

イネ免疫反応を誘導する
新規 Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)の同定と
その認識機構に関する研究

2014 年 1 月 10 日提出

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
植物分子環境生理学研究室
(蔡 晃植教授)

学籍番号 511306

古川 岳人

目次

序論	1
第一章 植物病原細菌 <i>Acidovorax avenae</i> N1141 菌株に存在する新規 PAMP の同定	7
緒言	8
材料と方法	9
結果	26
考察	59
第二章 イネが認識する EF-Tu エピトープ部位の同定	64
緒言	65
材料と方法	66
結果	69
考察	80
第三章 イネに存在する EF-Tu 受容体の探索	83
緒言	84
材料と方法	85
結果	90
考察	101
謝辞	104
引用文献	105
論文目録	116

序論

紀元前 8,500 年頃、人類はメソポタミアの肥沃三日月地帯で初めて食料生産を始めた。ここで、最初に栽培された作物はエンマーコムギ、ヒトツブコムギ、大麦であった。その後、食料生産技術はエジプト文明、インダス文明が興ったナイル川、インダス川流域へと伝播されていった。また、中国では紀元前 7,500 年頃には長江流域で稲作が始まっており、その後、東南アジアや朝鮮半島、日本に伝わっていった。さらに、アメリカ大陸では紀元前 3,500 年頃にトウモロコシの栽培が始まったと考えられている。しかし、これらの作物は気候やその土地特有の病原菌による病気によって、栽培地域が限定され、地球規模での栽培には至らなかった。もし、病原体の感染から植物を守る方法を人類が獲得できたら、気候さえ適せばどの場所でもこれら作物を高い生産性で栽培できることになり、今後世界人口の増加に従って起こることが予想される食料不足を解決するのに大きく貢献することと考えられる。特に、先史より現在まで主要な穀物として栽培されてきたイネの病気に関する発現機構を明らかにすることは、世界的な食糧不足の解消により貢献するであろう。

植物は大多数の病原体に対して有効な防御機構を有しており、それを回避したいくつかの病原体によってのみ加害されることが明らかとなっている。植物は動物のような免疫担当細胞を持たないが、植物独自の病原菌認識機構と免疫機構を有している。植物の免疫反応としては病原菌認識後、早期にみられる活性酸素の発生 (Torres et al., 2005) や細胞質の収縮、核の凝集など形態的变化を伴う過敏感細胞死 (Greenberg and Yao, 2004)、抗菌性物質である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 (Aziz et al., 2003) などがある。

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 (Jones and Dangl, 2006)。植物は、侵入してくる病原菌が共通して持つ Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) 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。これにより PTI を抑制することができた場合には、病原菌の感染が成立する。しかし、植物がエフェクターを認識する分子を有していた場合には、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。さらに、これらの免疫反応は、独立した系であるが、その誘導には両システム間のクロストークが重要なことが明らかになっている。事実、過敏感細胞死の誘導には活性酸素の発生が必須となる (Levine et al., 1994)。このことは、植物が効果的な免疫反応を誘導し病原菌の感染から身を守るためには、感染の初期に PAMPs を認識し PTI を誘導することが非常に重要であることを示している。

これまでに植物における PAMPs として、糸状菌の細胞壁構成因子であるキチン (Felix et al., 1993)、細菌の鞭毛を構成するタンパク質フラジェリン (Felix et al., 1999、Che et al., 2000)、翻訳伸長因子 Elongation Factor Tu (EF-Tu) (Kunze et al., 2004)、細胞壁構成因子であるペプチドグリカン (Gust AA et al., 2007)、エルゴステロール (Laquitaine et al., 2006)、リポポリサッカライド (LPS) (Silipo et al., 2005) などの分子が明らかになっている。この様に、これまで明らかになった PAMPs は多種多様であるが、シロイヌナズナは細菌由来の PAMP であるフラジェリン、EF-Tu、LPS、ペプチドグリカンを認識することが報告されている。一方、トマトは真菌由来の PAMP であるキチンとエルゴステロールを認識することが明らかとなっている。このことから、現在、植物は一種類の病原体が持つ複数の PAMPs を認識すると考えられている。

多種多様な PAMPs のなかで、フラジェリンと EF-Tu が比較的良好に研究されている。フラジェリンは双子葉植物であるトマトの培養細胞の免疫反応を誘導する物質として、*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* から同定された (Gómez-Gómez et al., 1999)。さらに Boller らは、臭化シアンでフラジェリンを分解したところ、N 末端領域に免疫反応を誘導する活性を有することを明らかにした。また、*P. syringae* pv. *tabaci* 以外の細菌のフラジェリンが免疫反応を誘導する活性を有していることと、フラジェリンの N 末端と C 末端は種間で比較的に保存されていることから (Wilson and Beveridge, 1993)、植物はフラジェリンの保存されている領域を認識していると推測した。そこで、免疫反応誘導活性を有し、菌種間で最も保存されていた *P. aeruginosa* のフラジェリンの N 末端領域の 22 アミノ酸を合成

し **flg22** と名づけた。この **flg22** はトマトやジャガイモ、タバコ、シロイヌナズナといった植物種に対してカロースの沈着や PR タンパク質の蓄積などの免疫反応を引き起こすことが明らかにされた。また、シロイヌナズナのエコタイプである La-er の種子に **flg22** を処理すると生育阻害をひきおこすことも明らかになった (Gómez-Gómez et al., 1999)。そこで、**flg22** の受容体遺伝子を同定するために、La-er を EMS で処理することによって突然変異を誘発した植物を自殖させて得た M2 種子に **flg22** を処理し生育阻害が起きなかった個体を選抜することで、*fls2* 突然変異体を得た (Gómez-Gómez and Boller, 2000)。そして、CAPS マーカーを用いたマップベースクローニングによって、**flg22** の受容体をコードする *FLS2* (*FLagellin-Sensing 2*) 遺伝子を同定した (Gómez-Gómez and Boller, 2000)。このタンパク質は、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であった (Gómez-Gómez and Boller, 2000, 2002)。

Boller らは *fls2* 突然変異体に対して既知の免疫反応誘導分子であるフラジェリンを欠損した *Escherichia coli* GI826 の菌体破碎液を処理しても、免疫反応が誘導されることを明らかにした (Kunze et al., 2004)。そこで、シロイヌナズナの培養細胞と *Escherichia coli* GI826 のフラジェリン欠損株を用いて新たな植物免疫反応を誘導する分子を探索したところ、EF-Tu が同定された (Kunze et al., 2004)。さらに、EF-Tu を様々なプロテアーゼで切断し、免疫誘導活性を調べることで、N 末端領域の 18 アミノ酸を活性部位として同定し、それを elf18 と名付けた。彼らは、**flg22** を処理したシロイヌナズナ培養細胞において、**flg22** 処理を行っていないものと比べて elf18 の結合量が増加していることと、elf18 を処理したシロイヌナズナ培養細胞において、elf18 処理を行っていないものに比べて **flg22** の結合量が増加していることを明らかにした (Zipfel et al., 2006)。そこで、elf18 を処理したシロイヌナズナ培養細胞と **flg22** を処理したシロイヌナズナ培養細胞の両方で発現量の増加した受容体様キナーゼ (*RLKs* : *Receptor Like Kinases*) 遺伝子の中に EF-Tu 受容体遺伝子が存在すると予想し、発現量が増加したすべての *RLKs* 遺伝子についてシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体を取得し、その中から elf18 処理に対して免疫反応を誘導できなくなった変異体を選抜することで、EF-Tu 受容体をコードする *EFR* (*EF-Tu Receptor*) 遺伝子を同定した (Zipfel et al., 2006)。このタンパク質は細胞外に 21 個のロイシンリッチリピ

ート領域を、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であった。

フラジェリンの受容体である FLS2 と EF-Tu の受容体である EFR は、細胞外にそれぞれのリガンドと直接結合するロイシンリッチリピート領域と、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ領域を持つ受容体型キナーゼであった。さらに、これらの受容体は、それぞれのリガンドとの相互作用後、速やかに細胞膜に存在する BAK1 (BRI1-associated kinase 1) という受容体様キナーゼと相互作用することが明らかとなっている (Chinchilla et al., 2007, Roux et al., 2011)。そして、FLS2 または EFR は BAK1 と相互作用した後に、トランスリン酸化することで情報を下流に伝達していることも明らかとなっている (Schwessinger et al., 2011)。また、FLS2 と EFR の下流の情報伝達に関与する分子についても共通の分子が使われていることが報告されており (Eschen-Lippold et al., 2012)、その下流で発現する遺伝子群に関しても共通性があることも明らかとなっている (Zipfel et al., 2006)。このようなことから現在、多様な PAMPs に対応するように PAMPs と直接結合する受容体は多様であるが、その認識情報を伝達する経路は共通のシステムを使用していると考えられている。

これまでに、フラジェリンや EF-Tu がどのような植物種において PAMPs として機能するかについても調べられている。フラジェリンに関しては機能的な FLS2 オーソログがトマト (Robatzek et al., 2007) やタバコ (Hann and Rathjen, 2007)、アブラナ科植物 (Dunning et al., 2007)、イネ (Takai et al., 2008) に存在することが報告されている。しかし、イネに存在する FLS2 オーソログ (OsFLS2) は、flg22 がイネに対して PTI を誘導しないことから、フラジェリン認識における主たる受容体になっていないと考えられている (Takai et al., 2008)。elf18 はシロイヌナズナの様々なエコタイプやほかのアブラナ科植物に対して PTI を誘導するが、ジャガイモやキュウリ、ヒマワリ、ダイズに対しては PTI を誘導しないことが報告されている (Kunze et al., 2004)。さらに、イネにおいては EFR のオーソログが存在しないことが全ゲノム解析から明らかになっており、elf18 はイネにおいても PAMP として機能しないと予想されている (Boller and Felix, 2009)。この様に、植物免疫における PAMP はその効果範囲が一定の植物種に限定されるという特徴を持つ。このことはさらに、植物種によっては異なる分子が PAMP として機能する可能性を提示する。

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。これまでこの菌は、イネ、アワ、ヒエ、トウモロコシなどから様々な菌株として単離されているが、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 (Kadota et al., 1996)。例えば、イネから単離された K1 菌株はイネを加害できるが、シコクビエを加害できない。同様に、シコクビエから単離された N1141 菌株はイネに感染できない。これまで研究で、イネに対して非病原性の N1141 菌株をイネに接種すると、活性酸素の発生や抵抗性遺伝子の発現といった PTI や過敏感細胞死を含む ETI が誘導されるのに対し、病原性の K1 菌株では、このような PTI や ETI は誘導されないことが明らかになった (Che et al., 1999, Tanaka et al., 2001, Iwano et al., 2002, Tanaka et al., 2003, Fujiwara et al., 2004)。このことは、*A. avenae* の宿主特異性は、植物が *A. avenae* を認識して免疫反応を誘導できるかどうか依存していることを示している。

そこで、イネによる *A. avenae* の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 や ETI を誘導する物質の探索が進められた。まず、イネの PTI を誘導する物質について探索を行った。*A. avenae* N1141 菌株の菌体表層抽出物をイネ培養細胞に処理し、免疫反応を誘導するか調べた結果、この抽出物に活性酸素の発生などの PTI 誘導活性があることが明らかになった。また、こ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、PAMP 活性物質はタンパク質であることが示唆された。次に、N1141 菌株と K1 菌株の菌体表層間で異なる物質を探索するために、N1141 菌体をウサギに接種して作製した抗血清を K1 菌体で吸収することで抗 N1141 抗体を、抗 K1 抗血清を N1141 菌体で吸収することで抗 K1 抗体をそれぞれ得た。これらの抗体を用いて各菌株の表層抽出物に対するウェスタンブロットを行ったところ、どちらの抗体も約 50 kDa の物質を検出した。そこで、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構成タンパク質であるフラジェリンと相同性が認められた (Che et al., 2000)。そこで、両菌株より精製したフラジェリンをイネ培養細胞に処理して PTI が誘導されるか調べたところ、非病原性 N1141 菌株由来のフラジェリン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 反応を誘導した。一方、病原性 K1 菌株から精製したフラジェリンはこのような免疫反応を

誘導しなかった (Che et al., 2000)。これらのことから、イネによる *A. avenae* の特異的な認識にはフラジェリンが関与していることが明らかとなった。さらに、イネによるフラジェリン認識の特異性機構について調べたところ、K1 菌株のフラジェリンに付加されている糖鎖がイネによるフラジェリン認識を阻害していることが新たに明らかになった (Hirai et al., 2011)。

このように、*A. avenae* N1141 菌株にはイネによって特異的に認識されるフラジェリンが存在することが明らかになった。一方、N1141 菌株のフラジェリン遺伝子欠損株をイネに接種したときに、PTI 関連遺伝子のいくつかが発現誘導されることが明らかになった (Tanaka et al., 2003)。このことは、*A. avenae* N1141 菌株にはイネの PTI を誘導するフラジェリン以外の PAMP が存在していることを示す。これは、植物が病原体の持つ複数の PAMPs を認識することで PTI を誘導しているという事実からも支持される。しかし、このような *A. avenae* N1141 菌株に存在するフラジェリン以外の PAMP についての物性や特徴は全く明らかになっていない。*A. avenae* N1141 菌株での存在が示唆されているフラジェリン以外の PAMP を同定し、その認識と免疫誘導機構を分子レベルで明らかにすることは、イネの免疫機構を分子レベルで理解するためには非常に重要となる。

そこで、*A. avenae* に存在するフラジェリン以外の PAMP を同定し、その分子の認識による免疫誘導機構を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を行った。本論文の第一章では、*A. avenae* N1141 菌株のフラジェリン欠損株からイネに対して PTI 反応を誘導する PAMP として EF-Tu を同定したことについて記述する。また、第二章では、EF-Tu のイネにより認識されるエピトープ部位を同定し、そのエピトープ部位を EFa50 と名付けたことについて記述する。さらに、第三章では PTI 誘導時に PAMP 受容体が発現誘導されることを利用して、EFa50 を認識する受容体を探索した結果について記述する。

第一章

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株に 存在する新規 PAMP の同定

第一章 緒言

これまでに、*A. avenae* N1141 菌株の鞭毛構成タンパク質フラジェリンがイネに対して PAMP として機能していることが報告されている (Che et al., 2000)。しかし、N1141 菌株のフラジェリン遺伝子欠損株をイネに接種したときに、一部の PTI 反応が誘導されることから、*A. avenae* N1141 菌株にはイネの PTI を誘導するフラジェリン以外の PAMP が存在している可能性が示唆されている (Tanaka et al., 2003)。さらに、シロイヌナズナやトマトが一種類の病原体が持つ複数の PAMPs を認識して PTI を誘導することから、*A. avenae* N1141 菌株にもフラジェリン以外の PAMP が存在し、イネの免疫反応誘導に関与している可能性が考えられる。しかし、*A. avenae* N1141 菌株に存在するフラジェリン以外の PAMP に関する情報は全く得られていない。

そこで本章では、フラジェリン遺伝子欠損 N1141 菌株からイネに対して PTI 反応を誘導するフラジェリン以外の PAMP を精製し、同定することを目的として研究を行った。

第一章 材料と方法

1) 菌の保存と培養

A. avenae はイネに対して病原性である K1 菌株 (MAFF 301505)、非病原性である N1141 菌株 (MAFF 301141) およびフラジェリン欠損 N1141 菌株 (Δ fla1141) (Tanaka et al., 2003) を用いた。*A. avenae* の保存は、Pseudomonas F (以下、PF) 固体培地 (Bacto Trypton (BD) 10 g, Bacto Protease Peptone No. 3 (BD) 10 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.1 g, Bacto Agar (BD) 3 g, total vol. 1 L) で 30°C、一晚培養した菌体を白金耳でかきとり、スキムミルク溶液 (10% [w/v] Skim milk, 80 mM Sodium glutamate) 1 mL に懸濁し、これを 50 μL ずつ分注して液体窒素で瞬間凍結して -80°C で凍結保存することで行った。

2) イネ培養細胞の培養と継代

イネ培養細胞は Oc 細胞 (*Oryza sativa* L.C5924) を用いた。培養細胞はオートクレーブ滅菌した R2S 培地 (20×R2 Major stock 50 mL, 1000×R2 Minor stock 1 mL, 500×Fe liq. 2 mL, 1000×MS vitamin 1 mL, 40 mg/mL 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid 100 μL , Sucrose 30 g, total vol. 1 L [pH 5.6]) を用いて 100 mL 三角フラスコに 22 mL 入れた状態で、30°C、108 rpm、連続光下で振盪培養を行った。また、培養細胞の継代は 7 日ごとに行い、200°C、2 時間の乾熱滅菌を行った 100 mL 三角フラスコに培養細胞 2 mL と R2S 培地 20 mL 加えて 22 mL とした。以降の実験に用いるものは、継代から 4 日目のものを用いた。

R2S 培地作製に用いた各種 stock solution

・20×R2 Major stock (KNO_3 80 g, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 6.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.46 g, total vol. 1L) をフィルター (MILLEX®-GS, MILLIPORE) で滅菌し、180℃、3 時間の乾熱滅菌を行ったメジウム瓶に保存した。

・1000×R2 Minor stock ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 172.9 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 220 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg, H_3BO_3 300 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mg, total vol. 100 mL) をフィルター (MILLEX®-GS, MILLIPORE) で滅菌し、180℃、3 時間の乾熱滅菌を行ったメジウム瓶に保存した。

・500×Fe liq. ($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ 375 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 275 mg, total vol. 100 mL) は EDTA を溶かしてから硫酸鉄を加え、溶解後オートクレーブで滅菌した。

・1000×MS vitamin (MS vitamin powder 1000× 1.03 g, total vol. 10 mL) をフィルター (MILLEX®-GS, MILLIPORE) で滅菌し、1.5 mL マイクロチューブに分注し、-20℃で保存した。

・40 mg/mL 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid は 40 mg の 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid を 1 mL の DMSO に溶解して作製した。

3) イネの育成

イネは日本晴れ (*O. sativa* L. ssp. Japonica cv. Nipponbare) を使用した。種子を水道水に浸し、人工気象器 (Bio TRON, NK system) に 30℃、2 日置き発芽させた。発芽した種子を粒状土 (びわこ 2 号) が入ったプランターに定植して、人工気象器で明期 16 時間 (30℃)、暗期 8 時間 (25℃) の条件下で生育させた。

4) *A. avenea* フラジェリン欠損 N1141 菌株 (Δ fla1141) 菌体破砕液の調製と PTI 反応試験

4-1) Δ fla1141 菌体破砕液の作製

Δ fla1141 スキムミルク保存溶液 10 μ L を PF 液体培地 5 mL に加え、30°C で一晚振盪培養を行った。前培養した培養液 5 μ L を PF 液体培地 500 mL \times 8 本にそれぞれ 500 μ L ずつ加え、30°C、18 時間振盪培養を行った。培養後、培養液を Himac CR20G (HITACHI) 用遠心チューブに分注し、6,000 g、4°C で 20 分間遠心分離した後、沈殿を得た。沈殿物に MilliQ 水 50 mL ずつ加え、再懸濁した後、6,000 g、4°C で 20 分間遠心分離することで再度沈殿を集めた。この洗浄操作を 2 回行った後、MilliQ 水 20 mL で再懸濁し、50 mL ビーカーに移した。懸濁液をクラッシュアイス上で氷冷しながら超音波破砕機 (UD-201, TOMY) で 1 分破砕 (OUTPUT: 4)、1 分氷冷を 15 回行った後、10,000 g、4°C で 60 分間遠心分離した上清を Δ fla1141 菌体破砕液として 4°C で保存した。 Δ fla1141 菌体破砕液のタンパク質濃度は Pierce 660nm Protein Assay Reagent (Thermo SCIENTIFIC) を用いて BSA により作製した検量線より算出した。

4-2) イネ培養細胞を用いた活性酸素発生試験

継代 4 日後の Oc 細胞を三角フラスコから R2S 培地とともにシャーレに移し、ピペットで培地を吸い取った後、細胞を濾紙に移して残った水分をできるだけ除去した。その後、細胞重量を測定し、あらかじめ R2S 培地を分注しておいた三角フラスコに細胞 10 mg が R2S 培地 1 mL に懸濁される様に入れ、スターラーで攪拌した。攪拌した状態で 24 穴培養細胞プレート (TPP) に懸濁液 1 mL を移し、新しい培地に慣らすために、30°C、108 rpm、連続光下で 2 時間振盪培養を行った。その後、 Δ fla1141 菌体破砕液を終濃度 2 μ g/mL となるように加えた。また、ポジティブコントロールとして精製したフラジェリンを終濃度 100 nM になるように加え、ネガティブコントロールとして MilliQ 水を Δ fla1141 菌体破砕液と等量加えた。その後経時的に、蛍光・発光シグナル検出用 96 穴プレート (nunc)

に 10 μ l の培地をはかりとり、1.1 mM ルミノール 10 μ L を加え、PHELIOS AB-2350 (ATTO) にセットし、50 mM KH_2PO_4 (pH 7.9) 15.56 mM $\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ 180 μ L を自動分注し、10 秒間の化学発光量を測定した。

