

イネによる鞭毛構成タンパク質フラジェリンの認識機構

Recognition mechanism of flagellin by rice

桂木雄也¹・村上貴彦²・伊庭弘貴²・近藤真千子¹・蔡 晃植^{1,2,3}

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部フロンティアバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科

³長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Yuya Katsuragi¹, Takahiko Murakami², Hiroki Iba², Machiko Kondo¹, Fang-Sik Che^{1,2,3}

¹Department of Frontier Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

²Graduate School of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

³Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

要旨

シロイヌナズナはフラジェリンの N 末端側に存在する flg22 を FLS2 という受容体型キナーゼで認識して PTI を誘導する。一方、イネは flg22 ではなく、C 末端側に存在する CD2-1 を認識して免疫反応を誘導する。これまでの研究で、CD2-1 の認識に関与する分子として FliRK2 という受容体型キナーゼが同定されているが、FliRK2 が CD2-1 の受容体かどうかは明らかになっていない。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 法を用いて FliRK2 ノックアウトイネを作製することで FliRK2 が CD2-1 の受容体であることを確定することを目的として研究を行った。

Plants have evolved a multilayered immune system that can be activated under conditions of pathogen invasion. The first line of the active defense system relies upon the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs). Flagellin functions as PAMP and induces PAMP-triggered immunity (PTI) in several plant species. *Arabidopsis thaliana* recognizes flg22 presenting within the N-terminal region of flagellin with a receptor-type kinase called FLS2 and induces PTI. Whereas, rice recognizes CD2-1 existing on the C-terminal side instead of flg22. Previous studies reported that a receptor-like kinase called FliRK2 is candidate of receptor for CD2-1 in rice. To determine whether FliRK2 is a true receptor for CD2-1, FliRK2 knockout rice lines were prepared using the CRISPR/Cas9 method, and the CD2-1 recognition ability of the knockout line was examined.

1. 緒言

植物免疫は、段階的に誘導される主に 2 層のシステムによって構築されている¹⁾。植物免疫の最初の層では、植物が侵入してくる病原菌が共通して持つ病原菌関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns: PAMP) と呼ばれる分子群を認識し、活性酸素の発生や免疫関連遺伝子の発現、カロースの蓄積、ファイトアレキシンの合成などに代表される PAMP-triggered immunity (PTI) が誘導され

る。これまでに、糸状菌の細胞壁構成因子である β グルカン²⁾、キチン³⁾、細菌の鞭毛を構成するタンパク質フラジェリン⁴⁾、翻訳伸長因子 Elongation Factor Tu⁵⁾ などが PAMP として機能することが知られている。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 Effector-triggered immunity (ETI) である。このエフェクタータンパク質は、本来、病原菌が PTI を抑制するために、タイプ III 分泌装置を介して植物細胞内に分泌するものである。このエフェクターが効果的に PTI を抑制した場合、病原菌の感染が成立する。しかし、植物がエフェクターを認識する機構を有していた場合、過敏細胞死を含む ETI が誘導される。このような PTI と ETI は、それぞれ独立した系であるが、効果的な ETI 誘導には PTI が誘導されることが必須であることも報告されている⁶⁾。

これまでに、シロイヌナズナはフラジェリンの N 末端側に存在する 22 個のアミノ酸領域 (flg22) を FLS2 という受容体型キナーゼで認識して PTI を誘導することが知られている。一方、イネは flg22 を認識せずフラジェリンの C 末端側に存在する CD2-1 領域を認識し PTI を誘導することが明らかになっている⁷⁾。そこで、イネに存在する CD2-1 の受容体を同定するために、イネ培養細胞にフラジェリンを処理して発現上昇する遺伝子を探索したところ、受容体型キナーゼをコードする 2 つの遺伝子 (AK110075, AK111851) が存在していた。そこで、この 2 つの遺伝子をイネプロトプラストに一過的に過剰発現させたところ、AK111851 を過剰発現させたプロトプラストにおいてフラジェリン応答性 *O_sWRKY70* 遺伝子の発現量が増加した。このことから、AK111851 がフラジェリン受容体候補であると考え、Flagellin-induced receptor kinase 2 (FliRK2) と名付けた。FliRK2 は、全長 1,041 アミノ酸で構成され、細胞外に細胞膜輸送シグナルペプチド、8 個の LRR、膜貫通領域、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼドメインを持つ一回膜貫通型の受容体型キナーゼであった。そこで、FliRK2 過剰発現イネから調整した膜面分に CD2-1 を加え、抗 FliRK2 抗体を用いた共免疫沈降実験を行ったところ、FliRK2 は CD2-1 と特異的に結合することが明らかとなった。そこで、FliRK2 が CD2-1 の真の受容体として機能するかどうかを調べるために、CRISPR/Cas9 法を用いて FliRK2 ノックアウトイネを作製し、これらノックアウトイネにおける CD2-1 認識による PTI 誘導能を調べることにした。

