

# 博 士 論 文

*Acidovorax avenae* が持つ  
植物免疫誘導性エフェクタータンパク質 RHIF に関する研究

2022 年 3 月

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

中村 みなみ

## 目次

目次	・・・2
序論	・・・3

### 第一章 *A. avenae* N1141 菌株由来のエフェクタータンパク質 NRHIF の同定

1-1 材料と方法	・・・12
1-2 結果	・・・32
1-3 考察	・・・46

### 第二章 *A. avenae* K1 菌株由来のエフェクタータンパク質 KRHIF の同定

2-1 材料と方法	・・・50
2-2 結果	・・・61
2-3 考察	・・・73

### 第三章 NRHIF および KRHIF が持つエフェクターとしての機能の解析

3-1 材料と方法	・・・76
3-2 結果	・・・98
3-3 考察	・・・117

参考文献	・・・122
謝辞	・・・129

## 序論

現在の世界人口は約 78 億人であり、2050 年には 97 億人に達すると予想されている (DESA, 2019)。人口増加に伴い、食糧需要も増加していき 2050 年には現在の 1.7 倍の食料が必要になると想定されている。しかし、地球上の耕地として利用可能な面積はすでに限界に達しており、増加する食糧需要を満たすためには耕地面積あたりの食糧の生産率を向上させる必要がある (MAFF, 2019)。現在の農業において作物の生産率を低下させている要因のひとつとして、病原菌の感染による病害がある。病害によって失われている農業生産量は莫大であり、その損失量は世界規模で見た場合、全収穫量の 20~40%にも達する (JAICAF, 2020)。作物を病害から守るため、現在の農業においては病原菌に直接作用する殺菌剤を用いることが多いが、殺菌剤による防除は環境汚染や薬剤耐性菌の出現などを引き起こす危険性もある。これらの問題を解決し、食糧の増産を行うためには、植物自身が持つ免疫力を向上させることで病害防除を行う方法もひとつの選択肢であろう。

植物免疫システムは PAMPs-triggered immunity (PTI) と Effector-triggered immunity (ETI) の 2 層で形成される (Jones and Dangl, 2006) (Fig. A)。植物は植物病原体が共通して持つ病原菌分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識し活性酸素の発生やカロースの沈着、PTI 関連遺伝子の発現などの反応を含む PTI を誘導する。これに対して病原体は、病原細菌などが持つ Type III 分泌装置 (T3SS) からエフェクタータンパク質を植物細胞内に分泌し、Effector-triggered susceptibility (ETS) を引き起こす。一方、植物がこのエフェクタータンパク質を認識できた場合、過敏細胞死などのより強い免疫反応を含む ETI を誘導する。このような植物と病原体の攻防は zigzag model と呼ばれており、植物病原細菌の植物への感染は、PTI の強度、ETS の強度、ETI の強度の合計 (PTI-ETS+ETI) が感染閾値を超えるかどうかによってその可否が決定される。

筆者が所属する研究室では、植物病原細菌 *Acidovorax avenae* とイネを用いて植物の病原細菌認識および免疫反応誘導機構に関して活発に研究を行ってきた。*A. avenae* は単子葉植物を宿主とするグラム陰性菌であり、感染すると褐条病を引き起こす。褐条病は箱育苗および畑苗代で多く発生しており、イネがこの病気に感染すると幼芽の場合は黄褐色水浸状になり生育が停止し腐敗枯死する。2、3 葉期に達した苗に感染した場合は、葉鞘に黄褐色水浸状の条斑が現れ湾曲し、次第に葉身にも条斑が生じ生育に大きな影響を生じる。本菌はイネ、アワ、シコクビエ、トウモロコシ、ヒエなどから単離されているが、それぞれの宿主特異性が非常に厳密であり、一つの菌株が感染で

きる植物種はほぼ1種に限定される (Kadota, 1996)。例えば、イネから分離された K1 菌株や H8301 菌株はイネ以外の植物に感染することができず、シコクビエから分離された N1141 菌株はシコクビエ以外の植物に感染することができない。K1 菌株および N1141 菌株については全ゲノム配列が解析されており、両菌株のゲノムは約 5.3 Mpb で構成され、K1 菌株は 5,138、N1141 菌株は 4,786 の CDS を含む (Kondo et al., 2017)。*A. avenae* の厳密な宿主特異性の機構を調べるため、N1141 菌株を非宿主であるイネに接種したところ、活性酸素の発生やカロースの沈着、免疫関連遺伝子の発現誘導、過敏細胞死の誘導のような PTI や ETI と思われる反応が誘導された。一方、イネを宿主とする K1 菌株や H8301 菌株をイネに接種した場合、このような免疫反応は誘導されないことも示され、この菌の厳密な宿主特異性には、イネによるこれらの菌の認識と免疫反応が関与する可能性が高いことが示唆された (Che et al., 1999)。

そこで、まず *A. avenae* N1141 菌株が持つであろう PTI 誘導因子に関する研究が開始された。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たところ、N1141 菌株の菌体表層抽出物をイネ細胞に加えたときにのみ、活性酸素の発生やカロースの沈着、PTI 関連遺伝子の発現誘導などの PTI 反応が誘導された。また、N1141 菌株の菌体表層抽出物が持つその活性は、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、PTI 誘導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、N1141 菌株と H8301 菌株間で構造が大きく異なるタンパク質を探索するために、N1141 菌体と H8301 菌体をそれぞれウサギに接種し、作製した N1141 菌体に対する抗体を H8301 菌体で反応、吸収することで N1141 特異的抗体を、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 特異的抗体をそれぞれ得た。これら特異抗体を用いて両菌株の菌体表層抽出物を Western blot で解析したところ、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を行ったところ、*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。そこで、イネに対して非病原性の N1141 菌株と病原性の H8301 菌株からフラジェリンを精製しイネ培養細胞に処理したところ、N1141 菌株由来のフラジェリンを処理したイネ培養細胞では活性酸素の発生や免疫関連遺伝子の発現誘導といった PTI 反応が誘導されたが、H8301 菌株から精製したフラジェリンを処理した場合はこのような PTI 反応が誘導されなかった。これらのことから、*A. avenae* のイネ非病原性 N1141 菌株由来のフラジェリンはイネの PTI を特異的に誘導する PAMPs として機能することが明らかに

なった (Che et al., 2000)。

N1141 菌株由来のフラジェリンがイネの PTI を誘導することが明らかになったのとはほぼ同時に、*P. syringae* pv. *tabaci* のフラジェリンが双子葉植物であるトマトやシロイヌナズナの免疫反応を誘導することが報告された (Felix et al., 1999)。さらに、このフラジェリンの分解産物や合成ペプチドを使用することで、トマトやシロイヌナズナが認識するフラジェリン領域として、N 末端領域にある保存された 22 アミノ酸残基からなる flg22 を同定した (Felix et al., 1999)。興味深いことに、flg22 はイネの PTI を誘導しないことも示され、イネはフラジェリンの flg22 以外の領域を認識して PTI を誘導していることが明らかとなった。フラジェリンはその構造上、N 末端から D0、D1、D2、D3、D2、D1、D0 の 7 つのドメインから形成される。そこで、イネが認識するフラジェリンの認識部位を特定するため、N1141 フラジェリンを N 末端側の D0、D1、D2 ドメイン (ND0-2)、N 末端側の D2、D3、C 末端側の D2 ドメイン (ND2-CD2)、N 末端側の D2、D1、D0 ドメイン (CD2-0) の 3 つを発現タンパク質として作製した。各ドメインタンパク質をイネ培養細胞にそれぞれ処理したところ、CD2-0 は PTI を誘導したが、flg22 を含む ND0-2 や ND2-CD2 はイネの PTI を誘導しなかった。そこで、CD2-0 領域を含む様々な発現タンパク質を作製したところ、イネはフラジェリンの C 末端の D2、D1 領域の 100 アミノ酸残基からなる CD2-1 を認識することが明らかとなった (Katsuragi et al., 2015)。

植物による PAMPs 認識は、植物細胞膜表面に存在する Pattern-Recognition Receptors (PRR) と呼ばれる受容体によって行われる。例えば、シロイヌナズナは flg22 を細胞外にロイシンリッチリピート領域 (LRR) を持ち、細胞質内にセリン/スレオニンキナーゼドメインを有する一回膜貫通型の受容体キナーゼである Flagellin-sensitive 2 (FLS2) を用いて認識している (Gomez-Gomez and Boller, 2002)。FLS2 は flg22 を認識後、速やかに Brassinosteroid insensitive 1-associated kinase1 (BAK1) と複合体を形成し (Chinchilla et al., 2007; Schulze et al., 2010)、FLS2/BAK1 複合体は Botrytis-induced kinase1 (BIK1) によってリン酸化され、このリン酸化情報が MAPK カスケードを介して細胞内に伝達され PTI が誘導されると考えられている (Lu et al., 2010)。シロイヌナズナは flg22 を認識し、イネは CD2-1 を認識するという事は、両者の受容機構は異なっており、イネでは FLS2 以外の受容体が CD2-1 の認識に関与していると予想される。そこで、このイネにおける受容機構を調べるため FLS2 とアミノ酸レベルで 45% の相同性を有する *Oryza sativa* FLS2 (OsFLS2) をノックダウンしたイネを作製したところ、フラジェリン認識能は全く低下しなかったことから、イネの OsFLS2 はフラジェリン CD2-1 領域に対する主要な受容体として機能しないことが示された (Takai et al.,

2008)。そこで、CD2-1 を認識するイネ受容体を同定するため、イネ培養細胞にフラジェリンを処理し、処理後に発現上昇する遺伝子をイネオリゴマイクロアレイにより解析した。その結果、受容体型キナーゼをコードする *Flagellin-induced receptor kinase 2 (FliRK2)* と名付けた遺伝子が同定された (今尾, 2019)。FliRK2 は CD2-1 と直接相互作用することや、*FliRK2* ノックアウトイネに CD2-1 を処理しても PTI が誘導されないことから、FliRK2 が CD2-1 の受容体であると考えられている (安田, 2021)。このように、イネはシロイヌナズナとは異なり *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン CD2-1 を FliRK2 で認識して PTI を誘導するシステムを有していることが示された。

イネはシロイヌナズナとは全く異なる認識システムを利用することで *A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン CD2-1 を認識し PTI を誘導することが示されたので、次に、N1141 菌株のフラジェリンの PTI 誘導能が、この菌の宿主特異性にどの程度関与するのかが調べられた。N1141 菌株のフラジェリン CD2-1 と K1 菌株をイネに同時接種し、菌体数と病徴の変化を観察したところ、K1 菌株のみを接種した時と比較して CD2-1 を同時に接種した場合、菌体数が若干減少するものの病徴は同様に発現した。このことから、*A. avenae* のフラジェリンは PTI 誘導には関与するものの、宿主特異性決定の主因子とはならないことが示された (Katsuragi et al., 2015)。

Zigzag model および、病原菌の感染可否が PTI の強度、ETS の強度、ETI の強度の合計 (PTI+ETS+ETI) によって決定されることを考えると、*A. avenae* の宿主特異性決定にはエフェクタータンパク質と、それによって引き起こされる ETS および ETI も重要であると予想される。病原菌は感染時に宿主植物の細胞内に T3SS を介してエフェクターと呼ばれるタンパク質を植物細胞内に輸送し、PTI を抑制する ETS を引き起こす。エフェクタータンパク質を植物細胞内に輸送する T3SS を構成するタンパク質は一般に、*hypersensitive response and pathogenicity (Hrp)* 遺伝子群にコードされていることが知られており (Roine et al., 1997)、実際に *Pseudomonas* 属、*Xanthomonas* 属、*A. avenae* などから 20 個以上の遺伝子が約 20 kbp から 35 kbp の範囲内でクラスター (遺伝子群) を形成している *Hrp* 遺伝子群が見つまっている (Kondo et al., 2012)。これらの病原細菌は植物に感染するときに、T3SS を介して数十種から数百種のエフェクタータンパク質を宿主の植物細胞内に分泌すると考えられている (Baker et al., 1997; Lindgren et al., 1997)。そこで、*A. avenae* のイネ病原性 K1 菌株にも ETS を誘導する能力があるかどうかを調べるため、事前に野生型 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ところ、活性酸素の発生をはじめとする PTI が誘導されなかった。さらに、T3SS をコードする遺伝子を欠損させた K1 菌株 (K $\Delta$ T3SS 株) を接種したイネ培養細胞にフラジェリンを処理すると PTI が誘導されたことから、K1 菌株は

T3SS を介してイネ細胞内に PTI を抑制する ETS エフェクタータンパク質を分泌することが示唆された (Kawaguchi et al., 2021)。そこで次に、*A. avenae* K1 菌株が持つ ETS エフェクターを同定するため、K1 菌株のトランスポゾン挿入変異株を作製し、N1141 菌株フラジェリンによる活性酸素発生を抑制する能力を失った株を選抜したところ、156 個の遺伝子変異株が得られた。これら変異株のトランスポゾン挿入変異部位を解析した結果、68 個の遺伝子を同定した。また、RNA-seq 法による K1 菌株のトランスクリプトーム解析により、イネ感染後に発現量が増加する遺伝子を解析したところ、トランスポゾン挿入変異株のスクリーニングで得られた 68 遺伝子の中で 16 遺伝子が含まれていた。この 16 遺伝子の産物が T3SS から分泌されるかを *in silico* で解析したところ、*A. avenae* K1 suppression factor 1 (AKSF1) と名付けたタンパク質が T3SS から分泌される可能性が高いことが示された。そこで、AKSF1 が実際に ETS エフェクターとして機能するかどうかを確認するために、AKSF1 遺伝子欠損株を作製しイネ培養細胞に接種したところ、AKSF1 欠損株は  $\Delta$ T3SS 株と同等までフラジェリン誘導性 PTI の抑制能を失っており、これは AKSF1 の導入により相補された。このことから、AKSF1 は K1 菌株のイネに対する主要な ETS エフェクタータンパク質であることが明らかになった (Kawaguchi et al., 2020)。

AKSF1 欠損株をイネ植物体に接種すると、野生型株と比較して病徴の縮小と細菌増殖の抑制が観察される。これは、ETS エフェクターである AKSF1 を欠損していることが原因であると考えられる。しかし、 $\Delta$ T3SS 株と比較して AKSF1 欠損株がイネに対する病原性を完全には失っていないことから、K1 菌株には AKSF1 以外にも病原性に関わるエフェクタータンパク質が存在する可能性がある。前述の通り、zigzag model および PTI の強度、ETS の強度、ETI の強度の合計によって病原菌感染の可否が決定されることを考えると、*A. avenae* のイネに対する宿主特異性には、フラジェリンなどによって誘導される PTI と AKSF1 によって誘導される ETS の他に、ETI も関与するはずである。

そこで次に、*A. avenae* のイネに対する感染閾値を決定するもうひとつの要素の一つである ETI についても調べられた。一般的に ETI 反応の中でも、過敏感細胞死は細菌の植物への感染が可能かどうかを決定する重要な免疫反応の一つである。過敏感細胞死とは、細胞膜透過性の喪失や核 DNA の断片化を伴う自発的なプログラム細胞死であり、細菌の感染部位で比較的早期に局所的に引き起こされるのが特徴である (Che et al., 1999)。これまで筆者の所属する研究室において、*A. avenae* のイネ非病原性の N1141 菌株をイネに接種した時に、細胞膜透過性の喪失や核 DNA の断片化を伴う過敏感細胞死が誘導されるが、病原性の K1 菌株をイネに接種した場合、このような過

敏感細胞死は誘導されないことを明らかにした。さらに、N1141 菌株によって誘導されるイネの過敏感細胞死はタンパク質翻訳の特異的阻害剤であるシクロヘキシミドやカルシウムイオンのキレート剤である EGTA、タンパク質リン酸化阻害剤 staurosporine などによって阻害されることも示された (Kaneda et al, 2007)。まず、シクロヘキシミドによって抑制されたことから、N1141 菌株による過敏感細胞死誘導には新たな遺伝子の発現やそれによる新規タンパク質の合成が必要であると考えられた。そこで、この過敏感細胞死誘導時に特異的に発現誘導される遺伝子をマイクロアレイによって解析したところ、植物特有の転写因子をコードする *OsNAC4* が同定された。*OsNAC4* は N 末端側に約 160 アミノ酸残基から構成される 5 つの NAC ドメインを持ち、C 末端側に転写活性化領域を有する典型的な植物の転写調節因子である (Kikuchi et al., 2000; Ooka et al., 2003)。*OsNAC4* が実際に過敏感細胞死誘導に関与するかどうか確かめるため、*OsNAC4* をイネで過剰発現させたところ、細胞膜透過性の喪失や核 DNA の断片化を伴う過敏感細胞死が誘導された (Kaneda et al, 2009)。また、*OsNAC4* RNAi 抑制変異体では過敏感細胞死の誘導が認められず、これらのことから、*OsNAC4* はイネの過敏感細胞死を正に制御する因子であることが初めて示された。さらに、過敏感細胞死誘導時に *OsNAC4* は、細胞質でリン酸化され核へ移行し、核 DNA の断片化に関与するとされるエンドヌクレアーゼをコードする *IREN* や、細胞膜の透過性喪失に関与する分子シャペロンをコードする *OsHSP90* の転写を誘導することも明らかになった (Kaneda et al, 2009)。N1141 菌株によって誘導されるイネの過敏感細胞死は EGTA および staurosporine によって抑制されたことから、イネの過敏感細胞死誘導にはカルシウムイオンの細胞内流入とタンパク質のリン酸化が必要であることが示された (Fujiwara et al, 2004)。そこで、 $Ca^{2+}$  とタンパク質のリン酸化の両方に関与するタンパク質であるカルシウムイオン依存性プロテインキナーゼ (CPKs) について調べたところ、N1141 菌株を接種したイネでは *OsCPK8* が特異的に発現上昇することが示された (Fujiwara et al, 2004; Kamimura et al., 2014)。また、*OsCPK8* RNAi 抑制変異体に N1141 菌株を接種した時に過敏感細胞死が減少していたことや、イネプロトプラストに *OsCPK8* を過剰発現させた時に明瞭な細胞死が誘導されたことから、*OsCPK8* は過敏感細胞死の誘導に関与することが明らかになった。さらに、BiFC 法による相互作用解析や Phos tag ゲルを用いたインビトロキナーゼアッセイによって、*OsCPK8* は *OsNAC4* と相互作用し、直接 *OsNAC4* をリン酸化することで核に移行させ、過敏感細胞死を誘導することも示された (土本, 2019)。

以上のことから、N1141 菌株をイネに接種した時には、*OsCPK8* から *OsNAC4* を介した過敏感細胞死が誘導されることが明らかになった。このような過敏感細胞死は

ETI に属するが、前述のように ETI は病原性細菌のエフェクタータンパク質を認識することで誘導される。これまでに、シロイヌナズナの ETI を誘導するエフェクタータンパク質として *P. syringae* の *avrRpm1* や *X. campestris* の *avrBs3* が報告されている (Ritter and Dangl, 1995; Marois et al, 2002)。このことから、N1141 菌株をイネに接種した時に誘導される過敏感細胞死を始めとする様々な ETI 反応にも、N1141 菌株のエフェクタータンパク質が関与する可能性が高い。実際、T3SS 欠損 N1141 菌株 (NΔT3SS 株) をイネに接種した時に、過敏感細胞死を始めとした ETI 反応は誘導されなかった (近藤, 2012)。一方、N1141 菌株によって誘導されるイネの過敏感細胞死には OsCPK8 や OsNAC4 が関与するが、OsNAC4 のオルソログはシロイヌナズナやトマト、タバコなどには存在しない。このことは、N1141 菌株によって誘導されるイネの過敏感細胞死を含む ETI 反応は、既知のエフェクタータンパク質によるものではなく、これまで知られていない新規の ETI エフェクタータンパク質によって誘導されることを示唆している。*A. avenae* の宿主特異性は PTI と ETS、ETI の強度によって決定されているとすると、イネの ETI を誘導する N1141 菌株が有する新規の ETI エフェクタータンパク質を同定し、その機能を分子レベルで解析することが *A. avenae* の厳密な宿主特異性を分子レベルで理解することにつながるであろう。

そこで本研究は、N1141 菌株の持つ ETI エフェクタータンパク質を同定し、このエフェクターを介したイネの ETI 誘導機構を解明することを目的とした。第 1 章では、N1141 菌株のトランスポゾン挿入変異株ライブラリの中から、イネの過敏感細胞死誘導能を失っている変異株を選抜し、*N1411 rice HR cell death-inducing Factor (NRHIF)* と名付けた遺伝子が ETI エフェクターをコードしていることを明らかにした結果について記す。第 2 章では、イネに対して病原性の *A. avenae* K1 菌株から KRHIF と名付けたエフェクタータンパク質を同定し、KRHIF はシコクビエの過敏感細胞死誘導に関与していることを明らかにした結果について記す。また、第 3 章では NRHIF によるイネの ETI 誘導機構と、KRHIF との特異性がどのように決定されているのかについて調べた結果を記す。さらに、本論文では、*A. avenae* の厳密な宿主特異性がどのようにして制御されているのかについても議論したい。

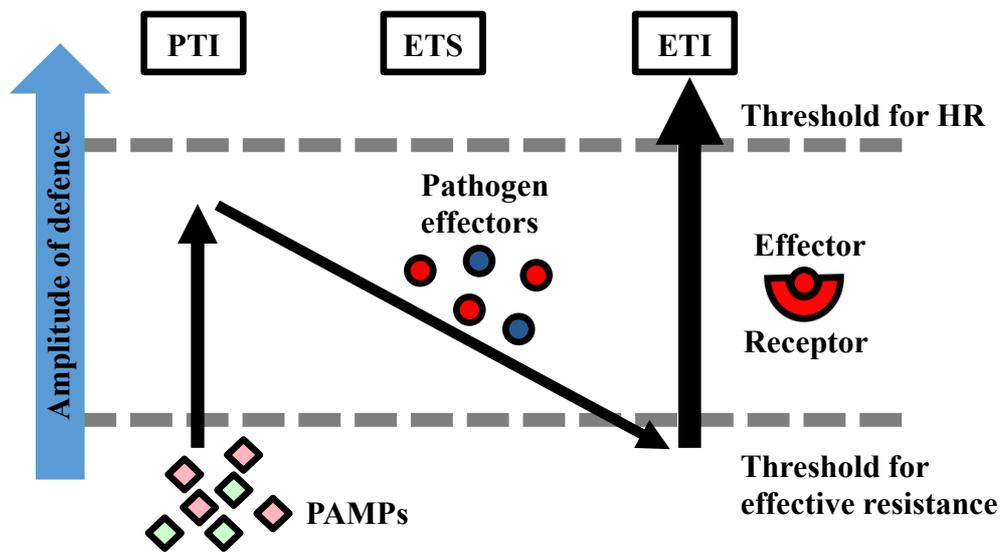


Fig. A 植物免疫の概略図 (ジグザグモデル)

## 第一章

*A. avenae* N1141 菌株由来のエフェクタータンパク質 NRHIF の同定

## 1-1 材料と方法

### 1-1-1 植物と細菌

#### 1) イネ培養細胞の培養条件

本研究で用いたイネ培養細胞（Oc 細胞：*Oryza sativa* L.C 5924）の培養は以下のように行った。乾熱滅菌した 100 ml 三角フラスコに R2S 培地（39.6 mM KNO<sub>3</sub>, 2.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 20.1 μM EDTA · 2Na, 19.8 μM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 6.6 μM MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 7.7 μM ZnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.5 μM CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 48.5 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.6 μM NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1% [w/v] Murashige and Skoog Vitamin powder [Sigma-Aldrich], 18 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3% [w/v] Sucrose [Wako]) 20 ml と培養細胞 2 ml を加えて、30°C、108 rpm、連続光下（40 μmol/m<sup>2</sup>s）で振盪培養した。培養細胞の植継ぎは 7 日ごとに行い、新しい乾熱滅菌済みの三角フラスコに R2S 培地 20 ml と培養細胞 2 ml を加えて振盪培養した。また、実験には植継ぎから 4 日目の培養細胞を用いた。

#### 2) 植物体の栽培条件

イネ (*O. sativa* L. subsp. Kinmaze) は水道水に浸して 2 日間吸水させた後、びわこ培土 2 号（琵琶湖産業株式会社）に植え替え、200 μE/m<sup>2</sup>s の 16 時間明期（30°C）、8 時間暗期（25°C）に設定した人工気象器 BIOTRON LH-350SP-T（日本医科器械製作所）内で生育させた。シコクビエ (*Eleusine coracana*) は、種子をバーミキュライト（ニッタイ株式会社）：スーパーミックス A（サカタのタネ）=3：4 の割合で混合した土に播種し、イネと同じ条件で生育させた。

#### 3) 細菌の保存条件

本研究では、シコクビエを宿主とする植物病原細菌 *A. avenae* N1141 菌株（MAFF 301141）と NΔT3SS 株を用いた（Kadota et al., 1996; Kondo et al., 2017）。また、N1141 トランスポゾン挿入変異株ライブラリは長浜バイオ大学植物分子環境生理学研究室の乗京氏から譲渡されたものを用いた（乗京, 2011）。各菌株のスキムミルクストックを Pseudomonas F (PF) 培地（1% [w/v] Bacto Trypton [BD], 1% [w/v] Bacto Proteose No. 3 [DIFCO], 0.15% [w/v] KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15% [w/v] MgSO<sub>4</sub>, 1.5% [w/v] Bacto Agar [BD]) にプレティングし、30°Cで一晩培養した。プレート上の菌体を白金耳で掻き取り、スキムミルク培地（10% [w/v] Skim milk powder, 1.5% [w/v] L-glutamic acid monosodium salt）

1 ml に懸濁し、50  $\mu$ l ずつ液体窒素で凍結してから  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、これをストック菌株として使用した。

## 1-1-2 ベクターの作製

### 1) *A. avenae* からの DNA 抽出

*A. avenae* N1141 菌株から DNA を抽出するため、PF 液体培地 5.0 ml に、*A. avenae* N1141 のスキムミルクストック溶液 5.0  $\mu$ l を植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で一晩振盪培養した。培養液を 1.5 ml のエッペンドルフチューブ（以下チューブ）に移し、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $4,000\times g$ 、10 min で遠心分離を行い（微量遠心機 CT13R, HITACHI）、上清を除去した。得られた沈殿を TE buffer 250  $\mu$ l で懸濁し、500  $\mu$ l ずつチューブに分注し、そこに、10% SDS 15  $\mu$ l、20 ng/ml プロテイナーゼ K 1.5  $\mu$ l を加えて転倒混和し、 $37^{\circ}\text{C}$  のエアインキュベーター（SHIMAZU）で 1 時間酵素消化した。酵素消化後、チューブに 5.0 M NaCl 50  $\mu$ l、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）溶液（0.7 M NaCl, 10% [w/v] CTAB [CALBIOCHEM]）40  $\mu$ l を加え、 $65^{\circ}\text{C}$  のヒートブロックで 10 分間静置した。反応後、溶液と等量のフェノールクロロホルムイソアミルアルコール（PCI）を加え、転倒混和し、室温、 $15,000\times g$  で 5 分間遠心分離を行った。その後、水層を新しいチューブに移し、溶液と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール（CIA）を加え、転倒混和し、室温、 $15,000\times g$  で 5 分間遠心分離を行った。遠心分離後、水層を新しいチューブに移し、水層の 1/10 量の 3.0 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  と等量の 2-プロパノールを加え、転倒混和し、室温、 $15,000\times g$  で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿に 70%エタノール 1.0 ml を加えてリンスを行い、室温、 $15,000\times g$  で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。残った沈殿を小型微量濃縮遠心機（WAKENYAKU）で減圧乾燥し、TE buffer 250  $\mu$ l を加え、沈殿を溶解した。この溶液に 1.0 mg/ml RNase A を 5.0  $\mu$ l 加え、 $37^{\circ}\text{C}$  の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（1.6 M NaCl, 13% PEG 8000 [MP Biomedicals]）を加え、ピッペティングで混合し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間静置した。静置後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $15,000\times g$  で 15 分間遠心分離し、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、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $15,000\times g$ 、10 分間遠心分離し、上清を除去する操作を 2 回行った後、残った沈殿を減圧乾燥し、TE buffer 50  $\mu$ l を加え、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。

### 2) *NT5-CyaA fusion* ベクターの作製

*NT5* と名付けた遺伝子にコードされるエフェクター候補タンパク質が、イネ細胞内

に分泌されているかどうかを調べるため、NT5 とカルモジュリン依存性アデニル酸シクラーゼ (CyaA) の融合タンパク質を *A. avenae* に発現させるベクターを作製した。5'末端側に *Hind* III サイトを付けた NT5 遺伝子を増幅する下記のプライマーセットを用いて 1-1-2-1) で抽出した N1141 菌株のゲノムをテンプレートに PCR を行った。Zero Blunt PCR Cloning kit (Invitrogen) を用いて PCR 産物と *pCR-Blunt* ベクターとのライゲーションを行い、*pCR-Blunt-NT5 -HindIII* を構築した。得られた *pCR-Blunt-NT5 -HindIII* を *HindIII* で消化した後、QIAquickR Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲル抽出を行った。ゲルから抽出した DNA 断片と *HindIII* 消化および CIAP 処理を行なった *pBBR1TP-flapro-CyaA* (迹見, 2011) を、Ligation-convenience Kit (NIPPON GENE) を用いてライゲーションすることで、*pBBR1TP-flapro-NT5 -CyaA* を得た。

#### <PCR 反応>

##### ・ 組成

2 × PCR buffer for KOD FX	5.0 μl
2 mM dNTPs	2.0 μl
Primer F (10 μM)	0.3 μl
Primer R (10 μM)	0.3 μl
Template (DNA 50 ng)	0.2 μl
KOD-FX (TOYOBO)	0.2 μl
滅菌水 (Sterilized water)	1.0 μl
Total	10 μl

##### ・ 反応条件

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

##### ・ NT5 遺伝子増幅プライマー

*HindIII* -NT5 -cya-F : 5'-AAGCTTATGTCCACTCCCCCTTCCCTGC-3'

NT5-*HindIII* -cya-R : 5'-AAGCTTTGCCCGCACCCCGAGC-3'

<Ligation 反応>

・組成

---

10×Ligation Buffer (ATP 含有)	1 μl
<i>pCR-Blunt</i> (12.5 ng)	0.5 μl
<i>NT5</i> 遺伝子増幅産物	1.2 μl
T4 DNA Ligase (10 U/μl)	1 μl
滅菌水	6.3 μl

---

Total	10 μl
-------	-------

・反応条件

16°C     30 min

<*Hind*III 消化>

・組成

---

<i>Hind</i> III	1 μl
M buffer	2 μl
Vector (1 μg)	10 μl
滅菌水	7 μl

---

Total	20 μl
-------	-------

・反応条件

37°C     Over night

90°C     15 min

<CIAP 処理>

・組成

---

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (TKR)	1 μl
10×buffer	5 μl
<i>Hind</i> III 消化 vector	20 μl
滅菌水	24 μl

---

Total	50 μl
-------	-------

・反応条件

37°C 15 min

↓ +CIAP 1  $\mu$ l

50°C 15 min

75°C 10 min

<Ligation 反応>

・組成

2 × Ligation mix	5 $\mu$ l
<i>pBBR1TP-flapro-CyaA</i> (50 ng)	2.5 $\mu$ l
DNA 断片 (20 ng)	2.5 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

・反応条件

16°C 5 min

### 3) *NRHIF* 遺伝子欠損用ベクター *pKmobsacB- $\Delta$ NRHIF* の作製

*NRHIF* 遺伝子を N1141 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、*NRHIF* 遺伝子 (全長 1053 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 874 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た。*NRHIF* 上流領域増幅用 F プライマー (*NRHIF-F1-xbaI*) と *NRHIF* 下流領域増幅用 R プライマー (*NRHIF-R2-xbaI*) の 5'末端側には *XbaI* サイトを含む *pKmobsacB* ベクターの配列と同じ 15 bp を付け足した。各プライマーセット (上流増幅用: *NRHIF-F1-xbaI*, *NRHIF-R1*) (下流増幅用: *NRHIF-F2-*, *NRHIF-R2-xbaI*) を用いた PCR 反応後、得られた上流 944 bp と下流 905 bp の各増幅断片を 100 倍希釈して混合し、上流と下流の DNA を下記の条件でアニーリングさせた。その後、上流 944 bp を増幅した時の F プライマー (*NRHIF-F1-xbaI*) と下流 905 bp を増幅した時の R プライマー (*NRHIF-R2-xbaI*) を加えて再度 PCR を行うことで、*NRHIF* 遺伝子の上流と下流が連結した 1,829 bp の領域を増幅した。PCR 産物は QIAquickR Gel Extraction Kit を用いてゲル抽出を行った。ゲルから抽出した DNA 断片と、*XbaI* 消化および CIAP 処理を行なった *pKmobsacB* を In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa) を用いてライゲーションすることで、*pKmobsacB- $\Delta$ NRHIF* を得た。

<PCR 反応>

・ 組成

2 × PCR buffer for KOD FX	5.0 μl
2 mM dNTPs	2.0 μl
Primer F (10 μM)	0.3 μl
Primer R (10 μM)	0.3 μl
Template (N1141 genome 50 ng)	0.2 μl
KOD-FX	0.2 μl
滅菌水	1.0 μl
Total	10 μl

・ 反応条件

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

・ *NRHIF* 上流領域増幅用プライマー

NRHIF-F1-*xba*I : 5'-CAGGTCGACTCTAGAGATCGCCATCACCGGAGCCT-3'

NRHIF-R1 : 5'-GCTGTCATGCGGACATGATCCCCCGGAGCGTAC-3'