4-3) イネ葉切片を用いたカロース沈着の観察

3 週間生育したイネ葉を 1 cm の長さに刻み、R2S 培地 1 mL を入れた 24 穴培養細胞プレートに移して、30°C、3 時間、連続光下で静置した。その後、 Δ fla1141 菌体破碎液を終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、30°C、16 時間、連続光下で反応させた。ネガティブコントロールとして MilliQ 水を Δ fla1141 菌体破碎液と等量加え、同様に反応させた。反応後、ファーマー固定液 (酢酸:エタノール = 1 : 3) に 1 時間浸し固定した後、100 mM Potassium phosphate buffer (pH 8.0) で三回洗浄し、0.1% アニリンブルーを含む 100 mM Potassium phosphate buffer (pH 8.0) で 4 時間染色した。染色後、100 mM Potassium phosphate buffer (pH 8.0) で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡 BX51 (OLYMPUS) でカロースの沈着を観察し数を数えた。

4-4) イネ免疫関連遺伝子の発現誘導解析

継代 4 日後の Oc 細胞の R2S 培地をピペットで吸い出し、新しい R2S 培地を等量加え、新しい培地に慣らすために、30°C、108 rpm、連続光下で 2 時間振盪培養を行った。2 時間後、 Δ fla1141 菌体破碎液を終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた。また、ネガティブコントロールとして MilliQ 水を Δ fla1141 菌体破碎液と等量加えた。その後、経時的に、1 mL の培養細胞懸濁液を先切りチップで回収し 1.5 mL チューブに入れ、培地を取り除いた後、液体窒素で凍結した。凍結した培養細胞からの Total RNA の抽出は RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用いて行い、Nano drop (SCRUM) で RNA の濃度を測定した。抽出した Total RNA は、免疫関連遺伝子である *OsWRKY70*、*OsCht1*、*OsEDS1*、*OsNAC4* と内部標準として *OsAct1* をそれぞれ特異的に増幅するプライマーセットと

GoTaq® 1-Step RT-qPCR Kit (Promega) を用いた Real time RT-PCR に使用した。なお、Real time RT-PCR は DNA Engine Opticon®2 System (BIO-RAD) を使用して行った。

【RT-PCR に用いたプライマーセット】

- *OsWRKY70* を特異的に増幅するプライマーセット

RT-*OsWRKY70*-F (5'-GGCGTCTCGTCCTCCGGGTT-3')

RT-*OsWRKY70*-R (5'-GTCGTAATCCAGCTGAACAA-3')

- *OsCht1* を特異的に増幅するプライマーセット

RT-*riceCht1*-F (5'-TCTACACCTACGACGCCTTC-3')

RT-*riceCht1*-R (5'-AGGAACGCGGCGACCTCGCG-3')

- *OsEDS1* を特異的に増幅するプライマーセット

RT-*riceEDS1*-F (5'-TTCCTCGCCTCCTTCGGCGC-3')

RT-*riceEDS1*-R (5'-GAATGGCCTGTGAATACAAT-3')

- *OsNAC4* を特異的に増幅するプライマーセット

RT-*OsNAC4*-F (5'-AATCATCGCCGAGGTCGACC-3')

RT-*OsNAC4*-R (5'-GGTCCCTCGGCGTGAAGAAG-3')

- *OsAct1* を特異的に増幅するプライマーセット

RT-*riceActin*-F (5'-AGTGTCTGGATAGGAGGGTC-3')

RT-*riceActin*-R (5'-GTGAACAATTGCTGGACCCG-3')

5) Δ fla1141 菌体破砕液の凍結、加熱および酵素処理

タンパク質 100 μ g 分の Δ fla1141 菌体破砕液について以下の様な凍結、加熱、各酵素処理を行った。凍結処理は、-80°C で 18 時間凍結させた。加熱処理は、95°C で 30 分間加熱した。凍結または加熱処理後に、10,000 g、4°C、60 分間遠心分離で上清と沈殿に分け、沈殿は上清と等量の MilliQ 水で再懸濁して以後の実験に用いた。トリプシン消化は、 Δ fla1141 菌体破砕液と等量の 200 mM Tris-HCl (pH 8.5) を加え、そこに 100 μ g/mL トリプシン溶液 (Trypsin (modified sequencing Grade, Roche) 25 μ g, 20 mM CH₃COOH 250 μ L) を 4 μ l 加えてから、37°C、

18 時間反応させた。RNase 処理と DNase 処理は、それぞれ RNase-free DNase (QIAGEN) もしくは Ribonuclease (DNase free) (Wako) を 10 μ L 加え、37°C で 1 時間反応させた。各酵素処理のコントロールとして、酵素の代わりに MilliQ 水を加えたものを用いた。

6) Q Sepharose 担体を用いた強陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

Q Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare) の 50%スラリーを 25 mL をカラムに充填し、そこへ 1 M NaOH を担体の 10 倍量加え活性化させた。さらに、担体の 10 倍量の 200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) で平衡化した。ここに、 Δ fla1141 菌体破碎液を添加し、吸着させた。次に、200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0)、200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) , 100 mM NaCl、200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) , 200 mM NaCl、200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) , 300 mM NaCl、200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) , 400 mM NaCl、200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) , 500 mM NaCl を担体の 4 倍量順次加えることで溶出を行い、非吸着画分、200 mM Sodium phosphate buffer 画分、100 mM NaCl 溶出画分、200 mM NaCl 溶出画分、300 mM NaCl 溶出画分、400 mM NaCl 溶出画分、500 mM NaCl 溶出画分を得た。それぞれの画分のタンパク質濃度は Pierce 660nm Protein Assay Reagent を用いて BSA により作製した検量線より算出した。

7) 二次元電気泳動による活性画分の分離と質量分析計を用いたタンパク質の同定

7-1) 二次元電気泳動

最も強い免疫反応誘導活性を有していた 300 mM NaCl 溶出画分のうち、タンパク質 800 μ g 分を Amicon Ultra-10K (MILLIPORE) で限外濾過を行った後、

遠心濃縮機で乾固した。沈殿した活性物質を、2DE sample buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 0.5% Triton, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 0.5% IPG buffer (GE Healthcare)) 50 μ L に溶解させ、室温で 10,000 rpm で 15 分間遠心して不溶物を除いた。濃縮した 300 mM NaCl 溶出画分に含まれるタンパク質を二次元電気泳動によって分離するため、まず、一次元目の等電点電気泳動 (IEF) を行った。等電点電気泳動に使用するゲルストリップ (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 13 cm, GE Healthcare) を 5 mL の膨潤 buffer (Urea 3.63 g, Thiourea 1.52 g, 20% TritonX-100 1 mL, DTT 0.02 g, Pharmalyte (pH 3-10 for IEF, GE Healthcare), 0.1 M acetic acid 0.25 mL, 0.1% (w/v) Orange G 0.25 mL, total vol. 10 mL) の入った膨潤器にそれぞれピンセットで入れ、等電点電気泳動装置 (Cool Phorster IPG-IEF Type-PX, Anatech) にセットし、20°C で 8 時間以上膨潤させた。その後、ゲルストリップ保持板をセットしたトレイにシリコンオイルを入れ、キムタオル上で 90 秒間横向きにして立てて余分な膨潤液を除き、ゲルストリップを保持板にのせた。電極を取り付けた後、試料塗布用濾紙 3 枚にサンプルのタンパク質溶液を染み込ませてゲルストリップの陰極側にのせた。サンプル押さえアタッチメントでその濾紙を固定した後、トレイにゆっくりシリコンオイルを注ぐことで大気から遮断し、以下の泳動条件にて等電点電気泳動を行った。

等電点電気泳動後、ゲルストリップについたシリコンオイルを MilliQ 水中で 1 秒ほど洗い流し、5 mL の SDS 処理液 (Urea 3.63 g, DTT 0.05 g, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.5 mL, 10% SDS 2 mL, 0.1% (w/v) BPB 0.25 mL, 50% (v/v) Glycerol 5 mL, total vol. 10 mL) の入った膨潤器に入れて 30 分間浸透させた。その後、5 mL の還元アルキル化反応液 (Urea 3.63 g, Iodoacetamide 0.45 g, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.5 mL, 10% SDS 2 mL, 0.1% (w/v) BPB 0.25 mL, 50% (v/v) Glycerol 5 mL, total vol. 10 mL) の入った膨潤器に入れて 15 分間浸透させた。還元アルキル化処理後、ゲルストリップの両端のプラスチック部分を切り落とし、二次元目 SDS-PAGE 用のスラブゲル (MilliQ 水 20 mL, 30% Acrylamid/Bis Solution 37.5:1 16.7 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 12.5 mL, 10% SDS 0.5 mL, 50% (v/v) Glycerol 105 μ L, TEMED 37.5 μ L) の上部にのせた。ゲルストリップをのせたスラブゲル上部に封入用アガロースゲル (SDS 泳動バッファー 100 mL, アガロース 0.5 g, BPB 適量) によってゲルストリップを固定した。そして、スラブゲルを二次元目 SDS-PAGE 用装置 (SE 600 Ruby Standard Dual Cooled

Vertical Unit, Amersham Biosciences) にセットして泳動した。また、電気泳動に使用したスラブゲルは作製後に、重層した水飽和ブタノール (1-ブタノール 50 mL, MilliQ 水 10 mL) を MilliQ 水にて洗浄し、ゲル保存用溶液 (1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 500 mL, 10% SDS 20 mL, total vol. 2L) に浸したキムワイプで湿潤した状態で冷蔵庫に保存し、作製後 6 時間以上経過したものを使用した。

一次元目等電点電気泳動 (IEF) と二次元目 SDS-PAGE の泳動条件は下記に示した。

<一次元目等電点電気泳動 (IEF) 泳動条件>

Gradient mode	
↓ 1-1V	500V, 250 mA, 200 W, 3:00 M(hr)
↓ 1-2SG	500V, 2.0 mA, 7.0 W, 3:00 M(hr)
↓ 1-3SV	3500V, 2.0 mA, 200 W, 3:00 M(hr)
↓ 1-4SV	3500V, 2.0 mA, 200 W, ∞(hr)

<二次元目 SDS-PAGE 泳動条件>

Gradient mode	
↓ 2-1C	3500 V, 50 mA, 200 W, 5:30 M(hr)
↓ 2-2	End

7-2) 銀染色

二次元電気泳動により分離したタンパク質を染色するため、銀染色を行った。銀染色は銀染色キットワコー (Wako) を用いて 1 枚のゲルにつき 200 mL スケールで行った。

二次元目 SDS-PAGE 終了後、ゲル板からゲルストリップを取り外し、それぞれのゲルを固定液 1 (Methanol 100 mL, 酢酸 20 mL, total vol. 200 mL) が 200 mL の入ったタッパーに入れ、15 分間ゆるやかに振とうした。その後、固定液 1 を捨てて固定液 2 (Methanol 10 mL, 酢酸 15 mL, total vol. 160 mL) を 160 mL 注ぎ、15 分間振とうした。次に固定液 2 を捨て、MilliQ 水 300 mL を注ぎ、

5 分間振とうした。これを 3 回繰り返して十分に洗浄した後、水を捨てて増感液（増感液 1 mL, MilliQ 水 199 mL）を 200 mL 注ぎ、10 分間振とうした。振とう後、増感液を捨てて MilliQ 水 300 mL で 5 分間振とうして洗浄し、水を捨てて染色液（染色液 A 10 mL, 染色液 B 10 mL, total vol. 200 mL）200 mL を注ぎ、正確に 15 分間振とうした。染色後、MilliQ 水 300 mL で 5 分間振とうして洗浄し、これを 3 回繰り返して十分に洗浄した。洗浄後、水を捨てて、現像液（現像液 10 mL, MilliQ 水 190 mL）200 mL を注ぎ、適度な染色像が得られるまで振とうした（5 分程度）。適度な染色像が得られたら、現像中の液に酢酸を 1 mL 添加して 3 分間振とうして反応を停止させた。現像停止後、現像液を捨てて、MilliQ 水 300 mL で 2 分間洗浄した。これを 3 回繰り返して銀染色を終了した。

7-3) ゲルの切り出しとタンパク質のゲル内消化、および抽出

銀染色で染色されたスポットを直径 3~4 mm のゲル片として切り出し、低タンパク質吸着用遠心マイクロチューブ（NIPPON GENE）に入れた。これ以降の MS 測定用サンプルの調製の操作で用いた水はすべて HPLC 用蒸留水を用いた。ゲル片の入ったチューブに脱銀染液（30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mL, 100 mM $Na_2S_2O_3$, 5 mL）を 100 μ L 添加し、室温で 10 分間振とうさせた（プチぶる MODEL2330, WAKENYAKU）。その後、脱銀染液を取り除き、HPLC 用蒸留水 500 μ L を加えて 10 分間振とうした。色素が抜けたことを確認し、HPLC 用アセトニトリルを 100 μ L 加えて室温で 5 分間振とうして脱水操作を行った。アセトニトリルを取り除き、減圧乾燥器（CENTRIFUGUL CONCENTRATOR CC-105, TOMY）で乾燥させ、溶媒を除去した。乾燥させたゲルに 10 μ g/mL トリプシン溶液（100 μ g/mL トリプシン溶液 50 μ L, 50mM NH_4HCO_3 450 μ L）を 50 μ L 添加し、氷上に 45 分間静置してゲル内にトリプシン溶液を含ませた。その後、余分なトリプシン溶液を取り除き、37°C で 16 時間以上反応させてタンパク質を消化した。トリプシン消化後、ゲル片に 25 mM NH_4HCO_3 を 10 μ L 加えて室温で 10 分間振とうした。さらに、そこへ 20 μ L の HPLC 用アセトニトリルを加え、室温で 10 分間振とうした。チューブの溶液をゲル片を吸わないように別のチューブに移し、残ったゲル片の入ったチューブに 5% ギ酸を 10 μ L 加えて室温で

10 分間振とうした。さらに、そこへ 20 μ L の HPLC 用アセトニトリルを加え、室温で 10 分間振とうした。この溶液を上記でトリプシン消化して抽出した溶液を移したチューブに回収した。残ったゲル片の入ったチューブに 5%ギ酸を 10 μ L 加えて同じ操作を行い、溶液を回収した。3 回分の抽出液をまとめたチューブを減圧乾燥器 (CENTRIFUGUL CONCENTRATOR CC-105, TOMY) にて乾燥させ、溶媒を除去した。そこへ MS 用溶液 (5% ギ酸 0.1 mL, HPLC 用アセトニトリル 0.5 mL, HPLC 用蒸留水 4.4 mL) を 20 μ L 加え、さらに HPLC 用蒸留水を 180 μ L 加えて希釈した溶液を MS 測定用サンプルとした。この MS 測定用サンプルを Ultrafree MC カラム (MILLIPORE) で 12,000 g で 4 分間遠心して濾過を行い、濾過後のサンプルをプラスチックサンプルバイアル (SHIMADZU) に入れて質量分析計のオートサンプラーにセットした。

質量分析計には LCMS-IT-TOF (SHIMADZU) のナノエレクトロスプレー NES-100 インターフェースを用いた。また、MS 測定用データの解析には LCMS solution (SHIMADZU) を用い、得られたタンパク質の同定は MASCOT Version 2.2 (MATRIX SCIENCE) により、NCBI-nr データベースを用いて行った。MS の測定条件または MASCOT の検索条件は以下に示した通りである。

<MS 測定条件>

<LC>

システムコントローラ	CBM-20A
注入サンプル量	50 μ l
モード	Binary gradient

<MS>

インターフェース	NanoESI
データ採取時間	65.00 min
CDL 温度	200.0°C
ヒートブロック温度	200.0°C
検出器電圧	1.7kV
装置モニタ温度	40.0°C
ポラリティ	ポジティブ

<MASCOT 検索条件>

Database	NCBIInr
Taxonomy	All entries/rice
Enzyme	Trypsin
Allow up to	1 missed cleavage
Fixed Mods	Carbamidomethyl(C)
Variable Mods	Oxidation(M)
Protein Mass	0 kDa
ICAT	No
Peptide Tol	0.050 Da
MS/MS Tol	0.050 Da
OverView	Yes
Report	50

8) *A. avenae* N1141 菌株の *EF-Tu* 遺伝子の配列解析

8-1) *A. avenae* N1141 菌株からのゲノム抽出

PF 液体培地 5.0 mL に *A. avenae* N1141 菌株スキムミルク保存液 5 μ L を加え、30°C で一晩振盪培養した。培養液を 15 mL ファルコンチューブに移し、4,000 g、4°C で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去し、TE buffer 1 mL で沈殿を懸濁し、500 μ L ずつをエッペンチューブに分注した。そこに 10% SDS 15 mL、20 ng/mL プロテイナーゼ K 溶液 (Wako) 1.5 μ L を加えて転倒混和を行い、37°C のエアインキュベーター (SHIMAZU) で 1 時間反応させた。反応後、各チューブに 5 M NaCl 50 μ L、CTAB/NaCl (CTAB 10 g, NaCl 4.1 g, total vol. 100 mL) 40 μ L を加え、65°C のヒートブロックで 10 分間反応させた。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を加え、転倒混和を行い、室温、12,600 rpm で 5 分間遠心分離を行った。遠心分離後、水層を新しいエッペンチューブに移し、水層の 1/10 量の 3 M CH₃COONa と等量の 2-プロパノールを加え、転倒混和を行った。転倒混和後、室温、13,000 rpm 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 mL を加えてリンスを行い、室温、13,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行った。残った沈殿を小型微量遠心濃縮機 (WAKENYAKU) で減圧乾燥し、TE buffer (1 M Tris-HCl (pH 8.0) 2 mL, 500 mM EDTA (pH 8.0) 0.4 mL, total vol. 200 mL) 250 μ L を加え、沈殿を溶解した。この溶液に 1 mg/mL RNase A (NIPPON GENE) 5 μ L を加え、37°C のエアインキュベーターで 1 時間反応させた。この反応液に等量の PEG 溶液 (13% PEG 8000, 1.6 M NaCl) を加え、ピペッティングで混合し、4°C で 1 時間静置を行った。静置後、4°C、13,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清の除去を行った。沈殿に 70%エタノール 1 mL を加えてリンスし、4°C、13,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行う操作を 2 回行った。残った沈殿を減圧乾燥し、TE buffer 50 μ L を加え、沈殿を溶解した。溶解後、Nano drop を用いて、DNA の濃度測定を行った。

8-2) *A. avenae* N1141 菌株の *EF-Tu* 遺伝子の配列解析

A. avenae N1141 菌株の近縁種である *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1 の全ゲノム配列を基に、2 つの *EF-Tu* 遺伝子 (GeneID: 4669330, 4669847) の上流と下流の位置にプライマーを作製し、*A. avenae* N1141 菌株のゲノムをテンプレートとして PCR 反応で増幅を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。単一のバンドが増幅されたことが確認できた増幅産物を Exo-SAP 処理を行った。Exo-SAP 処理を行った増幅産物をテンプレートとしてサイクルシーケンス反応を行い、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて配列解析した。また、PCR 反応およびサイクルシーケンス反応はサーマルサイクラー Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて行った。以降の配列解析および PCR 反応、サイクルシーケンス反応には同じ機器を使用した。

【PCR 反応に用いたプライマーセット】

• GeneID: 4669330 (*EF-Tu-a1*)

4669330f165 (5'-TTGCAAAAGTTGCGCTTTCACAAG-3')

4669330r1615 (5'-CCCATGTGGCTCAGTGGTAGAG-3')

• GeneID: 4669847 (*EF-Tu-a2*)

4669847f62 (5'-AGTAAGTACCACCCCTGTGT-3')

4669847r1518 (5'-GGATACGGATCTTTTGCTTGGA-3')

9) GST-EF-Tu-a 発現ベクターの作製と発現 EF-Tu-a タンパク質の精製

9-1) *EF-Tu-a* 遺伝子のクローニング

8-2) で得られた 2 つの *EF-Tu-a* 遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列が両遺伝子間で 100%一致していることが明らかとなったため、*EF-Tu-a1* 遺伝子の 5' 末端側に *Bam*HI、3'末端側に *Sa*II の認識配列を付加するように設計したプライマーを用いて *A. avenae* N1141 菌株のゲノムをテンプレートとして PCR 反応で増幅を行った。理論値と同じ大きさの増幅産物を Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて *pCR-Blunt* にライゲーションし、大腸菌 (DH5α) に形質転換した。得られたコロニーのうち目的のインサートが組み込まれたベクターをもつ形質転換体をプラスミド上に存在する配列をもとに作製したプライマーを用いてコロニーPCR で選抜した。このコロニーを 50 µg/mL Kanamycin を含む LB 液体培地を用いて 37°C、一晩振盪培養した。大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを単離した。単離したプラスミドを *Bam*HI-*EFTu**-*Sa*II/*pCR Blunt* と名付けた。

【*EF-Tu-a* 遺伝子の増幅に用いたプライマーセット】

*Bam*HI-1141EFTupGEXF

(5'-ggatccGCAAAAGGTAAGTTCTGAACGTACC-3')

