

博 士 論 文

植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* による
イネ免疫反応の抑制に関する研究

2021 年 3 月

長浜バイオ大学 特別任用助手

氏 名 川口 雄正

目次

目次	2
序論	3
第1章 <i>A. avenae</i> K1 菌株によるイネ PTI 抑制の解析	
緒言	16
材料と方法	17
結果	25
考察	38
第2章 <i>A. avenae</i> K1 菌株によるイネ PTI 抑制に関わる因子の同定	
緒言	42
材料と方法	43
結果	63
考察	90
第3章 AKSF1 によるイネ PTI 反応の抑制機構	
緒言	94
材料と方法	95
結果	107
考察	113
参考文献	115
謝辞	124

序論

現在の地球には、動物界に 777 万種、クロミスタ界に 2 万 7500 種、菌界に 61 万 1000 種、植物界に 29 万 8000 種、原生動物界に 3 万 6400 種の真核生物が存在する (Mora et al., 2011)。一方、真正細菌などの原核生物は通常条件下での培養が不可能な種が多く、その大部分が未知であるために総数の類推が困難であるが、100 万種以上存在すると予想されている。このように地球環境で生息する多数の生物は、生物間の高度に複雑な相互作用の上に成り立つ生態系を構築している。異なる生物種間で認められる相互作用の中でも古くから研究が盛んに行われているのは、動物と微生物間の相互作用であろう。微生物の中には、生活環境を動物体内に求めるものも多く、それらは時に宿主となる生物に病気という形で害を与えるものも存在する。このような病原微生物から身を守るため、動物は多様な免疫機構を発展させてきた。特に、哺乳類などでは自然免疫と獲得免疫という二種類の免疫を用いて病原体の感染に対抗していることが知られている。自然免疫とは病原体に共通に存在する構成要素を認識することで起こる生物種に非特異的な免疫であり、病原体の感染に対する初期防御の役割を果たす。また獲得免疫は病原体の抗原を特異的に認識することで機能する免疫であり、病原体の感染に対する後期防御の役割を果たす。この獲得免疫には、同じ病原体が再度感染した時に前回よりも早期に病原体に対抗する免疫記憶という特徴がある。

一方植物には獲得免疫のような後天的に形成、強化される免疫機構は存在しないが、その生活の場を植物体内に求める微生物との独自の相互作用が存在する。植物に病気を引き起こす病原体は糸状菌、細菌、ウイルスなどを含めて地球上に約 14,000 種存在すると推測されている (Agrios, 2005)。自発的移動手段を持たない植物はこれらの植物病原体と自然界において多くの接触の機会にさらされているが、接触のほとんどが感染にまで至ることはなく、発病することは稀である。例えば、イネに感染できる植物病原体は糸状菌で約 50 種、細菌で 9 種、ウイルスで 8 種であり、このうち重大な被害を及ぼすものは 10 種にも満たない (Agrios, 2005)。これは、イネがこれら多くの病原体を認識し、免疫反応を誘導することで、病原体から自己を防衛しているためである。

植物が持つ免疫は、複数の病原体認識機構によって段階的に誘導される多層的な免疫反応によって構成される。植物免疫の最初の層は、病原体に存在する PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) と呼ばれる分子を植物が認識することにより誘導される PTI (PAMP-triggered immunity) である。このような PAMP の特徴としては宿主植物が有しておらず、多くの微生物が共通して持つ分子であること、比較的保存性が高く変異速度が遅いということである。これまでに、PAMP とし

ては細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンや、DNA 伸長因子である EF-Tu、糸状菌の細胞壁構成因子であるキチンやリポポリサッカライドなどが報告されている (Zipfel et al., 2005)。このような PAMP は植物に存在するパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor; PRR) によって認識されることが知られている。例えば、フラジェリンの N 末端側に保存された 22 個のアミノ酸配列からなる flg22 はシロイヌナズナに存在する FLS2 (flagellin-sensitive 2) という PRR によって認識される (Gómez-Gómez et al., 2001)。FLS2 は細胞外にロイシンリッチリピート (Leucine-rich repeat; LRR)、細胞内にはセリン/スレオニンキナーゼドメインを持つ一回膜貫通型のタンパク質である。FLS2 の細胞外には 28 個の LRR が存在し、5 番目から 9 番目の LRR が flg22 との結合に重要なことが明らかとなっている (Dunning et al., 2007)。また、トマトやジャガイモなどのナス科植物はフラジェリンの flg22 だけでなく N 末端側に存在する 28 アミノ酸からなる FlgII-28 と名付けたペプチドも FLS3 という PRR で認識し PTI を誘導していることが明らかになった (Naito et al., 2008; Cai et al., 2011; Clarke et al., 2013; Hind et al., 2016)。一方、イネはフラジェリンを認識して免疫反応を誘導するものの、flg22 は認識しないことが明らかになった (Takai et al., 2008)。桂木らは、フラジェリンの様々なドメインを合成してその活性を測定することで、イネは C 末端側に存在する CD2-1 領域を認識して PTI を誘導することを明らかにすると共に、その受容体として細胞外に LRR ドメインと細胞内にキナーゼドメインを持つ一回膜貫通型の FliRK2 という PRR を同定した (桂木, 2015)。

このような植物による PAMP 認識機構の特徴は、病原細菌のタンパク質翻訳時に働く EF-Tu (elongation factor Tu) の認識でも認められている。シロイヌナズナは、EF-Tu の保存性の高い N 末端側の N アセチル化された 18 個のアミノ酸からなる elf18 を 21 個の LRR とキナーゼドメインから構成される一回膜貫通型の EFR (EF-Tu receptor) で認識する (Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2006)。一方、イネは EF-Tu を認識して免疫反応を誘導できないと考えられていたが、古川らは植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株の破碎産物の中にフラジェリンとは異なる PAMP が存在することを見出し、この物質が EF-Tu であることを明らかにした。さらに、イネが認識する EF-Tu 領域について、断片化したペプチドを用いて調べ、イネは EF-Tu の中央領域に存在する EFa50 を ERC1 と名付けた PRR で認識し PTI を誘導することを示した (Furukawa et al., 2014, 松田, 2019)。このように、植物におけるフラジェリンや EF-Tu の認識機構には、植物種によって同一分子の異なる部位を認識するという特徴があり、進化の過程でそれぞれの植物種が各フラジェリン認識機構や EF-Tu 認識機構を獲得してきたと推測される。

植物免疫のもう一つの層は、細菌から分泌されるエフェクタータンパク質を植

物が特異的に認識することで誘導される ETI (Effector-triggered immunity) である。エフェクタータンパク質は、細菌の細胞内から Type III 分泌装置 (T3SS : Type III secretion system) を介して植物に輸送され、植物細胞内で様々な働きをおこなう。T3SS は菌体細胞の内膜、ペリプラズム領域、外膜にまたがって存在し、複雑なトンネル構造を形成しており、そのトンネルからニードル状の構造を細胞外に伸ばして宿主細胞膜に接続し、宿主細胞内にエフェクタータンパク質を輸送する。T3SS を構成するタンパク質は、植物病原細菌が持つ *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 遺伝子群にコードされている (Roine et al., 1997)。*hrp* 遺伝子は、*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* のトランスポゾンタギング株のなかで、非宿主であるタバコの葉における抵抗性反応の 1 つである過敏感細胞死誘導能を欠損した株の解析からその存在が明らかとなった (Lindgren et al., 1986)。この変異株は非宿主植物であるタバコの葉における過敏感細胞死誘導能を欠損してだけでなく、宿主植物であるインゲンに対しての病原性 (pathogenicity) も失っていた (Bauer et al., 1995)。興味深いことに、同様の表現型を示す変異株の変異部位の解析を行った結果、ほとんどの変異株において *hrp* 遺伝子と同じか、または、その遺伝子の近傍の領域に変異が導入されていることが示された。このような *hrp* 遺伝子は、*P. syringae* 以外にも、*Erwinia* 属、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas* 属、*Acidovorax avenae* などのグラム陰性植物病原細菌に存在することが報告されており、それぞれのゲノム上に 20 個以上の *hrp* 遺伝子が約 20 kb から 35 kb の範囲内にクラスター (群) を形成している (Fig. A) (Baker et al., 1997, Lindgren, 1997)。これら *hrp* 遺伝子の中には、T3SS の構造体を構成するタンパク質をコードする遺伝子が存在しており、その配列相同性は各病原細菌内で非常に高い。そこで、現在ではこの *hrp* 遺伝子群の中で T3SS 構造物をコードする遺伝子を特に *hrc* (*hrp* and conserved) 遺伝子と呼んでいる。植物病原細菌 *R. solanacearum* では HrpG や HrpB などの制御因子を介した経路がこれらの T3SS をコードする遺伝子の発現を制御しており、植物由来成分の認識などを介して T3SS を感染時特異的に発現誘導することが明らかとなっている。また、この経路の下流で T3SS を介して植物細胞内に分泌されるいくつかのエフェクタータンパク質が発現制御されることも報告されており、このようなエフェクタータンパク質の中に宿主植物に病徴を引き起こす因子や非宿主植物に抵抗性反応を誘導する因子などが存在すると考えられている (Wu et al., 2015)。

植物病原細菌のエフェクタータンパク質の中でも研究が進んでいるものは、非病原性 (*avr*) 遺伝子産物であろう。*avr* 遺伝子とは、1971 年に Flor がアマの品種とさび病菌のレース間に存在する宿主特異性を説明するために提唱した gene-for-gene 説 (Flor, 1971) における植物病原細菌側の遺伝子のことである。gene-for-gene

説は、植物が持つ抵抗性 (*R*) 遺伝子とそれに対応する *avr* 遺伝子を病原細菌が持つ場合に限り、植物が病気にならないという説である。これらの遺伝子がコードするタンパク質の構造が明らかになる前には、このような *avr* 遺伝子産物と *R* 遺伝子産物はそれぞれ、リガンドとそれに対応するレセプターをコードしていると考えられていた。しかし、多くの *avr* 遺伝子とそれに対応する *R* 遺伝子の構造が明らかになることで、それぞれの翻訳産物である *Avr* タンパク質とそれに対応する *R* タンパク質は相互作用しないことが示された。そこで、*avr* 遺伝子と *R* 遺伝子の関係性を説明するために、新たにガード説が提唱された。ガード説によると、*Avr* タンパク質が相互作用するのは宿主植物の抵抗性反応誘導に関わる何らかのターゲットタンパク質であり、このターゲットタンパク質に *R* タンパク質が相互作用することでこの分子をガードしている。*Avr* タンパク質がターゲットタンパク質に結合すると、この結合情報を *R* タンパク質が感知し抵抗性反応を誘導する (Dangl & Jones, 2001)。このガード説を支持する例が、シロイヌナズナの *R* 遺伝子である *RPM1* で報告されている。シロイヌナズナの *RPM1* は *P. syringae* 由来の 2 つの *avr* 遺伝子である *avrRpm1* と *avrB* に対応する *R* 遺伝子として同定された (Nimchuk et al., 2000)。*P. syringae* が植物に感染した際、*P. syringae* から *avrRpm1* 又は *avrB* が植物細胞内に輸送されてターゲットタンパク質である *RIN4* と相互作用し、*RIN4* のリン酸化を誘導する。植物が *R* 遺伝子を持たない場合、リン酸化された *RIN4* は植物の免疫反応を抑制し、結果として病原細菌の感染が成立し、病気が発生する。一方、植物が *R* 遺伝子である *RPM1* を持つ場合、*avrRpm1* 又は *avrB* によってリン酸化された *RIN4* を *RPM1* が認識して免疫反応を誘導する (Mackey et al., 2002)。このことから、エフェクタータンパク質は本来、病原細菌が感染を成立させるために植物細胞内に輸送する病徴発現タンパク質であると考えられる。

そこで、エフェクタータンパク質の本来の役割について *R* 遺伝子を持たない植物種を用いて研究が行われた。ナス科のトマトやトウガラシを宿主とし、細菌性斑点病を引き起こす *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* から単離された *avrBs3* はそれに対応する *R* 遺伝子である *Bs3* を持つ植物細胞に輸送された場合は抵抗性反応の 1 つである過敏感細胞死を誘導するが、*Bs3* を持たない宿主植物細胞では核に局在し、細胞のサイズを制御する遺伝子を発現誘導させることで葉肉細胞の肥大化といった病徴を誘導し、*Xanthomonas* 属種における主要な病原性決定因子を構成している (Kay et al., 2007)。また、エフェクタータンパク質の本来の働きとして、宿主植物の免疫を直接抑制するものも存在する。*P. syringae* の病原性のエフェクタータンパク質である *HopM1* はシロイヌナズナの免疫関連タンパク質である *AtMIN7* を標的とし、宿主のプロテアソーム分解系を用いて *AtMIN7* の分

解を仲介することで宿主の免疫系を破壊し、病原細菌の宿主植物への感染を補助している (Nomura et al., 2006)。

これまで述べたように、植物免疫には PTI と ETI が存在する。この二つの免疫システムが実際の細菌侵入時にどのように機能するのかについては、ジグザグモデルというものが提唱されている。このモデルでは、まず植物病原細菌が持つ PAMP が植物の持つ PRR によって認識され、活性酸素の発生や細胞壁におけるカロースの沈着、気孔閉鎖、防御関連遺伝子の発現などの比較的弱い免疫反応である PTI が誘導される。これに対して植物病原細菌は複数のエフェクタータンパク質を T3SS で植物細胞内に分泌するが、このエフェクタータンパク質にこの PTI を抑制する活性を有するものが存在する場合、ETS (Effector-triggered susceptibility) が誘導され、植物の PTI が抑制される。しかし、植物側がいずれかのエフェクタータンパク質を認識できた場合、植物は過敏感細胞死の誘導を伴う強力な免疫反応である ETI を誘導し、感染が阻止される (Jones & Dangl, 2006)。さらに、分泌されたエフェクタータンパク質の中に ETI を抑制するエフェクタータンパク質が存在した場合には再び ETS が誘導され ETI 自体を抑制する。このように、植物と病原細菌の間には、PTI 及び ETI と ETS が関与することで病徴発現や免疫反応の誘導、感染の排除などが起きていると考えられる (Fig. B)。

これまでに、植物病原細菌 *Acidovorax avenae* を用いた植物の病原細菌認識および免疫反応誘導機構についての研究が行われてきた。この菌は単子葉植物を宿主とするグラム陰性単桿菌である。この菌が宿主植物に感染すると発芽障害、葉鞘の湾曲、中胚軸の異常伸長および葉鞘、葉身の褐色病斑などの病徴をもたらす褐条病を引き起こすことが知られている (門田、大内, 1983)。これまでに、多くの植物種から様々な菌株が単離されているが、この菌株間には厳密な宿主特異性が存在する。たとえば、イネを宿主とする K1 菌株や H8301 菌株はイネに病徴を引き起こすが、その他の単子葉植物種には病徴を引き起こすことができない。一方、シコクビエを宿主とする *A. avenae* N1141 菌株はシコクビエには病徴を引き起こすが、イネに病徴を引き起こすことができない。この菌の菌株間に存在する宿主特異性には植物によるこの菌の認識と免疫反応誘導が関与することが明らかになっている。例えば、N1141 菌株をイネの培養細胞に接種すると、核 DNA の断片化、細胞質凝集、細胞膜の収縮といった形態変化を伴う過敏感細胞死が誘導される。一方、K1 菌株をイネ培養細胞に接種すると、このような細胞死は見られない。また、N1141 菌株を接種した細胞では活性酸素の発生や *PAL*、*Cht-1*、*LOX*、*PBZ1* などの免疫関連遺伝子の発現などの免疫反応が誘導されるものの、K1 菌株接種の培養細胞ではこれらの免疫反応は誘導されない (Iwano et al., 2002; Tanaka et al., 2003)。

このような *A. avenae* の宿主特異性と免疫反応誘導の分子機構を明らかにするために、イネの免疫誘導を引き起こす病原細菌由来の認識物質の探索が行われた。N1141 菌株と H8301 菌株の菌体表層抽出物をイネ培養細胞に処理し、N1141 菌株の菌体表層抽出物にのみイネの免疫反応誘導活性があることが確認された。また、その活性はトリプシンやプロテイナーゼ K 処理によって失われることから、活性物質はタンパク質であることが示唆された。そこで、菌体表層抽出物に存在するタンパク質のうち、両菌株間で構造が大きく異なるタンパク質が存在するかを探索するために、N1141 菌体とイネ病原性 H8301 菌株をそれぞれウサギに接種し、作成した N1141 菌体に対する抗体を H8301 菌体で反応、吸収することによって、N1141 特異的抗体が、H8301 菌体に対する抗体を N1141 菌体で反応、吸収することによって、H8301 特異的抗体がそれぞれ作成された。この抗体を用いた両菌株の菌体表層抽出物の Western blot 解析の結果、N1141 特異的抗体は N1141 菌株に存在する約 50 kDa の物質を、H8301 特異的抗体は H8301 菌株に存在する約 50 kDa の物質をそれぞれ認識した。このバンドの N 末端アミノ酸配列解析の結果、*Pseudomonas aeruginosa* や *Salmonella typhimurium* などのグラム陰性細菌の鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンとの高い相同性が認められた (Che et al., 2000)。そこで、両菌株からフラジェリンを精製し、イネ培養細胞に処理すると、N1141 菌株のフラジェリンは活性酸素の発生や、*PAL*、*Cht-1*、*PBZ1*、*OsWRKY70* などの PTI 関連遺伝子の発現、カロースの沈着などのイネの免疫反応を誘導するが、K1 菌株や H8301 菌株のフラジェリンは免疫反応を誘導しないことが明らかとなった (Tanaka et al., 2003; Takai et al., 2006; Katsuragi et al., 2015)。

そこで、これらのフラジェリン間に存在する免疫反応誘導の特異性を制御するそれぞれのフラジェリンの構造の違いについて研究が行われた。まず、フラジェリンのアミノ酸配列の違いに由来するかどうかを調べるため、N1141 菌株と K1 菌株のフラジェリンを *Escherichia coli* に発現させた発現フラジェリンを作成し、イネ培養細胞に処理すると、N1141 菌株の発現フラジェリンだけでなく、K1 菌株の発現フラジェリンも活性酸素の発生や PTI 関連遺伝子の発現などを誘導することが示され、両菌株のフラジェリン間に存在する免疫反応の誘導特異性はアミノ酸配列の違いによるものではないことが明らかとなった。また、MALDI-TOF MS による両菌株のフラジェリンの分子量測定により、予想分子量に比べ、N1141 菌株のフラジェリンが 1,600、K1 菌株のフラジェリンが 2,150 大きいことがわかり、この分子量の違いは両菌株のフラジェリンに付加されている糖鎖によるものであることも明らかになった (Che et al., 2000; Hirai et al., 2011)。フラジェリンに付加されている糖鎖が認識特異性に関与する可能性を検証するため、糖鎖が付加されていないフラジェリンの作成が試みられた。両菌株のフラジェリンには N 結合型

糖鎖付加のコンセンサス配列が存在しなかったことと、植物病原細菌 *P. syringae* pv. *tabaci* ではフラジェリンに *O* 結合型糖鎖が付加されていることが知られていたことから (Taguchi et al., 2006)、*A. avenae* のフラジェリンに付加される糖鎖は *O* 結合型糖鎖であろうと推察された。そこで、化学分解や酵素消化による *O* 結合型糖鎖の脱離が試みられたが、フラジェリンが凝集するなどしてうまくいかなかった。*P. aeruginosa* や *P. syringae* のフラジェラオペロン内に存在する *glycosyltransferase* はフラジェリンの糖鎖付加に必須であり、*glycosyltransferase* を欠損した変異体は糖鎖付加されていないフラジェリンを産生することが報告されていることから (Arora et al., 2001; Takeuchi et al., 2003)、*A. avenae* N1141 菌株と K1 菌株のフラジェラオペロンの配列解析が行われ、両菌株とも約 10 kbp にわたるフラジェラオペロンを持つことが明らかになった。このフラジェラオペロン内には、N1141 菌株ではフラジェリンをコードする *FlaA* の 6.8 kbp 上流に、K1 菌株では *FlaA* の 6 kbp 上流にそれぞれ *NFgt*、*KFgt* と名付けた *glycosyltransferase* をコードする遺伝子が存在していた。*NFgt* は 1,359 アミノ酸からなるタンパク質をコードし、*KFgt* は 1,265 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、両菌株の *glycosyltransferase* 間における配列相同性は 61%であった。そこで、*NFgt* と *KFgt* の欠損株である *NΔFgt*、*KΔFgt* を作成し、これら変異株のフラジェリン分子量を MALDI-TOF MS で解析すると、それぞれのフラジェリンの予想分子量とほぼ同一の分子量であったため、*NΔFgt* と *KΔFgt* の持つフラジェリンには糖鎖が付加されていないことが示された。次に、*NΔFgt* と *KΔFgt* の糖鎖非存在型フラジェリンが免疫反応の誘導特異性に関与するかどうか調べるため、それぞれの糖鎖非存在型フラジェリンをイネ培養細胞に処理したところ、*NΔFgt* のフラジェリンだけでなく *KΔFgt* のフラジェリンも活性酸素の発生や PTI 関連遺伝子の発現などの免疫反応を誘導することが明らかとなった。このことは、K1 菌株のフラジェリンに付加されている糖鎖がフラジェリンの認識を阻害していることを示している。

そこで次に、糖鎖付加されているアミノ酸を同定するために、この糖鎖非存在型フラジェリンをトリプシンやアスパラギン酸 N-ペプチダーゼ等で分解し、ペプチドマッピング等により糖鎖付加アミノ酸の同定が行われ、N1141 菌株では 3 ケ所 (Ser¹⁷⁸、Ser¹⁸³、Thr³⁵¹)、K1 菌株では 4 ケ所 (Ser¹⁷⁸、Ser¹⁸³、Ser²¹²、Thr³⁵¹) のアミノ酸に糖鎖が付加されていることが明らかとなった。また、K1 菌株の 4 ケ所の糖鎖付加部位のうち 2 ケ所 (Ser¹⁷⁸、Ser¹⁸³) の糖鎖付加アミノ酸をアラニンに置換すると、免疫反応誘導能が認められることから、Ser¹⁷⁸、Ser¹⁸³ に付加される糖鎖がフラジェリンの認識を阻害していることが明らかになった。興味深いことに、免疫誘導活性を持つ N1141 のフラジェリンの Ser¹⁷⁸、Ser¹⁸³ にも同様に糖鎖が付加されている。そこで、両菌株のフラジェリンに付加された糖鎖の構造の違いが免

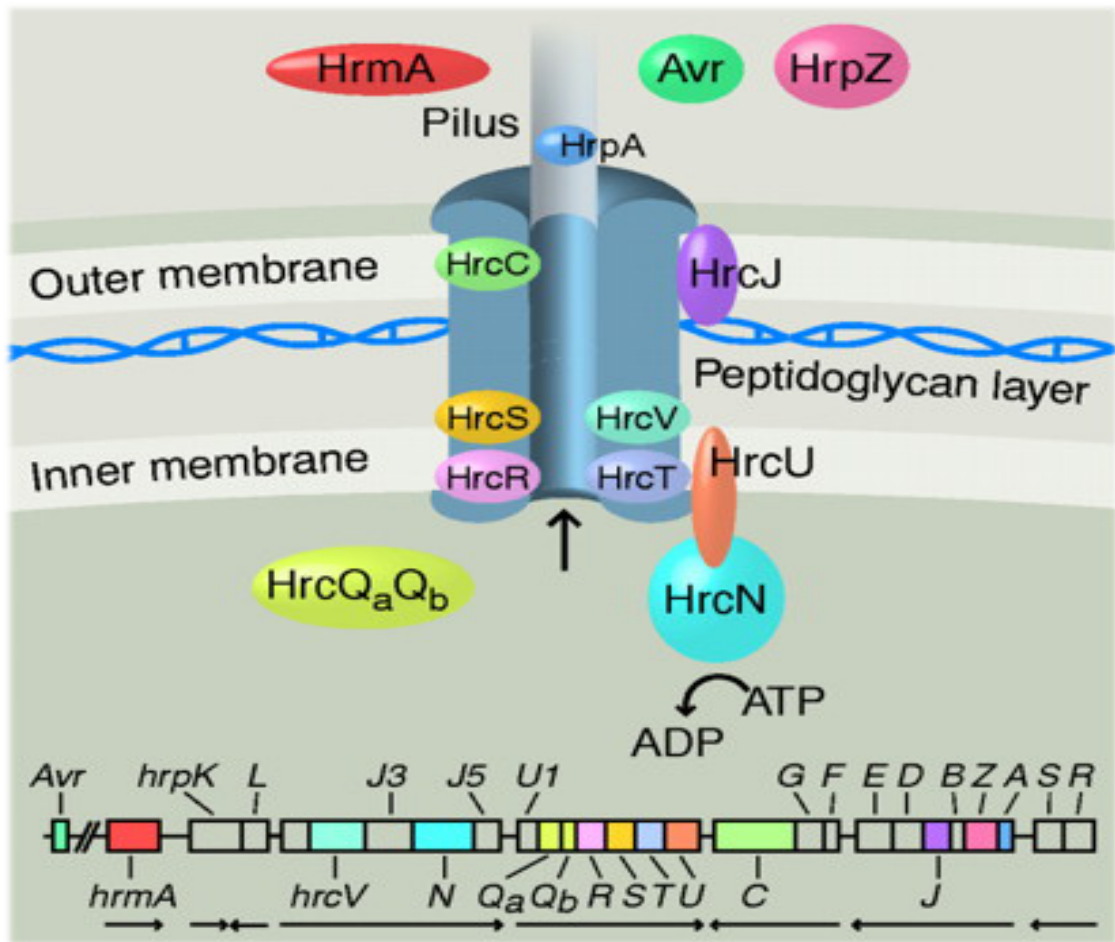
疫誘導の特異性の原因である可能性を調べるため、それぞれの糖鎖の構造解析が行われ、両フラジェリンの糖鎖は3糖で構成されているが、非還元末端に存在する糖のみが両フラジェリン間で異なることが示された。これらのことから、N1141菌株と K1 菌株のフラジェリンの間に存在する免疫反応誘導特異性は、両フラジェリンの Ser¹⁷⁸、Ser¹⁸³ に付加された糖鎖の非還元末端糖の違いによって制御されていることが明らかとなった (Hirai et al., 2011; 平井, 2012)。

次に、N1141 菌株と K1 菌株の間に存在するフラジェリンの PTI 誘導特異性が *A. avenae* の宿主特異性に関与しているかを調べる研究が行われた。フラジェリンの PTI 誘導活性を持つペプチド断片である CD2-0 を K1 菌株と同時にイネに接種すると、K1 菌株のみを接種した時と比較して、菌体数が若干減少するものの病徴は同様に発現し、感染が成立することが明らかとなった。このことから、*A. avenae* のフラジェリンは免疫反応誘導には関与するものの、宿主特異性の決定因子にはならないことが示された (Katsuragi et al., 2015)。そこで、宿主特異性の決定に T3SS から分泌されるエフェクタータンパク質が関与する可能性を調べるために、*A. avenae* の両菌株の *hrp* 遺伝子群に関する研究が開始された。両菌株のゲノム解析の結果、両菌株には約 35 kbp の *hrp* 遺伝子群が存在することが明らかになり (Kondo et al., 2012, Fig. C)、他の植物病原細菌のエフェクターをコードしている遺伝子と相同性がある *hrpW*、*hrpY*、*lrp* の存在も明らかになった。*hrpW* はシステインを含まないグリシンリッチの耐熱性タンパク質であり、広範囲の植物種に対する過敏細胞死誘導能を持つ harpin をコードする *E. amylovora* の *hrpW* と相同性がある。また、*hrpY* は T3SS を介して植物細胞内に分泌されることで、免疫反応誘導や病徴発現に関与する *R. solanacearum* の PopA をコードする遺伝子と相同性が存在する。さらに、*lrp* は真核細胞における特異的なタンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソーム系で働く F-box、シグナル伝達系因子に多く見られるタンパク質-タンパク質間相互作用に関与するロイシンリッチリピートを分子内に持つ *R. solanacearum* の LrpD をコードする遺伝子と相同性を有する。そこで、これらの遺伝子がコードするタンパク質がイネの免疫反応誘導や病徴発現に関与するかどうかを調べるため、各菌株の T3SS、*hrpW*、*hrpY*、*lrp* 遺伝子の欠損株が相同組み換え法によって作製された。これらの欠損株をイネに接種したところ、N1141 菌株の $\Delta hrpW$ 、 Δlrp を接種したイネ培養細胞では野生株を接種した時と同様の免疫反応が誘導された。しかし、N1141 菌株の $\Delta hrpY$ を接種したイネ培養細胞では $\Delta T3SS$ を接種した時と同様に過敏細胞死の減少、活性酸素発生量の減少、LOX 発現量の減少が見られた。このことから、N1141 菌株の *hrpY* はイネ ETI 誘導に関与するエフェクタータンパク質であることが示唆された (Kondo et al., 2012)。一方、K1 菌株の各欠損株をイネに接種した場合、 $\Delta hrpW$ 、 $\Delta hrpY$ を接種し

た葉での病徴は K1 野生株を接種した葉と同様に認められたが、 Δlrp を接種した葉では野生株を接種した葉に比べ若干であるが病徴が縮小しており、植物細胞内における菌体数も微減していた。このことから、K1 菌株の Lrp はイネの病徴因子として機能することが示唆された。興味深いことに、K1 菌株の *lrp* では 1 塩基挿入によってフレームシフトが生じており、N1141 菌株と K1 菌株の Lrp のアミノ酸相同性は 11.9% しかないことが分かっている。このことから、K1 菌株の Lrp はフレームシフト変異によってイネの病徴因子としての機能を獲得したと考えられる (Kondo et al., 2017)。しかし、K1 菌株の Δlrp を接種したイネにおいて病徴は縮小するものの感染が成立することから、これらのエフェクタータンパク質の他に宿主特異性に関与する因子が存在することは明らかである。

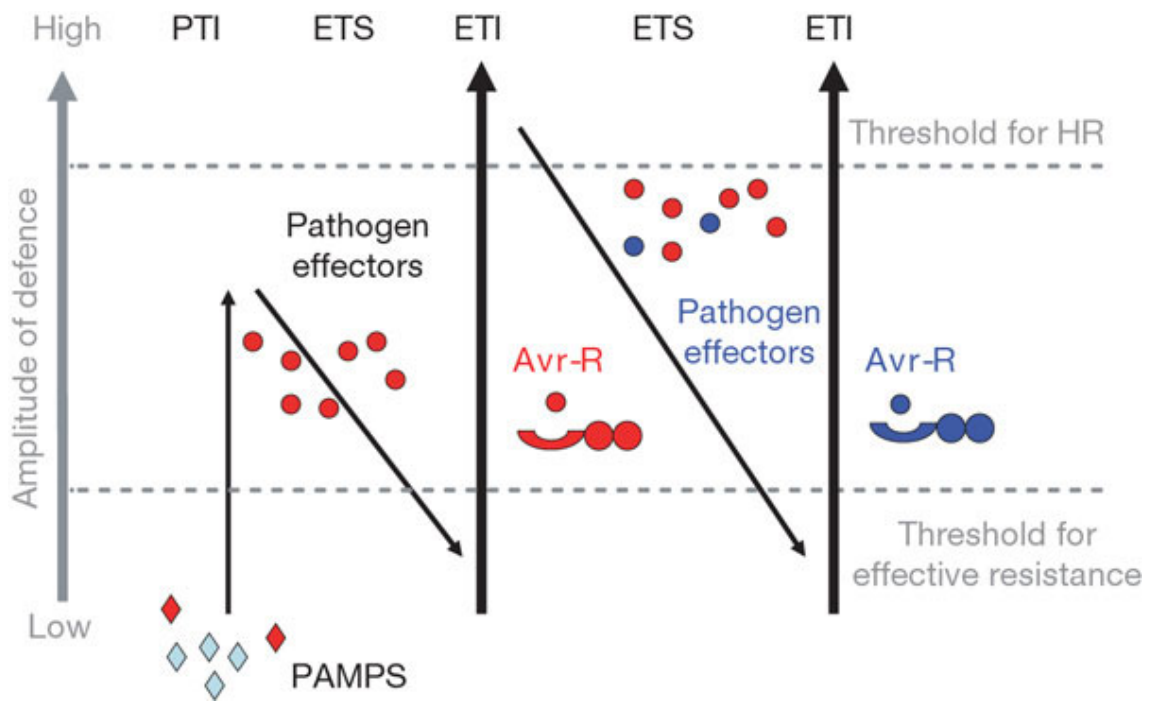
このようなことから、*A. avenae* の K1、N1141 菌株に存在する宿主特異性に ETS が関与する可能性も考えられた。しかし、実際にこの菌の宿主特異性決定に ETS が関与するかどうかについての知見は全く得られておらず、この菌とイネの間に ETS が存在するかどうかさえわかっていない。

そこで本研究では、イネに対して病原性の *A. avenae* K1 菌株とイネの間に ETS が存在するかどうか、また、存在するのであればその機構はどのようなものを明らかにすることで、*A. avenae* の宿主特異性の制御機構についての知見を得ることを目的とした。



Baker et al., 1997

Fig. A 植物病原細菌 *P. syringae* の Type III 分泌装置（上）と *Hrp* 遺伝子群（下）
 (Baker et al., 1997 から引用)