2. フラジェリン CD2-1 の受容体候補である FliRK2 のノックアウトイネ株の構築

FliRK2 ノックアウトイネの作成にあたっては、構築した CRISPR/Cas9 カセットをアグロバクテリウムによってイネゲノムに導入し、再分化個体を得て、これを自殖させることで、両アレルに変異をホモで持ち、購入した CRISPR/Cas9 カセットを持たない個体を得る方法を用いることにした。

FliRK2 遺伝子の変異体を作製するため、まず、Cas9 によって切断する各遺伝子内の標的配列をソフトウェア CRISPR direct を用いて設計した。FliRK2 遺伝子の ORF の上流に存在し、予測されたオフターゲットとなる配列の少ないものを選んだ結果、*FliRK2* 遺伝子 ORF の 157bp 部位を Cas9 により切断することとした (図 1)。設計した gRNA 配列と、それに対して相補的な配列の 5' 末端に *Bsa* I 配列を付加したオリゴ DNA を化学合成し、それぞれのプライマーセットのリン酸化とアニーリングを行い、これらを *Bsa* I で消化した pRGE31 とライゲーション

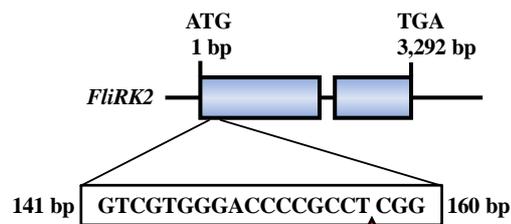


図 1 設計した gRNA の配列と Cas9 による切断部位
CRISPR/Cas9 システムによって *FliRK2* 遺伝子に変異を入れる部位と使用した gRNA の配列を示す。青のボックスはエクソンを、赤の矢印は Cas9 による切断部位を示す。

ンした。ライゲーション産物は*E. coli* DH5 α に導入し、得られたクローンが保持するプラスミドの配列を確認することで、*FliRK2* ノックアウトイネの作製に用いる *FliRK2-CRIS2/pRGE31* ベクタープラスミドを得た。

前培養したイネカルスに *FliRK2-CRIS2/pRGE31* ベクタープラスミドを保持するアグロバクテリウム懸濁液と混合し、5 分間静置した。その後、培地を除去し、カルスを滅菌濾紙に移し余分な水分を除去した。カルスを感染培地に一面に広げるように並べ、22°C、暗黒化で 3 日間培養した。感染させたカルスを 50 ml チューブに回収し、30 ml の Claforan/滅菌水 (250 μ g/ml) を加え強く攪拌し、カルスを洗浄した。この操作を 5 回繰り返した後、カルスを滅菌濾紙に移し余分な水分を除去した。カルスを 1 次選抜培地にプレート 1 枚あたり 25 個程度となるように並べ、人工気象器で 30°C、光照明下で 3 週間培養した。生育が認められたイネカルスを 2 次選抜培地へ植え継ぎ、30°C、光照明下で 2 週間培養し、さらに生育が認められたカルスを 2 次選抜培地へ植え継ぎ、30°C、光照明下で 2 週間培養した。このようにして選抜されたカルスを再分化培地へ植え継ぎ、30°C、光照明下で培養することで、カルスからシュートを生じさせ、シュートが得られた個体については、シュート部分を発根培地に移し、再分化個体を得た。

