説明

OsrbohはN末端側親水性領域には Ca^{2+} が結合するEF handモチーフ、C末端側の親水性領域にはFAD結合ドメイン (FAD BD)、NADPH結合ドメイン (NADPH BD) を有する6つの膜貫通領域型のタンパク質である。OsCPK12とOsrbohとの相互作用はOsrbohの細胞内ドメインで起こると考え、Pfam で予測された膜貫通領域からN末端側の細胞内ドメイン、膜貫通領域からC末端側の細胞内ドメインを相互作用解析に用いた。

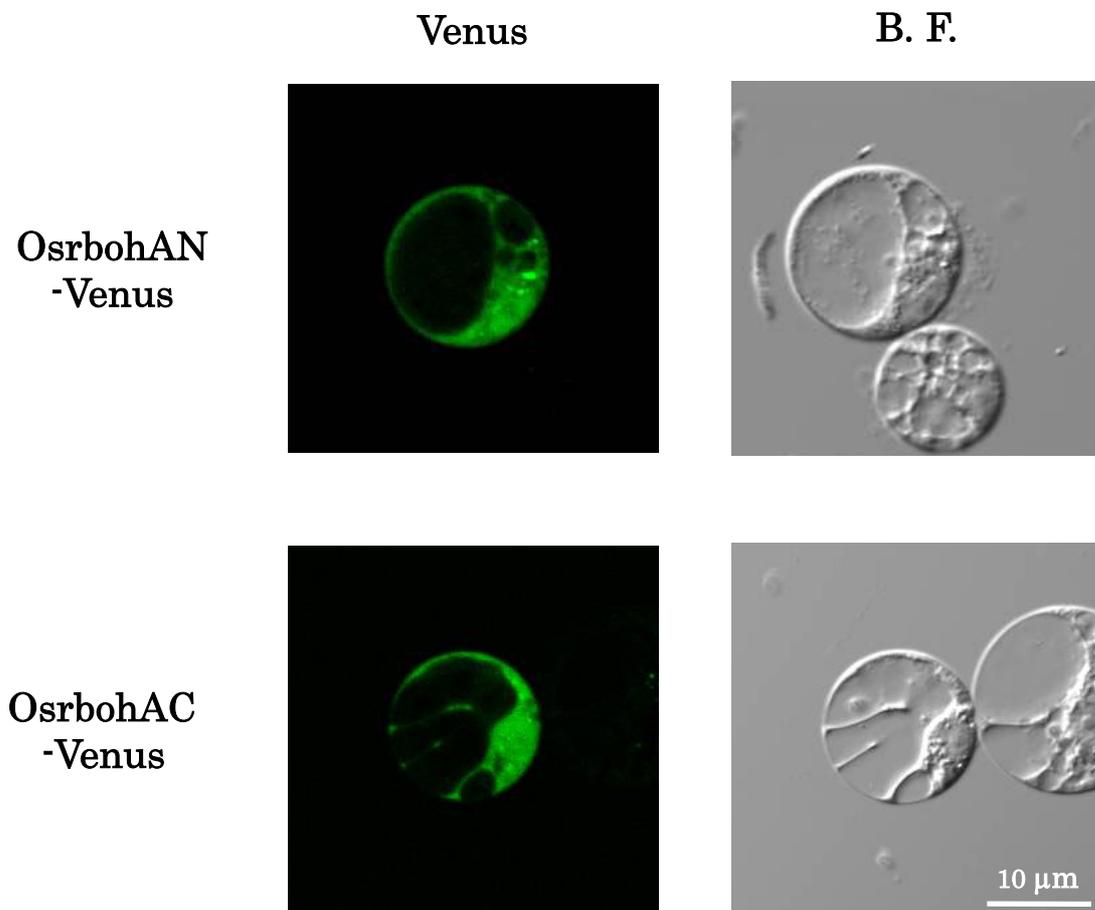


Fig. 26 イネプロトプラストにおけるOsrbohAN及びOsrbohACの細胞内局在の解析
OsrbohAN-Venus/pBI221、*OsrbohAC-Venus/pBI221*をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、OsCPK12とOsSYP13bの相互作用を解析した。B. F. : Bright field

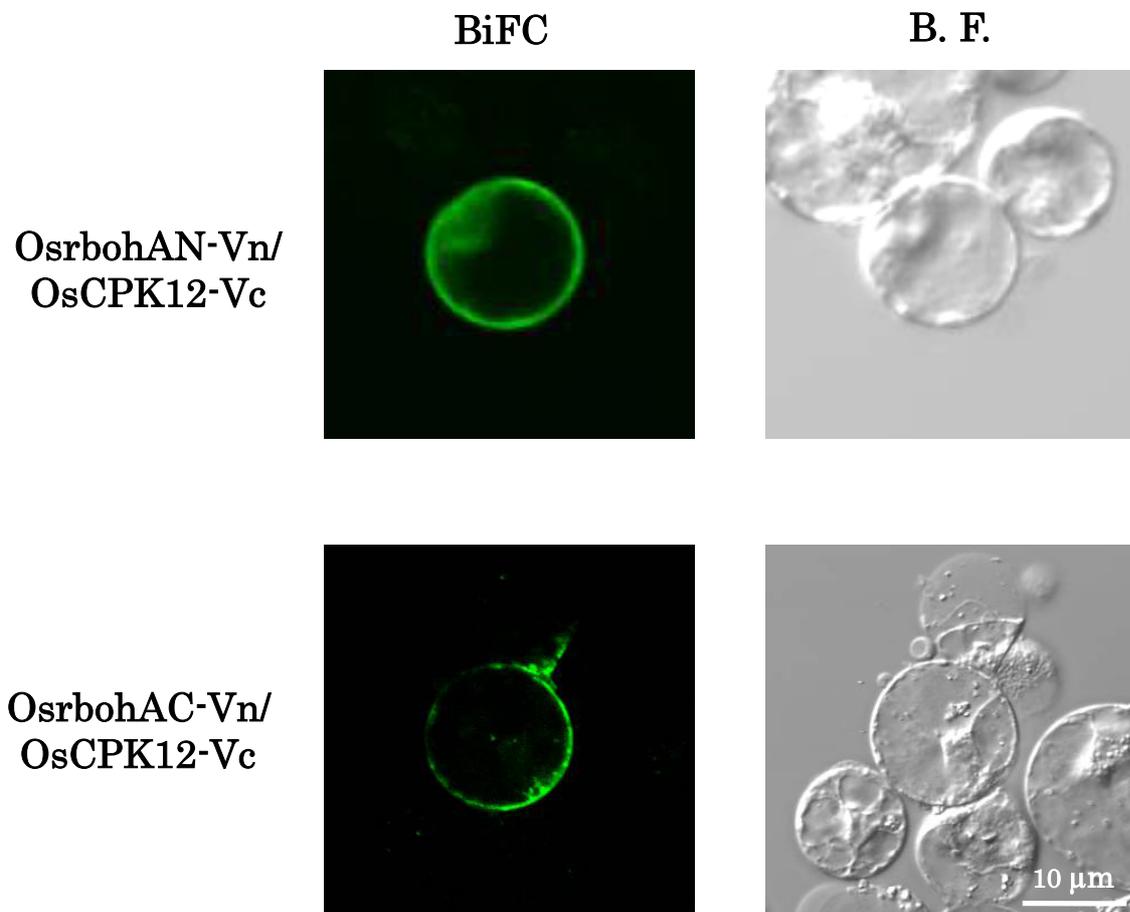


Fig. 27 BiFC法を用いたOsrbohAN及びOsrbohACとOsCPK12のタンパク質間相互作用の解析

*OsrbohAN-Vn/pBI221*または*OsrbohAC-Vn/pBI221*と*OsCPK12-Vc/pBI221*をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、OsCPK12とOsSYP13bの相互作用を解析した。B. F. : Bright field

