

博士論文

論文題目

OsNAC 転写因子を介した植物免疫反応である過敏感細胞死の
誘導機構に関する研究

2016 年 3 月

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

氏名 大坪 由佳

目次

目次	・・・2
序論	・・・3
第 1 章 OsNAC 転写因子の過敏感細胞死誘導への関与	・・・10
緒言	・・・11
材料および方法	・・・12
結果	・・・28
考察	・・・78
第 2 章 新規エンドヌクレアーゼ IREN の同定と過敏感細胞死特異的な核	・・・82
DNA の断片化への関与	
緒言	・・・83
材料および方法	・・・84
結果	・・・102
考察	・・・129
参考文献	・・・135
謝辞	・・・155

序論

植物病原菌は地球上に多数存在しており、これらによって引き起こされる病気は、農作物の収穫量を激減させる主たる原因となっている。植物に対して病気を発症しうる病原体としては、真菌、細菌、ファイトプラズマ、植物ウイルス、ウイロイドなどが知られており、日本では、特に、真菌や細菌による病害が 75%以上を占めることが報告されている (Sato 2013)。植物が植物病原菌に感染し、病気になる場合、まず、病原菌と遭遇しなければならない。しかし、植物と病原体との遭遇がそのまま感染から発病に結びつくのかというところというわけでもない。実際、地球上に存在する微生物種数は膨大であるが、特定の植物に病気を起こすことのできる微生物種数は限られている。例えば、イネに病気を引き起こすことのできる真菌は、知られている 10 万種以上のうち約 50 種、ウイルスでは、知られている約 700 種のうち 8 種、植物病原細菌では 100 種のうち 8 種と極めて少ない。これは、植物がほとんどの病原菌の侵入を感知し、効果的な免疫反応を誘導できるからに他ならない。これまでに知られている植物の免疫反応としては、Oxidative burst とよばれる活性酸素種 (Bolwell et al., 1995) の発生やグリシンリッチタンパク質や細胞壁の架橋やカロースの沈着による細胞壁の強化 (Corbin et al., 1987)、植物の自発的細胞死である過敏感細胞死 (Hypersensitive response cell death: HR cell death) の誘導 (Greenberg 1997)、抵抗性関連遺伝子 (pathogenesis related gene: PR-gene) の発現 (Dixon et al., 1994)、ファイトアレキシンなどの低分子抗菌物質の産生・蓄積 (Yamaguchi et al., 2000) などがある。これらの免疫反応が植物病原菌認識後、早期に秩序だてて誘導された場合、植物は病気にはならないが、このような免疫反応が起こらないかまたは遅れた場合、植物は病気になることが明らかになっている (Muthamilarasan and Prasad et al., 2013)。

これまでの研究で、植物には二つの免疫システムが存在していることが明らかになっている (Jones and Dangl 2006)。植物はまず、病原微生物に共通して存在する分子である Pathogen-associated molecular pattern (PAMP) を認識することにより PAMP-triggered immunity (PTI) と呼ばれる免疫を誘導する。このような PTI には、活性酸素の発生やファイトアレキシンの産生と蓄積、カロース沈着による細胞壁の強化、PTI 関連遺伝子群の発現誘導などの免疫反応が含まれており、これらの反応は PAMP 認識後、比較的早期に誘導されるのが特徴である。これまでに、植物が認識する PAMP としては、細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの N 末端側にある保存された 22 残基のアミノ酸に由来するペプチド (flg22) (Felix et al., 1999)、翻訳伸長因子 EF-Tu に由来するペプチド

(elf18) (Kunze et al., 2004)、細胞壁成分であるペプチドグリカン、そして、真菌のもつキチン等が知られている (Gust et al 2007; Kaku et al., 2004)。植物は、これらを細胞膜に存在するパターン認識受容体によって認識し、その認識情報を細胞内に伝達することで PTI を誘導していることが知られている。これらのパターン認識受容体の中で、シロイヌナズナに存在する flg22 を認識するパターン認識受容体である Flagellin-sensing 2 (FLS2) に関する研究が活発に行われている (Gomez-Gomez and Boller 2000)。FLS2 は、細胞外に flg22 と結合するロイシンリッチリピート領域 (LRR) を持ち、細胞質内にセリン/スレオニンキナーゼドメインを有する一回膜貫通型の受容体様キナーゼ (LRR-RLK) である。FLS2 は flg22 非存在下ではホモ二量体を形成しているが (Sun et al., 2012)、flg22 を認識すると細胞外にロイシンリッチリピートをもつ受容体型キナーゼである BAK1 と相互作用する (Chinchilla et al., 2007)。この相互作用により FLS2 と BAK1 は相互にリン酸化され活性化状態になると考えられる。そして、FLS2 からのシグナルは受容体型細胞質タンパク質キナーゼ (RLCK : receptor-like cytoplasmic kinase) ファミリーに属する BIK1、PBS1、PBL1、PBL2、BSK1 に伝達され、そのシグナルを細胞内に伝達することで PTI を誘導している (Zhang et al., 2010; Shi et al., 2013)。このように、植物は様々な PAMP をパターン認識受容体で認識し、PTI を誘導するが、植物病原菌もこの PTI を積極的に抑制する機構を発達させてきた。植物病原細菌の一部は type III 分泌装置 (TTSS) を介してエフェクターとよばれるタンパク質を宿主細胞内に分泌するが、これらのエフェクターの中には PTI を抑制する活性があるものが報告されている。これらの植物病原菌は、このエフェクターを介した PTI 抑制により感染を成立させていると思われる (effector-triggered susceptibility: ETS)。このような病原細菌による ETS に対応して植物は、病原微生物が送り込んだエフェクターを認識してより強い免疫反応を誘導するシステムを獲得した。これが、植物の持つ二つ目の免疫システムであり、effector-triggered immunity (ETI) とよばれている。この ETI には、植物の自発的な細胞死である Hypersensitive response (HR) cell death (過敏感細胞死) が含まれるのが特徴である。このような、細胞内におけるエフェクターの認識には nucleotide-binding site and leucine-rich repeat (NBS-LRR) proteins が関与する場合があることが報告されている。植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* のエフェクターである AvrB の認識に関与する NBS-LRR としてシロイヌナズナから RPM1 が同定された (Mackey et al., 2002)。AvrB をもつ *Pseudomonas syringae* を接種すると AvrB は TypeIII 分泌装置を介してシロイヌナズナ細胞内に分泌される。細胞内に分泌された AvrB は RIN4 (resistance to *Pseudomonas maculicola* protein 1 [RPM1]-interacting protein) と相互作用するが、この RIN4 には RPM1 が結合しており、この AvrB と RIN4 の相互作用を感知しそれを細胞内に伝達する。し

かし、RPM1 から下流にどのようにシグナルが伝達されているかについては未だ不明な点が多く、ETI の全貌が明らかになったとは言い難い。

植物の ETI で認められる免疫反応の一つである過敏感細胞死は、病原菌の進入後早期に、また侵入部位に限局して誘導される細胞死である。このような過敏感細胞死は、遺伝的に高度に組織化されたシステムにより誘導されるプログラム細胞死であることが知られている。同様のプログラム細胞死としては、動物の発生や分化における形態形成や機能獲得、生体防御、老化などにおいて重要な役割をはたしているアポトーシスが知られている。動物のアポトーシスには、核クロマチンの凝集、細胞膜の収縮による細胞容積の減少、アポトーシス小体の発現、細胞膜ブレッピングなどの特徴的な形態変化とともに、特異的なエンドヌクレアーゼによりヌクレオソーム単位で分解される核 DNA のラダー化などが認められる (Walker et al., 1988)。植物の過敏感細胞死においても、細胞膜の収縮、クロマチンの凝集といった形態変化 (Levine et al., 1996; Lacomme and Cruz, 1999; Mur et al., 2008)、核 DNA の断片化 (Yao et al., 2001 ; Tanaka et al., 2001) といったアポトーシスと類似した現象が認められる。しかし、植物の過敏感細胞死には、動物のアポトーシスとは異なっていくつかの特徴も同時に認められる。まず、動物のアポトーシスで見られるアポトーシス小体が過敏感細胞死では認められず、アポトーシスを起こした細胞の貪食作用による消化も認められない。また、植物のゲノム中には動物のアポトーシス誘導において重要な因子である Bcl-2 や Bax などのタンパク質をコードする遺伝子 (Kutuk and Basaga, 2006) や、アポトーシスの実行において中心的役割を果たすシステインプロテアーゼであるカスパーゼをコードする遺伝子が存在しない (Shi 2002)。このように、植物の過敏感細胞死と動物のアポトーシスにはいくつか類似している部分がある一方で、異なる部分も存在している。このことは、植物の過敏感細胞死は動物のアポトーシスとは異なる独自の機構で誘導されていることを示している。

近年、このような植物独自のプログラム細胞死である過敏感細胞死の誘導機構に関する研究が行われるようになった。その中でも、過敏感細胞死誘導の開始シグナルについての研究が活発に行われている。シロイヌナズナに対して非病原性である *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) strain DC3000 *avrRpm1* を接種すると過敏感細胞死が誘導されるが、この接種部位近辺に NADPH オキシダーゼである AtrbohD、AtrbohF によって細胞外のアポプラスト中に ROS が蓄積していることが明らかになった。この時、NADPH オキシダーゼの特異的阻害剤である DPI を処理すると活性酸素の発生だけでなく過敏感細胞死も誘導されなかったことから、AtrbohD、AtrbohF によって産出される ROS が

過敏感細胞死誘導に関与することが証明された (Torres et al., 1998, 2002)。また、細胞内に存在するオルガネラから発生する ROS も過敏感細胞死誘導に関与することが明らかとなっている。シロイヌナズナに対して非病原性である *Pst* DC3000 *AvrRpm1* を接種すると過敏感細胞死が誘導されるが、このとき、*Staygreen* (*SGR*) (Park et al., 2007) という遺伝子の mRNA 発現量が上昇していることが示された。*SGR* は葉の老化時に葉緑体の集光性色素複合体 (light-harvesting complexes: LHCs) と結合してクロロフィル分解を促進するタンパク質をコードする遺伝子として知られている (Park et al., 2007)。そこで、*SGR* の過剰発現株 (*SGR-OX*)、RNAi 抑制株 (*SGRi*) にこの菌を接種したところ、*SGR-OX* では野生株よりも強く過敏感細胞死が誘導され、一方の *SGRi* では過敏感細胞死が抑制されることが示された。また、このときの ROS 蓄積量を測定したところ、*SGR* の mRNA 発現量と ROS の蓄積量に相関性が認められたことから、*SGR* は過敏感細胞死誘導時の活性酸素の発生に影響することが示唆された。タバコにおいて、*SGR* が過剰発現すると、LHCs が分解され、ROS が産生されることが知られている (Park et al., 2007; Mur et al., 2010)。のことから、葉緑体から産生した ROS が過敏感細胞死誘導に関与することが示唆された (Mur et al., 2010)。

近年の研究で、植物の過敏感細胞死誘導には植物特有の細胞小器官である液胞に存在するタンパク質分解酵素、vacuolar processing enzyme (VPE) が関与することが報告された (Hara-Nishimura and Hatsugai 2011)。VPE は種々の液胞タンパク質の成熟化に関与しており、基質タンパク質のアスパラギンまたはアスパラギン酸残基の C 末端側を切断するシステインプロテアーゼであるが、動物のシステインプロテアーゼであるカスパーゼファミリーには属さない。しかし、カスパーゼとよく似た基質認識部位や活性中心をもつことが明らかにされている (Hara-Nishimura et al., 1993)。タバコモザイク病を引き起こす病原体である tobacco mosaic virus (TMV) をその抵抗性遺伝子である *N* 遺伝子をもつタバコに感染させると、過敏感細胞死が誘導されるが、この時、タバコの VPE をコードする *NtVPE* の mRNA 発現量が上昇することが示された (Hara-Nishimura et al., 2004)。同時に、カスパーゼ-1 の阻害剤である Ac-ESEN-CHO と同時に TMV をタバコに感染させると、過敏感細胞死が抑制され、また、*NtVPE* の発現を抑制した *NtVPE* サイレンシングタバコに TMV を接種したときも同様に過敏感細胞死が抑制されることが示された。このときのタバコの葉抽出物に、ビオチン化されたカスパーゼの基質を加え、ストレプトアビジンを用いてウエスタンブロット解析したところ、過敏感細胞死が誘導されたものでは 40kDa と 38kDa 付近に特異的なバンドが検出された。これは、抗 VPE 特異的抗体を用いたときに検出されるバンドと一致する。一方、カスパーゼ-1 阻害剤を処理したタバコの葉抽出物ではこのふたつの特異的なバンドが検出されなかった。さら

に、TMV を感染させたタバコの葉抽出物を用いてカスパーゼ-1 阻害剤の濃度依存における活性の変化を調べたところ、阻害剤の濃度依存的にカスパーゼ-1 の基質である biotin-YVAD-fmk の分解活性が低下した。このことから、液胞に存在する VPE のカスパーゼ-1 様の活性化が TMV 感染時の過敏感細胞死を誘導するのに重要であることが示された。また、VPE サイレンシングタバコにおける形態変化を電子顕微鏡で観察したところ、過敏感細胞死誘導時に認められる液胞膜の崩壊が観察されなかった (Hara-Nishimura et al., 2004)。このことから、TMV によって誘導されるタバコの過敏感細胞死は VPE のカスパーゼ-1 様の活性によって誘導されることが示された (Hara-Nishimura et al., 2004)。一方、シロイヌナズナに植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) strain DC3000 *avrRpm1/avrRpt2* 接種したときに認められる過敏感細胞死には液胞膜の崩壊は認められず、液胞膜と細胞膜が融合する (Hatsugai et al., 2009)。このことは、TMV により誘導される過敏感細胞死と、植物病原細菌によって誘導される過敏感細胞死は異なる経路により誘導されていることを示している。植物病原細菌によって誘導される過敏感細胞死は、カスパーゼ-1 の阻害剤では阻害されず、カスパーゼ-3 の阻害剤である Ac-DEVD-CMK やプロテアソーム阻害剤である Ac-APnLD-CHO 等により阻害された。シロイヌナズナには PBA1、PBB、PBE とよばれるプロテアソームサブユニットが存在している (Yang et al., 2004)。興味深いことに、PBA1 の阻害剤とカスパーゼ-3 阻害剤は濃度依存的に PBA1 の活性を抑制した。同時に、PBA1 阻害剤を加えた場合、カスパーゼ-3 の活性も阻害されたことから、PBA1 はプロテアソームとしての活性と共にカスパーゼ-3 様の活性を持つことが初めて明らかになった。さらに、PBA1 の RNAi 抑制形質転換体 *ipba1-11* に *Pst* DC3000 *AvrRpm1* を接種すると、過敏感細胞死は誘導されず、液胞膜と細胞膜との融合も認められなかったことから、植物病原細菌を接種した葉で認められる過敏感細胞死は PBA1 のプロテアソームとしての活性とカスパーゼ-3 としての活性を介して誘導されていることが明らかとなった (Hatsugai et al., 2009)。

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* は、単子葉を宿主とするグラム陰性細菌であり、葉鞘から葉身にかけて褐色の細長い病斑や、葉鞘の屈曲を引き起こす。この菌には、様々な菌株が存在するが、その宿主特異性は非常に厳密であり、一つの菌株が感染できる植物種はほぼ一種に限定されている。これまでの研究で、イネに対して非病原性である、*A. avenae* N1141 菌株をイネ培養細胞に接種すると、核 DNA の断片化、細胞膜透過性の喪失、細胞膜の収縮や核の凝集を含む形態学的な変化を伴う過敏感細胞死が誘導されることが明らかとなっている (Che et al., 1999; Kaneda et al., 2009)。そこで、この N1141 菌株による過敏感細胞死の誘導機構を調べるため、まずこの過敏感細胞死へのタンパク

質翻訳の特異的阻害剤であるシクロヘキシミドの影響を検討した。その結果、この過敏感細胞死は完全に阻害されたことから、*A. avenae* N1141 菌株によって誘導されるイネ培養細胞の過敏感細胞死誘導には新たな遺伝子の発現やそれによる新規タンパク質の合成が必須であることが示された。そこで、この過敏感細胞死誘導時に特異的に発現誘導される遺伝子をマイクロアレイや特異的サブトラクションによって解析したところ、植物特有の転写因子をコードする *OsNAC4* が同定された。*OsNAC4* は N 末端側に、NAM (Souer et al., 1996) と ATAF1、ATAF2 および CUC2 (Aida et al., 1997) などと保存されている NAC ドメインをもち、C 末端側に転写活性化領域 (TAR) (Kikuchi et al., 2000; Ooka et al., 2003) を有している。また、およそ 160 アミノ酸残基から構成される NAC ドメインは、5 つのサブドメイン (A-E) からなる (Puranik et al., 2012)。シロイヌナズナでは推定上 105 個の NAC 遺伝子が存在し、イネでは 140-151 個存在していることから、植物において *NAC* 遺伝子は大きなファミリー遺伝子群を形成していることが明らかになっている (Nuruzzaman et al., 2010)。近年の研究で、NAC 転写因子はシュートの頂端分裂組織の維持や細胞分裂の制御、花組織における細胞伸長、側根の発達促進のような多くの形態形成の過程に関与していることが示された (Olsen et al., 2005)。また、その他にもホルモンシグナル経路 (He et al., 2005)、葉の老化 (Guo et al., 2006; Kjaersgaard et al., 2011; Wu et al., 2012)、非生物的ストレスのシグナル伝達や耐性 (Hu et al., 2006; Jeong et al., 2012) のような多種多様な現象にも関係することが知られている。さらに、シロイヌナズナの ATAF1 や ATAF2 は細菌や真菌の病原菌に対する防御応答のネガティブレギュレーターとして機能しており (Delessert et al., 2005; Wang et al., 2009)、ONAC122、ONAC131 のサイレンシングイネではイモチ病に対する感受性が増したことから、ONAC122 と ONAC131 はイモチ病の病害抵抗性のポジティブレギュレーターとして機能することが報告されている (Sun et al., 2013)。実際、イネイモチ病菌である *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) を接種したときに発現誘導される *OsNAC111* を過剰発現させるとイネイモチ病に対する抵抗性が上昇することが示された (Yokotani et al., 2013; Yilmaz et al., 2009) ことから、いくつかの NAC 転写因子は植物病害応答にも関与することが示唆されている。これ以外にも、乾燥、浸透圧ストレスに *OsNAC6* が関与し、RIM1 はイネ萎縮病ウイルスに対する抵抗性のネガティブレギュレーターとして機能していることなども知られている (Nakashima et al. 2007; Yoshii et al., 2009)。

筆者の所属する研究室では、過敏感細胞死誘導時に特異的に発現誘導される *OsNAC4* が実際に過敏感細胞死誘導に関与するかどうかについても調べてきた。その結果、*OsNAC4* をイネ培養細胞で過剰発現させたところ、細胞膜透過性の喪失や核 DNA の断片化を伴う過敏感細胞死が誘導された (Kaneda et al., 2009)。また、*OsNAC4* RNAi 抑制

形質転換細胞株では過敏感細胞死の誘導が認められないことも明らかになり、OsNAC4 はイネの過敏感細胞死を正に制御する因子であることが示された。また、*OsNAC4* RNAi 抑制形質転換細胞株では過敏感細胞死誘導時に 139 個の遺伝子が発現誘導されないことが示された (Kaneda et al., 2009)。この 139 遺伝子の中には、カルシウム依存型エンドヌクレアーゼ様分子をコードする *IREN* と、分子シャペロンである *OsHSP90* が存在していた。そこで、これら遺伝子をイネ培養細胞で高発現させたところ、*IREN* は核 DNA の断片化に、*OsHSP90* は細胞膜透過性の喪失に関与していることが明らかになった (Kaneda et al., 2009)。このように、*OsNAC4* がイネの過敏感細胞死を正に制御することは明らかになったが、*OsNAC4* がどのようにこれら細胞死実行因子の発現を制御しているのか、また *OsHSP90* や *IREN* が実際にどのようにして過敏感細胞死誘導時に認められる細胞膜透過性の喪失や核 DNA の断片化を引き起こしているのかについてはほとんど明らかになっておらず、*OsNAC4* を介した過敏感細胞死誘導の研究はその途端にいたばかりである。

そこで、本研究では、*OsNAC4* による過敏感細胞死実行因子の発現制御機構や過敏感細胞死誘導の実行に関わる因子の作用機序を調べることで、植物の過敏感細胞死の誘導機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。第 1 章では、イネ細胞において *OsNAC4* がどのように様々な過敏感細胞死実行因子の発現を制御しているのかについて調べた結果を述べる。また、第 2 章では、過敏感細胞死誘導時に発現誘導される *IREN* の核 DNA 断片化への関与を明らかにするとともに、そのエンドヌクレアーゼとしての酵素特性についても調べた結果を述べる。

第 1 章
OsNAC 転写因子の過敏感細胞死誘導への関与

第 1 章 OsNAC 転写因子の過敏感細胞死誘導への関与

緒言

これまでの研究で、イネに対して非病原性である *Acidovorax avenae* N1141 菌株をイネ培養細胞に接種すると、核 DNA の断片化や細胞質の凝集といった特徴的な形態変化を伴う過敏感細胞死が誘導されることが明らかになった。さらに、この非病原性菌株を接種したときにのみに認められる過敏感細胞死の誘導は OsNAC4 という植物特有の転写因子によって正に制御されていることが示された (Kaneda et al., 2009)。また、*OsNAC4* RNAi 抑制形質転換細胞株を用いたマイクロアレイ解析の結果から、139 個の遺伝子が過敏感細胞死誘導時に実際に OsNAC4 によって転写制御されていることが示されており、OsNAC4 転写因子はこれらの遺伝子の転写制御を介して過敏感細胞死を誘導している可能性が高いと考えられる。しかし、過敏感細胞死誘導に転写活性が必要だというのは明らかになっているが、OsNAC4 がどのような機構でこれら遺伝子を転写制御し、過敏感細胞死を誘導しているのかだけでなく、OsNAC4 に転写活性化能がそもそも存在するかどうかについても全く明らかになっていない。そこで、本章では、このような OsNAC 転写因子がどのようにして過敏感細胞死誘導に関与しているのかについて分子レベルでの解析を試みた。

第 1 章

材料と方法

1) イネ培養細胞の培養と継代

イネ培養細胞は、Oc 細胞 (*Oryza sativa* L. C5924) を用いた。100 ml の三角フラスコに分注した R2S 培地 20 ml にイネ培養細胞懸濁液 2 ml を加え、30℃、108 rpm、連続光下 (LH-350SP、日本医化器機製作所) で振盪培養 (NR-20、TAITEC) を行った。7 日毎に植え継ぎ、継代から 4 日目の培養細胞を実験に用いた。

2) 植物病原細菌の保存と培養

イネに対して非病原性である *Acidovorax avenae* N1141 (MAFF 301141) 菌株 (Kodota et al., 1996) は農業生物資源研究所から分与していただいた。菌体の保存は、*Pseudomonas* agar F (DIFCO, USA) 寒天培地で 30℃ 一晚静置培養し、寒天培地 1 枚分の菌体を skim milk 培地 (10% (w/v) skim milk (WAKO)、1.5% (w/v) sodium glutamate) 1ml に懸濁し、50 ml ずつ分注して -80℃ に保存した。

菌体を用いる実験のためには、保存してある菌体 50 ml を *Pseudomonas* agar F 寒天培地へ植菌し、30℃、over night で培養した。菌体は滅菌水 1 ml に懸濁し、吸光度 (A_{610}) を測定し菌体数を計算した。その後、滅菌水で適宜希釈し、それぞれの実験に用いた (Che et al., 1999)。

3) イネプロトプラストの単離と PEG 法による遺伝子導入

イネプロトプラストは、イネ培養細胞 (Oc) から単離した。酵素液 (1% cellulose RS (Yakult)、0.5% Macerozyme、0.1% pectolyase、0.6 M Mannitol、5 mM MES-KOH pH5.7、総酵素液 15 ml) を調製したのち、55℃、10 分間熱処理することにより、Cellulase RS、Macerozyme、pectolyase に不純物として含まれるタンパク質分解酵素を失活させた。室温になるまで静置し、1M CaCl_2 150 ml (終濃度 10 mM)、BSA 0.015g (終濃度 0.1%) を加えてよく溶解させた。イネ培養細胞 20 ml をシャーレ (9 cm) にとり、培養液を取り除いたのち酵素液 15 ml を加え、遮光で 30℃、3 時間処理した。セルストレーナー (100 mm, BD Bioscience) を 50 ml の遠心チューブにセットし、そこに酵素処理産物を加えることにより細胞残渣を取り除いたのち、100g、5 分間遠心分離し、ペレットを得た。KMC (117 mM KCl、82 mM MgCl_2 、85 mM CaCl_2) 5 ml をプロトプラストへ加え、よく懸濁したのち 100g、5 分間遠心分離し、プロトプラストをペレットとして得た。プロトプラ

スト溶液の少量を血球計算板にのせプロトプラストの数を測定した後、 1×10^6 になるように MMg (0.4 M mannitol、15 mM MgCl_2 、4 mM MES-KOH pH5.7) を加えた。このプロトプラスト溶液 200 ml に、導入するプラスミド 5 ml を混合し、5 分間静置した後、50% PEG 溶液 (PEG 4000 (Fluka)、0.2 M Mannitol、0.1M CaCl_2) を 210 ml 加え、穏やかにピペッティングし (23-25 回程度ピペッティング)、30 分間静置した。静置後、KMC を 800 ml 加え、100g、5 分間遠心分離し、上清を取り除いた後、新たに KMC 500 ml を加え、各実験で使用するまで 30°C で遮光静置した。

4) *OsNAC3* RNAi 形質転換体作製

pANDA-OsNAC3 ベクターをエレクトロポレーションにより *Agrobacterium tumefaciens* EH105 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ウム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) 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。*pANDA-OsNAC3* を保持した *A. tumefaciens* EHA105 菌株を AB 培地に植菌し、22°C 暗黒下で 3 日間培養した。培養した *A. tumefaciens* EHA105 菌株を MSL (40 mg/ml Acetosyringone) に $\text{OD}_{600}=0.02-0.04$ となるように懸濁後、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 暗黒下で 3 日間培養した。感染させたカルスを滅菌水 (250 mg/ml Claforan) で洗浄後、一次選抜培地 (MS 培地) へ移し、30°C、光照明下で 3 日間培養した。一次選抜培地上で生育が認められるカルスを二次選抜培地 (R2R 培地) に移し、30°C、光照明下で 2 週間培養した。この様な二次選抜は 2 回行った。二次選抜培地上で生育が認められるカルスを Oc 細胞と同様に液体培地中で培養し、培養細胞化した。

5) プラスミド作製

OsNAC3 RNAi 抑制形質転換体を作製するのに用いるためのベクターは、dsRNA をイネ細胞内で高効率に発現することができる *pANDA* vector (Miki and Shimono, 2004, 奈良先端科学技術大学院大学・島本功博士より分与) を用いた。*OsNAC3* の塩基配列情報をもとに C 末端領域をターゲット領域 (514-831bp) として増幅させるプライマーセット (Forward primer は cDNA 断片を *pENTR/D-TOPO* とライゲーションするため CACC を付加した) を用いて、*pAHC17-OsNAC3* をテンプレートとして PCR を行った。アガロースゲル電気泳動により目的の cDNA 断片が増幅されていることを確認した後、*pENTR* Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、*pENTR/D-TOPO* へライゲーション

ンし、大腸菌 DH5 α へ形質転換した。

PCR 反応液		PCR 反応条件	
2 \times buffer for KOD-FX	7.5 μ l	94 $^{\circ}$ C	2 min
dNTP (2mM)	3 μ l	*98 $^{\circ}$ C	10 sec
Primer F (10 mM)	0.45 μ l	*55 $^{\circ}$ C	30 sec
Primer R (10mM)	0.45 μ l	*68 $^{\circ}$ C	1min
KOD-Fx polymerase	0.1 μ l	68 $^{\circ}$ C	7 min
Sterile Water	2.5 μ l	4 $^{\circ}$ C	∞
IREN cDNA (100 pg/ml)	1.0 μ l	* (98 $^{\circ}$ C \rightarrow 55 $^{\circ}$ C \rightarrow 68 $^{\circ}$ C) \times 30 cycles	
Total vol.	15 μ l		

【Primer sets】

Primer		Sequence
<i>OsNAC3</i> RNAi /pENTR	F	5' - <u>CACCATGCAGAGCAGGAAGGAGGAGGAG</u> - 3'
	R	5' - AATCTCCAATCTGGAGTAACACTGCTAAAC - 3'

二重線は TOPO クローニングサイトを示す。

作製した *pENTR-OsNAC3 RNAi* を LR クローニング反応 (Invitrogen) により *OsNAC3* の RNAi ターゲット領域である 508 bp を dsRNA 発現用 *pANDA* ベクターへ導入した (*pANDA-OsNAC3*)。

TOPO [®] cloning 反応液		LR clonase 反応液	
PCR product	1 μ l	pENTR-IREN RNAi (100 ng/ml)	1.5 μ l
Salt solution	1 μ l	pANDAmmini (100 ng/ml)	1.5 μ l
Sterile water	3.5 μ l	TE buffer (pH8.0)	6 μ l
<i>pENTR D-TOPO</i> (12.5 ng 分)	0.5 μ l	Total vol.	8 μ l
Total vol	6 μ l		

イネプロトプラスト内に *OsNAC3* タンパク質を一過的に過剰発現するプラスミドを作製するために、*pAHC17-OsNAC3* をテンプレートとし、特異的なプライマーセットを用いて PCR を行った。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 (*pENTR-OsNAC3*)。作製した *pENTR-OsNAC3* を LR clonase 反応により *OsNAC3* mRNA の ORF 領域を植物細胞内発現用 *pBI221-GW-Ve* ベクターへ導入した (*pBI221-OsNAC3*)。 *pBI221-OsNAC4* は同様な方法で作成したものを分与していただいた (多賀、2008)。

PCR 反応液		PCR 反応条件	
2×buffer for KOD-FX	7.5 µl	94°C	2 min
dNTP (2mM)	3 µl	*98°C	10 sec
Primer F (10 mM)	0.45 µl	*62°C	30 sec
Primer R (10mM)	0.45 µl	*68°C	1min
KOD-Fx polymerase	0.1 µl	68°C	7 min
Sterile Water	2.5 µl	4°C	∞
IREN cDNA (100 pg/ml)	1.0 µl	* (98°C→55°C→68°C) × 30 cycles	
Total vol.	15 µl		

【Primer sets】

Primer		Sequence
<i>pENTR-OsNAC3</i> (終始コドン有)	F	5' - <u>CACCGTGTCCATGGCGGCGGCGAAGCGG</u> - 3'
	R	5' - CGGGAT <u>CCTCAGAAGAATGGCGCGCCGA</u> - 3'

下線部は *Bam*HI サイトを示し、二重線は TOPO クローニングサイトを示す。

イネプロトプラスト内での *OsNAC3-Venus* 融合タンパク質の局在を観察するため、*pBI221-OsNAC3-Ve* ベクターを作製した。*pBI221-OsNAC3-Ve* ベクターは上記で作製した *pBI221-OsNAC3* と同様の方法で作製した (*pBI221-OsNAC3-Ve*)。このときのディステーションベクターは *pBI221-GW-Venus* を用いた。*pBI221-OsNAC4-Ve* は以前作成したものをを用いた (多賀、2008)。

【Primer set】

Primer		Sequence
<i>pENTR-OsNAC3</i> (終始コドン無)	F	5' - <u>CACCGTGTCCATGGCGGCGGCGAAGCGG</u> - 3'
	R	5' - GAAGAATGGCGCGCCGAGCGGCTCCGT - 3'

二重線は TOPO クローニングサイトを示す。

BiFC 法による OsNAC3 と OsNAC4 との相互作用解析に用いる *pBI221-OsNAC3-VC* は上記と同様の方法で作製した (*pBI221-OsNAC3-VC*)。このときのディスティネーションベクターには *pBI221-GW-VC* を用いた。*pBI221-OsNAC4-VN* は以前作成したものを用いた (多賀、2008)。

また、OsNAC3 と OsNAC4 との相互作用解析において、OsNAC3 と OsNAC4 がどの領域で相互作用しているのかを調べるためのベクターとして、*pBI221-OsNAC3-NAC domain-VC*、*pBI221-OsNAC4-NAC domain-VN* を作製した。このベクターを作成するため、*pAHC17-OsNAC3* をテンプレートとし、NAC domain 領域 (1 bp-513 bp) のみを増幅する特異的なプライマーセットを用いて PCR を行った。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 (*pENTR-OsNAC3 NAC domain*)。作製した *pENTR-OsNAC3* を LR clonase 反応により *OsNAC3* mRNA の ORF 領域を植物細胞内発現用 *pBI221-GW-Ve* ベクターへ導入した (*pBI221-OsNAC3 NAC domain-Ve*、*pBI221-OsNAC4 NAC domain-Ve*)。

【Primer sets】

Primer		Sequence
<i>pENTR-OsNAC3NACdomain</i>	F	5' - CACCGTGTCCATGGCGGCGGCGAAGCGG - 3'
	R	5' - CTTCTTGTTGTACAGCCGGCACAGCAC - 3'
<i>pENTR-OsNAC4NACdomain</i>	F	5' - CACCAACATTTTCACGAGAGGAGAAGGATGGA - 3'
	R	5' - CTTGTTGTACAGCCGGCACAGC - 3'

Venus タンパク質を融合した NAC domain に存在するセリンをアラニンに 1 つずつ置換した OsNAC4 を発現するプラスミドを作製した。まず、*pENTR-OsNAC4-S1A* は、*pENTR-OsNAC4* をテンプレートとし、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.)。また、*pENTR-OsNAC4-S2A* は *pENTR-OsNAC4-S1A* をテンプレートとし、特異的なプライマーセットを用いて Inverse PCR を行った。そして、*pENTR-OsNAC-4-S3A* には *pENTR-OsNAC-4S2A*、*pENTR-OsNAC4-S4A* は *pENTR-OsNAC-4-S3A*、*pENTR-OsNAC-4S5A* には *pENTR-OsNAC-4S4A* をそれぞれテンプレートとし、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。PCR 反応液に *DpnI* 処理を加え、37℃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℃で 1 時間セルフライゲーションさせ、大腸菌 DH5a へ形質転換した

(*pENTR-OsNAC4-S1A*, *pENTR-OsNAC4-S2A*, *pENTR-OsNAC4-S3A*, *pENTR-OsNAC4-S4A*, *pENTR-OsNAC4-S5A*)。

Inverse PCR 反応液		Inverse PCR 反応条件	
2 × buffer for iPCR	7.5 μl	94℃	2 min
2 mM dNTP	3 μl	*98℃	10 sec
Primer F (10 mM)	0.45 μl	*68℃	1min
Primer R (10 mM)	0.45 μl	68℃	7 min
KOD -plus-	0.1 μl	4℃	∞
Sterile Water	2.5 μl	* (98℃→68℃) × 30 cycles	
pBI221-IREN-Venus (100 pg/ml)	1.0 μl		
Total vol.	15 μl		

【Primer sets】

Primer	Sequence	
<i>OsNAC4-S91A/pAHC17</i>	F	5' - CACCGTGTCCATGGCGGCGGCGAAGCGG - 3'
	R	5' - CTTCTTGTGTACAGCCGGCACAGCAC - 3'
<i>OsNAC4-S91A/S116A/pAHC17</i>	F	5' - CACCAACATTTTCACGAGAGGAGAAGGATGGA - 3'
	R	5' - CTTGTTGTACAGCCGGCACAGC - 3'
<i>OsNAC4-S91A/S116A/S130A/pAHC17</i>	F	5' - GCCGGGAAGGCGCCGAG - 3'
	R	5' - GTAGAACACGAGCGCCTTCTTG - 3'
<i>OsNAC4-S91A/S116A/S130A/S161A/pAHC17</i>	F	5' - GCACAGAAGCTGGACGAGTGGGT - 3'
	R	5' - GCCCTTCTTGCCGCCCGG - 3'
<i>OsNAC4-S10A/S91A/S116A/S130A/S161A/pAHC17</i>	F	5' - GCCGGGAGGAGGGACGCG - 3'
	R	5' - GCCCCCAACCGCCGCCG - 3'

Self-ligation 反応液

PCR product (<i>DpnI</i> treated)	2 μl
Ligation High	5 μl
T4 Polynucleotide Kinase	1 μl
Sterile Water	7 μl
Total vol.	15 μl

作製した *pENTR-OsNAC4-S1A*、*pENTR-OsNAC4-S2A*、*pENTR-OsNAC4-S3A*、*pENTR-OsNAC4-S4A*、*pENTR-OsNAC4-S5A* をそれぞれ LR clonase 反応によりインサート領域を植物細胞内発現用 *pBI221-GW-Ve* ベクターへ導入した (*pBI221-OsNAC4-S1A-Ve*、*pBI221-OsNAC4-S2A-Ve*、*pBI221-OsNAC4-S3A-Ve*、*pBI221-OsNAC4-S4A-Ve*、*pBI221-OsNAC4-S5A-Ve*)。

pAHC17-OsNAC3、*pAHC17-OsNAC4*、*pAHC25* (*uidA* 発現ベクター) は奈良先端大の金田博士より分与していただいた。

OsNAC4 と相互作用するイネタンパク質の探索を行うために、Yeast two hybrid を用いた。そこで、このときに用いるベクターを作製するために *pAHC17-OsNAC4* をテンプレートに OsNAC4 の C 末端側から 78 アミノ酸残基分欠損するようなプライマーセットを用いて PCR を行った。PCR 産物を *pGEM-T* ベクターと Ligation を行った (*pGEM-T* vector System I Kit, Promega) (*pGEM-T-OsNAC4*)。

PCR 反応液		PCR 反応条件
10×buffer for Blend taq	2.0 μl	96°C 5 min
dNTP (2mM)	2.0 μl	*96°C 30 sec
Primer F (10 mM)	1.0 μl	*69°C 30 sec
Primer R (10mM)	1.0 μl	*72°C 3 min
Blend taq polymerase	0.2 μl	15°C ∞
Sterile Water	11.8 μl	* (96°C→69°C→72°C) × 30 cycles
<i>OsNAC4/pGEX</i> (100 pg/ml)	2.0 μl	
Total vol.	20 μl	

【Primer sets】

Primer		Sequence
<i>pGEM-T-OsNAC4</i>	F	5' - <u>GAATTC</u> ATGGCGGCGGCGGTTGGGGG - 3'
	R	5' - <u>GGATC</u> CCCCGCCGCAGCCACCGTGCCG - 3'

F primer の下線部は *EcoRI* サイトを示しており、R primer の下線部は *BamHI* サイトを示している。

pGEM-T vector への Ligation 反応液

2×rapid buffer	2 µl
pGEM-T vector	5 µl
T4 DNA リガーゼ	1 µl
PCR product (インサート DNA)	7 µl
Total vol.	15 µl

作製した *pGEM-T-OsNAC4* のインサートである OsNAC4 を酵母発現用ベクターである *pGBKT7* へ組み込むため、それぞれを *EcoRI* と *BamHI* で処理し、ベクターとインサートをそれぞれ切り出した後、ライゲーションさせ、大腸菌 DH5a に形質転換した (*pGBKT7-OsNAC4*)。

pGBKT-7 への Ligation 反応液

Vector	2 µl
Insert	1.4 µl
2×Ligation Mix	10 µl
Sterile Water	6.6 µl
Total vol.	15 µl

OsNAC3 の特異的な抗体を作製するために OsNAC3 抗原タンパク質の発現ベクターを作製した。まず OsNAC3 のエピトープ部位を GENETYX-MAC により同定し、また、OsNAC ファミリー間でマルチプルアライメントを行い、ファミリー間で相同性の低い領域を探索した。その結果、C 末端側の転写活性化領域において配列の相同性が非常に低いことが明らかとなり、またこの部分はエピトープ部位となり得ることがわかったので、173 番目のグルタミン酸から 276 番目のフェニルアラニンで OsNAC3 の抗原タンパク質とした (antigen OsNAC3)。Antigen OsNAC3 の領域を増幅するプライマーセットを用いて、*pAHC17-OsNAC3* をテンプレートとして PCR を行い、得られた PCR 産物を *Zero-Blunt* ベクター (*Zero Blunt*®PCR cloning Kit, Invitrogen) へライゲーション後、大腸菌 DH5a へ形質転換した (Antigen OsNAC3/pCR-Blunt)。

PCR 反応液

2×buffer for KOD-FX	7.5 µl
---------------------	--------

PCR 反応条件

94°C 2 min

dNTP (2mM)	3 μ l	*98°C 10 sec
Primer F (10 mM)	0.45 μ l	*62°C 30 sec
Primer R (10mM)	0.45 μ l	*68°C 1min
KOD-Fx polymerase	0.1 μ l	68°C 7 min
Sterile Water	2.5 μ l	4°C ∞
<i>pAHC17-OsNAC3</i> (100 pg/ml)	1.0 μ l	* (98°C→55°C→68°C) \times 30 cycles
Total vol.	15 μ l	

【Primer set】

Primer		Sequence
Antigen <i>OsNAC3</i>	F	5' - <u>GGATCC</u> GAGTGGGAGAAGATGCAGAGCAGG - 3'
<i>/pCR-Blunt</i>	R	5' - CTCGAGTCAGAAGAATGGCGCGCCGA - 3'

F primer の下線部は *Bam*HI、R primer の下線部は *Xho*I を示す。

<i>pCR-Blunt</i> vector への Ligation 反応液	
pCR®-Blunt (25 ng)	1 μ l
PCR product	1-5 μ l
5 \times Express Link™T4DNA Ligase Buffer	2 μ l
Steril Water	7 μ l
ExpressLink™T4DNA Ligase (5 units)	1 μ l
Total vol	10 μ l

作製した *antigen OsNAC3/pCR-Blunt* を *Bam*HI と *Xho*I で制限酵素処理し、同様に処理した発現用 *pGEX-6P-3* ベクター (GE Healthcare) へそれぞれライゲーション後、大腸菌 DH5a へ形質転換した (*pGEX-6P-3-antigen OsNAC3*)。

6) Yeast two hybrid 法

Yeast two hybrid は MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) を用い、添付しているプロトコルに従って行った。酵母は AH109 株 (Clontech) を用いた。AH109 株は PJ69-2A 株の派生株であり、GAL2 プロモーターによって制御される ADE2 レポーター遺伝子、GAL1 プロモーターによって制御される HIS3 レポーター遺伝子に加えて、MEL1 プロモーターによって制御される MEL1 および LacZ レポーター遺伝子を持つ。

グリセロールストックの AH109 株を YPDA 寒天培地に画線し、30℃で 3 日間培養した。直径 2 mm のシングルコロニーを選び、3 ml の YPDA 液体培地 (1% (w/v) Bacto Yeast Extract、2% (w/v) Yeast nitrogen base w/o a.a.、2% (w/v) glucose、75 mg/ml adenine) に植菌し、30℃で振盪培養した。これを前々培養とし、OD₆₀₀ が 0.6-1.0 になるまで約 8~9 時間培養した。[OD₆₀₀ = 8×10^8 cells/ml] の計算式を用いて、菌体数が 8×10^6 - 9.6×10^6 cfu/ml なるように前々培養液を 50 ml の YPDA 液体培地添加し、30℃で振盪培養した。これを前培養とし、OD₆₀₀ が 0.15-0.2 になるまで約 12-16 時間培養した。前培養液を 700g、室温で 5 分間遠心分離し、酵母を回収した。培地を取り除き、YPDA 液体培地 2 ml を加えて懸濁したものを、100 ml の YPDA 液体培地に添加し、30℃で振盪培養した。これを本培養とし、OD 測定結果が 0.4-0.5 になるまで約 2-5 時間培養した。本培養液を 700g、室温で 5 分間遠心分離し、酵母を回収した。培地を取り除き 20 ml の滅菌水を加え、酵母を完全に懸濁し、700g、室温で 5 分間遠心分離して上清を取り除き、1 ml の 1.1×TE/LiAc 溶液を加えてピペッティングにより酵母を懸濁した。これを 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し替えて、13,000g、室温で 5 秒間遠心分離して上清を取り除き、1.1×TE/LiAc 溶液 600 µl に懸濁したものをコンピテントセルとして用いた。50 µl の酵母コンピテントセルに、作製した bait プラスミド 2.5 µg と *pGADT7* プラスミド 2.5 µg をそれぞれ添加し混合した。50 µg のキャリア DNA (Salmon Sperm DNA (invitrogen)) と 500 µl の PEG/LiAc 溶液を添加してボルテックスでよく混合した後、30℃で 30 分間振盪した。70 µl の DMSO を (SIGMA) を添加して転倒混和し、42℃で 5 分毎に転倒混和しながら 15 分間熱処理をした。熱処理後、氷上で 1 分間冷却し、13,000g、室温で 5 秒間遠心分離して上清を取り除き、YPDA 液体培地 1 ml を加えて 30℃で 30 分間振盪した。30 分後、13,000g、室温で 5 秒間遠心分離して上清を取り除き、750 µl の滅菌水に懸濁したものを、直径 5 mm のガラスビーズを用いて直径 9 cm の SC (synthetic complete) /-His/-Leu/-Trp 寒天培地と SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 寒天培地、またコントロールとして SC/-Leu/-Trp 寒天培地に各 150 µl ずつプレーティングした。これを 30℃で 3 日間培養した。

一次スクリーニングには作製した bait プラスミドとイネ cDNA ライブラリーのプラスミドを LiAc 法により酵母へ同時導入し、SC/-Leu/-Trp 寒天培地と SC/-His/-Leu/-Trp 寒天培地にプレーティングし、SC/-His/-Leu/-Trp 寒天培地で得られた形質転換体を一次スクリーニングの候補体とした。また、ポジティブコントロールでは bait ベクターに *pGBKT7-53* を 2.5 µg、prey ベクターに *pGADT7-T* を 2.5 µg を使用し、ネガティブコントロールでは bait ベクターに *pGBKT7-Lam* を 2.5 µg、prey ベクターに *pGADT7-T* を 2.5 µg を使用した。ポジティブコントロールとネガティブコントロールも同様な方法で酵母に

導入し、SC/-Leu/-Trp 寒天培地と SC/-His/-Leu/-Trp 寒天培地と SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 寒天培地に各 150 μ l ずつプレーティングした。30℃で 3 日間培養した後、それぞれの培地に形成したコロニー数を数えた。

二次スクリーニングでは、一次スクリーニングによって得られた候補体のコロニーを SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 寒天培地と SC/-His/-Leu/-Trp/X-a-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactos pyranoside) (nacalai tesque) 寒天培地にそれぞれに画線し、30℃で 3 日間培養した。3 日後、SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 寒天培地上で生育でき、且つ SC/-His/-Leu/-Trp/20 mg/ml X-a-GAL 寒天培地で青色を呈したコロニーを二次スクリーニングの候補体とした。

【PEG/LiAc 溶液】

組成	容量
50 % PEG	6 ml
10×TE	0.75 ml
10×LiAc	0.75 ml
Total vol.	7.5 ml

【20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)】

組成	容量
L - Arginine	0.2 g
L - Methionine	0.2 g
L - Tyrosine	0.3 g
L - Isoleucine	0.3 g
L - Lysine HCl	0.3 g
L - Phenylalanine	0.6 g
L - Valine	1.5 g
L - Threonine	2.0 g
Uracil	0.2 g
Total vol.	500 ml

【100×Stock in 100 ml】

Final conc. (mg/L)

Uracil	0.2 g	20
L-Leucine	0.6 g	60
L-Tryptophan	0.4 g	40
L-Histidin	0.2 g	20
Adenine	0.75 g	75

【SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp寒天培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base w/v a.a	1.34 g
Glucose	4 g
20 × Drop-out mixture	10 ml
100 × Ura	2 ml
Agar	4 g
Total vol.	200 ml

【SC/-Leu/-Trp 寒天培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base w/v a.a	1.34 g
Glucose	4 g
20×Drop-out mixture	10 ml
100×Ura	2 ml
100×L-Histidin	2 ml
100×Adenine	2 ml
Agar	4 g
Total. vol	200 ml

SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 寒天培地に生育したコロニーをテンプレートとしてコロニーPCRを行い、1.25 %アガロースゲルにて電気泳動を行うことによりインサートの有無を確認した。反応組成、反応条件は以下に示す通りである。また、PCR産物をテンプレートとしてサイクルシーケンス反応を行なうため、コロニーPCRで一本のバンドが得られたPCR産物のみ ExoSAP-IT 処理を行い、処理が終わったサンプルをサイクルシーケンス反応に用いた。

【コロニーPCR 反応組成】

PCR 反応液		PCR 反応条件	
buffer for KOD-FX	5 μ l	94°C	2 min
dNTPs	2 μ l	*98°C	10 sec
10 mM Primer F	0.5 μ l	*55°C	30 sec
10 mM Primer R	0.5 μ l	*68°C	3 min
PCDx	8 μ l	4°C	∞
KOD-FX	1.6 μ l		
DW	0.8 μ l	* (98°C→55°C→68°C) \times 30 cycles	
Total. vol	10 μ l		

【Primer】

コロニーPCR	Y2H-Amplimer-F	5' - CTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCC - 3'
	Y2H-Amplimer-R	5' - GTGAACTTGCGGGGTTTCAGTATCTACGATT - 3'
Sequence	Y2H-T7pro-F	5' - TAATACGACTCACTAT -3'

7) OsNAC3-Venus、OsNAC4-Venus のイネ細胞内局在

OsNAC3 と OsNAC4 のそれぞれのイネ細胞内の局在を調べるために、OsNAC3、OsNAC4 に蛍光標識として Venus タンパク質を融合した発現ベクター (*pBI221-OsNAC3-Venus*、*pBI221-OsNAC4-Venus*) 5 μ g を PEG 法によりイネプロトプラスト (2×10^5 cell) に導入し、導入して 5-6 時間後のイネプロトプラストを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、観察する 1 時間前に Hoechst 33342 を終濃度 20 μ g/ml となるようにプロトプラストに加えた。

8) セリン、スレオニン特異的リン酸化阻害である Staurosporine の処理

単離したイネプロトプラストを目的の細胞濃度になるように MMg solution で希釈後、200 μ l ずつエッペンドルチューブに分注し、そこへ Staurosporine を添加し 30°C の遮光下で 1 時間静置した。1 時間後、目的のプラスミドを必要量導入し、再び、30°C の遮光下で静置培養した。そして、2 時間おきに Staurosporine を終濃度 2 μ M になるように再添加した。また、コントロールには Staurosporine を溶解しているメタノールを等量添加した。

9) BiFC 法

イネ細胞内で発現する *pBI221-OsNAC3-VC* ベクターを作製したものと、本学の 2008 年度修士卒、多賀氏から分与していただいた *pBI221-OsNAC4-VN* を使用した。それぞれのベクター 5 µg ずつを PEG 法によりイネプロトプラストへ導入し、導入して 6 時間後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、このとき、顕微鏡観察する 1 時間前に Hoechst 33342 を終濃度 20 µg/ml となるようにプロトプラストに処理した。

10) GUS 活性を指標とした過敏感細胞死の測定

パーティクルボンバードメント法を用いて OsNAC3、OsNAC4 発現プラスミドをそれぞれイネ培養細胞に導入し、導入して 4, 16, 28 時間後にイネ培養細胞懸濁液 1ml を 24 穴プレートに回収し、培地を除去した。GUS 反応液 (2.0 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc)、0.5 mM K₃Fe (CN)₆、0.5 mM K₄Fe (CN)₆、0.5% TritonX-100、20% Methanol、200 mM phosphate buffer、pH7.0) を 1 ml 加え、37°C 暗黒下で反応させた。

11) TUNEL 染色

パーティクルボンバードメント法を用いて OsNAC3、OsNAC4 発現プラスミドをそれぞれイネ培養細胞に導入し、導入して 12 時間後にイネ培養細胞懸濁液 1ml を 24 穴プレートに回収し、培地を除去した。1×PBS で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド/PBS を 1ml 加え、一晚室温で固定した。固定したサンプルを一部エッペンドルフチューブにとり、1×PBS で 3 回洗浄した後、0.2% triton-100/PBS を 200 µl を加え、室温で 30 分間、透過処理を行った。30 分後、1×PBS で 3 回洗浄後、PCR チューブに移し DeadEnd Fluoromeric TUNEL system (Promega) に従って細胞を TUNEL 染色した。

12) OsNAC3 抗体の作製

発現ベクター (*pGEX-6p-3-OsNAC3antigen*) を導入した BL21 (DE3) 株を LB 液体培地 1 ml に植菌し、37°C、over night で培養した (前培養)。前培養液を 1L に植菌し、37°C で振盪培養した。培養液の OD₆₀₀ が 0.6 付近になったら、最終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加え、さらに、3 時間培養した。培養液を 5000g で 10 分間遠心分離し、大腸菌を回収し、PBS (-) で沈殿した大腸菌を懸濁した後、再度 5000g で 10 分間遠心分離を行い、上清を取り除いた。菌体からすぐにタンパク質を精製しない場合は、菌体を -80°C で凍結し、保存した。このようにして得られた大腸菌を lysisbuffer (PBS (-)) で

再懸濁し、クラッシュアイスで氷冷しながら超音波破碎機 (ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201, TOMY) で 30 秒間破碎し、1 分間静置した。この操作を 7 回繰り返した後、破碎物を 4℃、15,300g で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。得られた上清から Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare) を用いて OsNAC3 抗原タンパク質を精製した。

精製したOsNAC3抗原タンパク質 (約3 mg) を抗原として6回に分けてウサギへ注射した。ウサギへの免疫と抗血清の調製はSIGUMA®Life Scienceに依頼した。抗原投与と採血スケジュールは以下の表に示した。

日数	作業日	作業項目	採血量
0	2013/07/16	予備採血、抗原投与 (200 µg/FCA)	1.5 ml
13	2013/07/29	抗原投与 (100 µg/FIA)	
27	2013/08/12	抗原投与 (100 µg/FIA)	
41	2013/08/26	抗原投与 (100 µg/FIA)	
48	2013/09/02	採血1	15.0 ml
55	2013/09/09	抗原投与 (100 µg/FIA)	
63	2013/09/17	採血2	18.0 ml
70	2013/09/24	抗原投与 (100 µg/FIA)	
76	2013/09/30	全採血	55.0 ml

OsNAC3抗血清からIgG抗体を精製するために、5 mlの抗血清に等量の20 mM sodium phosphate (pH7.0) を加え、0.45 µmフィルターで濾過した。20 mM sodium phosphate (pH7.0) で平衡化したHiTrap rProteinA 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 (pH7.0) で洗浄した後、100 mM sodium citrate buffer (pH3.0) で溶出し、1MTris-HCl (pH9.0) で即座に中和した。溶出液をAmicon Ultra 10Kを用いた限外濾過で、PBSに置換し、OsNAC3抗体が1 mg/ml となるように希釈し、-80℃で凍結保存した。

13) 過敏感細胞死誘導細胞における OsNAC3、OsNAC4 の存在部位

A. avenae N1141 菌株を接種して 0、1、3、6、9 時間後のイネ培養細胞を回収し、-80℃で凍結保存した。これらの細胞を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いてパウダー状になるまですり潰し、suspension buffer (5 mM MES (pH5.6)、5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.4% (w/v) TritonX-100、0.35 M sucrose、20% (w/v) glycerol、5 mM 2-mercaptoethanol) に懸濁した。100 µm セルストレイナーで濾過した後、溶液を 4℃、3,500g で 5 分間遠心分離し、ペレットを回収した (核分画)。得られたペレットに washing buffer (5 mM MES (pH5.6)、5

mM MgCl₂、10 mM KCl、0.35 M sucrose、20% (w/v) glycerol、5 mM 2-mercaptoethanol) を加えて懸濁し、4°C、2,000g で 5 分間遠心分離し、ペレットを回収した。そこへ isolation buffer (50mM HEPES-KOH (pH8.0)、1% SDS、2 mM EDTA、1 mM DTT) を加え、室温で 30-60 分間インキュベートし、核抽出物を得た。それぞれのサンプル 5 µg を 15% アクリルアミドゲルによる SDS-PAGE で分離し、Western Blotting を行った。1 次抗体には OsNAC3 抗体 (1:2500)、OsNAC4 抗体 (1:5000) それぞれを用い、2 次抗体には Anti-Rabbit IgG (H+L-chain) -HRP (1:2500, MBL) を用いた。ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で化学発光反応を行い、ImageQuantTM LAS-4000 (GE Healthcare) を用いてシグナルを検出した。

14) マイクロアレイ解析

OsNAC3 の下流で発現制御される遺伝子をマイクロアレイで同定した。*A. avenae* N1141 菌株を接種したキンマゼ野生株細胞と OsNAC3 RNAi 抑制形質転換細胞を 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 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。

15) セルソーターを用いた過敏感細胞死誘導の検定

PEG 法を用いて *pAHC17* 空ベクター (control)、*pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4* をイネプロトプラストにそれぞれ導入し、*pAHC17-OsNAC3* と *pAHC17-OsNAC4* をイネプロトプラストに同時導入した。導入して 12 時間後、サンプルを回収し、PI を加えることで死細胞の核を染色した。染色後、 2×10^4 になるように KMC で希釈しフローサイトメーター (JSAN) で解析した。細胞死の検出結果は、PI 蛍光と SSC (側方散乱光) のシグナル強度によって分布された図で表した。

第 1 章

結果

1. OsNAC4 過剰発現による過敏感細胞死誘導

これまでに、イネに対して非病原性である *A. avenae* N1141 菌株を接種したときに、免疫反応の一つである過敏感細胞死が誘導されることが明らかとなっている (Fig. 1-1)。また、この過敏感細胞死は植物特有の転写因子をコードしている *OsNAC4* 遺伝子によって制御されることが示されており、実際に *OsNAC4* によって転写制御される可能性のある過敏感細胞死関連の遺伝子がいくつか同定されている。そこで、*OsNAC4* がどのような機構でこれら遺伝子を転写制御し、過敏感細胞死を誘導しているのかについてまずは調べることにした。

まず、実際にイネ細胞内で *OsNAC4* を過剰発現することで、過敏感細胞死が引き起こされるかどうか、またその時の *OsNAC4* の存在部位について調べた。植え継ぎ後 4 日目のイネ培養細胞から単離したプロトプラストに、恒常的発現を示すトウモロコシのユビキチンプロモーターの下流に *OsNAC4* を連結した *pAHC17-OsNAC4* ベクターとコントロールとして *pAHC17* を導入した。遺伝子導入後、30°C で 24 時間静置し、その後この細胞を回収して、エバンスブルーにより死細胞を検出した。エバンスブルーを添加することで、生細胞はエバンスブルー色素を細胞外へ排出できることから細胞が染色されないのに対し、死細胞はエバンスブルー色素を排出することができないため、青く染まる (Fig. 1-2 A)。エバンスブルーによって染色したプロトプラストを、スライドガラス上にのせて顕微鏡で観察および染色細胞のカウントを行った。全細胞数とエバンスブルーにより染色された細胞をカウントし、導入効率を加味してデータを解析した結果、*pAHC17-OsNAC4* を導入したプロトプラストでは、導入された細胞のほぼ 100% がエバンスブルーにより染色されていた (Fig. 1-2 B)。これに対して、*pAHC17* のみを導入したプロトプラストでは、遺伝子導入後 24 時間におけるエバンスブルーによる細胞の染色は 10% 程度しか認められなかった。このことから、植物細胞内で *OsNAC4* を過剰発現すると、細胞死が引き起こされることが確認された。

次に、*OsNAC4* を過剰発現することで誘導された細胞死が過敏感細胞死かどうかを確認するため、過敏感細胞死に特徴的な核 DNA の断片化について調べた。植え継ぎ後 4 日目のイネ培養細胞へ、上記の *pAHC17-OsNAC4* ベクターおよび *pAHC17* ベクターをパーティクルガン用の金粒子に塗し、それぞれイネ培養細胞内に導入した。この時、*pAHC17-DsRed* も同時に導入し、*pAHC17-OsNAC4* ベクターとコントロール *pAHC17* ベ

クターが導入された細胞は、DsRed 由来の蛍光が観察されるようにした。それぞれのベクター導入から 6、8、10、12 時間後のイネ培養細胞を回収して、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、断片化により生じる DNA の 3'-OH 末端にフルオレセイン-dUTP を標識する TUNEL 反応を行い、FITC 由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。その結果、*pAHC17-OsNAC4* を導入したイネ培養細胞では、導入から 6 時間後に DsRed と TUNEL による FITC の蛍光発色が共に観察された (Fig. 1-3)。このような DsRed 由来の蛍光が認められるイネ培養細胞における TUNEL 由来の蛍光は、*pAHC17-OsNAC4* の導入後、8、10、12 時間においても認められた。これに対して、*pAHC17* のみを導入したプロトプラストでは、導入 6 時間から 12 時間後において DsRed 由来の蛍光を持つイネ培養細胞で FITC の蛍光を有するものは確認されなかった (data not shown)。以上のことから、OsNAC4 を細胞内で一過的に過剰発現することによって認められる細胞死は、核 DNA の断片化を伴った過敏感細胞死であることが示された。

2. 過敏感細胞死誘導における OsNAC4 の核局在の必要性

植物細胞内で過剰発現することにより、過敏感細胞死を引き起こすことが確認された OsNAC4 が、過剰発現時に細胞内のどこに局在して機能しているかを調べるため、OsNAC4 に DsRed を融合した蛍光タンパク質を発現するベクターを作製し、イネ細胞に導入した。植え継ぎ後 4 日目のイネ培養細胞から単離したプロトプラストに、イネ細胞内において恒常発現するユビキチンプロモーターの下流に *OsNAC4-DsRed* および *DsRed* のみの遺伝子を連結した *pAHC17-OsNAC4-DsRed* および *pAHC17-DsRed* (コントロール) をそれぞれ導入した。遺伝子導入をしてから 6 時間後のイネプロトプラストをスライドガラス上にのせて共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った結果、*pAHC17-DsRed* を導入したイネプロトプラストでは、DsRed 由来の蛍光が細胞質と核で確認されたのに対し、*pAHC17-OsNAC4-DsRed* を導入したイネプロトプラストでは、導入された細胞の核においてのみ DsRed の蛍光が観察された (Fig. 1-4)。また、*pAHC17-OsNAC4-DsRed* 導入 12 時間後のイネプロトプラストにおいても導入後 6 時間のイネプロトプラストと同様に、核で DsRed の蛍光が認められた (data not shown)。

次に、このように過剰発現をすることにより核に局在することが認められた OsNAC4 が、実際の植物細胞において、*A. avenae* N1141 菌株を接種した時にどこに局在するかを調べた。N1141 菌株を接種したイネ培養細胞とコントロールとして水を接種したイネ培養細胞から、0、1、3、6、9 時間の細胞を回収し、核と細胞質に分画した。それぞれのサンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 OsNAC4 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、コントロールとして水を接種したイネ培養細胞では、核・細胞質

共に OsNAC4 タンパク質の経時的な蓄積量の変化は認められなかった。一方、N1141 菌株を接種したイネ培養細胞では、菌接種 6 時間後の核で OsNAC4 タンパク質が菌接種 0 時間と比べて増加していた (Fig. 1-5)。

また、過敏感細胞死誘導時における OsNAC4 の存在部位について、抗 OsNAC4 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析で調べた。*A. avenae* N1141 菌株を接種したイネ培養細胞と、コントロールとして水を接種したイネ培養細胞を 12 時間後に回収し、加圧凍結により細胞を固定した。その後、-82℃のアセトンにて凍結置換を行った試料を、-50℃、-30℃、-4℃、室温におくことでエタノールに置換し、樹脂包埋した。また、一部の試料はパラフォルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液で固定後に、アルコールシリーズで脱水後、樹脂包埋を行った。これらを、ダイヤモンドナイフで超薄切片にし、抗 OsNAC4 抗体を用いて免疫染色を行い、ウラン染色を施した試料を透過型電子顕微鏡により解析を行った。その結果、接種前の細胞においては、OsNAC4 がイネ培養細胞の細胞質と核に均一に存在していることが認められた (Fig. 1-6 A)。それに対し、接種後 12 時間後の細胞では、核に集中的に存在していることが認められた。また、コントロールである水を接種した細胞においては、OsNAC4 は処理後も変わらず、細胞質と核に均一に存在していた (data not shown)。さらに、核と細胞質においてランダムに 1 μm^2 の 5 カ所を選択し、金粒子のカウントを行ったところ、非病原性である N1141 菌株を接種前では、核と細胞質で同程度の OsNAC4 が存在して細胞全体にまばらに存在していたのに対し、接種後 12 時間における細胞では、核における OsNAC4 タンパク質の存在量が約 7 倍にまで増加していた (Fig. 1-6 B)。以上の結果から、OsNAC4 は通常時の発現量は低いものの、過敏感細胞死誘導時には発現量が増加し、増加した OsNAC4 は主に核に移行して存在することが示された。さらに、通常の細胞に OsNAC4 を過剰発現させた場合でも、発現した OsNAC4 は核に移行して存在することも同時に明らかになった。

次に、DsRed 融合 OsNAC4 ベクターおよび免疫電顕により確認された OsNAC4 の核への局在が、OsNAC4 が過敏感細胞死を引き起こす上で必須かどうかを調べるため、これまでに核外輸送シグナルである NES (Nuclear Export Signal) をもつ遺伝子として報告されている OsNAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1) の NES 部分とされる Leu⁵⁴~Gln⁶⁹ の 16 アミノ酸 (Dong et al., 2005) を、全長の OsNAC4 の N 末端側に付加した *pAHC17-NES-OsNAC4-DsRed* ベクターを作製した。植え継ぎ後 4 日目のイネ培養細胞から単離したプロトプラストへ導入して過剰発現させることにより、細胞内のどの部位に局在するかを確認した。また、細胞内局在を確認すると同時に、遺伝子導入したプロトプラストをエバンスブルーによって染色することで、過敏感細胞死の指標の一つである

細胞膜の透過性喪失が引き起こされるかどうかを確認した。その結果、導入から 24 時間後のポジティブコントロールとして用いた *pAHC17-OsNAC4-DsRed* を導入したプロトプラストにおいては DsRed 由来の蛍光が核でのみ認められたのに対し、OsNAC4 に NES を付加した *pAHC17-NES-OsNAC4-DsRed* ベクターを導入したプロトプラストにおいては、核だけでなく細胞質においても DsRed の蛍光が確認された (Fig. 1-7 A)。このとき同時に、エバンスブルーによる細胞染色を行ったところ、*pAHC17-OsNAC4-DsRed* を導入したプロトプラストではほぼ 100% のプロトプラストが青く染色されたのに対し、*pAHC17-NES-OsNAC4-DsRed* を導入したプロトプラストでは、60% 程度の細胞においてのみエバンスブルーによる染色が認められた (Fig. 1-7 B)。このことは、OsNAC4 による過敏感細胞死の誘導には、このタンパク質が核に局在することが必要であることを示している。

3. 過敏感細胞死誘導時における OsNAC4 の核移行の機構

OsNAC4 が過敏感細胞死誘導時に細胞質から核に移行して蓄積することが明らかになると共に、この核への移行は過敏感細胞死を誘導する上で必須であることが示された。このことは、OsNAC4 の核移行は細胞の生死を決定する上で非常に重要なステップであることを示している。そこで、次に、OsNAC4 の核移行の制御機構について調べた。近年、植物においてタンパク質の核への移行はリン酸化によって制御される場合があることが報告された (Kannegant et al., 2007)。そこで、OsNAC4 の核移行にタンパク質リン酸化が関与しているのかを調べるために、植え継ぎ 4 日後のイネ培養細胞に N1141 菌株を接種し、Ser/Thr protein kinase の強力な阻害剤である Staurosporine を処理したものと、コントロールとしてエタノールを処理し、0、3、6、9 時間後の細胞をエバンスブルーによって染色した。その結果、N1141 菌株を接種した細胞では 6 時間後から過敏感細胞死誘導が認められ、9 時間にかけて徐々に細胞死が増加していくのに対し、Staurosporine を処理した細胞では、このような過敏感細胞死は全く誘導されなかった (Fig. 1-8)。このことから、N1141 菌株接種によって誘導されるイネ培養細胞の過敏感細胞死誘導にはタンパク質リン酸化が関与していることが示された。

そこで、タンパク質リン酸化は過敏感細胞死誘導時に認められる OsNAC4 の核移行に関与するのか調べることにした。2 μ M Staurosporine を処理した植え継ぎ 4 日目のイネ培養細胞に N1141 菌株を接種し、0、6、9 時間後に細胞を回収し、それぞれの細胞から核を単離し、SDS-PAGE で分離後、抗 OsNAC4 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、Staurosporine を処理した細胞では、OsNAC4 タンパク質の核での蓄積が認められなかった (Fig. 1-9)。このことから、N1141 菌株接種によって誘導さ

れる OsNAC4 の核移行はタンパク質リン酸化によって制御されていることが示された。

これまでに、イネプロトプラストで OsNAC4 を一過的に過剰発現させると OsNAC4 が核へ移行し、過敏感細胞死が誘導されることを示した (Fig. 1-7)。そこで、イネプロトプラストに OsNAC4 を一過的に過剰発現させた時に誘導される過敏感細胞死にもタンパク質リン酸化が関与しているのかを調べた。イネプロトプラストに OsNAC4 を高発現させるベクターである *pAHC17-OsNAC4* を導入し、そこへ Staurosporine を加え、24 時間後のプロトプラストをエバンスブルーで染色した。このとき、ポジティブコントロールとして、Staurosporine を処理していない *pAHC17-OsNAC4* を導入したイネプロトプラストを、ネガティブコントロールとして *pAHC17* 空ベクターを導入したイネプロトプラストを用いた。その結果、ポジティブコントロールである *pAHC17-OsNAC4* を導入した細胞では、ほぼ 100% の細胞が青く染色され、またネガティブコントロールである *pAHC17* 空ベクターを導入した細胞では約 10% の細胞だけが青く染色されていた (Fig. 1-10)。一方、*pAHC17-OsNAC4* を導入した後、Staurosporine を加えた細胞では、約 20% の細胞だけがエバンスブルーで染色されていた。このことから、OsNAC4 の過剰発現によって誘導される過敏感細胞死にもまた、タンパク質リン酸化が関与することが示された。

そこで、Staurosporine 処理による OsNAC4 過剰発現細胞における細胞死の抑制が、OsNAC4 の核移行の阻害によるものなのかについて調べた。まず、Staurosporin 処理したイネプロトプラストで OsNAC4 を過剰発現したときの細胞内局在について観察した。Staurosporine を終濃度 2 μ M になるように添加し、30°C、遮光で 1 時間処理培養したイネプロトプラストに、OsNAC4 の C 末端側に Venus を融合したタンパク質を発現するベクターである *pBI221-OsNAC4-Venus* を PEG 法で導入し、導入して 7 時間後、共焦点レーザー顕微鏡で Venus 蛍光を観察した。その結果、Staurosporine 未処理のイネプロトプラストでは、核で OsNAC4-Venus 蛍光が観察されたが、Staurosporine を処理したイネプロトプラストでは、細胞質中に Venus 蛍光が観察され、核では認められないことが明らかになった (Fig. 1-11)。

また、Staurosporin 処理したイネプロトプラストで OsNAC4 を過剰発現したときの細胞内局在について、抗 OsNAC4 抗体を用いたウエスタンブロット解析によっても調べた。イネプロトプラストに OsNAC4 発現ベクター (*pAHC17-OsNAC4*) を PEG 法で導入し、2 μ M Staurosporine を加えたイネプロトプラストと水を加えたイネプロトプラストを遺伝子導入 0、6、9 時間後に回収した。このプロトプラストから核と細胞質を単離し、SDS-PAGE で分離後、抗 OsNAC4 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、水を添加したイネプロトプラストでは、核における OsNAC4 タンパク質が 6

時間以降に増加することが認められたが、Staurosporine を加えたイネプロトプラストでは、このような核における OsNAC4 タンパク質の増加は認められなかった (Fig. 1-12 A)。

さらに、核に局在する OsNAC4 が実際にリン酸化されているかどうかを抗リン酸化セリン抗体によるウェスタンブロットで解析した。OsNAC4 発現ベクター (*pAHC17-OsNAC4*) を PEG 法で導入したプロトプラストを核と細胞質に分画し、SDS-PAGE で分離後、抗リン酸化セリン抗体で検出した。その結果、核画分の OsNAC4 だけが抗リン酸化セリン抗体で検出されたことから、核に移行した OsNAC4 はセリン残基がリン酸化されていることが示された (Fig. 1-12 B)。上記の研究から、Staurosporine による OsNAC4 誘導型細胞死の抑制は、Staurosporine によって OsNAC4 のリン酸化が阻害され、その結果、OsNAC4 が核に移行できないため生じていることが確認された。

4. OsNAC4 の核移行を制御するリン酸化部位

次に、OsNAC4 の核移行を制御するリン酸化部位を特定することにした。これまでに、OsNAC4 の核移行には N 末端側の NAC ドメイン領域が重要であることが示されている (Taga 2008)。そこで、OsNAC4 のリン酸化部位の同定は NAC ドメイン領域に絞って行うこととした。OsNAC4 の NAC ドメイン中に存在するセリン、スレオニン残基について調べたところ、セリン残基は 10、91、116、130、161 番目に、スレオニン残基は 30、81、105、119、138 番目に存在していた (Fig. 1-13)。抗リン酸化セリン抗体を用いた実験で、OsNAC4 ではセリン残基がリン酸化されていることが示されている (Fig. 1-12)。実際、リン酸化予測サイトである NetPhos 2.0 プログラムを用いて、OsNAC4 のリン酸化される部位の予測を行ったところ、NAC ドメイン中では特に 10、130、161 残基目のセリン残基がリン酸化される可能性があることが示された (Fig. 1-14)。そこで、NAC ドメイン中に存在する 5 つのセリン残基をすべてアラニン残基に置換した OsNAC4 の DsRed 融合タンパク質発現ベクターを作製し、これをイネプロトプラストに導入し、導入して 7 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて DsRed の蛍光を観察した。その結果、OsNAC4 は核の中には局在しておらず、核の周囲に凝集した状態で存在していた (Fig. 1-15)。そこで、次にこの 5 つのセリン残基を 1 つずつアラニン残基に置換した OsNAC4-DsRed 融合タンパク質を発現するベクターを作製し、それぞれイネプロトプラストに導入した。これらの遺伝子を導入したプロトプラストを共焦点レーザー顕微鏡で確認したところ、OsNAC4-DsRed と同様に DsRed の蛍光はすべて核で認められた (data not shown)。以上のことから、NAC ドメイン中に存在する 5 つのセリン残基のうち、どれか 1 つがリン酸化されることで核移行が制御されているのではなく、OsNAC4 が核に移行するためには、複数のセリン残基がリン酸化される必要があること

が示された。

5. Yeast two hybrid 法による OsNAC4 と相互作用するイネタンパク質の同定

OsNAC4 は分子内に NAC ドメインと転写活性化領域 (TAR) を有していることから、転写調節因子として機能することが考えられる。植物の転写因子は核内で他のタンパク質と相互作用することで、様々な遺伝子の発現を制御することが知られている。そこで次に、OsNAC4 による核内での転写制御機構を明らかにするため、OsNAC4 と相互作用するイネタンパク質を Yeast two hybrid 法を用いて探索した。まず、スクリーニングで bait ベクターとして用いる OsNAC4 の自律転写活性について調べたところ、OsNAC4 全長では自律転写活性を有するが、OsNAC4 の C 末端側から 78 アミノ酸を欠失させるとこの様な自律転写活性を失うことが示された (data not shown)。このことから、今回の Yeast two hybrid スクリーニングには、OsNAC4 の C 末端側から 78 アミノ酸を欠失させたものを bait として用いることにした。

次に、prey ベクターを用いたイネの cDNA ライブラリーの構築を試みた。イネに対して非病原性である *A. avenae* N1141 菌株をイネに接種し、接種直後と、6 時間後のイネ培養細胞から total RNA をそれぞれ抽出し、この total RNA からオリゴ d (T) プライマーとランダムプライマーの 2 種類を用いて cDNA 合成を行い prey ベクターに導入し、スクリーニング用のライブラリーを構築した。

このようにして構築した bait ベクターと prey ベクターを用いて OsNAC4 と相互作用するタンパク質の酵母 two hybrid スクリーニングを行った。5.4×10⁵ 個体の酵母形質転換体を、SC/-His/-Leu/-Trp 要求性寒天培地に播種したところ、1856 クローンが選抜された。そこで、このクローンを SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 要求性寒天培地と SC/-Leu/-Trp/X-a-Gal 寒天培地を用いて再度選抜を行ったところ、SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 要求性寒天培地で生育し、SC/-Leu/-Trp/X-a-Gal 寒天培地上で a-ガラクトシダーゼ活性を有するクローンは 152 個得られた。次に、得られた 152 個のクローンをテンプレートにコロニー PCR を行い、増幅断片が得られた 80 個の PCR 産物を直接配列解析した。その結果、OsNAC3 が 15 クローン、OsNAC6 が 6 クローン重複して得られた。さらに、C2domain containing protein が 3 クローン、Helicase, C-terminal domain containing protein が 2 クローン、Ribosomal protein S10 family protein が 2 クローン、Peptidase M24, methionine aminopeptidase が 1 クローン、Cyanate hydratase が 1 クローン得られた (Table. 1)。これらのなかで、OsNAC3 と OsNAC6 は、OsNAC4 と同じ NAC ファミリーに属しており、OsNAC3 は OsNAC4 と同じサブグループに、OsNAC6 は ATAF サブファミリーにそれぞれ属することも明らかになっている (Fig. 1-16)。イネのストレス誘導性遺

伝子やストレス耐性の制御に関与している NAC 型転写因子である OsNAC5 は、同じ NAC ファミリーに属する OsNAC6 や SNAC1 と相互作用し、後期の胚形成に関与する *OsLEA3* のプロモーター領域に結合し転写を制御していることが報告されている (Takasaki et al., 2010)。そこで、NAC グループに属する OsNAC3、OsNAC6 に着目し、過敏感細胞死誘導との関連を調べることにした。

イネゲノムデータベースから OsNAC3 と OsNAC6 の全塩基配列を取得したところ、*OsNAC3* の cDNA は全長 1,155 bp で構成されており、そのうちの ORF は 831 bp、5'-UTR は 64 bp、3'-UTR が 260 bp の遺伝子であることが明らかとなった (Fig. 1-17)。また、*OsNAC3* タンパク質は 276 アミノ酸から構成されており、平均分子量は 30,841 であった。一方、*OsNAC6* の cDNA は全長 1,423 bp で構成されており、そのうちの ORF は 912 bp、5'-UTR は 111 bp、3'-UTR が 402 bp の遺伝子であることが明らかとなった (Fig. 1-17)。また、*OsNAC6* タンパク質は 303 アミノ酸から構成されており、平均分子量は 32,906 であった。さらに、*OsNAC3* と *OsNAC6* の N 末端側には *OsNAC4* と非常に高い相同性を有する 5 つに分かれた NAC ドメインを持ち、C 末端側には SNAC グループ間で保存されている共通のモチーフ (WVLCR) が存在していた (Fig.1-18) (Ooka H et al., 2003)。

6. OsNAC3 と OsNAC6 の過敏感細胞死への関与

OsNAC3 と OsNAC6 が過敏感細胞死に関与しているかどうかを明らかにするため、まず、OsNAC3 と OsNAC6 が *OsNAC4* と同様に過敏感細胞死誘導時に発現誘導されるかどうか調べた。*A. avenae* N1141 菌株をイネ培養細胞に接種し、0、1、3、6、9 時間後に Total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法で各遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、*OsNAC3*、*OsNAC4*、*OsNAC6*、共に、N1141 菌株接種後 3 時間で発現が誘導され始め、その発現は 6 時間でピークを示した (Fig. 1-19)。接種 6 時間後におけるそれぞれの発現量は、*OsNAC4* はおよそ 70 倍程度、*OsNAC6* は 16 倍程度、*OsNAC3* はおよそ 3 倍程度であることが示された。

そこで次に、*OsNAC3* と *OsNAC6* それぞれをイネ細胞内に一過的に過剰発現させたときに *OsNAC4* と同様に過敏感細胞死が誘導されるかどうか調べた。*OsNAC3*、*OsNAC4*、*OsNAC6* それぞれの発現ベクター (*pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4*、*pAHC17-OsNAC6*) をイネプロトプラストに PEG 法により導入し、24 時間後にエバンスブルーで死細胞を染色した。その結果、*pAHC17-OsNAC3* と *pAHC17-OsNAC4* をそれぞれ導入した細胞では、コントロールである *pAHC17* を導入した細胞よりも死細胞の割合が 40%ほど増加していた (Fig. 1-20)。一方、*pAHC17-OsNAC6* を導入した場合は、死細胞の割合がコントロールとほぼ同等であった。

そこで、次に、ホタルルシフェラーゼ (LUC) 活性を指標とした細胞死検定を行った。マーカー遺伝子である Luciferase 遺伝子を CaMV35S プロモーターの制御下で発現させるベクター *pPluc* を *pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4*、*pAHC17-OsNAC6* とそれぞれ同時にイネプロトプラストに PEG 法を用いて導入し、20 時間後のイネプロトプラストにおけるルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、コントロールとして *pAHC17* を導入したイネプロトプラストから得た細胞抽出液中では、高い LUC 活性が認められたが、*pAHC17-OsNAC3* と *pAHC17-OsNAC4* をそれぞれ導入したイネプロトプラストでは約 1/5 程度まで LUC 活性が低下していた (Fig. 1-21)。一方、*pAHC17-OsNAC6* を導入したイネプロトプラストでは、*pAHC17* を導入したイネプロトプラストと同程度の LUC 活性が認められた。

さらに、この *OsNAC3* の過剰発現による細胞死について死細胞の核を染色する PI を用いて検討した。イネプロトプラストに *pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4* を PEG 法により導入し、12 時間後に死細胞の核を PI で染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、*pAHC17-OsNAC3* を導入したイネプロトプラストは、*pAHC17-OsNAC4* を導入したイネプロトプラストと同様に、細胞死を引き起こしたと思われるイネプロトプラストが増加することが観測された (Fig. 1-22)。以上の結果から、*OsNAC3* の一過的な過剰発現は細胞死を誘導するが、*OsNAC6* を過剰発現しても細胞死が誘導されないことが示された。

次に、*OsNAC3* の過剰発現によって認められる細胞死が過敏感細胞死かどうかを明らかにするため、過敏感細胞死の特徴のひとつである核 DNA の断片化について調べた。*DsRed* 遺伝子 (*pAHC17-DsRed*) を *OsNAC3* 遺伝子 (*pBI221-OsNAC3*) と共に細胞内に導入し、5 時間後に細胞を固定し TUNEL 反応を行った。そして、*DsRed* の蛍光が観察される細胞において TUNEL 陽性を示す核が存在するかを共焦点レーザー顕微鏡で調べた。その結果、コントロールの *pAHC17-DsRed* と *pBI221* 空ベクターを導入した細胞においては、*DsRed* の蛍光が観察される細胞の中で FITC 蛍光を示す核を持つ細胞は一つも存在しなかった (Fig. 1-23)。一方、*pAHC17-DsRed* と *pBI221-OsNAC3* を導入した細胞では、*DsRed* の蛍光が観察される細胞において FITC 蛍光を示す核を持つ細胞が複数認められ、*OsNAC3* を過剰発現すると核 DNA が断片化されることが確認された。このことから、*OsNAC3* を一過的に過剰発現させると *OsNAC4* と同様に過敏感細胞死が誘導されることが示された。

次に、*OsNAC3* が実際に非病原性 *A. avenae* N1141 菌株によって誘導されるイネ過敏感細胞死の誘導に関わるのか調べるために、*OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体を作製した。RNAi ノックダウン形質転換体を作製するため、*OsNAC3* の TAR 領域

(514-831bp)を *pANDA* ベクターに組み込み RNAi 作製用ベクターを構築した。この際、形質転換体のコントロールとして、GUS linker のみを発現させるベクターも同時に作製した。これら、RNAi ベクターをイネ完熟種子由来のカルスへ導入し、形質転換されたカルスをハイグロマイシンにより選抜した結果、10 ラインの形質転換体を得ることができた。そこで、このうちの 5 ラインについて *OsNAC3* の mRNA 発現量を解析したところ、コントロールラインと比較して、およそ 90%発現量が抑制された形質転換体を 2 ライン得ることができた (Fig. 1-24)。そこで、この 2 ラインの *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体を R2S 液体培地へ移し、形質転換培養細胞を作出した。これらの形質転換培養細胞に *A. avenae* N1141 菌株を接種し、誘導される過敏感細胞死をエバンスブルー染色で調べたところ、コントロール形質転換体では N1141 菌株接種後 9 時間で顕著な細胞死の誘導が認められたが、*OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体 (*osnac3_1* と *osnac3_2*) では、ほとんど細胞死の誘導が認められなかった (Fig. 1-25)。

さらに、この時の過敏感細胞死の特徴である核 DNA の断片化についても解析した。コントロール形質転換体と *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換細胞である *osnac3_2* に N1141 菌株を接種し、接種して 12 時間後の細胞を固定し TUNEL 染色で核 DNA の断片化を解析した。その結果、コントロール形質転換体では、核 DNA の断片化を示す FITC の蛍光が観察されたが、RNAi 抑制形質転換体では、コントロールで認められたような FITC の蛍光が観察される核の数が有意に減少していることが明らかとなった (Fig. 1-26)。さらに、核の断片化がヌクレオソーム単位で起きているかどうかについて調べた。コントロール形質転換体と *osnac3_2* それぞれに、水と N1141 菌株を接種し、接種して 12 時間後の細胞を回収し、ゲノム DNA を単離し、アガロースゲル電気泳動で分離後、各 DNA 断片をエチジウムブロマイド染色により可視化した。その結果、N1141 菌株を接種したコントロール形質転換体では 180bp のヌクレオソーム単位の DNA のラダー化が観察されたのに対し、*osnac3_2* ではそのような DNA のラダー化がコントロールほど顕著に観察されなかった (Fig. 1-27)。このことから、N1141 菌株を接種した *OsNAC3* の発現が抑制されているイネ細胞では、ヌクレオソーム単位の断片化が抑制されていることが示された。

以上の結果から、*OsNAC3* ノックダウン形質転換体では、*A. avenae* N1141 菌株によって誘導される過敏感細胞死が抑制されることが明らかとなり、*OsNAC3* は過敏感細胞死を正に制御する転写因子であることが示唆された。

7. 過敏感細胞死誘導時における *OsNAC3* の局在

次に、*OsNAC3* による過敏感細胞死誘導の機構について調べることにした。まず、

OsNAC3 を過剰発現させたことで過敏感細胞死が誘導されたことから、過剰発現した OsNAC3 が細胞内のどこに局在しているのかを調べた。OsNAC3 の C 末端側に Venus 蛍光タンパク質を融合させた発現ベクター *pBI221-OsNAC3-Venus* を作製し、イネプロトプラストに導入して 7 時間後に、共焦点レーザー顕微鏡で Venus 蛍光を観察した。その結果、Hoechst33342 によって染色された核での蛍光と OsNAC3-Venus 蛍光が一致したことから、発現させた OsNAC3-Venus のほとんどが核内に局在していることが明らかとなった (Fig. 1-28)。

そこで、N1141 菌株接種による過敏感細胞死誘導時における OsNAC3 タンパク質の核内存在量の変動について調べた。N1141 菌株を接種し、0、1、3、6、9 時間後の細胞を回収し、この細胞から核を単離した。単離した核を SDS で処理することにより、核内タンパク質を抽出した。得られた核溶出タンパク質 (10 µg) を、SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写後、OsNAC3 特異抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、菌接種して 1 時間後から核内に OsNAC3 タンパク質が蓄積し、6 時間後に最も蓄積していることが明らかとなった (Fig. 1-29)。以上の結果から、OsNAC3 は OsNAC4 と同様に過敏感細胞死誘導時に核に蓄積することが示された。

8. OsNAC4 と OsNAC3 の核内における相互作用と過敏感細胞死への寄与

OsNAC3 と OsNAC4 が酵母細胞内で相互作用することが明らかとなり、また、OsNAC3 も OsNAC4 と同様に過敏感細胞死を制御する転写因子であることが示された。さらに、この両者は過敏感細胞死誘導時に核に移行していることが明らかとなった。このことは、OsNAC3 と OsNAC4 が過敏感細胞死誘導時に核内で相互作用している可能性を示している。そこで、実際に、イネ細胞の核内で OsNAC3 と OsNAC4 が相互作用しているかを BiFC 法により解析した。BiFC 法に用いるための発現ベクターである *pBI221-OsNAC4-VN* と *pBI221-OsNAC3-VC* ベクターを作製した。*pBI221-OsNAC4-VN* ベクターは Venus タンパク質の N 末端側半分 (VN) を OsNAC4 の C 末端に融合させたタンパク質を発現させる。一方、*pBI221-OsNAC3-VC* ベクターは、OsNAC3 の C 末端側に Venus タンパク質の C 末端側半分の VC を融合したタンパク質を発現させる。イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pBI221-OsNAC3-VC* と *pBI221-OsNAC4-VN* を同時導入し、導入して 7 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で Venus タンパク質の再構築による蛍光を観察した。その結果、核で BiFC 由来の蛍光が観察されたことから、OsNAC4 と OsNAC3 は、イネ細胞の核内で実際に相互作用することが示された (Fig. 1-30)。

次に、この相互作用に関与する領域を調べることにした。これまでに、OsNAC4 と同様の NAC ファミリーに属する OsNAC5 と OsNAC6 が NAC ドメイン間を介して相互作

用することが明らかとなっている (Takasaki et al., 2010)。そこで、OsNAC3 と OsNAC4 の NAC ドメイン領域のみでの相互作用について BiFC 法で解析することにした。まず、両分子の NAC ドメイン領域のみにおけるイネ細胞内局在について調べるため、C 末端側の転写活性化領域を欠損させた両分子の NAC ドメインの C 末端側にそれぞれ、Venus 蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を発現するベクター *pBI221-OsNAC4domain-Venus* と *pBI221-OsNAC3domain-Venus* を作製した。そして、イネ培養細胞から単離したプロトプラストにそれぞれのベクターを導入し、7 時間後に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、OsNAC3 の NAC ドメイン Venus 融合タンパク質、OsNAC4 の NAC ドメイン Venus 融合タンパク質ともに、核内で Venus の蛍光が観察された (Fig. 1-31、1-32)。そこで、BiFC 解析を行うため、*pBI221-OsNAC3 domain-VC* ベクターと *pBI221-OsNAC4domain-VN* ベクターを作製し、イネプロトプラストに共導入したところ、核内で BiFC 由来の蛍光が観察された。このことから、OsNAC4 と OsNAC3 は NAC ドメインを介して相互作用することが示された (Fig. 1-33)。

次に、OsNAC3 と OsNAC4 の相互作用が過敏感細胞死誘導においてどのような意味を持つのかを調べるため、OsNAC3 と OsNAC4 をそれぞれ単独で過剰発現させたときと、OsNAC3 と OsNAC4 を共発現させたときの過敏感細胞死誘導について β -glucuronidase (GUS) 活性を指標にして調べた。 β -glucuronidase (GUS) をコードしている遺伝子 *uidA* と *OsNAC3* と *OsNAC4* をユビキチンプロモーター制御下で発現させるベクター (*pAHC25*、*pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4*) をイネ培養細胞へパーティクルボンバードメント法を用いて導入し、4、16、24 時間後の GUS 活性を X-Gluc による染色法で検出した。その結果、コントロールとして GUS と *pAHC17* 空ベクターを導入したイネ培養細胞では、導入して 4 時間後から GUS 活性が検出され、その後、16 時間では顕著な GUS 活性が検出され、28 時間まで高い GUS 活性が認められた (Fig. 1-34)。一方、*pAHC17* と *pAHC17-OsNAC3* ベクターを共導入したイネ培養細胞では、導入 16 時間後に極めて弱い GUS 活性が認められたが、28 時間ではほとんど GUS 活性が認められなかった。また、*pAHC17* と *pAHC17-OsNAC4* を共導入した細胞においては 16 時間後にコントロールに比べて若干低い細胞死が誘導され、28 時間ではより強い細胞死が認められた。興味深いことに、OsNAC3 と OsNAC4 を共発現させたときは、導入 16 時間後と 28 時間後ではほとんど GUS 活性が認められず、特に 28 時間後では細胞が褐変化するほどの強い細胞死が誘導されることが明らかになった (Fig. 1-34)。このことから、OsNAC3 と OsNAC4 を同時に発現させるとそれぞれを単独で過剰発現させたときに比べて強い過敏感細胞死を誘導することが示された。

9. OsNAC3 と OsNAC4 による様々な遺伝子の転写調節

ここまでの結果から、OsNAC4 と OsNAC3 は相互作用することで過敏感細胞死を誘導している可能性が示された。この様な OsNAC4 と OsNAC3 の相互作用が過敏感細胞死誘導時に発現する遺伝子の調節に重要であるなら、*OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体では *OsNAC4* RNAi ノックダウン形質転換体と同様の遺伝子が過敏感細胞死誘導時に発現抑制されているはずである。そこで、*OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体に *A. avenae* N1141 菌株を接種し、過敏感細胞死誘導時に発現誘導される遺伝子の中で、発現が上昇しなくなる遺伝子についてイネ 44K オリゴマイクロアレイを用いて解析した。コントロール形質転換体と *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体にそれぞれに *A. avenae* N1141 菌株を接種し、0、1、3、6 時間後に各細胞を回収し、抽出した mRNA を用いて、イネ 44K オリゴマイクロアレイ解析を行った。これまでの研究で、OsNAC4 の下流で制御されていることが明らかになっている 139 遺伝子を得られたデータから抽出し、それぞれの遺伝子の発現パターンごとに階層的なクラスタリングを行ったところ、A-D の 4 個のクラスターに分類された (Fig. 1-35)。これらのクラスターの発現量パターンを詳細に調べたところ、*A. avenae* N1141 菌株を接種したコントロール形質転換体で発現量が上昇し、*OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体で発現上昇が認められなかった遺伝子群がクラスター B に分類されていることが明らかになった (Fig. 1-35)。このクラスター B には 10 個の遺伝子が含まれており、これら遺伝子が OsNAC3 と OsNAC4 RNAi ノックダウン形質転換体で過敏感細胞死誘導時に発現上昇しないことから、これら遺伝子の発現が OsNAC3 と OsNAC4 によって制御されていることが示された。興味深いことに、このクラスター内には OsNAC4 の下流で制御されている遺伝子のなかでも唯一エンドヌクレアーゼ様分子をコードする遺伝子 *IREN* と細胞膜の透過性喪失を誘導する *OsHSP90* が存在していた (Fig. 1-35)。

そこで、実際に、*OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体において *A. avenae* N1141 菌株接種後に *OsHSP90* と *IREN* の発現誘導が認められないのかどうかを real-time RT-PCR を用いて解析した。コントロール形質転換体と *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体それぞれに、*A. avenae* N1141 菌株を接種して、0、3、6、9 時間の細胞を回収し、各細胞から抽出した total RNA を用いて real-time RT-PCR を行ったところ、コントロール形質転換体と比較して、*OsHSP90*、*IREN* ともに *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体では発現上昇しないことが明らかとなった (Fig. 1-36)。

以上の結果から、過敏感細胞死誘導時には OsNAC3 と OsNAC4 が共に発現誘導された後、核に移行し、核内で相互作用することによって過敏感細胞死の誘導に関連したいくつかの遺伝子の発現を制御していることが示された。