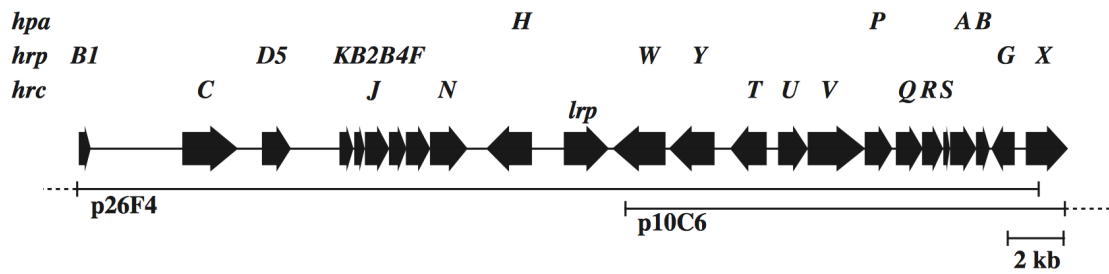
Jones & Dangl, 2006

PTI:PAMP-triggered immunity

ETS:Effector-triggered susceptibility

ETI:Effector-triggered immunity

Fig. B 植物免疫の概略図
(Jones & Dangl, 2006 から引用)



Kondo et al., 2012

Fig. C *A. avenae* N1141 菌株の *hrp* オペロンの構造
(Kondo et al., 2012 から引用)

第1章

A. avenae K1 菌株によるイネ PTI 抑制の解析

1-1 緒言

序論にも述べたように、植物病原細菌 *A. avenae* は、単子葉植物を宿主とするグラム陰性細菌である。この菌の菌株間には厳密な宿主特異性が存在し、イネを宿主とする *A. avenae* K1 菌株はイネに感染した際に病徴を引き起こすが、シコクビエを宿主とする *A. avenae* N1141 菌株はイネに病徴を引き起こすことができない。これまでの研究で、この菌の PTI を誘導する分子としてフラジェリンや EF-Tu が、またこの菌の ETI を誘導する分子として *lrp* などのエフェクタータンパク質がそれぞれ同定されている。しかし、これらはイネの免疫反応誘導に關与するものの、宿主特異性を決定する因子にはなっておらず、*A. avenae* とイネの間には PTI、ETI 誘導とは別の相互作用が存在する可能性が提示された。これまでの研究で、エフェクター分子のいくつかは植物が病原菌の PAMP を認識して誘導する PTI を抑制する ETS という活性を有しているものが存在することが報告されている。しかし、*A. avenae* の N1141 菌株や K1 菌株がこのような ETS 活性を有するかどうかは明らかになっていない。そこで、*A. avenae* K1 菌株とイネを用いて、両者間において ETS が認められるかどうかについて調べることから研究を開始した。

1-2 材料と方法

1-2-1 菌体の保存と培養

Acidovorax avenae の菌体液を PF プレートにプレーティングし、30°Cで一晩静地培養した。培養後、白金耳を用いて菌体をかき取り、1.0 ml のスキムミルク溶液に懸濁した。これを 50 μ l ずつ 1.5 ml マイクロチューブに分注し、液体窒素で凍結してから-80°Cで冷凍保存した。菌体を使用する際は冷凍保存したスキムミルク溶液を解凍し、PF プレートにプレーティングして、30°Cで一晩静置培養した。培養したプレートに滅菌水を 1 ml 加えてコンラージ棒で菌体をかき集め、1.5 ml マイクロチューブに回収した。回収した菌体液の 100 倍希釈を作製し、OD₆₁₀ の値を測定した。以下の計算式から菌体濃度を算出し、必要な濃度に希釈した。

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

溶液組成

【Pseudomonas F (PF) プレート】

組成	容量
Bacto Tryptone (BD)	2.0 g
Proteose peptone No.3 (BD)	2.0 g
KH ₂ PO ₄ (nacalai tesque)	0.30 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (nacalai tesque)	0.62 g
Bacto Agar (BD)	3.0 g
純水	up to 200 ml

試薬をすべて混合した後、121°C、20 分間オートクレーブで滅菌した後に、プレートを作製した。以下、特記していないオートクレーブ滅菌は全てこの条件で行った。また、本論文において用いた純水は全て Elix[®] Essential 純水製造装置 (Merck) を用いて、超純水は全て Milli-Q[®] Reference 超純水製造装置 (Merck) を用いて作製した。本論文において用いた滅菌水は超純水をオートクレーブ滅菌することで作製した。

【スキムミルク溶液】

組成	容量
Skim milk powder (Wako)	10 g
Sodium hydrogen L (+) -glutamate Monohydrate (Wako)	1.5 g
純水	up to 100 ml

115°C、15 分間オートクレーブで滅菌した後に室温で一晩静置し、再び 115°C、5 分間オートクレーブで滅菌した。

1-2-2 イネ培養細胞の継代

イネ培養細胞は、Oc 細胞 (*Oryza sativa* L.C5924) を用いた。培養細胞の継代として、200°C、2 時間の乾熱滅菌を行った 100 ml 三角フラスコに、7 日目の培養細胞 2.0 ml と R2S 培地 20 ml を加え、30°C、108 rpm、連続光 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下で振盪培養を行った。イネ培養細胞を用いた実験には、継代から 4 日目の細胞を用いた。

【R2S 培地】

組成	容量
20×R2 Major stock	50 ml
1000×R2 Minor stock	1.0 ml
500×Fe liq.	2.0 ml
1000×MS vitamin	1.0 ml
40 mg/ml 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	100 μl
Sucrose (Wako)	30 g
KOH	pH 5.6
超純水	up to 1000 ml

MS vitamin 以外はクリーンベンチ内で混合し、試薬をすべて混合後、KOH で pH 5.6 に調整した。その後、メジウム瓶に移して、オートクレーブで滅菌した。

《R2S 培地作成に用いた各種 stock solution の組成》

【20×R2 Major stock】

組成	容量
KNO ₃ (nacalai tesque)	80 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Wako)	6.7 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Wako)	5.0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O (nacalai tesque)	3.0 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (Wako)	5.46 g
超純水	up to 1.0 L

試薬をすべて混合した後、フィルター (MILLEX®-GS, MILLIPORE) で滅菌し、180°C、2 時間、乾熱滅菌を行ったメジュウム瓶に保存した。

【1000×R2 Minor stock】

組成	容量
MnSO ₄ · 5H ₂ O (nacalai tesque)	172.9 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O (nacalai tesque)	220.0 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O (nacalai tesque)	12.5 mg
H ₃ BO ₃ (Wako)	300.0 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (nacalai tesque)	12.5 mg
超純水	up to 100 ml

試薬をすべて混合した後、フィルター (MILLEX®-GS, MILLIPORE) で滅菌し、180°C、2 時間、乾熱滅菌を行ったメジュウム瓶に保存した。

【500×Fe liq.】

組成	容量
Na ₂ · EDTA (DOJINDO)	375 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O (Wako)	275 mg
超純水	up to 100 ml

EDTA を溶かしてから鉄分を加え、溶解後オートクレーブによって滅菌した。

【1000×MS vitamin】

組成	容量
MS vitamin powder 1000× (Sigma)	1.03 g
超純水	10 ml

溶解後、フィルター(MILLEX[®]-GS,MILLIPORE)で滅菌し、1.5 ml マイクロチューブに 1.0 ml ずつ分注し-20°Cで保存した。

【40 mg/ ml 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid】

組成	容量
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Wako)	40 mg
Dimethyl sulfoxide (DMSO : MP Biomedicals)	1.0 ml

溶解後、フィルター (MILLEX[®]-LG, MILLIPORE) で滅菌し、1.5 ml マイクロチューブに移し保存した。

1-2-3 *A. avenae* N1141 菌株からのフラジェリンの精製

スキムミルク溶液に保存した *Acidovorax avenae* N1141 菌株を LB 液体培地 500 ml×3 本に 5 µl ずつ加え、30°C、36 時間振盪培養を行った。培養液を himac CR20G (HITACHI) 用遠心チューブに分注し、6,000×g、4°Cで 30 分間遠心分離し集菌した。この菌体に 25 mM TBS を 50 ml 加え懸濁し、6,000×g、4°Cで 30 分間遠心分離した後、上清を捨てた。菌体を 54 ml の 25 mM TBS に懸濁し、MX-X57-P ファイバーミキサー (National) で 1 分間剪断処理後、5 分間氷上で静置する操作を 7 回繰り返し N1141 菌株のフラジェリンを菌体から切り離した。この溶液を 50 ml コニカルチューブに移し、遠心機 (MX-300、TOMY) で 6,000×g、4°Cで 30 分間遠心分離した後、上清を 100 ml コニカルチューブに移した。上清を遠心機 (himac CR20G) で 16,000×g、4°Cで 1 時間遠心分離し、上清を超遠心用チューブに移し、さらに超遠心機 (himac CP 70MX) で 200,000×g、4°Cで 1 時間遠心分離した。得られたペレットは 3 ml の滅菌水で懸濁した。この懸濁液を (MX307、TOMY) 遠心機で 20,000×g、4°Cで 5 分間遠心分離し、沈殿を 1 ml の滅菌水で懸濁して-80°Cで保存した。精製したフラジェリンの濃度は、BSA を標品とした Quick Start Protein assay kit (BIO-RAD) による比色定量によって求めた。

【LB 液体培地】

組成	容量
LB Broth (MO BIO)	25 g
純水	1000 ml

調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

【25 mM TBS】

組成	容量
NaCl (Wako)	8 g
KCl (nacalai tesque)	0.2 g
Tris (Wako)	3 g
超純水	up to 1000 ml

HCl で pH 7.4 に調整後、超純水でメスアップした。調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

1-2-4 *A. avenae* K1 菌株のイネ培養細胞への接種とフラジェリン処理によって発生する活性酸素の測定

新しい R2S 培地にイネ培養細胞を 10 mg/ml となるように加え、培養液をスターラーで攪拌しながら 96 穴プレートに 150 μ l ずつ分注した。イネ培養細胞を新しい R2S 培地に慣らすため、人工気象器で 30°C、108 rpm、連続光 (40 μ mol m⁻² s⁻¹) 下で 2 時間振盪培養した。その後 1.0 \times 10⁸ cfu/ml となるように K1 菌株、*KAT3SS*、滅菌水を接種し、接種後 3 時間後に培養液を取り除き、イネ培養細胞に付着した菌体を取り除くために 30°C の R2S 培地 150 μ l で 3 回洗浄し、新しい R2S 培地 150 μ l に再懸濁して N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 100 nM になるように加えた。ネガティブコントロールとしては加えたフラジェリンと等量の滅菌水を加えたものを用いた。その後、30 分ごとに培養液 10 μ l を蛍光・発光シグナル検出用の 96 穴プレート (nunc) に量り取り、そこに 1.1 mM ルミノール溶液を 10 μ l 加え、このプレートを PHELIOS AB-2350 (ATTO) にセットし、15.56 mM K₃[Fe(CN)₆] 溶液 180 μ l を自動分注し、10 秒間の化学発光量を測定した。

【11 mM ルミノール溶液】

組成	容量
ルミノール (Wako)	1.9 mg
50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.9)	1.0 ml

【1.1 mM ルミノール溶液】

組成	容量
11 mM ルミノール溶液	100 μ l
50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.9)	900 μ l

【15.56 mM K₃[Fe (CN)₆]溶液】

組成	容量
K ₃ [Fe (CN) ₆] (Wako)	23 mg
50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.9)	45 ml

1-2-5 *A. avenae* K1 菌株接種したイネ培養細胞における免疫関連遺伝子の発現量解析

新しい R2S 培地にイネ培養細胞を 10 mg/ml となるように加え、培養液をスターラーで攪拌しながらアセプトシャーレに 10 ml ずつ分注した。イネ培養細胞を新しい R2S 培地に慣らすため、人工気象器で 30°C、108 rpm、連続光 (40 μ mol m⁻² s⁻¹) 下で 2 時間振盪培養した。その後 K1 菌株、*K Δ T3SS* を 1.0 \times 10⁸ cfu/ml になるように接種し、接種後 3 時間後に培養液を取り除き、新しい R2S 培地を 10 ml 加え、N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM になるように加えた。菌接種前とフラジェリン処理 1 時間後の培養液 1 ml 分の細胞を回収して上清を除き、液体窒素で凍結し -80°C で保存後 Plant RNeasy kit を用いて RNA を抽出し、GoTaq 1-Step RT-qPCR kit (Promega) を使用して Opticon 2 instrument (Bio-Rad) で定量的リアルタイム RT-PCR を行った。BRYT Green[®] の蛍光値から得られた増幅曲線データより、指数関数的増幅域に閾値を設定し、閾値と増幅曲線が交差する点を Ct 値 (Threshold Cycle) として算出し、*PAL* と *OsWRKY70* の発現量の解析を行った。

【qRT-PCR 反応液】

組成	容量
2 × GoTaq® Master Mix	5 μl
10 μM Primer-F	1 μl
10 μM Primer-R	1 μl
50 × GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR	0.2 μl
RNA Template (10 ng/μl)	1 μl
Nuclease-free water	1.8 μl
Total vol.	10 μl

【qRT-PCR 反応条件】

37°C	15 min	
95°C	10 min	} 40 cycles
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
65°C	1 min	

【使用したプライマー】

PAL 遺伝子発現確認用プライマー

- *PAL* gene primer-F : 5'-ACATCGGCAAGCTCATGTTC-3'
- *PAL* gene primer-R : 5'-CCCTTGAACCCGTAGTCCAA-3'

OsWRKY70 遺伝子発現確認用プライマー

- RT-*OsWRKY70*-F : 5'-GGCGTCTCGTCCTCCGGGTT-3'
- RT-*OsWRKY70*-R : 5'-GTCGTAATCCAGCTGAACAA-3'

1-2-6 フラジェリン処理によって誘導されるイネカロース沈着の測定

新しい R2S 培地にイネ培養細胞を 10 mg/ml となるように加え、培養液をスターラーで攪拌しながら 24 穴プレートに 1 ml ずつ分注した。イネ培養細胞を新しい R2S 培地に慣らすため、人工気象器で 30°C、108 rpm、連続光 (40 μmol m⁻² s⁻¹) 下で 3 時間振盪培養した。K1 菌株、*KΔT3SS*、滅菌水を 1.0×10⁸ cfu/ml になるように接種し、接種後 3 時間後に培養液を取り除き、新しい R2S 培地 1 ml で 3 回洗浄し、新しい R2S 培地 1 ml に再懸濁して N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 200 nM になるように加えた。6 時間後に培地を除去し、100 mM リン酸カリウム

緩衝液 (pH 8.0) で3回洗浄した。Farmer's 固定液 1 ml を加えて室温で1時間静置し、固定液を除去して 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で3回洗浄した。0.1%アニリンブルーを含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) を加えて4時間染色し、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で3回洗浄した。染色されたカロースを蛍光顕微鏡 (BX51、OLYMPUS) で観察し、細胞面積あたりのカロース数を算出した。

【100 mM K₂HPO₄ 水溶液】

組成	容量
K ₂ HPO ₄	1.74 g
純水	up to 100 ml

【100 mM KH₂PO₄ 水溶液】

組成	容量
KH ₂ PO ₄	1.36 g
純水	up to 100 ml

【100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0)】

組成	容量
100 mM K ₂ HPO ₄ 水溶液	100 ml
100 mM KH ₂ PO ₄ 水溶液	pH 8.0 となるように混合

1-3 結果

1-3-1 フラジェリン処理したイネ培養細胞における PTI 反応

A. avenae のイネ病原性 K1 菌株にイネの PTI 反応を抑制する能力があるかどうかを検定するために、*A. avenae* のイネ非病原性 N1141 菌株由来のフラジェリンによってどのようなイネ PTI 反応が起きるかについて詳細に検討することにした。まず、イネ培養細胞に *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンを処理することによって誘導される活性酸素発生について詳細に調べた。イネ培養細胞にフラジェリンを 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800 nM の濃度で処理し、1 時間後の活性酸素発生量を測定した。その結果、1 nM と 10 nM では活性酸素発生が見られなかったが、50 nM、100 nM、200 nM までは濃度依存的な活性酸素発生量の増加が認められ、400 nM、800 nM の間では活性酸素発生量は一定の値を示した。活性酸素発生量がプラトーに達したときの活性酸素発生量は水処理の約 30 倍であり、EC₅₀ の値は 46.8 nM となった (Fig. 1)。そこで、活性酸素発生を指標とした PTI 反応の抑制を調べる際には 100 nM のフラジェリン濃度で行うことにした。

次に、フラジェリンを処理したイネ培養細胞における活性酸素発生の経時的な変化について調べるため、イネ培養細胞にフラジェリンを 100 nM となるように処理し、30 分ごとに活性酸素発生量を測定した。その結果、フラジェリン処理後 0.5 時間でコントロールの 41 倍、1 時間で 67 倍に活性酸素量が増加した。その後減少に転じ、1.5 時間で 46 倍、2 時間で 41 倍の活性酸素発生量を示した (Fig. 2)。このことから、フラジェリンによって誘導されるイネ活性酸素発生は処理後 1 時間でピークを迎えることが示された。そこで、活性酸素の抑制試験においては、フラジェリン処理後 1 時間の活性酸素発生量を基本とすることにした。

また、イネ培養細胞にフラジェリンを処理した時に PTI 関連遺伝子である *PAL* と *OsWRKY70* がどのように発現変動するかを調べた。フラジェリン (100 nM) をイネ培養細胞に処理し、0、1 時間後の培養細胞から RNA を抽出してこれをテンプレートとした qRT-PCR を行い、*PAL* と *OsWRKY70* の発現量を調べた。その結果、フラジェリン処理 1 時間後に、*PAL* は 3.2 倍、*OsWRKY70* は 180 倍に発現上昇していた (Fig. 3)。

さらに、フラジェリンを処理することによって認められるイネ培養細胞におけるカロースの沈着についても調べた。イネ培養細胞にフラジェリンを 200 nM となるように処理し、0、6 時間後のイネ培養細胞を固定してカロースを染色し、カロースの沈着数を測定した。その結果、フラジェリン処理前のカロース沈着数は 2.6×10^2 個/mm² であったが、フラジェリン処理 6 時間後には 1.5×10^4 個/mm² に増

加していた (Fig. 4)。以上のことから、この条件でフラジェリンを処理すると、カロースの沈着数増加を検定できることが明らかになった。

1-3-2 *A. avenae* K1 菌株によるイネ PTI 反応の抑制

K1 菌株がイネのフラジェリンによって誘導される PTI 反応を抑制する能力を有するかどうかについて調べた。まず、活性酸素発生に与える影響を調べるため、イネ培養細胞に K1 菌株を 1.0×10^8 cfu/ μ l となるように接種し、0, 2, 3, 4, 6 時間後にフラジェリンを 100 nM となるように加え、その 1 時間後の活性酸素発生量を測定した。その結果、K1 菌株接種 0 時間後にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株未接種と同様にフラジェリン処理前の 31 倍の活性酸素発生量を示した。一方、K1 菌株接種 2 時間後の培養細胞にフラジェリン処理した場合はフラジェリン処理前の 17 倍程度の活性酸素発生量を示した。さらに、K1 菌株接種 3 時間、4 時間、6 時間の培養細胞にフラジェリンを処理した場合は、有意な活性酸素発生量の増加は認められなかった (Fig. 5)。

次に、K1 菌株がフラジェリン処理によって誘導される PTI 関連遺伝子である *PAL* と *OsWRKY70* の発現に与える影響を調べた。イネ培養細胞に K1 菌株を接種し (1.0×10^8 cfu/ μ l)、3 時間後に 100 nM のフラジェリンを加えた。フラジェリン処理 1 時間後に、各イネ培養細胞から RNA を抽出して *PAL* と *OsWRKY70* の発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。その結果、K1 菌株の代わりに水を接種し、フラジェリンを処理したイネ培養細胞では、*PAL* の発現量は接種前の 4.8 倍、*OsWRKY70* の発現量は接種前の 180 倍に上昇した。一方、K1 菌株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合、*PAL* の発現量は接種前の 1.6 倍、*OsWRKY70* の発現量は接種前の 46 倍になっており、K1 菌株を接種していないイネ培養細胞の時より、有意 ($p < 0.05$) に減少していることが示された (Fig. 6)。このことから、K1 菌株はフラジェリンによるイネ PTI 関連遺伝子の発現誘導も抑制することが明らかとなった。

さらに、K1 菌株がフラジェリンによって誘導されるカロース沈着に対してどのような影響を及ぼすのかを調べるため、イネ培養細胞に K1 菌株を 1.0×10^8 cfu/ μ l となるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 200 nM となるように処理し、その 6 時間後に細胞を固定してアニリンブルーによってカロースを染色し、沈着したカロースの数を測定した。その結果、K1 菌株の代わりに水を接種し、その後フラジェリン処理したイネ培養細胞では 1.5×10^4 個/ mm^2 のカロースの沈着が確認された。一方、K1 菌株を接種し、その後フラジェリンを処理したイネ培養細胞では、

3.4×10^3 個/mm² のカロースの沈着が確認され、K1 菌株はフラジェリンによって誘導されるカロース沈着を有意 ($p < 0.05$) に減少させることが明らかになった (Fig. 7)。以上のように *A. avenae* のイネ病原性 K1 菌株はイネ非病原性 N1141 菌株由来のフラジェリンによって誘導されるイネ PTI 反応を抑制する能力があることが明らかになった。

1-3-3 *KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞におけるイネ PTI 反応

多くのグラム陰性細菌に保存されている *hrp* クラスターに存在する *hrcV* と *hrcQ* は T3SS の構成部品をコードしており、これらの遺伝子のどちらか一つでも欠損した植物病原細菌は T3SS の機能を喪失することが報告されている (Rossier et al., 1999; Lorenz et al., 2012)。そこで、*A. avenae* K1 菌株によるイネ PTI 抑制が Type III 分泌装置 (T3SS) に依存しているかどうかについて調べるため、K1 菌株の *hrp* クラスターに存在する *hrcV*、*hpaP*、*hrcQ* を欠損させた *KΔT3SS* (Kondo et al., 2017) を用いて PTI 抑制試験を行った。

まず、フラジェリンによって誘導される活性酸素発生における T3SS の役割について調べた。イネ培養細胞に K1 菌株と *KΔT3SS* を 1.0×10^8 cfu/μl となるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM となるように処理し、1 時間後の活性酸素発生量を測定した。その結果、*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞では、K1 菌株を接種したイネ培養細胞の 7.7 倍の活性酸素の発生が認められた (Fig. 8)。一方、未接種のイネ培養細胞では K1 菌株を接種したイネ培養細胞の 21 倍の活性酸素の発生が認められた。K1 菌株を接種した培養細胞では活性酸素発生がほとんど認められなかったことから (Fig. 5)、K1 菌株によるイネ活性酸素発生誘導の抑制には部分的ではあるが T3SS が関与する可能性が示された。

次に、フラジェリンによって誘導されるイネ PTI 関連遺伝子の発現に K1 菌株の T3SS が関与するのかを調べた。イネ培養細胞に K1 菌株と *KΔT3SS* を 1.0×10^8 cfu/μl となるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM となるように処理し、1 時間後に *PAL* と *OsWRKY70* の発現量を調べた。その結果、*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞では K1 菌株を接種したイネ培養細胞に比べて *PAL* 発現量が 6.4 倍、*OsWRKY70* の発現量は 2.9 倍であった。一方、未接種のイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合、*PAL* と *OsWRKY70* の発現量はそれぞれ 3.8 倍と 1.8 倍であった (Fig. 9)。このことから、K1 菌株によるイネ PTI 関連遺伝子 *PAL*、*OsWRKY70* の発現量増加の抑制にも T3SS が関与することが明らかとなった。

次に、フラジェリンにより誘導されるカロースの沈着への T3SS の関与につい

て調べた。イネ培養細胞に K1 菌株と $K\Delta T3SS$ を 1.0×10^8 cfu/ μ l となるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 200 nM となるように処理し、6 時間後に細胞を固定してカロースを染色し、カロースの沈着数を測定した。その結果、 $K\Delta T3SS$ を接種したイネ培養細胞では K1 菌株を接種したイネ培養細胞の 2.8 倍のカロース沈着が確認できた (Fig. 10)。一方、未接種のイネ培養細胞にフラジェリン処理した場合には K1 菌株を接種したイネ培養細胞の 3.9 倍のカロース沈着が確認できた。このことから、K1 菌株によるイネのカロース沈着の抑制にも部分的ではあるが T3SS が関与する可能性が示された。

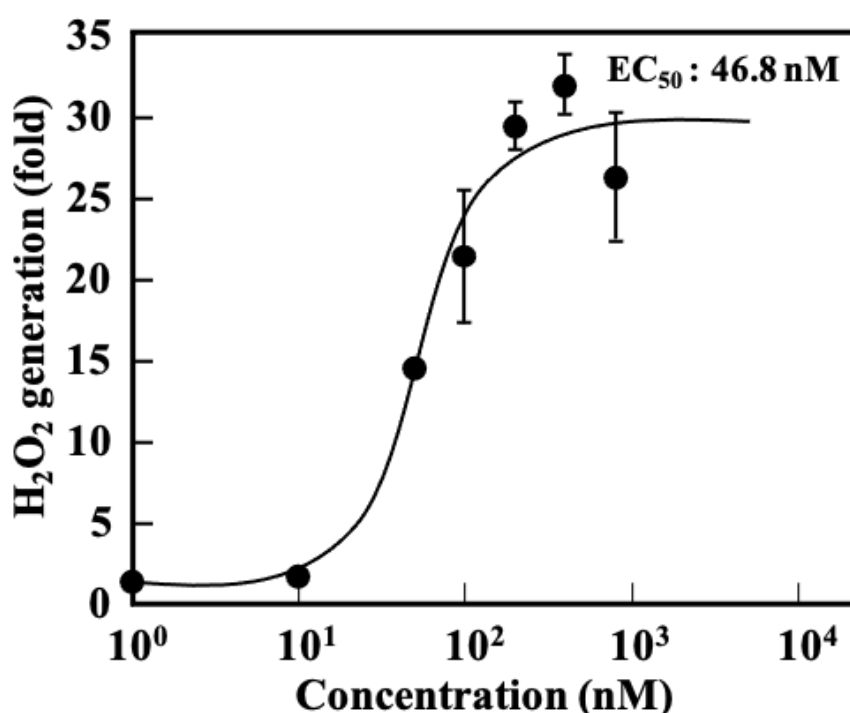


Fig. 1 フラジェリンを処理したイネ培養細胞における濃度依存的な活性酸素発生

イネ培養細胞に *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンを 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800 nM の濃度で処理し、1 時間後の活性酸素発生量をルミノールの化学発光を利用して検出した。活性酸素発生量は水を処理したイネ培養細胞における活性酸素発生量を 1 とした相対値で表した。図中のエラーバーは 3 回の実験を行なった値の標準偏差を表す。

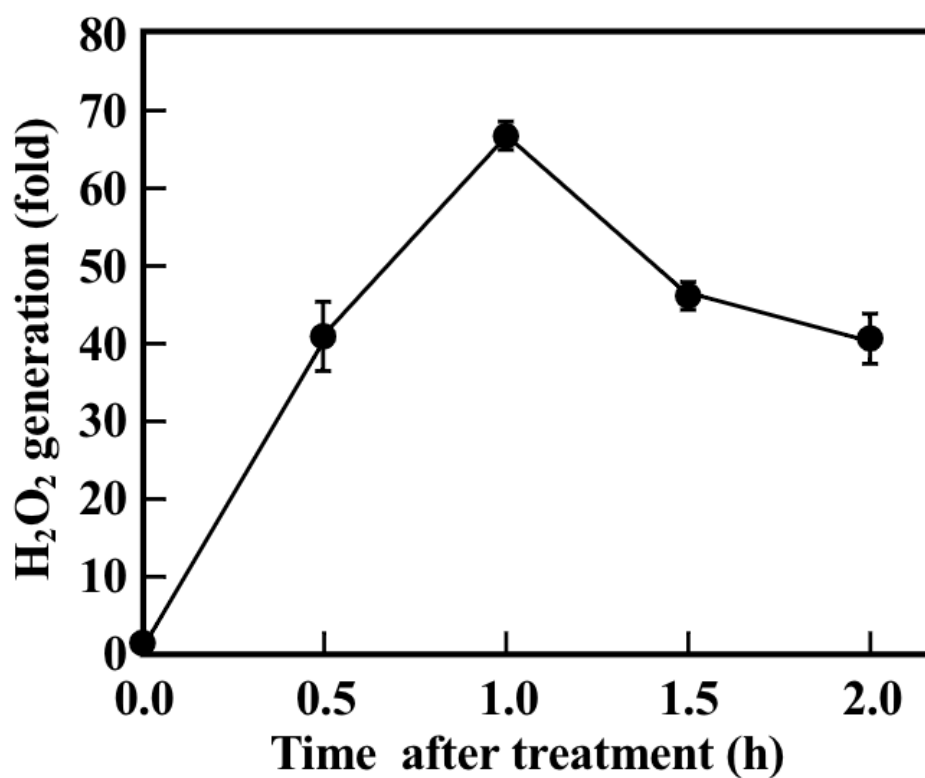


Fig. 2 フラジェリンを処理したイネ培養細胞における経時的な活性酸素発生

イネ培養細胞に *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンを 100 nM の濃度で処理し、0.5h ごとに活性酸素発生量を測定した。活性酸素発生量は水を処理したイネ培養細胞における活性酸素発生量を 1 とした相対値で表した。図中のエラーバーは 3 回の実験を行なった値の標準偏差を表す。

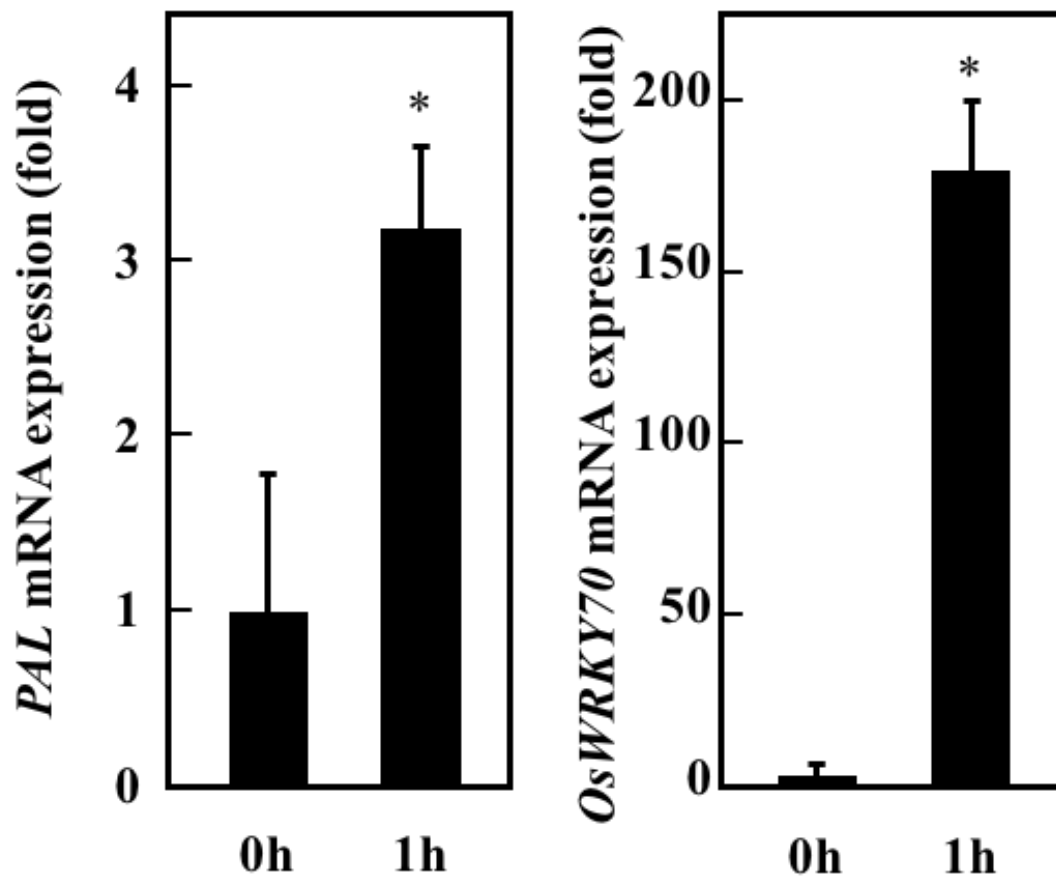


Fig. 3 フラジェリンを処理したイネ培養細胞における PTI 関連遺伝子の発現

イネ培養細胞に *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリンを 100 nM で処理し、0、1 時間後のイネ培養細胞から RNA を抽出して qRT-PCR を行い、*PAL* と *OsWRKY70* の発現量を測定した。縦軸は未処理のイネ培養細胞における値を 1 とした相対値で表し、図中のエラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。アスタリスクは T 検定による 0 時間との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

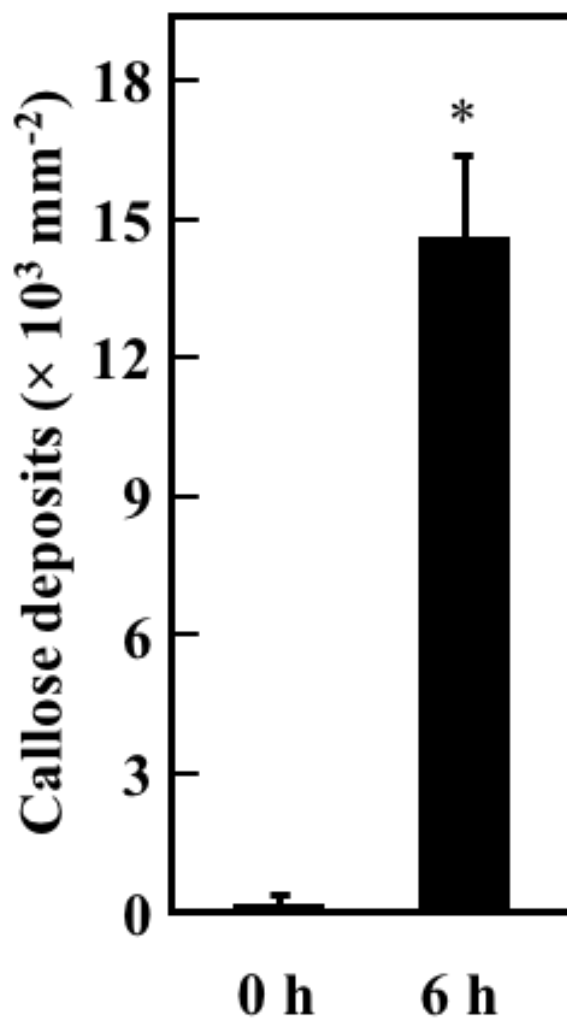


Fig. 4 フラジェリンを処理したイネ培養細胞におけるカロースの沈着数

イネ培養細胞にフラジェリンを 200 nM になるように処理した後、0、6 時間後に細胞を固定してアニリンブルーで染色し、カロースの沈着数を計測した。図中のエラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。アスタリスクは T 検定による 0 時間との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