*Sa*II-1141EFTu*pGEXR

(5'-gtcgacTCAGGCAATGATCTTGCCAC-3')

【コロニーPCR に用いたプライマーセット】

pBCSK-F (5'-TGACGTAGATGCCGTGCTGGGACA-3')

pBCSK-R (5'-GGCGACGACGTCTTCGGCGACG-3')

9-2) GST-EF-Tu-a 発現ベクターの作製

*Bam*HI-*EFTu**-*Sa*II/*pCR Blunt* と *pGEX-6P-3* を *Bam*HI と *Sa*II で消化後、アガロース電気泳動で分離し、*Bam*HI-*EFTu**-*Sa*II/*pCR Blunt* はインサート部分を、*pGEX-6P-3* はベクター部分を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲルから DNA を抽出した。抽出した *Bam*HI-*EFTu**-*Sa*II を Ligation-Convenience Kit (NIPPON GENE) を用いて *pGEX-6P-3* とライゲーション反応を行った。ベクターとインサートのモル比はおおよそ 1:10 で行い、16°C で 5 時間反応後、大腸菌 (DH5α) に形質転換した。目的のベクターをもつ形質転換体は *EF-Tu-a* 遺伝子の増幅に用いたプライマーセットを用いてコロニー PCR で選抜した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によりその大きさを確認し、正しい増幅断片長があったクローンを 50 µg/mL Ampicillin を含む LB 液体培地に植菌し、37°C で一晩振盪培養した。作製したプラスミドを *Bam*HI-*EFTu**-*Sa*II/*pGEX-6P-3* と名付けた。

9-3) GST-EF-Tu-a タンパク質の発現確認

9-2) で作製した *Bam*HI-*EFTu**-*Sa*II/*pGEX-6P-3* をタンパク質発現用大腸菌 BL21(DE3) に形質転換させた。同時に *pGEX-6P-3* も形質転換を行った。生じたコロニーを、pGEX-F primer と pGEX-R primer を用いたコロニー PCR によって、形質転換の確認を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によりその大きさを確認し、正しい増幅断片長があったクローンを 50 µg/mL Ampicillin を含む LB 液体培地に植菌し、37°C で一晩振盪培養した。この前培養液を 50 µg/ml Ampicillin を含む LB 液体培地 1 L に 1 mL 加え、O.D.₆₀₀ が 0.6 付近になるまで 37°C で振盪培養した。O.D. の測定は SmartSpec Plus Spectrophotometer

(BIO-RAD)を用いて測定した。O.D.₆₀₀が0.6付近に達したら、終濃度が0.1 mMとなるように100 mM IPTGを添加し、37°Cで3時間振盪して発現誘導を行った。この時、発現確認用にIPTGを加えない大腸菌も用意した。培養後、6,000 rpmで20分間遠心分離を行い、回収した菌体をPBS (NaCl 1.64 g, KCl 0.04 g, Na₂HPO₄ 0.72 g, KH₂PO₄ 0.05 g, (pH 7.8) total vol. 200 mL) 10 mLで再懸濁し、超音波破碎機 (UD-201 : TOMY) で1分破碎 (OUT PUT : 4)、1分氷冷を10回行った後、10,000 g、4°Cで60分間遠心分離した。破碎上清と等量のPBSで沈殿を懸濁した。目的タンパク質の発現は、SDS-PAGEとCBB染色で確認した。ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO) に少量のSDS泳動バッファー (Tris 3 g, SDS 1 g, Glycine 14.4 g, total vol. 1 L) を浸し、ミニスラブゲル作製キット (ATTO) で作製したゲル ([10%分離ゲル: MilliQ 水 3 mL, 30% Acylamid/Bis Solution 37.5:1 (BIO-RAD) 3.75 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.25 mL, 10% SDS 0.1 mL, 10% APS 50 µL, TEMED 5 µL], [濃縮ゲル: MilliQ 水 1.8 mL, 30% Acylamid/Bis Solution 37.5:1 0.45 mL, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.75 mL, 10% SDS 0.02 mL, 10% APS 25 µL, TEMED 5 µL]) をセットし、100 V 定電圧で2時間電気泳動を行った。マーカーはAPRO-Marker Low range (APRO)を使用した。SDS-PAGE後のアクリルアミドゲルをCBB染色液 (CBB-R250 0.5 g, Methanol 100 mL, Acetic acid 10 mL, MilliQ 水 200 mL) に浸し、1時間攪拌した後、脱色液 (Methanol 250 mL, Acetic acid 55 mL, MilliQ 水 250 mL) にゲルを移した。タンパク質のバンドが検出できるようになったら、MilliQ 水にゲルを移し脱色液を除いた。

【コロニーPCR に用いたプライマーセット】

pGEX-F primer (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3')

pGEX-R primer (5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3')

9-4) 発現 EF-Tu-a タンパク質の精製

Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare) の 50%スラリーを必要量取り、300 g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。担体の 5 倍量の PBS で懸濁し、300 g、5 分間の遠心分離を行った。この作業を 4 回繰り返すことで、担体を平衡化させ、最後に担体と等量の PBS を加えて懸濁することで、50 %スラリーとした。目的タンパク質を発現した大腸菌の破碎上清に、平衡化した Glutathione Sepharose™ 4B の 50 %スラリーを添加し、4℃で 16 時間、転倒混和させた。その後、4℃、500 g、5 分間の遠心分離を行い、上清を非吸着画分として回収した。次に、担体に 5 倍量の PBS を加えて 4℃で 10 分間転倒混和させ、4℃、500 g、5 分間の遠心分離により上清を洗浄画分 1 として回収した。この操作を 2 回繰り返す、洗浄画分 2、3 を回収し、担体を洗浄した。次に、担体に 5 倍量の PreScission Protease Buffer (Tris 181.9 mg, NaCl 263 mg, DTT 2.3 mg, 0.5 M EDTA 30 µL, (pH 7.5) total vol. 30 mL) を加えて 4℃で 10 分間転倒混和させ、4℃、500 g、5 分間の遠心分離により上清を除去した。この操作を 2 回繰り返した後、担体と等量の PreScission Protease Buffer と担体の 1/10 量の PreScission Protease (GE Healthcare) を加えて、4℃で 18 時間転倒混和させ、そこに担体の 4 倍量の PreScission Protease Buffer を加え 4℃、500 g、5 分間の遠心分離により上清を溶出画分 1 として回収した。さらに、担体の 5 倍量の PreScission Protease Buffer を加え 4℃、500 g、5 分間の遠心分離により上清を溶出画分 2 として回収した。もう一度この操作を行い、溶出画分 3 を回収した。この時、GST のみを発現する大腸菌も同じ操作を行った。これらの各画分を SDS-PAGE と CBB 染色を行い、発現 EF-Tu タンパク質の精製度を確認した。

10) 抗 EF-Tu-a 抗血清を用いた *A. avenae* の成熟型 EF-Tu-a の検出

SDS-PAGE 後のアクリルアミドゲルと濾紙 (Extra thick blot paper, BIO-RAD) 2 枚、ニトロセルロース膜 (Protran® BA 85, GE Healthcare) を転写バッファー (Tris 1.5 g, SDS 0.25 g, Glycine 7.5 g, Methanol 100 mL, total vol. 1 L) に 15 分間浸した。TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL

(BIO-RAD) に濾紙、ニトロセルロース膜、アクリルアミドゲル、濾紙の順に重層して 10 V 定電圧で 90 分ブロッティングを行った。ブロッティング後、ニトロセルロース膜を TBST (Tris 2.42 g, NaCl 8.8 g, Tween-20 500 μ L, HCl [pH 7.8], total vol. 1L) で 5 分間洗浄し、ブロッッキングバッファー (5% Skim milk, TBST 25 mL) でブロッティングを行った。1 時間後、ブロッッキングバッファーを除き、TBST で 5 分間洗浄を 3 回行った。洗浄後、抗 EF-Tu-a 抗血清を TBST で 1,000 倍希釈した一次抗体液 10 mL にニトロセルロース膜を浸し、室温で 1 時間振盪させた。1 時間後、フラジェリン抗体希釈液を除き、TBST で 5 分間洗浄を 5 回行った。洗浄後、二次抗体 (Anti-Rabbit IgG (H+L-chain) (Goat IgG/Fab'), MBL) を TBST で 2,000 倍希釈した二次抗体液にニトロセルロース膜を浸し、30 分振盪させた。30 分後、二次抗体液を除き、TBST で 5 分間洗浄を 3 回行った。その後、ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いて EF-Tu を検出した。

11) *A. avenae* の成熟型 EF-Tu-a の質量分析

Q SepharoseTM Fast Flow で分離した 300 mM NaCl 溶出画分を ZipTip (MILLIPORE) で脱塩し、MS 溶液 (0.1% TFA, 50% CH₃CN) で溶解させ、等量のマトリックス溶液 (0.1% TFA, 50% CH₃CN, 10 mg/mL Sinapinic acid) と混合した。このうち 2 μ L をターゲットにアプライし、風乾した。その後、MALDI-TOF MS (SpiralTOFTM JMS-S3000, JEOL) を用いて Linear、Positive モードで分析した。

第一章 結果

1) *A. avenea* フラジェリン欠損 N1141 菌株の菌体破砕液によるイネの PTI 誘導

A. avenae N1141 菌株からフラジェリン以外の新たな PAMP を同定するために、イネの PAMP として機能するフラジェリンの遺伝子を欠損させた Δ fla1141 菌体の破砕液に PAMP 活性が存在するかどうかを調べた。

Δ fla1141 菌株を超音波で破砕し、破砕物を 10,000 g、1 時間の遠心分離を行うことで、 Δ fla1141 菌体破砕液を得た。タンパク質濃度 2 μ g/mL となるように Δ fla1141 菌体破砕液をイネ培養細胞に処理し、発生する活性酸素をルミノールで測定したところ、処理後 30 分でネガティブコントロールの約 2 倍、処理後 1 時間で水処理の約 3 倍の活性酸素の発生が認められた。その後、この活性酸素の発生量は徐々に減少し、処理後 3 時間で約 2 倍程度の発生量となった (Figure 1)。

次に、PTI の 1 つであるカロースの沈着について調べた。イネ葉切片にタンパク質濃度 10 μ g/mL となるように Δ fla1141 菌体破砕液を処理し、16 時間後のカロースの沈着をアニリンブルーで染色し、観察した。その結果、水処理したイネ葉切片に比べて Δ fla1141 菌体破砕液処理したイネ葉切片で約 90 倍のカロースの沈着が認められた (Figure 2)。

また、タンパク質濃度 10 μ g/mL となるように Δ fla1141 菌体破砕液を処理したイネ培養細胞から処理 1、3、6 時間後に RNA を抽出し、real time RT-PCR で免疫関連遺伝子の発現について調べた。その結果、PTI 関連遺伝子である *OsWRKY70* と *OsEDS1* 遺伝子の発現量が処理 1、3 時間後に上昇することが認められた。さらに、同じく PTI 関連遺伝子である *OsCht1* 遺伝子の発現量も処理 6 時間後に増加していた。一方、ETI 反応である過敏感細胞死を制御する転写因子として同定された *OsNAC4* 遺伝子の発現量はどの時間においても変化しなかった (Figure 3)。

これらのことから、 Δ fla1141 菌体破砕液にはイネの PTI 誘導活性があることが明らかとなった。また、活性測定に用いた菌体破砕液は、フラジェリンを欠損

している菌体から調製していることから、この PAMP 活性はフラジェリンとは異なる物質であることが示された。

2) Δ fla1141 菌体破砕液に含まれる PAMP 活性物質の特徴解析

Δ fla1141 菌体破砕液にはフラジェリン以外の PAMP 活性物質が存在することが示されたため、この活性物質の特徴を調べることにした。

まず、この物質の熱安定性を調べるため、 Δ fla1141 菌体破砕液を 95°C で加熱処理し PAMP 活性を調べた。この様な、加熱処理を行ったところ、沈殿が生じたため、遠心分離を行って上清と沈殿に分け、沈殿には上清と等量の MilliQ 水で懸濁後、それぞれ終濃度 10 μ g/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。その結果、95°C の加熱処理後の上清を処理したイネ培養細胞では、処理後 1 時間で活性酸素の発生がピークとなり、この時の活性酸素量はネガティブコントロールに比べて約 4.5 倍であることが示された。一方、95°C の加熱処理後の沈殿を処理したイネ培養細胞では、処理 1 時間後には水処理に比べて約 8 倍の活性酸素の発生が認められ、処理 2 時間後から活性酸素の発生量は減少した (Figure 4)。このことから、 Δ fla1141 菌体破砕液に存在する PAMP 活性物質には、熱処理によって沈殿する PAMP 活性物質と沈殿しない PAMP 活性物質が存在することが示された。また、どちらの PAMP 活性物質も熱処理によってその活性は失われないことも明らかとなった。

次に、 Δ fla1141 菌体破砕液を -80°C で凍結させた後、再解凍し、その活性に変化があるのかどうかを調べた。この様な凍結処理を行ったところ、沈殿が生じたため、遠心分離を行って上清と沈殿に分け、沈殿は上清と等量の MilliQ 水で懸濁後、それぞれ終濃度 10 μ g/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。その結果、-80°C の凍結処理後の上清を処理したイネ培養細胞では、ネガティブコントロールである水処理と同じく、全く活性酸素の発生が認められなかった。一方、-80°C の凍結処理後の沈殿を処理したイネ培養細胞では、処理 1 時間後に水処理に比べて約 4 倍の活性酸素の発生が認められた (Figure 5)。これらのことから、PAMP 活性物質は凍結によって沈殿する物質であり、沈殿になってもその PAMP 活性は保持されることが明らかとなった。

次に、この PAMP 活性物質がタンパク質であるかを調べるために、 Δ fla1141 菌体破碎液をトリプシンで消化した後、イネ培養細胞に処理し活性酸素の発生活性について調べた。トリプシンを加え 37°C で 18 時間処理した Δ fla1141 菌体破碎液とネガティブコントロールとしてトリプシンの代わりに水を加え 37°C で 18 時間処理した Δ fla1141 菌体破碎液をそれぞれ終濃度 10 μ g/mL となるようにイネ培養細胞に加えた。その結果、トリプシンで消化した Δ fla1141 菌体破碎液を処理したイネ培養細胞では活性酸素の発生が認められなかった。ところが、ネガティブコントロールとして 37°C で 18 時間放置した菌体破碎液を処理したイネ培養細胞でも活性酸素の発生が認められなかった (Figure 6)。このことは、 Δ fla1141 菌体破碎液中を 37°C、18 時間処理すると PAMP 活性物質が失活することが明らかになった。

Δ fla1141 菌体破碎液を 37°C で処理することで活性が失われたことから、 Δ fla1141 菌体破碎液中には PAMP 物質を分解する酵素が含まれている可能性があると考えた。そこで、 Δ fla1141 菌体破碎液中の PAMP 活性が 95°C の加熱処理によっても維持されることが明らかとなっていたので、 Δ fla1141 菌体破碎液中の PAMP 活性物質を分解する酵素を失活させるために 95°C の加熱処理後、遠心分離した上清に対して再度トリプシン消化を行うことにした。この処理を行った Δ fla1141 菌体破碎液を終濃度 10 μ g/mL となるようにイネ培養細胞に加えたところ、イネ培養細胞に対する活性酸素の発生能を失っていた。一方、熱処理後、トリプシン消化を行っていない Δ fla1141 菌体破碎液を処理したイネ培養細胞では、処理 1 時間後には水処理に比べて約 4.5 倍の活性酸素の発生が認められた

(Figure 7)。このことから、加熱処理した Δ fla1141 菌体破碎液の上清には熱処理でも沈殿しないタンパク質性 PAMP が存在していることが示された。

次に、この上清に存在するタンパク質性 PAMP が DNase と RNase によって失活するかどうかを調べた。95°C の加熱処理した Δ fla1141 菌体破碎液を 37°C で 1 時間 DNase 処理し、終濃度 10 μ g/mL となるように加えたイネ培養細胞では、処理 1 時間後で水処理に比べて約 6 倍、処理 1.5 時間後で水処理の約 7 倍の活性酸素の発生が認められた。また、DNase 未処理の Δ fla1141 菌体破碎液を終濃度 10 μ g/mL となるように加えたイネ培養細胞では、処理 1 時間後で水処理に比べて 8 倍、処理 1.5 時間後で水処理の約 7 倍の活性酸素の発生が認められた。(Figure 8)。さらに、95°C の加熱処理した Δ fla1141 菌体破碎液を 37°C で 1 時間 RNase

処理し、終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ となるように処理したイネ培養細胞では、処理 1 時間後で水処理に比べて約 10 倍、処理 1.5 時間後で水処理の約 6 倍の活性酸素の発生が認められた (Figure 9)。DNase や RNase 処理によって $\Delta\text{fla1141}$ 菌体破碎液による活性酸素発生誘導能が低下しなかったことから、 $\Delta\text{fla1141}$ 菌体破碎液に含まれるタンパク質性 PAMP 物質は、DNase や RNase に対して耐性があることが示された。

3) Q Sepharose 担体を用いた強陰イオン交換クロマトグラフィーによる PAMP 活性物質の精製

特徴解析を行った結果、 $\Delta\text{fla1141}$ 菌体破碎液中にはタンパク質性の PAMP 活性物質が存在することが明らかとなった。そこで、この PAMP 活性物質を、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製することとした。 $\Delta\text{fla1141}$ 菌体破碎液を 200 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) で平衡化した Q Sepharose 担体に加えて吸着させ、NaCl 濃度を段階的に上昇させたステップワイズ溶出を行った。各濃度の NaCl 溶出画分をイネ培養細胞に処理し活性酸素発生試験を行い、処理 1 時間後の活性酸素量をそれぞれ測定した。ネガティブコントロールとして溶出液だけを処理したイネ培養細胞での発生量を 1 として各画分の活性の相対値を算出したところ、300 mM NaCl 溶出画分に約 3 倍の活性酸素の発生が認められた (Figure 10)。そこで、まずは溶出画分の中でも最も強い活性を示した 300 mM NaCl 溶出画分をこれ以降の精製に用いることにした。

4) 二次元電気泳動による活性画分の分離と質量分析計を用いたタンパク質の同定

次に、300 mM NaCl 溶出画分を限外濾過で濃縮、脱塩し、タンパク質 800 μg 分を等電点電気泳動と SDS-PAGE による二次元電気泳動で分離し、銀染色を行った。その結果、pI 4 から 8、分子量 25 kDa から 45 kDa の範囲に主要なスポットとして 9 個のスポットが得られた (Figure 11)。これらのスポットをゲルか

ら切り出して、トリプシンを用いて in gel 消化を行った後、ゲルからペプチドを抽出してペプチドマスフィンガープリンティング法を用いて各スポットに含まれるタンパク質を推定した。推定のためのソフトは MASCOT を使用し、検索するデータベースは NCBI nr を使用した。MASCOT 検索は全生物種 (All entries) を対象に行い、検索条件を Significance threshold [$p < 0.05$] に設定しており、それぞれのデータにおいて有意なスコア内でタンパク質の推定を行った。その結果、Spot No. 1 はストレプトトリシンを加水分解する Isochorismatase hydrolase と推定された。Spot No. 2 は原核生物のファージやプラスミドに対する獲得免疫機構に参与するファミリータンパク質 CRISPR-associated protein, Csd2 family と推定された。Spot No. 3 と Spot No. 4 は、グルタミン生合成に関わる Type I glutamine synthetase と推定された。Spot No. 5 と Spot No. 6 は Hypothetical protein AcavDRAFT_3545 と推定された。Spot No. 7 はシロイヌナズナに対して PAMP として機能することが報告されている翻訳伸長因子である Translation elongation factor Tu (EF-Tu) と推定された。また、Spot No. 8 と Spot No. 9 は δ -aminolevulinic acid dehydratase と推定された (Table 1)。

5) *A. avenae* N1141 菌株の *EF-Tu* 遺伝子の配列解析

これまでに報告された PAMP は、多くの病原体が共通で持つということと、比較的少量に存在する物質であるということが知られている。そこで、PAMP としてのこの様な特徴を推定された 6 種類のタンパク質に当てはめて考えると、EF-Tu が最も PAMP として機能する可能性が高いと考えた。そこで、はじめに EF-Tu がイネに対する PAMP として機能するかどうかを、発現 EF-Tu タンパク質を作製して調べることにした。発現 EF-Tu タンパク質を作製するにあたって、*A. avenae* N1141 菌株の *EF-Tu* 遺伝子配列が必要となる。そこで、*A. avenae* N1141 菌株の *EF-Tu* 遺伝子配列を明らかにすることにした。まず、*A. avenae* N1141 菌株のゲノム配列が明らかとなっていなかったため、ゲノム配列が明らかとなっている近縁種 *A. avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1 のゲノム配列から *EF-Tu* 遺伝子を探索した。その結果、*A. avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1 のゲノムには 2 つの *EF-Tu* 遺伝子 (GeneID: 4669330, 4669847) が存在することが明らかと