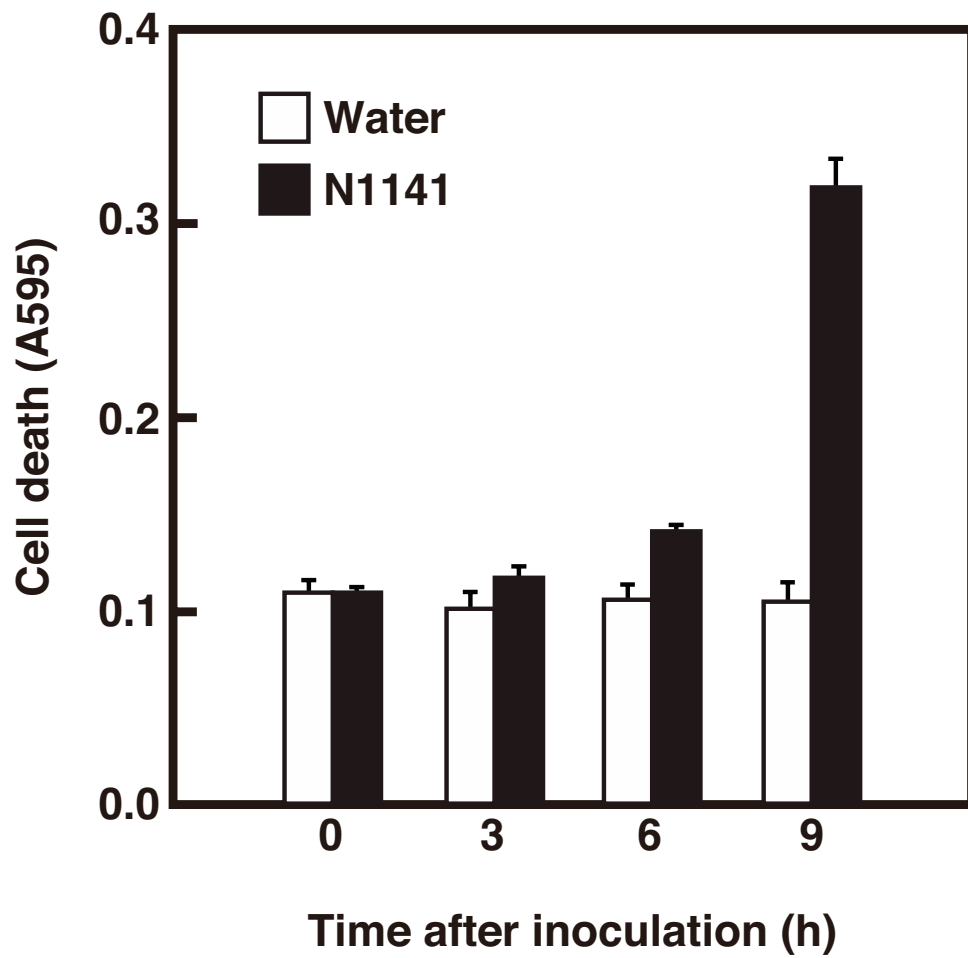


Fig. 1-1

イネ培養細胞に非病原性の *A. avenae* N1141 菌株を接種した時に認められる過敏細胞死の誘導

A. avenae N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) を接種したイネ培養細胞で誘導される細胞死をエバンスブルー染色で測定した。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

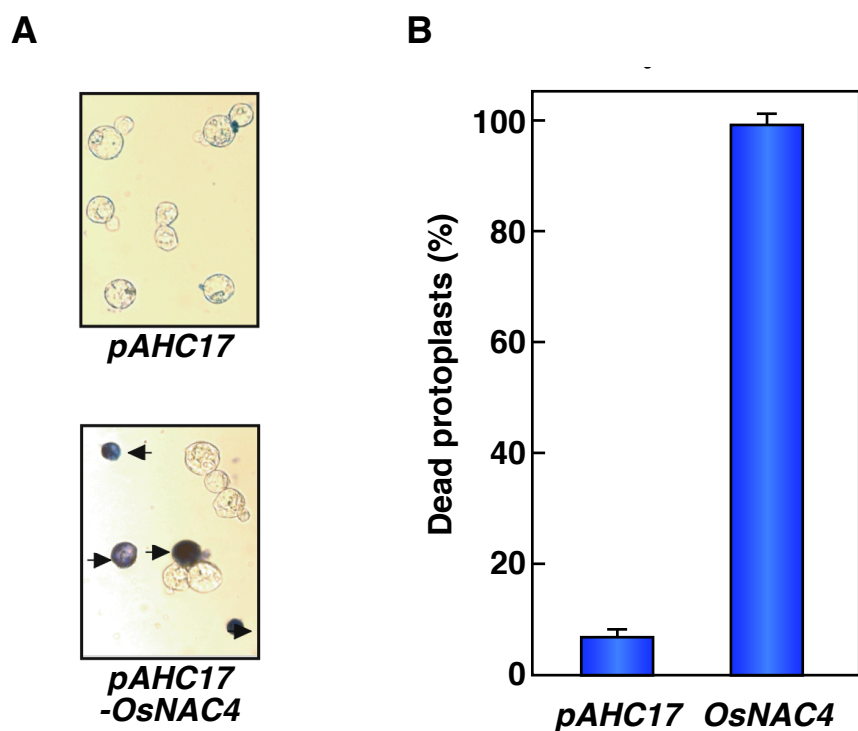


Fig. 1-2

イネプロトプラストに *OsNAC4* を過剰発現させたときに認められる細胞死

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pAHC17-OsNAC4* または *pAHC17* (コントロール) を PEG 法により導入し、導入 24 時間後の細胞を回収して終濃度が 0.05% となるようにエバンスブルー染色液を加えた。(A) 染色した細胞を、顕微鏡により観察を行った。矢印はエバンスブルーにより染色されたプロトプラストを示す。(B) 染色した細胞の画像をランダムで 10 枚選出し、全細胞数とエバンスブルーにより染色された細胞のカウントを行った。実験は 3 回以上行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

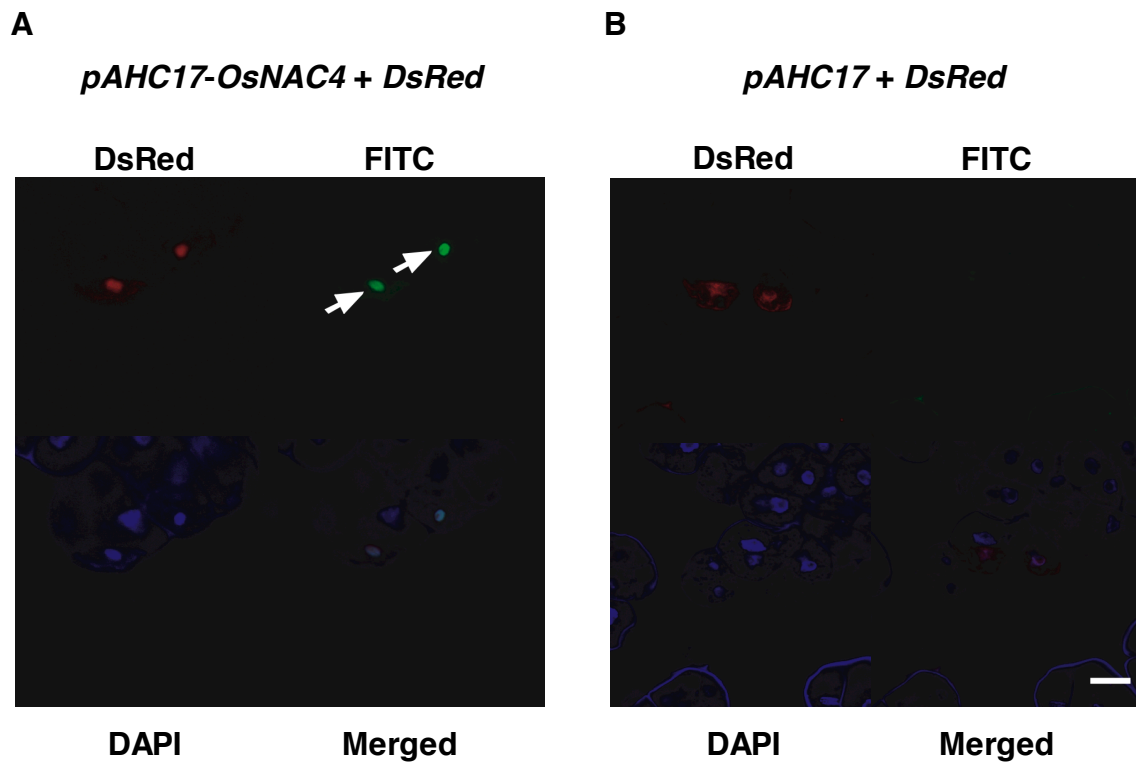


Fig. 1-3

OsNAC4 を過剰発現させた培養細胞で認められる核 DNA の断片化

イネ培養細胞に *pAHC17-OsNAC4* (A) または *pAHC17* (コントロール) (B) と *pAHC17-DsRed* を同時にパーティクルボンバードメント法により導入し、導入 6 時間後の細胞を TUNEL 染色した。蛍光像は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D) により観察を行った。矢印は DNA 断片化を示す FITC 蛍光である。Bar = 10 μ m。

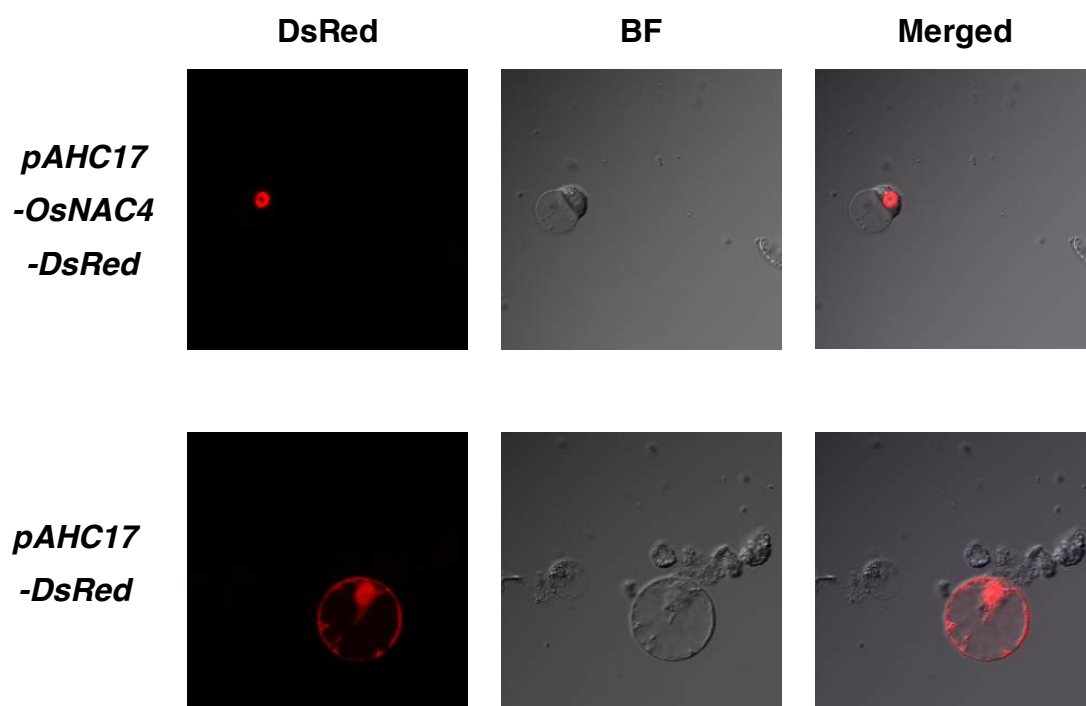


Fig. 1-4

イネプロトプラストにおける **OsNAC4** の細胞内局在

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pAHC17-OsNAC4-DsRed* または *pAHC17-DsRed* (コントロール) を PEG 法により導入し、導入 6 時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D) で観察した。Bar = 10 μ m。を示す。BF : Bright field.

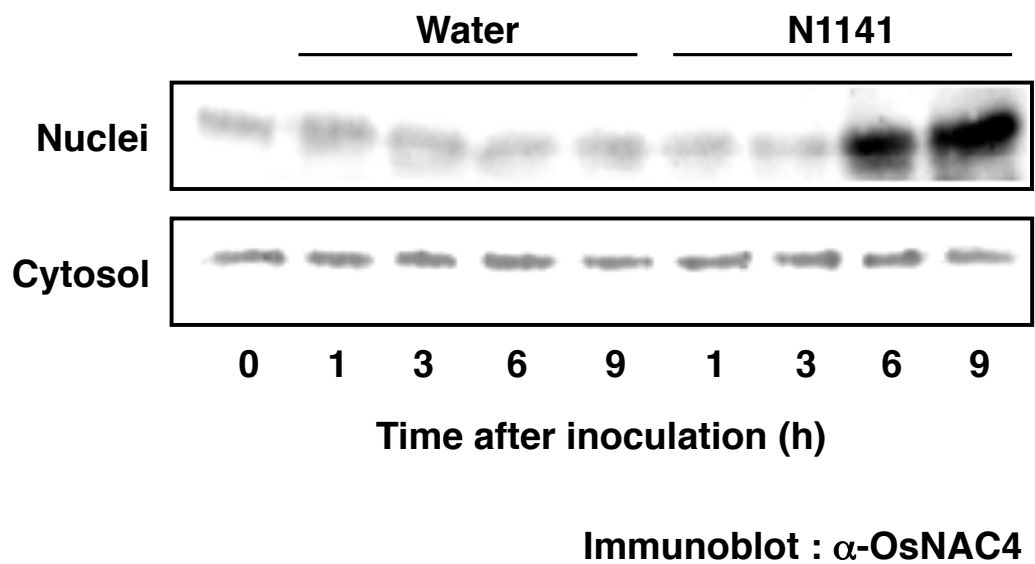


Fig. 1-5

過敏感細胞死誘導時における OsNAC4 の核と細胞質での蓄積

水 (Control) と N1141 菌株をイネ培養細胞に接種し核と細胞質における OsNAC4 の蓄積を抗 OsNAC4 抗体によるウエスタンブロットで解析した。

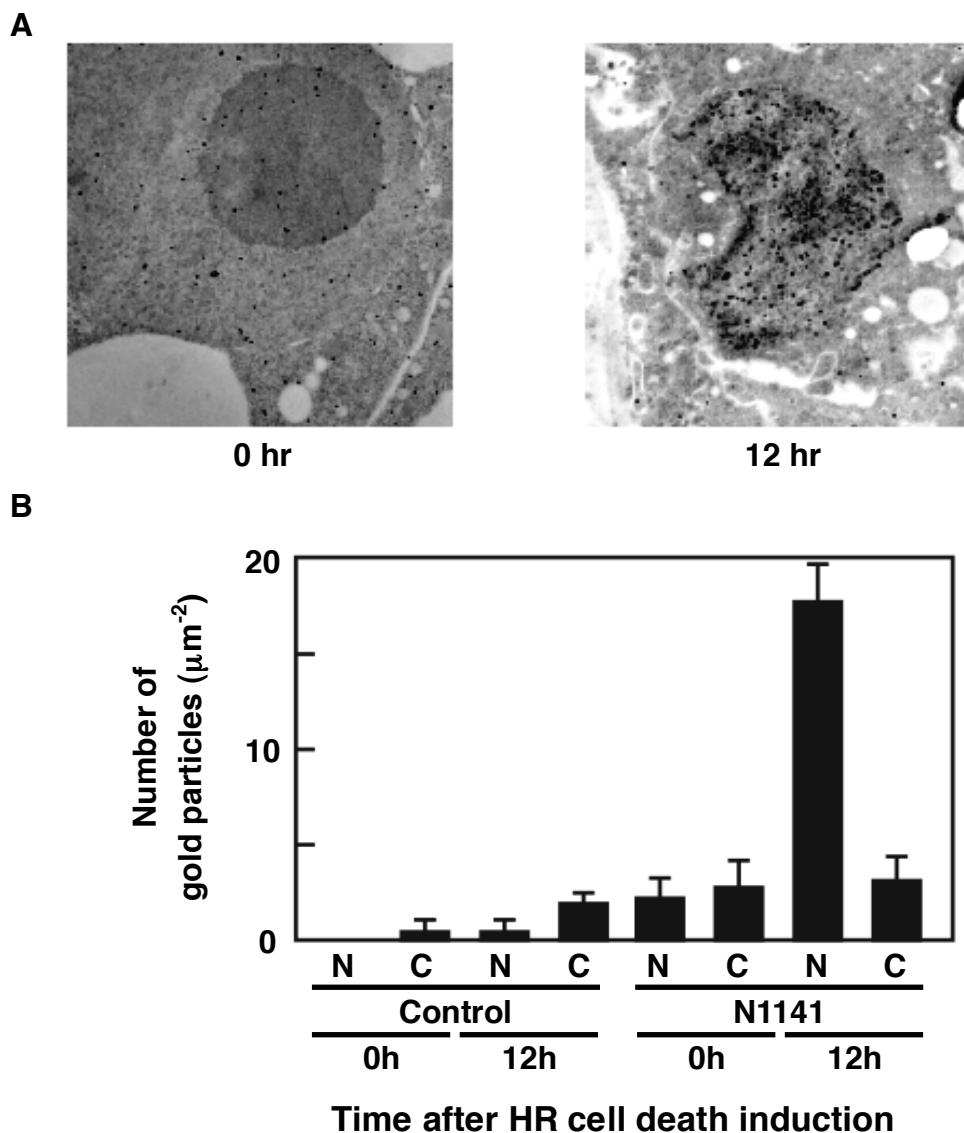


Fig. 1-6

免疫電子顕微鏡による過敏感細胞死誘導時の OsNAC4 細胞内局在の解析

水 (Control) と N1141 菌株を接種したイネ培養細胞における OsNAC4 の細胞内局在を免疫電子顕微鏡により観察した。(A) N1141 菌株を接種したときの接種 0 時間後と 12 時間後における細胞内の金粒子を示す。(B) 核と細胞質においてランダムで $1 \mu\text{m}^2$ の 5 カ所を選出し、金粒子のカウントを行った。

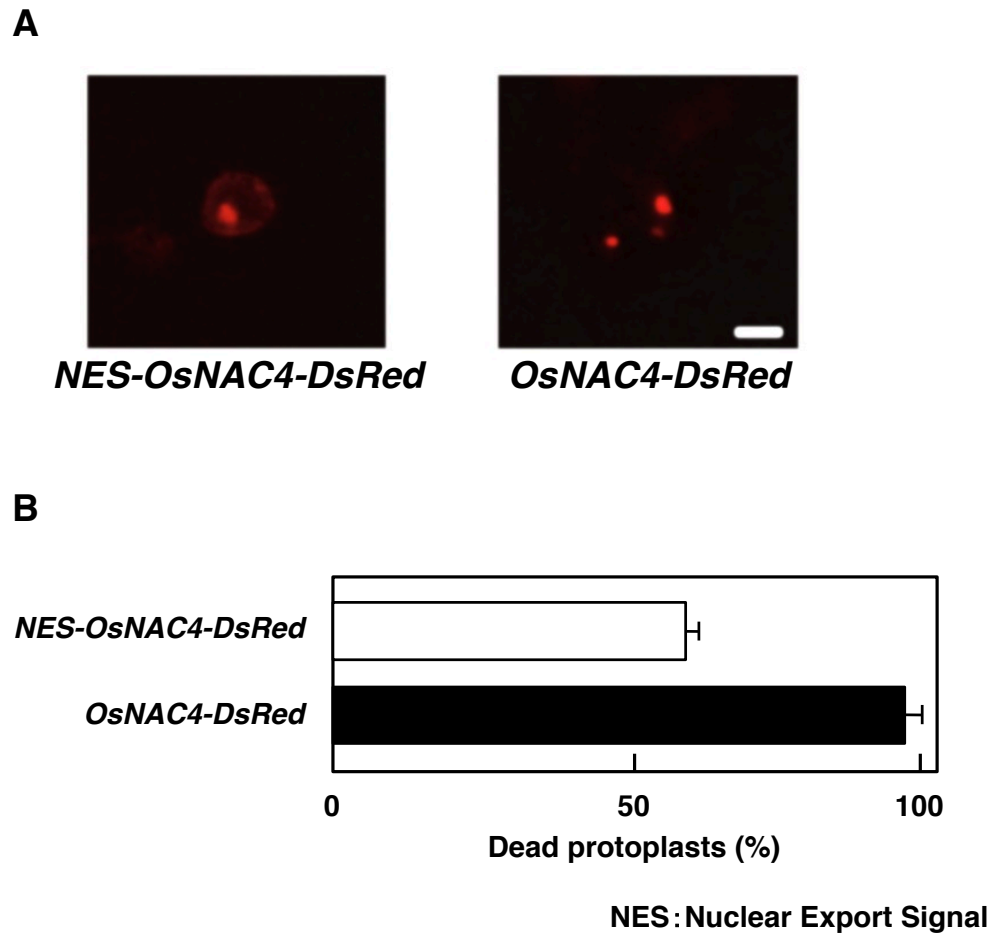


Fig. 1-7

核外輸送シグナル（NES）付加による *OsNAC4* の細胞内局在の変化と細胞死誘導

イネプロトプラストに *OsNAP1* 由来の NES（16 アミノ酸）を付与した *pAHC17-NES-OsNAC4-DsRed* または *pAHC17-OsNAC4-DsRed*（コントロール）を PEG 法により導入した。（A）導入 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡により観察を行った。Bar = 10 μm 。（B）エバンスブルーで染色した細胞の画像をランダムに 10 枚選出し、全細胞数とエバンスブルーで染色された細胞をカウントした。縦軸は、数えた全細胞数における死細胞の割合を示す。

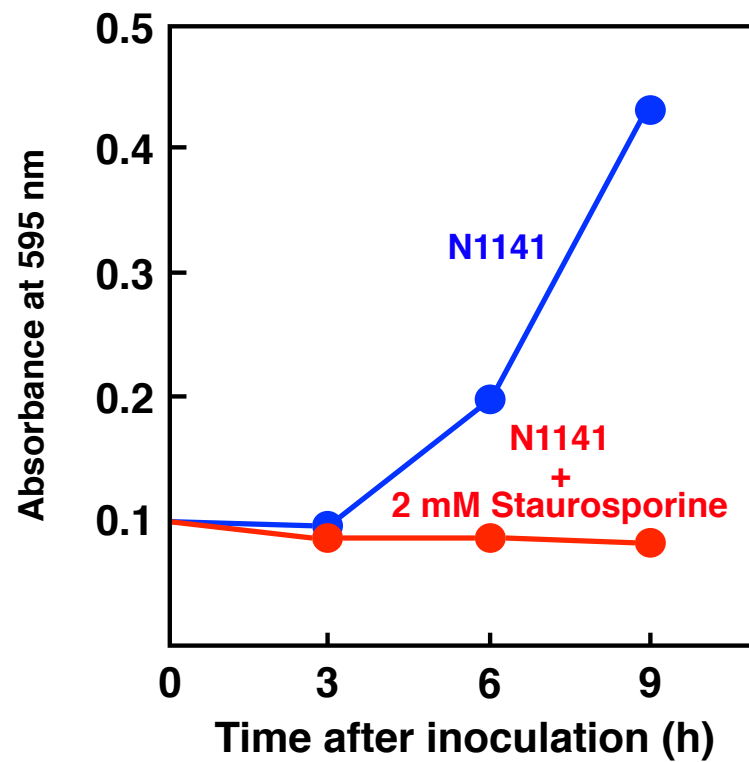


Fig. 1-8

タンパク質リン酸化の過敏感細胞死誘導への関与

2 μ M Staurosporine を処理したイネ培養細胞に N1141 菌株を接種した後、細胞死をエバンスブルーで経時的に観察した。細胞死は OD 595 nm を測定することで定量した。

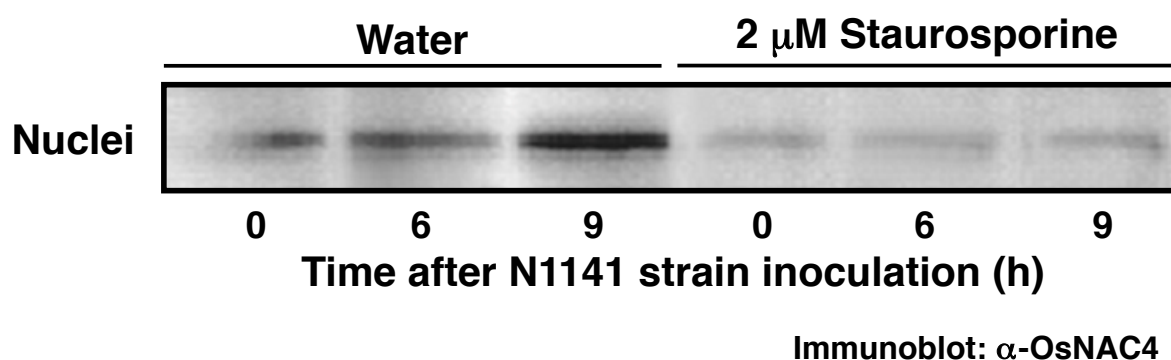


Fig. 1-9

A. avenae N1141 菌株接種時に認められる OsNAC4 の核移行へのタンパク質リン酸化の関与

2 μM Staurosporine 処理したイネ培養細胞に N1141 菌株を接種した時に認められる核における OsNAC4 タンパク質量の経時的な変化を示す。N1141 菌株を接種して 0、6、9 時間後の細胞を回収し、核と細胞質に分画後、各サンプル 10 μg を SDS-PAGE で分離し、抗 OsNAC4 抗体を用いてタンパク質を検出した。

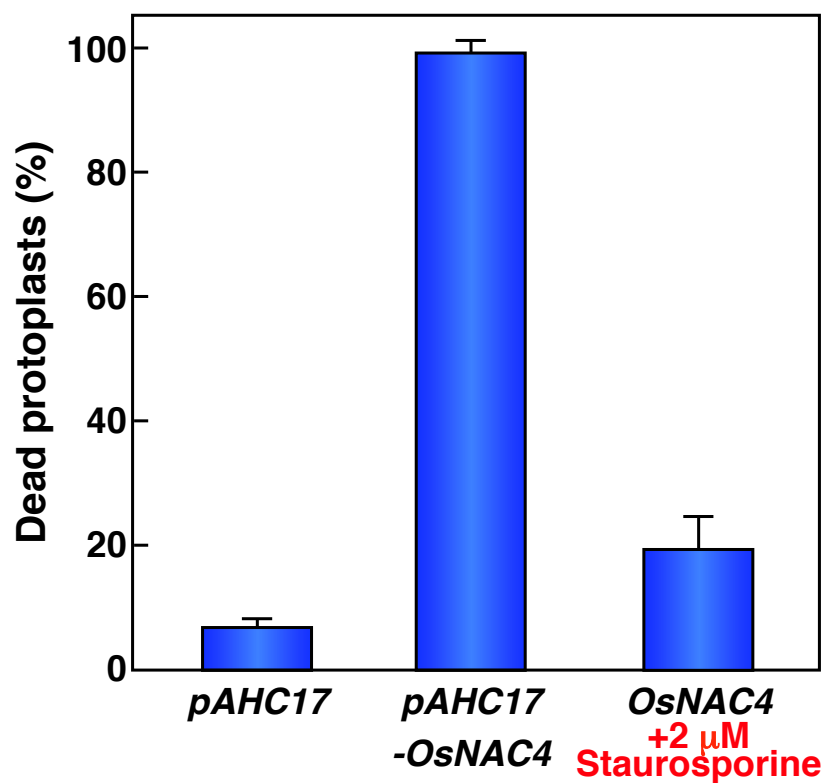


Fig. 1-10

OsNAC4過剰発現によって誘導される過敏感細胞死へのタンパク質リン酸化の関与

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pAHC17-OsNAC4* または *pAHC17* (コントロール) を PEG 法により導入した。同時に、*pAHC17-OsNAC4* を導入した細胞にリン酸化阻害剤である Staurosporine を終濃度が 2 μ M となるように添加し、導入 24 時間後の細胞における死細胞をエバンスブルーで染色した。得られた画像をランダムで 10 枚選出し、全細胞数とエバンスブルーにより染色された細胞をカウントした。

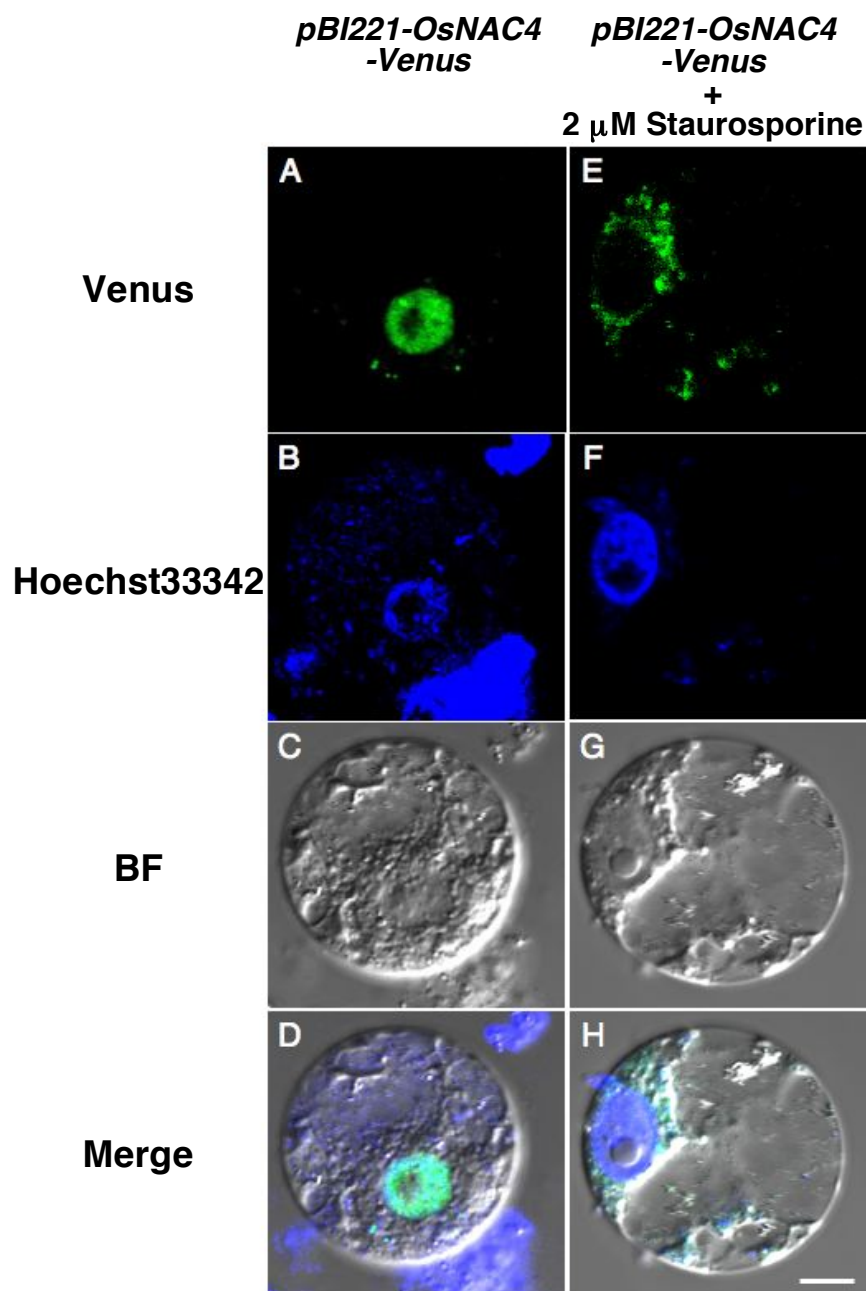


Fig. 1-11

Ser/Thr 型キナーゼ特異的阻害剤 Staurosporine 処理による OsNAC4 核移行の阻害

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pBI221-OsNAC4-Venus* (A-D) と、*pBI221-OsNAC4-Venus* を導入後、終濃度 2 mM の Staurosporine を 2 時間おきに添加し (E-H)、6~8 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(A, E) Venus 蛍光画像図、(B, F) Hoechst33342 蛍光画像図、(C, D) 明視野の画像図、(D, H) Merge させた画像図。Bar = 10 μ m。BF : Bright field.

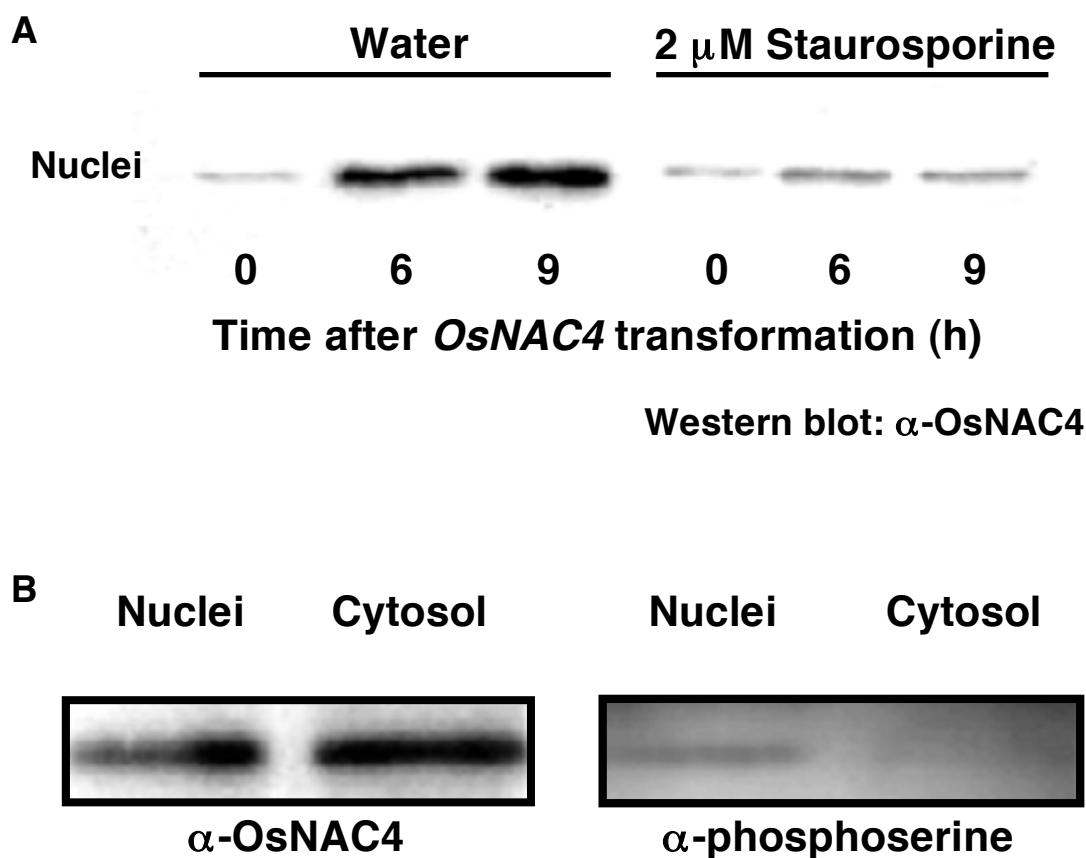


Fig. 1-12

OsNAC4 を過剰発現させたイネプロトプラストへのリン酸化阻害剤 Staurosporine の処理

イネプロトプラストに *pAHC17-OsNAC4* を導入し、Staurosporine を終濃度 2 μ M になるように処理した時の核での *OsNAC4* タンパク質の経時的な蓄積を示した。導入 0 時間後、6 時間後、9 時間後に回収した細胞を核と細胞質に分画し、SDS-PAGE の後、ウェスタンブロットを行い、タンパク質を検出した。(A) 抗 *OsNAC4* 抗体を用いて各時間における *OsNAC4* タンパク質量を検出した。(B) 抗 *OsNAC4* 抗体の結果を ImageJ software を用いて解析を行い、核と細胞質の *OsNAC4* タンパク質量が等量となるように SDS-PAGE で分離した後、抗 *OsNAC4* 抗体と抗リン酸化セリン抗体を用いて検出した。

1	MEMAAAVGGS	GRRDAEAELN	LPPGFRFHPT	DEELVVHYLC	40
41	RKVARQPLPV	PIIAEVDLYK	LDPWDLPEKA	LFGRKEWYFF	80
81	TPRDRKYPNG	SRPNRAAGRG	YWKATGADKP	VAPKGSARTV	120
121	GIKKALVFYS	GKAPRGVKTD	WIMHEYRLAD	ADRAPGGKKKG	160
161	SQKLDEWVLC	RLYNKKNNWE	KVKLEQQDVA	SVAAAAPRNH	200
201	HHQNGEVM DA	AAADTM SDSF	QTHDSDIDNA	SAGLRHGGCG	240
241	GGGFGDVAPP	RNGFVT VKED	NDWFTGLNFD	ELQPPYMMNL	280
281	QHMQM QMVNP	AAPGHDGGYL	QSISSPQM KM	WQTILPPF	318

Fig. 1-13

OsNAC4 の推定アミノ酸配列

OsNAC4 のアミノ酸配列と各ドメインを示している。赤字表記：NAC ドメイン中のセリン残基、青字表記：NAC ドメイン中のスレオニン残基を示している。黒色の上線は5つのNACドメインを示している。

(a)
Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	10	AVGGSGRRD	0.885	*S*
Sequence	91	YPNGSRPNR	0.101	.
Sequence	116	APKGSARTV	0.012	.
Sequence	130	LVFYSGKAP	0.696	*S*
Sequence	161	GKKGSQKLD	0.967	*S*
Sequence	191	QDVASVAAA	0.105	.
Sequence	217	ADTMSDSFQ	0.377	.
Sequence	219	TMSDSFQTH	0.215	.
Sequence	225	QTHDSIDIDN	0.992	*S*
Sequence	231	IDNASAGLR	0.012	.
Sequence	302	GYLQSISSP	0.004	.
Sequence	304	LQSISSPQM	0.017	.
Sequence	305	QSISSPQMK	0.165	.

(b)
Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	30	RFHPTDEEL	0.575	*T*
Sequence	81	WYFFTDRDR	0.980	*T*
Sequence	105	YWKATGADK	0.326	.
Sequence	119	GSARTVGIK	0.068	.
Sequence	139	RGVKTDWIM	0.037	.
Sequence	215	AAADTMSDS	0.605	*T*
Sequence	222	DSFQTHDS	0.886	*T*
Sequence	256	NGFVTVKED	0.962	*T*
Sequence	265	NDWFTGLNF	0.017	.
Sequence	313	KMWQTILPP	0.598	*T*

(c) NetPhos 2.0: predicted phosphorylation sites in Sequence

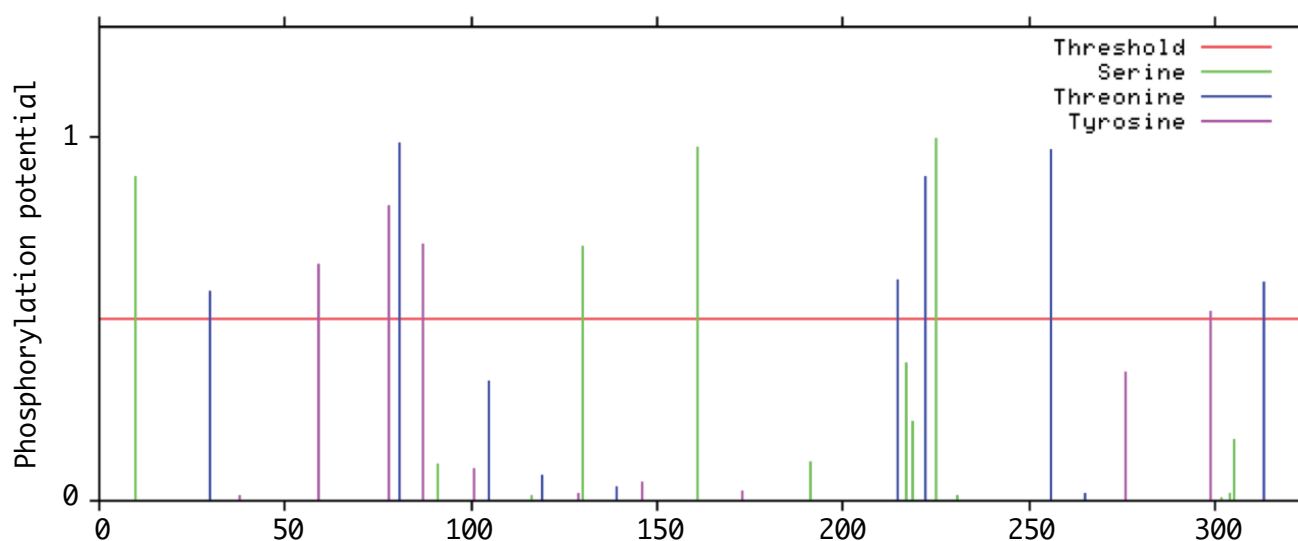


Fig. 1-14

OsNAC4 リン酸化部位の予測

タンパク質リン酸化部位予測プログラム (NetPhos2.0 program) により (a) OsNAC4 の分子内に存在するセリン残基中のリン酸化予測部位のセリン残基を示した表である。

(b) OsNAC4 の分子内に存在するスレオニン残基中のリン酸化予測部位のスレオニン残基を示した表である。(c) OsNAC4 のセリン、スレオニン残基すべてにおけるリン酸化予測値を示したグラフである。

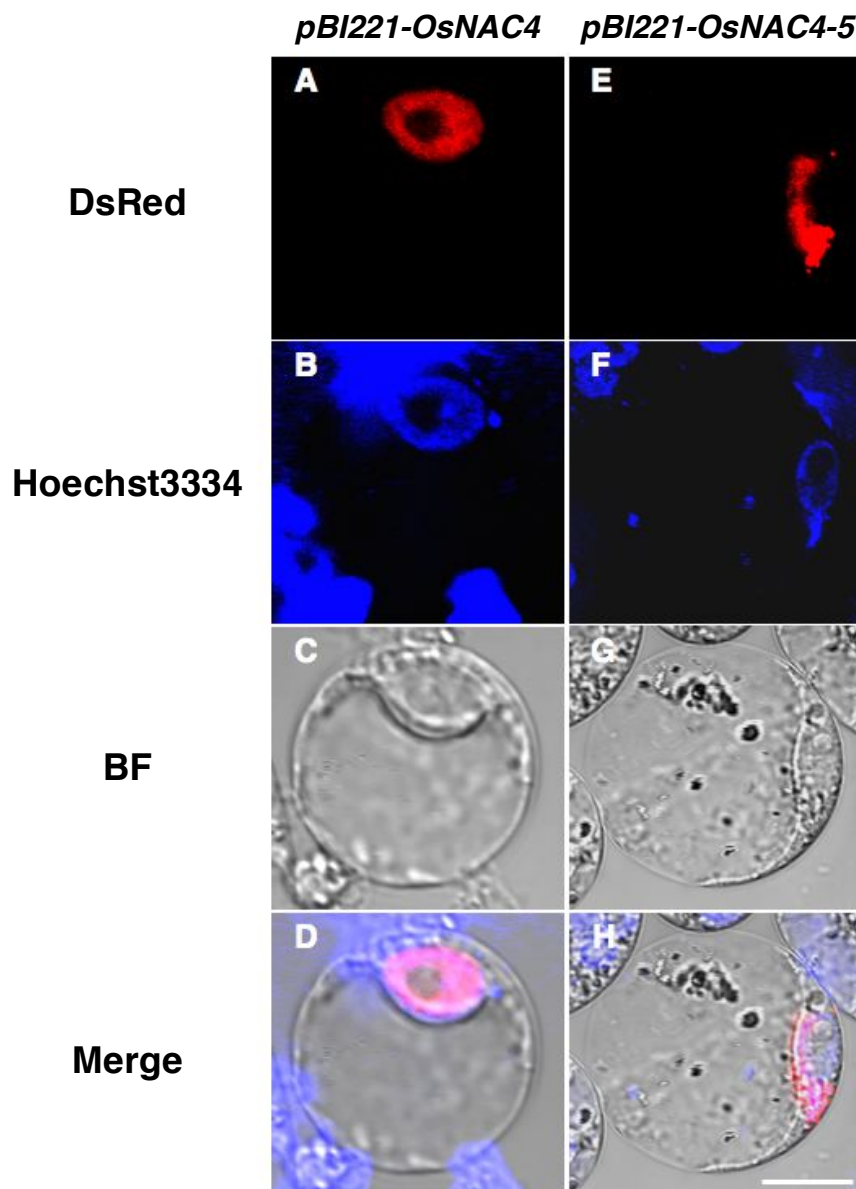


Fig. 1-15

OsNAC4 の NAC ドメイン内のセリン残基をアラニン残基に置換したタンパク質の細胞内局在

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに OsNAC4 の C 末端側に DsRed タンパク質を融合させた OsNAC4-DsRed タンパク質発現ベクター *pBI221-OsNAC4-DsRed* (A-D) と、*pBI221-OsNAC4-5A-DsRed* (E-H) を導入して 12 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(A,E) DsRed 蛍光画像図、(B,F) Hoechst33342 蛍光画像図、(C,D) 明視野の画像図、(D,H) Merge させた画像図。Bar = 10 μ m。BF : Bright field.