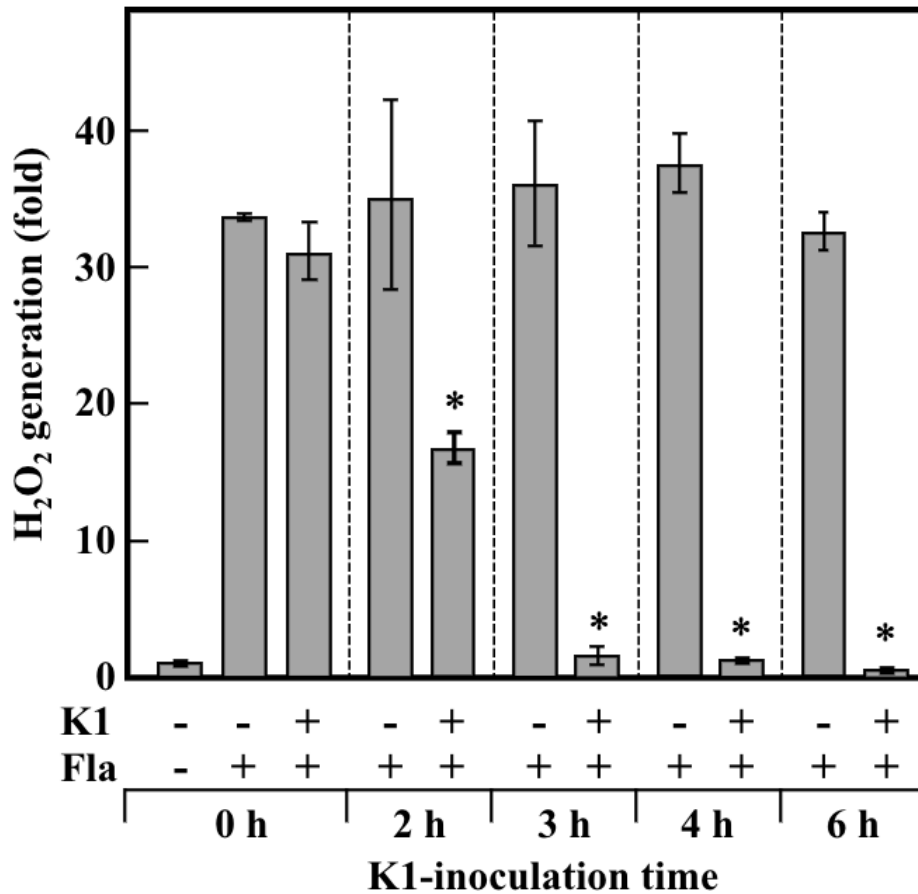


Fig. 5 K1 菌株を接種したイネ培養細胞で認められるフラジェリンによって誘導される活性酸素発生の減少

イネ培養細胞に K1 菌株を 1.0×10^8 cfu/ μ l となるように接種し、0, 2, 3, 4, 6 時間後にフラジェリンを 100 nM となるように処理し、1 時間後の活性酸素発存量をルミノールの化学発光を利用して検出した。活性酸素発存量はフラジェリン未処理のイネ培養細胞における活性酸素発存量を 1 とした相対値で表した。図中のエラーバーは 5 回の実験値の標準偏差を表す。アスタリスクは T 検定による水接種との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

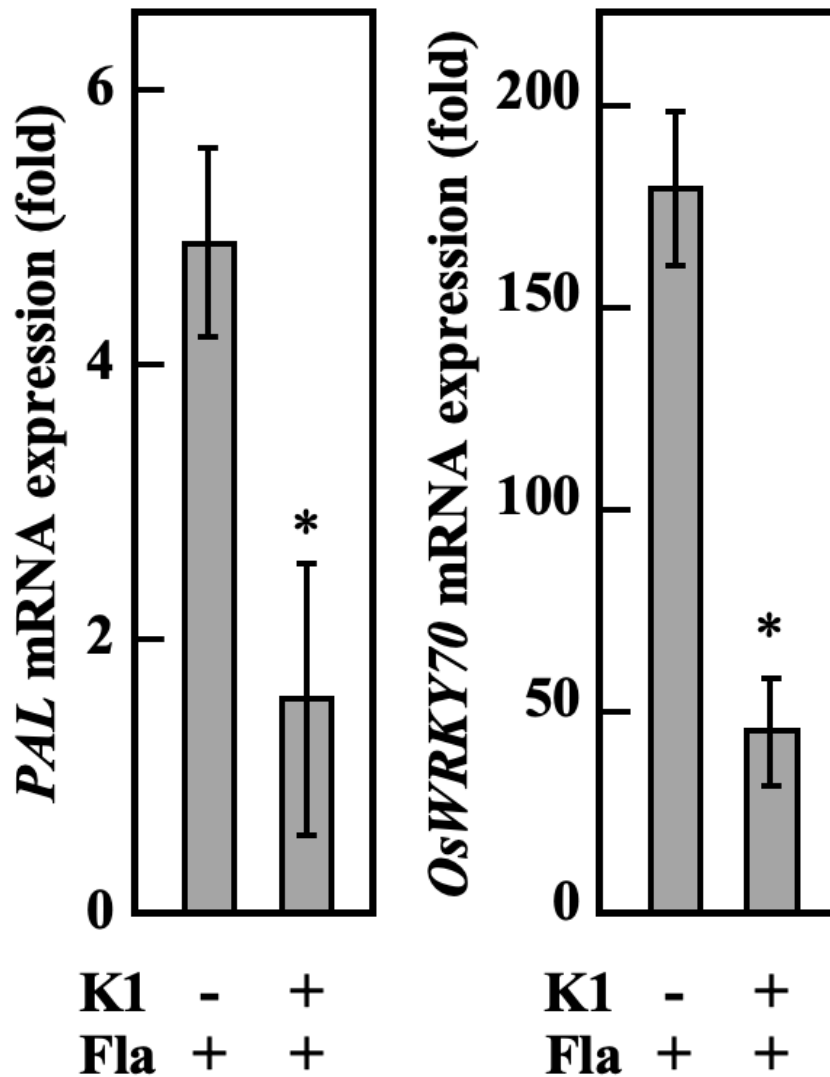


Fig. 6 K1 菌株を接種したイネ培養細胞で認められるフラジェリンによって発現誘導される *PAL* (左) と *OsWRKY70* (右) の遺伝子発現量の減少

イネ培養細胞に水と K1 菌株を 1.0×10^8 cfu/ μ l となるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM で処理し、1 時間後のイネ培養細胞から RNA を抽出して qRT-PCR で *PAL* (左) と *OsWRKY70* (右) の発現量を測定した。縦軸は K1 未接種のイネ培養細胞における値を 1 とした相対値で表した。エラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。アスタリスクは T 検定による水接種との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

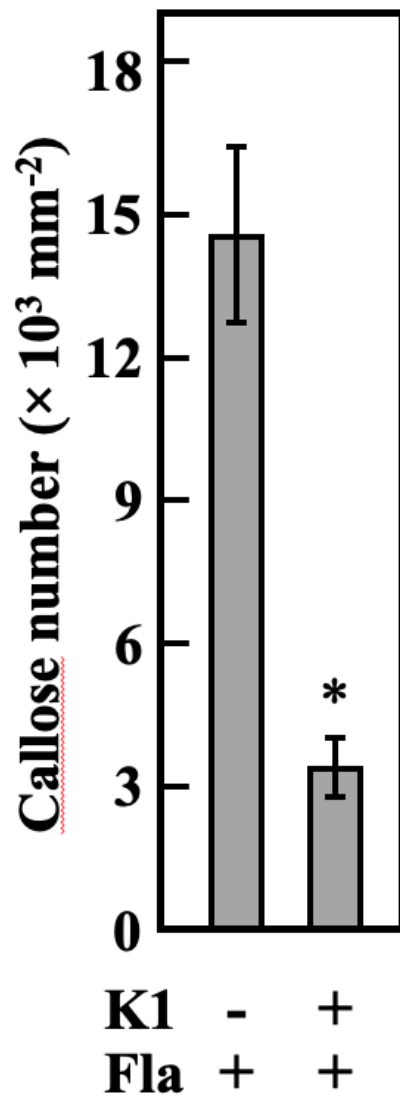


Fig. 7 K1 菌株を接種したイネ培養細胞で認められるフラジェリンによって誘導されるイネカロース沈着の減少

水と K1 菌株を 1.0×10^8 cfu/ml になるようにイネ培養細胞に接種し、3 時間後にフラジェリンを 200 nM になるように処理した後、6 時間後に細胞を固定してアニリンブルーで染色し、カロースの沈着数を計測した。図中のエラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。アスタリスクは T 検定による水接種との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

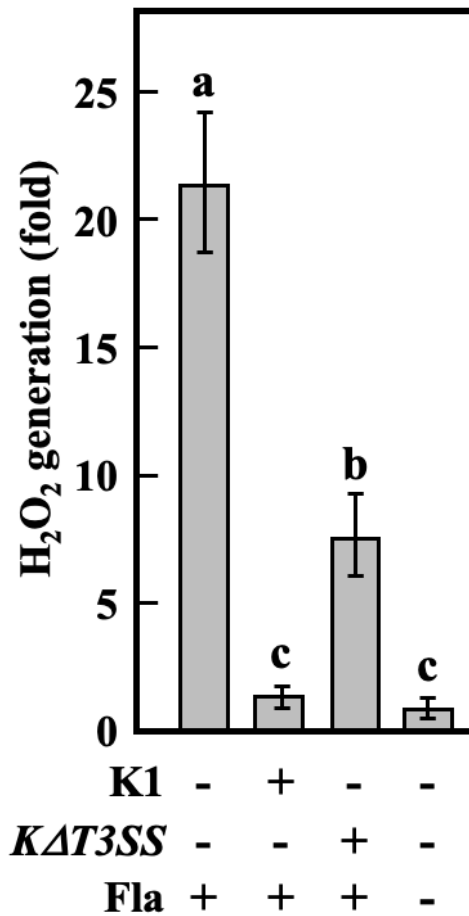


Fig. 8 *A. avenae* *KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞におけるフラジェリンによる活性酸素発生誘導

イネ培養細胞に K1 菌株と *KΔT3SS* を 1.0×10^8 cfu/ μ l になるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM になるように処理し、1 時間後の活性酸素の発生をルミノールの化学発光を利用して検出した。活性酸素発生量は菌未接種、フラジェリン未処理のイネ培養細胞における活性酸素発生量を 1 とした相対値で表した。エラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。

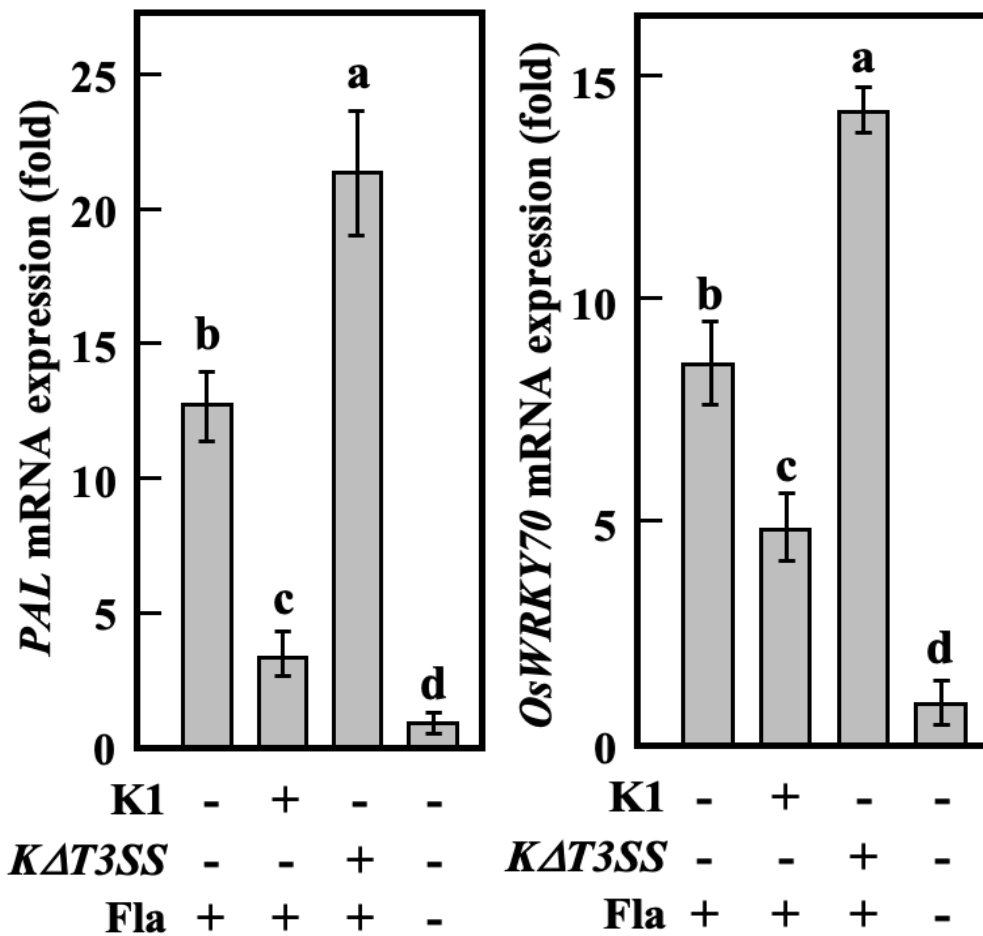


Fig. 9 *A. avenae* *KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞におけるフラジェリン処理による *PAL* (左) と *OsWRKY70* (右) 発現量変動

イネ培養細胞に *K1* 菌株と *KΔT3SS* を 1.0×10^8 cfu/ μ l になるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM になるように処理し、1 時間後のイネ培養細胞から RNA を抽出して qRT-PCR を行い、*PAL* (左) と *OsWRKY70* (右) の発現量を測定した。縦軸は菌未接種、フラジェリン未処理のイネ培養細胞における発現量を 1 としたときの相対値で表し、図中のエラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。

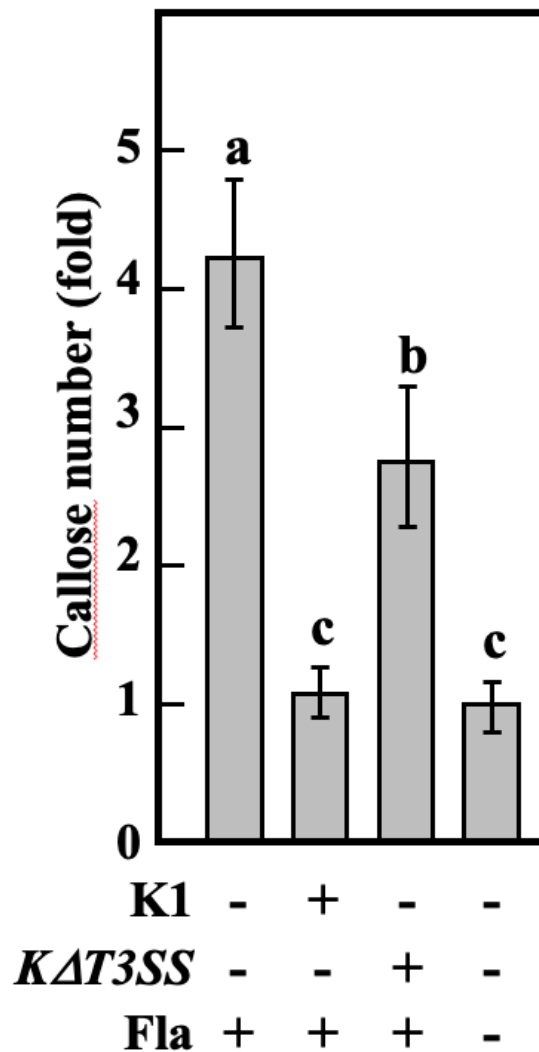


Fig. 10 *A. avenae* *K Δ T3SS* を接種したイネ培養細胞におけるフラジェリン処理によって誘導されるカロースの沈着

イネ培養細胞に K1 菌株と *K Δ T3SS* を 1.0×10^8 cfu/ μ l になるように接種し、3 時間後にフラジェリンを 200 nM になるように処理した後、6 時間後に細胞を固定してアニリンブルーで染色し、カロースの沈着数を計測した。縦軸は菌未接種、フラジェリン未処理のイネ培養細胞におけるカロース沈着数を 1 としたときの相対値を示す。図中のエラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。

1-4 考察

A. avenae K1 菌株が持つフラジェリンにより誘導される免疫反応の抑制能を調べるために用いた $K\Delta T3SS$ は K1 菌株の *hrp* 遺伝子群に存在する *hrcV*、*hpaP*、*hrcQ* 遺伝子を欠損するように設計されている (Kondo et al., 2017)。これらの遺伝子は、多くのグラム陰性細菌の *hrp* 遺伝子群上に保存されている。植物病原細菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* の *hrcV* は 8 つの細胞膜貫通型ヘリックスと約 320 アミノ酸の C 末端細胞質部位を持つ HrcV タンパク質をコードしており (Berger et al., 2010)、*X. campestris* pv. *vesicatoria* の *hrcV* 欠損株ではエフェクタータンパク質 AvrBs3 と AvrRxv の分泌が起こらなくなることが報告されていることから (Rossier et al., 1999)、HrcV は Type III 分泌装置の部品の一つであると考えられている。また、*X. campestris* pv. *vesicatoria* の *hrcQ* は T3SS の cytoplasmic (C) ring の構成因子をコードすると考えられており、HrcV や HrcU と相互作用し、分泌タンパク質の動員プラットフォームとして機能していると考えられている (He et al., 2004; Lorenz et al., 2012)。また、植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* の *hpaP* がコードする HpaP タンパク質は植物細胞内には分泌されないが、エフェクタータンパク質の一つである RipP1 と直接相互作用することや (Lohou et al., 2014)、機能的な T3SS と *R. Solanacearum* の病原性に不可欠だと考えられている HrpJ と相互作用し、HrpJ の植物細胞内への分泌を妨げることなどが知られており、T3SS からのエフェクターの分泌を調節する重要なスイッチタンパク質として機能すると考えられている (Lonjon et al., 2019)。*A. avenae* N1141 菌株の *hrcV*、*hpaP*、*hrcQ* 遺伝子を欠損させた $N\Delta T3SS$ は、宿主であるシコクビエに対する病原性と非宿主であるイネに対する ETI の誘導能力を失っていた (Kondo et al., 2012)。このことから $N\Delta T3SS$ では分泌装置の機能不全やエフェクターの分泌調節異常が生じることで、エフェクターを植物細胞内に分泌できないと考えられる。このことから、 $K\Delta T3SS$ においても分泌装置の機能不全やエフェクターの分泌調節異常が起きていると推察され、 $K\Delta T3SS$ が N1141 フラジェリンによって誘導される様々な PTI 反応の抑制能を失っていたという事実はこの PTI の抑制が K1 菌株が持つエフェクターによるものであることを示唆する。

本研究において、K1 菌株を接種したイネ培養細胞においてフラジェリン処理による活性酸素発生の誘導が抑制されたが、 $K\Delta T3SS$ を接種したイネ培養細胞では K1 菌株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した時に比べ 7.7 倍の発生量を示した。一方、K1 菌株未接種のイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の 21 倍の活性酸素発生量を示した (Fig. 8)。このことは、 $K\Delta T3SS$ を接種したイネ培養細胞では、菌株を接種していない培

養細胞における活性酸素発生量までは回復していないことを示す。この事実は、K1 菌株には T3SS を介さない活性酸素発生誘導の抑制機構が存在している可能性を示唆する。植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 は植物が産生する活性酸素を病原性に必要な KatB、KatE、KatG という複数のカタラーゼによって分解する機構を有することが報告されている(Guo et al., 2012)。K1 菌株の全ゲノム配列を解析したところ、K1 菌株ゲノムにはカタラーゼをコードすると推定される遺伝子が7つ存在していることが示されており(三橋, 2015)、K1 菌株に存在するこのカタラーゼによって、フラジェリンによって誘導される活性酸素の一部が分解されている可能性もあるだろう。

同様に、*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞ではフラジェリン処理時に K1 菌株を接種したイネ培養細胞の 2.8 倍のカロース沈着が認められた一方、未接種のイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の 3.9 倍のカロース沈着が認められた (Fig. 10)。このことはフラジェリンによって誘導されるカロース沈着量は、*KΔT3SS* を接種した培養細胞においては未接種の培養細胞までには回復していないことを示す。一般的に植物が PTI を誘導するためのシグナルは、PRR による PAMP 認識後、陰イオン流入、MAPK リン酸化カスケード、活性酸素種の蓄積、植物ホルモンの作用、防御遺伝子誘導などによって下流に伝達される (Nicaise et al., 2009)。シロイヌナズナにおいて、flg22 やキトサンなどの PAMP を認識して誘導されるカロースの沈着量が、光の強さやスクロースの量、ビタミンの量などの環境要因によって変化することが報告されている (Luna et al., 2011)。興味深いことに、これらの環境要因は H₂O₂ の発生量にも影響を与えることが示され、カロースの沈着量と H₂O₂ の発生量には相関があることが明らかとなった。また、H₂O₂ の生合成に関わる *RBOHD* を欠損したシロイヌナズナにおいて、flg22 処理時の H₂O₂ の発生量とカロースの沈着量が減少したが、グルコシノレート調節酵素をコードする *PEN2* を欠損した変異体では flg22 処理時の H₂O₂ の発生量に変化がなく、カロースの沈着量のみが減少した。このことから、シロイヌナズナにおいてカロースの沈着は、発生した H₂O₂ によって誘導されると考えられる (Luna et al., 2011)。イネにおけるカロース沈着の誘導経路は未だ明らかになっていないが、*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞におけるカロースの沈着量が菌株未接種の培養細胞より低かったのは、K1 菌株が持つカタラーゼによる活性酸素の分解によって活性酸素量が減少したため、カロースの沈着量が減少した可能性が考えられる。この可能性について検証するためには、K1 菌株や *KΔT3SS* を培養細胞に接種するときにカタラーゼ阻害剤を加えておくことで、活性酸素の発生量やカロースの沈着量がどのように変化するかを調べる必要があるであろう。

KΔT3SS を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合、処理 1 時間後の *PAL* の発現量は *K1* 菌株を接種したイネ培養細胞の 6.4 倍、*OsWRKY70* の発現量は 2.9 倍となった。一方、菌株を接種していないイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合、処理 1 時間後の *PAL* の発現量は *K1* 菌株を接種したイネ培養細胞の 3.8 倍、*OsWRKY70* の発現量は 1.8 倍であり *KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞にフラジェリン処理した場合の方が *PAL* と *OsWRKY70* の発現量はより高いことが示された。加えて、*K1* 菌株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合における *PAL* と *OsWRKY70* の発現量は菌株未接種のイネ培養細胞に水を処理した場合よりも 5 倍程度多かった (Fig. 9)。*K1* 菌株のフラジェリンは PTI 誘導能を持たないため、このことは *K1* 菌株および *KΔT3SS* がフラジェリンとは別の PAMP 様活性物質を有している可能性を示唆する。*A. avenae* には、フラジェリン以外にも EF-Tu という PAMP が存在することが明らかになっており (Furukawa et al., 2014)、その他に未知の PAMP が存在する可能性も考えられる。

PAL はフェニルアラニンアンモニアリアーゼをコードする遺伝子であり、植物免疫反応においてフェニルプロパノイド経路の最初の反応を触媒することで抗菌物質ファイトアレキシンの生合成に関与する (Dixon & Paiva, 1995; Zhu et al., 1995)。また、*OsWRKY70* は植物特有の転写因子である WRKY ファミリーに属するタンパク質をコードしており、このファミリーのメンバーは W-box 配列との結合を介してシロイヌナズナにおいて全身獲得抵抗性の指標となる *PR-1* 遺伝子や植物の免疫反応誘導のポジティブレギュレーターである *NPR1* などを制御することが示されている (Maleck et al., 2002; Yu et al., 2001)。シロイヌナズナにおいて、FLS2 からの flg22 認識情報は、MEKK1、MKK4/MKK5、MPK3/MPK6 を含む MAPK カスケードによって伝達され、この情報に従って WRKY22/29 が発現誘導される (Asai et al., 2002)。また、イネにおいても、*OsWRKY70* は *OsMPK3* を含む MAPK カスケードの下流で発現制御されることも示されている (Li et al., 2015)。一方、*X. campestris* pv. *vesicatoria* のエフェクターである XopB は flg22 によって誘導されるシロイヌナズナの活性酸素発生を抑制するが、MAPK シグナリングには変化を与えないことから、活性酸素の発生は MAPK カスケードとは異なる経路によって制御されていると考えられている (Priller et al., 2016)。*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞において活性酸素発生やカロース沈着と、*OsWRKY70*、*PAL* の発現が異なる挙動を見せたことは、*K1* 菌株は異なる PTI 反応誘導経路を同時に抑制している可能性を示唆する。

第 2 章

A. avenae K1 菌株によるイネ PTI 抑制に関わる因子の同定

2-1 緒言

第1章において、*A. avenae* K1 菌株を接種したイネ培養細胞ではフラジェリン処理によって誘導される活性酸素発生や *PAL*、*OsWRKY70* の発現、カロースの沈着などの PTI 反応が抑制されるが、T3SS 欠損株である *KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞ではこれら PTI 反応の抑制が弱くなることが明らかとなった。このことは、K1 菌株が T3SS を介して分泌する何らかの因子によってフラジェリンによって誘導される各種イネ PTI 反応を抑制している可能性を示す。そこで、本章では K1 菌株による PTI 抑制に関わる因子を同定することを目的として研究を行った。

2-2 方法

2-2-1 エレクトロポレーション用 *A. avenae* K1 菌株のコンピテントセルの作製

A. avenae K1 菌株のスキムミルク保存溶液を PF プレートにストリークし、30°C、2 日間生育させた。生育した *A. avenae* K1 菌株のシングルコロニーを PF 培地 3.0 ml に植菌し、30°C、約 20 時間振盪培養した。この培養液 100 μ l を 2 \times YT 培地 100 ml に植菌し、30°C、200 rpm で OD₆₁₀ が 0.8~1.0 になるまで振盪培養した。この培養液を 50 ml ファルコンチューブに 25 ml ずつ分注し、3,300 \times g、4°C、5 分間遠心分離して、上清を取り除いた。4°C の 10% グリセロールを 20 ml 加え、vortex で激しく懸濁し、さらに 4°C の 10% グリセロールを 20 ml 加えた。1 分間 vortex で激しく懸濁し、1 分間氷冷を 3 回繰り返した後、3,300 \times g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。ここまでの操作を 2 回繰り返した後、沈殿物を 1.0 ml の 30% グリセロールに再懸濁し、50 μ l ずつ 1.5 ml マイクロチューブに分注した。その後、液体窒素で瞬間凍結し -80°C で保存した。

【2 \times YT 培地】

組成	容量
Bacto™ Tryptone (BD)	16 g
Bacto™ Yeast Extract (BD)	10 g
NaCl (Wako)	5.0 g
5.0 N NaOH (Wako)	0.2 g
純水	1,000 ml

試薬をすべて混合した後、オートクレーブで滅菌した。

【10% (v/v) グリセロール】

組成	容量
Glycerol (Wako)	50 ml
超純水	up to 500 ml

調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

【30% (v/v) グリセロール】

組成	容量
Glycerol (Wako)	30 ml
超純水	up to 100 ml

調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

2-2-2 *A. avenae* K1 トランスポゾン挿入変異株の作製

コンピテントセル 50 μ l を氷上で融解した後、EZ-Tn5TM<KAN-2>Tnp TransposomeTM (EPICENTRE) を 20 ng 添加し、氷上で 30 分間静置した。あらかじめ 4°C に冷やしておいたキュベット (Gene Pulser® Cuvette, 0.1 cm, BIO RAD) に混合液を移し、素早く Gene Pulser XcellTM (BIO-RAD) のチャンバーにセットし、電圧 1.7 kV/cm、電気容量 25 μ F、キュベット抵抗 200 Ω で遺伝子の導入を行った。エレクトロポレーション後すぐに SOC 培地 950 μ l を加えて 1.5 ml マイクロチューブに移し、30°C、200 rpm で 90 分間振盪培養した。菌懸濁液を 3,300 \times g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去後、菌体を 50 μ g/ml Kanamycin を含む PF プレートに全量をプレーティングし、30°C で 2 日間培養した。得られた Kanamycin 耐性菌が EZ-Tn5TM<KAN-2>Transposon をゲノム上に有しているか確認するため、Kanamycin 耐性遺伝子領域を増幅するプライマーを用いたコロニーPCRを行った。

【使用したプライマー】

- EZ-Tn_171_F_KANR
5'-AGGCCGCGATTAAATTCCAA-3'
- EZ-Tn_798_R_KANR
5'-TGGTATCGGTCTGCGATTCC-3'

【コロニーPCR 反応液組成】

組成	容量
10×PCRx enhancer solution	1.0 μ l
10×Blend Taq Buffer	1.0 μ l
2.0 mM dNTPs	1.0 μ l
10 μ M Primer-F	0.2 μ l
10 μ M Primer-R	0.2 μ l
Blend Taq (2.5 units/ μ l : TOYOBO)	0.05 μ l
滅菌水	6.55 μ l
Total vol.	10 μ l

【コロニーPCR 反応条件】

96°C	5 min	
96°C	1 min	} 30 cycles
55°C	1 min	
72°C	2 min	
25°C	∞	

2-2-3 トランスポゾン挿入変異株のカタログ化

96 穴マイクロプレートの各ウェルに 50 μ g/ml kanamycin を含んだ LB freezing buffer を 100 μ l ずつ分注し、50 μ g/ml kanamycin を含んだ PF プレート上に形成した K1 トランスポゾン挿入変異株のシングルコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて一つずつ植菌した。植菌後の 96 穴マイクロプレートを滅菌プレートシール (EXCEL Scientific) でシールし、コンタミネーションや培養液の蒸発が起こらないようにした。このプレートを 200 rpm、30°C で約 2 日間振盪培養を行い、十分に菌体が増えたことを確認してから -80°C で冷凍保存した。

【LB freezing buffer】

組成	容量
1 M K ₂ HPO ₄	18 ml
1 M KH ₂ PO ₄	6.6 ml
1 M Na-citrate	0.85 ml
100 mM MgSO ₄	0.20 ml ※
100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	3.4 ml
88% glycerol	25 ml
LB Broth (MOBIO)	12.5 g
超純水	up to 500 ml

※印はオートクレーブ処理をし室温に戻した後、無菌的に加えた。

2-2-4 K1 トランスポゾン挿入変異株のレプリカプレート作製

カタログ化された K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーを実験に用いるために、このライブラリーのレプリカプレートを作製した。植菌作業をする前に 96 穴ピンツール（日本エイドー特注品）を 2.5%次亜塩素酸ナトリウムに 5 分漬け、次に 70%エタノールに 5 分漬けた後、滅菌水に 1 分漬けて 96 穴ピンツールの滅菌を行った。この 96 穴ピンツールを K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーのカatalogプレートに差し込み、50 µg/ml kanamycin を含む LB 液体培地を 200 µl ずつ分注した 96 穴マイクロプレートに植菌することでレプリカプレートを作製した。作製したレプリカプレートは、溶液の蒸発及びコンタミネーションの防止のために滅菌プレートシールで封をし、30°C、150 rpm の条件で 3 日間振盪培養を行った。また、コントロールとして K1 野生株と *K1T3SS* も kanamycin を含まない LB 液体培地を用いて同様にレプリカプレートを作製し、振盪培養した。

2-2-5 K1 トランスポゾン挿入変異株を用いたスクリーニング法

イネ培養細胞の生重量を測定し、新しい R2S 培地に 10 mg/ml となるようにイネ培養細胞を加えて調整した培養液をスターラーで攪拌しながら 96 穴マイクロプレートに 150 µl ずつ分注し、人工気象器で 30°C、光照射下、マイクロミキサー (E-36, TAITEC) を用いて 2 時間振盪培養した。また、K1 トランスポゾン挿入変

異株レプリカプレートで3日間培養し、この菌体溶液を5倍希釈し、マイクロプレートリーダー（GE Healthcare）でOD₆₂₀の値を測定し、OD₆₂₀の値が0.35~0.70（約1.0×10⁵~3.0×10⁵ cfu/μlに相当）になるようにLB液体培地で希釈した。2時間振盪培養後のイネ培養細胞に濃度調整を行った各菌株を15 μl接種し、人工気象器で30℃、光照射下、マイクロミキサーを用いて3時間振盪培養した。振盪培養後、培養液を取り除き、150 μlのR2S培地で3回洗浄し、フラジェリンを100 nMになるように加えた。フラジェリン処理前と処理1時間後の培養液10 μlを蛍光・発光シグナル検出用の96穴プレートに量り取り、このプレートをPHELIOSにセットし、ポンプ2より0.55 mMのルミノール溶液20 μlを、ポンプ1より17.81 mM K₃[Fe(CN)₆]溶液170 μlを自動分注し、10秒間の化学発光量を測定した。