A

AF015302(AN).pep	1	-----	1
AK120739(BN).pep	1	MWTPSRGSAARRSGHRIADYLADDQTTNTDSDNESYTTAYGDEFFAAAAAGSGGGGMLPAFLADQGD LVEVMLELDEE-SMVRSVIPTSATLY	98
AK120905(DN).pep	1	-----MRAGIGSGSGGGTTPVRPRWGSVTTTPRSLSTGSSPRGSDRSSDGGEE LVEVTLDLQEDDTI LRSVEPAAGGAAV	76
AF015302(AN).pep	1	-----	1
AK120739(BN).pep	99	GGGGQMPDPLPPLRT-PEGGGARS----LSRCSST----SRIRKK-FAWLRSPSPSPR-----PPTPAELQREAAARERRRQARLNRSST	182
AK120905(DN).pep	77	ASSSGASPSAVAPPRRAEPPGGVASRSRSPAMRRTSSRLLQFSQELKAEAMARARQFSQDLTKRFRTRTQSTTTAPPGISALAAARERRQARLDRTKS	176
AF015302(AN).pep	1	-----	1
AK120739(BN).pep	183	GAKRALKGLRFISRTTGTVQAELWRRVEDRFNALARDGLLSRDDFGECIGMVDSKEFVGI FDALARRRQNLERITREELYDFWLDI DQSFDA RLQI	282
AK120905(DN).pep	177	GADRATRGLRFIS---GPNKASNAWIEVQANFDR LARDGYLSRDDFPQCIGMTESKEFAMELFDL SRRRQMDVDKINKEELREIWQITDNSFDSRLQI	273
AF015302(AN).pep	30	FFDMVDKNADGRITEAEVKEIIMLSASANKLSRLKEQAEYAAALIMEELDPEGLGYIELWQLETLLQKDTYMNYSQALSYSQSAL SQNLAGLRK KSSIT	128
AK120739(BN).pep	283	FFDMVDINVDGRITREEVQELIIVLSASANKLAKLKEQAEYASLIMEELDPELNGYIELWQLEALLQKDTYMNYSRPLSTASGAQWSQNLGGAAVAAGA	382
AK120905(DN).pep	274	FFDMVDKNADGRITEAEVKEIIMLSASANKLSRLKEQAEYAAALIMENLNPEQLGYIELWQLETLLQKDTYMNYSQALSYSQSAL SQNLAGLRK RSPIT	372
AF015302(AN).pep	129	RKISTLSYYF EDNWKRLWVLALWIGIMAGLFIWKFMQYRNRVYFVMGYCVTTA	183
AK120739(BN).pep	383	AAATGGGAHAAVAARGGQQQQQEGRRGGWGVKKAARVRVAAEENWRRRAWVA WFAAMASLFWVKFVQYRRTPAFRVMGYCLPTA	470
AK120905(DN).pep	373	RKISTLSYYF EDNWKRLWVLALWIGIMAGLFIWKFIQYRNRVYFVMGYCVTTA	427

B

AK103747(AC).pep	1	VHGEKLYLIHWYRRTTWMYLSVPVCLYVGERILRFFRSGSYSVRLKVAIYPGNVLTLMQSKPPTFRYKSGQYMFVQCPAVSPFEWHFPFITSAPGDDY	100
AK120739(BC).pep	1	AHGYFLVRRWYKTTWMYLSVPLMLYVGERMLRALRSNAYVTKVCLLPGNVLTLMQSKPYGFYRSGQYDFLRQCPITSPFEWHFPFITSAPGDDY	100
AK120905(DC).pep	1	IHGEWLYLIRIHWYRRTTWMYLSVPVCLYVGERILRFFRSGSYSVRLKVAIYPGNVLTLMQSKPPTFRYKSGQYMFVQCPAVSPFEWHFPFITSAPGDDY	100
AK103747(AC).pep	101	LSIHVRQLGDWTRRELKRVFAAC-EPPAGGKSGLLRADETTKALPKLLIDGPGYSPAQDYSKYDVLVLLVGLGIGATPFISILKDLLNIIKMEEEEAS	199
AK120739(BC).pep	101	LSVHRTNGDWTEQLKRDFVENYFSPHLNRRASFSELGATEPRSLPRLLVDGPGYSPAQDFRNYDVLVLLVGLGIGATPFISILRDLNIIKLAEE--L	196
AK120905(DC).pep	101	LSIHVRQLGDWTRRELKRVFAAC-EPPAGGKSGLLRADETTKALPKLLIDGPGYSPAQDYSKYDVLVLLVGLGIGATPFISILKDLLNIIKMEEEEAS	199
AK103747(AC).pep	200	TDLYPPMGRNKP HVDLGLTMTITSRPKILKTTNAYFYWVTRQEGSDFWFKGMVNEIADLDQRNIIEMHNYLTSVYEEGDARSALITMLQALNHAKNGVD	299
AK120739(BC).pep	197	MDLAMETSRSSEDSANSFVSSTASSNKKRAYRISRAHFLGYPGATVI-----	243
AK120905(DC).pep	200	GDLYPPIGRNKA HVDLGLTMRITSPKRVLKTNTNAYFYWVTRQEGSDFWFKGMVNEIADLDQRNIIEMHNYLTSVYEEGDARSALITMLQALNHAKNGVD	299
AK103747(AC).pep	300	IVSGTKVRTHFARNPKVLSKISKHPYAKIGVFYCGAPVLAQELSLCHDFNGKCTSKFEFHKEHF	367
AK120739(BC).pep	243	-----	243
AK120905(DC).pep	300	IVSGTKVRTHFARNPKVLSKISKHPYAKIGVFYCGAPVLAQELSLCHDFNGKCTSKFEFHKEHF	367

Fig. 28 Osrbohの予想アミノ酸配列のマルチプルアライメント

(A) OsrbohのN末端領域の予想アミノ酸配列におけるマルチプルアライメントを示す。赤色で示した枠は保存されているアミノ酸を示し、青線はEF handモチーフを示している。(B) OsrbohのC末端領域の予想アミノ酸配列におけるマルチプルアライメントを示す。赤色で示した枠は保存されているアミノ酸を示し、緑線はFAD結合ドメインを示し、黄色線はNADPH結合ドメインを示している。それぞれのドメインはPfamを用いて検索した。

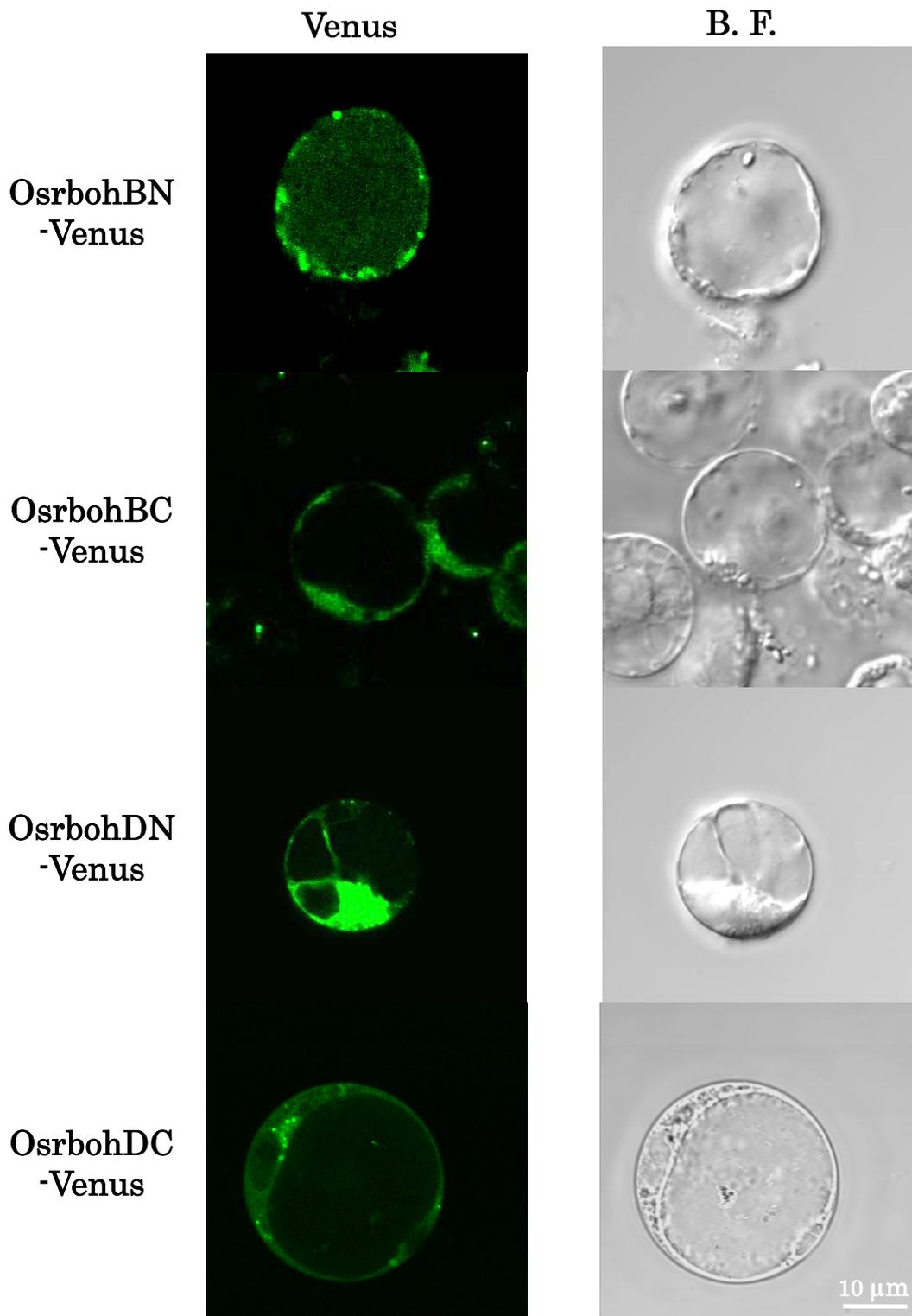


Fig. 29 イネプロトプラストにおけるOsrboh-N、Osrboh-Cの細胞内局在性の解析
 各Venus融合タンパク質発現ベクター (*OsrbohBN-Venus/pBI221*、*OsrbohDN-Venus/pBI221*、*OsrbohBC-Venus/pBI221*、*OsrbohDC-Venus/pBI221*) をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりVenus蛍光を観察し、それぞれのOsrbohのN末端細胞内ドメイン、C末端細胞内ドメインの細胞内局在を確認した。B. F. : Bright field