Candidate clones	Clones
OsNAC3 protein	15
OsNAC6 protein	6
C2 domain containing protein	3
Helicase, C-terminal domain containing protein	2
Ribosomal protein S10 family protein	2
Peptidase M24, methionine aminopeptidase	1
Cyanate hydratase (EC 4.2.1.104)	1
Unknown protein	2

Table. 1

Yeast two hybrid 法により得られた OsNAC4 と相互作用するイネタンパク質

>OsNAC3mRNA

TCGACCCACGCGTCCGCCACCACCCTCATTCCCTCAAGTCCCAAGATCGAACACCTCGTGTCCATGGCG
GCGGCGAAGCGGCGAGTGC GCGACGCGGAGGCGGACCTGAACCTCCCGCCGGGCTTCGCTTCCACCCCA
CCGACGAGGAGCTGGTGGCGCACTACCTCTGCCCGCGCGCCGCGGGCCGCGCCGCCCGGTCCCCATCAT
CGCCGAGCTCGACCTCTACCGCCACGACCCATGGGACCTCCCCACCGCGCCCTCTTCGGCCGCGCGAG
TGGTACTTCTTACCCCGCGCGACCGCAAGTACCCCAACGGCTCCCGCCCCAACCGCGCCGCGCCTCGG
GCTACTGGAAGGCCACCGGCGCCGACAAGCCCGTGTGCACAACGGCAGGACGGCCGGGATCAAGAAGGC
GCTCGTGTCTACACGGCAAGCCCCCGCGGCGTCAAGACGGAGTGGATCATGCACGAGTACCGCCTC
GCCAAGAAGGGCGGCGCCGCCCGCGGGCGCGGGCGCGCTCAGGCTGGATGACTGGGTGCTGTGCC
GGCTGTACAACAAGAAGAACGAGTGGGAGAAGATGCAGAGCAGGAAGGAGGAGGAGGAGGCCATGGCGGC
GGCGCAGTCGTGGGGGAGACGCGGACGCCGAGTCGGAGGTCTGTCAGACGACGCGCTTCCGGAGATG
GACTACTCGCTGCCGGCGGCGTCTTCGACGACGCCCTGCTGCCAAGGAGGAGGCGCGCAGCAGCAGT
GGCTCATGGGGATGAGCCTCGACGACCTCCAGGGCCTCGGCTCGCTGCTGCAGGCCGACGACCTCTCCAT
GCTCGCGCCGCCCGCGGCGGAAGACGGAGCCGCTCGGCGCGCCATTCTTCTGAGCTCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGACTGCACCACTGTATATAAATTCAGAGTTTTAGACATGTTAGTATTC
AGAGTTCTCAGGCAAGTTCAGAATTCAGAGATGGTTAAGGATTAGTGGCTTATGAGCAGTATGATATGCA
GGTAGTTTCTAGTTTACAGTGTACTCCAGATTGGAGATTTGATTAATGATTTGATTCTAATTAATGT
AGTATACTGAGTGTTACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>OsNAC6mRNA

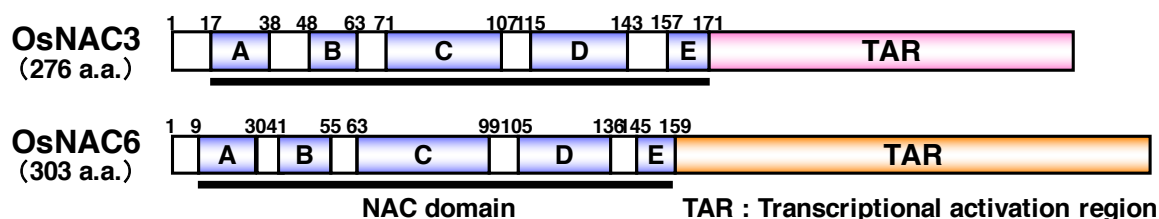
TCGACCCACGCGTCCGCTCTTCCCAACACTAGTAGGATAAAGCCACAGAGAGAGCAGTAGTAGTAGCGAG
CTCGCCGAGAACGGACGATCACCAGAGAGGGGGAGAGAGATGAGCGGCGGTACGACCTGCAGCTGCC
GCCGGGGTTCCGGTTCCACCCGACGAGGAGCTGGTGATGCACTACCTCTGCCGCCGCTGCGCCGGC
CTCCCCATCGCCGTCCCCATCATCGCCGAGATCGACCTCTACAAGTTCGATCCATGGCAGCTTCCCCGGA
TGGCGCTGTACGGAGAGAAGGAGTGGTACTTCTTCTCCCCGCGAGACCGCAAGTACCCGAACGGGTGCGG
GCCGAACCGCGCCGCCGGGTGCGGGTACTGGAAGGCGACCGGCGCCGACAAGCCGGTGGGCTCGCCGAAG
CCGGTGGCGATCAAGAAGGCCCTCGTCTTCTACGCCGGAAGGCGCCCAAGGGCGAGAAGACCAACTGGA
TCATGCACGAGTACCGCCTCGCCGACGTGACCGCTCCGCCCGCAAGAAGAAGACAGCCTCAGGTTGGATGA
TTGGGTGCTGTGCCGATTTACAACAAGAAGGGCGGGCTGGAGAAGCCGCCGGCGCGCGGTGGCGGCG
GCGGGGATGGTGAGCAGCGGCGGCGGCTCCAGAGGAAGCCGATGGTGGGGGTGAACGCGGCGGTGAGCT
CCCCGCCGAGCAGAAGCCGGTGGTGGCGGGGCCGCTTCCCGGACCTGGCGGCGTACTACGACCGGCC
GTCGGAATCGATGCCGCGGCTGCACGCCGACTCGAGCTGCTCGGAGCAGGTGCTGTGCGCGGAGTTCGCG
TGCGAGGTGCAGAGCCAGCCCAAGATCAGCGAGTGGGAGCGCACCTTCGCCACCGTCGGGCCCATCAACC
CCGCCGCTCCATCCTCGACCCCGCGGCTCCGGCGGCTCGGCGGCTCGGCGGCGGCGGCGAGCGACCC
CCTCCTCCAGGACATCCTCATGTACTGGGGCAAGCCATTCTAGACGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAACAACCG
CATTGGCAGCAATGGTGTCACTGAACACCGTGCAGGCTAGCTAGCTTCATGGCCGGTGAACCTTTGACTCA
GGCGAGCCGCCGAGTTGACTCAAAGATAATTAAAAGAAGTGTTTTAAGTGGATTGGATTGGATTAGACA
GAGGAGATGAGGACTCGAGAAAAGCGGCGATGAGACCGTGGTTGGGGGACCCTGGCCTGGACTGAACGA
CGACGAGGCAGCAGCAGAAAGATGGTGCAATTGCATCGGGTGGCATGTCAGTGTGTGTATAGTGGCAT
GTACATAGTACATGGTGATTGATTCGGTATACAGGGGGCTAGCTTTCCTGTTTCTGTTTAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 1-17

酵母 Two-hybrid により OsNAC4 と相互作用することが明らかになった OsNAC3 と OsNAC6 の塩基配列

OsNAC3 (GnenBank accession No AB028182)、*OsNAC6* (GnenBank accession No AB028185)。赤字は ORF を示している。

A



B

	A	B	
OsNAC3	1 ----MAAAKRRVRDAEADNLPPGFRFHPTDEELVAHYLCPRAGRAAPVPIIAELDLYR		56
OsNAC4	1 MEMAAAVGGSGRRDAEAEINLPPGFRFHPTDEELVHYLCRKVARQPLVPPIIAEVDLYK		60
OsNAC6	1 -----MSGGQDLQLPPGFRFHPTDEELVMHYLCRRAGLPPIIAEIDLYK		48
	C		
OsNAC3	57 HDPWDLPHRALFGRREWFYFFTPRDRKYPNGSRPNRAAAGSYWKATGADKPVHNG--RTA		114
OsNAC4	61 LDPWDLPEKALFGRKEWYFFTPRDRKYPNGSRPNRAAGRGYWKATGADKPVAPKGSARTV		120
OsNAC6	49 FDPWQLPRMALYGEKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRAAGSGYWKATGADKPV---GSPKPV		105
	E	F	
OsNAC3	115 GIKKALVFYHGKPPRGVKTENWIMHEYRLAKKGGAAAAGAGALRLDDWVLCRLYNKKNEW		174
OsNAC4	121 GIKKALVFYSGKAPRGVKTENWIMHEYRLAD-ADRAPGGKKGSQKLDWVLCRLYNKKNNW		179
OsNAC6	106 ATKKALVFYAGKAPKGEKTNWIMHEYRLAD--VDRSARKKNSLRLDDWVLCRLYNKKGGL		163
OsNAC3	175 EKMQSRKEEEFAAAQSWGETRTPSEVVDSDAFPEMDYSLPAASFDDALLPKEEARDD		234
OsNAC4	180 EKVKLEQQDVASVAAAAPRNHHH-QNGEVMDAAADTMDSFQTHDSDIDNASAGLRHGG		238
OsNAC6	164 EKPPAAAVAAAGMVSSGGGVQRKPMVGVNAAVSSPPEQKPVVAGPAFPDLAAYYDRPSDS		223
OsNAC3	235 DWLMGMSLDDLQGLGSLQADDLSMLAPPPAAKTEPLGAPFF-----		276
OsNAC4	239 CGGGFGDVAPPRNGFVTVKEDNDWFTGLNFDLQPPYMMNLQHMQMVMNPAAPGHGG		298
OsNAC6	224 MPRLHADSSCSEQVLSPEFAFCEVQSQPKISEWERTFATVGPINPAASILDPAGSGGLGGL		283
OsNAC3	276 -----		276
OsNAC4	299 YLQSISSPQMKMWQTILPPF		318
OsNAC6	284 GGGGSDPLLQDILMYWGKPF		303

Fig. 1-18

OsNAC3 と OsNAC6 タンパク質の構造と OsNAC3、OsNAC4、OsNAC6 のアミノ酸配列比較

(A) OsNAC3 と OsNAC6 タンパク質の構造を模式的に示した。A、B、C、D は 5 つに分かれた NAC ドメイン領域を示す。(B) OsNAC3、4、6 のマルチプルアライメント解析結果を示す。N 末端側の上線は、5 つの NAC ドメインを示す。緑の枠の領域は SNAC グループに属する NAC タンパク質の共通モチーフである WVLCR motif を示す。

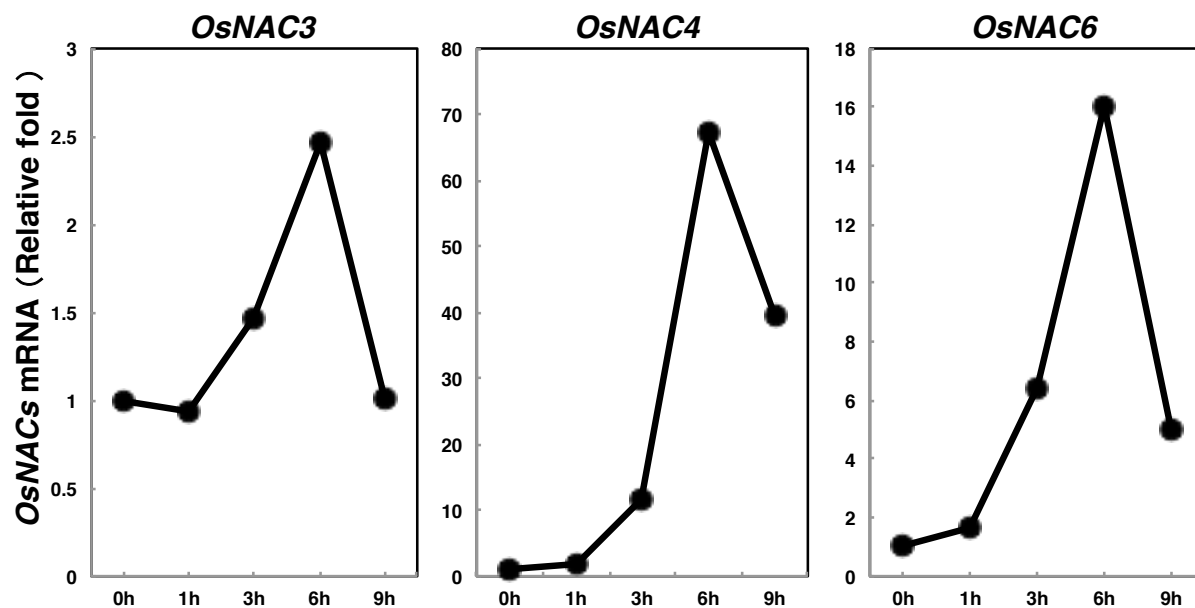


Fig. 1-19

A. avenae N1141 菌株接種時の OsNAC3、OsNAC4、OsNAC6 遺伝子の発現パターン

A. avenae N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) を接種して 0、1、3、6、9 時間後のイネ培養細胞から total RNA を抽出し、それぞれの遺伝子の発現パターンを real-time RT-PCR により解析した。縦軸は 0 時間の時の発現量を 1 として表記した。

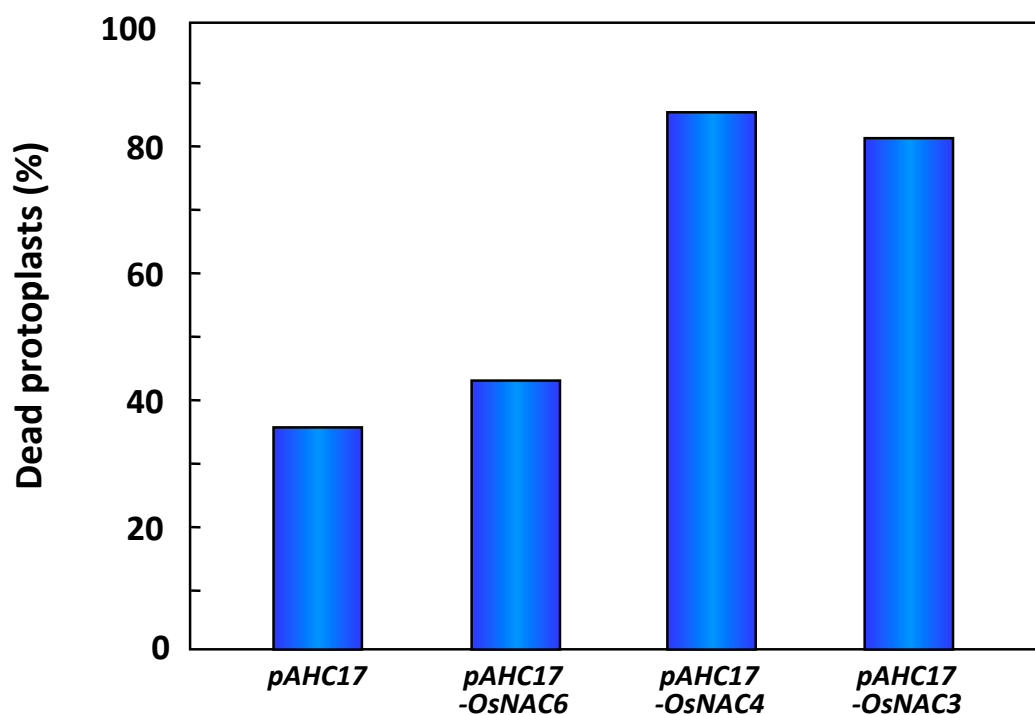


Fig. 1-20

OsNAC3 と OsNAC6 を一過的に過剰発現させたときに認められる細胞死をエバンスブルーで検出した結果

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pAHC17*、*pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4*、*pAHC17-OsNAC3* と *pAHC17-OsNAC4*、*pAHC17-OsNAC6* をそれぞれ導入して 24 時間後に死細胞をエバンスブルーで染色した。染色した細胞を顕微鏡で観察し、生細胞と死細胞数を計測し、死細胞の割合を算出した。

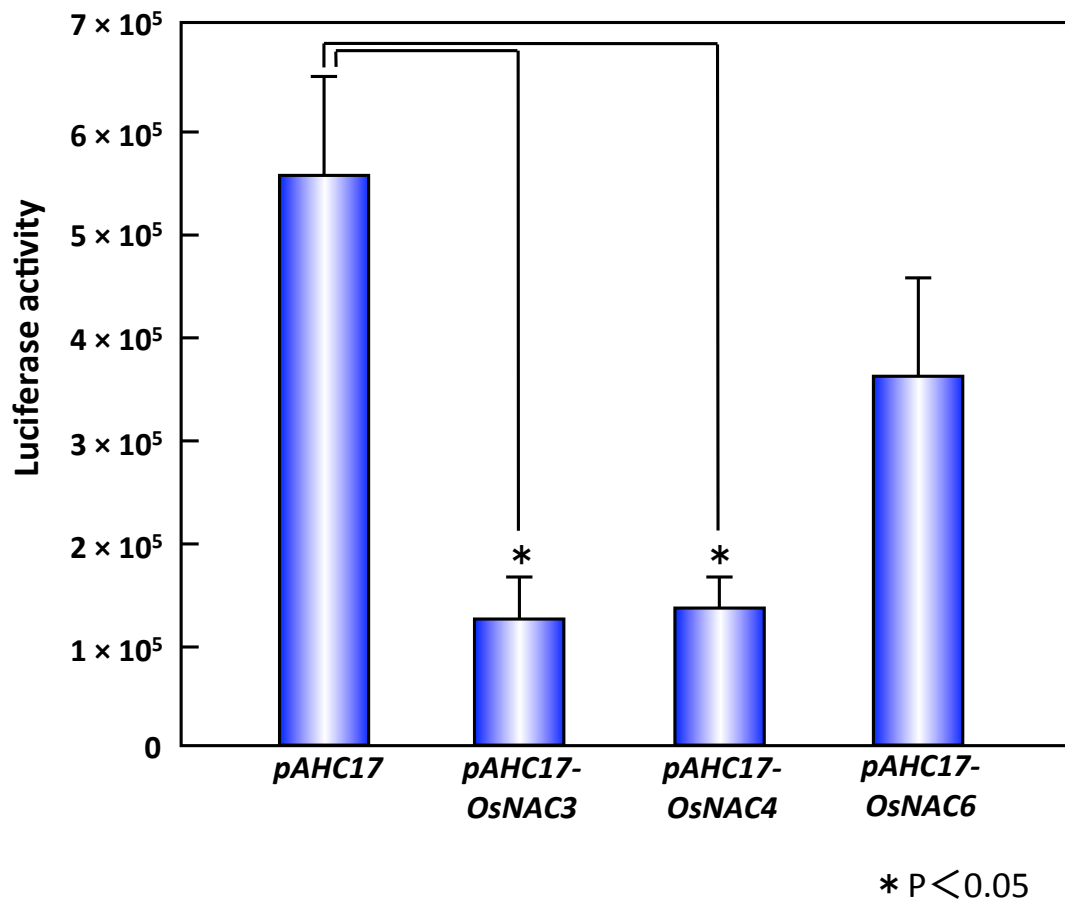
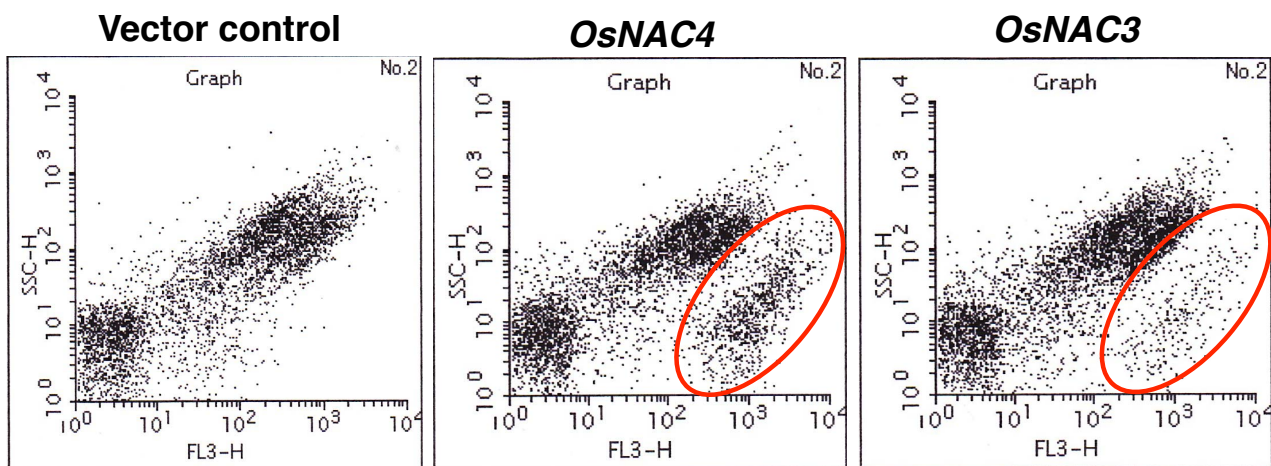


Fig. 1-21

OsNAC3 と OsNAC6 を一過的に過剰発現させた細胞におけるルシフェラーゼ活性を指標とした細胞死の測定

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pAHC17*、*pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4*、*pAHC17-OsNAC3* と *pAHC17-OsNAC4*、*pAHC17-OsNAC6* をルシフェラーゼ発現ベクターと同時に導入して 20 時間後の細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は Phelios AB2350 (ATTO) を用いて 10 秒間の発光量を測定した結果から産出した。この試験は独立に 3 回 ($n = 5$) 行った結果を示す。*は有意差 < 0.05 を示す。



FL3-H : Propidium Iodide

Fig. 1-22

OsNAC3 と OsNAC6 を一過的に過剰発現させた細胞における PI 染色を指標とした細胞死の測定

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pAHC17*、*pAHC17-OsNAC3*、*pAHC17-OsNAC4* を導入後、PI により死細胞の核を染色し、フローサイトメーターで測定することで死細胞を測定した。縦軸は SSC (側方散乱光) のシグナル強度を示し、横軸は PI 蛍光のシグナル強度を示す。赤枠の領域は死細胞の分布を示す。

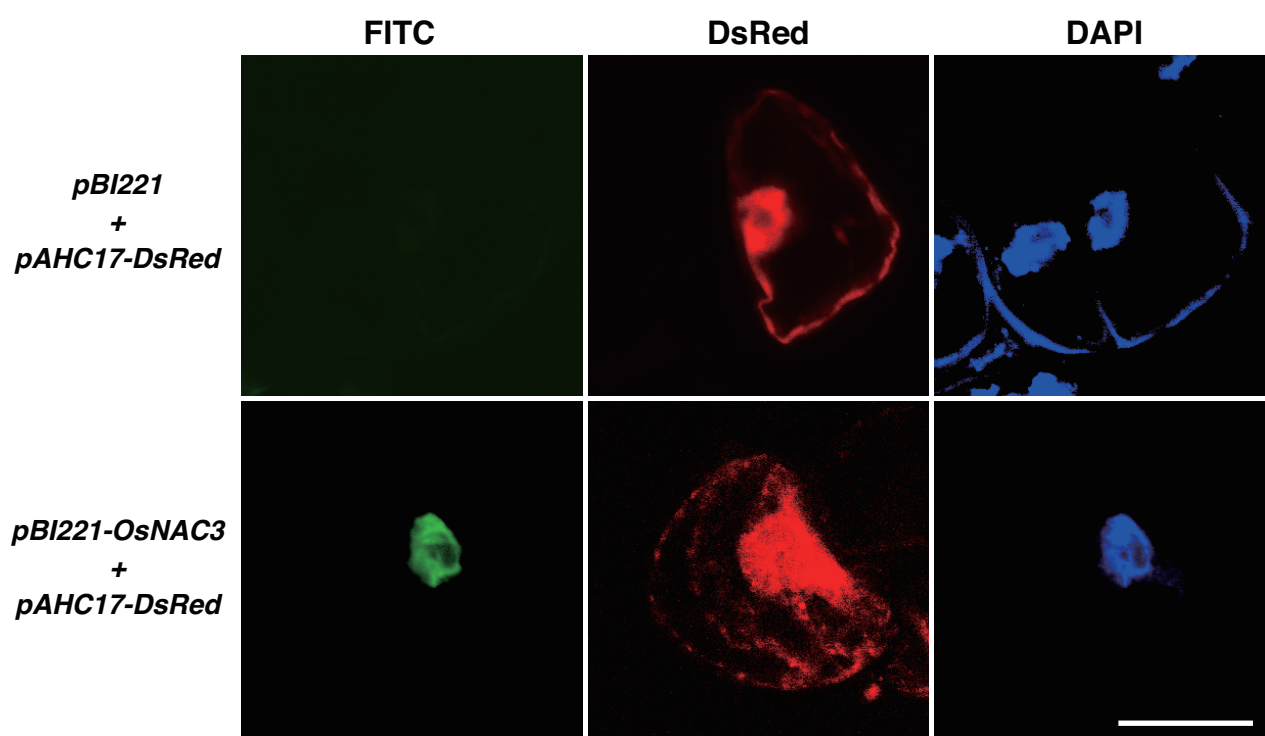


Fig. 1-23

OsNAC3を一過的に過剰発現した細胞で認められる核DNAの断片化

pAHC17-DsRed と *pBI221-OsNAC3* を共導入して5時間後の細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、TUNEL染色を行った。DAPIでDNAを染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Bar = 10 μ m。

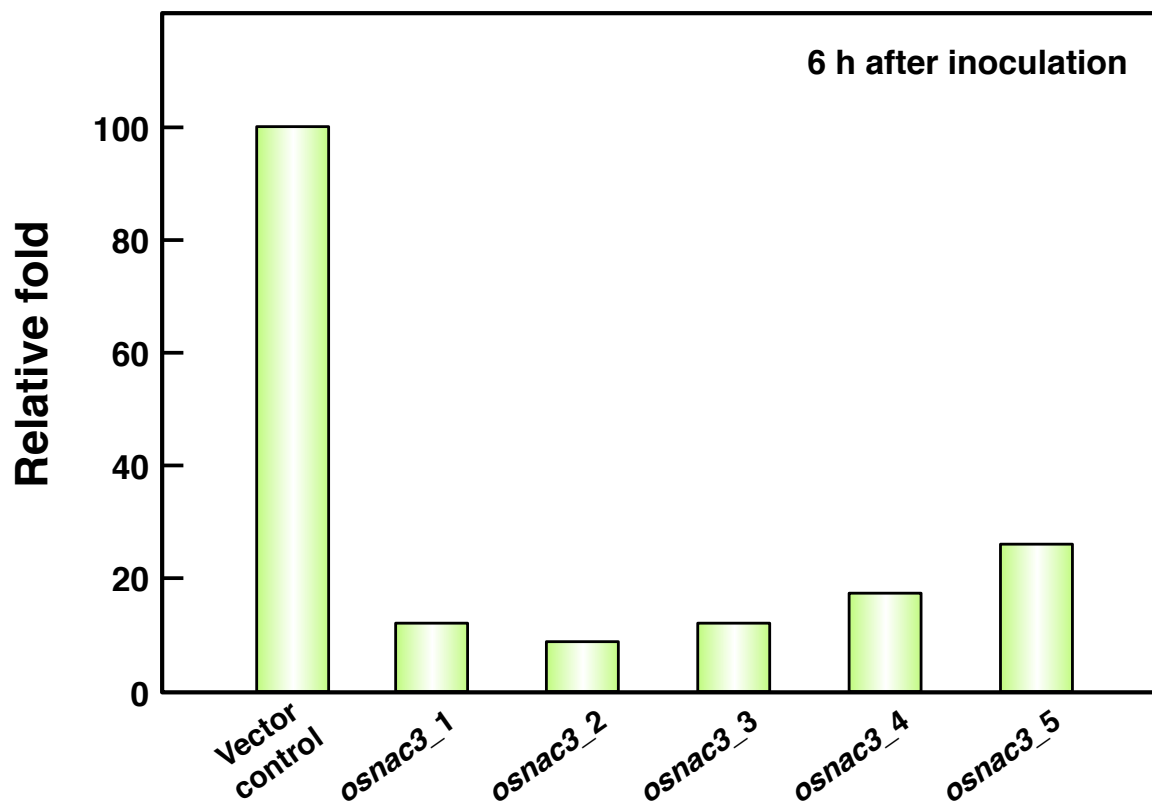


Fig. 1-24

A. avenae N1141 菌株を接種した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体における *OsNAC3* の発現量

A. avenae N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) を接種した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体における *OsNAC3* 遺伝子の発現量を示す。N1141 菌株接種後 6 時間の細胞から抽出した total RNA を用いて real time RT-PCR によって *OsNAC3* mRNA 量を定量した。縦軸は処理 0 時間を 1 としたときの発現量を示す。

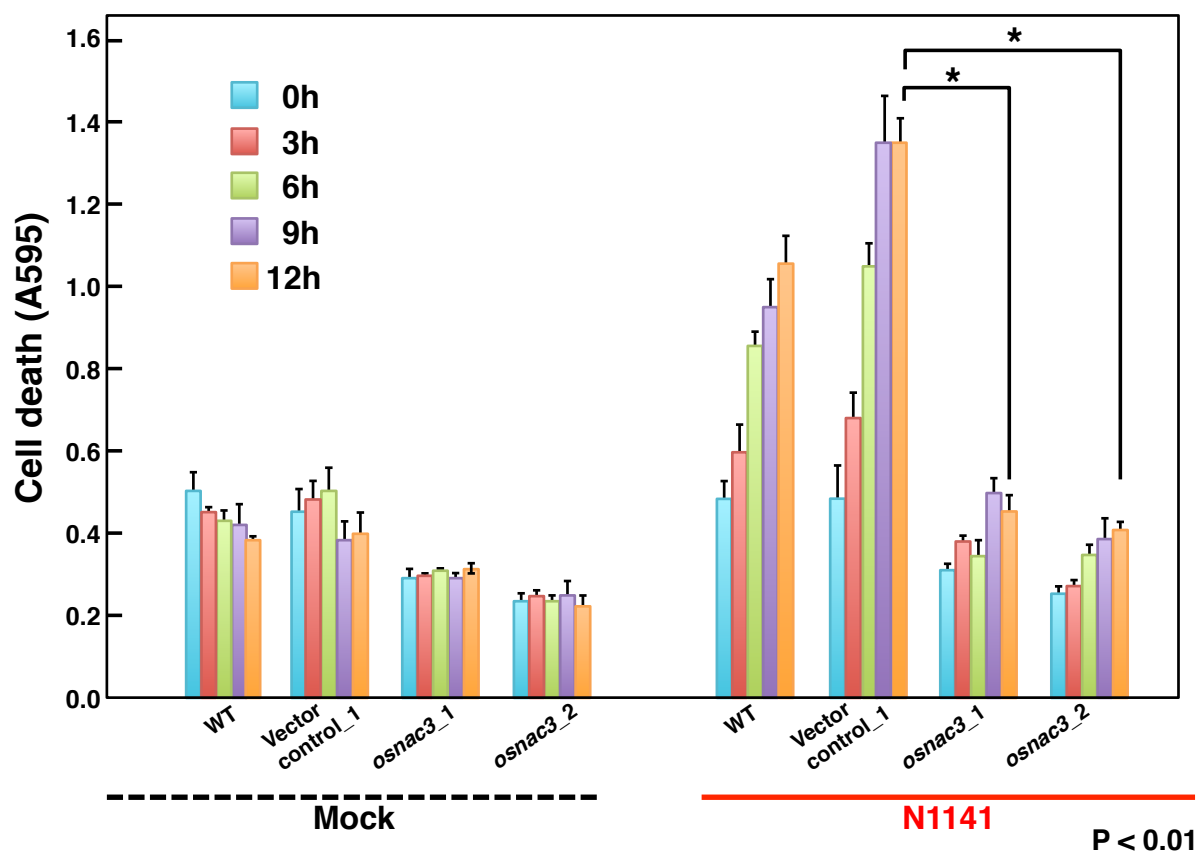


Fig. 1-25

A. avenae N1141 菌株を接種した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体における過敏細胞死誘導

A. avenae N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) を接種した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体における過敏細胞死をエバンスブルー染色で測定した。*は有意差 < 0.01 を示す。

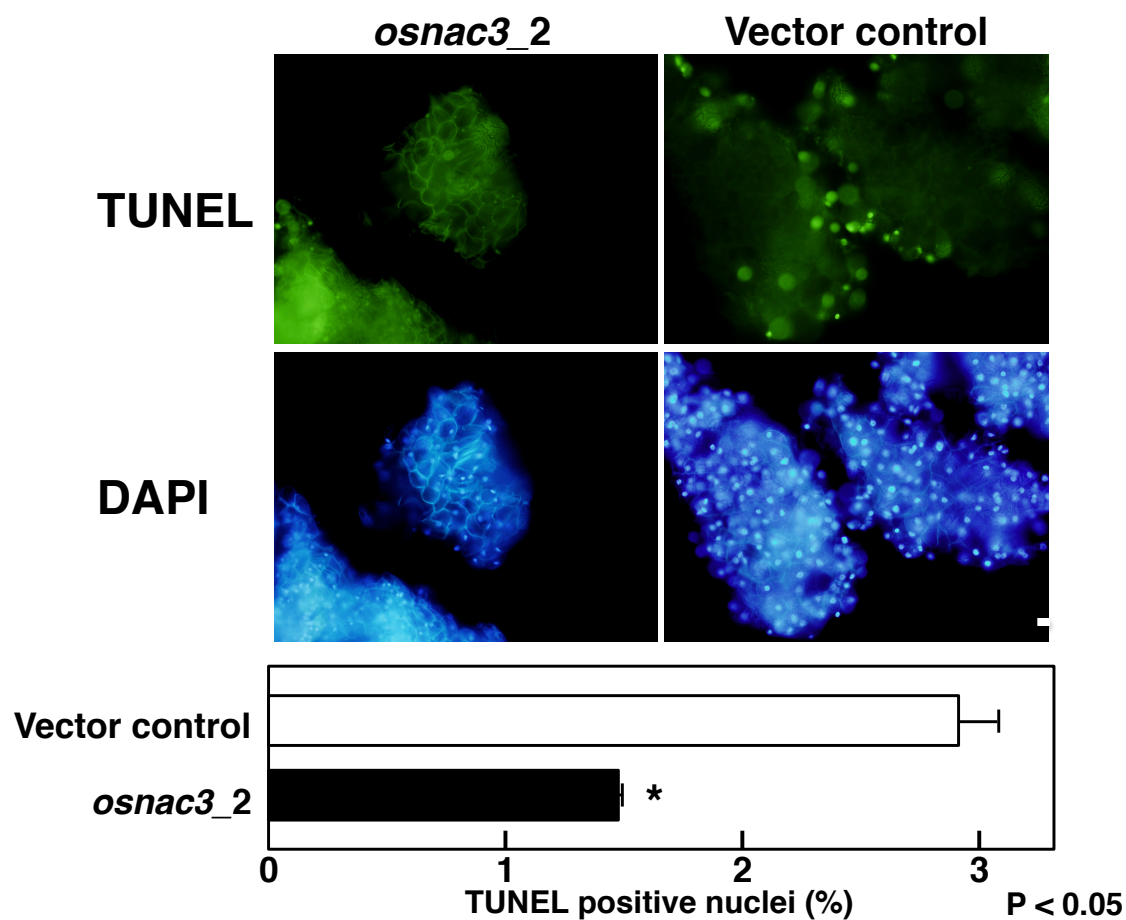


Fig. 1-26

A. avenae N1141 菌株を接種した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体における核 DNA 断片化

A. avenae N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) をコントロール形質転換体と *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体に接種して 12 時間後の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、TUNEL 染色を行った。DAPI で DNA を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Bar = 10 μ m。

下の図は、全細胞に対する TUNEL ポジ核の割合を示している。* は有意差 < 0.05 を示す。

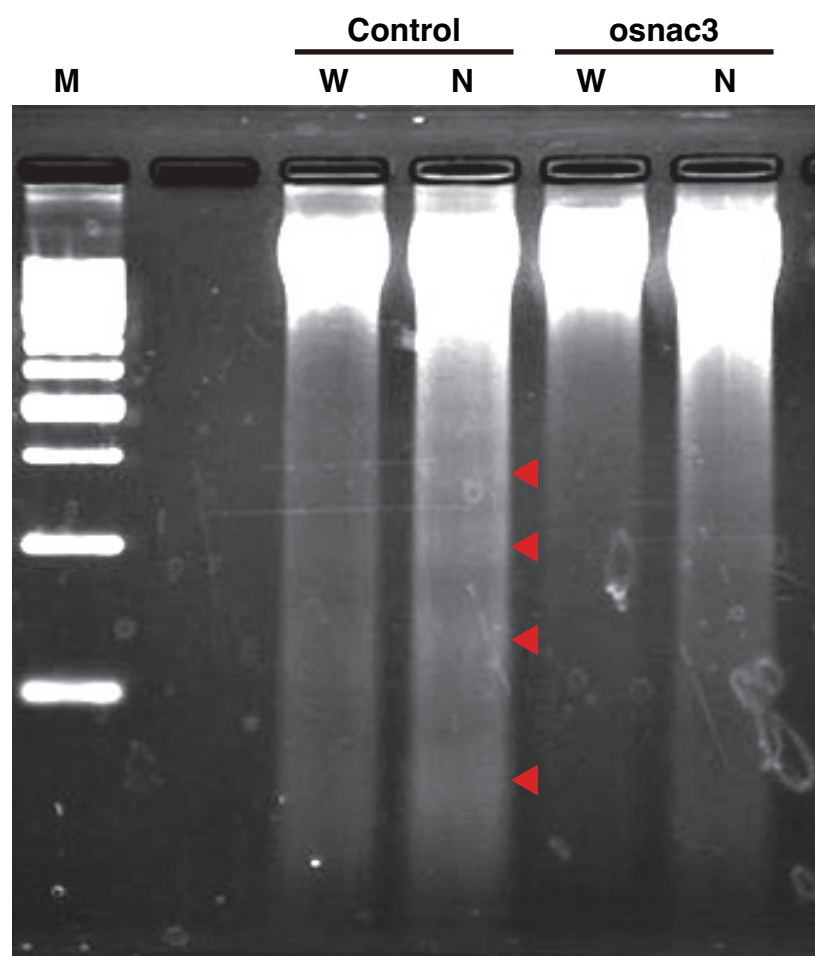


Fig. 1-27

A. avenae N1141 を接種した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体での核 DNA のラダー化

コントロール形質転換体と *OsNAC3* RNAi 抑制形質転換体に *A. avenae* N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) と水 (コントロール) をそれぞれ接種し、接種後 12 時間後に回収した細胞からゲノム抽出し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後 0.5 mg/mL のエチジウムブロマイドで染色した。DNA アプライ量: 10 μ g。

レーン M; Marker (250bp DNA ladder)、control; コントロール形質転換体、*osnac3*; *OsNAC3* RNAi 抑制形質転換体 (*osnac3_2* ライン)、レーン W; water 処理、N; *A. avenae* N1141 菌株接種。赤矢印は、180bp のヌクレオソーム単位の DNA 断片を示す。

pBI221-OsNAC3-Venus

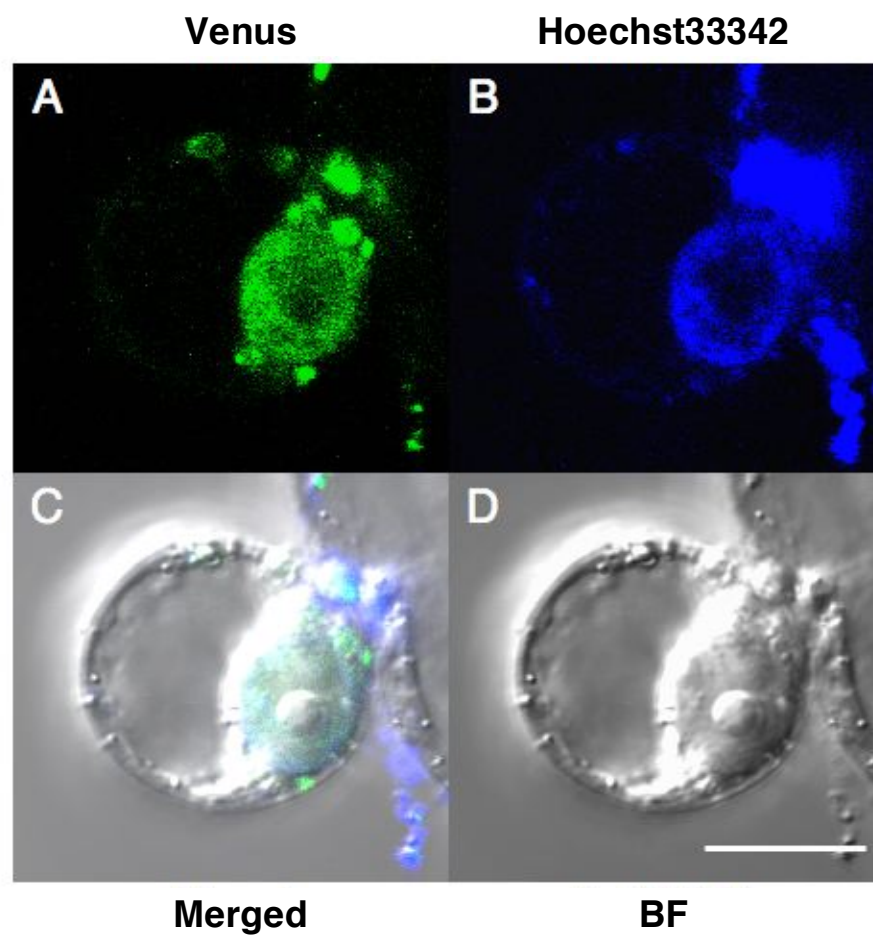


Fig. 1-28

共焦点レーザー顕微鏡を用いたイネ細胞内における **OsNAC3-Venus** の局在観察

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pBI221-OsNAC3-Venus* を導入して7時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(A) Venus 蛍光の画像。(B) Hoechst33342 の画像。(C) Merge した画像。(D) 明視野での画像。Bar = 10 μm 。BF : Bright field.

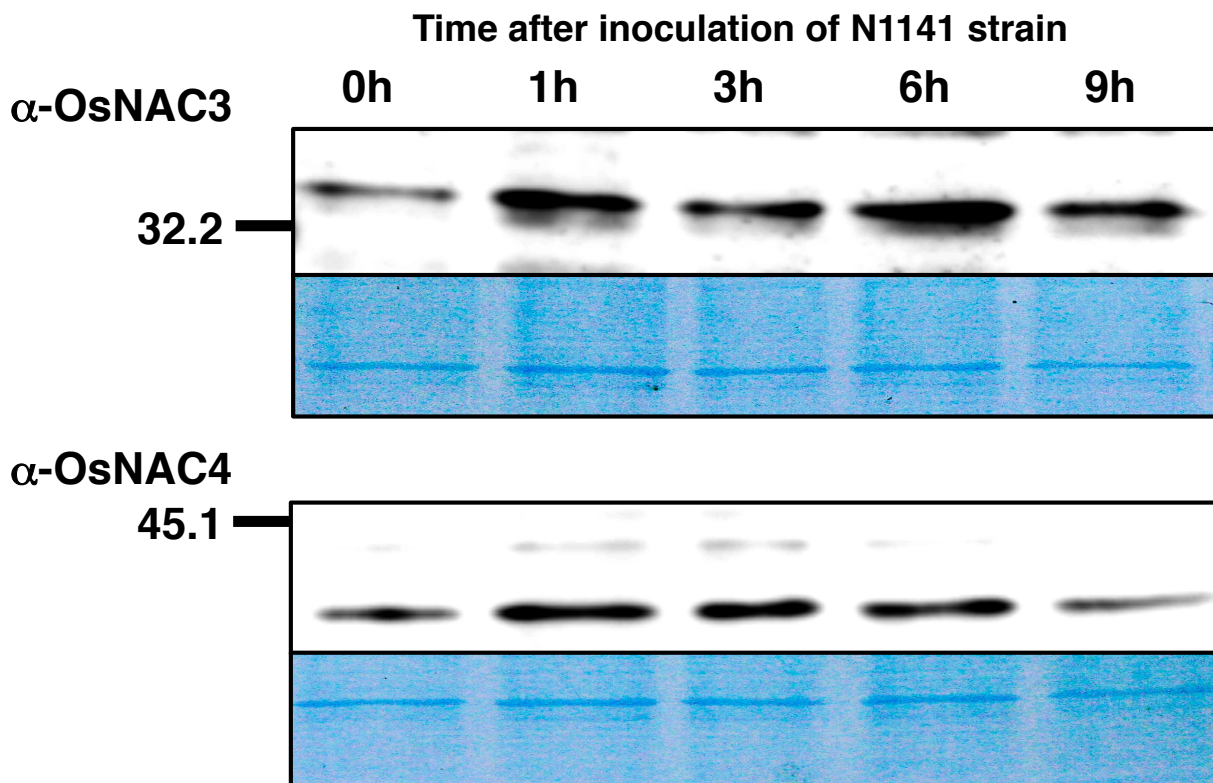


Fig. 1-29

A. avenae N1141 菌株を接種したイネ細胞における OsNAC3 タンパク質の核での蓄積

A. avenae N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) をイネ培養細胞に接種して 0、1、3、6、9 時間後の細胞から核を単離し、得られた核抽出物 (5 μ g) を 15% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離した。それぞれの上段は OsNAC3 抗体 (1/2500 希釈) と OsNAC4 抗体 (1/5000 希釈) を用いた Western Blot 解析結果を示し、下段が CBB 染色を行った結果を示す。

pBI221-OsNAC4-VN + pBI221-OsNAC3-VC

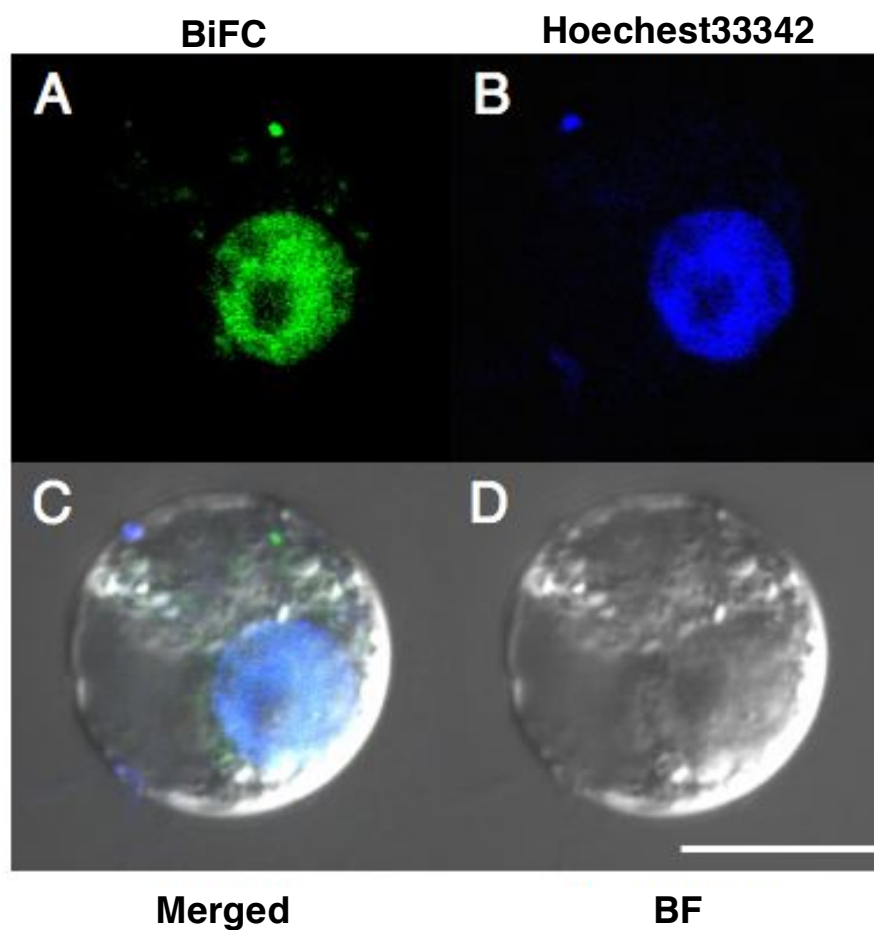


Fig. 1-30

イネ細胞内における OsNAC4 と OsNAC3 の相互作用の BiFC による解析

イネ培養細胞から単離したイネプロトプラストに、*pBI221-OsNAC4-VN*、*pBI221-OsNAC3-VC*を同時導入して7時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(A) BiFC 由来蛍光の画像を示す。(B) Hoechst33342 の蛍光画像を示す。(C) Merge した画像を示す。(D) 明視野の画像を示す。Bar = 10 μ m。BF : Bright field.

pBI221-OsNAC3domain-Venus

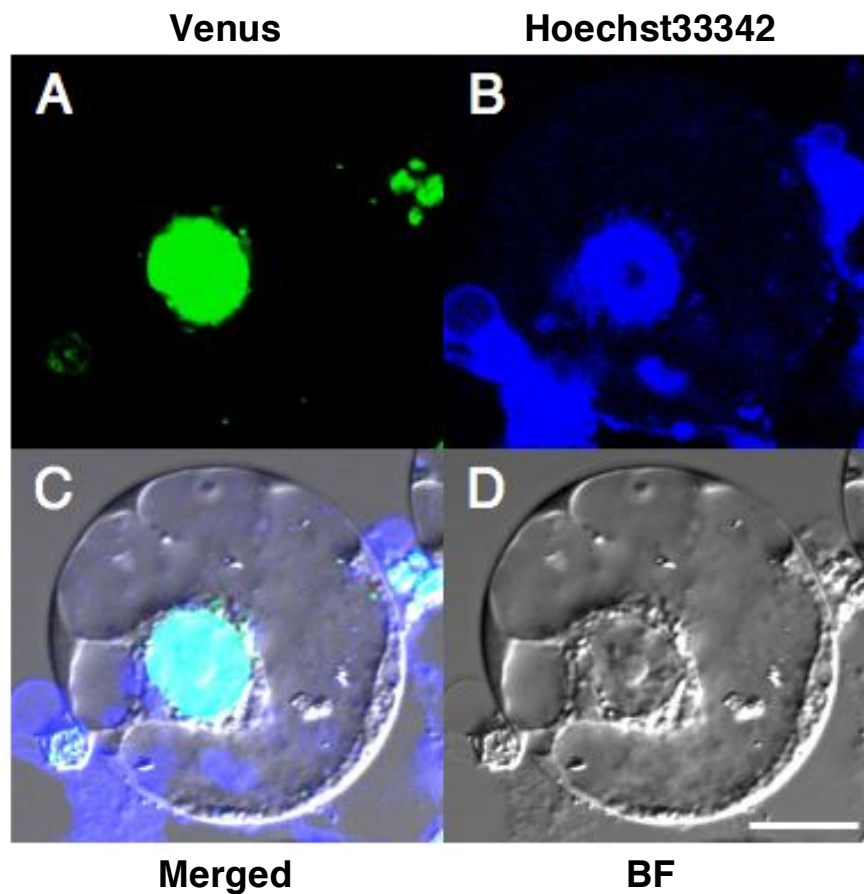


Fig. 1-31

OsNAC3domain-Venus のイネ細胞内における局在

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pBI221-OsNAC3daomin-Venus* を導入し、導入して7時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(A) Venus 蛍光画像を示す。(B) Hoechst33342 の蛍光画像を示す。(C) Merge した画像を示す。(D) 明視野の画像を示す。Bar = 10 μ m。BF : Bright field.

pBI221-OsNAC4domain-Venus

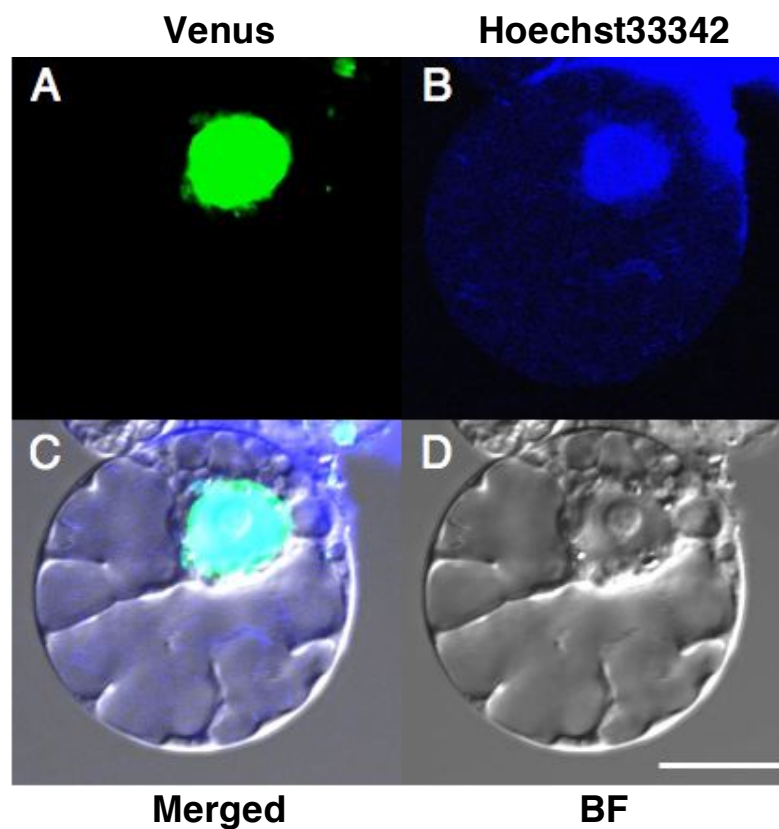


Fig. 1-32

OsNAC4domain-Venus のイネ細胞内における局在

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pBI221-OsNAC4domain-Venus* を導入して7時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(A) Venus 蛍光画像を示す。(B) Hoechst33342 の蛍光画像を示す。(C) Merge した画像を示す。(D) 明視野の画像を示す。Bar = 10 μ m。BF : Bright field.

pBI221-OsNAC4domain-VN + pBI221-OsNAC3domain-VC

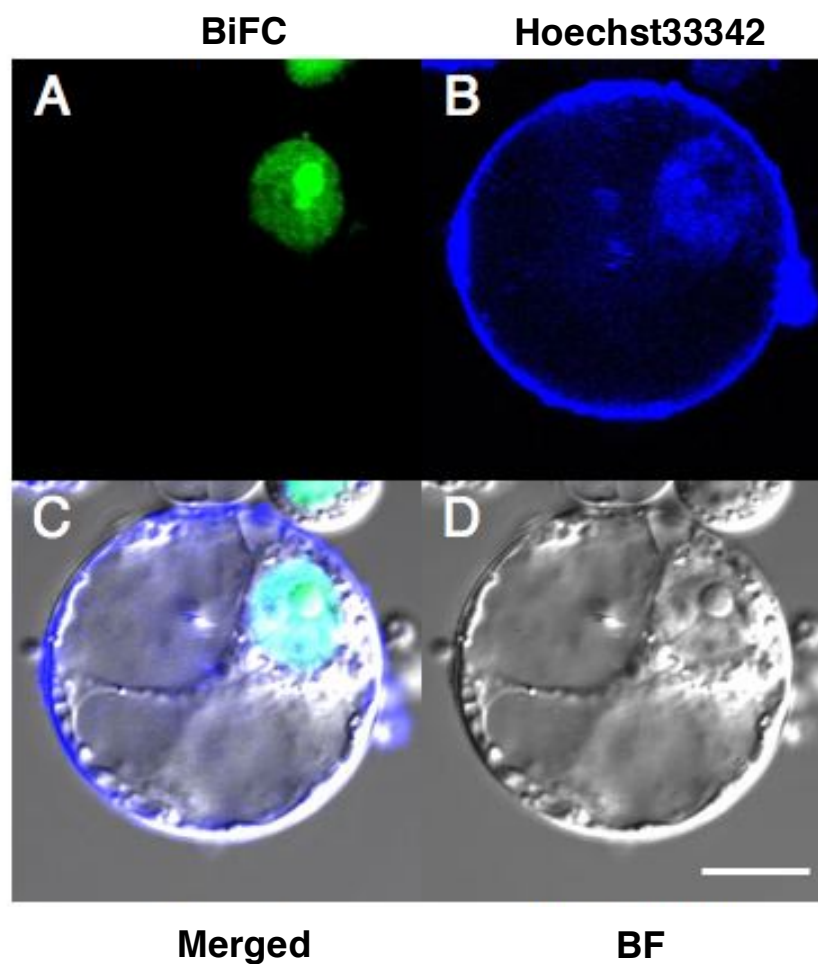


Fig. 1-33

BiFC 法による OsNAC4domain と OsNAC3domain 間の相互作用解析

イネ培養細胞から単離したプロトプラストに *pBI221-OsNAC4domain-VN* と *pBI221-OsNAC3domain-VC* を同時導入して7時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(A) BiFC 由来の蛍光画像を示す。(B) Hoechst33342 の蛍光画像を示す。(C) Merge した画像を示す。(D) 明視野の画像を示す。Bar = 10 μ m。BF : Bright field.