・ *NRHIF* 下流領域増幅用プライマー

NRHIF-F2 : 5'-GATCATGTCCGCATGACAGCCCACGGCGATG-3'

NRHIF-R2-*xba*I : 5'-CGGGGATCCTCTAGACGCTATTACGGCGCCGTGGC-3'

<NRHIF 遺伝子の上流・下流産物の結合>

・組成

---

2×PCR buffer for KOD FX	5 μl
2 mM dNTP	2 μl
上流 PCR 産物 (1/100 希釈)	1 μl
下流 PCR 産物 (1/100 希釈)	1 μl
KOD-FX	0.2 μl
滅菌水	0.8 μl

---

Total	10 μl
-------	-------

・反応条件

96°C 1 min

98°C 30 sec

55°C 30 sec

68°C 2 min

25°C ∞

↓ + RHIF -F1-xbaI、RHIF -R2-xbaI 各 0.3 μl

96°C 2 min

98°C 10 sec

68°C 2.5 min

25°C ∞

} 40 cycles

<XbaI 消化>

・組成

---

XbaI	1 μl
M buffer	2 μl
Vector (1 μg)	10 μl
滅菌水	7 μl

---

Total	20 μl
-------	-------

・ 反応条件

37°C Over night

90°C 15 min

< In-fusion 反応 >

・ 組成

5 × In-fusion HD enzyme premix	2 μl
<i>Xba</i> I 消化 <i>pKmobsacB</i> (100 ng)	2 μl
PCR 産物 (30 ng/μl)	2 μl
滅菌水	4 μl
Total	10 μl

反応条件

50°C 15 min

#### 4) *NRHIF* 遺伝子相補用ベクター *NRHIF/pKmobsacBKm* の作製

N1141 菌株のゲノムをテンプレートにして N1141 菌株の *RHIF* 遺伝子 (*NRHIF*) を含む配列を増幅するプライマーセット (*RHIF-F1-xba*I、*RHIF-R2-xba*I) 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 *pK18mobsacBKm* ベクターにクローニングし、*NRHIF/pKmobsacBKm* を構築した。

### 1-1-3 イネ過敏感細胞死を指標としたスクリーニング系の確立

#### 1) 菌体の培養と菌体液の調整

トランスポゾンライブラリからイネ過敏感細胞死誘導能を失った株をスクリーニングする系を確立するために、N1141 菌株と *NΔT3SS* 株の培養と濃度調整を行った。PF 培地に N1141 菌株と *NΔT3SS* 株のスキムミルクストック溶液 50 μl をプレーティングし、30°C で一晩培養した。培養後、コンラージ棒と 1.0 ml の滅菌水を用いて菌体を回収し、回収した菌体液の 100 倍希釈液を作成して、 $OD_{610}$  を測定した。得られた  $OD_{610}$  の値から以下の計算式を使用して回収した菌体の濃度を計算し、適切に希釈することで  $1.0 \times 10^{10}$  cfu/ml に調整した。

$$(OD_{610} - 0.0797) / 3.78 \times 10^8 \times 100 \text{ (希釈倍率)} / 50 = \text{菌体濃度 (cfu/μl)}$$

スクリーニングに用いる菌体溶液の濃度を決定するために、調整した菌体溶液の 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、40 倍、100 倍の希釈系列を作成し、各溶液 100  $\mu$ l の OD<sub>620</sub> の値をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により測定し、これを接種に用いた。

## 2) イネ培養細胞への菌体の接種と過敏感細胞死の誘導の確認

継代から 4 日目のイネ培養細胞を 96 穴マイクロプレート (TPP) に先切りチップを用いて 150  $\mu$ l ずつ分注し、これに希釈系列の各菌体液を 2  $\mu$ l ずつ接種した。接種後、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 96 穴マイクロプレートをシールし、30°C、連続光下、マイクロミキサー-E-36 (TAITEC) を用いて 9 時間攪拌した。攪拌後、培養細胞懸濁液から培地を取り除き、滅菌蒸留水を用いて培養細胞の洗浄を 3 回行った。そこに 0.05%エバンスブルー染色液を 200  $\mu$ l 加え、遮光して 15 分間静置した。染色後、染色液を取り除き、滅菌水で培養細胞を 3 回洗浄し、エバンスブルー脱色液 (50% methanol, 1% SDS) 200  $\mu$ l を加えて一晩静置し、エバンスブルー色素の抽出を行った。抽出後、抽出液の 100  $\mu$ l を 96 穴マイクロプレートに移し、595 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーによって測定した。

### 1-1-4 エフェクター候補遺伝子の探索

#### 1) N1141 トランスポゾン挿入変異株のイネ過敏感細胞死誘導能を指標としたスクリーニング

50  $\mu$ g/ $\mu$ l kanamycin 含有の LB 液体培地で 3 日間、30°C、150 rpm で振盪培養した N1141 トランスポゾン挿入変異株を、OD<sub>610</sub> の値が 0.4~0.8 (菌体濃度: 約  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml~ $2.0 \times 10^9$  cfu/ml に相当) になるように調製した。96 穴マイクロプレートへ植継ぎ後 4 日目のイネ培養細胞を 150  $\mu$ l ずつ分注し、調製した各菌体を 2  $\mu$ l 接種した後、30°C、連続光下条件でマイクロミキサーを用いて 9 時間振盪培養した。培養後、培地を取り除き、0.05%エバンスブルー染色液を 200  $\mu$ l 加え、暗黒下、15 分間静置した。染色液を取り除き、培養細胞を滅菌蒸留水で 3 回洗浄後、エバンスブルー脱色液 200  $\mu$ l を加えて一晩静置し、エバンスブルー色素の抽出を行った。抽出液 100  $\mu$ l の 595 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、N1141 菌株を接種した場合の 595 nm の吸光度を 100%とした時、595 nm の値が 50%以下のものをフェクター候補遺伝子変異株とした。

## 2) RATE 法によるトランスポゾン挿入部位近傍の配列解析

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、エフェクター候補遺伝子変異株から 1-1-2-1) と同様の方法で DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートに Random Amplification of Transposon Ends (RATE) 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 PCR 反応>

#### ・組成

2×PCR buffer for KOD FX	5 $\mu$ l
2 mM dNTPs	2 $\mu$ l
Inv1 または Inv2 (10 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ l
Template (DNA 10~200 ng)	1 $\mu$ l
KOD-FX	0.2 $\mu$ l
滅菌水	1.5 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

・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	∞		

・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'

3) サイクルシーケンス反応

RATE 法によって得られた増幅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) 1.0 μl と 99.5%エタノール 25 μl を加えて混合し、室温で 15 分間静置した後、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 μl 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 μl 加え、サンプルを溶解した。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 を用いて解析した。

<Exo-Star 反応>

・ 組成

PCR 産物	5.0 $\mu$ l
Alkaline phosphatase (GE Healthcare)	1.0 $\mu$ l
Exonuclease 1 (GE Healthcare)	1.0 $\mu$ l
Total	7.0 $\mu$ l

・ 反応条件

37°C	15 min
80°C	15 min
25°C	$\infty$

<サイクルシーケンス反応>

・ 組成

Big dye (Applied Biosystems)	2.5 $\mu$ l
Exo-Star 処理済みサンプル	2.0 $\mu$ l
Primer F or R (1 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
滅菌水	4.5 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

・ 反応条件

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

・ トランスポゾン挿入部位近傍の配列解析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'

## 1-1-5 エフェクター候補タンパク質のイネ細胞内への分泌確認

### 1) *in silico* 解析による NRHIF の分泌予測

NRHIF が T3SS から分泌される可能性があるかを、EffectiveT3 (<http://www.effectors.org/index.jsp>) を用いて予測した。Classification module は EffectiveT3 classification module for plant-associated bacteria 1.0.1 を使い、NRHIF のアミノ酸配列を基に予測を行なった。

### 2) *A. avenae* コンピテントセルの作製

*pBBR1TP-flapro-NT5-CyaA* を野生型 N1141 菌株と  $\Delta$ T3SS に導入するため、各菌株のコンピテントセルを作製した。スキムミルクストックを PF 固体培地にストリークし、30°C のインキュベーター (AS ONE) で 1 日静置培養した。培養後、生じたシングルコロニーを PF 液体培地 3 ml に植菌し、30°C、20 時間、振盪培養 (Bio Shaker、TAITEC) した。このうち、100  $\mu$ l の菌体培養液を 2 $\times$ YT 培地 100 ml に植菌し、OD<sub>610</sub> の値が 0.8~1.0 になるまで、30°C で約 10 時間振盪培養を行った。OD<sub>610</sub> の測定には Smart spec™ plus (BIORAD) を用いた。培養後、50 ml 遠沈管 4 本に 25 ml ずつ培養液を分注し、3,000 $\times$ g、4°C で 5 分遠心分離を行うことで、菌体を回収した。集菌後上清を除き、氷冷した 10% グリセロールを 20 ml 加え、菌体の沈殿が混ざるように vortex を用いて激しく懸濁した。懸濁後、氷冷した 10% グリセロールをさらに約 20 ml 加え、vortex で 1 分混和後、氷上に 1 分静置する操作を 3 回繰り返した。その後、3,000 $\times$ g、4°C で 5 分遠心分離して上清を除去することで集菌した。10% グリセロールによる菌の懸濁から集菌までの操作を 3 回繰り返した後、上清を完全に除去した。残ったペレットに、30% グリセロールを 1 ml 加え、先切りしたチップでピペッティングすることで再懸濁した。懸濁液は、滅菌したチューブに 50  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素を用いて細胞を凍結し、-80°C 超低温フリーザー (SANYO) で保存した。

### 3) エレクトロポレーションによる *pBBR1TP-flapro-NT5-CyaA* の導入

氷上で融解した野生型 N1141 菌株と  $\Delta$ T3SS 株のコンピテントセル 50  $\mu$ l に、1-1-2-3) で作製した *pBBR1TP-flapro-NT5-CyaA* をそれぞれ 1  $\mu$ g 添加し、氷上で 30 分静置した。30 分静置後、氷冷したキュベット (Gene Pulser Cuvette 0.1 cm gap, Bio-Rad) に混合液を移した。このキュベットを Gene Pulser (Bio-Rad) のチャンバーにセットし、電圧 1.7 kV/cm、電気容量 25  $\mu$ F、キュベット抵抗 200  $\Omega$  の条件でエレクトロポレーションした。その後直ちに、SOC 培地 950  $\mu$ l をキュベットに添加し、混和後、全量

をチューブに移し、150 rpm、30°Cで 60 分振盪培養した。培養後、菌体液を 3,000×g、室温で 5 分遠心分離し、上清を 100 μl 残して除き、50 μg/ml trimethoprim 含有の PF 固体培地にプレーティングした。*pBBR1TP-flapro-NT5-CyaA* の導入が確認された菌株を NT5 -CyaA/N1141 および NT5 -CyaA/NΔT3SS と名付け、1-1-1-3) の方法に従ってスキムミルクストックを作製し、保存した。

#### 4) *A.avenae* のイネ培養細胞への接種

NT5 -CyaA/N1141 および NT5 -CyaA/NΔT3SS のスキムミルクストック 50 μl を PF プレートにプレーティングし、30°Cで一晩静置培養した。培養後、コンラージ棒と 1 ml の滅菌水を用いて菌体を回収し、回収した菌体液の 100 倍希釈液を作製後 OD<sub>610</sub> の測定に用いた。1-1-3-1) の計算式に従い菌体の濃度を算出し、菌体濃度を  $1.0 \times 10^{10}$  cfu/ml に調製した。この菌懸濁液をイネ培養細胞 22 ml に  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml になるように接種し、30°C、108 rpm、連続光下 ( $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) で振盪培養を行った。

#### 5) *Cya* 活性を指標とした NT5 のイネ細胞内分泌確認

NT5 -CyaA/N1141 および NT5 -CyaA/NΔT3SS を接種し、12 時間後のイネ培養細胞を滅菌水で 3 回洗浄後、細胞 20 mg をスクリュウキャップチューブに入れ、液体窒素で凍らした後、-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 分ボイルした。ボイル後、スクリュウキャップ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。上清を別のチューブに回収し、1,500×g、4°Cで 10 分遠心分離し、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、NT5 -CyaA fusion タンパク質の輸送確認を行った。

### 1-1-6 2 回の相同組換えによる *NRHIF* 遺伝子欠損株と相補株の作製

作製した *pKmobsacB-ΔNRHIF* を 1-1-5-3) と同様の方法で N1141 菌株にエレクトロポレーションで導入した。10 μg/ml の kanamycin 含有の PF 培地にプレーティングすることで、N1141 菌株のゲノムと *pKmobsacB-ΔNRHIF* の間で 1 回目の相同組換え起きた株を選抜した。1 回目の組換えが確認出来た菌株に対して、さらにスクロース選抜を行うことで、2 回目の相同組換えを引き起こした菌株を選抜した。1 回目の相同組換えが確認された菌株を 10 μg/ml の kanamycin 含有の PF 液体培地 3 ml に植菌し、

30°Cで一晩振盪培養した。この菌培養液 3  $\mu$ l をスクロース濃度 20%、22%、24%、26%の PF 液体培地 3 ml に植菌して、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、1,000 倍希釈、10,000 倍希釈してそれぞれ PF 固体培地にプレーティングし、30°Cで 2 日間培養した。*pK18MobsacB* ベクターに存在する *SacB* 遺伝子は高濃度のスクロース存在条件下では菌体の致死を引き起こすため、*pK18MobsacB* ベクターを持つ菌株のうち 2 回目の相同組換えが起きて *SacB* 遺伝子を失った菌株だけが生育できることとなる。得られたシングルコロニーを PF 固体培地と 50  $\mu$ g/ml の kanamycin 含有の PF 固体培地に爪楊枝でレプリカをとり、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 を含有の PF 固体培地では生育できず、PF 固体培地でのみ生育できる。PF 固体培地でのみ生育したコロニーには *RHIF* 遺伝子が欠損した菌株と *RHIF* 遺伝子を保有する菌株の 2 種類が存在する。そこで、*RHIF* 遺伝子欠損株を選抜するために *RHIF* 遺伝子上流 944 bp を増幅した時の F プライマー (RHIF-F1-xba1) と下流 905 bp を増幅した時の R プライマー (RHIF-R2-xba1) を用いてコロニーPCR を行うことで欠損を確認した。*RHIF* 遺伝子の欠損が確認された菌株を  $\Delta$ RHIF 株とした。また、 $\Delta$ RHIF 株に *NRHIF/pKmobsacBKm* を導入し、上記と同様の方法でスクロース選抜を行い、*NRHIF* の再導入が確認できた菌株を  $\Delta$ RHIFC 株とした。相同組換えによる遺伝子欠損株の作製方法についての模式図を Fig. B に示す。

### 1-1-7 イネ ETI 反応の検出

#### 1) エバンスブルーを用いた細胞死の検出

N1141 菌株、 $\Delta$ T3SS 株、 $\Delta$ RHIF 株、 $\Delta$ RHIFC 株を 1-1-5-4) の条件でイネ培養細胞に接種し、0、3、6、9、12 時間目に 1 ml の培養細胞懸濁液を 24 穴プレート (TPP) に移した。培養細胞懸濁液から培地を取り除き、0.05%エバンスブルー染色液を 500  $\mu$ l 加え、暗黒下、15 分間静置した。その後、染色液を取り除き、培養細胞を純水で 3 回洗浄し、エバンスブルー脱色液を 1 ml 加えて一晩静置し、エバンスブルー色素の抽出を行った。抽出液 100  $\mu$ l の 595 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 2) TUNEL 法による核 DNA 断片化の検出

N1141 菌株、 $\Delta$ T3SS 株、 $\Delta$ RHIF 株、 $\Delta$ RHIFC 株を 1-1-5-4) の条件でイネ培養細胞に接種した。12 時間後のイネ培養細胞 1 ml を 24 穴プレートに回収し、4%パラ

フォルムアルデヒド/PBSで一晩固定した。PBSで3回程洗浄し、Proteinase K(10 µg/ml)を加え、スパチュラで細胞液をよくほぐした後、37°Cで30分間酵素処理を行った。処理後、PBSで3回程洗浄し、96穴マイクロプレートへ底が隠れる程度の細胞を移した後、室温で20分ほど完全に乾かないように風乾した。その後、TUNEL反応液(Roche)40 µlを加え、37°C、遮光下で1時間静置した。PBSで3回程洗浄後、10分ほど完全に乾かないように風乾し、DAPI solution (DOJINDO)を50 µl加えた。室温で2時間静置後、細胞液をスライドガラスに適量(約20 µl)のせ、カバーガラスをかけて共焦点顕微鏡(FV1000-D、OLYMPUS)で観察した。

### 3) ETI 関連遺伝子の発現量解析

N1141 菌株、NΔT3SS 株、NΔRHIF 株、NΔRHIFC 株を接種して6時間後のイネ培養細胞から、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてTotal RNAを抽出した。RNA濃度は260 nmの吸光度をNano dropで測定することで算出した。Total RNAを10 ng/µlに調整し、Go Taq 1-Step RT-qPCR System (Promega)と、Opticon Monitor ver.3 (BIO-RAD)を用いてReal time RT-PCRの解析を行った。発現量の解析を行った遺伝子は、イネのETI関連遺伝子である*OsNAC4*と*PAL*遺伝子である。各遺伝子の発現量解析は以下に示したプライマーを用いた。また、内部標準としては*actin1*遺伝子を用いた。

#### <Real time RT-PCR>

##### ・組成

2× GoTaq qPCR Master Mix	10 µl
Forward Primer (10 µM)	2 µl
Reverse Primer (10 µM)	2 µl
GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR	0.4 µl
RNA Template (10 ng)	1 µl
Nuclease-free water	4.6 µl
Total	20 µl

・ 反応条件

50°C	30 min	
95°C	5 min	
94°C	2 min	} 40 cycles
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	

\*Melting curve 65°C~90°C

・ *OsNAC4* 遺伝子発現確認用プライマー

OsNAC4-RT-F : 5'-TCCTGCCACCACCATTCTGAGATG-3'

OsNAC4-RT-R : 5'-TTGCAGAATCATGCTTGCCAG-3'

・ *PAL* 遺伝子発現確認用プライマー

PAL-RT-F : 5'-ACATCGGCAAGCTCATGTTC-3'

PAL-RT-R : 5'-CCCTTGAACCCGTAGTCCAA-3'

・ *actin1* 遺伝子発現確認用プライマー

actin-F : 5'-TCCATCTTGGCATCTCTCAG-3'

actin-R : 5'-TGGCTTAGCATTCTTGGGTC-3'

#### 4) イネ植物体の細胞死の検出

2週間生育させたイネの葉鞘を剃刀 (FEATHER) で約 100 μm にスライスした。葉片を 24 穴プレートに入れ、そこに 10<sup>9</sup> cfu/ml に調製した N1141 菌株、NΔT3SS 株、NΔRHIF 株、NΔRHIFC 株の菌液を 800 μl 接種した。30°C で 6 時間静置した後、菌液を除き、0.1% エバンスブルーを用いて遮光下で 15 分染色した。滅菌水で 5 回洗浄した後、スライドガラスに乗せて顕微鏡で観察し、死細胞数を測定した。

#### 5) イネプロトプラストの調製

植継ぎ 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。細胞の入ったシャーレに Millex-GS Filter Unit 0.22 μm (MILLIPORE) でろ過した Enzyme solution (1.0% [w/v] cellulase Onozuka RS [Yakult], 0.5% [w/v] Macerozyme R10 [Yakult], 0.1% [w/v] Pectolyase Y23 [Kyowa Chemical Products], 0.6 M Mannitol, 5 mM MES- KOH [pH 5.7], 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% [w/v] BSA) を加えて遮光し、30°C で 3 時間酵素反応を行った。この時、酵素反応が 2 時間経過した時に、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 5 分間遠

心分離を行った。上清を除去した後、KMC Solution (117 mM KCl, 82 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM MES-KOH [pH 5.7]) を 3 ml 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 5 分間、遠心分離を行うという操作を 2 回行った。2 回の遠心分離が終わった後、上清を除去し、MMg Solution (0.3 M Mannitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM MES-KOH [pH 5.7]) 1 ml を加え、先切りチップを用いて沈殿を懸濁した。この懸濁液の一部を用いて作製した 5 倍希釈溶液 20 μl を血球計算版 (THOMA) にのせ、細胞数をカウントした。イネプロトプラストを MMg Solution を用いて 1.0×10<sup>6</sup> cells/ml に調製し、遺伝子導入実験に用いた。

#### 6) PEG 法によるイネプロトプラストへのベクターの導入

回収したイネプロトプラスト 200 μl (2.0×10<sup>5</sup> cells) に *β-glucuronidase (GUS)/pBI221* (大坪, 2016)、*OsNAC4/pBI221* (大坪, 2016)、*NRHIF/pBI221* (中村, 2017)、*Venus/pBI221* (神村, 2014) をそれぞれ 2 μg 加え、そこに PEG Solution 210 μl (40% PEG 4000 [Fluka])、0.2 M Mannitol, 0.1 M CaCl<sub>2</sub>) を加えて先切りチップを用いて混合し、室温で 30 分間静置した。静置後、KMC solution 800 μl を加えて緩やかに転倒混和し、室温、200×g で 5 分間遠心分離を行った。上清を除き、KMC Solution 500 μl を加え、先切りチップを用いて沈殿を懸濁し、遮光して 30°C で静置した。

#### 7) プロトプラストの細胞死の検出

導入から 12 時間後のイネプロトプラスト 20 μl と 1% エバンスブルー染色液 1.0 μl をチューブ内で混合し、遮光して 5 分間静置した。その後、全量をプレパラートに滴下し、蛍光顕微鏡 Axioskop2 plus を用いて全細胞数と死細胞数をカウントした。

#### 8) パーティクルボンバードメント法によるイネ培養細胞への遺伝子導入

イネ培養細胞をシャーレに移して培地を除去し、20 ml の R2O 液体培地 (39.6 mM KNO<sub>3</sub>, 2.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 20.1 μM EDTA · 2Na, 19.8 μM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 6.6 μM MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 7.7 μM ZnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.5 μM CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 48.5 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.6 μM NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1% [w/v] Murashige and Skoog Vitamin powder [Sigma-Aldrich], 18 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3% [w/v] Sucrose, 3% [w/v] Mannitol, 3% [w/v] Sorbitol) を加えて培養細胞を懸濁した。先切りチップを用いて 1 ml の細胞懸濁液を取り、7 mm 径のろ紙の中央に細胞が重ならないように広げた。このろ紙を R2O 寒天培地 (1% Agar) プレートに乗せ、30°C、3 時間、遮光下で静置した。次に、分注した金粒子 50 μl に *NRHIF/pBI221* 5 μg、*DsRed/pAHC17*

(大坪, 2016) 5  $\mu\text{g}$ 、2.5 M  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{l}$ 、0.1 M Spermidine 20  $\mu\text{l}$  を加えて 3 分間攪拌し、10,000 $\times g$  で 10 秒間遠心分離して上清を除去し、99.5%エタノール (HPLC グレード) 250  $\mu\text{l}$  で懸濁した。同条件で再度遠心分離し上清を除去し、99.5%エタノール 50  $\mu\text{l}$  を加えて懸濁した。Macro carrier を Macro carrier holder にセットし、上記で調製した溶液をよく懸濁し Macro carrier の中央に 10  $\mu\text{l}$  滴下した。乾燥させた後、パーティクルガン Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad) 内に、1,100 psi の Rupture disk、Stopping screen と共にセットし、プラスミドを付着させた金粒子を減圧装置とヘリウムガスの圧力を利用して、イネ培養細胞に打ち込むことにより目的遺伝子を導入した。導入後、R2S 液体培地 1 ml にイネ培養細胞を移し、これを 30°C、108 rpm 遮光下で 12 時間培養した。

### 1-1-8 *A. avenae* のイネおよびシコクビエ植物体への接種

#### 1) 菌体の接種と病徴の観察

二週間生育させたイネまたはシコクビエに、 $1.0 \times 10^6$  cfu/ml に調製した N1141 菌株、N $\Delta$ T3SS 株、N $\Delta$ RHIF 株、N $\Delta$ RHIFC 株の懸濁液 1.0  $\mu\text{l}$  を 22G の針の先端にのせ、イネの植物体の地上部 2 cm の部分に針接種した。接種後 4 日目まで 1 日ごとに病徴の長さを測定した。

#### 2) 菌体数の測定

各菌株を接種後 4 日目のイネ植物体の接種部位から下 2.0 cm、上 8.0 cm の全長 10 cm の長さの部位を切り取った。各切片を 1%次亜塩素酸ナトリウム、70%エタノール、滅菌水①、滅菌水②の順に浸漬することで表面殺菌を行った。イネの葉を切り刻み、滅菌水 1 ml を加え、乳鉢で細くなるまですり潰し、さらに滅菌水を 5 ml 加えた。懸濁液 1 ml を 1,000 倍希釈、10,000 倍希釈、100,000 倍希釈し PF 固体培地に各 3 枚ずつプレーティングした。30°C で 2 日間培養した後、コロニーをカウントすることで植物体内の菌体数を推定した。

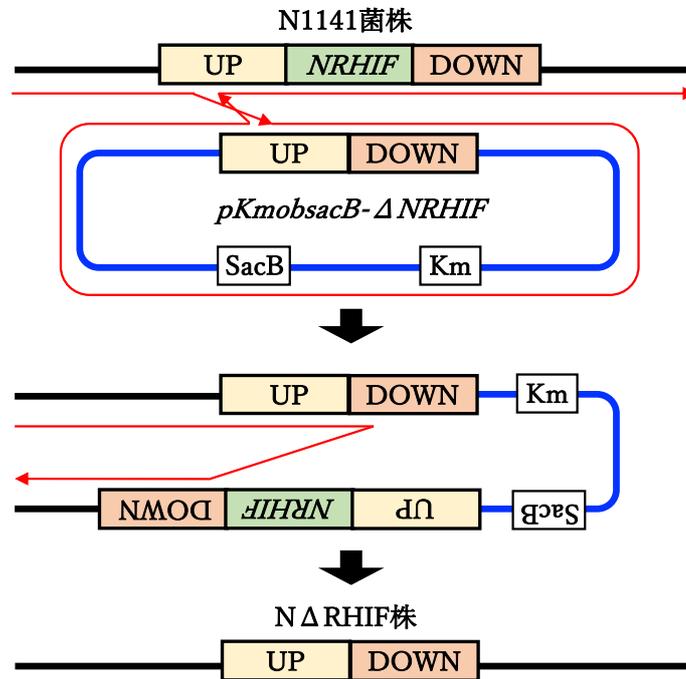


Fig. B 2回の相同組換えによる遺伝子欠損株の作製方法

N1141 菌株に *NRHIF* の上流 944 bp と下流 905 bp を結合させた *pKmobsacB-ΔNRHIF* を導入し、kanamycin 耐性を指標に赤色の矢印のような 1 回目の相同組換えが起こった菌株を選抜する。kanamycin 耐性 N1141 菌株に対してさらにスクロース選抜を行うことで、赤色の矢印のような 2 回目の相同組換えが起こった  $N\Delta RHIF$  株が作製できる。

## 1-2 結果

### 1-2-1 イネ過敏感細胞死を指標とした ETI 誘導能欠損株のスクリーニング系の確立

N1141 菌株のイネ ETI を誘導するエフェクタータンパク質を同定するため、N1141 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーから、過敏感細胞死誘導能を欠損した変異株を選抜することにした。これまでに、N1141 菌株などの過敏感細胞死誘導能を検出する系としては、100 ml 三角フラスコに分注したイネ培養細胞 22 ml に  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml になるように菌体を接種し、エバンスブルー染色で経時的に死細胞を検出するアッセイ系が既に構築されている (近藤, 2012)。しかし、このアッセイ系では多量のトランスポゾン挿入変異株をハイスループットでスクリーニングするには困難が予想される。そこで、イネ過敏感細胞死誘導能を指標とした新たなハイスループットスクリーニング系を構築することにした。

ハイスループットスクリーニング系の条件としては、野生型 N1141 株と NΔT3SS 株を接種したイネ培養細胞で明確な細胞死の差が認められることであり、かつ大量の菌体をスクリーニングできることであるため、既存のアッセイ系をスケールダウンして 96 穴プレートでアッセイできる系の構築を検討した。まず、96 穴プレートに分注したイネ培養細胞 150  $\mu$ l に、 $1.0 \times 10^{10}$  cfu/ml ( $OD_{620}$  = 約 1.57)、 $5.0 \times 10^9$  cfu/ml ( $OD_{620}$  = 約 1.30)、 $2.0 \times 10^9$  cfu/ml ( $OD_{620}$  = 約 0.80)、 $1.0 \times 10^9$  cfu/ml ( $OD_{620}$  = 約 0.40)、 $5.0 \times 10^8$  cfu/ml ( $OD_{620}$  = 約 0.16)、 $2.5 \times 10^8$  cfu/ml ( $OD_{620}$  = 約 0.09)、 $1.0 \times 10^8$  cfu/ml ( $OD_{620}$  = 約 0.04) の 7 種類の濃度に調製した N1141 菌株および NΔT3SS 株をそれぞれ 2  $\mu$ l 接種し、30°C、連続光下で 9 時間培養した。培養後、培養細胞懸濁液から培地を取り除き、滅菌蒸留水を用いて培養細胞の洗浄を 3 回行った。そこに 0.05% エバンスブルー染色液を 200  $\mu$ l 加え、遮光して 15 分間静置した。染色後、染色液を取り除き、滅菌水で培養細胞を 3 回洗浄し、エバンスブルー脱色液 200  $\mu$ l を加えて一晩静置し、エバンスブルー色素の抽出を行った。脱色液の 595 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーによって測定した結果、 $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上の N1141 株を接種したイネ培養細胞 (終濃度  $2 \times 10^6$  cfu/150  $\mu$ l) では、同濃度の NΔT3SS 株を接種したイネ培養細胞に比べて有意な死細胞の増加が認められた (Fig. 1)。

このスクリーニング方では、多数の変異株を効率よく培養する必要がある。そこで次に、スクリーニングに用いる N1141 トランスポゾン挿入変異株の培養と、濃度の調整法について検討した。96 穴プレートに冷凍保存されているトランスポゾン挿入変異株を、96 穴ピンツールを用いて一部を掻きとり、LB 液体培地を 100  $\mu$ l ずつ分注さ

れた 96 穴プレートに植菌し、200 rpm、30°C の条件下で 3~4 日間振盪培養を行った。培養後、マイクロプレートリーダーを用いてそれぞれのトランスポゾン挿入変異株の OD<sub>620</sub> の値を測定した。その結果、変異株によって生育速度が異なることが示され、特に  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上の菌懸濁液の OD<sub>620</sub> はマイクロプレートリーダーの検出限界値を超えることから正確な菌体数を推定できないことがわかった。そこで、マイクロプレートリーダーによる濃度の測定が可能であり、N1141 株と NΔT3SS 株を接種したイネ培養細胞で明確な細胞死の差が認められる濃度として  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml~ $2.0 \times 10^9$  cfu/ml (OD<sub>620</sub>=約 0.40~0.80) の範囲内に全てのウェルが入るように培養時間を調整し、その後希釈を行うことでスクリーニングに用いることにした。構築したスクリーニング系の模式図を Fig. 2 に示す。

### 1-2-2 ETI 誘導能を欠損した N1141 トランスポゾン挿入変異株の選抜

イネの ETI を誘導するエフェクタータンパク質を同定するために、N1141 菌株のトランスポゾン挿入変異株ライブラリーから、上記で構築したハイスループットスクリーニング系を用いてイネの過敏感細胞死誘導能を欠損した菌株を選抜した。 $1.0 \times 10^9$  cfu/ml~ $2.0 \times 10^9$  cfu/ml (OD<sub>620</sub>=約 0.40~0.80) に調整した 6,200 株を 2 μl ずつイネ培養細胞 150 μl に接種し、9 時間後にエバンスブルー染色を行い、抽出液の 595 nm の吸光度を測定することで死細胞を測定した。その結果、N1141 菌株を接種したイネ培養細胞で認められる細胞死にくらべ 50%以下の細胞死しか誘導しない株が 17 株存在した。そこで、これら 17 株について RATE-PCR によりトランスポゾン挿入領域の配列解析を行ったところ、17 株はそれぞれ *NT1*、*NT2*、*NT3*、*NT4*、*NT5* と名付けた 5 つの遺伝子のいずれか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。5 つの遺伝子のうち、*NT1*、*NT2*、*NT3* は *Hrp* 遺伝子群に存在する *HrpX*、*HrpD5*、*HrcU* をコードしていた。また、*NT4* はプロトンチャネル関連タンパク質をコードしていることも明らかになり、*NT1*、*NT2*、*NT3*、*NT4* は T3SS に関連したタンパク質をコードする遺伝子だった。このことから、これら変異株はエフェクタータンパク質を分泌できなくなったことで過敏感細胞死誘導能を失ったと考えられるので、エフェクター候補から除外した。残りの *NT5* を配列解析した結果、*NT5* は 350 アミノ酸で構成されており、中央部分に p-loop NTPase ドメインを持つ機能不明のタンパク質をコードしていることが示された (Fig. 3A)。

### 1-2-3 エフェクター候補タンパク質 NT5 のイネ細胞内への輸送

NT5 が *A. avenae* N1141 菌株のエフェクタータンパク質であるなら、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。そこでまず、EffectiveT3 を用いて NT5 の T3SS からの分泌予測を行った。その結果、NT5 の T3 スコアは 0.999998249001828 となり、最大値である 1 に非常に近いことから、NT5 は T3SS から分泌される可能性が高いと予想された。