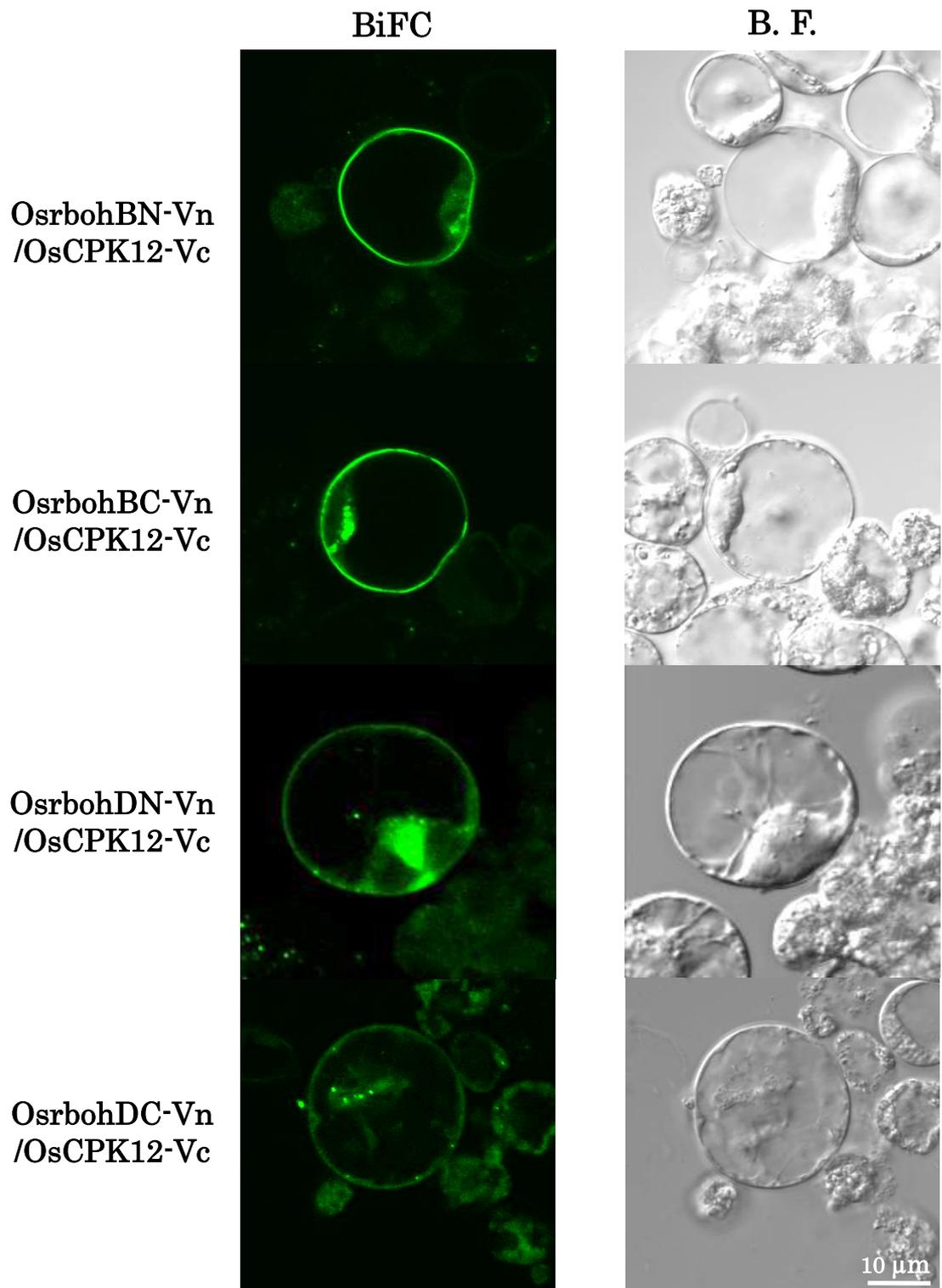


Fig. 30 BiFC法を用いたOsrbohとOsCPK12のタンパク質間相互作用の解析

各Vn融合タンパク質発現ベクター (*OsrbohBN-Vn/pBI221*、*OsrbohDN-Vn/pBI221*、*OsrbohBC-Vn/pBI221*、*OsrbohDC-Vn/pBI221*) と *OsCPK12-Vc/pBI221* をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、それぞれのOsrbohのN末端細胞内ドメイン、C末端細胞内ドメインとOsCPK12との相互作用を確認した。B.F.: Bright field

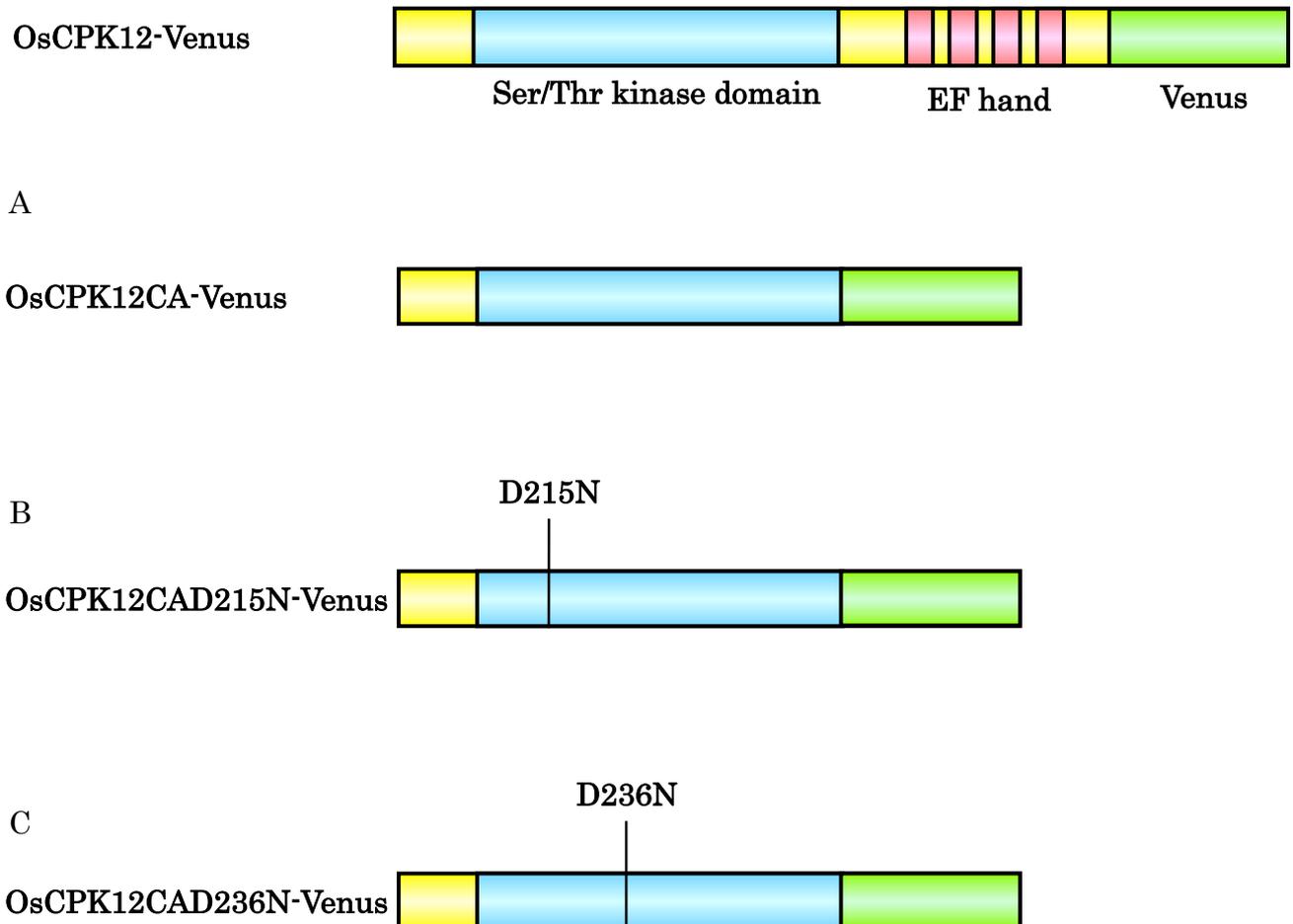


Fig. 31 OsCPK12のコンストラクトの模式図

(A) OsCPK12のキナーゼドメインよりC末端側を欠損させた恒常活性型のOsCPK12のC末端側にVenusを融合させた。(B) 予想アミノ酸配列からPfamを用いてプロテインキナーゼドメインの活性中心を推測し、215番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換したOsCPK12CAD215NのC末端側にVenusを融合させた。(C) 236番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換したOsCPK12CAD236NのC末端側にVenusを融合させた。

