

博士論文

イネにおける植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの
受容機構に関する研究

2015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
バイオ科学技術研究領域

氏名 桂木 雄也

目次

序論	…	1
第1章 イネに認識されるフラジェリン部位の同定		
緒言	…	10
材料と方法	…	11
結果	…	22
考察	…	50
第2章 フラジェリン CD2-1 領域を認識する受容体の同定と その受容機構の解析		
緒言	…	55
材料と方法	…	56
結果	…	64
考察	…	95
総合考察	…	101
謝辞	…	102
参考論文	…	103

序論

植物は、自発的な移動手段を持たないため、自らの生存環境を選択できない。それ故、多くの植物病原菌と接触する機会を持つ。しかし、この様な植物と病原菌の接触のほとんどは感染に至らず、病原菌による接触によって植物が病気を発症することは非常に稀である。これは、植物が多くの病原菌に対して機能する免疫システムを有しているからに他ならない。植物が病原菌を認識し免疫反応を誘導することは、病原菌の感染から自身の身を守る自己の生存を懸けた重要な反応である。植物は、まず Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs) と呼ばれる広範囲な病原菌において共通に存在する分子群を認識することで、PAMP-triggered immunity (PTI) という免疫反応を誘導する。この PTI には、病原菌への直接的な攻撃やセカンドメッセンジャーとして作用する活性酸素の発生、様々な抗菌活性を有する Pathogenesis-related (PR) タンパク質や Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL)、Chalcone Synthase (CHS) などの Phytoalexin 合成に関与する酵素タンパク質などをコードする防御関連遺伝子群の発現、細胞壁を強化するためのカロースの沈着などの病原菌認識後比較的早期に認められる反応が含まれる (Klarzynski *et al.*, 2000; Aziz *et al.*, 2003; Miguel Angel Torres *et al.*, 2005; Boller and Felix, 2009; Luna *et al.*, 2011)。植物の免疫反応においては、PTIに引き続き Effector と呼ばれる分子を認識して誘導する Effector-triggered immunity (ETI) という免疫反応も存在する。Effector は、植物病原細菌の TypeIII 分泌装置を介して植物細胞内に分泌される分子であり、多くの場合植物は、この Effector 分子を細胞内で認識して ETI 反応を引き起こす。この様な二相性の植物免疫反応が、速やかにまた協調的に誘導された場合、植物病原菌の接触が感染に至ることはないが、これらの反応が誘導されないか遅れた場合、植物は病原菌の侵入を許すことになり、その結果、発病することとなる (Yang *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1999; Jones and Dangl, 2006)。

このような植物の免疫システムの中で PTI は、感染初期における病原菌への防御とこれに引き続いて起きる ETI 誘導にも深く関与することから、植物免疫において重要なプロセスとなる。PTI 誘導はまず多くの病原菌が共通して持つ PAMPs の認識から始まる。現在までに PAMPs として、 β -グルカン、キチン、エルゴステロール、Lipopolysaccharide (LPS: リポ多糖)、細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリン、翻訳伸長因子である Elongation Factor Tu (EF-Tu)、分泌型ペプチドである Activator of XA21-mediated Immunity (Ax21) など

が同定されている (Felix *et al.*, 1999; Klarzynski *et al.*, 2000; Kunze *et al.*, 2004; Silipo *et al.*, 2005; Kaku *et al.*, 2006; Laquitaine *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009)。これら同定された PAMPs の中でも、フラジェリンに対する研究がもっとも活発に行われてきた。Felix らは、植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* の抽出物をトマト (*Lycopersicon esculentum* L. Mill, line Msk8) に処理し PTI 時に認められる細胞外へのイオン流出の誘導活性を指標に調べたところ、フラジェリンが PTI を誘導する活性を有していることを明らかにした (Felix *et al.*, 1999)。さらに、このフラジェリンの中に存在する活性部位についても調べたところ、多様な菌種で配列が高度に保存されている N 末端領域を含む 10 kDa に PTI 誘導活性が存在した。そこで、他の *Pseudomonas* 属や *Escherichia coli*、*Helicobacter mustelae*、*Bacillus subtilis* など様々な菌種のフラジェリンの N 末端領域の中で最も保存された領域に存在する 22 個のアミノ酸 (flg22) を合成しトマトに処理したところ、フラジェリン全長を処理した場合と同様の PTI が誘導された。また、flg22 の N 末端側から 1 アミノ酸ずつ欠損させたペプチドを合成しトマトにおける PTI 誘導活性を調べたところ、7 アミノ酸を欠損させた flg15 までは PTI を誘導したが、7 アミノ酸以上欠損させた flg14-12 では PTI が著しく減少したことから、トマトにおいては flg15-22 までが認識に重要な領域であることを明らかにした (Felix *et al.*, 1999)。興味深いことに、シロイヌナズナに flg15 と flg22 を処理した場合には、flg22 ではイオン流出の他にカロースの沈着や PR タンパク質の蓄積、強い生育阻害、活性酸素の発生などの PTI が誘導されるが、flg15 では非常に弱い PTI しか誘導されなかった (Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez *et al.*, 1999)。さらに、flg15 と flg22 をトマト (*Lycopersicon peruvianum*) とジャガイモ、タバコに対する PTI 誘導活性についても調べたところ、*L. peruvianum* では flg15 と flg22 両方が PTI を誘導したが、ジャガイモとタバコではシロイヌナズナと同様に flg22 は PTI を誘導するが、flg15 は弱い PTI しか誘導しないことが明らかにされた (Felix *et al.*, 1999)。

病原菌に存在する PAMPs としては、Elongation factor Tu (EF-Tu) についても多くの研究が行われている。Kunze らは、フラジェリンを欠損した *Escherichia coli* GI826 菌株をシロイヌナズナに処理した場合に PTI が誘導されることを見いだした。そこで、この菌のフラジェリン欠損株の抽出物から PTI 誘導活性を示すタンパク質を精製したところ、EF-Tu が PTI 誘導分子として同定された (Kunze *et al.*, 2004)。さらに、EF-Tu の認識部位についての研究が開始されたが、EF-Tu の配列は菌種間で高く保存されており、90% 以上の相同性があるものも存在する。そこで、EF-Tu を化学的に分解したペプチドを用いて PTI 活性を測定したとこ

ろ、1-26番目のペプチド断片にPTI誘導活性が認められた。また、*E. coli*のEF-Tuは、N末端のSer残基がN-アセチル化されていることが報告されていたことから (Laursen *et al.*, 1981)、N末端をアセチル化した1-26番目のアミノ酸 (elf26) を合成したところ、アセチル化されていないペプチドより高いPTI誘導活性を示した。また、elf26を2アミノ酸ごと短くしたペプチドを合成し、PTI誘導活性を調べたところ、1-18番目のアミノ酸 (elf18) で構成されるペプチドは活性を有していたが、1-12番目のアミノ酸 (elf12) まで短くしたペプチドでは、elf18のPTI誘導活性を誘導しないどころかEF-TuによるPTI誘導を阻害したことからアンタゴニストとして作用することが明らかになった。さらに、elf26によるPTI誘導活性をシロイヌナズナ以外の多様な植物種で調べたところ、*Brassica alboglabra*や*Sinapis alba*などのアブラナ科においてはPTIを誘導するが、アブラナ科以外のタバコ (*Nicotiana tabacum*) やトマト (*Lycopersicon esculentum*)、ムラサキウマゴヤシ (*Medicago sativa*) などではPTIを誘導しないことが明らかになった (Kunze *et al.*, 2004)。これらのことから、EF-Tuはアブラナ科に特異的なPAMPであることが明らかになった。

近年、フラジェリンやEF-Tuにおいてはflg22やelf18以外の領域にもPTI誘導活性があることが報告された。様々な地域や年代の植物病原細菌*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*のフラジェリン遺伝子の配列を解析したところ、フラジェリン遺伝子に非同義置換の変異を持つ2種類の菌株が明らかになった。その変異のひとつは、シロイヌナズナなどにおいて認識部位となっているflg22領域の39番目のAsnがIleになる変異であったため、この変異flg22を作成しトマトに対するPTI活性を調べたところ、flg22より弱い活性を示した。また、もうひとつの変異はflg22とは異なる領域の96番目のAlaがValになる変異であったため、その周辺の保存された28アミノ酸を合成しトマトに処理したところ、変異を持たないペプチドではPTI誘導活性が認められたが、変異を持つペプチドではPTI誘導活性が減少していることが明らかになった。これらのことから、新たなフラジェリン認識部位として28アミノ酸から成るflgII-28が同定された (Cai *et al.*, 2011)。

また、EF-Tuについても近年、新たな認識部位が同定された。植物病原細菌*Acidovorax avenae* N1141菌株のフラジェリン欠損株の抽出物をイネに処理するとPTIが誘導されたことから、フラジェリン以外の新規PAMPsの存在が示唆された。そこで、この活性物質を同定するために、菌体抽出物から数段階のカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、イネ細胞に対するPTI誘導分子としてEF-Tuが同定された。これまでの研究で、elf18はアブラナ科のみでPTIを誘導することが明らかになっていたため、イネはelf18とは異なる領域を

認識することが示唆された。そこで、イネにおけるEF-Tuの認識部位を探索したところ、中央領域の50アミノ酸が活性部位であることが示された (EFa50)。また、このEFa50をシロイヌナズナに処理したところPTIを誘導しないことから、EFa50はイネ特異的な認識部位であることも示された (Furukawa *et al.*, 2014)。以上の様に、これまで同定されたPAMPには、植物種によっては異なるいくつかの領域を認識することが示され、複数認識領域を持つことが植物免疫に機能するPAMPの特徴であることが明らかになってきた。

植物免疫システムにおいて、PAMPの認識には植物細胞膜表面に存在する Pattern-Recognition Receptors (PRRs) と呼ばれる受容体が関与する場合があることが示されている。シロイヌナズナLa-erのEMS変異体からflg22非感受性株の探索を行なったところ、*Flagellin sensing 2 (FLS2)* という変異体と同定された。さらに、CAPSマーカーを用いたマップベースクローニングによりFLS2遺伝子の同定を試みたところ、FLS2遺伝子は Receptor-like kinase (RLK)をコードすることが明らかになった (Gómez-Gómez and Boller *et al.*, 2000)。FLS2は1,173アミノ酸から成り、細胞外に28個のLeucine-Rich Repeat (LRR) から成るLRRドメインを持ち、細胞内には Serine/Threonineキナーゼドメインを持った一回膜貫通型のLRR-RLKであった。また、このFLS2の細胞外LRRドメインには推定上のN-グリコシル化部位が23カ所存在し、実際この場所にN型糖鎖が付加されていることも明らかになった (Gómez-Gómez and Boller *et al.*, 2000; Chinchilla *et al.*, 2006)。さらに、この糖鎖が付加された細胞外LRRドメインに存在する28個のLRRモチーフをアミノ酸置換した様々な変異受容体を作成したところ、9-15番目のLRRがflg22の認識に寄与することも明らかになった (Dunning *et al.*, 2007)。

FLS2によるflg22の認識後の情報伝達機構についてはシロイヌナズナを用いた研究により多くの知見が得られている。FLS2はflg22と結合後、即座に細胞膜上に存在するFLS2とは異なるLRR-RLKであるBRI1-associated kinase 1 (BAK1) と複合体を形成する。BAK1は、植物ホルモンであるブラシノステロイドの受容体Brassinosteroid-insensitive 1 (BRI1) と相互作用するタンパク質としてすでに同定されていたが、flg22非感受性を示すシロイヌナズナの変異体 (homozygous T-DNA-tagged mutants) のスクリーニングによりflg22認識にも関与することが明らかになった (Li *et al.*, 2002; Chinchilla *et al.*, 2007)。BAK1と同様にFLS2からのflg22認識情報伝達に関与するその他のタンパク質としては、Receptor-like Cytoplasmic Kinase (RLCK) に属するBotrytis-induced kinase 1 (BIK1)、PBS1-like (PBL) タンパク質群、BR-signaling kinase 1 (BSK1) が存在する。BIK1は病原性真菌*Botrytis cinerea*に対する抵抗性

に關与するタンパク質として同定されていたが、シロイヌナズナにおけるPTIシグナルに關与するキナーゼタンパク質を探索するために行われたマイクロアレイ解析により、flg22などのPAMPsによって即座に発現誘導されることからPTIシグナルにも關与することが示された (Veronese *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2010)。BIK1はflg22の有無に關わらずFLS2とBAK1のそれぞれに結合しており、シロイヌナズナの*bik1*変異体 (homozygous T-DNA insertion) ではflg22によるPTIが減少していたことから、BIK1はflg22認識後の情報伝達に關与することが示された (Veronese *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2010)。PBLタンパク質群は、BIK1と同じRLCKサブファミリーVIIに属している。PBL1を含むいくつかのPBLはBIK1と同様の機能を持つことが明らかにされていたことから、*bik1/pbl1* 二重変異体を作成したところ、それぞれの単独変異体よりも低いPTI誘導能を示した。このことから、PBL1はPTI誘導においてBIK1と相加的に作用していることが示唆された (Zhang *et al.*, 2010)。BSK1はブラシノステロイドシグナルに關与するタンパク質としてすでに同定されていたが、シロイヌナズナの病原性真菌*Golovinomyces cichoracerum*に対する抵抗性にも關与することが新たに明らかになった (Tang *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013)。また、*bsk1*変異体 (homozygous T-DNA insertion) は*G. cichoracerum*だけでなく*Pseudomonas syringae*に対しても感受性が増加していたことから、細菌に対する抵抗性にも關与することが示唆された。そこで、FLS2との関連性を調べたところ、FLS2とflg22非依存的に相互作用することが明らかになり、*bsk1*変異体におけるPTIも減少していたことから、認識後の情報伝達に重要であることが明らかにされた (Shi *et al.*, 2013)。このように、FLS2を介したPTI情報伝達には様々な細胞膜、細胞内タンパク質が關与していることが明らかになっている。

FLS2を介したflg22認識情報の細胞内伝達にはタンパク質リン酸化が主に關わっている。flg22認識後、BAK1のSer/Thrキナーゼドメイン (Thr450、Thr455) とBIK1のSer/Thrキナーゼドメイン (Thr237、Tyr243、Tyr250) の自己リン酸化が起こる。その後、BAK1はBIK1のThr237をリン酸化し、BIK1はFLS2のSer/Thrキナーゼドメイン内のSer938とBAK1のThr455をリン酸化する。リン酸化したBIK1はFLS2、BAK1から遊離し下流へ認識情報を伝達することが明らかになっている (Lu *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014)。

flg22認識後のFLS2からのタンパク質リン酸化は、現在のところ二つの経路を通して細胞内に伝達されていると考えられている。PTIには活性酸素発生が含まれているが、この活性酸素はNADPHオキシダーゼのRespiratory burst oxidase homolog (RBOH) によって産生され

ていることが知られている。シロイヌナズナにはRBOH (AtRBOH) が10個存在しており、ヒトのNoxタンパク質と同様にC末端領域にトランスメンブレンドメインとオキシダーゼドメインを持つが、N末端領域にはさらにカルシウムイオンが結合するEF-handモチーフを持つ (Torres and Dangl, 2005; Suzuki *et al.*, 2011; Marino *et al.*, 2012)。flg22処理により誘導される活性酸素発生には、AtRBOHDが関与するが、AtRBOHDはBIK1を介してFLS2やBAK1と相互作用していることも明らかになった (Benschop *et al.*, 2007; Nühse *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Kadota *et al.*, 2014)。さらに、AtRBOHDはBIK1によってN末端領域のSer39、Ser339、Ser343、Ser347がリン酸化され、これらの中で特にSer39とSer343のリン酸化がPTI反応としての活性酸素発生に重要であることが明らかにされた (Kadota *et al.*, 2014)。

flg22の認識情報によるFLS2のタンパク質リン酸化はMitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードも活性化する。以前から病原菌認識後の情報伝達にMAPKが関与することは報告されていた (Ligterink *et al.*, 1999; Romeis *et al.*, 1999; Nühse *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2000)。そこで、シロイヌナズナの5つのMAPK (AtMPK) サブファミリーに含まれる代表的な6個のAtMPKについてflg22依存的なリン酸化を調べたところ、AtMPK3とAtMPK6がflg22依存的にリン酸化されており、このリン酸化はFLS2のキナーゼドメインを不活性化すると消失することが示された。さらにAtMPK3とAtMPK6をリン酸化するMAPKK (AtMKK) を明らかにするために4つのAtMKKサブファミリーからそれぞれ代表的なAtMKKを選択しAtMPK3とAtMPK6に対するリン酸化能を調べたところ、AtMKK4とAtMKK5が特異的にAtMPK3とAtMPK6をリン酸化することが明らかになった。また、AtMKK4とAtMKK5はflg22依存的に発現誘導される*AtWRKY29*と*FRK1*のプロモーターを活性化したことから、FLS2の下流で制御されていることも示された。そこで、AtMKK4とAtMKK5をリン酸化するMAPKKKを探索したところ、恒常活性型のAtMEKK1がAtMKK5を活性化することが示された。このようにflg22認識後のMAPKカスケードには、AtMPK3/6 (MAPK)、AtMKK4/5 (MAPKK)、AtMEKK1 (MAPKKK) が関与していることが明らかにされた (Asai *et al.*, 2002)。

FLS2がflg22を認識後エンドソトーシスにより細胞内に取り込まれることやflg22依存的にFLS2タンパク質量が減少することから、flg22を認識後にFLS2が分解されている可能性が示唆された (Robatzek *et al.*, 2006)。そこで、FLS2と相互作用するBAK1のキナーゼドメインをBaitとしたYeast two-hybridスクリーニングを行ったところ、E3ユビキチンリガーゼであるPUB13 (Plant U-box 13) が同定された (Lu *et al.*, 2011)。PUB13 (ホモログであるPUB12

も同様に) はBAK1とは恒常的に結合しており、flg22依存的にBAK1を介してFLS2と複合体を形成する。また、PUB12/13のE3ユビキチンリガーゼ活性を調べたところ、PUB12/13は自己ユビキチン化能を有しており、FLS2をユビキチン化するがBAK1やBIK1はユビキチン化しないことが示された。さらに、*pub12/13*変異体 (homozygous T-DNA insertion) におけるPTI誘導能への影響を調べたところ、PTIは減少せず、むしろ増強されることが示された。このように、flg22認識後のFLS2を介したPTIシグナルは、FLS2のユビキチン化による分解によって不活性化されることが明らかにされた (Lu *et al.*, 2011)。

筆者の属する研究室ではこれまでに、イネと植物病原細菌 *Acidovorax avenae* を用いて植物における病原菌認識と免疫反応誘導機構について研究を行ってきた。*A. avenae* は主に単子葉植物を宿主とするグラム陰性の植物病原菌で、感染した植物に褐条病を引き起こす原因細菌である。この *A. avenae* の特徴としては、それぞれの菌株間における宿主特異性が非常に厳密であることである。例えば、イネを宿主とする H8301 菌株や K1 菌株はイネ以外の単子葉植物を加害出来ず、シコクビエを宿主とする N1141 菌株はイネを加害出来ない。これまでの研究で、イネに対して非病原性の N1141 菌株をイネに接種すると、PTI や ETI が誘導されるが、イネに対して病原性の K1 菌株や H8301 菌株をイネに接種すると、免疫反応が誘導されないことが明らかにされた (Che *et al.*, 1999)。このような免疫反応誘導の特異性は、イネによるこれらの菌の認識の違いによって制御されている可能性が考えられたので、イネの認識に関与する *A. avenae* の分子の同定が試みられた。まず、非病原性 N1141 菌株に対する抗体を病原性 H8301 菌株で反応、吸収させることによって非病原性 N1141 菌株特異抗体を作製した。同様に病原性 H8301 菌株特異抗体も作製し、両菌株から調製した菌体抽出物に対するウェスタンブロット解析を行った。その結果、非病原性 N1141 菌株特異的抗体は非病原性 N1141 菌株由来の菌体抽出物中に存在する 50 kDa のバンドを認識し、また、病原性 H8301 菌株特異的抗体は病原性 H8301 菌株由来の菌体抽出物中に存在する同程度の大きさのバンドをそれぞれ認識した。このバンドの N 末端アミノ酸配列を解析したところ、*Pseudomonas aeruginosa* や *Salmonella typhimurium* などのグラム陰性細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンの N 末端と高い相同性を示した。そこで、段階的な遠心分離により、両菌株からフラジェリンを精製し、PTI 誘導能について調べたところ、非病原性 N1141 菌株から精製したフラジェリンを処理したイネ培養細胞では、PTI である活性酸素の発生や抵抗性遺伝子の発現誘導が認められたが、病原性 H8301 菌株由来のフラジェリンを処理した培養細胞では、このような PTI 誘導は認められなかった (Che *et al.*,

2000; Tanaka *et al.*, 2003)。これらの結果は、イネが非病原性 N1141 菌株のフラジェリンと病原性 H8301 や K1 菌株のフラジェリンの構造の違いを認識するシステムを有しており、この認識情報によって PTI を誘導していることを示している。

このような非病原性 N1141 菌株と病原性 H8301 菌株や K1 菌株のフラジェリンによる PTI 誘導の相違は、フラジェリンのどのような構造の違いに依存しているかについても研究が行われた。非病原性 N1141 菌株と病原性 K1 菌株のフラジェリンのアミノ酸配列を比較した結果、14 残基のアミノ酸が異なっていた。しかし、両フラジェリンを大腸菌で発現させたところ、両発現フラジェリン共に PTI を誘導したことから、このアミノ酸の違いは認識の特異性に関与しないことが明らかになった (Hirai *et al.*, 2011)。そこで、両菌株のフラジェリンの分子量を MALDI-TOF MS で測定したところ、予想分子量に比べ、非病原性 N1141 菌株のフラジェリンで 1,600、病原性 K1 菌株のフラジェリンで 2,150 大きいことが分かり、この分子量の違いは、両菌株のフラジェリンに存在している糖鎖であることも明らかになった (Che *et al.*, 2000; Hirai *et al.*, 2011)。そこで、両菌株のフラジェリンに存在している糖鎖について研究が行われた。両菌株のフラジェリンには、N 結合型糖鎖が付加するための共通配列が存在しなかった。また、植物病原細菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* のフラジェリンに O 結合型糖鎖が付加されていることから (Taguchi *et al.*, 2006)、*A. avenae* においても O 結合型糖鎖が付加されていることが予想された。そこで、この O 結合型糖鎖を弱アルカリ溶液で化学的に脱離することを試みたが、フラジェリン自体が凝集するなどして成功しなかった。そのため、両菌株について糖鎖を修飾する遺伝子を欠損させた菌株 (糖鎖欠損株) を作製し、糖鎖非存在型フラジェリンを得た。この糖鎖非存在型フラジェリンをトリプシンやアスパラギン酸 N-ペプチダーゼ等で分解し、そのペプチドマッピングなどにより糖鎖付加アミノ酸を同定したところ、非病原性 N1141 菌株では 3 ヶ所 (Ser178、Ser183、Thr351)、病原性 K1 菌株では 4 ヶ所 (Ser178、Ser183、Ser212、Thr351) のアミノ酸に糖鎖が付加されていることが明らかになった。また、病原性 K1 菌株の 4 ヶ所のうち 2 ヶ所 (Ser178、Ser183) の糖鎖付加アミノ酸を置換したフラジェリンをイネ培養細胞に処理したところ、非病原性 N1141 菌株のフラジェリンを処理した場合と同様に PTI を誘導した (Hirai *et al.*, 2011)。この結果から、イネにおいて、病原性 K1 菌株のフラジェリンに付加されている Ser178、Ser183 の糖鎖はイネによるフラジェリン認識を阻害することが示された (Hirai *et al.*, 2011)。

シロイヌナズナ等においてフラジェリンの認識部位として同定されている *flg22* をイネ

培養細胞に処理したところ、弱いPTIしか誘導されなかった (Takai *et al.*, 2008)。また、*A. avenae* のフラジェリン内に存在する **flg22** 部位をもとに作製した **flg22-avenae** をイネ培養細胞に同様に処理した場合においても、同様に弱いPTIしか誘導されなかった (Takai *et al.*, 2008)。このことは、イネにおいては **flg22** とは異なる部位を認識してPTI反応を誘導していることを示している。一方、イネには FLS2 と 45%の相同性を示す *Oryza sativa* FLS2 (OsFLS2) が存在している。そこで、この *OsFLS2* をシロイヌナズナの *fls2* 変異株 (homozygous T-DNA insertion) に導入したところフラジェリン認識能が回復したことから、OsFLS2はFLS2と同様に**flg22**を認識する能力を有することが示された (Takai *et al.*, 2008)。また、OsFLS2の過剰発現イネを作成したところ、このイネは**flg22**を認識してPTI反応を強く誘導することが明らかになった (Takai *et al.*, 2008)。これらの結果は、イネは機能的なOsFLS2を保有しているが、フラジェリンによるPTI誘導においてはOsFLS2が主要な受容体として機能していないことを示唆している。同時に、このことはイネにはフラジェリンの**flg22**以外を認識する機能的な受容体が存在していることを示している。しかし、これまでこの様な受容体については全く知られていないどころか、イネが認識するフラジェリンの**flg22**以外の領域についても知見が得られていない。

そこで本研究では、イネにおけるフラジェリン受容機構の解明を目的とし、イネがフラジェリンのどの領域を認識しているか、さらに認識にはどのような受容体が関与しているかを分子レベルで明らかにすることとした。第1章では、イネにおけるフラジェリンの認識部位の同定を試みた。非病原性N1141菌株由来のフラジェリンの様々な領域を有するフラジェリン断片をイネ培養細胞に処理した場合におけるPTI誘導の有無を調べることで認識部位の同定を行った。また、**flg22**はイネにおいて弱いPTIしか誘導しないが、実際にイネのPTIにどのような影響を与えているかについても調べた。第2章では、イネにおけるフラジェリン受容体の同定と受容機構の解析を試みた。フラジェリンを処理したイネにおけるマイクロアレイや遺伝子挿入破壊株のPTI誘導能を解析することでフラジェリン受容体の同定を試みた。また、ドメインを欠損させた変異体を作製し、PTI誘導能を調べることでフラジェリン認識における機能を解析した。さらに、過剰発現体についても同様に作製し、PTI誘導への影響やフラジェリンとの直接的な相互作用を調べた。また、フラジェリン認識後の情報伝達に関してもリン酸化阻害時のPTI誘導能やMAPKの活性化を調べることで知見を得た。本論文ではこれらの研究によって得られた結果を総合して、イネにおけるフラジェリンの受容機構についても議論する。

第一章

イネに認識されるフラジェリン部位の同定

緒言

植物が認識する PAMP として同定されている鞭毛構成タンパク質のフラジェリンは、7つのドメインから構成されており、N 末端から D0、D1、D2、D3、D2、D1、D0 ドメインに分けられる (Samatey *et al.*, 2001)。鞭毛を構成したときに、鞭毛の内側に存在する N 末端と C 末端の D0、D1 ドメインのアミノ酸配列は様々な菌で保存されているが、鞭毛の外側に露出する D2 ドメイン及び D3 ドメインのアミノ酸配列は種間で大きく異なっている (Wilson and Beveridge, 1993)。これまでにシロイヌナズナなどの様々な植物種においてフラジェリンの認識部位として同定されている flg22 は、N 末端の D0 ドメインに存在する。イネに flg22 や *A. avenae* のフラジェリン配列を基にした flg22-*avenae* を処理した場合には、弱い PTI しか誘導されなかった (Takai *et al.*, 2008)。このことから、イネは *A. avenae* のフラジェリンの flg22 領域を主となる認識部位としておらず、それ以外の領域を主に認識して PTI を誘導していることが示唆された。そこで本章では、大腸菌で作製した発現タンパク質を用いてイネによって認識されるフラジェリン部位の同定を試みた。

第 1 章

方法と材料

1. 植物と細菌の生育条件

イネ培養細胞は、Oc 細胞 (*Oryza sativa* L C5924) を用いた。培養は、R2S 培地で 30°C、光照明下、108 rpm で振盪培養した (Baba *et al.*, 1986)。また、イネ培養細胞は 1 週間ごとに植え継ぎ、実験には植え継ぎ 4 日目の培養細胞を用いた。シロイヌナズナ培養細胞は、T87 細胞 (*Arabidopsis thaliana* Columbia) を用いた。培養は、改変 LS 培地で 23°C、光条件 16 時間/暗条件 8 時間、108 rpm で振盪培養した (Furukawa *et al.*, 2014)。また、シロイヌナズナ培養細胞は 1 週間ごとに植え継ぎ、実験には植え継ぎ 7 日目の培養細胞を用いた。*Acidovorax avenae* N1141 菌株 (MAFF 301141) と K1 菌株 (MAFF 301755) は、以前報告された方法に従って培養を行った (Kadota *et al.*, 1996; Che *et al.*, 2000)。

2. *A. avenae* N1141 菌株由来フラジェリンの精製

フラジェリンは、以前報告された方法を参考に精製した (Che *et al.*, 2000; Hirai *et al.*, 2011)。1.5 L の LB 液体培地に *A. aveae* N1141 菌株を植菌し、30°C、36 時間振盪培養した。培養液を 6,000 × g、4°C で 30 分間遠心分離し菌体を回収した。菌体を TBS に懸濁後、6,000 × g、4°C で 30 分間遠心分離し菌体の洗浄を行った。回収した菌体に氷冷 TBS を 20 ml 加えて懸濁し、氷冷したミキサーへ移した後、1 分間破碎し、5 分間氷上で静置した。この操作を 7 回繰り返した。破碎物を 6,000 × g、4°C、30 分間、遠心分離した後、上清を再度 16,000 × g、4°C、60 分間、遠心分離することで細胞の残骸など取り除いた。上清を 182,000 × g、4°C で 60 分間遠心分離し、沈殿物を回収した。沈殿物を、滅菌水に懸濁し、20,000 × g、4°C で 20 分間遠心し、上清をフラジェリン画分として回収した。フラジェリン画分は 1 mg/ml となるように希釈し -80°C で凍結保存した。

3. プラスミド

pOsWRKY70-luc レポータープラスミドと His-tag 融合フラジェリン発現用 *pET28b-Fla* プラスミドは以前報告されたものを使用した (Takai *et al.*, 2007, Hirai *et al.*, 2011)。

GST-tag を融合した ND0-2、ND2-CD2、CD2-0 を発現するプラスミド作製するために、*pET28b-Fla* プラスミドをテンプレートとして、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン遺伝子内の ND0-2 領域を *Bam*HI サイトが付加した特異的なプライマーセットで、ND2-CD2、CD2-0 領域を *Eco*RI サイトが付加した特異的なプライマーセットでそれぞれ増幅した (KOD FX, TOYOBO 使用)。増幅産物をそれぞれ *Zero-Blunt* ベクター (*Zero Blunt*[®] PCR Cloning Kit, Invitrogen) へライゲーション後、大腸菌 DH5 α へ形質転換した。

PCR 反応液		PCR 反応条件	
2 × buffer for KOD-FX	25 μ l	94°C	2 min
dNTP (2 mM each)	10 μ l	98°C	10 sec
Primer F (10 μ M)	1.5 μ l	55°C	30 sec
Primer R (10 μ M)	1.5 μ l	68°C	1 min/kb
KOD-FX polymerase	1 μ l	4°C	∞
Sterile Water	10 μ l		
<i>pET28b-Fla</i> (100 pg/ μ l)	1 μ l	30 × [98°C+55°C+68°C]	
Total vol.	50 μ l		

Ligation 反応液	
pCR [®] -Blunt (25 ng)	1 μ l
PCR product	1-5 μ l
5 × ExpressLink [™] T4 DNA Ligase Buffer	2 μ l
Sterile Water	1-5 μ l
ExpressLink [™] T4 DNA Ligase (5 units)	1 μ l
Total vol.	10 μ l

作製した *Zero-Blunt-ND0-2* を *Bam*HI で、*Zero-Blunt-ND2-CD2* と *-CD2-0* を *Eco*RI で制限酵素処理し、同様に処理した発現用 *pGEX6P-3* ベクター (GE Healthcare) へそれぞれライゲーション後、大腸菌 DH5 α へ形質転換した (*pGEX6P-3-ND0-2*、*-ND2-CD2*、*-CD2-0*)。

Ligation 反応液	
pCR [®] -Blunt (25 ng)	1 µl
PCR product	1 µl
5 × ExpressLink [™] T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
Sterile Water	5 µl
ExpressLink [™] T4 DNA Ligase (5 units)	1 µl
Total vol.	10 µl

GST-tag を融合した CD2-1、CD1-0、CD2-1ΔN50、CD2-1ΔN66、CD2-1ΔN80、CD2-1ΔN90、CD2-1ΔN109、CD2-1ΔC30、CD2-1ΔC40 を発現するプラスミド作製するために、*pGEX6P-3-CD2-0* をテンプレートとし、それぞれの特異的なプライマーセットを用いて Inverse PCR を行った (KOD -Plus- Mutagenesis Kit, Takara bio Inc.)。PCR 反応液に *DpnI* を加え、37°C で 1 時間反応させることで、テンプレートプラスミドの消化を行った後 (KOD -Plus- Mutagenesis Kit)、PCR 産物を 16°C で 1 時間セルフライゲーションさせ、大腸菌 DH5α へ形質転換した (*pGEX6P-3-CD2-1*、*-CD1-0*、*-CD2-1ΔN50*、*-CD2-1ΔN66*、*-CD2-1ΔN80*、*-CD2-1ΔN90*、*-CD2-1ΔN109*、*-CD2-1ΔC30*、*-CD2-1ΔC40*)。

Inverse PCR 反応液		Inverse PCR 反応条件	
10 × buffer for iPCR	5 µl	94°C	2 min
2 mM dNTPs	5 µl	98°C	10 sec
Primer F (10 µM)	1.5 µl	68°C	1 min/kb
Primer R (10 µM)	1.5 µl	4°C	∞
KOD -Plus-	1 µl	1 cycle/kb × [98°C+68°C]	
Sterile Water	35 µl		
<i>pGEX6P-3-CD2-0</i> (50 ng/µl)	1 µl		
Total vol.	50 µl		

Self-ligation 反応液	
PCR product (<i>DpnI</i> treated)	2 μ l
Ligation high	5 μ l
T4 Polynucleotide Kinase	1 μ l
Sterile Water	7 μ l
Total vol.	15 μ l

OsFLS2-RNAi 抑制形質転換体を作製するベクターを作るために、*OsFLS2* cDNA をテンプレートとし、*OsFLS2* mRNA の 325 bp を増幅する特異的なプライマーセットにより PCR を行った(KOD FX 使用)。PCR 産物をエントリーベクターである *pENTR D-TOPO* (Invitrogen) へ TOPO[®] Cloning で導入した。作製した *pENTR-OsFLS2 RNAi* を LR clonase 反応により *OsFLS2* mRNA の 325 bp を含む領域を double strands RNA 発現用 *pANDA* ベクターへ導入した (*pANDA-OsFLS2*) (Kaneda *et al.*, 2009)。

PCR 反応液		PCR 反応条件	
2 \times buffer for KOD-FX	25 μ l	94°C	2 min
dNTP (2 mM each)	10 μ l	98°C	10 sec
Primer F (10 μ M)	1.5 μ l	55°C	30 sec
Primer R (10 μ M)	1.5 μ l	68°C	1 min/kb
KOD-FX polymerase	1 μ l	4°C	∞
Sterile Water	10 μ l		
<i>OsFLS2</i> cDNA (100 pg/ μ l)	1 μ l	30 \times [98°C+55°C+68°C]	
Total vol.	50 μ l		

TOPO [®] Cloning 反応液		LR clonase 反応液	
PCR product	0.5 μ l	<i>pENTR-OsFLS2 RNAi</i> (50 ng/ μ l)	1 μ l
Salt Solution	1 μ l	<i>pANDA</i> (150 ng/ μ l)	1 μ l
Sterile Water	3.5 μ l	TE buffer (pH8.0)	6 μ l
<i>pENTR D-TOPO</i>	1 μ l	Total vol.	8 μ l
Total vol.	6 μ l		

【Primer sets】

Primer		Sequence
ND0-2	F	ggatccATGGCATCCACCATCAACACC
	R	ggatccGCCGAGCCGGCCGTG
ND2-CD2	F	gaattcGGCCACCGGCGCGGCCAC
	R	gaattcTCCGTCCACGGTGGACACGTCGATG
CD2-0	F	gaattcCGACGTGTCCTCGCAGACC
	R	gaattcACGCAGCAGGGACAGCAC
CD2-1	F	GAATTCCC GGGTCGACTCGAGCGGC
	R	GCGGCTGCGCGAGGCGGACATGTTC
CD1-0	F	GGAATTCGGGGATCCCAGGGG
	R	TCGACCAAGGCCTTGAAGATCATCG
CD2-1 Δ N50	F	ACGCAGTCTTCGGGCACGCTGACGT
	R	GGAATTCGGGGATCCCAGGGGCCCC
CD2-1 Δ N66	F	ACCGGCGTCACCGTGGCCTCGCGC
	R	GGAATTCGGGGATCCCAGGGGCCCC
CD2-1 Δ N80	F	TCCGACAAGGGTTACACCGTGAGCGG
	R	GGAATTCGGGGATCCCAGGGGCCCC
CD2-1 Δ N90	F	GGCGGCACCATGACGAACGCCACG
	R	GGAATTCGGGGATCCCAGGGGCCCC
CD2-1 Δ N109	F	ATCGACGTGTCCACCGTGGAC
	R	GGAATTCGGGGATCCCAGGGGCCCC

CD2-1	F	TGAGAATTCCC CGGGT CGACTCGAGCGGC
ΔC30	R	TCGCTGGCCGTTGACGGCCG
CD2-1	F	TGAGAATTCCC CGGGT CGACTCGAG
ΔC40	R	ATCGATGATCTTCAAGGCCTTGGTC
OsFLS2	F	<u>CACCT</u> GGACCCCCGCATGAAGGTC
RNAi	R	CCTCATCAATGGAGAAAGTTCGCAATGC

小文字は制限酵素サイトを示し、二重線は TOPO クローニングサイトを示す。

4. 発現タンパク質の精製

His-tag 融合フラジェリン (Fla-His) を作成するために、*pET28b-Fla* を保持した BL21 (DE3) を LB 培地で 37°C、16 時間前培養を行った。前培養液を本培養の LB 培地の 1/1000 量加え、OD₆₀₀=0.3-0.4 になるまで 37°C で培養を行った。その後、isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) が終濃度 0.5 mM となるように LB 培地へ添加した後、15°C、18 時間培養した。培養液を 7,000 × g、4°C、15 分間遠心分離し菌体を回収した。菌体を PBS に懸濁後、同様の条件で遠心分離し菌体を洗浄した。回収した菌体を PBS に懸濁後、クラッシュアイスで氷冷しながら超音波破碎機 (UD-201, TOMY) で 30 秒間破碎し、1 分間静置した。この操作を 10 回繰り返した後、破碎物を 15,300 × g、4°C、30 分間の遠心分離により細胞の残骸など取り除き上清を回収した。Lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) で平衡化した 1 ml の Ni-NTA Agarose (Qiagen) に回収した上清画分を添加し、4°C で一晩吸着させた。500 × g、4°C で 5 分間遠心分離後、上清を取り除き担体の 5 倍量の Wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) で洗浄した。500 × g、4°C で 5 分間遠心分離後、上清を取り除き担体の 3 倍量の Elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) で溶出を行った。精製した Fla-His 画分を Amicon Ultra 10K (Merck Millipore) により限外濾過を行い、脱塩と濃縮を行った。精製した Fla-His 画分は、1 mg/ml となるように希釈し-80°C で凍結保存した。

GST-tag 融合タンパク質を作成するために、*pGEX6P-3* 発現用ベクター (*pGEX6P-3-ND0-2*、*-ND2-CD2*、*-CD2-0*、*-CD2-1*、*-CD1-0*、*-CD2-ΔN50*、*-CD2-ΔN66*、*-CD2-ΔN80*、*-CD2-ΔN90*、*-CD2-ΔN109*、*-CD2-ΔC30*、*-CD2-ΔC40*) を保持した BL21 (DE3) を Fla-His の場合と同様の条件で培養し、菌体回収、破碎、破碎上清の回収を行った。菌体の洗浄と破碎には PBS を用いた。破碎上清を 22 μm フィルターで濾過後、PBS で平衡化した GSTrap™