【0.55 mM ルミノール溶液】

組成	容量
11 mM ルミノール溶液	50 μl
50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.9)	950 μl

【17.81 mM K₃[Fe(CN)₆]溶液】

組成	容量
K ₃ [Fe(CN) ₆] (Wako)	23 mg
50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.9)	42.5 ml

2-2-6 PTI抑制能を欠失したK1トランスポゾン挿入変異株からゲノムの単離

スクリーニングで得られた候補のトランスポゾンが挿入された部位近傍の配列を明らかにするために、各候補株からゲノムを単離した。50 μg/ml kanamycinを含むPF液体培地5.0 mlに、スクリーニングで得られた候補株のスキムミルクストック溶液5.0 μlを植菌し、30℃で一晩振盪培養した。培養液を1.5 mlマイクロチューブに移し、4℃、4,000×g、10 min、遠心分離（微量遠心機CT13R, HITACHI）を行い、上清を除去した。得られた沈殿をTE buffer 1.0 mlで懸濁し、500 μlずつを1.5 mlマイクロチューブに分注した。そこに、10% SDS 15 μl、20 ng/ml プロテイナーゼK 1.5 μlを加えて転倒混和し、37℃で1時間反応させた。その後、5.0 M NaCl 50 μl、CTAB/NaCl 40 μlを加え、65℃、10 min処理することで失活させた。

その後、等量の PCI (Phenol chloroform isoamyl alcohol) を加えて転倒混和し、室温、15,000×g、5 min、遠心分離し、水層を別の 1.5 ml マイクロチューブに移した。次に、水層と等量の CIA (Chloroform isoamyl alcohol) を加えて転倒混和し、15,000×g、5 min で遠心分離し、水層を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。そこに水層の 1/10 量の 3.0 M CH₃COONa と等量の 2-プロパノールを加えて転倒混和し、室温、4°C、15,000×g、10 min、遠心分離を行い、上清を除去した。得られた沈殿に 70%エタノールを 1.0 ml 加えて 4°C、15,000×g、10 min、遠心分離を行い、上清を除去した。沈殿を小型微量濃縮遠心機 (WAKENYAKU) で減圧乾燥し、TE buffer 250 µl に溶解後、1.0 mg/ml RNaseA を 5 µl 加えて混合し、37°C に設定したエアインキュベーターで 1 時間静置した。この反応液に等量の PEG 溶液を加え、ピペティングで混合し、4°C で 1 時間静置した後、4°C、15,000×g で 15 min、遠心分離し、上清を除去した。沈殿に 70%エタノール 1.0 ml を加えてリンスし、4°C、15,000×g で 10 min、遠心分離後、上清を除去する操作を 2 回行った。残った沈殿を減圧乾燥し、TE buffer 50 µl を加えて沈殿を溶解した。溶解後、Nano drop (SCRUM) を用いて、DNA の濃度を測定した。

【TE buffer】

組成	容量
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	2.0 ml
500 mM EDTA (pH 8.0)	0.4 ml
超純水	up to 200 ml

調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

【CTAB/NaCl】

組成	容量
NaCl (Wako)	4.1 g
CTAB (CALBIOCHEM)	10.0 g
超純水	up to 100 ml

調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

【PEG 溶液 (1.6 M NaCl, 13% PEG 8000)】

組成		容量
NaCl (Wako)		4.67 g
PEG 8000 (MP Biomedicals)		6.50 g
超純水	up to	50 ml

調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

2-2-7 RATE 法によるトランスポゾン挿入部位の近傍の配列解析

PTI 抑制能を欠失した変異株のトランスポゾンが挿入された部位の近傍配列を明らかにするために、RATE (Random Amplification of Transposon Ends) 法を用いてトランスポゾン近傍の DNA を増幅した。RATE 法による DNA の増幅は下記に示した RATE PCR 反応条件で行い、1st step ではトランスポゾン上の配列に特異的な単一プライマー (Inv1 または Inv2) を用いた一本鎖 DNA の伸長反応を行った。2nd step ではアニーリング温度を低く設定することにより、用いた単一プライマーの非特異的なアニーリングを誘発し、PCR 反応を行うことでランダムな DNA 断片の増幅を行った。3rd step では通常の PCR 反応を行い、2nd step で増幅したランダムな DNA 断片の増幅を行った。RATE 法によって増幅された DNA 増幅産物とトランスポゾンに特異的なシーケンス用プライマー (FP1 または RP1) を次のサイクルシーケンス反応に用いた。

【RATE 法に使用したプライマー】

・ TnF 1731-1755 RACE (Inv2) :

5'-CGAACTTTTGCTGAGTTGAAGGACT-3'

・ TnR 145_169_RACE (Inv1) :

5'-GAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATAT-3'

【RATE PCR 反応液組成】

組成	容量
2×PCR buffer for KOD FX (TOYOBO)	5 μ l
2 mM dNTPs (TOYOBO)	2 μ l
Inv1 または Inv2 (10 μ M)	0.3 μ l
Template (単離ゲノム：10~200 ng)	1 μ l
KOD-FX (TOYOBO)	0.2 μ l
滅菌水	up to 10 μ l

【RATE PCR 反応条件】

96°C	5 min	
98°C	30 sec	} 30 cycles (1st step)
55°C	30 sec	
68°C	3 min	
96°C	30 sec	} 30 cycles (2nd step)
30°C	30 sec	
68°C	2 min	
96°C	30 sec	} 30 cycles (3rd step)
55°C	30 sec	
68°C	2 min	
25°C	∞	

2-2-8 サイクルシーケンス反応

RATE 法によって得られた PCR 産物を直接サイクルシーケンス反応に用いるために Exo-Star 処理を行った。Exo-Star 処理が終わったサンプルとトランスポゾンに特異的なシーケンス用プライマー (FP1 または RP1) を用いてサイクルシーケンスを行い、1.5 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 8.0、250 mM EDTA 含有) 1.0 μ l と 99.5%エタノール 25 μ l を加えて混合し、室温で 15 分間静置した後に、室温、15,000×g で 10 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を除去し、70%エタノールを 100 μ l 加えてリンスし、室温、15,000×g で 10 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を除いた沈殿を減圧乾燥し、Hi-Di formamide を 20 μ l 加え、サンプル

ルを溶解した。このサンプルを 96 穴プレート（シーケンス用）に移し、95°Cで 2 分間熱処理した後、シーケンサー（3130 genetic analyzer, HITACHI）を用いて配列を解析した。得られたシーケンスのデータは GENETYX MAC ver. 15 ATSQ で解析し、得られた配列と相同性のある遺伝子について BLAST を用いた解析を行った。

【Exo-Star 反応液組成】

組成	容量
PCR 産物	5.0 μ l
Alkaline phosphatase (GE Healthcare)	1.0 μ l
Exonuclease 1 (GE Healthcare)	1.0 μ l
Total volume	7.0 μ l

【Exo-Star 反応条件】

37°C	15 min
80°C	15 min
25°C	∞

【サイクルシーケンス反応に使用したプライマー】

- ・ KAN-2 FP-1 Forward Primer (FP1) :
5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3'
- ・ KAN-2 RP-1 Reverse Primer (RP1) :
5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3'

【サイクルシーケンス反応液組成】

組成	容量
Big dye (Applied Biosystems)	2.5 μ l
Exo-Star 処理済みサンプル	2.0 μ l
Primer F or R (1 μ M)	1.0 μ l
滅菌水	up to 10 μ l

【サイクルシーケンス反応条件】

96°C	1 min	
98°C	10 sec	} 40 cycles
55°C	5 sec	
68°C	4 min	
25°C	∞	

2-2-9 RNA sequencing による ETS 誘導時の K1 菌株の遺伝子発現解析

LB 培地 100 ml に *A. avenae* K1 菌株を植菌し、30°C、200 rpm で 12 時間培養した。培養 4 日目のイネ培養細胞から培地を除去し、細胞を新しい R2S 培地 150 ml に懸濁した。菌体培養液を 3 分割して 6,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、上清を除いて沈殿をイネ培養細胞の培養液に加えることで、接種を行なった。30°C、200 rpm でイネ培養細胞を培養し、0, 2, 4, 6 時間後の培養液上清を 20 ml ずつ回収した。セルストレイナーでイネ細胞を取り除き、6,000 rpm、4°C、5 分間遠心して上清を除き、沈殿した細菌を回収した。液体窒素で凍結し、-80°C で保存後、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて細菌の Total RNA を抽出し、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (illumina) で rRNA を除去した。この RNA を HiSeq2500 システムでシーケンスし、Subio Platform で解析を行い、2, 4, 6 時間のいずれか一点以上で発現量が 5 倍以上に上昇する遺伝子を選抜した。

2-2-10 遺伝子産物の分泌予測

選抜した K1 菌株の遺伝子産物が植物細胞に分泌される可能性を調べるため、EffectiveT3 (EffectiveDB : <https://effectors.csb.univie.ac.at>) を用いて分泌予測を行なった。Classification module は EffectiveT3 classification module for plant-associated bacteria 1.0.1 を用い、遺伝子産物のアミノ酸配列を基に予測を行なった。

2-2-11 イネ細胞内への AKSF1 の分泌確認

1) *AKSF1-CyaA* fusion ベクターの作製

AKSF1 がイネ細胞内に分泌されているかどうかを調べるため *AKSF1-CyaA*

fusion ベクターを作製した。まず、*AKSF1* 遺伝子 (全長: 627 bp) の開始コドンを含む 6 bp とその上流 913 bp、終止コドンを除く 6 bp とその下流 957 bp を増幅するようにそれぞれプライマーを設計した。また、このプライマーの 5'末端には *CyaA* fusion 用ベクターである *pBBR1TP-flapro-CyaA* (迹見, 2010) の配列と同じ 15 bp を付け足した。PCR 反応後、各 PCR 産物の一部を 1.25 %アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅断片の有無を確認した。

次に、*Hind* III で消化し、CIAP 処理した *pBBR1TP-flapro-CyaA* (迹見, 2010) と上記で得られた *AKSF1* 遺伝子由来の DNA の濃度を電気泳動で確認し、In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa) を用いてクローニングした。このクローニング産物を大腸菌 DH5 α コンピテントセルに導入後、50 μ g/ml の trimethoprim 含有の LB 固体培地にプレATINGし、30°Cで一晩培養した。培養後、下記に示したようなベクター上のプライマーセットを用いて、インサートの確認を行った。さらに、挿入を確認するため、この PCR 産物について Exo-Star 処理後、2-2-8 と同様の条件で配列を解析し、*pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA* の構築を確認した。*pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA* の構築を確認できたコロニーを 100 ml の LB 液体培地に植菌し、150 rpm、37°Cで一晩振盪培養した。培養後、Genopure Plasmid Midi Kit を用いてプラスミドの単離を行うことで、*pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA* を得た。

【PCR 反応液】

組成	容量
2 \times PCR buffer for KOD FX	5.0 μ l
2 mM dNTPs	2.0 μ l
Primer F (10 μ M)	0.3 μ l
Primer R (10 μ M)	0.3 μ l
Template (N1141 or K1 genome : 50 ng)	0.2 μ l
KOD-FX (TOYOBO)	0.2 μ l
滅菌水	1.0 μ l
Total	10 μ l

反応条件

96°C	2 min	} 30 cycles
98°C	30 sec	
68°C	1 min	
25°C	∞	

【AKSF1 遺伝子領域増幅プライマー】

・ In-fusionAKSF1-Cya-F :

5'-TTTGCAATGAAGCTTATGTACTCATCCGTACAATTCGTAG-3'

・ In-fusionAKSF1-Cya-R :

5'-CGATTGCTGAAGCTTATCATCTTGGTAATCTGGGTTATT-3'

【コロニーPCR 反応液】

組成	容量
2×KOD-FX buffer (TOYOBO)	5 μ l
2 mM dNTP (TOYOBO)	2 μ l
Primer F (10 μ M)	0.3 μ l
Primer R (10 μ M)	0.3 μ l
KOD-FX (TOYOBO)	0.2 μ l
滅菌水	2.2 μ l
Total	10 μ l

反応条件

96°C	1 min	
98°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	30 sec	
68°C	2 min	
25°C	∞	

【Hind III 消化】

組成	容量
Hind III	1 μ l
M buffer	2 μ l
Vector	1 μ g
滅菌水	up to 20 μ l

反応条件

37°C Over night

90°C 15 min

【CIAP 処理】

組成	容量
Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)	1 μ l
10 \times buffer	5 μ l
<i>Hind</i> III 消化 vector	-
滅菌水	up to 50 μ l

反応条件

37°C 15 min

↓+CIAP 1 μ l

50°C 15 min

75°C 10 min

【Ligation 反応】

組成	容量
2 \times Ligation mix	5 μ l
<i>pBBR1TP-flapro-CyaA</i>	50 ng
<i>AKSF1</i> 遺伝子	20 ng
滅菌水	up to 10 μ l

pBBR1TP-flapro-CyaA に存在するインサート確認用プライマー

flapro-Fp : 5'-CGGCAACGCCATATCCAGTCA-3'

cya-Rp : 5'-GTTGACCAGGCGGAACATCAATG-3'

2) *AKSF1-CyaA* fusion ベクターの導入と *AKSF1-CyaA* fusion タンパク質の発現確認

A. avenae K1 菌株、*KAT3SS* それぞれに *pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA* を導入し、50 μ g/ml trimethoprim を含む PF プレートにプレーティングし、30°Cで一晩培養した。生育した菌体を滅菌水 1 ml に回収した。この菌体懸濁液の 100 倍希釈液を OD₆₁₀ を分光光度計で測定し、滅菌水中の菌体数を以下に記載した計算式を用いて概算した。植継ぎから 4 日目のイネ培養細胞を新しいフラスコに 20 ml ずつ分注し、2 時間、30°C、108 rpm、連続光 (40 μ mol m⁻² s⁻¹) 下で培養した。これに 1.0 \times 10⁸ cfu/ml となるように調整した菌懸濁液を 20 μ l 接種し 10 時間 30°C、108 rpm、連続光 (40 μ mol m⁻² s⁻¹) 下で培養した。その後、サンプルを 1.5 ml チュー

ブに移し 2×サンプルバッファと 1 対 1 で混ぜて 95°C、5 分間熱処理した。5 分後に、室温で 9,300×g、5 分間遠心分離し、上清 30 µl を 10.0%アクリルアミドゲルにアプライし、電圧 100 V、電流 400 mA、30 W で 2 時間泳動した。電気泳動後、分離ゲル、ニトロセルロース膜 (PROTRAN, Whatman)、濾紙 (FILTER PAPER, ADVANTEC) を転写 buffer に 10 分間浸した。セミドライブロッター (TRANSBROT SD CELL, BIO-RAD) に下から濾紙 3 枚、ニトロセルロース膜、アクリルアミドゲル、濾紙 3 枚の順にセットし、電圧 10 V、電流 500 mA、200 W で 2 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、純水で 3 回洗浄し、ボンソー染色液でタンパク質を染色した。純水で 3 回洗浄し、カメラで撮影した後、TBST で 5 分間洗浄を 3 回行い、ブロッキングバッファで 1 時間ブロッキングを行った。その後、TBST で 5 分間洗浄を 3 回行い、TBST で 1/4,000 に希釈した CyaA 抗体液に浸し、室温で 1 時間振盪した。1 時間後、CyaA 抗体液を除き、TBST で 5 分間洗浄を 3 回行った後、TBST で 1/5,000 に希釈した二次抗体 (抗マウス IgG 抗体) 液に浸し、室温で 1 時間振盪した。1 時間後、TBST で 5 分間洗浄を 5 回行い、ECL Prime Western Blotting detection キット (GE Healthcare) を使って CyaA タンパク質を検出した。また、蛍光検出には ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いた。

3) Cya 活性を指標とした各融合タンパク質のイネ細胞内分泌確認

pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA を導入した *A. avenae* K1 菌株、*pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA* を導入した *KAT3SS* を 2-2-12-2) と同様の手順でイネ培養細胞に接種し、200 rpm、30°C、連続光下 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で 10 時間培養した。培養後イネ培養細胞を純水で 3 回洗浄し、細胞 90 mg をスクリーキャップチューブに入れ、液体窒素で凍結した後、-80°C で保存した。保存していたサンプルに 200 µl の滅菌水を加え、ヒートブロックで 95°C、5 分加熱した後、チューブにジルコニアビーズを加え、Bead smash 12 (WAKENYAKU) を用いて 5,000 rpm で 5 分間破碎した。破碎物を別のエッペンドルフチューブに回収し、1,500×g、4°C で 10 分遠心し、上清を回収した。この作業を 2 回繰り返した後、Cyclic AMP EIA Kit, without Acetic Anhydride (Cayman Chemical Company) を用いて cAMP の濃度を測定した。

2-2-12 イネ細胞内での AKSF1-venus の局在

1) *AKSF1-venus* fusion ベクターの作製

AKSF1 がイネ細胞内のどこに局在するかを調べるために、まず、AKSF1-venus

fusion タンパク質を発現するベクターを作製した。*AKSF1* 遺伝子 (全長: 627 bp) の 5'末端に CACC 配列を付加し、終止コドンを除いた DNA 断片を増幅するようにそれぞれプライマーを設計した。PCR 反応後、増幅断片を pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いて *pENTR D-TOPO* にクローニングした。得られたベクターに含まれる *AKSF1* 遺伝子を Gateway Vector Conversion System を用いて *GW-venus/pBI221* ベクター (Ootsubo et al., 2016) に導入し、*AKSF1-venus* 融合タンパク質を発現する *AKSF1-venus/pBI221* ベクターを得た。

【*AKSF1* 遺伝子領域増幅プライマー】

・ CACCAKSF1-F :

5'-CACCATGTACTCATCCGTACAATTCGTAG-3'

・ AKSF1-withoutstop-R :

5'-ATCATCTTGGTAATCTGGGTTATT-3'

2) パーティクルガンによるイネ培養細胞への *AKSF1-venus/pBI221* ベクターの導入

植え継ぎ 4 日目のイネ培養細胞をプラスチックシャーレに移し、培地を取り除き、R2O 培地 20 ml を加えた。先切りチップを用いて細胞懸濁液を取り、5 cm 直径のろ紙の中央に細胞が重ならないように広げた。吸引瓶と真空ポンプを用いてこのろ紙から水分を除き、ろ紙自体を R2O プレート上に乗せ、30°C、暗所で 3 時間静置した。エッペンドルフチューブに 5 µg の *AKSF1-venus/pBI221* ベクターを加え、50 µl に分注した 3 mg の金粒子 (1.0 micron gold)、50 µl の 2.5 M CaCl₂、20 µl の 0.1 M spermidine を加えて 3 分間激しく攪拌した。その後、10,000 rpm で 10 秒間遠心分離して上清を除去し、250 µl の 100% ethanol を加えて激しく攪拌し、同条件で再度遠心分離して上清を除去した。得られた沈殿物を 50 µl の 100% ethanol に懸濁し、このうち 20 µl を macro carrier holder にセットした macro carrier の中央にのせ、乾燥させた。この macro carrier とイネ細胞を、パーティクルガン Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad) 内に 1,100 psi の rupture disk、stopping screen とともにセットし、減圧装置とヘリウムガスの圧力を利用して金粒子をイネ細胞に撃ち込み、目的遺伝子を導入した。このイネ細胞を 30°C、暗所で 6 時間静置し、共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 (OLYMPUS) によって Venus の蛍光を観察した。

【R2O 培地】

組成	容量
20×R2 Major	50 ml
1000×R2S Minor	1 ml
500×Fe 溶液	2 ml
1000×Ms vitamin	1 ml
0.4 mg/ml 2,4-D	10 ml
Sucrose (nacalai tesque)	30 g
mannitol	30 g
sorbitol	30 g
超純水	up to 1 L

KOH で pH5.6 に合わせてオートクレーブ滅菌した。R2O プレーットの作製時はオートクレーブ前に Ager を 1%となるように加えた。

2-2-13 AKSF1 遺伝子破壊株の作製

K1 菌株の PTI 抑制に関与するエフェクター候補遺伝子を破壊するベクターを作製するために、K1 野生株のゲノムをテンプレートにして下記に示したようなエフェクター候補遺伝子の一部分を増幅するプライマーで PCR を行った。その後、Zero blunt PCR クローニングキット (invitrogen) を用いて増幅断片と *pCR-blunt* ベクターとのライゲーションを行った。次に、大腸菌 One Shot® TOP10 コンピテントセル 50 µl にライゲーション反応液 2 µl を加えて混和した後、氷上で 20 分間インキュベート、42°C 50 秒間ヒートショック、氷上で 2 分間インキュベートを行った。これに 950 µl の SOC 培地を加えて 30°C、150 rpm で 60 分間振盪培養を行った。培養後、25°C、800×g、10 分で遠心分離し、上清を 100 µl だけ残して除き、懸濁した菌体液を 50 µg/ml kanamycin 含有の LB プレートにプレーティングした後、37°C で 1 日培養を行った。培養後、生じたコロニーに対してインサートを増幅したときと同じプライマーを用いてコロニー PCR を行った。*pCR-blunt* ベクター上に遺伝子の挿入が確認できたコロニーを 50 µg/ml Kanamycin 含有の LB 液体培地 5 ml に植菌して 37°C で一晩震盪培養し、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (SIGMA) を用いてプラスミドの抽出を行うことでプラスミドを単離し、2-2-2 と同じ方法で K1 菌株に導入・選抜・確認を行い、AKSF1 遺伝子破壊株 (*SF1DM*) を得た。

【各候補遺伝子の一部を増幅するために用いたプライマー】

・ Kgene_3339_40-60F : 5'-TATTCCGCGCCACCATTTCC-3'

・ Kgene_3339_378-358R : 5'-AATGCCCCGGCGATGTTAGTGC-3'

2-2-14 AKSFI 遺伝子欠損株の作製

2 回の相同組換えにより *AKSFI* 遺伝子を K1 菌株のゲノムから取り除くための相同組換え用ベクターを作製した。まず、*AKSFI* 遺伝子 (全長 : 627 bp) の開始コドンを含む 6 bp とその上流 913 bp、終止コドンを含む 6 bp とその下流 957 bp を増幅するようにそれぞれプライマーを設計した。また、このプライマーは上流と下流が 20 bp 重複するように設計し、また、それぞれの 5' 末端側には *Xba* I サイトを含む *pKmobsacBKm* ベクターの配列と同じ 15 bp を付け足した。PCR 反応後、各 PCR 産物の一部を 1.25 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅断片の有無を確認した。得られた上流 bp と下流 bp の各増幅断片を 100 倍希釈して混合し、上流と下流の DNA を以下の条件でアニーリングさせた。その後、上清を除去し、沈殿の減圧乾燥を行い、滅菌水に沈殿を溶解し、*Xba* I で消化した *pKmobsacBKm* を回収した。次に、回収した *pKmobsacBKm* の濃度をアガロース電気泳動によって確認し、*AKSFI* 遺伝子の上流と下流が連結した 1,870 bp の領域を *Xba* I で消化した *pKmobsacBKm* に In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa) を用いてクローニングした。このクローニング産物を大腸菌 DH5 α コンピテントセルに導入し、50 μ g/ml Kanamycin 含有の LB 固体培地にプレーティングし、37°C で一晩培養した。培養後、生じたコロニーに対して下記に示したインサートを囲むベクター上のプライマーセット (Mobsac_F、Mobsac_R) を用いて、インサートの確認を行った。さらに、インサートの配列をシーケンスで確認するため、この PCR 産物を Exo-Star 処理後、サイクルシーケンスを行い、インサートの配列を確認し、*AKSFI* 欠損株作製用ベクター *pKmobsacBKm- Δ AKSFI* の構築を確認した。*pKmobsacBKm- Δ AKSFI* の構築を確認できたコロニーを 50 μ g/ml Kanamycin 含有の LB 液体培地 100 ml に植菌して 37°C で一晩震盪培養し、Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) を用いてプラスミドを抽出し、2-2-2 と同じ方法で K1 菌株に導入し、50 μ g/ml Kanamycin 含有の PF プレートで選抜した。*pK18MobsacB* ベクターに存在する *SacB* 遺伝子は高濃度のスクロース培地において致死性になるため、*pK18MobsacB* ベクターを持つ菌株のうち相同組換えが起きた菌株だけが *SacB* 遺伝子を失い、生育できることとなる。そのため、スクロース培地を用いて 2 回目の相同組換えを引き起こした菌株を選抜するために、

pKmobSacBkm-ΔAKSFI の導入が確認できたコロニーを 50 μg/ml Kanamycin 含有の PF 液体培地 3 ml に植菌し、30°C で 1 晩振盪培養した。この菌培養液 100 μl を 4,000 g で 5 分間遠心分離し、上清を除いて PF 培地 100 μl を加えて再懸濁した。この懸濁液 3 μl を 27%、28% スクロース濃度の PF 培地 3 ml に植菌し 30°C で 3 日間振盪培養した。その後、白濁した培養液を 100 倍希釈して PF 固体培地にプレーティングし、30°C で 2 日間培養した。得られたシングルコロニーを PF プレートと 50 μg/ml の kanamycin 含有の PF プレートにレプリカをとり、30°C で培養した。相同組換えが起きた場合、kanamycin 耐性遺伝子や *SacB* 致死遺伝子を失うため、kanamycin 含有の PF プレートには生育せず、PF プレートのみで生育する。PF プレートのみで生育したコロニーには *AKSFI* 遺伝子が欠損した *AKSFI* 遺伝子欠損株と *AKSFI* 遺伝子を持ったままの野生株の 2 種類が存在する。そのため、*AKSFI* 遺伝子欠損株を選抜するために *AKSFI* 遺伝子上流の F プライマー (Kgene3339UP-seq-F) と下流の R プライマー (Kgene3339down-seq-R) を用いてコロニー PCR を行い、*AKSFI* 遺伝子の欠損を確認した。さらに、コロニー PCR 産物を Exo-Star 処理後、2-2-8 と同様にして *AKSFI* 遺伝子の欠損部位の周辺配列を確認した。*AKSFI* 遺伝子欠損の確認が出来た菌株を *AKSFI* 遺伝子欠損株 (*KΔSFI*) とした。

【インサートの増幅に用いたプライマー】

・ In-fuXbaI-Kgene3339-UP-F :

5'-CAGGTCGACTCTAGAAACATCGAATTTATTACAGCAC-3'

・ In-fuKgene3339-UP-R :

5'-TCAATCAATCGTACATCCAAAATAACTCGG-3'

・ In-fuKgene3339-DOWN-F :

5'-TTGGATGTACGATTGATTGAAAAATATAATTTAAAATATC-3'

・ In-fuXbaI-Kgene3339-DOWN-R :

5'-CGGGGATCCTCTAGAGTGAAAGACATCCTGCGGAG-3'

【インサートを囲むベクター上のプライマー】

・ Mobsac_F : 5'-GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT-3'

・ Mobsac_R : 5'-TCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAA-3'

【欠損の確認に用いたプライマー】

・ Kgene3339UP-seq-F : 5'-CGGCGATCTTATTCTCTGGCGCC-3'

・ Kgene3339down-seq-R : 5'-GCAGGCCTTCCCTTGGTAAG-3'

2-2-15 AKSF1 遺伝子破壊株と欠損株の PTI 抑制能の確認

AKSF1 が実際に PTI の抑制に関与しているのか確かめるために、作製した *SF1DM* と *KΔSF1* の PTI 抑制能を調べた。それぞれの変異株を 1-2-4 と同様にしてイネ培養細胞に接種し、フラジェリン処理によって発生する活性酸素の発生量を測定した。また、*SF1DM* を 1-2-5 と同様にしてイネ培養細胞に接種し、フラジェリン処理による *PAL* と *OsWRKY70* の発現量を解析した。さらに、それぞれの変異株を 1-2-6 と同様にしてイネ培養細胞に接種し、フラジェリン処理によって誘導されるカロースの沈着数を測定した。

2-2-16 AKSF1 遺伝子相補株の作製

KΔSF1 における PTI 抑制能の喪失が AKSF1 の欠損によるものであるかどうかを確かめるため、*AKSF1* 遺伝子相補株を作製した。K1 野生株のゲノムをテンプレートにして *AKSF1* を含む配列を増幅するプライマーセット (In-fuXbaI-Kgene3339-UP-F、In-fuXbaI-Kgene3339-DOWN-R) を使用し、PCR 反応を行なった。PCR 産物を In-Fusion HD Cloning kit を用いて 2-2-12 と同様の方法で *pK18mobsacBKm* ベクターにクローニングし、*pKmobsacBKm/AKSF1* を構築した。Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) を用いてプラスミドを抽出し、2-2-1 と同様の方法で作製した *KΔSF1* コンピテントセルに導入し、2-2-12 と同様にしてスクロース選抜を行い、*AKSF1* の再導入が確認できた菌株を *KΔSF1/SF1* とした。

また、*AKSF1* のプロモーター配列からターミネーター配列までを含む領域を特異的に増幅するプライマーセット (newK1SF-1UP-F、Kgene3339down334R) を設計して PCR を行い、Zero blunt PCR クローニングキット (invitrogen) を用いて増幅断片と *pCR-blunt* ベクターとのライゲーションを行った。2-2-11 と同様の方法で増幅領域が挿入されたプラスミドを抽出し、*KΔSF1* コンピテントセルに導入した。*AKSF1* の導入が確認できた菌株を *KΔSF1/VSF1* とした。

また、2-2-11-1) で作製した *flapro-AKSF1-CyaA/pBBR1TP* を *KΔSF1* コンピテントセルに導入した。*AKSF1* の導入が確認できた菌株を *KΔSF1/FpSF1CyaA* とした。

【インサートの増幅に用いたプライマー】

・ newK1SF-1UP-F :

5'-TTTCCGGGATCACCCCTGC-3'

・ Kgene3339down334R :

5'-CGGGAGCGCCAGTTTCAGCA-3'

2-2-17 K1 菌株を接種したイネ植物体における病徴の確認

イネ (*O. sativa* L. cv. Kinmaze) の種子を水道水に浸し、30°C、連続光 (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下で3日間静置して発芽させた後、びわ湖培土2号 (琵琶湖産業株式会社) の入ったプランターに植え替え、人工気象器内で明期16時間 (30°C、200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、暗期8時間 (28°C) の条件で約3週間生育させた。K1 菌株、*KAT3SS*、*KASF1*、*SF1DM* を 1.0×10^6 cfu/ μl に調整し、菌懸濁液 1 μl を 22G の針の先にのせ、イネの地上部 3 cm の位置に針を貫通させて菌を接種した。接種後イネを同じ生育条件の人工気象器に戻し、接種4日後まで1日おきに病徴を観察した。接種4日後に接種部位から下 2 cm、上 8 cm の全長 10 cm の部位を切断し、1% 次亜塩素酸、70%エタノール、滅菌蒸留水①、滅菌蒸留水②の順番に、切り取った植物体を浸漬することで、表面殺菌を行った。これを乾熱滅菌した乳鉢に細かく刻んで移し、そこへ滅菌蒸留水を 1.0 ml を加えて乳棒で磨碎し、さらにそこへ滅菌蒸留水を 5.0 ml 加えて懸濁した。この懸濁液から 1.0 ml を 1.5 ml マイクロチューブに移し、1,000 倍希釈、10,000 倍希釈、100,000 倍希釈してそれぞれの希釈液を PF プレートに各2枚ずつストリークした。2日間 30°C で培養後、形成したコロニーを計数した。

2-3 結果

2-3-1 K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーの作製

K1 菌株の PTI 抑制に関わる因子を探索するために、K1 トランスポゾン挿入変異株を作製し、それをライブラリー化した。まず K1 菌株のコンピテントセルにエレクトロポレーション法で EZ-Tn5™<KAN-2>Tnp Transposome™を導入した。Kanamycin 含有 PF プレート上で 30°C、2 日間培養し、得られたコロニーの中からランダムに 7 つのコロニーを選択し、Kanamycin 耐性遺伝子領域を増幅するプライマーを用いたコロニーPCR を行ったところ、7 つとも目的の DNA 断片の増幅が確認できた。そこで、シングルコロニー約 10,000 株を 96 穴マイクロプレートに分注した LB freezing buffer に植菌して 2 日間培養し、K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーを作製し、-80°C で保存した。

次に、作製したライブラリーのクオリティチェックのため、ランダムに 15 株を選択し、トランスポゾン挿入部位の解析を行った。その結果、7 株についてトランスポゾン近傍の配列が得られ、それぞれ *Kgene_2857* (*ABC-type polysaccharide/polyol phosphate transport system, ATPase component*) の開始コドン下流 147 bp、*Kgene_2169* (*Phosphoenolpyruvate-protein kinase (PTS system EI component in bacteria)*) の開始コドン下流 79 bp、*Kgene_3502* (*Outer membrane protein*) の開始コドン上流 66 bp、*Kgene_3649* (*3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III*) の開始コドン下流 216 bp、*Kgene_2607* (*Predicted membrane protein*) の開始コドン下流 484 bp、*Kgene_248* (*ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component*) の開始コドン下流 37 bp、*Kgene_2614* (*Hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase*) の開始コドン上流 84 bp の領域にトランスポゾンが挿入されていることが明らかとなった。このように、選択した 7 株においてはトランスポゾン挿入部位が異なっていたので、このライブラリーは K1 菌株の遺伝子を探索するために十分なクオリティを有していると判断した。