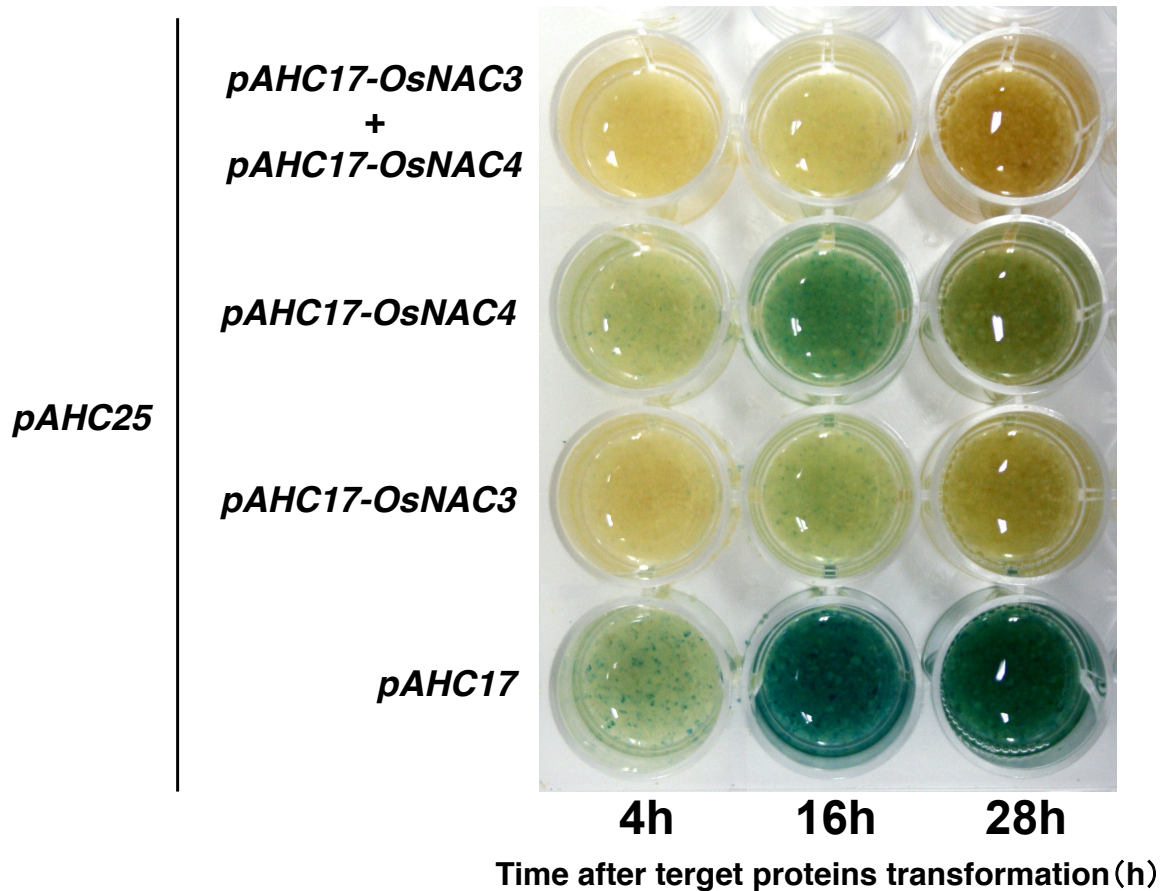


Fig. 1-34

OsNAC3 と OsNAC4 の一過的な過剰発現によって誘導される細胞死の GUS 活性を指標とした測定

GUS 発現ベクター (*uidA*) と空ベクター (Vector control)、OsNAC3 タンパク質発現ベクター (OsNAC3)、OsNAC4 タンパク質発現ベクター (OsNAC4)、をそれぞれイネ培養細胞に共導入して 4 時間、16 時間、28 時間後の GUS 活性を測定した。

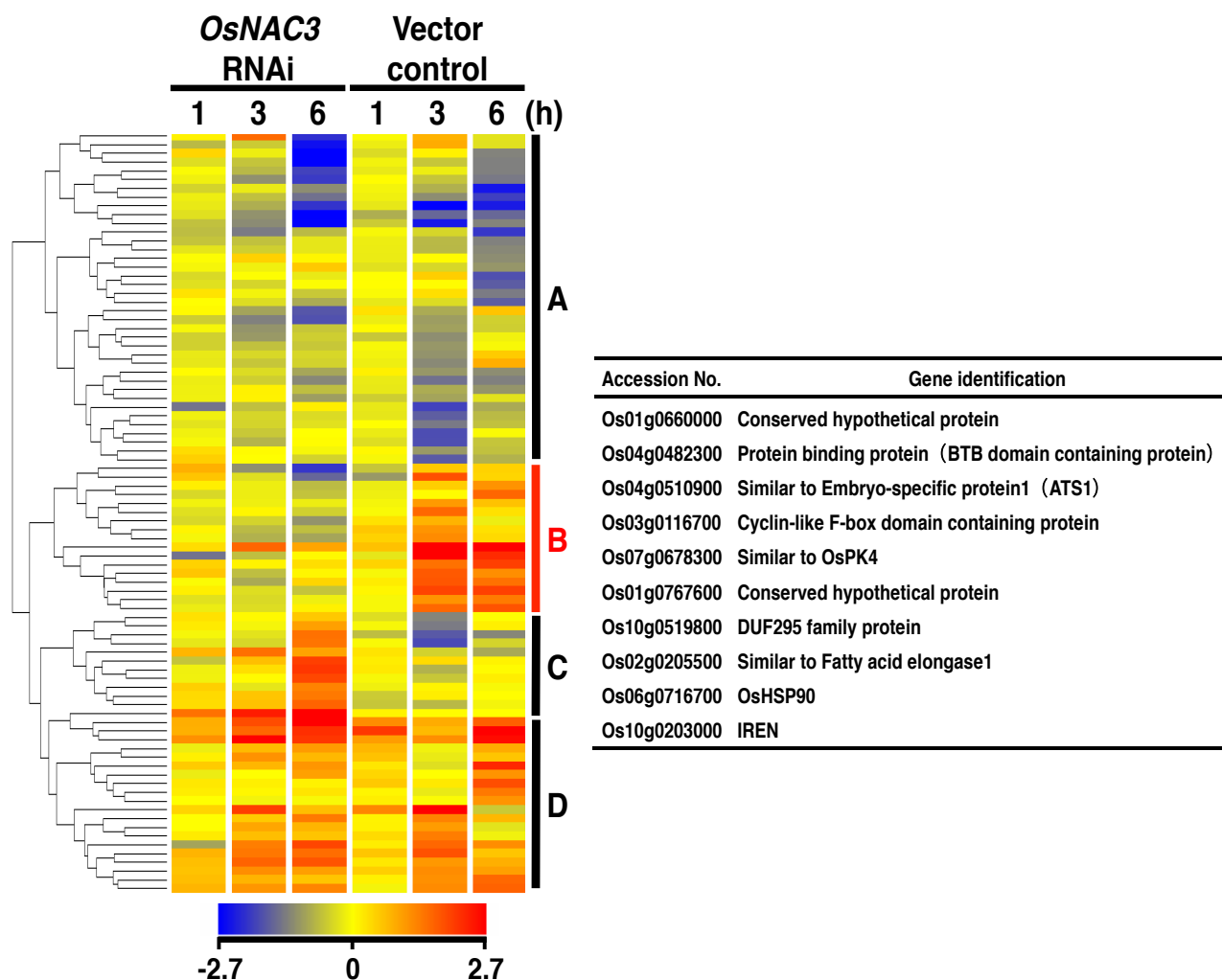


Fig. 1-35

OsNAC3 RNAi ノックダウン形質転換体に *A. avenae* N1141 菌株を接種したときに発現誘導される遺伝子のイネオリゴマイクロアレイを用いた解析

(左) *A. avenae* N1141 菌株を接種した *OsNAC3* ノックダウン形質転換体における *OsNAC4* の下流で制御されていることが明らかになっている 139 遺伝子の発現パターンのヒートマップ。(右) クラスターB にカテゴライズされた遺伝子。

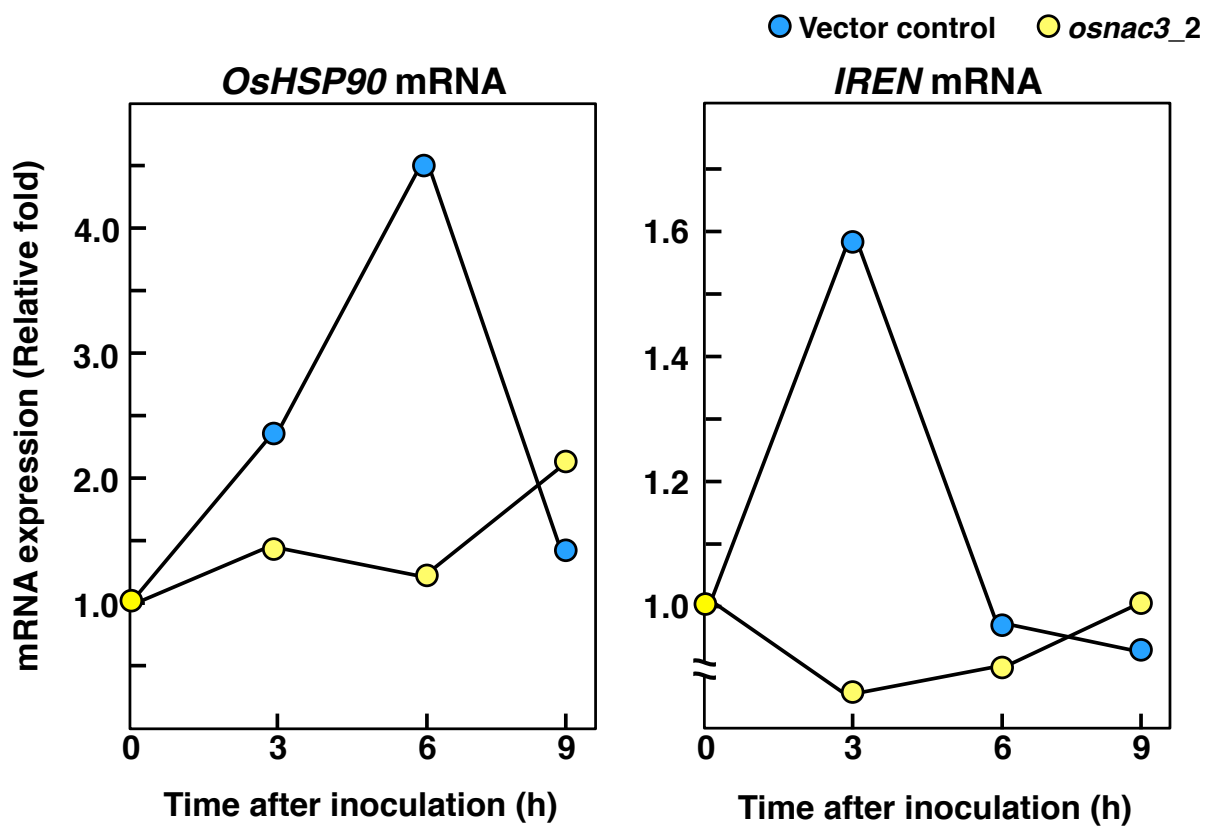


Fig. 1-36

A. avenae N1141 を接種した *OsNAC3* RNAi ノックダウン形質転換体における *OsHSP90* と *IREN* の発現パターン

OsNAC3 RNAi ノックダウン形質転換体に *A. avenae* N1141 菌株を 1×10^8 cfu/mL 接種し、接種後 0、3、6、9 時間の細胞から抽出した total RNA を用いて real-time RT-PCR で *OsHSP90* と *IREN* の発現パターンを解析した。

第 1 章

考察

本研究において、OsNAC4 が敏感細胞死誘導時に細胞内のどこに存在しているかを調べたところ、核に局在していることが示され、また、OsNAC4 の核への移行は OsNAC4 がリン酸化されることで開始されることも明らかになった。これまでも、植物の転写因子の核移行がリン酸化によって制御されている例が報告されている。タバコにおいて、ジベレリン合成酵素遺伝子の発現を制御する bZIP 型転写調節因子である RSG は 114 番目の Ser 残基がカルシウム依存性タンパク質キナーゼである CDPK1 によってリン酸化されることで 14-3-3 と呼ばれる真核生物に広く存在する制御因子によって認識され核へ移行される (Ishida et al., 2008、Yoshida et al., 2008)。転写因子のリン酸化は核移行だけでなく、転写活性自体も制御する場合は報告されている。病原菌感染時にダイズで発現する防御遺伝子の一つである *chalcone synthase* (*chs15*) の転写を制御する因子である G/HBF-1 (G-box/H-box binding factor1) はリン酸化されると *chs15* の cis 領域に結合できるようになる。この G/HBF-1 は bZIP タイプの転写因子で、やはり CDPK によりリン酸化される。イネには 29 種の OsCPK が存在しており、そのうちの 6 個が N1141 菌株接種後、特異的に発現誘導されることが明らかとなっている (Fujiwara et al., 2003)。このことから、OsNAC4 も OsCPK のどれかによってリン酸化される可能性が示唆される。イネの OsCPK と OsNAC4 や OsNAC3 との BiFC 法等を用いた相互作用実験や発現タンパク質を用いた実際のリン酸化実験により、OsCPK と OsNAC との関係が明らかになるものと思われる。

タンパク質がリン酸化された後、どのようなメカニズムで核に移行するかについて、興味深い報告がある。動物細胞における免疫応答の制御に関与する転写因子 NF- κ B は、通常時は細胞質で I κ B α と相互作用することで自身が持つ NLS (Nuclear Localization Signal) 領域がマスクされた状態で存在している。しかし、病原菌関連分子パターン (PAMPs) などの認識により細胞内にシグナルが伝達されると、I κ B α の 32 番目と 36 番目のセリン残基が IKK- β によってリン酸化され、さらに、SCF ユビキチンリガーゼ複合体によって、ポリユビキチン化されることにより、26S プロテアソーム系で分解される。これにより、NF- κ B から I κ B α が遊離し、NF- κ B の核移行シグナル NLS が露出されることで、NLS 領域に importin α が結合できるようになり、核へ移行される (Hayden, M.S. et al., 2004、Lätzer J et al., 2006)。OsNAC4 もリン酸化されることで、結合しているタンパク質から離れ、これまでマスクされていた NLS 領域が露出されることで、核に移

行する可能性が考えられる。事実、OsNAC4 には 2 つの NLS 領域 (Thr⁸³~Arg⁹⁵、Ile¹²²~Lys¹³⁸) が存在し、OsNAC4 の核移行にはこの両方の NLS が必要であることが本研究で明らかになっている。これまで OsNAC4 と相互作用し 2 つの NLS をマスクするような細胞質タンパク質については知られていないが、酵母 two-hybrid 法により OsNAC4 と結合する細胞質タンパク質がいくつか明らかになっている。このことから、OsNAC4 が通常時はこれら細胞質タンパク質と相互作用しているが、OsNAC4 がリン酸化されるとこれらタンパク質から遊離し 2 つの NLS が露出することで核に移行し、核内で再度 OsNAC3 と相互作用して様々な遺伝子の転写を制御している可能性が考えられる。これら細胞質タンパク質との相互作用確認やリン酸化との関係について今後調べる必要があるだろう。

NAC 遺伝子ファミリーは植物特有の転写因子の大きなグループのひとつであり、そのグループに属する NAC 遺伝子は浸透圧ストレスなどの非生物学的ストレスや生物学的ストレス、そして、さまざま発生プロセスに関与することが知られている (Cenci et al., 2013)。現在、NAC 遺伝子は推定のもも含めて少なくともイネに 151 個、シロイヌナズナでは 117 個存在していることが明らかとなっている (Nuruzzan et al., 2010)。NAC ファミリーは N 末端側に NAM や NAC domain といった高度に保存された領域をもち、この領域は核局在や DNA との結合、タンパク質間相互作用に関係していることが報告されている (Olsen et al., 2005)。特に、シロイヌナズナの ANA019 に存在する NAC domain はこの転写因子が発現制御する遺伝子のプロモーター領域に結合することが X 線結晶構造解析により明らかになっている (Ernst et al., 2004)。本研究によって過敏感細胞死誘導に関与することが明らかになった OsNAC4 は ANA019 と同じ SNAC グループに属しており、また OsNAC4 と相互作用することが示された OsNAC3 や OsNAC6 も同じ SNAC グループに属している (Nuruzzan et al., 2010, Fig. 1-16)。興味深いことに、OsNAC3 と OsNAC4 は SNAC グループの中でも、OsNAC3 サブグループに分類されるが OsNAC6 は他のサブグループに分類される。OsNAC3 サブグループに分類される OsNAC4 と OsNAC3 は共に過敏感細胞死誘導に関与するが、他のサブグループに分類される OsNAC6 は過敏感細胞死を誘導しない。OsNAC3 サブグループには他に SNAC1 が含まれており、SNAC1 もまた過敏感細胞死に関与する可能性がある。また、この OsNAC3 サブグループは単子葉植物の遺伝子だけで構成されている。このことから、OsNAC4 と OsNAC3 を介した過敏感細胞死誘導は単子葉植物に特異的に存在するシステムである可能性が示唆される。

OsNAC4 と相互作用するイネタンパク質を酵母 two-hybrid 法で解析したところ、OsNAC3 や OsNAC6 以外にもいくつかのタンパク質が同定された (Table. 1)。C2domain

containing protein は線虫の微小管の中心小体の形成にかかわるタンパク質として同定されている (Tobel et al., 2014) が、植物での機能は明らかになっていない。Helicase, C-terminal domain containing protein は DNA の二重らせん構造をほどくヘリカーゼの C 末端に存在するドメインを持つタンパク質であるが、このタンパク質自体が何をやっているのかについては全くわかっていない。Peptidase ファミリー M24 に属しているメチオニンアミノペプチダーゼは、膜結合型酵素であり、L-メチオニンの分解酵素である。また、Cyanate hydratase は細菌由来のシステインプロテアーゼであるアルギニンやリジン特異的ジンジパインに対して抑制活性を示し、ポルフィロモナスの生育を抑制する働きをもつことが報告されている (Taiyoji et al., 2009)。この様に、今回 OsNAC4 と相互作用することが明らかとなったタンパク質の多くが過敏感細胞死と関係するかどうかについてはその構造からはうかがい知ることができない。今後、これらタンパク質が実際にイネ細胞内で OsNAC4 と相互作用するかどうかについて BiFC 法等を用いて明らかにする必要があるであろう。

植物の転写因子の中で最も良く研究されているのが bZIP (basic leucine zipper) 型の転写因子である。この転写因子は、イネでは 97 個、シロイヌナズナでは 77 個存在しており、強光ストレスや病害応答、種子成熟、花形成などを制御している (Correa et al., 2008)。典型的な bZIP は分子内に 40-80 アミノ酸からなる保存されたドメイン (bZIP domain) を特徴として持っている。このドメインは DNA と結合する領域と転写因子同士の相互作用に重要なロイシンジッパー領域の 2 種類の領域で構成されている。シロイヌナズナでの bZIP はその相同性から 13 グループに分類される。これらの中で、グループ C に分類される AtbZIP10 はグループ S に分類される AtBZIP53 とヘテロダイマーを形成し、ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) と相互作用することにより、転写活性化能が上昇することが報告されている (Rosario A et al., 2009)。本研究で OsNAC4 は別のサブグループである OsNAC6 と相互作用することが示された。一方、OsNAC6 は、過敏感細胞死誘導には関与しないことも示されている。OsNAC4 と OsNAC6 の相互作用の意味については今のところ明らかではないが、過敏感細胞死以外の現象に関与する可能性もあると考える。

イネの *OsLEA3* の転写を制御する OsNAC5 は 1~172 アミノ酸残基の部分に DNA 結合活性が存在することが報告されている。さらに、OsNAC5 の *OsLEA3* のプロモーター結合領域を探索した結果、*OsLEA3* の転写開始点から上流 -56 から -85 までの領域に OsNAC5 が結合することが示された。この領域には、アブシシン酸によって誘導される多くの遺伝子のプロモーター領域に存在する ABRE 塩基配列 (ACGTGG/TG) が含まれていたが、NAC 転写因子の DNA 結合領域と考えられている NACRS (CACG) は含ま

れていなかった (Takasaki H et al., 2010)。このことから、OsNAC4 や OsNAC3 も NACRS 領域とは別の領域に結合する可能性もあると考える。現在のところ、OsNAC3 と OsNAC4 が結合する DNA 領域に関しては知見が得られていない。本研究によって、OsNAC4 や OsNAC3 の下流で発現制御されている遺伝子がいくつか同定されている。今後は、これら遺伝子の上流に存在する共通配列やこの部分への結合能を解析することで、OsNAC3 と OsNAC4 の DNA 認識配列を特定し、OsNAC4 と OsNAC3 による各遺伝子の発現制御機構の詳細を明らかにする必要があると考える。

第 2 章 新規エンドヌクレアーゼ **IREN** の同定と過敏感細胞死 特異的な核 **DNA** 断片化への関与

第2章 新規エンドヌクレアーゼ IREN の同定と過敏感細胞死特異的な核 DNA 断片化への関与

緒言

前章では *A. avenae* N1141 菌株による過敏感細胞死の誘導には OsNAC4 だけでなく同じサブファミリーに属する OsNAC3 が必要であることが明らかになった。*A. avenae* N1141 菌株を接種したイネにおいては、過敏感細胞死の早い段階で核 DNA が 180bp のヌクレオソーム単位で断片化するので、その断片を電気泳動したときに階段状（核 DNA のラダー化）になることが明らかになっている（Tanaka et al., 2001）。この様な核 DNA のラダー化は同じプログラム細胞死の一つである動物のアポトーシスなどでも認められており、この DNA ラダー化の実行因子であるいくつかのヌクレアーゼに関する知見も得られている。例えば、マウスのリンパ腫細胞では、カスパーゼが活性化するデオキシリボヌクレアーゼ（CAD）とその阻害タンパク質（ICAD）の複合体がカスパーゼ-3 によって分解されることにより DNA の断片化が引き起こされることが報告されている（Enari et al., 1998）。また、マウス由来の線維芽細胞では、ミトコンドリアから始まるカスパーゼカスケードとは別のアポトーシス経路において、ミトコンドリアに特異的に見られるエンドヌクレアーゼ G（EndoG）が、アポトーシス誘導時に核へ移行し、クロマチン DNA をヌクレオソーム単位に分解することが報告されている（Li et al., 2001）。このように、動物のアポトーシス誘導時に見られる核 DNA の断片化についての分子機構についてはいくつかの知見が得られているが、植物の過敏感細胞死特異的な核 DNA の断片化に関する知見は乏しく、この断片化を引き起こすヌクレアーゼも同定されていない。

OsNAC3 と OsNAC4 の RNAi ノックダウン形質転体をそれぞれ用いたマイクロアレイ解析によって、IREN (*Immune Related Endonuclease*) というエンドヌクレアーゼ様分子が OsNAC3 と OsNAC4 の下流で発現制御されていることが明らかになった。このことは、この IREN が過敏感細胞死特異的な核 DNA の断片化に関与している可能性を示している。そこで、本章では、イネの過敏感細胞死特異的な核 DNA の断片化に IREN が実行因子として機能しているのか、また、IREN がどのようにして核 DNA の断片化を引き起こしているのかなどについて酵素科学的、細胞生物学的、分子生物学的、生化学的手法を用いて明らかにすることにした。

第 2 章

材料と方法

1) 菌の保存と培養

Saccharomyces cerevisiae strains BY4743 (MATa/a *his3* Δ 1/*his3* Δ 1 *leu2* Δ 0/*leu2* Δ 0 *MET15/met5* Δ 0 *LYS2/lys2* Δ 0 *ura3* Δ 0/*ura3* Δ 0) は長浜バイオ大学の向 由起夫 准教授から分与していただいた。この菌株を YPAD 個体培地 (1% Yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 0.56 mM Adenine, 2% Agar) で 30°C、一晩培養し、得られた菌体のコロニーを YPAD 液体培地に植菌してさらに 30°C、一晩培養した。培養後、培養液 5ml に 2.1ml の滅菌した 50%グリセロールを加えよく攪拌し、50 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、液体窒素で瞬間凍結して -80°C で凍結保存した。

2) イネ培養細胞における細胞死の検出

イネ培養細胞における細胞死の検出には Evans blue を用いた色素染色法を用いた (Turner and Novacky, 1974)。 *A. avenae* N1141 菌株を 10^8 cfu/ml になるようにイネ培養細胞に接種し、108rpm、30°C、光照射下で振盪培養した。一定時間毎に液体培地 1ml をイネ培養細胞ごと 24 穴プレートに移し、液体培地を取り除いた後、細胞に 0.05% (w/v) Evans blue (SIGMA、USA) を加え 15 分間染色した。色素を取り除いた後、余剰色素を取り除くため純水で 3 回洗浄し、脱色液 (1% (w/v) SDS, 50% (w/v) Methanol) を 1ml 加えた。一晩静置した後、この脱色液の 595nm における吸光度を分光光度計 (Smart SpecTM Plus Spectrophotometer, Bio-RAD) を用いて測定し、細胞死を定量した。

3) ベクターの作製

IREN 抗体作製用の抗原タンパク質発現ベクターである His-tag 融合 IREN 発現用 IREN (128-466) -His \times 6/pET28b プラスミドと GST-tag を融合した IREN を発現する pGEX-6p-IREN プラスミドは以前報告されたものを使用した (日比野 修論 2011)。

一過的に IREN を抑制したイネ培養細胞を作製するためのベクターは、dsRNA をイネ細胞内で高効率に発現することができる *pANDAmmini* vector (Miki and Shimono, 2004)、(奈良先端科学技術大学院大学・島本功博士より分与) を用いて作製した。IREN の塩基配列情報を基に 5'-UTR 領域を含んだ N 末端領域をターゲット領域 (508bp; -113-395bp) として増幅させるプライマーセット (Forward primer は cDNA 断片を *pENTR/D-TOPO* と

ライゲーションするため CACC を付加した) を用いて、アクセッションナンバー AK100514 (IREN) のイネ完全長 cDNA (独立行政法人 農業生物資源研究所から分与) をテンプレートとして PCR を行った。アガロースゲル電気泳動により目的の cDNA 断片が増幅されていることを確認した後、pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、*pENTR/D-TOPO* へライゲーションし、大腸菌 DH5a へ形質転換した (*pENTR-IREN RNAi*)。

PCR 反応液		PCR 反応条件	
2×buffer for KOD-FX	7.5 µl	94℃	2 min
dNTP (2mM)	3 µl	*98℃	10 sec
Primer F (10 mM)	0.45 µl	*55℃	30 sec
Primer R (10mM)	0.45 µl	*68℃	1min
KOD-Fx polymerase	0.1 µl	68℃	7 min
Sterile Water	2.5 µl	4℃	∞
IREN cDNA (100 pg/ml)	1.0 µl	* (98℃→55℃→68℃) × 30 cycles	
Total vol.	15 µl		

作製した *pENTR-IREN RNAi* から LR クロナーゼ反応 (Invitrogen) により *IREN* の RNAi ターゲット領域である 508bp を double strands RNA 発現用 *pANDAmi* ベクターへ導入した (*pANDAmi-IREN*)。

TOPO [®] cloning 反応液		LR clonase 反応液	
PCR product	1 µl	<i>pENTR-IREN RNAi</i> (100 ng/ml)	1.5 µl
Salt solution	1 µl	<i>pANDAmi</i> (100ng/ml)	1.5 µl
Steril water	3.5 µl	TE buffer (pH8.0)	6 µl
<i>pENTR D-TOPO</i> (12.5ng 分)	0.5 µl	Total vol.	8 µl
Total vol	6 µl		

【Primer set】

Primer			Sequence
IREN RNAi	F	AK100514-56F	5'- CACCCAAATCGCAGCGACAGCAAG -3'
	R	AK100514-563R	5'- CCGTCTCCACGATTGTTGGT -3'

下線部は TOPO クローニングサイトを示す。

IREN の細胞内局在を調べるために、*Venus-fused IREN/pBI221* プラスミドと *Venus-fused NLS1-deleted IREN/pBI221*、*Venus-fused NLS2-deleted IREN/pBI221*、*Venus-fused NLS1,2-deleted IREN/pBI221* プラスミドを作製した。*Venus-fused IREN/pBI221* プラスミドは以前報告されたものを使用した (Kaneda et al., 2009)。まず、蛍光タンパク質である Venus と核移行シグナル (NLS1) を欠損させた IREN、または、核移行シグナル (NLS2) を欠損させた IREN それぞれとの融合タンパク質を発現するベクターを作製するために、pENTR-IREN (終始コドンを含まない：日比野、2011) をテンプレートとし、それぞれ、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℃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、PCR 産物を 16℃で 1 時間セルフライゲーションさせ、大腸菌 DH5a へ形質転換した (NLS1-deleted *IREN/pENTR*、NLS2-deleted *IREN/pENTR*、NLS1,2-deleted *IREN/pENTR*)。

Inverse PCR 反応液		Inverse PCR 反応条件	
2×buffer for iPCR	7.5 µl	94℃	2 min
2 mM dNTP	3 µl	*98℃	10 sec
Primer F (10 µM)	0.45 µl	*68℃	1min
Primer R (10 µM)	0.45 µl	68℃	7 min
KOD -plus-	0.1 µl	4℃	∞
Sterile Water	2.5 µl	* (98℃→68℃) × 30 cycles	
pBI221-IREN-Venus (100 pg/µl)	1.0 µl		
Total vol.	15 µl		

【Primer set】

NLS1-deleted IREN/pENTR	F	5' -CCCGGGAATTCTAGAAATGGCGAAGAAGCAGCGGA -3'
	R	5' -CGATGAATTAAGCTTCTAGGGGGTTCGAGGGGTG -3'
NLS2-deleted IREN/pENTR	F	5' -CCCGGGAATTCTAGAAATGGTGTCTGCACCACGTTCAAC -3'
	R	5' -CGATGAATTAAGCTTCTAGGGGGTTCGAGGGGTG -3'
NLS1,2-deleted IREN/pENTR	F	5' -CCCGGGAATTCTAGAAATGGCGAAGAAGCAGCGGA -3'
	R	5' -CGATGAATTAAGCTTCTAGGGGGTTCGAGGGGTG -3'

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

作製した NLS1-deleted *IREN/pENTR*、NLS2-deleted *IREN /pENTR*、NLS1,2-deleted *IREN/pENTR* を LR クロナーゼ反応 (Invitrogen) により *pBI221-Venus* ベクターへ導入した (*Venus-fused* NLS1-deleted *IREN/pBI221*、*Venus-fused* NLS2-deleted *IREN/pBI221*、*Venus-fused* NLS1,2-deleted *IREN/pBI221*)。

LR clonase 反応液

エントリーベクター (100 ng/ml) *	1.5 μ l
<i>pBI221-Venus</i> (100ng/ml)	1.5 μ l
TE buffer (pH8.0)	6 μ l
Total vol.	8 μ l

* NLS1-deleted *IREN/pENTR*、NLS2-deleted *IREN/pENTR*、NLS1,2-deleted *IREN/pENTR*

IREN の核移行が過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化を引き起こすのに重要かどうかを調べるための *pBI221-IREN*、*pBI221-NLS1,2-deleted IREN* を作製するために、*IREN/pENTR* (終始コドン含む) と NLS1,2-deleted *IREN/pENTR* (終始コドン含む) をそれぞれ LR clonase 反応によりインサートを植物細胞内発現用ベクターである *pBI221* ベクターへ導入した (*pBI221-IREN*、*pBI221-NLS1,2-deleted IREN*)。

LR clonase 反応液

エントリーベクター (100 ng/ml) *	1.5 μ l
<i>pBI221-Venus</i> (100ng/ml)	1.5 μ l
TE buffer (pH8.0)	6 μ l
Total vol.	8 μ l

**IREN/pENTR*、NLS1,2-deleted *IREN/pENTR*

酵母発現用ベクターである *pEG-IREN*、*pEG-IREN deletion NLS1,2* を作製するために、*pEG-IREN* は *pCR-Blunt-IREN* をテンプレートとし、*pEG-IREN deletion NLS1,2* は *NLS1,2-deleted IREN/pBI221* 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増幅した。*pEG* ベクターは *XbaI* と *HindIII* で制限酵素処理した。増幅した PCR 断片と制限酵素処理したベクターをスピニングカラムで精製し、In-Fusion cloning 反応 (In-Fusion HD Cloning Kit, Clontech Laboratories, Inc.) を行い大腸菌 DH5a へ形質転換した (*pEG-IREN*、*pEG-IREN deletion NLS1,2*)。

PCR 反応液		PCR 反応条件
2 × buffer for KOD-FX	25 µl	94°C 2 min
dNTP (2mM each)	10 µl	*98°C 10 sec
Primer F (10 mM)	1.5 µl	*55°C 30 sec
Primer R (10 mM)	1.5 µl	*68°C 1 min/kbp
KOD-FX polymerase	1 µl	4°C ∞
Sterile Water	10 µl	
Plasmid template (100 pg/ml)	1 µl	* (98°C→55°C→68°C) × 30 cycles
Total vol.	50 µl	

【Primer set】

<i>pEG-IREN</i>	F	F 5' -CCCGGGAATTCTAGAAATGGCGAAGAAGCAGCGGA -3'
	R	R 5' -CGATGAATTAAGCTTCTAGGGGGTTCGAGGGGTG -3'
<i>pEG-IREN deletion NLS1,2</i>	F	F 5' -CCCGGGAATTCTAGAAATGGTGTCTGCACCACGTTCAAC -3'
	R	R 5' -CGATGAATTAAGCTTCTAGGGGGTTCGAGGGGTG -3'

In-Fusion cloning 反応液		制限酵素反応液	
5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µl	XbaI	1.5 µl
線状化ベクター	X µl	HindIII	1.5 µl
精製済 PCR 断片	Y µl	10×M buffer	1.5 µl
Up to 10 µl		Plasmid	6 µg 分
50°C 15 min インキュベーション		Up to 50 µl	
		37°C 3h インキュベーション	

4) 核 DNA のラダー化検出

A. avenae N1141 菌株 (10^8 cfu/mL) をイネ培養細胞に接種し、接種して 0、6、12 時間後の細胞を回収し、50 mM Hepes-KOH (pH 7.2) で 2 回洗浄後、液体窒素で瞬間凍結した。これらのサンプルに DNA 抽出バッファー (2% (w/v)) hexadecyl triethyl ammonium bromide (CTAB)、1.4 M NaCl、0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM EDTA and 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone-30) を 500 μ l 加え、65°C、10 分間インキュベートした。常温にまでサンプルを冷まし、そこへ 3 M 酢酸ナトリウムを 60 μ l 加え、DNA 抽出バッファーと等量の CIA を加え、5 分間シーソーシェーカーで緩やかに混合した。その後、室温で 12,000g、5 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml エッペンチューブに移した。そこへ、サンプル溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、さらに、4°C で 12,000g、5 分間遠心し、上清を除去した後、70%冷エタノールを 800 μ l 加え遠心し、得られたペレットを洗浄し、減圧乾燥させた。乾燥後、0.5 mL Tris-EDTA (TE) buffer を加え、ペレットを溶解後、100 μ g/ml RNase A を添加し 37°C で 30 分間 RNA 消化処理を行った。30 分後、3 M 酢酸ナトリウムを 60 μ l 加え、等量のフェノール/クロホルム溶液を加え混合後、室温で、12,000g、5 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml エッペンチューブに移した。そこへ得られた上清と等量のイソプロピルアルコールを加え、5 分間室温で静置後、-20°C で 15 分間インキュベートした。15 分後、4°C、12,000g、1 秒間遠心して、大きいサイズの DNA を沈殿させた。上清を新しい 1.5 ml エッペンチューブに移し、12,000g、15 分間遠心分離した後、70%冷エタノールで洗浄し、得られたペレットを TE buffer に溶解し、この溶液の 260 nm と 280 nm における吸光度を分光光度計により測定することで DNA の濃度定量と純度を確認した。得られた DNA 10 μ g を 2% (w/v) アガロースゲルにアプライし、電気泳動を行った後、終濃度 0.5 μ g/mL ethidium bromide で DNA を染色後、ATTO CCD camera system (Tokyo, Japan) を用いて写真を撮影した。

5) 定量的リアルタイム RT-PCR を用いた IREN の発現量解析

A. avenae N1141 菌株 (10^8 cfu/mL) をイネ培養細胞に接種し、0、1、3、6 時間後の細胞 100 mg を回収し培地を除去後、液体窒素で瞬間凍結した。RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、回収した細胞から total RNA を抽出し、QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) に従って qRT-PCR を行い、IREN の mRNA 発現量解析を行った。SYBR Green 由来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。使用した primer セットは以下に示す。また、補正

には *18S rRNA* 遺伝子を使用した (Jain et al., 2006)。

qRT-PCR 反応液		qRT-PCR 反応条件	
2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl	50°C	30 min
Primer F	1 µl	95°C	15 min
Primer R	1 µl	*95°C	15 sec
QuantiTect RT Mix	0.2 µl	*55°C	30 sec
Nuclease-Free water	6.8 µl	*72°C	1 min
Total RNA (100 ng/ml)	1 µl	72°C	10 min
Total vol.	20 µl	* (95°C→55°C→72°C) × 40 cycles 65°C 1 min	

【Primer set】

<i>IREN</i>	F	F 5'-CTGCCAGGCACTTTGTCAGT-3
	R	R 5'-TCTTGGCTGCAGCATGTAGG-3'
<i>18S rRNA</i>	F	F 5'-CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3'
	R	R 5'-ACACTTCACCGGACCATTCAA-3'

6) In-gel ヌクレアーゼ活性測定

核と細胞質の画分は Plant Nuclei Isolation/Extraction kit (SIGMA) を用いて以下の方法で調整した。*A. avenae* N1141 菌株 (10^8 cfu/mL) をイネ培養細胞に接種し、接種して 0、3、6、9 時間後の細胞をそれぞれ回収し、培地を除去後、液体窒素で凍結させた。凍結させたイネ培養細胞の重量を測定した後、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉末状になるまで磨り潰した。粉末状にした培養細胞を 1.5 ml エッペンチューブに移し、NIBA buffer (NIB buffer 2.5ml protease inhibitor cocktail : SIGMA) 25 µl を 3 ml/g になるように加え、懸濁した後、4°C、1,200g で 10 分間遠心分離し、上清を細胞質画分とした。ペレットに 1×NIBA buffer を 500 µl 加えて再懸濁し、10% TritonX-100 を終濃度が 0.4% になるように加えた。4°C、1,200g で 10 分間遠心分離後、上清を除去し、このペレットの 2/3 量の Extraction buffer を加えて再懸濁後、4°C で 30 分間ボルテックスを行った。これを 4°C、1200g で 10 分間遠心分離し、上清を核画分として回収した。回収した細胞質画分と核画分は液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。この一連の作業はコントロールである水を接種したイネ培養細胞の場合も同様に行い、核画分と細胞質画分を得た。得ら

れたそれぞれの核画分と細胞質画分のタンパク質を Microplate BCA protein assay kit-Reducing Agent Compatible (Pierce) を用いて定量した。Standard control (それぞれの画分の Extraction buffer から DTT を除いたもの)、Sample Control (それぞれの画分の Extraction buffer を使用)、Protein Standard (Standard Control を使用)、Sample をマイクロプレートウェルの中央に 9 μ l ずつ添加した後、それぞれに 4 μ l の Compatibility Reagent Solution を加えた。プレートに蓋をして、プレートシェーカーにて 1 分間混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。それぞれのウェルに 260 μ l BCA working Reagent を加え、プレートに蓋をして、プレートシェーカーで 1 分間混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。室温まで冷ました後、OD₅₉₅ を測定した。Protein Standard は、BSA の希釈系列 2 mg/ml、1.5 mg/ml、1.0 mg/ml、0.75 mg/ml、0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0.125 mg/ml を用いた。それぞれの吸光度の値から、Standard Control の吸光度の値を差し引いた値を Protein Standard、Sample Control、Sample とした。Protein Standard から検量線を作成し、Sample から Sample Control を引いた値からタンパク質濃度を算出した。*A. avenae* N1141 菌株接種して 9 時間後のイネ培養細胞から単離した核画分を 50 μ g 使用し、5 \times SDS buffer (-DTT) と 4:1 になるように混合した。DNA を含む 10% running gel のアクリルアミドゲル用にそれぞれのサンプルをアプライし、100V、500 mA、200 W、4°C にて SDS-PAGE を行った。その後、500 ml の 10 mM Tris-HCl (pH7.8) にゲルを入れ、50°C で 1 時間放置することで SDS を除いた。次に、500 ml の 10 mM Tris-HCl (pH7.8) にゲルを入れ、4°C で一昼夜放置し、リフォールディングさせた。そして、200 ml の反応バッファー1 (50 mM Tris-HCl (pH7.0)、2 mM MgCl₂ \cdot 6H₂O、2 mM CaCl₂ \cdot 2H₂O)、反応バッファー2 (50 mM Tris-HCl (pH7.0)) にそれぞれゲルを入れ、37°C で 48 時間反応させた後、終濃度が 0.5 μ g/ml の EtBr で DNA を染色後、トランスイルミネーターで検出した。

7) 酵母への酢酸リチウム法による遺伝子導入

2 ml の YPD 液体培地 (2% (w/v) グルコース、2% (w/v) peptone、1% (w/v) yeast extract) に酵母を植菌し、30°C で一晚培養した (前培養)。5 ml の YPD に終濃度が 2% になるように前培養液を植菌し、OD₆₀₀=1 \pm 0.2 (2×10^7 cells/ml) になるまで 30°C で培養を行った (本培養)。滅菌チューブに本培養液を移し、400g、5 分間遠心分離し菌体を回収した後、菌体に約 5 ml の滅菌水を加え懸濁し、400g、5 分間遠心分離し菌体を洗浄した。菌体に 100 mM LiAc を 500 ml 加え懸濁後、17,800g、10 秒間遠心分離しデカントで上清を除去した。得られた菌体に、50% PEG 240 ml \rightarrow 1.0 M LiAc 36 μ l \rightarrow キャリアーDNA (2.0 mg/ml) 25 μ l \rightarrow 導入プラスミド 100 ng を順番に加え vortex で混合し、30°C、30 分間振

盪培養した後、42℃、20 分間ヒートショックを行い、17,800g、10 秒間遠心分離し上清を除去した。菌体を滅菌水 50 μ l で懸濁し、全量をプレーティングし 30℃で 2-3 日培養した。

8) リコンビナント IREN タンパク質 (GST-IREN) の発現と精製

作製した GST-IREN 発現ベクターGST-IREN/pGEX-6P-3 を導入した BL21 (DE3) 株を LB 液体培地 2 ml に植菌し、37℃で一晩振盪培養した。LB 液体培地 1L にその 1/2000 量の前培養液を加え、OD₆₀₀ が 0.6 付近になるまで 37℃で振盪培養した。OD₆₀₀ が 0.6 付近に達したら、終濃度が 0.1 mM となるように、100 mM IPTG を添加し、37℃で 3 時間振盪培養しタンパク質発現誘導を行った。発現誘導後、4℃、2,300g で 10 分間遠心分離を行い、菌体を回収した。その後、菌体を PBS (-) で洗浄し、再度遠心分離を行い、上清を取り除いた。洗浄した菌体に培養液の 1/50 量の binding buffer を加えて懸濁し、超音波破砕機により菌体を破砕した。破砕液を遠心分離し、上清を Binding buffer で平衡化した Glutathione sepharoseTM High performance 担体 (GE Healthcare) を用いてバッチ法で精製した。