FF (5 ml, GE Healthcare) に 4°C で一晩吸着させた。担体の 5 倍量の PBS で洗浄後、担体の 3 倍量の PreScission Protease buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH7.5) で平衡化を行った。PreScission Protease (GE Healthcare) を GST 融合タンパク質 100 µg あたり 2 unit 添加し 4°C で 16 時間消化を行った。上清を回収し Amicon Ultra 10K により限外濾過を行い、脱塩と濃縮を行った。精製した目的タンパク質画分は、1 mg/ml となるように希釈し -80°C で凍結保存した。

5. オリゴペプチド

flg22 (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA) と flg22-*avenae* (QRLSSGLRINSAKDDAAGLAI S) は Eurofins Genomics K.K. または Sigma-Aldrich Japan に合成量 20 mg で合成を依頼した。作成された各オリゴペプチドは、HPLC で 95% 以上になるように精製することで、実験に用いた。

6. 活性酸素の定量

培養細胞の培地中における活性酸素 (H_2O_2) は、フェリシアン化物の触媒によるルミノールの酸化で起こる化学発光を基にした方法で定量した (Schwacke and Hager, 1992)。イネまたはシロイヌナズナ培養細胞 10 mg を 500 µl の新しい培地へ移し 30°C または 23°C で光照明下、2 時間プレインキュベートした。その後、エリシターを各濃度になるように添加した。エリシターを添加後、培地 10 µl に 1.1 mM ルミノールを 10 µl、50 mM KH_2PO_4 (pH 7.9)・14 mM $K_3 [Fe (CN)_6]$ を 180 µl 加え、混合液の化学発光量 (10 秒間) を PHELIOS (AB-2350, ATTO) を使用して経時的に測定した。

7. Total RNA 抽出と定量的リアルタイム RT-PCR

イネ total RNA はイネ培養細胞 (50-100 mg) から RNeasy plant mini kit (Qigaen) を用いて、記載された DNase 消化を同時に行う方法に従って抽出した。

qRT-PCR は、GoTaq One-Step RT-qPCR kit (Promega) を使用して Opticon 2 instrument (Bio-Rad) で行った。SYBR[®] Green の蛍光値から得られた増幅曲線データより、指数関数的増幅域に閾値 (Threshold) を設定し、閾値と増幅曲線が交差する点を Ct 値 (Threshold Cycle) として算出した。

qRT-PCR 反応液		qRT-PCR 反応条件	
2 × GoTaq [®] Master Mix	10 μl	37°C	15 min
Primer F (10 μM)	0.2 μl	95°C	10 min
Primer R (10 μM)	0.2 μl	95°C	10 sec
50 × GoScript [™] RT Mix for 1-Step RT-qPCR	0.4 μl	60°C	30 sec
Nuclease-Free water	7.2 μl	72°C	30 sec
Total RNA (50 ng/μl)	2 μl	40 × [95°C+60°C+72°C]	
Total vol.	20 μl		

【qRT-PCR 用 Primer sets】

Primer		Sequence
OsWRKY70	F	GTTTCATTTGTTTCGGAGGCC
	R	TTCTCCCTATACGCCCTCTGTG
PBZ1	F	ATGGACGCGTCCACTTTGCC
	R	ATGACTTGCGGCGTCGCAC
Cht-1	F	AACATCATCAACGGCGGCGT
	R	GCTAGAACGAGCTATTAGGAGTT
PAL	F	ACATCTACGGCGTCACCAC
	R	GAAGATTCCGGCGTTGAG
OsFLS2	F	GCGACGTCAAGCCGTCCAAC
	R	CGACACCGTCCTCATGTACGCGAA
25S rRNA	F	AAGGCCGAAGAGGAGAAAGGT
	R	CGTCCCTTAGGATCGGCTTAC

8. OsFLS2-RNAi 抑制形質転換体の作製

pANDA-OsFLS2 ベクターをエレクトロポレーションにより *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 菌株へ導入した。イネ (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Kinmaze) へのアグロバクテリアを介した形質転換は、以前報告された方法を参考に行った (Takai *et al.*, 2008)。滅菌処理を行ったイネの種子をカルス誘導培地 (N6D 培地) に置床し、30°C、光照明下で3週

間、カルスを誘導した。胚由来のカルスを前培養培地 (MS 培地) へ移し 30°C、光照明下で 3 日間培養した。p*ANDA-OsFLS2* を保持した *A. tumefaciens* EHA105 菌株を AB 培地に植菌し 22°C、暗黒化で 3 日間培養した。培養した *A. tumefaciens* EHA105 菌株を MSL (40 µg/ml Acetosyringone) に OD₆₀₀=0.02-0.04 となるように懸濁後、前培養したカルスと混合し 5 分間静置後、感染培地へ移し、22°C、暗黒化で 3 日間培養した。感染させたカルスを滅菌水 (250 µg/ml Claforan) で洗浄後、1 次選抜培地 (MS 培地) へ移し、30°C、光照明下で 3 週間培養した。1 次選抜培地上で生育が認められるカルスを 2 次選抜培地 (R2R 培地) に移し 30°C、光照明下で 2 週間培養した。この様な 2 次選抜は 2 回行った。2 次選抜培地上で生育が認められるカルスを Oc 細胞と同様の方法で培養細胞化を行い実験に用いた。

9. イネプロトプラストの単離と一過的形質転換

イネプロトプラストの単離は以前報告された方法を参考に行った (Takai *et al.*, 2007)。イネ培養細胞に Enzyme Solution (1% (w/v) cellulose “Onozuka” RS, 0.5% (w/v), macerozyme R10, 0.1% (w/v), pectolyase Y23, 0.6 M mannitol, 5 mM MES-KOH (pH5.7), 10mM CaCl₂) を加え、30°C、遮光条件で 3 時間静置し酵素処理を行った。酵素処理したイネ培養細胞を 100 µm セルストレイナーで濾過し、130 × g、室温で 3 分間遠心分離することでイネプロトプラストを回収した。回収したイネプロトプラストに KMC Solution (117 mM KCl, 82 mM MgCl₂, 85 mM CaCl₂) を加え穏やかに懸濁し、130 × g、室温で 3 分間遠心分離することで洗浄した。この操作を 2 回行った。KMC Solution を取り除いた後、MMg solution (0.3 M manitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES-KOH, pH5.7) に懸濁し細胞密度を計測した。

イネプロトプラストへの一過的な形質転換は、以前報告された方法を参考に行った (Takai *et al.*, 2007)。単離したイネプロトプラストを 2×10^5 cells/ml となるように MMg solution に懸濁した。0.2 ml (4×10^4 cells) のイネプロトプラスト溶液に 2.5 µg のプラスミドと 0.21 ml の PEG solution (0.2 M manitol, 100 mM CaCl₂, 40% PEG 4000) を加え、穏やかに懸濁後、室温で 30 分間インキュベートした。その後、0.8 ml の KMC solution (117 mM KCl, 82 mM MgCl₂, 85 mM CaCl₂) を加え混合し、200 × g、室温で 5 分間遠心分離を行った。上清を取り除き 100 µl の KMC solution を加え、30°C、遮光条件で 16 時間静置した。

10. レポーターアッセイ

イネプロトプラストを用いたレポーターアッセイは以前報告された方法を参考に行った

(Takai *et al.*, 2008)。レポータールシフェラーゼプラスミド (*pOsWRKY70-luc*, Firefly luciferase) を導入したイネプロトプラストにエリシターを終濃度 500 nM となうように処理し、30°C、遮光条件で5時間インキュベートした。イネプロトプラストを 200 × g、室温で5分間遠心分離により回収し上清を取り除いた後、50 μl の 1 × Passive lysis buffer (Dual-Luciferase[®] reporter assay system, Promega) を加え、室温で10分間インキュベートした。20 μl のイネプロトプラスト溶解液と 25 μl の Luciferase assay reagent II (beetle luciferin, Dual-Luciferase[®] reporter assay system) を混合し、PHELIOS を用いてルシフェラーゼ発光の定量を行った。

11. カロースの検出

カロースの検出は、以前報告された方法を参考に行った (Furukawa *et al.*, 2014)。イネまたはシロイヌナズナ培養細胞 10 mg を 1 ml の新しい培地へ移し 30°C または 23°C で光照明下、3時間プレインキュベートした。その後、エリシターを終濃度 200 nM となるように処理し、30°C または 23°C で 16 時間インキュベートした。培養細胞を 100 mM potassium phosphate buffer (pH8.0) で3回洗浄し、Farmer's 固定液を添加後、室温で1時間固定化した。固定化後、100 mM potassium phosphate buffer (pH8.0) で3回洗浄し、0.1% Aniline blue を含む 100 mM potassium phosphate buffer (pH8.0) で4時間染色を行った。染色後、100 mM potassium phosphate buffer (pH8.0) で3回洗浄し、沈着したカロースを蛍光顕微鏡 BX51 (OLYMPUS) で観察した。

12. マイクロアレイ解析

マイクロアレイは、以前報告された方法を参考に行った (Furukawa *et al.*, 2014)。イネ培養細胞に終濃度 300 nM となるように CD2-0 を処理し、0、1、3、6 時間後の細胞から total RNA を抽出した。抽出した total RNA を Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて Cy3 標識 cDNA を合成し、RNeasy Mini Kit を用いて Cy3 標識 cDNA を精製した。精製した Cy3 標識 cDNA を Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用いて Rice Expression Microarray, 4 × 44K マイクロアレイスライド (Agilent Technologies) に 65°C で 17 時間ハイブリダイゼーションした。反応後、Gene Expression Wash Pack (Agilent Technologies) を用いてマイクロアレイスライドを洗浄した。マイクロアレイスライドは Scan Array 4000XL (GSI Lumomics) でスキャンし、得られたデータは GeneSpring 12.6

(Agilent Technologies) で解析した。

13. イネ植物体への細菌接種

イネ植物体への各植物病原細菌の接種は、以前報告された方法を参考に行った (Furukawa *et al.*, 2014)。培養した *A. avenae* N1141 菌株と K1 菌株を滅菌水に 2×10^9 Colony-forming unit (CFU)/ml となるように希釈し、等量の CD2-0 と混合した。混合液 1 μ l (10^6 CFU + 20 μ M CD2-0) を $\phi 22$ の針で 4 週間生育させたイネ植物体 (*Oryza sativa* L. Nipponbare) へ針接種した。接種したイネは明期 16 時間 (30°C) /暗期 8 時間 (25°C) で生育させた。接種 3、7、10 日後に接種部位から下部 2 cm、上部 8 cm の全長 10 cm を切り取り、葉表面をアルコールで滅菌後、磨砕し滅菌水に懸濁した。懸濁液を希釈し *Pseudomonas* F 固体培地に植菌後、30°C で 24 時間培養し、生育したコロニー数を測定することで菌体数を算出した。

第 1 章

結果

1. 発現フラジェリンの PTI 誘導活性

イネが認識するフラジェリン部位を同定するために、大腸菌で作製した発現フラジェリン部分タンパク質を作成することにした。まず、大腸菌で作製した発現 N1141 フラジェリンが *A. avenae* N1141 菌株から精製したフラジェリンと同様に PTI を誘導するかどうかについて調べることにした。C 末端に 6×His-tag を融合した発現 N1141 フラジェリンと N1141 菌体から精製した精製 N1141 フラジェリンを SDS-PAGE で分析したところ、両者ともほぼ単一バンドであり (data not shown)、高度に精製されていたことが明らかとなったため、以降の実験に用いた。

まず、早期の PTI 反応である活性酸素の発生について調べた。N1141 菌株から精製したフラジェリンと大腸菌で発現させたフラジェリンを各 200 nM になるようにイネ培養細胞に加え、発生する活性酸素量についてルミノールを用いた化学発光で測定したところ、発現 N1141 フラジェリンを処理したイネ培養細胞は精製 N1141 フラジェリンを処理したイネ培養細胞と同様に、処理後 30 分で活性酸素の発生が認められ、1 時間で最大値を示した後、処理後 3 時間にかけて活性酸素量が緩やかに減少することが示された (Fig. 1-1)。次に、両フラジェリンによる濃度依存的な活性酸素発生について調べたところ、発現 N1141 フラジェリンは濃度依存的に活性酸素発生量が増加し、200 nM 処理で活性酸素発生量が最大に達した (Fig. 1-2)。また、このときの half-maximal effective concentration (EC₅₀) を算出したところ、発現 N1141 フラジェリンの EC₅₀ は 26.3 nM であった (Fig. 1-2)。一方、精製 N1141 フラジェリンでは、400 nM 処理まで濃度依存的な活性酸素発生が認められたが、800 nM 処理から活性酸素発生量の減少が認められ、5 μM 処理ではほとんど活性酸素発生が認められなかった (Fig. 1-2)。このとき、最大活性濃度を 400 nM とした場合、精製 N1141 フラジェリンの EC₅₀ は 63.3 nM となった (Fig. 1-2)。

次に、フラジェリンにより誘導される PTI 関連遺伝子の発現について調べた。500 nM の発現 N1141 フラジェリンまたは精製 N1141 フラジェリンを処理したイネ培養細胞における、フラジェリンによって発現誘導される転写因子をコードする *OsWRKY70* (Takai *et al.*, 2007)、

キチナーゼをコードする *OsCht-I* (Tanaka *et al.*, 2003)、プロベナゾールによって誘導されるタンパク質をコードする *PBZI* (Nakashita *et al.*, 2001) の発現量を qRT-PCR により定量した。その結果、発現 N1141 フラジェリンを処理したイネ培養細胞の *OsWRKY70* の発現は、処理 1 時間後に 70 倍まで発現上昇し 3 時間後には 20 倍、6 時間後には 10 倍と緩やかな発現の減少を示し、精製 N1141 フラジェリン処理したイネ培養細胞と同様の発現パターンを示した (Fig. 1-3)。また、*OsCht-I* の発現は、処理 1 時間後に 10 倍、3 時間後に 40 倍、6 時間後に 60 倍と緩やかな発現上昇を示し、やはり精製 N1141 フラジェリン処理したイネ培養細胞と同様の発現パターンを示した (Fig. 1-3)。さらに、*PBZI* の発現は、処理 1 時間後ではほとんど発現の上昇は認められないが、3 時間後から 200 倍、6 時間後には 300 倍と比較的後期に発現上昇が認められ、これもまた精製 N1141 フラジェリン処理したイネ培養細胞と同様の発現パターンを示した (Fig. 1-3)。

さらに、PTI 反応のひとつであるカロース沈着についても調べた (Luna *et al.*, 2011)。200 nM の発現 N1141 フラジェリンまたは精製 N1141 フラジェリンをイネ培養細胞に処理し、処理 16 時間後のイネ培養細胞をアニリンブルーにより染色することでカロースの沈着を観察した。その結果、発現フラジェリンと精製フラジェリンのどちらを処理したイネ培養細胞においても明らかなカロースの沈着が認められた。一方、コントロールとして水を処理したイネ培養細胞においては、このようなカロースの沈着は認められなかった (Fig. 1-4)。

これらの結果から、発現 N1141 フラジェリンは精製 N1141 フラジェリンと同様にイネにおいて PAMP として機能することが明らかになった。

2. N1141 フラジェリンにより誘導されるイネ PTI への *flg22* の関与

これまでにシロイヌナズナなどでフラジェリンの認識部位として同定されている *flg22* が N1141 フラジェリンにより誘導されるイネ PTI にどのように関与しているかを調べた。

まず、*flg22* または *A. avenae* N1141 菌株の *flg22* 領域を基に合成した *flg22-avenae* をイネ培養細胞に 200 nM 処理した場合の活性酸素の発生を調べた。発現 N1141 フラジェリンをイネ培養細胞に処理した場合は、処理後 0.5 時間でコントロールである水の 40 倍程度まで活性酸素発生が認められるのに対し、*flg22* または *flg22-avenae* を処理したイネ培養細胞は、弱い活性酸素発生が認められるもののコントロールである水の 10 倍にも満たない程度であった (Fig. 1-5)。また、PTI 関連遺伝子である *OsWRKY70*、*OsCht-I*、*PBZI* の発現誘導についても qRT-PCR で測定したところ、500 nM の *flg22* を処理したイネ培養細胞では、処

理 1 時間後から 6 時間後までこれら PTI 関連遺伝子の発現誘導がほとんど認められなかった (Fig. 1-6)。この結果から、N1141 フラジェリンにより誘導されるイネ PTI は、*flg22* とは異なる領域をイネが認識して引き起こされていることが明らかになった。

次に、フラジェリンの *flg22* 以外の領域により誘導されているイネ PTI に *flg22* が実際に関与するのかどうかを調べるために、10 μ M の *flg22* 存在下で様々な濃度の発現 N1141 フラジェリンをイネ培養細胞に処理した場合の活性酸素の発生を調べた。その結果、10 μ M の *flg22* 存在下で発現 N1141 フラジェリンを処理した場合、*flg22* 非存在下で発現 N1141 フラジェリンを処理した場合と同様に、濃度依存的に活性酸素発生量が増加し 800 nM 処理で活性酸素発生量が最大に達した (Fig. 1-7)。また、フラジェリンの 1 nM 処理や 10 nM 処理など低濃度における活性酸素発生量においても *flg22* 存在下または非存在下で違いが認められなかった (Fig. 1-7)。さらに、*flg22* 存在下と非存在下におけるフラジェリンの EC₅₀ についても両者間で有意な差は認められなかった (data not shown)。

この結果から *flg22* は N1141 フラジェリンのイネにおける PTI 誘導活性に対して、アンタゴニストやアゴニストとして作用しないことが明らかになった。

3. イネのフラジェリン認識における OsFLS2 の関与

イネには、シロイヌナズナ *flg22* 受容体である FLS2 のホモログである OsFLS2 が存在する。この OsFLS2 は、シロイヌナズナの *fls2* 変異体の *flg22* 依存的な PTI 誘導能を相補することから、*flg22* の受容体として機能することが示唆されている (Takai *et al.*, 2008)。そこで、N1141 フラジェリンにより誘導されるイネ PTI に OsFLS2 が関与するか調べた。

まず、OsFLS2 の RNAi 抑制形質転換体の作製を行った。OsFLS2 cDNA の 3'UTR を含む 325 bp の Double stranded RNA を産生するコンストラクトをイネに導入し、これらの導入遺伝子を持つ 2 つの培養細胞ラインを確立した (OsFLS2 RNAi-2、OsFLS2 RNAi-3)。また、コントロールとしてベクターのみを導入した 1 つのラインも確立した (Control)。qRT-PCR により各形質転換体の OsFLS2 の発現量を定量したところ、OsFLS2 RNAi-2 における OsFLS2 発現量は Control の 7%で、OsFLS2 RNAi-3 における OsFLS2 発現量は Control の 2%であり、両ラインとも OsFLS2 の発現量が著しく減少していた (Fig. 1-8)。

そこで次に、これら OsFLS2-RNAi 抑制形質転換体におけるフラジェリン認識による PTI 誘導について調べた。300 nM の精製 N1141 フラジェリンを処理した OsFLS2 RNAi-2 と OsFLS2 RNAi-3 における活性酸素発生量を定量したところ、処理 0.5 時間後に Control 株、

OsFLS2 RNAi-2、*OsFLS2* RNAi-3 共に約 5 μ M であり、処理 1 時間後には Control 株で約 7 μ M、*OsFLS2* RNAi-2 で 8 μ M、*OsFLS2* RNAi-3 で 10 μ M であった (Fig. 1-9)。このことから、*OsFLS2* RNAi-2 と *OsFLS2* RNAi-3 においては Control と同様にフラジェリン処理により活性酸素が発生することが示された。また、精製 N1141 フラジェリンにより発現誘導されファイトアレキシン生合成に関与する酵素である *Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* (Zhu *et al.*, 1995; Tanaka *et al.* 2003) の発現量を qRT-PCR により定量したところ、500 nM の精製 N1141 フラジェリンを処理した *OsFLS2* RNAi-2 と *OsFLS2* RNAi-3 は、Control に 500 nM の精製 N1141 フラジェリンを処理した場合と同様に、処理 3 時間後に発現量が処理前の 3 倍まで増加していた (Fig. 1-10)。

これらの結果から、*OsFLS2* はフラジェリンにより誘導される PTI にはほとんど関与しないことが明らかになった。

4. イネが認識する N1141 フラジェリン部位の同定

これまでの結果から、イネは *flg22* 以外の部位を *OsFLS2* 以外の受容体を介して認識することで PTI を誘導していることが示された。そこで、イネが認識する N1141 フラジェリン部位の同定を試みた。

フラジェリンは、N 末端から D0、D1、D2、D3、D2、D1、D0 の 7 つのドメインから構成されている (Samatey *et al.*, 2001; Yonekura *et al.*, 2003)。そこで、N1141 フラジェリンの N 末端領域の D0、D1、D2 ドメインから成る ND0-2、中央領域の D2、D3、D2 ドメインから成る ND2-CD2、C 末端領域の D2、D1、D0 ドメインから成る CD2-0 タンパク質の N 末端に GST-tag を融合し、大腸菌で発現させた。GST-tag を融合した目的タンパク質をアフィニティーカラムに吸着後、各タンパク質と GST-tag の間を特異的に切断するプロテアーゼにより消化を行うことで目的タンパク質のみを溶出した。精製度を SDS-PAGE より確認したところ、ほぼ単一バンドであり、それぞれのペプチド断片は高度に精製されていた (data not shown)。精製した ND0-2、ND2-CD2、CD2-0 をイネ培養細胞に 300 nM になるように処理し、処理 1 時間後の活性酸素の発生を PTI 誘導活性の指標として調べた。その結果、CD2-0 を処理したイネ培養細胞において精製 N1141 フラジェリンを処理したイネ培養細胞と同様にコントロールである水処理の 7 倍程度の活性酸素発生が認められた (Fig. 1-11)。一方、ND0-2 や ND2-CD2 を処理したイネ培養細胞では、*flg22* 処理したイネ培養細胞と同様にほとんど活性酸素発生が認められなかった (Fig. 1-11)。

次に、活性酸素発生が認められた CD2-0 領域のどのドメインに認識部位が存在するかを明らかにするために、CD2-0 の D0 ドメインまたは D2 ドメイン欠損させた CD2-1 と CD1-0 タンパク質を CD2-0 と同様に GST-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させた。発現を確認したところ、CD2-1 については発現が認められたが CD1-0 は発現が認められなかった (data not shown)。そのため、発現が認められた CD2-1 を CD2-0 と同様の方法で精製を行った。精製度を SDS-PAGE より確認したところ、ほぼ単一バンドであり高度に精製されていた (data not shown)。精製した CD2-1 をイネ培養細胞に 300 nM 処理し、処理 1 時間後の活性酸素の発生を調べたところ、CD2-1 を処理したイネ培養細胞は CD2-0 を処理したイネ培養細胞と同様にコントロールである水処理の約 7.5 倍程度の活性酸素発生が認められた (Fig. 1-11)。

CD2-1 にも PAMP としての活性があることがわかったので、次に、CD2-1 領域内に存在する認識部位調べた。CD2-1 の N 末端側 50 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ N50、66 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ N66、80 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ N80、90 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ N90、109 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ N109、また、C 末端側 30 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ C30 と 40 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ C40 を CD2-0 と同様に GST-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させたところ、すべてのタンパク質において発現が認められたため、CD2-0 と同様の方法で精製を行った。精製した CD2-1 Δ N50、CD2-1 Δ N66、CD2-1 Δ N80、CD2-1 Δ N90、CD2-1 Δ N109、CD2-1 Δ C30、CD2-1 Δ C40 をイネ培養細胞に 200 nM になるように処理し、処理 1 時間後の活性酸素の発生を調べた。その結果、CD2-1 Δ N50、CD2-1 Δ N66、CD2-1 Δ N80、CD2-1 Δ N90、CD2-1 Δ C30 を処理したイネ培養細胞は、CD2-1 を処理したイネ培養細胞と同様にコントロールである水処理の 30 倍程度の活性酸素発生が認められた (Fig. 1-12)。一方、CD2-1 Δ N109 と CD2-1 Δ C40 を処理したイネ培養細胞では、CD2-1 を処理したイネ培養細胞と比較して著しい活性酸素発生量の減少が認められた (Fig. 1-12)。そこで次に、CD2-1 の N 末端側 80 または 90 アミノ酸と C 末端側 30 または 40 アミノ酸を欠損させた CD2-1 Δ N80C30、CD2-1 Δ N80C40、CD2-1 Δ N90C40 を同様の方法で作製し、イネ培養細胞に 200 nM となるように処理し、処理 1 時間後の活性酸素の発生を調べた。その結果、著しい活性酸素発生量の減少を示した Δ C40 領域を含む CD2-1 Δ N80C40、CD2-1 Δ N90C40 を処理したイネ培養細胞は、CD2-1 Δ C40 を処理したイネ培養細胞と同様に活性酸素発生量の減少が認められた (Fig. 1-12)。しかしながら、活性酸素発生能を示した Δ N80 と Δ C30 から成る CD2-1 Δ N80C30 を処理したイネ培

養細胞でも CD2-1ΔC40 を処理したイネ培養細胞と同様に活性酸素発生量の減少が認められた (Fig. 1-12)。さらに、この実験で PTI 活性が認められた CD2-1ΔN50、CD2-1ΔN66、CD2-1ΔN80、CD2-1ΔN90、CD2-1ΔC30 の活性酸素発生能は、タンパク質を保存する際の凍結融解や有機溶媒の添加などにより容易に消失した (data not shown)。これらの結果から、CD2-1 の N 末端または C 末端領域を欠損させるとタンパク質の構造が不安定になり、PTI 活性が減少することが明らかになり、安定的に PTI 誘導活性を有する領域は CD2-1 であることが明らかになった。

そこで次に、CD2-1 やそれを含む領域である CD2-0 がフラジェリンによって発現誘導されることが明らかになっている *OsWRKY70* のプロモーター転写活性に与える影響について調べた。*OsWRKY70* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを作製し、イネプロトプラストに導入後 30°C で 16 時間培養を行った。その後、精製 N1141 フラジェリン、flg22、CD2-0 を 500 nM 処理し、処理 5 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールとして水を処理したイネプロトプラストについても同様に測定を行った。その結果、CD2-0 を処理したイネプロトプラストのルシフェラーゼ活性は、精製 N1141 フラジェリンを処理したイネプロトプラストと同様に処理 5 時間後に処理前の 3 倍まで上昇した (Fig. 1-13)。一方、flg22 や水を処理したイネプロトプラストは、処理 5 時間後においても処理前と同程度のルシフェラーゼ活性しか示さなかった (Fig. 1-13)。

また、各フラジェリン断片ペプチドによるカロース沈着誘導についても調べた。200 nM の発現 N1141 フラジェリン、ND0-2、CD2-1 をイネ培養細胞に処理し、処理 16 時間後のイネ培養細胞をアニリンブルーによりカロースを染色し、カロースの沈着を定量した。その結果、CD2-1 を処理したイネ培養細胞におけるカロース沈着は、発現 N1141 フラジェリンを処理したイネ培養細胞と同様に、処理 16 時間後でコントロールである水処理の 8 倍であった (Fig. 1-14)。一方、flg22 領域を含む ND0-2 を処理したイネ培養細胞では、水処理と同様に処理 16 時間後でもカロースの沈着は認められなかった (Fig. 1-14)。

これらの結果から、N1141 フラジェリンにより誘導されているイネ PTI は、イネがフラジェリンの C 末端領域に存在する CD2-1 を認識することで誘導されることが示され、CD2-1 がイネのフラジェリン認識部位であることが明らかになった。

5. イネとシロイヌナズナにおけるフラジェリン認識特異性

CD2-1 による PTI 誘導がイネ特異的なものか調べるために、シロイヌナズナ培養細胞に

CD2-1 やそれを含む領域である CD2-0 を処理した場合の PTI 誘導能を調べた。まず、300 nM の精製 N1141 フラジェリン、flg22、ND0-2、ND2-CD2、CD2-0、CD2-1 を処理したシロイヌナズナ培養細胞における活性酸素発生量を調べたところ、flg22 やそれを含む ND0-2 を処理したシロイヌナズナ培養細胞は、精製 N1141 フラジェリンを処理したシロイヌナズナ培養細胞と同様に、処理 1 時間後にコントロールである水処理の 15 倍程度の活性酸素発生量が認められた (Fig. 1-15)。一方、ND2-CD2、CD2-0、CD2-1 を処理したシロイヌナズナ培養細胞では、水を処理したシロイヌナズナ培養細胞と同様に、処理 1 時間後でも活性酸素発生量の増加は認められなかった (Fig. 1-15)。

また、200 nM の発現 N1141 フラジェリン、ND0-2、CD2-1 をシロイヌナズナ培養細胞に処理し、処理 16 時間後のシロイヌナズナ培養細胞をアニリンブルーにより染色後、カロースの沈着を観察し数値化した。その結果、flg22 領域を含む ND0-2 を処理したシロイヌナズナ培養細胞のカロース沈着は、発現 N1141 フラジェリンを処理したシロイヌナズナ培養細胞と同様に、処理 16 時間後でコントロールである水処理の 2 倍の蓄積が認められた (Fig. 1-16)。一方、CD2-1 を処理したシロイヌナズナ培養細胞では水を処理したシロイヌナズナ培養細胞と同様に顕著なカロースの沈着は認められなかった (Fig. 1-16)。

以上のように、シロイヌナズナは CD2-1 を認識して PTI 反応を誘導することができないことが明らかになり、CD2-1 はイネ特異的に認識される領域であることが示された。

6. CD2-1 認識後の下流で制御される遺伝子群の解析

イネ PTI 応答における CD2-1 認識後の下流で制御されている遺伝子を網羅的に解析するために、CD2-1 を含む領域である CD2-0 をイネ培養細胞に 300 nM になるように処理し、0、1、3、6 時間後に各細胞から抽出した mRNA を用いて、44K イネ DNA オリゴマイクロアレイ解析を行った。GeneSpring 12.6 を用いて得られた CD2-0 処理後 1、3、6 時間の発現量データを処理 0 時間の発現量データで Per chip all gene normalization を行った。その後、Per Gene Analysis を行い、CD2-0 処理後 1、3、6 時間の発現量が少なくとも 1 点以上で 2 倍以上の変動を示す遺伝子を抽出したところ 6,982 個存在した。次に、それら遺伝子に対して、Distance metric を Euclidean、Linkage rule を Ward's に設定し階層的なクラスタリングを行ったところ、A-F の 6 つのクラスターに分類された (Fig. 1-17)。

クラスター A には、CD2-0 処理後 1、3、6 時間の発現量が少なくとも 1 点以上で強く発現が上昇する 1,289 遺伝子が含まれていた。このクラスターには Receptor protein kinase、

WRKY transcription factor 70、PR-1a のような Pathogenicity-related protein などコードする遺伝子が含まれていた (Fig. 1-17)。クラスターBには、CD2-0 処理後 3 時間以降に徐々に発現が上昇する 892 遺伝子が含まれていた。このクラスターには PAL、Probenazole-inducible protein (PBZ1)、Thaumatococcus などの PTI 関連タンパク質やファイトアレキシン生合成酵素をコードする遺伝子が含まれていた (Fig. 1-17)。クラスターCには、CD2-0 処理後 1 時間に発現が上昇する 1,912 遺伝子が含まれていた。このクラスターには RING-type domain containing protein、bHLH16 transcription factor、Zinc finger transcription factor、mitogen-activated protein kinase 8 (MPK8)、calcium-dependent protein kinase 9 (CPK9) などの転写因子やシグナル伝達因子をコードする遺伝子が含まれていた (Fig. 1-17)。しかしながら、過敏感細胞死誘導に関与する転写因子である *OsNAC4* のような ETI 関連遺伝子は、これらのクラスターには含まれていなかった。

対照的に、クラスターDは、CD2-0 処理後 1 時間に発現が減少する 1,027 遺伝子が含まれていた。このクラスターには Photosystem II protein PsbY、Pyruvate/Phosphoenolpyruvate kinase のような光合成や代謝関連タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた (Fig. 1-17)。クラスターEは、CD2-0 処理後 3 時間以降に強く発現が減少する 398 遺伝子が含まれていた。このクラスターには Photosystem II protein PsbX のような光合成関連タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた (Fig. 1-17)。クラスターFは、CD2-0 処理後 1、3、6 時間の発現量が少なくとも 1 点以上で減少する 1,466 遺伝子が含まれていた。このクラスターには Cytochrome P450、Cell division control protein 48a のような光合成や成長関連タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた (Fig. 1-17)。

7. CD2-1 により誘導される PTI の病原細菌の生育に及ぼす効果

CD2-1 により誘導される PTI が病原細菌に対する抵抗性に寄与するか明らかにするために、生育 4 週間のイネ植物体に 1×10^6 CFU の *A. avenae* 非病原性 N1141 菌株または病原性 K1 菌株を 20 μ M の CD2-0 と共接種した。コントロールとして N1141 菌株または K1 菌株と水をイネ植物体に共接種した。その結果、コントロールである N1141 菌株と水を共接種したイネ植物体は、接種 3 日後の菌体数が 1.6×10^6 CFU/ml まで増加していた (Fig. 1-18)。それに対して、N1141 菌株と CD2-0 を共接種したイネ植物体は、接種 3 日後の菌体数が 1×10^5 CFU/ml とコントロールと比較して有為に菌体数の減少が認められた (Fig. 1-18)。

一方、K1 菌株と水または CD2-0 を共接種したイネ植物体では、どちらを共接種した場

合でも接種3日後に 3.2×10^6 CFU/mlと著しい菌体数の増加が認められた (Fig. 1-18)。また、K1 菌株と水または CD2-0 をイネ植物体に共接種し、接種7、10 日後における菌体数も同様に測定した。その結果、コントロールである K1 菌株と水を共接種した植物体では、接種7日後に 2×10^7 CFU/ml、接種10 日後に 8×10^7 CFU/mlと菌体数の増加が認められたが、K1 菌株と CD2-0 を共接種した植物体は、接種7 日後の菌体数は 2×10^6 CFU/ml でコントロールと比較して有意な違いは認められなかったが、接種10 日後は 8×10^6 CFU/ml とコントロールよりも菌体数が有意に減少していた (Fig. 1-19)。これらの結果から、CD2-1 により誘導される PTI は、*A. avenae* 非病原性 N1141 菌株または病原性 K1 菌株の生育抑制に寄与することが明らかになった。

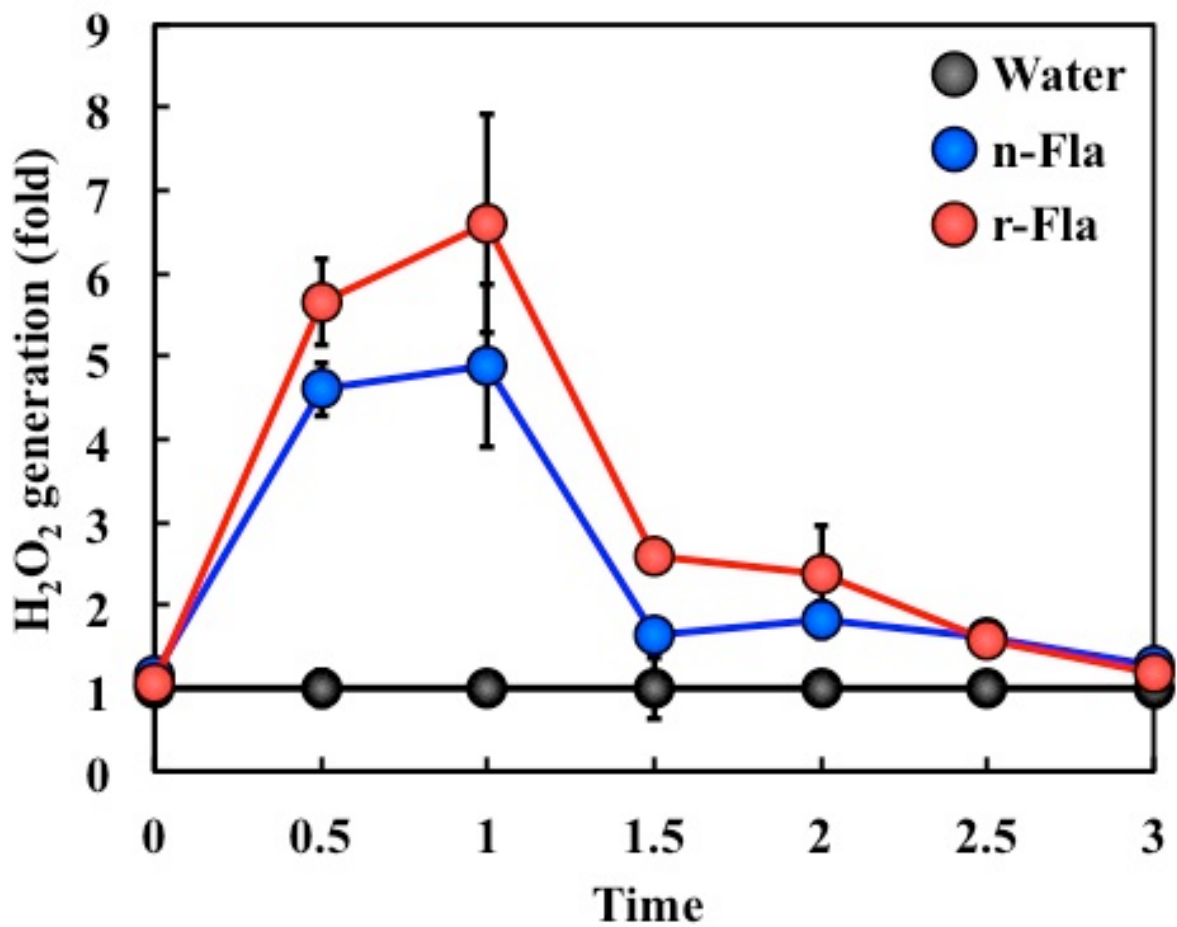


Fig. 1-1

精製 N1141 フラジェリンまたは発現 N1141 フラジェリンによる活性酸素発生の経時的な変化

200 nM の精製 N1141 フラジェリン (n-fla) または発現 N1141 フラジェリン (r-fla) とコントロールとして水を処理したイネ培養細胞における経時的な活性酸素の発生。

縦軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示し、横軸は処理後の時間を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

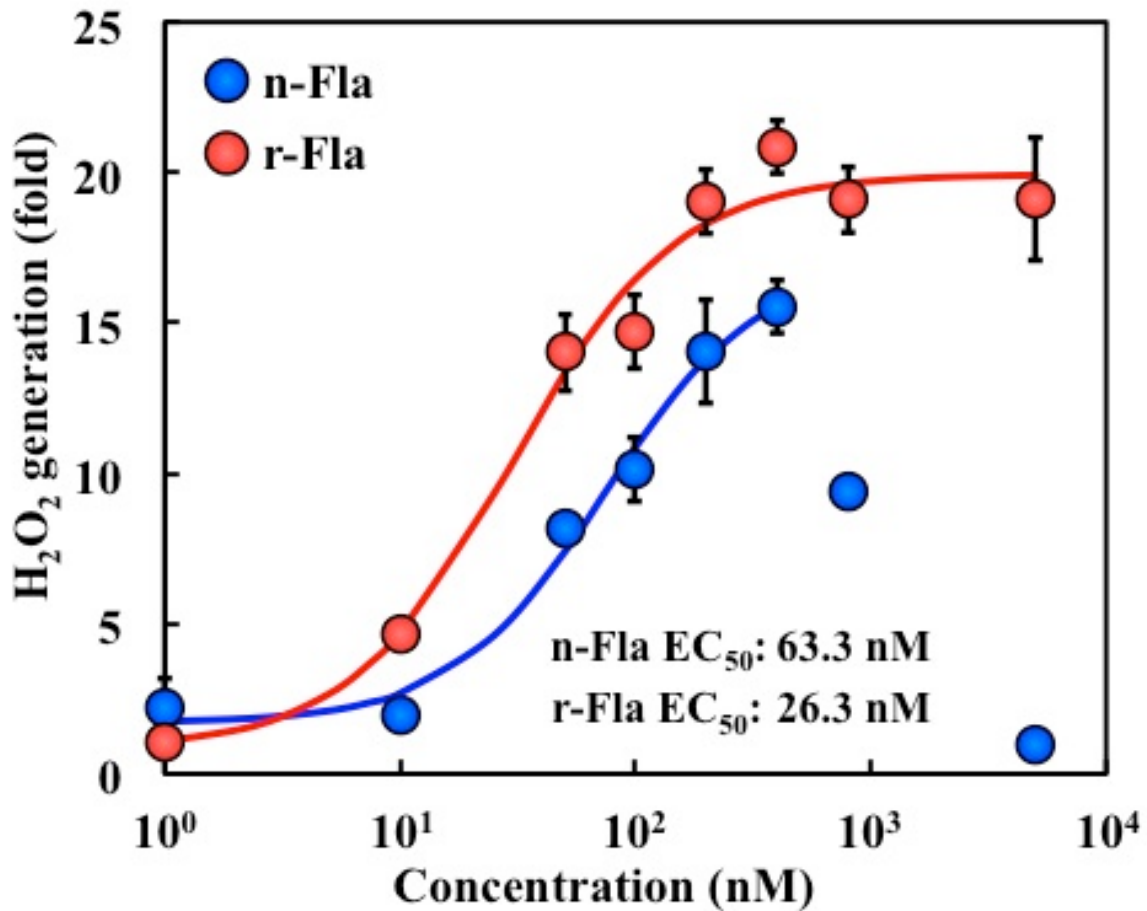


Fig. 1-2

精製 N1141 フラジェリンまたは発現 N1141 フラジェリンによる活性酸素発生の濃度依存的な変化

様々な濃度 (1、10、50、100、200、400、800、5000 nM) の精製 N1141 フラジェリン (n-fla) または発現 N1141 フラジェリン (r-fla) を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生。活性酸素の発生は、処理 1 時間後に測定を行った。

