

新規エフェクタータンパク質 RHIF による イネ免疫反応誘導機構の解析

中村 みなみ¹・鈴木 愛芽¹・近藤 真千子²・蔡 晃植^{1,2,3}

¹長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科

²長浜バイオ大学バイオサイエンス学部フロンティアバイオサイエンス学科

³長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

要旨

植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株は自身が持つ Type III 分泌装置を介してイネ細胞内に RHIF (Rice HR cell death Induction Factor) というタンパク質を分泌することで過敏感細胞死 (HR cell death) という植物免疫反応を誘導する。RHIF による植物免疫反応の誘導機構を分子レベルで明らかにするため、RHIF と結合するイネタンパク質を Yeast-two hybrid 法と BiFC 法で同定し、同定した RIP1、RIP2、RIP3 タンパク質のイネ欠損株を CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集法で作製した。

1. 植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* イネ非病原性菌株が産生する RHIF と相互作用するイネタンパク質の同定

1. 1 緒言

これまでの我々の研究で、植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* のイネ非病原性 N1141 菌株は Type III 分泌装置¹⁾を介してイネ細胞内にエフェクタータンパク質を分泌することにより過敏感細胞死²⁾を誘導することが明らかになっている³⁾。このような N1141 菌株が持つ HR 細胞死誘導に関与するエフェクターを同定するため、トランスポゾン挿入 N1141 変異株ライブラリーを作製し、これらの中から HR 細胞死を誘導できない菌株を選抜したところ、*Rice HR cell death Induction Factor (RHIF)* と名付けた遺伝子にトランスポゾンが挿入された変異株がイネの過敏感細胞死誘導能を失っていることが示された。RHIF はイネの細胞内に分泌されることから、この受容体またはターゲットタンパク質はイネの細胞内に存在すると考えられる。そこでまず、RHIF と特異的に相互作用するタンパク質を酵母 Two-hybrid 法と BiFC 法で同定することとした。

1. 2 酵母 Two-hybrid 法を用いた RHIF と相互作用するタンパク質の選抜

RHIF と相互作用するイネのタンパク質を選抜するために、まず N1141 菌株のゲノムをテンプレートとして、両末端に *Nde* I サイトを付加した In-Fusion 用プライマーセットを用い、*RHIF* 遺伝子の全長を PCR で増幅させ、In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech) を用いて *Nde* I で処理した *pGBKT7* とライゲーションすることで、*RHIF* 遺伝子全長を組み込んだ Bait ベクターである *RHIF/pGBKT7* を作製した。酵母 Two-hybrid 法に用いる Prey としては、イネに N1141 菌株を接種したイネから抽出した mRNA を用いて作製したイネの cDNA ライブラリーを用いた。このように作製した Bait ベクターと Prey ベクターを用いて酵母 Two-hybrid スクリーニングを行ったところ、Cinnamyl alcohol dehydrogenase (RIP1 : RHIF

-interacting protein 1)、Probable carboxylesterase 15 (RIP2)、Pyruvate decarboxylase 1 (RIP3)と相互作用することが示された。

1. 3 BiFC法によるRHIFとのイネ細胞内での相互作用確認

イネ細胞内における、RHIF全長とRIP1、RIP2、RIP3の全長との相互作用についてBiFC法で調べることにした。まず、RHIFタンパク質がイネ細胞内のどこに局在しているのかを調べるため、RHIFのC末端側に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 (*RHIF-Venus/pBI221*) をイネプロトプラストに導入し、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。その結果、イネ細胞の核と細胞質でVenus由来の蛍光が観察されたことから、RHIF-Venusはイネプロトプラストの核と細胞質に局在することが示された(Fig. 1)。次に、RIP1、RIP2、RIP3タンパク質についてもイネ細胞内のどこに局在しているのかを調べるため、RIP1、RIP2、RIP3のC末端側に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 (*RIP1*、*RIP2*、*RIP3-Venus/pBI221*) をイネプロトプラストに導入し、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。その結果、*RIP1-Venus/pBI221*を導入したイネプロトプラストでは細胞質で、*RIP3-Venus/pBI221*を導入したイネプロトプラストでは核と細胞質でVenus由来の蛍光が観察された。一方、*RIP2-Venus/pBI221*を導入したイネプロトプラストでは蛍光は観察されなかった。このことから*RIP1-Venus*はイネプロトプラストの細胞質に、*RIP3-Venus*はイネプロトプラストの核と細胞質に局在することが示された。