なった。そこで、これらの遺伝子上流と下流の位置にそれぞれの遺伝子の特異的に増幅するプライマーを設計し、*A. avenae* N1141 菌株のゲノムをテンプレートとして PCR を行った。アガロース電気泳動で増幅産物を確認した結果、どちらのプライマーセットを用いた PCR によっても約 1,500 bp の位置に単一のバンドが見られたので、これらの PCR 産物の配列をそれぞれ解析したところ、どちらの増幅産物も *A. avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1 の *EF-Tu* 遺伝子と相同性の高い配列を有することが示された。そこで、これらを *A. avenae* N1141 菌株の *EF-Tu* 遺伝子 (*EF-Tu-a1* および *EF-Tu-a2*) とした。これら 2 つの *EF-Tu-a* 遺伝子の DNA 配列を比較すると 4 カ所の置換が存在したが、それらはすべて同義置換であった (Figure 12)。そこで、発現タンパク質の作製には *EF-Tu-a1* 遺伝子の塩基配列を用いることにした。

6) GST-EF-Tu-a タンパク質の発現確認

発現 EF-Tu-a タンパク質を作製するために、*A. avenae* N1141 菌株の *EF-Tu-a* 遺伝子を GST 融合タンパク質発現ベクター *pGEX-6P-3* にクローニングし、GST-EF-Tu-a タンパク質発現ベクターを作製した。それを形質転換した大腸菌を O.D.₆₀₀ が 0.6 付近になるまで 37°C で振盪培養し、終濃度が 0.1 mM となるように IPTG を添加し、37°C で 3 時間振盪して発現誘導を行った。菌体を超音波破碎した後、上清と沈殿を分けて SDS-PAGE で分離し、CBB 染色でタンパク質の発現の有無を確認した (Figure 13)。その結果、IPTG 誘導を行った後の破碎上清とその沈殿では、IPTG 誘導を行っていない破碎上清やその沈殿と比べて、66.4 kDa 付近に特異的にバンドが認められた。これは、EF-Tu-a (約 43 kDa) と GST (約 27 kDa) の融合タンパク質 (約 70 kDa) に近く、IPTG 添加によってのみ認められることから、このバンドが GST-EF-Tu-a タンパク質と判断した。さらに、この GST-EF-Tu-a 融合タンパク質は、破碎上清に多く存在しており、このタンパク質を可溶性タンパク質として回収することに成功した (Figure 13)。

7) 発現 EF-Tu-a タンパク質の精製

GST-EF-Tu-a タンパク質の発現が確認された破砕上清を Glutathione Sepharose™ 4B 担体に吸着させ、PreScission Protease を 18 時間反応させタンパク質を切断し、担体の 5 倍量の PreScission Buffer で 3 回溶出することで EF-Tu-a タンパク質を回収した。この様にして得られた画分をそれぞれ、非吸着画分、洗浄画分 1、2、3、溶出画分 1、2、3 とし、これらを SDS-PAGE で分離後、CBB 染色でタンパク質を染色した。その結果、GST-EF-Tu-a を吸着させた担体から溶出した EF-Tu-a 溶出画分 1、2、3 に約 45kDa のバンドが検出された (Figure 14)。一方、コントロールとしては、GST を発現した菌体の破砕上清を、同様に、Glutathione Sepharose™ 4B 担体に吸着させ、PreScission Protease を用いて溶出した溶出画分 1、2、3 を用いた。この溶出画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分析したところ、約 45kDa のバンドは認められなかった (Figure 15)。EF-Tu-a 溶出画分 1、2、3 に発現 EF-Tu-a タンパク質が認められたので、これらの画分をひとつにまとめ EF-Tu-a 溶出画分とした。コントロールも同様にまとめ GST 溶出画分とした。

8) 発現 EF-Tu-a タンパク質による PTI の誘導

発現 EF-Tu-a タンパク質にイネの PTI 誘導活性があるのか調べるため、まずイネ培養細胞に終濃度 100 nM となるように発現 EF-Tu-a を加えて活性酸素の発生量を測定した。このときに、ネガティブコントロールとしては、GST 溶出画分を発現 EF-Tu-a と等量になるようにイネ培養細胞に処理したものをを用いた。その結果、発現 EF-Tu-a 処理後 90、120 分で水処理の約 3 倍の活性酸素の発生が認められ、その後、徐々に活性酸素の発生量は減少した。一方、GST 溶出画分を加えたイネ培養細胞では、水処理と同様に活性酸素発生量の増加は全く認められなかった (Figure 16)。この結果から、イネは発現 EF-Tu-a を認識して PTI を誘導していることが示された。そこで次に、発現 EF-Tu-a の活性酸素発生活性における濃度依存性について調べた。様々な濃度の発現 EF-Tu-a をイネ培養細胞に処理して、処理 90 分後の活性酸素の発生量を調べたところ、600 nM 発現 EF-Tu-a

を最大活性とする逆シグモイドカーブが得られた。また、その EC₅₀ は約 300 nM であることも明らかとなった (Figure 17)。

次に、発現 EF-Tu-a にカロースの沈着や PTI 関連遺伝子の発現誘導活性が存在するかどうかを調べた。その結果、発現 EF-Tu-a を終濃度 300 nM となるように処理したイネ葉切片において、コントロールに比べて約 40 倍のカロース沈着が認められた (Figure 18)。

さらに、発現 EF-Tu-a を終濃度 300 nM となるように処理したイネ培養細胞における免疫関連遺伝子の発現についても調べた。その結果、発現 EF-Tu-a を処理したイネ培養細胞と同様に PTI 関連遺伝子である *OsWRKY70*、*OsCht1*、*OsEDS1* の発現量の上昇が処理 1、3、6 時間後で認められたが、ETI 関連遺伝子 *OsNAC4* の発現量は変化なかった (Figure 19)。これらのことから、発現 EF-Tu-a はイネに対する PAMP として機能することが明らかとなった。

9) *A. avenae* K1 菌株の EF-Tu-a 遺伝子の配列解析

イネに対して非病原性である *A. avenae* N1141 菌株の EF-Tu-a が、イネに対して PAMP として機能することが明らかとなった。そこで、EF-Tu-a も *A. avenae* のフラジェリンのように病原菌と非病原菌の間でイネに対する PTI 誘導能が異なっているかどうかを調べることにした。はじめに、病原菌である *A. avenae* K1 菌株の EF-Tu-a 遺伝子の同定を試みた。N1141 菌株の EF-Tu-a 遺伝子を増幅する 2 組のプライマーセットを用いて K1 菌株のゲノムをテンプレートとした PCR を行ったところ、K1 菌株にも 2 つの EF-Tu-a 遺伝子が存在していることが明らかとなった。得られた 2 つの K1 菌株の EF-Tu-a 遺伝子の DNA 配列を比較したところ、両遺伝子間では 3 カ所で塩基置換が存在していたが、すべて同義置換であった (Figure 20)。さらに、K1 菌株の EF-Tu-a 遺伝子配列をもとに得た推定アミノ酸配列は N1141 菌株の EF-Tu-a タンパク質の配列と完全に一致していることが示された (Figure 21)。このことから、*A. avenae* N1141 菌株と K1 菌株に存在する EF-Tu のアミノ酸配列は完全に一致していることが明らかとなった。

10) *A. avenae* N1141 菌株および K1 菌株の成熟型 EF-Tu-a の精製と質量分析

これまでに、イネに対して病原性の K1 菌株と非病原性の N1141 菌株から得られたフラジェリンには異なる糖鎖構造が存在していることが知られている。さらに、K1 菌株のフラジェリンに付加している糖鎖構造は、イネによる認識を特異的に阻害していることも明らかになっている (Hirai et al., 2011)。そこで、両菌株の EF-Tu-a が翻訳後修飾されているのかどうかを調べるため、EF-Tu-a を精製し、その質量を分析することにした。 Δ fla1141 菌体破砕液と同様の方法で N1141 菌体破砕液と K1 菌体破砕液を調製し、強陰イオン交換クロマトグラフィーで分離した。得られた画分のどこに EF-Tu-a が含まれているのか調べるために、抗 EF-Tu-a 抗血清を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、N1141 菌株の EF-Tu-a は 300 mM NaCl 溶出画分に検出された (Figure 22; Lane 1)。また、K1 菌株の EF-Tu-a は 200 mM NaCl 溶出画分に検出された (Figure 22; Lane 3)。そこで、この粗精製画分に含まれるタンパク質の質量を測定した。その結果、N1141 菌株 300 mM NaCl 溶出画分には m/z 43,030 に $[M+H]^+$ のピークが観測できた。K1 菌株 200 mM NaCl 溶出画分には m/z 43,023 に $[M+H]^+$ のピークが観測できた (Figure 23)。これまでに大腸菌の EF-Tu は開始メチオニンがプロセシングされ、N 末端にアセチル化修飾されており、Lys56 にメチル化修飾されているという報告がある (Laursen et al., 1981)。同じような翻訳後修飾が *A. avenae* の EF-Tu-a にされていた場合の予想分子量は 43,053 (Average MS の $[M+H]^+$) となり、今回観測されたどちらの値ともほぼ一致する。このことから、両菌株の EF-Tu-a と同じように翻訳後修飾されている可能性が示された。一方、K1 菌株と N1141 菌株由来の EF-Tu の測定質量がほぼ同一であることから、両 EF-Tu 分子には同一の修飾基が存在していることも明らかになった。

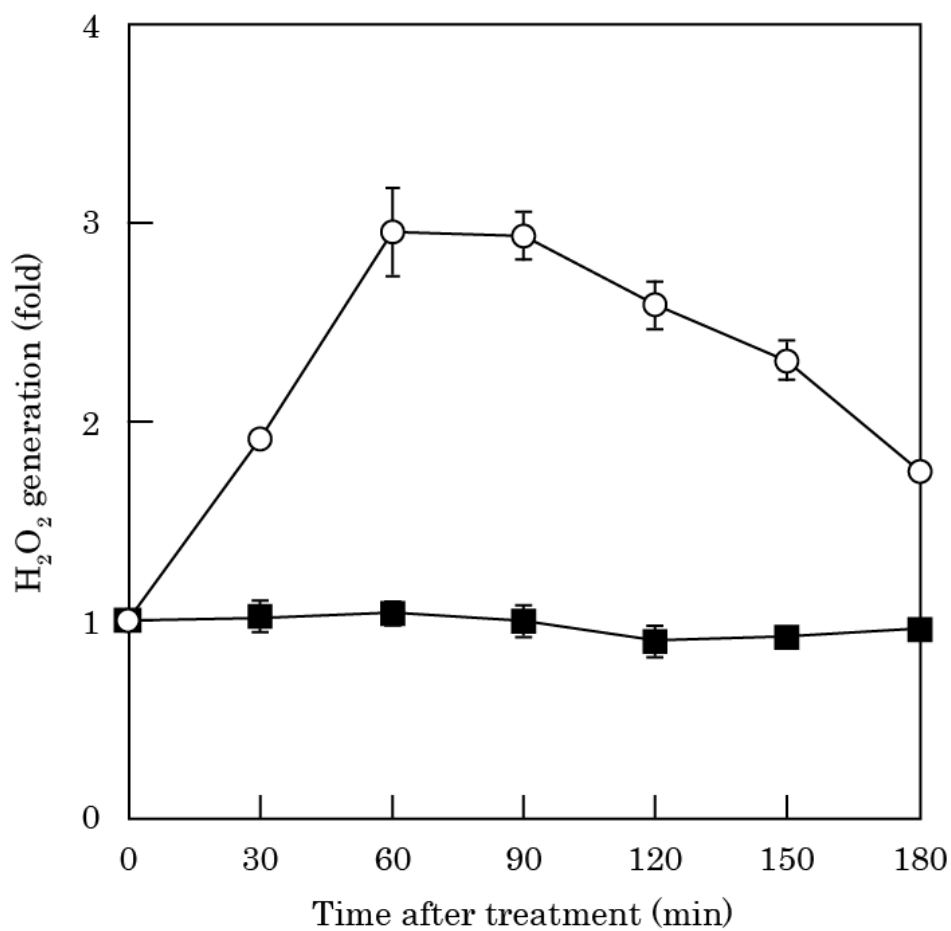


Figure 1. ΔflaA1141 菌体破砕液を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: ΔflaA1141 菌体破砕液、■: 水。ΔflaA1141 菌体破砕液は終濃度 2 μg/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 5 回の実験の平均で示した。

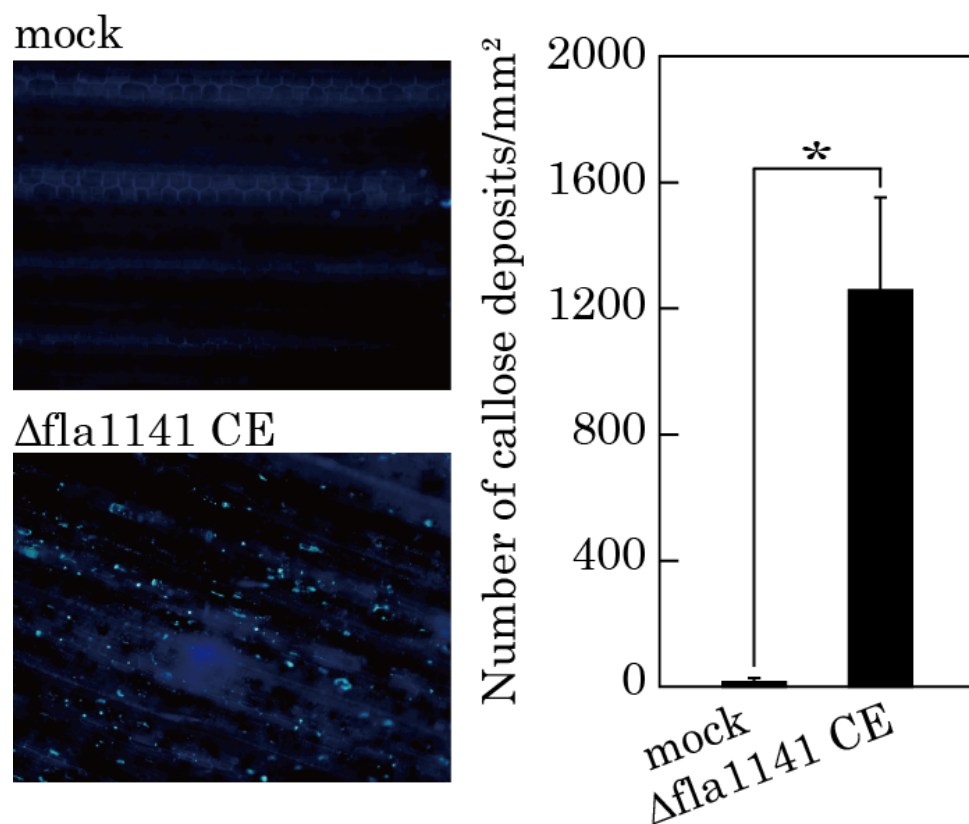


Figure 2. Δ flaA1141 菌体破砕液を処理したイネ葉におけるカロースの沈着

Δ flaA1141 菌体破砕液 (Δ flaA1141 CE) は終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ となるようにイネ葉に処理した。カロースの沈着はアニリンブルー染色によって検出した。画像はコントロール葉と Δ flaA1141 菌体破砕液を処理した葉の蛍光顕微鏡写真で、グラフの縦軸は 1 mm^2 当たりのカロースの沈着数を示している。値は 9 回の実験の平均で示した。アスタリスク (*) は t 検定により $p < 0.01$ で有意な差を示した。

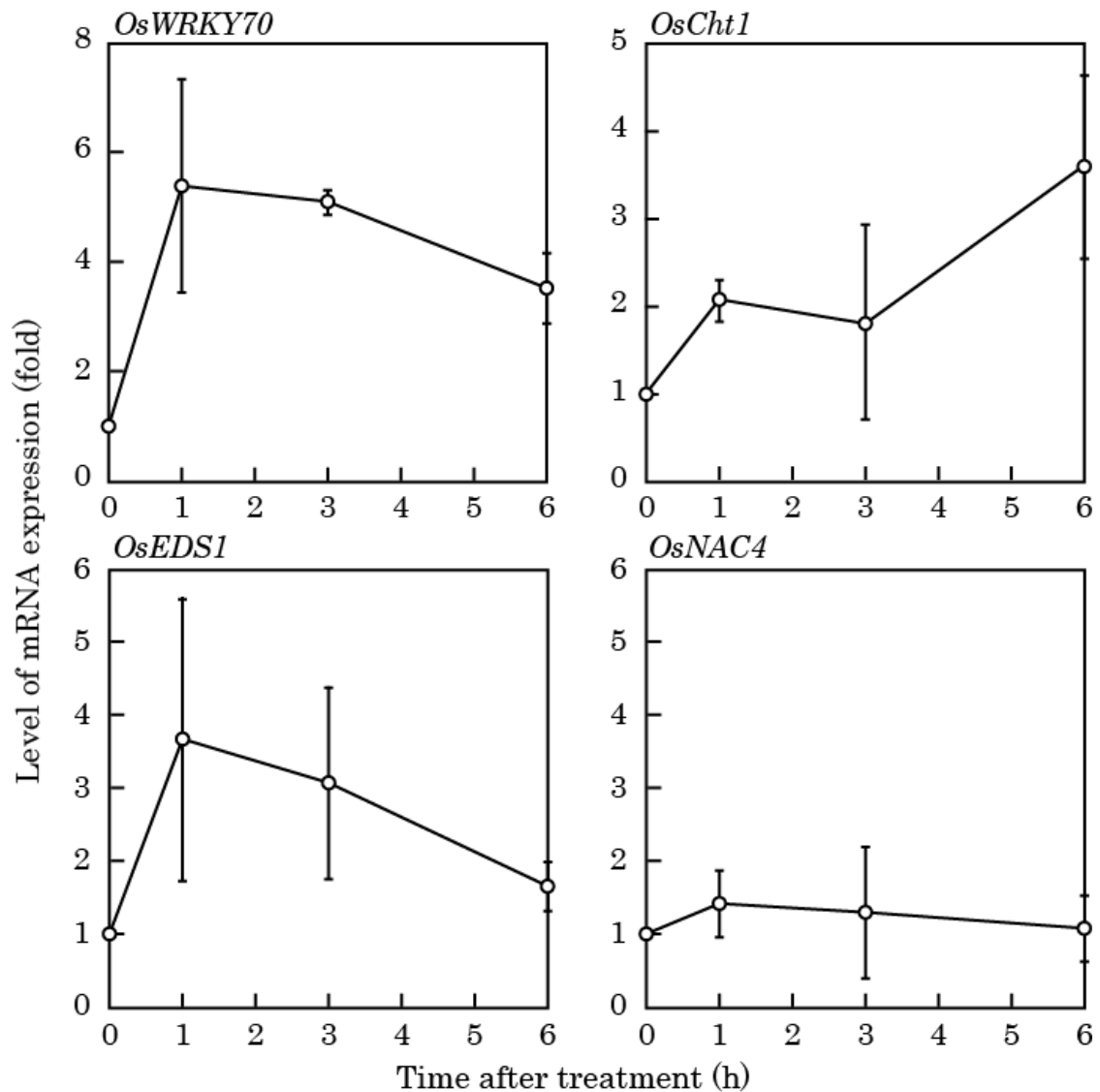


Figure 3. Δ flaA1141 菌体破砕液を処理したイネ培養細胞における免疫関連遺伝子の発現

Δ flaA1141 菌体破砕液を終濃度 10 μ g/mL となるように処理したイネ培養細胞から抽出した RNA に含まれる *OsWRKY70*、*OsCht1*、*OsEDS1*、*OsNAC4* の mRNA レベルを測定した。mRNA レベルは RT-PCR の対数増幅期における閾値点から計算した。縦軸は mRNA レベル、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。