このようにして得られた再分化個体中で変異が導入された個体を選別するため、再分化個体の第 3 葉上部約 5 cm を切り取り、DNA を抽出した後、これをテンプレートに *FliRK2* 遺伝子の標的配列を増幅するように設計したプライマーセットを用いて PCR を行った。増幅した PCR 産物についてダイレクトシーケンスを行うことで各個体の DNA 配列を解析した結果、157 bp 周辺に変異を持つ個体が 2 個体得られたので、これらを *FliRK2-CR2-4* および *FliRK2-CR2-12* と名付けた。*FliRK2-CR2-4* では、157 番目の T の後に T が挿入されており、*FliRK2-CR2-12* では 157 番目の T が欠損していた。さらに、ダイレクトシーケンスによって 1 種類の配列のみが検出されたことから、これらの株は *FliRK2* 遺伝子の中に同じ変異をホモで持つ株であることが示唆された。次に、*FliRK2* 遺伝子の変異を両対立遺伝子に持ち、さらに Cas9 カセットを保持しないイネ個体を作製するため、*FliRK2-CR2-4* と *FliRK2-CR2-12* をそれぞれ自殖させ、得られた後代の中から Cas9 カセットを持たない株を選抜したところ、*FliRK2-CR2-4* の自殖個体からは *FliRK2-CR2-4-9* と名付けた個体が、*FliRK2-CR2-12* の自殖個体からは *FliRK2-CR2-12-5* と名付けた個体が Cas9 カセットを保持しないことが示された。また、*FliRK2-CR2-4-9* と *FliRK2-CR2-12-5* の *FliRK2* 遺伝子配列についても解析したところ、親株と同じく、*FliRK2-CR2-4-9* には T の一塩基挿入が、*FliRK2-CR2-12-5* には T の一塩基欠損が確認できた。T が挿入された *FliRK2-CR2-4-9* 株ではフレームシフトが生じ、69 番目のコドンがストップコドンになる。また、T が欠損した *FliRK2-CR2-12-5* 株でもフレーム

シフトが生じ、65 番目のコドンがストップコドンになることが予想された (図 2)。以上のことから、*FliRK2-CR2-4-9* 株と *FliRK2-CR2-12-5* *FliRK2* 株は *FliRK2* の機能を欠損した *FliRK2* ノックアウト株であることが示された。



図 2 *FliRK2-CR2-4-9* と *FliRK2-CR2-12-5* における *FliRK2* の予想構造
 緑のボックスは細胞膜輸送シグナルペプチド、青のボックスはLRRドメイン、茶色のボックスは膜貫通領域、橙色のボックスはセリン/スレオニンキナーゼドメインを示す。

3. *FliRK2* ノックアウトイネにおける CD2-1 認識能

3. 1 CD2-1 処理による活性酸素発生の誘導の確認

FliRK2 ノックアウトイネの CD2-1 認識能について調べるために、まず、PTI の一つである活性酸素の発生を指標に実験を行なった。まず、ニホンバレ野生株と FliRK2 ノックアウトイネ培養細胞 (FliRK2-CR2-4-9、FliRK2-CR2-12-5) に CD2-1 を 300 nM となるように処理し、0 時間から 3 時間まで 0.5 時間ごとの活性酸素量を測定した。その結果、ニホンバレ野生株では CD2-1 処理により 0.5 時間から活性酸素の発生が認められ、処理後 2 時間後に水処理の約 25 倍の活性酸素発生量を示したのに対して、FliRK2-CR2-4-9 に CD2-1 を処理した場合、処理後 1 時間後に水処理の約 3.9 倍の活性酸素量しか認められなかった。また、FliRK2-CR2-12-5 に CD2-1 を処理した場合でも、処理後 1.5 時間後に約 4 倍の活性酸素発生量しか認められなかった (図 3)。この FliRK2 ノックアウトイネ培養細胞 (FliRK2-CR2-4-9、FliRK2-CR2-12-5) にイネに対して PAMP 活性を示す EF-Tu を処理した場合、野生株と同程度の活性酸素発生が認められたことから、これら FliRK2 ノックアウトイネ培養細胞ではフラジェリン以外の PAMP を認識して活性酸素発生を誘導する能力は残っていた。

