

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* が持つ翻訳伸長因子 EF-Tu による イネ免疫反応の誘導機構

Induction mechanism of rice immune responses by translation elongation factor EF-Tu of phytopathogenic bacterium *Acidovorax avenae*

古川岳人¹・綿谷幸樹²・伊庭弘貴²・桂木雄也¹・近藤真千子¹・蔡 晃植^{1,2,3}

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部フロンティアバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科

³長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Takehito Furukawa¹, Kouki Wataya¹, Hiroki Iba², Yuya Katsuragi¹, Machiko Kondo¹, Fang-Sik Che^{1,2,3}

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

²Department of Animal Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

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

要旨

イネは細菌の翻訳伸長因子である EF-Tu を認識して PAMP-triggered immunity (PTI) を誘導する。イネが認識する EF-Tu の部位を調べたところ、シロイヌナズナにおいて PAMP 活性を示す elf18 ではなく、中央領域に存在する EFa50 を認識して PTI を誘導することが示された。そこで、イネに存在する EF-Tu の認識に関与する分子の同定を試みたところ、受容体型キナーゼをコードする ERC1 を同定した。ERC1 ノックアウトイネを CRISPR/Cas9 法で作製したところ、EF-Tu 認識能を失っていた。このことから、ERC1 がイネの EF-Tu 受容体である可能性が示唆された。

Plants have evolved a multilayered immune system that can be activated under conditions of pathogen invasion. The first line of the active defense system relies upon the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs). Elongation factor Tu functions as PAMP and induces PAMP-triggered immunity (PTI) in several plant species. *Arabidopsis thaliana* recognizes elf18 presenting within the N-terminal region of EF-Tu with a receptor-type kinase called EFR and induces PTI. Whereas, rice recognizes EFa50 existing on the middle region instead of elf18. Complementation experiments of EFa50 recognition ability in *Arabidopsis thaliana* showed that a receptor-like kinase called ERC1 is candidate of receptor for EFa50 in rice. To determine whether ERC1 is a true receptor for EFa50, ERC1 knockout rice lines were prepared using the CRISPR/Cas9 method. ERC1 knockout rice line lost the ability to recognize EFa50, indicating that ERC1 functions as a receptor for EFa50.

1. 緒言

植物は大多数の病原体に対して有効な植物免疫系を有している。近年、この植物免疫は、2つの階層的なシステムによって構築されていることが報告された¹⁾。植物は、侵入してくる病原菌が共通して持つ Pathogen-associated molecular pattern (PAMP) と呼ばれる分子群を認識し、活性酸素の発生や、ファイトアレキシン合成に関与する遺伝子の発現と抗菌性物質の蓄積などに代表される PAMP-triggered immunity (PTI) という早期の免疫反応を誘導する。これに対して、植物病原菌は PTI を抑制するために、タイプ III 分泌装置を介してエフェクターと呼ばれる分子群を植物細胞内に分泌する。しかし、植物がエフェクターを認識する機構を有していた場合、過敏感細胞死を含む Effector-triggered immunity (ETI) と呼ばれるより強力な免疫反応が誘導される。このような PTI と ETI は、それぞれ独立した系であるが、効果的な ETI 誘導には PTI が誘導されることが必須であることも報告されている²⁾。

これまでに植物における PAMPs として、細菌の鞭毛を構成するタンパク質フラジェリン^{3,4)}、翻訳伸長因子 Elongation Factor Tu (EF-Tu)⁵⁾、エルゴステロール⁶⁾、リポポリサッカライド (LPS)⁷⁾ などの分子が明らかになっている。これら PAMPs のなかで、フラジェリンと EF-Tu が世界中で活発に研究されている。フラジェリンは細菌の鞭毛を構成するタンパク質であり、双子葉植物であるシロイヌナズナやトマトでは、フラジェリンの N 末端領域の 22 アミノ酸である flg22 の領域を認識して PTI を誘導する。さらに、この flg22 を認識する受容体タンパク質として、細胞外に 28 個のロイシンリッチリピート領域を持ち、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ領域を持った一回膜貫通型の受容体型キナーゼ FLS2 (Flagellin-sensing 2) が同定された⁸⁾。興味深いことに、FLS2 遺伝子を欠損した突然変異体にフラジェリンを欠損した *Escherichia coli* GI826 の菌体破砕液を処理しても、免疫反応が誘導された。そこで、フラジェリン以外の新たな PAMP を探索したところ、細菌の翻訳伸長因子である EF-Tu が同定された⁹⁾。さらに、シロイヌナズナでは EF-Tu の N 末端領域に存在する 18 アミノ酸で構成される elf18 を、細胞外に 21 個のロイシンリッチリピート領域を持つ受容体型セリン/スレオニンキナーゼ EFR (EF-Tu Receptor) で認識して PTI を誘導することも明らかになった⁹⁾。ところがイネの全ゲノムを調べたところ、EFR のオーソログが存在しなかったことから、イネは elf18 を認識して PTI を誘導できないと予想された。