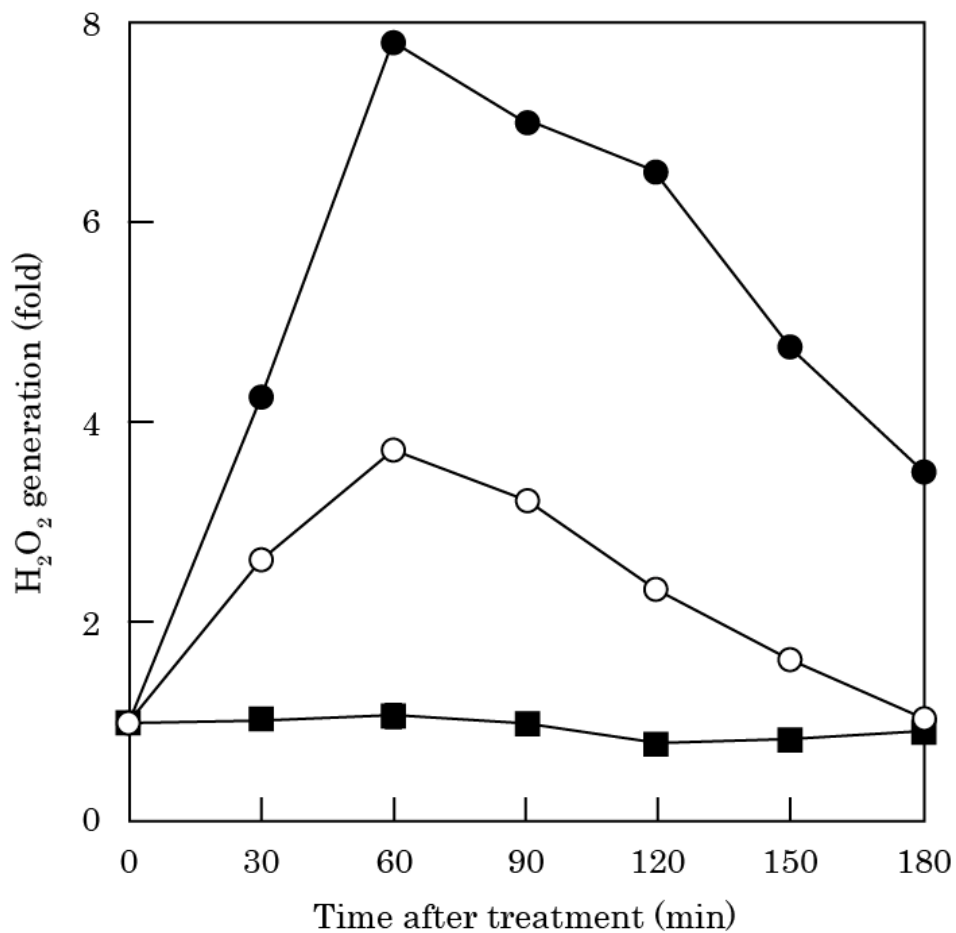


Figure 4. 95°C加熱後、遠心分離した Δ flaA1141 菌体破碎液の上清および沈殿を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: 95°C加熱後の Δ flaA1141 菌体破碎液上清、●: 95°C加熱後の Δ flaA1141 菌体破碎液沈殿、■: 水。95°C加熱後の菌体破碎液上清および沈殿は終濃度 10 μ g/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は2回の実験の平均で示した。

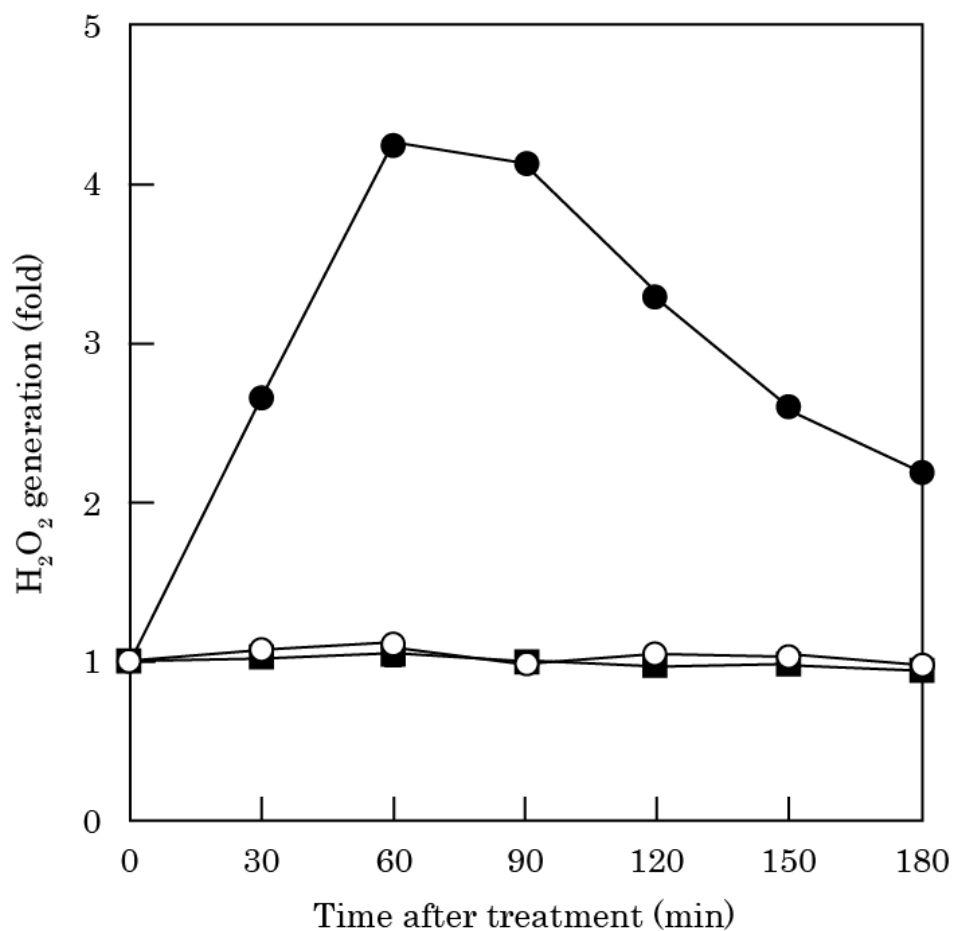


Figure 5. -80℃凍結後、遠心分離したΔflaA1141 菌体破砕液の上清および沈殿を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: -80℃凍結後のΔflaA1141 菌体破砕液上清、●: -80℃凍結後のΔflaA1141 菌体破砕液沈殿、■: 水。-80℃凍結後の菌体破砕液上清および沈殿は終濃度 10 μg/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は2回の実験の平均で示した。

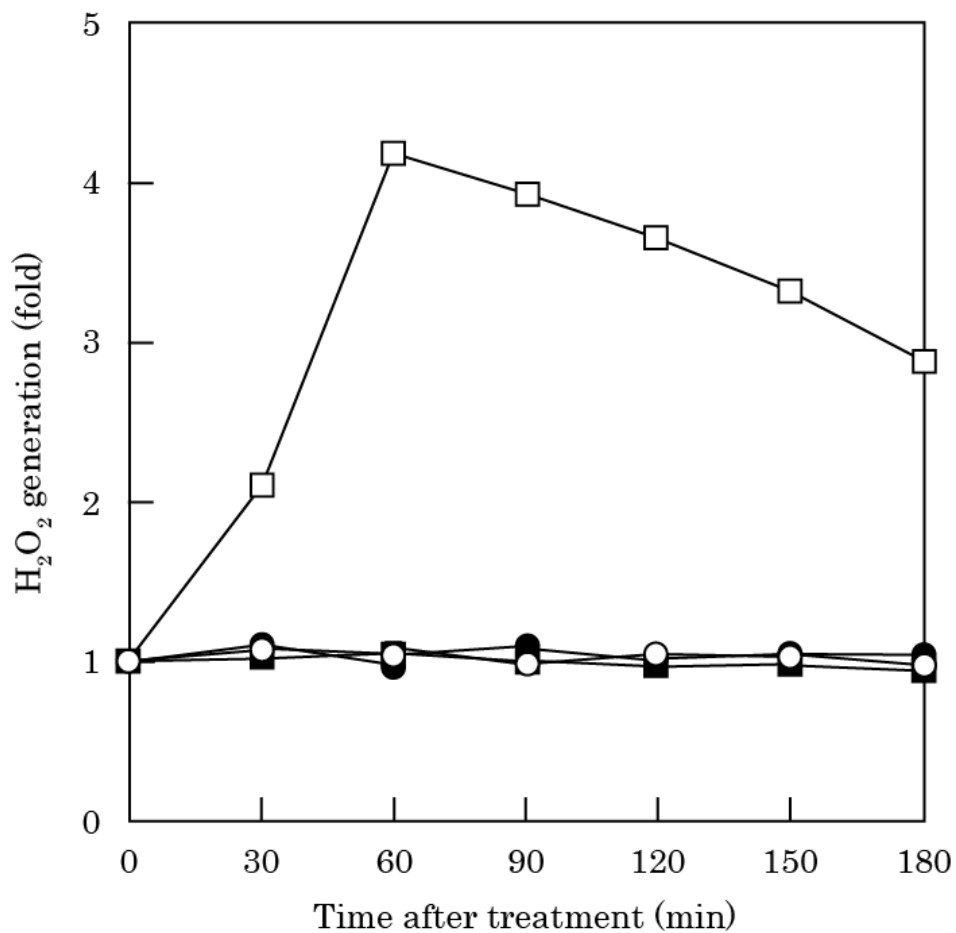


Figure 6. トリプシン消化 Δ flaA1141 菌体破砕液とトリプシン未消化 Δ flaA1141 菌体破砕液を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: トリプシン消化 Δ flaA1141 菌体破砕液、●: トリプシン未消化 Δ flaA1141 菌体破砕液、□: 4℃保存 Δ flaA1141 菌体破砕液、■: 水。トリプシン消化 Δ flaA1141 菌体破砕液およびトリプシン未消化 Δ flaA1141 菌体破砕液、4℃保存 Δ flaA1141 菌体破砕液は終濃度 10 μ g/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 2 回の実験の平均で示した。

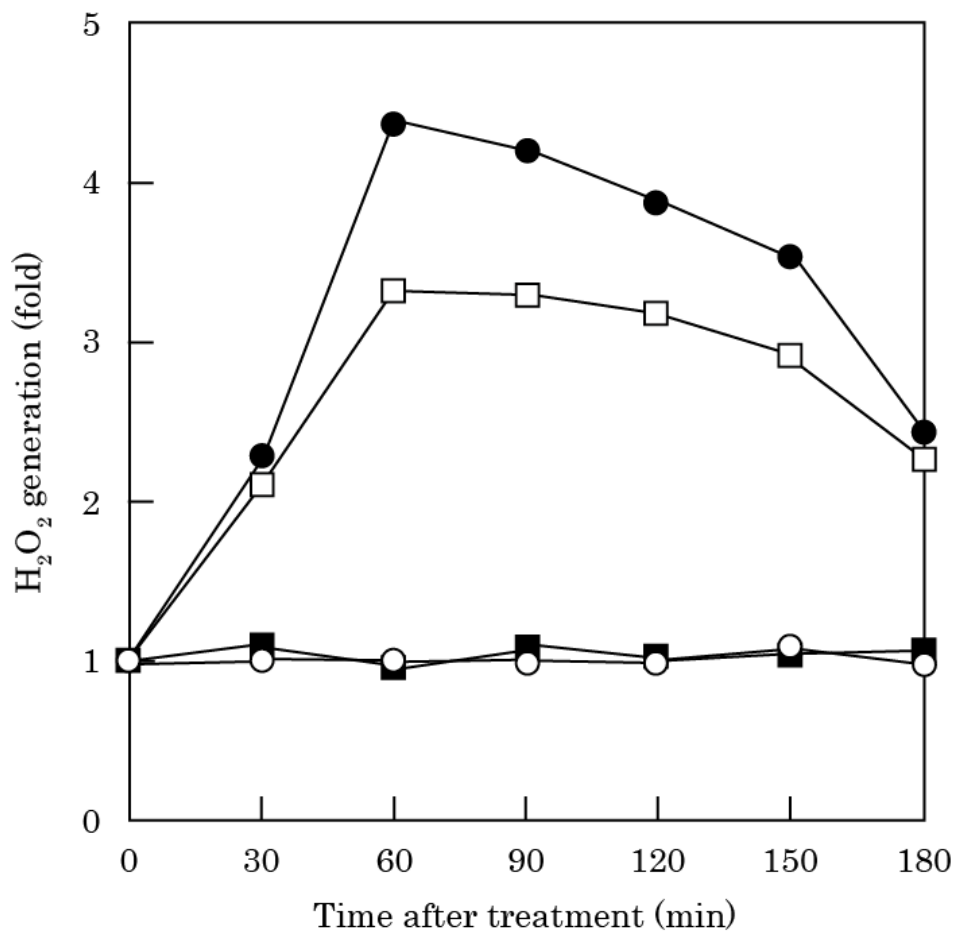


Figure 7. 95°C加熱処理した Δ flaA1141 菌体破砕液のトリプシン消化産物とトリプシン未消化物を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: 95°C加熱後の Δ flaA1141 菌体破砕液のトリプシン消化物、●: 95°C加熱後の Δ flaA1141 菌体破砕液のトリプシン未消化物、□: 4°C保存 Δ flaA1141 菌体破砕液、■: 水。95°C加熱後の Δ flaA1141 菌体破砕液のトリプシン消化物、トリプシン未消化物および 4°C保存 Δ flaA1141 菌体破砕液は終濃度 10 μ g/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 2 回の実験の平均で示した。

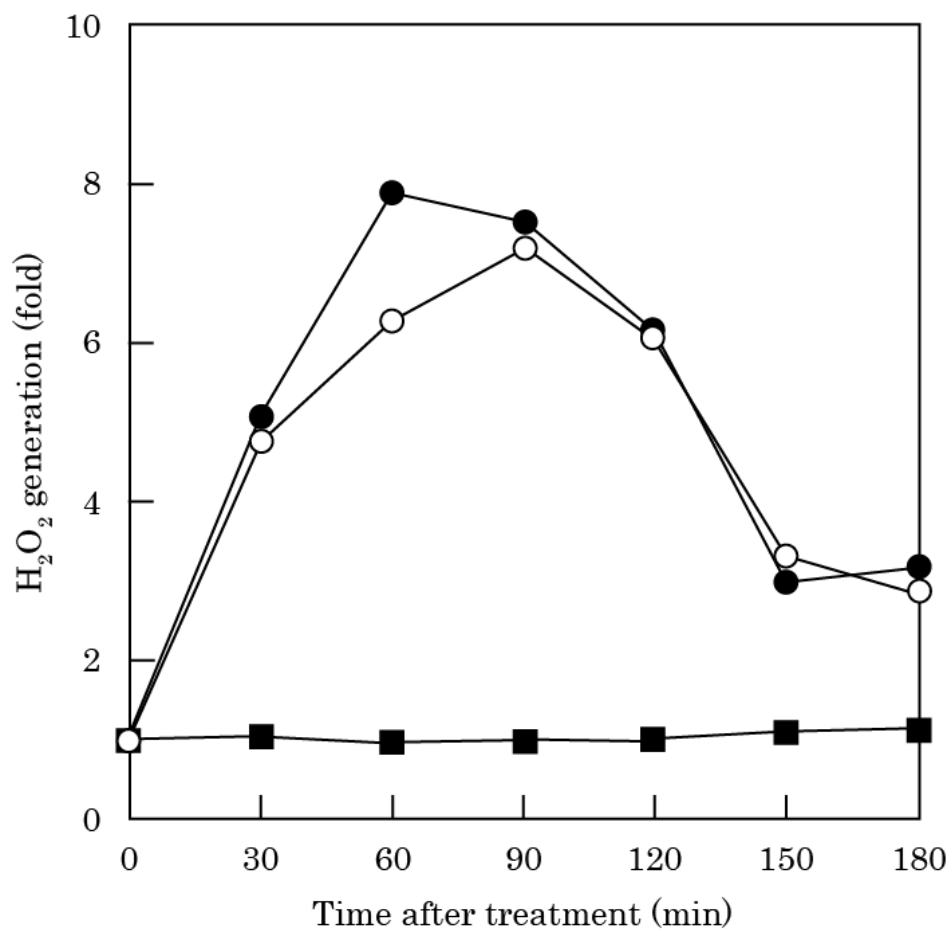


Figure 8. DNase 処理ΔflaA1141 菌体破砕液と DNase 未処理ΔflaA1141 菌体破砕液を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: ΔflaA1141 菌体破砕液、●: DNase 処理ΔflaA1141 菌体破砕液沈殿、■: 水。
 DNase 処理ΔflaA1141 菌体破砕液および DNase 未処理のΔflaA1141 菌体破砕液は終濃度 10 μg/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 2 回の実験の平均で示した。

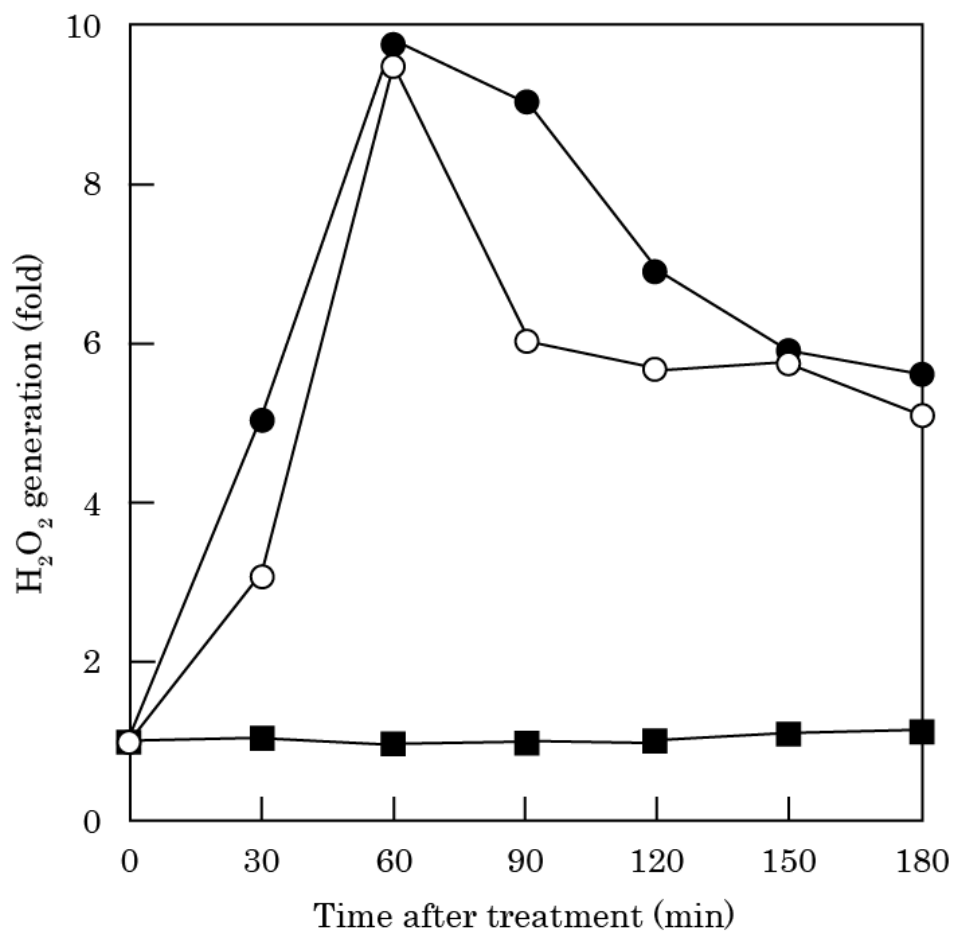


Figure 9. RNase 処理ΔflaA1141 菌体破砕液と RNase 未処理ΔflaA1141 菌体破砕液を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: ΔflaA1141 菌体破砕液、●: RNase 処理ΔflaA1141 菌体破砕液沈殿、■: 水。
RNase 処理ΔflaA1141 菌体破砕液および RNase 未処理のΔflaA1141 菌体破砕液は終濃度 10 μg/mL となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 2 回の実験の平均で示した。

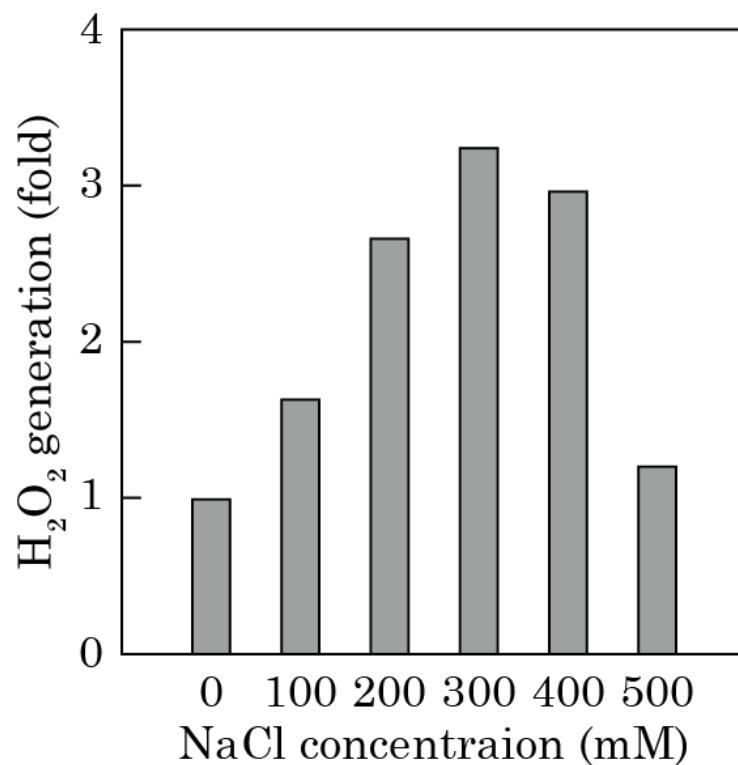


Figure 10. Q Sepharose 担体を用いた強陰イオン交換クロマトグラフィーの各溶出画分を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