A. avenae K1 菌株の全ゲノム解析の結果によると、K1 菌株のゲノム上には ORF が 5,138 個、RBS (ribosome binding site) が 4,379 個存在する (三橋、2015)。*A. avenae* K1 菌株は原核生物であるため、K1 菌株の ORF に存在する遺伝子の多くはポリシストロニックな転写単位で転写されると考えられる。K1 菌株と同じグラム陰性細菌である *Escherichia coli* の場合、ゲノム上に ORF が約 4,300 個存在し、ゲノム全体において 407 個の転写単位がポリシストロニックな転写単位として存在すると予測されている (森、2003)。この比率が K1 菌株においても同程度

であると仮定すると、K1 菌株に存在するポリシストロニックな転写単位は約 490 個であると考えられる。一つのポリシストロニックな転写単位で転写される遺伝子の数を 3 個とした場合、ポリシストロニックな転写単位で転写される遺伝子は約 1,500 個となり、残りの約 3,600 個の ORF がモノシストロニックに転写される遺伝子となる。そうすると K1 菌株の総転写単位数は約 4,100 個と推測される。そのため、作製した約 10,000 株の K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーは全ての転写単位について試験を行うために十分な量を確保していると判断した。

2-3-2 PTI 抑制能を喪失した K1 トランスポゾン挿入変異株の選抜

K1 菌株の PTI 抑制に関わる因子を同定するために、K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーからイネ PTI 抑制能を喪失した変異株を選抜した。4,562 株のトランスポゾン挿入変異株をイネ培養細胞に接種し、3 時間後にフラジェリンを処理して処理 0 時間と処理 1 時間後の活性酸素発生量を測定した。各変異株の PTI 誘導活性は、K1 野生株を接種したイネ培養細胞におけるフラジェリン処理 1 時間後の活性酸素発生量を 0%、*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞におけるフラジェリン処理 1 時間後の活性酸素発生量を 100%として示した (Fig. 11)。その結果、80%~120%の活性酸素発生を示した変異株が 163 株、120%以上の活性酸素発生を示した変異株が 524 株、50~80%の活性酸素発生を示した変異株が 229 株得られた (Table 1)。80%~120%の活性酸素発生を示した変異株のうちで、フラジェリン処理 0 時間の方が高い活性酸素発生量を示した変異株が 7 株あったので、これを除外して 156 株を Group A とし、120%以上の活性酸素発生を示した変異株の中にはフラジェリン処理 0 時間の方が高い活性酸素発生量を示した変異株が 6 株あったので、これを除外して 518 株を Group B、50~80%の活性酸素発生を示した変異株中でフラジェリン処理 0 時間の方が高い活性酸素発生量を示した 17 株を除外した 212 株を Group C とした。

T3SS を介したイネ PTI 抑制能を失った変異株としては *KΔT3SS* と同等の活性酸素発生量を示した Group A が第 1 候補になると考え、この 156 株のトランスポゾン挿入部位の解析を行った。RATE 法を用いてトランスポゾン近傍の DNA を増幅し、配列を解析した結果、84 株のトランスポゾン近傍配列が得られた。得られた配列を K1 菌株の全ゲノムデータ (三橋、2015) に照合したところ、67 株はトランスポゾンが 66 個の遺伝子の ORF 中に挿入されており、2 株は 2 個の遺伝子とその RBS と推定される配列の間にトランスポゾンが挿入されていることが明らかになった (Table 2)。また、3 株は 23S rRNA をコードする領域に、1 株は

16S rRNA をコードする領域にトランスポゾンが挿入されていることも示された。残りの 11 株についてはトランスポゾンの挿入によって影響を受ける遺伝子を特定できなかった。

2-3-3 RNA sequencing による ETS 誘導時の K1 菌株の遺伝子発現解析

これまでに、青枯病細菌 *Ralstonia solanacearum* は、植物由来成分であるオレアノール酸を認識して T3SS が発現誘導されるが、このときに複数のエフェクタータンパク質の発現量も増加することが報告されている (Wu et al., 2015)。そこで、K1 菌株においても植物由来の成分を認識してエフェクタータンパク質の発現量が増加するのではないかと考え、イネに接種した後に発現が増加する K1 菌株の遺伝子を RNA-seq で解析した。イネに接種した後に発現が上昇する K1 菌株遺伝子の中には、*A. avenae* においてエフェクタータンパク質をコードすると考えられている *lrp*、*hrpW*、*hrpY* (Kondo et al., 2012, 2016) が含まれていた。このことは、やはり K1 菌株においても T3SS を介してイネ細胞内に分泌されるタンパク質は宿主に接種した後に発現が増加することを示す (Table 3)。これら遺伝子の発現量は全て 5 倍以上に増加していたので、イネ細胞に接種後に発現量が 5 倍以上に増加する遺伝子 (1,240 個) がエフェクター遺伝子の第 1 候補になると考えた。この 1,240 個の遺伝子を詳細に調べたところ、スクリーニングで同定された 68 個のトランスポゾン挿入遺伝子のうち 16 個の遺伝子が含まれていることも明らかになった (Fig. 12)。このことは、この 16 個の遺伝子がエフェクターをコードする可能性が高いことを示す。

そこで次に、この 16 遺伝子の中で、どの遺伝子がエフェクターをコードしている可能性が高いのかをさらに検証するため、EffectiveT3 によって各遺伝子産物の T3SS を介した分泌予測を行なった。その結果、*Kgene_3339* の T3 スコアが最大値である 1 であることがわかり、この遺伝子の産物が T3SS から分泌される可能性が高いことが示された (Table 4)。そこでこの遺伝子を *AKSF1* (*A. avenae* K1 suppression factor 1) と名付けた。

AKSF1 は 208 アミノ酸残基で構成されるタンパク質をコードしており、27-93 アミノ酸の領域は *E. coli* の DNA polymerase III beta subunit N 末端ドメインとの間に 14% の相同性を有する (Fig. 13)。また、タンパク質全長は様々な細菌種において発見されている Domain of unknown function (DUF) 4935 と 43% の相同性を有することも明らかとなった。

2-3-4 AKSF1 のイネ培養細胞内への輸送

AKSF1 がエフェクターであるならば、イネ感染時に T3SS を介してイネ細胞内に輸送されるはずである。そこで、AKSF1 が実際に T3SS を介してイネ細胞内に輸送されるかどうかを調べるため、AKSF1 とカルモジュリン依存性アデニル酸シクラーゼである CyaA の融合タンパク質 AKSF1-CyaA を用いたイネ培養細胞への輸送試験を行った。この試験は、カルモジュリンが真核生物特有のタンパク質であり原核生物では発見されていないという性質を利用し、カルモジュリンによる CyaA の活性化にしたがって生産される cAMP の量を測定することで、AKSF1-CyaA が K1 菌株の細胞内からイネ細胞内に移動したかどうかを調べる手法である。まず AKSF1-CyaA 発現ベクターである *pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA* を作製し、K1 菌株と *KΔT3SS* に導入した。導入した K1 菌株と *KΔT3SS* をイネ培養細胞に接種し、10 時間後に菌体を回収した。この菌体から精製したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、一次抗体に抗 CyaA 抗体、二次抗体に抗マウス IgG 抗体を用いたウェスタンブロットを行なったところ、*pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA* を導入した K1 菌株と *KΔT3SS* の両方で、AKSF1-CyaA の理論値である 67.6 kDa のタンパク質の発現が確認できた (Fig. 14)。そこで AKSF1-CyaA の発現が確認された K1 菌株と *KΔT3SS* をイネ培養細胞に接種し、10 時間後のイネ細胞を回収・破碎し、細胞抽出液における cAMP の蓄積量を測定した。その結果、AKSF1-CyaA 融合タンパク質を発現する K1 菌株を接種したイネ細胞の cAMP 蓄積量は 230 pmol/ml であった。一方、AKSF1-CyaA 融合タンパク質を発現する *KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞の cAMP 蓄積量は 5.7 pmol/ml であり、両者間には有意な差 ($p < 0.05$) が認められた (Fig. 15)。このことから、AKSF1-CyaA 融合タンパク質は T3SS を介してイネ細胞内に輸送されることが確認された。

2-3-5 イネ培養細胞における AKSF1 の局在部位

AKSF1 がイネ細胞内に分泌された後、どこに存在しているのかを調べるため、AKSF1-venus 融合タンパク質を発現するための *AKSF1-venus/pBI221* ベクターを作製し、パーティクルガンを使用してイネ培養細胞に導入し、6 時間後に共焦点レーザー顕微鏡によって Venus の蛍光を観察した。その結果、イネ細胞の核および細胞質において Venus 由来の蛍光が観察された (Fig. 16)。イネにおいては分子量 60,000 以下のタンパク質は分子内に核移行シグナルを有していなくても核膜孔を

自由に通過できると言われている。AKSF1-venus 融合タンパク質は 52.8 kDa であり、分子内に核移行シグナルが存在しないことから、核で認められた AKSF1-venus 由来の蛍光は核膜孔を自由通過した分子であると考えられる。

2-3-6 AKSF1 を破壊した変異株におけるイネ PTI 抑制能

AKSF1 が実際に PTI の抑制に関与するのかを確かめるため、AKSF1 ベクター挿入破壊株 (*SF1DM*) と AKSF1 欠損株 (*KΔSF1*) を作製し、イネ PTI の抑制能を調べた。イネ培養細胞に水、K1 菌株、*KΔT3SS*、*KΔSF1*、*SF1DM* を接種し、3 時間後にフラジェリンを処理して 1 時間後の活性酸素の発生量を測定したところ、水を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 10 倍の活性酸素発生を示した。*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 8.5 倍の活性酸素発生を示した。*SF1DM* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 7.3 倍、*KΔSF1* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 7.6 倍の活性酸素発生を示した (Fig. 17)。このことから、AKSF1 は K1 菌株によるフラジェリン依存性イネ活性酸素発生誘導の抑制に関与することが明らかとなった。

次に、イネ培養細胞に水、K1 菌株、*KΔT3SS*、*KΔSF1*、*SF1DM* を接種し、3 時間後にフラジェリンを処理して 6 時間後のカロース沈着数を計測した。その結果、水を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 3.8 倍のカロース沈着数を示した。*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 2.7 倍のカロース沈着数を示した。*SF1DM* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 2.8 倍、*KΔSF1* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 2.6 倍のカロース沈着数を示した (Fig. 18)。このことから、AKSF1 は K1 菌株によるフラジェリン依存性イネカロース沈着の抑制にも関与することが明らかとなった。

次に、イネ培養細胞に水、K1 菌株、*KΔT3SS*、*SF1DM* を接種し、3 時間後にフラジェリンを処理して 1 時間後の *PAL* と *OsWRKY70* の発現量を測定した。その結果、水を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の約 3.6 倍の *PAL* の発現量と約 1.9 倍の *OsWRKY70* の発現量

が認められた。*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は *K1* 菌株を接種したイネ培養細胞の約 5.4 倍の *PAL* の発現量と約 2.7 倍の *OsWRKY70* の発現量が、*SF1DM* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は *K1* 菌株を接種したイネ培養細胞の約 4.7 倍の *PAL* の発現量と約 2.7 倍の *OsWRKY70* の発現量が、*KΔSF1* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は *K1* 菌株を接種したイネ培養細胞の約 5.2 倍の *PAL* の発現量と約 2.4 倍の *OsWRKY70* の発現量が認められた (Fig. 19)。このことから、*AKSF1* はフラジェリンによって誘導されるイネ PTI 関連遺伝子 *PAL*、*OsWRKY70* の発現量増加の抑制にも関与することが明らかとなった。

2-3-7 *AKSF1* 遺伝子相補株を接種したイネ培養細胞における PTI 誘導

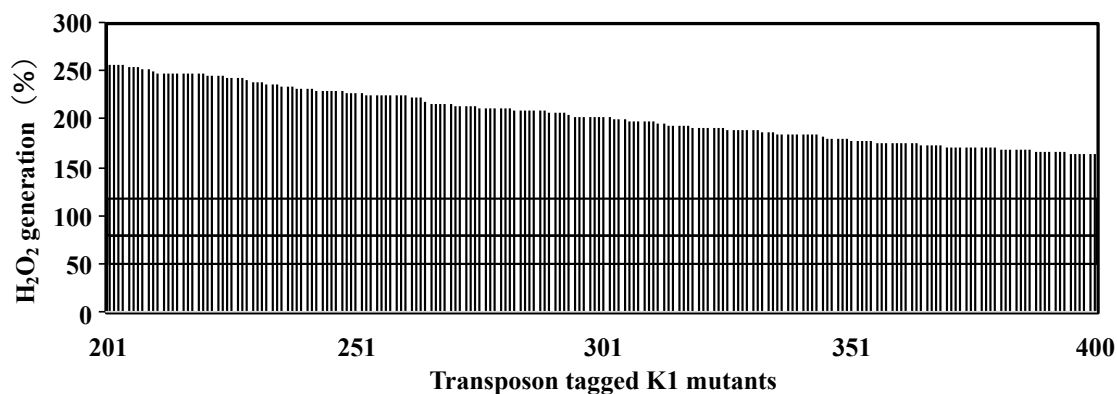
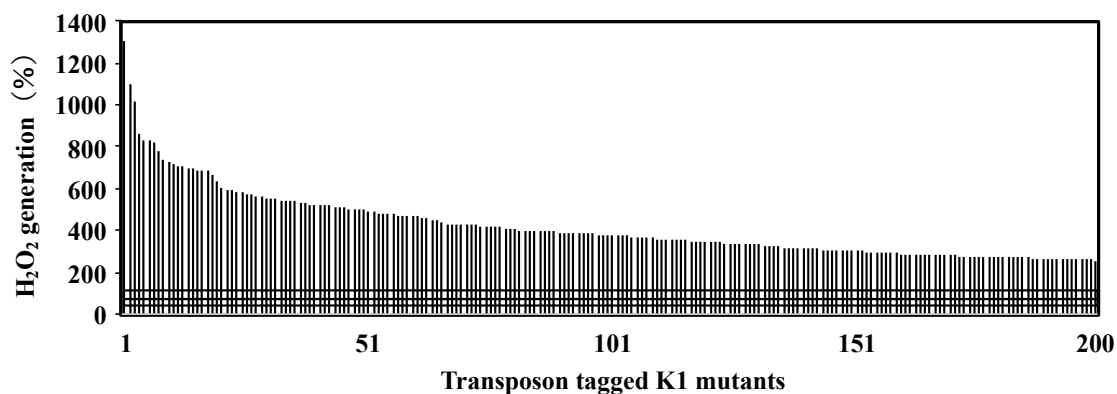
KΔSF1 における PTI 抑制能の喪失が *AKSF1* の欠損によるものであるかどうかを確かめるため、*AKSF1* 相補株を作製して PTI 抑制能を調べた。*KΔSF1* ゲノムの *AKSF1* 欠損部位に *AKSF1* を再導入した変異株 (*KΔSF1/SF1*) を作製した。同時に、*KΔSF1* に *AKSF1* のプロモーターからターミネーターまでの領域を持つベクターを導入した株 (*KΔSF1/VSF1*)、*KΔSF1* に *AKSF1-CyaA* を発現するベクターを導入した株 (*KΔSF1/FpSF1CyaA*) もそれぞれ作製し、 1.0×10^8 cfu/ μ l となるようにイネ培養細胞に接種し、100 nM のフラジェリン処理によって発生する活性酸素量を測定した。その結果、*K1* 菌株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は菌もフラジェリンも処理していないイネ培養細胞の 1.7 倍の活性酸素量を示したのに対し、菌未接種のイネ培養細胞にフラジェリン処理した場合と *KΔSF1* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合はそれぞれ菌もフラジェリンも処理していないイネ細胞の 20 倍、17 倍の活性酸素発生量を示した。一方、*KΔSF1/SF1*、*KΔSF1/VSF1*、*KΔSF1/FpSF1CyaA* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合は菌もフラジェリンも処理していないイネ培養細胞のそれぞれ 2.4 倍、2.9 倍、4.3 倍であり、いずれも *K1* 菌株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合に認められる活性酸素発生量と差は認められなかった (Fig. 20)。このことから、*KΔSF1* で認められるイネ PTI 抑制能の喪失は *AKSF1* によって相補されることが明らかとなり、*AKSF1* がイネ PTI の抑制因子であることが確認された。

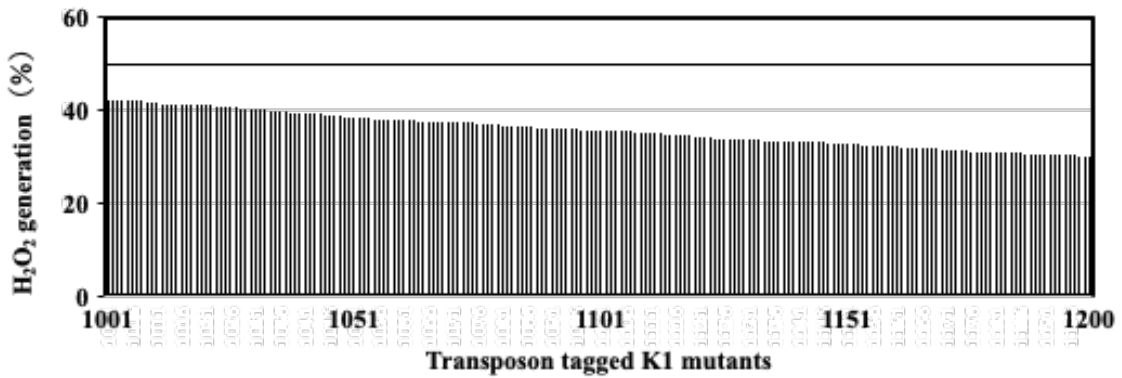
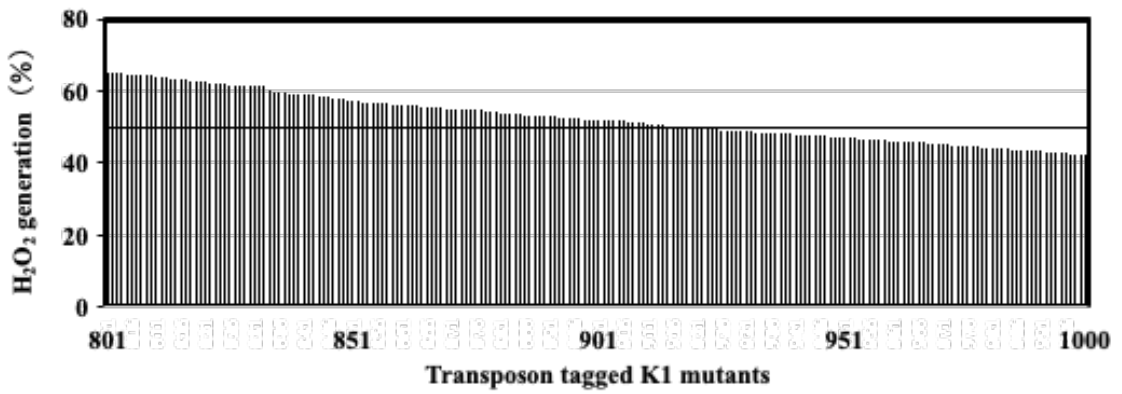
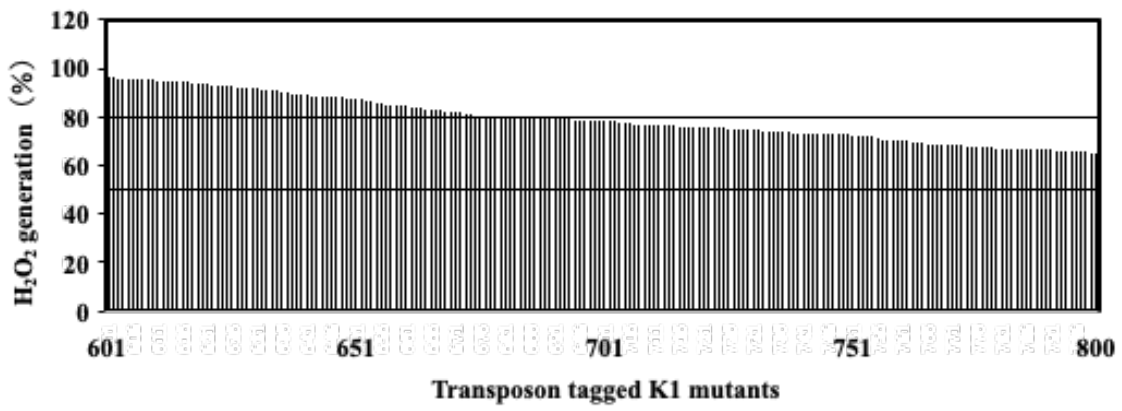
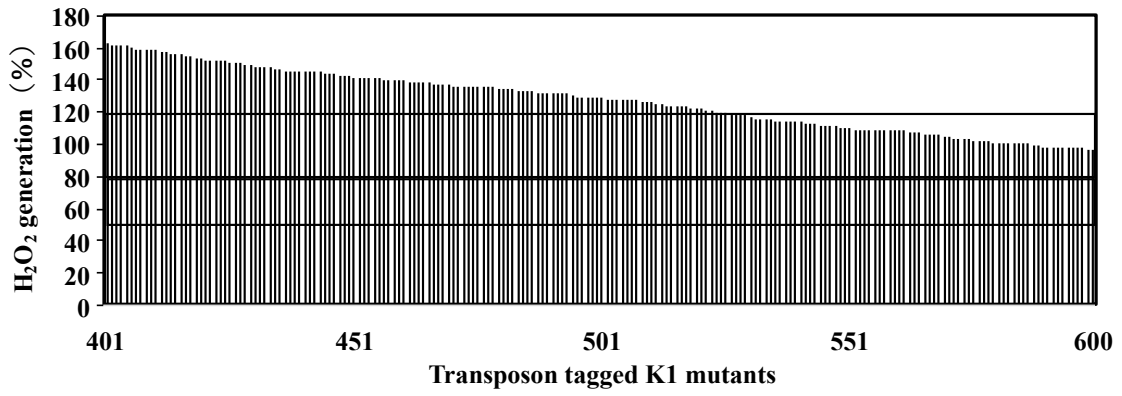
2-3-8 *AKSF1* を破壊した変異株のイネ植物体内での増殖とイネ植物体で認めら

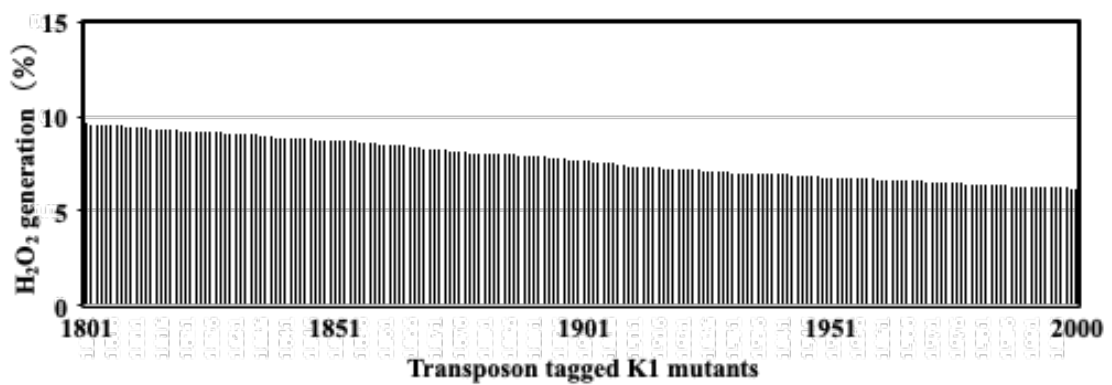
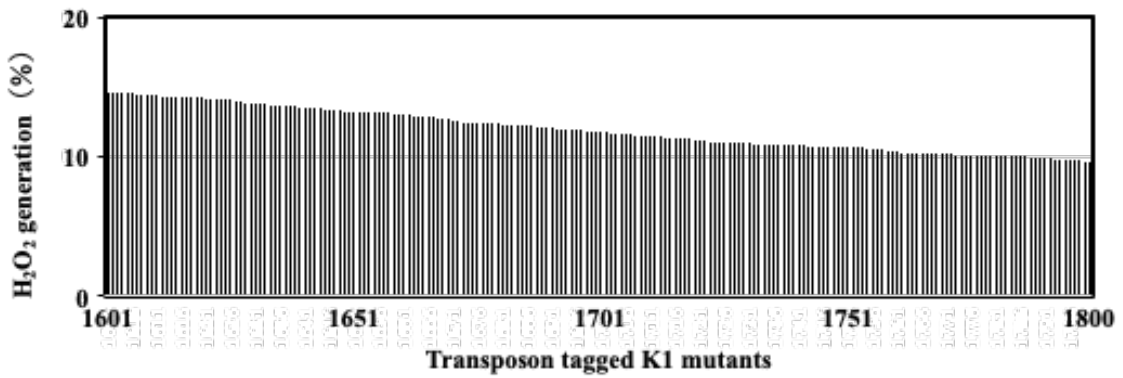
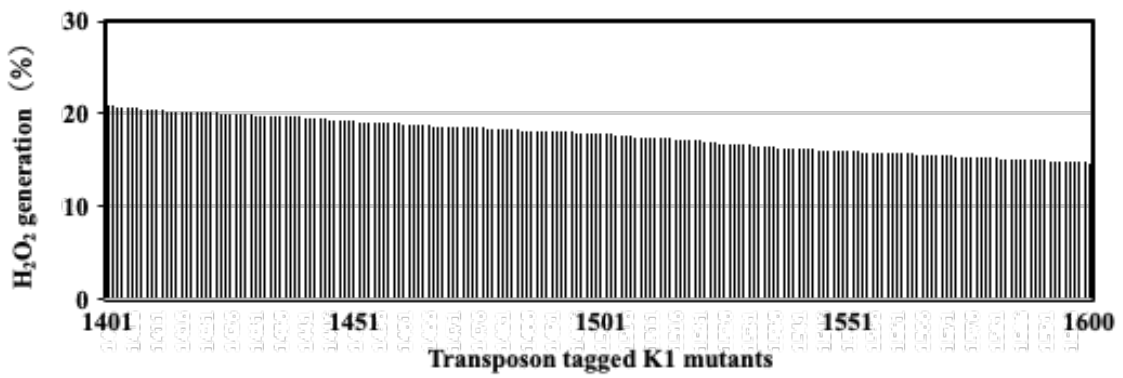
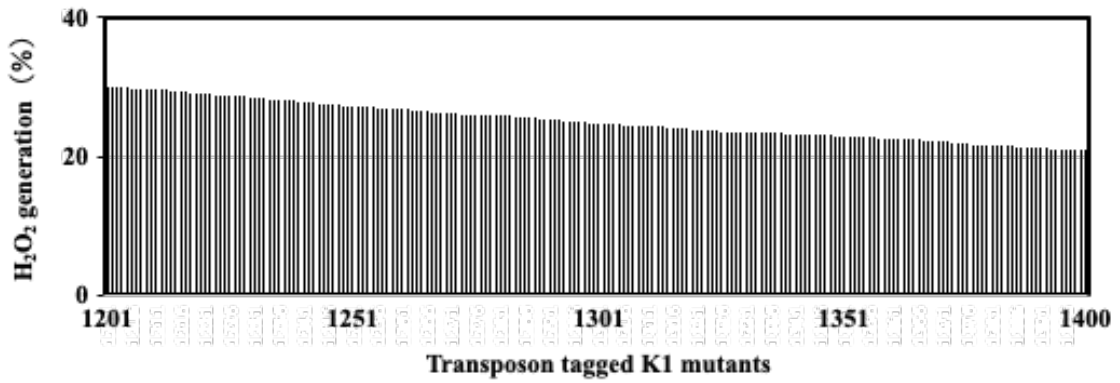
れる病徴

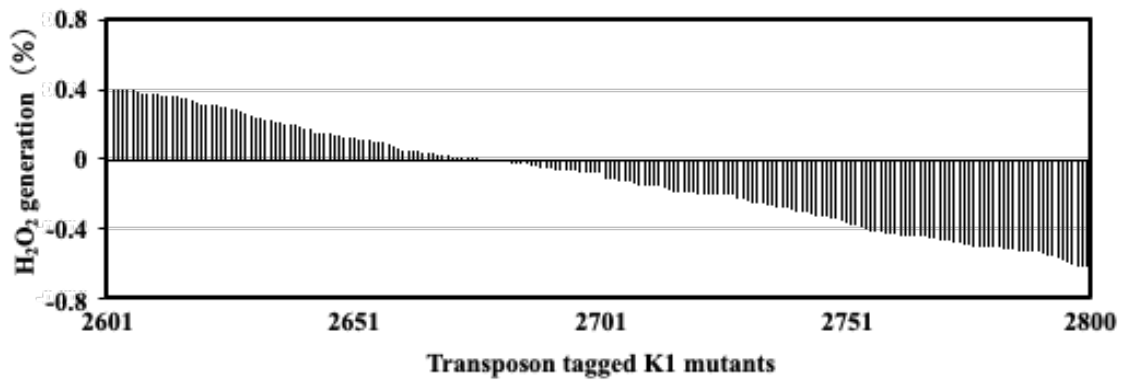
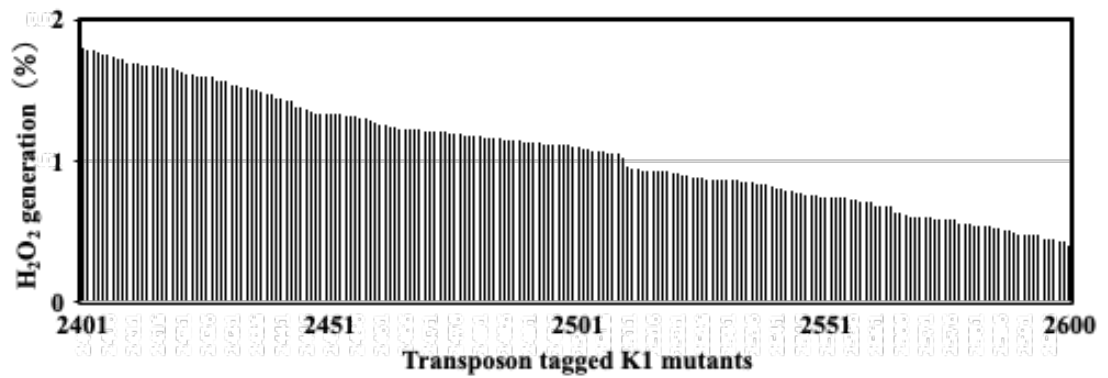
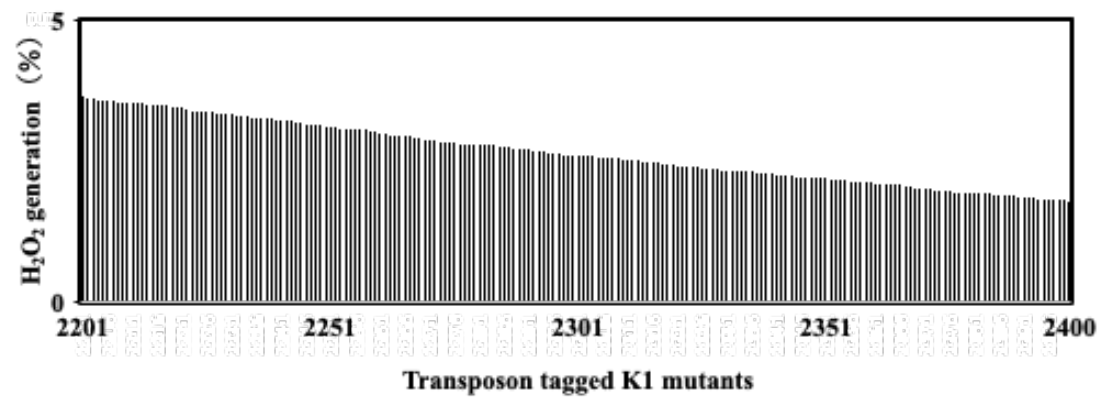
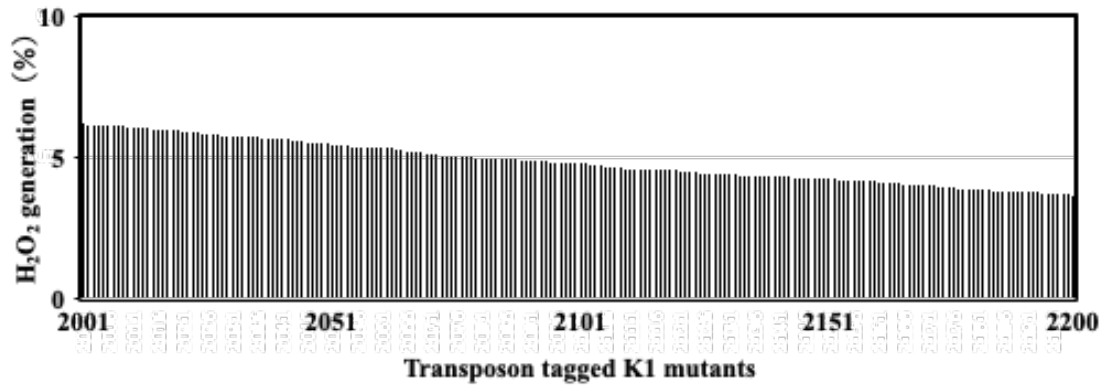
AKSF1 が K1 菌株の病原性に関与しているかどうかを調べるため、AKSF1 を破壊した変異株をイネ植物体に接種し、発生する病徴を観察した。3 週齢のイネ植物体に K1 菌株、*KΔT3SS*、*KΔSF1*、*SFIDM* を 1.0×10^6 cfu になるように接種し、接種 4 日後まで 1 日ごとに病徴を観察した。その結果、K1 菌株を接種したイネでは、接種 2 日後から褐色の病斑が観察され、接種 4 日後には 27 mm に拡大した。一方、*KΔSF1*、*SFIDM* を接種したイネでは接種 2 日後から褐色の病斑が観察されたが、接種 4 日後にはそれぞれ 10 mm、9 mm までしかならなかった。また、*KΔT3SS* を接種したイネでは接種 4 日後まで全く病斑が現れなかった (Fig. 21)。