縦軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示し、横軸は処理濃度を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

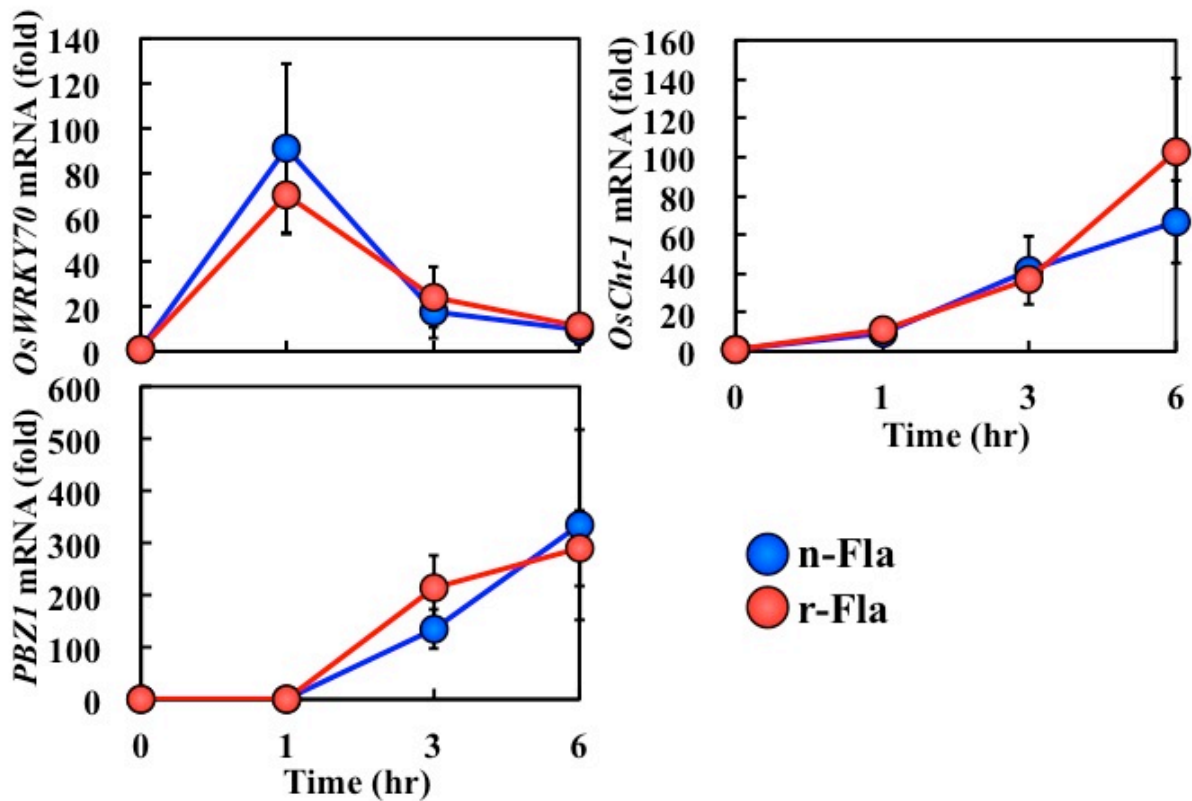


Fig. 1-3

精製 N1141 フラジェリンまたは発現 N1141 フラジェリンによる PTI 関連遺伝子の発現誘導

500 nM の精製 N1141 フラジェリン (n-fla) または発現 N1141 フラジェリン (r-fla) を処理したイネ培養細胞における PTI 関連遺伝子の発現。処理 0、1、3、6 時間後の細胞から抽出した mRNA を用いて qRT-PCR により定量した。

縦軸は処理 0 時間を 1 としたときの発現量を示し、横軸は処理後の時間を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

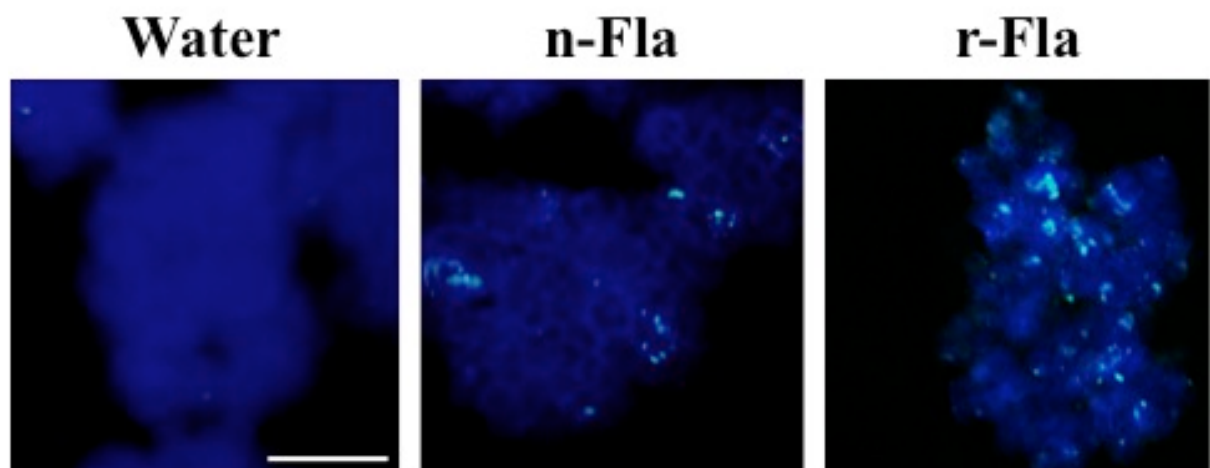


Fig. 1-4

精製 N1141 フラジェリンまたは発現 N1141 フラジェリンによるカロースの沈着

200 nM の精製 N1141 フラジェリン (n-fla) または発現 N1141 フラジェリン (r-fla) を処理したイネ培養細胞におけるカロースの沈着。処理 16 時間後の細胞をアニリンブルーにより染色し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは 200 μm を示す。

flg22: QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA
 flg22-avenae: QRLSSGLRINSAKDDAAGLAIS

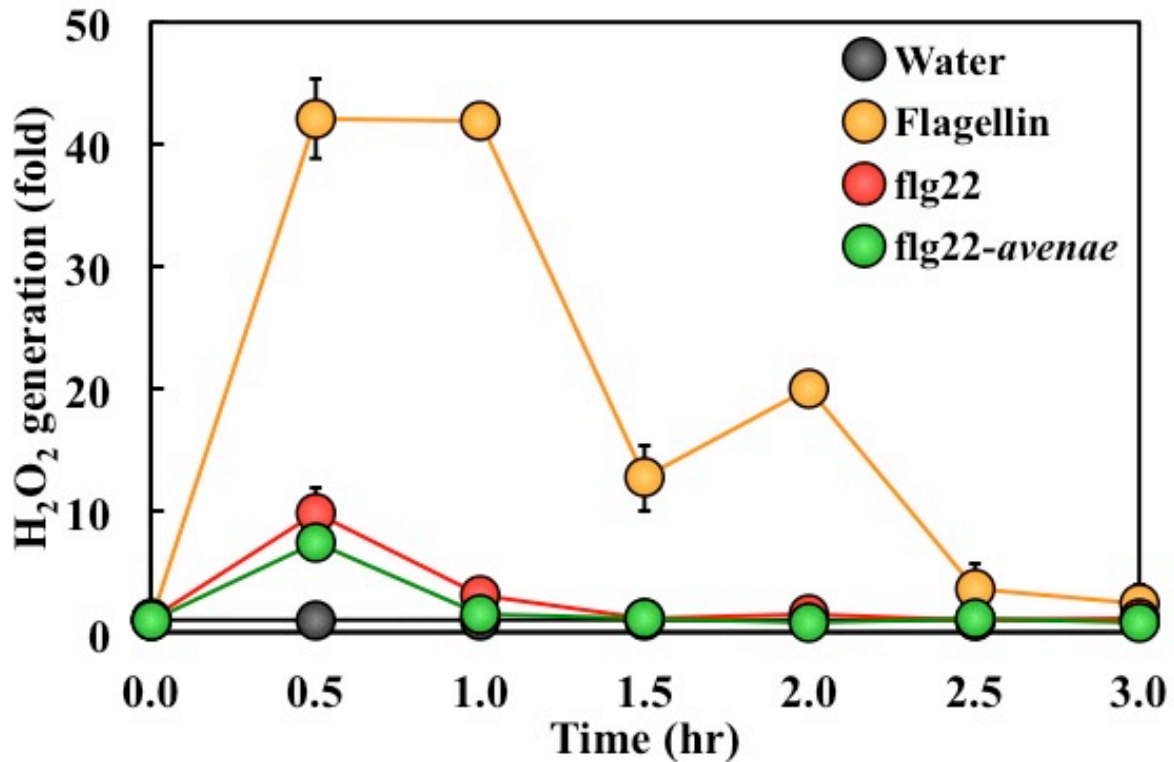


Fig. 1-5

flg22 または flg22-avenae による活性酸素発生の経時的な変化

flg22 と flg22-avenae のアミノ酸配列 (上)。200 nM の発現 N1141 フラジェリン (r-fla)、flg22、flg22-avenae、コントロールとして水を処理したイネ培養細胞における経時的な活性酸素の発生 (下)。

縦軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示し、横軸は処理後の時間を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

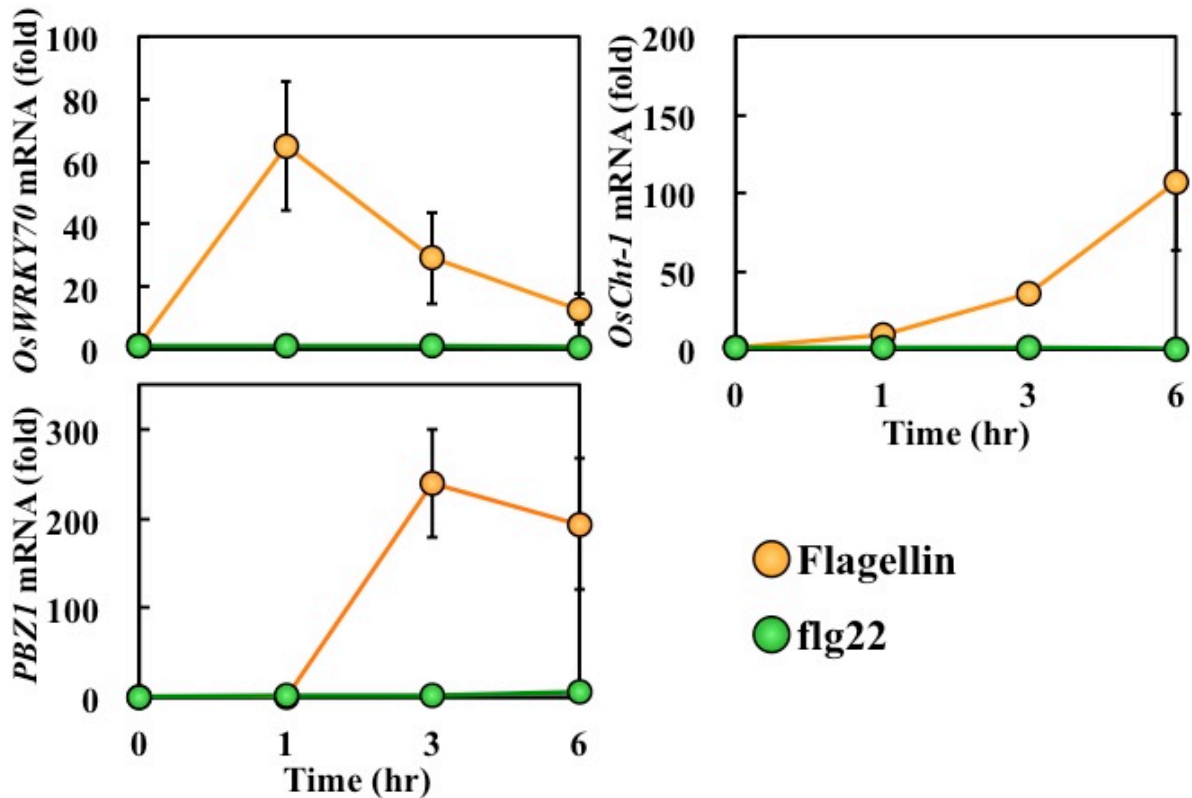


Fig. 1-6

flg22 による PTI 関連遺伝子の発現誘導

500 nM の発現 N1141 フラジェリン (r-fla) または flg22 を処理したイネ培養細胞における PTI 関連遺伝子の発現。処理 0、1、3、6 時間後の細胞から抽出した mRNA を用いて qRT-PCR により定量した。

縦軸は処理 0 時間を 1 としたときの発現量を示し、横軸は処理後の時間を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

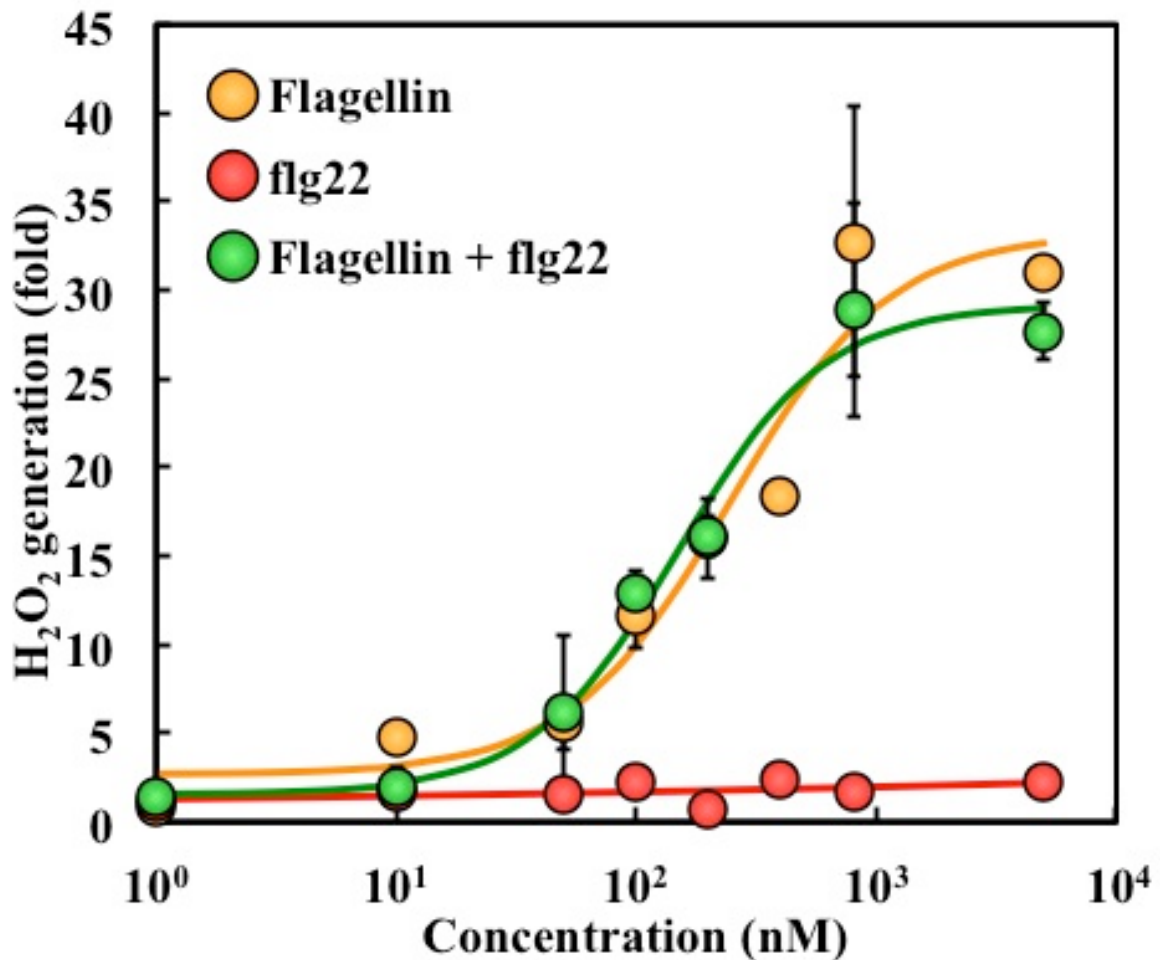


Fig. 1-7

発現 N1141 フラジェリンによる活性酸素発生への flg22 の影響

10 μM の flg22 存在下で様々な濃度 (1、10、50、100、200、400、800、5000 nM) の発現 N1141 フラジェリン (Flagellin) を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生。活性酸素の発生は、処理 1 時間後に測定を行った。

縦軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示し、横軸は処理濃度を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

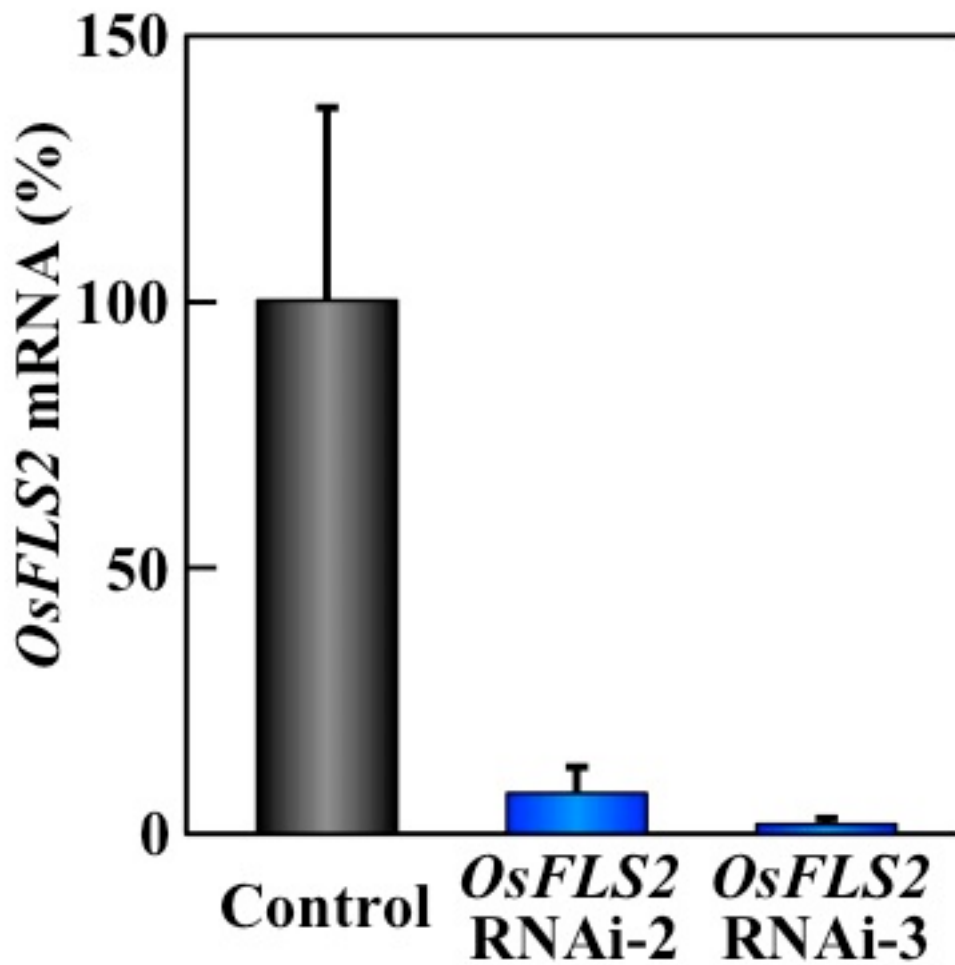


Fig. 1-8

OsFLS2 RNAi 抑制形質転換体における *OsFLS2* mRNA の発現量

OsFLS2 RNAi 抑制形質転換体ライン (*OsFLS2* RNAi-2、*OsFLS2* RNAi-3) における *OsFLS2* mRNA の発現量は、qRT-PCR により定量した。

縦軸はコントロールの発現量を 100%としたときの相対値を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

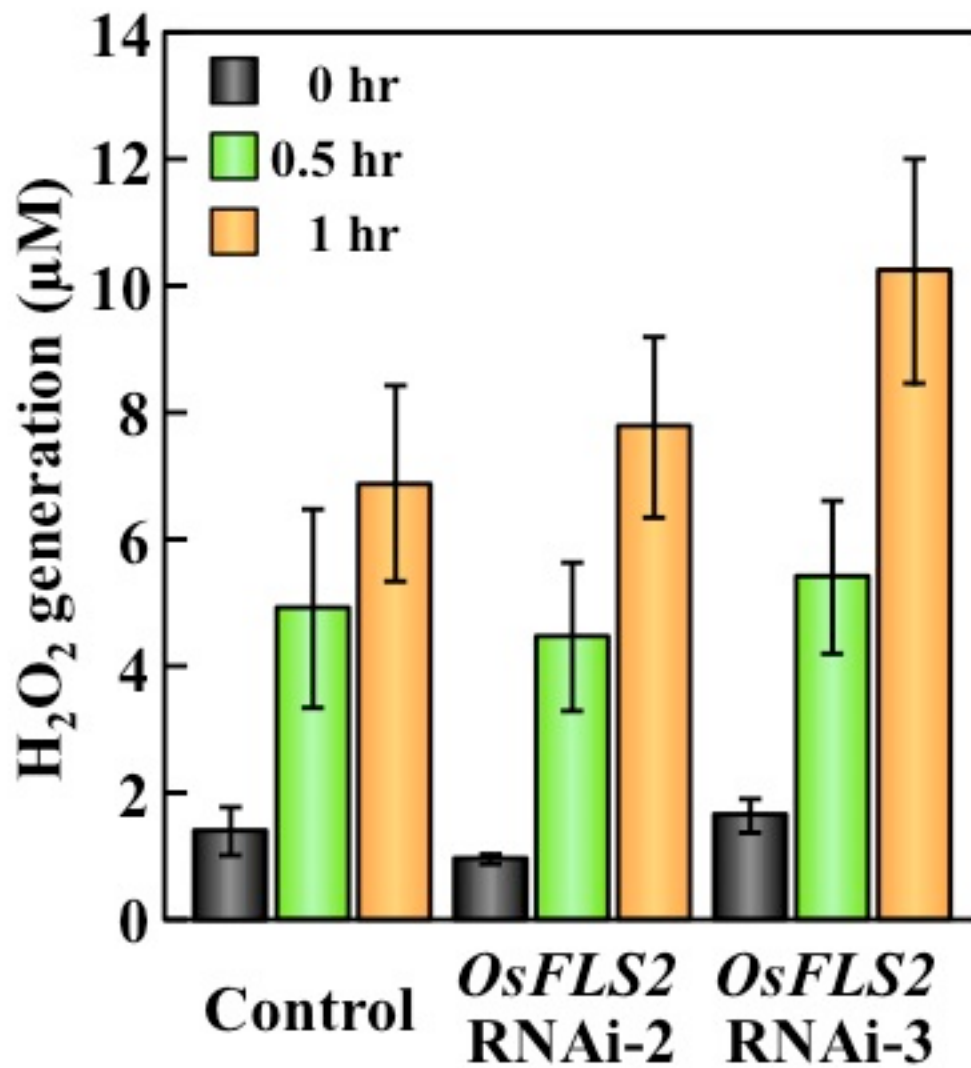


Fig. 1-9

OsFSL2 RNAi抑制形質転換体における精製N1141フラジェリンによる活性酸素発生の経時的な変化

300 nMの精製N1141フラジェリンを処理したOsFSL2 RNAi抑制形質転換体における経時的な活性酸素の発生。活性酸素の発生は、処理0、0.5、1時間後に測定を行った。

縦軸は定量した活性酸素発生量を示す。実験は3回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

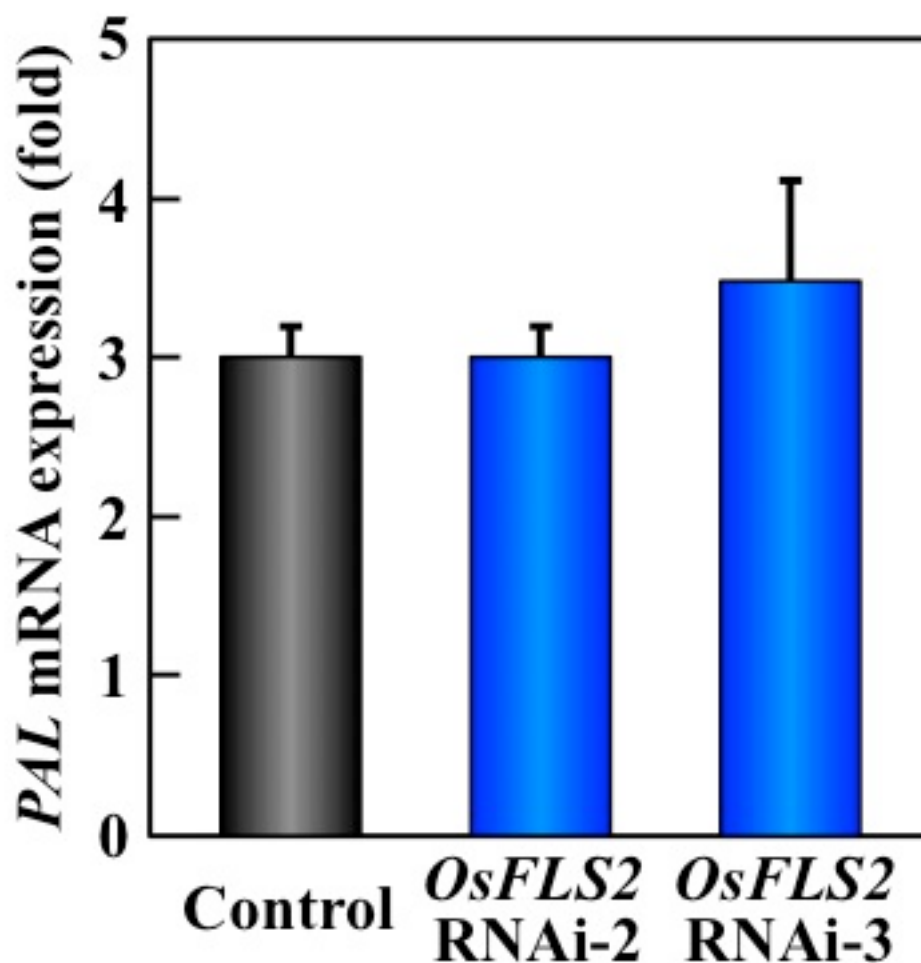


Fig. 1-10

OsFLS2 RNAi 抑制形質転換体における精製 N1141 フラジェリンによる PTI 関連遺伝子の発現誘導

500 nM の精製 N1141 フラジェリンを処理した *OsFLS2* RNAi 抑制形質転換体における PTI 関連遺伝子の発現。処理 3 時間後の細胞から抽出した mRNA を用いて qRT-PCR により定量した。

縦軸は処理 0 時間を 1 としたときの発現量を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

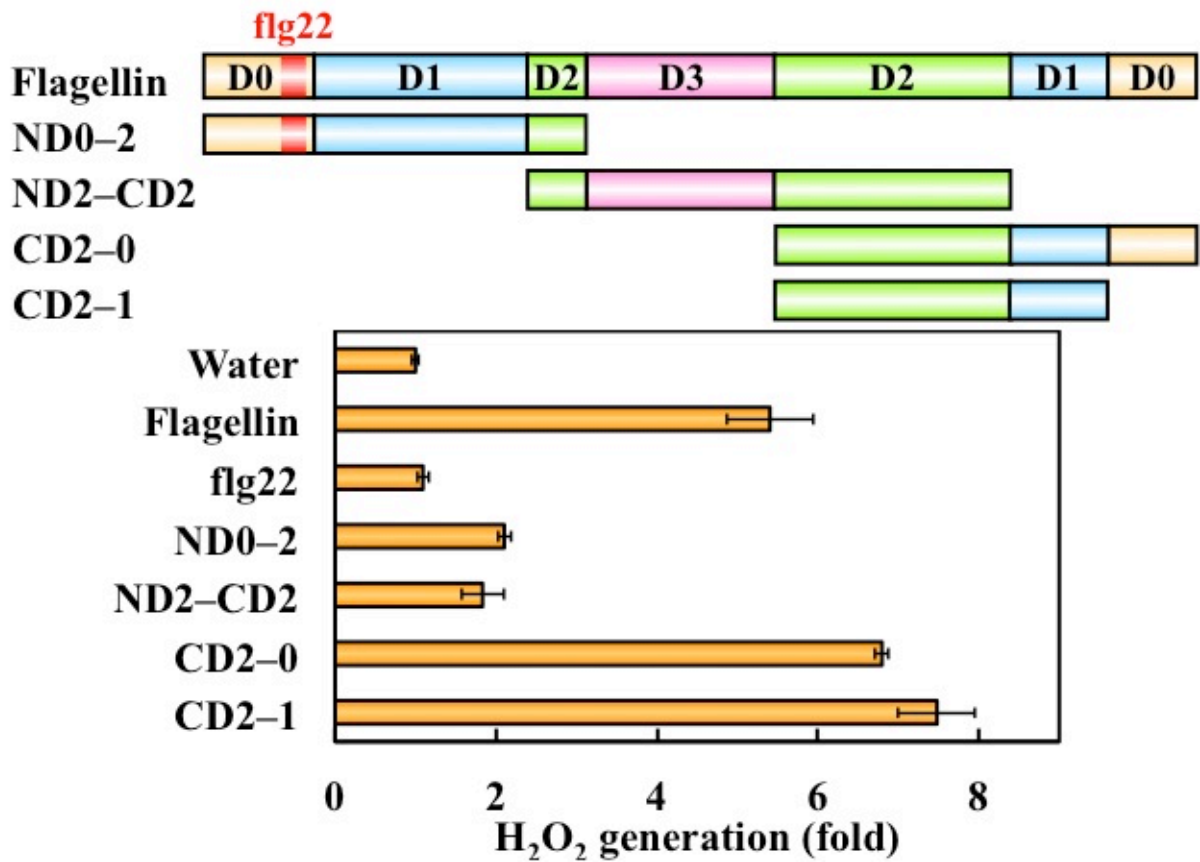


Fig. 1-11

イネ培養細胞における発現N1141フラジェリンとフラジェリン部分ペプチドによる活性酸素発生

N1141 フラジェリンとフラジェリン部分ペプチドの構造 (上)。300 nM の発現 N1141 フラジェリン、flg22、フラジェリン部分ペプチド、コントロールとして水を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生 (下)。活性酸素の発生は、処理 1 時間後に測定を行った。

横軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

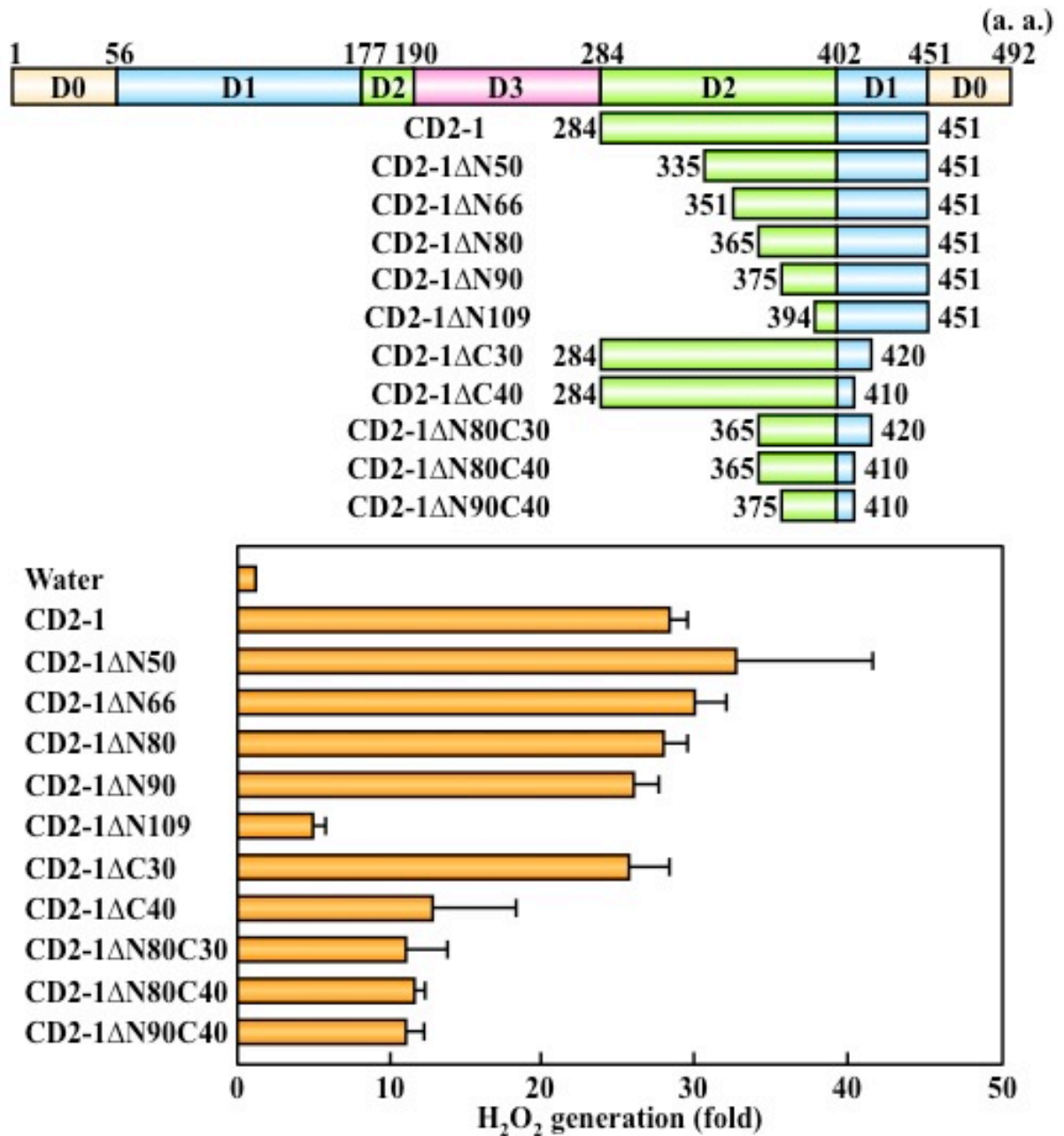


Fig. 1-12

イネ培養細胞における CD2-1 と CD2-1 部分ペプチドによる活性酸素発生

CD2-1 と CD2-1 部分ペプチドの構造 (上)。200 nM の CD2-1、CD2-1 部分ペプチドを処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生 (下)。活性酸素の発生は、処理 1 時間後に測定を行った。

横軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

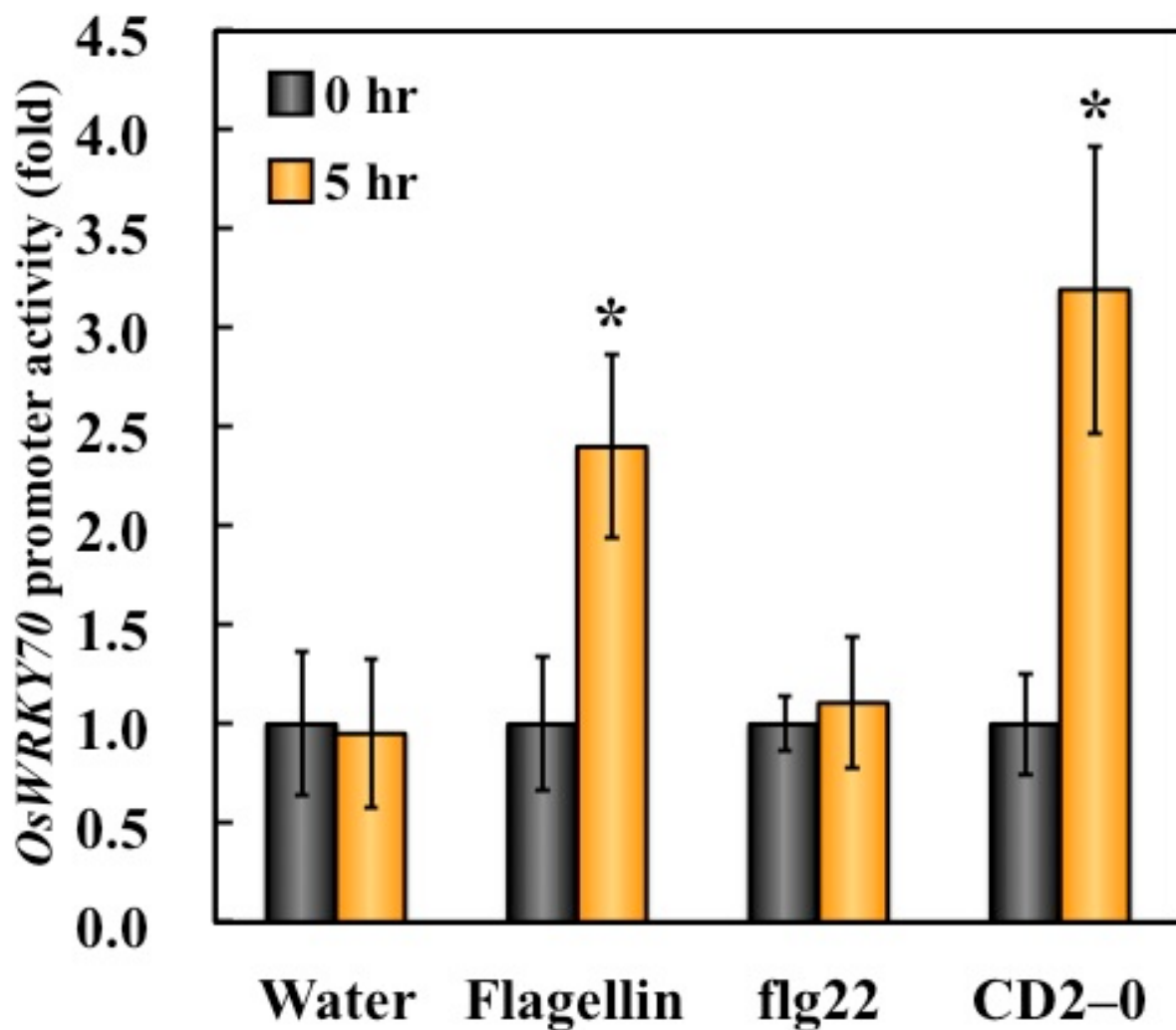


Fig. 1-13

イネプロトプラストにおける CD2-0 による *OsWRKY70* のプロモーター転写活性

500 nM の精製 N1141 フラジェリン、flg22、CD2-0、コントロールとして水を処理したイネプロトプラストにおける *OsWRKY70* のプロモーター転写活性。プロモーター転写活性は、処理 5 時間後に測定を行った。