Q Sepharose 担体を用いた強陰イオン交換クロマトグラフィーで分離した、各画分を終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ となるようにイネ培養細胞に処理した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量を示している。処理 1 時間後の値を画分ごとに示した。値は 2 回の実験の平均で示した。

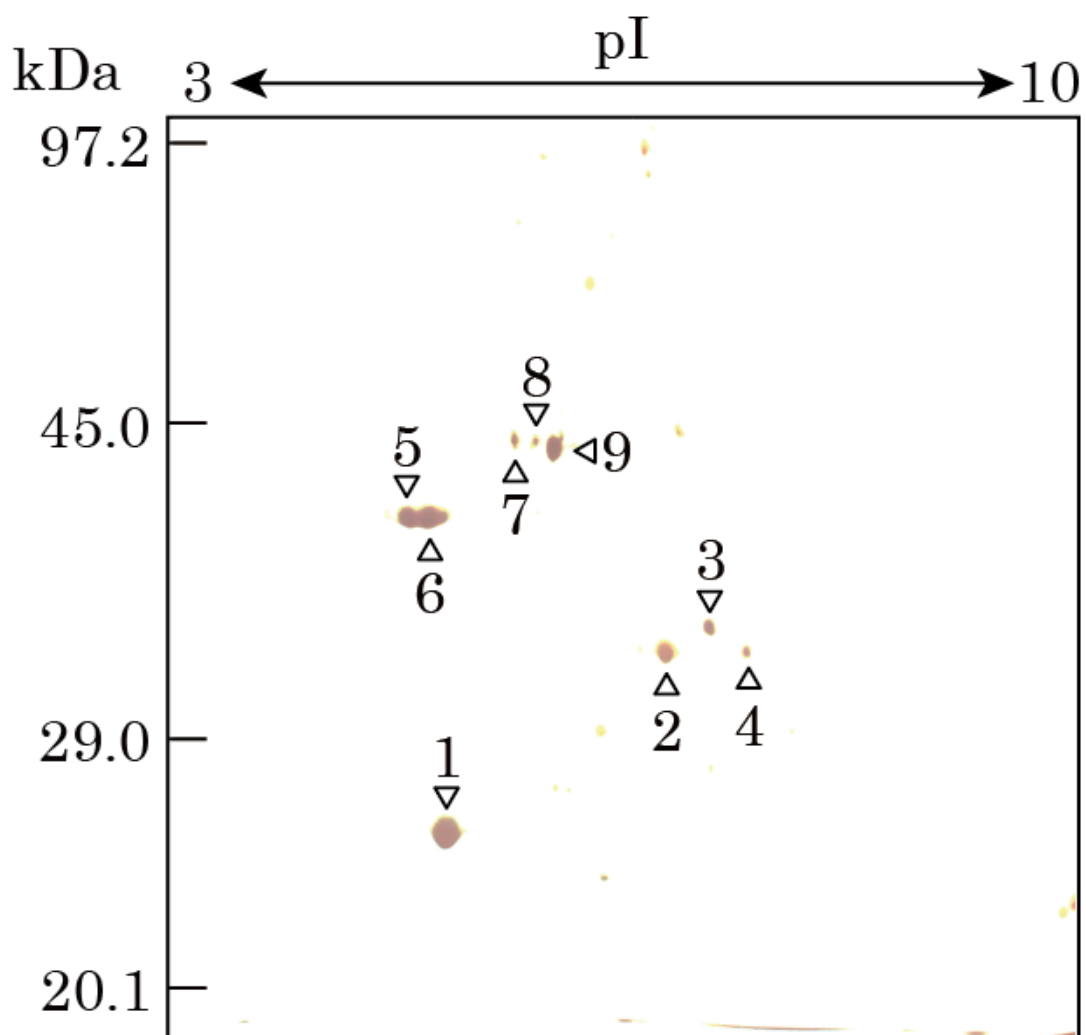


Figure 11. 二次元電気泳動による 300 mM NaCl 溶出画分に含まれるタンパク質の検出

Q Sepharose 300 mM NaCl 溶出画分を限外濾過で濃縮、脱塩し、二次元電気泳動で分離後、銀染色を行った。黒矢印は切り出したスポットを示す。左の値は分子量を示しており、上の値は等電点を示している。

Table 1. 300 mM NaCl 溶出画分に含まれるタンパク質の同定

Spot No.	Identified protein	Source	gi number	MW(Da)	pI
1	Isochorismatase hydrolase	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> AAC00-1	gi 120611492	22404	5.15
2	CRISPR-associated protein, Csd2 family	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270494315	33198	6.52
3	Glutamine synthetase, type I	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270491639	52489	5.40
4	Glutamine synthetase, type I	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270491639	52489	5.40
5	Hypothetical protein AcavDRAFT_3545	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270494756	43270	5.86
6	Hypothetical protein AcavDRAFT_3545	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270494756	43270	5.86
7	Translation elongation factor Tu	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270496056	35156	5.23
8	δ -aminolevulinic acid dehydratase	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270493504	36949	5.68
9	δ -aminolevulinic acid dehydratase	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860	gi 270493504	36949	5.68

二次元電気泳動で分離したスポットをトリプシン消化した後、質量分析計で分析し、分析データをもとに MASCOT 検索を行った。MASCOT 検索の結果を解析し、それぞれのスポットに含まれるタンパク質を同定した。

EF-Tu-a1.seq	1	ATGGCAAAGGTAAGTTCGAACGTACCAAGCCCCACGTGAACGTGGGCACGATCGGCCAC	60
EF-Tu-a2.seq	1	60
EF-Tu-a1.seq	61	GTGGACCATGGCAAGACGACGCTGACGGCAGCGATCGCCACGGTGTGTCCGCCAAGTTC	120
EF-Tu-a2.seq	61	120
EF-Tu-a1.seq	121	GGCGGCGAAGCCAAGAAGTACGACGAAATCGACGAGCGCCGAAGAAAAGGCCGCGGC	180
EF-Tu-a2.seq	121	180
EF-Tu-a1.seq	181	ATCACCATCAACACCGCACACGTGGAATACGAGACGGCCAACCGCCACTACGCCACGTG	240
EF-Tu-a2.seq	181	240
EF-Tu-a1.seq	241	GACTGCCCCGGCCACGCCGACTACGTCAAGAATGATCACCGGTGC	300
EF-Tu-a2.seq	241T.....	300
EF-Tu-a1.seq	301	GGCGCCATCCTGGTGTGCTCGGCCGCCGACGGCCGATGCCCCAGACGGCGAGCACATC	360
EF-Tu-a2.seq	301	360
EF-Tu-a1.seq	361	CTGCTGGCCCCGAGGTGGGCGTGCCCTACATCATCGTGTTCCTGAACAAGTGCGACATG	420
EF-Tu-a2.seq	361	420
EF-Tu-a1.seq	421	GTGGATGACGAAGAGCTGCTCGAGCTCGTCGAAATGGAAGTGCGCGAACTCCTCGACAAG	480
EF-Tu-a2.seq	421	480
EF-Tu-a1.seq	481	TACGACTTCCCCGGCGACGACACCCCCATCGTGCGCGGCTCGGCCAAGCTGGCCCTCGAA	540
EF-Tu-a2.seq	481	540
EF-Tu-a1.seq	541	GGCGACAAGGGCCCCCTGGGCGAGCAAGCCATCGACAAGCTGGCTGAAGCCCTGGACACC	600
EF-Tu-a2.seq	541	600
EF-Tu-a1.seq	601	TACATCCCGACGCCCCGAGCGCGCCGTGGACGGTGCCCTTCCTGATGCCCCGTGAAGACGTG	660
EF-Tu-a2.seq	601	660
EF-Tu-a1.seq	661	TTCTCCATCTCCGGTCGCGGTACCGTGGTGACGGTCTGTGTCGAGCGGGCATCATCAAG	720
EF-Tu-a2.seq	661	720
EF-Tu-a1.seq	721	GTCGGCGAAGAAATCGAAATCGTGGGTATCCGCGACACGAGAAGACCACCTGCACGGGC	780
EF-Tu-a2.seq	721	780
EF-Tu-a1.seq	781	GTGGAATGTTCCGCAAGCTGCTGGACCAGGGCCAGGCCGGCGACAACGTGGGCCTGCTG	840
EF-Tu-a2.seq	781	840
EF-Tu-a1.seq	841	CTGCGCGGCACGAAGCTGAAGACGTCGAGCGCGCCAGGTGCTGTGCAAGCCCCGGCTCC	900
EF-Tu-a2.seq	841	900
EF-Tu-a1.seq	901	ATCAAGCCGCACACCCACTTCACGGCTGAGGTGTACGTGCTGTGCAAGGACGAAGGCGGC	960
EF-Tu-a2.seq	901	960
EF-Tu-a1.seq	961	CGCCACACGCCCTTCTTCAACACTACCGT	1020
EF-Tu-a2.seq	961CCGCAATTCTACTTCGACGACCGACGTG	1020
EF-Tu-a1.seq	1021	ACCGGCGCCATCGAGCTGCCGGCCGACAAGGAAATGGTCATGCCCGGCGACAACGTGTCG	1080
EF-Tu-a2.seq	1021	1080
EF-Tu-a1.seq	1081	ATCACCGTCAAGCTGATCAACCCCATCGCCATGGAAGAAGGCCTGCGCTTCGCCATCCGC	1140
EF-Tu-a2.seq	1081	1140
EF-Tu-a1.seq	1141	GAAGGCGGCCGTACGGTCGGCGCCGGCGTCGTGGCCAAGATCATTGC	1191
EF-Tu-a2.seq	1141TAA	1191

Figure 12. *A. avenae* N1141 菌株の 2 つの *EF-Tu-a* 遺伝子のアライメント

EF-Tu-a1 と *EF-Tu-a2* と名付けた遺伝子はともに 1,191 bp で構成されており、それらの間には 4 カ所の同義置換が存在した。

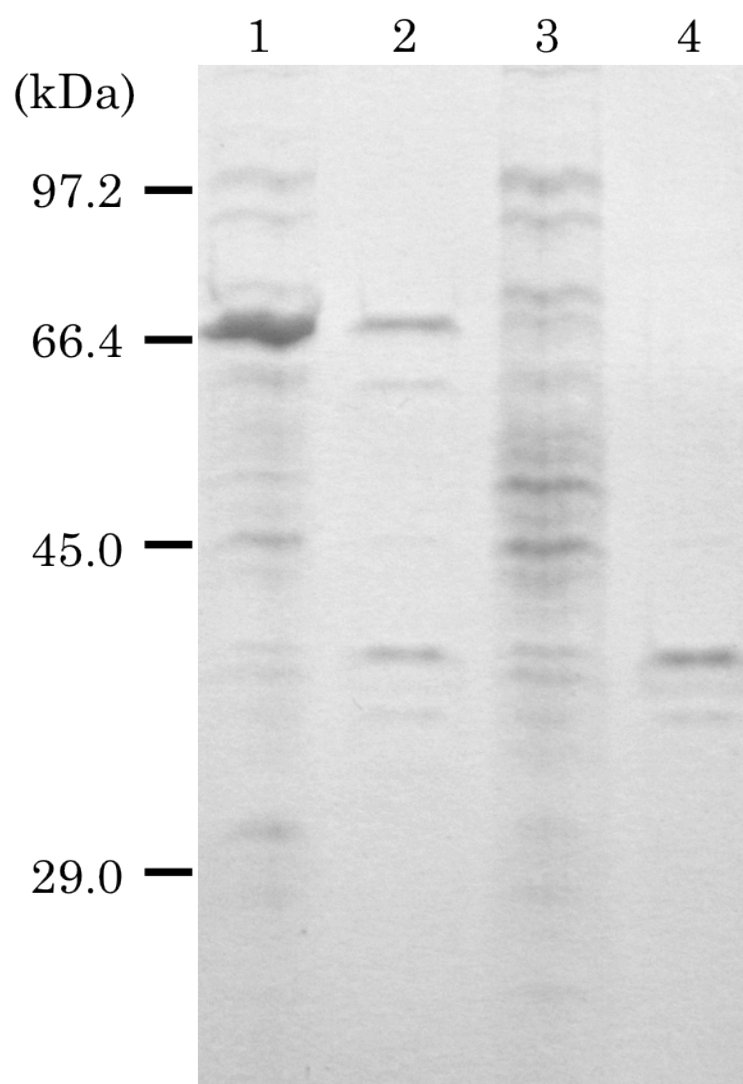


Figure 13. GST-EF-Tu-a タンパク質の発現確認

- 1 : IPTG 誘導あり、破碎上清
- 2 : IPTG 誘導あり、破碎沈殿
- 3 : IPTG 誘導なし、破碎上清
- 4 : IPTG 誘導なし、破碎沈殿

それぞれ 20 μ L を SDS-PAGE に供し、電気泳動後、各タンパク質のバンドは CBB 染色によって可視化した。左の値は分子量を示している。

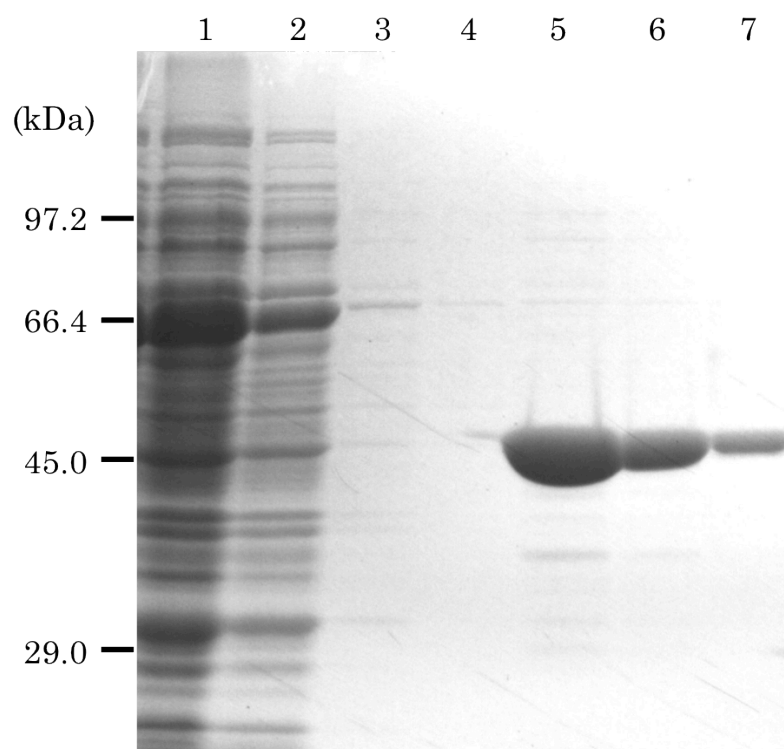


Figure 14. 発現 EF-Tu-a タンパク質の溶出確認

- 1 : GST-EF-Tu-a 非吸着画分
- 2 : GST-EF-Tu-a 洗浄画分 1
- 3 : GST-EF-Tu-a 洗浄画分 2
- 4 : GST-EF-Tu-a 洗浄画分 3
- 5 : EF-Tu-a 溶出画分 1
- 6 : EF-Tu-a 溶出画分 2
- 7 : EF-Tu-a 溶出画分 3

それぞれ 20 μ L を SDS-PAGE に供し、電気泳動後、各タンパク質のバンドは CBB 染色によって可視化した。左の値は分子量を示している。

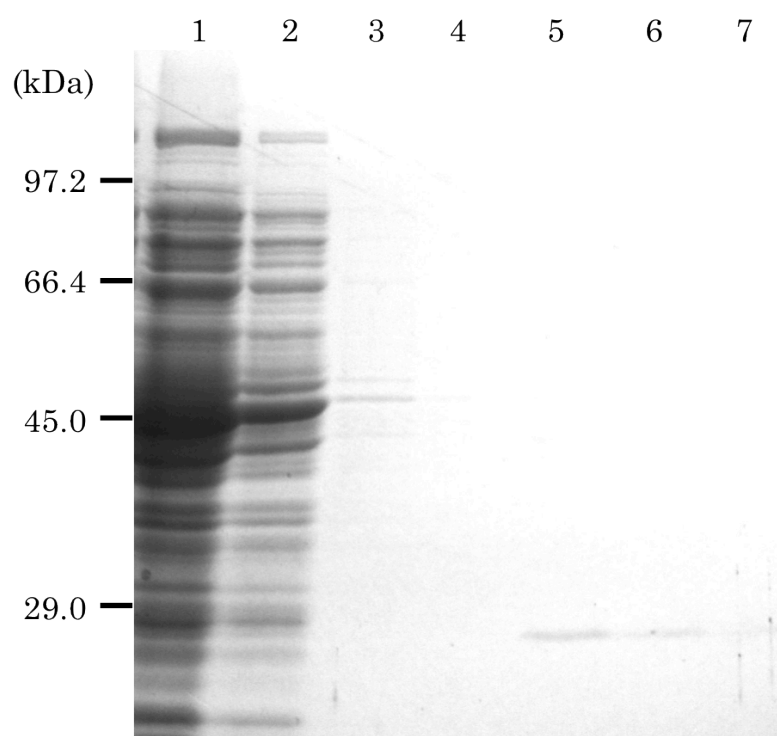


Figure 15. 発現 EF-Tu-a タンパク質の溶出確認のコントロール

- 1 : GST 非吸着画分
- 2 : GST 洗浄画分 1
- 3 : GST 洗浄画分 2
- 4 : GST 洗浄画分 3
- 5 : GST 溶出画分 1
- 6 : GST 溶出画分 2
- 7 : GST 溶出画分 3

それぞれ 20 μ L を SDS-PAGE に供し、電気泳動後、各タンパク質のバンドは CBB 染色によって可視化した。左の値は分子量を示している。

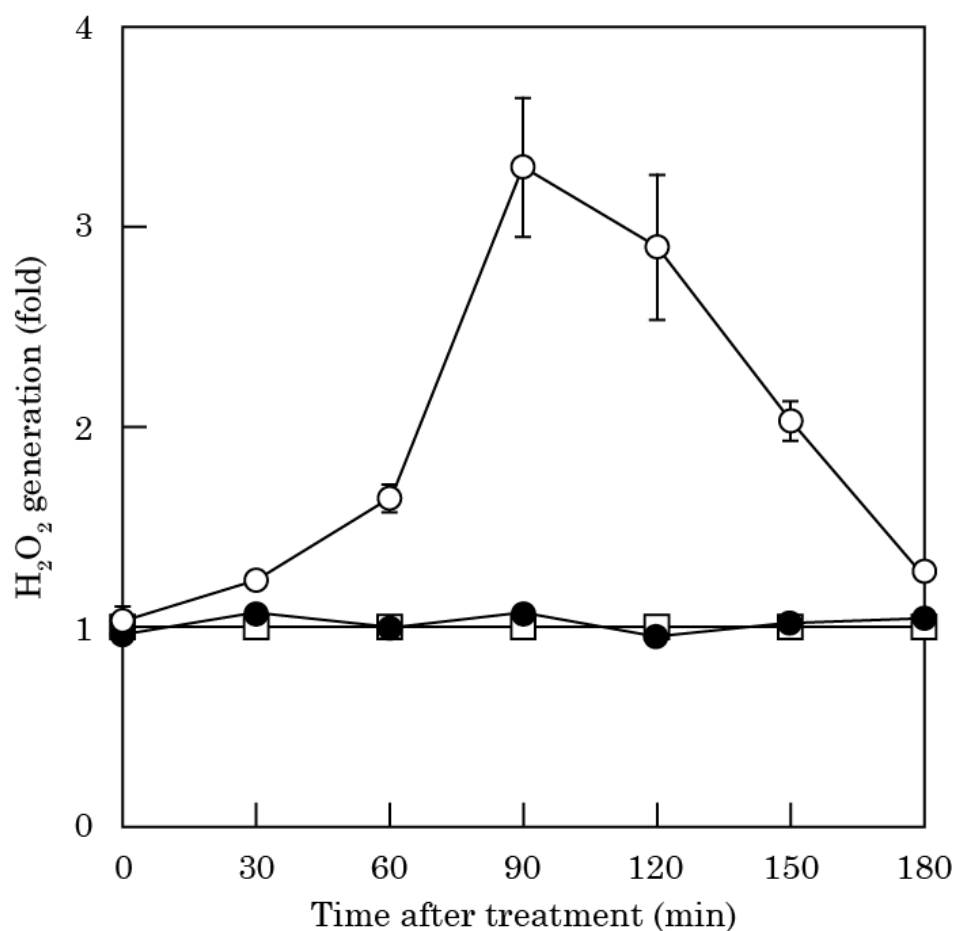


Figure 16. 発現 EF-Tu-a タンパク質を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

○: 発現 EF-Tu-a タンパク質、●: GST 溶出画分、□: 水。発現 EF-Tu-a タンパク質は終濃度 100 nM となるようにイネ培養細胞に処理した。GST 溶出画分は発現 EF-Tu-a タンパク質と等量イネ培養細胞に加えた。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。