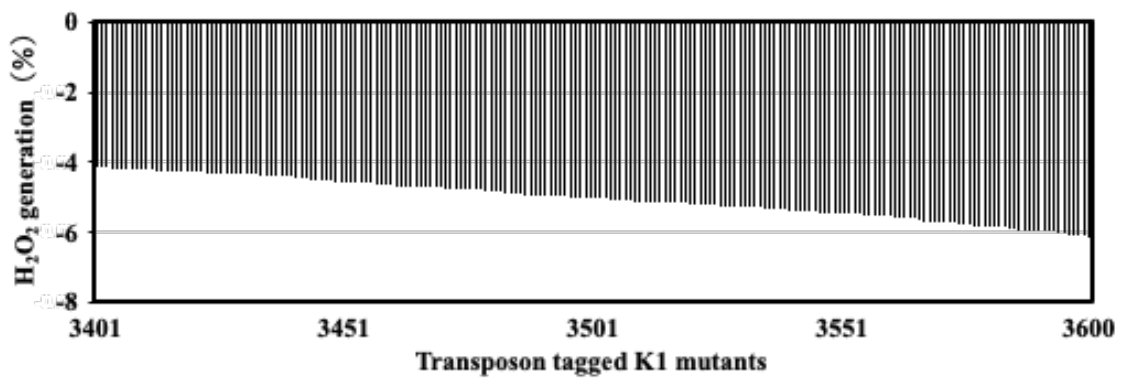
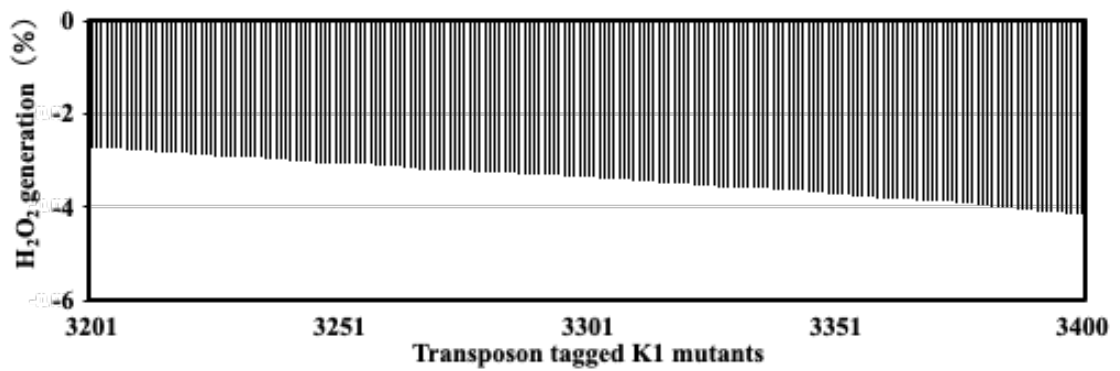
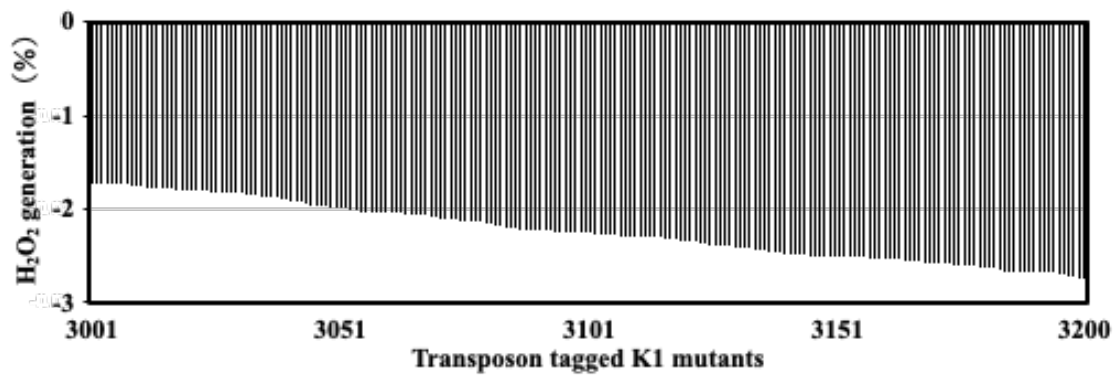
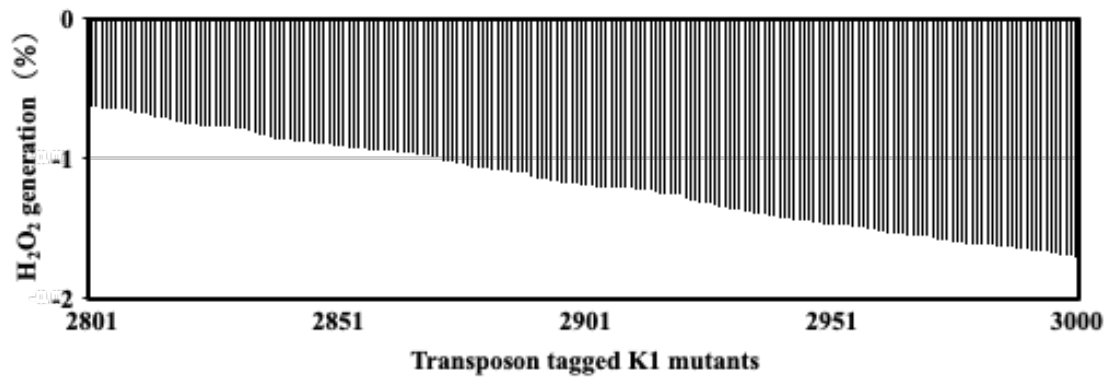
次に、接種 4 日後のイネ内に存在する菌体数を測定したところ、K1 菌株を接種したイネでは 7.0×10^7 cfu、*KΔSF1* を接種したイネでは 3.9×10^7 cfu、*SFIDM* を接種したイネでは 3.6×10^7 cfu の菌の生育が確認された。また、*KΔT3SS* を接種したイネでは 1.8×10^6 cfu であった (Fig. 22)。これらのことから、AKSF1 を破壊した変異株はイネに認められる病徴の減少を示すことが明らかになった。

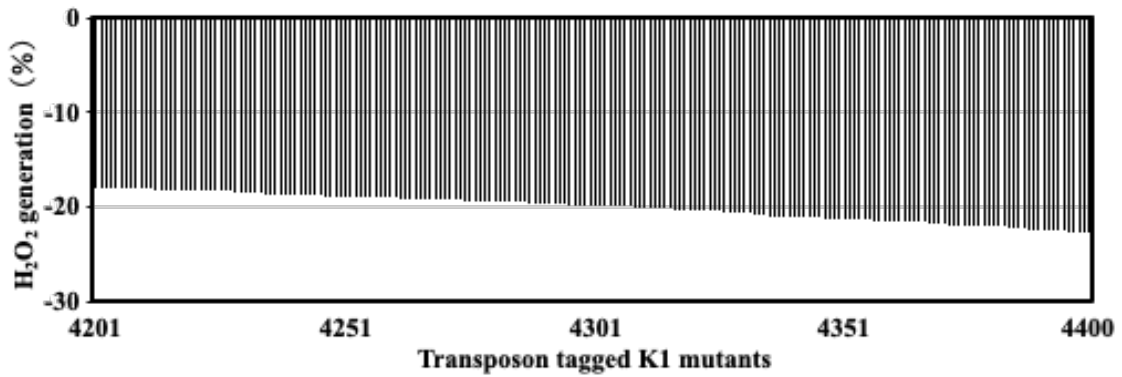
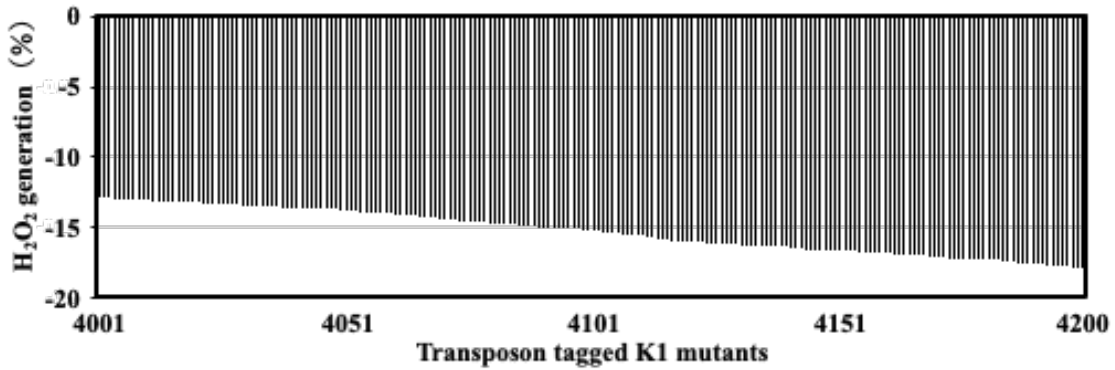
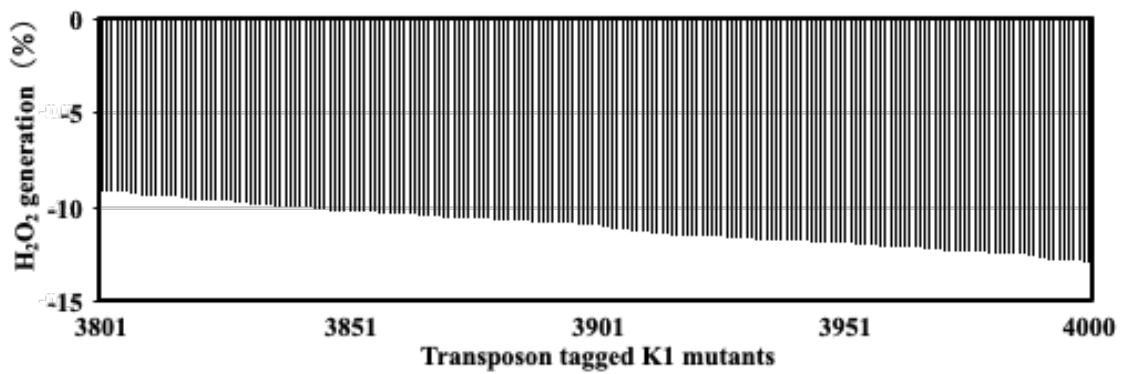
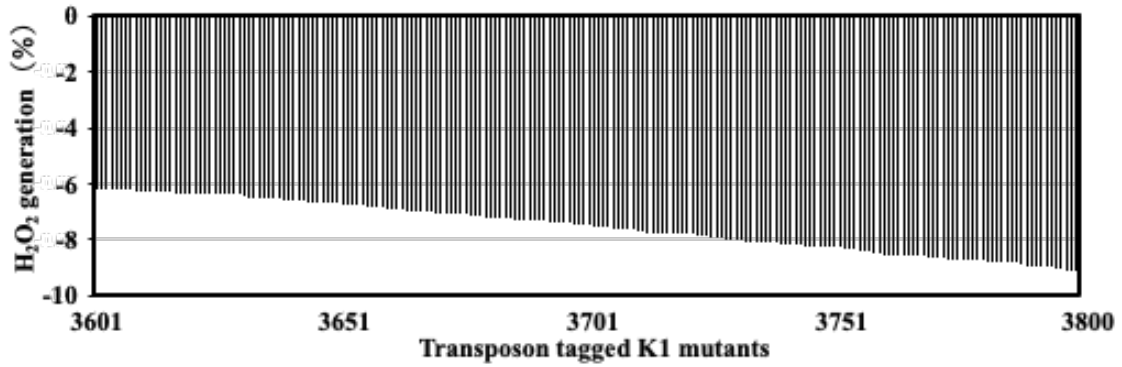












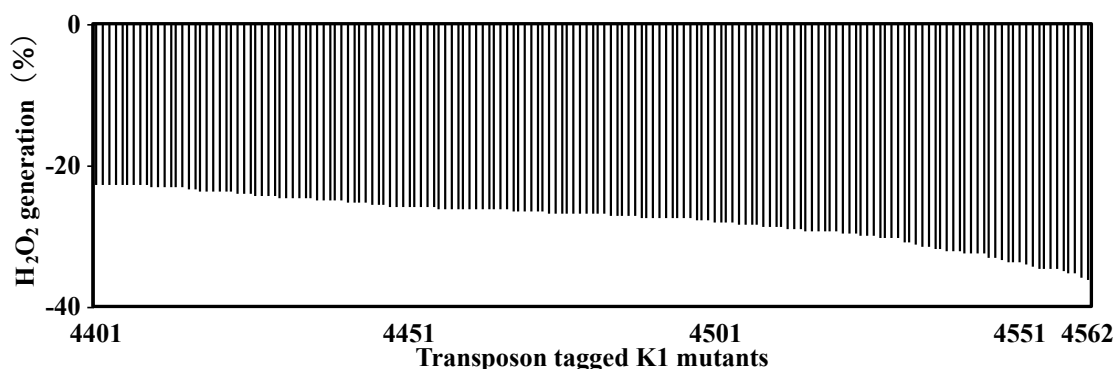


Fig. 11 K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーを用いたイネ活性酸素発生抑制能喪失変異株のスクリーニングの結果

イネ培養細胞に K1 トランスポゾン挿入変異株を接種し、3 時間後にフラジェリン処理して 1 時間後の H₂O₂ 発生量を測定した。各バーはそれぞれの変異株を接種したイネにおいて認められる H₂O₂ 発生量を示す。縦軸は K1 菌株を接種したイネ培養細胞の値を 0%、*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞の値を 100%とした時の値を示す。図中の横線はそれぞれ 120%、80%、50%を示す。

Table 1 スクリーニングに用いた K1 トランスポゾン挿入変異株のカテゴリー分け

処理 1 h 後の 活性酸素発生量 (%)	処理 1 h 後に 活性酸素量が 増加した変異株	処理 1 h 後に 活性酸素量が 減少した変異株	合計
120 以上	518 (Group B)	6	524
80~120	156 (Group A)	7	163
50~80	212 (Group C)	17	229
50 未満	1754	1892	3646
合計	2640	1922	4562

Table 2 近傍配列の解析によって得られたトランスポゾン挿入遺伝子

Gene No.	Predicted encoding protein
<i>Kgene_1</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein
<i>Kgene_47</i>	Signal transduction histidine kinase
<i>Kgene_57</i>	Predicted flavoprotein
<i>Kgene_66</i>	ABC-type sulfate/molybdate transport systems, ATPase component
<i>Kgene_158</i>	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component
<i>Kgene_223</i>	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase
<i>Kgene_361</i>	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase
<i>Kgene_363</i>	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components
<i>Kgene_459</i>	Protein of unknown function DUF748
<i>Kgene_463</i>	Predicted transcriptional regulator, consists of a Zn-ribbon and ATP-cone domains
<i>Kgene_491</i>	ABC-type uncharacterized transport system, permease and ATPase components
<i>Kgene_516</i>	ATPases involved in chromosome partitioning
<i>Kgene_601</i>	Ketol-acid reductoisomerase
<i>Kgene_629</i>	Periplasmic binding protein type2 superfamily
<i>Kgene_713</i>	Predicted ATPase
<i>Kgene_726</i>	RTX toxins and related Ca ²⁺ -binding proteins
<i>Kgene_753</i>	Predicted RNA-binding proteins
<i>Kgene_766</i>	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit
<i>Kgene_872</i>	Glutathione S-transferase
<i>Kgene_937</i>	GMP synthase, PP-ATPase domain/subunit
<i>Kgene_980</i>	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components
<i>Kgene_1154</i>	Isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthases
<i>Kgene_1292</i>	ABC-type proline/glycine betaine transport system, permease component
<i>Kgene_1327</i>	Serine/threonine protein kinase
<i>Kgene_1717</i>	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related FMN-binding protein
<i>Kgene_1734</i>	Predicted transcriptional regulators
<i>Kgene_1749</i>	Heme/copper-type cytochrome/quinol oxidases, subunit 2

<i>Kgene_1750</i>	Type VI secretion system (T6SS), amidase effector protein 4
<i>Kgene_1888</i>	Predicted PP-loop superfamily ATPase
<i>Kgene_2024</i>	Signal transduction histidine kinase regulating C4-dicarboxylate transport system
<i>Kgene_2035</i>	Transposase and inactivated derivatives
<i>Kgene_2221</i>	Malate synthase G
<i>Kgene_2238</i>	Predicted N6-adenine-specific DNA methylase
<i>Kgene_2325</i>	Cytochrome P450-family protein
<i>Kgene_2345</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
<i>Kgene_2451</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein
<i>Kgene_2478</i>	Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme
<i>Kgene_2540</i>	Lipid A core - O-antigen ligase and related enzymes
<i>Kgene_2549</i>	UDP-N-acetylmuramate-alanine ligase
<i>Kgene_2584</i>	Protein of unknown function DUF2252
<i>Kgene_2629</i>	Fibronectin type 3 domain-containing protein
<i>Kgene_3241</i>	Predicted phosphoribosyltransferases
<i>Kgene_3265</i>	Hypothetical protein
<i>Kgene_3267</i>	Acyl-protein synthetase LuxE
<i>Kgene_3324</i>	Outer protein F2
<i>Kgene_3339</i>	DNA polymerase sliding clamp subunit (PCNA homolog)
<i>Kgene_3417</i>	Carbamoylphosphate synthase large subunit (split gene in MJ)
<i>Kgene_3447</i>	ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains
<i>Kgene_3456</i>	Predicted acyltransferases
<i>Kgene_3488</i>	Negative regulator of beta-lactamase expression
<i>Kgene_3818</i>	ABC-type oligopeptide transport system, ATPase component
<i>Kgene_3976</i>	Hemerythrin HHE cation binding domain protein
<i>Kgene_4069</i>	Urea ABC transporter, ATP-binding protein UrtD
<i>Kgene_4163</i>	Stringent starvation protein B
<i>Kgene_4229</i>	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily
<i>Kgene_4550</i>	Acetylornithine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases
<i>Kgene_4563</i>	Peptidase M75, Imelysin
<i>Kgene_4598</i>	Membrane carboxypeptidase/penicillin-binding protein PbpC

<i>Kgene_4837</i>	Transglutaminase-like enzymes, putative cysteine proteases
<i>Kgene_4986</i>	Hypothetical protein
<i>Kgene_5011</i>	Transcriptional regulators
<i>Kgene_5027</i>	Transcriptional regulators
<i>Kgene_5064</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein
<i>Kgene_5066</i>	Transcriptional accessory protein
<i>Kgene_5091</i>	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component, and related enzymes
<i>Kgene_5093</i>	Transposase and inactivated derivatives
<i>Kgene_5096</i>	Hypothetical protein
<i>Kgene_5107</i>	Leucine-rich repeat (LRR) protein

Table 3 *lrp*、*hrpW*、*hrpY* の *A. avenae* K1 菌株をイネに接種した後の発現量変化

遺伝子名	接種後の各時間における発現量 (fold)			
	0 h	2 h	4 h	6 h
<i>lrp</i>	1	17.4238	7.0431	5.3676
<i>hrpW</i>	1	231.5798	69.9378	57.8366
<i>hrpY</i>	1	233.5985	71.6055	38.4663

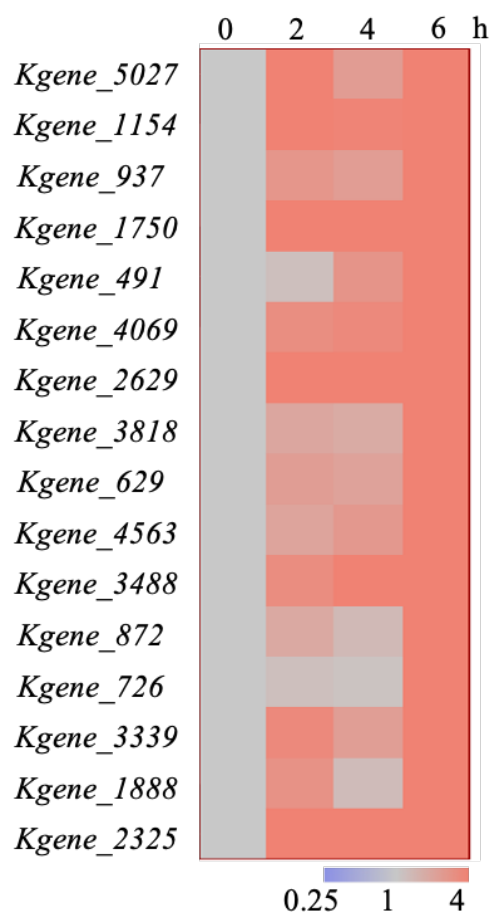


Fig. 12 イネ培養細胞に K1 菌株を接種した後の 16 遺伝子の発現パターン

RNA sequencing においてイネ接種後に発現量が 5 倍以上に上昇した 1,240 個の遺伝子のうち、トランスポゾン挿入変異株を用いたスクリーニングにおいて PTI 抑制候補遺伝子として同定された 16 個の遺伝子の発現パターンを示した。

Table 4 effectiveT3 による 16 遺伝子がコードするタンパク質の分泌予測

Gene No.	T3score
<i>Kgene_491</i>	0.15472
<i>Kgene_629</i>	0.01348
<i>Kgene_726</i>	0.00000
<i>Kgene_872</i>	0.00000
<i>Kgene_937</i>	0.00000
<i>Kgene_1154</i>	0.04338
<i>Kgene_1750</i>	0.83140
<i>Kgene_1888</i>	0.00000
<i>Kgene_2325</i>	0.55888
<i>Kgene_2629</i>	0.00002
<i>Kgene_3339</i>	1.00000
<i>Kgene_3488</i>	0.00119
<i>Kgene_3818</i>	0.00000
<i>Kgene_4069</i>	0.00000
<i>Kgene_4563</i>	0.00000
<i>Kgene_5027</i>	0.00000

AKSF1 (*A. avenae* K1 suppression factor 1)

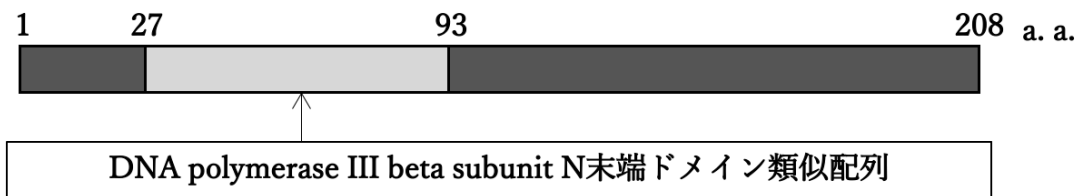


Fig. 13 AKSF1 の一次構造

AKSF1 は 208 アミノ酸残基からなり、27-93 アミノ酸の領域に DNA polymerase III beta subunit N 末端ドメインと類似した配列を有する。

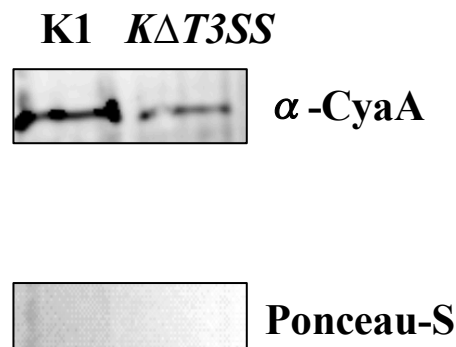


Fig. 14 AKSF1-CyaA 融合タンパク質の発現確認

pBBR1TP-flapro-AKSF1-CyaA を導入した *A. avenae* K1 菌株と *K Δ T3SS* をイネ培養細胞に接種し、10 時間後に菌体を回収した。この菌体から回収したタンパク質を SDS-PAGE によって分離し、一次抗体に抗 CyaA 抗体、二次抗体に抗マウス IgG 抗体を用いたウェスタンブロットを行なった。

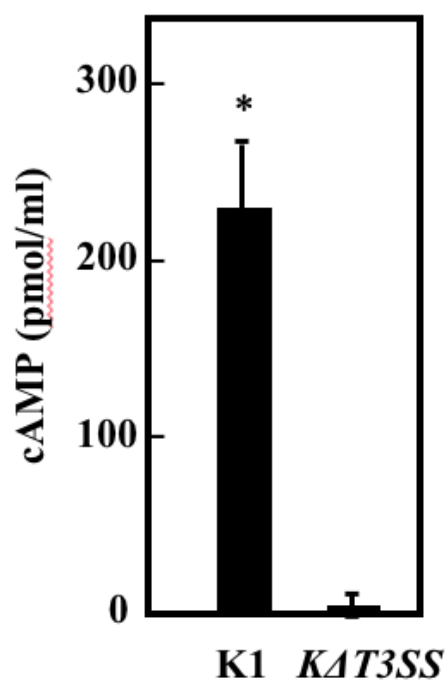


Fig. 15 AKSF1 のイネ細胞への輸送確認

AKSF1-Cya 融合タンパク質を発現させた *A. avenae* K1 菌株または *KΔT3SS* をイネ培養細胞に接種し、10 時間後のイネ培養細胞における cAMP の蓄積量を cAMP の検量線を元に Cyclic AMP ELISA Kit (without Acetic Anhydride) (Cayman Chemical Company) を用いて測定した。エラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。アスタリスクは T 検定による *KΔT3SS* との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

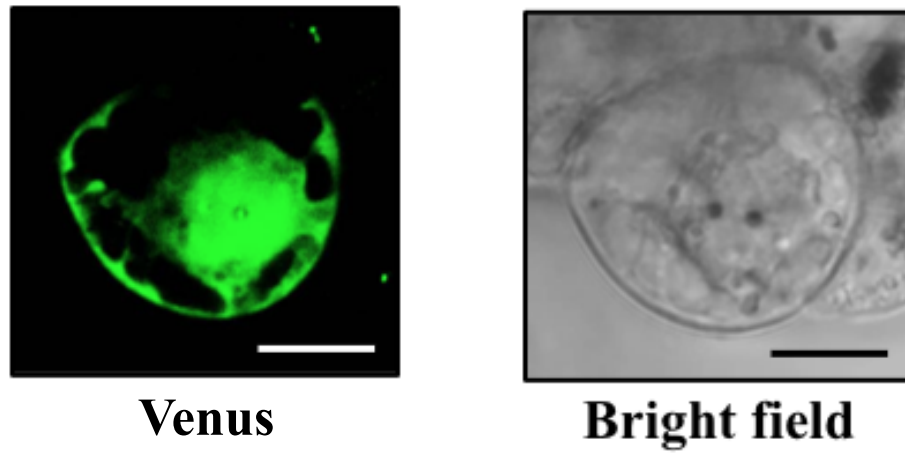


Fig. 16 AKSF1-venus 融合タンパク質のイネ細胞内局在

イネ培養細胞に *AKSF1-venus/pb1221* ベクターをパーティクルガン法で導入し、30°C、暗所で6時間静置した後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。左図が Venus の蛍光、右図が明視野を示す。スケールバーは 20 μm を示す。

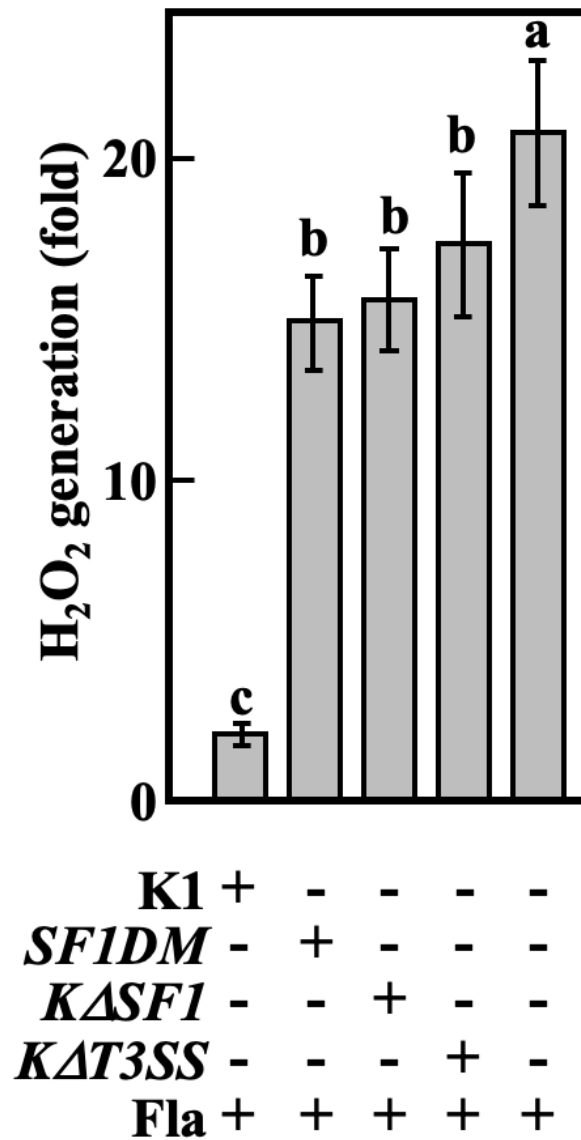
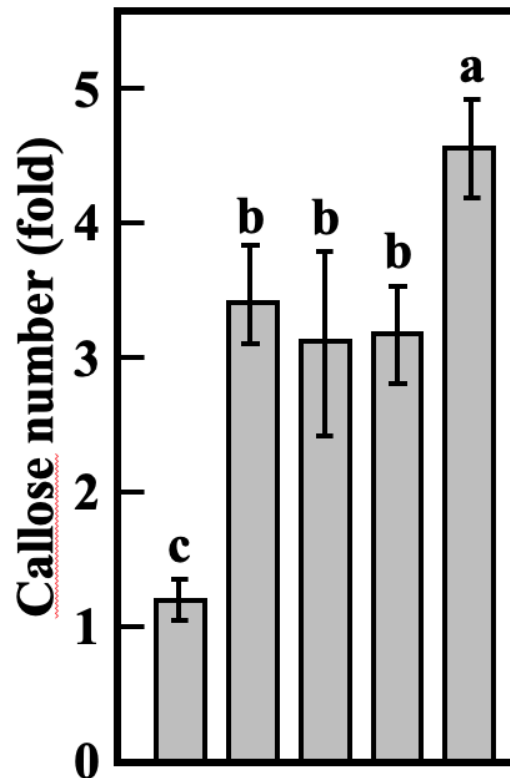


Fig. 17 *KΔSF1*、*SF1DM* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合の活性酸素発生量

水、K1 菌株、*KΔT3SS*、*KΔSF1*、*SF1DM* をイネ培養細胞に接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM になるように処理し、1 時間後の活性酸素の発生をルミノールの化学発光を利用して検出した。活性酸素発生量は菌未接種、フラジェリン未処理のイネ培養細胞における活性酸素発生量を 1 とした相対値で表した。エラーバーは 6 回の実験値の標準偏差を表す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。



K1	+	-	-	-	-
SF1DM	-	+	-	-	-
KΔSF1	-	-	+	-	-
KΔT3SS	-	-	-	+	-
Fla	+	+	+	+	+

Fig. 18 *KΔSF1*、*SF1DM* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合のカロース沈着数

水、K1 菌株、*KΔT3SS*、*KΔSF1*、*SF1DM* を 1.0×10^8 cfu/ μ l になるようにイネ培養細胞に接種し、3 時間後にフラジェリンを 200 nM になるように処理した後、6 時間後に細胞を固定してアニリンブルーで染色し、カロースの沈着数を計測した。縦軸は菌未接種、フラジェリン未処理のイネ培養細胞におけるカロース沈着数を 1 としたときの相対値を示す。エラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。

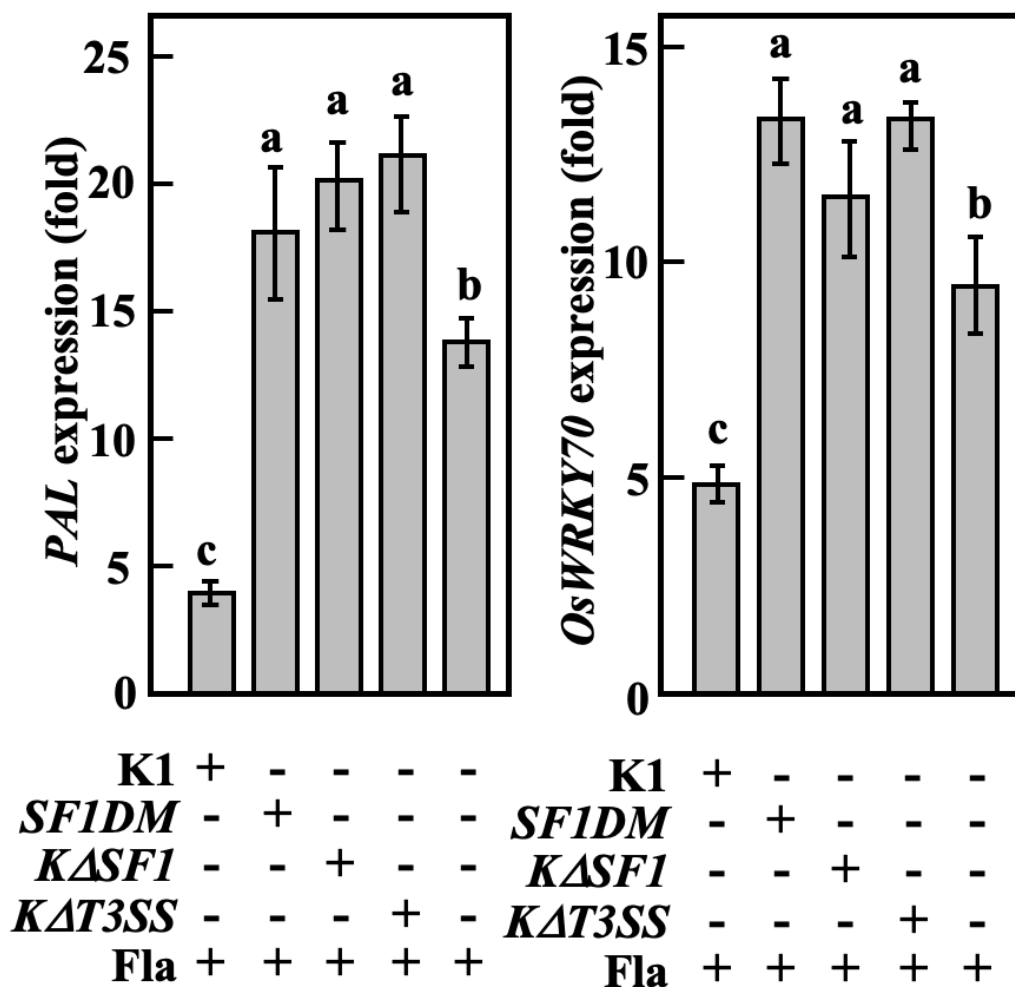


Fig. 19 *KΔSF1*、*SF1DM* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合の *PAL* (左) と *OsWRKY70* (右) の発現量