そこで、実際に NT5 が感染時にイネ細胞内に輸送されているかどうかを、カルモジュリン存在下で活性化される CyaA を利用して確認した。NT5 と CyaA の融合タンパク質が細菌から植物細胞内に分泌されると、植物細胞内に存在するカルモジュリンによって活性化され、CyaA が ATP を cAMP に変換する。細菌にはカルモジュリンが存在しないため、感染後の植物細胞内における cAMP の蓄積量を測定することで NT5 が植物細胞内に輸送されたかどうかを確認できる。NT5 と CyaA の融合タンパク質を発現させるベクター *pBBR1TP-flapro-NT5-CyaA* を保持する N1141 菌株 (NT5-CyaA/N1141) および  $\Delta$ T3SS 株 (NT5-CyaA/ $\Delta$ T3SS) をイネ培養細胞に接種し、12 時間後の cAMP 量を Cyclic AMPEIA Kit を用いて測定した。その結果、NT5-CyaA/N1141 を接種したイネ培養細胞では NT5-CyaA/ $\Delta$ T3SS と比較して約 18 倍の cAMP が蓄積していたことから (Fig. 3B)、NT5-CyaA は N1141 菌株の T3SS を介してイネ細胞内へ分泌されていることが明らかになった。したがって、NT5 がエフェクターである可能性が高いと考え、この NT5 を N1141 rice HR cell death-inducing factor (NRHIF) と名付けた。

### 1-2-4 NRHIF によるイネの ETI 誘導

#### 1) $\Delta$ NRHIF 株および $\Delta$ NRHIFC 株によるイネ ETI 誘導

今回選抜してきたトランスポゾン挿入変異株では *NRHIF* 遺伝子以外の領域にトランスポゾンが挿入されている可能性も存在する。そこで、*NRHIF* 遺伝子が真の ETI エフェクターをコードしているかを調べるために、相同組換えにより *NRHIF* 遺伝子を N1141 菌株のゲノムから取り除いた欠損株 ( $\Delta$ NRHIF 株) およびその遺伝子を相補した株 ( $\Delta$ NRHIFC) を作製した。N1141 菌株、 $\Delta$ T3SS 株、 $\Delta$ NRHIF 株、 $\Delta$ NRHIFC 株をイネ培養細胞に接種し、接種後 0、3、6、9、12 時間におけるイネ培養細胞の細胞死をエバンスブルー染色で検出した。その結果、N1141 菌株を接種した細胞では、接種前 (0 時間後) の時点で約 0.1 だった 595 nm の吸光度が接種 9 時間後には 0.30、12

時間後には 0.89 まで上昇し、細胞死が誘導されていた (Fig. 4A)。一方、 $\Delta T3SS$  を接種した細胞では 595 nm の吸光度が約 0.1 でほぼ一定であり、細胞死はほとんど誘導されなかった。 $\Delta RHIF$  株を接種した細胞では、接種 6 時間後まで  $\Delta T3SS$  を接種したイネ培養細胞と同程度の細胞死しか検出されず、接種 12 時間後でも 595 nm の吸光度が 0.25 と低い値を示した。このような  $\Delta RHIF$  におけるイネ細胞誘導能の欠損は  $\Delta RHIF$  を再導入した  $\Delta RHIFC$  株では認められず、 $\Delta RHIFC$  株を接種したイネ培養細胞では、接種 12 時間後に N1141 菌株と同等の細胞死が誘導された。これらのことから、 $\Delta RHIF$  株はイネ培養細胞の細胞死誘導能を失っており、これは  $\Delta RHIF$  遺伝子の導入によって相補されることが明らかになった。

また、 $\Delta RHIF$  株がイネ植物体に対する細胞死誘導能も欠損しているかを確認するため、各菌株をイネ葉鞘切片に接種し、6 時間後にエバンスブルーで染色することで死細胞数を測定した。その結果、N1141 菌株を接種したイネ切片における死細胞の割合は 68% であるのに対し、 $\Delta T3SS$  株では 6%、 $\Delta RHIF$  株では 3%、 $\Delta RHIFC$  株では 65% であった (Fig. 4B, C)。したがって、イネ培養細胞の場合と同様に、 $\Delta RHIF$  株はイネ植物体に対する細胞死誘導能も失っていた。

次に、イネ過敏感細胞死に付随して認められる核 DNA の断片化についても調べた。各菌株を接種して 9 時間後のイネ培養細胞に対し、DNA の断片化により生じる 3'-OH 末端にフルオレセイン-dUTP を標識する TUNEL 染色を行った。その結果、DAPI で染色された核のうち DNA の断片化を表す FITC 蛍光を示す核の割合は、野生型 N1141 菌株を接種した場合で約 8.7% だったのに対し、 $\Delta T3SS$  株を接種した場合は 2.4%、 $\Delta RHIF$  株では 2.1%、 $\Delta RHIFC$  株では 8.6% であった (Fig. 5A)。 $\Delta RHIF$  株で有意に TUNEL によって染色された核の割合が減少していたことから、 $\Delta RHIF$  株はイネの過敏感細胞死誘導能を失っていることが明らかになった。

次に、ETI のもう一つの指標である ETI 関連遺伝子の発現誘導について調べた。イネの ETI 関連遺伝子であり、イネの ETI 誘導時に発現量が増加することが明らかになっている *OsNAC4* 遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR で調べたところ、N1141 菌株および  $\Delta RHIFC$  株を接種したイネ培養細胞では、接種 6 時間後に接種前と比べて *OsNAC4* の発現量が 100 倍以上になるのに対し、 $\Delta T3SS$  株や  $\Delta RHIF$  株を接種したイネ培養細胞では 20 倍以下だった (Fig. 5B)。さらに、他の ETI 関連遺伝子である *OsPAL* についてもその発現量を調べたところ、N1141 菌株および  $\Delta RHIFC$  株を接種したイネ培養細胞では接種 6 時間後に発現量が約 30 倍になるのに対し、 $\Delta RHIF$  株を接種したイネ培養細胞では約 15 倍であり、 $\Delta T3SS$  株を接種した場合はほとんど発現量が上昇していなかった (Fig. 5C)。これらの結果から、 $\Delta RHIF$  は過敏感細

胞死や ETI 関連遺伝子の発現誘導を引き起こせなくなっており、これは *NRHIF* 遺伝子の再導入によって相補されることが示された。

## 2) *NRHIF* 遺伝子を発現させたイネ細胞の過敏感細胞死

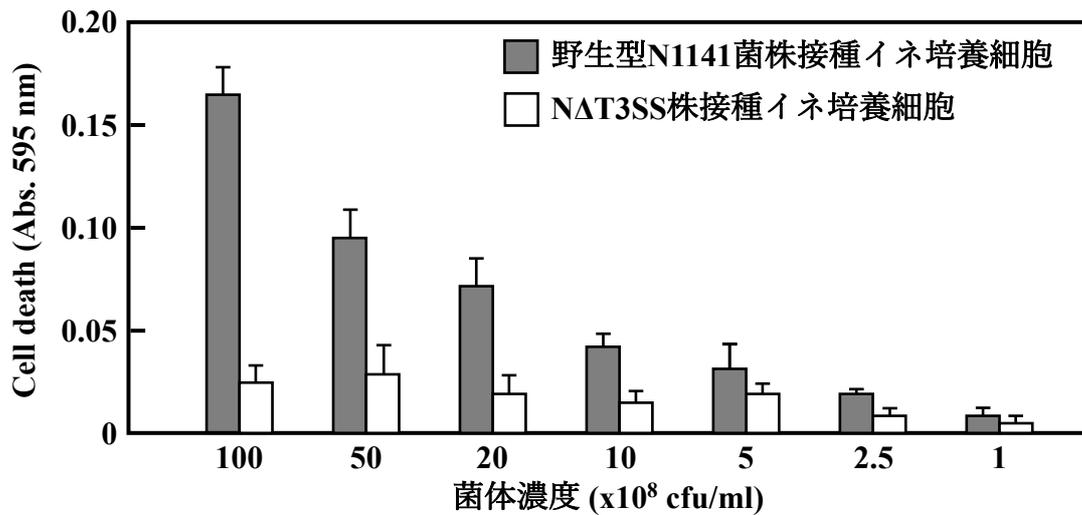
*NRHIF* が輸送されたイネ細胞内で過敏感細胞死誘導を引き起こす ETI エフェクターとして機能しているのかを明らかにするため、*NRHIF* をイネ細胞内で発現させ、過敏感細胞死が誘導されるか調べた。イネ細胞内で一過的に *NRHIF* を発現させる *NRHIF/pBI221* を PEG 法でイネプロトプラストに導入し、12 時間後の死細胞をエバンスブルーで検出した。生細胞と死細胞を実験ごとに合計 1,000 個以上カウントした結果、コントロールである *GUS* を発現したイネプロトプラストにおける死細胞の割合が 32%に対し、*NRHIF* を発現したイネプロトプラストでは 89%であり、約 3 倍の細胞死が誘導された (Fig. 6A)。

次に、*NRHIF* を発現した細胞で認められた細胞死が過敏感細胞死かどうかを確認するため、核 DNA の断片化について調べた。*NRHIF/pBI221*、*OsNAC4/pBI221*、*GUS/pBI221* をそれぞれイネ培養細胞にパーティクルボンバードメント法により導入した。この時、*DsRed/pAHC17* ベクターも同時に導入し、遺伝子が導入された細胞は DsRed 由来の蛍光が観察されるようにした。遺伝子導入から 12 時間後の細胞を TUNEL 染色し、FITC 由来の蛍光を共焦点顕微鏡で観察した結果、*GUS/pBI221* を導入したイネ培養細胞では DsRed 由来の蛍光と FITC 由来の蛍光を核に持つ細胞は認められなかった (Fig. 6B)。一方、*NRHIF/pBI221* および *OsNAC4/pBI221* を導入したイネ培養細胞では DsRed と FITC 由来の蛍光を核に持つ細胞が観察された。このことから、*NRHIF* をイネ細胞内で発現させると、核 DNA の断片化が誘導されることが示され、*NRHIF* を過剰発現することで認められるイネ細胞死は、過敏感細胞死であることが明らかになった。これらの結果から、*NRHIF* はイネの ETI を誘導する ETI エフェクターであると結論づけた。

### 1-2-5 *NΔRHIF* 株および *NΔRHIFC* 株のイネやシコクビエに対する病原性

N1141 菌株の病原性に *NRHIF* が関与するのかどうか調べるため、*NΔRHIF* 株を非宿主であるイネまたは宿主であるシコクビエに針接種した。*NΔRHIF* 株を非宿主であるイネに接種し 4 日後に病徴を観察したところ、N1141 株を接種した場合と同じく病徴の広がりには認められなかった (Fig. 7A)。一方、この時の植物体内に存在する菌体を数えたところ、N1141 株を接種した場合と比較して *NΔRHIF* 株を接種した場合は有

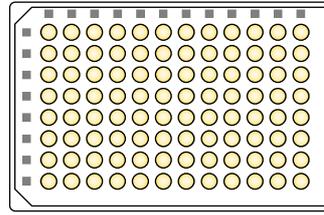
意に増加していた (Fig. 7B)。また、宿主であるシコクビエに  $\Delta$ RHIF 株を接種した場合、N1141 株を接種した場合に比べ病徴が縮小しており、さらに菌体数も有意に減少していた (Fig. 8A, B, C)。このことから、NRHIF は非宿主であるイネに対して免疫反応誘導因子として機能し、宿主であるシコクビエに対しては増殖因子として機能することが明らかになった。



**Fig. 1** 各濃度のN1141菌株によるイネの過敏感細胞死誘導

96穴プレートに分注したイネ培養細胞に各濃度の野生型N1141菌株およびNAT3SS株を接種し、9時間後にエバンスブルー染色を行った。その後、脱色液を加えエバンスブルー色素を抽出し、595 nmの吸光度を測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。

96穴マイクロプレート



+ イネ培養細胞 150  $\mu$ l

+ N1141トランスポゾン挿入変異株 2  $\mu$ l

震盪培養 9 h 30°C

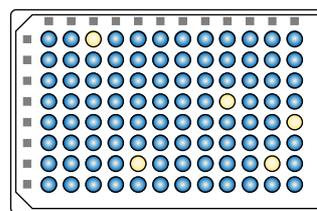
R2S培地を除く

+ 0.05%エバンスブルー染色液 200  $\mu$ l

静置 15 min

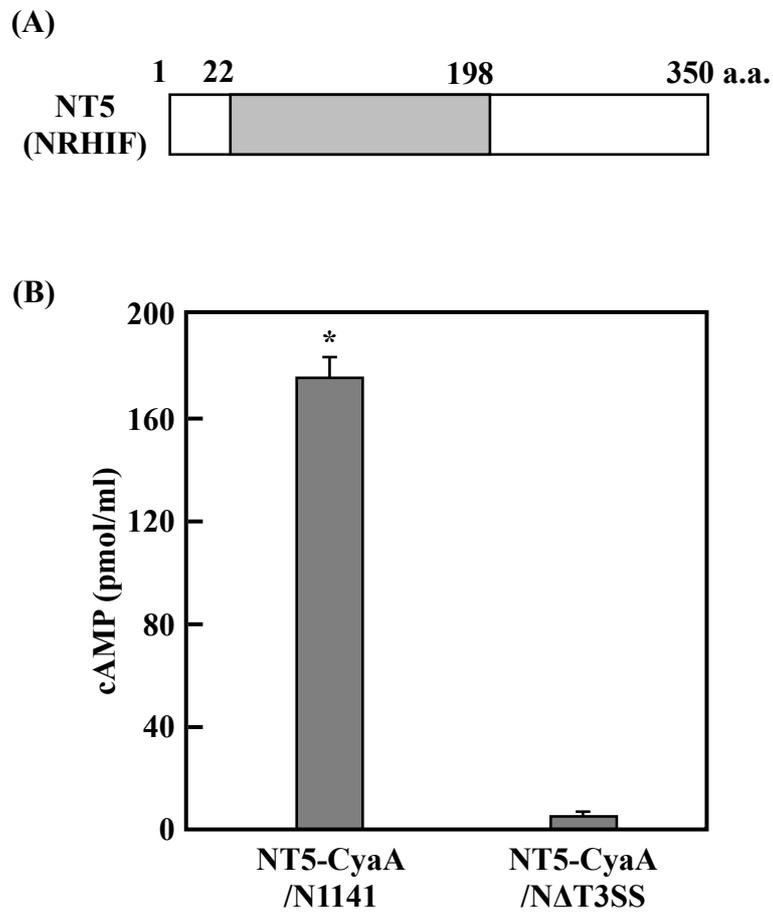
エバンスブルーを除く

+ 脱色液 200  $\mu$ l

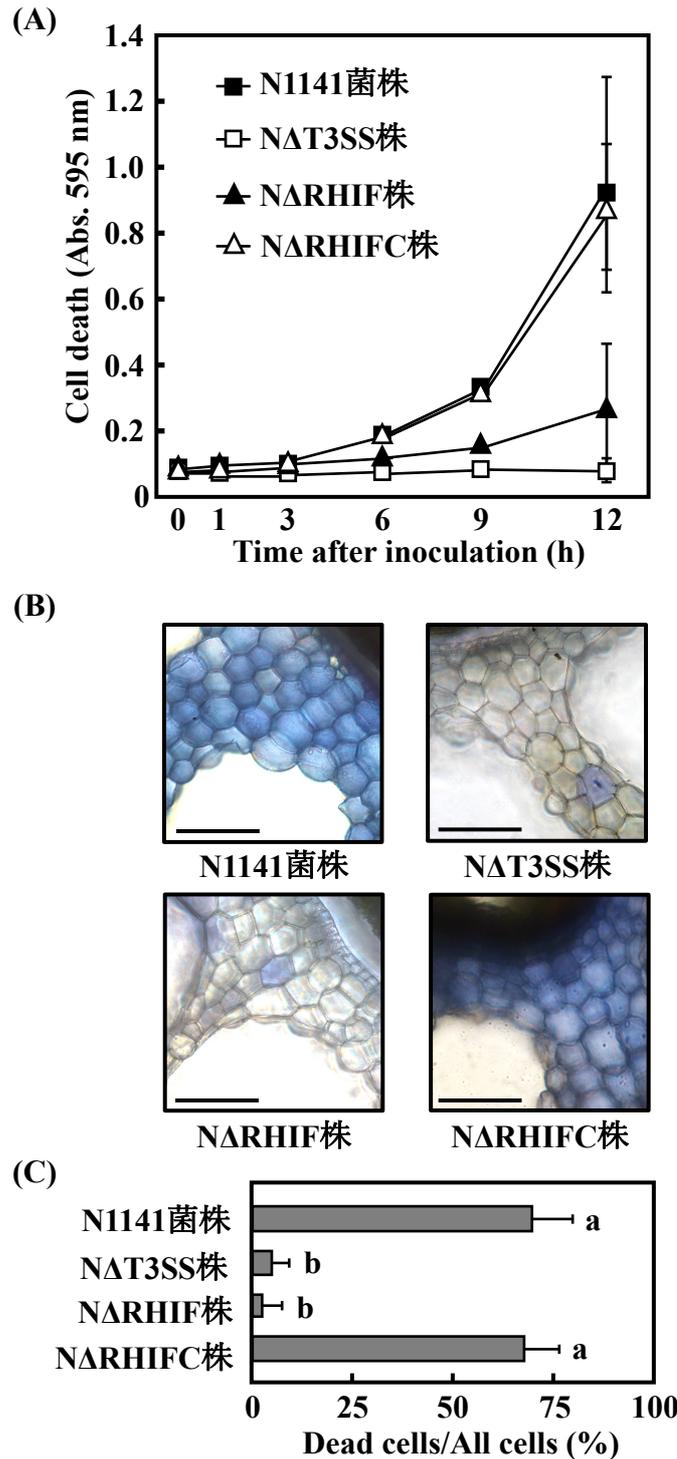


595 nmの吸光度を測定

Fig. 2 イネ過敏感細胞死を指標としたN1141トランスポゾン挿入変異株ライブラリのハイスループットスクリーニングの手順

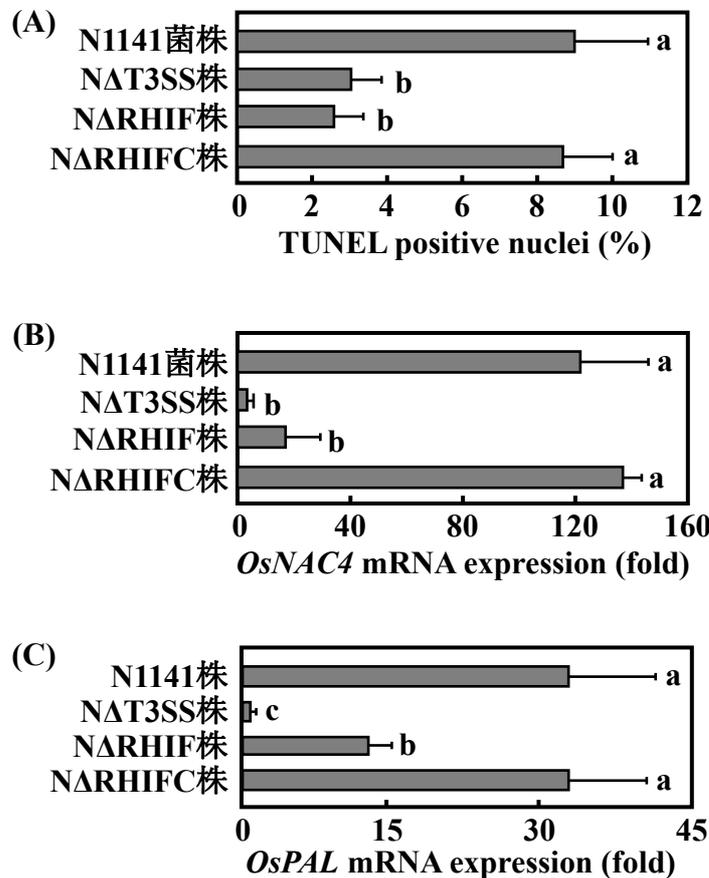


**Fig. 3** エフェクター候補タンパク質NT5 (NRHIF) の構造とイネ細胞内への輸送  
 (A) NT5の構造の模式図を示す。グレーボックスはp-loop NTPaseドメインと推定される部分を示した。(B) NT5とCyaAの融合タンパク質を発現するN1141菌株およびNΔT3SS株をイネ培養細胞に接種し、12時間後のcAMP量を測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。アスタリスクは有意差を示す (t検定、 $p < 0.05$ )。



**Fig. 4** NΔRHIF株およびNΔRHIFC株を接種したイネで認められる細胞死

(A) 各菌株を $1.0 \times 10^8$  cfu/mlになるようにイネ培養細胞に接種し、0、3、6、9、12時間後の死細胞をエバンスブルーで検出した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。(B) 各菌株をイネ葉鞘切片に接種し、6時間後の死細胞をエバンスブルーで染色した。(Bar = 100  $\mu$ m) (C) イネ葉鞘切片の画像から生細胞数と死細胞数をカウントし、その割合を算出した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

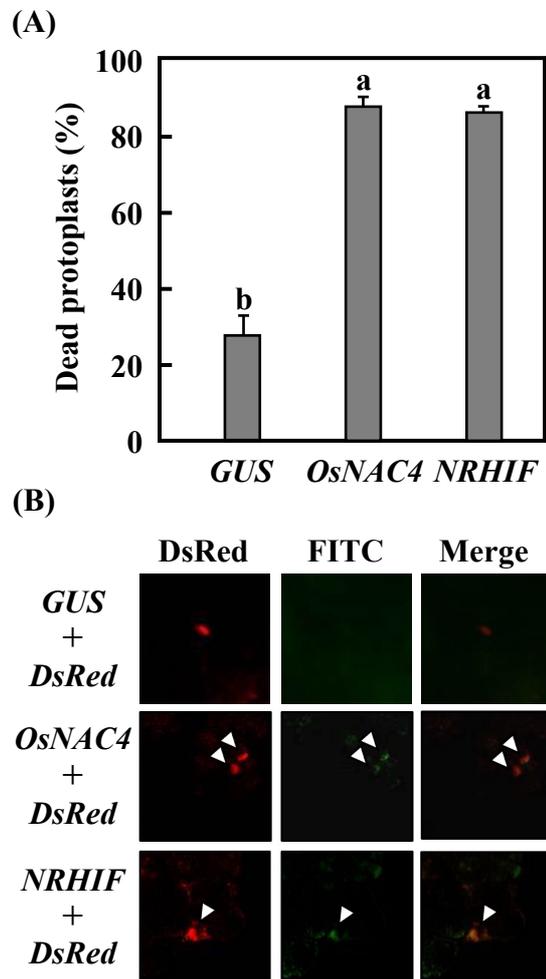


**Fig. 5** NΔRHIF株およびNΔRHIFC株を接種したイネのETI反応

(A) 各菌株を接種して9時間後のイネ培養細胞をTUNEL染色し、FITC蛍光を示した核の割合を示す。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれら間に有意な差存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

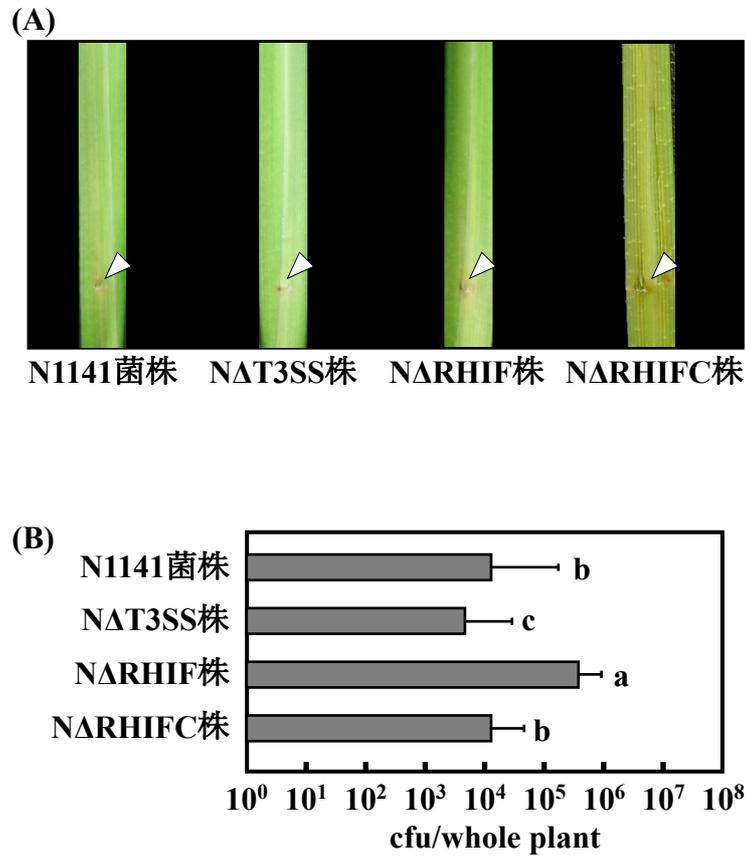
(B) 各菌株を接種して6時間後のイネ培養細胞における*OsNAC4*遺伝子の発現量をReal time RT-PCRで解析した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれら間に有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

(C) 各菌株を接種して6時間後のイネ培養細胞における*OsPAL*遺伝子の発現量をReal time RT-PCRで解析した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、b、cの表記はこれら間に有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。



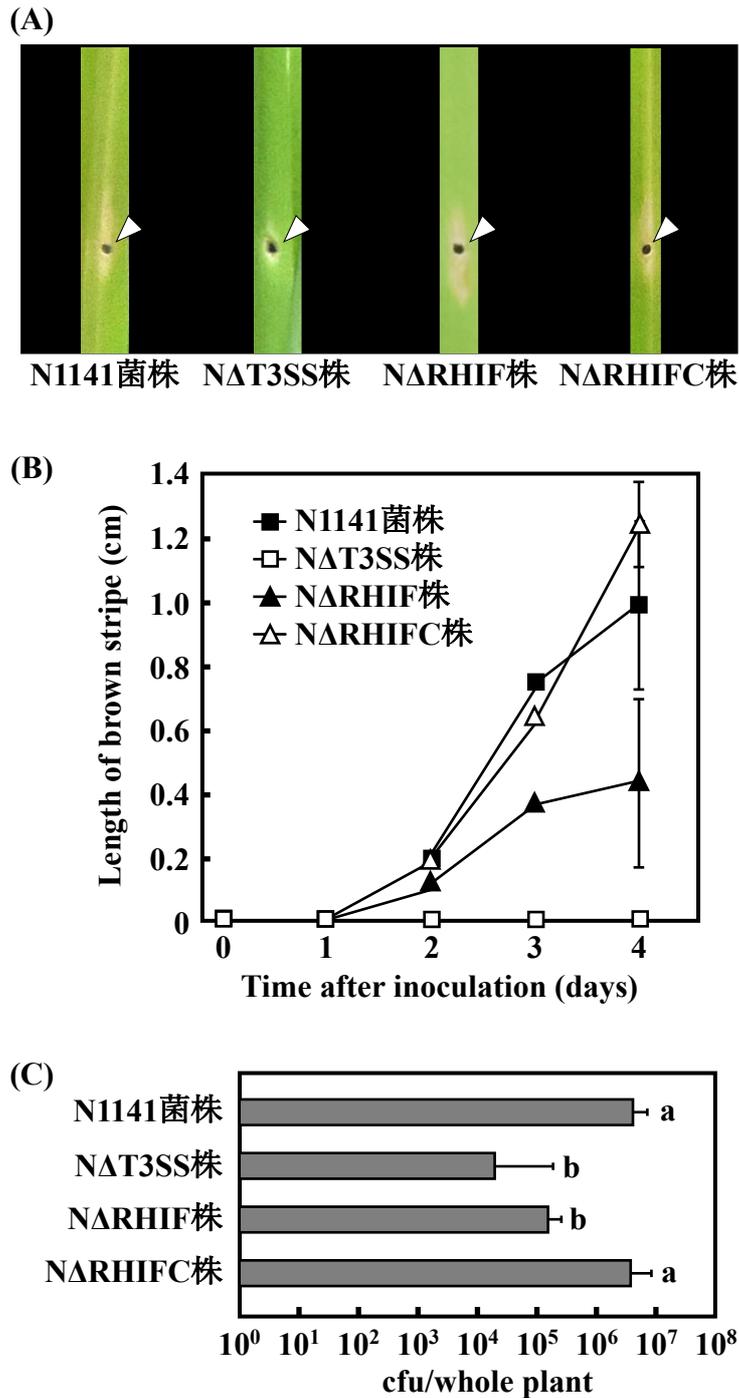
**Fig. 6** *NRHIF*遺伝子を導入したイネにおける過敏感細胞死

(A) 各遺伝子をイネプロトプラストにPEG法で導入し、導入後12時間目のイネプロトプラストをエバンスブルーにより染色した。全細胞数とエバンスブルーにより染色された死細胞を合計1,000個以上カウントした。縦軸は、遺伝子が導入された細胞のうち死細胞の割合を示す。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す。(Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。 (B) *DsRed*遺伝子と各遺伝子をイネ培養細胞へ同時に導入し、12時間後にTUNEL染色を行った。細胞は共焦点顕微鏡で観察した。矢印はTUNELにより染色された核を示す。



**Fig. 7 NARHIF株およびNARHIFC株のイネに対する病原性**

(A)  $1.0 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ lに調製した各菌の懸濁液1.0  $\mu$ lをイネへ接種し、4日後に写真を撮影した。矢印は接種部位を表している。(B) 各菌株を接種後4日目に植物体内に存在する*A. avenae*の菌体数を測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、b、cの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。



**Fig. 8** NΔRHIF株およびNΔRHIFC株のシコクビエに対する病原性

(A)  $1.0 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ lに調製した各菌の懸濁液1.0  $\mu$ lをシコクビエへ接種し、4日後に写真を撮影した。矢印は接種部位を表している。(B) 各菌株を接種後4日目まで1日ごとに病徴の長さを測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。(C) 各菌株を接種後4日目に植物体内に存在する*A. avenae*の菌体数を測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれら間に有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

### 1-3 考察

N1141 菌株のトランスポゾン挿入変異株ライブラリーから、イネの過敏感細胞死誘導能を欠損した菌株を選抜した結果、*NT1*、*NT2*、*NT3*、*NT4*、*NT5* と名付けた 5 つの遺伝子のいずれかにトランスポゾンが挿入された菌株が、過敏感細胞死誘導能を失っていることが明らかになった。5 つの遺伝子のうち、*NT1*、*NT2*、*NT3* はそれぞれ *HrpX*、*HrpD5*、*HrcU* をコードしていた。N1141 菌株の *Hrp* 遺伝子群は 24 個の遺伝子で構成され、そのうち、T3SS を構成する *hrp conserved* (*hrc*) 遺伝子は 9 個、*hrp-associated* (*hpa*) 遺伝子は 4 個、転写調節に関わる遺伝子を含む *hrp* 遺伝子は 10 個、*lrp* 遺伝子は 1 個存在している (Kondo et al, 2012)。今回のスクリーニングで得られた *HrpX* と *HrpD5* は *hrp* 遺伝子に、*HrcU* は *hrc* 遺伝子に分類される。*Xanthomonas* 属細菌の *HrpX* は *hrc* 遺伝子の転写を活性化し、この転写産物によって T3SS が構成されることで、エフェクタータンパク質の分泌に貢献する (Wengelnik and Bonas, 1996)。*HrpD5* の機能については不明な部分が多いが、*X. oryzae* pv. *oryzicola* の *HrpD5* 欠損株は病原性と免疫反応誘導能を同時に失うことや、*HrpX* の発現を調節する可能性が報告されている (ZhongNan et al., 2018)。また、*HrcU* は、T3SS 自体を構成するタンパク質をコードすることが知られている。以上のことから、これら三つの遺伝子にトランスポゾンが挿入された N1141 菌株がイネの過敏感細胞死誘導能を欠損していたのは、T3SS が機能していないためであると考えられる。一方、*NT4* はプロトンチャネル関連タンパク質をコードしている。*NT4* が過敏感細胞死誘導能の欠損にどのように関与するのかは明らかではないが、エフェクタータンパク質を植物細胞内に T3SS を介して輸送するためにはプロトン駆動力 (PMF) を必要とすることが知られていることから (Ohgita, 2013)、*NT4* 遺伝子変異株では T3SS によるエフェクターの細胞内輸送に何らかの障害が生じている可能性が存在する。

NRHIF が T3SS から分泌されるかどうかを EffectiveT3 により予測したところ、T3 スコアが 0.999 以上となり、NRHIF が T3SS から分泌される可能性は高いことが示された。そこで、実際に NRHIF がイネ細胞内に輸送されているかどうかを、*CyaA* を利用して確認した結果、NRHIF は N1141 菌株の T3SS を介してイネ細胞内へ分泌されていることが証明された。*A. avenae* N1141 菌株の *HrpW* や *HrpY*、K1 菌株の *AKSF1* についても EffectiveT3 を用いた解析を行ったところ、これらタンパク質の T3 スコアは最大値の 1 やそれに近い数値を示したので、これらタンパク質の分泌について *CyaA* を用いた分泌確認を行ったところ、すべてのタンパク質が植物細胞内に輸送されていた (近藤, 2012; Kawaguchi et al., 2021)。これらの結果は、EffectiveT3 による分泌予測