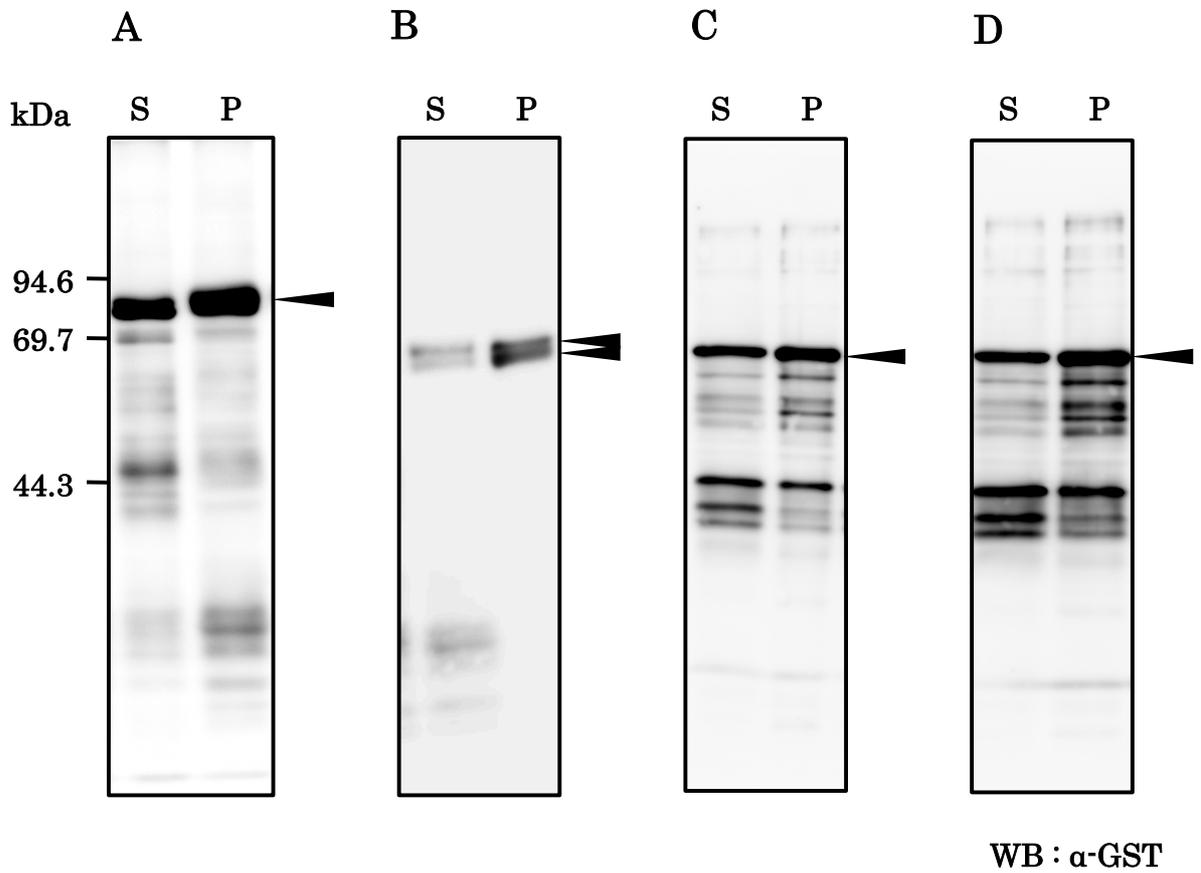


Fig. 32 大腸菌Rosetta-gami2でのOsCPK12自己リン酸化解析

(A) GST-OsCPK12-Flag、(B) GST-OsCPK12CA-Flag、(C) GST-OsCPK12D215N-Flag、(D) GST-OsCPK12D236N-Flagを発現させた大腸菌からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEで分離後、抗GST抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。S: 可溶性画分 P: 不溶性画分

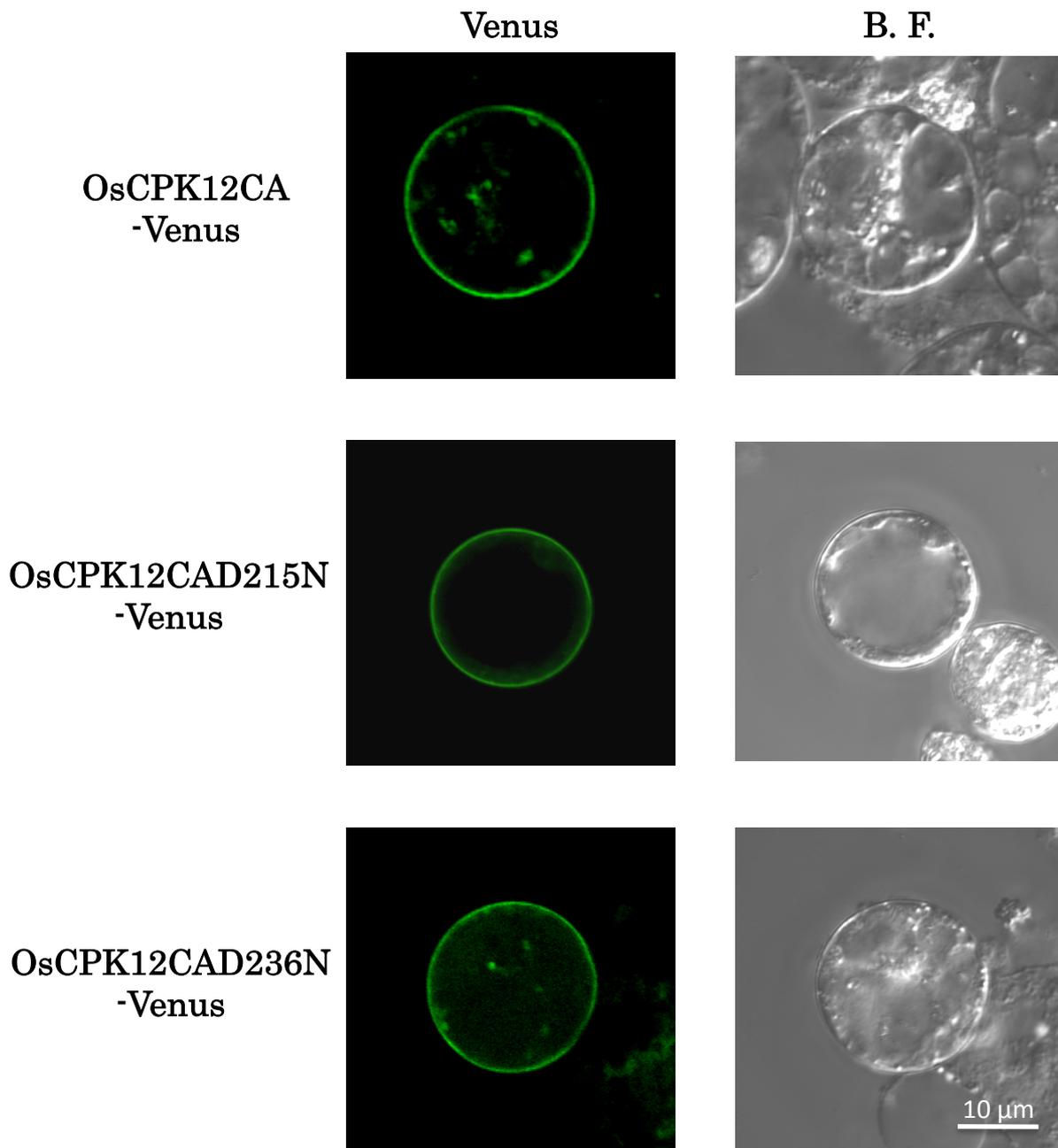


Fig. 33 イネプロトプラストにおけるOsCPK12CA、OsCPK12CAD215N、OsCPK12CAD236Nの細胞内局在性の解析

OsCPK12CA-Venus/pBI221、*OsCPK12CAD215N-Venus/pBI221*、*OsCPK12CAD236N-Venus/pBI221*をそれぞれPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりVenus蛍光を観察し、細胞内局在を確認した。