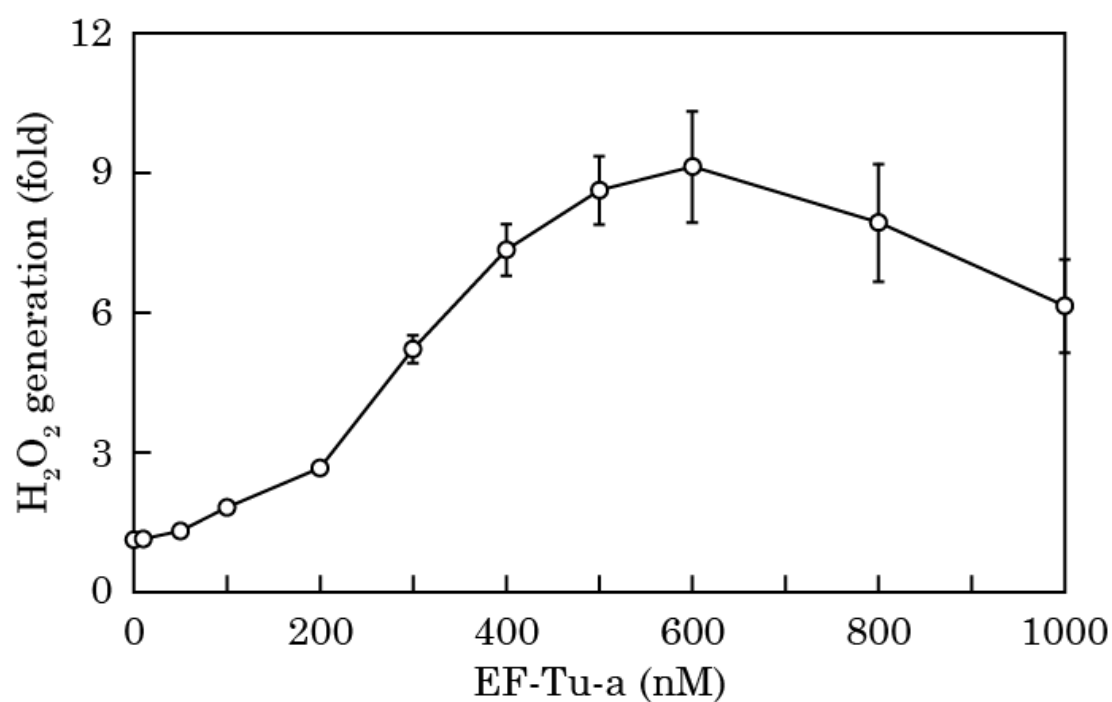


Figure 17. 発現 EF-Tu-a タンパク質を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

横軸に示した終濃度となるように EF-Tu-a をイネ培養細胞に処理し、処理後 1.5 時間後のイネ培養細胞における活性酸素の発生量を測定した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理濃度を示している。値は 4 回の実験の平均で示した。

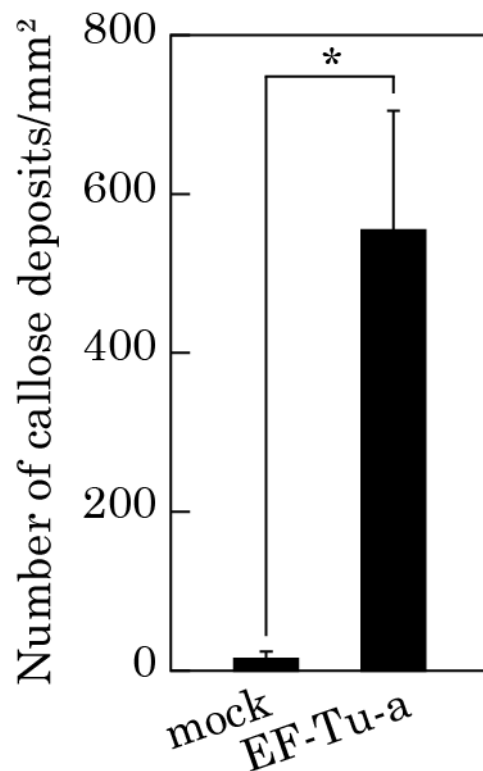


Figure 18. 発現 EF-Tu-a タンパク質を処理したイネ葉におけるカロースの沈着

EF-Tu-a は終濃度 300 nM となるようにイネ葉に処理した。カロースの沈着はアニリンブルー染色によって検出した。縦軸は 1 mm² 当たりのカロースの沈着数を示している。値は 9 回の実験の平均で示した。アスタリスク (*) は t 検定により $p < 0.01$ で有意な差を示した。

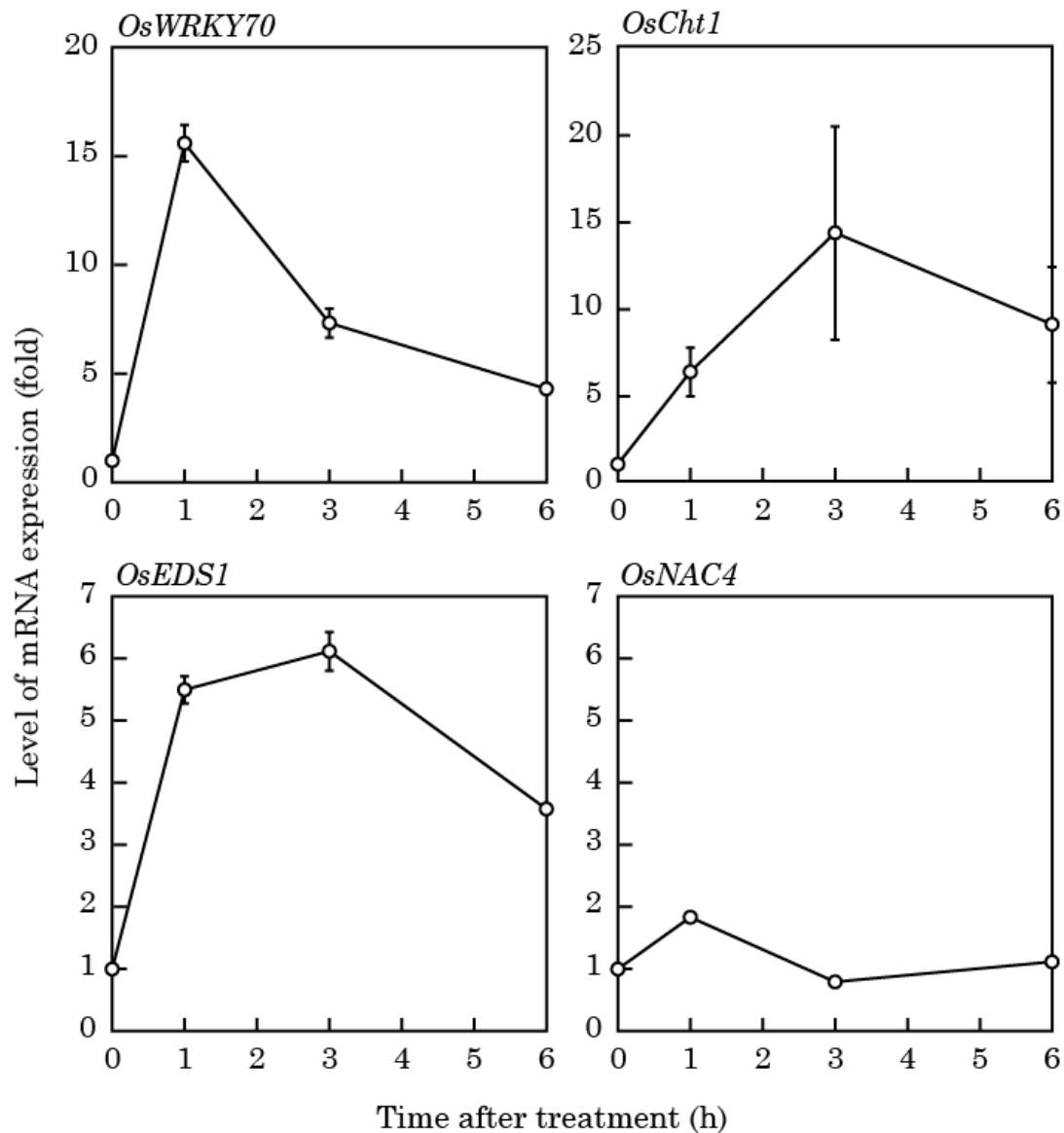


Figure 19. 発現 EF-Tu-a タンパク質を処理したイネ培養細胞における免疫関連遺伝子の発現

EF-Tu-a を終濃度 300 nM となるように処理したイネ培養細胞から抽出した RNA に含まれる *OsWRKY70*、*OsCht1*、*OsEDS1*、*OsNAC4* の mRNA レベルを測定した。mRNA レベルは RT-PCR の対数増幅期における閾値点から計算した。縦軸は mRNA レベル、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。

K1 EF-Tu-a1.seq	1	ATGGCAAAAGGTAAGTTCGAACGTACCAAGCCCCACGTGAACGTGGGCACGATCGGCCAC	60
K1 EF-Tu-a2.seq	1	60
K1 EF-Tu-a1.seq	61	GTGGACCATGGCAAGACGACGCTGACGGCAGCGATCGCCACGGTGCTGTCCGCCAAGTTC	120
K1 EF-Tu-a2.seq	61	120
K1 EF-Tu-a1.seq	121	GGCGGCGAAGCCAAGAAGTACGACGAAATCGACGACGCGCCGAAGAAAAGGCCGCGGC	180
K1 EF-Tu-a2.seq	121	180
K1 EF-Tu-a1.seq	181	ATCACCATCAACACCGCACACGTGGAATACGAGACGGCCAACCGCCACTACGCCACGTG	240
K1 EF-Tu-a2.seq	181	240
K1 EF-Tu-a1.seq	241	GACTGCCCCGGCCACGCCGACTACGTAAAGAACATGATCACCGGTGCCGCCAGATGGAC	300
K1 EF-Tu-a2.seq	241C.....	300
K1 EF-Tu-a1.seq	301	GGCGCCATCCTGGTGTGCTCGGCCGCCGACGGCCGATGCCCCAGACGCGGAGCACATC	360
K1 EF-Tu-a2.seq	301	360
K1 EF-Tu-a1.seq	361	CTGCTGGCCCCGCCAGGTGGGCGTGCCCTACATCATCGTGTCTCTGAACAAGTGCGACATG	420
K1 EF-Tu-a2.seq	361	420
K1 EF-Tu-a1.seq	421	GTGGATGACGAAGAGCTGCTCGAGCTCGTCGAAATGGAAGTGCGCGAACTCCTCGACAAG	480
K1 EF-Tu-a2.seq	421	480
K1 EF-Tu-a1.seq	481	TACGACTTCCCCGGCGACGACACCCCATCGTGC GCGGCTCGGCCAAGCTGGCCCTCGAA	540
K1 EF-Tu-a2.seq	481	540
K1 EF-Tu-a1.seq	541	GGCGACAAGGGCCCCCTGGGCGAGCAAGCCATCGACAAGCTGGCAGAAGCCCTGGACACC	600
K1 EF-Tu-a2.seq	541	600
K1 EF-Tu-a1.seq	601	TACATCCCAGCGCCCGAGCGCGCCGTGGACGGTGCCCTTCTGATGCCCGTGAAGACGTG	660
K1 EF-Tu-a2.seq	601	660
K1 EF-Tu-a1.seq	661	TTCTCCATCTCCGGTCGCGGTACCGTGGTGACGGGCCGTGTCGAGCGCGGCATCATCAAG	720
K1 EF-Tu-a2.seq	661	720
K1 EF-Tu-a1.seq	721	GTGGGCGAAGAAATCGAAATCGTGGGCATCCGCGACACGCGAGAAGACCACCTGCACGGGC	780
K1 EF-Tu-a2.seq	721	780
K1 EF-Tu-a1.seq	781	GTGGAAATGTTCCGCAAGCTGCTGGACCAGGGCCAAGCCGGCGACAACGTCGGCCTGCTG	840
K1 EF-Tu-a2.seq	781	840
K1 EF-Tu-a1.seq	841	CTGCGCGGCACGAAGCGTGAAGACGTCGAGCGCGGCCAGGTGCTGTGCAAGCCCGGCTCC	900
K1 EF-Tu-a2.seq	841	900
K1 EF-Tu-a1.seq	901	ATCAAGCCGCACACCCACTTCACGGCCGAGGTGTACGTGCTGTGCAAGGACGAAGGCGGC	960
K1 EF-Tu-a2.seq	901	960
K1 EF-Tu-a1.seq	961	CGCCACACGCCCTTCTTCAACAATAACCGTCCGAGTTCTACTTCCGCACGACCGACGTG	1020
K1 EF-Tu-a2.seq	961	1020
K1 EF-Tu-a1.seq	1021	ACCGGCGCCATCGAGCTGCCGGCCGACAAGGAAATGGTCATGCCCGGCGACAACGTGTCG	1080
K1 EF-Tu-a2.seq	1021	1080
K1 EF-Tu-a1.seq	1081	ATCACCGTCAAGCTGATCAACCCCATCGCCATGGAAGAAGGCCTGCGCTTCGCCATCCGC	1140
K1 EF-Tu-a2.seq	1081	1140
K1 EF-Tu-a1.seq	1141	GAAGGCGGCGGTACGGTCGGCGCCGGCGTCGTGGCCAAGATCATTGCTGA	1191
K1 EF-Tu-a2.seq	1141TAA	1191

Figure 20. *A. avenae* K1 菌株の 2 つの *EF-Tu-a* 遺伝子のアライメント

K1 EF-Tu-a1 と *K1 EF-Tu-a2* と名付けた遺伝子はともに 1,191 bp で構成されており、それらの間には 3 カ所の同義置換が存在した。

K1.seq	1	MAKGKFERTKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAAIATVLSAKFGGEAKKYDEIDAAPEEKARG	60
N1141.seq	1	60
K1.seq	61	ITINTAHVEYETANRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVCSAADGMPQTREHI	120
N1141.seq	61	120
K1.seq	121	LLARQVGVPYIIVFLNKCDMVDDEELLELVEMEVRELLDKYDFPGDDTPIVRGSAKLAL	180
N1141.seq	121	180
K1.seq	181	GDKGPLGEQAIDKLAEALDTYIPTPERAVDGAFLMPVEDVFSISGRGTVVTGRVERGIK	240
N1141.seq	181	240
K1.seq	241	VGEEIEIVGIRDQKTTCTGVEMFRKLLDQGQAGDNVGLLLRGTKREDVERGQVLCKPGS	300
N1141.seq	241	300
K1.seq	301	IKPHTHFTAENVVLSKDEGGRHTPFFNNYRPQFYFRTTDVTGAIELPADKEMVMPGDNVS	360
N1141.seq	301	360
K1.seq	361	ITVKLINPIAMEEGLRFAIREGGRTVGAGVVAKIIA	396
N1141.seq	361	396

Figure 21. *A. avenae* K1 菌株と N1141 菌株の EF-Tu-a アミノ酸配列のアライメント

K1: *A. avenae* K1、N1141: *A. avenae* N1141。

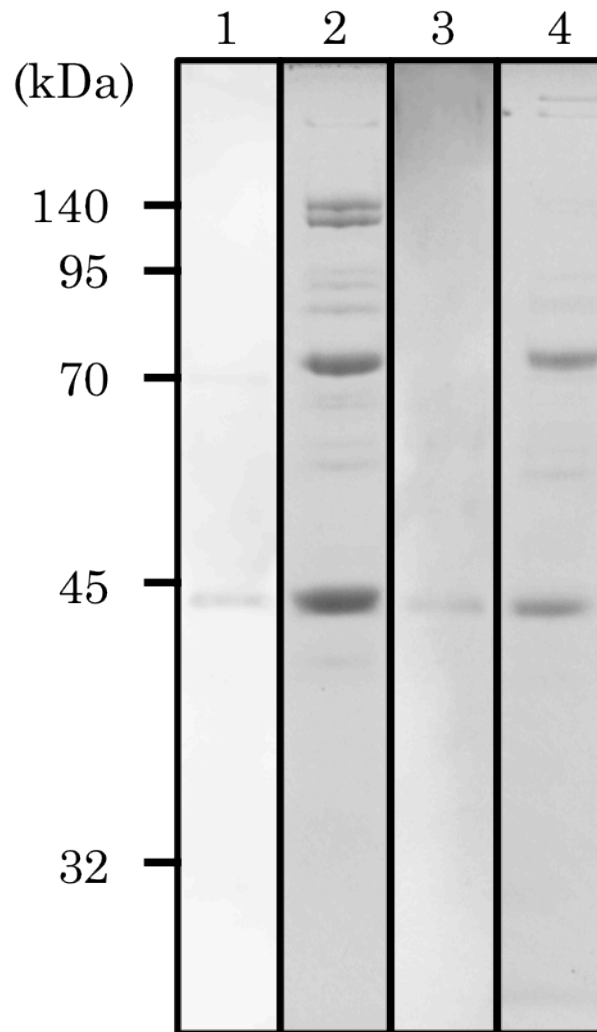


Figure 22. 抗 EF-Tu 抗血清による成熟型 EF-Tu-a の検出

1 : N1141-Q 300 mM NaCl 溶出画分 ウェスタンブロット

2 : N1141-Q 300 mM NaCl 溶出画分 CBB 染色

3 : K1-Q 200 mM NaCl 溶出画分 ウェスタンブロット

4 : K1-Q 200 mM NaCl 溶出画分 CBB 染色

N1141 菌体破砕液と K1 菌体破砕液を Q Sepharose 担体を用いた強陰イオン交換クロマトグラフィーで分離し、それぞれ 300 mM NaCl 溶出画分と 200 mM NaCl 溶出画分を SDS-PAGE に供した。電気泳動後、抗 EF-Tu-a 抗血清を用いたウェスタンブロットと CBB 染色によって可視化した。左の値は分子量を示している。

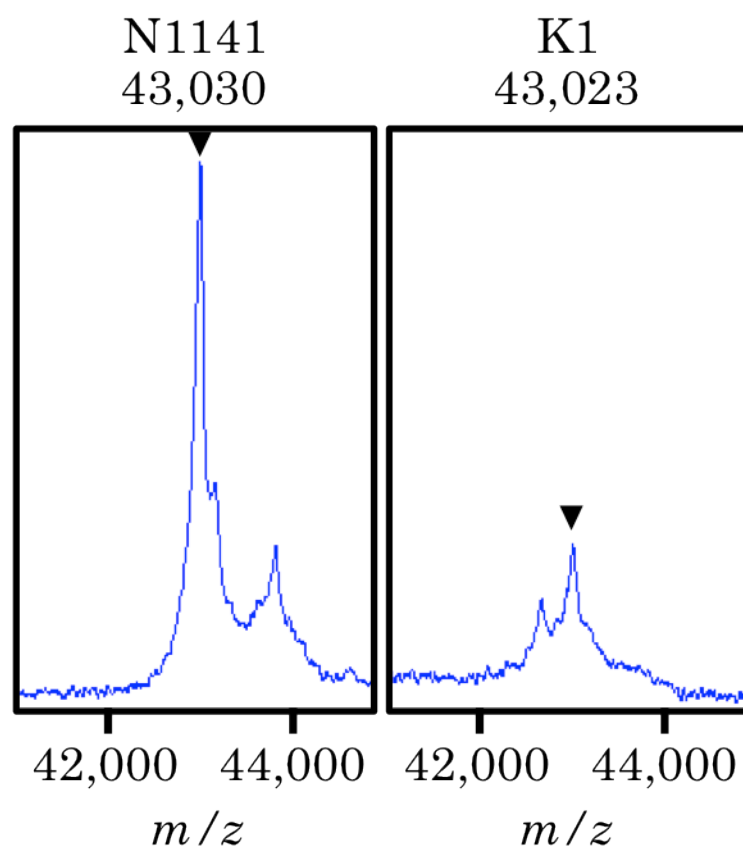


Figure 23. *A. avenae* の成熟型 EF-Tu-a の MALDI-TOF MS を用いた分子量解析

N1141-Q 300 mM NaCl 溶出画分（左）と K1-Q 200 mM NaCl 溶出画分（右）をそれぞれ MALDI-TOF MS を用いて分子量を測定した。マトリックスはシナピン酸を使用した。▼は、N1141-Q 300 mM NaCl 溶出画分では m/z 43,030、K1-Q 200 mM NaCl 溶出画分では m/z 43,023 のピークを示している。

第一章 考察

本章では、*A. avenae* N1141 菌株の EF-Tu にはイネに対して活性酸素の発生やカロースの沈着といった PTI 反応を誘導する PAMP 活性があることを示した。EF-Tu は、原核生物のタンパク質新生においてリボソームにアミノアシル-tRNA を運び込む役割を担う重要なタンパク質である。このような重要な機能故に、様々な細菌において EF-Tu の配列は高度に保存されていることも明らかになっている (Lathe and Bork, 2001)。また、細菌内の細胞質に含まれているタンパク質量のうち 5-10% が EF-Tu であることが報告されており、細菌の中で最も豊富なタンパク質であることも明らかになっている (Jonák, 2007)。これまでに報告されている植物に免疫反応を誘導する PAMP は、多くの病原体が共通で持つということと、比較的多量に存在する物質であるということがその特徴であることが知られている。事実、シロイヌナズナやトマト、イネに対する PAMP であるフラジェリンは、細菌の鞭毛構成タンパク質であるため細胞表面に大量に存在し、そのアミノ酸配列も C 末端領域と N 末端領域では比較的保存されていることも明らかになっている。(Yonekura et al., 2003)。また、幅広い植物種に認識される真菌由来のキチンやグラム陰性細菌由来のリポポリサッカライドといった細胞壁を構築する上で多量に必要となる物質も PAMP として機能することが報告されている (Felix et al., 1993, Silipo et al., 2005)。これらの知見から、イネが EF-Tu を PAMP として認識することは十分に合理性があることと考える。