単子葉植物を宿主とする単鞭毛性グラム陰性単桿菌である *Acidovorax avenae* は、植物の葉の褐変や、葉鞘の屈曲などを引き起こす植物病原細菌である。これまでに、イネ、アワ、ヒエ、トウモロコシなどから様々な菌株が単離されているが、ひとつの菌株が感染できる植物種はほぼ 1 種に限られる。イネによる *A. avenae* の宿主特異性を特異的な認識機構を明らかにするために、N1141 菌株に存在するイネの PTI を誘導する分子について検討を行ったところ、この菌の鞭毛を構成するフラジェリンが同定された⁴⁾。そこで、イネにおいて認識されるフラジェリン領域について調べたところ、イネは flg22 を PAMP として認識せず、C 末端の CD2-1 領域を認識して PTI を誘導することが明らかになった。このことから、イネとシロイヌナズナはフラジェリンを認識して免疫反応を誘導するが、その認識部位と受容体は異なることが示された。

A. avenae N1141 菌株に存在するフラジェリン以外の新たな PAMP を調べるため、フラジェリン遺伝子欠損株の破砕液をイネ培養細胞に処理したところ、PTI の誘導が認められた。そこで、この PAMP 様物質を精製し、質量分析計を用いたプロテオームで構造を解析したところ、EF-Tu であることが示された¹⁰⁾。そこで、この N1141 菌株の EF-Tu をリコンビナントタンパク質として作製し、これをイネ培養細胞に処理したところ、イネの PTI が誘導された。前述したように、イネには ELF のオーソログが存在しないことから、イネは elf18 を認識して PTI を誘導できないと予想されていた。そこで、イネにお

ける EF-Tu 認識の分子機構を調べる必要性が出てきた。

2. 結果

2. 1 イネによって認識される EF-Tu 部位の同定

イネによる *A. avenae* の EF-Tu の認識領域を明らかにするために、EF-Tu の N 末端ペプチド EF-Tu-a 1-200、C 末端ペプチド EF-Tu-a 201-396、中央ペプチド EF-Tu-a 101-300 に加え、EF-Tu-a 151-250、EF-Tu-a 176-225、EF-Tu-a 181-220、EF-Tu-a 186-215 をリコンビナントタンパク質として作製し、これをイネ培養細胞に処理した。その結果、EF-Tu-a と中央ペプチド EF-Tu-a 101-300、EF-Tu-a 151-250、EF-Tu-a 176-225 を処理したイネ培養細胞において活性酸素の発生が認められたが、elf18 とこれを含む EF-Tu-a 1-200 はイネ PTI を誘導し

なかった。EF-Tu-a 176-225 に活性が認められたので、EF-Tu-a 176-225 の C 末端側 20 アミノ酸を削除した EF-Tu-a 176-205 と N 末端側 20 アミノ酸を削除した EF-Tu-a 196-225 を作製した。これらをイネ培養細胞に処理して活性酸素の発生の有無を調べたところ、どちらのペプチドを処理したイネ培養細胞においても活性酸素の発生が認められなかった (図 1)。これらのことから、EF-Tu-a 176-225 がイネの PTI を誘導する最小のペプチドであることが示されたので、これを EFa50 と名付けた。イネでは elf18 ではなく、中央領域部分の EFa50 が PAMP として機能することというこの結果は、イネにはシロイヌナズナとは異なる EF-Tu 認識系が存在することを示す¹⁰⁾。