縦軸は各サンプルにおける 0 時間を 1 としたときのプロモーター転写活性を示す。実験は 5 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.05$ (t-test) を示す。

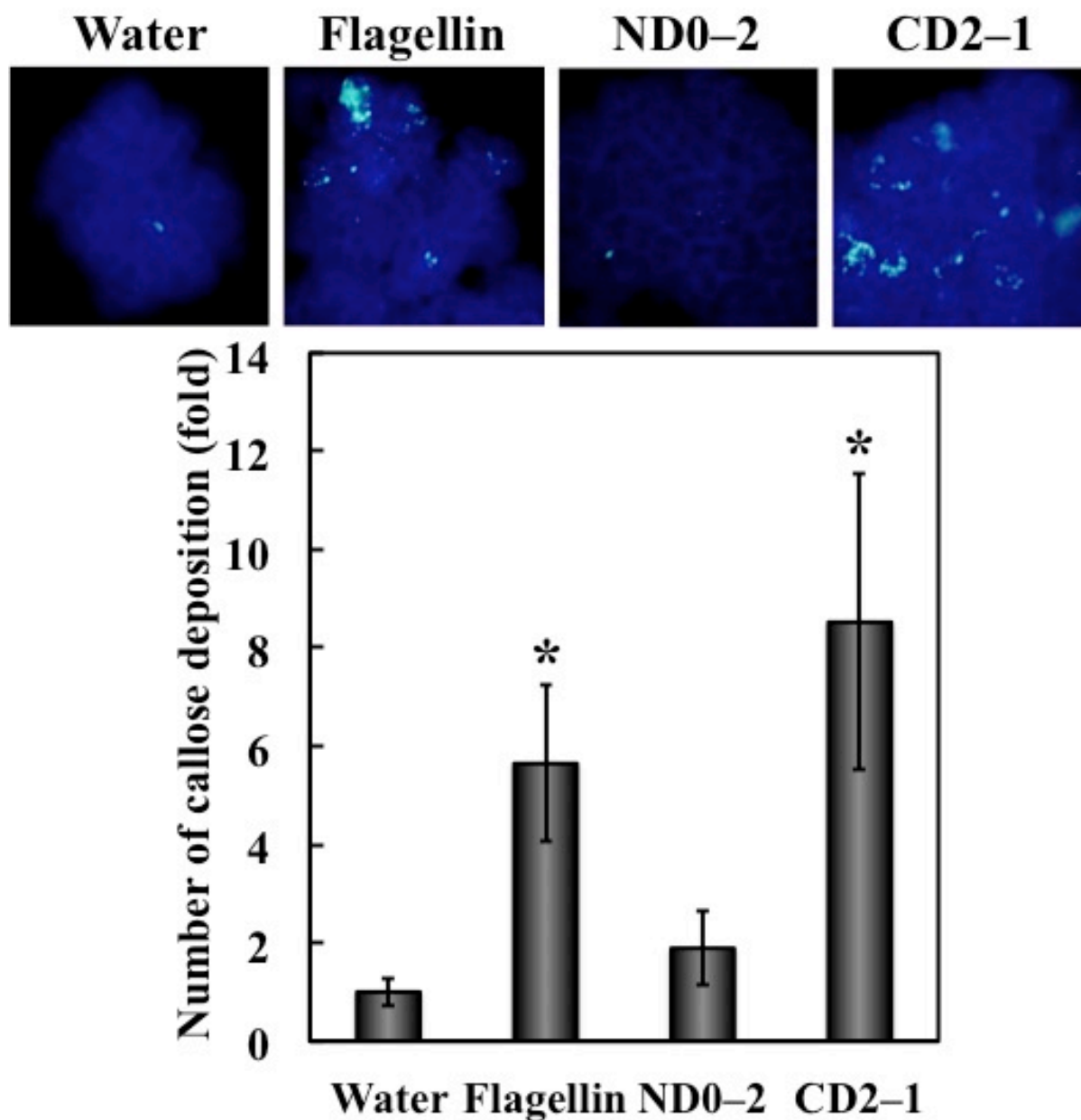


Fig. 1-14

イネ培養細胞における CD2-1 によるカロースの沈着

200 nM の発現 N1141 フラジェリン、ND0-2、CD2-1、コントロールとして水を処理したイネ培養細胞におけるカロースの沈着。処理 16 時間後の細胞をアニリンブルーにより染色し、蛍光顕微鏡で観察した (上)。また、このときのカロース数を測定し数値化した (下)。

縦軸は、水処理を 1 としたときのカロース数を示す。実験は 7 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.05$ (t-test) を示す。

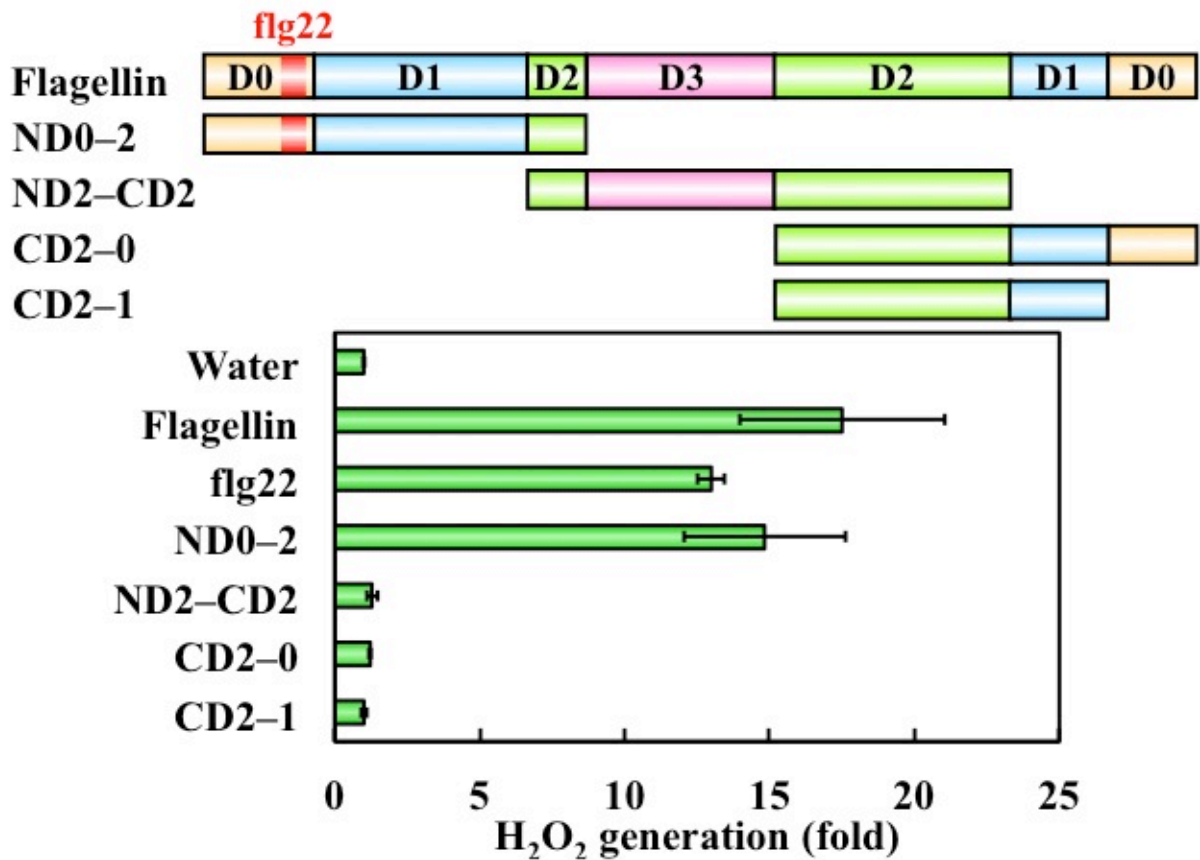


Fig. 1-15

シロイヌナズナ培養細胞における発現N1141フラジェリンとフラジェリン部分ペプチドによる活性酸素発生

N1141 フラジェリンとフラジェリン部分ペプチドの構造 (上)。300 nM の発現 N1141 フラジェリン、flg22、フラジェリン部分ペプチド、コントロールとして水を処理したシロイヌナズナ培養細胞における活性酸素の発生 (下)。活性酸素の発生は、処理 1 時間後に測定を行った。

横軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

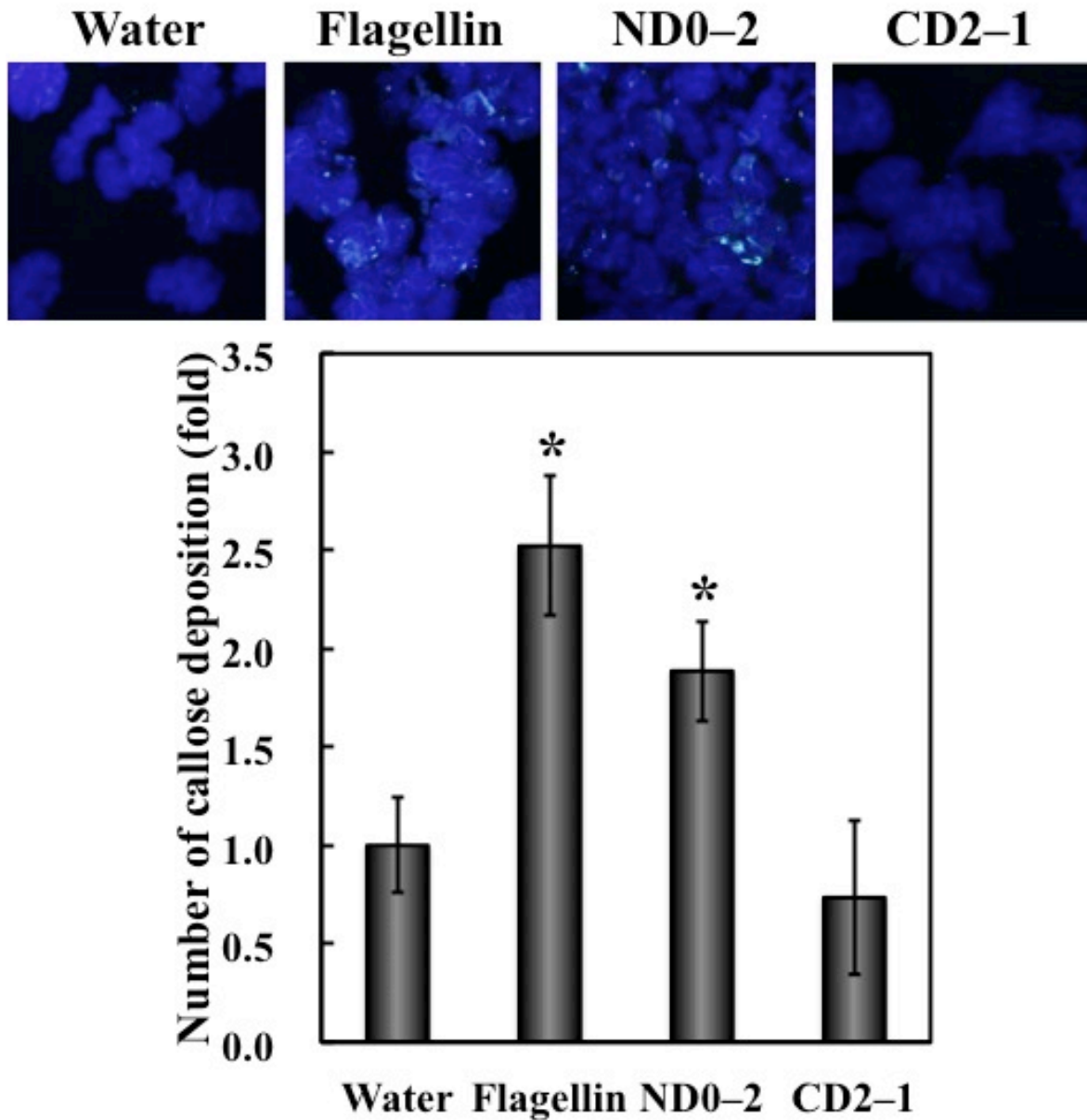


Fig. 1-16

シロイヌナズナ培養細胞にN1141フラジェリンとその部分ペプチドを処理した場合のカロース沈着

200 nM の発現 N1141 フラジェリン、ND0-2、CD2-1、コントロールとして水を処理したシロイヌナズナ培養細胞におけるカロースの沈着。処理 16 時間後の細胞をアニリンブルーにより染色し、蛍光顕微鏡で観察した (上)。また、このときのカロース数を測定し数値化した (下)。

縦軸は、水処理を 1 としたときのカロース数を示す。実験は 8 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.05$ (t-test) を示す。

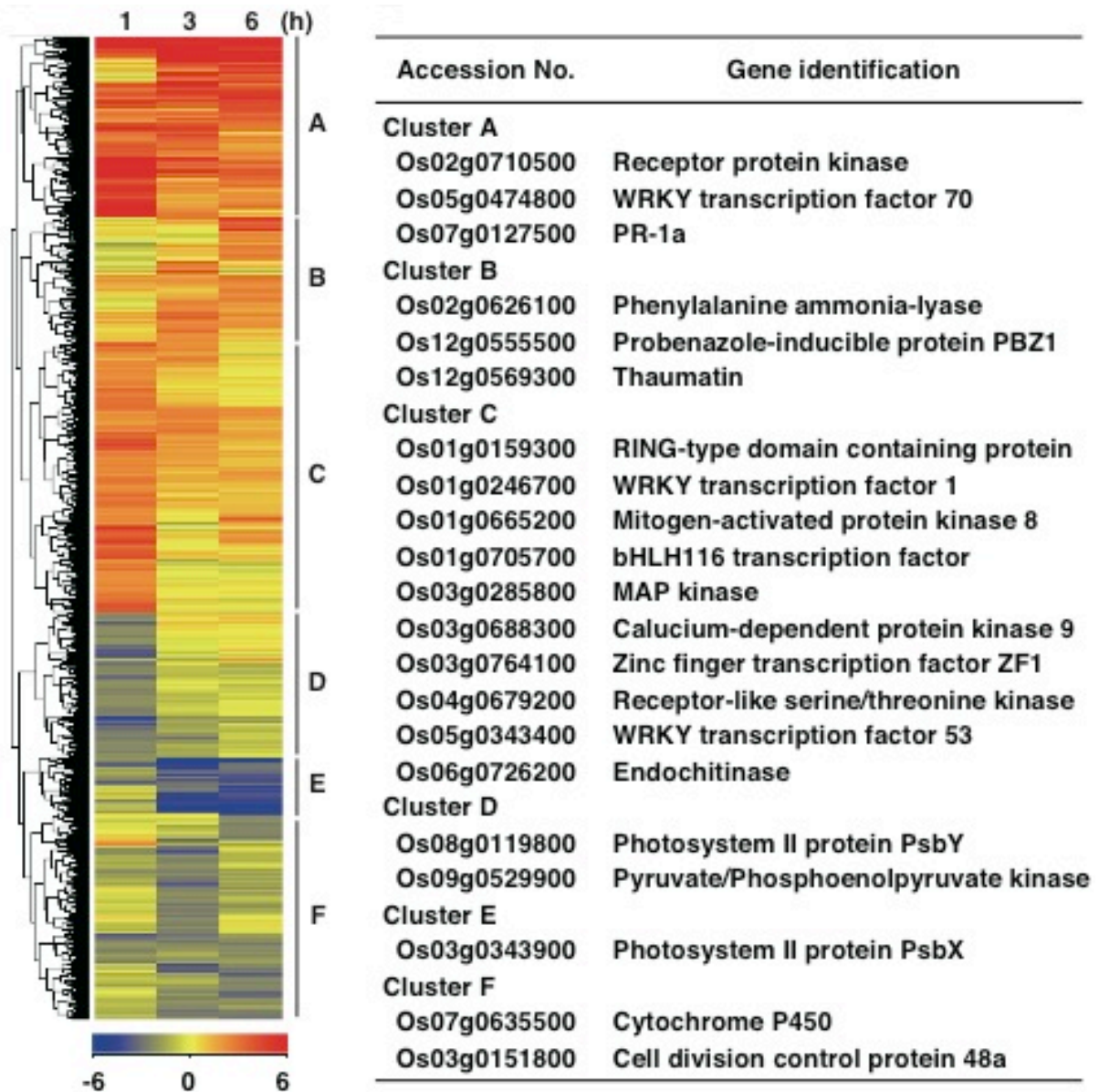


Fig. 1-17

CD2-0 を処理したイネ培養細胞におけるトランスクリプトーム解析

CD2-0 処理によりコントロールと比較して2倍以上の変化認められた遺伝子群における階層的クラスタリング (左)。各時間 (1、3、6) における転写物量はコントロールを1としたときの相対値を示す。

各クラスター内における代表的な遺伝子 (右)。クラスターA-Cは、CD2-0 処理により発現量が増加する遺伝子群。クラスターD-Fは、CD2-0 処理により発現量が減少する遺伝子群。

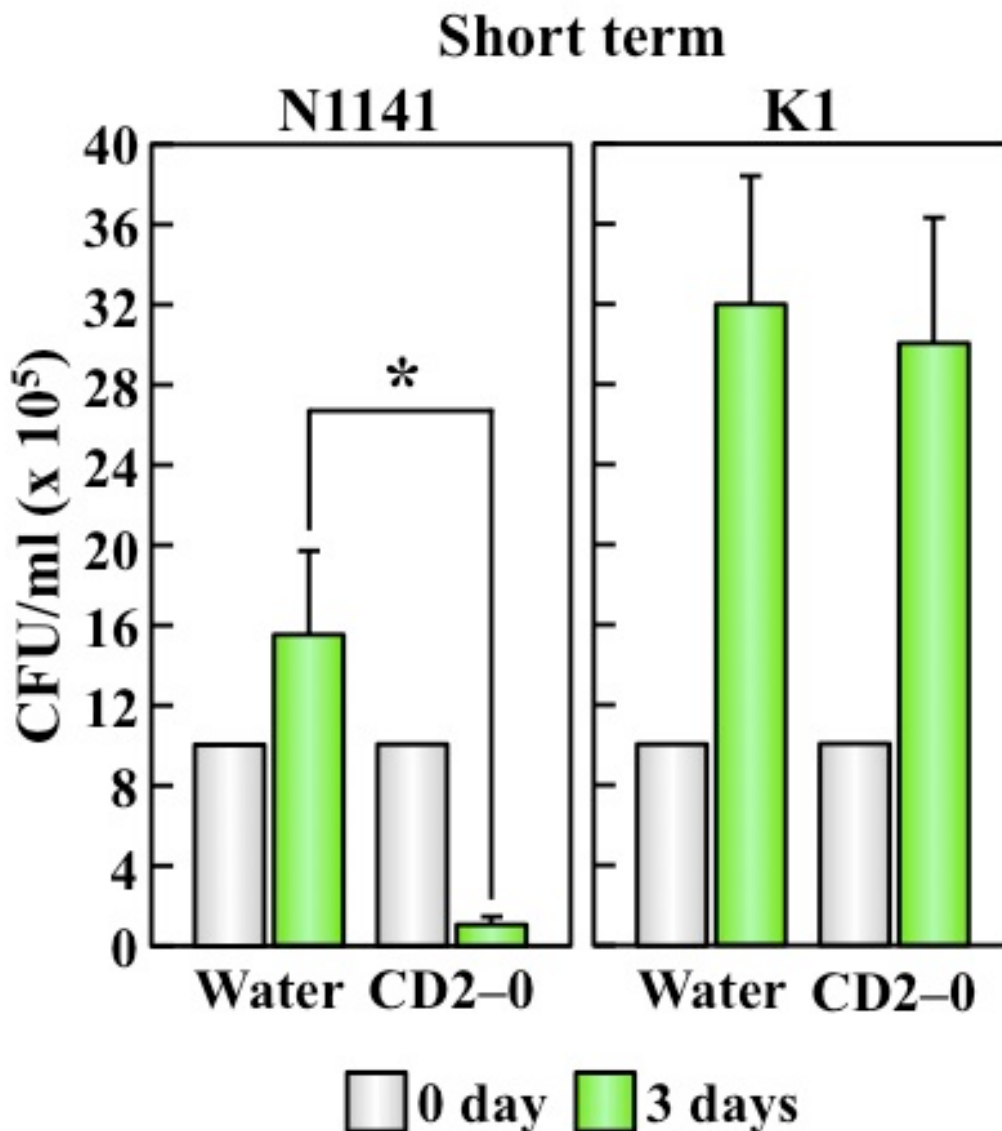


Fig. 1-18

CD2-0 による病原細菌の増殖への影響 (short term)

生育4週間のイネ植物体に 1×10^6 CFU の *A. avenae* 非病原性 N1141 菌株 (左) または病原性 K1 菌株 (右) を 20 μ M の CD2-0 と共接種したときの菌体数。コントロールには水を共接種した。菌体数は接種0日後と3日後に行った。

縦軸は、接種部位付近 (10 cm) あたりの菌体数を示す。実験は3回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.05$ (t-test) を示す。

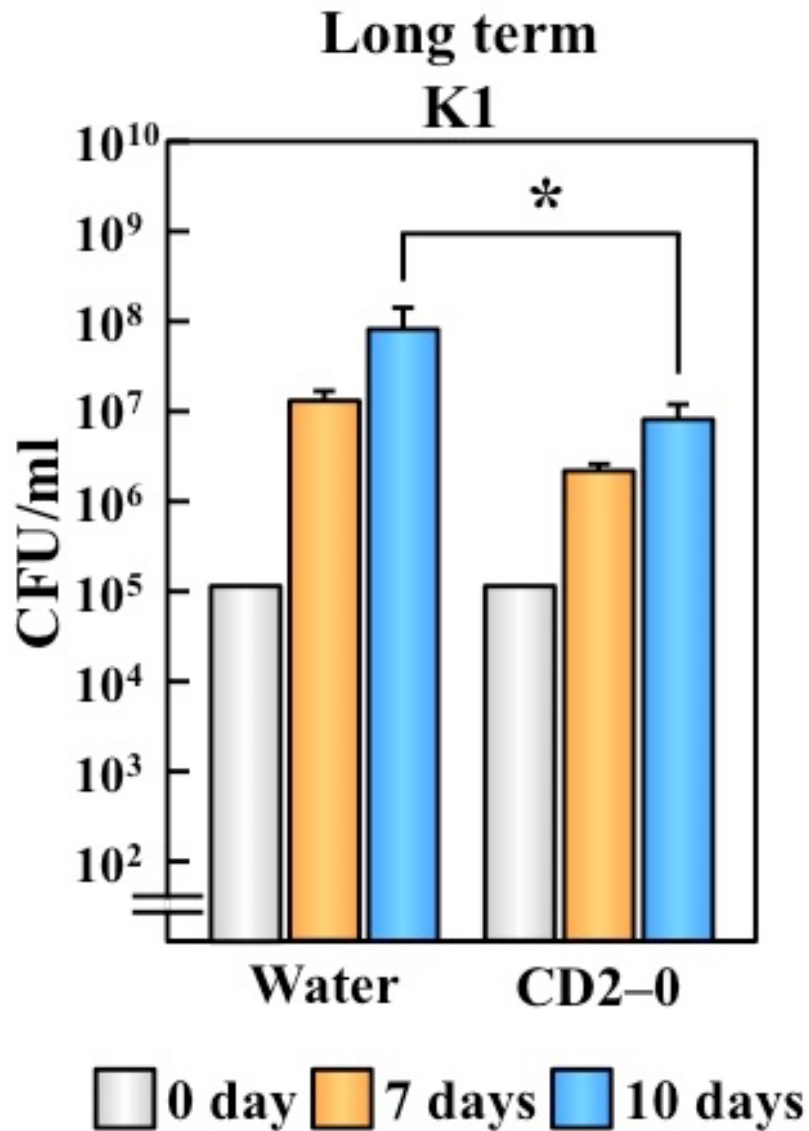


Fig. 1-19

CD2-0 による病原細菌の増殖への影響 (long term)

生育4週間のイネ植物体に 1×10^6 CFU の *A. avenae* 病原性 K1 菌株を 20 μ M の CD2-0 と共接種したときの菌体数。コントロールには水を共接種した。菌体数は接種 0 日後、7 日後、10 日後に行った。

縦軸は、植物体あたりの菌体数を示す。実験は3回以上行われ、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.05$ (t-test) を示す。

第 1 章

考察

本章では、イネにおけるフラジェリン認識機構を明らかにするために、イネのフラジェリン認識部位の同定を行った。これまでに、シロイヌナズナやトマト、ジャガイモなどにおけるフラジェリン認識部位として N 末端領域の高度に保存された領域に存在する flg22 が同定されている (Felix *et al.*, 1999)。一方、本研究でイネにおけるフラジェリン認識部位を探索したところ、大腸菌で作製したフラジェリンの C 末端領域 D2、D1 ドメインから成る CD2-1 は、活性酸素の発生、カロース沈着、PTI 関連遺伝子の発現誘導などのいくつかのイネ PTI 反応を誘導した (Fig. 1-11, 13, 14)。また、同様に大腸菌で作製した flg22 を含む領域である N 末端領域 D0、D1、D2 ドメインからなる ND0-2 や中央領域の D2、D3、D2 ドメインから成る ND2-CD2 はそのようなイネ PTI 反応は誘導しなかった (Fig. 1-11, 13, 14)。このことから、イネにおけるフラジェリン認識部位はフラジェリンの C 末端領域の D2 と D1 ドメインに存在することが明らかになった。

フラジェリンの X 線結晶構造解析により、D0 から D3 ドメインはフラジェラフィラメント軸の中心から外へ向かって放射線状に連なっていることが明らかになった。D0 と D1 ドメインは、フィラメントの構築と重合のために重要なコア領域であり、D2 ドメインは、フィラメントの安定性に関係する。また、D3 ドメインは、フィラメント形成時に他のフラジェリンサブユニットに隣接している中心的なドメインであるが、それらは互いに結合はしていない。イネのフラジェリン認識部位である CD2-1 は C 末端領域の D2、D1 ドメインから構成されており、N1141 フラジェリンの立体構造予測から、フラジェラフィラメントの内側に存在することが予想された (Fig. 1-20; Samatey *et al.*, 2001; Yonekura *et al.*, 2003)。さらに、CD2-1 はフラジェラフィラメントの重合に寄与する長く強固な α -ヘリックス構造を形成することも明らかになった (Fig. 1-20)。この構造は、本章で CD2-1 の N 末端または C 末端のアミノ酸を欠損させ詳細な認識部位を明らかにしようとした際に、安定的に活性を示す発現タンパク質を得ることができなかったことと関連しているかもしれない。すなわち、イネにおけるフラジェリン認識には認識部位の立体構造が重要ではないかということである。事実、CD2-1 の N 末端または C 末端のアミノ酸を欠損させたペプチドの凍結融

解や、有機溶媒処理により活性が失われた。これは、短くなったペプチドではこのような処理で α ヘリックスを含む立体構造が壊れたため、活性が失われたと推察される。CD2-1の立体構造と活性の関係を明確にするためには、CD2-1の立体構造解析が必須であろう。

序論でも述べたように、非病原性N1141菌株のフラジェリンはイネのPTIを誘導するが、病原性K1菌株のフラジェリンはイネのPTIを誘導しない。この両フラジェリンには14ヶ所のアミノ酸の違いが存在するが、このうち8個のアミノ酸がCD2-1内に存在する (Hirai *et al.*, 2011)。しかしながら、発現N1141フラジェリンと発現K1フラジェリンは同様にイネのPTIを誘導することから (Hirai *et al.*, 2011)、このCD2-1内の異なる8ヶ所のアミノ酸はイネによるフラジェリン認識に関与していないと考えられる。

また、K1フラジェリンには、4ヶ所の糖鎖付加部位 (Ser178、Ser183、Ser212、Thr351)が存在しており、このうち2ヶ所 (Ser178、Ser183)をAlaに置換するとN1141フラジェリンと同様にイネのPTIを誘導する (Hirai *et al.*, 2011)。興味深いことに、このSer178とSer183はN末端領域のD2ドメインに存在しており、この領域は立体構造上C末端のD2とD1の間の領域に近接している (Fig. 1-20; Samatey *et al.*, 2001; Yonekura *et al.*, 2003)。本研究により、この領域はイネによるフラジェリン認識部位ではないことが証明されている。このことから、この糖鎖付加部位はフラジェリンの認識に関与しているのではなく、K1フラジェリンではこの糖鎖付加部位に存在する糖鎖が隣接する部位に存在する認識部位を覆い隠すことで、イネに認識されなくなっているものと推察される。

フラジェリンのN末端またはC末端領域のD0、D1ドメインのアミノ酸配列は高度に保存されている (Wilson and Beveridge, 1993)。このような高度に保存された分子やその領域は、PAMPsとして機能することが多く報告されている。例えば、グラム陰性細菌の外膜に存在するリポ多糖類 (LPS) は、植物のPTIを誘導することが示され、細菌で広く保存されているlipid Aが主に認識されることが明らかになっている (Silipo *et al.*, 2005)。さらに、大腸菌のEF-Tuの保存されたN末端領域の18アミノ酸を基に合成されたelf18もシロイヌナズナや他のアブラナ科で認識されPTIを誘導することが明らかになっている (Kunze *et al.*, 2004)。本研究で、イネのフラジェリン認識部位として同定したCD2-1も様々な菌種で広く保存されており、PAMPとしての条件を備えているといえる。

本研究で、CD2-1がイネにおけるフラジェリンの主要な認識部位であることを示したが、flg22を処理した場合でも弱いPTIが誘導されている (Fig. 1-5)。この現象は、イネにおいてOsFLS2も発現しflg22の受容体として機能しているが、フラジェリン認識にはOsFLS2

以外の他の受容体が主に寄与していることを示唆している。実際に、イネの主要な認識領域である CD2-1 の認識には OsFLS2 は関与していなかった (Fig. 1-9, 10)。このイネのフラジェリン認識における OsFLS2 の貢献度の低さは、おそらくイネにおける OsFLS2 タンパク質の存在量に依存している可能性が考えられる (Takai *et al.*, 2008)。イネにおける OsFLS2 の役割を明らかにするためには、特異抗体を用いた OsFLS2 の定量や OsFLS2 の flg22 に対するアフィニティーの測定を行う必要があるであろう。

イネとシロイヌナズナにおける PAMP としてのフラジェリンの認識機構は、おそらく一つのシステムから進化してきたものではなく、広く保存された大量に存在する分子を偶然認識するようになることで生まれたと思われる。多様な植物種において、一つの分子種の異なる部分を PAMP として認識することが報告されている。例えば、PAMP である β -グルカンには、植物間でいくつかの特異的な認識部位が存在する。大豆においてファイトアレキシン産生を誘導する卵菌の *Phytophthora* の細胞壁由来のヘプタ- β -グルコシドは、イネやタバコの PTI を誘導しない (Fliegmann *et al.*, 2004)。対照的に、真菌である *Pyricularia oryzae* の細胞壁由来のヘプタ- β -グルコシドとは構造的に異なる β -グルカンであるテトラグルコシルグルシトールは、イネの PTI を誘導するが、大豆においては誘導しないことが報告されている。このことから、植物は進化の中で、多量に存在する分子の様々な部位を認識する能力を備えてきたのであろう。

近年、トマトは flg22 と共に、flgII-28 と名付けられたフラジェリン部位も認識することが明らかになった (Cai *et al.*, 2011)。*Pseudomonas syringe* pv. *tomato* にはフラジェリン遺伝子内に 2 つの非同義変異を持つ様々な菌株が存在する。そこで、この非同義置換部位とフラジェリン活性との関係を調べたところ、この非同義置換によってフラジェリンの PAMP としての活性が失われているものが存在していた。興味深いことに、この非同義置換部位は flg22 領域だけでなくそれとは異なる保存された 28 アミノ酸から成る領域にも存在した。そこで、この 28 アミノ酸を合成しトマトにおける PTI 誘導能を調べたところ、変異を持つペプチドは PTI を誘導せず、変異を持たないペプチドは PTI を誘導したことから、新たな認識部位として flgII-28 が同定された (Cai *et al.*, 2011)。これは、トマトが変異 flgII-28 を認識できないという選択により細菌において認識部位への変異が保存された可能性があることと示唆されている。また、flgII-28 はトマトなどのナス科植物では認識されるが、シロイヌナズナでは認識されないことも報告されている (Clarke *et al.*, 2013)。flgII-28 はシロイヌナズナでは認識されないにもかかわらず、flg22 や flgII-28 に認識できなくなるような変異が生

じても FLS2 依存的に細菌の病原性に影響を及ぼすことが示された。しかしながら、*Nicotiana benthamiana* にトマトの FLS2 を発現させても flgII-28 に対する認識能を与えず、またトマトの FLS2 をサイレンシングにより抑制させた場合でも flgII-28 に対する認識能に影響を与えなかった (Clarke *et al.*, 2013)。このことは、フラジェリンの flg22 と flgII-28 における多様性が、効果的な病原細菌の感染戦略であることを示している (Clarke *et al.*, 2013)。一方、イネの場合は、flg22 を認識する機構 (Takai *et al.*, 2008) と CD2-1 を認識する機構をそれぞれ潜在的に保有している。このことは、病原細菌側の感染戦略によって flg22 と CD2-1 のような多様性が存在しているのではなく、イネが様々な病原細菌に対抗するために獲得した防御戦略の結果であることを示しているであろう。



```

N1141 MASTINTNVSSLTAQRNLSLQSSLNLSIQRLSSGLRINSAKDDAAGLAISERFTSQIRGLNQAVRNANDGISLAQTAEGALKSTGDILQRVRELAVQSA 100
SaImo MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNLRVRELAVQSA 100
**.....** :*.** ** :*.*.....***** **.:***.:*.** ** *****.**:*..... .: *****

N1141 NATNSSGDRKAIQAEVQQLSEMDRIAGNTEFNQKLLDGSFGSATFQVGANANQITATTGNFRNNYGAQLTASATGAATTGATAGSAGAAAGTVVIA 200
SaImo NSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGTQFNGVKVLAQDN-TLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDTLNVQKQKVSQDAATVTGYADTTIALD 199
*.*.....* :.*...* *.*.**..*.*.....* * . :*.***** :.** ..:::*. * : ..::* :* * *..:

N1141 GLQTKTVNVAAGTASDIASAVNAVADSTGVTASARNVSEMKFSGTSFVLAVKGDNSTAAAVTFNVSATSTAAGLAEAVKAFNDVSSQTGVTAKLNSDS 300
SaImo NSTFKASATGLGGTDQKIDGDL-KFDDTTGKYYAKVTVTGGTGD-DGYYEVSVDKTN---GEVTLGGGATSPGTGLPAT-ATEDVKNVQVANADLTEAK 293
. * : .. ** . * : . . * . ** : * : .. * * : ** : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *

N1141 SGLILTNESGND-----INIANGSSSAAGITLASQD---AVTTQSSGTLTF-TSATAAGTGVTVASRGTVVEYKSKDKGYTVSGTGGMATATSTLTK 391
SaImo AALTAAGVTGTASVVKMSYTDNNGKITDGLLAVKVGDDYYSATQNKDGSISINTTKYTADDGTSKTALNKLGGADGKTEVVSIGGKTYAASKAEGHNFKA 393
:* :.* :.* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

N1141 VSDIDIVSTVDGSTKALKIIDAALSAVNGQRASFGALQSRFETVNNLQSTSENMSASRSRIQDADFAAETANLSRSQILQQAGTAMVAQANQLPQGVLSL 490
SaImo QPDLAEAAATTTENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTSARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVQNVLSL 493
.* : : : * : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

N1141 LR 492
SaImo LR 495
**

```

Fig. 1-20

N1141 フラジェリンの立体構造予測と *A. avenae* と *S. enterica* subsp. のフラジェリンアミノ酸配列

A. avenae N1141 菌株由来のフラジェリン一分子の立体構造予測。左右はそれぞれ 180° 回転したものを示す (上)。*A. avenae* と *S. enterica* subsp. のフラジェリンアミノ酸配列 (下)。立体構造予測は *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* のフラジェリン (PDB ID: 1UCU) を基に予測を行った。赤は flg22 領域、緑は CD2-1 領域を示す。

第二章

フラジェリン CD2-1 領域を認識する受容体の同定と その受容機構の解析

緒言

シロイヌナズナなどは FLS2 を介して flg22 を認識し PTI を誘導していることが明らかにされている (Gómez-Gómez and Boller *et al.*, 2000)。イネにおいても FLS2 のイネオルソログである OsFLS2 が同定されており、FLS2 と同様に flg22 を認識する能力を有することが示された (Takai *et al.*, 2008)。しかしながら、第 1 章で述べたようにイネの OsFLS2-RNAi 体では、フラジェリン認識能の減少は認められず、さらにイネはフラジェリンの flg22 領域を認識するのではなく、C 末端側の CD2-1 領域を認識することが示された。以上のことから、イネはフラジェリンの flg22 領域を認識する OsFLS2 だけでなく、CD2-1 領域を認識する新たな受容体を有することが示された。しかし、この CD2-1 領域を認識する受容体に関する情報は全くない。そこで本章では、イネにおけるフラジェリン受容体の同定とその受容機構の解析を試みた。

第2章

方法と材料

1. マイクロアレイ解析

フラジェリン下流で発現誘導される遺伝子の同定を行うために、以前得られたマイクロアレイデータを再解析した (Fujiwara *et al.*, 2004)。N1141 菌株、K1 菌株、N1141 フラジェリン、 Δ fla1141-2 菌株 (フラジェリン欠損株) を接種した培養細胞と水を処理した培養細胞を、0、1、3、6 時間後に回収し、回収した細胞から total RNA を抽出した。抽出した RNA から合成した cDNA をそれぞれ Cy3 もしくは Cy5 蛍光色素で標識した後、イネ 22K オリゴアレイチップにハイブリダイゼーションさせ、Cy3 と Cy5 の蛍光画像を Array Vision 5.1 (Amersham) で解析した。得られた定量データは、Gene Spring version 5.1 (Silicon Genetics) を用いて解析し、N1141 菌株と K1 菌株で異なる発現を示す遺伝子を選抜した。選抜した遺伝子の中で受容体型遺伝子とキナーゼをコードする遺伝子を抽出した。次に、抽出した遺伝子の接種後 0、1、3、6 時間の発現量変化を指標にして、N1141 菌株、K1 菌株、N1141 フラジェリン、 Δ fla1141-2 菌株接種後「増加なし」「N1141 菌株接種では増加するが、N1141 菌株由来フラジェリン接種では増加なし」「K1 菌株接種で増加」「 Δ flaN1141-2 菌株接種で増加」「N1141 菌株由来フラジェリン接種で増加」「1 時間後に N1141 菌株由来フラジェリン接種でのみ増加」の 6 グループに分類した。その中で、N1141 菌株由来フラジェリン接種で増加」のグループと「1 時間後に N1141 菌株由来フラジェリン接種でのみ増加」のグループに含まれている遺伝子を受容体候補とした。

さらに、イネ培養細胞に N1141 菌株を接種したものと未接種の培養細胞から total RNA を抽出し、これをもとに cDNA ライブラリーを構築した。この cDNA ライブラリーから、ランダムにクローンをピックアップし、配列解析を行った結果、重複のないユニークな 3,353 クローンを得た。この 3,353 クローンをテンプレートに用いて PCR によりインサートの cDNA 配列を増幅し、スライドガラスにスポットティングすることにより cDNA マイクロアレイを作製した。このマイクロアレイチップに、精製した N1141 菌株由来のフラジェリンを接種した培養細胞と水を接種した培養細胞から調製した cDNA をそれぞれ Cy3 または Cy5 蛍光色素で標識した後、ハイブリダイゼーションを行い、22K オリゴアレイと同様