は正確であり、EffectiveT3 を用いた *in silico* 解析は今後のエフェクターに関する研究において重要なツールになると思われる。

NRHIF を欠損させた  $\Delta$ NRHIF 株はイネの ETI を誘導できず、NRHIF 遺伝子を発現させたイネ細胞では過敏感細胞死が認められたことから、NRHIF は過敏感細胞死を含むイネの ETI を誘導するエフェクターであると結論付けた。過敏感細胞死は、病原体の持つ非病原性遺伝子 (*avr* 遺伝子) に植物の抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) が対応している場合に誘導される (Flor, 1971)。これは遺伝子対遺伝子説 (gene-for-gene theory) と呼ばれ、実際に、*P. syringae* の *avr* 遺伝子産物である *avrRpm1* とそれに対応するシロイヌナズナの *R* 遺伝子 *RPM1* などによって実証されている。*avrRpm1* をはじめとした *avr* 遺伝子は、多くの場合エフェクタータンパク質をコードしている (三村他, 2009)。ETI エフェクターをコードする NRHIF 遺伝子が *avr* 遺伝子とすると、今回の実験で用いた Oc 細胞や Kinmaze には NRHIF に対応する *R* 遺伝子が存在するはずである。様々なイネ品種の中から N1141 菌株を接種した時に ETI が誘導されない品種を探索し、ETI が誘導される品種を用いたマップベースドクローニングにより、NRHIF に対応する *R* 遺伝子を同定することが可能であろう。

*P. syringae* の *avrRpm1* はシロイヌナズナの過敏感細胞死を誘導するエフェクタータンパク質であるが、対応するシロイヌナズナの *R* 遺伝子産物である *RPM1* とは直接相互作用しない。*avrRpm1* はシロイヌナズナの細胞内に分泌されると、まず、標的としている *RPM1*-interacting protein 4 (*RIN4*) と結合し、これをリン酸化する。*R* 遺伝子である *RPM1* を有するシロイヌナズナでは、リン酸化された *RIN4* が *R* 遺伝子産物である *RPM1* により検出されることで過敏感細胞死が誘導される (Mackey et al., 2002)。このように、*R* 遺伝子産物が間接的に *avr* 遺伝子産物を認識するモデルはガード説と呼ばれている。NRHIF も *R* 遺伝子によって間接的に認識されているとすると、今後、NRHIF によるイネの ETI 誘導機構を明らかにするためには、NRHIF が標的とするイネタンパク質についても解析する必要があるだろう。

NRHIF の中央付近には p-loop NTPase と高い相同性を示すドメインが存在していた (Fig. 3A)。A box (P-loop) を含む NTPase ドメインは、細菌から真核生物まで広く保存され、プログラム細胞死、病気、免疫反応など多くの生理機能に関与することが知られており、特に、動物のアポトーシスとの関連性について多くの報告がある (Leipe et al, 2003; Leipe et al, 2004)。哺乳類の apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1)、ショウジョウバエの (Death-associated APAF1-related killer) DARK、線虫の cell death abnormal 4 (CED4) には Walker's A box (P-loop) と B box ( $Mg^{2+}$ -binding site) を含む Apoptotic ATPase (Ap-ATPase) ドメインが存在しており、アポトーシスの誘導におい

て重要な機能を有している (Koonin and Aravind, 2002)。これまでに発見された植物の *R* 遺伝子の大半を占める NLR タンパク質にも APAF1 と同じく Ap-ATPase ドメインが存在している (Jones et al., 2016; Urbach and Ausube, 2017; Arya and Acharya, 2018)。NRHIF は p-loop NTPase ドメインを持つことから、NRHIF 自体が NTPase として働くことで過敏感細胞死を直接誘導している可能性も考えられる。これを確かめるには、NRHIF が NTPase 活性を有するかどうか、また p-loop NTPase ドメインがイネの敏感細胞死の誘導に関与しているかどうかを調べることが重要になるだろう。

NRHIF を欠損した  $\Delta$ NRHIF 株を非宿主であるイネに針接種したところ、イネにおいては N1141 菌株を接種した場合と同じく病徴の広がりには認められなかったが、植物体内に存在する菌体数は N1141 株を接種した場合よりも  $\Delta$ NRHIF 株を接種した場合に有意に増加していた (Fig. 7A, B)。これは、ETI を誘導するエフェクタータンパク質である NRHIF を欠損することで、イネは ETI を誘導できず免疫が低下したためであると考えられる。しかし、 $\Delta$ NRHIF 株は ETI を誘導しないにも関わらず、イネに対し褐条病徴を形成しなかった。これは、*A. avenae* が引き起こすイネの褐条病斑は NRHIF とは別に褐条病斑形成因子によると仮定すると説明出来るであろう。すなわち、 $\Delta$ NRHIF 株は NRHIF を欠損することでイネ ETI を誘導しないため、イネ内での増殖が増加したが、N1141 菌株自体が褐条病斑形成因子を持たないため、病徴形成には変化がなかったと考えられる。実際、イネに対して病原性の *A. avenae* H8301 菌株をイネ培養細胞に接種すると細胞壁の軟化が引き起こされるが、N1141 菌株を高濃度で接種した場合、このような軟化は認められない (Che et al, 1999)。対照的に、 $\Delta$ NRHIF 株を宿主であるシコクビエに接種した場合、菌体数の減少と褐条病斑の減少が認められた (Fig. 8A, B, C)。このことは、NRHIF は宿主であるシコクビエにおいて増殖するために必要な因子であるとともに、病徴形成因子としても機能している可能性を示唆する。NRHIF はイネとシコクビエに対して異なる機能を示すのであろう。

## 第二章

### *A. avenae* K1 菌株由来のエフェクタータンパク質 KRHIF の同定

## 2-1 材料と方法

### 2-1-1 植物と細菌

本章では、実験材料としてイネ培養細胞（Oc 細胞： *O. sativa* L.C 5924）、イネ（*O. sativa* L. subsp. Kinmaze）、シコクビエ（*E. coracana*）、イネを宿主とする植物病原細菌 *A. avenae* K1 菌株（MAFF 301755）および T3SS 欠損 K1 菌株（KΔT3SS 株）を用いた（Kadota et al., 1996; Kondo et al., 2017）。イネ培養細胞の培養条件、植物体の栽培条件、細菌の保存条件は 1-1-1 に準ずる。

### 2-1-2 KRHIF の同定

*A. avenae* K1 菌株の全ゲノム配列に対して *NRHIF* 遺伝子配列を用いて相同性検索を行った。*NRHIF* 遺伝子と高い相同性を示した領域を *KRHIF* と名付け、*KRHIF* 遺伝子全長を増幅するようなプライマー（KRHIF-F、KRHIF-R）を設計し、K1 菌株の DNA をテンプレートに PCR を行った。PCR により増幅された DNA 増幅産物を、Exo-Star 処理後、KRHIF-F または KRHIF-R プライマーを用いて 1-1-4-3) の方法に従いサイクルシーケンス反応を行なった。得られたシーケンスのデータは GENETYX MAC ver. 15 ATSQ で解析し、KRHIF の DNA 配列およびアミノ酸配列を得た。

#### <PCR 反応液>

##### ・組成

2 × PCR buffer for KOD FX	5.0 μl
2 mM dNTPs	2.0 μl
Primer F (10 μM)	0.3 μl
Primer R (10 μM)	0.3 μl
Template (DNA 50 ng)	0.2 μl
KOD-FX (TOYOBO)	0.2 μl
滅菌水	1.0 μl
Total	10 μl

・反応条件

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

・ *KRHIF* 遺伝子増幅プライマー

KRHIF-F : 5'-ATGTCCAGTCCCTCTTCCCTGC-3'

KRHIF-R : 5'-GCCTGCACCCCGAGC-3'

### 2-1-3 ベクターの作製

#### 1) KRHIF-CyaA fusion ベクターの作製

KRHIF が K1 菌株の T3SS を介してイネ細胞内に分泌されているかどうかを調べるため、1-1-2-2) と同様の方法で、KRHIF と CyaA の融合タンパク質を *A. avenae* に発現させるベクターを作製した。5'末端側に *Hind* III サイトを付加した *KRHIF* 遺伝子を増幅する下記のプライマーセットを用いて K1 菌株の DNA をテンプレートに PCR を行った。Zero Blunt PCR Cloning kit を用いて PCR 産物を *pCR-Blunt* ベクターにライゲーションし、*pCR-Blunt-KRHIF-Hind* III を構築した。得られた *pCR-Blunt-KRHIF-Hind* III を *Hind* III で消化した後、QIAquickR Gel Extraction Kit を用いてゲルから DNA 断片を抽出した。この DNA 断片を *Hind* III 消化および CIAP 処理を行なった *pBBR1TP-flapro-CyaA* に Ligation-convenience Kit を用いてライゲーションすることで、*pBBR1TP-flapro-KRHIF-CyaA* を得た。

<PCR 反応液>

・ 組成

2 × PCR buffer for KOD FX	5.0 μl
2 mM dNTPs	2.0 μl
Primer F (10 μM)	0.3 μl
Primer R (10 μM)	0.3 μl
Template (DNA 50 ng)	0.2 μl
KOD-FX	0.2 μl
滅菌水	1.0 μl
<hr/>	
Total	10 μl

・ 反応条件

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

・ *KRHIF* 遺伝子増幅プライマー

HindIII -*KRHIF*-*cya*-F : 5'- AAGCTTATGTCCAGTCCCTCTTCCCTGC -3'

*KRHIF*-HindIII -*cya*-R : 5'- AAGCTTTGCCTGCACCCCGAGC -3'

<Ligation 反応>

・ 組成

10 × Ligation Buffer (ATP 含有)	1 μl
<i>pCR-Blunt</i> (12.5 ng)	0.5 μl
<i>KRHIF</i> 遺伝子増幅産物	1.2 μl
T4 DNA Ligase (10 U/μl)	1 μl
滅菌水	6.3 μl
<hr/>	
Total	10 μl

・ 反応条件

16°C     30 min

<Hind III 消化>

・ 組成

---

<i>Hind</i> III	1 $\mu$ l
M buffer	2 $\mu$ l
Vector (1 $\mu$ g)	10 $\mu$ l
滅菌水	7 $\mu$ l

---

Total	20 $\mu$ l
-------	------------

・ 反応条件

37°C Over night

90°C 15 min

<CIAP 処理>

・ 組成

---

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	1 $\mu$ l
10 $\times$ buffer	5 $\mu$ l
<i>Hind</i> III 消化 vector	20 $\mu$ l
滅菌水	24 $\mu$ l

---

Total	50 $\mu$ l
-------	------------

・ 反応条件

37°C 15 min

↓ +CIAP 1  $\mu$ l

50°C 15 min

75°C 10 min

## <Ligation 反応>

### ・ 組成

2 × Ligation mix	5 μl
<i>pBBR1TP-flapro-CyaA</i> (50 ng)	2.5 μl
DNA 断片 (20 ng)	2.5 μl
<hr/>	
Total	10 μl

### ・ 反応条件

16°C 5 min

## 2) *KRHIF* 遺伝子欠損株作製用ベクター *pKmobsacB-ΔKRHIF* の作製

*KRHIF* 遺伝子欠損株を作製するために、下記で示したような両端に *Xba*I サイトを付加したプライマーセット (*K1\_KRHIF\_up\_F*, *K1\_KRHIF\_down\_R*) を用いて *K1* 菌株のゲノムをテンプレートに *KRHIF* (1053 bp) を含む *KRHIF* の上流 (709 bp) から下流 (731 bp) までの 2,493 bp を PCR によって増幅させた。Zero Blunt PCR Cloning kit を用いて PCR 産物を *pCR-Blunt* ベクターにライゲーションし、*up-KRHIF-down/pCR-Blunt* を構築した。

*up-KRHIF-down/pCR-Blunt* から *KRHIF* 遺伝子領域を除くため、*up-KRHIF-down/pCR-Blunt* をテンプレートに、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) と下記に示したプライマーセット (*KK\_muta\_F*, *KK\_muta\_R*) を用いてインバース PCR を行った。テンプレートに用いた *up-KRHIF-down/pCR-Blunt* を *Dpn*I により消化した後、インバース PCR 産物をセルフライゲーションさせることで *KRHIF* 遺伝子の上流 (709 bp) と下流 (731 bp) を連結した、*up-down/pCR-Blunt* を得た。*up-down/pCR-Blunt* のインサート部分を *pKmobsacB* ベクターに寄せ換えるため、*up-down/pCR-Blunt* と *pKmobsacB* を *Xba*I で消化した後、QIAquickR Gel Extraction Kit を用いて DNA 断片をゲルから抽出した。この DNA 断片を *pKmobsacB* に Ligation-convenience Kit を用いてライゲーションすることで、*pKmobsacB-ΔKRHIF* を得た。

<PCR 反応>

・ 組成

2 × PCR buffer for KOD FX	5.0 μl
2 mM dNTPs	2.0 μl
Primer F (10 μM)	0.3 μl
Primer R (10 μM)	0.3 μl
Template (DNA 50 ng)	0.2 μl
KOD-FX	0.2 μl
滅菌水	1.0 μl
Total	10 μl

・ 反応条件

96°C	2 min	
98°C	30 sec	} 30 cycles
68°C	2.5 min	
25°C	∞	

・ *KRHIF* の上流から下流までを増幅するプライマー

K1\_KRHIF\_up\_F : 5'-CAGGTCGACTCTAGAGGCAACGCACGGCCC-3'

K1\_KRHIF\_down\_R : 5'-CGGGGATCCTCTAGACAGCCGGCCCCGATG-3'

<インバース PCR 反応>

・ 組成

10 × Buffer for iPCR (TOYOBO)	2.5 μl
2 mM dNTPs	2.5 μl
Primer F (10 μM)	0.75 μl
Primer R (10 μM)	0.75 μl
Plasmid DNA (50 ng/ μl)	0.5 μl
KOD-Plus-	0.5 μl
滅菌水	17.5 μl
Total	25 μl

・反応条件

96°C	2 min	
98°C	10 sec	} 10 cycles
68°C	7 min	
25°C	∞	

・ *up-KRHIF-down/pCR-Blunt* から *KRHIF* 遺伝子領域を除くためのプライマー

KK\_muta\_F : 5'-CCCCCGGAGCGTACCAGCGCCCGGTGCC-3'

KK\_muta\_R : 5'-ATCCGGCCCACGGCGACGGGATCTCCGCGG-3'

<DpnI 消化>

Inverse PCR 反応液全量に 1 μl の *DpnI* を加え、37°C で 1 h 消化した。

<PCR 産物のセルフライゲーション反応>

・組成

<i>DpnI</i> 消化済み PCR 産物	2 μl
Ligation high	5 μl
T4 Polynucleotide Kinase	1 μl
滅菌水	7 μl
Total	15 μl

反応条件

16°C 1 h

<*XbaI* 消化>

・組成

<i>XbaI</i>	1 μl
M buffer	2 μl
Vector (2 μg)	10 μl
滅菌水	7 μl
Total	20 μl

・ 反応条件

37°C Over night

90°C 15 min

<Ligation 反応>

・ 組成

2× Ligation mix	5 µl
<i>pKmobsacB</i> (50 ng)	2.5 µl
DNA 断片 (20 ng)	2.5 µl
<hr/>	
Total	10 µl

・ 反応条件

16°C 5 min

### 3) *KRHIF* 遺伝子再導入用ベクター *KRHIF/pKmobsacBKm* の作製

*up-KRHIF-down/pCR-Blunt* のインサート部分を *pKmobsacB* ベクターに乘せ換えるため、*up-KRHIF-down/pCR-Blunt* と *pKmobsacB* を *Xba* I で消化した後、QIAquickR Gel Extraction Kit を用いてゲルから抽出した。抽出した DNA 断片を *pKmobsacB* に Ligation-convenience Kit を用いてライゲーションすることで、*KRHIF/pKmobsacBKm* を得た。

#### 2-1-4 *KRHIF* のイネ細胞内への輸送確認

1-1-5 と同様の方法で、*KRHIF* がイネ細胞内に分泌されているかどうかを調べた。野生型 K1 菌株と *KΔT3SS* 株のコンピテントセル 50 µl に、*pBBR1TP-flapro-KRHIF-CyaA* を 1 µg 添加し、エレクトロポレーションによって導入した。*pBBR1TP-flapro-KRHIF-CyaA* を持つことが確認できた K1 菌株を *KRHIF-CyaA/K1*、*pBBR1TP-flapro-KRHIF-CyaA* を持つ *KΔT3SS* 株を *KRHIF-CyaA/KΔT3SS* と名付けた。*KRHIF-CyaA/K1* および *KRHIF-CyaA/KΔT3SS* の菌懸濁液をイネ培養細胞 22 ml に  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml になるように接種し、30°C、108 rpm、連続光下 (40 µmol/m<sup>2</sup>s) で振盪培養を行った。各菌株を接種して 12 時間後のイネ培養細胞 20 mg を回収し、Cyclic AMP EIA Kit で cAMP の蓄積量を測定した。

## 2-1-5 2回の相同組換えによる *KRHIF* 遺伝子欠損株と相補株の作製

1-1-6 と同様の方法で、*KRHIF* 遺伝子欠損株と相補株を作製した。エレクトロポレーションによって *pKmobsacB-ΔKRHIF* が導入された K1 菌株を、10 μg/ml の kanamycin 含有の PF 培地にプレーティングすることで、K1 菌株のゲノムと *pKmobsacB-ΔKRHIF* の間で1回目の相同組換え起きた株を選抜した。1回目の組換えが確認出来た菌株に対して、さらにスクロース選抜を行うことで、2回目の相同組換えを引き起こした菌株を選抜した。1回目の相同組換えが確認された菌株を 10 μg/ml の kanamycin 含有の PF 液体培地 3 ml に植菌し、30°Cで一晩振盪培養した。この菌培養液 3 μl をスクロース濃度 20%、22%、24%、26%の PF 液体培地 3 ml に植菌して、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、1,000 倍希釈、10,000 倍希釈してそれぞれ PF 固体培地にプレーティングし、30°Cで2日間静置培養した。得られたシングルコロニーを PF 固体培地と 50 μg/ml の kanamycin 含有の PF 固体培地に爪楊枝でレプリカをとり、30°Cで培養した。その後、PF 固体培地でのみ生育したコロニーをテンプレートに PCR を行うことで、*KRHIF* 遺伝子欠損株 ( $K\Delta RHIF$  株)を得た。また、 $K\Delta RHIF$  株に *KRHIF/pKmobsacBKm* を導入し、上記と同様の方法でスクロース選抜を行い、*KRHIF* の再導入が確認できた菌株を  $K\Delta RHIFC$  株とした。

## 2-1-6 イネ ETI 反応の検出

### 1) エバンスブルーを用いた細胞死の検出

N1141 菌株、K1 株、 $K\Delta RHIF$  株、 $K\Delta RHIFC$  株をイネ培養細胞 22 ml に  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml になるように接種し、1-1-7-1) と同様の方法で細胞死を検出した。各菌を接種したイネ培養細胞から 0、3、6、9、12 時間後に細胞液 1 ml を 24 穴プレートに移した。培養細胞懸濁液から培地を取り除き、0.05%エバンスブルー染色液を 500 μl 加え、暗黒下、15 分間静置した。その後、染色液を取り除き、培養細胞を純水で 3 回洗浄し、エバンスブルー脱色液を 1 ml 加えて一晩静置し、エバンスブルーを抽出した。抽出液 100 μl の 595 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定することで死細胞を算出した。

### 2) TUNEL 法による核 DNA 断片化の検出

N1141 菌株、K1 株、 $K\Delta RHIF$  株、 $K\Delta RHIFC$  株をイネ培養細胞 22 ml に  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml になるように接種し、1-1-7-2) と同様の方法で核 DNA 断片化を検出した。各

菌を接種して12時間後のイネ培養細胞1 mlを24穴プレートに回収し、4%パラフォルムアルデヒド/PBSで一晩固定した。PBSで3回程洗浄し、Proteinase K (10 µg/ml)を加え、スパチュラで細胞液をよくほぐした後、37°Cで30分間酵素処理を行った。処理後、PBSで3回程洗浄し、96穴マイクロプレートへ底が隠れる程度の細胞を移した後、室温で20分ほど完全に乾かないように風乾した。その後、TUNEL反応液40 µlを加え、37°C、遮光下で1時間静置した。PBSで3回程洗浄後、10分ほど完全に乾かないように風乾し、DAPI solutionを50 µl加えた。室温で2時間静置後、細胞液をスライドガラスに適量のみ、カバーガラスをかけて共焦点顕微鏡で観察した。

### 3) ETI 関連遺伝子の発現量解析

N1141 菌株、K1 株、KΔRHIF 株、KΔRHIFC 株をイネ培養細胞 22 ml に  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml になるように接種し、1-1-7-3) と同様の方法で ETI 関連遺伝子である *OsNAC4* と *OsPAL* の発現量を解析した。各菌を接種して6時間後のイネ培養細胞から、RNeasy Plant Mini Kit を用いて Total RNA を抽出した。RNA 濃度は 260 nm の吸光度を Nano drop で測定することで算出した。Total RNA を 10 ng/µl に調整し、Go Taq 1-Step RT-qPCR System と、Opticon Monitor ver.3 を用いて Real time RT-PCR の解析を行った。解析条件や用いたプライマーも 1-1-7-3) と同様である。

### 4) プロトプラストの細胞死の検出

1-1-7-6) と同様の方法でイネプロトプラスト 200 µl ( $2.0 \times 10^5$  cells) に *GUS/pBI221*、*NRHIF/pBI221*、*KRHIF/pBI221* (中村, 2017)、*Venus/pBI221* をそれぞれ 2 µg 導入し、12時間後のイネプロトプラストを1%エバンスブルーにより染色した。遮光して5分間染色した後、蛍光顕微鏡 Axioskop2 plus でプロトプラストを観察し、全細胞数と死細胞数をカウントした。

## 2-1-7 シコクビエ植物体での細胞死の検出

2週間生育させたシコクビエの葉鞘を剃刀で約 100 µm にスライスした。葉片を24穴プレートに入れ、そこに  $10^9$  cfu/ml に調製した K1 株、KΔT3SS 株、KΔRHIF 株、KΔRHIFC 株の菌液を 800 µl 接種した。30°Cで12時間静置した後、菌液を除き、0.1%エバンスブルーを加え遮光下で15分間染色した。滅菌水で5回洗浄した後、スライドガラスに乗せて顕微鏡で観察し、死細胞数を測定した。

## 2-1-8 イネおよびシコクビエ植物体への接種

### 1) 菌体の接種と病徴の観察

2週間生育させたイネまたはシコクビエに、 $1.0 \times 10^6$  cfu/ml に調製した K1 株、KΔT3SS 株、KΔRHIF 株、KΔRHIFC 株の懸濁液 1.0 μl を 22G の針の先端にのせ、イネおよびシコクビエの地上部 2 cm の部分に針接種した。接種後 4 日目まで 1 日ごとに病徴の長さを測定した。

### 2) 菌体数の測定

各菌株を接種して 4 日目のイネおよびシコクビエ植物体の接種部位から下 2.0 cm、上 8.0 cm の全長 10 cm の長さの部位を切り取った。各切片を 1%次亜塩素酸ナトリウム、70%エタノール、滅菌水①、滅菌水②の順に浸漬することで表面殺菌を行った。イネの葉を切り刻み、滅菌水 1 ml を加え、乳鉢で細くなるまですり潰し、さらに滅菌水を 5 ml 加えた。懸濁液 1 ml を 1,000 倍希釈、10,000 倍希釈、100,000 倍希釈し PF 固体培地に各 3 枚ずつプレーティングした。30°C で 2 日間培養した後、コロニーをカウントすることで植物体内に存在する菌体数を推定した。

## 2-2 結果

### 2-2-1 KRHIF の同定

*A. avenae* K1 菌株の全ゲノム配列に対して *NRHIF* 遺伝子をクエリー配列として相同性検索を行ったところ、*NRHIF* の DNA 配列と 88%一致する遺伝子配列が存在した。そこで、この遺伝子全長を増幅するようなプライマーを作製し、K1 菌株の DNA をテンプレートに PCR を行った結果、約 1,000 bp の増幅産物が得られた。DNA 増幅産物のシーケンスを解析したところ、この遺伝子は *NRHIF* と同じく 1,050 bp の DNA で構成されることが明らかになった。また、得られた KRHIF の DNA 配列から推定アミノ酸配列を得て、これを *NRHIF* と比較したところ、96%の相同性が存在しており、全体では 350 アミノ酸のうち 13 アミノ酸の置換が認められた (Fig. 9)。そこで、この遺伝子を *K1 rice HR cell death-inducing factor* (*KRHIF*) と名付けた。

### 2-2-2 KRHIF のイネ細胞内への輸送

EffectiveT3 を用いて KRHIF の T3SS からの分泌予測を行った結果、KRHIF の T3 スコアは最大値である 1 を示したことから、KRHIF は T3SS から分泌される可能性が高いと予想された。次に、実際に KRHIF が感染時にイネ細胞内に輸送されているかどうかを、CyaA を利用して確認した。KRHIF と CyaA の融合タンパク質を発現させるベクター *pBBR1TP-flapro-KRHIF-CyaA* を保持する K1 菌株 (KRHIF-CyaA/N1141) および K $\Delta$ T3SS 株 (KRHIF-CyaA/N $\Delta$ T3SS) をイネ培養細胞に接種し、12 時間後の cAMP 量を Cyclic AMP EIA Kit を用いて測定した。その結果、KRHIF-CyaA/N1141 を接種したイネ培養細胞では KRHIF-CyaA/N $\Delta$ T3SS を接種したイネ培養細胞と比較して約 18 倍の cAMP が蓄積していた。(Fig. 10) このことから、KRHIF-CyaA は K1 菌株の T3SS を介してイネ細胞内へ分泌されていることが明らかになった。

### 2-2-3 KRHIF によるイネの ETI 誘導

#### 1) K $\Delta$ RHIF 株および K $\Delta$ RHIFC 株によるイネ ETI 誘導

KRHIF が *NRHIF* 同様にイネの ETI 誘導に関与するのかどうか調べるため、相同組換えにより *KRHIF* 遺伝子を K1 菌株のゲノムから取り除いた欠損株 (K $\Delta$ RHIF 株) およびその遺伝子を相補した株 (K $\Delta$ RHIFC 株) を作製した。N1141 菌株、K1 株、K $\Delta$ RHIF

株、K $\Delta$ RHIFC 株をイネ培養細胞に接種し、接種後 0、3、6、9、12 時間におけるイネ培養細胞の細胞死をエバンスブルー染色で検出した。その結果、N1141 菌株を接種した細胞では、接種前 (0 時間後) の時点で約 0.1 だった 595 nm の吸光度が、接種 9 時間後には 0.81、12 時間後には 1.18 まで上昇し、細胞死が誘導されることが示された (Fig. 11A)。一方、K1 株、K $\Delta$ RHIF 株、K $\Delta$ RHIFC 株を接種した細胞では、接種 12 時間後でも 595 nm の吸光度が 0.4 以下と低い値を示したことから、K1 株、K $\Delta$ RHIF 株、K $\Delta$ RHIFC 株はイネ培養細胞の細胞死を誘導できないことが示された。

次に、K $\Delta$ RHIF 株がイネ植物体に対しても細胞死を誘導できないのか確認するため、各菌株をイネ葉鞘切片に接種し、6 時間後にエバンスブルーで染色することで死細胞数を測定した。その結果、N1141 菌株を接種したイネ切片における死細胞の割合は 70%であるのに対し、K1 株、K $\Delta$ RHIF 株、K $\Delta$ RHIFC 株を接種した細胞では、いずれも死細胞の割合は約 20%であった (Fig. 11B)。したがって、K $\Delta$ RHIF 株および K $\Delta$ RHIFC 株は K1 菌株と同じく、イネ培養細胞や植物体の細胞死を誘導しないことが明らかになった。

次に、イネ過敏感細胞死に付随して認められる核 DNA の断片化についても調べた。N1141 菌株、K1 株、K $\Delta$ RHIF 株、K $\Delta$ RHIFC 株を接種して 9 時間後のイネ培養細胞に対し、DNA の断片化により生じる 3'-OH 末端にフルオレセイン-dUTP を標識する TUNEL 染色を行った。その結果、DAPI で染色された核のうち DNA の断片化を表す FITC 蛍光を示す核の割合は、野生型 N1141 菌株を接種した場合で 9.3%だったのに対し、K1 株、K $\Delta$ RHIF 株、K $\Delta$ RHIFC 株を接種した場合にはいずれも 3%以下だった (Fig. 12A)。以上の実験結果から、KRHIF はイネの過敏感細胞死誘導には関与しないことが明らかになった。

次に、ETI のもう一つの指標である ETI 関連遺伝子の発現誘導への KRHIF の関与について調べた。イネの ETI 関連遺伝子であり、イネの ETI 誘導時に発現量が増加することが明らかになっている *OsNAC4* 遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR で調べたところ、N1141 菌株を接種したイネ培養細胞では、接種 6 時間後に接種前と比べて *OsNAC4* の発現量が 100 倍以上になるのに対し、K1 株、K $\Delta$ RHIF 株、K $\Delta$ RHIFC 株を接種したイネ培養細胞では 5 倍以下だった (Fig. 12B)。さらに、他の ETI 関連遺伝子である *OsPAL* の発現量についても調べたところ、N1141 菌株を接種したイネ培養細胞では接種 6 時間後に発現量が約 25 倍になるのに対し、K1 株、K $\Delta$ RHIF 株、K $\Delta$ RHIFC 株を接種したイネ培養細胞では約 3 倍であり、ほとんど増加していなかった (Fig. 12C)。以上の結果から、K1 菌株に存在する KRHIF はイネの過敏感細胞死や ETI 関連遺伝子の発現誘導などの ETI 反応の誘導には関与しないことが明らかになった。

## 2) *KRHIF* 遺伝子を発現させたイネ細胞の過敏感細胞死

*KRHIF* がイネの ETI 反応誘導には関与しないことを確認するため、*KRHIF* をイネ細胞内で発現させることで過敏感細胞死誘導の有無について調べた。イネ細胞内で一過的に *KRHIF* を発現させる *KRHIF/pBI221* を PEG 法でイネプロトプラストに導入し、12 時間後の死細胞をエバンスブルーで検出した。生細胞と死細胞を実験ごとに合計 1,000 個以上カウントした結果、コントロールである *GUS* を発現したイネプロトプラストにおける死細胞の割合が 30%、*NRHIF* を発現したイネプロトプラストでは 88% であるのに対し、*KRHIF* を発現したイネプロトプラストでは 34% だった (Fig. 13A)。

次に、*KRHIF* を発現したイネ細胞における核 DNA の断片化について調べた。*GUS/pBI221*、*NRHIF/pBI221*、*KRHIF/pBI221* をイネ培養細胞にパーティクルボンバードメント法によりそれぞれ導入した。この時、*DsRed/pAHC17* ベクターも同時に導入し、遺伝子が導入された細胞は *DsRed* 由来の蛍光が観察されるようにした。遺伝子導入から 12 時間後の細胞を TUNEL 染色し、FITC 由来の蛍光を共焦点顕微鏡で観察した結果、*NRHIF/pBI221* を導入したイネ培養細胞では *DsRed* と FITC 由来の蛍光を核に持つ細胞が観察されたが、*GUS/pBI221* および *KRHIF/pBI221* を導入したイネ培養細胞では *DsRed* 由来の蛍光と FITC 由来の蛍光を核に持つ細胞は認められなかった (Fig. 13B)。これらの結果から、*KRHIF* はイネの過敏感細胞死を誘導しないことが確認された。

### 2-2-4 $\Delta$ *KRHIF* 株および $\Delta$ *KRHIFC* 株によるシコクビエの過敏感細胞死誘導

K1 菌株の非宿主であるシコクビエに対する *KRHIF* の機能を調べるため、K1 菌株、 $\Delta$ *KAT3SS* 株、 $\Delta$ *KRHIF* 株、 $\Delta$ *KRHIFC* 株をシコクビエ葉鞘切片に接種し、12 時間後にエバンスブルーで染色することで死細胞数を測定した。その結果、K1 菌株および  $\Delta$ *KRHIFC* 株を接種したシコクビエ切片における死細胞の割合は約 75% であるのに対し、 $\Delta$ *KAT3SS* 株および  $\Delta$ *KRHIF* 株を接種した細胞では、死細胞の割合は約 45% であった (Fig. 14A, B)。この結果は、K1 菌株が誘導するシコクビエの過敏感細胞死を  $\Delta$ *KRHIF* 株や  $\Delta$ *KAT3SS* 株では誘導できなくなっており、 $\Delta$ *KRHIF* 株への *KRHIF* 遺伝子の導入によってシコクビエ過敏感細胞死誘導能が相補されたことを示している。以上のことから、*KRHIF* はシコクビエの過敏感細胞死を誘導するエフェクタータンパク質として機能することが明らかになった。

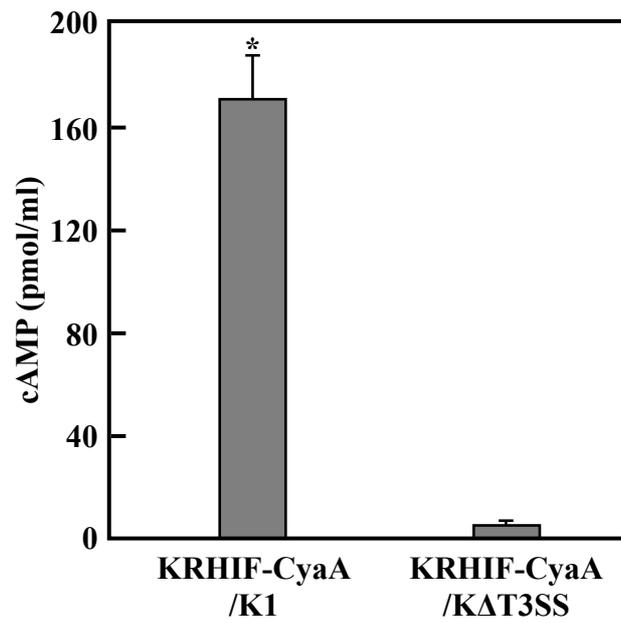
### 2-2-5 K $\Delta$ RHIF 株と K $\Delta$ RHIFC 株のイネおよびシコクビエに対する病原性