RHIFとRIP1、RIP2、RIP3の細胞内局在が明らかになったので、BiFC法を用いたイネ細胞内での相互作用について調べた。RHIFとVN融合タンパク質を発現するベクター (*RHIF-VN/pBI221*) とRIP1、RIP2、RIP3とVC融合タンパク質を発現するベクター(*RIP1-VC/pBI221*、*RIP2-VC/pBI221*、*RIP3-VC/pBI221*)をそれぞれイネプロトプラストに同時導入し、12時間後、共焦点顕微鏡でVenus由来の蛍光を観察した。その結果、*RHIF-*

*VN/pBI221*と*RIP1-VC/pBI221*を導入したイネプロトプラストでは、細胞質で蛍光が観察された。また、*RHIF-VN/pBI221*と*RIP3-VC/pBI221*を導入したイネプロトプラストでは核と細胞質で蛍光が観察された (Fig. 1)。一方、*RHIF-VN/pBI221*と*RIP2-VC/pBI221*を導入したイネプロトプラストでは蛍光は観察されなかった。以上のことから、RHIFはRIP1、RIP3とイネプロトプラスト内で相互作用することが、RHIFとRIP2は相互作用しないことが示された。

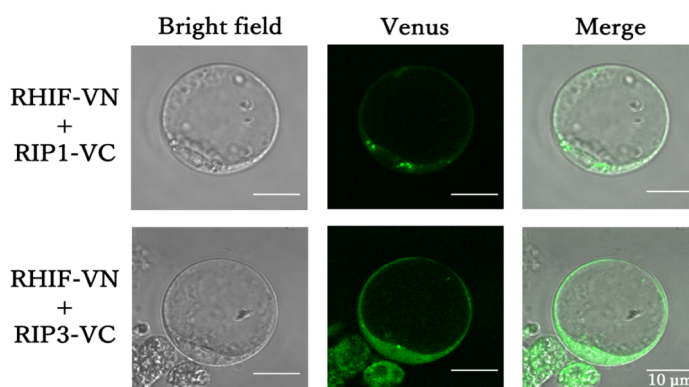


Fig. 1 BiFC法による相互作用解析

RHIFとRIP全長タンパク質の相互作用解析を行うため、RHIFとVN融合タンパク質発現ベクター (*RHIF-VN/pBI221*) とRIP1とVC融合タンパク質発現ベクター(*RIP1-VC/pBI221*、*RIP3-VC/pBI221*)をイネプロトプラストに導入し、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。

2. 新規エフェクターRHIFと相互作用するイネタンパク質RIP1、RIP2、RIP3を欠損したイネ変異体のCRISPR/Cas9法による作製

2. 1 緒言

植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* のイネ非病原性 N1141 菌株がイネ細胞内に分泌する RHIF と相互作用する RIP1、RIP2、RIP3 が実際に RHIF による HR 細胞死誘導に関与するかを明らかにするには、これらタンパク質を欠損したイネ変異体が有用である。植物においては、遺伝子ターゲティング法による特異的遺伝子への変異導入は一般化していないので、化学変異原処理やランダムにベクターを導入する方法などで様々な遺伝子を欠損した変異株を作製し、これらの中から目的遺伝子を欠損している株を選抜して実験に用いるのが主流である。そこで、イネのデータベースを検索したところ、RIP1、RIP2、RIP3 のタンパク質を欠損したイネ変異株は入手できないことが明らかになった。そこで、近年我々が構築した CRISPR/Cas9 法によるイネの特異的遺伝子欠損法を用いて RIP1、RIP2、RIP3 の欠損株を作製することとした。