に解析した。解析データから、N1141 菌株由来フラジェリン処理で発現が上昇し受容体型キナーゼをコードする遺伝子を受容体候補とした。

2. プラスミド

フラジェリン受容体候補遺伝子をイネプロトプラスト内で一過的に過剰発現させるベクターの作製を行った。アクセッションナンバーAK110075 と AK111851 (FliRK2) の ORF 領域をイネ完全長 cDNA (独立行政法人 農業生物資源研究所から分与) をテンプレートに増幅し、PCR 産物を *pENTR D-TOPO* へ TOPO[®] Cloning で導入した (*pENTR-AK110075*、*-FliRK2*) (方法は第 1 章を参照)。作製した *pENTR-AK110075*、*-FliRK2* を LR clonase 反応により 35S プロモーターを有する *pBI221* ベクターへ導入した (*pBI221-AK110075*、*-FliRK2*) (方法は第 1 章を参照)。また、FliRK2 については、イネプロトプラスト内での局在解析のために、終止コドンを除いた *pENTR-FliRK2-ns* を上記と同様に作製し、35S プロモーターと挿入遺伝子の下流に融合するように蛍光タンパク質の *Venus* 遺伝子が組み込まれた *pBI221* ベクターへ同様に導入した (*pBI221-FliRK2-Venus*)。

FliRK2 を高発現する形質転換体を作製するベクターを作るために、*pENTR-FliRK2* を LR clonase 反応により 2 × 35S プロモーターを有する *pMDC32* ベクターへ導入した (*pMDC32-FliRK2*) (方法は第 1 章を参照) (Curtis and Grossniklaus, 2003)。

FliRK2 のキナーゼドメインを欠損した FliRK2-ΔKD を高発現する形質転換体を作製するベクターを作るために、*pENTR-FliRK2* をテンプレートに特異的なプライマーセットを用いて Inverse PCR とそれに続く *DpnI* 処理、セルフライゲーションを行った (*pENTR-FliRK2-ΔKD*) (方法は第 1 章を参照)。作製した *pENTR-FliRK2-ΔKD* を LR clonase 反応により *pMDC32* ベクターへ導入した (*pMDC32-FliRK2-ΔKD*)。

【Rice full-length cDNA】

Accession number	Clone name
AK110075	002-160-F03
AK111851	J023150C23

【Primer sets】

Primer		Sequence
AK110075	F	<u>CACCATGGCAATGCCAGTTGGA</u>
	R	TTATTTACCACAAGCACGAAG
AK111851 (FliRK2)	F	<u>CACCATGTTCGAACACCTATCTCC</u>
	R	CTAAACAACGTGCACCACGA
FliRK2-ns	F	<u>CACCATGTTCGAACACCTATCTCC</u>
	R	AACAACGTGCACCACGA
FliRK2-ΔKD	F	GACGGCGCCGCTCCGCTGCTG
	R	GTTGCCGAGCACGTCCGACTCGGCG

二重線は TOPO クローニングサイトを示す。

3. レポーターアッセイ

イネプロトプラストを用いたレポーターアッセイは以前報告された方法を参考に行った (Takai *et al.*, 2008)。 *pBI221-AK110075*、 *pOsWRKY70-luc* (Firefly luciferase)、 *phRluc* (内部標準ベクター、 *Renilla luciferase*) または *pBI221-FliRK2*、 *pOsWRKY70-luc*、 *phRluc*、 コントロールとして *pBI221*、 *pOsWRKY70-luc*、 *phRluc* を導入したイネプロトプラストにエリシターを終濃度 500 nM となうように処理し、 30°C、 遮光条件で 5 時間インキュベートした。 イネプロトプラストを 200 × g、 室温で 5 分間遠心分離により回収し上清を取り除いた後、 50 μl の 1 × Passive lysis buffer (Dual-Luciferase[®] reporter assay system, Promega) を加え、 室温で 10 分間インキュベートした。 20 μl のイネプロトプラスト溶解液と 25 μl の Luciferase assay reagent II (beetle luciferin, Dual-Luciferase[®] reporter assay system) を混合し、 PHELIOS を用いて First luciferase 発光 (Firefly luciferase 由来) の定量を行った。 さらに、 25 μl の 1 × Stop Glo reagent (coelenterazine, Dual-Luciferase[®] reporter assay system) を混合し、 PHELIOS を用いて Second luciferase 発光 (*Renilla luciferase* 由来) の定量を行った。

fliRK2 から単離したイネプロトプラストに *pBI221-FliRK2*、 *pOsWRKY70-luc*、 *phRluc* を導入した場合のレポーターアッセイも上記と同様の方法で行った。

4. イネプロトプラストを用いた局在解析

pBI221-FliRK2-Venus を第 1 章で述べた方法に従い、イネ培養細胞から単離したイネプロトプラストに導入した。導入後 10~16 時間培養したイネプロトプラストを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (OLYMPUS, FLUOVIEW FV1000) で観察した。

5. *flirk2* 培養細胞の作製

イネ遺伝子挿入破壊株 *flirk2* (*Oryza sativa japonica* cv. Dongjin, homozygous T-DNA insertion) を第 1 章で述べた方法に従いカルスを誘導し、そのカルスを培養細胞化したものを実験に用いた。

【T-DNA insertion line】

Accession number	Tag line name	Institute
AK111851	3D-00010.R	Pohang University of Science and Technology

6. FliRK2 および FliRK2-ΔKD 形質転換体の作製

pMDC32-FliRK2 または *pMDC32-FliRK2-ΔKD* ベクターをエレクトロポレーションにより *A. tumefaciens* EHA105 菌株へ導入した。イネ野生株 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Kinmaze) には *pMDC32-FliRK2* を導入し、*flirk2* には *pMDC32-FliRK2* と *pMDC32-FliRK2-ΔKD* をそれぞれ導入した。形質転換は第 1 章で述べた方法に従い、培養細胞化したものを実験に用いた。コントロールとして、*ccdB* カセットを除いた *pMDC32-non-cassette* を同様の方法で形質転換した。

7. Total RNA 抽出と定量的リアルタイム RT-PCR

flirk2、*FliRK2/flirk2*、*FliRK2-ΔKD/flirk2*、*FliRK2* 高発現培養細胞からの total RNA 抽出と qRT-PCR は、第 1 章で述べた方法で行った。

【qRT-PCR 用 Primer set】

Primer		Sequence
FliRK2	F	GAGCCTGAGTCCGTGTCG
	R	CACCCTCTTGCTGTACCCATA

8. FliRK2 抗体の作製

FliRK2 抗体を作製するために、抗原部位の予測、抗原ペプチドの合成、免疫動物への接種、抗血清の精製を Sigma-Aldrich Japan に委託した。FliRK2 の細胞内領域の 712-729 (KVYRIHLTSRGGGATATA) を抗原部位としウサギへ免疫接種を行った。接種は 6 回 (抗原 700 μ g 分) 行い、1 回目の接種から 77 日後に全採血を行った。そこから抗血清を 50 ml 得た。

FliRK2 抗血清から IgG 抗体の精製を行うために、5 ml の抗血清に等量の 20 mM sodium phosphate buffer (pH7.0) を加え、0.45 μ m フィルターで濾過した。20 mM sodium phosphate buffer (pH7.0) で平衡化した HiTrap rProtein A FF (1 ml, GE Healthcare) に濾過したサンプルを添加し、4~5 時間、室温で吸着させた。10 ml の 20 mM sodium phosphate buffer (pH7.0) で洗浄した後、100 mM sodium citrate buffer (pH3.0) で溶出を行い、1 M Tris-HCl (pH9.0) で即座に中和した。溶出液を Amicon Ultra 10K により限外濾過を行い PBS に置換した。精製した FliRK2 抗体は 1 mg/ml となるように希釈し -80°C で凍結保存した。

9. FliRK2 高発現培養細胞からの膜画分の単離

膜画分の単離は、以前報告された方法を参考に行った (Abas and Luschnig, 2010)。FliRK2 高発現培養細胞 (600 mg) を液体窒素中で破砕し、600 μ l の 1.5 \times EB buffer (150 mM Tris-HCl (pH7.5), 1.215 M Sucrose, 7.5% (v/v) Glycerol, 15 mM EDTA (pH8.0), 15 mM EGTA (pH8.0), 7.5 mM KCl, 1.5 mM DTT) に懸濁した。懸濁液を Equilibration buffer (200 mM Tris-HCl (pH7.5), 1.37 M Sucrose, 20 mM EDTA (pH8.0), 20 mM EGTA (pH8.0), 10 mM KCl) で 2 時間平衡化した PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) ペレットに懸濁し、5 分間静置した。600 \times g、4°C で 3 分間、遠心分離後、上清を回収し沈殿に 300 μ l の 1.1 \times EB buffer を加え懸濁した。600 \times g、4°C で 3 分間遠心分離後、上清を回収した。回収したすべての上清を混合し 600 \times g、4°C で 3 分間、遠心分離し上清を回収した。さらに 10,000 \times g、4°C で 10 分間、遠心分離し上清を回収した。この遠心分離は 2 回行った。回収した上清を滅菌水で 6 倍希

積し (Sucrose 濃度が 0.2 M 以下)、21,000 × g、4°C で 2 時間、遠心分離した後、上清を取り除き、500 μl の Wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA) を加え 21,000 × g、4°C で 45 分間、遠心分離した。Wash buffer を取り除き、沈殿 (膜画分) を回収した。回収した膜画分は凍結保存せずにそのまま以降の実験に用いた。

10. Western Blot 解析

FliRK2 高発現培養細胞の膜画分と同様の方法でコントロール培養細胞から単離した膜画分を Resuspension buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 20% (v/v) Glycerol) に懸濁した。それぞれ 10 μg を 7.5% アクリルアミドゲルによる SDS-PAGE で分離し、続いて Western Blotting を行った。1 次抗体には FliRK2 抗体 (1:2000) を用い 2 次抗体には Anti-Rabbit IgG (H+L-chain)-HRP (1:2500, MBL) を用いた。ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で化学発光反応を行い、ImageQuant™ LAS-4000 (GE healthcare) を用いてシグナルを検出した。

11. ELISA

FliRK2 高発現培養細胞またはコントロール培養細胞の膜画分に 4 nmol の GST または GST を融合した CD2-0 を添加し、全量 1 ml となるように PBS (pH7.3) を加え懸濁後、4°C で一晩インキュベートした。21,000 × g、4°C、10 分間、遠心分離し上清を取り除き、架橋剤 BS³ (Thermo Scientific) を終濃度が 5 mM で全量 1 ml となるように PBS (pH8.0) を加え、4°C で 2 時間インキュベートした。Tris-HCl (pH7.5) を終濃度が 20 mM となるように添加し、室温で 15 分間静置することで架橋反応を停止させた。21,000 × g、4°C、10 分間、遠心分離し上清を取り除き、1 ml の PBS (pH8.0) で洗浄した。21,000 × g、4°C、10 分間、遠心分離し上清を取り除き、20 μl の PBS (pH7.3, 0.1% Triton X-100) に懸濁し、ELISA サンプルとした。

FliRK2 抗体を Coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃) で 1 μg/ml に希釈した。Nunc Maxsorp 96well プレート (Nunc) に 200 μl/well ずつ添加し、シールをして 4°C で一晩インキュベートした。FliRK2 抗体溶液を取り除いた後、Wash buffer (PBS (pH7.3), 0.05% (v/v) Tween20) を 200 μl/well ずつ加え 1 分間静置し、Wash buffer を取り除いた。この洗浄操作は 5 回行った。Blocking buffer (PBS (pH7.3), 0.05% (v/v) Tween20, 5% (w/v) BSA) を 200 μl/well ずつ分注し、室温で 2 時間インキュベートした。Blocking buffer を取り除いた後、

Wash buffer を 200 μ l/well ずつ加え 1 分間静置し、Wash buffer を取り除いた。洗浄操作は 5 回行った。ELISA サンプルの Triton X-100 の濃度が 0.01% となるように PBS (pH7.3) で希釈し、全量 200 μ l を添加後、室温で 2 時間インキュベートした。ELISA サンプル溶液を取り除いた後、Wash buffer を 200 μ l/well ずつ加え 1 分間静置し、Wash buffer を取り除いた。この洗浄操作は 5 回行った。GST-HRP 抗体 (MBL) を Antibody dilution buffer (PBS (pH7.3), 0.05% (v/v) Tween20, 0.1% (w/v) BSA) で 1 μ g/ml となるように希釈した。100 μ l/well ずつ分注し室温で 2 時間インキュベートした。GST-HRP 抗体溶液を取り除いた後、Wash buffer を 200 μ l/well ずつ加え 1 分間静置し、Wash buffer を取り除いた。この洗浄操作は 5 回行った。ECL prime western blotting detection system の検出液を 50 μ l/well ずつ分注し、遮光、室温で 5 分間インキュベートした後、検出液を取り除き、PHELIOS で化学発光を測定した (測定時間 5 秒)。

12. 阻害剤を処理したイネにおける PTI 誘導能試験

活性酸素の定量は第 1 章で述べた方法に従った。イネ培養細胞を 2 時間プレインキュベートさせた後、プロテインキナーゼ阻害剤である Staurosporine (終濃度 2 μ M) またはカルシウムイオン阻害剤である EGTA (終濃度 2 mM) を添加し、30°C で光照明下、30 分間インキュベートした。その後、第 1 章で述べた方法と同様にエリシター処理と活性酸素の測定を行った。

レポーターアッセイは第 1 章で述べた方法に従った。*pOsWRKY70-luc* をイネプロトプラストに導入し 30°C、遮光条件で 16 時間静置した後、Staurosporine (終濃度 2 μ M) を添加し、30°C、遮光条件で 30 分間インキュベートした。その後、第 1 章で述べた方法と同様にエリシター処理とレポーターアッセイを行った。

13. リン酸化 MAPK の検出

リン酸化 MAPK の検出は、以前報告された方法を参考に行った (Romeis *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2012)。イネ培養細胞に終濃度 1 μ M となるようにエリシターを処理後、0、5、10 分後の細胞 (packed volume 500 μ l) を回収し液体窒素中で破砕した。破砕した細胞を 1 ml の Extraction buffer (50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM DTT, 10 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 50 mM β -glycerophosphate, 1 mM AEBSF, 使用直前に 1% (v/v) Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)) で懸濁後、16,000 \times g、4°C、20 分間、遠心分離し上清を回収した。

回収した上清を Elution buffer (20 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM β-glycerophosphate, 使用直前に 1% (v/v) Protease inhibitor cocktail) で平衡化した NAP-5 カラムで置換を行った。溶出したサンプルは-80°Cで保存した。溶出サンプル 10 μg を 12.5%アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、続いて Western Blotting を行った。1 次抗体には Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体 (1:2000, Cell Signaling Technology)を用い 2 次抗体には Anti-Rabbit IgG (H+L-chain)-HRP (1:2500) を用いた。ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent で化学発光反応を行い、ImageQuant™ LAS-4000 を用いてシグナルを検出した。

14. FliRK2 高発現培養細胞における過敏感細胞死誘導能

過敏感細胞死の検出は、以前報告された方法を参考に行った (Che *et al.*, 1999)。FliRK2 高発現培養細胞またはコントロール培養細胞を 20 ml の新しい培地へ移し 30°C、光照明下、2 時間、プレインキュベートした。培養した *A. avenae* N1141 菌株を滅菌水で 1×10^{10} CFU/ml となるように希釈しプレインキュベートした培養細胞へ 1×10^8 CFU/20 ml となるように接種した。接種後 0、3、6、9、12 時間の細胞を回収し、0.05% (w/v) Evans blue stain solution を 1 ml 添加後、室温で 5 分間静置した。細胞を滅菌水で 3 回以上洗浄し、Destain solution (50% (v/v) Methanol, 1% (w/v) SDS) を 1 ml 加え、室温で一晩脱色した。脱色後の溶液の 595 nm における吸収を測定し、細胞死を定量した。

第2章

結果

1. DNA マイクロアレイ解析によるフラジェリン受容体候補の選抜

植物では、flg22 や、EF-Tu などの PAMP を処理すると、それぞれに対する受容体である FLS2 や EFR の発現量が増加することが報告されている (Zipfel *et al.*,2004; 2006)。そこで、イネにおけるフラジェリン受容体を同定するために、DNA マイクロアレイによりフラジェリンによって発現量が増加する遺伝子の解析を行った。フラジェリンにより発現上昇する遺伝子は、以前行われたマイクロアレイデータを再解析することで選抜した (Fujiwara *et al.*, 2004)。N1141 菌株、K1 菌株、精製 N1141 フラジェリン、 Δ fla1141-2 菌株 (フラジェリン欠損株) を接種したイネ培養細胞と水を処理したイネ培養細胞を、0、1、3、6 時間後に回収し、回収した細胞から total RNA を抽出した。抽出した RNA から合成した cDNA をそれぞれ Cy3 もしくは Cy5 蛍光色素で標識した後、イネ 22K オリゴアレイを行った。得られたデータを Benjamini and Hochberg 法によって FDR (False Discovery Rate) の有意水準を 0.01 に設定した多重検定と、さらに ANOVA (Analysis of variation) によって N1141 菌株と K1 菌株で異なる発現を示す 1,779 個の遺伝子を選抜した。この 1,779 個の遺伝子の中から、各遺伝子のアノテーションを基に受容体型キナーゼをコードしていると推定される遺伝子を探索したところ、69 個の遺伝子を選抜された。次に、この 69 個の遺伝子における N1141 菌株、K1 菌株、精製 N1141 フラジェリン、 Δ fla1141-2 菌株接種後 0、1、3、6 時間の発現量変化を、「増加なし」「N1141 菌株接種では増加するが、精製 N1141 フラジェリン処理では増加なし」「K1 菌株接種で増加」「 Δ flaN1141-2 菌株接種で増加」「精製 N1141 フラジェリン処理で増加」「1 時間後に精製 N1141 フラジェリン処理でのみ増加」の 7 グループに分別した。その結果、「増加なし」のグループには 26 個 (data not shown)、「N1141 菌株接種では増加するが、精製 N1141 フラジェリン処理では増加なし」のグループには 7 個 (data not shown)、「K1 菌株接種で増加」のグループには 7 個 (data not shown)、「 Δ flaN1141-2 菌株接種で増加」のグループには 9 個 (data not shown)、「精製 N1141 フラジェリン処理で増加」のグループには 5 個 (Fig. 2-1)、「1 時間後に精製 N1141 フラジェリン処理でのみ増加」のグループには 6 個の遺伝子が存在した (Fig. 2-2)。このようなカテゴリー分別を元に、「精

製 N1141 フラジェリン処理で増加」のグループと、「1 時間後に精製 N1141 フラジェリン処理でのみ増加」のグループに含まれている AK067635、AK105289、AK105683、AK111851、AK112096、AK065815、AK068451、AK068495、AK099402、AK103700、AK110482 の 11 個の遺伝子をフラジェリンによって誘導される受容体型キナーゼ遺伝子として同定した。

さらに、*A. avenae* 非病原性 N1141 菌株を接種したイネ培養細胞と未接種のイネ培養細胞から作製した cDNA ライブラリーにより作製した重複のない 3,353 個の cDNA マイクロアレイを用いた解析も行った。精製 N1141 フラジェリンを処理したイネ培養細胞から調製した cDNA と水処理を行った細胞から調製した cDNA をそれぞれ Cy3 と Cy5 で標識し、作成したマイクロアレイチップにハイブリダイゼーションを行った。それぞれの蛍光を測定し、22K オリゴアレイと同様に統計解析したところ、精製 N1141 フラジェリン処理で発現が上昇する 102 クローンを同定した。そこで、この 102 クローンから受容体型キナーゼをコードする遺伝子を探索したところ、AK066121、AK110075、AK111590、AK111710、AK111733 の 5 つの遺伝子が含まれていることが明らかとなった (Fig. 2-3)。

以上のように、異なる二種類のマイクロアレイ解析によって、合計 16 個の遺伝子 (AK067635、AK105289、AK105683、AK111851、AK112096、AK065815、AK068451、AK068495、AK099402、AK103700、AK110482、AK066121、AK110075、AK111590、AK111710、AK111733) をフラジェリン受容体候補遺伝子として選抜した。

2. フラジェリン受容体遺伝子の同定

選抜した受容体型キナーゼ遺伝子の中から、フラジェリン受容体をコードした遺伝子を同定するために、まず、選抜した 16 個の遺伝子がコードするタンパク質の構造予測を行った。その結果、一回膜貫通型の受容体をコードする遺伝子が 12 個存在していた (AK067635、AK105289、AK111851、AK065815、AK068495、AK099402、AK110482、AK066121、AK110075、AK111590、AK111710、AK111733)。さらに、これらの遺伝子を構造別にカテゴライズすると、細胞外に LRR ドメインのみを持つものが 2 個 (AK065815、AK066121)、細胞内にキナーゼドメインのみを持つものが 2 個 (AK105289、AK110482)、細胞外に LRR ドメインを持ち細胞内にキナーゼドメインを持つものが 8 個であった (AK067635、AK111851、AK068495、AK099402、AK110075、AK111590、AK111710、AK111733) (Fig. 2-4)。また、これら 16 個のタンパク質の細胞内局在予測を行った。その結果、細胞外に LRR ドメインのみを持つ 2 個 (AK065815、AK066121) と細胞内にキナーゼドメインのみを持つ 2 個

(AK105289、AK110482) は細胞膜に局在することが予測された (Fig. 2-4)。また、細胞外に LRR ドメインを持ち細胞内にキナーゼドメインを持つ 8 個のうち、AK068495 はミトコンドリアに、AK067635 と AK111733 は葉緑体に、AK111851、AK110075、AK111590、AK111710 は細胞膜に局在すると推定され、膜貫通領域を持たない細胞内キナーゼである AK105683、AK112096、AK068451、AK103700 は細胞質に、AK099402 はその局在が不明であることも示された (Fig. 2-4)。そこで、細胞膜に局在することが予測され、細胞外に LRR ドメインと細胞内にキナーゼドメインを持つ 4 個のうち、受容体と成り得る完全な LRR ドメインを持つ AK110075、AK111851 をフラジェリン受容体候補として選抜した。

次に、この 2 つの遺伝子がフラジェリン認識に関与するかを調べるために、これら遺伝子と *OsWRKY70* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターをイネプロトプラストに一過的に発現させ、フラジェリンに対する感受性の変化を *OsWRKY70* のプロモーター転写活性を指標に調べた。その結果、AK110075 を導入したイネプロトプラストに 500 nM となるように精製 N1141 フラジェリンを処理した場合、処理 5 時間後にコントロールであるベクターのみを導入したイネプロトプラストに精製 N1141 フラジェリンを処理した場合と同様に、水処理の 1.3 倍程度のプロモーター転写活性を示した (Fig. 2-5)。一方、AK111851 を導入したイネプロトプラストに 500 nM となるように精製 N1141 フラジェリンを処理した場合は、処理 5 時間後に水処理の 2 倍程度のプロモーター転写活性を示し、コントロールであるベクターのみを導入したイネプロトプラストに精製 N1141 フラジェリンを処理した場合よりも有為なプロモーター転写活性の上昇が認められた (Fig. 2-5)。

この結果から、AK111851 を高発現させるとフラジェリンに対する感受性が増加することが明らかになり、この AK111851 が CD2-1 の受容に関与するタンパク質をコードする可能性が示された。そこで、この遺伝子を *Flagellin-induced receptor kinase 2 (FliRK2)* と名付けさらなる解析を行った。

3. FliRK2 のタンパク質構造と細胞内局在

選抜した FliRK2 がイネにおけるフラジェリン受容体であるのかを解析するにあたり、まず、このタンパク質のアミノ酸配列から推定される詳細な構造を調べた。その結果、FliRK2 は、N 末端に 25 アミノ酸から成る Signal peptide が存在し、続いて 43 アミノ酸から成る LRR N-terminal domain、22 個の LRR から成る LRR domain を持っていた (Fig. 2-6)。

さらに続いて、23 アミノ酸から成る Transmembrane domain を1つ、C末端領域には286 アミノ酸から成る Serine/Threonine kinase domain を持つことも明らかになった (Fig. 2-6)。また、細胞外領域には推定上の N-グリコシル化部位が14ヶ所存在し、細胞外領域が糖鎖修飾されている可能性が示された (Fig. 2-6)。さらに、細胞内の Serine/Threonine kinase domain には、推定上のキナーゼ活性残基 (Asp) が1ヶ所存在し、この Asp 残基はこれまでにキナーゼ活性を有することが報告されている Serine/Threonine kinase において保存されていたことから、FliRK2 の Serine/Threonine kinase domain もキナーゼ活性を有する可能性も明らかになった (Fig. 2-6, 7)。また、キナーゼ活性残基 (Asp) に隣接するアミノ酸が Arg であったことから、この Serine/Threonine kinase domain は RD kinase グループに属することが明らかになった (Fig. 2-6)。

次に、FliRK2 は Signal peptide を持っており、細胞膜に局在することが推定されていたが、実際にこの FliRK2 が細胞膜に局在するかどうかを調べた。FliRK2 の C 末端に蛍光タンパク質 GFP の改変型である Venus を融合した FliRK2-Venus を発現するベクターを作製し、イネプロトプラストで一過的に発現させ共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を察した。その結果、イネプロトプラストの細胞膜上で FliRK2-Venus 由来の蛍光が観察されたことから、予測通り FliRK2 は細胞膜に局在することが明らかになった (Fig. 2-8)。

4. *flirk2* 変異体における PTI 誘導能

FliRK2 がイネにおいてフラジェリン認識に関与しているかどうかを明らかにするために、*FliRK2* 遺伝子の 5'UTR に T-DNA が挿入された遺伝子破壊株 (Fig. 2-9) を取得し、フラジェリン認識能などについて調べることにした。まず、取得した遺伝子破壊株を自植させることにより T-DNA ホモ系統を作出した (data not shown)。次に、植物体では栽培条件などにより個体間差が認められ、フラジェリン認識能を調べるに当たり支障があると考えられたため、*flirk2* 変異体培養細胞 (*flirk2*) を作製した。*flirk2* 変異体 (homozygous T-DNA insertion) の種子からカルスを作成し、それを液体培養することで培養細胞化を行った。実験には、細胞塊が均一になるまで培養した細胞を用いた。このように作成した、*flirk2* における *FliRK2* mRNA の発現量を qRT-PCR により定量したところ、コントロールである野生株 (WT) の *FliRK2* mRNA の発現量を 100%とした場合の *flirk2* における *FliRK2* mRNA の発現量は 1%以下であることも明らかになった (Fig. 2-9)。

flirk2 における PTI 誘導能を調べるために、PTI の1つである活性酸素の発生を指標に実

験を行った。*flirk2* に精製 N1141 フラジェリン、*flg22*、CD2-0 を 200 nM となるように処理し、処理 1.5 時間後の活性酸素発生を調べたところ、イネ野生株 (WT) では処理 1.5 時間後に精製 N1141 フラジェリン処理でコントロールである水処理の 14 倍程度、CD2-0 処理でコントロールである水処理の 17 倍程度の活性酸素発生が認められるのに対して、*flirk2* では、処理 1.5 時間後に精製 N1141 フラジェリン処理または CD2-0 処理の場合、コントロールである水処理の 2 倍程度しか認められず、ネガティブコントロールである *flg22* を加えたときと同程度の活性酸素量であった (Fig. 2-10)。以上のように、*FliRK2* 遺伝子を破壊するとフラジェリン感受性が喪失されることが明らかになり、*FliRK2* 遺伝子はイネにおいて CD2-1 の受容に関与するタンパク質をコードする可能性が示唆された。

5. *flirk2* 変異体への *FliRK2* 導入による PTI 誘導能の相補

flirk2 において認められた PTI 誘導能の減少が *FliRK2* を欠失したことによるものかを調べるために、*flirk2* 培養細胞から単離したイネプロトプラストに *FliRK2* を発現するベクターと *OsWRKY70* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを導入し、フラジェリン認識能が回復するかどうかを *OsWRKY70* のプロモーター活性を指標に調べた。その結果、ベクターのみを導入した *flirk2* イネプロトプラストに 500 nM となるように精製 N1141 フラジェリンを処理した場合には、処理 5 時間後においてコントロールである水処理と同様に、プロモーター活性の上昇は認められなかったが、*FliRK2* を導入した *flirk2* イネプロトプラストに 500 nM となるように精製 N1141 フラジェリンを処理した場合は、処理 5 時間後にコントロールである水処理の 1.3 倍程度の有意なプロモーター活性の上昇が認められた (Fig. 2-11)。このことから、*flirk2* に一過的に *FliRK2* を発現させることでフラジェリン認識能が回復することが明らかになった。

次に、*flirk2* に *FliRK2* 全長、または *FliRK2* のキナーゼドメインを欠損させた *FliRK2-ΔKD* を恒常的に発現させたイネにおける PTI 誘導能について調べた。*FliRK2* または *FliRK2-ΔKD* を *Agrobacterium* 法により *flirk2* へ導入し、これらの挿入遺伝子を持つ培養細胞ラインを確立した (*FliRK2/flirk2*、*FliRK2-ΔKD/flirk2*)。また、コントロールとしてベクターのみを導入した培養細胞ラインについても同様に確立した (*Empty/flirk2*)。qRT-PCR によりこれら形質転換体の *FliRK2* mRNA の発現量を定量したところ、*Empty/flirk2* における *FliRK2* mRNA の発現量は未導入の *flirk2* の *FliRK2* mRNA の発現量と同様に WT と比較して 1%以下であり、ほとんど発現が認められなかった (Fig. 2-9)。また、*FliRK2/flirk2*、*FliRK2-ΔKD/flirk2*

は、FliRK2 の高発現による影響を取り除くために、それぞれ *FliRK2/flirk2* の *FliRK2* mRNA の発現量が WT の 130%程度、*FliRK2-ΔKD/flirk2* の *FliRK2* mRNA の発現量が WT の 105%程度と WT と同程度の *FliRK2* mRNA の発現量を示す個体を選抜した (Fig. 2-9)。

そこで、作製した *FliRK2/flirk2* または *FliRK2-ΔKD/flirk2* における PTI 誘導能を調べるために、200 nM となるように flg22、CD2-0 を処理した各形質転換培養細胞における活性酸素の発生量を調べた。その結果、*FliRK2/flirk2* に flg22 を処理した場合は、WT に flg22 を処理した場合と同様に活性酸素の発生は認められず、*FliRK2/flirk2* に CD2-0 を処理した場合には、WT に CD2-0 を処理した場合と同様に水処理の 10 倍程度まで活性酸素発生が認められた。一方、コントロールである *Empty/flirk2* では有意な活性酸素発生量の増加は認められなかった (Fig. 2-12)。一方、*FliRK2-ΔKD/flirk2* に flg22 を処理した場合は、WT に flg22 を処理した場合と同様に活性酸素の発生は認められないが、*FliRK2-ΔKD/flirk2* に CD2-0 を処理した場合でも水処理の 4 倍程度までしか活性酸素発生が認められなかった (Fig. 2-12)。以上のように、*flirk2* に恒常的に FliRK2 を発現させた場合でもフラジェリン認識能が回復することが明らかになり、さらに FliRK2 キナーゼドメイン欠損株ではこの様な相補が認められなかったことから、このキナーゼドメインがフラジェリン認識後の情報伝達に重要であることが明らかになった。

6. FliRK2 高発現培養細胞における PTI 及び ETI 誘導能

シロイヌナズナの flg22 受容体である FLS2 は、発現量を増加させると PTI が強まり、さらに PTI に引き続いて起こるより強い免疫反応である ETI も亢進するという報告がある (Gómez-Gómez and Boller *et al.*, 2000; Zipfel *et al.*, 2004)。そこで、FliRK2 の機能をさらに解析するために、FliRK2 を恒常的に高発現する形質転換体を作製し、PTI または ETI 誘導能への影響を調べた。

まず、FliRK2 高発現形質転換体の作製を行った。2 × 35S プロモーターの下流に FliRK2 の ORF を連結したベクターを *Agrobacterium* 法によりイネ野生株に導入し、この挿入遺伝子を持つ 2 つの培養細胞ラインを確立した (OX-1、OX-2)。また、コントロールとしてベクターのみを導入した 2 つ培養細胞ラインについても同様に確立した (Cont-1、Cont-2)。qRT-PCR により各形質転換体の *FliRK2* mRNA の発現量を定量したところ、OX-1 における *FliRK2* 発現量は Cont-1 と Cont-2 における *FliRK2* 発現量に比べて約 40 倍、OX-2 における *FliRK2* 発現量は約 30 倍であり、両ラインとも *FliRK2* の発現量が著しく増加していること

が示された (Fig. 2-13)。また、FliRK2 抗体を用いた Western Blot により各形質転換体の FliRK2 タンパク質量についても測定したところ、OX-1 と OX-2 共に、Cont-1 と Cont-2 よりも明瞭な FliRK2 タンパク質の蓄積が認められ、タンパク質レベルでも高発現していることが明らかになった (Fig. 2-13)。

そこで次に、これら FliRK2 高発現培養細胞における PTI 誘導について調べた。様々な濃度の CD2-0 を FliRK2 高発現培養細胞 (OX-1) とコントロール培養細胞 (Cont-2) に処理した場合の活性酸素発生を測定した結果、CD2-0 を処理した OX-1 における活性酸素発生量は、200 nM 処理までは濃度依存的な増加が認められたが、500 nM 処理から活性酸素発生量の減少が認められ、1 μ M 処理ではほとんど活性酸素発生が認められなかった (Fig. 2-14)。また、CD2-0 を処理した Cont-2 における活性酸素発生量も、OX-1 の場合と同様に 200 nM 処理までは濃度依存的な増加が認められたが、500 nM 処理から活性酸素発生量の減少が認められ、1 μ M 処理ではほとんど活性酸素発生が認められなかった (Fig. 2-14)。このときの OX-1、Cont-2 の最大活性濃度を 200 nM とした場合、EC₅₀ を算出すると OX-1 の EC₅₀ は 6.8 nM、Cont-2 の EC₅₀ は 13.7 nM となった (Fig. 2-14)。この結果から、FliRK2 を高発現させることにより CD2-0 に対する感受性が増加することが示され、PTI が亢進していることが明らかになった。

さらに、FliRK2 高発現培養細胞における ETI 誘導について調べるために、 1×10^8 CFU の *A. avenae* 非病原性 N1141 菌株を FliRK2 高発現培養細胞 (OX-1、OX-2) とコントロール培養細胞 (Cont-1、Cont-2) に接種した場合の過敏感細胞死をエバンスブルー染色により検出した。その結果、N1141 菌株を接種した Cont-1、Cont-2 では共に接種 6 時間後から過敏感細胞死が認められ、その後徐々に過敏感細胞死が増加し、12 時間後には接種前の 3 倍程度になることが示された (Fig. 2-15)。一方、N1141 菌株を接種した OX-1 は、接種 3 時間後から過敏感細胞死の誘導が認められ、Cont-1、Cont-2 と同様にその後徐々に過敏感細胞死が増加し、接種 12 時間後には Cont-1、Cont-2 よりもより強い過敏感細胞死が認められた (Fig. 2-15)。また、N1141 菌株を接種した OX-2 も、OX-1 と同様に接種 3 時間後から過敏感細胞死が誘導され始め、6、9、12 時間後には Cont-1、2 よりも有意に強い過敏感細胞死が誘導された (Fig. 2-15)。これらのことから、FliRK2 の高発現株においては、ETI も亢進していることが明らかになった。

7. FliRK2 高発現培養細胞を用いた FliRK2 とフラジェリンの相互作用解析

これまでの結果から、FliRK2 がフラジェリン認識に関与することが示された。そこで、実際に FliRK2 がフラジェリンと相互作用するかを ELISA により解析した。FliRK2 高発現培養細胞 (OX-2) またはコントロール培養細胞 (Cont-2) から単離した膜画分に 4 nmol の GST、または GST を融合した CD2-0 (GST-CD2-0) を添加し、4°C で一晩インキュベートすることで結合反応を行った。その後、架橋剤である BS³ を添加することにより結合したタンパク質間を化学的に架橋し、これを ELISA サンプルとした。ELISA サンプルを界面活性剤である Triton X-100 を含む溶液に懸濁し可溶化させたあと、FliRK2 抗体を固定化した ELISA 用プレートに添加し、室温で 2 時間インキュベートした。その後、HRP を融合した GST 抗体と反応させ、化学発光を検出することによりタンパク質間の結合を確認した。その結果、OX-2 由来の膜画分に GST-CD2-0 を処理した場合、発光量が 8×10^7 Relative light unit (RLU) となり、Cont-2 由来の膜画分に GST-CD2-0 を処理した場合の発光量、 4×10^7 RLU より有意に高いことが示された (Fig. 2-16)。また、OX-2 由来の膜画分にリガンドのコントロールである GST を処理した場合は、発光量が 5×10^7 RLU であり、GST-CD2-0 を処理した場合より低いことも示された (Fig. 2-16)。一方、Cont-2 由来の膜画分に GST-CD2-0 を処理した場合とリガンドのコントロールである GST を処理した場合は、発光量が 4×10^7 RLU であり、両者間にほとんど差が無いことも明らかとなった (Fig. 2-16)。そこで次に、どの程度の結合能を有するか調べるために、 K_d 値と B_{max} 値の算出を行った。その結果、 B_{max} が 0.75 pmol/mg total protein で、 K_d 値は 0.195 μ M であった (Fig. 2-17)。この結果から、FliRK2 は GST-CD2-0 と相互作用することが示され、FliRK2 がイネにおけるフラジェリン受容体であることが明らかになった。

8. FliRK2 を介したフラジェリン認識後の情報伝達

FliRK2 がイネにおけるフラジェリン受容体であることが明らかになったため、次に FliRK2 を介したフラジェリン認識後の情報伝達機構について解析を行った。

まず、フラジェリン認識後の情報伝達にタンパク質のリン酸化が関与するか調べるために、プロテインキナーゼ阻害剤である Staurosporine を処理したイネ培養細胞における PTI 誘導を調べた。Staurosporine を 2 μ M となるように前処理したイネ培養細胞に flg22、CD2-0 を終濃度 200 nM になるように処理し、処理 1 時間後の活性酸素の発生量を定量した。その結果、Staurosporine を前処理していないイネ培養細胞に CD2-0 を処理した場合は、処理 1 時間後に水処理の 8 倍程度の活性酸素発生が認められるのに対して、Staurosporine を

前処理したイネ培養細胞に CD2-0 を処理した場合、処理 1 時間後でも水処理と同程度の活性酸素発生しか認められず有為に活性酸素発生量が減少していた (Fig. 2-18)。一方、Staurosporine を前処理したイネ培養細胞に flg22 を処理した場合、Staurosporine を前処理していないイネ培養細胞に flg22 を処理した場合と同様に、処理 1 時間後においてもほとんど活性酸素量の増加は認められなかった (Fig. 2-18)。

また、*OsWRKY70* のプロモーター活性を指標とした Staurosporine の影響についても調べた。*OsWRKY70* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを導入したイネプロトプラストに Staurosporine を 2 μ M となるように前処理した。このように Staurosporine を前処理していないイネプロトプラストに CD2-0 を処理した場合は、処理 5 時間後に CD2-0 処理前の 2 倍程度のプロモーター活性の上昇が認められるのに対して、Staurosporine を前処理したイネプロトプラストに CD2-0 を処理した場合、処理 5 時間後でも CD2-0 処理前と同程度のプロモーター活性しか認められなかった (Fig. 2-19)。一方、Staurosporine を前処理したイネプロトプラストに flg22 を処理した場合、Staurosporine を前処理していないイネプロトプラストに flg22 を処理した場合と同様に、処理 5 時間後においても、プロモーター活性の上昇は認められなかった (Fig. 2-19)。

次に、フラジェリン認識後の情報伝達にカルシウムイオンの細胞内流入が関与するかを調べるために、カルシウムイオンキレート剤である EGTA を 2 mM となるように前処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生を調べた。その結果、EGTA を前処理していないイネ培養細胞に CD2-0 を処理した場合は、処理 1 時間後に水処理の 10 倍程度の活性酸素発生が認められるのに対して、EGTA を前処理したイネ培養細胞に CD2-0 を処理した場合、処理 1 時間後でも水処理と同程度の活性酸素発生量しか認められなかった (Fig. 2-19)。一方、EGTA を前処理したイネ培養細胞に flg22 を処理した場合、EGTA を前処理していないイネ培養細胞に flg22 を処理した場合と同様に、処理 1 時間後においても、水処理と同程度の活性酸素発生量しか認められなかった (Fig. 2-20)。これらの結果から、FliRK2 を介したフラジェリン認識後の情報伝達には、タンパク質リン酸化とカルシウムイオンの細胞内流入が関与することが示された。