K1 菌株の病原性や植物体内での増殖に KRHIF が関与するのかどうか調べるため、K $\Delta$ RHIF 株を非宿主であるシコクビエまたは宿主であるイネに針接種した。まず、K $\Delta$ RHIF 株を非宿主であるシコクビエに接種し 4 日後に観察したところ、K1 株を接種した場合と同じく褐条病斑は認められなかった。同様に、シコクビエ内に存在する菌体数についても調べたが、やはり菌体数は変化してなかった (Fig. 15A, B)。一方、宿主であるイネに K $\Delta$ RHIF 株を接種した場合、接種 4 日後には褐条病斑が認められたが、K1 株を接種した場合に認められる褐条病斑より縮小していた。さらに、このときのイネ植物体内の菌体数についても調べたところ、K1 株に比べ K $\Delta$ RHIF 株の方が有意に減少していた (Fig. 16A, B, C)。以上のように KRHIF を欠損することによって宿主のイネに対する褐条病斑の減少と菌体の増殖抑制が認められることが明らかになった。

	1	25	198	350 a.a.	
NRHIF	TPATQ		TAGR	AEDR	
	*****		*****	*****	96 %
KRHIF	SSTAP		STRQ	VDEQ	

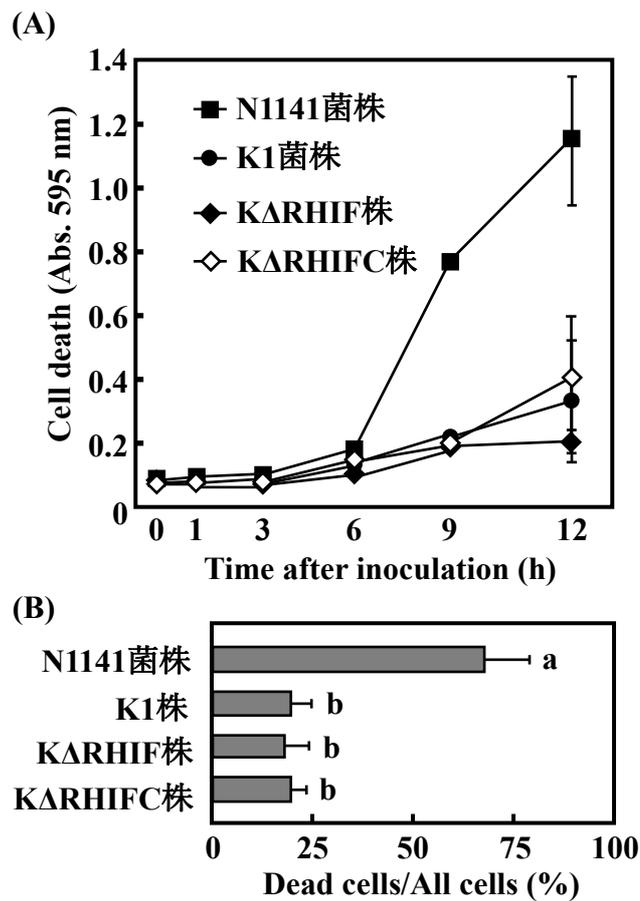
**Fig. 9 KRHIFとNRHIFの構造**

NRHIFとKRHIFの構造の模式図を示す。グレーボックスはp-loop NTPaseドメインと推定される部分を示した。アスタリスクはNRHIFとKRHIFで異なるアミノ酸残基を表している。



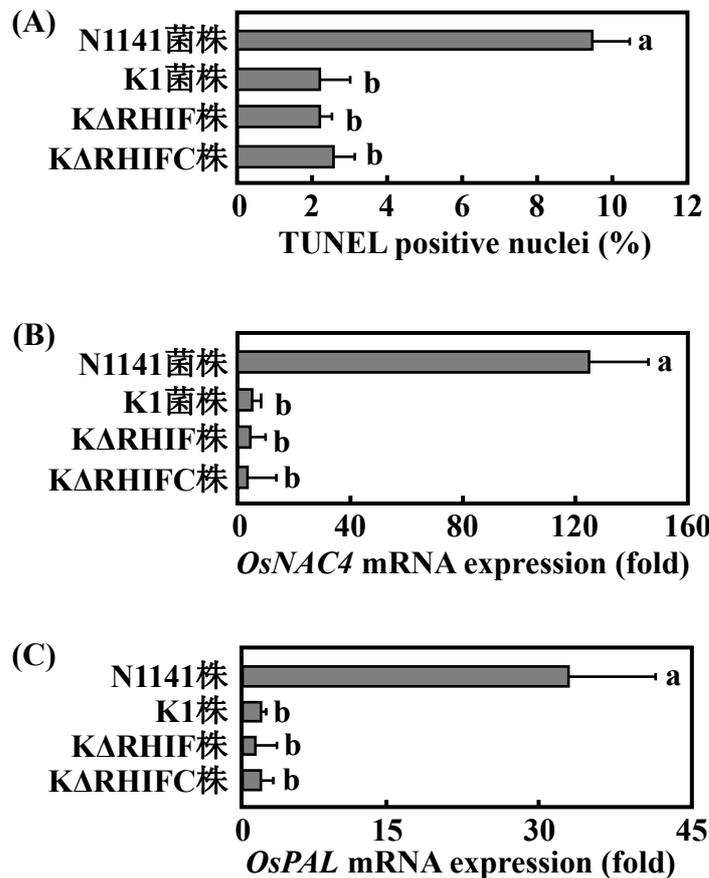
**Fig. 10 KRHIFのイネ細胞内への輸送**

KRHIFとCyaAの融合タンパク質を発現するK1菌株およびKΔT3SS株をイネ培養細胞に接種し、12時間後のcAMP量を測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。アスタリスクは有意差を示す (t検定、 $p < 0.05$ )。



**Fig. 11 KARHIF株およびKARHIFC株を接種したイネで認められる細胞死**

(A) 各菌株を $1.0 \times 10^8$  cfu/mlになるようにイネ培養細胞に接種し、0、3、6、9、12時間後の死細胞をエバンスブルーで検出した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。(B) 各菌株をイネ葉鞘切片に接種し、6時間後の死細胞をエバンスブルーで染色した。生細胞数と死細胞数をカウントし、その割合を算出した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらの中に有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

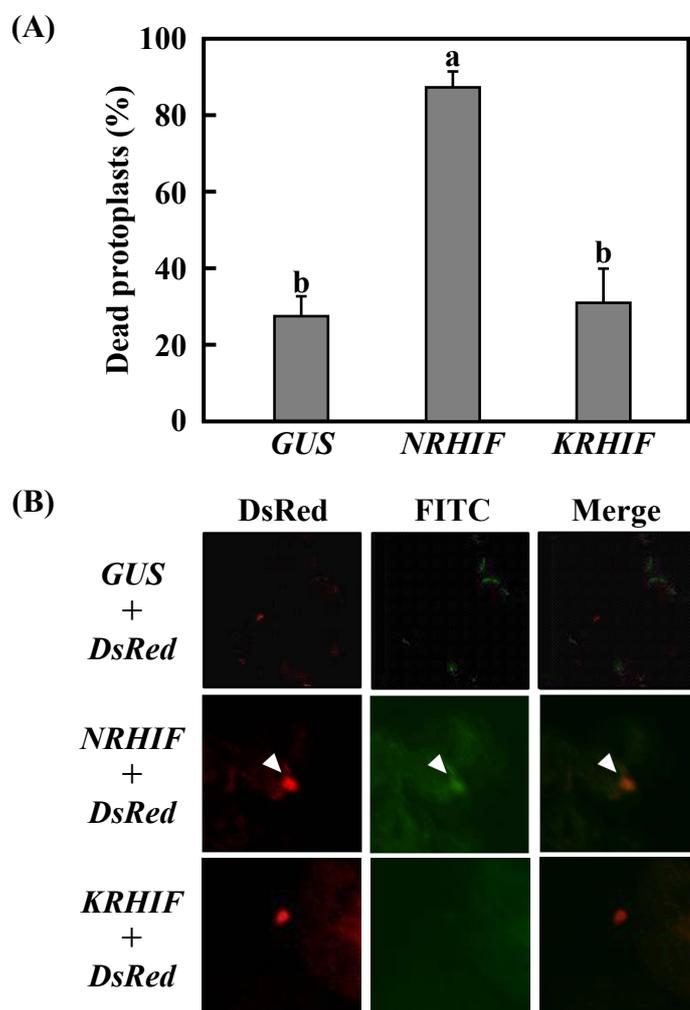


**Fig. 12 KARHIF株およびKARHIFC株を接種したイネのETI反応**

(A) 各菌株を接種して9時間後のイネ培養細胞をTUNEL染色し、FITC蛍光を示した核の割合を示す。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

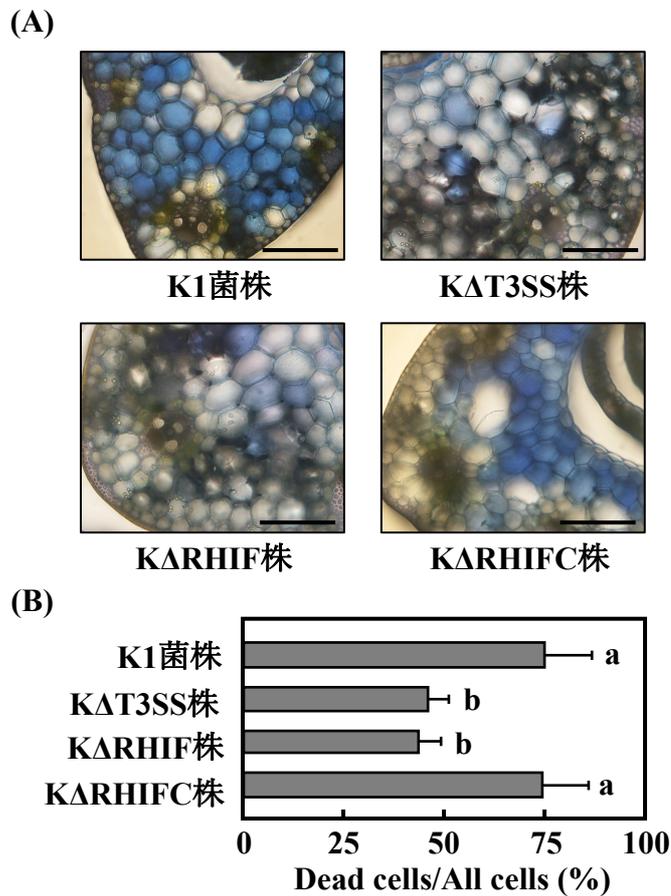
(B) 各菌株を接種して6時間後のイネ培養細胞における*OsNAC4*遺伝子の発現量をReal time RT-PCRで定量した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

(C) 各菌株を接種して6時間後のイネ培養細胞における*OsPAL*遺伝子の発現量をReal time RT-PCRで定量した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。



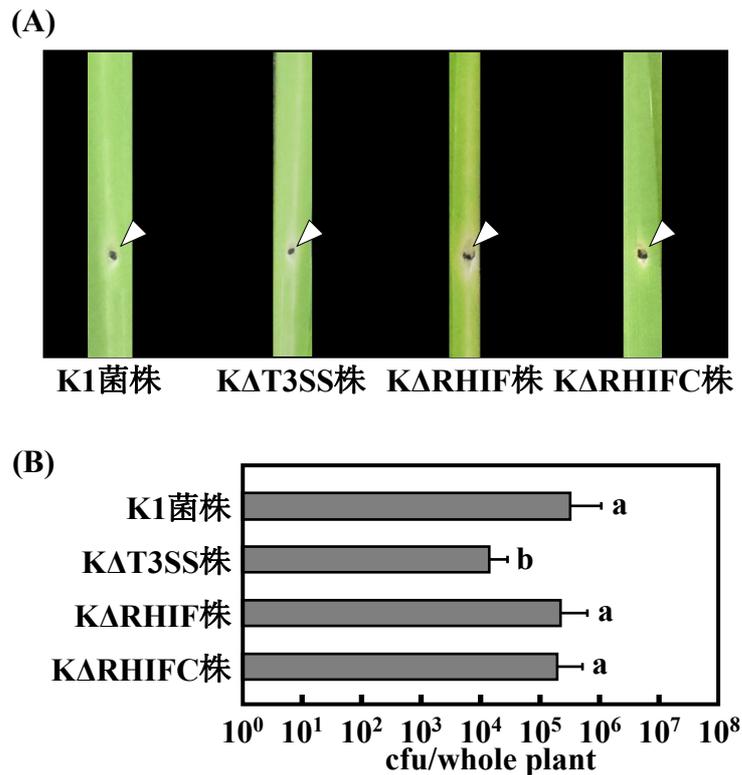
**Fig. 13** *KRHIF*遺伝子を導入したイネにおける過敏感細胞死

(A) 各遺伝子をイネプロトプラストにPEG法で導入し、導入後12時間目のイネプロトプラストをエバンスブルーで染色した。全細胞数とエバンスブルーにより染色された死細胞を合計1,000個以上カウントした。縦軸は、遺伝子が導入された細胞のうち死細胞の割合を示す。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。 (B) *DsRed*遺伝子と各遺伝子をイネ培養細胞へ同時に導入し、12時間後にTUNEL染色を行い共焦点顕微鏡で観察した。矢印はTUNELにより染色された核を示す。



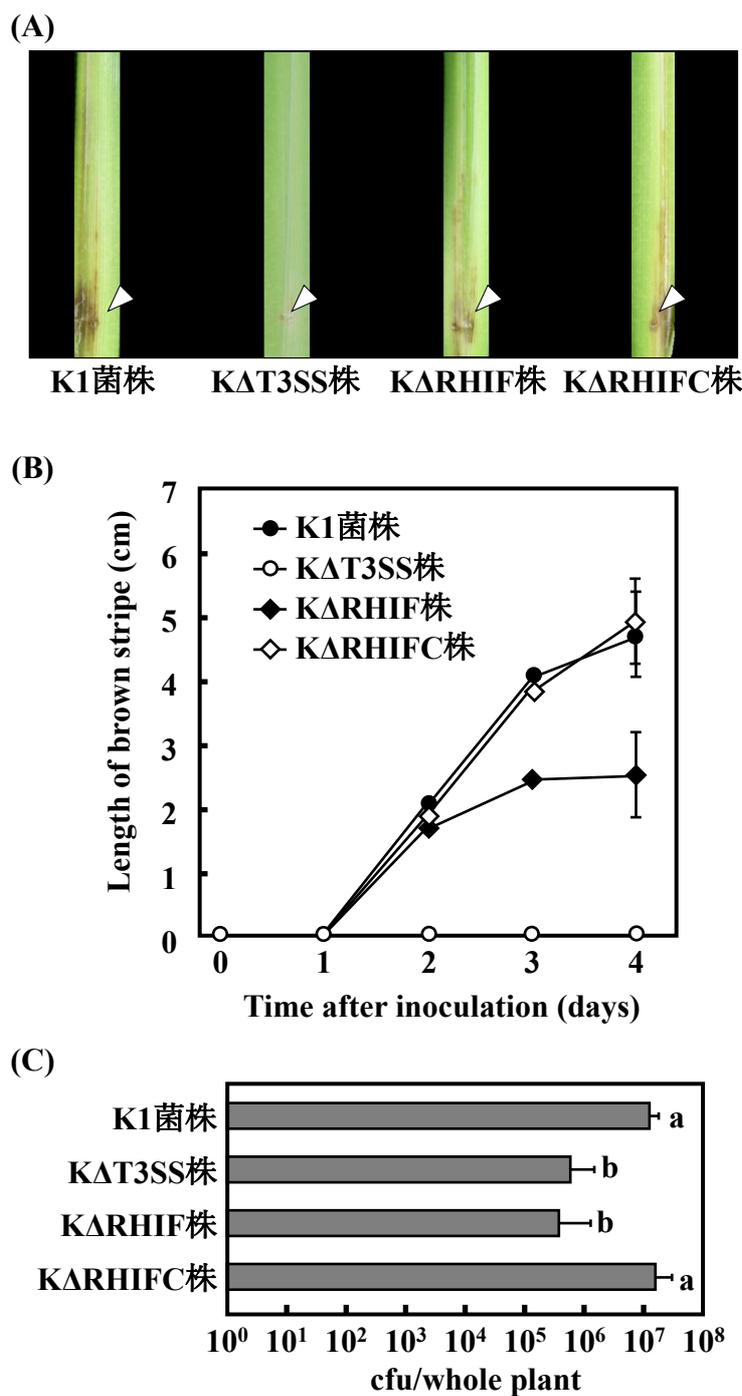
**Fig. 14** KΔRHIF株およびKΔRHIFC株を接種したシコクビエ葉鞘切片で認められる細胞死

(A) 各菌株をシコクビエ葉鞘切片に接種し、12時間後の死細胞をエバンスブルーで染色した。(Bar = 100 μm) (B) シコクビエ葉鞘切片の画像から生細胞数と死細胞数をカウントし、その割合を算出した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらの中に有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。



**Fig. 15 KΔRHIF株およびKΔRHIFC株のシコクビエに対する病原性**

(A)  $1.0 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ lに調製した各菌の懸濁液1.0  $\mu$ lをシコクビエへ接種し、4日後に写真を撮影した。矢印は接種部位を表している。(B) 各菌株を接種後4日目に植物体内に存在する*A. avenae*の菌体数を測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらの中に有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。



**Fig. 16 KARHIF株およびKARHIFC株のイネに対する病原性**

(A)  $1.0 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ lに調製した各菌の懸濁液1.0  $\mu$ lをイネへ接種し、4日後に写真を撮影した。矢印は接種部位を表している。(B) 各菌株を接種後4日目まで1日ごとに病徴の長さを測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。

(C) 各菌株を接種後4日目に植物体内に存在する*A. avenae*の菌体数を測定した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

## 2-3 考察

K1 菌株には、イネ ETI 誘導エフェクター NRHIF と 96% の配列相同性を持つ KRHIF が存在し、K1 菌株の T3SS を介してイネ細胞内に輸送されることが明らかになった。N1141 菌株を接種したイネでは ETI 反応の 1 つである過敏感細胞死が誘導されるのに対し、K1 菌株を接種したイネではこのような過敏感細胞死は誘導されない。KRHIF が感染時にイネ細胞内に輸送されることを考えると、KRHIF は、イネ過敏感細胞死を誘導する能力を持たないと推測される。実際に、KRHIF をイネ細胞内で発現させたときも過敏感細胞死の誘導は認められなかった。K1 菌株がイネの ETI を誘導できない原因が KRHIF のイネ過敏感細胞死誘導能の欠如のみに由来するかどうかは現状では確定できないが、K $\Delta$ RHIF 株に NRHIF を発現させた交換株を作成し、イネの過敏感細胞死が誘導されるかどうかを調べることで、K1 菌株のイネ ETI 非誘導性が KRHIF のみに由来するかどうかを明確にできるだろう。

イネ ETI を誘導できない KRHIF とイネ ETI を誘導できる NRHIF 間には 350 アミノ酸のうち 13 アミノ酸の置換しか存在しない。アミノ酸配列がエフェクター自体の活性や特異性を制御している例がいくつか報告されている。*X. campestris* pv. *vesicatoria* が持つ AvrBs3 などの Transcription activator-like effector (TAL エフェクター) には、宿主植物の DNA 配列へ特異的に結合する領域と、核移行シグナルおよび転写活性化ドメインが存在する (Romer et al., 2009)。DNA 結合領域は 34 残基の類似したアミノ酸配列が 17.5 回繰り返した構造となっており、34 残基のうち Repeat variable diresidues (RVD) と呼ばれる 12 番目と 13 番目のアミノ酸残基によって、結合する塩基の特異性が決定されている。例えば、AvrBs3 では対応する非宿主植物の R 遺伝子である *Bs3* の上流配列に結合し、転写を制御することで過敏感細胞死を誘導する。一方、同じ菌から同定された TAL エフェクターである AvrBs4 は、AvrBs3 と異なるアミノ酸配列の RVD を持っているため、*Bs3* 上流に結合できず過敏感細胞死も誘導しない。TAL エフェクターのように、NRHIF や KRHIF も 13 アミノ酸の置換によってターゲット因子との親和性に違い生じ、これが過敏感細胞死誘導の特異性を制御している可能性もある。NRHIF または KRHIF のどちらかのみと相互作用する因子を同定できれば、この仮説を証明できると考える。

アミノ酸配列の違いによって植物細胞内での局在を変化させることで、宿主植物による認識を回避するようなエフェクタータンパク質も発見されている。べと病卵菌 *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*) の Emoy2 株から同定されたエフェクタータンパク質 HaRxL103<sup>Emoy2</sup> は Nuclear localization signal (NLS) を持っており、植物細胞内

では細胞質と核に局在する (Asai et al., 2018)。HaRxL103<sup>Emoy2</sup> は、同じく核に局在するシロイヌナズナの R 遺伝子産物 RPP4 によって認識され、過敏感細胞死を誘導する。一方、*Hpa* Hind2 株由来の HaRxL103<sup>Hind2</sup> エフェクターは、HaRxL103<sup>Emoy2</sup> の NLS と比較して 1 アミノ酸の置換が存在することで植物細胞の核に局在できなくなっている。これにより、HaRxL103<sup>Hind2</sup> は RPP4 により認識されず、過敏感細胞死が誘導されない。KRHIF もアミノ酸の置換によって、細胞内での局在場所を変化させることで宿主植物であるイネからの認識を回避している可能性も考えられる。NRHIF や KRHIF にオルガネラへの局在化シグナルが存在するかどうかや、GFP 等の蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いることで、NRHIF や KRHIF のイネ細胞内における局在を確認することでこの可能性について検証できるであろう。

KΔRHIF 株は非宿主であるシコクビエの過敏感細胞死を誘導できず、KΔRHIF 株に *KRHIF* 遺伝子を導入した KΔRHIFC 株はシコクビエの過敏感細胞死を誘導したことから、*KRHIF* はシコクビエの過敏感細胞死を誘導するエフェクタータンパク質であることが明らかになった (Fig. 14A, B)。さらに KΔRHIF 株は KΔT3SS と同じ程度までシコクビエ過敏感細胞死の誘導能を失っていたことから、*KRHIF* は K1 菌株が持つシコクビエの過敏感細胞死を誘導する唯一のエフェクタータンパク質であると考えられる。このことから、シコクビエの過敏感細胞死を誘導する *KRHIF* を欠損した KΔRHIF 株は、K1 菌株よりも非宿主であるシコクビエへの感染が有利になると予想された。しかし、実際にシコクビエに KΔRHIF 株を接種したところ、K1 菌株と同じく病徴は形成されず、菌体数の増加も認められなかった。この原因については現在のところ明らかではないが、K1 菌株にはシコクビエ過敏感細胞死誘導以外の免疫反応を誘導する他の因子が存在する可能性もあるだろう。この可能性を実証するためには、KΔRHIF 株が K1 菌株によって誘導されるであろう活性酸素の発生やカロースの沈着、サリチル酸の蓄積などの免疫反応を誘導しないかどうかを調べる必要がある。

### 第三章

NRHIF および KRHIF が持つエフェクターとしての機能の解析

## 3-1 材料と方法

### 3-1-1 植物と細菌

本章では、実験材料としてイネ培養細胞（Oc 細胞： *O. sativa* L.C 5924）、イネ（ *O. sativa* L. subsp. Kinmaze）、シコクビエを宿主とする植物病原細菌 *A. avenae* N1141 菌株（MAFF 301141）、イネを宿主とする植物病原細菌 *A. avenae* K1 菌株（MAFF 301755）を用いた（Kadota et al., 1996）。イネ培養細胞の培養条件、植物体の栽培条件、細菌の保存条件は 1-1-1 と同様である。

### 3-1-2 Yeast two-hybrid (Y2H) 法に用いた酵母とその保存

Y2H 法に用いた酵母は Y2HGold 株（Clontech）と Y187 株（Clontech）である。Y2H に使用したイネ cDNA ライブラリーは、N1141 菌株接種後 0、1、3 時間後のイネ培養細胞の total RNA から cDNA を合成し、これを *pGADT7-Rec* に挿入することで作製した *pGADT7-Rec-cDNA* を Y187 株に導入したものである。各酵母を保存するため、酵母を YPAD 培地（1% [w/v] Bacto Yeast Extract [BD], 2% [w/v] Bacto Proteose No. 3, 2% [w/v] Glucose [Wako], 0.04% [w/v] Adenine [Wako], 2% [w/v] Bacto Agar）に画線し、30°C で 3 日間培養した。直径約 2.0 mm のシングルコロニーを選び、3.0 ml の YPAD 液体培地に植菌し、30°C、200 rpm で一晩震盪培養して前培養を行った後、この前培養液を 100 倍希釈して分光光度計で OD<sub>600</sub> を測定し、下記の計算式に当てはめて 1.0 ml 当たりの菌体数を割り出し、 $5 \times 10^6$  cfu/ml になるように 50 ml の YPAD へ添加し、30°C、200 rpm で振盪培養した。OD<sub>600</sub> 測定結果が 0.8~1.2 になるまでおよそ 3 時間~5 時間振盪培養を行った後、800×g、室温で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。得られた酵母のペレットを 1.0 ml の 20%グリセロールで懸濁し、50 μl ずつチューブに分注し、これを、液体窒素で瞬間凍結し-80°Cに保存した。

OD<sub>600</sub> と菌体数の換算式 [OD<sub>600</sub>= $8 \times 10^8$  cells/ml]

<Y2HGold 株の遺伝子型>

*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ*, *gal80 Δ*,

*LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*,

*URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-AURI-C*, *MEL1*

<Y187 株の遺伝子型>

*MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*,  
*trp1-901*, *leu2-3, 112*, *met*, *gal4 Δ*, *gal80 Δ*,  
*URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ*, *MEL1*

### 3-1-3 ベクターの作製

#### 1) NTPase 活性中心を置換した RHIF 発現用ベクターの作製

RHIF の NTPase としての活性がイネの過敏感細胞死誘導に関与するかどうか調べるため、活性中心と予想される 188 番目のアルギニンをアラニンに置換した NRHIF または KRHIF を発現する植物細胞内発現用ベクター *NRHIF<sup>R188A</sup>/pBI221* および *KRHIF<sup>R188A</sup>/pBI221* を作製した。*NRHIF/pBI221* または *KRHIF/pBI221* をテンプレートに、下記のプライマーセットと KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて Inverse PCR を行った。PCR 産物に含まれる鋳型プラスミドを分解するため、PCR 反応液全量に 1 μl の *DpnI* を加え 37°C で 1 時間消化した後、PCR 産物のセルフライゲーションを行うことで、*NRHIF<sup>R188A</sup>/pBI221* および *KRHIF<sup>R188A</sup>/pBI221* を得た。

<Inverse PCR 反応液>

・ 組成

10× Buffer for iPCR	2.5 μl
2 mM dNTPs	2.5 μl
Primer F (10 μM)	0.75 μl
Primer R (10 μM)	0.75 μl
Template (50 ng)	0.5 μl
KOD-Plus-	0.5 μl
滅菌水	17.5 μl
Total	25 μl

・反応条件

94°C	2 min	} 10 cycles
98°C	10 sec	
68°C	6 min	
16°C	∞	

・ *RHIF*<sup>R188A</sup>/*pBI221* 構築用プライマー

RHIF572-591F : 5'-GGGCGCTGGAGGTCTGGCAC-3'

RHIF551-571R\_R188A : 5'-GCTGGATGGCCTGGCTGTCGC-3'

<セルフライゲーション反応液>

・組成

<i>DpnI</i> 処理済み PCR 産物	2 μl
Ligation high	5 μl
T4 Polynucleotide Kinase	1 μl
滅菌水	7 μl
Total	15 μl

・反応条件

16°C 1 h

2) NRHIF と KRHIF の部位置換タンパク質を発現するベクターの作製

イネの過敏感細胞死誘導に NRHIF のどの部分が重要か調べるため、NRHIF と KRHIF を3つの領域に分け、それらを組み合わせた部位置換タンパク質 (Fig. C) を発現するベクター *NNK/pBI221*、*NKK/pBI221*、*NKN/pBI221*、*KKN/pBI221*、*KNN/pBI221*、*KNK/pBI221* を作製した。まず、*NNK/pBI221* を作成するため、*NRHIF/pBI221* をテンプレートに、Fig. D に示すようなプライマー (RHIF\_736\_755\_R、N\_1035\_1053\_221\_F) を用いて PCR を行い、PCR 産物①を得た。また、K1 菌株の DNA をテンプレートに、Fig. D に示すようなプライマー (RHIF\_741\_763\_F、KRHIF\_221\_R) を用いて PCR を行い、PCR 産物②を得た。RHIF\_736\_755\_R と RHIF\_741\_763\_F、N\_1035\_1053\_221\_F と KRHIF\_221\_R はそれぞれ 15 bp 重複するように設計されている。PCR 産物①と PCR 産物②を In-Fusion HD Cloning kit を用いてクローニングすることで、*NNK/pBI221* を得た。残り5つのベクターも同様の方法で作成した。

<PCR 反応>

・ 組成

KOD One (TOYOBO)	5.0 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ l
Template (50 ng)	1.0 $\mu$ l
滅菌水	3.4 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

・ 反応条件

96°C	2 min	
98°C	5 sec	} 30 cycles
68°C	10 sec / 1 kb	
25°C	$\infty$	

・ *NNK/pBI221* 作製用プライマー

RHIF\_736\_755\_R : 5'-CAGGTCGACTCTAGAGATCGCCATCACCGGAGCCT-3'

N\_1035\_1053\_221\_F : 5'-GCTGTCATGCGGACATGATCCCCCGGAGCGTAC-3'

RHIF\_741\_763\_F : 5'-GATCATGTCCGCATGACAGCCCACGGCGATG-3'

KRHIF\_221\_R : 5'-CGGGGATCCTCTAGACGCTATTACGGCGCCGTGGC-3'

・ *NKK/pBI221* 作製用プライマー

221\_F : 5'-TACCGAGCTCGAATTTCCCC3'

221\_NRHIF\_F : 5'-GACTCTAGAGGATCCATGTCCACTCCCCCTTCCCTGC-3'

221\_R : 5'-GGATCCTCTAGAGTCCCCCG-3'

N\_KRHIF\_R : 5'-ATCTCGCGCACGAGCCGTTG-3'

・ *NKN/pBI221*、*KNK/pBI221* 作製用プライマー

RHIF\_736\_755\_R : 5'-CAGGTCGACTCTAGAGATCGCCATCACCGGAGCCT-3'

N\_1035\_1053\_221\_F : 5'-GCTGTCATGCGGACATGATCCCCCGGAGCGTAC-3'

RHIF\_741\_763\_F : 5'-GATCATGTCCGCATGACAGCCCACGGCGATG-3'

KRHIF\_221\_R : 5'-CGGGGATCCTCTAGACGCTATTACGGCGCCGTGGC-3'

・ *KKN/pBI221* 作製用プライマー

K1034\_1053\_221\_F : 5'-CGCTCGGGGTGCAGGCATGATACCGAGCTCGAATTTCCCC-3'

N1035\_1053\_221\_R : 5'-GGGGAAATTCGAGCTCGGTATCATGCCCGCACCCCGAGC-3'

RHIF\_736\_755\_R : 5'-CCCTCGTCCAGCATGGCGTC-3'

RHIF\_741\_763\_F : 5'-CATGCTGGACGAGGGTTTCGTGG-3'

・ *KNN/pBI221* 作製用プライマー

221\_K\_1\_23\_F : 5'-GACTCTAGAGGATCCATGTCCAGTCCCTCTTCCCTGCC-3'

221\_N\_1\_23\_R : 5'-GGCAGGGAAGGGGGAGTGGACATGGATCCTCTAGAGTC-3'

RHIF\_331\_350\_R : 5'-TGGATCTCGCGCACGAGCCG-3'

RHIF\_336\_354\_F : 5'-CGTGCGCGAGATCCAGGCG-3'

<In-fusion 反応>

・ 組成

5 × In-fusion HD enzyme premix	2 μl
PCR 産物① (PCR-Linearized Vector)	1 μl
PCR 産物② (Insert)	3 μl
Cloning Enhancer	1 μl
滅菌水	3 μl
Total	10 μl

・ 反応条件

37°C     15 min

50°C     15 min

### 3) Bait ベクターの作製

Y2H 法により NRHIF および KRHIF と相互作用するイネタンパク質を探索するため、各 RHIF 遺伝子全長を組み込んだ Bait ベクターを作製した。NRHIF/pBI221 または KRHIF/pBI221 をテンプレートとして、両末端に *NdeI* サイトを付加した下記の In-Fusion 用プライマーセットを用い、各 RHIF 遺伝子の全長を PCR により増幅させた。得られた PCR 産物を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて *NdeI* で消化した pGBKT7 とライゲーションすることで、NRHIF/pGBKT7 および KRHIF/pGBKT7 を得た。

## <PCR 反応>

### ・ 組成

2 × PCR buffer for KOD FX	5.0 μl
2 mM dNTPs	2.0 μl
Primer F (10 μM)	0.3 μl
Primer R (10 μM)	0.3 μl
Template (50 ng)	0.2 μl
KOD-FX	0.2 μl
滅菌水	1.0 μl
Total	10 μl

### ・ 反応条件

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

### ・ *NRHIF* 増幅 In-Fusion 用プライマー

pGBKT7-NRHIF-F : 5'-GAGGACCTGCATATGTCCACTCCCCCTTCCCTGC-3'

pGBKT7-NRHIF-R : 5'-CTCCATGGCCATATGTCATGCCCGCACCCCGAG-3'