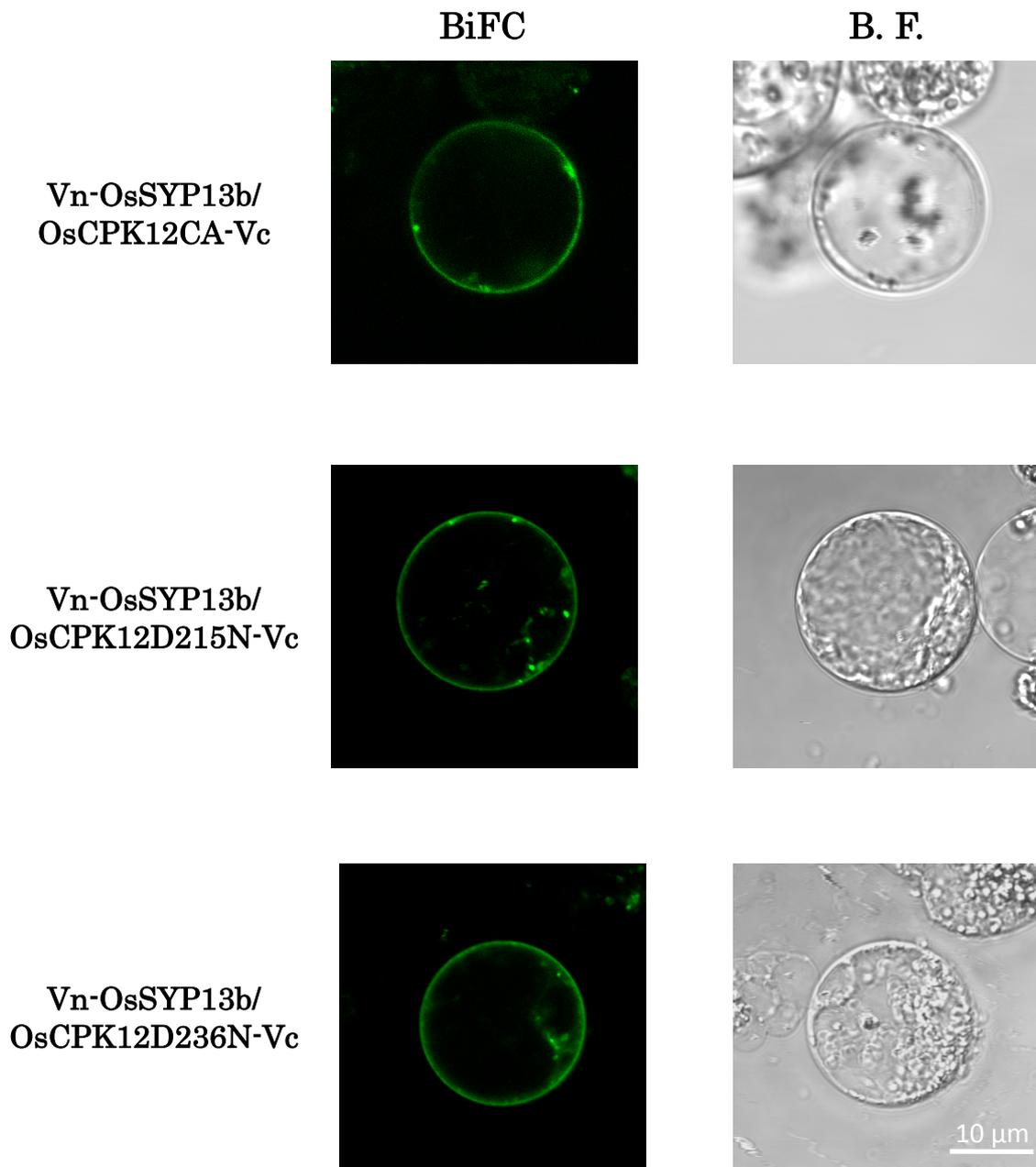


Fig. 34 BiFC法を用いたOsSYP13bとOsCPK12のタンパク質相互作用の解析

Vn-OsSYP13b/pBI221と各Vc融合タンパク質発現ベクター (*OsCPK12CA-Vc/pBI221*、*OsCPK12CAD215N-Vc/pBI221*、*OsCPK12CAD236N-Vc/pBI221*) をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30°C、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、OsCPK12とOsSYP13bの相互作用を解析した。B. F.: Bright field

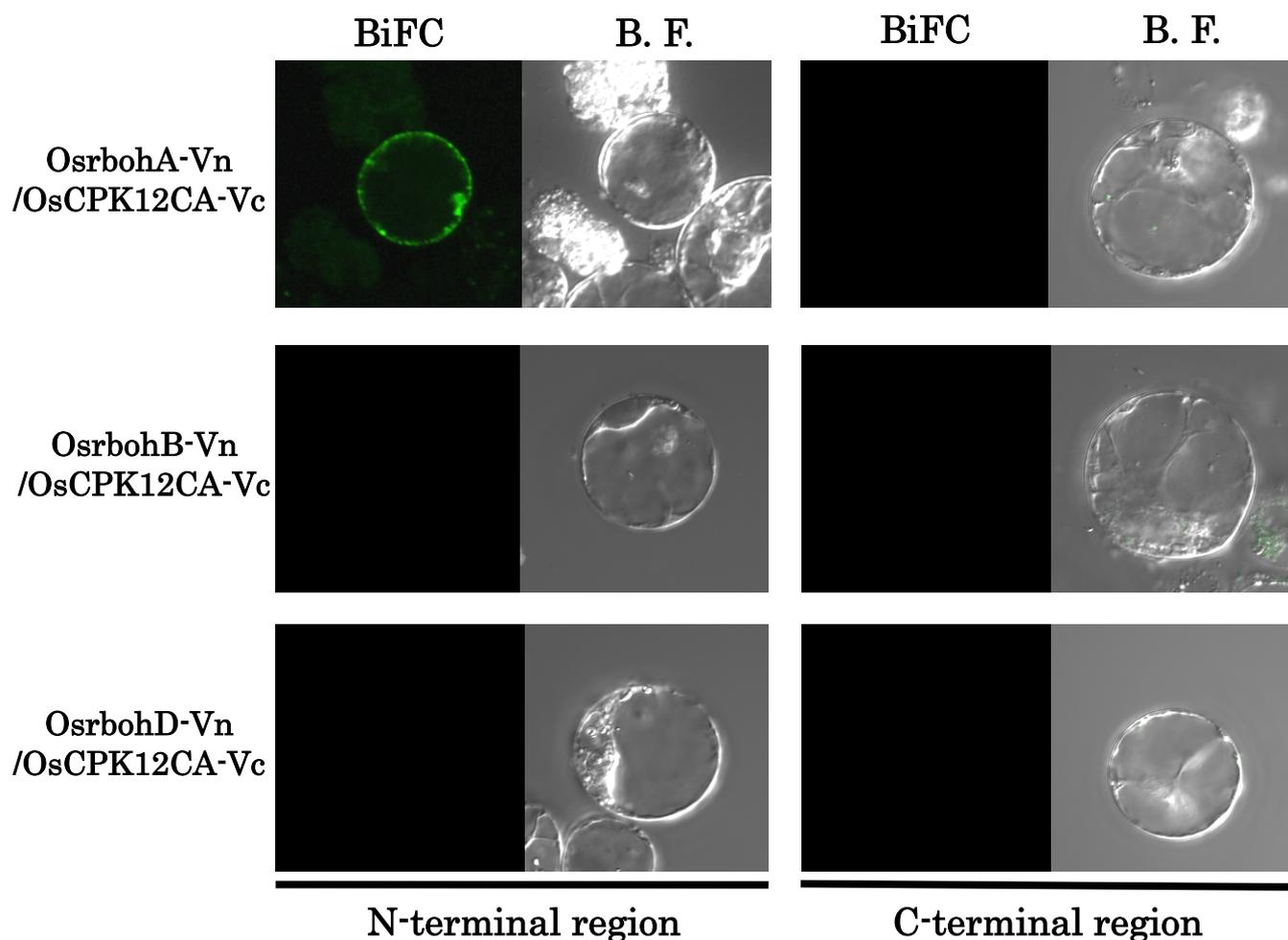


Fig. 35 BiFC法を用いたOsrbohとOsCPK12CAのタンパク質相互作用の解析

各Vn融合タンパク質発現ベクター (*OsrbohAN-Vn/pBI221*, *OsrbohBN-Vn/pBI221*, *OsrbohDN-Vn/pBI221*, *OsrbohAC-Vn/pBI221*, *OsrbohBC-Vn/pBI221*, *OsrbohDC-Vn/pBI221*) と *OsCPK12CA-Vc/pBI221* をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30°C遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、それぞれのOsrbohのN末端細胞内ドメイン、C末端細胞内ドメインとOsCPK12との相互作用を確認した。B.F.: Bright field