シロイヌナズナにおいて、FLS2 による flg22 の認識情報の伝達に MAPK である AtMPK3、4、6 のリン酸化が関与することが報告されている (Asai *et al.*, 2002)。そこで、イネにおいても FliRK2 によるフラジェリンの認識情報の伝達に MAPK カスケードが関与するかを調べるために、シロイヌナズナとイネ培養細胞に精製 N1141 フラジェリン、flg22、CD2-0

を 1 μ M となるように処理し、処理 5、10 分後の細胞を回収後、タンパク質を抽出し Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体を用いた Western Blot 解析によりリン酸化 MAPK を検出した。その結果、シロイヌナズナ培養細胞に精製 N1141 フラジェリンまたは flg22 を処理した場合、処理 5 分後から AtMPK3、4、6 のリン酸化が認められた (Fig. 2-21)。一方、シロイヌナズナ培養細胞に CD2-0 を処理した場合は処理 5、10 分後においてもこのような AtMPK3、4、6 のリン酸化は認められなかった (Fig. 2-21)。対照的に、イネ培養細胞に精製 N1141 フラジェリンを処理した場合は処理 5 分後から MAPK のリン酸化が認められ、また、イネ培養細胞に CD2-0 を処理した場合でも処理 5 分後から精製 N1141 フラジェリンを処理した場合よりも強く、複数の MAPK のリン酸化が認められた (Fig. 2-21)。一方、イネ培養細胞に flg22 を処理した場合は処理 5、10 分後においてもそのような MAPK のリン酸化は認められなかった (Fig. 2-21)。また、イネ培養細胞で認められた MAPK のリン酸化は、プロテインキナーゼ阻害剤である Staurosporine を処理することで消失した (Fig. 2-21)。これらの結果から、イネにおける FliRK2 を介したフラジェリン認識後の情報は MAPK カスケードにより細胞内に伝達されることが明らかになった。

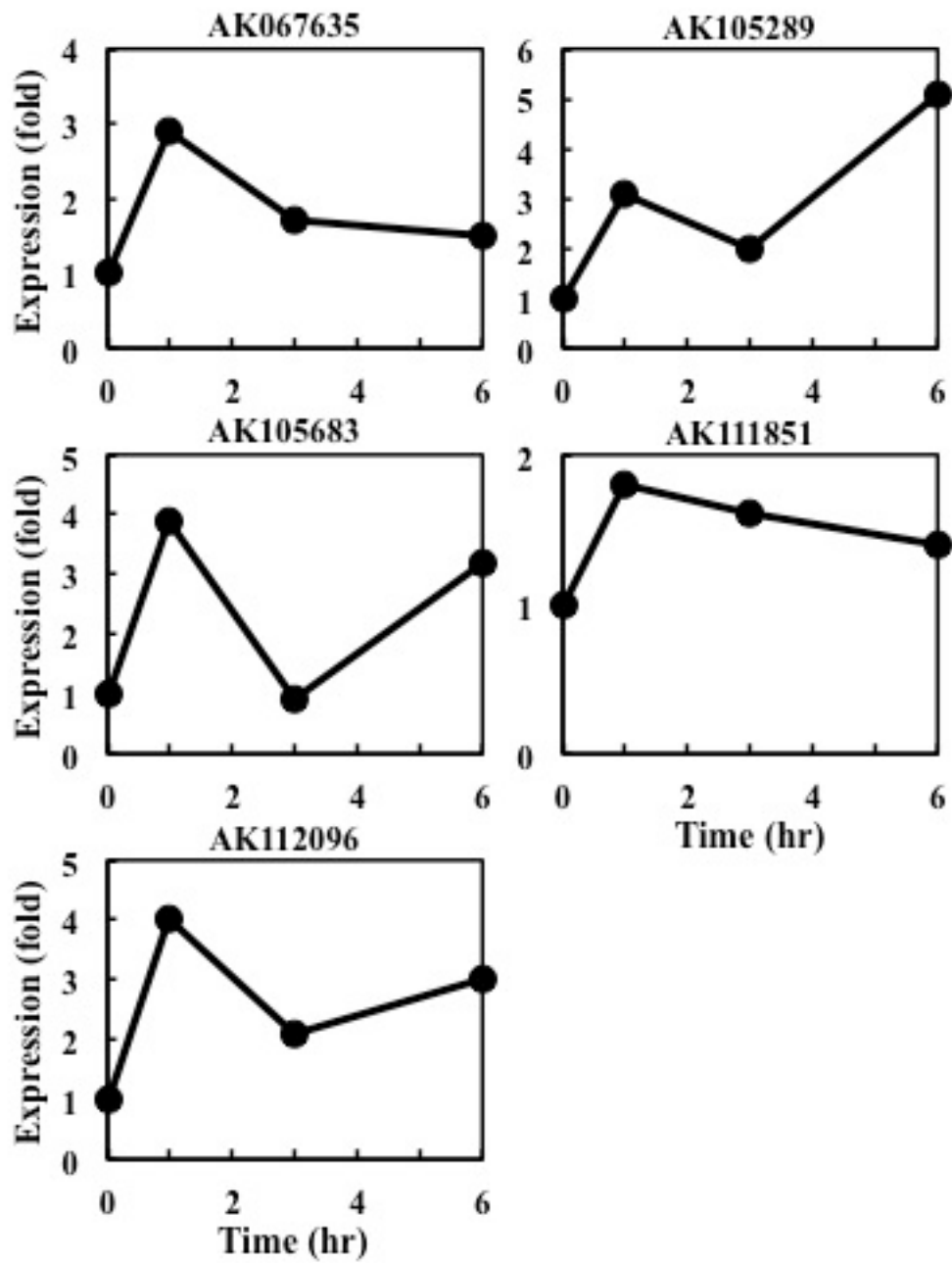


Fig. 2-1

精製 N1141 フラジェリン処理により発現量が増加した遺伝子群

22K オリゴ DNA マイクロアレイ解析結果より精製 N1141 フラジェリン処理で発現量の増加が認められた遺伝子群。

縦軸は処理 0 時間を 1 としたときの発現量を示し、横軸は処理後の時間を示す。

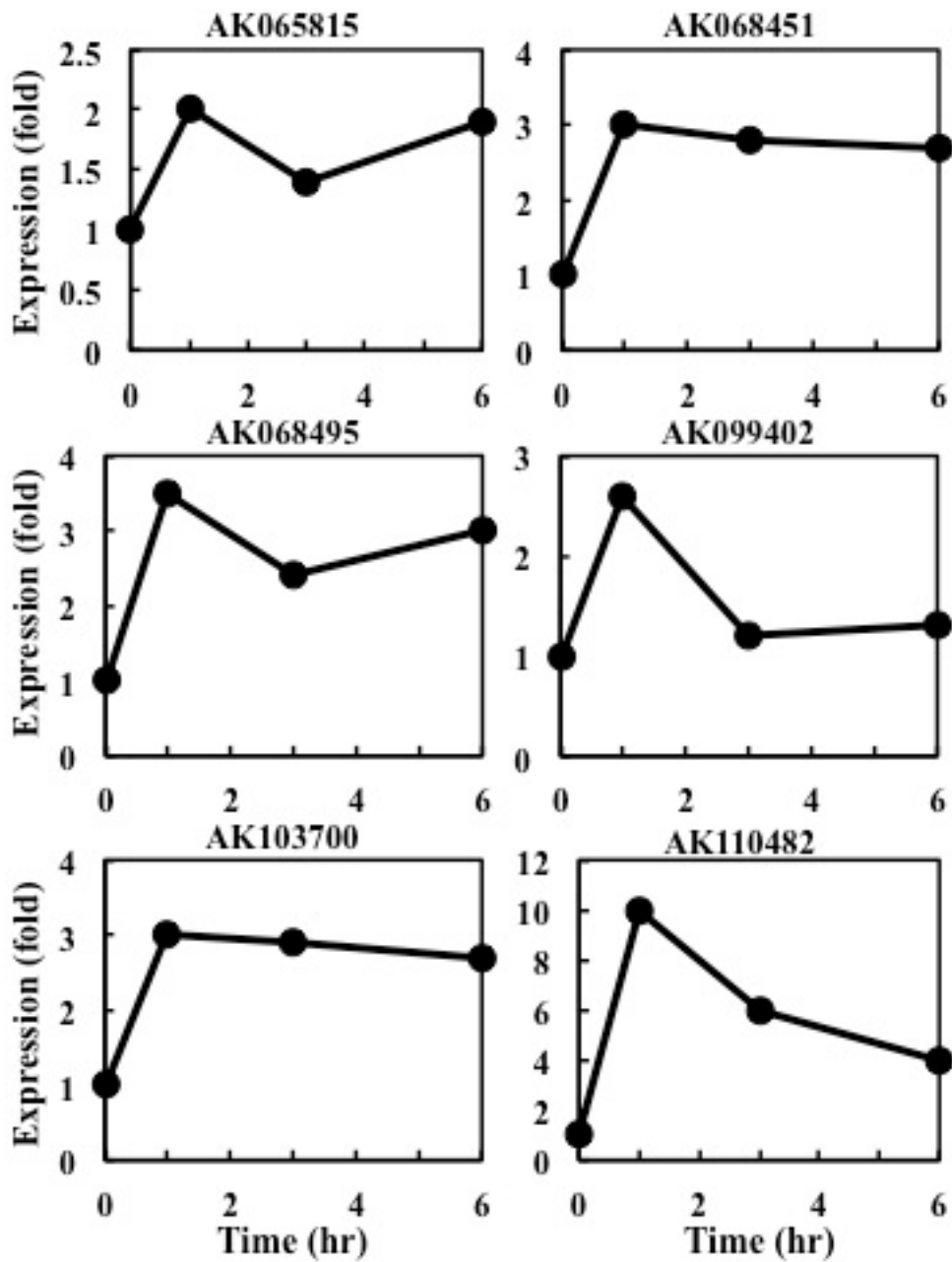


Fig. 2-2

精製 N1141 フラジェリン処理 1 時間後に特異的に発現量が増加した遺伝子群

22K オリゴ DNA マイクロアレイ解析結果より精製 N1141 フラジェリン処理 1 時間後に特異的に発現量の増加が認められた遺伝子群。

縦軸は処理 0 時間を 1 としたときの発現量を示し、横軸は処理後の時間を示す。

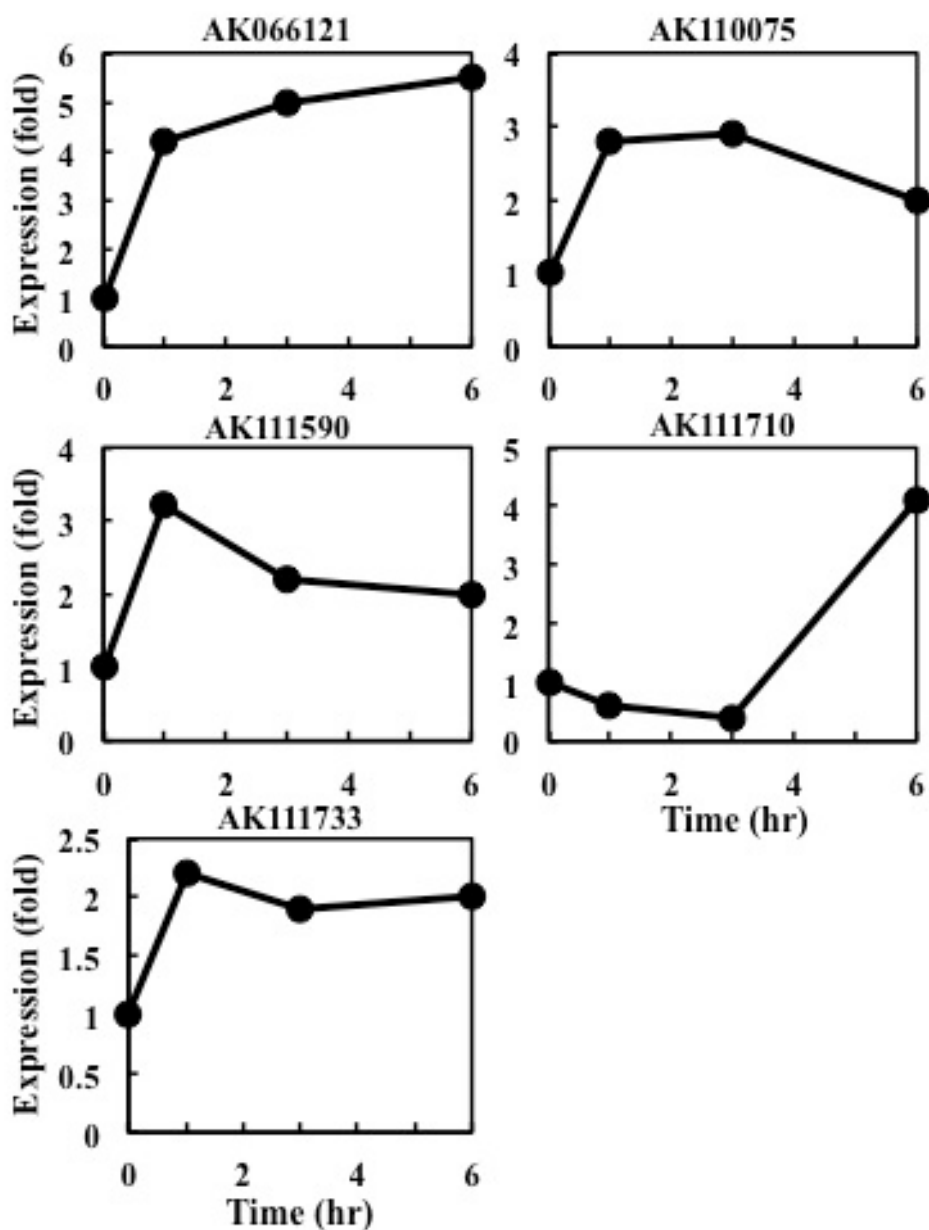


Fig. 2-3

精製N1141フラジェリンにより発現誘導される受容体型キナーゼをコードする遺伝子群

cDNA マイクロアレイ解析結果より N1141 フラジェリンにより発現誘導され、受容体型キナーゼをコードする遺伝子群。

縦軸は処理0時間を1としたときの発現量を示し、横軸は処理後の時間を示す。

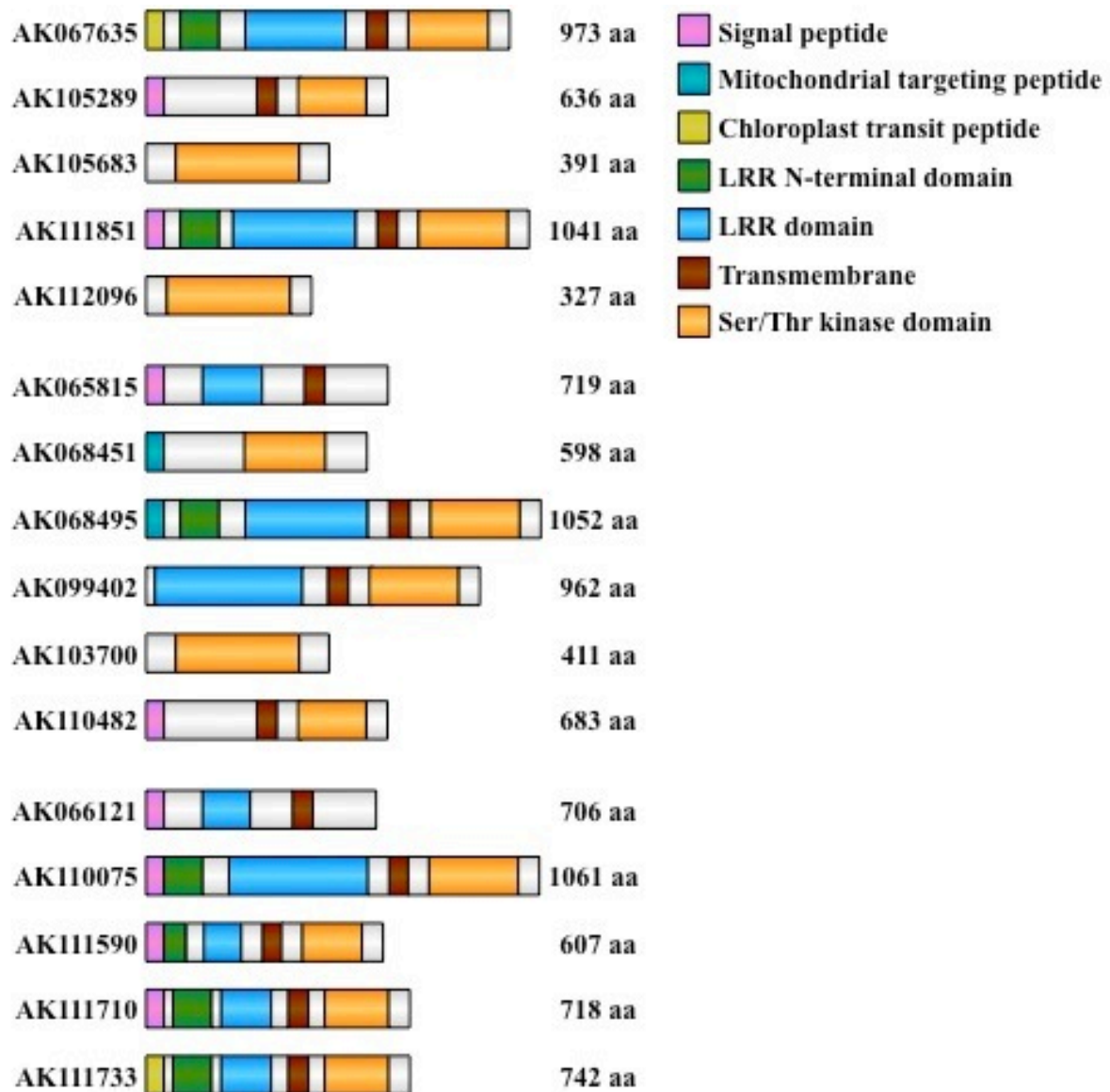


Fig. 2-4

N1141 フラジェリンにより発現上昇した遺伝子がコードするタンパク質の予想される構造

N1141 フラジェリンにより発現上昇した遺伝子がコードするタンパク質の構造。それぞれ Fig. 2-1 の 5 遺伝子 (上)、Fig. 2-2 の 6 遺伝子 (中)、Fig. 2-3 の 5 遺伝子 (下)を示す。Accession number とアミノ酸数は構造の左右に示した。

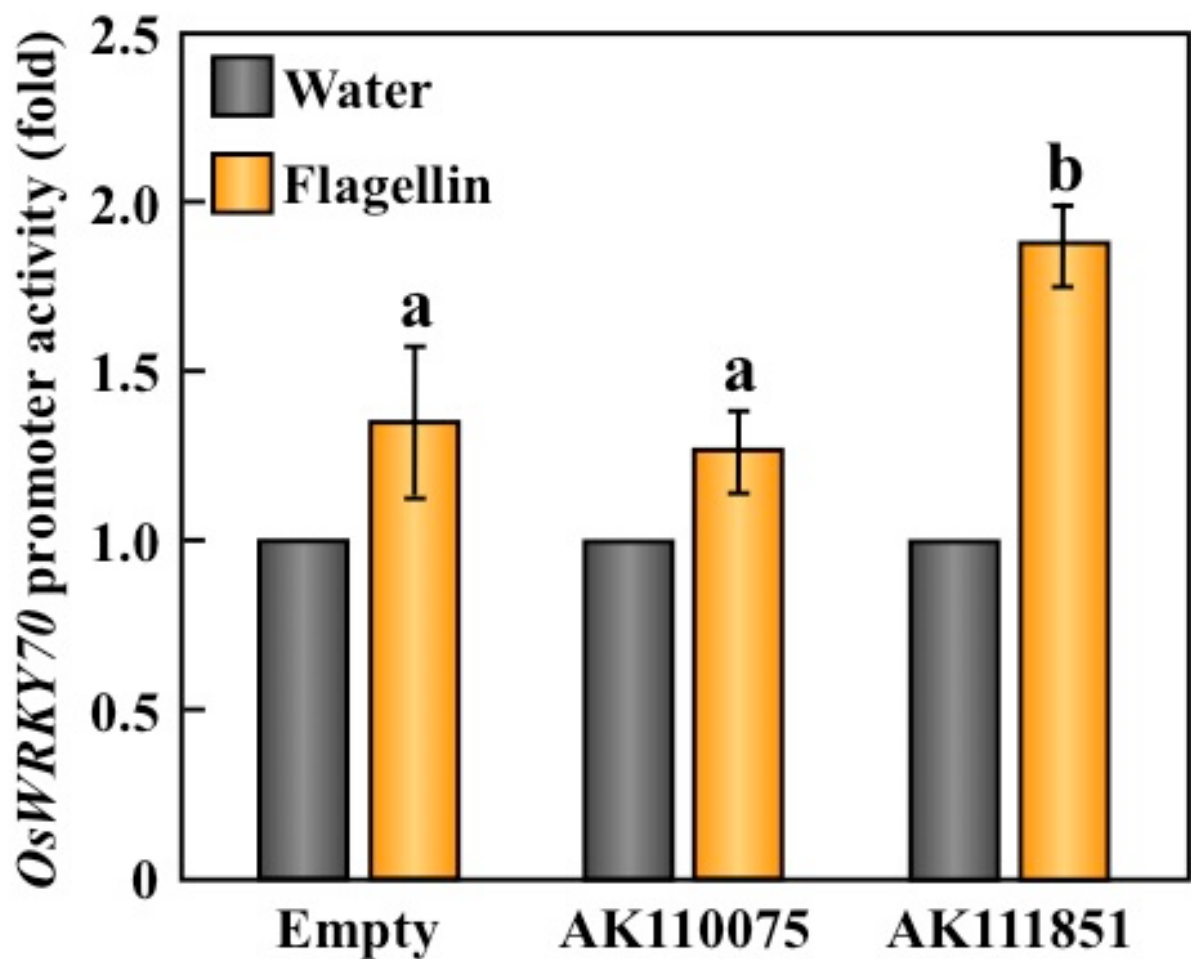


Fig. 2-5

受容体候補遺伝子を高発現させたイネプロトプラストにおける *OsWRKY70* のプロモーター転写活性

受容体候補遺伝子 (AK110075、AK111851) を一過的に高発現させたイネプロトプラストに 500 nM の精製 N1141 フラジェリン、コントロールとして水を処理した場合の *OsWRKY70* のプロモーター転写活性。プロモーター転写活性は、処理 5 時間後に測定を行った。

縦軸は各サンプルにおける 0 時間を 1 としたときのプロモーター転写活性を示す。実験は 5 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。a, b は $p < 0.05$ (Tukey's test) を示す。

Signal peptide (1–25)
MSNTYLPLLALVAGVLLLAAGCAA

LRR N-terminal domain (26–68)
AAGDRDTLVAIRKGWGNPRHLASWD
PASAAAADHCSWEGVTCS

NATTGGGGG

LRR domain (78–604)
AGVVTELSLHDM**N**LTGTVPTAVCD
LASLTRLDLSSNQLTGAFPAALSR
CARLRFLDLANNALD GALPQHVGRL
SPAMEHL**N**LSSNRLSGAVPPEVAA
LPALRSLLLDTNRFTGAYPAAEIA**N**
LTALERLTLADNGFAPAPVPPAFAK
LTKLTYLWMSKM**N**ITGEIPEAFSS
LTELTLLDMSGNKLTGAIPAVVFR
HQKLERLYLYENSLSGELPR**N**VT
TANLVEIDLSSNQLGGEISEDFGN
L**N**L**S**LLFLYFNKVTGAIPASIGR
LP**N**LTDLRLFGNELSGELPPELGK
NSPLANFEVS**N**NLSGALPETLCA
NGKLFDIVVF**N**NSFSGELPANLGD
CVLLNNLMLYNNRFTGDFPEKIWS
FQKLTTVMIQNGFTGALPAEI
ST**N**ISRIEMGNMFSGSIPTS
ATKLTVFRAENLLAGELPADMS**N**
LTDLTDLSVPGNRISGSIPASIRL
LVKLNSL**N**LSSNRISGVIPPASFGT
LPALTILDLSGNELTGDIPADLG
YLNFN**S**L**N**VSSNRLTGEVPLTLQGA

Outer juxtamembrane domain (605–643)
AYDRSFLGNSLCARPGSGTNLPSCP
GGGGGGGGHDELSK

Transmembrane domain (644–666)
GLIVLFSMLAGIVLVGSAGIAWL

Inner juxtamembrane domain (667–698)
LLRRRKDSQDVTDWKMTQFTPLDFA
ESDVLGN

Serine/Threonine kinase domain (699–984)
IREENVIGSGGSGKVYRIHLTSRGG
GATATAGRMVAVKKIWNARKLDAKL
DKEFEAEVTVLGNIRHNNIVKLLCC
ISSQDAKLLVYEYMENGLDRWLHH
RDRDGAPAPLDWPTRLAIAVDAARG
LSYMHHDCAQAIVHR**D**VKSSNILLD
PEFQAKIADFGLARMLVKSSEPESV
SAIGGTFGYMAPEYGYSKRVNEKVD
VYSFGVLLLELTGKVVANDAAADFC
LAEWARRRYQKGGPFDDVIDADIRE
QASLPDIMSFTLVGVICTGENPPAR
PSMKEVLHHLI

C-terminal (985–1041)
RCDRMSAQGPEACQLDYVDGAAPLL
EAKKGSRRRSSESGRWDDDDDDDDSG
NFVVHV

Fig. 2-6

FliRK2 (AK111851) のアミノ酸配列から予想される構造

アミノ酸配列から予想される FliRK2 の構造は、細胞外に Signal peptide、LRR N-terminal domain、22 個 LRR から成る LRR domain を持ち、細胞内には Serine/Threonine kinase domain を持つ一回膜貫通型の受容体キナーゼである。

X は LRR の Consensus sequence ([L, C, M]-x-x-[L, I, V, M]-x-x-[L, F]-x-[L, F]-x-x-N-x-[L, F]-[T, F]-G-x-I-P-x-x-[L, I, F, M]-[G, F, A]-x)、**N** は推定上の糖鎖修飾部位、**D** はキナーゼドメインの推定上の活性残基を示す。

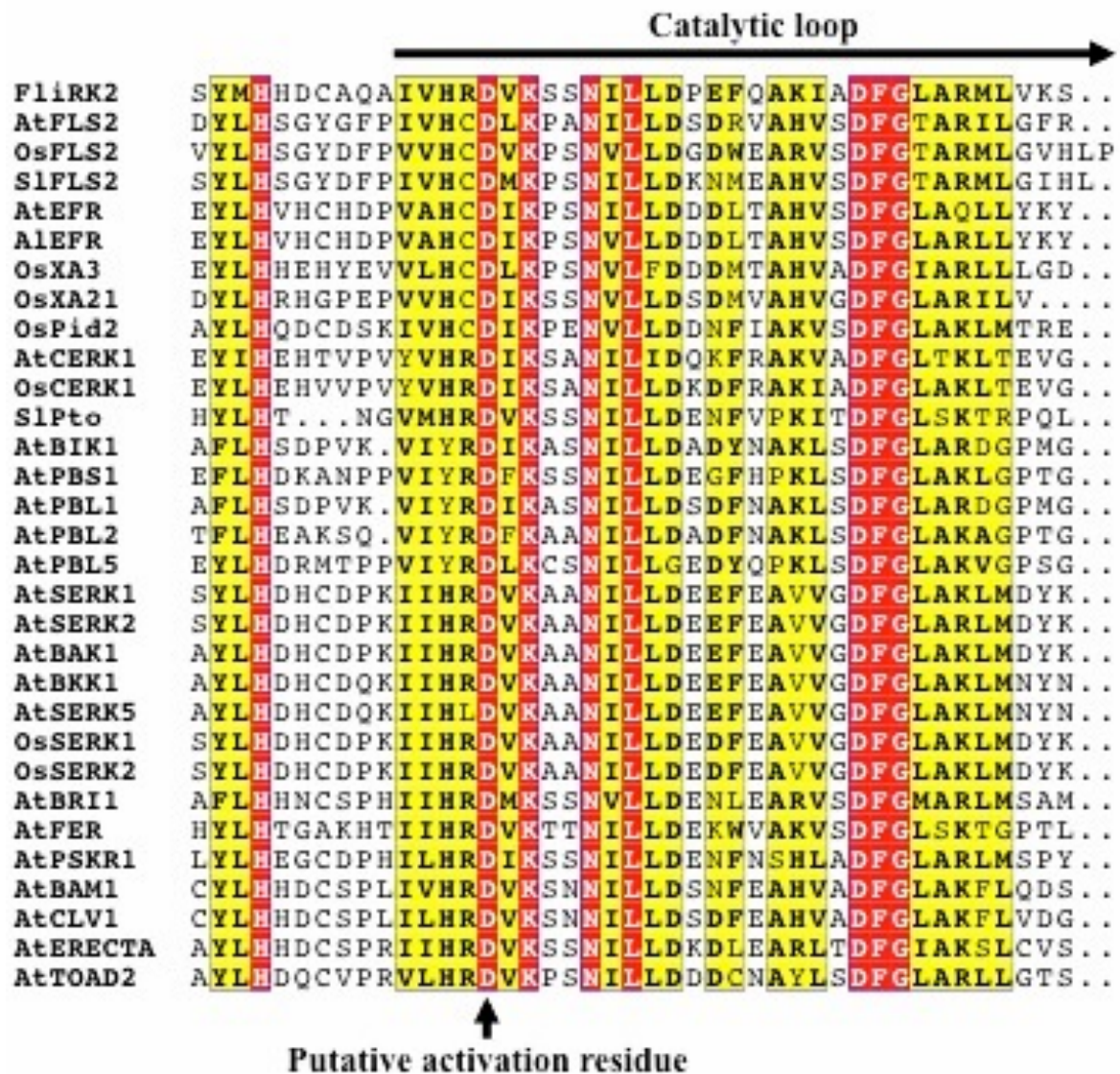


Fig. 2-7

既知の植物受容体型キナーゼと **FliRK2** のキナーゼドメインにおけるアライメント

Ser/Thr kinase domain を有する受容体型キナーゼと **FliRK2** の Ser/Thr kinase domain のアライメント。黄色は相同性 70%以上、赤色は相同性 100%を示す。

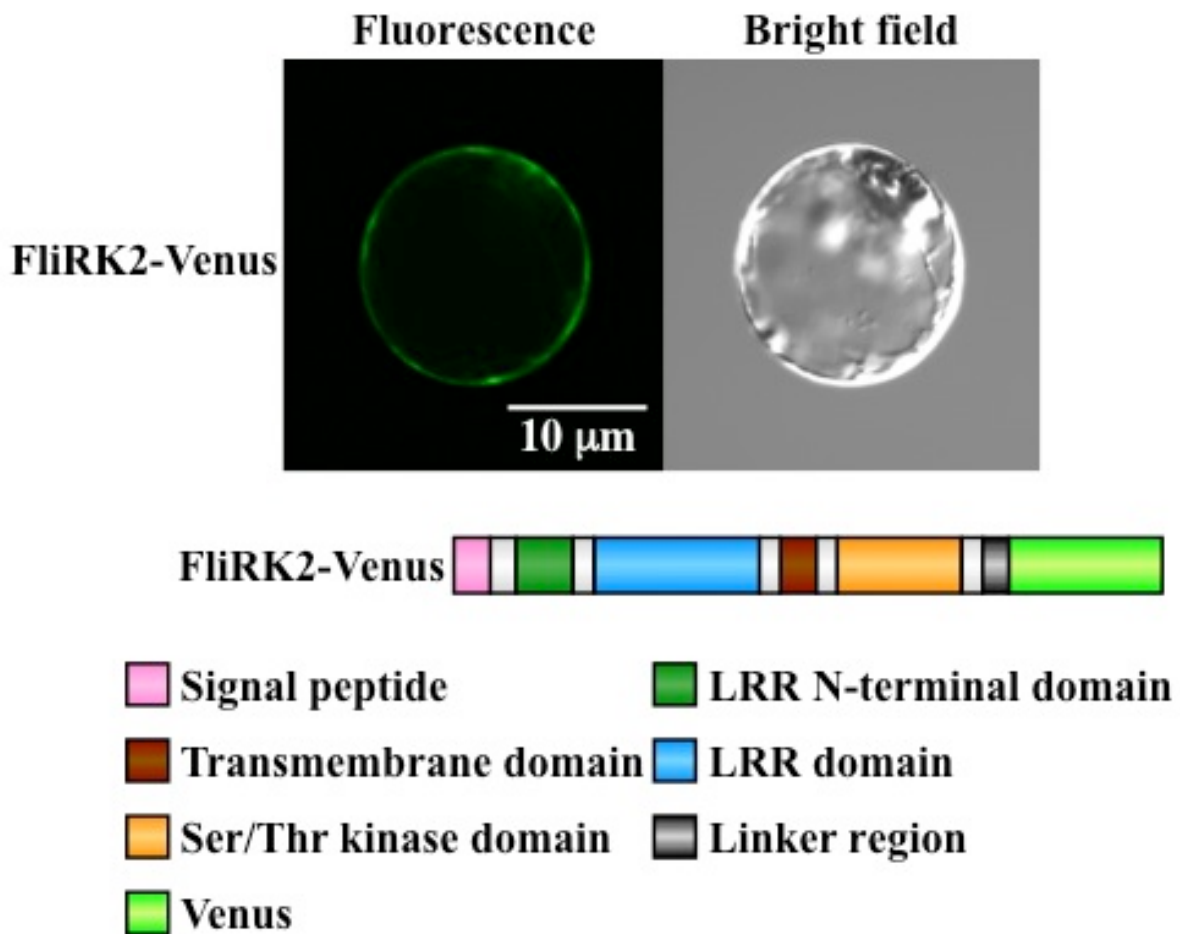


Fig. 2-8

FliRK2-Venus のイネプロトプラスト内における局在

FliRK2 の C 末端に蛍光タンパク質 GFP の改変型である Venus を融合した FliRK2-Venus を発現するベクターをイネプロトプラストに一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で局在を観察した。導入後 10-16 時間後のイネプロトプラストを観察した。

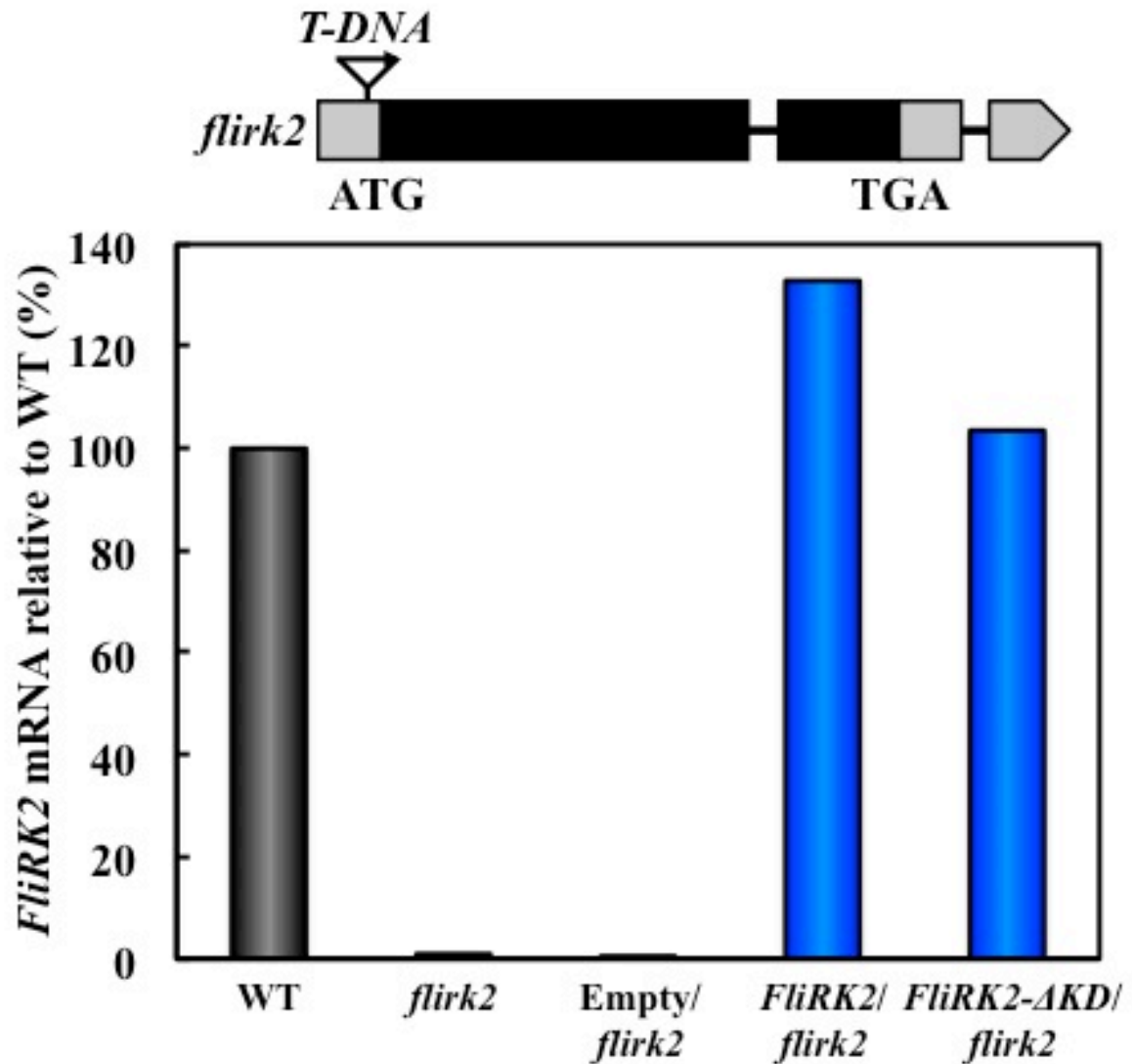


Fig. 2-9

flirk2 変異体培養細胞及び *FliRK2/flirk2*、*FliRK2-ΔKD/flirk2* 形質転換体における *FliRK2* mRNA の発現量

flirk2 変異体の T-DNA 挿入位置 (上)。 *flirk2* 変異体培養細胞及び *flirk2* 変異体に *FliRK2* を発現させた形質転換体 (*FliRK2/flirk2*)、 *flirk2* 変異体に *FliRK2-ΔKD* を発現させた形質転換体 (*FliRK2-ΔKD/flirk2*)、コントロールとしてベクターのみを導入した形質転換体 (Empty/*flirk2*) における *FliRK2* mRNA の発現量は、qRT-PCR により定量した (下)。