次に、ニホンバレ野生株と FliRK2 ノックアウトイネの葉からリーフパンチを用いてリーフディスクを作製し、このリーフディスクに CD2-1 をそれぞれ終濃度 1000 nM になるように処理した後の活性酸素発生量を測定した。その結果、ニホンバレ野生株では CD2-1 処理により 5 時間後から活性酸素の発生が認められたが、FliRK2-CR2-4-9 と FliRK2-CR2-12-5 では活性酸素の発生が認められなかった。一方、EF-Tu101-300 を処理した場合、野生株と同程度の活性酸素発生が認められたことから、FliRK2 ノックアウトイネはフラジェリン CD2-1 を認識し活性酸素発生を誘導する能力を失っていることが示された。

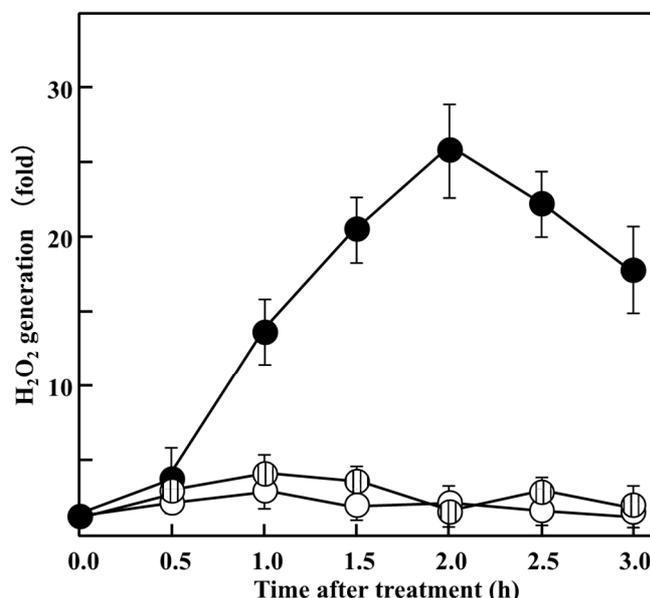


図 3 CD2-1 処理によって認められる活性酸素の発生
ニホンバレ野生株 (●)、FliRK2-CR2-4-9 (○)、FliRK2-CR2-12-5 (◐) に CD2-0 を 300 nM になるように加え、経時的に発生する活性酸素発生量を測定した。実験は 3 回以上行われ、測定値の標準偏差をバーで示した。

3. 2 CD2-1 処理によるカロースの沈着の誘導の確認

次に、PTI の一つであるカロースの沈着を指標に FliRK2 ノックアウトイネの CD2-1 認識能について調べた。まず、ニホンバレ野生株と FliRK2 ノックアウトイネ培養細胞に CD2-1 を 300 nM となるように処理し、16 時間後にイネ培養細胞をアニリンブルーで染色しカロースを観察した。その結果、ニホンバレ野生株では、CD2-1 処理により水処理の約 8.3 倍のカロースの沈着量が認められたのに対し、FliRK2-CR2-4-9 と FliRK2-CR2-12-5 では共に水処理の約 2 倍のカロースの沈着量しか認められなかった。この FliRK2 ノックアウトイネ培養細胞に EF-Tu を処理した場合、野生株と同程度のカロースの沈着が認められたことから、これら FliRK2 ノックアウトイネ培養細胞ではフラジェリン以外の PAMP を認識してカロースの沈着を誘導する能力は残っていることが示された。