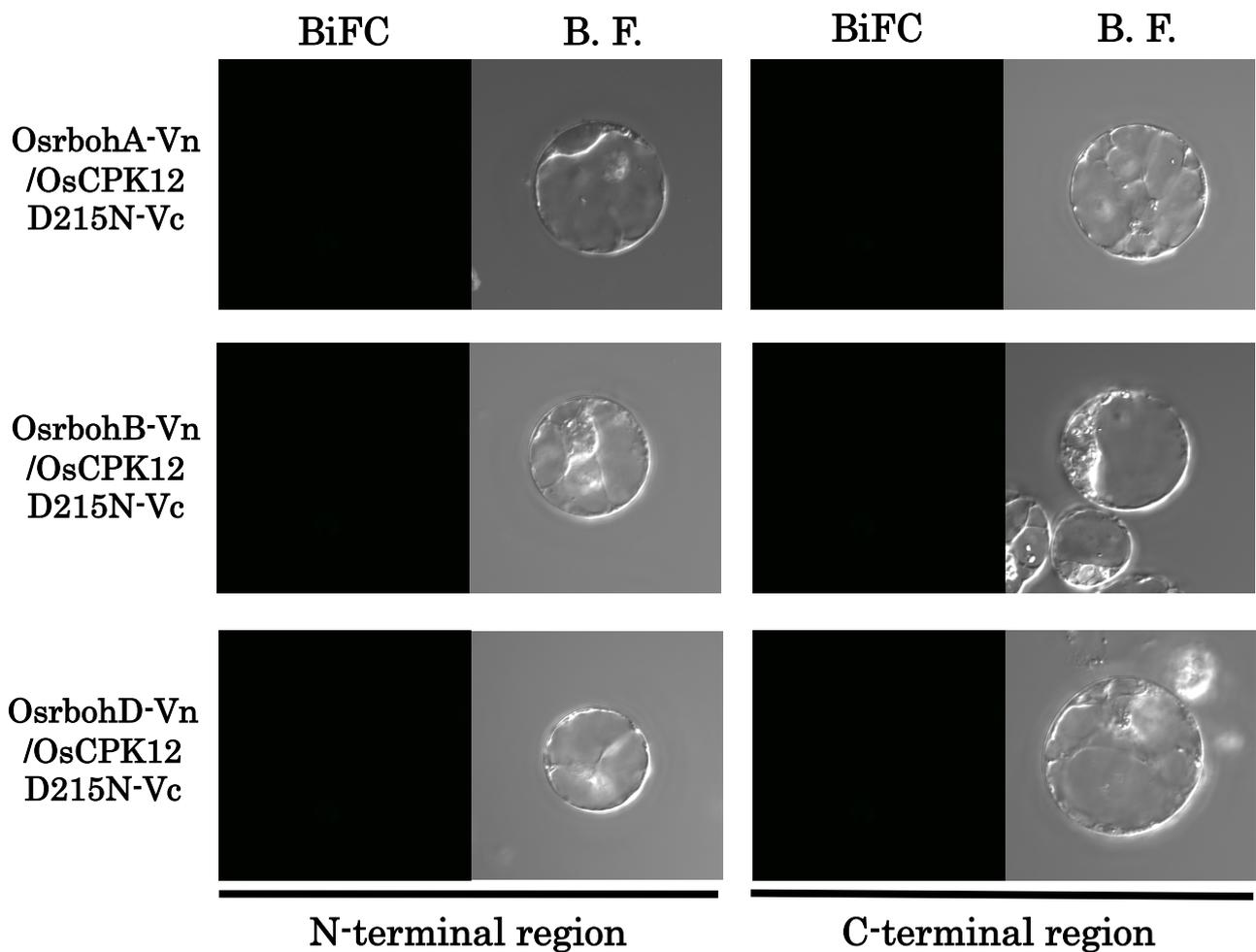


Fig. 36 BiFC法を用いたOsrbohとOsCPK12CAD215Nのタンパク質間相互作用の解析
 各Vn融合タンパク質発現ベクター (*OsrbohAN-Vn/pBI221*, *OsrbohBN-Vn/pBI221*, *OsrbohDN-Vn/pBI221*, *OsrbohAC-Vn/pBI221*, *OsrbohBC-Vn/pBI221*, *OsrbohDC-Vn/pBI221*) と *OsCPK12CAD215N-Vc/pBI221* をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30°C、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、それぞれのOsrbohのN末端細胞ドメイン、C末端細胞内ドメインとOsCPK12との相互作用を確認した。B.F.: Bright field

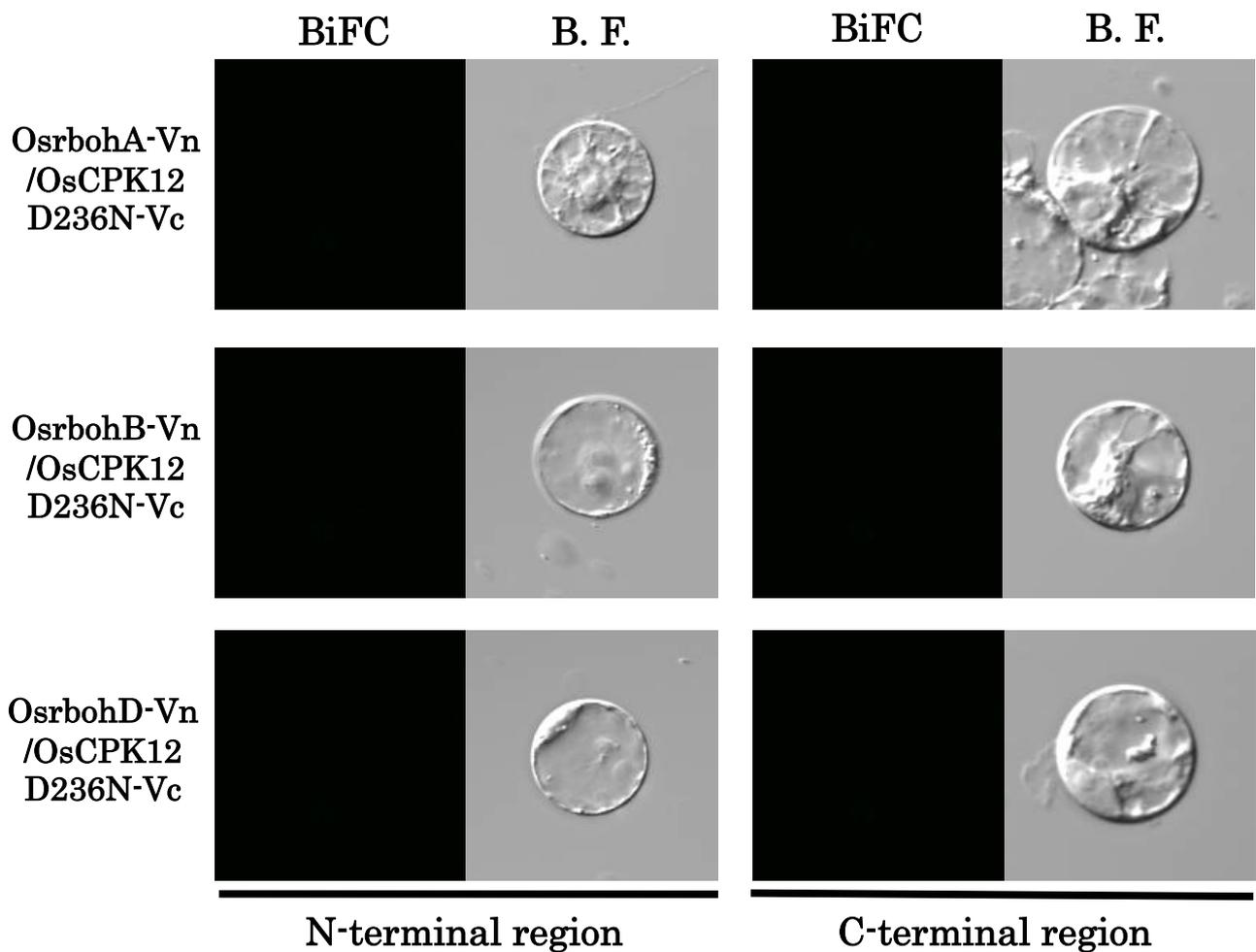


Fig. 37 BiFC法を用いたOsrbohとOsCPK12DCA236Nのタンパク質間相互作用の解析
 各Vn融合タンパク質発現ベクター (*OsrbohAN-Vn/pBI221*, *OsrbohBN-Vn/pBI221*, *OsrbohDN-Vn/pBI221*, *OsrbohAC-Vn/pBI221*, *OsrbohBC-Vn/pBI221*, *OsrbohDC-Vn/pBI221*) と *OsCPK12D236N-Vc/pBI221* をPEG法によりイネプロトプラストに導入し、30℃、遮光下で静置培養した。導入後16時間の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によりBiFC蛍光を観察し、それぞれのOsrbohのN末端細胞内ドメイン、C末端細胞内ドメインとOsCPK12との相互作用を確認した。B.F.: Bright field

2-4 考察

本章ではまず、OsCPK12 によるシグナル伝達機構の全容を明らかにするために、OsCPK12 の基質となるタンパク質の同定を行った。タンパク質間相互作用を検出するハイスループットなスクリーニング系はいくつか存在するが、最も広く使われているスクリーニング系は Yeast two-hybrid 法である。Yeast two-hybrid 法とは、転写活性化因子である GAL4 タンパク質の Binding Domain (BD) と Activating Domain (AD) が分離可能であることを利用した方法である。BD 断片を bait タンパク質に、AD 断片を Prey タンパク質にそれぞれ融合したものを酵母内で発現させた際に、Bait と Prey タンパク質が相互作用すると、BD と AD が近接することで AD が転写開始領域に近接し、レポーター遺伝子の転写が活性化される。しかし、この方法におけるタンパク質間相互作用の検出には、Bait と Prey タンパク質間の継続的な相互作用が必要となるため、キナーゼや基質などのような一過的な相互作用の検出には適さないと考えられる。加えて、Yeast two-hybrid 法は自律活性が問題となるなどのデメリットが存在する。そこで、キナーゼとその基質のような一過的な結合でも検出できる新たな検定系を構築する必要があった。本研究で用いた BiFC 法とは、N 末端側と C 末端側に分断され、蛍光を失ったタンパク質断片が会合することで元の構造が回復し、同時に蛍光を回復する性質を利用した方法である。再構築された蛍光タンパク質は融合タンパク質同士の相互作用が失われても蛍光が継続的に観察できるという特徴を持つため、キナーゼと基質間のような一過的な相互作用の検出に適している。さらに、Yeast two-hybrid 法で問題となる自律活性がある場合でもスクリーニングを行うことが出来るという利点がある。そこで、大腸菌 Rosetta-gamiB とイネプロトプラストを用いて、BiFC 法によるキナーゼと基質間の特異的な相互作用を検出することができる新規のスクリーニング系の確立を行った。確立したスクリーニング系を用いて、OsCPK12 と相互作用するタンパク質の探索を行った結果、OsSYP13b と OsrbohA が基質候補タンパク質として同定された。特に、OsrbohA は CPK の基質となる可能性が報告されていることから、今回新たに構築したスクリーニング系は効率よくキナーゼの基質を探索できる有用な系であると思われる。

新しく構築した BiFC 法をベースとした検定系を用いて、OsCPK12 と相互作用するタンパク質として、OsSYP13b が同定された (Fig.