縦軸はコントロールである野生株 (WT) の発現量を 100%としたときの相対値を示す。

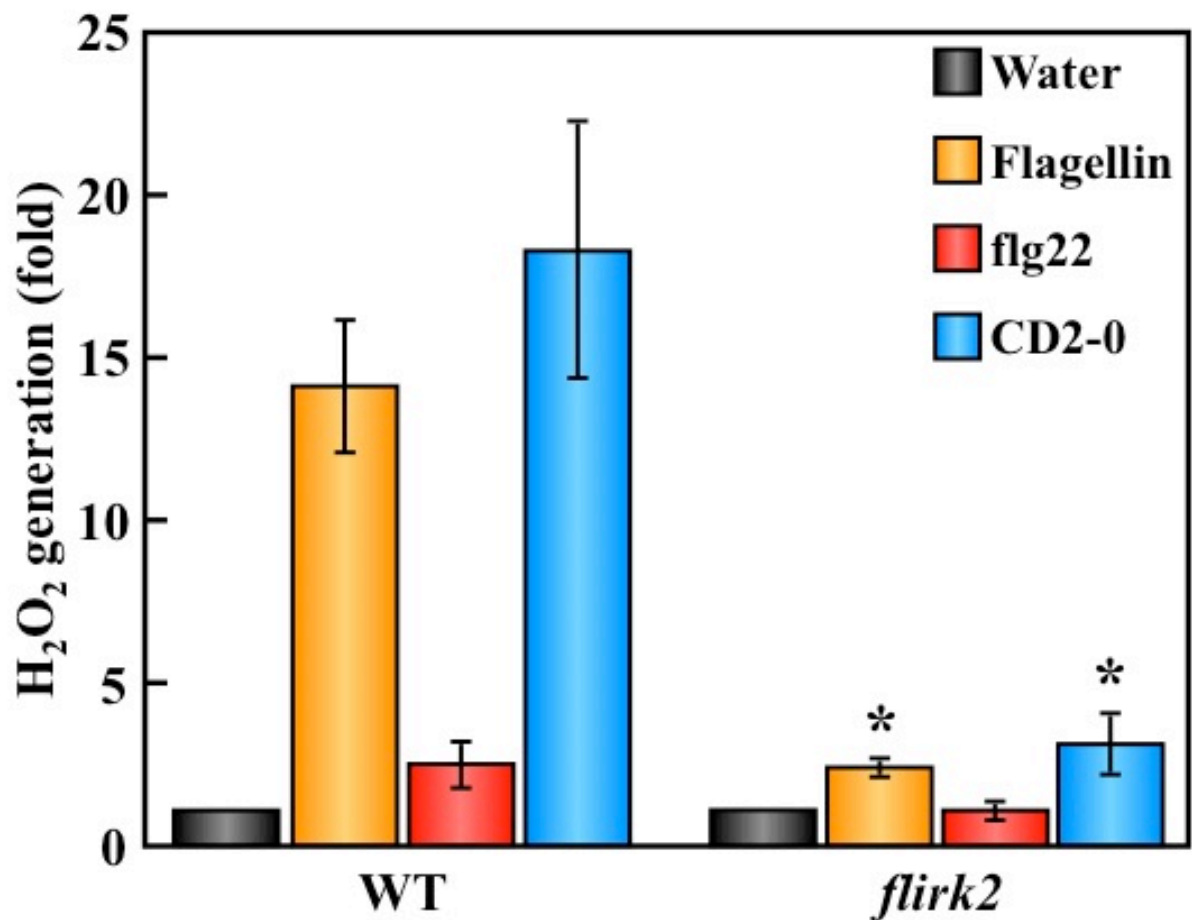


Fig. 2-10

flirk2 変異体培養細胞における活性酸素の発生

200 nM の精製 N1141 フラジェリン、flg22、CD2-0、コントロールとして水を処理した *flirk2* 変異体培養細胞における活性酸素の発生。活性酸素の発生は、処理 1.5 時間後に測定を行った。

縦軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示す。実験は 5 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は WT と比較したときの有意差を示す ($p < 0.01$, t-test)。

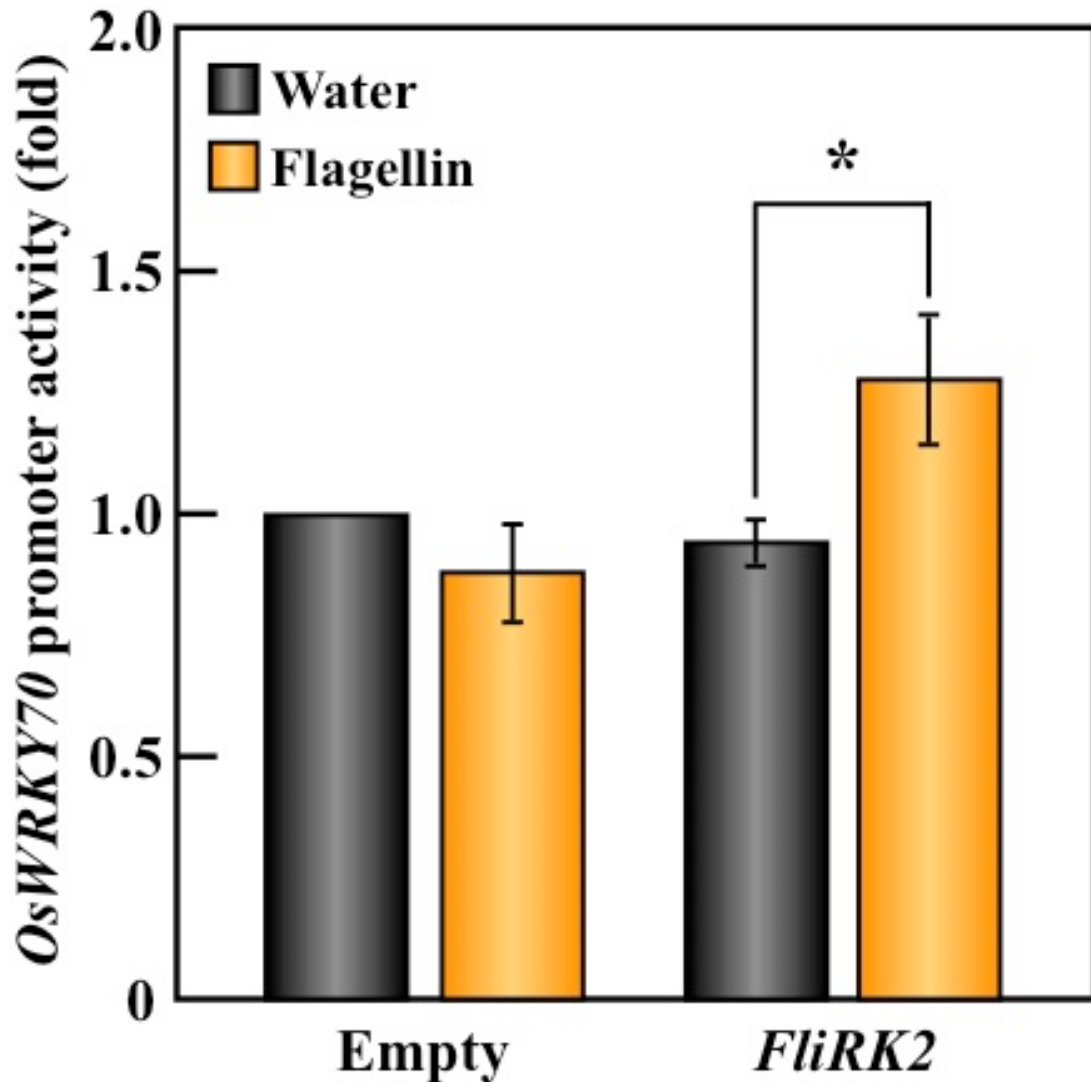


Fig. 2-11

FliRK2 を発現させた *fliRK2* 変異体イネプロトプラストにおける *OsWRKY70* のプロモーター転写活性

FliRK2 を一過的に発現させた *fliRK2* 変異体由来のイネプロトプラストに 500 nM の精製 N1141 フラジェリン、コントロールとして水を処理した場合の *OsWRKY70* のプロモーター転写活性。プロモーター転写活性は、処理 5 時間後に測定を行った。

縦軸は Empty の水処理を 1 としたときのプロモーター転写活性を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.05$ (t-test) を示す。

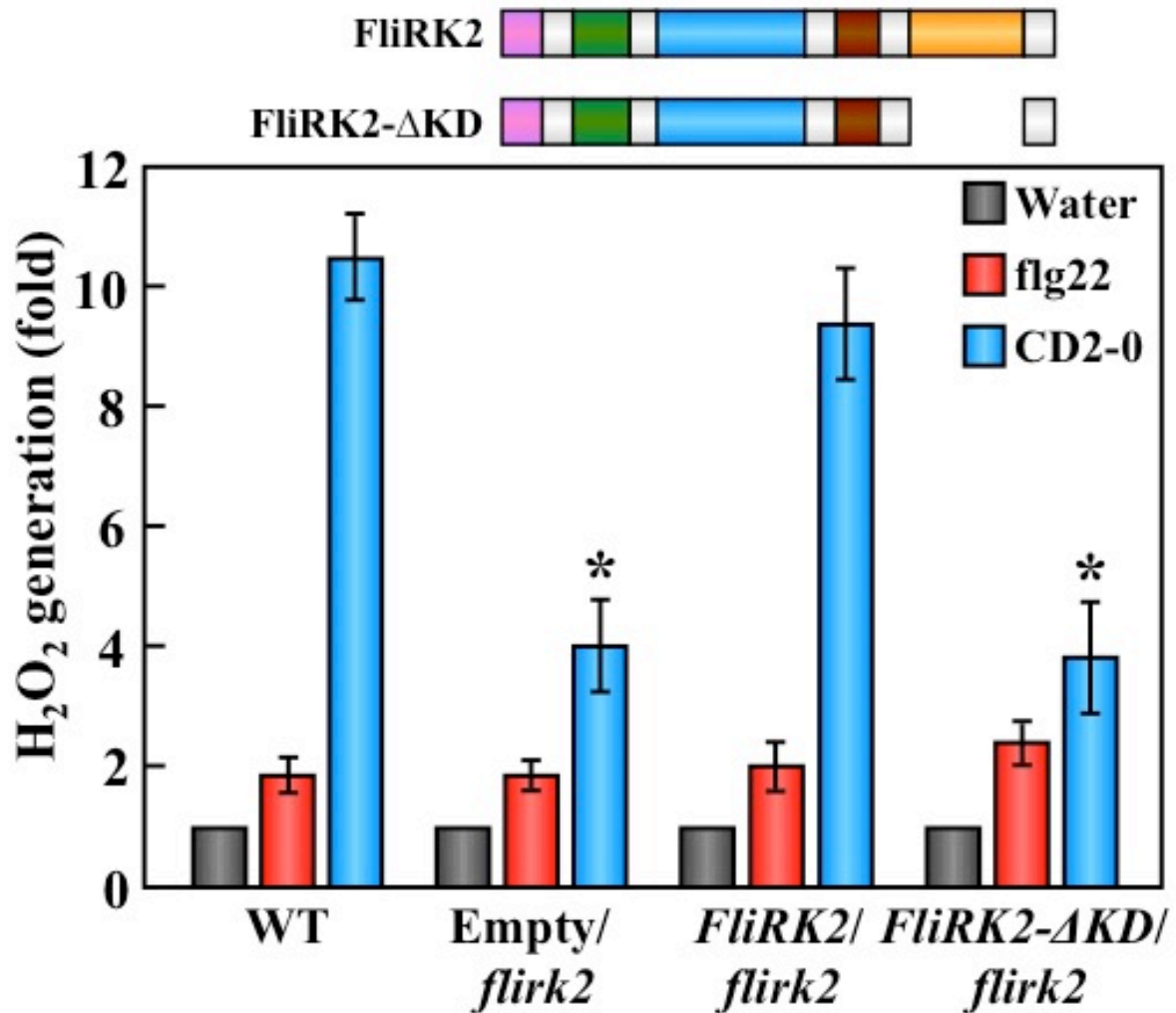


Fig. 2-12

FliRK2/flirk2、*FliRK2-ΔKD/flirk2* 形質転換体における活性酸素の発生

flirk2 変異体に発現させた全長の *FliRK2* とキナーゼドメインを欠損させた *FliRK2-ΔKD* の構造 (上)。200 nM の *flg22*、CD2-0 を処理した野生株 (WT)、*flirk2* 変異体に *FliRK2* を発現させた形質転換体 (*FliRK2/flirk2*)、*flirk2* 変異体に *FliRK2-ΔKD* を発現させた形質転換体 (*FliRK2-ΔKD/flirk2*)、コントロールとしてベクターのみを導入した形質転換体 (*Empty/flirk2*) における活性酸素の発生 (下)。活性酸素の発生は、処理 1.5 時間後に測定を行った。

縦軸は各培養細胞の水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は WT と比較したときの有意差を示す ($p < 0.05$, t-test)。

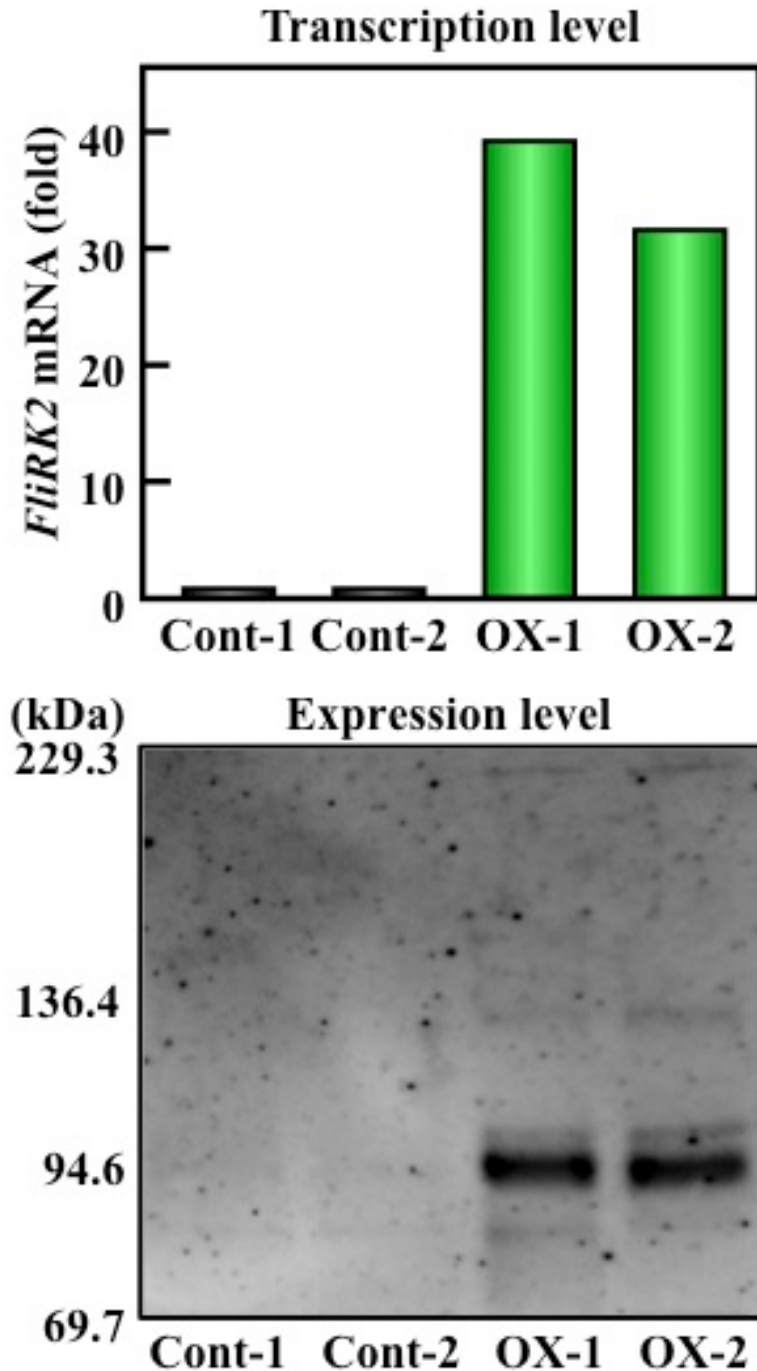


Fig. 2-13

FliRK2 高発現培養細胞における FliRK2 の発現解析

野生株に FliRK2 を高発現させた形質転換培養細胞ライン (OX-1、OX-2) における *FliRK2* mRNA の発現量 (上) と FliRK2 タンパク質量 (下)。*FliRK2* mRNA は qRT-PCR により定量し、FliRK2 タンパク質量は FliRK2 抗体を用いた Western Blot 解析により確認した。

FliRK2 mRNA の発現量の縦軸は2つコントロールラインの平均値を1としたときの発現量を示す。

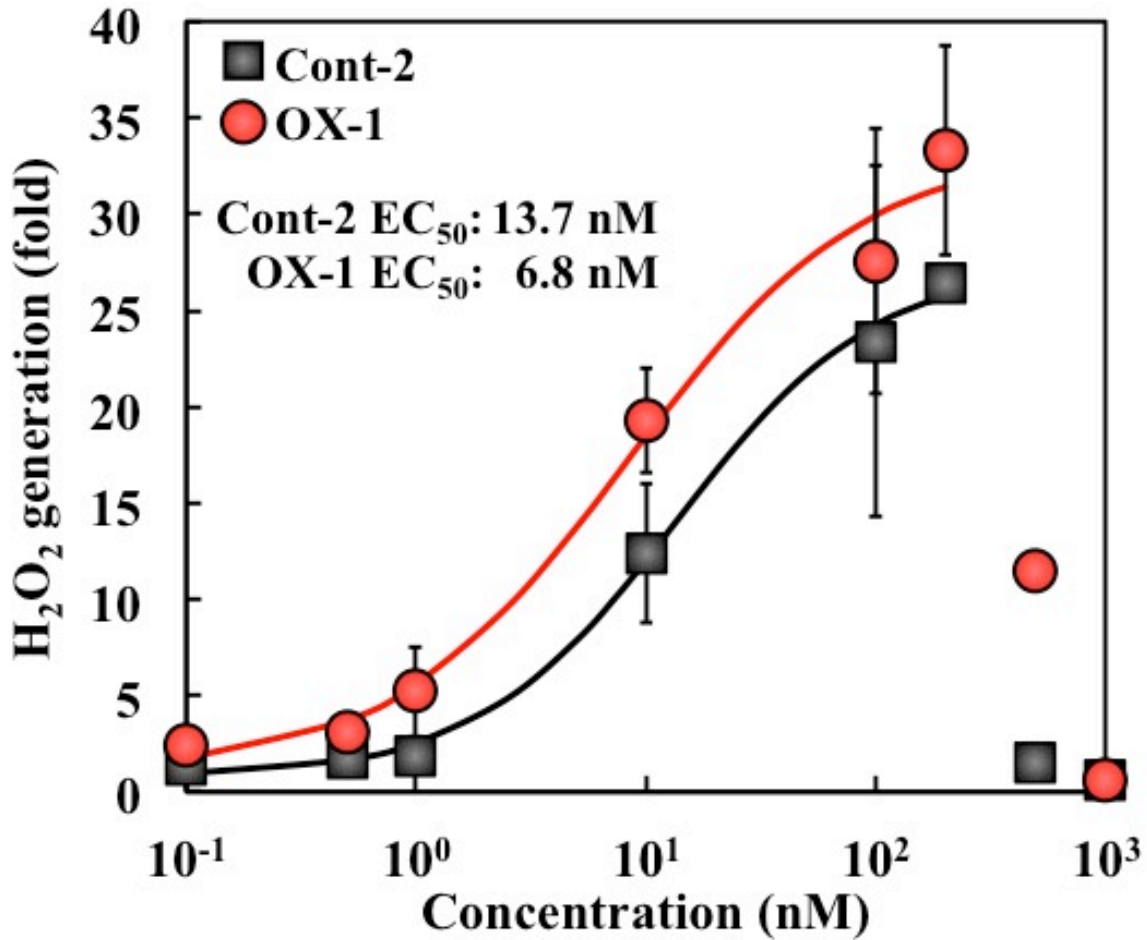


Fig. 2-14

CD2-0 を処理した FliRK2 高発現培養細胞における活性酸素誘導能への影響

様々な濃度 (0.1、0.5、1、10、100、500、1000 nM) の CD2-0 を処理した FliRK2 高発現培養細胞 (OX-1) とコントロール培養細胞 (Cont-2) における活性酸素の発生。活性酸素の発生は、処理 1 時間後に測定を行った。

縦軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示し、横軸は処理濃度を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

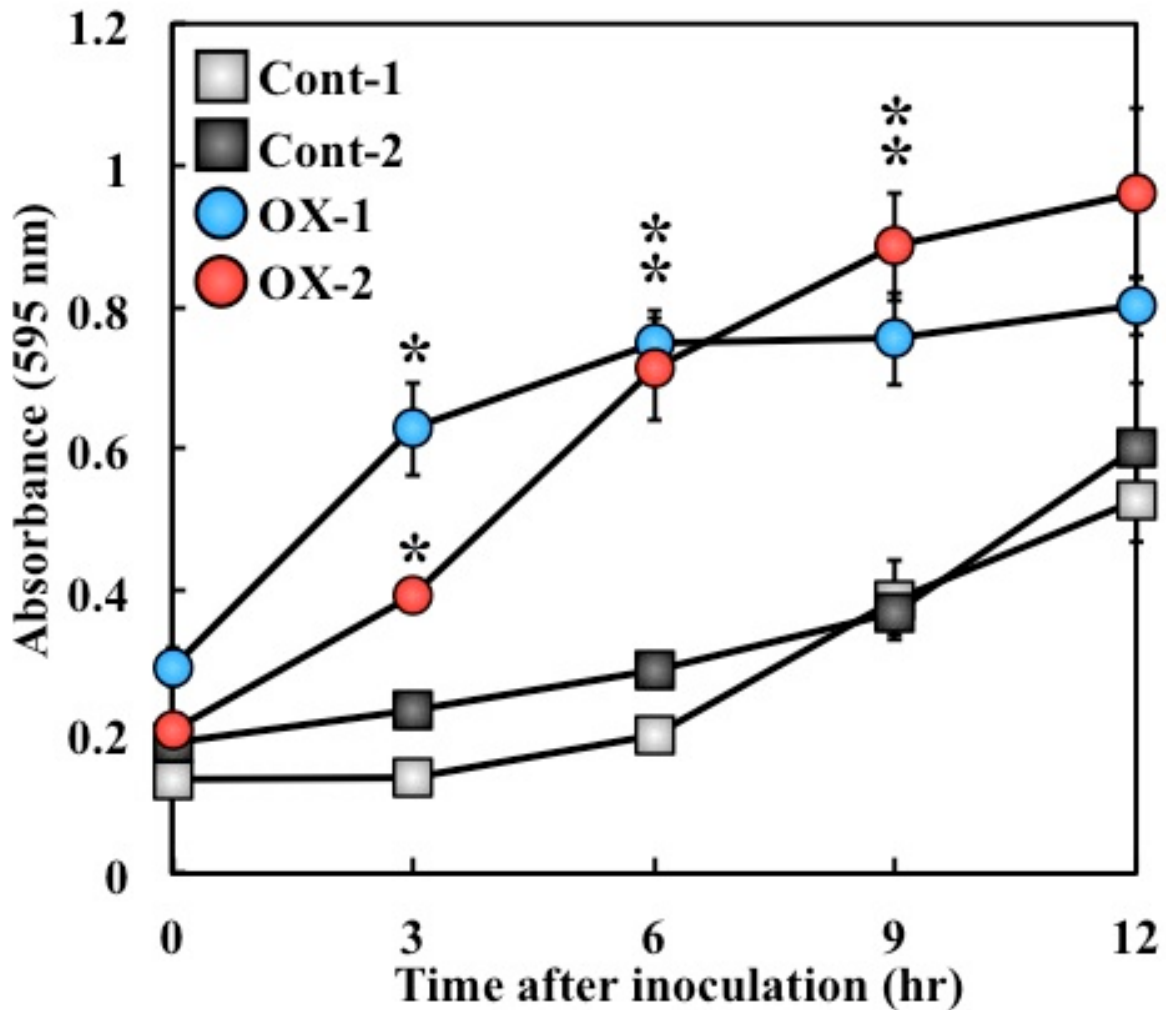


Fig. 2-15

A. avenae 非病原性 N1141 菌株を接種した FliRK2 高発現培養細胞における過敏感細胞死誘導能への影響

1×10^8 CFU の *A. avenae* 非病原性 N1141 菌株を接種した FliRK2 高発現培養細胞 (OX-1、OX-2) とコントロール培養細胞 (Cont-1、Cont-2) における過敏感細胞死。過敏感細胞死は、接種 0、3、6、9、12 時間後にエバンスブルー染色により検出した。

縦軸は 595 nm における吸収を示し、横軸は接種後の時間を示す。実験は 4 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は Cont-1 または Cont-2 と比較したときに両者に対して有意差が認められたものを示す ($p < 0.05$, Tukey's test)。

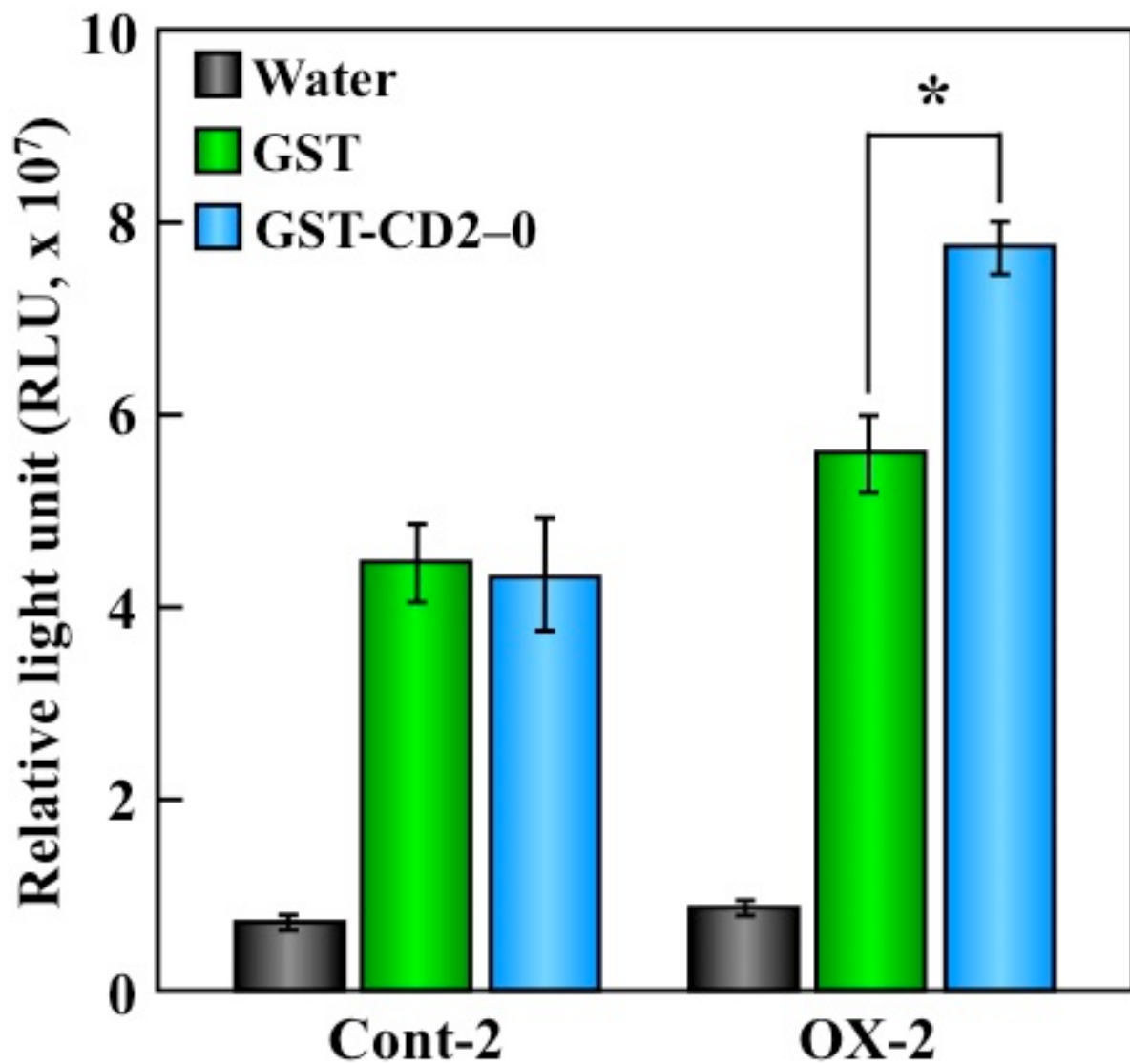


Fig. 2-16

サンドイッチ ELISA 法による FliRK2 と GST-CD2-0 の相互作用の検出

4 nmol の GST または GST を融合した CD2-0 を添加した FliRK2 高発現培養細胞 (OX-2) またはコントロール培養細胞 (Cont-2) の膜画分における結合量をサンドイッチ ELISA 法により検出した。

縦軸は各サンプルにおける化学発光量 (RLU) を示す。実験は 5 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*: $p < 0.05$ (t-test) を示す。

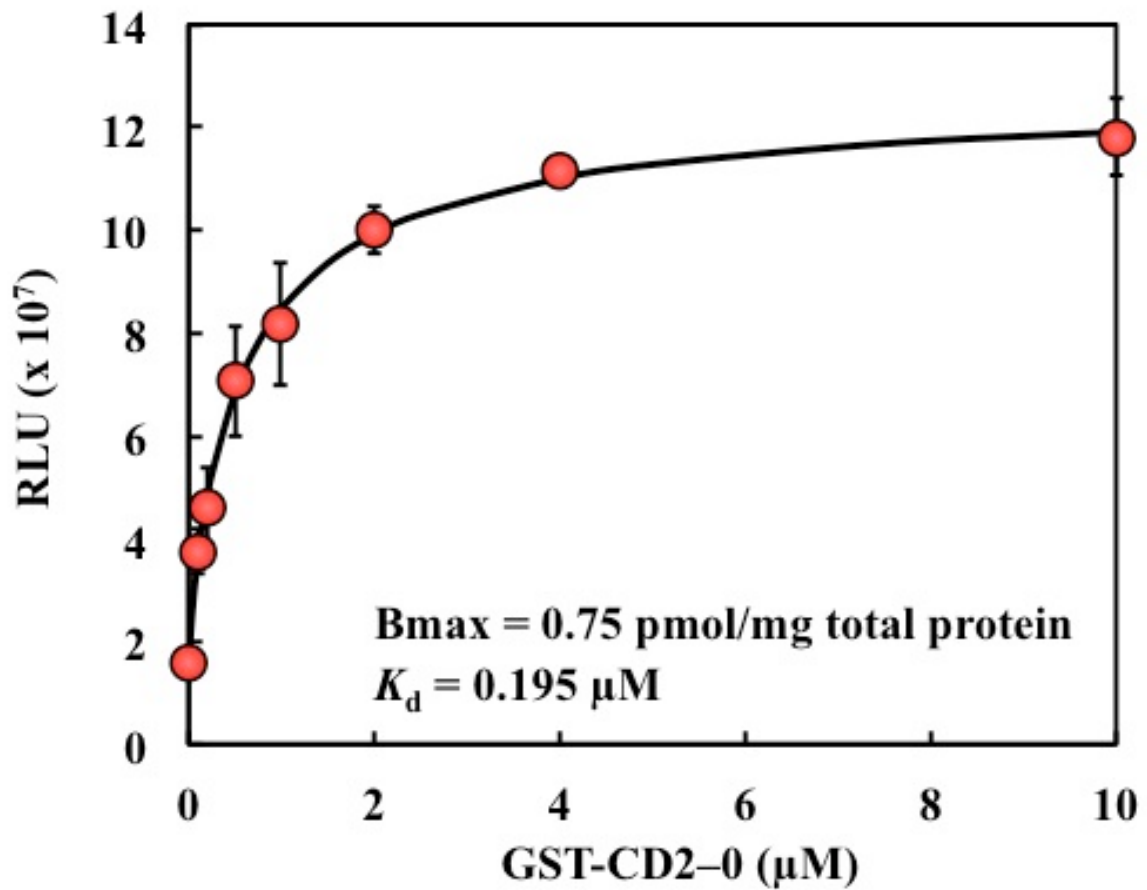


Fig. 2-17

濃度依存に GST-CD2-0 を添加した場合の FliR2 との結合量の変化

様々な濃度 (0、0.1、0.2、0.5、1、2、4、10 μM) の GST を融合した CD2-0 を添加した FliR2 高発現培養細胞 (OX-2) の膜画分における結合量の変化をサンドイッチ ELISA 法により検出した。

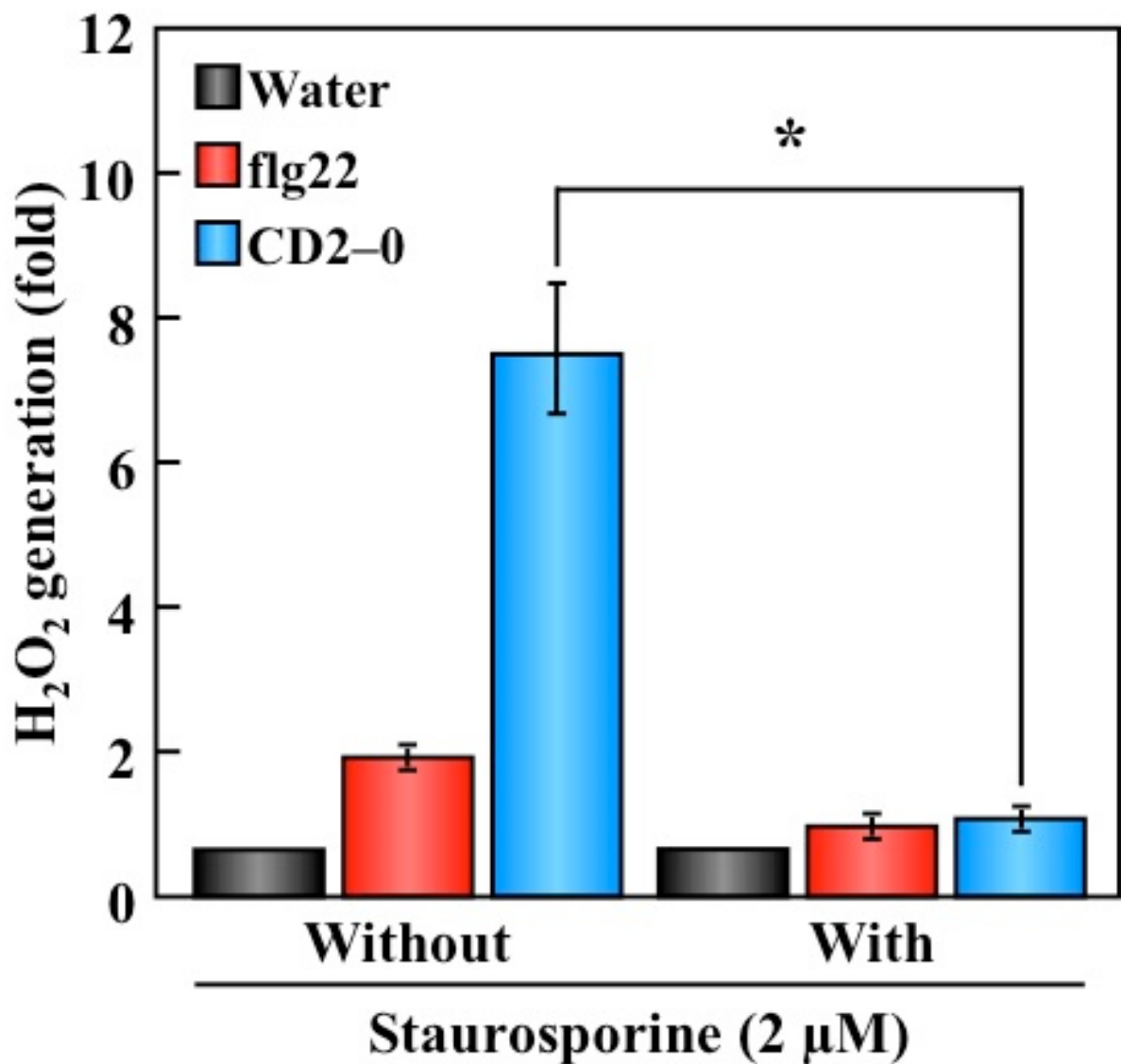


Fig. 2-18

プロテインキナーゼ阻害剤を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

プロテインキナーゼ阻害剤である Staurosporine を前処理し、200 nM の flg22、CD2-0、コントロールとして水を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生。活性酸素の発生は、処理1時間後に測定を行った。

縦軸は水処理を1としたときの活性酸素発生量を示す。実験は3回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.01$ (t-test) を示す。

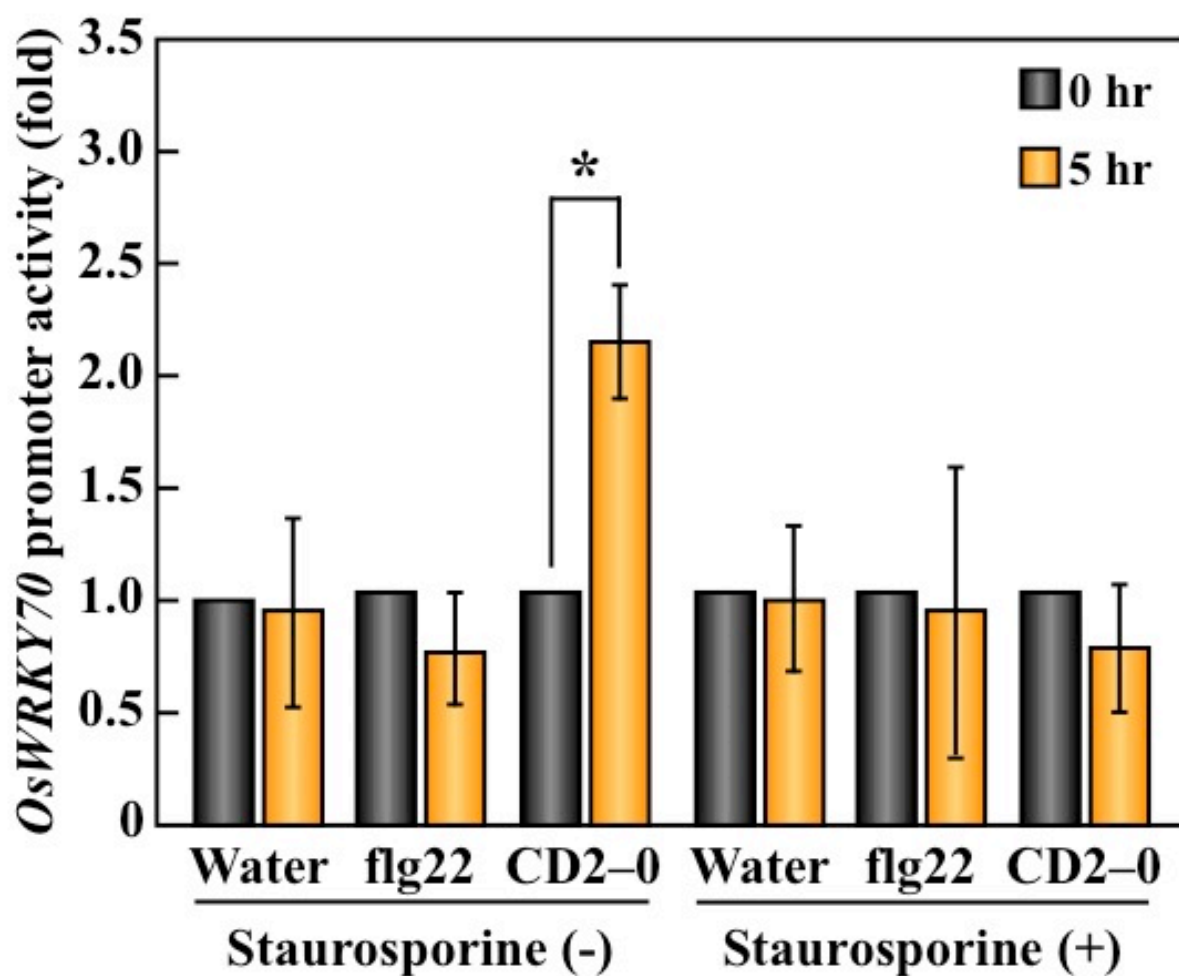


Fig. 2-19

プロテインキナーゼ阻害剤を処理したイネプロトプラストにおける *OsWRKY70* のプロモーター転写活性

プロテインキナーゼ阻害剤である Staurosporine を前処理し、500 nM の flg22、CD2-0、コントロールとして水を処理したイネプロトプラストの *OsWRKY70* のプロモーター転写活性。プロモーター転写活性は、処理 5 時間後に測定を行った。

縦軸は各サンプルの処理 0 時間を 1 としたときのプロモーター転写活性を示す。実験は 5 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.05$ (t-test) を示す。