2. 2 各欠損株作成用ベクターの作製と *Agrobacterium* への導入

ソフトウェア CRISPRdirect により各遺伝子の gRNA 配列を設計した結果、RIP1 遺伝子は 57 と 58、RIP2 遺伝子は 145 と 146、RIP3 遺伝子は 29 と 30 番目の塩基の間を Cas9 により切断するターゲットとすることを決めた (Fig. 2)。設計した gRNA 配列のプライマーとそれに対して相補的な配列のプライマーを作製しそれぞれの 5' 末端に *Bsa* I 配列を付加した。それぞれのプライマーセットのリン酸化とアニーリングを行い、これらを *Bsa* I で消化した *pRGEB31* とライゲーションし *RIP1/pRGEB31*、*RIP2/pRGEB31*、*RIP3/pRGEB31* と名付けたベクターを作製した。このようにして作製した各ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株のコンピテントセルに Gene Pulser Xcell (BIORAD) を用いたエレクトロポレーション法で導入した。

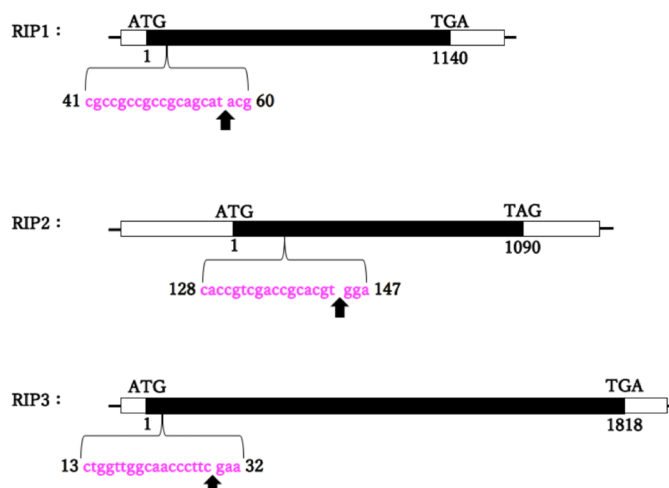


Fig. 2 設計したgRNAの場所と配列

RHIFとCRISPR/Cas9法により候補遺伝子欠損イネを作製するため、CRISPRdirectを用いてgRNAを設計した。設計したgRNA配列は桃色で示す。黒矢印はCas9により切断される部分を示す。白箱は非翻訳領域、黒箱は翻訳領域を示す。

2. 3 イネ形質転換体の作製

イネの金南風品種 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Kinmaze) の種子から米殻を取り除き、超純水で3回洗い、さらに70%エタノール中で3 min 振盪することでイネ種子表面の親水処理を行った後、1%次亜塩素酸ナトリウムに浸し、1時間除菌を行った。このイネ種子を胚が上向きになるように2N6培地に乗せ、30°C、連続光下 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で4週間静置培養し、*Agrobacterium* による感染3日前に前培養培地に移した。

RIP1、*RIP2*、*RIP3/pRGEB31* を導入したアグロバクテリウムのHMFМストック菌体保存液をAB培地に塗抹し、遮光下22°Cで3日間静置培養した後、その一部をアグロバクテリウム感染液体培地に $\text{OD}_{600}=0.01\sim 0.04$ になるように懸濁した。感染当日、前培養培地上のカルスに50 ml チューブに移し、

ここに上記で調整したアグロバクテリウム感染液体培地を 5~6 ml 加え軽く攪拌し、5 min、室温で静置した後、カルスを濾紙の敷いたシャーレに移し、培地を取り除き、感染固体培地に移し遮光下、22°Cで 3 日間静置培養した。感染から 3 日後のカルスを 50 ml チューブに移し、クラフォランの濃度が 250 $\mu\text{l/ml}$ になるように調製した溶液で数回洗浄した後、カルスを濾紙に敷いたシャーレに移し、滅菌水を取り除いた後、細かくほぐしながら一次選抜培地に移し、連続光下、30°Cで 3 週間静置培養した。一次選抜培地上で生育してきたカルスを二次選抜培地に移し、連続光下 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、30°Cで 2 週間静置培養した後、新しい二次選抜培地に移し、同条件で 2 週間さらに静置培養した。生育してきた形質転換体カルスを再分化培地に移し、連続光下 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、30°Cで 3 週間静置培養した。その後、再分化体を発根培地に移し、同条件で 3 週間静置培養することで、形質転換イネ個体を得た。