### ・ *KRHIF* 増幅 In-Fusion 用プライマー

pGBKT7-KRHIF-F : 5'-GAGGACCTGCATATGTCCAGTCCCTCTTCCCTGC-3'

pGBKT7-KRHIF-R : 5'-CTCCATGGCCATATGTCATGCCTGCACCCCGAG-3'

## 4) ゲノム編集イネ作成用ベクター *RIP1/pRGEB31* および *RIP3/pRGEB31* の作製

NRHIF と相互作用することが示されたタンパク質 NRHIF -interacting protein (RIP) 1、RIP3 をコードする遺伝子を CRISPR/Cas9 法により欠損させたイネを作製するため、植物用 CRISPR/Cas9 ベクター *pRGEB31* (Xie and Yang, 2013) に *RIP1*、*RIP3* の gRNA を組み込んだ *RIP1/pRGEB31* と *RIP3/pRGEB31* を構築した。各遺伝子の gRNA はソフトウェア CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) により設計した。設計した gRNA 配列のプライマーとそれに対して相補的な配列のプライマーを作製し、それぞれの 5' 末端に *BsaI* 配列を付加した (*RIP1\_41-63F*, *RIP1\_41-63R*, *RIP3\_13-35F*, *RIP3\_13-35R*)。

それぞれのプライマーセットのリン酸化とアニーリングを行い、これらを *Bsa*I で消化した *pRGEB31* と Ligation-convenience Kit を用いてライゲーションした。

<リン酸化反応>

・組成

Primer F (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer R (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
ATP (100 nM)	0.5 $\mu$ l
10x T4 PNK Buffer	5 $\mu$ l
T4 Polynucleotide Kinase (Takara)	1 $\mu$ l
滅菌水	41.5 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

・リン酸化とアニーリング反応条件

37°C 60 min

95°C 10 sec

25°C  $\infty$

・gRNA 用プライマー

RIP1\_41-63F : 5'-GGCA CGCCGCCGCCGCAGCATAACG-3'

RIP1\_41-63R : 5'-AAACCGTATGCTGCGGCGGCGGCG-3'

RIP3\_13-35F : 5'-GGCACTGGTTGGCAACCCTTCGAA-3'

RIP3\_13-35R : 5'-AAACTTCGAAGGGTTGCCAACCAG-3'

<*Bsa*I 処理>

・組成

<i>Bsa</i> I	1 $\mu$ l
10 $\times$ BSA	2 $\mu$ l
10 $\times$ buffer 4	2 $\mu$ l
<i>pRGEB31</i> (78 ng/ $\mu$ l)	12.8 $\mu$ l
滅菌水	2.2 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

・反応条件

37°C                    over night

65°C (失活)        20 min

<Ligation 反応>

・組成

2×Ligation mix	5 μl
<i>pRGEB31</i> (50 ng)	2.5 μl
アニーリング産物 (1,000 倍希釈)	2.5 μl
<hr/>	
Total	10 μl

・反応条件

16°C    5 min

### 3-1-4 RHIF を一過的に発現したイネでの細胞死の検出

*NRHIF/pBI221*、*KRHIF/pBI221* および 3-1-3-1) と 3-1-3-2) で作製したベクター *NRHIF<sup>R188A</sup>/pBI221*、*KRHIF<sup>R188A</sup>/pBI221*、*NNK/pBI221*、*NKK/pBI221*、*NKN/pBI221*、*KKN/pBI221*、*KNN/pBI221*、*KNK/pBI221* を 1-1-7-6) と同様の方法で、イネプロトプラストに導入し、12 時間後の死細胞の割合を測定した。

### 3-1-5 Y2H 法による NRHIF と相互作用するイネタンパク質の探索

#### 1) 酵母 Y2HGold 株のコンピテントセル作製

グリセロールストック状態で保存していた Y2HGold 株を YPAD 固体培地に画線し、30°C で 3 日間培養した。直径約 2.0 mm のシングルコロニーを選び、3.0 ml の YPAD 液体培地に植菌し、30°C、200 rpm でおよそ 8 時間振盪培養して前々培養を行った後、この前々培養液を 100 倍希釈して分光光度計で OD<sub>600</sub> を測定し、前述の計算式から、1.0 μl 当たりの菌体数を  $8 \times 10^6 \sim 9.6 \times 10^6$  cfu/ml になるように 50 ml の YPAD 液体培地に添加し、30°C、200 rpm で前培養を行った。OD<sub>600</sub> 測定結果結果が 0.15~0.2 になるまでおよそ 12 時間~16 時間振盪培養した後、800×g、室温で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。得られた酵母のペレットを 1.0 ml の YPAD 液体培地で懸濁し、100 ml の YPAD 液体培地に全量加え、30°C、200 rpm で震盪培養した。OD<sub>600</sub> 測定結

果が 0.4~0.5 になるまでおよそ 3 時間~5 時間振盪培養し、50 ml ファルコンチューブに移し、800×g 室温で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。得られたペレットを 25 ml の滅菌水に再懸濁し、800×g 室温で 5 分間遠心分離した後、上清を取り除き、得られたペレットに 1.1×TE/酢酸リチウム (11 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 0.1 M CH<sub>3</sub>COOLi · 2H<sub>2</sub>O [Wako]) 1.0 ml を加えて懸濁し、新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し、800×g 室温で 5 秒間遠心分離した。上清を取り除き、1.1×TE/酢酸リチウム 1.0 ml に再懸濁し、新しいチューブに 100 μl ずつ分注してコンピテントセルを得た。

## 2) 酢酸リチウム法による酵母の形質転換

Y2HGold 株コンピテントセル 100 μl に *NRHIF/pGBKT7* または *KRHIF/pGBKT7* ベクター 1 μg を加え混合した。0.1 ng/ml carrier DNA (invitrogen) を 25 μl と PEG/酢酸リチウム溶液 (40% PEG 3,350 [SIGMA], 10 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 M CH<sub>3</sub>COOLi · 2H<sub>2</sub>O) を 600 μl 加え、vortex でよく混合し、30°C で 30 分間震盪した。その後、70 μl の DMSO を添加し転倒混和後、42°C で 15 分間ヒートショックを行った。ヒートショック後、氷上に 1 分間静置し、800×g、室温で 5 秒間遠心分離し、上清を取り除き、1 ml の YPAD 培地で懸濁した後、30°C で 90 分間振盪した。その後、800×g、室温で 5 秒間遠心分離した後、YPAD 培地を除き、滅菌水 100 μl に懸濁した。酵母の懸濁液を synthetic complete (SC) /-Trp 培地にプレーティングし、30°C で 3 日間静置培養することで *NRHIF/pGBKT7* または *KRHIF/pGBKT7* を保持した酵母 Y2HGold 株を得た。

### < SC/-Trp 培地 >

#### ・ 組成

Yeast nitrogen base without amino acids (BD)	1.34 g
Glucose	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
超純水 (Ultra pure water)	200 ml

\* 固体培地の場合、4 g の Agar を加える

< 20 × Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura) >

・ 組成

L-Arginine (Wako)	0.4 g
L-Methionine	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

< 100 × Ura >

・ 組成

Uracil (Wako)	0.2 g
超純水	100 ml

< 100 × His >

・ 組成

L-Histidine (Wako)	0.2 g
超純水	100 ml

< 100 × Leu >

・ 組成

L-Leucine (Wako)	0.2 g
超純水	100 ml

3) *NRHIF/pGBKT7* および *KRHIF/pGBKT7* の自律的な転写活性化能の確認

*NRHIF/pGBKT7* または *KRHIF/pGBKT7* を保持した酵母 Y2HGold 株を OD<sub>600</sub> が 1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> になるように希釈し、それぞれ SC/-Trp、SC/-His/-Trp、SC/-Ade/-His/Trp 培地に 2 μl ずつ滴下して 30°C で 3 日間培養した。

< SC/-His/-Trp 培地 >

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

< SC/-Ade/-His/-Trp 培地 >

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

4) 一次スクリーニング

自律活性が無いことが確認された Bait vector (*NRHIF/pGBKT7*) を持った Y2HGold 株のコロニーを SC/-Trp 液体培地 50 ml に植菌し、OD<sub>600</sub> の値が 0.7 になるまで (約 20 時間)、30°C、150 rpm で振盪培養した。培養液を 1,000×g で 5 分間遠心し、上清を捨て、前述の計算式を用いて細胞密度が 1×10<sup>8</sup> cfu/ml 以上になるように、SC/-Trp 液体培地 (4~5 ml) を加えて細胞を懸濁し、この懸濁液 4~5 ml とイネ cDNA ライブラリーを含む Y187 株 1 ml を乾熱滅菌した 1 L 三角フラスコに入れ、2×YPAD 液体培地 (50 µg/ml kanamycin 含有) 45 ml を加えた。また、ライブラリーバイアルも 2×YPAD 液体培地 (50 µg/ml kanamycin 含有) 1 ml で 2 回すすぐことで細胞を回収し、それを全て 1 L 三角フラスコに加えた。30°C、30~50 rpm で 20 時間振盪培養した後、その培養液を 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。接合子の形成を確認した後、培養液全量を 1,000×g で 10 分間遠心分離し、上清を捨てた。また、1 L 三角フラスコを 0.5×YPAD 液体培地 (50 µg/ml kanamycin 含有) ですすぎ、そのすすぎ液を沈殿した細胞に加え、再び遠心分離した。その操作を 2 回行った後、沈殿し

た細胞に 0.5×YPAD 液体培地（50 μg/ml kanamycin 含有）を 10 ml 加えて細胞を懸濁した。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、細胞懸濁液の一部を取り、10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍の希釈液を作成し、各細胞希釈液 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。培養後、各培地の細胞数をカウントし、接合効率及びスクリーニングされた細胞数を以下の計算式を元に算出した。残りの細胞懸濁液を SC/-His/-Leu/-Trp 培地に 100 μl ずつプレーティングし、30°C で 3 日間培養した。

< SC/-Leu 培地 >

・ 組成

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

< SC/-Leu/-Trp 培地 >

・ 組成

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

<SC/-His/-Leu/-Trp 培地>

・ 組成

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

<計算式>

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

スクリーニングした細胞数 = 二倍体の cfu/ml × 細胞懸濁液の体積 (ml)

5) 二次スクリーニング

一次スクリーニングで得られたコロニーを 25 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranoside (X-α-gal) を含む SC/-His/-Leu/-Trp/X-α-gal 培地と SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地にそれぞれ画線し、30°Cで3日間培養した。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	1.34 g
Glucose	4 g
20 × Drop-out mixture (-Ade/-His/-Leu/-Trp/-Ura)	10 ml
100 × Ura	2 ml
超純水	200 ml

6) 候補クローンが保持する Prey ベクターの cDNA 領域の配列決定

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

ローソゲルで電気泳動を行い、250 bp 以上のシングルバンドの増幅が確認できた PCR 産物に Exo-star 処理を行った。処理後、pGADT7-Rec-F または pGADT7-Rec-R プライマーを用いて 1-1-4-3) の方法に従いサイクルシーケンス反応を行なった。得られたシーケンスのデータは GENETYX MAC ver. 15 ATSQ で解析し、cDNA 領域の塩基配列およびアミノ酸配列を得た。

#### <コロニーPCR 反応>

##### ・組成

KOD One	5.0 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M)	0.3 $\mu$ l
酵母懸濁液	1.0 $\mu$ l
滅菌水	3.4 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

##### ・反応条件

96°C	2 min	
98°C	10 sec	} 30 cycles
68°C	10 sec	
25°C	$\infty$	

・ Prey ベクターの cDNA 領域の増幅用およびサイクルシーケンス反応に用いたプライマー

pGADT7-Rec-F : 5'-CTTTAATACGACTCACTATAGGGCG-3'

pGADT7-Rec-R : 5'-CGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'

### 3-1-6 BiFC 法を用いたイネ細胞内における NRHIF と候補タンパク質の相互作用解析

#### 1) タンパク質の細胞内局在確認

NRHIF と RIP1、RIP2、RIP3 のイネ細胞内局在を確認するため、Venus 融合タンパク質を発現させるベクター *NRHIF-Venus/pBI221* (中村, 2017)、*RIP1-Venus/pBI221*、*RIP2-Venus/pBI221*、*RIP3-Venus/pBI221* を 1-1-7-6) と同様の方法でイネプロトプラストに導

入した。*RIP1-Venus/pBI221*、*RIP2-Venus/pBI221*、*RIP3-Venus/pBI221* は長浜バイオ大学植物分子環境生理学研究室の神村氏から譲渡されたものを用いた。導入して 12 時間後のイネプロトプラスト懸濁液をスライドガラスに適量 (約 20  $\mu$ l) のせ、カバーガラスをかけて共焦点顕微鏡で観察した。

## 2) BiFC 法による相互作用解析

NRHIF と RIP1、RIP2、RIP3 の相互作用解析を行うため、NRHIF と Venus タンパク質の N 末端側 (VN) 融合タンパク質を発現するベクター *NRHIF-VN/pBI221* (中村, 2017) と RIP1、RIP2、RIP3 と Venus タンパク質の C 末端側 (VC) 融合タンパク質を発現するベクター *RIP1-VC/pBI221*、*RIP2-VC/pBI221*、*RIP3-VC/pBI221* を 1-1-7-6) と同様の方法で、同時にイネプロトプラストに導入した。*RIP1-VC/pBI221*、*RIP2-VC/pBI221*、*RIP3-VC/pBI221* は長浜バイオ大学植物分子環境生理学研究室の神村氏から譲渡されたものを用いた。導入して 12 時間後のイネプロトプラスト懸濁液をスライドガラスに適量 (約 20  $\mu$ l) のせ、カバーガラスをかけて共焦点顕微鏡で観察した。

### 3-1-7 CRISPR/Cas9 法による候補遺伝子欠損イネの作製

#### 1) アグロバクテリウムへの *RIP1/pRGEB31* および *RIP3/pRGEB31* の導入

*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株のコンピテントセルは 1-1-5-2) と同様の方法で作製した。コンピテントセル 50  $\mu$ l に作製した *RIP1/pRGEB31*、*RIP3/pRGEB31* を 0.1  $\mu$ g 加え、穏やかに攪拌した。これを氷冷したキュベットに移し、Gene Pulser を用いて電圧 1.25 kv、電気容量 25  $\mu$ F、キュベット抵抗 200  $\Omega$  でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、SOC 培地 1 ml をキュベットに注ぎ懸濁し、チューブに移した。30°C、1.5 h で振盪培養を行った後、LB 寒天培地 (50  $\mu$ g/ml kanamycin 含有) にプレーティングし、遮光下 30°C で 2 日間培養した。培養後、kanamycin 含有培地上で生育が確認できたコロニーを LB 液体培地 (50  $\mu$ g/ml kanamycin 含有) 30 ml に植菌し、28°C で一晩振盪培養した。その後 800  $\times$  g、5 min、4°C 遠心分離を行い、菌体ペレットを回収後、HMFM (3.6 mM  $K_2HPO_4$ 、1.1 mM  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 、1 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、4.4% Glycerine、2.2 mM Na-citrate) 5 ml に懸濁した。チューブに 500  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素中で凍結させ -80°C で保存し、HMFM ストック菌体保存液とした。

#### 2) イネカルスの作製

キンマゼの種子の米殻を取り除き、50 ml チューブへ移し、超純水で 3 回洗浄した

後、70%エタノール中で3分間振盪することでイネ種子表面の親水処理を行い、1%次亜塩素酸ナトリウムに浸し、1時間振盪することで滅菌操作を行った。滅菌水で3回洗浄した後、滅菌した濾紙でなるべく水分を除き、胚が上向きになるように2N6培地 (28 mM KNO<sub>3</sub>, 3.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.74 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 20 nM MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 5.2 nM ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 25.9 nM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4.8 nM KI, 2 ng/l Glycine, 1 ng/l Thiamin Hydrochloride, 0.5 ng/l Nicotinic Acid, 0.05 ng/l Pyridoxine Hydrochloride, 20.1 μM EDTA · 2Na, 19.8 μM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.03% [w/v] Acid Hydrolysate of Casein [Wako], 0.28% [w/v] L(-)-Proline, 3% [w/v] Sucrose, 36 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.4% [w/v] Gellan Gum [Wako]) に乗せ、30°C、連続光下で4週間静置培養した。

### 3) アグロバクテリウムのイネカルスへの感染

感染3日前に2N6培地上のカルスを前培養培地に移し30°C、連続光下で培養した。前培養培地はMS培地 (1 pack/l Murashige and Skoog Plant Salt Mixture [日本製薬], 2 ng/l Glycine, 1 ng/l Thiamin Hydrochloride, 0.5 ng/l Nicotinic Acid, 0.5 ng/l Pyridoxine Hydrochloride, 2% [w/v] Sucrose, 36 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.9% [w/v] Agarose Type 1 [Sigma-Aldrich]) 20 ml に対し、植え継ぎ7日目のOc細胞2 mlを無菌的に加えたものである。また、*RIP1/pRGEB31*、*RIP3/pRGEB31*を導入したアグロバクテリウムのHMFMストック菌体保存液をAB培地 (17.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl, 18.7 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2 mM KCl, 91 μM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 9 μM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) にプレーティングし、遮光下22°Cで3日間静置培養した。AB培地上に生育したアグロバクテリウムを一部掻き取り、アグロバクテリウム感染液体培地 (0.4% [w/v] Acetosyringone 含有前培養培地) に OD<sub>600</sub>=0.01~0.04 になるように懸濁した。感染当日、前培養培地上のカルスを50 ml チューブに移し、ここに上記で調整したアグロバクテリウム感染液体培地を5~6 ml 加え軽く攪拌し、5 min、室温で静置した。カルスから滅菌した濾紙を用いてなるべく水分を除いた後、感染個体培地に移し遮光下、22°Cで3日間静置培養した。

### 4) 形質転換体カルスの選抜

感染から3日後のカルスを50 ml チューブに移し、250 μl/ml クラフォラン溶液で数回洗浄した。カルスから滅菌した濾紙を用いてなるべく水分を除いた後、細かくほぐしながら一次選抜培地 (50 ng/l Hygromycin, 500 ng/l クラフォラン含有2N6培地) に移し、連続光下、30°Cで3週間静置培養した。一次選抜培地上で生育してきたカル

スを二次選抜培地（50 ng/l Hygromycin, 250 ng/l クラフォラン, 3% [w/v] D-sorbitol [Wako], 0.4% [w/v] Agarose Type 1 含有 R2S 培地）に移し、連続光下、30°Cで2週間静置培養した。2週間後、新しい二次選抜培地に移し、同条件で2週間静置培養した。

#### 5) 形質転換体カルの再分化と発根

二次選抜終了後、生育した形質転換体カスを再分化培地（1 pack/l Murashige and Skoog Plant Salt Mixture, 1% [w/v] Murashige and Skoog Vitamin powder, 2% [w/v] Sucrose, 1 mg/l 1-Naphthlacetic acid, 0.2% [w/v] 6-Benzyladenine, 50 ng/l Hygromycin, 250 ng/l クラフォラン, 0.9% [w/v] Gellan Gum）に移し、連続光下、30°Cで3週間静置培養した。その後、再分化体を発根培地（1 pack/l Murashige and Skoog Plant Salt Mixture, 2 ng/l Glycine, 1 ng/l Thiamin Hydrochloride, 0.5 ng/l Nicotinic Acid, 0.05 ng/l Pyridoxine Hydrochloride, 0.03% [w/v] Acid Hydrolysate of Casein, 3% [w/v] Sorbitol, 3% [w/v] Sucrose, 0.4% [w/v] Gellan Gum）に移し、同条件で3週間静置培養した。

#### 6) イネ植物体からの DNA 抽出

再分化したイネの葉を約5cm切り取り、ジルコニアビーズを1目盛り分（100 mm<sup>3</sup>分）入れた破碎用チューブに移し、DNA 抽出 buffer（200 mM Tris-HCl pH7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS）を350 µl 加え、Bead Smash 12 にセットし5,000 rpm で60秒破碎した。破碎液にさらにDNA 抽出 buffer を350 µl 加え3,000×g 室温で2分間遠心分離を行った。新しいチューブに遠心分離して得た水層約400 µl を移し、10,000×g 室温で2分間遠心分離を行った後、上清約400 µl を新しいチューブに移した。60°Cで20分加熱し、クロロホルム/イソアミルアルコール500 µl を加えシーソーシェイカーで5分間混和した後、10,000×g 室温で5分間遠心分離を行った。新しいチューブに水層を移し、2-プロパノール500 µl 加え転倒混和した後、10,000×g 室温で10分間遠心分離を行った。上清の除去後、70%エタノールを1ml 加えてリンスし、10,000×g 室温で5分間遠心分離を行った。上清を除去し、沈殿の減圧乾燥を行い、TE buffer 50 µl に懸濁した。

#### 7) 形質転換体植物の遺伝子欠損の確認

再分化した植物のゲノムに *pRGEB31* の T-DNA 領域が存在しているかどうかを確認するため、抽出した DNA をテンプレートにハイグロマイシン耐性遺伝子を増幅するプライマーセット（HPT-F、HPT-R）を用いてPCRを行った。PCRによってハイグロマイシン耐性遺伝子の増幅が確認できた個体の DNA をテンプレートに、*RIP* 遺伝

子周辺で設計したプライマーセット (IP1-check-F、IP1-check-R、IP3-check-F、IP3-check-R) を用いて PCR を行った。この増幅産物を 1.25%アガロースゲルで電気泳動し、予想通りの増幅産物が確認されたら、Zero Blunt PCR Cloning Kit を用いて、得られた PCR 産物と *pCR-Blunt* ベクターとのライゲーションを行った。このライゲーション産物をハナハン法で大腸菌 DH5 $\alpha$  コンピテントセルに導入し、50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  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、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を用いて、コロニー PCR でインサートの確認を行った。コロニーPCR 産物を Exo-Star 処理後、1-1-4-3) と同様の方法でインサートの配列を解析することで、*RIP* 遺伝子の変異の有無を調べた。

#### <PCR 反応液>

##### ・組成

2×KOD-FX buffer	5 $\mu\text{l}$
2 mM dNTPs	2 $\mu\text{l}$
Primer F (10 $\mu\text{M}$ )	0.3 $\mu\text{l}$
Primer R (10 $\mu\text{M}$ )	0.3 $\mu\text{l}$
KOD-FX	0.1 $\mu\text{l}$
テンプレート DNA (50 ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
滅菌水	1.2 $\mu\text{l}$
Total	10 $\mu\text{l}$

##### ・反応条件

96°C	2 min	
98°C	30 sec	} 30 cycles
68°C	1 min	
25°C	$\infty$	

##### ・ハイグロマイシン耐性遺伝子を増幅するプライマー

HPT-F : 5'-GAGCCTGACCTATTGCATCTCC-3'

HPT-R : 5'-GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG-3'

・ *RIP1* 遺伝子の欠損確認のため用いたプライマー  
IP1-check-F : 5'-TTAGCTCAAGACACTGGCGG-3'  
IP1-check-R : 5'-ATGGAGCGGTATACGGTTGG-3'

・ *RIP3* 遺伝子の欠損確認のため用いたプライマー  
IP3-check-F : 5'-ACCCATCTCACCAGACCACA-3'  
IP3-check-R : 5'-CAGATCACGGGGAGGTTCTC-3'

*pCR-Blunt* 上に存在するインサートを増幅するプライマー  
NeoM13-F : 5'-CGTTGTAAACGACGGCCAG-3'  
NeoM13-R : 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

#### 8) 対立遺伝子の両方に変異を持つホモ接合変異体の作製

*RIP1* または *RIP3* 遺伝子の変異が確認できた再分化体 (F0 世代) を、びわこ培土 2 号の入った 20 L ワグネルポットに植え替え、温室内で 30°C、自然光下で約 3 ヶ月間生育させた。出穂したら、穂に袋がけを行い、自家受粉によってできた種子 (F1 世代) を得た。F1 世代の植物は 1-1-1-2) の条件で生育させ、3-1-6-6) と同様の方法で、T-DNA 領域が組み込まれているか、目的の遺伝子に変異を持つかどうかを確認した。

#### 3-1-8 N1141 菌株を接種した候補遺伝子欠損イネにおける細胞死の検出

2 週間生育させた *RIP1* または *RIP3* 遺伝子欠損イネの葉鞘を剃刀で約 100  $\mu\text{m}$  にスライスした後、葉片を 24 穴プレートに入れ、そこに滅菌水または  $10^9$  cfu/ml に調製した N1141 菌株を 800  $\mu\text{l}$  接種した。30°C で 6 時間静置した後、菌液を除き、0.1% エバンスブルーを用いて遮光下で 15 分染色した。滅菌水で 5 回洗浄した後、スライドガラスに乗せて顕微鏡で観察し、死細胞数を測定した。

#### 3-1-9 NRHIF によって誘導される細胞死への EGTA の影響

イネ培養細胞に NRHIF を発現させたとき誘導される細胞死に、カルシウムイオンが関与するかどうか調べた。1-1-7-8) と同様の方法で、パーティクルボンバードメント法を用いて *NRHIF/pBI221* 5  $\mu\text{g}$  と *GUS/pAHC25* 5  $\mu\text{g}$  を同時にイネ培養細胞に導入した後、カルシウムキレート剤である 2 mM EGTA を含む R2S 液体培地 1 ml にイネ培

養細胞を移し、これを 30°C、108 rpm 遮光下で 12 時間培養した。培養後、R2S 培地を除き、GUS 染色液（50 mM Phosphate Buffer [pH7.2], 0.5 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0.5 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$ , 1 mM X-Gluc）1 ml を加え、37°C 暗黒下で 12 時間染色し、写真を撮影した。

### 3-1-10 OsCPK8 と NRHIF または KRHIF との相互作用解析

#### 1) Y2H 法による酵母内での相互作用解析

OsCPK8 が NRHIF または KRHIF と酵母内で相互作用するかどうか調べるため、Bait ベクター (*NRHIF/pGBKT7* または *KRHIF/pGBKT7*) を保持した Y2HGold 株に 3-1-5-2) と同様の方法で Prey ベクター (*OsCPK8/pGADT7*) を導入した。*OsCPK8/pGADT7* は長浜バイオ大学植物分子環境生理学研究室の神村氏から譲渡されたものを用いた。両ベクターの保持が確認できた酵母を OD<sub>600</sub> が 1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  になるように希釈し、SC/-Leu/-Trp 培地、SC/-His/-Leu/-Trp 培地、SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地にそれぞれ 2  $\mu$ l ずつスポットし、30°C で 3 日間培養した。

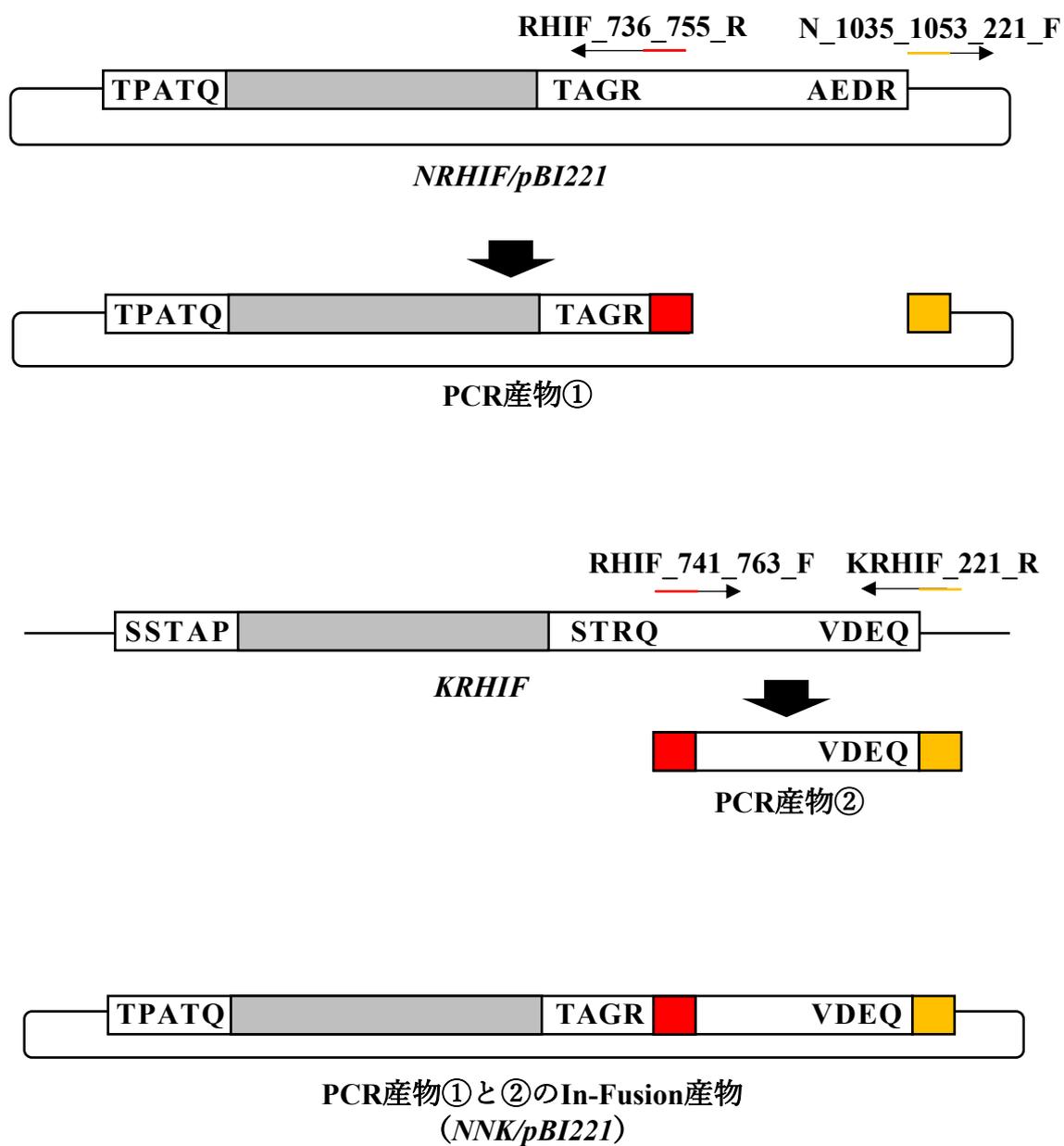
#### 2) BiFC 法によるイネ細胞内での相互作用解析

OsCPK8 が NRHIF または KRHIF とイネ細胞内で相互作用するかどうか調べるため、*NRHIF-VN/pBI221* または *KRHIF-VN/pBI221* (中村, 2017) と OsCPK8 と VC の融合タンパク質を発現するベクター *OsCPK8-VC/pBI221* を、1-1-7-6) と同様の方法で同時にイネプロトプラストに導入した。*OsCPK8-VC/pBI221* は長浜バイオ大学植物分子環境生理学研究室の神村氏から譲渡されたものを用いた。導入して 12 時間後のイネプロトプラスト懸濁液をスライドガラスに適量 (約 20  $\mu$ l) のせ、カバーガラスをかけて共焦点顕微鏡で観察した。

	1	25	198	350 a.a.
NRHIF	TPATQ		TAGR	AEDR
KRHIF	SSTAP		STRQ	VDEQ
NNK	TPATQ		TAGR	VDEQ
NKK	TPATQ		STRQ	VDEQ
NKN	TPATQ		STRQ	AEDR
KKN	SSTAP		STRQ	AEDR
KNN	SSTAP		TAGR	AEDR
KNK	SSTAP		TAGR	VDEQ

**Fig. C KRHIFとNRHIFの部位置換タンパク質の構造**

グレーボックスはp-loop NTPaseドメインと推定される部分を示す。



**Fig. D NNKを発現用ベクターの作製**

赤またはオレンジの同じ色で示された部分は、同じDNA配列であることを示す。グレーボックスはp-loop NTPaseドメインと推定される部分を示す。

## 3-2 結果

### 3-2-1 *NRHIF*<sup>R188A</sup> および *KRHIF*<sup>R188A</sup> を発現したイネプロトプラストの過敏感細胞死

NRHIF および KRHIF はその分子内に NTPase ドメインを持つ。この NTPase ドメインが NRHIF および KRHIF によるイネとシコクビエに対する過敏感細胞死誘導に関与するのかを調べるため、NTPase ドメインを持ち、酵素活性や構造が明らかになっている大腸菌の *N*<sup>6</sup>-isopentenyltransferase (MiaA) (Chimnaronk et al., 2009) とアミノ酸配列を比較した。その結果、MiaA の活性中心であると報告されている 167 番目のアルギニンが、NRHIF や KRHIF でも 188 番目のアルギニンとして保存されていた (Fig. 17)。そこで、NRHIF や KRHIF の NTPase としての活性がイネの過敏感細胞死誘導に関与するかどうか調べるため、188 番目のアルギニンをアラニンに置換した *NRHIF*<sup>R188A</sup> および *KRHIF*<sup>R188A</sup> を作製し、イネプロトプラストで発現させ、誘導される死細胞を調べた。その結果、*NRHIF* や *NRHIF*<sup>R188A</sup> を発現したイネプロトプラストの死細胞の割合は 80%を超えていた (Fig. 18)。一方、*KRHIF* や *KRHIF*<sup>R188A</sup> を発現した場合は 30%以下だった。これらのことから、NRHIF によるイネの過敏感細胞死誘導に NTPase 活性は必要ないことが明らかになった。