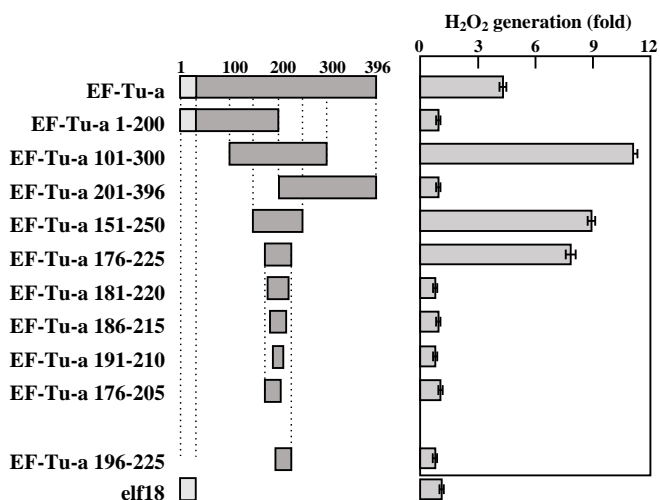


図1 イネのPTI誘導活性を有するEF-Tu部位

2. 2. イネによって認識される EF-Tu 部位の同定

植物の受容体をコードする遺伝子は、この受容体が発現誘導される場合が多い⁹⁾。そこで、イネ EF-Tu 受容体を同定するために、イネ 44 k オリゴ DNA マイクロアレイを使用して、EFa50 処理後に発現上昇する遺伝子を調べた。EF-Tu-a 101-300 処理後の発現量が 4 倍以上発現上昇した遺伝子を抽出したところ、処理 1 時間後には 2,453 遺伝子、処理 3 時間後には 2,044 遺伝子、処理 6 時間後には 1,809 遺伝子が選抜された。そこで、これらの遺伝子の中から、細胞外にタンパク質と相互作用するためのロイシンリッチリピートドメインをもち、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼドメインをもつ受容体型キナーゼタンパク質をコードする遺伝子を探索しところ、10 遺伝

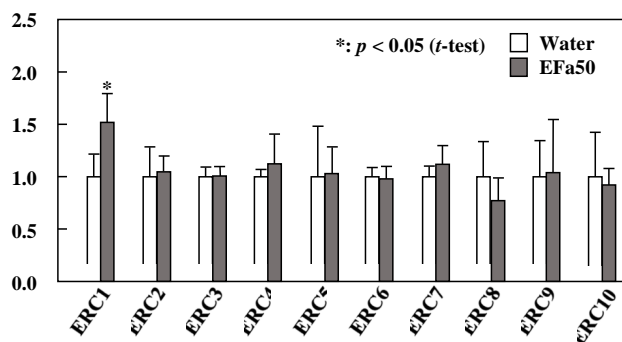


図2 シロイヌナズナへのEFa50認識能の付与

子が得られたので、これらをイネ EF-Tu 受容体候補遺伝子 (*ERC*) とした。

次に、EF-Tu 受容体候補遺伝子の中から受容体候補遺伝子を同定するため、これら遺伝子を EF-Tu-a 101-300 認識能を持たないシロイヌナズナに過剰発現させることで、シロイヌナズナが EF-Tu-a 101-300 認識能を持つかどうかを調べた。シロイヌナズナのプロトプラストにイネ EF-Tu 受容体候補タンパク質発現ベクターを導入し、導入 15 時間後に EF-Tu-a 101-300 を処理して、3 時間後のシロイヌナズナ PTI 関連遺伝子である *AtWRKY29* のプロモーター活性を測定したところ、*ERC1* 遺伝子を発現させたシロイヌナズナのプロトプラストにおいては、EF-Tu-a 101-300 処理によって水処理に比べて約 1.5 倍の *AtWRKY29* プロモーター活性の上昇が認められた (図 2)。このことから、*ERC1* がイネ EF-Tu 受容体として機能している可能性が示された (図 3)。