2. 4 得られたイネ形質転換体における変異導入の確認

得られた再分化イネ植物体において目的の遺伝子に変異しているか調べるため、各植物個体の DNA をテンプレートに、*RIP* 遺伝子周辺に設計したプライマーセットを用いて PCR を行った。増幅断片を Zero Blunt PCR Cloning Kit を用いてクローニングし、それぞれのインサート配列を解析することで、*RIP* 遺伝子の変異の有無を調べた。その結果、*RIP1* についてはクローニングできた 10 個体のうち変異が認められたのは 2 個体だった。そこで、この 2 個体をそれぞれ *RIP1*-2、*RIP1*-9 と名付けた。配列解析の結果、*RIP1*-2、*RIP1*-9 は 57 番目に T が挿入された 1 塩基挿入変異であり、この変異を片方の対立遺伝子で持つヘテロ接合変異体だった (Fig. 3)。この植物体では、この 1 塩基挿入によってフレームシフトが起こり、21 番目のアミノ酸から異なるアミノ酸配列となり、141 番目に終止コドンが出現することから、47 アミノ酸までが翻訳される可能性がある。*RIP2* についてはクローニングできた 7 個体のうち変異が認められたのは 2 個体だったので、この 2 個体をそれぞれ *RIP2*-4、*RIP2*-7 と名付けた。配列解析の結果、*RIP2*-4 では 127 番目に 25 塩基欠損と 133 番目に 10 塩基欠損の二種類の変異が存在することが明らかになり、異なる変異をそれぞれの対立遺伝子で持つ変異体であることが明らかになった (Fig. 3)。25 塩基欠損では、127 番目からフレームシフトが起こ

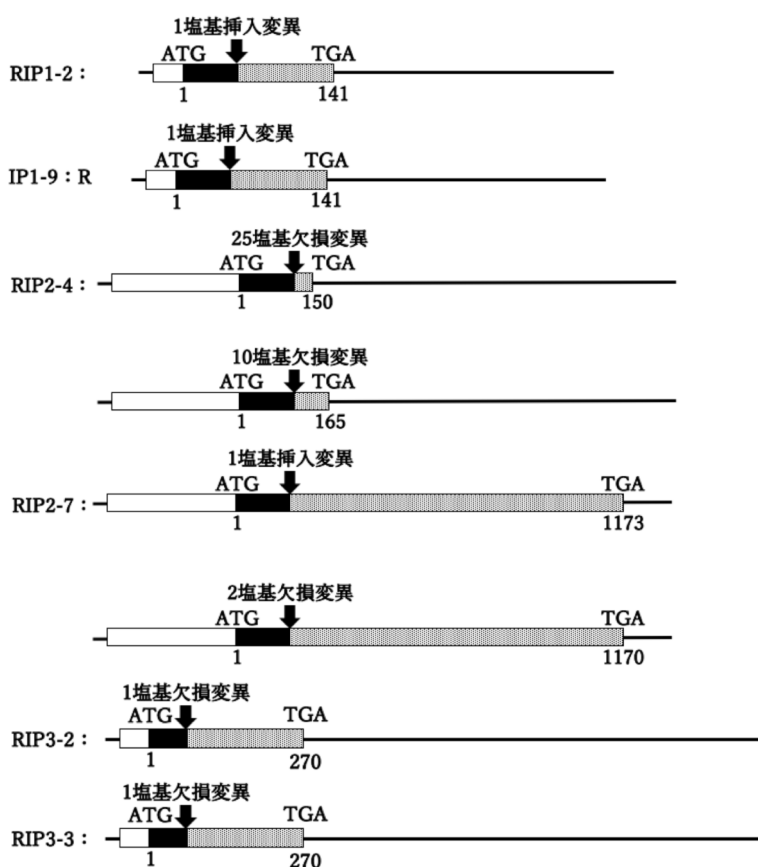


Fig. 3 *RIP* 遺伝子変異株の配列解析

RIP 遺伝子周辺を PCR により増幅し増幅断片をクローニングした後、それぞれのインサート配列を解析した。黒矢印は Cas9 により切断される部分を示す。白箱は非翻訳領域、黒箱は野生型配列の翻訳領域、グレーの箱は変異によりフレームシフトが起こった場合に翻訳されるタンパク質領域を示す。