9) IREN 抗体の作製

大腸菌 BL21 (DE3) に抗原となる IREN を発現するベクターである IREN (128-466)-His \times 6/pET28b をハナハン法で導入し、37℃で一晩培養した。前培養として、得られた形質転換体のコロニーを LB 液体培地 (50 μ g/ml kanamycin を含む) 2 ml に植菌し、37℃で一晩振盪培養した。LB 液体培地 (50 μ g/ml kanamycin を含む) 1L にその 1/2000 量の前培養液を加え、OD₆₀₀ が 0.6 付近になるまで 37℃で振盪培養した。OD₆₀₀ が 0.6 付近に達したら、終濃度が 0.1 mM となるように、100 mM IPTG を添加し、37℃で 3 時間振盪培養しタンパク質の発現誘導を行った。このとき発現確認用に IPTG を加えない大腸菌も用意した。培養後、2,300g で 10 分間遠心分離を行い、回収した菌体を Lysis buffer (NaH₂PO₄ \cdot 2H₂O、NaCl、Imidazole、pH8.0) 25 ml で懸濁し、2,300g で 10 分間遠心分離した後、再度 Lysis buffer 25 ml で懸濁した。菌体懸濁液を超音波破砕機 (ULTRASONIC DISRUPTOR UD201、TOMY 社) を用いて氷上で破砕 10 秒、冷却 20 秒を 20 サイクル行うことで菌体を破砕し、菌体破砕液を 4℃、10,000g、60 分間遠心分離し、上清を新しいファルコンチューブに移し、ペレットに上清と等量の Lysis buffer に再懸濁した。上清とペレットを等量の 2 \times sample buffer で混合して 95℃で 5 分間熱処理後、氷上に 20 秒間静置したものを 12.5%アクリルアミドゲルにアプライし、SDS-PAGE を行った。また、タンパク質分子量マーカーとして Low range (SP-0110) (APRO 社) を使用した。

泳動終了後、ゲルを CBB 染色 (CBB-R250、Methanol、Acetic acid) することでリコンビナント抗原 IREN タンパク質の発現を確認した。抗原 IREN タンパク質は封入体としてペレットに存在していたことから、菌体破砕液を 4℃、10,000g、60 分間遠心分離し、そのペレットに 20 ml の封入体洗浄液 (0.5% Triton X-100、1 mM EDTA) を加えて懸濁し、4℃、2,300g で 10 分間遠心分離を行い、上清を除いた。この操作を 3 回繰り返した後、残ったペレットに洗浄 buffer (100 mM NaH₂PO₄・2H₂O、10 mM Tris、2M Urea、pH8.0 (NaOH で調整)) を 20 ml 加えて懸濁し、同様に遠心分離し、上清を除いた。この操作を 3 回繰り返した後、ペレットに 5 ml の可溶化 buffer (100 mM NaH₂PO₄・2H₂O、10 mM Tris、6 M Urea、pH8.0 (NaOH で調整)) を加えてボルテックスで懸濁し、1 時間静置した。可溶化後、4℃、15,300g、30 分間遠心分離を行い、上清を新しいチューブに移した。可溶化の操作を数回繰り返して得られた可溶化上清を 12.5% のアクリルアミドゲルにアプライし、100V 定電圧で 120 分間 SDS-PAGE を行い、CBB 染色でバンドを検出することで、IREN (128-466) -His×6 が可溶化されているかを確認した。可溶化された IREN (128-466) -His×6 タンパク質を定量するため、BSA の標品を用いて調製したスタンダード溶液 (30 µg、20 µg、10 µg、5 µg、2.5 µg) と発現 IREN を同時に SDS-PAGE で分離し、CBB で染色後、バンドの濃淡を ImageJ で計測することによって発現 IREN を定量した。

抗原の投与から抗血清作製まではユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。免疫動物はウサギとし、初回は 0.15 mg を投与し、その後は 14 日間毎に 0.3 mg の投与を 5 回行い、初回免疫から 77 日後に全採決を行うスケジュールで抗体作製を行った。また、中間報告として、3 回目の投与 7 日後 (1st) と 4 回目の投与 7 日後 (2nd) に試験採決を行い、その時点での抗体価を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) によって測定した。

IREN 抗体を抗血清から精製するために、GST-IREN タンパク質を発現精製した。抗原 IREN タンパク質を発現誘導と同様に IPTG を添加後、25℃で 24 時間の静置培養することで、発現誘導を行った。発現誘導後、4℃、2300g で 10 分間遠心分離し、菌体を回収した。その後、菌体を培養液 1/20 量の Binding buffer (PBS; 140 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄、pH7.3) で懸濁し、4℃、2300g で 10 分間遠心分離を行い、菌体を洗浄した。この作業を 2 回繰り返した後、菌体に培養液の 1/50 量の Binding buffer を加えて懸濁し、破砕と遠心分離により、破砕上清を得た。破砕上清を 10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離後、一次抗体に TBST で 2000 倍希釈した GST 抗体 (rabbit-IgG、MBL) と 8000 倍希釈した IREN 抗血清をそれぞれ用いてウェスタンブロット解析を行った。発現確認後、菌体の破砕液を遠心して得られた上清を

Binding buffer で平衡化した Glutathione sepharoseTM High performance (GE Healthcare) 担体を用いてバッチ法で IREN タンパク質を精製した。また、タンパク質の定量には、Quick Start Bradford protein assay (Bio-RAD) を用いた。

精製した GST-IREN が含まれる溶出画分 (GST-IREN の総量 1.5 mg) を Amicon Ultra-4 10K (Millipore) に 3.5 ml 入れ、7,500g で 20 分間遠心させ、サンプルの液量が 500 ml になるまで濃縮した。10 ml の Coupling buffer (200 mM NaHCO₃、500 mM NaCl、pH8.3) で平衡化させた NAP-5TM columns (GE Healthcare) に、濃縮した GST-IREN 溶液 500 ml をアプライし、1 ml の Coupling buffer で溶出することで、GST-IREN の溶液を Coupling buffer に置換した。溶出液のタンパク質濃度は 0.65 mg/ml となり、これを IREN 抗体精製カラムの作製に用いるリガンド溶液とした。

IREN 抗体精製には、HiTrap NHS-activated HP column に GST-IREN をカップリングしたアフィニティークラムを使用した。抗血清を TBS (20 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl) で平衡化された上記のアフィニティークラムに添加し、TBS 10 ml で洗浄した後、3 ml の 0.1 M Glycine-HCl (pH2.5) によりカラムに吸着したタンパク質を溶出した。溶出後、直ちに 1 M Tris-HCl (pH9.5) を加えることで中和した。

10) IREN のイネ細胞内局在

(A) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析

第 1 章の「イネプロトプラストの単離と PEG 法による形質転換」の項に従って、イネプロトプラストを単離し、このプロトプラストに IREN 発現ベクターである *pBI221-IREN-Venus*、核移行シグナルを 1 カ所欠損させた IREN の発現ベクターである *pBI221-deleted NLS1 IREN-Venus*、*pBI221-deleted NLS2 IREN-Venus*、核移行シグナルを 2 カ所欠損させた IREN 発現ベクターである *pBI221-deleted NLS1,2 IREN-Venus* を導入した。遺伝子導入後、遮光 30℃で、6-8 時間培養後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、このとき、顕微鏡観察する 1 時間前に Hoechst 33342 を終濃度 20 mg/ml となるようにプロトプラストに処理した。

(B) ウェスタンブロットによる解析 (immunoblot)

第 2 章の「In-gel スクレアーゼ活性測定」の項にしたがって、*A. avenae* N1141 菌株と水処理したイネ培養細胞からそれぞれ核画分と細胞質画分を回収しタンパク質定量を行った。得られたそれぞれの画分 10 µg ずつを 10%アクリルアミドゲルにアプライし、100V 定電圧で 120 分間 SDS-PAGE で分離後、2000 倍希釈の IREN 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。タンパク質の検出には、ECL-plus を利用したケミルミネッセンスで検出した。また、このときのアプライ量を Silver Stain kit Wako (Wako) を

用いて銀染色を行うことにより確認した。

11) *IREN* の RNAi による抑制

pANDAmmini に *IREN* mRNA の 508 bp を組み込んだ *pANDAmminiIREN* ベクターをイネ培養細胞にパーティクルボンバードメント法を用いて導入した。導入後、R2S 液体培地に細胞を移し、24 時間、30℃、遮光で培養し、それをアッセイに用いた。

12) TUNEL 染色

(A) イネ培養細胞を用いた解析

第 1 章の「植物病原菌の保存と培養」の項に従って培養した *A. avenae* N1141 菌株を 10^8 cfu/ml になるようにイネ培養細胞に接種し、接種して 12 時間後にイネ培養細胞懸濁液 1ml を 24 穴プレートに回収し、培地を除去した。1×PBS で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド/PBS を 1ml 加え、一晩室温で固定した。固定したサンプルを一部エッペンドルフチューブにとり、1×PBS で 3 回洗浄した後、0.2% triton-100/PBS を 200 ml を加え、室温で 30 分間、透過処理を行った。30 分後、1×PBS で 3 回洗浄後、PCR チューブに移し DeadEnd Fluoromeric TUNEL system (Promega) に従って細胞を TUNEL 染色した。

(B) 酵母を用いた解析

第 2 章の「酵母への酢酸リチウム法による遺伝子導入」の項に従って得られた形質転換体を SC-Leu 液体培地 3 ml に植菌し、30℃で振盪培養した。OD₆₁₀ が 1.0 に達したところで、集菌して SG-Leu 液体培地で 2 回洗浄後、再度、SG-Leu 液体培地 3ml で懸濁し、12 時間培養し、タンパク質発現誘導した。12 時間後、培養液を 1ml 回収し、PBS で 3 回洗浄後、3.7% (v/v) ホルムアルデヒドで 1 時間固定した。PBS で 3 回洗浄し、Zymolyase 20 T (650 µg/ml, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を含む sorbitol buffer (35 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3), 1.2 M sorbitol, 0.5 mM MgCl₂) を 200 µl 加え、37℃、40 分間処理後、PBS で 3 回洗浄した。ProteinaseK (20 mg/ml ProteinaseK, 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM EDTA) を加え、37℃、1 時間処理し PBS で 3 回洗浄し、そこに、0.1% Triton X-100 (v/v) と 0.1% クエン酸 (w/v) を等量加え、氷上に 15 分間静置し透過処理を行った。処理後、PBS で 3 回洗浄し、DeadEnd Fluoromeric TUNEL system (Promega) を用いて TUNEL 染色を行った。染色後、DAPI (1 mg/ml DAPI, 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 0.25 M スクロース、1 mM EDTA、1mM MgCl₂、0.1 mM ZnSO₄、0.4 mM CaCl₂、0.05% 2-Mercaptoethanol) で DNA の断片化を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用い FITC 蛍光を観察した。また、観察にはスライドガラスに 0.1 mg/ml poly-L-Lysin でコーティング

してあるものを使用した。

13) *in vitro* nuclease activity assay による IREN のヌクレアーゼ活性の測定

リコンビナント IREN タンパク質と等量のコントロール溶出画分をそれぞれ基質である環状 *pBluescript* と下記のバッファー中で 30°C、遮光条件下で 16 時間反応させた。比較として、基質と滅菌水のための反応も行った。反応後、反応溶液 4 μ l (*pBluescript* 100 ng 分) を 1.25 %アガロースゲル電気泳動後、EtBr により DNA を染色し、トランスイルミネーターを用いて DNA を可視化した。

【*in-vitro* nuclease 反応液 (環状 *pBluescript*)】

組成	容量
5×buffer*	8 μ l
IREN 発現タンパク質	200 ng
環状 <i>pBluescript</i>	1 μ g
Sterile Water	40 μ l

*下記のカチオンが含まれるバッファーをそれぞれ使用。

【5×buffer Ca^{2+} 】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	7.4 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml

*0.22 μ m フィルターで滅菌

【5×buffer Mg^{2+} 】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Wako) 終濃度 10 mM	10.2 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml

*0.22 μ m フィルターで滅菌

【5×buffer Mn²⁺】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	9.9 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
*0.22 μm フィルターで滅菌	

【5×buffer Zn²⁺】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
ZnCl ₂ (Wako) 終濃度 20 mM	13.6 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
*0.22 μm フィルターで滅菌	

【5×buffer カチオン無】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
*0.22 μm フィルターで滅菌	

14) IREN の活性に必要なカチオンの探索

リコンビナント IREN タンパク質と、等量のコントロールの溶出画分をそれぞれ、基質である直鎖状 *pBluescript* と混ぜて 30℃、遮光下で、16 時間程度反応させた。この反応の際に、それぞれのカチオンを含む反応液を用いることで活性化に必要なカチオンを同定した。各レーンのバンドの黒化度を Image J (National Institutes of Health (NIH)) を用いて解析し、比較用反応液のバンドの分解率を 0%として、各レーンのバンドの分解率を算出し、グラフ化した。

【in-vitro nuclease 反応液（直鎖状）】

組成	容量
5×buffer	8 μl
IREN 発現タンパク質	200 ng
直鎖状 pBluescript (<i>EcoR</i> I 処理)	100 ng
Total vol.	40 μl

【比較用反応液（直鎖状）】

組成	容量
直鎖状 pBluescript (<i>EcoR</i> I 処理)	100 ng
Total vol.	40 μl

【5×buffer Ca²⁺ + Mg²⁺】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	22.2 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Wako) 終濃度 10 mM	7.4 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
* 0.22 mm フィルターで滅菌	

【5×buffer Ca²⁺ + Zn²⁺】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	22.2 mg
ZnCl ₂ (Wako) 終濃度 20 mM	13.6 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
* 0.22 mm フィルターで滅菌	

【5×buffer Mg²⁺ + Zn²⁺】

組成	容量
----	----

Tris (Wako)	151.4 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Wako) 終濃度 10 mM	7.4 mg
ZnCl ₂ (Wako) 終濃度 20 mM	13.6 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
*0.22 mm フィルターで滅菌	

【5×buffer Ca²⁺ +Mg²⁺+ Zn²⁺】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	22.2 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Wako) 終濃度 10 mM	7.4 mg
ZnCl ₂ (Wako) 終濃度 20 mM	13.6 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
*0.22 mm フィルターで滅菌	

【5×buffer Ca²⁺ + Mn²⁺】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	22.2 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	9.9 mg
Adjust pH to 7.0 using HCl	
Total vol.	5 ml
*0.22 mm フィルターで滅菌	

【5×buffer Ca²⁺ + Mn²⁺+ Zn²⁺】

組成	容量
Tris (Wako)	151.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	22.2 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	9.9 mg
ZnCl ₂ (Wako) 終濃度 20 mM	13.6 mg

Adjust pH to 7.0 using HCl

Total vol.	5 ml
------------	------

*0.22 mm フィルターで滅菌

【5×buffer $Mn^{2+} + Zn^{2+}$ 】

組成	容量
----	----

Tris (Wako)	151.4 mg
-------------	----------

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (nacalai tesque) 終濃度 10 mM	9.9 mg
---	--------

$ZnCl_2$ (Wako) 終濃度 20 mM	13.6 mg
---------------------------	---------

Adjust pH to 7.0 using HCl

Total vol.	5 ml
------------	------

*0.22 mm フィルターで滅菌

15) IREN の至適 pH 測定

Recombinant IREN タンパク質のヌクレアーゼ活性を測定するときに、各反応液の pH を 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 に調整したものを用いた。 Mn^{2+} は pH8.0 と 9.0 で、沈殿したため、 Mn^{2+} については pH 5.0、6.0、7.0 だけを用いた。

16) タバコへの IREN の一過的発現

(A) *N. benthamiana* の育成

N. benthamiana の種子を次亜塩素酸殺菌水溶液 (1%次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度 5%)、0.02% Tween20) 1 ml 中に浸し、ボルテックスで 10 分間攪拌した。その後、1 ml の滅菌水で 5 回洗浄し、溶液を除去後、500 μ l の 0.1%Agar 溶液を加えた MS 培地上に種子を 15 粒程播種し、人工気象器 (Biotron) 内で 22.0-23.0°C、光の強度 80 μ molm⁻²s⁻¹、明期 16 時間、暗期 8 時間で約 2 週間生育させた。播種から約 2 週間後、*N. benthamiana* を 10.5 cm ポットへ移植した。ポットは下から順に、赤玉土 (中粒: 琴印) を 1 cm 程度、スーパーミックス A (サカタのタネ) を 8 割程度、スーパーミックス A: バーミキュライト (ニッタイ株式会社) = 4 : 6 の割合で混合させたものを加えた。ポットには液体肥料 (HYPONeX: 株式会社ハイポネックスジャパン) を加えた水道水を散水し、2,000 Lux、温度は 25-26°C で栽培した。1 日 1 回水道水を与え、1 週間に 1 回液体肥料を与えた。

(B) *Agrobacterium* の *N. benthamiana* への接種

pMDC32-IREN ベクターをエレクトロポレーションにより *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

菌株へ導入した。*pMDC32-IREN* を保持した *Agrobacterium* を LB 培地 (25 mg/ml ハイグロマイシンと 25 mg/ml カナマイシンを含む) に植菌し、22℃暗黒下で培養後、2000g で集菌し、OD₆₀₀ が 0.5 になるように MMA (10 mM MES、10 mM MgCl₂、100 mM Acetsyringone、pH5.6) バッファーに懸濁し、室温で 2 時間インキュベーション後、*Agrobacterium* 懸濁液を *N. benthamiana* の葉にシリンジを当て浸潤させ、6 日後に観察した。

第 2 章

結果

1. *A. avenae* N1141 菌株を接種したイネ培養細胞で認められる核 DNA の断片化

イネに対して非病原性である *A. avenae* N1141 菌株をイネ培養細胞に接種すると過敏感細胞死が誘導される。そこでまず、実際に、*A. avenae* N1141 菌株接種することで過敏感細胞死を引き起こしたイネ培養細胞において核 DNA の断片化が誘導されているのか調べることにした。菌接種して 12 時間後のイネ培養細胞を固定した後、TUNEL 法によりゲノム DNA の切断によって生じる 3'-OH 突出末端を蛍光標識 (FITC) し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、N1141 菌株を接種したイネ培養細胞では核 DNA の断片化を示す FITC の強い蛍光が多く観察された (Fig. 2-1)。そこで、次にこの断片化がヌクレオソーム単位で起きているのかどうかを調べることにした。イネ培養細胞に水と *A. avenae* N1141 菌株をそれぞれ接種して 0、6、12 時間後のイネ培養細胞からゲノム DNA を単離し、アガロースゲル電気泳動で分離後、各 DNA 断片をエチジウムブロマイド染色により可視化した。その結果、N1141 菌株を接種して 6 時間後では DNA のラダー化は確認できなかったが、12 時間後のイネ細胞において 180bp のヌクレオソーム単位の DNA ラダー化が観察された (Fig. 2-2)。一方、水を接種したイネ培養細胞では接種して 12 時間後でもそのような DNA のラダー化は観察されなかった (Fig. 2-2)。

以上のように、*A. avenae* N1141 菌株を接種したイネ培養細胞において過敏感細胞死の特徴である核 DNA の断片化が認められ、この断片化によって DNA はヌクレオソーム単位で分解されていることが示された。

2. エンドヌクレアーゼとしての IREN の同定

次に、このような過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA 断片化の実行因子を同定することにした。まず、前章で、過敏感細胞死誘導に関与する *OsNAC3* の RNAi ノックダウン形質転換体を用いたマイクロアレイ解析データから、*OsNAC3* によって発現制御される遺伝子群中に DNA の分解に関与すると考えられるエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子 (AK100514) が一つ存在していることが明らかとなった。この遺伝子は以前、我々の研究で過敏感細胞死を正に制御する *OsNAC4* の下流で発現制御されていることも明らかになっている (Kaneda et al., 2007)。AK100514 の推定タンパク質は、全長 471 アミノ酸で構成されており、N 末端側に endonuclease-exonuclease-phosphatase (EEP)

domain を含み、C 末端側には Ca^{2+} 結合部位として知られている EF-hand モチーフを有している (Fig.2-3)。これまで、この遺伝子についての報告は無く、この遺伝子産物の機能についても全く知見が得られていない。そこで、この遺伝子を *IREN* (immune-related endonuclease) と名付け、その機能についての解析を試みることにした。

3. *IREN* の過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA 断片化への関与

過敏感細胞死の誘導を制御する *OsNAC3* と *OsNAC4* の RNAi ノックダウン形質転換体を用いたマイクロアレイ解析の結果から、エンドヌクレアーゼ分子をコードしている遺伝子 *IREN* が同定された。そこで、実際に *IREN* が過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化に関与しているのかを調べるために、イネ細胞内で *IREN* を一過的に過剰発現させ、核 DNA の断片化が誘導されるかどうかを TUNEL 法で調べた。この時、実際に *IREN* 遺伝子が発現している細胞を同定するため、*DsRed* 遺伝子 (*pAHC17-DsRed*) を *IREN* 遺伝子 (*pBI221-IREN*) と一緒に細胞内に導入し、導入 12 時間後に細胞を固定し TUNEL 反応を行った。そこで、*DsRed* の蛍光が観察される細胞において TUNEL 陽性を示し FITC の蛍光を持つ核が存在するかを共焦点レーザー顕微鏡で調べた。その結果、コントロールの *pAHC17-DsRed* と *pBI221* 空ベクターを導入した細胞においては、*DsRed* の蛍光が観察される細胞の中で FITC 蛍光を示す核を持つ細胞は一つも存在しなかった (Fig. 2-5, I-L)。一方、*pAHC17-DsRed* と *pBI221-IREN* を導入した細胞では、*DsRed* の蛍光が観察される細胞において FITC 蛍光を示す核を持つ細胞が複数認められ、*IREN* を過剰発現すると核 DNA が断片化することが確認された (Fig. 2-5, A-D)。そこで、次に、このような核 DNA の断片化が核 DNA のラダー化を引き起こした結果なのかを調べるため、イネプロトプラストに *pBI221-IREN*、*pBI221-OsNAC4* (ポジティブコントロール)、*pBI221 empty vector* (ネガティブコントロール) をそれぞれ導入し、導入 12 時間後のイネプロトプラストからゲノム DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動で分離した。その結果、*IREN* を過剰発現させたイネプロトプラストでは *OsNAC4* を過剰発現させた場合と同様に核 DNA のラダー化が観察された (Fig. 2-4)。一方、*pBI221 empty vector* を導入した細胞ではそのような核 DNA のラダー化が認められなかった (Fig. 2-4)。以上のことから、*IREN* をイネ細胞内で一過的に過剰発現させると、核 DNA がヌクレオソーム単位で急速に断片化されることが明らかとなった。

IREN が核 DNA 断片化を引き起こすことが明らかになったので、次に、*IREN* が実際の過敏感細胞死誘導時にも核 DNA の断片化の実行因子であるかを調べることにした。過敏感細胞死誘導時に *IREN* が実際に核 DNA 断片化に関与するなら、*IREN* が核に局在する必要があると考え、まず、*IREN* の細胞内局在について調べることにした。*IREN*

の Venus 融合タンパク質発現ベクター (*IREN-Venus/pBI221*) を作製しイネプロトプラストに導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、観察時には Hoechst33342 を用いて核を染色した。その結果、*IREN-Venus/pBI221* を導入したイネプロトプラストでは、核で Venus 蛍光が観察された (Fig. 2-6)。このことから、IREN-Venus タンパク質を細胞で一過的に発現させると、そのほとんどはイネ細胞の核内に局在することが明らかとなった。

次に、IREN の核局在が核 DNA の断片化を引き起こすのに重要であるかを調べることにした。これまでに報告されている核局在するタンパク質は核移行シグナル (NLS) を持つことが多数報告されていることから、IREN 分子内に NLS が存在しているのかを PSORT (Genome NET Service, Osaka University, Japan) (Nakai and Kaneshita, 1992) を用いて解析した。その結果、N 末端側と中央部の 2 カ所に核移行シグナル (NLS1、NLS2) が存在することが推定された (Fig. 2-3)。そこで、NLS1 と NLS2 のどちらが、IREN の核移行に必要なかを調べるため、NLS1、または NLS2 を欠損させた IREN (*Venus-fused NLS1-deleted IREN/pBI221*、*Venus-fused NLS2-deleted IREN/pBI221*)、NLS1 と NLS2 両方を欠損させた IREN の Venus 融合タンパク質を発現するベクター (*Venus-fused NLS1,2-deleted IREN/pBI221*) をイネプロトプラストに導入し、IREN の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、観察時には Hoechst33342 を用いて核を染色した。その結果、コントロールである全長 *IREN-Venus/pBI221* を導入したイネプロトプラストでは、核で Venus 蛍光が観察されるのに対し、*Venus-fused NLS1-deleted IREN/pBI221*、*Venus-fused NLS2-deleted IREN/pBI221* それぞれを導入した場合、核と細胞質で Venus 蛍光が観察された。また、*Venus-fused NLS1,2-deleted IREN/pBI221* を導入した場合はそのすべての Venus 蛍光が細胞質で観察された (Fig. 2-6)。以上の結果から、IREN の核局在には NLS1、NLS2 の両方が必要であることが示された。

そこで、IREN の核局在が過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化に必要なかどうかを調べるため、IREN 発現ベクター (*pBI221-IREN*) と今回、IREN の核移行制御に機能していることが明らかとなった NLS1 と NLS2 両方を欠損させた IREN の発現ベクター (*pBI221-NLS1,2-deleted IREN*) を作製し、イネ培養細胞にパーティクルボンバードメントを用いてレポータープラスミド (*pAHC17-DsRed*) と共導入した。導入 12 時間後に、TUNEL 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、NLS1、NLS2 両方を欠損させた IREN を過剰発現させたイネ培養細胞では、vector control を導入した細胞と同様に、DsRed 蛍光を示す細胞の中で、FITC 蛍光を示す細胞核を持つ細胞は存在しなかった (Fig. 2-5, E-H)。以上の結果から、IREN の核局在が核 DNA の断片化に必須であることが明らかになった。

次に、*A. avenae* N1141 菌株接種による過敏感細胞死誘導時に IREN タンパク質が核に蓄積しているのかを調べた。まず、過敏感細胞死誘導時における IREN の mRNA 蓄積量を real-time RT-PCR で解析したところ、*A. avenae* N1141 菌株を接種して 6 時間後に IREN の転写量の上昇がみられた (Fig. 2-7)。そこで、実際に、過敏感細胞死誘導時に IREN タンパク質が核に蓄積しているかを調べた。*A. avenae* N1141 菌株を接種して 0、3、6、9 時間後のイネ培養細胞から核画分と細胞質画分を得て、それぞれの画分のタンパク質 (10 μ g) を、SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 IREN 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、*A. avenae* N1141 菌株を接種後 0 時間目の核画分においては、IREN は検出されなかったが、接種後 3 時間で IREN が核画分で観察された後、6、9 時間後では徐々にその量が増加していくことが示された (Fig. 2-8)。一方、細胞質分画においては、*A. avenae* N1141 菌株を接種した細胞、水接種した細胞の両方において IREN は検出されなかった (Fig. 2-8)。このことから、実際に、IREN タンパク質は過敏感細胞死誘導時に核へ蓄積することが示された。

4. IREN 発現抑制細胞における核 DNA 断片化

IREN の発現誘導が過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化を引き起こしているのかどうかを調べるために IREN の発現を特異的に抑制した RNAi ノックダウン形質転換体の作製を試みた。RNAi ノックダウン形質転換体を作製するため、IREN の 5'UTR を含む N 末端側の 508bp の領域をターゲットとし、*pANDA* ベクターを用いて RNAi ベクターを構築した。この際、形質転換体のコントロールとして、GUS linker のみを発現させるベクターを用いた。これら、RNAi ベクターをイネ完熟種子由来のカルスへ導入したところ、8 個の形質転換体を得ることができたが、得られた形質転換体の IREN の発現量を調べたところ、顕著に抑制された形質転換体を得ることができなかった (data not shown)。このことから、IREN の効果的な抑制は胚致死を引き起こす可能性があると考え、恒常的な IREN 抑制株の作製は不可能であると判断した。

Johansen らは、*N. benthamiana* の GFP transgenic の葉に GFP を一過的に発現させるベクターと GFP の dsRNA を一過的に発現するベクターを同時に導入すると、GFP の mRNA 発現量が低下し、さらに GFP 蛍光が認められなくなることから、一過的にターゲット遺伝子の dsRNA を発現するベクターを導入した場合も、RNAi によるターゲット遺伝子発現の抑制が認められることを示した (Johansen and Carrington 2001)。そこで、IREN の RNAi コンストラクトを細胞内で一過的に発現させることにより IREN の発現抑制を試みることにし、一過的な発現が可能な RNAi 用ベクター *pANDAmi* を用いて IREN 抑制用のベクターを作製した (*IREN/pANDAmi*)。ベクターが導入された細胞を

同定するために、DsRed 蛍光タンパク質発現ベクター (*pAHC17-DsRed*) を *IREN/pANDAmmini* と同時導入し、この細胞に *A. avenae* N1141 菌株を接種した後、細胞を固定し、TUNEL 染色で核 DNA の断片化を解析した。その結果、N1141 菌株を接種したコントロールベクター導入細胞では、DsRed 蛍光が観察された細胞において核 DNA の断片化を示す FITC の強い蛍光を示す核をもつ細胞が 50% 以上であることが示された (Fig. 2-9)。一方、*A. avenae* N1141 菌株を接種した RNAi 抑制細胞においては、FITC 蛍光を有する核を持つ細胞は 20% 程度まで減少していることが示された (Fig. 2-9)。以上のことから、IREN の発現を抑制した細胞では *A. avenae* N1141 菌株によって誘導される核 DNA の断片化が抑制されることが明らかとなった。

5. IREN のヌクレアーゼ活性

前述した様に、IREN が過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化に関与することが明らかになったことから、次に、IREN が直接的に核 DNA の断片化を引き起こせるかどうかを調べることにした。まず、過敏感細胞死を誘導したイネ細胞でヌクレアーゼ活性が上昇しているかどうかを調べるため、過敏感細胞死を誘導した細胞の核抽出物を用いた In-gel nuclease assay を行った。N1141 菌株を接種して 9 時間後のイネ培養細胞とコントロールである水を接種したイネ培養細胞それぞれから核抽出物を精製し、イネゲノムを含むポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動で分離した。分離後、ゲルから SDS を除去し、ヌクレアーゼ活性に必要なカチオンとして知られている Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含む reaction buffer 中で反応させた。その結果、N1141 菌株を接種したイネ細胞から得た核抽出物には、コントロールと比較して強い DNA の分解活性が認められた (Fig. 2-10)。このことから、過敏感細胞死を誘導することで核内ではヌクレアーゼ活性が上昇することが示された。

そこで、次に、リコンビナント IREN タンパク質が実際にヌクレアーゼ活性を有するかどうかを調べた。まず、IREN に GST-tag を融合したタンパク質を大腸菌で発現させた。アフィニティークラムに吸着させた後、IREN タンパク質と GST-tag の間を特異的に切断する PreScission protease により消化を行うことで IREN 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、ほぼ単一バンドが得られたことから、高度に精製された IREN を得ることができたと結論づけた (Fig. 2-11)。しかし、IREN を大腸菌で発現し、精製したことから大腸菌由来のヌクレアーゼが混入している可能性が懸念された。そこで、GST のみを発現する pGEX-6P-3 を用いてタンパク質を発現させ、IREN と同様の精製過程を経て得られた溶出画分を、IREN 活性検定の時にネガティブコントロールとして用いることにした。

in vitro nuclease assay を行うにあたり、まず、基質として環状 *pBluescript* を用いて検討を行った。リコンビナント IREN と環状 *pBluescript* をヌクレアーゼの代表的な要求カチオンである Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} をそれぞれ含んだバッファー中で反応させた。この試験では、IREN の至適 pH や必要とされるカチオン濃度も不明であったため、pH は 7.0、カチオン濃度は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} については 2 mM で、 Zn^{2+} においては 4mM で行った。 Zn^{2+} だけを 4 mM として用いた理由は、 Zn^{2+} は要求カチオンとして必要とするヌクレアーゼも存在するが、多くのヌクレアーゼに対しては阻害剤として働くことが確認されていることから、阻害剤としても活性を見るためにも他のカチオンより濃い濃度が必要と考えたためである。直鎖状 *pBluescript* 100 ng に精製した IREN を加え 30°C、遮光下、16 時間反応を行い、分解産物を 1.25%アガロースゲル電気泳動で解析した。DNA の検出は EtBr に 20 分間浸し、UV による蛍光検出を行うことで調べた。その結果 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} を添加した場合、環状 *pBluescript* が分解されて存在量が減っていると共に、一部が切断されて直鎖状になったと考えられるバンドが確認された (Fig. 2-12, 上段)。しかし、 Zn^{2+} を添加した場合とカチオンを全く添加しない場合や、IREN 自体を加えていない場合は、環状 *pBluescript* の存在量の減少は認められず、分解産物と思われるバンドも検出されなかった (Fig. 2-12, 上段)。一方、Control を加えて行った実験では、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} をそれぞれ添加しても環状 *pBluescript* の分解は認められなかった (Fig. 2-12, 下段)。このことから、IREN はエンドヌクレアーゼとしての活性を有することが示された。

IREN のエンドヌクレアーゼ活性が証明され、その活性に Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} が関与することが明らかとなったことから、次に、それらカチオン要求性について詳細に調べることにした。その結果、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} の存在下では基質である直鎖状 *pBluescript* の分解が認められた (Fig. 2-13)。この時、 Mg^{2+} や Mn^{2+} の存在下ではおよそ 25-30% の DNA 分解活性が認められたのに対し、 Ca^{2+} 存在下ではおよそ 15% であった (Fig. 2-13)。一方、 Zn^{2+} の存在下では、DNA の分解活性は認められなかった (Fig. 2-13)。このことから、IREN は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 存在下で活性を示すことが明らかとなった。次に、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} の 4 種のカチオンを組み合わせて添加した時に、IREN の活性がどのように変化するかを調べた。その結果、IREN は Ca^{2+} と Mg^{2+} の組み合わせではおよそ 50%、 Ca^{2+} と Mn^{2+} の組み合わせではおよそ 40% の高いヌクレアーゼ活性を示した (Fig. 2-13)。一方、 Ca^{2+} と Mg^{2+} 、 Ca^{2+} と Mn^{2+} のそれぞれに Zn^{2+} を加えることで IREN のヌクレアーゼ活性が抑制されたことから (Fig. 2-13)、 Zn^{2+} は IREN の活性の阻害剤として機能していることが示唆された。

次に、IREN がどのくらいのカチオン濃度で最も高い活性を有するのかを調べるこ

にした。この実験は pH7.0 で行い、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} の各カチオン濃度を 0.2 mM、2 mM、20 mM に設定した。その結果、 Mg^{2+} では、0.2 mM でわずかに DNA の分解が認められ、2 mM ではより強い DNA の分解が認められ、20 mM では DNA が完全に分解されることが確認された (Fig. 2-14)。同様に、 Mn^{2+} は、2 mM から DNA の分解が認められ、20 mM で完全な DNA の分解が認められた (Fig. 2-14)。一方、 Ca^{2+} は 2 mM、20 mM においてわずかな DNA の分解が認められた (Fig. 2-14)。

次に、IREN の至適 pH について調べることにした。この実験では、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} の各カチオンを添加した反応液の pH をそれぞれ、pH5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 に調整して測定を行った。ただし、 Mn^{2+} だけは pH8.0 以上で沈殿が生じたため正確な結果を得ることができないと判断し、pH は 8.0 までとした。その結果、 Ca^{2+} を添加した場合、pH8.0 と pH9.0 において DNA の分解が認められ、特に pH9.0 で最も強い分解活性が認められた (Fig. 2-15)。 Mg^{2+} を添加した場合は、pH5.0-9.0 まですべての反応で DNA 分解活性が認められた。特に pH8.0-9.0 で最も強い DNA 分解活性が認められた (Fig. 2-15)。 Mn^{2+} を添加した場合は、pH7.0 で最も強い DNA 分解活性が認められた (Fig. 2-15)。一方、カチオン無しの反応では DNA の分解が認められなかった。これらの結果から、リコンビナント IREN は Ca^{2+} と Mg^{2+} の存在下において pH9.0 で最も強い活性を示し、 Mn^{2+} の存在下では、pH7.0 で最も強い活性を示すことが明らかとなった。

6. 過敏感細胞死誘導における IREN の役割

過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化は IREN によって引き起こされていることが明らかになった。しかし、IREN によって引き起こされる核 DNA の断片化が過敏感細胞死誘導においてどのような役割を担っているのかについては未だ不明である。まず、IREN による核 DNA の断片化が細胞死の誘導に直結するのかどうかを調べるため、イネ培養細胞に IREN を過剰発現させるプラスミドと β -glucuronidase (GUS) をコードしている遺伝子 *uidA* をもつプラスミドをパーティクルボンバードメントで同時導入し、GUS 活性を指標とした過敏感細胞死誘導の有無を解析した。この方法では、IREN の過剰発現により細胞死が誘導されたなら、細胞内における GUS 活性が消失すると考えられる。一方、細胞死が引き起こされなかった場合は、高い GUS 活性が示されることになる。まず、この方法で実際に細胞死が検出できるかどうかを、細胞死を誘導することが明らかになっている OsNAC4 を細胞に導入したところ、遺伝子導入後 12 時間から 24 時間にかけて GUS 活性の顕著な低下が認められた (Fig. 2-16)。そこで、IREN と *uidA* を同時導入し、GUS 活性を測定したところ 24 時間までネガティブコントロールと同等の GUS 活性が認められた (Fig. 2-16)。

次に、タバコに *Agrobacterium* を介して IREN を一過的に発現させたときの過敏感細胞死誘導についても解析した。その結果、IREN を導入したタバコにおいては、導入後 6 日まで明瞭な過敏感細胞死は認められなかった (Fig. 2-17)。このとき、タバコに対して非病原性となる *A. avenae* N1141 菌株を接種したところ菌株接種 2 日後に明瞭な過敏感細胞死が認められた (Fig. 2-17)。このことから、IREN によって引き起こされる核 DNA の断片化は過敏感細胞死のような急速な細胞死の引き金にはならないことが示された。

次に、IREN による DNA の断片化が他の生物でも認められるのかを調べるために、酵母に IREN を発現させ、TUNEL 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することにした。その結果、IREN を発現させた酵母細胞では、TUNEL 蛍光を有する核を持つ細胞が確認された (Fig. 2-18)。一方、*pEG-IREN*、*pEG-NLS1,2-deleted IREN* を導入した酵母細胞では、FITC の蛍光を示す核はほとんど存在しなかった。このことから、IREN は異なる生物種においても核 DNA の断片化を引き起こすことが確認された。

また、このときの酵母の生育についても解析した。その結果、ロイシン要求性培地 (SC/Leu) では *pEG* 空ベクター、*pEG-IREN* ベクター、*pEG-NLS1,2-deleted IREN* ベクターをそれぞれ導入した酵母細胞すべてにおいて生育に差が認められなかった (Fig. 2-19)。一方、ガラクトース誘導培地では IREN を発現させた酵母細胞において生育の遅延が認められた (Fig. 2-19)。また、NLS を欠損させた IREN を発現させた酵母細胞はコントロールである *pEG* 空ベクターを導入した酵母細胞と同等の生育が観察された (Fig. 2-19)。以上のことから、IREN によって誘導される核 DNA の断片化は細胞の生育を抑制することが示された。これは、DNA の分解は早期の自発的細胞死の引き金にはなっていないが、DNA の分解により細胞の生育は抑制させることによると思われる。

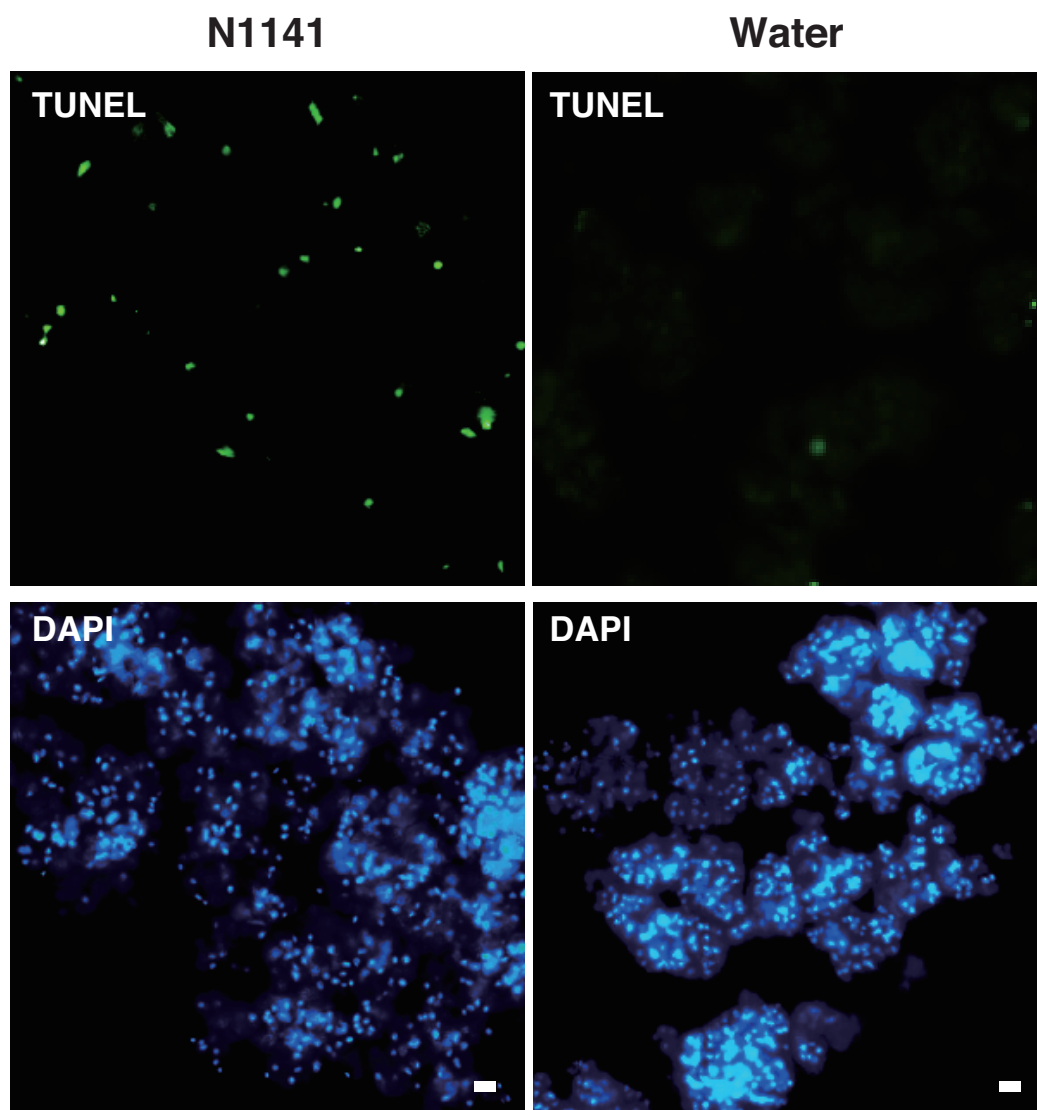


Fig. 2-1

***A. avenae* N1141 菌株を接種したイネ培養細胞で認められる核 DNA 断片化**

A. avenae N1141 菌株を 1×10^8 cfu/mL になるようにイネ培養細胞に接種し、12 時間後における核 DNA の断片化を TUNEL 染色を用いて検出した。このときの DAPI 染色により核を染色した。左側は *A. avenae* N1141 菌株を接種したイネ培養細胞であり、右側はコントロールとして水を接種したイネ培養細胞の画像である。Bar = 10 μ m。

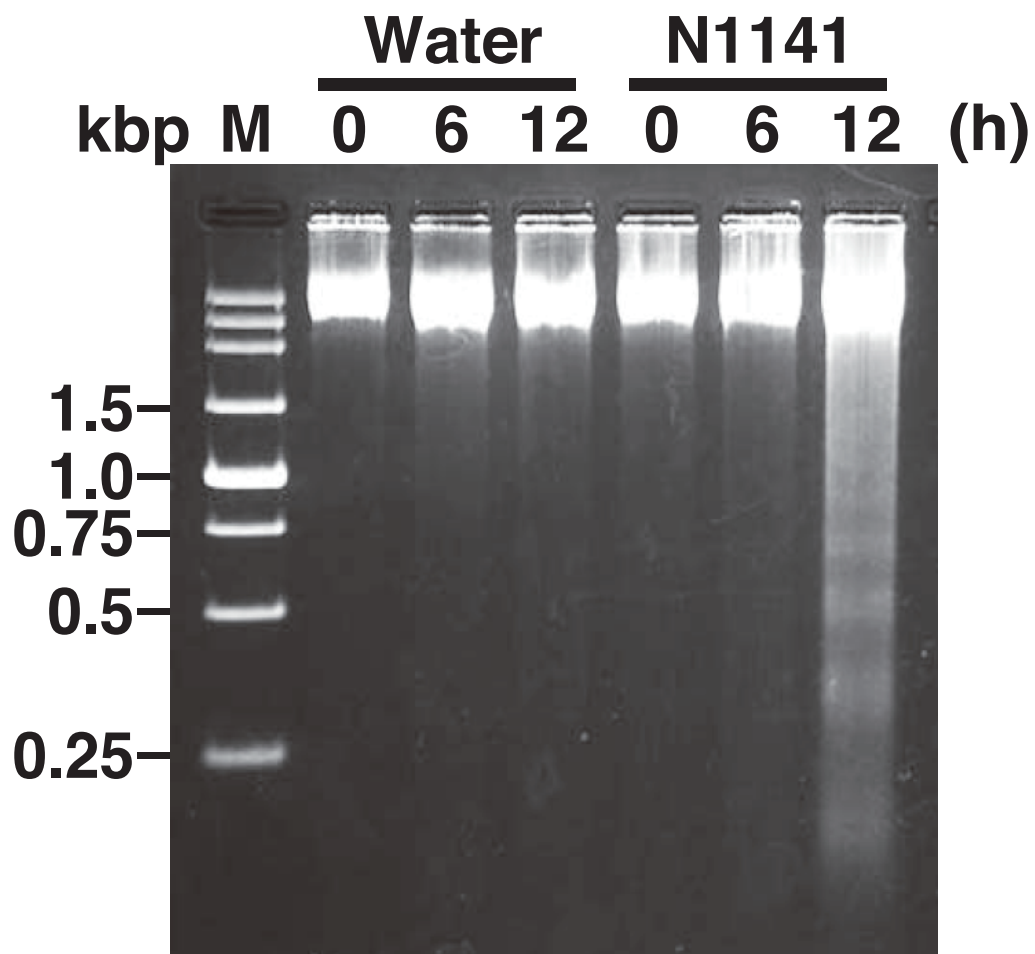


Fig. 2-2

A. avenae N1141 菌株によって誘導される核 DNA の ladder 化

イネ培養細胞に *A. avenae* N1141 菌株を 1×10^8 cfu/mL になるように接種して 0、6、12 時間後に回収し、それぞれのサンプルからゲノムを抽出し、10 μ g ずつ 2%アガロースゲルにアプライした後、電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。M: 250bp DNA ladder を使用。