20A)。これまでに、OsSYP13bと同様に細胞膜シンタキシンであるSYP122がflg22処理3分間でリン酸化される膜タンパク質として同定され、実際に*In vitro* kinase assayでCa²⁺依存的にリン酸化されることが報告された(Nühse *et al.*, 2003)。さらに、SYP122のリン酸化部位を特定したところ、Ser-6とSer-8であることも明らかとなった。この二つのセリン残基はSyp1ファミリー内で保存されている箇所であり、OsSYP13bにも保存されていた。このことからOsSYP13bにおいても、この二つのセリン残基がリン酸化されている可能性は高いと考えられる。大腸菌内でOsCPK12と相互作用するOsSYP13bタンパク質断片はN末端領域であり、このSer-6とSer-8も含まれていた。このことから、OsCPK12がCa²⁺によって活性化されOsSYP13bタンパク質のSer-6とSer-8を特異的にリン酸化している可能性が考えられる。現時点ではOsSYP13bがOsCPK12によって直接リン酸化されているかどうかを明らかにするデータは得られていないが、今後OsSYP13bタンパク質とOsCPK12タンパク質を精製し、*In vitro*でOsSYP13のリン酸化を確認することでOsCPK12によってOsSYP13bがリン酸化されるかどうか、またそのリン酸化部位について明らかになるであろう。

本研究において、大腸菌で発現させたGST-OsCPK12CA-Flagタンパク質は分子量の異なる二つのタンパク質として精製されたが、活性中心に変異を入れたGST-OsCPK12CAD215N-FlagとGST-OsCPK12CAD236N-Flagでは一本のバンドとして回収された(Fig. 32)。CPKの一部が自己リン酸化されることで、バンドがシフトすることが報告されている(Kwon C *et al.*, 2013)。このことから、GST-OsCPK12CA-Flagは、一部が自己リン酸化されているが活性中心に変異を入れたGST-OsCPK12CAD215N-Flag、GST-OsCPK12CAD236N-Flagでは自己リン酸化活性が失われていると推定される。そこで、OsCPK12の配列を詳細に解析したところ、CPKのリン酸化サイト(B-X-X-S)がOsCPK12CA中に3箇所存在することが示された。GST-OsCPK12CA-Flagタンパク質で認められた二つのタンパク質間における差は、非常に小さく、1 kDa以下であると推定される。OsCPK12CAの3カ所のセリン残基がすべてリン酸化されていると考えれば、この差は合理的に説明出来るかも知れない。GST-OsCPK12CA-Flagが本当にリン酸化されているのかどうかを明らかにするためには、得られたリコンビナントタンパク質の詳細な分子量を質量分析計で調べるか、抗セリンリン酸化抗体を用いたウエス

タンブロットティングなどによる実験が必要となるであろう。

大腸菌を用いたスクリーニングにより OsCPK12 と相互作用するタンパク質として OsrbohA の N 末端細胞内領域が同定された (Fig. 20B)。しかし、イネプロトプラスト内での相互作用解析を行ったところ、OsrbohAN だけでなく、比較対照として用いた OsrbohAC も相互作用を示した (Fig. 27)。Osrboh の N 末端領域は C 末端側の FAD/NADPH 結合領域と相互作用しており、Ca²⁺の結合によって構造変化を引き起こすことが知られている (Oda *et al.*, 2010)。このことから、OsCPK12 が OsrbohA の全長と相互作用する時、OsCPK12 は OsrbohA の N 末端細胞内ドメインと C 末端細胞内ドメインとの両方と相互作用している可能性があると思われる。序論でも述べたが、OsCPK12 は N 末端にキナーゼドメインを、C 末端に 4 つの EF hand モチーフを含むカルモジュリン様ドメインを有している (Fig. 12)。また、この実験で用いた OsCPK12CA はこのカルモジュリン様ドメインを失っている。この様な状況を考えると、OsCPK12 が全ての Osrboh の N 末端細胞内ドメイン、C 末端細胞内ドメインと相互作用したことは、OsCPK12 のカルモジュリン様ドメインを介した結合なのかも知れない。一方、OsCPK12CA の結合はキナーゼドメインを介しており、この二つの分子間で認められた OsrbohA との相互作用は、全く性質が異なるものだと思われる。特に、OsCPK12 が OsrbohA, B, D の全てと相互作用するが、OsCPK12CA は OsrbohA の N 末端細胞内ドメインとのみ相互作用するということから、この二つの相互作用が全く異なる様式で起きているという考え方を支持する。C 末端細胞内ドメインの FAD/NADPH 結合ドメインは保存性が高いことが明らかとなっており、OsCPK12 のカルモジュリン様ドメインを介した結合は比較的特異性が低いのかも知れない。一方、キナーゼドメインを介した OsrbohA の N 末端細胞内ドメインとの結合は、キナーゼ活性を必要とすることから、高い特異性が存在すると思われる。この様な、同一の分子間で異なる相互作用様式が存在することは非常に興味深い現象である。この様な異なる相互作用様式の機構を明らかにするためには、カルモジュリン様ドメインに点変異を入れた OsCPK12 を用いた相互作用解析が有効であると思われる。

OsCPK12 はキナーゼ活性依存的に OsrbohAN と相互作用した (Fig. 35)。OsrbohA の CPK によるリン酸化サイトは不明だが、ジャガイモの StrbohA, B においては 2 カ所であると報告されている (Kobayashi *et al.*, 2007)。しかし、今回 OsCPK12CA と相互作用した OsrbohA の

N末端細胞内ドメインにはこの予想リン酸化アミノ酸残基は存在していない。このことから **OsCPK12CA** による **OsrbohA** との結合がリン酸化と関係しているなら、**OsCPK12CA** は **StrbohA**、**B** とは異なるアミノ酸残基をリン酸化しているのであろう。現時点では **OrbohA** が **OsCPK12** の直接的な基質であるかどうかは確定していないが、発現タンパク質などを用いて実際のリン酸化を明らかにしたい。

OsSYP13b と **OsCPK12** との **BiFC** 法を用いた相互作用では、細胞膜上でドット状の蛍光として観察された (**Fig. 24**)。これまでに、いくつかのシンタキシンはゴルジ体やエンドソームに局在することが確認されている (**Uemura et al., 2004**)。このことからドット状に観察された **BiFC** 由来の蛍光は細胞膜付近に移動したエンドソームに由来するかも知れない。事実、**OsSYP13b** は分泌型の **SNARE** であるため、エンドソームに取り込まれている可能性が高いと考える。今後、このエンドソーム由来の **OsSYP13b** と **OsCPK12** との相互作用の生理的意義を明らかにすることで、植物免疫反応のメカニズム研究だけでなく、細胞輸送のメカニズム研究に対しても新規の知見を与えることが出来るかも知れない。

参考文献

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J.
MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity.
Nature. 2002 Feb 28; 415 (6875) : 977-83.

Assaad FF, Qiu JL, Youngs H, Ehrhardt D, Zimmerli L, Kalde M, Wanner G, Peck SC, Edwards H, Ramonell K, Somerville CR, Thordal-Christensen H.
The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae.
Mol Biol Cell. 2004 Nov; 15 (11) : 5118-29.

Babior BM.
NADPH oxidase.
Curr Opin Immunol. 2004 Feb; 16 (1) : 42-7.

Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R.
Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 22; 102 (8) : 3135-40.

Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J.
Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature*. 2010 Mar 18; 464 (7287) : 418-22.

Böhlenius H, Mørch SM, Godfrey D, Nielsen ME, Thordal-Christensen H.
The multivesicular body-localized GTPase ARFA1b/1c is important for callose deposition and ROR2 syntaxin-dependent preinvasive basal defense in barley. *Plant Cell*. 2010 Nov; 22 (11) : 3831-44.

Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ.
Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a

proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*. 1992 Jul 10; 70 (1) : 21-30.

Che FS, Nakajima Y, Tanaka N, Iwano M, Yoshida T, Takayama S, Kadota I, Isogai A.

Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *J Biol Chem*. 2000 Oct 13; 275 (41) : 32347-56

Chen L, Shiotani K, Togashi T, Miki D, Aoyama M, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K.

Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance. *Plant Cell Physiol*. 2010 Apr; 51 (4) : 585-95.

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T.

A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*. 2007 Jul 26; 448 (7152) : 497-500.

Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu JL, Hüchelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P.

SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*. 2003 Oct 30; 425 (6961) : 973-7.

Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K

The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene*. 1996 Nov 7; 179 (1) : 45-51

Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX, Romeis T.

Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 2013 May 21; 110 (21) : 8744-9.

Ellard-Ivey M, Hopkins RB, White TJ, Lomax TL.
Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Mol Biol*. 1999 Jan; 39 (2) : 199-208.

Gómez-Gómez L, Boller T.
FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*. 2000 Jun; 5 (6) : 1003-11.

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*. 2002; 9: 789-98.

Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K.
MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 2006 Dec 1; 281 (48) :36969-76.

Iwano M, Che FS, Goto K, Tanaka N, Takayama S, Isogai A.
Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells. *Mol Plant Pathol*. 2002 Jan 1; 3 (1) : 1-8.

Kadota Y, Furuichi T, Ogasawara Y, Goh T, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K.
Identification of putative voltage-dependent Ca²⁺-permeable channels involved in cryptogein-induced Ca²⁺ transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 May 7; 317 (3) : 823-30.

Kadota I, Mizuno A, Nishiyama K (1996) Detection of a protein

specific to the strain of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 pathogenic to rice. Ann Phytopathol Soc Jpn 62: 425-428.

Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T, Shimamoto K.

Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan 3; 103 (1) : 230-5. Epub 2005 Dec 27.

Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C
A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs Plant Cell. 1998 Feb; 10 (2) : 255-66.

Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M, Kuchitsu K.

Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta. 2012 Feb; 1823 (2) :398-405.

Kishi-Kaboshi M, Okada K, Kurimoto L, Murakami S, Umezawa T, Shibuya N, Yamane H, Miyao A, Takatsuji H, Takahashi A, Hirochika H.

A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. Plant J. 2010 Aug; 63 (4) : 599-612.

Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. Plant Cell. 2007 Mar; 19 (3) : 1065-80.

Kurusu T, Yagala T, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K.

Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and

mitogen-activated protein kinase activation in rice. *Plant J.* 2005 Jun; 42 (6) : 798-809.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G.
The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell.* 2004 Dec; 16 (12) : 3496-507.

Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, El Kasmi F, Jürgens G, Parker J, Panstruga R, Lauciello L, Kappes B, Scapozza L, Perozzo R.
Expression, purification and biochemical characterization of recombinant Ca-dependent protein kinase 2 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protein Expr Purif.* 2013 Aug; 90 (2) : 170-7.

Lipka V, Schulze-Lefert P.
Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature.* 2008 Feb 14; 451 (7180) : 835-40.

Leon J, Lawton MA, Raskin I.
Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol.* 1995 Aug; 108 (4) : 1673-1678.

Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC.
BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell.* 2002 Jul 26; 110 (2) : 213-22.

Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L.
Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science.* 2011 Jun 17; 332

(6036) : 1439-42.

Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P.

A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5; 107 (1) : 496-501

Ludwig AA, Romeis T, Jones JD

CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot*. 2004 Jan; 55 (395) :181-8.

Martín ML, Busconi L.

Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J*. 2000 Nov; 24 (4) : 429-35.

Meng X, Zhang S.

MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol*. 2013; 51: 245-66.

Minami E, Kuchitsu K, He DY, Kouchi H, Midoh N, Ohtsuki Y, Shibuya N.

Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant Cell Physiol*. 1996 Jun; 37 (4) : 563-7.

Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, Zárský V, Hirt H.

A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *J Biol Chem*. 2006 Dec 15; 281 (50) : 38697-704

Nakashima A, Chen L, Thao NP, Fujiwara M, Wong HL, Kuwano M, Umemura K, Shirasu K, Kawasaki T, Shimamoto K.

RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell*. 2008 Aug; 20 (8) : 2265-79.

Nam KH, Li J.

BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling.

Cell. 2002 Jul 26; 110 (2) : 203-12.

Nühse TS, Boller T, Peck SC.

A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin. J Biol Chem. 2003 Nov 14; 278 (46) : 45248-54.

Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, Shimizu T.

Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. J Biol Chem. 2010 Jan 8; 285 (2) : 1435-45.

Okada M, Matsumura M, Ito Y, Shibuya N.

High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor. Plant Cell Physiol. 2002 May; 43 (5) : 505-12.

Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, Nara M, Suzuki K, Tanokura M, Kuchitsu K.

Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. J Biol Chem. 2008 Apr 4; 283 (14) : 8885-92.

Qiu JL, Fiil BK, Petersen K, Nielsen HB, Botanga CJ, Thorgrimsen S, Palma K, Suarez-Rodriguez MC, Sandbech-Clausen S, Lichota J, Brodersen P, Grasser KD, Mattsson O, Glazebrook J, Mundy J, Petersen M.

Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J.* 2008 Aug 20; 27 (16) : 2214-21

Rutschmann F, Stalder U, Piotrowski M, Oecking C, Schaller A. LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol.* 2002 May; 129 (1) : 156-68.

Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem.* 2010 Mar 26; 285 (13) : 9444-51.

Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su SH, Jester PJ, Zhang S, Bent AF, Krysan PJ. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 2007 Feb; 143 (2) : 661-9.

Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science.* 2008 Feb 29; 319 (5867) : 1241-4.

Thao NP, Chen L, Nakashima A, Hara S, Umemura K, Takahashi A, Shirasu K, Kawasaki T, Shimamoto K. RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice. *Plant Cell.* 2007 Dec; 19 (12) : 4035-45.

Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol.* 2005 Aug; 8 (4) : 397-403.

Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH. Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct.* 2004 Apr; 29 (2) : 49-65.

van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 1998; 36: 453-83.

Wen JQ, Oono K, Imai R. Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant Physiol.* 2002 Aug; 129 (4) : 1880-91.

Wick P, Gansel X, Oulevey C, Page V, Studer I, Dürst M, Sticher L. The expression of the t-SNARE AtSNAP33 is induced by pathogens and mechanical stimulation. *Plant Physiol.* 2003 May; 132 (1) : 343-51.

Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, Tabata R, Yaeno T, Hasegawa K, Kojima C, Yoshioka H, Iba K, Kawasaki T, Shimamoto K. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell.* 2007 Dec; 19 (12) : 4022-34.

Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol.* 2004 Jul; 135 (3) : 1447-56.

Xu J, Xie J, Yan C, Zou X, Ren D, Zhang S. A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *Plant J.* 2013 Nov; 77 (2) : 222-234.

Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Doke N.

Nicotiana benthamiana gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*. 2003 Mar; 15 (3) : 706-18.

Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J.

Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2; 101 (44) : 15811-6.

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T.

Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception.

Nature. 2004 Apr 15; 428 (6984) : 764-7.

2010年農林業センサス（農林水産省）

2012年農林水産基本データ（農林水産省）

藤原沙都姫（2003）

イネ cDNA マイクロアレイを用いた病害抵抗性反応誘導機構の解析
修士論文（奈良先端科学技術大学院大学）

藤原沙都姫（2007）

イネにおけるフラジェリン認識情報の細胞内伝達機構に関する研究
博士論文（奈良先端科学技術大学院大学）

吉江義明（2004）

イネ抵抗性反応時の活性酸素種発生に関与する *Osrboh* 遺伝子群の解析。
修士論文（奈良先端科学技術大学院大学）

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、この上なく素晴らしい環境を与えて頂き、常に適切なお指導を賜りました長浜バイオ大学環境生命科学コース植物分子環境生理学研究室の蔡 晃植教授に厚く御礼申し上げます。

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座の藤原 沙都姫博士には Yellow cameleon3.6 の発現コンストラクトをご供与して頂きました。心から謹んで感謝いたします。

また、長浜バイオ大学環境生命科学コース植物分子環境生理学研究室の先輩方には多くの助言、ご指導頂きましたことを心から感謝いたします。特に、近藤真千子さん、平井洋行さんには実験について色々ご指導ありがとうございました。

大坪由佳さん、古川岳人くん、同じグループの韓宇龍くん、鬼頭信貴くん、黎芷瑜さんありがとうございました。

本研究を進めていく上で、迷惑を掛け、苦楽を共にしました研究室仲間に深く御礼申し上げます。

最後に、3年間の大学院生活を暖かく見守り、いつも支えてくれた両親に深く感謝します。

論文目録

Identification of Interacting Proteins for Calcium Dependent Protein Kinase 8 by a Novel Screening System Based on Bimolecular Fluorescence Complementation (2013) Mayu KAMIMURA, Yulong HAN, Nobuki KITO, and Fang-Sik CHE. BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY

In Press