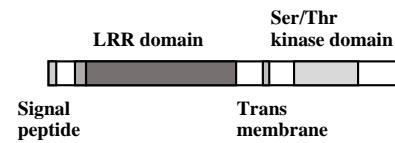


図3 *ERC1*の構造模式図

2. 3. *ERC1* 遺伝子をゲノム編集によってノックアウトしたイネの作製

ERC1 の EF-Tu 認識への関与を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて *ERC1* ノックアウトイネを作製した。まず、Cas9 によって切断する各遺伝子内の標的配列を CRISPR direct および E-CRISPR を用いて調べ、*ERC1* 遺伝子の 413bp を Cas9 により切断するターゲットとすることに決定した (図 4)。設計した gRNA 配列の 5'末端に *BsaI*配列を付加したオリゴ DNA とそれに対して相補的な配列の 5'末端に *BsaI*配列を付加したオリゴ DNA を作製し、各オリゴ DNA セットのリン酸化とアニーリングを行い、これらを *BsaI* で消化した pRGEB31 とライゲーションし、*ERC1*/pRGEB31 を作製した。

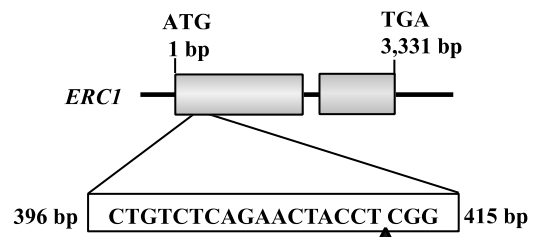


図4 CRISPR/Cas9での*ERC1*遺伝子の切断部位

作製したベクターをアグロバクテリウムに導入し、イネのニホンバレから作製したカルスに感染させ、ハイグロマイシン耐性を指標として選抜し、再分化させることで形質転換イネを作製した。作製した形質転換体における *ERC1* 遺伝子の変異を確認するために、再分化体からゲノムを抽出し標的配列周辺を増幅できるように設計したプライマーセットを用いて PCR を行い、ダイレクトシーケンスを行った。その結果、413 bp 周辺に変異を持つ個体が 2 個体得られたので、これらを *ERC1*-CR-6 および *ERC1*-CR-8 と名付けた。*ERC1*-CR-6 では、413 番目の T の後ろに G が挿入されており、*ERC1*-CR-8 では 413 番目の後ろに T の挿入が認められた。ダイレクトシーケンスによって 1 種類の配列のみが検出されたことから、これらの株は同じ *ERC1* 変異遺伝子をホモで持つ株であることが示された。

次に、*ERC1*-CR-6、*ERC1*-CR-8 を自殖させたところ、*ERC1*-CR-6 の自殖個体では *ERC1*-CR-6-22 と名付けた個体が、*ERC1*-CR-8 の自殖個体では *ERC1*-CR-8-7 と名付けた個体が Cas9 カセットを保持していないことが明らかとなった。また、*ERC1*-CR-6-22 と *ERC1*-CR-8-7 の *ERC1* 遺伝子変異も確認したところ、*ERC1*-CR-6-22 には G の一塩基挿入が、*ERC1*-CR-8-7 には T の一塩基挿入が確認でき、2 個体とも親株と同様の変異を保持していることが明らかとなった。一塩基の G または T が挿入された *ERC1* 配列ではフレームシフトが生じ、226 番目のコドンがストップコドンとなる。以上のことから *ERC1* ノックアウトイネを 2 ライン作製することができたと結論づけた。

2. 4. *ERC1* 遺伝子ノックアウトイネにおける EF-Tu101-300 認識能

ニホンバレ野生株と *ERC1* ノックアウトイネ (*ERC1*-CR2-6-22、*ERC1*-CR8-7) から葉切片を作製し、これに EF-Tu-a 101-300 を処理し、0、5、7 時間後の活性酸素発生量を測定した。その結果、野生株では EF-Tu-a 101-300 処理により 5 時間で約 5 倍、7 時間で約 6 倍の活性酸素発生量が認められたのに対して、*ERC1*-CR6-22 と *ERC1*-CR8-7 に EF-Tu-a 101-300 をそれぞれ処理した場合には、5 時間後に約 1.8 倍、7 時間後に約 2 倍の活性酸素量しか認められなかった (図 5)。この *ERC1* ノック