### 3-2-2 *NRHIF* と *KRHIF* の部位置換タンパク質を発現したイネプロトプラストの過敏感細胞死

NTPase 活性中心は NRHIF によるイネの過敏感細胞死誘導に関与しないことが示されたので、NRHIF と KRHIF のどの部分がイネの過敏感細胞死誘導の特異性を制御しているのかを明らかにするため、イネ過敏感細胞死を誘導しない KRHIF との部位置換タンパク質をイネに発現させ、過敏感細胞死誘導を調べた。各 RHIF を N 末端付近、中央付近、C 末端付近の 3 つの領域に分け合計 6 種類の部位置換タンパク質を作製し (NNK、NKK、NKN、KKN、KNN、KNK) (Fig. C)、イネプロトプラストに発現させた。その結果、死細胞の割合は、NRHIF では 69%、KRHIF では 27%であるのに対し、NNK では 95%、NKK では 31%、NKN では 41%、KKN では 34%、KNN では 80%、KNK では 40%だった。以上のように、NRHIF と同等以上の細胞死を誘導したのは、NNK と KNN であることからイネの過敏感細胞死誘導には NRHIF の中央付近が必要であることが示された。一方、中央部分を持つ KNK では細胞死誘導率が 40%とそれほど高くなかったことから、NRHIF の中央領域の活性には N 末端あるいは C 末端が

必要であることが示唆された。

### 3-2-3 NRHIF と相互作用するイネタンパク質の同定

#### 1) Bait ベクターの自律的転写活性の確認

NRHIF と相互作用するイネタンパク質を Y2H 法で同定するために、まず作製した Bait ベクターの自律的な転写活性化能を調べた。*NRHIF/pGBKT7* および *KRHIF/pGBKT7* を導入した酵母 Y2HGold 株を SC/-Trp、SC/-His/-Trp、SC/-Ade/-His/Trp 培地に 1  $\mu$ l ずつ滴下して 30°C で 3 日間培養した。その結果、*NRHIF/pGBKT7* および *KRHIF/pGBKT7* を保持した酵母は SC/-Trp 培地において生育したが、SC/-His/-Trp、SC/-Ade/-His/Trp 培地では生育しなかった (Fig. 20)。このことから、*NRHIF/pGBKT7* および *KRHIF/pGBKT7* は自律的な転写活性を持たないことが示され、これを Bait として用いた Y2H 法によるスクリーニングが可能であることがわかった。

#### 2) Y2H 法による NRHIF と相互作用するイネタンパク質のスクリーニング

NRHIF によるイネの過敏感細胞死誘導機構を明らかにするため、NRHIF 全長と相互作用するイネタンパク質を Y2H 法を用いて探索した。まず、Bait ベクター (*NRHIF/pGBKT7*) を導入した Y2HGold 株と Prey ベクター (*pGADT7-Rec-cDNA*) を導入した Y187 株を接合させた。接合効率及び検定した細胞数を求めるために、10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍に希釈した酵母懸濁液 100  $\mu$ l を SC/-Trp、SC/-Leu、SC/-Leu/-Trp 培地にプレーティングした。その結果、10,000 倍希釈した細胞懸濁液をプレーティングした SC/-Trp 培地では 1,502 個のコロニーが得られたことから、Bait 菌体の数は約  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml となった。1,000 倍希釈した細胞懸濁液をプレーティングした SC/-Leu 培地では 882 個のコロニーが得られたことから、Prey 菌体の数は約  $8.8 \times 10^7$  cfu/ml となった。100 倍希釈した細胞懸濁液をプレーティングした SC/-Leu/-Trp 培地では 1,149 個のコロニーが得られたことから、接合して得られた二倍体の数は  $1.1 \times 10^6$  cfu/ml となった。数が少なかった Prey 株が Limited partner となるため、接合効率は約 13% であり、スクリーニングに用いた細胞懸濁液の体積は 10 ml であったため、検定した細胞数は約  $2.6 \times 10^7$  cfu となった。

次に、Y2HGold 株と Y187 株の接合体を SC/-His/-Leu/-Trp 培地にプレーティングし、一次スクリーニングを行った結果、1,745 個のコロニーが得られた。得られた 1,745 個のコロニーのうち、400 個のコロニーを SC/-His/-Leu/-Trp/+X- $\alpha$ -gal 培地と SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地に植菌することで、二次スクリーニングを行った。400 個のコロニ

ーのうち、SC/-His/-Leu/-Trp/+X- $\alpha$ -gal 培地で青く呈色し、かつ SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地で生育したコロニーは 300 個であった。そこで、これらのうち 124 個のコロニーをテンプレートに PCR を行ったところ、64 個のコロニーから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て、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、NRHIF と相互作用するタンパク質として 40 種類のイネタンパク質を同定した (Table 1)。これらの 40 種類の候補タンパク質のうち、Cinnamyl alcohol dehydrogenase と Pyruvate decarboxylase isozyme は植物の免疫に関与するタンパク質として報告されていた (Rong et al., 2016, Tadege et al., 1998)。また、Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein は NCBI データベースにおいてイネの細胞死関連の mRNA として登録されていた。このことから、Cinnamyl alcohol dehydrogenase を RHIF-interacting protein (RIP) 1、Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein を RIP2、Pyruvate decarboxylase isozyme を RIP3 と名付け、これら 3 つのタンパク質についてさらなる研究を進めることにした。

### 3) BiFC 法による NRHIF および KRHIF と RIP1、RIP3 との相互作用解析

NRHIF と RIP1、RIP2、RIP3 の全長がイネ細胞内で実際に相互作用するかどうかを、BiFC 法により調べることにした。まず、各タンパク質がイネ細胞内のどこに存在しているのかを調べた。NRHIF および RIP1、RIP2、RIP3 の C 末端側に Venus 蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を発現するベクターをイネプロトプラストに導入し、12 時間後、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、NRHIF-Venus/pBI221 を導入したイネプロトプラストでは核と細胞質で蛍光が観察された (Fig. 21)。また、RIP1-Venus/pBI221 を導入したイネプロトプラストでは細胞質で、RIP3-Venus/pBI221 を導入したイネプロトプラストでは核と細胞質で蛍光が観察された。これらのことから NRHIF-Venus および RIP3-Venus は核と細胞質に、RIP1-Venus は細胞質に局在することが示された。一方、RIP2-Venus/pBI221 を導入したイネプロトプラストでは蛍光が観察されず、細胞内局在部位は確認できなかった (data not shown)。

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

れた (Fig. 22)。このことから、NRHIF は RIP1、RIP3 とイネプロトプラスト内で実際に相互作用することが明らかとなった。

さらに、KRHIF が RIP1、RIP3 とイネ細胞内で相互作用するかどうかを、同様の方法で調べた。まず、KRHIF がイネ細胞内のどこに存在しているのかを Venus 融合タンパク質を用いて調べたところ、*KRHIF-Venus/pBI221* を導入したイネプロトプラストでは核と細胞質で蛍光が観察されたことから (Fig. 23)、KRHIF-Venus は核と細胞質に局在することが示された。次に、KRHIF と VN 融合タンパク質を発現するベクター (*KRHIF-VN/pBI221*) と RIP1、RIP3 と VC 融合タンパク質を発現するベクター (*RIP1-VC/pBI221*、*RIP3-VC/pBI221*) をイネプロトプラストに同時導入し、Venus 由来の蛍光を観察した結果、*KRHIF-VN/pBI221* と *RIP1-VC/pBI221*、*RIP3-VC/pBI221* を導入したイネプロトプラストの細胞質で蛍光が観察された (Fig. 24)。このことから、KRHIF は NRHIF と同じく RIP1、RIP3 とイネプロトプラスト内で相互作用することが明らかとなった。

### 3-2-4 N1141 菌株による *RIP1*、*RIP3* 遺伝子変異イネの過敏感細胞死誘導

#### 1) CRISPR/Cas9 法による *RIP1*、*RIP3* 遺伝子変異イネの作製

ソフトウェア CRISPRdirect により各遺伝子の gRNA 配列を設計したところ、全長 1,140 bp の *RIP1* 遺伝子は 57 と 58 番目の塩基の間を、1,818 bp の *RIP3* 遺伝子は 29 と 30 番目の塩基の間を Cas9 により切断することに決定した。設計した gRNA を持つ *pRGEB31* をアグロバクテリウムに導入し、これをイネカルスに感染させ、ハイグロマイシンにより二回の選抜を行った。その後、選抜されたカルスを再分化させることで植物体を獲得した。再分化した植物体で目的の遺伝子に変異しているか調べるため、植物体から抽出した DNA をテンプレートに *RIP1*、*RIP3* 遺伝子周辺に設計したプライマーセットを用いて PCR を行った。PCR 産物を Zero Blunt PCR Cloning Kit を用いてクローニングし、それぞれのインサート配列を解析することで、各 *RIP* 遺伝子の変異の有無を調べた。その結果、*RIP1* については選抜した 10 個体のうち 2 個体で変異が認められたので、この 2 個体をそれぞれ *RIP1-2*、*RIP1-9* と名付けた。配列解析の結果、*RIP1-2*、*RIP1-9* はともに 58 番目に T が挿入された 1 塩基挿入変異であり、この変異を片方の対立遺伝子で持つヘテロ接合変異体だった。この 1 塩基挿入によってフレームシフトが起こり、141 塩基目で終止コドンが出現する。*RIP3* については選抜した 3 個体のうち全てに変異が認められたので、この 3 個体をそれぞれ *RIP3-1*、*RIP3-2*、*RIP3-3* と名付けた。配列解析の結果、*RIP3-1* からは 27 番目に 3 塩基欠損、30 番

目に A の 1 塩基挿入の 2 種類の配列が得られた。1 塩基の挿入があった場合はフレームシフトが起こり、270 番目の塩基で終止コドンが出現する。RIP3-2 からは 30 番目に T の 1 塩基挿入と A の 1 塩基挿入の二種類の配列が得られ、両方の対立遺伝子に異なる塩基が挿入された変異体であることが示された。RIP3-3 からは野生型遺伝子の配列と、18 番目に 15 塩基欠失、30 番目の 1 塩基挿入の 3 種類の配列が得られた。

次に、対立遺伝子の両方に変異を持つホモ接合変異体であり、さらに *pRGE31* の T-DNA 領域を持たないイネを得るため、RIP1-2 と RIP3-1 をそれぞれ自殖させた。自殖により得られた F1 世代の植物から抽出した DNA をテンプレートに PCR を行った結果、ハイグロマイシン耐性遺伝子に設計したプライマーセットで増幅産物が認められず、さらに対立遺伝子の両方に変異を持つ個体として、RIP1 遺伝子では *rip1-2-4* が、RIP3 遺伝子では *rip3-1-11* と名付けた個体を得られた (Fig. 25A)。

## 2) N1141 菌株を接種した *rip1-2-4* および *rip3-1-11* における過敏感細胞死

RIP1 および RIP3 がイネの過敏感細胞死誘導に関与するのか調べるため、作製した RIP1 遺伝子変異イネ *rip1-2-4* および RIP3 遺伝子変異イネ *rip3-1-11* の葉鞘切片に N1141 菌株を接種し、6 時間後にエバンスブルーで染色することで死細胞を確認した。その結果、N1141 菌株を野生型の Kinmaze 植物に接種した場合、死細胞の割合は 93% であり、*rip1-2-4* では 87%、*rip3-1-11* では 91% だった (Fig. 25B, C)。*rip1-2-4* および *rip3-1-11* では Kinmaze 野生株と同程度の細胞死が誘導されたことから、RIP1 および RIP3 遺伝子は N1141 菌株による過敏感細胞死誘導には関与しないことが明らかになった。

### 3-2-5 EGTA 処理による NRHIF 誘導性細胞死の阻害

序論で述べたように、イネの過敏感細胞死誘導には細胞内へのカルシウムイオンの流入と、それによる OsCPK8 の活性化が必要であることが明らかになっている (Fujiwara et al, 2004; Kamimura et al., 2014)。そこで次に、NRHIF によるイネの過敏感細胞死にカルシウムイオンが関与するかどうか調べることにした。

NRHIF 遺伝子と GUS 遺伝子を導入したイネ培養細胞を、カルシウムイオンキレート剤である EGTA 含む培地で培養し、その後 GUS 染色を行った。イネの細胞死を誘導しないネガティブコントロールとして *Venus* 遺伝子と GUS 遺伝子を導入したイネ培養細胞でも GUS 染色を行ったところ、EGTA を含まない培地で培養した場合、*Venus* と GUS を導入したイネ培養細胞では青く染色されており、GUS 活性が認められた

(Fig. 26)。このことは、細胞が生存していることを示している。また、*NRHIF* と *GUS* を導入したイネ培養細胞で *GUS* 活性は認められないことから、*NRHIF* により細胞死が誘導されていることが示された。一方、*NRHIF* と *GUS* を導入したイネ培養細胞を EGTA 含有培地で培養した場合、*GUS* 活性が認められたことから、*NRHIF* によって誘導される過敏感細胞死は EGTA により阻害されることが明らかになった。

### 3-2-6 OsCPK8 と NRHIF または KRHIF との相互作用解析

*NRHIF* による過敏感細胞死誘導にカルシウムイオンが必要であったことから、*NRHIF* による過敏感細胞死誘導にも *OsCPK8* が関与する可能性が示された。そこで、*OsCPK8* と *NRHIF* または *KRHIF* との相互作用を Y2H 法で調べた。Bait ベクターと Prey ベクター両方を持つ酵母を SC/-His/-Leu 培地、SC/-His/-Leu/-Trp 培地、SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地にそれぞれ 2  $\mu$ l ずつスポットし、30°C で 3 日間培養した結果、SC/-His/-Leu/-Trp 培地において *OsCPK8* と *KRHIF* を発現した酵母の生育が認められた (Fig. 27)。一方、SC/-His/-Leu/-Trp 培地や SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培地において *OsCPK8* と *NRHIF* を発現した酵母の生育は認められなかった。このことから、*OsCPK8* は *KRHIF* とのみ相互作用することが明らかになった。

次に、BiFC 法を用いて *OsCPK8* と *KRHIF* がイネ細胞内でも実際に相互作用するかどうか確認した。*KRHIF* と VN 融合タンパク質を発現するベクター (*KRHIF-VN/pBI221*) と *OsCPK8* と VC 融合タンパク質を発現するベクター (*OsCPK8-VC/pBI221*) をイネプロトプラストに同時導入し、12 時間後、共焦点顕微鏡で BiFC 蛍光を観察した。その結果、イネプロトプラストの細胞質で蛍光が観察されたことから (Fig. 28)、*OsCPK8* と *KRHIF* はイネ細胞内で相互作用することが明らかになった。

```

NRHIF          1                               60
KRHIF          MSTPPSLPAAGAPATHLPRGTAAQALPACLALAGPTASGKTAGALALARALAPHRPVEIV
MiaA          MSSPSSLPAAGAPTTHLPRGAAAPALPACLALAGPTASGKTAGALALARALAPHRPVEIV
                -----MSDISKASLPKAIFLMGPTASGKTALAIELRKILP----VELI
                . : : ** . : * ***** * : * : * . **::

NRHIF          61                               120
KRHIF          SVDSALVYRGMDIGTAKPTAAEQAAVPHHLIDIRDPLQPYSAAEFVADAQRLVREIQARG
MiaA          SVDSALVYRGMDIGTAKPTAAEQAAVPHHLIDIRDPLQPYSAAEFVADAQRLVREIQARG
                SVDSALIYKMDIGTAKPNAEELLAAPHRLDIRDPSQAYSAADFRRDALAEMADITAAG
                *****:*.*****.* * *.**:*.* ** : : * * *

NRHIF          121                               180
KRHIF          ALPLLVGGMMLYFKALWDGIDMPPADA AVRARLEA QAAAEGWPALHAELARVDPPTAAR
MiaA          ALPLLVGGMMLYFKALWDGIDMPPADA AVRARLEA QAAAEGWPALHAELARVDPPTAAR
                RIPLLVGGMMLYFKALLEGLSPLPSADPEVRARIEQQAAEQGWESLHRQLQEVDPVAAAR
                :***** :*.: :*. **.* ** :** :** :* .*** :***

NRHIF          181                               240
KRHIF          LAPGDSQRIQRALEVWHVSGRPLSSFHTRAATS GNAADAGHGPMPLFSLEPQDRAWLHER
MiaA          LAPGDSQRIQRALEVWHVSGRPLSSFHTRAASSGNAADTRHGPMPLFSLEPQDRAWLHER
                IHPNDPQRLSRALEVFFISGKLTTELQTSG-----DALPYQVHQFAIAPASRELLHQR
                :*.**.*.*****.:**.:**.: :. : * : : * : * **.*

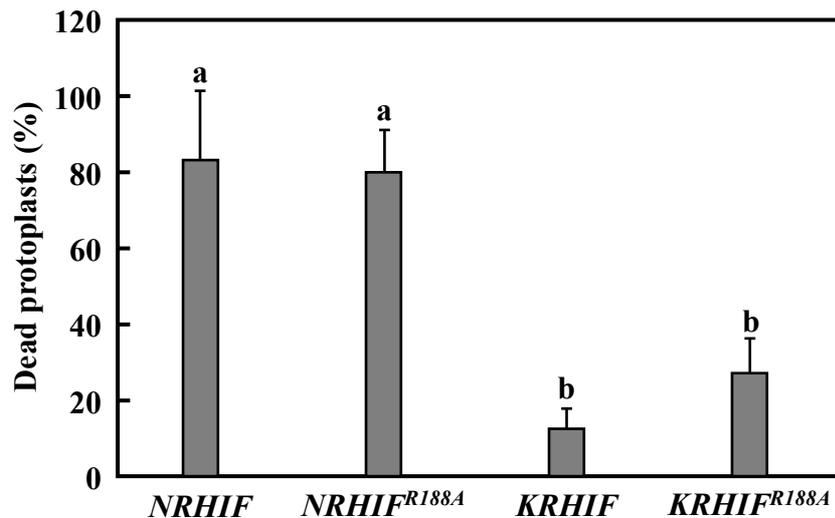
NRHIF          241                               300
KRHIF          IARRFDAMLDEGFVDEVRRRLRARGDLHPDLPSMRCVGYRQAWAELDAEERTGRLPLAELR
MiaA          IAQRFDAMLDEGFVDEVRRRLRARGDLHPDLPSMRCVGYRQAWAELDAEERTGRLPLAELR
                IEQRFHQMLASGF AEVRALFARGDLHTDLP SIRC VGYRQMWSYLEGEISY-----DEM V
                * :** . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NRHIF          301                               346
KRHIF          ERGIAATRQLAKRQVTWLRAMPWRHAIACDAPGATERWVAAALDALGVRA
MiaA          ERGIAATRQLAKRQVTWLRAMPWRHAIACDVPGATDRWVAAALEALGVQA
                YRGVCATRQLAKRQITWLRGWEGVHWLDSEKPEQARDEVLQVVGAIAG--
                **.:*****:****. * : .: * : * .: *.:

```

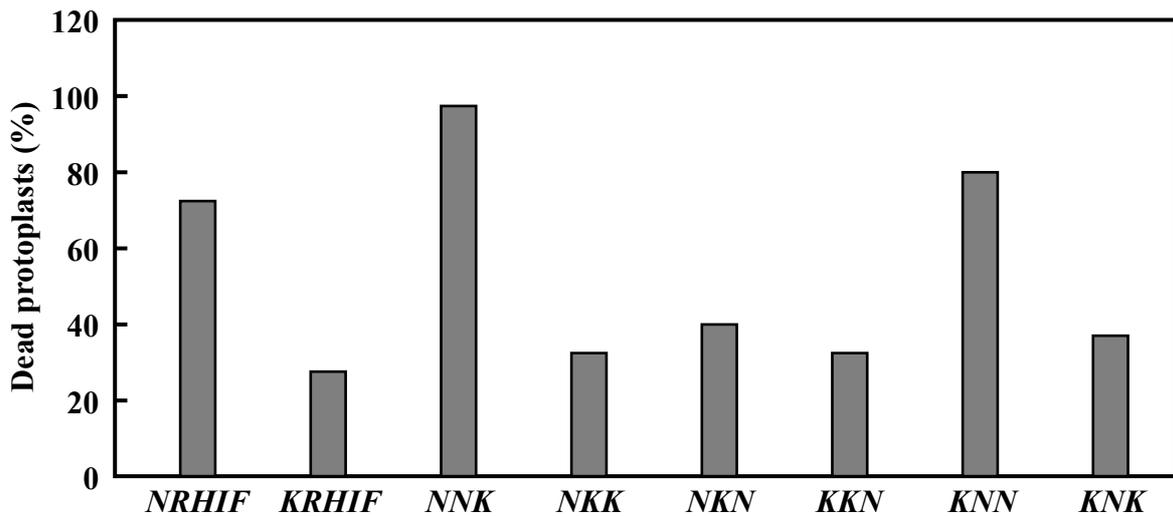
**Fig. 17 NRHIF、KRHIFおよびMiaAのアミノ酸配列比較**

ClustalWを用いてNRHIF、KRHIF、MiaAのアミノ酸配列のマルチプルアライメントを行った。アスタリスクは同一のアミノ酸、コロンは性質の同じアミノ酸、ピリオドは性質の似たアミノ酸を示す。矢印はMiaAの活性中心であるArg167を示す。



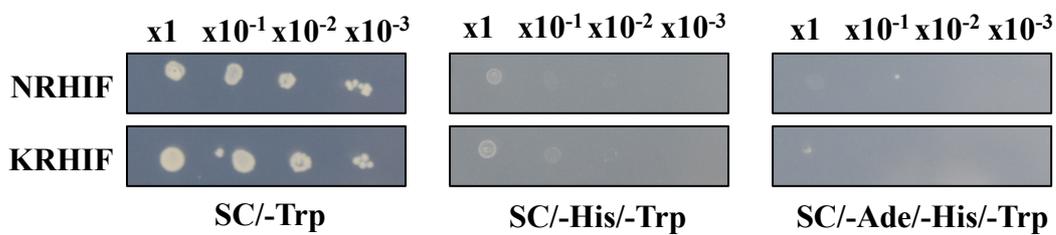
**Fig. 18** *NRHIF<sup>R188A</sup>* および *KRHIF<sup>R188A</sup>* 遺伝子を導入したイネにおける過敏細胞死

各遺伝子をイネプロトプラストにPEG法で導入し、導入後12時間目のイネプロトプラストをエバンスブルーで染色した。全細胞数とエバンスブルーにより染色された死細胞を合計1,000個以上カウントした。縦軸は、遺伝子が導入された細胞のうち死細胞の割合を示す。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。



**Fig. 19** *NNK*、*NKK*、*NKN*、*KKN*、*KNN*、*KNK*遺伝子を導入したイネにおける過敏細胞死

各遺伝子をイネプロトプラストにPEG法で導入し、導入後12時間目のイネプロトプラストをエバンスブルーで染色した。全細胞数とエバンスブルーにより染色された死細胞を合計1,000個以上カウントした。縦軸は、遺伝子が導入された細胞のうち死細胞の割合を示す。

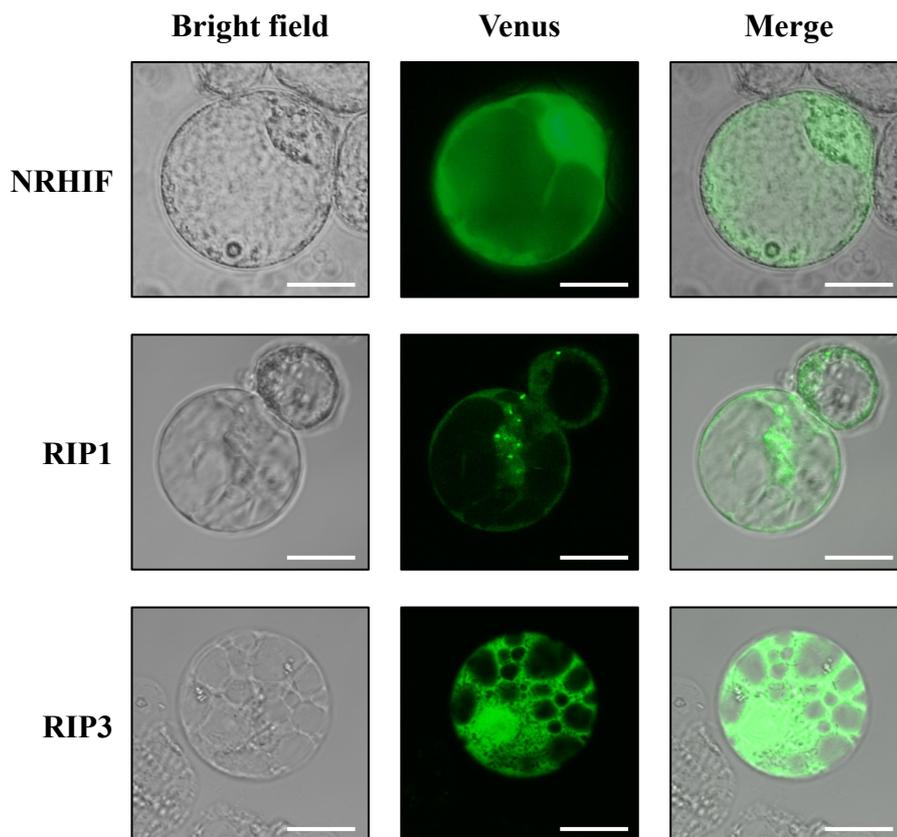


**Fig. 20 Baitベクターの自律的転写活性の確認**

NRHIF/pGBKT7またはKRHIF/pGBKT7を導入したY2HGold株をOD<sub>600</sub>=1.00になるように調整し、それらの10倍、100倍、1,000倍希釈液をそれぞれSC/-Trp、SC/-His/Trp、SC/-Ade/-His/Trp培地に2 μlずつ滴下して30°Cで3日間培養した

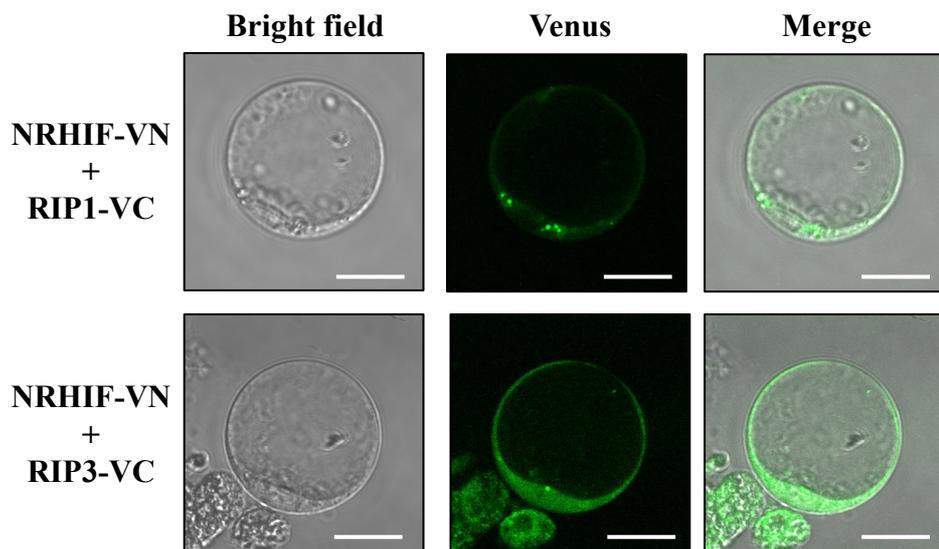
Table 1 Y2H法により得られたNRHIFと相互作用するイネタンパク質

タンパク質名	クローン数
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase, putative, expressed	1
Acetate/butyrate--CoA ligase AAE7, peroxisomal	1
Alpha-amylase isozyme 3E	1
AP2-like ethylene-responsive transcription factor	1
Casein kinase 1-like protein HD16	1
Chaperone protein ClpC1, chloroplastic	1
Cinnamyl alcohol dehydrogenase (RIP1)	1
COP9 signalosome complex subunit 3	1
CRM-domain containing factor CFM3, chloroplastic/mitochondrial	1
Cysteine-rich repeat secretory protein 55	3
Dihydroxy-acid dehydratase, chloroplastic	1
E3 ubiquitin-protein ligase 2	2
Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein (RIP2)	1
Fructose-bisphosphate aldolase 3	4
Gamma-glutamylcysteine synthetase	1
Gibberellin receptor	1
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	1
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor	1
Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1	2
Glutamine--tRNA ligase	1
GTP-mannose 4,6 dehydratase 1	1
Heat shock cognate 70 kDa protein	3
Hypersensitive-induced response protein-like protein 2	1
Leucine-rich repeat extensin-like protein 3	1
MAR-binding filament-like protein 1	1
Mitogen-activated protein kinase 9-like	1
Myosin heavy chain-like protein	1
Pentatricopeptide repeat-containing protein	1
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1	1
Phospholipase D	1
Probable aldo-keto reductase 1	1
Purple acid phosphatase 2	1
Putative kinase-like protein TMKL1	1
Pyruvate decarboxylase isozyme (RIP3)	1
Reversibly glycosylated polypeptide	3
Threonyl-tRNA synthetase, partial	1
Tubulin alpha-2 chain	1
Tuliposide A-converting enzyme 2, chloroplastic isoform X4	1
Type 2A protein serine/threonine phosphatase 55kDa B regulatory subunit-like	1
V-type proton ATPase catalytic subunit A	1



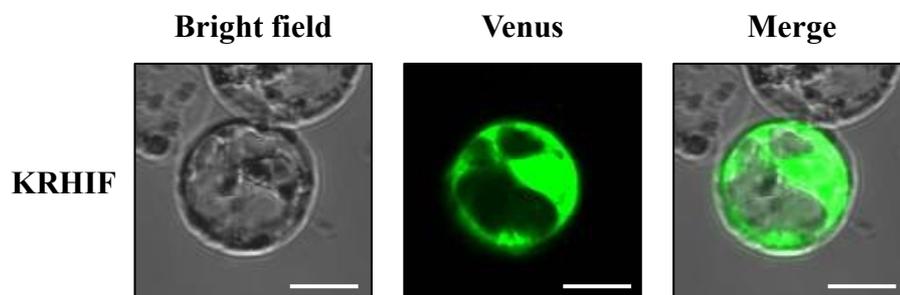
**Fig. 21 NRHIF、RIP1、RIP3のイネプロトプラスト内での細胞内局在**

C末端側にVenus蛍光タンパク質を融合させた各タンパク質をイネプロトプラストに発現させ、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10  $\mu$ m)



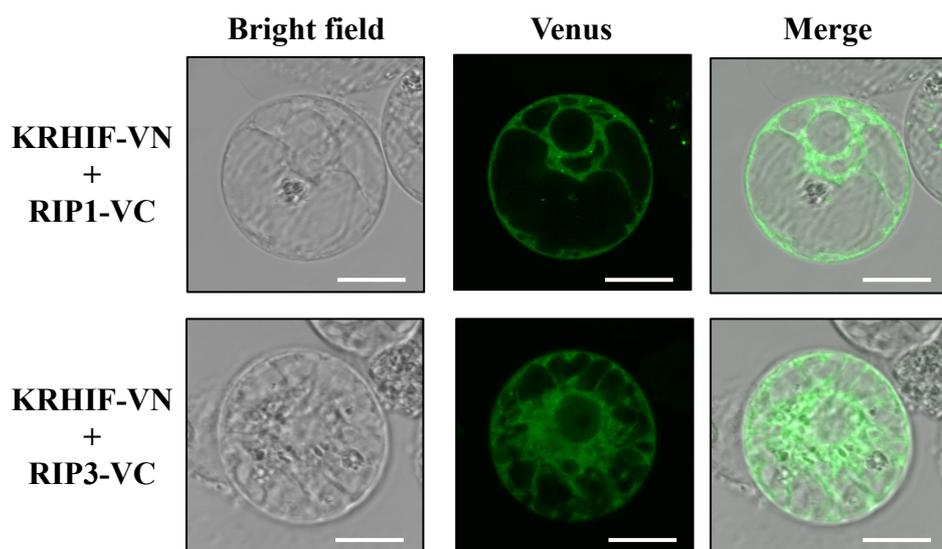
**Fig. 22 NRHIFとRIP1またはRIP3とのBiFC法による相互作用確認**

NRHIFとVN融合タンパク質（NRHIF-VN）とRIP1またはRIP3VC融合タンパク質（RIP-VC）をイネプロトプラストに発現させ、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。（Bar = 10  $\mu$ m）



**Fig. 23** KRHIFのイネプロトプラスト内での細胞内局在

C末端側にVenus蛍光タンパク質を融合させたKRHIFをイネプロトプラストに発現させ、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。(Bar = 10  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 24 KRHIFとRIP1またはRIP3とのBiFC法による相互作用確認**

KRHIFとVN融合タンパク質（KRHIF-VN）とRIP1またはRIP3VC融合タンパク質（RIP-VC）をイネプロトプラストに発現させ、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。（Bar = 10  $\mu$ m）

(A)