り、150番目に終止コドンが出現することになり、10塩基欠損した場合もフレームシフトが起きて、165番目で終止コドンが出現する。また、RIP2-7からは145番目にTの1塩基挿入、143番目に2塩基欠損、136番目に9塩基欠損の3種類の配列が得られた (Fig. 3)。1塩基挿入の場合、フレームシフトが起り、1173番目の塩基で終止コドンが出現し、2塩基欠損した場合は1170番目で終止コドンが出現する。RIP3についてはクローニングできた3個体のうち全てに変異が認められたので、この3個体をそれぞれRIP3-1、RIP3-2、RIP3-3と名付けた。配列解析の結果、RIP3-1からは27番目に3塩基欠損、29番目にAの1塩基挿入の2種類の配列が得られた (Fig. 3)。RIP3-2からは29番目にTの1塩基挿入とAの1塩基挿入の2種類の配列が得られ、両方の対立遺伝子に異なる塩基が挿入された変異体であることが示された (Fig. 3)。RIP3-3からは野生型遺伝子の配列と、18番目に15塩基欠失、29番目の1塩基挿入の3種類の配列が得られた (Fig. 3)。1塩基挿入体では、フレームシフトが起り、270番目の塩基で終止コドンが出現する。以上のように、作製した形質転換体ではそれぞれターゲットとしたRIP1、RIP2、RIP3遺伝子に様々な変異が導入されていることが示された。

3. おわりに

Yeast two-hybrid法を用いてRHIFと相互作用するタンパク質を選抜したところ、RIP1、RIP2、RIP3と名付けたタンパク質を同定した。RHIFと相互作用する領域は、RIP1は全長380アミノ酸残基の中でC末端側143アミノ酸残基、RIP2では全長350アミノ酸残基の中で、Alpha/beta hydrolase fold domainの約150アミノ酸残基、RIP3は全長604アミノ酸の中でN-terminal TPP binding domainである約160アミノ酸残基であった。これらは各タンパク質の機能を司る重要な部位であることから、RHIFとの結合によって各タンパク質の機能が損なわれている可能性がある。今後、この結合の意味について詳細に調べる必要があるだろう。

今回、我々が構築したイネ用のCRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集法によってRIP1、RIP2、RIP3の欠損株作製を試みたところ、各遺伝子に変異が導入された変異体がそれぞれ得られた。イネのゲノムにCRISPR/Cas9カセットを導入した形質転換体のうち、RIP2-7とRIP3-3には3種類の変異配列が得られている。イネは二倍体のゲノムを持つので、2種類の配列しか存在しないはずである。3種類以上の配列が認められたのは、カルス再分化の段階において複数の形質転換カルスが集まりモザイクとして再分化してしまったためか、今回はCRISPR/Cas9を恒常的に発現するようにゲノムに組み込んだため、再分化させた後に、一部の細胞において、再度変異が生じた可能性が考えられる。このことから、今回の実験で2種類までの配列しか認められなかった個体でも、ゲノム抽出に用いた植物体の箇所によっては異なる配列が得られる可能性がある。これを確かめるには、形質転換体の様々な場所からゲノムを抽出し、ターゲット遺伝子における変異の確認を行うか、この株の自殖種子を得て、それぞれについてターゲット遺伝子の配列と、ゲノムに組み込んだCRISPR/Cas9の存在を調べなければならない。そして、この変異体を用いてRIP1、RIP2、RIP3のRHIFによる免疫誘導への関与を明らかにするためには、得られた形質転換体を自殖させ、両方の対立遺伝子に変異を持ち、かつCRISPR/Cas9のカセットが抜けた変異体を獲得する必要がある。

参考文献

- 1) Kondo, M., Yoshida, Y., Fujiwara, S., Nakajima, Y., Hirai, H., Takayama, S., Isogai, A., and Che, F. S. Genetic organization of the hrp gene cluster in *Acidovorax avenae* and novel effector proteins that elicit immune responses of rice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 76: 129-138. (2012)
- 2) Kaneda, T., Taga, Y., Takai, R., Iwano, M., Matsui, H., Takayama, S., Isogai, A., Che F. S. The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *EMBO J.* 28: 926-936. (2009)
- 3) Kondo, M., Hirai, H., Furukawa, T., Yoshida, Y., Suzuki, A. and Che, F. S. Frameshift mutation confers function as virulence factor to leucine-rich repeat protein from *Acidovorax avenae*. *Frontiers in Plant Science.* 7: 1-13. (2017)