次に、ニホンバレ野生株、FliRK2 ノックアウトイネ葉切片に CD2-1 を 1,000 nM となるように処理し、処理 16 時間後の葉切片をアニリンブルーで染色し、カロースを観察した。その結果、ニホンバレ野生株では、CD2-1 処理により水処理の約 3 倍のカロースの沈着量が認められたのに対し、FliRK2-CR2-4-9 では CD2-1 処理により水処理の約 1.3 倍、FliRK2-CR2-12-5 では CD2-1 処理により水処理の約 1.5 倍のカロースの沈着量しか認められなかった。この FliRK2 ノックアウトイネ葉切片に EF-Tu を処理した場合、野生株と同程度のカロースの沈着が認められたため、これら FliRK2 ノックアウトイネ葉切片ではフラジェリン以外の PAMP を認識してカロース沈着を誘導する能力は残っていた。このことから、各ノックアウトイネ葉切片では CD2-1 によって誘導されるカロースの沈着のみが抑制されていることが示された。

3. 3 FliRK2 遺伝子を導入した *FliRK2* ノックアウトイネプロトプラストにおける PTI 誘導

FliRK2 ノックアウトイネに *FliRK2* 遺伝子を導入することで CD2-1 認識能が回復するかどうかを調べるために、PTI 関連遺伝子のプロモーター活性を指標に実験を行なった。まず、FliRK2 ノックアウトイネ培養細胞から単離したイネプロトプラストに *FliRK2* を発現するベクターと *OsWRKY70* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを導入し、各形質転換イネプロトプラストに CD2-1 を終濃度 500 nM となるように処理し、3 時間後の *OsWRKY70* のプロモーター活性を測定した。その結果、FliRK2-CR2-4-9 と FliRK2-CR2-12-5 に FliRK2 を発現させた場合では、CD2-1 処理により水処理の約 1.7 倍の有意な *OsWRKY70* のプロモーター活性の増加が認められた。このことから、FliRK2 ノックアウトイネプロトプラストとは *FliRK2* の導入によって CD2-1 認識能を回復させることが示された。

4. おわりに

FliRK2 が CD2-1 の受容体として機能するかどうかを明らかにするために、CRISPR/Cas9 法を用いて FliRK2 ノックアウトイネを作製し、この FliRK2 ノックアウトイネにおける CD2-1 認識能を調べた。その結果、FliRK2 ノックアウトイネに CD2-1 を処理しても PTI 反応である活性酸素発生とカロース沈着が誘導されないことが明らかになった。これまでの研究で、FliRK2 は CD2-1 と特異的に結合することも明らかになっていることから、FliRK2 が CD2-1 の受容体である可能性は高いと考えられる。今後 FliRK2 が CD2-1 の真の受容体であるかを確定させるためには、FliRK2 ノックアウト変異体に *FliRK2* を相補した形質転換体を作製することが必要であると思われる。

植物の PAMP 認識後のシグナル伝達には補助受容体が関係することも知られている。シロイヌナズナにおいては、FLS2 がフラジェリンの flg22 を認識すると、補助受容体 BAK1 のセリン/スレオニンキナーゼドメインと受容体型細胞質キナーゼである BIK1 のセリン/キナーゼドメインの自己リン酸化が生じ、その後、BAK1 は BIK1 をリン酸化し、BIK1 は FLS2 と BAK1 をリン酸化することが報告されている⁸⁾。FliRK2 を介した CD2-1 受容シグナルにも、このようなヘテロリン酸化が関与する可能性が考えられる。今後、FliRK2 が CD2-1 の受容と認識伝達に関与することを明らかにするためには、CD2-1 認識後の FliRK2 の自己リン酸化や FliRK2 と相互作用するイネタンパク質、FliRK2 によってリン酸化されるタンパク質を同定することも必要となるであろう。

参考文献

- 1) Jones, J.D., Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329. (2006)
- 2) Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, M., Kloareg, B., Fritig, B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* 124: 1027-1038. (2000)
- 3) Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11086-11091. (2006)
- 4) Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., Boller, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18:265-276. (1999)
- 5) Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* 16: 3496-3507. (2004)
- 6) Alfano, JR., Collmer, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 385-414. (2004)
- 7) Katsuragi, Y., Takai, R., Furukawa, T. Hirai, H., Morimoto, T., Katayama, T., Murakami T., and Che FS. CD2-1, the C-Terminal Region of Flagellin, Modulates the Induction of Immune Responses in Rice. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 28: 648-58. (2015)
- 8) Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., He, P. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 496-501. (2010)