41 61 bp

**Kinmaze** CGCCGCCGCCGCAGCAT-ACG

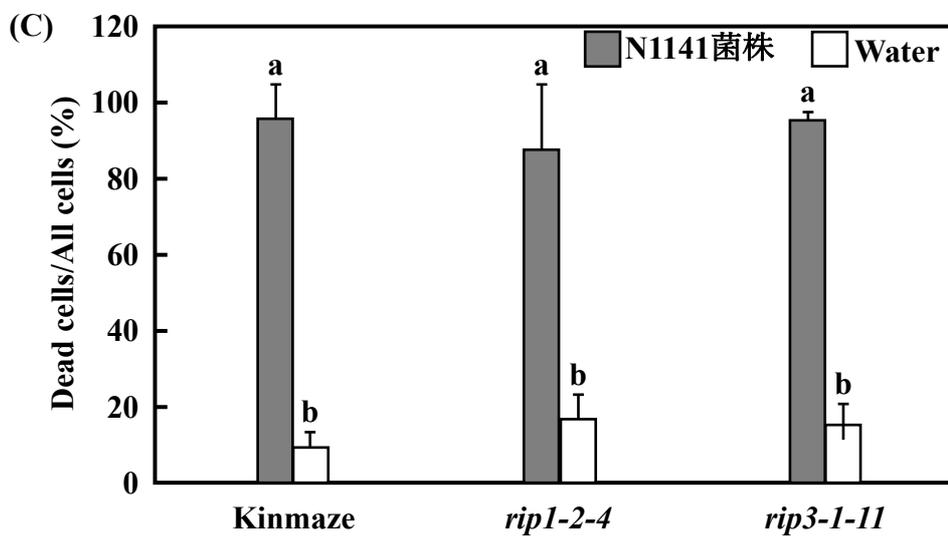
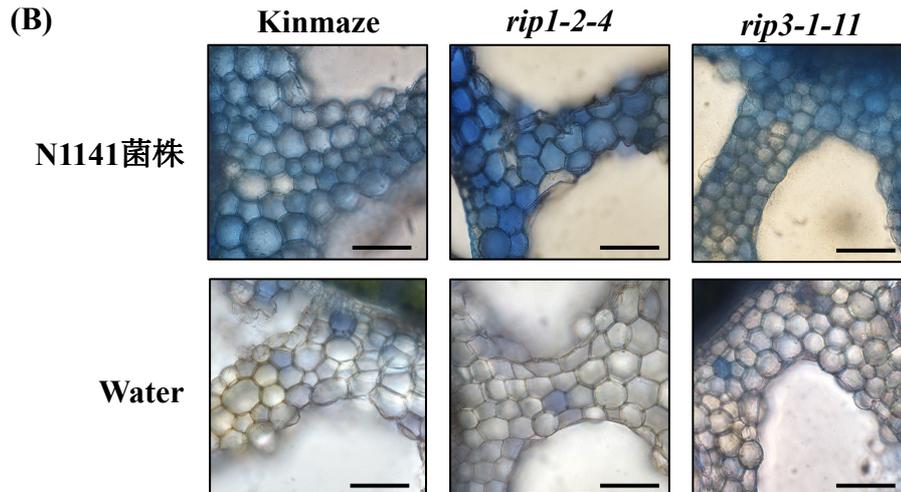
*rip1-2-4* CGCCGCCGCCGCAGCAT**T**ACG

13 33 bp

**Kinmaze** CTGGTTGGCAACCCTTC-GAA

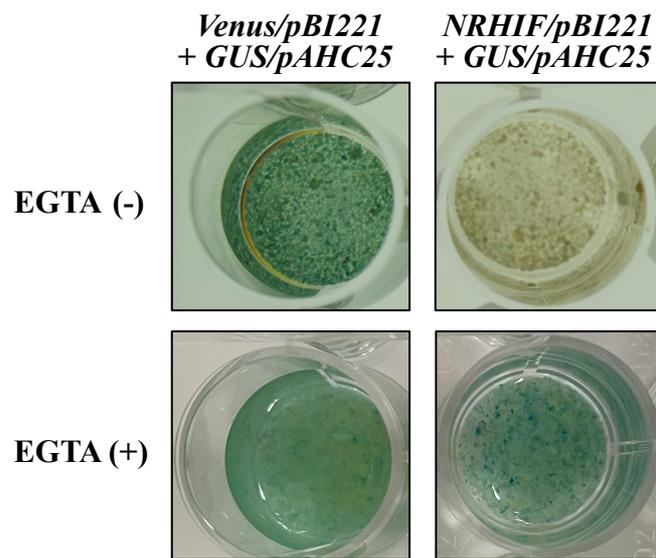
*rip3-1-11* CTGGTTGGCAACCCTTC**A**GAA



**Fig. 25** *RIP1*および*RIP3*遺伝子変異イネを用いた解析

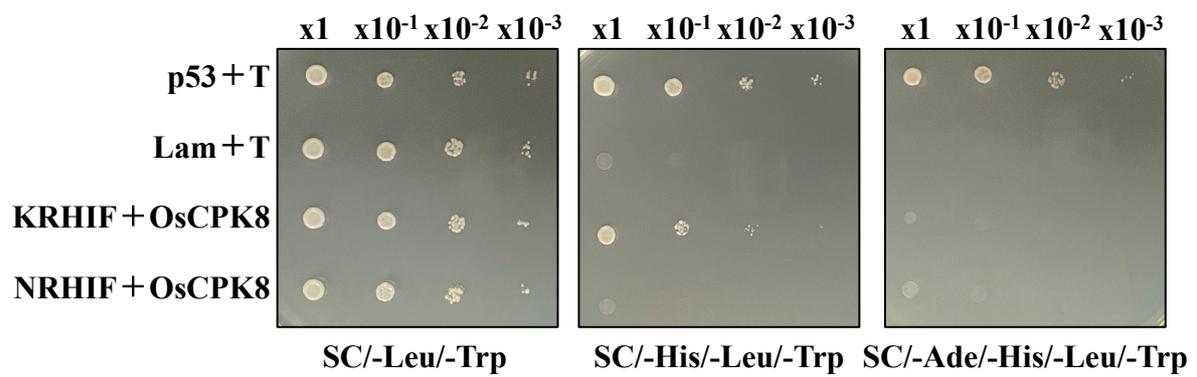
(A) CRISPR/Cas9法を用いて作成した*rip1-2-4*および*rip3-1-11*遺伝子変異イネの配列を示す。(B) N1141菌株または滅菌水を*rip1-2-4*および*rip3-1-11*の葉鞘切片に接種し、6時間後の死細胞をエバンスブルー染色により検出した。(Bar = 100  $\mu$ m)

(C) イネ葉鞘切片の画像から生細胞数と死細胞数をカウントし、その割合を算出した。実験は3回行い、標準偏差をエラーバーで示した。a、bの表記はこれらに有意差が存在することを示す (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。



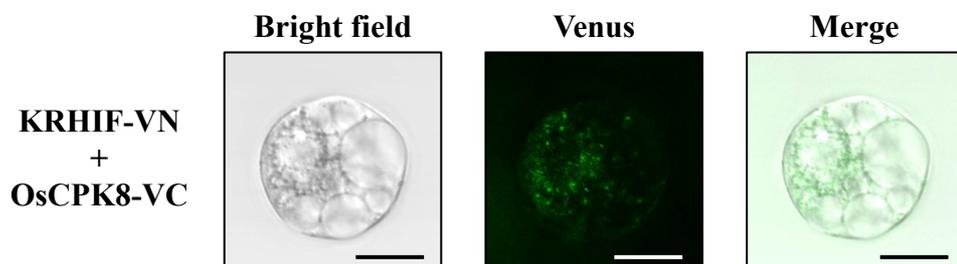
**Fig. 26** NRHIFによって誘導される細胞死へのEGTAの影響

パーティクルボンバードメント法を用いて*GUS*遺伝子と*NRHIF*遺伝子をイネ培養細胞へ導入し、2 mM EGTAを含む培地で12時間培養した。その後、GUS染色を行った。



**Fig. 27 OsCPK8とKRHIFまたはNRHIFとのY2H法による相互作用解析**

各ベクターを保持した酵母をOD<sub>600</sub>=1.00になるように調整し、それらの10倍、100倍、1,000倍希釈液をそれぞれSC/-Leu/-Trp、SC/-His/-Leu/-Trp、SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp培地に2 μlずつスポットした。その後、30°Cで2日間培養した。



**Fig. 28** KRHIFとOsCPK8のBiFC法による相互作用解析

KRHIFとVN融合タンパク質（KRHIF-VN）およびOsCPK8とVC融合タンパク質（OsCPK8-VC）をイネプロトプラストに発現させ、12時間後に共焦点顕微鏡で観察した。（Bar = 10  $\mu$ m）

### 3-3 考察

RIP1 および RIP3 がイネの過敏感細胞死誘導に関与するか調べるため、CRISPR/Cas9 法を用いて *RIP1*、*RIP3* 遺伝子変異イネを作製した。CRISPR/Cas9 は 2012 年に発表されたゲノム編集の技術のひとつであり、切断したい標的塩基配列に相補的な配列を含む gRNA と、エンドヌクレアーゼである Cas9 で構成される (Jinek et al., 2012)。一般的に、マウスや魚類などに CRISPR/Cas9 法を用いる際、受精卵へマイクロインジェクションによって gRNA と Cas9 タンパク質を導入するが多い。一方、植物をゲノム編集する場合は、アグロバクテリウム法を用いて必要な遺伝子を植物ゲノムへ導入する方法が一般的にとられる。本研究でも、*RIP1*、*RIP3* 遺伝子変異イネを作製するにあたり、アグロバクテリウム法を用いて各遺伝子に対する gRNA と Cas9 をコードする遺伝子をイネゲノムに組み込んだ。組換えが確認できた再分化イネ個体のうち、*RIP1* 遺伝子の場合は 10 個体中 2 個体で、*RIP3* 遺伝子では調べた 3 個体全てで目的遺伝子の変異が認められたことから、CRISPR/Cas9 法を用いた高効率なゲノム編集イネの作製方法を確立できたと考える。

イネがどのように NRHIF を認識し、過敏感細胞死を誘導しているのか調べるため、Y2H 法および BiFC 法により NRHIF と相互作用するイネタンパク質を探索したところ、NRHIF は Cinnamyl alcohol dehydrogenase (*RIP1*) と Pyruvate decarboxylase isozyme (*RIP3*) の全長とイネ細胞内で相互作用することが明らかになった。Cinnamyl alcohol dehydrogenase については、これまでに、コムギの Cinnamyl alcohol dehydrogenase (*TaCAD12*) が防御関連遺伝子やモノリグノール生合成関連遺伝子の発現調節をすることで *Rhizoctonia cerealis* に対する防御反応を制御することが報告されている (Rong et al., 2016)。また、Pyruvate decarboxylase についても、ジャガイモの葉で Pyruvate decarboxylase を高発現させるとプログラム細胞死やカロースの沈着などの植物防御応答を活性化することが明らかになっている (Tadege et al., 1998)。*P. syringae* のエフェクタータンパク質 *avrRpm1* の認識に関わるシロイヌナズナの *RIN4* も、本来はシロイヌナズナの PTI の制御因子であり (Kim et al, 2005)、*avrRpm1* が *RIN4* と相互作用するによって免疫反応の攪乱しようとする試みを、*RPM1* がガードすることで免疫反応を誘導すると考えられている。このことから、NRHIF は *RIP1* および *RIP3* と直接相互作用することで、*RIP1* および *RIP3* の機能を攪乱し、イネ ETI を誘導している可能性が示唆された。

*RIP1*、*RIP3* の NRHIF による ETI 誘導への関与が示唆されたので、*RIP1*、*RIP3* のノックアウトイネ (*rip1-2-4* および *rip3-1-11*) を作製し、N1141 菌株を接種した際に過

敏感細胞死が誘導されるかどうか調査した。*P. syringae* のエフェクタータンパク質 *avrRpm1* は、シロイヌナズナの RIN4 と RPM1 により検出されるため、RIN4 または RPM1 を欠損したシロイヌナズナは、*avrRpm1* を認識できず、*avrRpm1* を持つ *P. syringae* を接種した際も過敏感細胞死を誘導しない (Mackey et al., 2002)。このことから、RIP1 または RIP3 が NRHIF の認識に関わっているのであれば、*rip1-2-4* および *rip3-1-11* は過敏感細胞死を誘導しないことが予想された。しかし、実際には *rip1-2-4* および *rip3-1-11* では N1141 菌株により過敏感細胞死が誘導された。この原因について現在のところ明らかではないがいくつかの可能性が考えられる。一つは、RIP1 および RIP3 のアイソザイムが、*RIP1* および *RIP3* 遺伝子の欠損を補完している可能性がある。イネには Cinnamyl alcohol dehydrogenase アイソザイムは 12 種類、Pyruvate decarboxylase は 3 種類存在している (Tobias and Chow, 2005; Hossain et al., 1996)。*rip1-2-4* および *rip3-1-11* では 1 つの遺伝子のみに変異が導入されていることから、他のアイソザイムが同様の機能を有しているなら、これらによって ETI 誘導能が補完されるであろう。このことから、RIP1 と RIP3 が関与するかどうかを証明するためには、全てのアイソザイムに変異を導入する必要がある。この場合、それぞれのアイソザイムの保存された配列を標的とした RNAi ノックダウン変異体が有用になるとと思われる。

*rip1-2-4* および *rip3-1-11* において N1141 菌株によって過敏感細胞死が誘導された原因として、NRHIF による過敏感細胞死の誘導には RIP1 と RIP3 の両方が必要である可能性も考えられる。現在のところ、一種類のエフェクタータンパク質に対して、複数種類の R 遺伝子が対応する事例は知られていない。しかし、*AvrPto* などのエフェクターが複数の植物タンパク質と相互作用する例は多数存在する。さらに、これまでは一種類のエフェクタータンパク質に対して一種類の R 遺伝子が対応するとされていたが、膨大な数の病原体が持つ多様なエフェクタータンパク質に対して、それぞれ対応する R 遺伝子を植物側が獲得してきたとは考えにくい。このことから、RPM1 が *avrRpm1* による RIN4 に対する攻撃を認識するように、エフェクタータンパク質が攻撃すると予想される植物免疫反応に関わる標的タンパク質を、数種類の R 遺伝子によってガードするという説が提唱された。実際に、近年の研究報告で、シロイヌナズナはたった 8 つの R 遺伝子によって *P. syringae* のエフェクタータンパク質の 96.6% を認識すると予測されている (Laflamme et al., 2020)。これらのことから、NRHIF が RIP1 および RIP3 と複合体を形成することで、イネ ETI が誘導されている可能性は残るであろう。

*rip1-2-4* および *rip3-1-11* において N1141 菌株によって過敏感細胞死が誘導された原因としてこのほかに、N1141 菌株が NRHIF 以外にイネの過敏感細胞死を誘導するエ

エフェクタータンパク質を持つことも考えられる。*P. syringae* の場合では、T3SS エフェクターを介して、約百種類のエフェクタータンパク質を分泌すると考えられている。しかし、本論文第一章の結果では、 $\Delta$ NRHIF 株は  $\Delta$ T3SS と同程度イネの ETI 誘導能を失っていたことから、N1141 菌株が NRHIF 以外にイネ ETI を誘導するエフェクターを持つ可能性は低い。今後、イネによる NRHIF の認識機構を明らかにするためには、NRHIF に対応するイネの R 遺伝子を同定することが必要となるであろう。

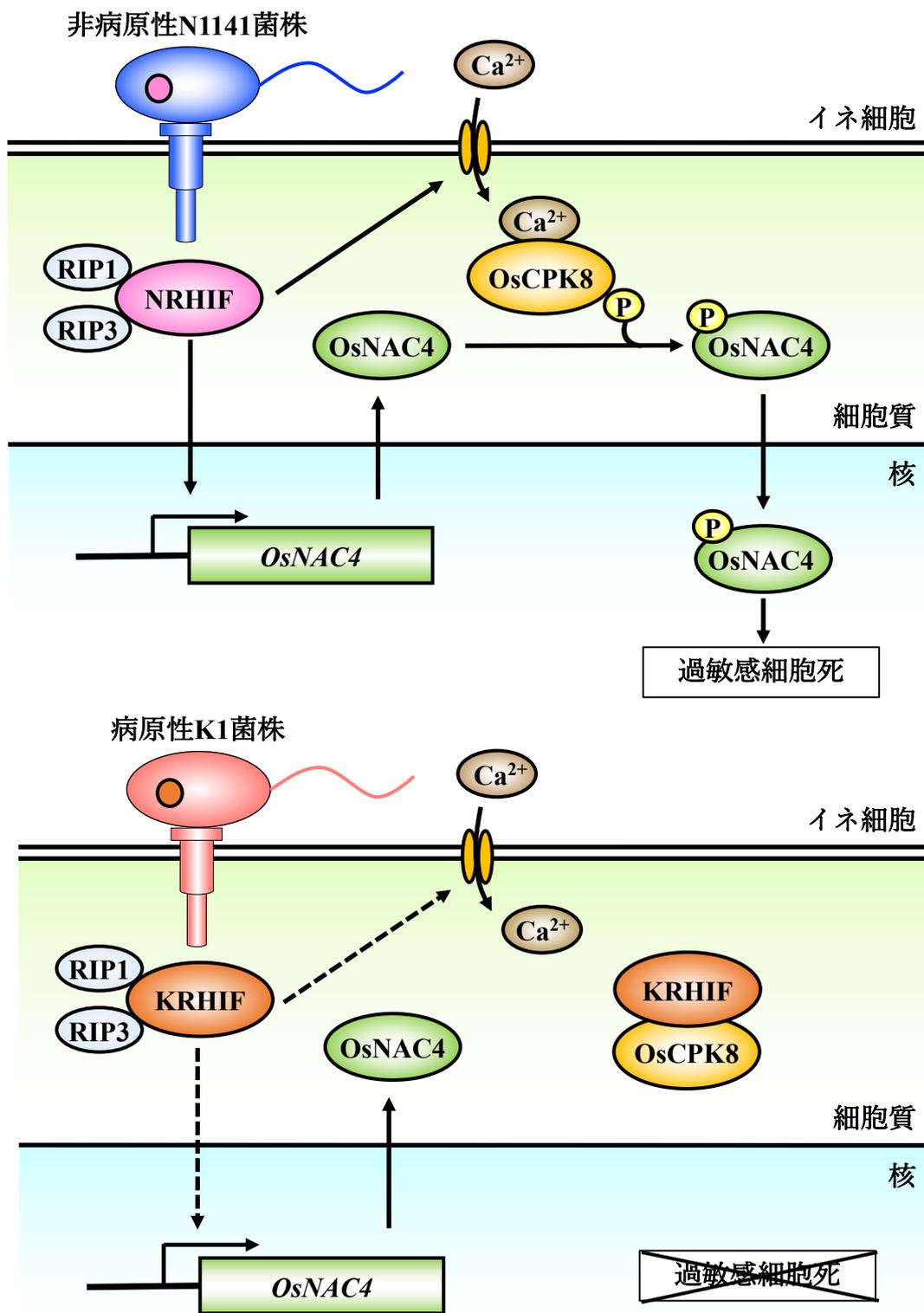
NRHIF と GUS を導入したイネ培養細胞で認められる細胞死は EGTA により阻害されたことから、NRHIF によって誘導される過敏感細胞死にはカルシウムイオンが必要であることが示された。N1141 菌株によるイネの過敏感細胞死誘導には、カルシウムイオンの細胞内への流入と、これにより活性化される OsCPK8 が必要である (Fujiwara et al, 2004; Kamimura et al., 2014)。このことから、NRHIF による過敏感細胞死誘導にも OsCPK8 が関与する可能性が考えられる。OsCPK8 ノックダウン変異体に NRHIF を発現させた時、過敏感細胞死が誘導されないことを確認することで、この仮説を証明できるだろう。

Y2H 法による相互作用解析の結果、OsCPK8 は KRHIF とのみ相互作用した。KRHIF を発現させたイネでは過敏感細胞死が誘導されないことと、 $\Delta$ KRHIF 株のイネに対する病原性が減少していることから、KRHIF は OsCPK8 と相互作用することでイネの過敏感細胞死誘導を抑制している可能性が考えられる。これまでに、植物のキナーゼと相互作用することで、病原菌認識情報の細胞内伝達を妨害するようなエフェクタータンパク質はいくつか報告がある。例えば、イネ白葉枯病菌 *X. oryzae* のエフェクタータンパク質 Xoo1488 は、イネの Receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK) 185 と相互作用することで、PAMPs 受容体である Chitin elicitor receptor kinase 1 (OsCERK1) による OsRLCK185 のリン酸化を阻害し、イネの免疫反応誘導を抑制している (Yamaguchi et al., 2013)。しかし、これまで CPK と相互作用することで植物の免疫反応を抑制するようなエフェクターは報告されていないことから、KRHIF はこれまで明らかになっていない新しい機構によって植物の ETI 反応を抑制しているのであろう。

BiFC 法による相互作用解析の結果、OsCPK8 は KRHIF とイネの細胞質で相互作用することが明らかになった。通常時、OsCPK8 はイネの細胞膜に局在しているが、N1141 菌株を接種すると、OsCPK8 はリン酸化することで活性化し、細胞質から核に局在を変化させる (土本, 2019)。核に移行した OsCPK8 は OsNAC4 を直接リン酸化することで過敏感細胞死を誘導していると考えられている。また、N1141 菌株を接種していない場合でも、OsCPK8 をイネ細胞内で過剰発現させると、OsCPK8 は細胞質

から核に移行し過敏感細胞死を誘導する。BiFC 法による OsCPK8 と KRHIF の相互作用解析の結果、イネプロトプラストの細胞質で蛍光が観察されたが、核で蛍光は認められなかった。このことから、KRHIF は OsCPK8 と細胞質で相互作用することで、OsCPK8 の核移行、もしくは OsNAC4 のリン酸化を阻害し、過敏感細胞死を抑制している可能性がある。今後、KRHIF と OsCPK8 の相互作用によりイネの過敏感細胞死誘導が抑制されることを証明するためには、KRHIF と OsCPK8 をイネに発現させた時、OsCPK8 を単独で発現させた時よりも死細胞数が減少するかを調べるなどの実験が必要になるだろう。

最後に、本研究より得られた結果と既知の情報を基板として、NRHIF および KRHIF の作用機構について予想したい (Fig. E)。イネが、N1141 菌株の T3SS から分泌されるエフェクタータンパク質 NRHIF を RIP1 および RIP3 を介して認識すると、カルシウムイオンの流入が起こり、活性化された OsCPK8 が OsNAC4 をリン酸化することで過敏感細胞死を誘導する。一方、KRHIF も RIP1 および RIP3 と相互作用するが、KRHIF は OsCPK8 と相互作用するので過敏感細胞死の誘導を抑制する。本研究によって、植物と病原細菌 *A. avenae* の相互作用を分子レベルで理解する重要な知見が初めて得られたものと考えられる。



**Fig. E NRHIFによるイネの過敏感細胞死誘導と、KRHIFによる抑制の予想図**  
 N1141菌株のT3SSからイネ細胞内へ輸送されたエフェクタータンパク質NRHIFは、イネ細胞内でRIP1およびRIP3と相互作用する。NRHIFはOsNAC4の発現や、イネ細胞内へのカルシウムイオンの流入を引き起こし、活性化されたOsCPK8がOsNAC4をリン酸化することで過敏感細胞死が誘導される。一方、KRHIFもRIP1およびRIP3と相互作用するが、KRHIFはさらにOsCPK8と相互作用することによってイネの過敏感細胞死の誘導を抑制する。

## 参考文献

- Asai, S., Furzer, O. J., Cevik, V., Kem, D. S., Ishaque, N., Goritschnig, S., et al. (2018). A downy mildew effector evades recognition by polymorphism of expression and subcellular localization. *Nature Communications* 9, 5192. doi: 10.1038/s41467-018-07469-3 |
- Arya, P., and Acharya, V. (2018). Plant STAND P-loop NTPases: a current perspective of genome distribution, evolution, and function. *Mol. Gen. Genomics* 293, 17–31. doi: 10.1007/s00438-017-1368-3
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S. P. (1997). Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Science* 276, 726-733. doi: 10.1126/science.276.5313.726
- Che, F.S., Iwano, M., Tanaka, N., Takayama, S., Minami, E., Shibuya, N., et al. (1999). Biochemical and morphological features of rice cell death induced by *Pseudomonas avenae*. *Plant Cell Physiol* 40, 1036–1045. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029485
- Che, F. S., Nakajima, Y., Tanaka, N., Iwano, M., Yoshida, T., Takayama, S., et al. (2000). Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *J. Biol. Chem* 275, 32347–32356. doi: 10.1074/jbc.M004796200
- Chimnarong, S., Forouhar, F., Sakai, J., Yao, M., Tron, C. M., Atta, M., et al. (2009). Snapshots of dynamics in synthesizing N<sup>6</sup>-Isopentenyladenosine at the tRNA anticodon. *Biochemistry* 48, 5057–5065. doi: 10.1021/bi900337d
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G. et al. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497-500. doi: 10.1038/nature05999
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. and Boller, T. (1999). Plant have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18, 265-276. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00265.x

- Flor, H. H. (1971). Current status the gene-for-gene concept. *Annual reviews of phytopathology* 9, 275-296. doi: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423
- Fujiwara, S., Tanaka, N., Kaneda, T., Takayama, T., Isogai, A. and Che, FS. (2004). Rice cDNA Microarray-Based Gene Expression Profiling of the Response to Flagellin Perception in Cultured Rice Cells. *Is-MPMI* 17, 986-998. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.9.986
- G-Gomez, L. and Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Plant Sci* 7, 251-256. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02261-6
- Hossain, A. M., Huq, E., Grover, A., Dennis, S. E., Peacock, J. W. and Hodges, K. T. (1996). Characterization of pyruvate decarboxylase genes from rice. *Plant Mol Biol.* 31, 761-770. doi: 10.1007/BF00019464
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. and Charpentier, E. (2012) A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337. doi: 10.1126/science.1225829
- Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Jones, J. D., Vance, R. E. and Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 345. doi: 10.1126/science.aaf6395
- Kadota, I., Mizuno, A., and Nishiyama, K. (1996). Detection of a protein specific to the strain of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 pathogenic to Rice. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62, 425–428. doi: 10.3186/jjphytopath.62.425
- Kamimura, M., Han, Y., Kito, N. and 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. doi: 10.1080/09168451

- Kaneda, T., Fujiwara, S., Takai, S., Takayama, S., Isogai, A. and Che, FS. (2007). Identification of genes involved in induction of plant hypersensitive cell death. *Plant Bio.* 24, 191-200. doi: 10.5511/plantbiotechnology.24.191
- Kaneda, T., Taga, Y., Takai, R., Iwano, M., Matsui, H., Takayama, S., et al. (2009). The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *The EMBO journal* 28, 926-936. doi: 10.1038/emboj.2009.39
- Katsuragi, Y., Takai, R., Furukawa, T., Hirai, H., Morimoto, T., Katayama, T., et al. (2015). CD2-1, the C-terminal region of flagellin, modulates the induction of immune responses in rice. *MPMI* 28, 648-658. doi: 10.1094/MPMI-11-14-0372-R
- Kawaguchi, T., Nakamura, M., Hirai, H., Furukawa, T., Kondo, M., and Che, FS. (2021) AKSF1 Isolated From the Rice-Virulent Strain *Acidovorax avenae* K1 Is a Novel Effector That Suppresses PAMP-Triggered Immunity in Rice. *MPMI*. 34, 186-197. doi: 10.1094/MPMI-10-20-0271-R
- Kikuchi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Yoshida, K. T., Nagato, Y., Matsusoka, M. and Hirano, H. Y. (2000). Molecular analysis of the *NAC* gene family in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 262, 1047-1051. doi: 10.1007/pI00008647
- Kim, G. M., Cunha, L., McFall, J. A. Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangj, L. J. and Mackry, D. (2005). Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. *Cell* 3;121(5):749-59. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.025.
- Kondo, M., Yoshida, Y., Miyata, C., Fujiwara, S., Nakajima, Y., Hirai, H., et al. (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. doi: 10.1271/bbb.110597
- Kondo, M., Hirai, H., Furukawa, T., Yoshida, Y., Suzuki, A., Kawaguchi, T., et al. (2017). Frameshift mutation confers function as virulence factor to leucine-rich repeat protein from *Acidovorax avenae*. *Front. Plant Sci.* 7:1988. doi: 10.3389/fpls.2016.01988

- Koonin, E. and Aravind, L. (2002). Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Nature* 9, 394-404. doi: 10.1038/sj.cdd.4400991
- Leipe, D. D., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2003). Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J. Mol. Biol.* 333, 781–515. doi: 10.1016/j.jmb.2003.08.040
- Leipe, D. D., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2004). STAND, a class of p-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.* 343, 1–28. doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.023
- Lindgren, P. B. (1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annual reviews of phytopathology* 35, 129-152. doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.129
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L. and He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *PNAS*. 107, 496-501. doi: 10.1073/pnas.0909705107
- Mackey, D., Holt III, B. F., Wiig, A. and Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 743-754. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00661-X
- Marois, E., Ackerveken, G. W. D., and Bonas, U. (2002). The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 637–646. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.7.637
- Ohgita, T., Hayashi, N., Hana, S., Tsuchiya, H., Gotoh, N. and Kogure, K. (2013). A novel effector secretion mechanism based on proton-motive force-dependent type III secretion apparatus rotation. *FASEB J.* 27, 2862-2872. doi: 10.1096/fj.13-229054
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., et al. (2003).

Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 10, 239-247. doi: 10.1093/dnares/10.6.239

Ritter, C. and Dangl, J. L. (1995). The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on *Arabidopsis*. *MPMI.* 8, 444-453. doi: 10.1094/mpmi-8-0444

Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E-L., Kallinen, N., Romantschuk, M., et al. (1997). Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PANS.* 94, 3459-3464. doi: 10.1073/pnas.94.7.3459

Romer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J. et al. (2009). Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol.* 150, 1697-712. doi: 10.1104/pp.109.139931

Rong, W., Luo, M., Shan, T., Wei, X., Du, L., Xu, H. et al. (2016). A Wheat Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase TaCAD12 Contributes to Host Resistance to the Sharp Eyespot Disease. *Front Plant Sci.* 16;7:1723. doi: 10.3389/fpls.2016.01723

Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A. K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., et al. (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem.* 285, 9444-9451. doi: 10.1074/jbc.M109.096842

Tadege, M., Brandle, R., Kuhlemeier, C. (1998) Anoxia tolerance in tobacco roots: effect of overexpression of pyruvate decarboxylase. *the plant journal* 14, 327-335. doi: org/10.1046/j.1365-313X.1998.00130.x

Tobias, M. C. and Chow, K. E. (2005) Structure of the cinnamyl-alcohol dehydrogenase gene family in rice and promoter activity of a member associated with lignification. *Planta* 220, 678-688

Urbach, J. M. and Ausubel, F. M. (2017). The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events. *PNAS.* 114, 1063-1068. doi:

10.1073/pnas.1619730114

Wengelnik, K. and Bonas, U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol.* 178, 3462-3469. doi: 10.1128/jb.178.12.3462-3469.1996

Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K. et al. (2013) A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Targeted by a Plant Pathogen Effector Is Directly Phosphorylated by the Chitin Receptor and Mediates Rice Immunity. *Cell Host Microbe.* 13, 347-57. doi: 10.1016/j.chom.2013.02.007

ZhongNan, G., HanMo, S., Meili, W., XiaoFei, Y., XiaoBin, C., GongYou, C., et al. (2018). Functional analysis of the *hrpD5* gene in pathogenesis of rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *CABI.* 48, 89-97. doi: 10.1371/journal.ppat.1007092

迹見 勇樹 (2011) 植物病原細菌の TypeIII 分泌装置を介したイネ細胞内タンパク質輸送に関する研究 修士論文 (長浜バイオ大学大学院)

今尾 優吾 (2019) フラジェリン CD2-0 領域に対するイネ受容体の同定とその認識機構 修士論文 (長浜バイオ大学大学院)

大坪 由佳 (2016) OsNAC 転写因子を介した植物免疫反応である過敏感細胞死の誘導機構に関する研究 博士論文 (長浜バイオ大学大学院)

近藤 真千子 (2012) イネのエフェクター誘導性免疫反応の分子機構に関する研究 博士論文 (長浜バイオ大学大学院)

土本 尚輝 (2019) 病原菌認識情報の Ca<sup>2+</sup>依存性プロテインキナーゼ 8 を介した細胞内伝達機構 修士論文 (長浜バイオ大学大学院)

中村 みなみ (2017) 植物病原細菌が持つ IPPT の病徴および免疫反応誘導への関与 卒業論文 (長浜バイオ大学大学院)

乗京 知宏 (2011) 植物病原細菌 *Acidovorax avenae* に存在するイネの免疫反応誘導性エフェクタータンパク質の同定とその作用機構の解析 修士論文(長浜バイオ大学大学院)

安田 宜剛 (2021) 受容体様タンパク質 FliRK1 と FliRK2 のフラジェリン認識における役割 修士論文 (長浜バイオ大学大学院)

公益社団法人国際農林業協働協会：JAICAF (2020) 世界の農林水産

国際連合経済社会局：DESA (2019) 世界人口推計 2019 年版

農林水産省大臣官房政策課食料安全保障室：MAFF (2019) 2050 年における世界の食料需給見通し

三村 徹郎、深城 英弘、鶴見 誠二 (2009) 植物生理学 (化学同人)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご協力を賜りました。

指導教官の蔡晃植教授からは多大なご指導、ご鞭撻を賜りました。魅力的な研究テーマと素晴らしい研究環境を与えていただき、感謝の念に堪えません。謹んで御礼申し上げます。

副指導をお願いいたしました、斎藤修教授、向由起夫教授にも貴重なご意見をいただきました。誠に感謝いたします。

日々の実験や研究報告、学会発表、論文購読など様々な場面でご指導、ご鞭撻を頂いた近藤真千子博士、平井洋行博士、古川岳人博士、神村麻友博士、桂木雄也博士、川口雄正博士、村上貴彦博士、鈴木愛芽先輩にお礼申し上げます。特に、同じグループの近藤真千子博士、川口雄正博士、鈴木愛芽先輩には、論文執筆に加え、大学院入試や学会発表の準備など様々な場面で多大なご迷惑をおかけし、大変お世話になりました。厚く御礼を申し上げ、感謝する次第です。

ともに研究に励んだ同窓生の皆様、大学院生の方々など研究室のメンバーにも、深く御礼申し上げます。

最後に、本研究ならびに学業全般にわたって経済的・心身的に支援して下さる家族に深く感謝し、御礼を申し上げます。