水、K1 菌株、*KΔT3SS*、*SF1DM* を 1.0×10^8 cfu/ μ l になるようにイネ培養細胞に接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM になるように処理し、1 時間後のイネ培養細胞から RNA を抽出して qRT-PCR を行い、*PAL* (左) と *OsWRKY70* (右) の mRNA の発現量を測定した。縦軸は菌未接種、フラジェリン未処理のイネ培養細胞における発現量を 1 としたときの相対値で表し、エラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。

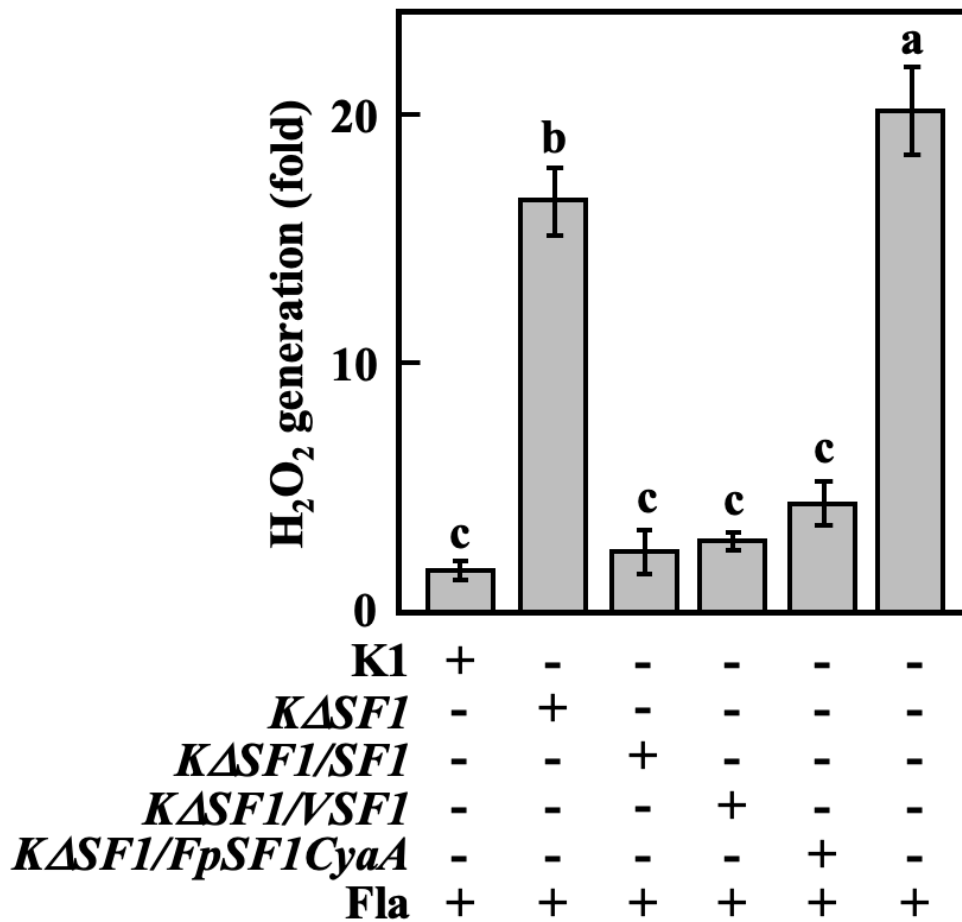


Fig. 20 *AKSF1* 遺伝子相補株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した時に認められる活性酸素発生量

水、K1 菌株、*KΔSF1*、*KΔSF1/SF1*、*KΔSF1/VSF1*、*KΔSF1/FpSF1CyaA* をイネ培養細胞に接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM になるように処理し、1 時間後の活性酸素の発生をルミノールの化学発光を利用して検出した。活性酸素発生量は菌未接種、フラジェリン未処理のイネ培養細胞における活性酸素発生量を 1 とした相対値で表した。エラーバーは 3 回の実験値の標準偏差を表す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。



K1 *KΔT3SS* *KΔSF1* *SF1DM*

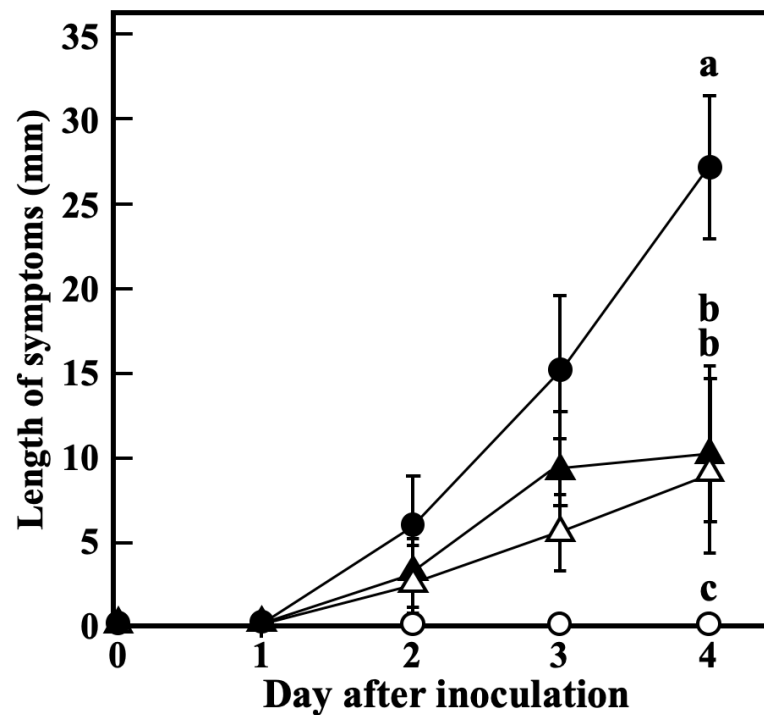


Fig. 21 *KΔSF1*、*SF1DM*を接種したイネ植物体で認められる病徴

3週齢のイネ植物体に K1 菌株、*KΔT3SS*、*KΔSF1*、*SF1DM*を 1.0×10^6 cfu ずつ接種し、褐色の条斑として表れる病徴を1日ごとに観察し、長さを測定した。上図は接種4日後のイネ植物体で認められる病徴を示す。下図は測定した病徴の長さを表し、黒丸は K1 菌株、白丸は *KΔT3SS*、黒三角形は *KΔSF1*、白三角形は *SF1DM*を接種したイネにおける病徴を示す。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。

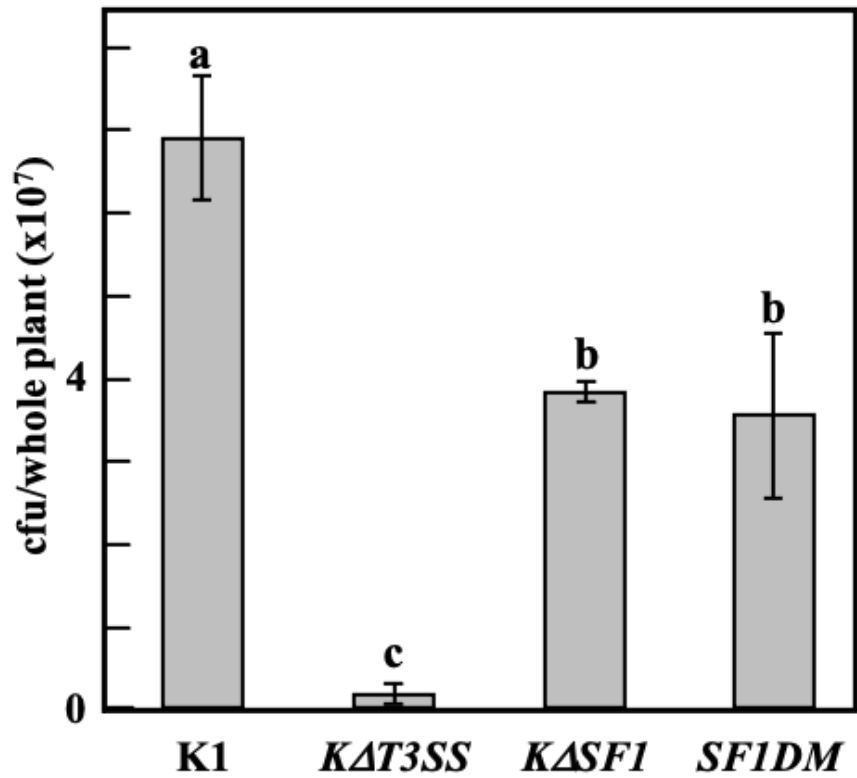


Fig. 22 *KΔSF1*、*SF1DM* を接種したイネ植物体における菌体数

3 週齢のイネ植物体に K1 菌株、*KΔT3SS*、*KΔSF1*、*SF1DM* を 1.0×10^6 cfu ずつ接種し、4 日後の植物体における菌体数を測定した。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す。バーの上の小文字は Tukey Kramer 法による多重検定の結果 ($p < 0.05$) を示す。

2-4 考察

本章では K1 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、*KAT3SS* と同様にフラジェリンによるイネ活性酸素発生の抑制能力を喪失した変異株を 156 株選抜し、そのトランスポゾン挿入部位を解析することで PTI の抑制に関与する可能性のある 68 個の K1 菌株の遺伝子を同定した (Table 2)。活性酸素発生の抑制能力を指標とした PTI 抑制エフェクターの探索は、以前にも他の植物病原細菌で行われている。*Ralstonia solanacearum* RS1000 由来の 61 個のエフェクターをそれぞれ *Nicotiana benthamiana* の葉に発現させて *flg22* を処理する実験により、*flg22* によって誘導される *N. benthamiana* の活性酸素の産生を強く抑制するエフェクター 5 個と適度に抑制するエフェクター 11 個の存在が明らかとなっている (Nakano & Mukaiharu, 2019)。また、*P. syringae* pv. *tomato* DC3000 では、22 個のエフェクターをそれぞれ *N. benthamiana* の葉に発現させて *flg22* を処理したところ、6 個のエフェクターが *N. benthamiana* の *flg22* によって誘導される活性酸素種の産生を抑制したことが報告されている (Gimenez-Ibanez et al., 2018)。これらの知見は、植物病原細菌は PTI を抑制するための重複した機能を持つエフェクターを複数有している場合があることを示している。K1 菌株もこれらと同じグラム陰性細菌であることから、PTI を抑制するエフェクターを複数持つ可能性があると考えられる。

実際に、トランスポゾン挿入変異株を用いたスクリーニングで 68 個の遺伝子が T3SS から分泌されるエフェクターをコードする可能性が示された。しかし、68 遺伝子によってコードされるタンパク質が T3SS から分泌されるかどうかを EffectiveT3 を用いて評価した結果、68 タンパク質の中で T3SS によって分泌されるタンパク質であると予想されたのは 5 つだけであった。このことは、K1 菌株において PTI 抑制活性を持つエフェクターが複数存在したとしても、その数はそれほど多いものでないことを示唆する。おそらく、これら遺伝子のうち PTI 抑制エフェクターでないものは K1 菌株の代謝、運動能、T3SS の形成などに関与しており、これら遺伝子の機能阻害によって PTI 抑制能力が失われた可能性が考えられる。

SF1DM と *KΔSF1* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合、*KAT3SS* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを接種した時と同等の活性酸素が発生した (Fig. 17)。同様の結果がカロースの沈着と *PAL*、*OsWRKY70* の発現誘導にも認められた (Fig. 18、19)。これらの結果は *AKSF1* がフラジェリンによって誘導されるイネ PTI の主要な抑制因子であることを示す。興味深いことに、*KAT3SS* を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合の *PAL* と

OsWRKY70 の発現量は菌株未接種のイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合よりも多く、*SF1DM*、*KΔSF1* を接種したイネ培養細胞においても同等の発現量を示した (Fig. 19)。*KΔT3SS* における *PAL* と *OsWRKY70* の発現誘導活性が K1 菌株の PAMP によるものであるならば、K1 菌株は AKSF1 を介してこの PAMP による *PAL* と *OsWRKY70* の発現誘導も抑制していると考えられる。

シロイヌナズナにおいて、FLS2 による flg22 の認識は RBOH (respiratory burst oxidase homolog) ファミリーに依存する急速な活性酸素種の産生を引き起こす。以前の研究で、免疫反応において RBOH は二段階で活性化されることが提言されている。flg22 認識後、FLS2 と補受容体である BAK1 は BIK1 をリン酸化し、活性化させる。BIK1 のリン酸化は RBOH に対する親和性を強め、RBOH の複数の部分のリン酸化を促進する (Li et al., 2014)。BIK1 を介した RBOH のリン酸化は RBOH の EF ハンドモチーフへの Ca^{2+} の結合を増加させ、CPK (Ca^{2+} -dependent protein kinase) を介してさらに RBOH のリン酸化を促進する (Kadota et al., 2015)。一方で、FLS2 への flg22 の結合は直接的、間接的の両方の経路で Ca^{2+} チャンネルの活性化と Ca^{2+} の流入を誘導する。細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は RBOH の EF ハンドモチーフへの Ca^{2+} の結合を促進し、CPK を活性化させ、RBOH のリン酸化を促進する。それによって産生される H_2O_2 はさらなる Ca^{2+} チャンネルの活性化を引き起こし、 Ca^{2+} 情報伝達の完全な活性化と Ca^{2+} に基づく RBOH の制御をもたらすと考えられている (Kimura et al., 2020)。これまでに、N1141 菌株のフラジェリンを処理したイネ培養細胞が急速な Ca^{2+} 濃度の増加を引き起こすことと、フラジェリンによる H_2O_2 発生の誘導はイネ細胞における Ca^{2+} の流入を必要とすることが報告されている (Kaneda et al., 2009)。また、N1141 菌株のフラジェリンによって産生される H_2O_2 は *OsrbohA* と *OsrbohE* のようなイネ NADPH オキシダーゼによって触媒されることも報告されている (Yoshiie et al., 2005)。このことから、AKSF1 は *OsrbohA* や *OsrbohE* を直接抑制するか、またはそのシグナル伝達の上流である Ca^{2+} の流入を抑制することによって *OsrbohA* と *OsrbohE* の活性化を抑制し、ETS を引き起こすと考えられる。したがって、AKSF1 がフラジェリン認識によって誘導される Ca^{2+} の流入に与える影響についてさらなる研究が必要である。

AKSF1 は *E. coli* の DNA polymerase III beta subunit N 末端ドメインと 14% の相同性がある類似配列を有している。PSORT と cNLS を用いたモチーフ解析により、AKSF1 は核移行シグナルを持っておらず、細胞質に局在すると予想された。しかし実際、AKSF1-venus 融合タンパク質は、核と細胞質の両方に局在した。AKSF1-venus は 52.8 kDa であり、イネの核膜孔を通過できるとされる分子量 60,000 より小さいタンパク質なので、核移行シグナルがなくとも核内へ移行することができると考えられる。AKSF1 が DNA polymerase III として機能するのであれば核内に

局在する必要性があるが、AKSF1 がフラジェリン誘導性イネ PTI を抑制するために DNA polymerase III と同様の機能を必要とするのかどうかは明らかになっていない。

AKSF1 の全長は DUF4935 と 43% の配列相同性が認められる。DUF4935 スーパーファミリーはまだ機能が明らかになっていない約 350 アミノ酸残基からなる様々な細菌種において発見されるタンパク質ファミリーである。近年、DUF4935 は金属イオン依存的なヌクレアーゼのスーパーファミリーである PIN ドメインファミリーに分類された (Matelska et al., 2017)。PIN ドメインを持つタンパク質としては DNA の複製や mRNA の分解、転写の制御や ncRNA の成熟などの重要な細胞内プロセスに関わる機能を持つものが知られている。しかし、これまでに報告されている PTI 抑制エフェクターには酵素としての機能を持つものが多いが、ヌクレアーゼの機能を持つものは発見されていない。AKSF1 がヌクレアーゼの機能を持つかどうかは不明であるが、AKSF1 の機能を解明することで ETS 誘導に関する新たな知見が得られるだろう。

第3章
AKSF1によるイネPTI反応の抑制機構

3-1 緒言

第2章までの研究で *A. avenae* K1 菌株に存在する AKSF1 がフラジェリンによって誘導されるイネ PTI を抑制するエフェクタータンパク質であることが示された。しかし、AKSF1 がどのような機構で PTI を抑制しているのかについてはそのアミノ酸配列からはうかがい知ることが出来なかった。そこで、本章では AKSF1 によるイネ PTI 抑制のメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

3-2 方法

3-2-1 K1 菌株を接種したイネ培養細胞におけるリン酸化 MAPK の検出

R2S 培地 20 ml にイネ培養細胞を 500 μ l (packed volume) 加え、人工気象器で 30°C、108 rpm、連続光 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下で 2 時間振盪培養した。その後 1.0×10^8 cfu/ μ l となるように K1 菌株、*KAT3SS*、*SF1DM*、滅菌水を接種し、さらに 3 時間振盪培養した。接種 3 時間後に培養液を取り除き、イネ培養細胞に付着した菌体を取り除くために 30°C の R2S 培地 20 ml で 3 回洗浄し、新しい R2S 培地 20 μ l に再懸濁して N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 100 nM になるように加えた。その後、0、5、10 分後に 170 μ l (packed volume) のイネ培養細胞を回収し、液体窒素で瞬間凍結して -80°C で保存した。保存したイネ培養細胞に液体窒素を加え乳鉢で破碎し、600 μ l の Extraction buffer (50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM DTT, 10 mM NaF, 10 mM Na_3VO_4 , 50 mM β -glycerophosphate, 1 mM AEBSF, 使用直前に 1% (v/v) Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)) で懸濁した。16,000 \times g、4°C、60 分で遠心分離して上清を回収し、NAP-5 カラムにアプライし、Elution buffer (2 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM β -glycerophosphate, 使用直前に 1% (v/v) Protease inhibitor cocktail) 1 ml で溶出することで溶液置換を行なった。溶出サンプル 10 μ g を 12.5% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、ニトロセルロースメンブレンにエレクトロブロットイングした。一次抗体として Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体 (1:1000 = 抗体:TBST, Cell Signaling Technology) を用い 4°C で一晩振盪した後、TBST で 5 回洗浄 (各 5 分) した。洗浄したメンブレンに二次抗体として Anti-Rabbit IgG (H+L-chain) - HRP (1:2000 = 抗体:TBST) を加え、室温で 1 時間振盪した後、ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent で化学発光反応を行い、ImageQuantTM LAS-4000 を用いてシグナルを検出した。

3-2-2 イネ cDNA ライブラリーの作製

AKSF1 と相互作用するイネタンパク質を探索するための Yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングを行うためにイネ cDNA ライブラリーを作製した。イネ培養細胞に N1141 菌株を接種し、接種後 0、1、3 時間後のイネ培養細胞の total RNA を RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出し、Make Your Own “Mate & Plate” Library Kit (Clontech, U.S.A.) を用いて cDNA を合成し、これを *pGADT7-Rec* に挿

入して作製した *pGADT7-Rec-cDNA* を酵母 Y187 株に導入し、イネ cDNA ライブラリーとした。

3-2-3 Yeast two-hybrid 法を用いた相互作用タンパク質の探索

1) Bait vector の作成

Yeast two-hybrid 法用の Bait 用のコンストラクト *pGBKT7-AKSF1* を作製するため、K1 菌株のゲノムをテンプレートとして、両末端に *NdeI* サイトが付加した下記の In-Fusion 用プライマーセットを用いて *AKSF1* の全長を増幅し、*NdeI* で消化し、その後熱失活させた *pGBKT7* に In-Fusion HD enzyme を用いて *AKSF1* をライゲーションした。これを大腸菌に導入し、50 µg/µl kanamycin 含有の LB 固体培地にプレATINGし、30°Cで一晩培養した。培養後、下記に示したベクター上に存在するインサートを増幅するプライマーを用いてコロニーPCRを行い、インサートの確認を行った。さらに、この PCR 産物について 2-2-8 と同様の方法でシーケンス解析し、*pGBKT7-AKSF1* の構築を確認した。*pGBKT7-AKSF1* の構築を確認できたコロニーを 100 ml の LB 液体培地に植菌し、150 rpm、37°Cで一晩振盪培養した。培養後、GenElute Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いてプラスミドの単離を行うことで、*pGBKT7-AKSF1* を得た。

【In-Fusion 用プライマーセット】

・ *pGBKT7-Kgene_3339-F*

5'-GAGGACCTGCATATGTACTCATCCGTACAATTCGTAG-3'

・ *pGBKT7-Kgene_3339-R*

5'-CTCCATGGCCATATGTCAATCATCTTGGTAATCTGGGT-3'

【インサート確認用プライマーセット】

・ *pGBKT7-F*

5'-GACTGTATCGGCCGGAATTTGTAA-3'

・ *pGBKT7-R*

5'-CGCCCGGAATTAGCTTGGC-3'

2) Bait vector の酵母への導入

Bait vector (*pGBKT7-AKSFI*) の自律転写活性を確認するため、*pGBKT7-AKSFI* を酵母 Y2HGold へ形質転換した。酵母 Y2HGold への形質転換には酢酸リチウム法を用いた。まず、100 μ l の酵母コンピテントセルに Bait vector (*pGBKT7-AKSFI*) 1 μ g を加え混合した。carrier DNA (Salmon sperm DNA, Invitrogen) 25 μ l を 95°C で 5 分間熱処理後、氷上に静置し、600 μ l の 2 mg/ml PEG/酢酸リチウム溶液 (用時調整) と共にコンピテントセルに加え、vortex でよく混合し、30°C で 30 分間震盪した。その後、70 μ l の DMSO を添加し、穏やかに混合後、ウォーターバス (TAITEC) で 42°C、15 分間震盪し、ヒートショックを行った。ヒートショック後、800 \times g 室温で 5 分間遠心分離し、上清を取り除き、得られた酵母のペレットに 1.0 ml の YPAD 液体培地を加えて懸濁した。そのうちの懸濁液 100 μ l を直径 3 mm の Bac'n' Roll Beads (NIPPON GENE) を用いて synthetic complete (以下、SC とする) /-Trp 寒天培地、SC/-His/-Trp 寒天培地、SC/-Ade/-His/-Trp 寒天培地にプレイングし、30°C で 3 日間静置培養した。

【carrier DNA (2.0 mg/ml)】

組成	容量
Salmon sperm DNA (10 mg/ml : Invitrogen)	200 μ l
滅菌水	800 μ l
Total	1 ml

調製後、-20°C で保存し、使用前に 95°C で 5 分間の熱変性を行い、氷上で急冷した。

【PEG/酢酸リチウム溶液】

組成	容量
50% PEG (SIGMA)	8.0 ml
10 \times TE buffer	1.0 ml
1.0 M 酢酸リチウム (Wako)	1.0 ml
Total	10 ml

【50% PEG】

組成		容量
Polyethylene glycol (PEG 3,350 : SIGMA)		50 g
超純水	up to	100 ml

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

組成		容量
L-Arginine (Wako)		0.4 g
L-Methionine (Wako)		0.4 g
L-Tyrosine (Wako)		0.6 g
L-Isoleucine (Wako)		0.6 g
L-Lysine HCl (Wako)		0.6 g
L-Phenylalanine (Wako)		1.2 g
L-Valine (Wako)		3.0 g
L-Threonine (Wako)		4.0 g
超純水		1.0 L

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

【100×Ura】

組成		容量
Uracil		0.2 g
超純水		100 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

【100×Leu】

組成		容量
L-Leucine		0.2 g
超純水		100 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

【100×His】

組成		容量
L-Histidine		0.2 g
超純水		100 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

【100×Trp】

組成	容量
L-Tryptophan	0.4 g
超純水	100 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

【SC/-Trp 培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose (Wako)	4 g
20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100×Ura	2 ml
100×His	2 ml
100×Leu	2 ml
Adenine (Wako)	0.01 g
Agar (Wako)	4 g
純水	200 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

【SC/-His/-Trp 培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose (Wako)	4 g
20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100×Ura	2 ml
100×Leu	2 ml
Adenine (Wako)	0.01 g
Agar (Wako)	4 g
純水	200 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

【SC/-Ade/-His/-Trp 培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose (Wako)	4 g
20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100×Ura	2 ml
100×Leu	2 ml
Agar (Wako)	4 g
純水	200 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

3) 一次スクリーニング

Bait vector (*pGBKT7-AKSF1*) を含む Y2HGold 株のコロニーを 50 ml の SC/-Trp 液体培地に植菌し、OD₆₀₀ の値が 0.8 になるまで (16~20 時間)、30°C で培養した。この培養液を 1,000×g で 5 分間遠心分離し、菌体を沈殿として得た。次に菌体密度が 1×10⁸ cfu/ml 以上になるように、SC/-Trp 液体培地 (4~5 ml) を加えて菌体を懸濁した。この懸濁した 4~5 ml の Y2HGold 株と 1 ml のイネ cDNA ライブラリーを含む Y187 株を乾熱滅菌した 1 L のフラスコに加え、45 ml の 2×YPAD 液体培地 (50 µg/ml kanamycin を含む) を加えた。また、ライブラリーバイアルも 1 ml の 2×YPDA (50 µg/ml kanamycin を含む) で洗浄し細胞を回収し、1 L のフラスコに加えた。その後、30°C、30~50 rpm で振盪培養し、培養 20 時間後に培養液を 1 滴とり、位相差顕微鏡 (40×) で観察し、接合子の存在を確認した。接合子の存在を確認した後、培養液を 1,000×g で 10 分間遠心分離し、菌体を沈殿として回収した。また、1 L のフラスコを 50 ml の 0.5×YPDA (50 µg/ml kanamycin を含む) で 2 回すすぎ、その液を回収した菌体に加え、菌体を懸濁した。この菌体懸濁液を 1,000×g で 10 分間遠心分離し、菌体を沈殿として回収した後、10 ml の 0.5×YPDA (50 µg/ml kanamycin を含む) を加えて菌体を懸濁した。また、接合効率および検定した菌体数を求めるために、この菌体懸濁液の一部を取り、10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍の希釈液を作り、それぞれの菌体希釈液 100 µl を SC/-Trp、SC/-Leu、SC/-Leu/-Trp 培地にプレーティングし、30°C で 3 日間培養した。接合効率および検定した菌体数は以下の計算式で算出した。残りの菌体懸濁液を SC/-His/-Leu/-Trp 培地 (100 ng/ml Aureobasidin A を含む) に 100 µl ずつプレーティングし、30°C で 3 日間培養した。

検定した菌体数 = 二倍体の cfu/ml × 菌体懸濁液の体積 (ml)

$$\text{接合効率} = \frac{\text{二倍体の cfu/ml}}{\text{Limiting partner の cfu/ml}} \times 100$$

【SC/-Trp 液体培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose (Wako)	4 g
20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100×Ura	2 ml
100×His	2 ml
100×Leu	2 ml
Adenine (Wako)	0.01 g
純水	200 ml

調製後、115°C、15 分でオートクレーブ滅菌した。

【SC/-His/-Leu/-Trp 培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose (Wako)	4 g
20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100×Ura	2 ml
Adenine (Wako)	0.01 g
Agar (Wako)	4 g
純水	200 ml

調製後、115°C、15 分でオートクレーブ滅菌した。

【SC/-Leu/-Trp 培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose (Wako)	4 g
20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100×Ura	2 ml
100×His	2 ml
Adenine (Wako)	0.01 g
Agar (Wako)	4 g
純水	200 ml

調製後、115°C、15分、オートクレーブで滅菌した。

4) 二次スクリーニング

上記の一次スクリーニングにおいて得られたコロニーを 4 mg/ml の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside (X- α -gal: Clontech) を含む SC/-His/-Leu/-Trp /X- α -gal 培地 (100 ng/ml Aureobasidin A を含む) と SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地 (100 ng/ml Aureobasidin A を含む) にそれぞれ画線し、30°Cで3日間静置培養した。また、コントロールとして、ポジティブコントロールとネガティブコントロールの形質転換酵母を同様にそれぞれの培地に画線し、30°Cで3日間静置培養した。3日後、SC/-His/-Leu/-Trp /X- α -gal 培地で青色を呈し、且つ SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地で生育したコロニーを選抜した。

【SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地】

組成	容量
Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose (Wako)	4 g
20×Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100×Ura	2 ml
Agar (Wako)	4 g
純水	200 ml

調製後、115°C、15分でオートクレーブ滅菌した。

5) 候補クローンが保持する Prey vector の cDNA 領域の塩基配列の決定

上記の二次スクリーニングで選抜したコロニーをテンプレートに、Prey ベクターの cDNA 領域を増幅するプライマーで PCR を行った。得られた PCR 産物の一

部を 1.25%アガロースゲルで電気泳動を行い、500 bp 以上のシングルバンドの増幅が確認できた PCR 産物を Exo-Star 処理後、2-2-8 と同様の条件でサイクルシーケンス反応を行い、DNA シーケンサーで cDNA 領域の配列を解析した。得られた cDNA 領域の配列をアミノ酸配列に変換し、そのアミノ酸配列をもとに National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST 検索を行い、登録されているタンパク質の配列との相同性解析を行った。

【コロニーPCR 反応液組成】

組成	容量
2×PCR buffer for KOD FX	5.0 μ l
2 mM dNTPs	2.0 μ l
Primer F (10 μ M)	0.3 μ l
Primer R (10 μ M)	0.3 μ l
KOD FX (TOYOBO)	0.2 μ l
滅菌水	2.2 μ l
Total	10 μ l

【反応条件】

96°C	1 min	} 30 cycles
98°C	30 sec	
55°C	30 sec	
68°C	2 min	
25°C	∞	

【用いたプライマーセット】

- ADT7-F : 5'-CTTTAATACGACTCACTATAGGGCG-3'
- ADT7-R : 5'-TCAGTATCTACGATTCATCTGCA-3'

3-2-4 BiFC 法による AKSF1 と STY46 の間の相互作用解析

1) ベクターの作製

AKSF1 の終止コドンを除く全長 (1-624 bp) と *STY46* の一部 (108-400 bp) を下に示す特異的プライマーセットを用いた PCR によって増幅し、増幅断片を

pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits を用いて *pENTR D-TOPO* ベクターにクローニングした。得られたベクターに含まれる *AKSF1* 遺伝子を Gateway Vector Conversion System を用いて *GW-VN/pBI221* ベクター (Kamimura et al., 2014) に導入し、*AKSF1-VN/pBI221* ベクターを得た。同様に *STY46* の一部を *GW-VC/pBI221* ベクター (Kamimura et al., 2014) に導入し、*STY46 BD-VC/pBI221* ベクターを得た。

【用いたプライマーセット】

- ・ AKSF1-F : 5'-CACCATGTACTCATCCGTACAATTCGTAG-3'
- ・ AKSF1-R : 5'-ATCATCTTGGTAATCTGGGTTATT-3'
- ・ STY46BD-F : 5'-CACCGAGGACGTGCTGACGCATAAG-3'
- ・ STY46BD-R : 5'-TGACATATATTCTGTGACTATAC -3'

2) イネプロトプラストの調整

植継ぎから4日目のイネ培養細胞をシャーレに移し、培地を除去した。細胞壁を溶解させるために、細胞の入ったシャーレに Millex-GS Filter Unit 0.22 mm (MILLIPORE) でろ過した Enzyme solution を加えて遮光し、30°Cで3時間反応を行った(30分、60分、90分、120分にシャーレを揺すって混合した)。反応後、100 µm Cell Strainer (BD Falcon) を用いてろ過し、回収したろ液を25°C、100×gで3分間遠心分離を行った。上清を除去した後、KMC Solution 10 ml を加え、先切りチップを用いて沈殿の懸濁を行い、25°C、100×gで3分間遠心分離を行う操作を二回行った。2回目の遠心分離後、上清を除去し、MMg Solution 2 ml を加え、先切りチップを用いて沈殿の懸濁を行った。

3) BiFC 法によるタンパク質相互作用試験

新しいエッペンドルフチューブに *AKSF1-VN/pBI221* と *STY46 BD-VC/pBI221*、*AKSF1-VN/pBI221* を 5 µg ずつ入れ、さらにプロトプラストを 300 µl 加えた。そこに PEG solution を等量加え、1分間穏やかにピペッティングした。その後5分間静置し、KMC solution を 400 µl 加えて穏やかにピペッティングした。25°C、200×gで5分間遠心分離し、上清を除去し、KMC solution を 600 µl 加えて穏やかに懸濁した。遮光して30°Cで6時間静置した後、共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 を用いて Venus の蛍光を観察した。