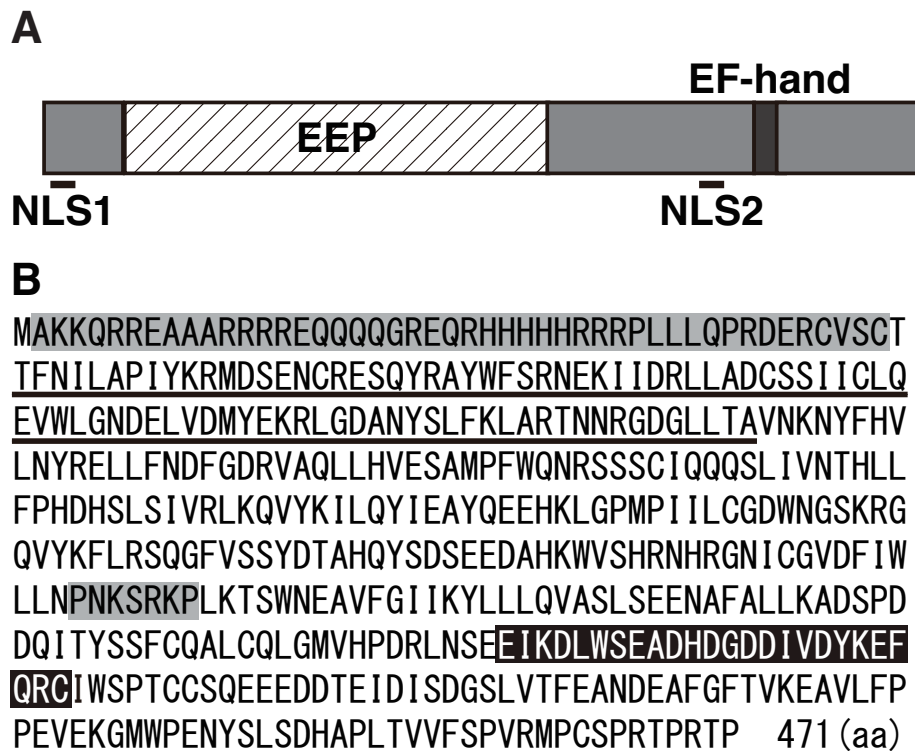


Fig. 2-3

IREN の分子模式図 (A) とアミノ酸配列 (B)

A. IREN (AK100514) の分子内構造を示した。NLS : Nuclear localization signal (核移行シグナル)、EEP : Endonuclease-exonuclease- phosphatase domain。B. IREN の推定アミノ酸配列 (全長 471 a.a.) を示した。グレーのボックスで囲まれた領域は核移行シグナル (NLS) を示しており、下線部領域は Endonuclease-exonuclease- phosphatase (EEP) domain を示している。また、黒のボックスで囲まれた領域は EF-hand モチーフを示している。

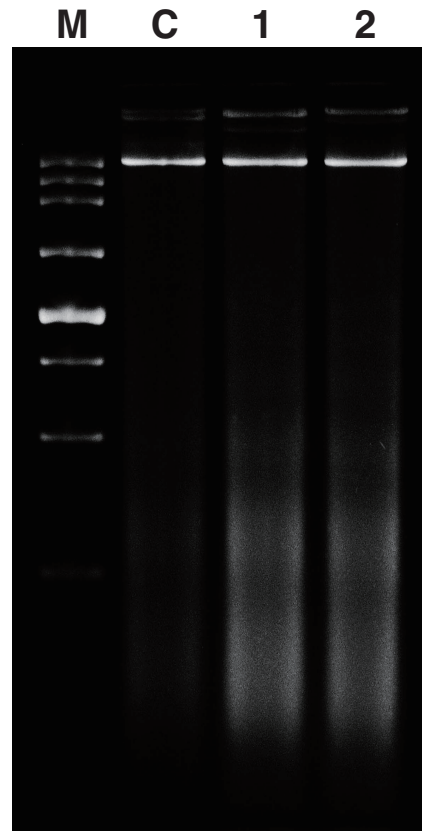


Fig. 2-4

IRENを一過的に過剰発現させたイネプロトプラストで観察されるDNAのラダー化

イネプロトプラストに *pBI221-IREN*、*pBI221-OsNAC4*、そしてコントロールである *pBI221 empty vector* をそれぞれ導入し、導入して12時間後のイネプロトプラストからゲノムDNAを抽出し、0.5 mg/ml エチジウムブロマイドで染色した2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。DNA アプライ量: 15 µg。

レーン M; Marker (250bp DNA ladder)、レーン C; *pBI221* 空ベクターを導入したイネプロトプラスト (negative control)、レーン 1; *pBI221-OsNAC4* を導入したイネプロトプラスト (positive control)、レーン 2; *pBI221-IREN* を導入したイネプロトプラスト。

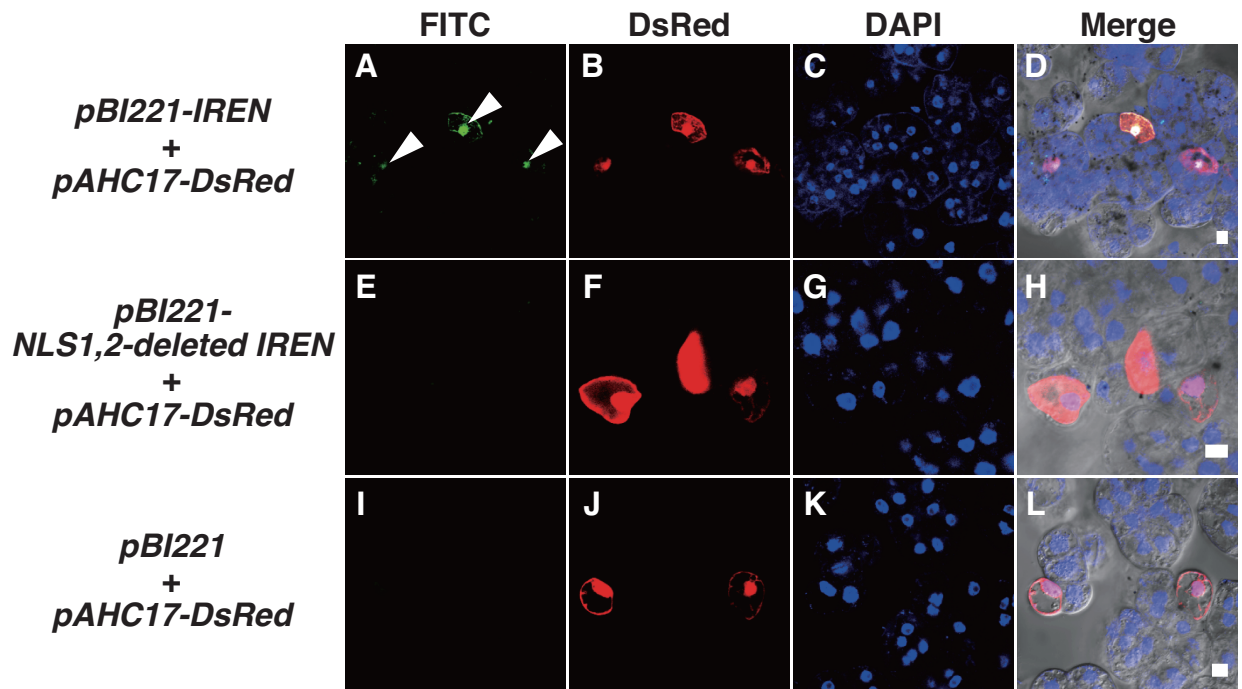


Fig. 2-5

イネ培養細胞内で IREN を過剰発現させることによって誘導される核 DNA の断片化と核 DNA の断片化に対する IREN 核移行の重要性

DsRed vector と *pBI221-IREN*, *pBI221-NLS1,2-deleted IREN*, *pBI221* empty vector それぞれをイネ培養細胞に共導入し、導入 12 時間後の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、TUNEL 染色を行った。観察時は DAPI で DNA を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Bar = 10 μ m。

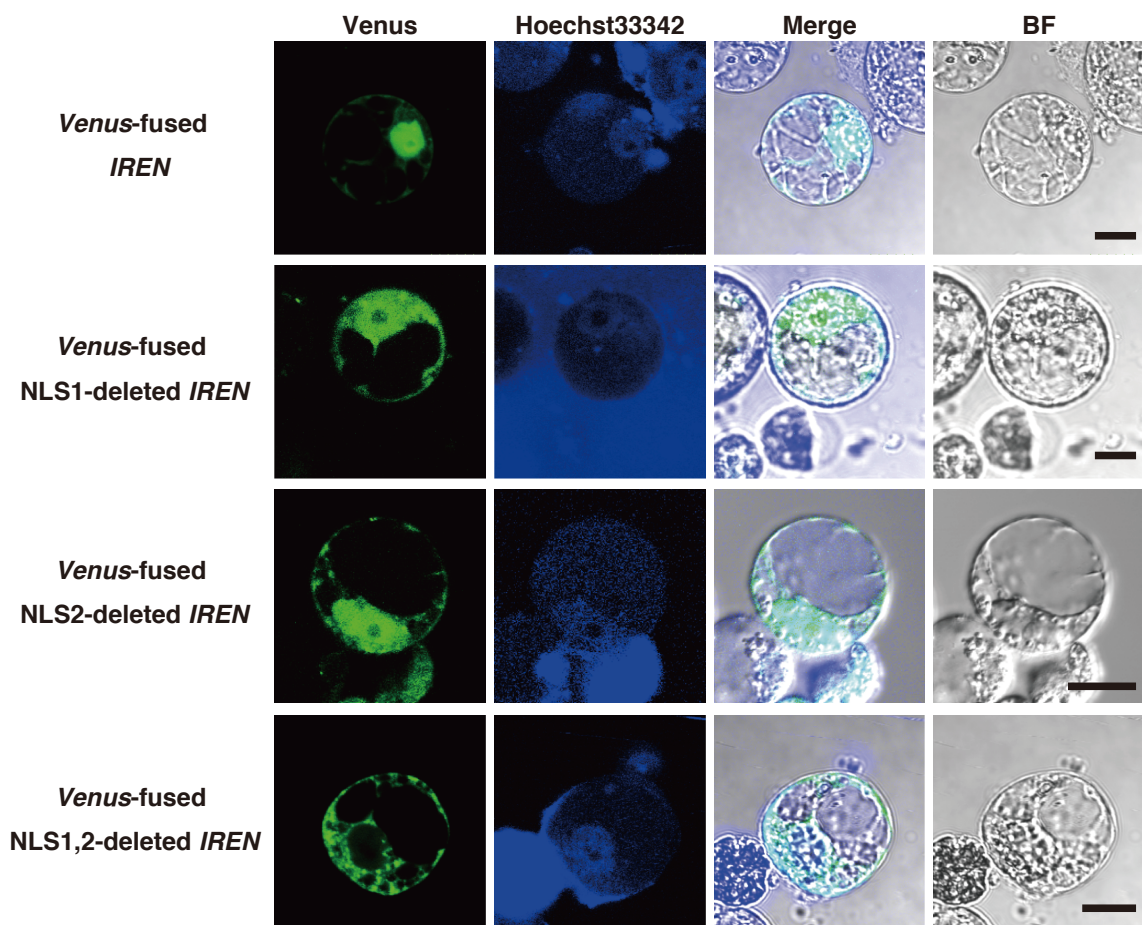


Fig. 2-6

イネプロトプラストにおける **IREN** の細胞内局在と **IREN** 分子内に存在する核移行シグナルの機能

イネプロトプラストに *Venus-fused IREN/pBI221*, *Venus-fused NLS1-deleted IREN/pBI221*, *Venus-fused NLS2-deleted IREN/pBI221*, *Venus-fused NLS1, 2-deleted IREN/pBI221* をそれぞれ導入し、導入 8 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Bar = 10 μ m。BF, bright field。

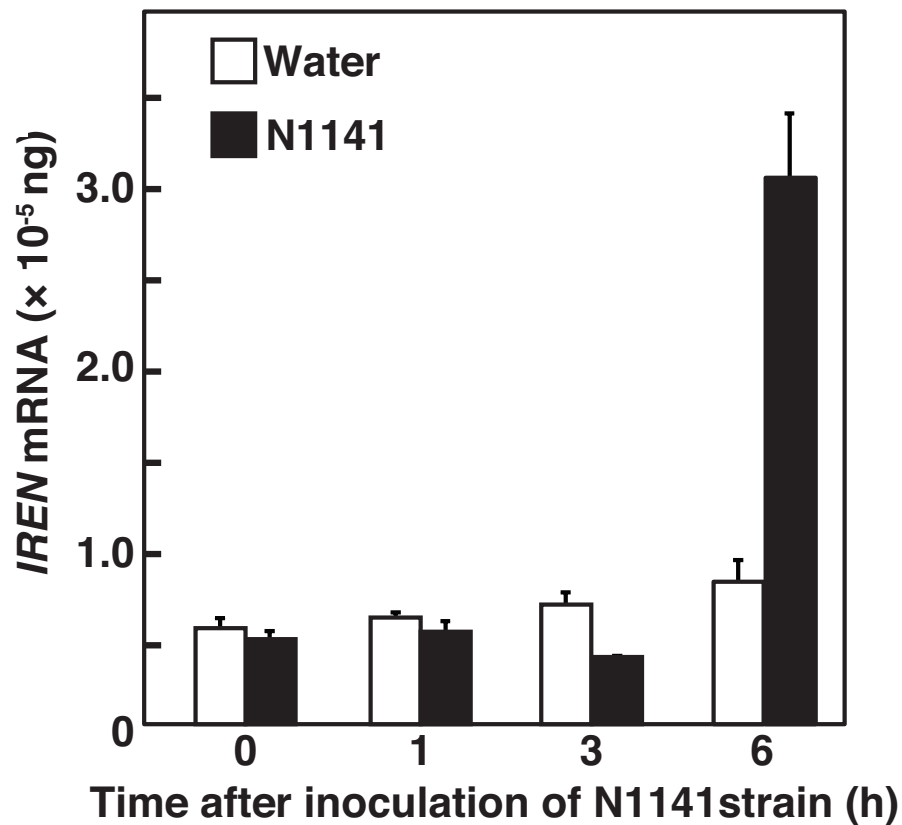


Fig. 2-7

A. avenae N1141 菌株を接種したイネ培養細胞における *IREN* mRNA 発現量の変化

イネ培養細胞に *A. avenae* N1141 菌株を 1×10^8 cfu/mL 接種し、接種後 0、1、3、6 時間ごとに回収した細胞から抽出した total RNA を用いて real-time RT-PCR で *IREN* の mRNA 量を定量した。実験は 3 回行い、測定値の標準偏差をバーで示した。

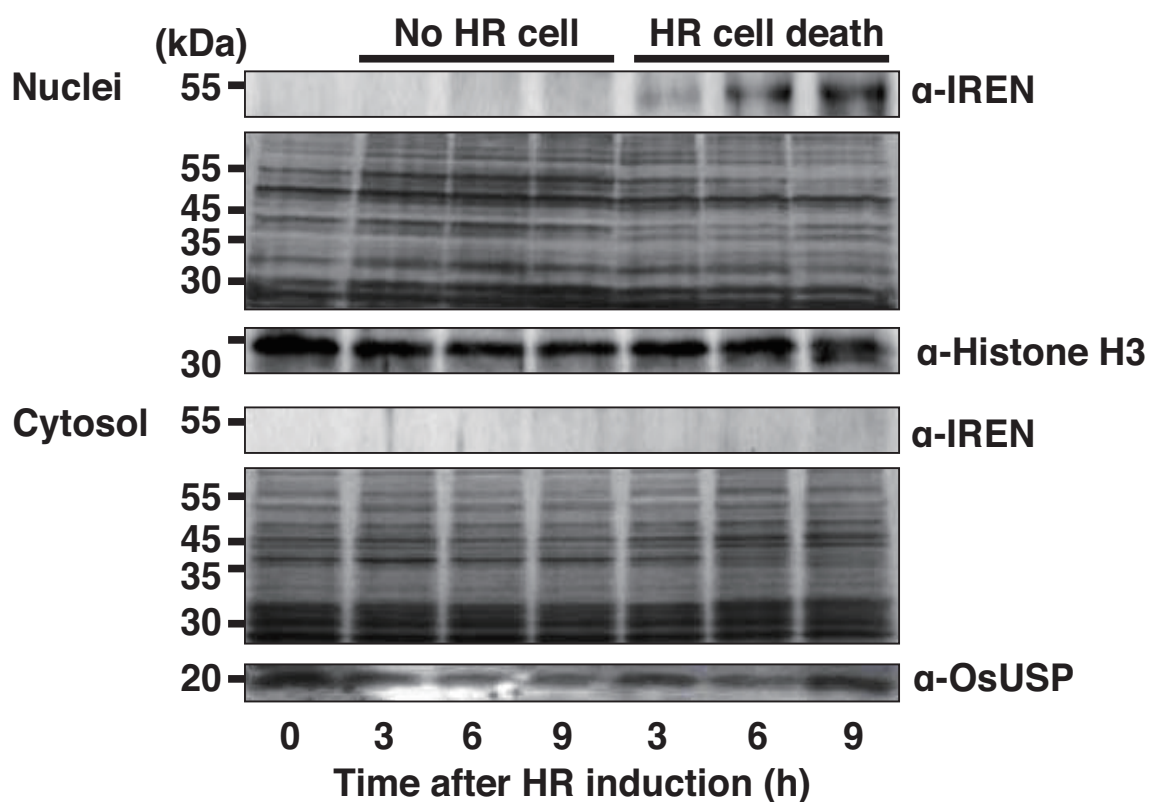


Fig. 2-8

過敏感細胞死誘導時における IREN の蓄積量の経時的変化

No HR cell death はネガティブコントロールとして水を接種したイネ培養細胞を示し、HR cell death は *A. avenae* N1141 菌株を 1×10^8 cfu/mL 接種したイネ培養細胞を示す。接種した培養細胞から単離した核画分 (10 μ g) を 10%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離した。上段が IREN 抗体 (1/2000 希釈) を用いた Western Blot 解析結果を示し、中段が銀染色を行った結果を示す。また、それぞれの下段には各画分のマーカー抗体を用いた Western Blot 解析の結果を示している。核画分マーカー; Histone H3 抗体、細胞質画分; OsUSP 抗体を使用。

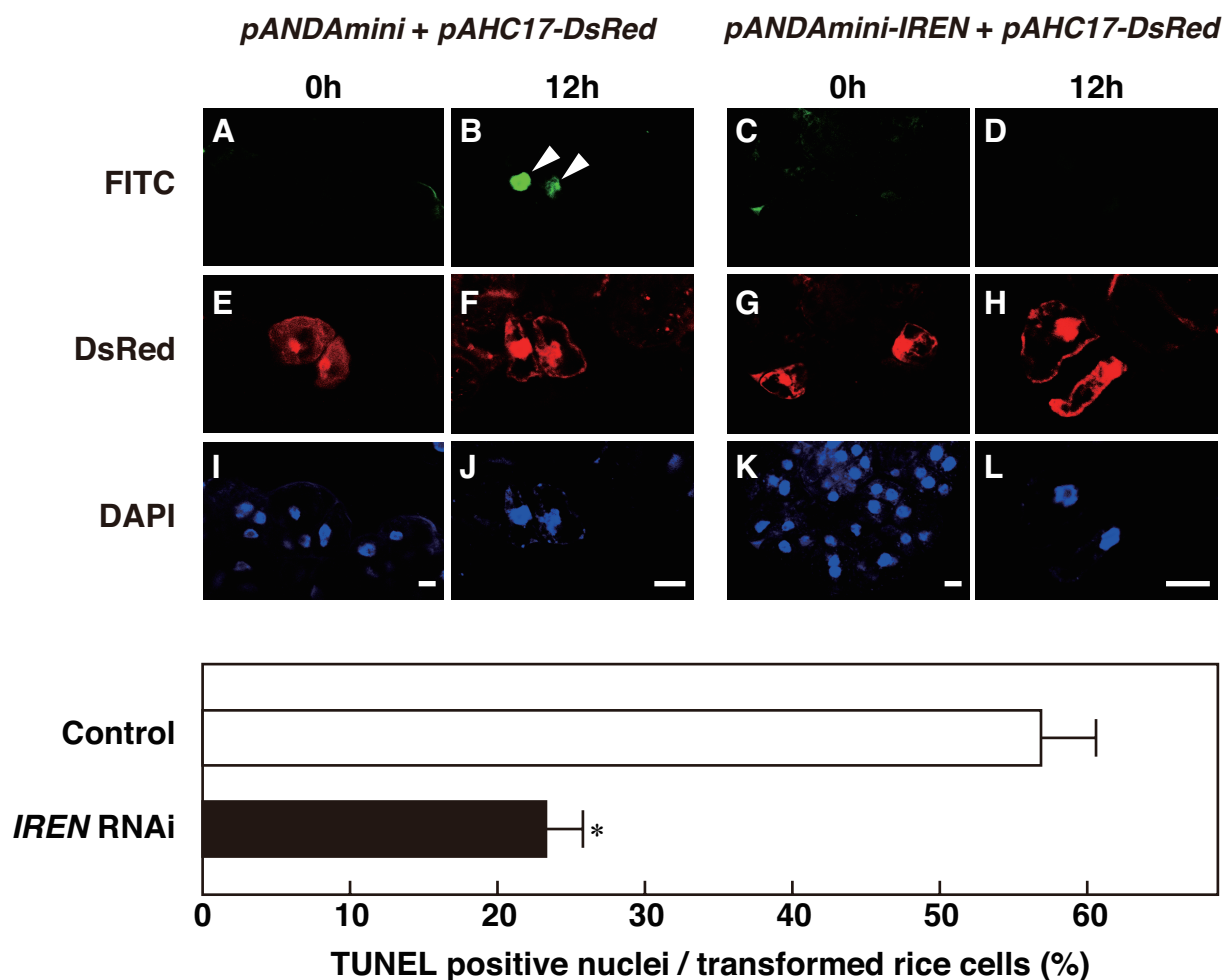


Fig. 2-9

IREN 抑制細胞における *A. avenae* N1141 菌株接種時の核 DNA 断片化

上の画像は *pANDAmmini-IREN* と *pAHC17-DsRed* (右側)、*pANDAmmini* (empty vector) と *pAHC17-DsRed* (左側) をイネ培養細胞に共導入して 24 時間後に *A. avenae* N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) を接種し、接種して 0 時間、12 時間後の細胞を固定し、TUNEL 染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果を示す。

(A-D) ; FITC images、(E-H) ; DsRed images、(I-L) ; DAPI images。白矢印は TUNEL-positive の核を示している。Bar = 10 μ m。

下図は、TUNEL- positive の細胞で核 DNA の断片化が認められた細胞の割合を示している。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。

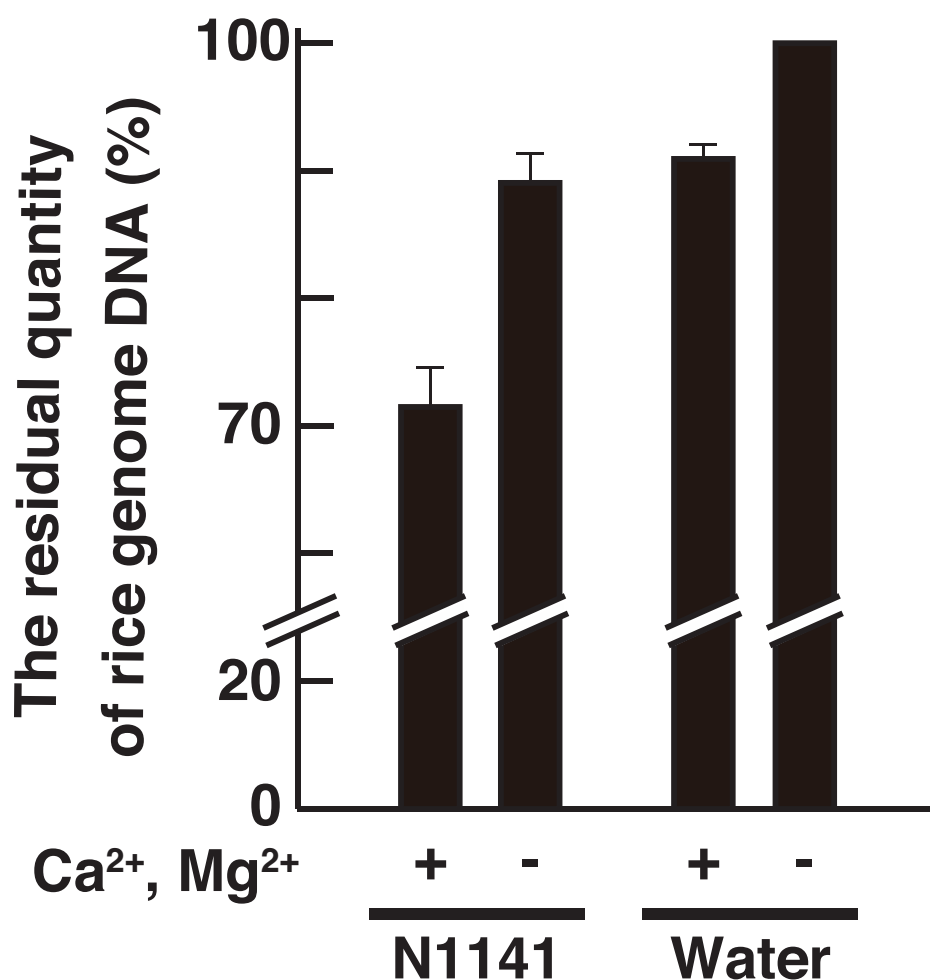


Fig. 2-10

A. avenae N1141 菌株を接種したイネ培養細胞の核抽出物に存在するヌクレアーゼ活性

A. avenae N1141 菌株 (1×10^8 cfu/mL) 接種 9 時間後のイネ培養細胞と、水を接種したイネ培養細胞から単離した核抽出物を用いて In-gel nuclease assay を行った。ゲルは 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA 含有 10%アクリルアミドゲルを使用した。DNA 分解活性は Ca^{2+} と Mg^{2+} を添加した場合 (+) と添加しない場合 (-) で測定した。DNA の検出は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の EtBr で 20 分間染色し、UV で発色することで行った。DNA 分解活性は、DNA の量を ImageJ で数値化することで算出した。

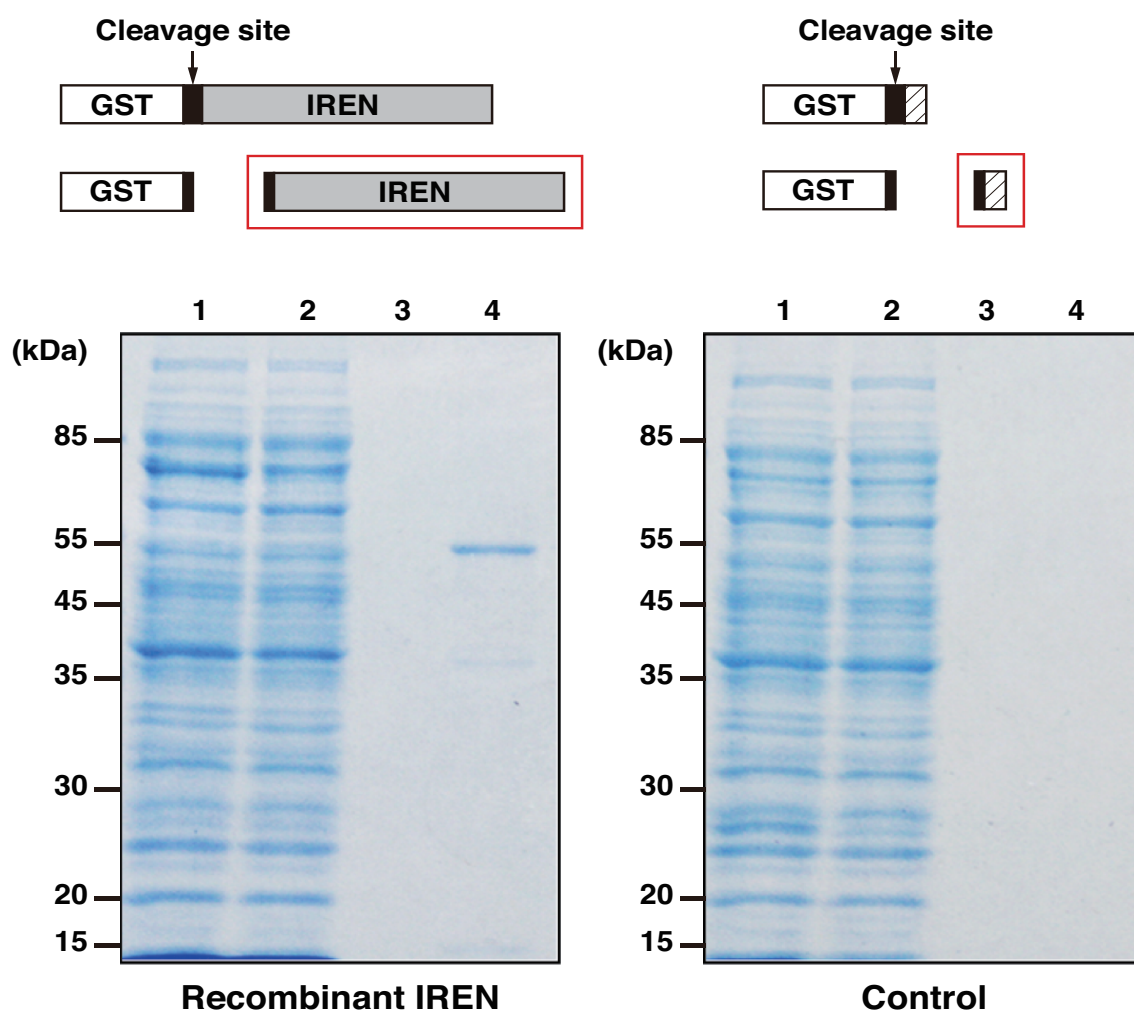


Fig. 2-11

作成した **Recombinant IREN** タンパク質の **SDS-PAGE** による精製度の確認

左図: 大腸菌で発現させた GST-IREN を Glutathione Sepharose™ 4B に結合させた後、PreScission Protease で GST を切断し、発現 IREN を得て、12.5% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて分離し、CBB 染色によって検出した。分子量マーカーは Prestained XL ladder Low を用いた。レーン 1. 破碎上清画分、2. 非吸着画分、3. 洗浄画分、4. 溶出画分。右図: 大腸菌で発現させた GST を Glutathione Sepharose™ 4B に結合させた後、PreScission Protease 処理を行い得られた画分を、12.5% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて分離し、CBB 染色を行った。各画分は、画分の総量に関係無く 10 μ l ずつアプライした。

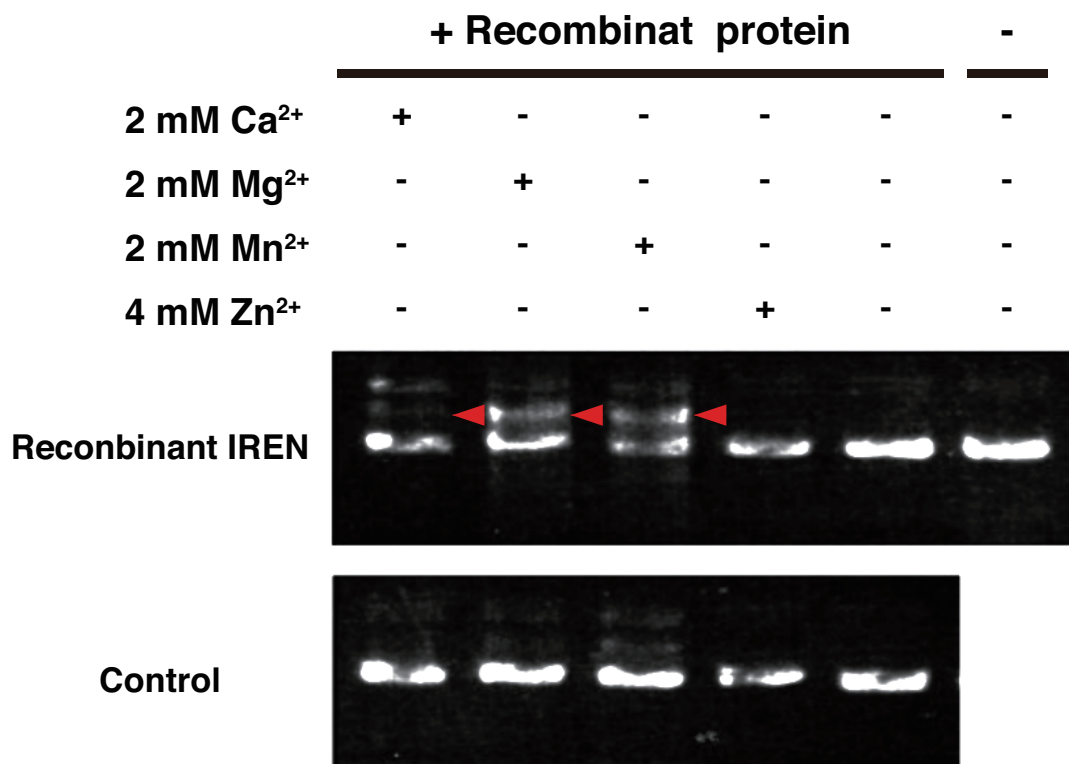


Fig. 2-12

IREN のエンドヌクレアーゼ活性確認

Fig. 2-11 で示した recombinat IREN と control の溶出画分に、それぞれ環状 *pBluescript* 100 ng を加え 30℃、遮光下、16 時間で反応させた後、分解産物を 1.25%アガロースゲル電気泳動で解析した。DNA の検出は EtBr に 20 分間浸し、UV による蛍光検出を行うことで調べた。上段：recombinat IREN を用いた反応の結果、下段：Control を用いた反応の結果を示す。Recombinant protein は recombinant IREN と control のことを指し、反応液に添加した場合を (+)、添加しない場合を (-) で示した。また、この反応は、代表的な要求カチオンを 1 種類ずつ含んだバッファー中にて行った。赤矢印は DNA の分解によって新たに生じた分解産物を示す。

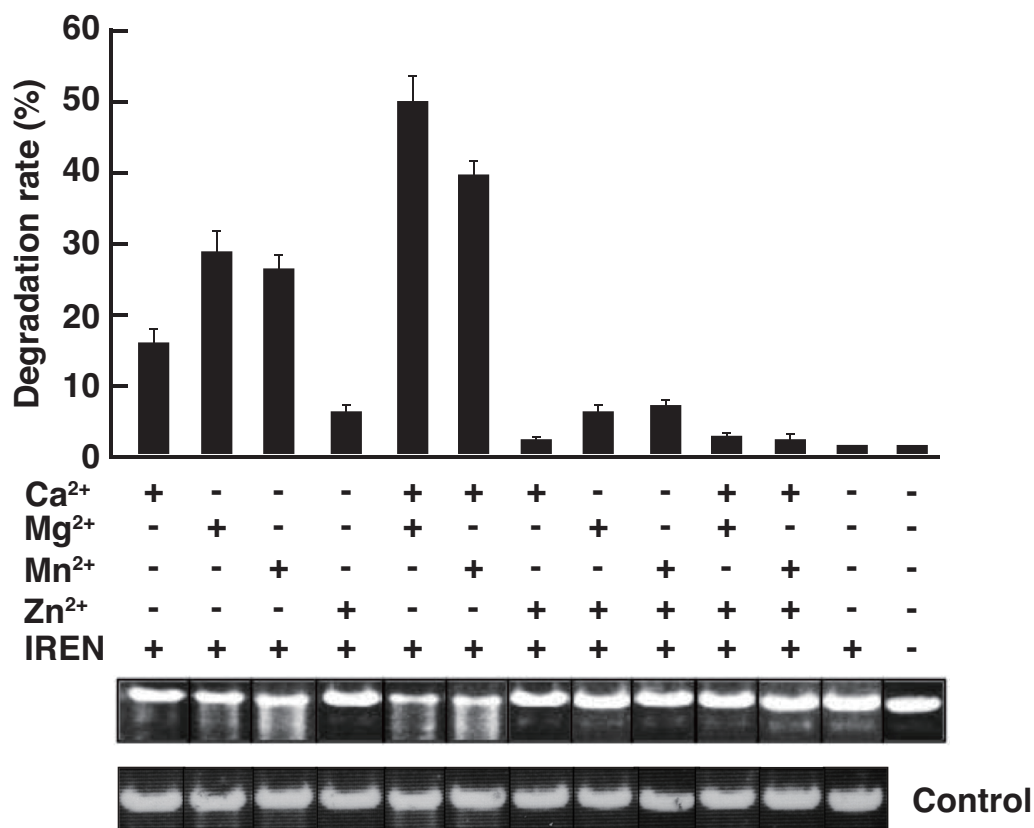


Fig. 2-13

Recombinant IREN タンパク質のヌクレアーゼ活性と各種金属イオン要求性

Fig. 2-11 で示した recombinat IREN と Control の溶出画分を等量用いて、それぞれ直鎖状 pBluescript と反応させた。泳動写真上段の一番右側のレーンは recombinat IREN と金属イオンを加えていない条件下での結果を示し、これを 0%として、各レーンのバンドの分解率をグラフ化している（上段）。DNA 量の定量はエチジウムブロマイド染色により可視化した DNA を ImageJ（National Institutes of Health（NIH））で解析することで行った。泳動写真の上段は Rconbinat IREN を用いた反応の結果であり、下段は Control を用いた反応の結果を示す。反応は、直鎖状 *pBluescript* 100 ng を加え 30℃、遮光下、16 時間で行い、1.25%アガロースゲル電気泳動で解析した。DNA の検出は EtBr に 20 分間浸し、UV による蛍光検出を行うことで調べた。

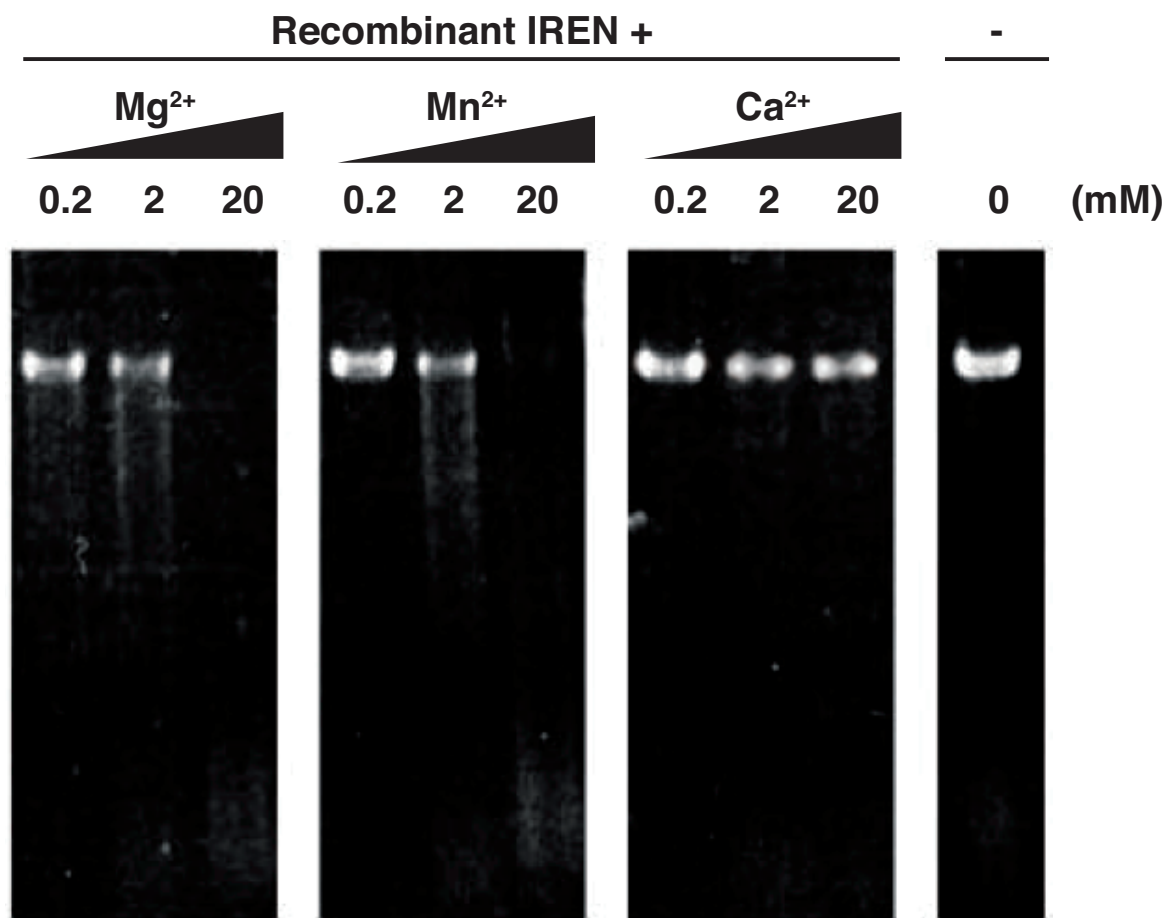


Fig. 2-14

Recombinant IREN タンパク質のヌクレアーゼ活性に対する各種カチオンの濃度依存性

Recombinat IREN と Control の溶出画分にそれぞれ直鎖状 *pBluescript* を加え 30℃、遮光下、16 時間反応させた。DNA の検出は EtBr に 20 分間浸し、UV による蛍光検出を行うことで調べた。

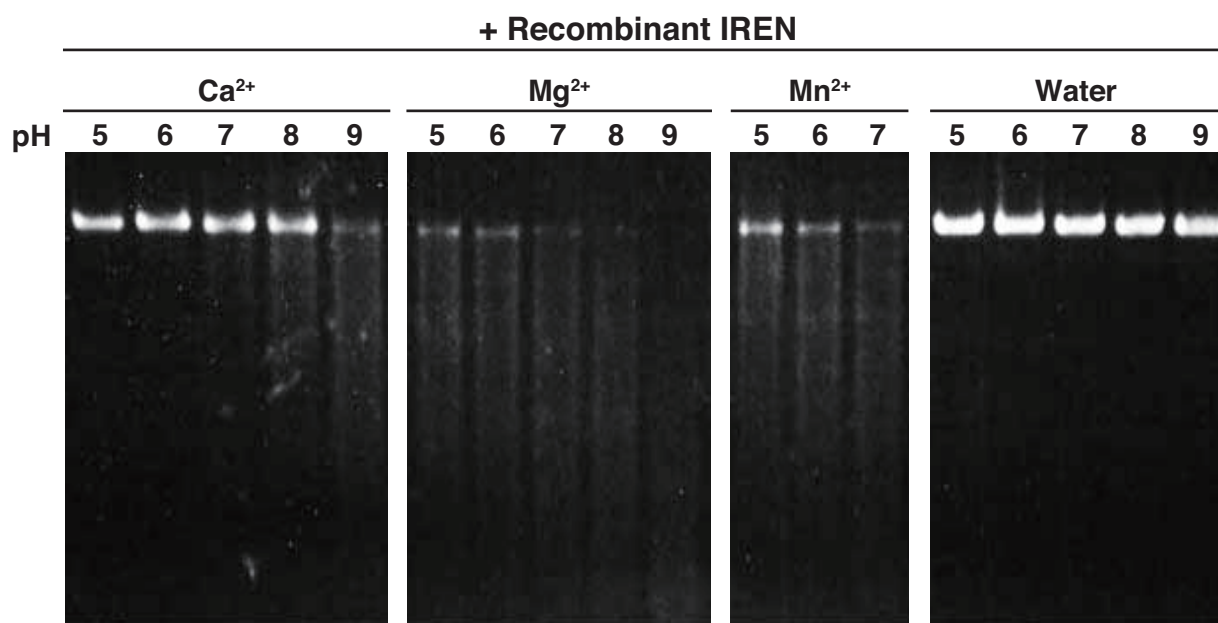


Fig. 2-15

Recombinant IREN タンパク質の至適 pH

Recombinat IREN と Control の溶出画分に直鎖状 *pBluescript* を加え 30℃、遮光下、16 時間反応させた。DNA の検出は EtBr に 20 分間浸し、UV による蛍光検出を行うことで調べた。

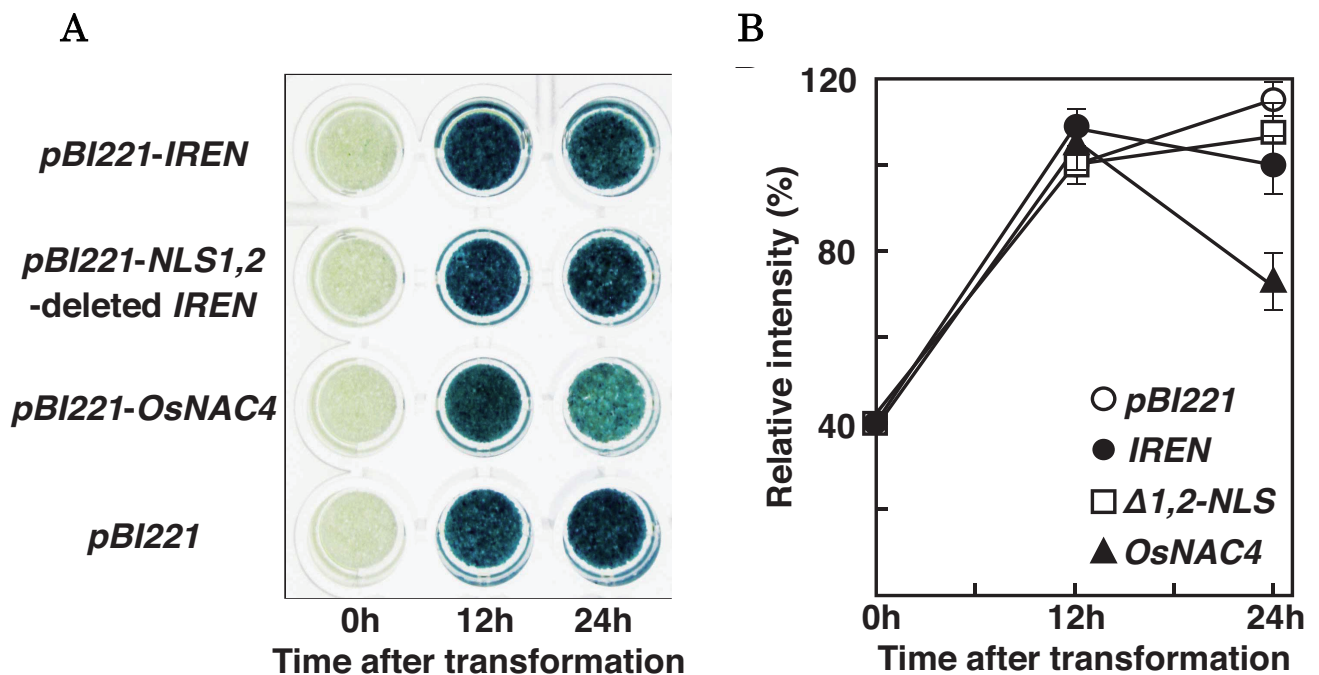


Fig. 2-16

IREN の過剰発現によって誘導される細胞死の GUS 活性を用いた測定

A. GUS 発現ベクター (*uidA*) と空ベクター (*pBI221*)、IREN タンパク質発現ベクター (*pBI221-IREN*)、NLS1, 2 を欠損させた IREN タンパク質発現ベクター (*pBI221-NLS1,2-deleted IREN*)、OsNAC4 発現ベクター (*pBI221-OsNAC4*) をそれぞれイネ培養細胞に共導入して 0 時間、12 時間、24 時間後の GUS 活性を測定した。B. 得られた画像を ImageJ (National Institutes of Health (NIH)) で定量化した。