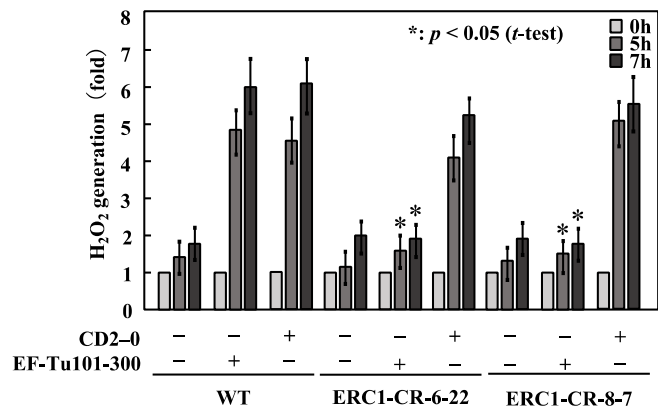


図5 *ERC1* ノックアウトイネに EF-Tu-a 101-300 を処理した時の活性酸素発生量

アウトイネ葉切片にイネに対して PAMP 活性を示す CD2-0 を処理した場合、野生株と同程度の活性酸素発生が認められたことから、*ERC1* ノックアウトイネ培養細胞では EF-Tu-a 101-300 以外の PAMP を認識して活性酸素発生を誘導する能力は欠損していないことが示された (図 5)。このような EF-Tu-a 101-300 によって発生する活性酸素量の低下はイネの植物体でも認められたことから、*ERC1* ノックアウト体では EF-Tu-a 101-300 を認識して活性酸素を発生させる能力を失っていることが明らかになった。

ERC1 ノックアウトイネに *ERC1* 遺伝子を導入することで EF-Tu101-300 認識能が回復するかどうかを調べるために、*ERC1*-CR-6-22 と *ERC1*-CR-8-7 から調製したイネプロトプラストに *ERC1* 発現ベクターと *OsWRKY70* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターを導入した。各遺伝子導入イネプロトプラストに EF-Tu-a 101-300 を処理し、3 時間後の *OsWRKY70* のプロモーター活性を測定したところ、*ERC1*-CR-6-22 では水処理の約 2 倍、*ERC1*-CR-8-7 では水処理の約 1.8 倍の *OsWRKY70* のプロモーター活性の増加が認められた。このことから、*ERC1* はイネにおいて EF-Tu の受容体として機能することが明らかになった。

3. おわりに

イネの EF-Tu 認識機構と免疫反応誘導機構を調べるため、イネにおける EF-Tu の認識領域を明らかにし、その受容体候補として *ERC1* を同定した。CRISPR/Cas9 法を用いて *ERC1* ノックアウトイネを作製したところ、EF-Tu を処理しても PTI 反応である活性酸素発生とカロース沈着が誘導されないことが明らかになった。これまでの研究で、*ERC1* は EF-Tu-a 101-300 と特異的に結合することが免疫沈降によって明らかになっていることから、*ERC1* がイネにおいての EF-Tu 受容体であると考えられる。今後 *ERC1* ノックアウト体に *ERC1* を相補した形質転換体や *ERC1* のキナーゼドメインを欠損させた遺伝子を導入したイネ形質転換体を作製することで、*ERC1* がイネにおいて EF-Tu を特異的に認識する受容体であることを確定したい。

参考文献

- 1) Jones, J.D., Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329. (2006)
- 2) Alfano JR, Collmer A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 385-414. (2004)
- 3) Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., Boller, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18: 265-276. (1999)
- 4) Che FS, Nakajima Y, Tanaka N et al. Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *J. Biol. Chem* 275: 32347-32356. (2000)
- 5) Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16: 3496-3507. (2004)
- 6) Laquittaine L, Gomès E, François J, Marchive C, Pascal S, Hamdi S, Atanassova R, Delrot S, Coutos-Thévenot P. Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against botrytis cinerea: induction of type I LTP promoter activity, *WRKY*, and stilbene synthase gene expression. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 19: 1103-1112. (2006)
- 7) Silipo A, Molinaro A, Sturiale L, Dow JM, Erbs G, Lanzetta R, Newman MA, Parrilli M. The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J. Biol. Chem.* 280:33660-33668. (2005)
- 8) Gómez-Gómez L, Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5: 1003-1011. (2000)
- 9) Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., Felix, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* 125:749-760. (2006)
- 10) Furukawa T, Inagaki H, Takai R et al. Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 27: 113-124. (2014)