【Enzyme solution】

組成	容量
Cellulase RS (Yakult)	0.15 g
Macerozyme R10 (Yakult)	0.075 g
Pectolyase Y23 (Kyowa Chemical)	0.015 g
0.8M Mannitol	11.25 ml
200 mM MES-KOH pH5.7	375 ml
上記を混合し、55°Cで10分間加熱し、室温に戻した後、下記を添加。	
1M CaCl ₂ · 2H ₂ O	150 ml
BSA	0.015 g
Total	15 ml

【MMg solution】

組成	容量
Mannitol (Wako)	3.64 g
3.0 M MgCl ₂ (Wako)	250 ml
200 mM MES-KOH pH 5.7 (Wako)	1.0 ml
超純水	up to 50 ml

調製後、4°Cで保存。

【200 mM MES-KOH pH 5.7】

組成	容量
MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid) (Wako)	3.64 g
KOH	up to pH 5.7
超純水	up to 50 ml

KOH で pH を 5.7 に調製後、4°Cで保存。

【KMC solution】

組成	容量
KCl (Wako)	1.744 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Wako)	3.332 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Wako)	2.5 g
KOH	up to pH 6.0
超純水	up to 200 ml

KOH で pH を 6.0 に調製後、4°Cで保存。

【PEG solution】

組成	容量
PEG4000 (Wako)	16 g
0.8 M Mannitol (Wako)	10 ml
1.0 M CaCl ₂ (Wako)	4 ml
超純水	12 ml
Total	42 ml

3-3 結果

3-3-1 AKSF1 を破壊した変異株を接種したイネ培養細胞におけるフラジェリン誘導性 MAPK 活性化

フラジェリン認識情報を伝達することが知られている MAPK カスケードへの AKSF1 の影響を調べるため、AKSF1 を破壊した変異株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した後の MAPK のリン酸化を調べた。イネ培養細胞に K1 菌株、*KΔT3SS*、*SF1DM*、滅菌水を 1.0×10^8 cfu/ μ l となるように接種し、3 時間後に N1141 菌株のフラジェリンを終濃度 100 nM になるように処理し、0、5、10 分後に培養細胞を回収し、タンパク質を抽出して SDS-PAGE で分離し、一次抗体にリン酸化された MAPK を認識する α -p44/42-ERK 抗体を用いたウェスタンブロットを行なった。その結果、水を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理した場合、フラジェリン処理 5 分後、10 分後に二つの MAPK のリン酸化が認められた。一方、K1 菌株を接種したイネ培養細胞では、フラジェリン処理 5 分後と 10 分後において分子量が大きい MAPK のリン酸化が認められたが分子量が小さい MAPK のリン酸化は認められなかった。一方、*KΔT3SS* を接種したイネ培養細胞では、0 分、5 分後で分子量が大きい MAPK のリン酸化が認められ、10 分後には二つの MAPK のリン酸化が認められた。*SF1DM* 接種したイネ培養細胞では、0 分の時点で分子量が大きい MAPK のリン酸化が認められ、5 分後、10 分後には二つの MAPK のリン酸化が認められた (Fig. 23)。このことから、K1 菌株は T3SS を介してイネフラジェリン認識における MAPK のリン酸化を抑制することが明らかとなり、AKSF1 がこの抑制にも関与することが示唆された。このことから、AKSF1 はフラジェリンの受容と MAPK カスケードの間の経路を抑制する可能性が示唆された。

3-3-2 Yeast two-hybrid 法を用いた AKSF1 と相互作用するイネタンパク質のスクリーニング

シロイヌナズナにおいて受容体型キナーゼ FLS2 にフラジェリンが結合すると同じ受容体型キナーゼである BAK1 (Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1) とヘテロダイマーを形成する。その後、FLS2 と BAK1 の相互リン酸化が行われることで活性化され、BIK1 (Botrytis-induced kinase 1) や BSK1 (Brassinosteroid-signaling kinase 1) をリン酸化することでこれらキナーゼを活性

化した後、直接または間接的に MAPKKK などをリン酸化することが明らかになっている (Lin et al., 2013)。BIK1 や BSK1 が直接 MAPKKK をリン酸化するかどうかは明らかになっていないが、少なくともフラジェリンシグナルによって MAPKKK をリン酸化するタンパク質が介在することは間違いない。イネにおけるフラジェリン認識受容体 FliRK2 の下流のシグナル伝達経路は明らかになっていないが、FliRK2 も受容体型キナーゼであることとフラジェリン認識によって MAPK がリン酸化されることを考えると、AKSF1 は FliRK2 から MAPK に至る経路に存在するキナーゼの活性を阻害している可能性が考えられる。そこで、AKSF1 による PTI 抑制機構を分子レベルで解明するため、AKSF1 と相互作用するイネキナーゼタンパク質を Yeast two-hybrid 法によるスクリーニングで探索した。

まず、イネ培養細胞に N1141 菌株を接種し、接種後 0、1、3 時間後のイネ培養細胞の total RNA を抽出し、これを元に合成した cDNA を *pGADT7-Rec* に挿入し、酵母 Y187 株に導入してイネ cDNA ライブラリーを作製した。次に、Bait vector である *pGBKT7-AKSF1* を作製し、酵母 Y2HGGold に導入した。*pGBKT7-AKSF1* を導入した Y2HGGold 株を Bait、イネ cDNA ライブラリーを Prey として、Yeast two-hybrid 法によるスクリーニングを行なった。SC/-His/-Leu/-Trp/+AbA 培地に Y2HGGold 株と Y187 株の接合体をプレーティングし、一次スクリーニングを行った結果、1,072 個のコロニーが得られた。その得られたコロニーを SC/-His/-Leu/-Trp/+X- α -gal/+AbA 培地と SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp/+AbA 培地に植菌し、二次スクリーニングを行った。SC/-His/-Leu/-Trp/+X- α -gal/+AbA 培地で青く呈色し、かつ SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp/+AbA 培地で生育したコロニーは 676 個となった。選抜された 676 個のコロニーのうち 358 個のコロニーをテンプレートに PCR を行ったところ、182 個のコロニーにおいて増幅断片が得られた。得られた増幅断片についてはシーケンス解析を行いそれぞれの配列を得た。得られた配列から、翻訳フレームが合っている配列を選抜し、NCBI データベースの BLAST 検索による相同性解析を行った。その結果、*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3, cytosolic* が 8 クローン、*BTB/POZ domain-containing protein POB1*、*Elongation factor 1-alpha* が 3 クローンずつ、*EH domain-containing protein 1*、*DnaJ homolog subfamily B member 1*、*Serine/threonine-protein kinase STY46*、*Serine/threonine protein kinase OSK4*、*Protein NETWORKED 1D*、*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP12*、*SAGA-associated factor 29 homolog A isoform X1*、*Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1*、*Chloroplastic, Oxalate--CoA ligase*、*Potassium transporter 7 isoform X1*、*GTPase activating protein 1*、*Non-specific lipid transfer protein GPI-anchored 1 isoform X1*、*CASP-like protein 4U1*、*Histone H2B.7* が 1 クローンずつ得られた (Table 5)。なお、*pGBKT7-AKSF1* を導

入した Y2HGold 株とイネ cDNA ライブラリーの接合効率及びスクリーニングされた細胞数を求めるために、10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍に希釈した細胞懸濁液 100 μ l を SC/-Trp、SC/-Leu、SC/-Leu/-Trp 培地にプレーティングしたところ、10,000 倍希釈した細胞懸濁液をプレーティングした SC/-Trp では 1,612 個のコロニーが得られたことから、Bait の生存数は約 1.6×10^8 cfu/ml であった。また、1,000 倍希釈した細胞懸濁液 100 μ l をプレーティングした SC/-Leu 培地では 783 個のコロニーが得られたことから、Prey ライブラリーの生存数は約 7.8×10^6 cfu/ml であった。10 倍希釈した細胞懸濁液 100 μ l をプレーティングした SC/-Leu/-Trp 培地では 996 個のコロニーが得られたことから、二倍体の生存数は 1.0×10^5 cfu/ml であった。このことから、スクリーニングにおいては生存数が少なかった Prey 株が Limited partner となっており、接合効率は約 1.3 % であった。スクリーニングに用いた細胞懸濁液の体積は 10.4 ml であったため、検定した菌体数は約 1.0×10^6 cfu であった。

Yeast two-hybrid 解析によって得られた遺伝子のうち、キナーゼをコードする遺伝子は *OSK4* (*Oryza S-phase kinase associated protein 1-like 4*) と *STY46* (*Protein kinase Ser/Thr/Tyr 46*) の二つである (Kong et al., 2007; Dong et al., 2020)。OSK4 はイネの核内で HDR1 (Heading date repressor 1) と複合体を形成し、長日条件における花成誘導の制御に参与する *Hd1* (*Heading date 1*) の発現誘導と *Ehd1* (*Early heading date 1*) の発現抑制を行なっている。また OSK4 による HDR1 依存的な HD1 リン酸化はこの発現調節に必須であることも明らかになっている (Sun et al., 2016)。しかし、OSK4 は HDR1 の有無にかかわらずイネの核内に局在するタンパク質であるため、細胞質における MAPK の上流のシグナル伝達に参与する可能性は低いと考えられる。一方、STY46 は TKL (Tyrosine kinase-like) group に属するキナーゼであり、この TKL グループには MAPKKK として機能する Raf kinase も属している (Lehti-Shiu & Shiu, 2012)。また、STY46 はシロイヌナズナにおいて糖飢餓 (Sugar starvation) に参与するキナーゼであることも知られており、糖飢餓シグナルの伝達に参与していると考えられている (Arias et al., 2014)。これらのことから、STY46 は AKSF1 のターゲットになっている可能性があると考え、STY46 に関するさらなる解析を試みた。

3-3-3 BiFC 法を用いた AKSF1 とイネタンパク質の相互作用試験

Yeast two-hybrid 法によるスクリーニングで得られた STY46 の AKSF1 との相互作用を確かめるため、BiFC 法による相互作用試験を行なった。AKSF1 と緑色蛍

光タンパク質 Venus の N 末端断片を結合させた AKSF1-VN 融合タンパク質を発現する *AKSF1-VN/pBI221* ベクターと Serine/threonine-protein kinase STY46 の 108 から 400 アミノ酸の断片と Venus の C 末端断片 VC の融合タンパク質を発現する *STY46 BD-VC/pBI221* ベクターを作製し、イネプロトプラストに導入して 6 時間後の Venus 由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、AKSF1-VN と STY46 BD-VC を共発現させたイネプロトプラストの細胞質において BiFC の蛍光が観察された (Fig. 25)。この結果は AKSF1 がイネ細胞内で STY46 と相互作用することを示す。

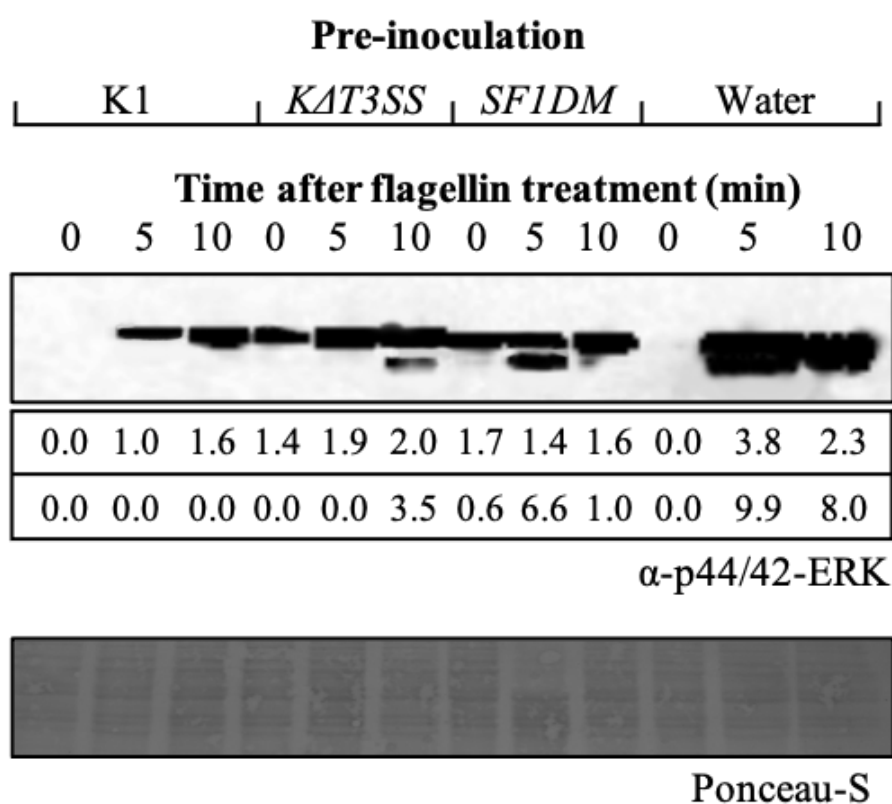


Fig. 23 フラジェリン処理したイネ培養細胞における MAPK のリン酸化に対する *SF1DM* 接種の効果

水、K1 菌株、*KAT3SS*、*SF1DM* を 1.0×10^8 cfu/ μ l になるようにイネ培養細胞に接種し、3 時間後にフラジェリンを 100 nM になるように処理し、0、5、10 分後のイネ細胞を回収し、タンパク質を抽出して SDS-PAGE で分離し、一次抗体に α -p44/42-ERK 抗体を用いたウェスタンブロットを行なった。上段は検出されたバン

ドを示し、中段は上段で検出されたバンドの黒化度を測定値として表した。下段はアプライしたタンパク質が同じであることを確認するため、メンブレンをポンソーSで染色した結果を示す。

Table 5 Yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングによって得られたクローン

Protein name	Number of clones	Accession No.
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3, cytosolic	8	XP_015625382.1
BTB/POZ domain-containing protein POB1	3	XP_015627030.1
Elongation factor 1-alpha	3	XP_015629735.1
EH domain-containing protein 1	1	XP_015623964.1
DnaJ homolog subfamily B member 1	1	XP_015637514.1
Serine/threonine-protein kinase STY46	1	XP_015611619.1
Serine/threonine protein kinase OSK4	1	XP_015650152.1
Protein NETWORKED 1D	1	XP_015614081.1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP12	1	XP_015625368.1
SAGA-associated factor 29 homolog A isoform X1	1	XP_015620348.1
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1, chloroplastic	1	XP_015630375.1
Oxalate--CoA ligase	1	XP_015635363.1
Potassium transporter 7 isoform X1	1	XP_015646990.1
GTPase activating protein 1	1	XP_015627601.1
Non-specific lipid transfer protein GPI-anchored 1 isoform X1	1	XP_015648349.1
CASP-like protein 4U1	1	XP_015621898.1
Histone H2B.7	1	XP_015621144.1

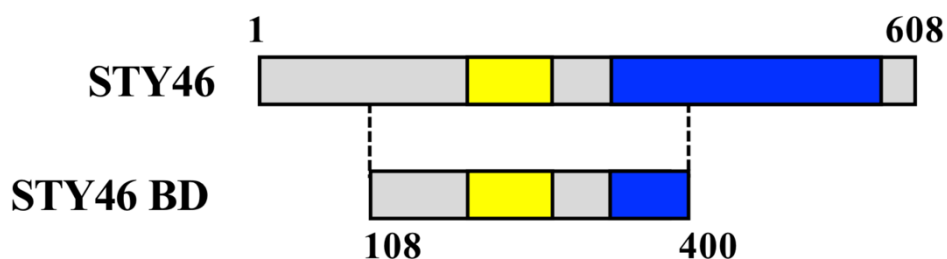


Fig. 24 STY46 の全長と AKSF1 との結合部位

STY46 タンパク質の全長の構造と、BiFC 試験に用いた STY46 結合領域を図示した。黄色は N 末端 ACT (Aspartate kinase-chorismate mutase-tyrA) ドメイン (202-272 アミノ酸残基)、青色はキナーゼドメイン (328-571 アミノ酸残基) を示す。STY46 BD は Yeast two-hybrid 法により AKSF1 と相互作用することが明らかとなった STY46 の 108-400 アミノ酸残基の領域を示す。

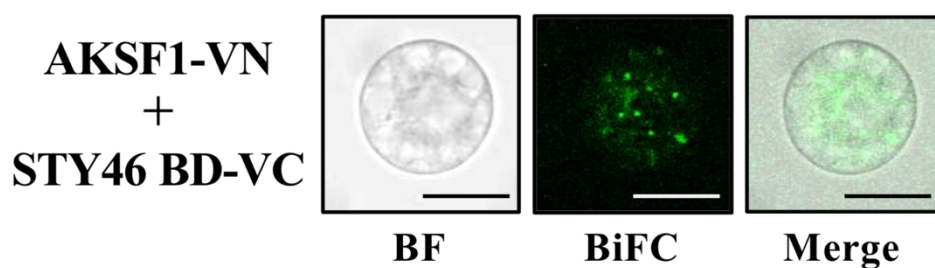


Fig. 25 BiFC 法による AKSF1 と STY46 のイネ細胞内における相互作用確認

イネプロトプラストに *AKSF1-VN/pBI221* ベクターと *STY46 BD-VC/pBI221* ベクターを導入し、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。左図は明視野、中図は BiFC 蛍光、右図は左図と中図を重ね合わせた図を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

3-4 考察

シロイヌナズナにおいてフラジェリン受容体である FLS2 がフラジェリンを認識すると、BAK1、BIK1、BSK1 などが次々とリン酸化され、このリン酸化情報が MAPKKK、MAPKK、MAPK を含む MAPK カスケードに伝達される (Lin et al., 2013)。イネにおいてフラジェリン受容体として同定された FliRK2 の下流のフラジェリン認識情報の伝達機構は明らかになっていないが、リン酸化阻害剤でフラジェリンによる免疫応答が完全に阻害されること、フラジェリンをイネに処理することで速やかに MAPK がリン酸化されることを考えると、イネにおいてもフラジェリン認識情報の伝達に MAPK カスケードが関与することは間違いなさであろう (桂木, 2015)。 α -p44/42-ERK 抗体を用いたウェスタンブロット解析において、*KAT3SS* と *SFIDM* を接種したイネ培養細胞ではフラジェリン処理前から分子量が大きい方の MAPK が活性化された (Fig. 23)。このことから K1 菌株に存在すると予想される PAMP は分子量が大きい方の MAPK の活性化を誘導する活性を有している可能性を示唆する。

また、K1 菌株を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理しても分子量が小さい方の MAPK が活性化されなかった (Fig. 23)。このことから、K1 菌株は AKSF1 によって FliRK2 から MAPK に至る経路を抑制していると考えられる。FliRK2 は一回膜貫通型キナーゼであり、MAPK もキナーゼであることから、この経路の情報伝達はタンパク質のリン酸化によると思われる。

そこで Yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより AKSF1 と相互作用するイネのキナーゼを探索した結果、STY46 が同定された。STY46 は TKL group に属するキナーゼであり、この TKL グループには MAPKKK として機能する Raf kinase も属している (Lehti-Shiu & Shiu, 2012)。MAPKKK はキナーゼ触媒ドメインの配列によってグループ A、B、C の 3 つに分けられるが、そのうちグループ B と C が Raf-like family のメンバーによって構成されている。*Arachis hypogaea* の STY キナーゼである AhSTYPK はグループ C に属する MAPKKK であることが明らかとなっていることから (Ning et al., 2011)、同じ STY キナーゼである STY46 もイネにおいて MAPKKK として機能する可能性も考えられる。また、Yeast two-hybrid 法によって得られた STY46 の AKSF1 との結合領域には ACT (Aspartate kinase-chorismate mutase-tyrA) ドメインが存在していた (Fig. 24)。このドメインはイソロイシンや SAM (S-adenosylmethionine) などの代謝産物と結合し、STY キナーゼの自己リン酸化と基質の結合を抑制することで STY キナーゼの活性を負に制御することが報告されている (Eisa et al., 2019)。このことから AKSF1 による STY46 の ACT ドメインとの結合は、STY46 のキナーゼ活性を抑

制している可能性がある。AKSF1 の STY46 への結合が MAPK のリン酸化を阻害していることを確定させるためには、STY46 による MAPKK のリン酸化などを調べる必要があるであろう。

植物の MAPK カスケードを直接制御する植物病原体のエフェクターとしては、これまでに *Pseudomonas syringae* の AvrB、HopAI1、HopF2、*Salmonella typhimurium* の SpvC、*Xanthomonas euvesicatoria* の XopAU、*Phytophthora infestans* の PexRD2 の 6 種が知られている。このうち PexRD2 はタバコとトマトの MAP3K ϵ のキナーゼドメインと相互作用し、その下流で機能する MAPK である WIPK と SIPK の活性化の抑制と、過敏感細胞死を含む免疫反応の抑制を引き起こす (Lang & Colcombet, 2020)。*P. infestans* は卵菌であるため、AKSF1 が MAPKKK を抑制することで PTI を抑制しているとすれば、細菌のエフェクターとしては初の事例となる。これらを明確にするためには、STY46 のイネ欠損株をゲノム編集技術で作製することが大きく貢献することだろう。

参考文献

- Agrios GN. (2005) *Plant Pathology*, 5th ed. (Sendiego: Academic Press)
- Arias MC, Pelletier S, Hilliou F, Wattedled F, Renou JP, D'Hulst C. (2014) From dusk till dawn: the *Arabidopsis thaliana* sugar starving responsive network. *Front Plant Sci.* 5:482.
- Arora SK, Bangera M, Lory S, Ramphal R. (2001) A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:9342-9347.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature.* 415:977-983.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP. (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science.* 276:726-733.
- Bauer DW, Wei ZM, Beer SV, Collmer S. (1995) *Erwinia chrysanthemi* harpinEch: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 8:484-491.
- Berger C, Robin GP, Bonas U, Koenig R. (2010) Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Microbiology.* 156:1963-1974.
- Cai R, Lewis J, Yan S, Liu H, Clarke CR, Campanile F, Almeida NF, Studholme DJ, Lindeberg M, Schneider D, Zaccardelli M, Setubal JC, Morales-Lizcano NP, Bernal A, Coaker G, Baker C, Bender CL, Leman S, Vinatzer BA. (2011) The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathog.* 7: e1002130.
- Che FS, 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.

Clarke CR, Chinchilla D, Hind SR, Taguchi F, Miki R, Ichinose Y, Martin GB, Leman S, Felix G, Vinatzer BA. (2013) Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytol.* 200:847-860.

Dangl JL, Jones JD. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411:826-833

Dixon RA, Paiva NL. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.* 7:1085-1097.

Dong S, Zhang F, Beckles DM. (2020) A Cytosolic Protein Kinase STY46 in *Arabidopsis thaliana* is Involved in Plant Growth and Abiotic Stress Response. *Plants (Basel)* . 9:57.

Dunning FM, Sun W, Jansen KL, Helft L, Bent AF. (2007) Identification and mutational analysis of *Arabidopsis* FLS2 leucine-rich repeat domain residues that contribute to flagellin perception. *Plant Cell.* 19:3297-3313.

Eisa A, Bölter B, Schwenkert S. (2019) The ACT domain in chloroplast precursor-phosphorylating STY kinases binds metabolites and allosterically regulates kinase activity. *J Biol Chem.* 294:17278-17288.

Flor HH. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol.* 9:275-296.

Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che FS. (2014) Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 27:113-124.

Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Chang JH, Segonzac C, Boller T, Rathjen JP. (2018) Differential suppression of *Nicotiana benthamiana* innate immune responses by transiently expressed *Pseudomonas syringae* type III effectors. *Front. Plant Sci.* 9:688.

Gómez-Gómez L, Bauer Z, Boller T. (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 13:1155-1163.

Guo M, Block A, Bryan CD, Becker DF, Alfano JR. (2012) *Pseudomonas syringae* Catalases Are Collectively Required for Plant Pathogenesis. *J Bacteriol*. 194: 5054–5064.

He SY, Nomura K, Whittam TS. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta*. 1694: 181–206.

Hind SR, Strickler SR, Boyler PC, Dunham DM, Bao Z, O’Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, Vinatzer BA, Schroeder FC, Martin GB. (2016) Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nat Plants*. 2:16128.

Hirai H, Takai R, Iwano M, Nakai M, Kondo M, Takayama S, Isogai A, Che FS. (2011) Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by *Acidovorax avenae* flagellin. *J Biol Chem*. 286:25519-25530.

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

Jones JD, Dangl JL. (2006) The plant immune system. *Nature*. 444:323-329.

Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C. (2015) Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol*. 56:1472-1480.

Kamimura M, Han Y, Kito N, Che FS. (2014) Identification of interacting proteins for calcium dependent protein kinase 8 by a novel screening system based on bimolecular fluorescence complementation. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 78:438-447.

Kaneda T, Taga Y, Takai R, Iwano M, Matsui H, Takayama S, Isogai A, Che FS. (2009) The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell

death. EMBO J. 28: 926-936.

Katsuragi Y, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T, Che FS. (2015) CD2-1, the C-terminal Region of Flagellin, Modulates the Induction of Immune Responses in Rice. Mol Plant Microbe Interact. 28:648-658.

Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, and Bonas U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. Science 318:648–651.

Kimura S, Hunter K, Vaahtera L, Tran HC, Citterico M, Vaattovaara A, Rokka A, Stolze SC, Harzen A, Meißner L, Wilkens MMT, Hamann T, Toyota M, Nakagami H, Wrzaczek M. (2020) CRK2 and C-terminal Phosphorylation of NADPH Oxidase RBOHD Regulate Reactive Oxygen Species Production in Arabidopsis. Plant Cell. 32:1063-1080.

Kondo M, Hirai H, Furukawa T, Yoshida Y, Suzuki A, Kawaguchi T, Che FS. (2017) Frameshift Mutation Confers Function as Virulence Factor to Leucine-Rich Repeat Protein from *Acidovorax avenae*. Front Plant Sci. 7:1988.

Kondo M, Yoshida Y, Miyata C, Fujiwara S, Nakajima Y, Hirai H, Takayama S, Isogai A, Che FS. (2012) Genetic organization of the hrp gene cluster in *Acidovorax avenae* strain N1141 and a novel effector protein that elicits immune responses in rice (*Oryza sativa* L.) . Biosci Biotechnol Biochem. 76:129-138.

Kong H, Landherr LL, Frohlich MW, Leebens-Mack J, Ma H, dePamphilis CW. (2007) Patterns of gene duplication in the plant SKP1 gene family in angiosperms: evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth. Plant J. 50:873-885.

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.

Lang J, Colcombet J. (2020) Sustained Incompatibility between MAPK Signaling and Pathogen Effectors. Int J Mol Sci. 21:7954.

Lehti-Shiu MD, Shiu SH. (2012) Diversity, classification and function of the plant protein

kinase superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:2619-2639.

Lindgren PB. (1997) The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 35:129-152.

Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ. (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol.* 168:512-522.

Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, Chen S, Zhou JM. (2014) The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe.* 15:329-338.

Lin W, Lu D, Gao X, Jiang S, Ma X, Wang Z, Mengiste T, He P, Shan L. (2013) Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 12114–12119.

Li R, Zhang J, Li J, Zhou G, Wang Q, Bian W, Erb M, Lou Y. (2015) Prioritizing plant defence over growth through WRKY regulation facilitates infestation by non-target herbivores. *Elife.* 4:e04805.

Lohou D, Turner M, Lonjon F, Cazalé AC, Peeters N, Genin S, Vaillau F. (2014) HpaP modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and harbours a substrate specificity switch domain essential for virulence. *Mol Plant Pathol.* 15:601-614.

Lonjon F, Rengel D, Roux F, Henry C, Turner M, Le Ru A, Razavi N, Sabbagh CRR, Genin S, Vaillau F. (2019) HpaP Sequesters HrpJ, an Essential Component of *Ralstonia solanacearum* Virulence That Triggers Necrosis in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact.* 33:200-211.

Lorenz C, Hausner J, Büttner D. (2012) HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from *Xanthomonas*. *PLoS One.* 11: e51063.

Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact.* 24:183-193.

Mackey D, Holt BF 3rd, Wiig A, Dangl JL. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*. 108:743-754.

Maleck K, Neuenschwander U, Cade RM, Dietrich RA, Dangl JL, Ryals JA. (2002) Isolation and characterization of broad-spectrum disease-resistant *Arabidopsis* mutants. *Genetics*. 160:1661-1671.

Matelska D, Steczkiewicz K, Ginalska K. (2017) Comprehensive classification of the PIN domain-like superfamily. *Nucleic Acids Res*. 45:6995-7020.

Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B. (2011) How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol*. 9:e1001127.

Naito K, Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. (2008) Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact*. 21:1165-1174.

Nakano M, Mukaiharu T. (2019) Comprehensive identification of PTI suppressors in type III effector repertoire reveals that *Ralstonia solanacearum* activates jasmonate signaling at two different steps. *Int. J. Mol. Sci*. 20:5992-6008.

Nicaise V, Roux M, Zipfel C. (2009) Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol*. 150:1638-1647.

Nimchuk Z, Marois E, Kjemtrup S, Leister RT, Katagiri F, Dangl JL. (2000) Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell*. 101, 353–363.

Ning J, Zhang B, Wang N, Zhou Y, Xiong L. (2011) Increased leaf angle1, a Raf-like MAPKKK that interacts with a nuclear protein family, regulates mechanical tissue formation in the Lamina joint of rice. *Plant Cell*. 23:4334-4347.

Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY. (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science*. 313:220-223.

Ootsubo Y, Hibino T, Wakazono T, Mukai Y, Che FS. (2016) IREN, a novel EF-hand motif-containing nuclease, functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 80:748-760.

Priller JP, Reid S, Konein P, Dietrich P, Sonnewald S. (2016) The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Type-3 Effector XopB Inhibits Plant Defence Responses by Interfering with ROS Production. *PLoS One*. 11:e0159107.

Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiaho-Lassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY. (1997) Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94, 3459–3464.

Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U. (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 9368–9373.

Sun X, Zhang Z, Xu J, Cui X, Feng D, Wang K, Xu M, Zhou L, Han X, Gu X, Lu T. (2016) The *Oryza sativa* Regulator HDR1 Associates with the Kinase OsK4 to Control Photoperiodic Flowering. *PLoS Genet*. 12: e1005927.

Taguchi F, Takeuchi K, Katoh E, Murata K, Suzuki T, Marutani M, Kawasaki T, Eguchi M, Katoh S, Kaku H, Yasuda C, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. (2006) Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Cell Microbiol*. 8: 923-938.

Takai R, Isogai A, Takayama S, Che FS. (2008) Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Mol Plant Microbe Interact*. 21:1635-1642.

Takai R, Kaneda T, Isogai A, Takayama S, Che FS. (2007) A new method of defense response analysis using a transient expression system in rice protoplasts. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71:590-593.

Takeuchi K, Taguchi F, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. (2003) Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *J. Bacteriol.* 185, 6658–6665.

Tanaka N, Che FS, Watanabe N, Fujiwara S, Takayama S, Isogai A. (2003) Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of *PAL*, *Chl-1*, and *PBZ1*, but not of *Lox* in rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:422-428.

Wu D, Ding W, Zhang Y, Liu X, Yang L. (2015) Oleanolic Acid Induces the Type III Secretion System of *Ralstonia solanacearum*. *Front Microbiol.* 6:1466.

Yoshie Y, Goto K, Takai R, Iwano M, Takayama S, Isogai A, Che FS. (2005) Function of the rice gp91phox homologs *OsrbohA* and *OsrbohE* genes in ROS-dependent plant immune responses. *Plant Biotech.* 22:127-135.

Yu D, Chen C, 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.

Zhu Q, Dabi T, Beeche A, Yamamoto R, Lawton MA, Lamb C. (1995) Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Mol Biol.* 29:535-550.

Zipfel C, Felix G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:353-360.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* 125: 749-760.

迹見勇輝 (2010) イネ褐条病細菌 *Acidovorax avenae* が生産するエフェクターの植物細胞内への輸送機構解析
卒業論文 (長浜バイオ大学)

桂木雄也 (2015) イネにおける植物病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの受容機構に関する研究

博士論文 (長浜バイオ大学大学院)

門田育生、大内昭 (1983) 幼苗期におけるイネ褐条病の病徴

Symptoms of Bacterial Brown Stripe of Rice Seedlings in Nursery Boxes

日本植物病理學會報 49, 561-564,

平井洋行 (2012) 植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来の鞭毛タンパク質 flagellin の 特異的イネ免疫反応誘導機構に関する研究

博士論文 (長浜バイオ大学大学院)

松田智裕 (2019) イネの受容体型キナーゼ ERC1 による EF-Tu の認識機構

修士論文 (長浜バイオ大学大学院)

三橋勇太 (2015) イネ褐条病原細菌 *Acidovorax avenae* sub sp. *avenae* K1 菌株のゲノム解析 卒業論文 (長浜バイオ大学)

森浩禎 (2003)

「大腸菌におけるゲノム機能の体系的解析」

JST CREST

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くださり、厳しくも暖かい指導を授けてくださった植物分子環境生理学研究室の蔡晃植教授に厚くお礼申し上げます。

実験手法や研究発表、学会発表、進学など様々な場面でご指導、ご鞭撻を頂いた近藤先輩、平井先輩、古川先輩、神村先輩、大坪先輩、桂木先輩、迹見先輩、宇野先輩、中川先輩に心よりお礼申し上げます。

同じ Hrp グループの一員としてともに研究に勤しんだ宮田先輩、佐々木先輩、柳生先輩、鈴木さん、坂口君、中村さん、山田君、加藤君、小林君、大森さん、上田さんにお礼申し上げます。

また、同期としてともに切磋琢磨した王君、片山君、寛座さん、鬼頭君、津田君、仲君、堀家君、丸山君、村上君、黎さん、若園君に深く感謝いたします。

最後に、研究生生活を支え、温かく見守ってくださった家族に心よりお礼申し上げます。