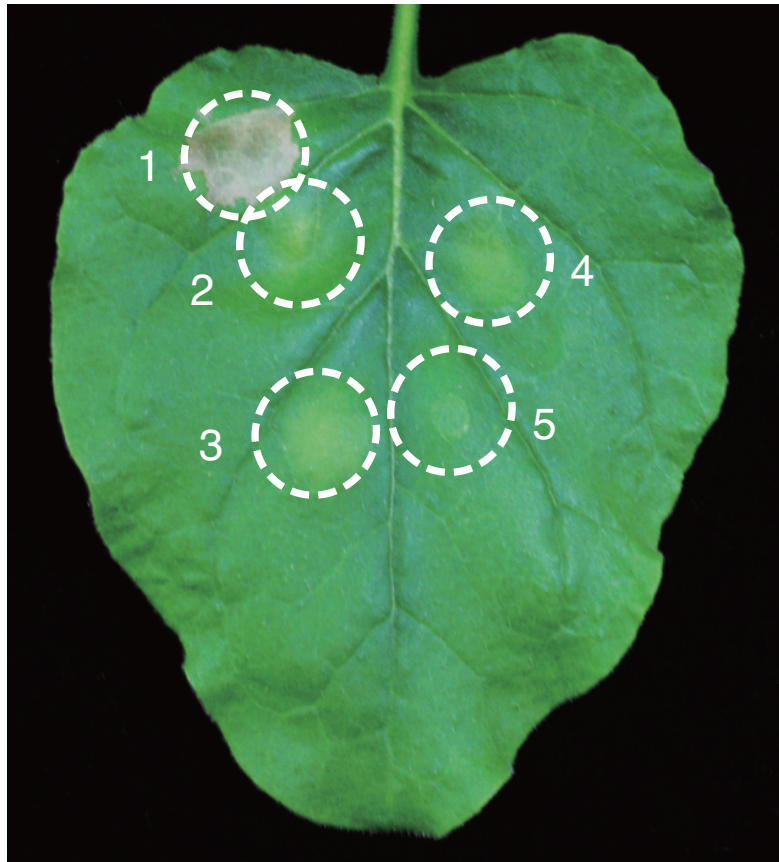


Fig. 2-17

N. benthamiana IREN を一過的な発現させた *N. benthamiana* での過敏感細胞死

アグロバクテリウム 法により *pMDC32-IREN*(2)、*pMDC32-NLS1,2-deleted-IREN*(3)、*pMDC32 empty vector* (4) を *N. benthamiana* の葉にそれぞれ導入し、導入して 6 日後に観察した結果を示す。ポジティブコントロールとして *A. avenae* N1141 を接種している (1)。また、ネガティブコントロールとして MMA buffer を接種した (5)。

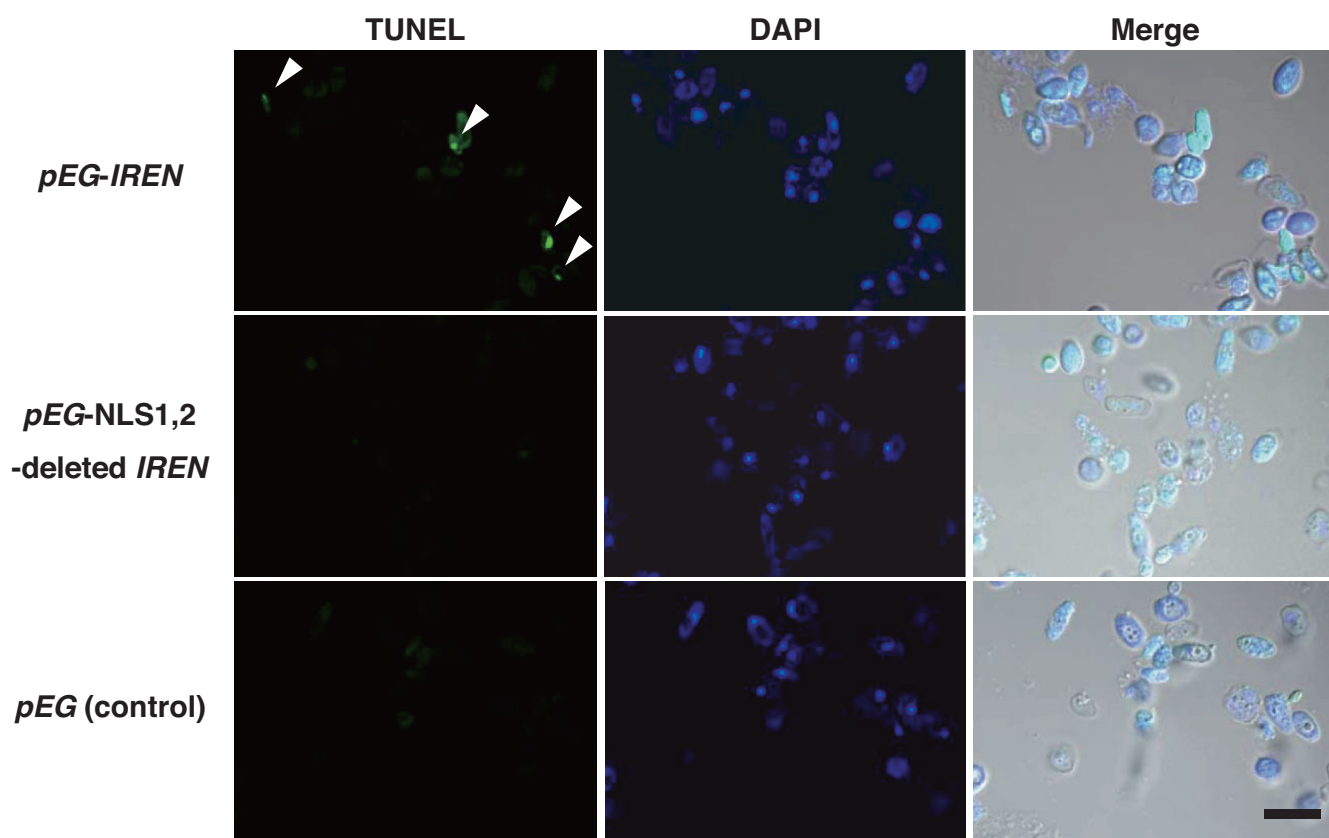


Fig. 2-18

IREN を発現させた酵母細胞で認められる核 DNA 断片化

酵母細胞に REN 発現ベクター (*pEG-IREN*)、NLS を欠損させた IREN の発現ベクター (*pEG-NLS1,2 deleted-IREN*)、を導入し、得られた形質転換体をそれぞれガラクトース誘導液体培地で培養してタンパク質発現誘導させ、誘導して 12 時間後の細胞を TUNEL 染色で DNA の断片化を解析した。Bar = 10 μ m。

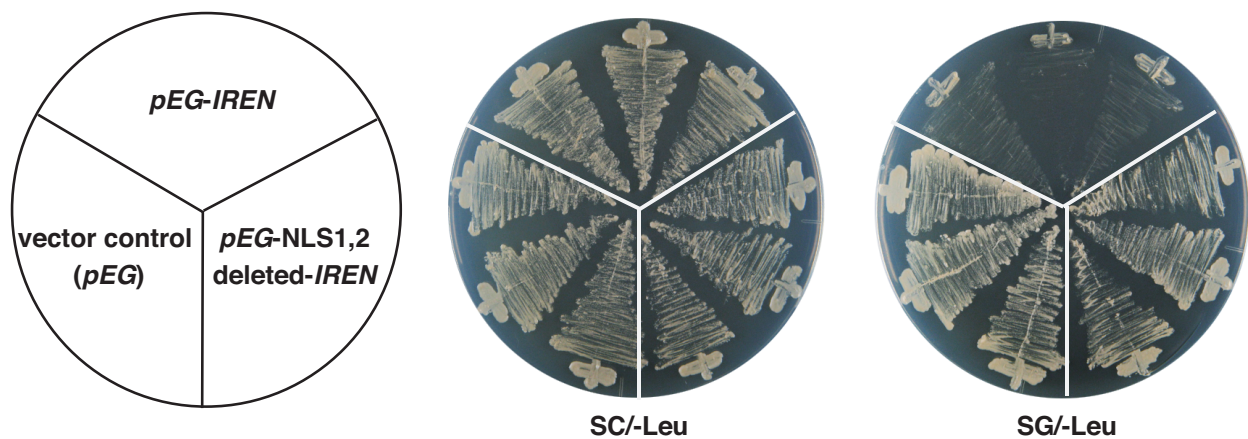


Fig. 2-19

IREN を発現させた酵母細胞の生育

酵母細胞 (BY4743) に IREN 発現ベクター (*pEG-IREN*)、NLS を欠損させた IREN の発現ベクター (*pEG-NLS1,2 deleted-IREN*)、を導入し、得られた形質転換体をそれぞれガラクトース未誘導培地 (SC/Leu)、ガラクトース誘導培地 (SG/Leu) にプレーティングし、30°C で 2-3 日間培養した結果を示す。

第 2 章

考察

植物が植物病原菌の非病原性株と接触した時に起こる過敏感細胞死の特徴の一つは、核での急速な DNA 分解である。これまでに、タバコモザイクウイルスを接種したタバコ (Mittler and Lam 1995) や、真菌を接種したササゲ (Ryerson and Heath, 1996)、細菌を接種したダイズやイネにおいて DNA の分解が生じることが明らかとなっている (Levine et al. 1996、Che et al. 1999)。このような過敏感細胞死誘導に伴う核 DNA の断片化は過敏感細胞死誘導後 12 時間程度で認められる。このことから、過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化は、過敏感細胞死誘導時に活性化される核に移行する特異的な DNA 分解酵素 (deoxyribonuclease : DNase) により生じている可能性が高いと考えられる。さらに、本研究においてイネ培養細胞に *A. avenae* の N1141 菌株を接種した場合に認められる核 DNA の断片化はヌクレオソーム単位と一致する 180 bp 単位で生じていることが明らかとなっている。このようなヌクレオソーム単位での断片化はヌクレオソームとヌクレオソームを結ぶヒストンと結合していないリンカーの部分が優先的に切断されていることを示しており、これも過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化が特定のヌクレアーゼによって引き起こされていることを示唆する。しかし、植物における過敏感細胞死やゲノム DNA の分解については多数報告されているにも関わらず、この DNA 断片化に関わるヌクレアーゼについてはほとんど報告がない。

イネの全ゲノム中にはヌクレアーゼをコードしている可能性のある遺伝子が 14 個存在しており、これらを構造的な特徴に基づいて分類すると、4 つの大きなグループに分けることができる (Fig. 2-19)。グループ I はリン酸ジエステル結合切断の一般的な触媒機構を共有する EEP (exonuclease/endonuclease/phosphatase) スーパーファミリーで構成されており、本研究で過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化の実行因子として同定された IREN はこのグループに属する。グループ II は、シロイヌナズナの BFN1/ENDO1 のような Bi-functional nucleaseI と相同性のある S1-P1 ヌクレアーゼが含まれる (Perez-Amador et al., 2000、Triques et al., 2007)。グループ III は、杜仲の EuCaN1/CaN2 のような Staphylococcal ヌクレアーゼを含む (Chen HM et al., 2012)。また、グループ IV は以前報告された BFN1 ファミリーとは別の *Oryza minuta* での basal defense に機能する bifunctional nuclease として同定された OmBBBD のホモログが含まれる (Lesniewics et al., 2013、You et al., 2010)。これまでに、植物の細胞死プロセスに関与するヌクレアーゼとして、葉の老化時の細胞死誘導時に発現することが報告されているシロイヌナズナの

BFN1/ENDO1 (Perez-Amador MA et al., 2000) や塩ストレスによる細胞死誘導時に発現することが明らかとなっているオオムギの Bnuc1 (Mutamoto et al., 1999)、道管形成時のトラチェリーエレメント分化におけるプログラム細胞死に関与することが知られているヒヤクニチソウの ZEN1 (Ito and Fukuda 2002)、胚乳の分解時に誘導されるプログラム細胞死に関与する BEN1 (Aoyagi et al., 1998) などが報告されている。興味深いことに、これまでに明らかになっている植物の細胞死プロセスに関与するヌクレアーゼは全て S1 タイプのヌクレアーゼファミリーのメンバーである。ところが、本研究で過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化を引き起こす IREN は S1 ヌクレアーゼファミリーとは別の EEP スーパーファミリーに分類される。このことは、過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化は他の形態形成時に認められる核 DNA の断片化とは異なる制御を受けている可能性があることを示している。いずれにしても、EEP スーパーファミリーに分類されるヌクレアーゼが植物の細胞死に関与することは今回初めて明らかになったことであり、今後詳細な活性化機構などについて解析を行う必要性があるであろう。

本研究において、イネ培養細胞に *A. avenae* の非病原性 N1141 菌株を接種したときに、明瞭な核 DNA の 180 bp 単位におけるラダー化が認められた。この様な DNA のラダー化はササゲにさび病菌を接種した時に認められる過敏感細胞死においても認められている (Reyson and Heath 1996)。一方、タバコの植物体にタバコモザイクウイルスを接種した時に認められる過敏感細胞死では、DNA の断片化は確認されたが、ヌクレオソーム単位での分解は認められなかった。この様な違いが、過敏感細胞死を誘導する病原菌の違いに由来するのか、または、植物種に由来するのかについては現在のところ明らかになっていないが、過敏感細胞死誘導時に認められる核 DNA の断片化は同じ種類のヌクレアーゼによるのではなく、それぞれ異なるヌクレアーゼによって引き起こされている可能性がある。

イネ培養細胞での過敏感細胞死では核 DNA がオリゴヌクレオソーム単位で分解されていることはヌクレオソーム間のリンカー部分で分解が起きていることを示している。このことは、この DNA 分解に関与するヌクレアーゼは二本鎖 DNA をエンドで分解する能力を持たなければいけない。IREN は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 存在下で二本鎖 DNA を切断することが本研究で確認されているので (Fig. 2-12)、イネの過敏感細胞死誘導時に認められるオリゴヌクレオソーム単位での DNA の分解を引き起こす十分な能力を有するであろう。一方、これまで他の細胞死において DNA の分解に関与することが明らかになっている ZEN1 や BEN1 は S1 タイプのヌクレアーゼであり、このタイプは一本鎖 DNA を切断するが、二本鎖 DNA は切断できないことが知られている。このことは、

ZEN1 や BEN1 が関与する核 DNA の断片化ではリンカー部分の切断が起きないため、核 DNA のオリゴヌクレオソーム単位での分解は起きないのかもしれない。今回、リコンビナント IREN による環状のベクター分解ではオリゴヌクレオソーム単位での分解は観察されなかった (Fig. 2-12)。これは、ベクターはヒストンに巻き付いた構造をとっていないため、リンカー部分の優先的な分解が起きなかったためと思われる。今後、植物のクロモソームを用いた IREN 分解実験を行い、IREN が実際にヌクレオソーム単位での分解を引き起こすかどうかを調べる必要がある。

IREN は C 末端領域に一つの EF-hand motif を持つ。この EF-hand motif はヘリックス-ループ-ヘリックスで構成されており、ループ部分は 12 残基から構成されている。EF-hand motif のループ部分に Ca^{2+} が結合すると、タンパク質自体に大きな立体構造変化が起き、内側に存在していた疎水性部分が外部に露出し、この部分を介して他のタンパク質と相互作用することが可能となる。機能的な EF-hand motif の多くは、ループの 1 残基目のアスパラギン酸と 12 残基目のグルタミン酸が高度に保存されていることが示されている (Tuteja and Mahajan 2007)。IREN に存在する EF-hand motif のループ部分も 1 残基目がアスパラギン酸で 12 残基目がグルタミン酸で構成されている (Fig. 2-20)。このことから、IREN に存在する EF-hand motif は機能的であり、 Ca^{2+} と EF-hand motif との結合により大きな立体構造変化を引き起こすことで活性化すると考えられる。

真核生物のヌクレアーゼは DNA の制限分解、修復、組換え、転位、プログラム細胞死などの様々なプロセスに関与している。特に、植物のヌクレアーゼは触媒作用の特徴や要求する金属イオンの種類などによりいくつかのグループに分類される。特に、植物のエンドヌクレアーゼには Zn^{2+} 依存タイプと Ca^{2+} 依存タイプで大別され (Sanchez and Vicent 2013)、それ以下のサブグループとして Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} を含むその他のイオンによって活性化されるヌクレアーゼグループに分けられる。これらのヌクレアーゼの中で、 Zn^{2+} 依存ヌクレアーゼ (Type I や S1 type ヌクレアーゼ) は比較的、よく研究されている。このタイプには RNA や解離した DNA を効率的に分解する 30 から 45 kDa の分子量で、中性で最大活性を示す酵素が含まれており、植物においては ZEN1 や BEN1、ENDO2 のような Zn^{2+} 依存ヌクレアーゼがよく知られている。近年、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依存のヌクレアーゼとして分類される CaMNU32 が報告された (Sanchez and Vicent 2013)。CaMNU32 の活性は、 Ca^{2+} または Mg^{2+} のみでは弱い、 Ca^{2+} と Mg^{2+} 両方の存在下では最大活性を示す。また、CaMNU32 の活性は Zn^{2+} や低い pH によって阻害される (Jiang et al. 2008)。他にも Ca^{2+} と Mg^{2+} 依存型のヌクレアーゼがいくつか報告されている。例えば、イネの OsCyt20 は pH7 付近で高い活性を示し、 Zn^{2+} によって阻害される $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依存のヌクレアーゼである (Dominguez and Cejudo 2006)。 Zn^{2+} によって活性が阻害される

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依存のヌクレアーゼもまた、プログラム細胞死が誘導されたコムギ穀粒の珠心細胞から同定されており、また、分子量が 28kDa 程度の同じ特徴をもつヌクレアーゼがウシ胸腺クロマチンから単離されている (Nikonova et al., 1989)。シロイヌナズナの CAN1 や CAN2 は中性付近で最大活性を有し、一本鎖 DNA や二本鎖 DNA と RNA を分解する Ca^{2+} 依存性ヌクレアーゼである (Lesniewicz et al., 2012)。IREN は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} それぞれ単独の存在下ではわずかな活性しか示さないが、 Ca^{2+} と Mg^{2+} または Ca^{2+} と Mn^{2+} の両方の存在下では高い活性を示した (Fig. 2-12)。さらに、IREN の活性は Zn^{2+} によって阻害され、二本鎖 DNA を分解した。IREN のそれらの特徴は、典型的な $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依存ヌクレアーゼとよく似ている。しかし、IREN は、EEP スーパーファミリーとして分類され、EF-hand モチーフを含むことを考えると、IREN は、過敏感細胞死に関与する EF-hand モチーフを有するヌクレアーゼとして新規のエンドヌクレアーゼであるといえるだろう (Fig. 2-19)。IREN はイネにおいて EF-hand モチーフをもった唯一のヌクレアーゼであることから、IREN は過敏感細胞死に特化したユニークな特徴をもつヌクレアーゼであると考えられる。

過敏感細胞死が誘導されたイネ培養細胞において、効果的な DNA 分解は、*A. avenae* N1141 菌株を接種して 12 時間後に観察された (Fig. 2-1)。対照的にエバンスブルー染色によって検出できる過敏感細胞死は菌を接種して 4 時間以降に観察された (Fig. 1-1)。これらのデータは、核 DNA の分解は過敏感細胞死誘導の後期ステージで起こっていることを示す。また、イネ細胞内での IREN の一過的な過剰発現は DNA 分解を引き起こすが、エバンスブルーでの染色が認められる細胞膜透過性の喪失を誘導しなかった (Kaneda et al., 2009)。タバコの細胞に TMV を接種した場合も、過敏感細胞死に付随する DNA 分解は細胞死誘導の後期ステージで起こっているように見える (Mittler and Lam 1995)。以上のことは、DNA 分解イベントが *A. avenae* N1141 菌株によって誘導された過敏感細胞死の直接的なトリガーでなく、過敏感細胞死の比較的下流で起きる現象の一部であることを示している。興味深いことに、酵母で IREN を発現させると細胞生育の抑制が観察された。これは、IREN による DNA の分解が遺伝子発現やタンパク質合成、代謝を低下させることを示している。以上のことから、IREN の過剰発現による DNA 分解はプログラム細胞死の直接的なトリガーにはならないが、IREN による DNA 分解は最終的には細胞生育の抑制を引き起こすと考えられる。

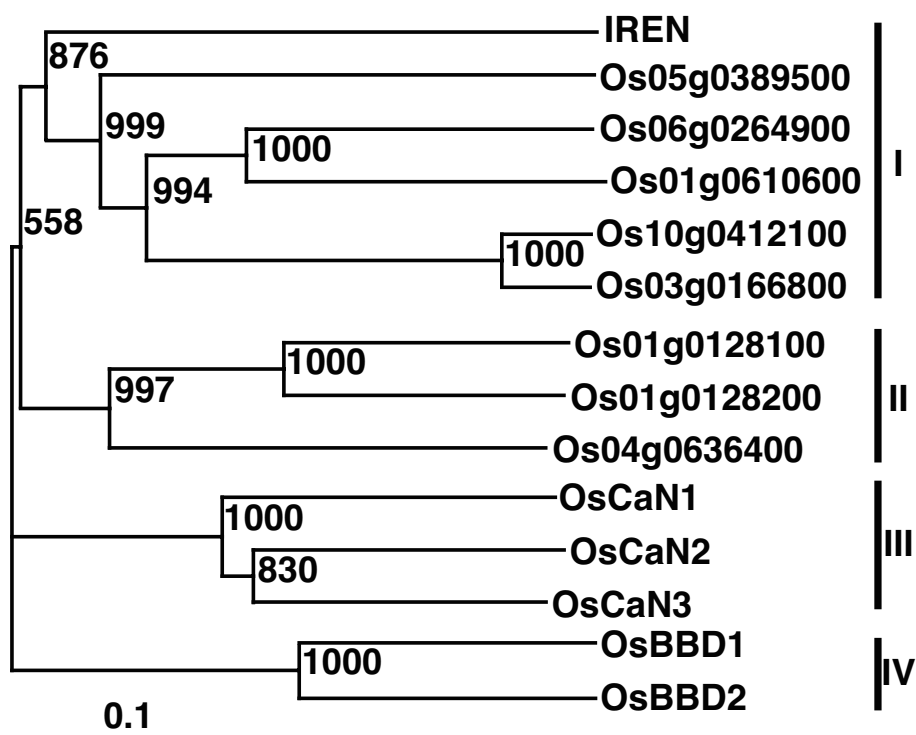


Fig. 2-19

イネのヌクレアーゼの分子系統樹

NCBI データーベースから得た IREN タンパク質を含む推定のヌクレアーゼタンパク質と IREN ホモログタンパク質での分子系統樹を作成した。得られた各タンパク質のアミノ酸配列のマルチプルアライメントを ClustalW2 プログラムを用いて作成し、分子系統樹は Tree View で描出した。分子系統樹推定法は、近隣結合法 (neighbor joining method, N-J 法) であり、確率計算はブートストラップ (繰り返し回数: 1000 回) 法を使用している。(I) グループは EEP (exonuclease/endonuclease/phosphatase) ファミリーに属する。(II) グループは S1-P1 ヌクレアーゼファミリーであるシロイヌナズナの Bi-Functional Nuclease (BFN1) /ENDO1 のホモロジータンパク質が属している。(III) グループはトチュウの EuCaN1/CaN2 のホモロジーであり、staphylococcal nuclease (SNase) domain をもつものが属する。(IV) グループは BFN ファミリーとは異なり basal な防御応答に関与する *Oryza minuta* の bifunctional nuclease (OmBBD) のホモロジータンパク質が属する。

A

	360	370	380	390	400	410	420
IREN seq	LGMVHPDRLN	SEIKDLWSEADHDGDDIVDYKEFQRCI	WSPTCCSQEEEDDTEIDISDGLVTFEANDEA				
DSC	cccccccccc	hhhhhhhh	cccccc	hhhhhhhh	cccccccccccccccc	eeeecccc	eeeecccc
MLR	cccccccccc	hhhhhhhh	cccccc	eehhhhhh	cccccccccccccccc	eeeecccc	eeeecccc
PHD	cccccccccc	hhhhhhhh	cccccc	hhhhhhhh	cccccccccccccccc	eeeecccc	eeeecccc
Sec. Cons.	cccccccccc	hhhhhhhh	cccccc	hhhhhhhh	cccccccccccccccc	eeeecccc	eeeecccc

B

E n * * n n * * n x * y * Z G -Y I -X * * -Z n * * n n * * n
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
 -----Helix E----- -----Loop----- -----Helix F-----

C

Consensus sequence	X * Y * Z * -Y* -X* * -Z
CCaMK EF-hand 0 (<i>Medicago truncatula</i>)	D R D N A T L S E F E E
CCaMK EF-hand 1 (<i>Medicago truncatula</i>)	D N N R D G T V D M R E
CCaMK EF-hand 2 (<i>Medicago truncatula</i>)	D T D R S G C I S K E E
CCaMK EF-hand 3 (<i>Medicago truncatula</i>)	D A N N D G K V T F D E
IREN EF-hand (<i>Oryza sativa</i>)	D H D G D D I V D Y K E
	-----Loop(12aa)-----

Fig. 2-20

IREN の分子内に存在する EF-hand motif の二次構造予測と loop 領域の解析

A. 二次構造予測サイト (NPS@: Network protein Sequence Analysis (Combet et al., 2000)) により、IREN の分子内に存在する EF-hand モチーフの二次構造予測を行った結果を示す。この図に示す IREN のアミノ酸配列は EF-hand motif が含まれる 360-430 番目までの領域である。h: Alpha helix、c: Random coil、e: Extended strand、赤枠: EF-hand motif を示す。B. EF-hand motif の helix-loop-helix の配列パターンを示す。高度に保存された 29 アミノ酸残基から構成されており、α helix E (1-10 残基目)、loop (10-21 残基目)、α-helix F (19-29 残基目) の構造をとる。E: グルタミン酸、n: 疎水性アミノ酸残基、*: 介在するアミノ酸残基、x: 1 番目のカルシウムリガンド、y: 2 番目のカルシウムリガンド、Z: 3 番目のカルシウムリガンド、G: グリシン、-Y: 4 番目のカルシウムリガンド、I: イソロイシン、-X: 5 番目のカルシウムリガンド、-Z: 6 番目と 7 番目のカルシウムリガンド (グルタミン酸残基または、アスパラギン酸残基) を示す。C. *M. truncatula* CCaMK の分子内に存在する 4 つの EF-hand motif 内の loop 領域と IREN の EF-hand motif 内の loop 領域との配列比較。12 アミノ酸残基からなる loop の配列パターンでは、X (D), Y (D), Z (D), -Y (K), -X (D), -Z (E) であり、*は介在するアミノ酸残基を示す。

参考文献

- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., Tasaka, M. (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*.9: 841-857.
- Agrios, G.N. (1997) How pathogens attack plants. In *Plant Pathology*, 4th ed. Edited by Agrios G.N. pp. 66-72. Academic Press, Sandiego.
- Aoyagi S, Sugiyama M and Fukuda H. (1998) BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett.* 429: 134-138.
- Arends M.J, Morris R.G and Wyllie A.H. Apoptosis. (1990) The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136: 593-608.
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A. (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res.* 23: 517-32.
- Brodsky, J.L. (2007) The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation) . *Biochem J.* 404: 353-363.
- Carmona-Gutierrez D, Fröhlich K.U, Kroemer G and Madeo F. (2010) Metacaspases are caspases. Doubt no more. *Cell Death Differ.* 17: 377-378.
- Cenci U, Chabi M, Ducatez M, Tirtiaux C, Nirmal-Raj J, Utsumi Y, Kobayashi D, Sasaki S, Suzuki E, Nakamura Y, Putaux JL, Roussel X, Durand-Terrasson A, Bhattacharya D, Vercoutter-Edouart AS, Maes E, Arias MC, Palcic M, Sim L, Ball SG, Colleoni C. (2013) Convergent evolution of polysaccharide debranching defines a common mechanism for starch accumulation in cyanobacteria and plants. *Plant Cell.* 10: 3961-75.

Che, F.S., Iwano, M., Tanaka, N., Takayama, S., Minami, E., Shibuya, N., Kadota, I. and 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.

Chen H.M, Pang Y, Zeng J, Ding Q, Yin S.Y, Liu C, Lu M.Z, Cui K.M and He X.Q. (2012) The Ca^{2+} -dependent DNases are involved in secondary xylem development in *Eucommia ulmoides*. *J Integr Plant Biol.* 54: 456-470.

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.

Chong, Z.Z., Li, F., Maiese, K. (2005) Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res.* 2: 387-399.

Christensen, A.H., Quail, P.H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5: 213-218.

Coffeen, W.C., Wolpert, T.J. (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell.* 16: 857-873.

Collinge, M., Boller, T. (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol. Biol.* 46: 521-529.

Coll N.S, Eppe P and Dangl J.L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 18: 1247-1256.

Corbin DR, Sauer N, Lamb CJ. (1987) Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol Cell Biol.* 7: 4337-44.

Cornejo M.J, Luth D, Blankenship K.M, Anderson O.D and Blechl A.E. (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol.* 23: 567-581.

Dangl J.L and Jones J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411: 826-833.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Richberg, M.H. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell.* 8: 1793-1807.

Delessert C, Kazan K, Wilson IW, Van Der Straeten D, Manners J, Dennis ES, Dolferus R. (2005) The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. *Plant J.* 43: 745-57.

Dixon J, Gladwin AJ, Loftus SK, Riley JH, Perveen R, Wasmuth JJ, Anand R, Dixon MJ. (1994) A YAC contig encompassing the Treacher Collins syndrome critical region at 5q31.3-32. *Am J Hum Genet.* 55: 372-8.

Dominguez F and Cejudo F.J. (2006) Identification of a nuclear-localized nuclease from wheat cells undergoing programmed cell death that is able to trigger DNA fragmentation and apoptotic morphology on nuclei from human cells. *Biochem J.* 397: 529-36.

Dong, A., Liu, Z., Zhu, Y., Yu, F., Li, Z., Cao, K., Shen, W.H. (2005) Interacting proteins and differences in nuclear transport reveal specific functions for the NAP1 family proteins in plants. *Plant Physiol.* 138: 1446-1456

Enoksson M and Salvesen G.S. (2010) Metacaspases are not caspases-always doubt. *Cell Death*

Differ. 17: 1221.

Felix G1, Duran JD, Volko S, Boller T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18: 265-76.

Geske F.J and Gerschenson L.E. (2001) The biology of apoptosis. *Hum Pathol.* 32: 1029-1038.

Goff, SA, Ricke, D, Lan, TH, Presting, G, Wang, R, Dunn, M, Glazebrook, J, Sessions, A, Oeller, P, Varma, H, Hadley, D, Hutchison, D, Martin, C, Katagiri, F, Lange, BM, Moughamer, T, Xia, Y, Budworth, P, Zhong, J, Miguel, T, Paszkowski, U, Zhang, S, Colbert, M, Sun, WL, Chen, L, Cooper, B, Park, S, Wood, TC, Mao, L, Quail, P, Wing, R, Dean, R, Yu, Y, Zharkikh, A, Shen, R, Sahasrabudhe, S, Thomas, A, Cannings, R, Gutin, A, Pruss, D, Reid, J, Tavtigian, S, Mitchell, J, Eldredge, G, Scholl, T, Miller, RM, Bhatnagar, S, Adey, N, Rubano, T, Tusneem, N, Robinson, R, Feldhaus, J, Macalima, T, Oliphant, A, Briggs, S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) . *Science.* 296: 92-100.

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.

Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A and Mansfield J. (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 23: 441-450.

Greenberg JT. (1997) PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:525-545.

Greenberg, J.T., Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 6: 201-211.

Guo Y, Gan S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* 46: 601-12.

Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nürnberger T. (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J Biol Chem.* 282: 32338-32348.

Hara-Nishimura I, Hatsugai N. (2011) The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ.* 18: 1298-1304

Hara-Nishimura I, Matsushima R, Shimada T, Nishimura M. (2004) Diversity and formation of endoplasmic reticulum-derived compartments in plants. Are these compartments specific to plant cells? *Plant Physiol.* 136: 3435-3439.

Hara-Nishimura I, Takeuchi Y, Nishimura M. (1993) Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell.* 5: 1651-1659.

Harmon A.C. (2003) Calcium-regulated protein kinase of plants. *Gravit Space Biol Bull.* 16: 83-90.

Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, Kondo M, Fuji K, Ogasawara K, Nishimura M, Hara-Nishimura I. (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev.* 23: 2496-2506.

Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced

hypersensitive cell death. *Science*. 305: 855-858.

Hayashi E, Kuramitsu Y, Fujimoto M, Zhang X, Tanaka T, Uchida K, Fukuda T, Furumoto H, Ueyama Y, Nakamura K. (2009) Proteomic profiling of differential display analysis for human oral squamous cell carcinoma: 14-3-3 σ Protein is upregulated in human oral squamous cell carcinoma and dependent on the differentiation level. *Proteomics Clin Appl*. 3: 1338-1347.

Heath MC. (1997) Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. In: Carrol GC, Tudzynski P (eds) , *The Mycota, Vol. V Part B*, pp.257-276. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Heath M.C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*. 44: 321-334.

He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. (2005) AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J*. 44: 903-916.

He, S.Y., Huang, H.C. and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{ps}: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*. 73:1255-1266.

Hicks, G.R., Smith, H.M., Shieh, M., Raikhel, N.V. (1995) Three classes of nuclear import signals bind to plant nuclei. *Plant Physiol*. 107: 1055-1058.

Hu S, Zhao H, Al-Humadi NH, Yin XJ, Ma JK. (2006) Silica-induced apoptosis in alveolar macrophages: evidence of in vivo thiol depletion and the activation of mitochondrial pathway. *J Toxicol Environ Health A*. 69: 1261-1284.

Igarashi D, Ishida S, Fukazawa J, Takahashi Y. (2001) 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *Plant Cell*. 13: 2483-97.

Ishida S, Yuasab T, Nakatac M, Takahashic Y. (2008) A Tobacco Calcium-Dependent Protein Kinase, CDPK1, Regulates the Transcription Factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in Response to Gibberellins. *Plant Cell*. 20: 3273-3288.

Ishiguro, S., Watanabe, Y., Ito, N., Nonaka, H., Takedad, N., Sakai, T., Kanaya, H., Okada, K. (2002) SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *EMBO J*. 21: 898-908.

Ito, J., Fukuda, H. (2002) ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell*. 14: 3201-3211.

Jakoby M1, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F; bZIP Research Group. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*. 7:106-11.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi A.K and Khurana J.P. (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 345: 646-651.

Jeong JS, Kim YS, Redillas MC, Jang G, Jung H, Bang SW, Choi YD, Ha SH, Reuzeau C, Kim JK. (2013) OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnol J*. 11: 101-114.

Jiang A.L, Cheng Y, Li J and Zhang W. (2008) A zinc-dependent nuclear endonuclease is responsible for DNA laddering during salt-induced programmed cell death in root tip cells of rice. *J Plant Physiol*. 165: 1134-1141.

Johnson, L.N., O'Reilly, M. (1996) Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol.* 6: 762-769.

Jones JD, Dangl JL. (2006) The plant immune system. *Nature.* 16: 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, I., Ohuchi, A. (1990) Symptoms and ecology of bacterial brown stripe of rice. *Japan. Agricultural Research Quarterly*, 24: 15-21.

Kadota, I., Ohuchi, A., Nishiyama, K. (1991) Serological properties and specificity of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 pathogenic to rice. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57: 268-273.

Kagaya, Y., Hodo, T., Murata, M., Ban, A., Hattori, T. (2002) Absciscic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell.* 14: 3177-3189.

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.

Kaminaka, H., Nake, C., Eppe, P., Dittgen, J., Schutze, K., Chaban, C., Holt, B.F. 3rd, Merkle, T., Schafer, E., Harter, K., Dangl, J.L. (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J.* 25: 4400-4411.

Kaneda, T., Fujiwara, S., Takai, R., Takayama, S., Isogai, A., Che, F.S. (2007) Identification of

genes involved in induction of plant hypersensitive cell death. *Plant Biotech.* 24: 191-200.

Kaneda T, Taga Y, Takai R, Iwano M, Matsui H, Takayama S, Isogai A and Che (2009) F.S. The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *EMBO J.* 28: 926-936.

Kikuchi, K., Ueguchi, Tanaka, M., Yoshida, K.T., Nagato, Y., Matsusoka, M., Hirano, H.Y. (2000) Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Mol. Gen. Genet.* 262: 1047-1051.

Kitagaki H, Araki Y, Funato K and Shimoi H. (2007) Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett.* 581: 2935-2942.

Kjaersgaard T, Jensen MK, Christiansen MW, Gregersen P, Kragelund BB, Skriver K. (2011) Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced cell death 1 through a disordered regulatory domain. *J Biol Chem.* 286: 35418-29.

Krishna, P., Gloor, G. (2001) The HSP90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones.* 6: 238-246.

Kroemer G and Martin S.J. (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 11: 725-730.

Kutuk, O., Basaga, H. (2006) Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis.* 11: 1661-1675

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.

- Lacomme C, Santa Cruz S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 7956-7561.
- Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 305-315.
- Lehmann S, Serrano M, L'Haridon F, Tjamos S.E and Metraux J.P. (2015) Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*. 112: 54-62.
- Lesniewicz K, Karlowski W.M, Pienkowska J.R, Krzywkowski P and Poreba E. (2013) The plant S1-like nuclease family has evolved a highly diverse range of catalytic capabilities. *Plant Cell Physiol*. 54: 1064-1078.
- Lesniewicz K, Poręba E, Smolarkiewicz M, Wolff N, Stanislawski S and Wojtaszek P. (2012) Plant plasma membrane-bound staphylococcal-like DNases as a novel class of eukaryotic nucleases. *BMC Plant Biol*. 12: 195-214.
- Levine, A, Pennell, R.I, Alvarez, M.E, Palmer, R, Lamb, C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol*. 6: 427-37.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79: 583-593.
- Li L.Y, Luo X and Wang X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412: 95-99.
- Maiese, K., Li, F., Chong, Z.Z. (2004) Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci*. 25: 577-583.

Mansfield, J.W., Bennett, M.H., Bestwick, C.S., Woods-Tor, A.M. (1997) Phenotypic expression of gene-for-gene interaction involving fungal and bacterial pathogens variation from recognition to response. In: I.R. Crute, J.J. Burden and E.B. Holub, Editors, *The Gene-for-Gene Relationship in Host-Parasite Interactions*, CAB International, London, UK 265-291.

McCabe P.F, Levine A, Meijer P.J, Tapon N.A and Pennell R.I. (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* 12: 267-280.

Mesner P.W Jr, Budihardjo I.I and Kaufmann S.H. (1997) Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol.* 41: 461-499.

Miki D and Shimamoto K. (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 490-495.

Mittler, R., Lam, E. (1995) Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell.* 7: 1951-1962.

Mould M.J.R., Heath MC. (1999) Ultrastructural evidence of differential changes in transcription, translation, and cortical microtubules during in planta penetration of cells resistant or susceptible to rust infection. *Physiol. mol. plant pathol.* 55: 225-236.

Mukae N, Yokoyama H, Yokokura T, Sakoyama Y, Sakahira H and Nagata S. (2000) Identification and developmental expression of inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 275: 21402-21408.

Mur LA, Aubry S, Mondhe M, Kingston-Smith A, Gallagher J, Timms-Taravella E, James C, Papp I, Hörtensteiner S, Thomas H, Ougham H. (2010) Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*.

New Phytol. 188: 161-174.

Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? J Exp Bot. :501-20.

Muthamilarasan M, Prasad M. (2013) Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. J Biosci. 38: 433-449.

Nakai K and Kaneshita M. (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. Genomics. 14: 897-911.

Nakashima, K., Tran, L.S., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. Plant J. 51: 617-630.

Nishikawa, S., Brodsky, J.L., Nakatsugawa, K. (2005) Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD) . J biochem. 137: 551-555.

Nishiyama, K., Nishihara, N., Ezuka, A. (1979) Bacterial brown stripe of ragi caused by *Pseudomonas alboprecipitans*. Ann. Phytopathol. Soc Jpn. 45: 25-31.

Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S. (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. Gene. 465: 30-44.

Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K. (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends Plant Sci. 10: 79-87.

Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., Kikuchi, S. (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 10: 239- 247.

Park SY, Yu JW, Park JS, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HJ, Jeon JS, Park YI, Paek NC. (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell.* 19: 1649-1664.

Perez-Amador M.A, Abler M.L, De Rocher E.J, Thompson D.M, van Hoof A, LeBrasseur N.D, Lers A and Green P.J. (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 169-180.

Puranik S, Sahu PP, Srivastava PS, Prasad M. (2012) NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 17 :369-381.

Ryerson D.E and Heath M.C. (1996) Cleavage of Nuclear DNA into Oligonucleosomal Fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* 8: 393-402.

Ryu H, Cho H, Kim K, Hwang I. (2010) Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol Cell.* 29 :283-290.

Sakamoto W and Takami T. (2014) Nucleases in higher plants and their possible involvement in DNA degradation during leaf senescence. *J Exp Bot.* 65: 3835-3843.

Sanchez-Pons N and Vicient C.M. (2013) Identification of a type I $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease induced in maize cells exposed to camptothecin. *BMC Plant Biol.* 13: 186-194.

Schiestl R.H. and Gietz R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* 16: 339-346.

Shen H, Cao K, Wang X. (2008) AtbZIP16 and AtbZIP68, two new members of GBFs, can interact with other G group bZIPs in *Arabidopsis thaliana*. *BMB Rep.* 41: 132-138.

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: 1143-1157

Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 9: 459-470.

Snyman, M., Cronje, M.J. (2008) Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *J Exp Bot.* 59: 2125-2132.

Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., Koes, R. (1996) The *no apical meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell.* 85: 159-170.

Sun L, Zhang H, Li D, Huang L, Hong Y, Ding XS, Nelson RS, Zhou X, Song F. (2013) Functions of rice NAC transcriptional factors, ONAC122 and ONAC131, in defense responses against *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol Biol.* 81: 41-56.

Sun W, Cao Y, Jansen Labby K, Bittel P, Boller T, Bent AF. (2012) Probing the *Arabidopsis* flagellin receptor: FLS2-FLS2 association and the contributions of specific domains to signaling function. *Plant Cell.* 24: 1096-1113.

Taiyoji M, Shitomi Y, Taniguchi M, Saitoh E, Ohtsubo S. (2009) Identification of proteinaceous inhibitors of a cysteine proteinase (an Arg-specific gingipain) from *Porphyromonas gingivalis* in rice grain, using targeted-proteomics approaches. *J Proteome Res.* 8: 5165-74

Takabatake, B., Ando, Y., Seo, S., Katou, S., Tsuda, S., Ohashi, Y., Mitsuhashi, I. (2007) MAP

kinases function downstream of HSP90 and upstream of mitochondria in TMV resistance gene N-mediated hypersensitive cell death. *Plant Cell Physiol.* 48: 498-510.

Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., Shirasu, K. (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*

Takai R, Kaneda T, Isogai A, Takayama S. and Che F.S. (2006) A new method for defense response analysis using a transient expression system in rice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71: 590-593.

Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics.* 284: 173-183.

Tan, N.Y., Midgley, V.C., Kavurma, M.M., Santiago, F.S., Luo, X., Peden, R., Fahmy, R.G., Berndt, M.C., Molloy, M.P., Khachigian, L.M. (2008) Angiotensin II-inducible platelet-derived growth factor-D transcription requires specific Ser/Thr residues in the second zinc finger region of Sp1. *Circ Res.* 102: 38-51.

Tanaka, N., Nakajima, Y., Kaneda, Takayama, S., Che, F.S., Isogai, A. (2001) DNA laddering during hypersensitive cell death in cultured rice cells induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae*. *Plant Biotech.* 18: 295-299.

Tian D, Wang J, Zeng X, Gu K, Qiu C, Yang X, Zhou Z, Goh M, Luo Y, Murata-Hori M, White F.F. and Yin Z. (2014) The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell.* 26: 497-515.

Torii, K.U. (2000) Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging

picture. *Curr Opin Plant Biol.* 3: 361-367.

Torres MA, Dangl JL, Jones JD. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 517-522.

Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD. (1998) Six Arabidopsis thaliana homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox) . *Plant J.* 14: 365-370.

Toyozo Sato. (2013) Plant diseases and their pathogenic microbes in Japan. Genetic Resources Center, National Institute of Agrobiological Sciences 2-1-2 Kannondai, Ibaraki 305-8602, Japan

Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell.* 16: 2481-2498.

Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, Aubourg S, Rameau C, Caboche M and Bendahmane A. (2007) Characterization of Arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J.* 51: 1116-1125.

Tuteja N and Mahajan S. (2007) Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant Signal Behav.* 2: 79-85.

Vert G, Chory J. (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature.* 441: 96-100.

Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C., Kerr, J.F. (1988) Patterns of cell death. *Method Achiev Exp Pathol.* 13: 15-54.

Wang X, Basnayake BM, Zhang H, Li G, Li W, Virk N, Mengiste T, Song F. (2009) The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* 22: 1227-1238.

Wang H, Li J, Bostock R.M and Gilchrist D.G. (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell.* 8: 375-391.

Wang, J., Shi, H., Mao, X., Runzhi, L. (2006) Transcription factors networks and their roles in plant responses to environmental stress. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 17: 1740-1746.

Wellmer, F., Kircher, S., Rugner, A., Frohnmeier, H., Schafer, E., Harter, K. (1999) Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by light. *J Biol Chem.* 274: 29476-29482.

Weltmeier F, Rahmani F, Ehlert A, Dietrich K, Schütze K, Wang X, Chaban C, Hanson J, Teige M, Harter K, Vicente-Carbajosa J, Smeeckens S, Dröge-Laser W. (2009) Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol.* 69: 107–119.

Wu A, Allu AD, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanol MI, Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S, Antonio C, Tohge T, Fernie AR, Kaufmann K, Xue GP, Mueller-Roeber B, Balazadeh S. (2012) JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC

transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. *Plant Cell*. 24: 482-506.

Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N.H. (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*. 14: 3024-3036.

Xie, Q., Guo, H.S., Dallman, G., Fang, S., Weissman, A.M., Chua, N.H. (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature*. 419: 167-170.

Xu, H., Heath, M.C. (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell*. 10: 585-598.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., Harrison, S.C. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*. 3: 629-638.

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, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C.M., Smalle, J., Ju, Y.M. and Vierstra, R.D. (2004) Purification of the Arabidopsis 26S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J. Biol.Chem*. 279: 6401–6413.

Yao, N., Tada, Y., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. (2001) Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats. *Plant J*. 28: 13-26.

Yokotani N, Tsuchida-Mayama T, Ichikawa H, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Kaku H, Minami E, Nishizawa Y. (2014) OsNAC111, a blast disease-responsive transcription factor in rice, positively regulates the expression of defense-related genes. *Mol Plant Microbe Interact.* 27: 1027-34.

Yoshida K, Wakamatsu S, Sakuta M. (2008) Characterization of SBZ1, a soybean bZIP protein that binds to the chalcone synthase gene promoter. *Plant Biotechnology* 25: 131-140.

Yoshii M, Yamazaki M, Rakwal R, Kishi-Kaboshi M, Miyao A, Hirochika H. (2010) The NAC transcription factor RIM1 of rice is a new regulator of jasmonate signaling. *Plant J.* 61: 804-815.

You M.K, Shin H.Y, Kim Y.J, Ok S.H, Cho S.K, Jeung J.U, Yoo S.D, Kim J.K and Shin J.S. (2010) Novel bifunctional nucleases, OmBBD and AtBBD1, are involved in abscisic acid-mediated callose deposition in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 152: 1015-1029.

Yu, D., Chen, C. and Chen, Z. (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell.* 13:1527-1540.

Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, Mengiste T, Zhang Y, Zhou JM. (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe.* 7: 290-301

金田隆志 (2007) 植物免疫応答の一つである過敏感細胞死の誘導機構に関する研究. 奈良先端技術大学院大学、博士論文

藤原沙都姫 (2007) イネにおけるフラジェリン認識情報の細胞内伝達機構に関する研究. 奈良先端技術大学院大学、博士論文

多賀有里（2008）植物免疫反応である過敏感細胞死の誘導機構に関する研究

松井弘善（2009）過敏感細胞死を誘導する転写因子 OsNAC4 の核移行制御機構に関する研究

山田康之、佐野浩（1999）遺伝子組換え植物の光と影. 学会出版センター、東京

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、山本 章嗣 教授、山本 博章 教授、齋藤 修 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。そして、長年、副指導をお願い致しました、向 由起夫 准教授には、日頃の研究などご指導を頂きました。謹んでお礼申し上げます。

また、以前に奈良先端大学院大学に所属されておられました金田 隆志 博士には、様々なベクターのご供与して頂きました。謹んで感謝致します。

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 桂木 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、同期の桂木 雄也 博士に感謝申し上げます。そして、同じグループであった、多賀 友里さん、松井 弘善さん、山田 美穂さん、青木 友里さん、若園 貴仁くん、中井 亮太くんにも色々と支えて下さいました。深くお礼申し上げます。

最後に、私を理解して大学院での8年間の研究生生活を快諾して頂き、いつも暖かく見守り、援助して頂いた両親、夫である萩原淳司に深く感謝申し上げます。また、娘の百夏にはいつも笑顔で研究室に送り出してくれたことに感謝します。