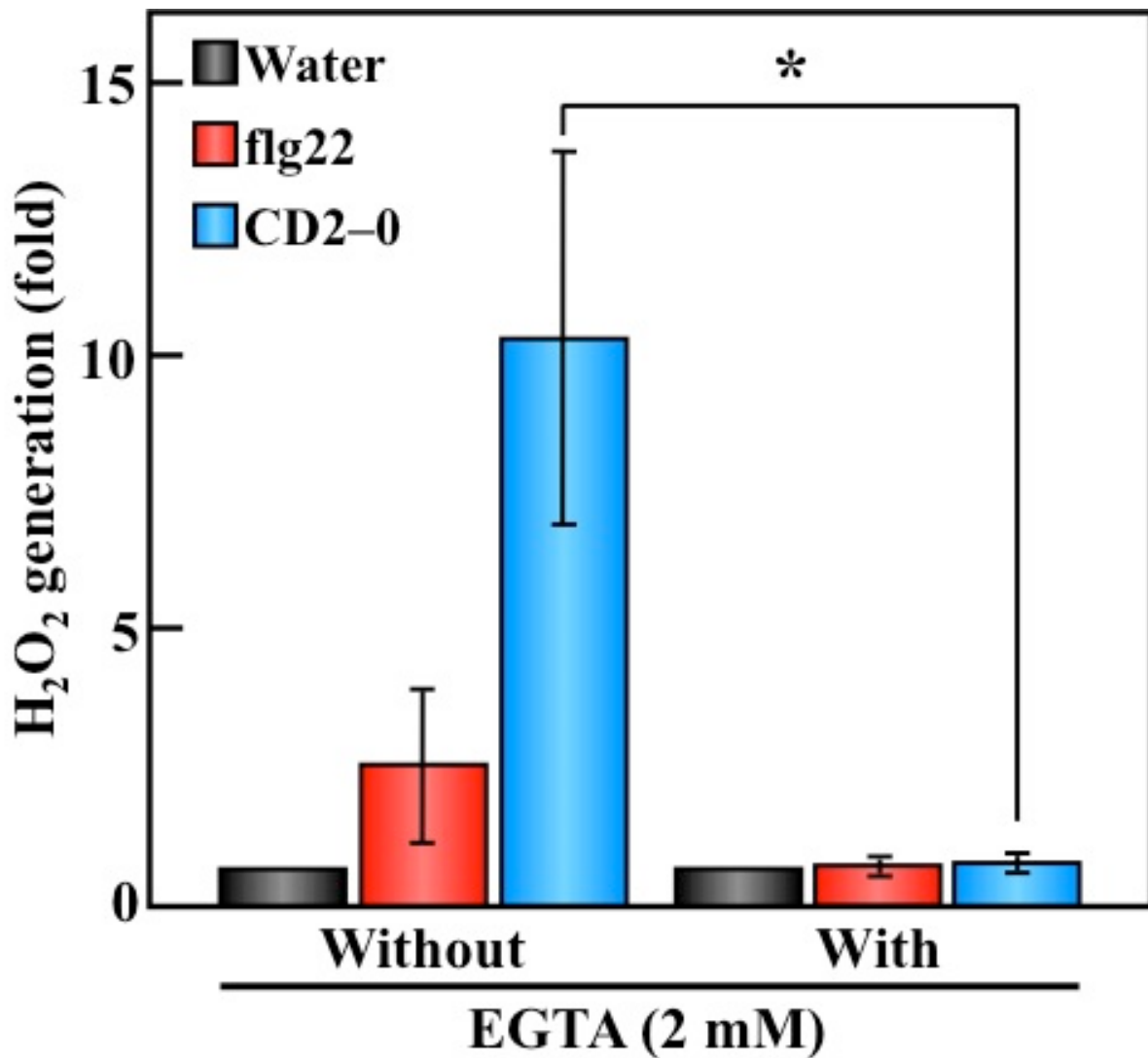


Fig. 2-20

カルシウムイオンキレート剤を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

カルシウムイオンキレート剤である EGTA を前処理し、200 nM の flg22、CD2-0、コントロールとして水を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生。活性酸素の発生は、処理 1 時間後に測定を行った。

縦軸は水処理を 1 としたときの活性酸素発生量を示す。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。*は $p < 0.01$ (t-test) を示す。

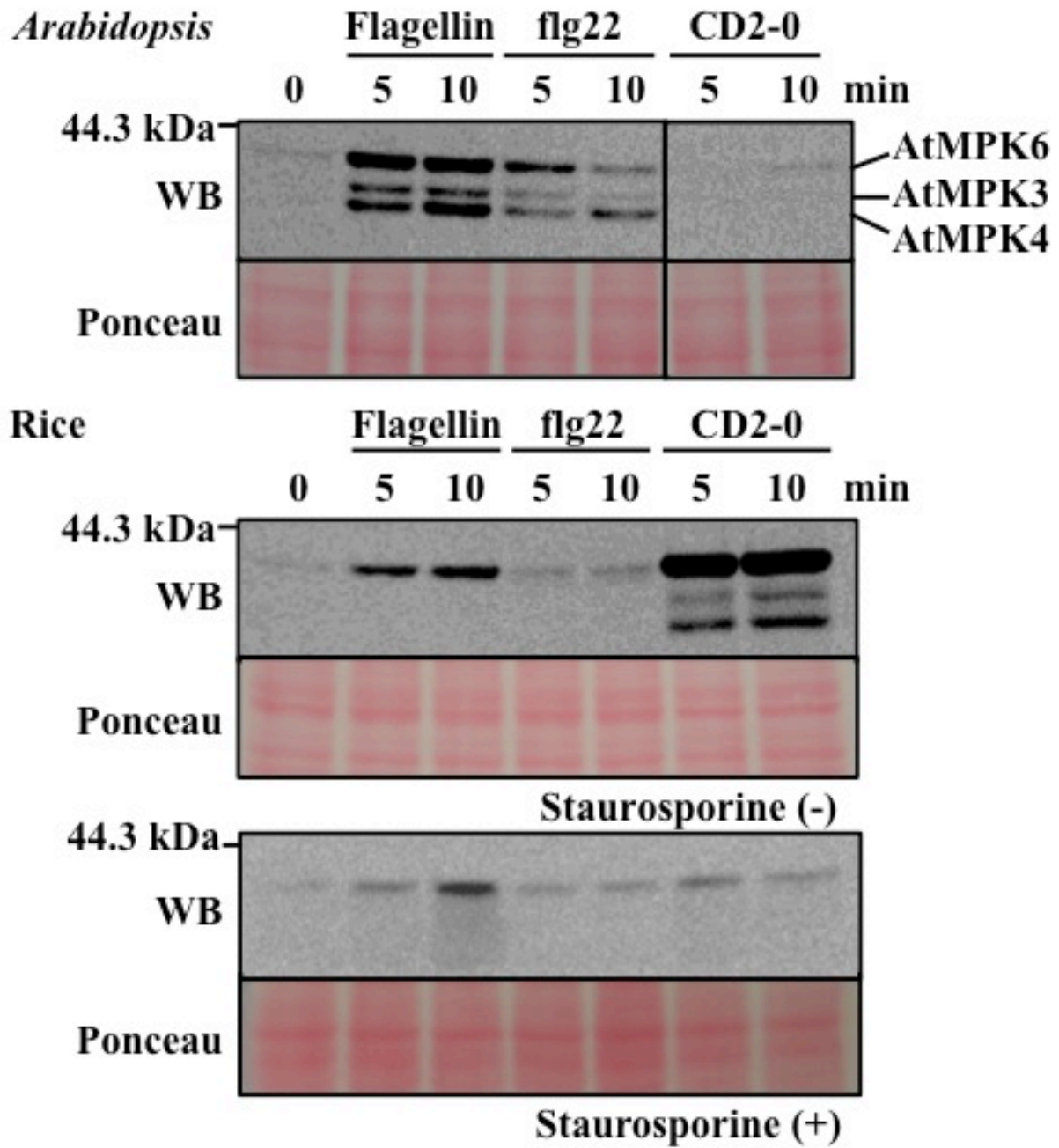


Fig. 2-21

シロイヌナズナまたはイネ培養細胞における MAPK の活性化

1 μ M の精製フラジェリン、flg22、CD2-0 を処理したシロイヌナズナまたはイネ培養細胞におけるリン酸化 MAPK の検出。培養細胞は処理 0、5、10 分後に回収しタンパク質抽出後、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体を用いた Western Blot 解析により検出した。アプライした総タンパク質量は Ponceau 染色により確認した。

第2章

考察

本章では、イネに存在するフラジェリンの CD2-1 領域を認識する受容体の同定を行うため、フラジェリンによって発現量が増加する受容体型キナーゼを解析した。植物では、リガンドを処理するとその受容体発現量が増加することが報告されており、実際に *flg22* や EF-Tu を処理したシロイヌナズナでは、それらの受容体である FLS2 や EFR の発現量が増加する (Zipfel *et al.*, 2004; 2006)。このリガンド認識後の受容体の発現上昇には、エンドサトーチスによる受容体の取り込みが関与することが示唆されている。例えば、FLS2 は *flg22* と結合後、即座にユビキチン化され、エンドサトーチスにより取り込まれた後、26S プロテアソームで分解されていることが示された (Robatzek *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2011)。また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを用いた実験においても、*flg22* と結合した FLS2 は細胞内でリサイクルされ細胞膜に輸送されるのではなく、新生した FLS2 が細胞膜に輸送されていることが明らかにされた (Robatzek *et al.*, 2006)。このような現象が認められることから、植物においてはリガンド認識後に受容体の発現が上昇すると考えられている。DNA マイクロアレイでは、フラジェリンを処理したイネ培養細胞において OsFLS2 の発現量は増加していないことが明らかになっている。このことは、イネにおいて OsFLS2 はフラジェリンの主要な受容体として機能していないことを示している。

本研究で同定した FliRK2 (Flagellin-induced receptor kinase 2) は、細胞外に 22 個の LRR から成る LRR domain を持ち、細胞内には Serine/Threonine kinase domain を持つ細胞膜局在型の一回膜貫通型受容体であった。この構造は、シロイヌナズナの FLS2 と非常に類似しているが、両者の相同性を調べたところ 18%程度で極めて低い (data not shown)。また、FLS2 には 23 ヶ所の N-グリコシル化部位が存在し N 型糖鎖が付加されていることが明らかになっており、特に、*flg22* との結合に重要な LRR モチーフ付近の糖鎖は、この LRR モチーフの構造的な安定に寄与している (Mueller *et al.*, 2012)。FliRK2 にも 14 ヶ所の N-グリコシル化部位が存在し糖鎖修飾の可能性が示されたが (Fig. 2-6)、FliRK2 抗体を用いた Western Blot 解析では、推定上の分子量と変化がなく糖鎖修飾されていない可能性が示された (Fig. 2-13)。これらのことから、両者とも同じフラジェリンを認識する受容体であるが、その構

造は大きく異なっており、両者におけるフラジェリンの認識様式もおそらく異なっているであろう。

本実験では、FliRK2 と CD2-0 との相互作用をサンドイッチ ELISA 法により検出した (Fig. 2-16, 22)。この解析結果を基に K_d 値と B_{max} 値を算出したところ、 K_d 値が $0.195 \mu\text{M}$ で、 B_{max} 値が $0.75 \text{ pmol/mg total protein}$ であった (Fig. 2-17)。これまでに報告されているシロイヌナズナの FLS2-flg22 間における相互作用では K_d 値が 1.7 nM 、 B_{max} 値が $1.2 \text{ pmol/mg microsomal protein}$ であった (Bauer *et al.*, 2001)。この値を単純に比較すると、FliRK2 と CD2-0 間のアフィニティーが FLS2 と flg22 間におけるアフィニティーよりも 100 倍程度高いことになる。しかし、FliRK2 と CD2-0 間の結合量解析では、非特異的吸着が非常に高いにも関わらず (Fig. 2-16, 17)、この非特異的吸着の影響を考慮していない。FliRK2 と CD2-0 間の結合を詳細に解析するためには、コンペティションアッセイ法等を検討することで、より正確な K_d 値と B_{max} 値を算出する必要があるであろう。

今回、FliRK2 と CD2-0 の相互作用を検出する方法として ELISA 法を用いた。当初は、膜画分を直接プレートに固相化し、検出抗体のみを使用することで定量が可能な直接吸着法を試みたが、リガンドを処理していないコントロールにおける非特異的吸着が非常に高く結合量の差を検出することができなかった (data not shown)。そこで、FliRK2 抗体をプレートに固相化するサンドイッチ法を試みたところ、Fig. 2-16 で示したようにコントロールと比較して結合量の増加が認められた。しかしながら、サンドイッチ法による FliRK2 と CD2-0 との相互作用検出においても非特異的吸着量が非常に多い (Fig. 2-16, 17)。この高いバックグラウンドの原因としては 2 つの問題点が考えられる。1 点目は、この実験に用いた膜画分である。今回用いた膜画分は、精製した細胞膜ではなく、細胞内に存在するミトコンドリアや葉緑体由来の膜を含んだ細胞膜画分である。FliRK2 と CD2-0 間の相互作用をより詳細に解析するためには、精製した細胞膜画分を用いる必要があるであろう。2 点目は、検出に用いた HRP を融合した GST 抗体の特異性である。Fig. 2-17 に示したようにリガンドである GST-CD2-0 を濃度依存的に処理した場合の結合量の変化を調べたところ、リガンドを処理していない場合でも、結合を示す化学発光量の増加が認められた。より特異性の高い GST 抗体を検出に用いるか、または、非特異的吸着を考慮した解析を行うことで FliRK2 と CD2-0 間の相互作用を検出する必要があると考える。

FLS2 を高発現させたシロイヌナズナに flg22 を処理すると、活性酸素の発生やカロースの沈着、生育阻害などの PTI が野生株よりも強く認められる (Gómez-Gómez and Boller *et al.*,

2000)。このような PTI の増強は FliRK2 を高発現させた形質転換体に CD2-0 を処理した場合にも認められた (Fig. 2-14)。また、FliRK2 の場合は CD2-0 を処理する前の段階からコントロールよりもわずかに PTI が誘導されるという現象も認められた (data not shown)。このような PTI の増強は、受容体の増加によりリガンドに対する感受性が増加し、結果として受容体から伝達されるシグナルが増強されることによるかもしれない。実際に、イネにおいてはフラジェリンの認識にほとんど寄与しない OsFLS2 だが、これを高発現させた場合には flg22 を認識し PTI 反応を誘導することが明らかになっている (Takai *et al.*, 2008)。また、PTI を亢進させると ETI が強く誘導されることも報告されている (Miguel Angel Torres *et al.*, 2002)。実際に、FLS2 の発現量を増加させたシロイヌナズナに flg22 を処理すると、野生株より強い病原細菌に対する増殖抑制を示す (Zipfel *et al.*, 2004)。FliRK2 の場合も、FliRK2 を高発現させた形質転換体に *A. avenae* N1141 菌株を接種した場合に、ETI である過敏感細胞死がコントロールよりも早期にかつ強く誘導された (Fig. 2-15)。このような結果は、FliRK2 がイネにおいてフラジェリンの受容体として機能していることを証明するものである。

本研究で、FliRK2 の Serine/Threonine kinase domain がフラジェリン認識後の情報伝達に重要であることを示した (Fig. 2-12)。しかしながら、FliRK2 自身のキナーゼ活性や CD2-1 認識後のリン酸化やそのリン酸化部位に関する知見は得られておらず、今後の重要な課題となるであろう。受容体のキナーゼ活性やリン酸化部位に関する研究で、近年、興味深い報告がなされた。シロイヌナズナにおいて、細胞内に Serine/Threonine kinase domain を持つ EF-Tu の受容体である EFR が EF-Tu 認識後、Ser や Thr 残基だけでなく Tyr 残基もリン酸化されることが明らかになった (Macho *et al.*, 2014)。これは、細菌がエフェクターを用いて PTI を抑制する Effector-triggered susceptibility (ETS) に関する研究からもたらされた。このような PTI 抑制型エフェクターにチロシンホスファターゼである HopAO1 が含まれていたことから、シロイヌナズナにチロシンリン酸化阻害剤を処理したところ EF-Tu による PTI 誘導が阻害された。さらに、HopAO1 をシロイヌナズナ細胞内で発現させると EF-Tu による PTI 誘導が減少することも同時に明らかになった。そこで、EFR の Tyr 残基を調べたところ、EF-Tu 依存的に Tyr 残基がリン酸化されることが示された (Macho *et al.*, 2014)。EFR に存在する Serine/Threonine kinase domain には、これまでに報告されている Tyr kinase domain に存在するコンセンサス配列が存在しないことから、植物にはこれまで知られていない新規の Tyr キナーゼ活性を有するタンパク質が存在することが示唆された。また、EFR

に存在する Serine/Threonine kinase domain は non-RD kinase に分類されており、リン酸化される Tyr 残基は non-RD kinase のコンセンサス配列付近であることも示された。FLiRK2 は RD kinase に分類されるが、に EFR においてリン酸化される Tyr 残基は保存されていた (Fig. 2-23)。以上のことから、今後、FLiRK2 の研究を進めていく上で、Ser や Thr 残基のリン酸化だけでなく Tyr 残基のリン酸化の可能性も考慮する必要があるだろう。

本研究では、CD2-1 認識後の FLiRK2 の下流の情報伝達経路に MAPK などを含むタンパク質のリン酸化やカルシウムイオンの流入が関与することを明らかにした (Fig. 2-18-21)。このような情報伝達は、シロイヌナズナにおける flg22 認識後の FLS2 を介した経路に類似している。例えば、シロイヌナズナにおいて flg22 依存的に認められる AtMPK3、4、6 のリン酸化は、イネにおいて CD2-0 依存的に認められる MAPK のリン酸化と非常に類似している (Fig. 2-21)。また、第 1 章で行った CD2-0 を処理したイネにおけるマイクロアレイ解析で発現上昇が認められた Receptor protein kinase、MPK8、CPK9 などのシグナル伝達因子、WRKY transcription factor、RING-type domain containing protein、bHLH116 transcription factor、Zinc finger transcription factor などの転写因子、PAL のようなファイトアレキシン合成酵素、PR-1a、PBZ1、Thaumatococcus などの PTI 関連タンパク質をコードする遺伝子は、シロイヌナズナなどに flg22 を処理したときにも同様に発現誘導される。しかし、WRKY transcription factor のようにイネでは OsWRKY70 がフラジェリン下流で制御されているが、シロイヌナズナでは AtWRKY29 がフラジェリンの下流で制御されており、両者間においてそのサブファミリーは異なる場合も散見される。イネとシロイヌナズナにおいて、フラジェリンの異なる部位を異なる受容体で認識し、その情報を細胞内に伝達するが、その根本的な認識様式と情報伝達機構は驚くほど似ている。これは、この二つの認識システムが同じシステムから進化してきたのではなく、それぞれ独自に獲得した認識機構が収斂進化してきた結果であろう。

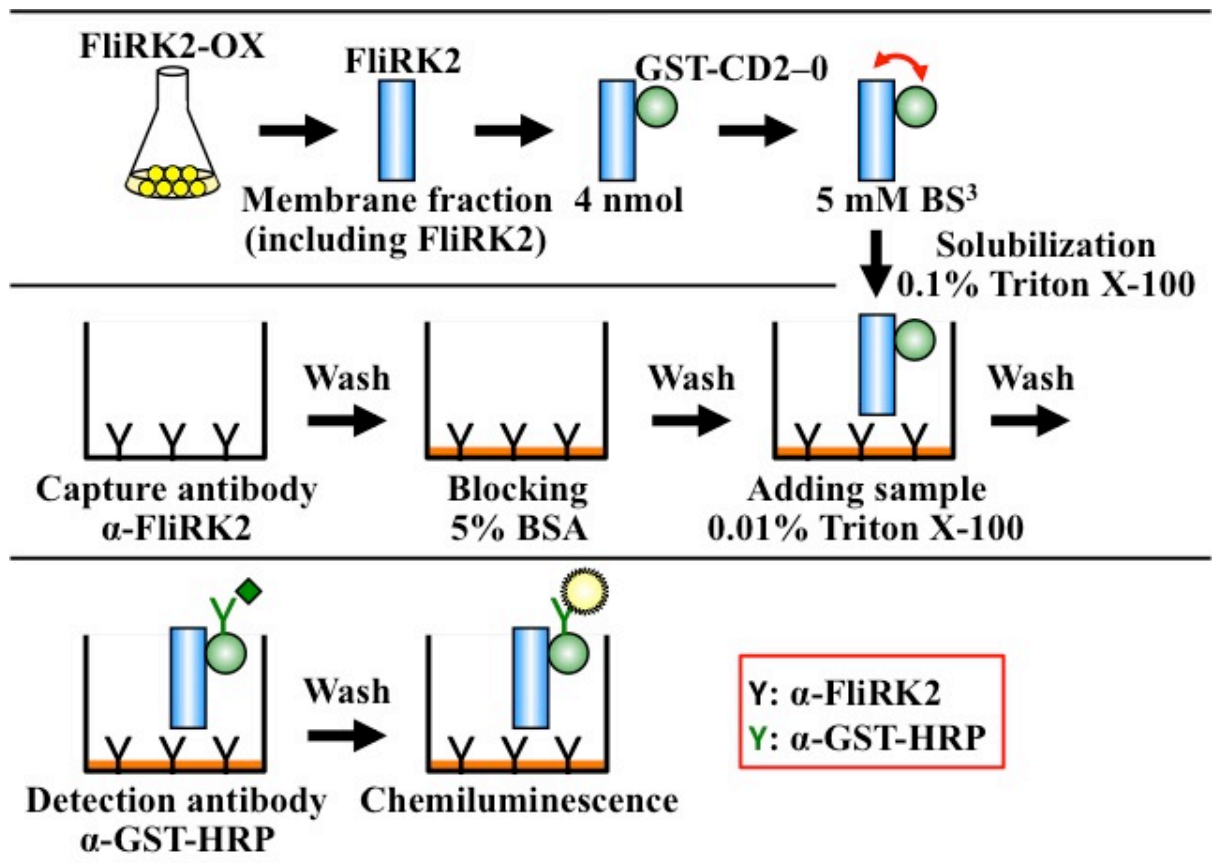


Fig. 2-22

サンドイッチ ELISA 法

FliRK2 と GST-CD2-0 間の相互作用の検出に用いた ELISA の概略を示す。

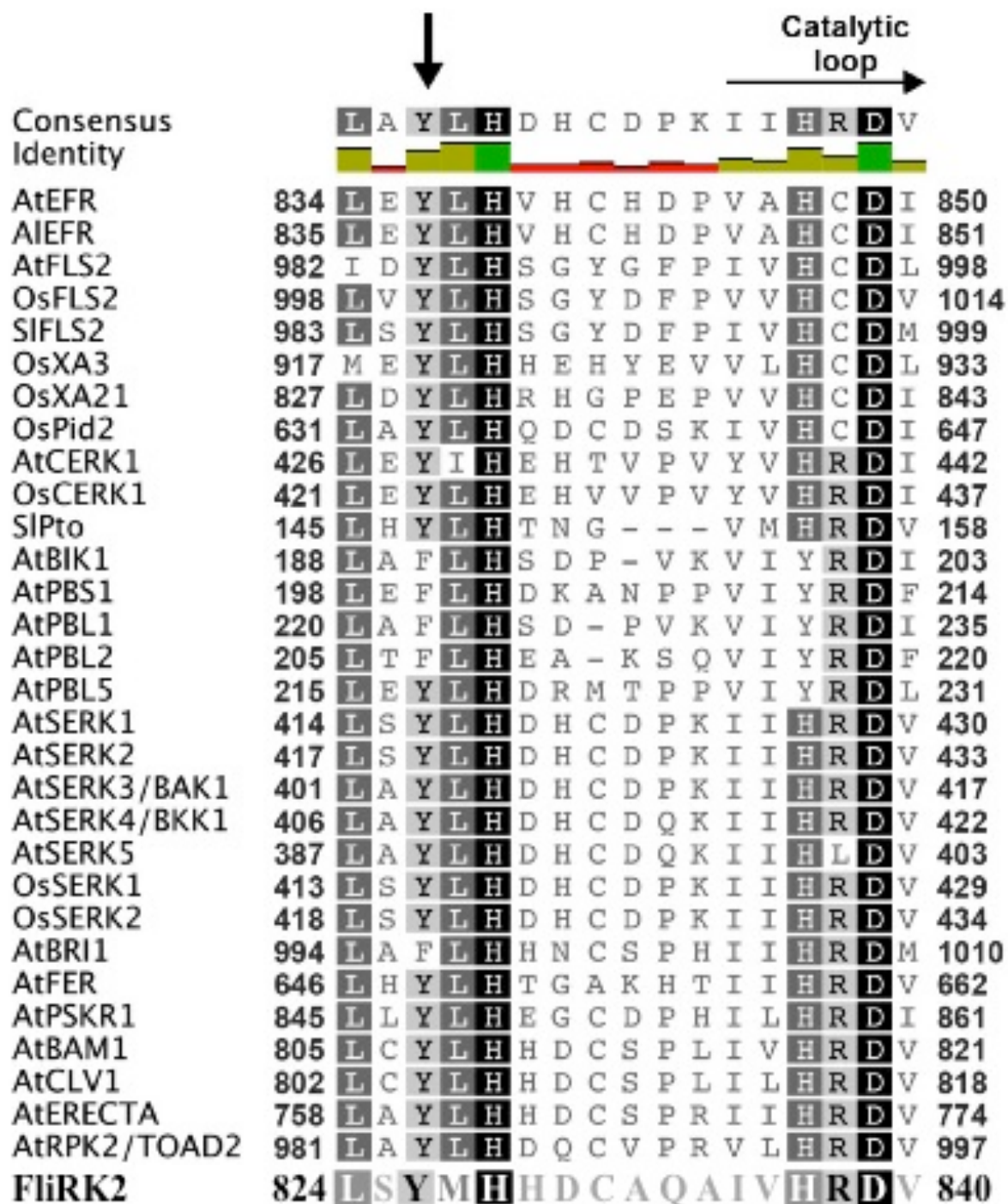


Fig. 2-23

RD キナーゼ、または Non-RD キナーゼに分類される PAMP 認識に関連する受容体のアライメント

RD キナーゼ、または Non-RD キナーゼに分類される PAMP 認識に関連する受容体のアライメント (Macho *et al.*, 2014)。矢印 (↓) は、リン酸化される Tyr 残基を示す。FliRK2 は最下段に示す。

総合考察

本研究で明らかにしたフラジェリン認識機構は、植物の PTI において最も重要な位置にあると考える。鞭毛を構成するフラジェリンは、鞭毛から剥落し、細胞外環境中に存在していることがあることから、他の PAMP よりも逸早く認識される可能性がある。つまり、PTI の第一段階としてフラジェリンの認識があり、それにより誘導された PTI で病原菌の崩壊が起こり他の PAMP が漏出することで、さらに PTI が誘導されるという連続的な PTI 反応があるのではないかと考える。また、フラジェリンによる PTI が誘導された状態では病原菌の増殖は抑制され、病気の発症を遅延させている可能性がある。これは、様々な病原菌が混在する自然環境においても重要な役割を果たしていることを示唆している。このように、植物の PTI におけるフラジェリン認識の重要性が高い故に、フラジェリンを介した病原菌側の感染戦略や植物側の防衛戦略に多様性が生じているのであろう。

今回、イネのフラジェリン受容体として同定した FliRK2 は LRR-RLK グループに属し、細胞外の LRR が CD2-1 の受容に関与している。これまでに同定されているシロイヌナズナのフラジェリン受容体 FLS2 や哺乳類の TLR5 も同様に細胞外の LRR がフラジェリンの受容に必須である。これは、フラジェリンを認識する上で LRR が進化の過程で選択されてきたことを示唆している。また、認識後の情報伝達についても FliRK2 と FLS2 の間で類似性が認められ、TLR5 でも細胞内の TIR 領域に IRAK と MyD88 が結合し、MAPK カスケードを介して転写を制御している自然免疫システムと一貫性がある。これは、植物と動物の認識システムが同じシステムから進化してきたのではなく、それぞれ独自に獲得した認識機構が収斂進化してきた結果であると考えられる。今後、FliRK2 を介した情報伝達機構を完全に明らかにすることで、これら他のフラジェリン認識システムとの相同性や相違性がよりはっきりし、収斂進化についても新たな知見が得られるものと考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、魅力的なテーマとすばらしい研究環境を与えて下さいました長浜バイオ大学大学院 植物分子環境生理学研究室、蔡晃植教授に厚くお礼申し上げます。蔡 晃植 教授にはお忙しい中、公私にわたり熱心に、時には厳しくご指導頂きました。謹んでお礼申し上げます。

また、副査をお願い致しました西 義介 教授、山本 博章 教授にも貴重なご意見を頂きました。謹んでお礼申し上げます。

植物分子環境生理学研究室におきましては、研究や私生活など、親切な指導を賜りました、環境コース助手 高井 亮太 博士、細胞コース助手 近藤 真千子 博士、研究員 平井 洋行 博士、神村 麻友 博士、古川 岳人 博士、博士3年大坪 由佳さんに感謝申し上げます。そして、同じ研究室内で、支えて下さいました同期である迹見 勇樹、同じグループである森本 匠、片山 貴等、村上 貴彦には深く御礼申し上げます。

同じグループであった田中 佑佳さん、柁山 航介さん、小栗 章成、梶本 博文にも卒業されたにもかかわらず、心配して頂き、支えて下さいました。深く御礼申し上げます。

最後に、私を理解して好きなことを大学、大学院と9年間もさせて頂いた両親に心より感謝申し上げます。

參考論文

- Abas L, Luschnig C. 2010. Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation. *Anal Biochem.* 401: 217-27.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature.* 415:977-983.
- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bezier A., Lambert B., Joubert J.M., Pugin A. 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 1118-1128
- Baba, A., Hasezawa, S., Syono, K. 1986. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiol.* 27:463-472.
- Bauer Z, Gómez-Gómez L, Boller T, Felix G. 2001. Sensitivity of different ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the bacterial elicitor flagellin correlates with the presence of receptor-binding sites. *J Biol Chem.* 276: 45669-76.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J., Slijper, M., and Menke, F.L. 2007. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1198–1214.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol.* 60:379-406.
- Cai, R., Lewis, J., Yan, S., Liu, H., Clarke, C. R., Campanile, F., Almeida, N. F., Studholme, D. J., Lindeberg, M., Schneider, D., Zaccardelli, M., Setubal, J. C., Morales-Lizcano, N. P., Bernal, A., Coaker, G., Baker, C., Bender, C. L., Leman, S., Vinatzer, B. A. 2011. The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathog.* 7:e1002130.
- Cao Y, Aceti DJ, Sabat G, Song J, Makino S, Fox BG, Bent AF. 2013. Mutations in FLS2 Ser-938 dissect signaling activation in FLS2-mediated *Arabidopsis* immunity. *PLoS Pathog.* 9: e1003313.
- Cardinale, F. et al. 2000. Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.* 36734-36740.

- Che, F. S., Iwano, M., Tanaka, N., Takayama, S., Minami, E., Shibuya, N., Kadota, I., Isogai, A. 1999. Biochemical and morphological features of rice cell death induced by *Pseudomonas avenae*. *Plant Cell Physiol.* 40:1036-1045.
- Che, F. S., Nakajima, Y., Tanaka, N., Iwano, M., Yoshida, T., Takayama, S., Kadota, I., Isogai, A. 2000. Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *J. Biol. Chem.* 275:32347-32356.
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G. 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell.* 18: 465-76.
- Chinchilla Delphine, Cyril Zipfel, Silke Robatzek, Birgit Kemmerling, Thorsten Nürnberger, Jonathan D. G. Jones, Georg Felix, & Thomas Boller. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497-500.
- Clarke, C.R., Chinchilla, D., Hind, S. R., Taguchi, F., Miki, R., Ichinose, Y., Martin, G. B., Leman, S., Felix, G., Vinatzer, B. A. 2013. Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytol.* 200:847-860.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133: 462-9.
- Dunning F. M., Sun W., Jansen K. L., Helft L., Bent A. F. 2007. Identification and mutational analysis of *Arabidopsis* FLS2 leucine-rich repeat domain residues that contribute to flagellin perception. *Plant Cell.* 19: 3297-313.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., Boller, T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18:265-276.
- Fliegmann, J., Mithofer, A., Wanner, G., Ebel, J. 2004. An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J Biol Chem.* 279:1132-1140.
- Fujiwara, S., Tanaka, N., Kaneda, T., Takayama, S., Isogai, A., Che, F. S. 2004. Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:986-998.

- Furukawa, T., Inagaki, H., Takai, R., Hirai, H., Che, F. S. 2014. Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 27:113-124.
- Gómez-Gómez L., Felix G., Boller T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18: 277-84.
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 5:1003-1011.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 410:1099-1103.
- Hirai, H., Takai, R., Iwano, M., Nakai, M., Kondo, M., Takayama, S., Isogai, A., Che, F. S. 2011. Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by *Acidovorax avenae* flagellin. *J Biol Chem.* 286:25519-25530.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S. C., Shinozaki, K., Shirasu, K. 2006. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 281:36969-36976.
- Iwano, M., Che, F. S., Goto, K., Tanaka, N., Takayama, S., Isogai, A. 2002. Electron microscopy analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells. *Mol. Plant Pathol.* 3:1-8.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444:323-329.
- Kadota, I., Mizuno, A., and 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.
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, Zipfel C. Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell.* 54: 43-55.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11086-11091.
- Kaneda, T., Taga, Y., Takai, R., Iwano, M., Matsui, H., Takayama, S., Isogai, A., Che, F. S. 2009. The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *EMBO J.* 28:926-936.

- Keller H., Pamboukdjian N., Ponchet M., Poupet A., Delon R., Verrier J.L., Roby D., Ricci P. 1999. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*, 11:223-235
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, M., Kloareg, B., Fritig, B. 2000. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* 124:1027-1038.
- Komoriya, K., Shibano, N., Higano, T., Azuma, N., Yamaguchi, S., Aizawa, S. I. 1999. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 34:767-779.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell.* 16:3496-3507.
- Laquitaine, L., Gomès, E., François, J., Marchive, C., Pascal, S., Hamdi, S., Atanassova, R., Delrot, S., Coutos-Thévenot, P. 2006. Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against botrytis cinerea: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:1103-1112.
- Laursen R. A., L'Italien J. J., Nagarkatti S., Miller D. L. 1981. The amino acid sequence of elongation factor Tu of *Escherichia coli*. The complete sequence. *J Biol Chem.* 256: 8102-9.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., and Walker, J.C. 2002. BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213–222.
- Ligterink, W., Kroj, T., Zurnieden, U., Hirt, H. Scheel, D. 1997. Receptor-mediated activation of a MAPkinase in pathogen defense in plants. *Science* 2054-2057.
- Lin W, Li B, Lu D, Chen S, Zhu N, He P, Shan L. 2014. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111: 3632-7.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. 2010. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 496–501.

- Lu D1, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L. 2011. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science*. 332: 1439-42.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., Ton, J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact*. 24:183-193.
- Macho AP, Schwessinger B, Ntoukakis V, Brutus A, Segonzac C, Roy S, Kadota Y, Oh MH, Sklenar J, Derbyshire P, Lozano-Durán R, Malinovsky FG, Monaghan J, Menke FL, Huber SC, He SY, Zipfel C. 2014. A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science*. 343: 1509-12.
- Malapaka, R. R., Adebayo, L. O., Tripp, B. C. 2007. A deletion variant study of the functional role of the *Salmonella* flagellin hypervariable domain region in motility. *J Mol Biol*. 365:1102-1116.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., and Pauly, N. 2012. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci*. 17, 9–15.
- Miguel Angel Torres, Jonathan D. G. Jones & Jeffery L. Dangl. 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 37, 1130-1134
- Nakashita, H., Yoshioka, K., Takayama, M., Kuga, R., Midoh, N., Usami, R., Horikoshi, K., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. 2001. Characterization of PBZ1, a probenazole-inducible gene, in suspension-cultured rice cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65:205-208.
- Nühse, T. S., Peck, S. C., Hirt, H. & Boller, T. 2000. Microbial elicitors induce activation and dualphosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK6. *J. Biol. Chem*. 7521-7526.
- Nühse, T.S., Bottrill, A.R., Jones, A.M.E., and Peck, S.C. 2007. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J*. 51, 931–940.
- Qiu, J. L., Zhou, L., Yun, B. W., Nielsen, H. B., Fiil, B. K., Petersen, K., Mackinlay, J., Loake, G. J., Mundy, J., Morris, P. C. 2008. *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol*. 148:212-222.
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T. 2006. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 20: 537-42.

- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., and Jones, J. D. 1999. Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*. 11:273–287.
- Samakovlis, C., Asling, B., Boman, H. G., Gateff, E., Hultmark, D. 1992. In vitro induction of cecropin genes--an immune response in a *Drosophila* blood cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 188:1169-1175.
- Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Namba, K. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*. 410:331-337.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., and Chinchilla, D. 2010. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J. Biol. Chem*. 285, 9444–9451.
- Schuster, S. C., and Khan, S. 1994. The bacterial flagellar motor. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 23:509-539.
- Schwacke, R., and Hager, A. 1992. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta* 187:136–141.
- Shi H., Shen Q., Qi Y., Yan H., Nie H., Chen Y., Zhao T., Katagiri F., Tang D. 2013. BR-SIGNALING KINASE1 physically associates with FLAGELLIN SENSING2 and regulates plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25:1 143-57
- Shiu, S. H., Karlowski, W. M., Pan, R., Tzeng, Y. H., Mayer, K. F., Li, W. H. 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*. 16:1220-1234.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J. M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M. A., Parrilli, M. 2005. The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J Biol Chem*. 280:33660-33668.
- Singh, P., Kuo, Y. C., Mishra, S., Tsai, C. H., Chien, C. C., Chen, C. W., Desclos-Theveniau, M., Chu, P. W., Schulze, B., Chinchilla, D., Boller, T., Zimmerli, L. 2012. The lectin receptor kinase-VI.2 is required for priming and positively regulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Plant Cell*. 24:1256-1270.

- Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W. X., Zhu, L. H., Fauquet, C., Ronald, P. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*. 270:1804-1806.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., and Mittler, R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 691–699.
- Taguchi F1, Takeuchi K, Katoh E, Murata K, Suzuki T, Marutani M, Kawasaki T, Eguchi M, Katoh S, Kaku H, Yasuda C, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. 2006. Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. *Cell Microbiol.* 8: 923-38.
- Takai, R., Kaneda, T., Isogai, A., Takayama, S., Che, F. S. 2007. A new method of defense response analysis using a transient expression system in rice protoplasts. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71:590-593.
- Takai, R., Isogai, A., Takayama, S., Che, F. S. 2008. Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 21:1635-1642.
- Tanaka, N., Nakajima, Y., Kaneda, T., Takayama, S., Che, F. S., Isogai, A. 2001. DNA laddering during hypersensitive cell death in cultured rice cell induced by an incompatible strains of *Pseudomonas avenae*. *Plant Biotech.* 18:295-299.
- Tanaka, N., Che, F. S., Watanabe, N., Fujiwara, S., Takayama, S., Isogai, A. 2003. Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of *PAL*, *Cht-1*, and *PBZ1*, but not of *Lox* in rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:422-428.
- Tang, W., Kim, T.W., Oses-Prieto, J.A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A.L., Wang, Z.Y. 2008. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science*. 321: 557–560.
- Torres, M.A., and Dangl, J.L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397–403.
- Veronesea Paola, Hirofumi Nakagamib, Burton Bluhma, Synan AbuQamara, Xi Chenc, John Salmeronc, Robert A. Dietrichc, Heribert Hirtb and Tesfaye Mengistea. 2006. The Membrane-Anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 Plays Distinct Roles in *Arabidopsis* Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens. *The Plant Cell* 18:257-273.

- Wilson, D. R., and Beveridge, T. J. 1993. Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can J Microbiol.* 39:451-472.
- Wyant, T. L., Tanner, M. K., Sztejn, M. B. 1999. Potent immunoregulatory effects of *Salmonella typhi* flagella on antigenic stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.* 67:1338-1346.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., Shibuya, N. 2000. Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell.* 12:817-826.
- Yang Y., Shah J., Klessig D.F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1639
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., Namba, K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature.* 424:643-650.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., et al. 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1, 175–185.
- Zeng, W., and He, S.Y. 2010. A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 153, 1188–1198.
- Zhu, Q., Dabi, T., Beeche, A., Yamamoto, R., Lawton, MA., Lamb, C. 1995. Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Mol Biol.* 29:535-550.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature.* 428: 764-7.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* 125: 749-60.