シロイヌナズナは EF-Tu の N 末端認識領域 elf18 を EFR という受容体によって認識し、PTI を誘導することが知られている (Zipfel et al., 2006)。EFR は一回膜貫通型受容体キナーゼで、細胞外に存在するロイシンリッチリピートドメインで elf18 を認識すると考えられている。イネには EFR のオーソログは存在しないが、細胞外に添加された *A. avenae* N1141 菌株由来の EF-Tu-a を認識して PTI を誘導することから、イネにも細胞膜上に EF-Tu を認識する EFR とは異なる受容体が存在していると考えられる。EF-Tu が植物の細胞膜上で認識されるためには EF-Tu が細胞外に分泌される必要がある。しかし、EF-Tu の機能から考えると、EF-Tu は病原菌体内に存在しており、細胞外に分泌されるとは考えがたい。

菌体内に局在している EF-Tu が植物細胞膜上で認識されるメカニズムとしては、2つの可能性が考えられる。まず、ひとつは、植物に侵入した病原菌に対し、植物が菌体外に存在する他の PAMP を認識することで、活性酸素発生などの免疫反応を誘導する。この活性酸素によって一部の細菌が破壊され、菌体内から漏れ出てきた EF-Tu がイネの細胞膜上で認識されるというものである。もうひとつの可能性は、病原細菌が感染した際に、植物自身の細胞がダメージを受け、破壊された細胞に存在する葉緑体やミトコンドリア由来の EF-Tu を認識して、免疫反応を誘導するというものである。両者の可能性のうち、どちらがより真実に近いのかということを決定するデータは今のところ存在しない。しかし、近年これとは別に、EF-Tu の認識に関して非常に興味深い現象が見つかった。それは、*A. avenae* と同じグラム陰性細菌である日和見感染症の原因菌である *Acinetobacter baumannii* は、その外膜小胞に EF-Tu を蓄積するというものである (Dallo et al., 2012)。外膜小胞の存在は、植物病原細菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* においても報告されている (Sidhu et al., 2008)。そして、*A. avenae* N1141 菌株の近縁種である *A. avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1 のゲノムに外膜小胞形成に関与する遺伝子がコードされているという報告もある (Shetty et al., 2011)。これらのことから、従来考えられていた仮説に加えて、外膜小胞に蓄積された EF-Tu が植物側へと輸送されて細胞膜上の受容体によって認識されているという新たな仮説も考えられるかもしれない。今後、イネに対して病原性の *A. avenae* K1 菌株と非病原性の N1141 菌株の成熟型 EF-Tu の局在や細胞外への分泌などを詳細に研究することで、EF-Tu の植物-微生物相互作用の実際の際における機能を明らかにすることが出来ると考える。

イネに対して病原性の *A. avenae* K1 菌株と非病原性の N1141 菌株の成熟型フラジェリンには構造の異なる糖鎖が翻訳後修飾されていることが知られている。さらに、K1 菌株のフラジェリンに付加されている糖鎖は、イネによる認識を特異的に阻害していることも明らかになっている (Hirai et al., 2011)。本章において、N1141 菌株と K1 菌株の EF-Tu-a は両者ともアミノ酸配列は同一であることを明らかにした。さらに、成熟型 EF-Tu-a の質量を測定したところ、ほぼ同一の質量を持つことも明らかとなったことから、両菌株の EF-Tu はイネに認識され、一般的な PAMP として機能すると推察される。この様に、同一菌株に特異的 PAMP と非特異的 PAMP が存在する意義については現在のところ明らかにな

っていない。しかし、非病原性 N1141 菌株が植物に感染したとき、菌体外に存在する特異的 PAMP であるフラジェリンの認識によって活性酸素が発生し、これにより菌体が破壊され菌体内から EF-Tu が分泌されることでより強い PTI が起きている可能性がある。一方、病原性の K1 菌株では、フラジェリンを認識出来ないため、活性酸素が発生せず、菌体内に存在する EF-Tu の認識による PTI 自体も抑制されている可能性がある。この様に、同一菌株に特異的 PAMP と非特異的 PAMP が存在することにより、より厳密な宿主特異性が規定されている可能性があると考ええる。

一方、K1 菌株と N1141 菌株由来の EF-Tu はほぼ同一の質量を持つことが明らかとなったが、その構造が異なる可能性は依然残っている。本章で質量分析に用いた MALDI-TOF MS の分解能を考慮すると、成熟型 EF-Tu-a に存在する修飾基が、メチル基やアセチル基などの小さい分子の相違である場合、その差を正確に把握すること難しい。また、修飾基の位置の違いについては、MALDI-TOF MS で特定することは不可能である。今後、この問題を結論づけるためには、成熟型 EF-Tu-a を精製し、トリプシン等の消化酵素でペプチド化を行った後に、各ペプチド断片の質量を正確に測定することが必要になると思われる。

EF-Tu の精製過程において、EF-Tu を含む 6 種類の PAMP 候補タンパク質が得られた。しかし、EF-Tu 以外の 5 種類のタンパク質が PAMP として機能しているという報告はない。PAMP として機能するためには、広範な菌種に存在し、その構造の全体または一部が保存されている必要がある。このこと考え合わせると、Hypothetical protein AcavDRAFT_3545 は *A. avenae* にのみ存在することから、PAMP として機能している可能性は低いだろう。Isochorismatase hydrolase は広範な細菌種に存在するが、その相同性は低く、こちらも PAMP として機能する可能性は低いと考えられる。一方、CRISPR-associated protein, Csd2 family、Type I glutamine synthetase、 δ -aminolevulinic acid dehydratase の 3 種類の PAMP 候補は、様々な細菌において高い配列相同性を示すことから、PAMP として機能する可能性が存在する。特に、CRISPR-associated protein, Csd2 family は、原核生物でファージやプラスミドに対する獲得免疫機構として機能していることが報告されている CRISPR-Cas (CRISPR-associated) システムにおいて Cas タンパク質として機能することが示されている (Barrangou et al., 2007, Kunin et al., 2007)。これまでに Cas タンパク質は、45 種類のファミ

リーに分類されることが明らかとなっており、異なるファミリーの Cas タンパク質で保存された領域も存在する (Haft et al., 2005)。そのため、植物が Cas タンパク質の共通の領域を認識することで、この分子が PAMP として機能している可能性が存在する。また、Type I glutamine synthetase は、細菌においてホモ 12 量体を形成することでグルタミン合成酵素として機能している。さらに、この機能に加えて、窒素が豊富な分子であるグリシン、アラニン、ヒスチジン、トリプトファンといったアミノ酸の濃度や AMP、CTP といったヌクレオチドの濃度を監視していることも報告されている (Eisenberg et al., 2000)。Type I glutamine synthetase が多量タンパク質であるという報告はないが、広範囲の細菌に高い配列相同性があることから、植物によって PAMP として認識されている可能性は考えられる。また、 δ -aminolevulinic acid dehydratase は、ポルフォビリノーゲンシンターゼとも呼ばれ、2 分子の 5-アミノレブリン酸の間で脱水縮合させることでポルフォビリノーゲンを合成する酵素である。光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* においてこの酵素は、4 量体で機能していることが示されている (Bollivar et al., 2004)。 δ -aminolevulinic acid dehydratase も多量タンパク質であるという報告はないが、このタンパク質も多く細菌間で高い配列相同性があることから、PAMP として認識されている可能性があるかもしれない。今後、これらの PAMP 候補タンパク質について発現タンパク質を用いた研究を行うことで、それぞれのタンパク質が PAMP として機能するかどうかを明らかにできるであろう。

本実験において、精製の段階で加熱処理によって生じた沈殿部分にも PAMP 活性が存在した。この沈殿に含まれる PAMP 活性物質は、主にペプチドグリカンではないかと考えられる。ペプチドグリカンは、細胞壁構成分子として多量に存在することと加熱によって沈殿することが報告されており (Gust et al., 2007)、イネによって認識されることも報告されている (Liu et al., 2012)。そして、本研究では解析を行わなかったが、強陰イオン交換クロマトグラフィーによって分離した後に PAMP 活性が認められた 200 mM NaCl 溶出画分と 400 mM NaCl 溶出画分には、EF-Tu とは異なる電荷の未知の PAMP 活性物質が存在するかもしれない。このように、*A. avenae* のイネ非病原性 N1141 菌株には、フラジェリンや EF-Tu の他にも、いくつかの PAMP が存在すると思われる。事実、植物は同一の菌の持つ複数の PAMP を認識することで強い PTI を誘導することが報告され

ている (Boller and Felix, 2009)。今後、様々な方法で N1141 菌株に存在する EF-Tu 以外の PAMP について同定することで、この菌とイネの間に存在する認識機構の全貌が明らかになるものと思われる。

第二章

イネが認識する EF-Tu エピトープ部位の同定

第二章 緒言

シロイヌナズナの EF-Tu 受容体である EFR のホモログは、イネに存在しないことが報告されている (Boller and Felix, 2009) ため、イネは EF-Tu を認識して PTI を誘導することができないと考えられてきた。一方、前章で *A. avenae* N1141 菌株に存在する EF-Tu-a が、イネに対して PTI を誘導する PAMP として機能することを明らかにした。このことから、イネとシロイヌナズナでは異なる受容機構により EF-Tu-a を認識し、PTI を誘導している可能性が考えられた。

そこで、イネにおける EF-Tu-a の認識機構を分子レベルで明らかにするために、本章ではイネが認識する EF-Tu-a のエピトープ部位について調べることにした。

第二章 材料と方法

1) シロイヌナズナ培養細胞の培養と継代

シロイヌナズナ培養細胞は T87 細胞を用いた。培養細胞はオートクレーブ滅菌した改変 LS 培地（ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 1 包, KH_2PO_4 200 mg, myo-inositol 100 mg, thiamine-HCl 1 mg, 0.02 mg/mL 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid 10 μL , Sucrose 30 g, total vol. 1 L [pH 5.8]) を用いて 100 mL 三角フラスコに 21 mL 入れた状態で、明期 16 時間、暗期 8 時間の光条件下、培地温度 23°C、108 rpm で振盪培養を行った。また、培養細胞の継代は 7 日ごとに行い、200°C、2 時間の乾熱滅菌を行った 100 mL 三角フラスコに培養細胞 1 mL と R2S 培地 21 mL 加えて 22 mL とした。以降の実験に用いるものは、継代から 6~8 日目のものを用いた。

2) GST-EF-Tu-a ペプチド発現ベクターの作製

GST-EF-Tu-a ペプチド発現ベクターは、第一章で作製した *Bam*HI-*EFTu**-*Sa*II/*pGEX-6P-3* に対して KOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて一度または二度の Inverse PCR (iPCR) を行うことで作製した。作製したベクター名と iPCR に用いたプライマーセットを以下に示す。

【*EF-Tu1-600/pGEX-6P-3*】

GST-elf-F (5'-TGAGTCGACTCGAGCGGCC-3')

EF-Tu600-R (5'-GGTGTCCAGGGCTTCAGCCA-3')

【*EF-Tu601-*/pGEX-6P-3*】

EF-Tu601-F (5'-TACATCCCGACGCCCGAGCG-3')

GST-M-R (5'-CATGGATCCCAGGGGCCCCCT-3')

【*EF-Tu301-900/pGEX-6P-3*】

(1st iPCR) GST-elf-F
EF-Tu900-R (5'-GGAGCCGGGCTTGCACAGCA-3')
(2nd iPCR) EF-Tu301-F (5'-GGCGCCATCCTGGTGTGCTC-3')
GST-M-R

【*EF-Tu451-750/pGEX-6P-3*】

(1st iPCR) GST-elf-F
EF-Tu750-R (5'-GATACCCACGATTTTCGATTT-3')
(2nd iPCR) EF-Tu451-F (5'-GAAATGGAAGTGCGC GA ACT-3')
GST-M-R

【*EF-Tu526-675/pGEX-6P-3*】

(1st iPCR) GST-elf-F
EF-Tu675-R (5'-ACCGGAGATGGAGAACACGT-3')
(2nd iPCR) EF-Tu526-F (5'-AAGCTGGCCCTCGAAGGCGA-3')
GST-M-R

【*EF-Tu541-660/pGEX-6P-3*】

(1st iPCR) GST-elf-F
EF-Tu660-R (5'-CACGTCTTCCACGGGCATCA-3')
(2nd iPCR) EF-Tu541-F (5'-GGCGACAAGGGCCCCCTGGG-3')
GST-M-R

【*EF-Tu556-645/pGEX-6P-3*】

(1st iPCR) GST-elf-F
EF-Tu645-R (5'-CATCAGGAAGGCACCGTCCA-3')
(2nd iPCR) EF-Tu556-F (5'-CTGGGCGAGCAAGCCATCGA-3')
GST-M-R

【*EF-Tu526-615/pGEX-6P-3*】

(1st iPCR) GST-elf-F
EF-Tu615-R (5'-GGGCGTCGGGATGTAGGTGT-3')
(2nd iPCR) EF-Tu526-F
GST-M-R

【EF-Tu586-675/pGEX-6P-3】

(1st iPCR) GST-elf-F
 EF-Tu675-R
(2nd iPCR) EF-Tu586-F (5'-GAAGCCCTGGACACCTACAT-3')
 GST-M-R

3) *A. avenae* のイネ葉鞘への EF-Tu-a 101-300 との共接種

A. avenae N1141 菌株と K1 菌株のスキムミルク保存溶液 5 μ L を PF 液体培地 5 mL に植菌し、30°C、200 rpm で一晩振盪培養した。次に、この培養液 100 μ L を PF 固体培地で 30°C、一晩培養した。培養後、固体培地上に滅菌した MilliQ 水 1 mL を添加して、コンラージ棒を用いて掻きとることで菌体を回収した。菌体懸濁液は MilliQ 水で 2×10^6 cfu/ μ L になるように調整した。この菌体懸濁液を等量の 600 μ M EF-Tu-a 101-300 と混合した。混合液 1 μ L を ϕ 22 の針上にのせ、4 週間生育したイネの地上部約 3 cm のところに接種した。接種したイネは、人工気象器で明期 16 時間 (30°C)、暗期 8 時間 (25°C) の条件下で生育させた。菌体数の測定は、接種 1、3、5 日後に接種部位から下 2 cm、上 8 cm の全長 10 cm を切り取り、1%次亜塩素酸、70%エタノールに順次数秒間浸すことによって滅菌処理を行い、MilliQ 水で洗浄してエタノールを除去した。イネはオートクレーブ滅菌したハサミを用いて刻んだ後、乾熱滅菌した乳鉢に移して MilliQ 水 1 mL を加えて磨砕した。磨砕後、MilliQ 水 5 mL を加えて懸濁し、この懸濁液を 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 倍希釈して、各希釈液を PF 固体培地に 2 枚ずつプレーティングした。このプレートを 30°C で 24 時間培養し、生育したコロニー数を計数することで菌体数を計測した。

菌体懸濁液中の菌体数の計算式

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

第二章 結果

1) イネの elf18 認識能の有無

第一章では *A. avenae* N1141 菌体の EF-Tu-a がイネに対する PAMP として機能していることを明らかにした。そこで、イネによる EF-Tu-a 認識の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

はじめに、これまでシロイヌナズナの EF-Tu 認識領域である N 末端 18 アミノ酸で構成される elf18 ペプチドがイネにおいても EF-Tu の認識部位として機能するかどうかについて調べた。シロイヌナズナに対しては elf18 の 2 番目のリジン残基と 5 番目のフェニルアラニン残基が変異すると PTI 誘導活性が失われることが報告されている (Kunze et al., 2004)。そこで、この 2 つの残基が EF-Tu-a にも保存されているかを調べたところ、Figure 24A に示したようにこの 2 つのアミノ酸残基は EF-Tu-a 由来の elf18-avenae にも保存されていた。そこで、elf18 と elf18-avenae の 2 つのペプチドをそれぞれ合成し、イネとシロイヌナズナに処理して活性酸素の発生量を測定した。その結果、elf18 と elf18-avenae を処理したシロイヌナズナ培養細胞では活性酸素の発生が認められた。また、EF-Tu-a を処理したシロイヌナズナ培養細胞でも活性酸素の発生が認められた。一方、イネに EF-Tu-a を処理した場合は、活性酸素の発生が認められたが、elf18 や elf18-avenae を処理した場合は、活性酸素の発生が誘導されないことが示された (Figure 24B)。これらのことから、シロイヌナズナは elf18 領域を認識して PTI を誘導するが、イネは elf18 とは異なる領域を認識して PTI を誘導することが明らかとなった。

2) イネが認識する EF-Tu-a エピトープ部位の同定

イネはシロイヌナズナにおける EF-Tu 認識領域 elf18 とは異なる領域を認識して PTI を誘導することが示された。そこで、イネによる EF-Tu-a の認識領域を明らかにするために、EF-Tu-a 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 の 3 つのペプチドを大腸菌で GST 融合タンパク質として発現させた (Figure 25A)。発現を確認後、EF-Tu-a と同様に PreScission Protease を用いて GST から各ペプチドを切断することで精製した後、終濃度 300 nM となるようにイネ培養細胞に処理して活性酸素の発生が誘導されるかどうか調べた。その結果、EF-Tu-a 101-300 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、EF-Tu-a 1-200 と EF-Tu-a 201-396 を処理したイネ培養細胞においてはこのような活性酸素の発生は認められなかった (Figure 25B)。このことから、イネは EF-Tu-a の中央領域 EF-Tu-a 101-300 を認識して PTI を誘導することが明らかになった。さらに、EF-Tu-a 1-200 と EF-Tu-a 201-396 はイネの PTI を誘導しないことから、イネが認識する EF-Tu-a エピトープ部位は EF-Tu-a 101-300 ペプチドの中でもより中央部分に存在することが示唆された。そこで、イネの PTI 誘導活性を保持する領域を決定するために、EF-Tu-a 101-300 ペプチドの中央領域を残すようにさらに短くした 4 種類のペプチド、EF-Tu-a 151-250、EF-Tu-a 176-225、EF-Tu-a 181-220、EF-Tu-a 186-215 を作製し、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 (Figure 25A)。その結果、EF-Tu-a 151-250 と 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、EF-Tu-a 181-220 と EF-Tu-a 186-215 を処理した培養細胞では活性酸素発生が認められなかった (Figure 25B)。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 (Figure 25A)。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 (Figure 25B)。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明らかとなった。そこで、この EF-Tu-a 176-225 ペプチドを EFa50 と名付けた。

3) EFa50 が誘導するイネ PTI の解析

次に、EFa50 の活性酸素発生活性における濃度依存性について調べた。EFa50 を含む EF-Tu-a 101-300 を様々な濃度でイネ培養細胞に処理して、処理 90 分後の活性酸素の発生量を調べたところ、200 nM EF-Tu-a 101-300 を最大活性とする逆シグモイドカーブが得られた。また、その EC₅₀ は約 50 nM であることも明らかとなった (Figure 26)。

次に、EFa50 を含む EF-Tu-a 101-300 によるカロースの沈着について調べた。EF-Tu-a 101-300 を終濃度 300 nM となるように処理したイネ葉切片におけるカロースの沈着量を調べたところ、コントロールとして水処理したイネ葉切片に比べて約 150 倍のカロースの沈着が認められることが示された (Figure 27)。このとき同時に elf18 を終濃度 300 nM でイネ葉切片に処理したところ、カロースの沈着は認められなかった (Figure 27)。このことから、EF-Tu-a 101-300 にはイネ葉切片におけるカロース沈着誘導活性も存在することが示された。

さらに、EFa50 を終濃度 300 nM となるように処理したイネ培養細胞における免疫関連遺伝子の発現についても調べた。その結果、EF-Tu-a を処理したイネ培養細胞と同様に PTI 関連遺伝子である *OsWRKY70* と *OsCht1* 遺伝子の発現量が処理 3、6 時間後に上昇することが認められた。さらに、同じく PTI 関連遺伝子である *OsEDS1* 遺伝子の発現量が処理 3 時間後に上昇することが認められた。一方、ETI 関連遺伝子 *OsNAC4* の発現量は変化しなかった (Figure 28)。これらのことから、イネは EFa50 を認識し、活性酸素発生やカロースの沈着、免疫関連遺伝子の発現といった PTI を誘導することが明らかとなった。

4) シロイヌナズナにおける EFa50 の認識

次に、EFa50 を認識し PTI を誘導することがイネに特有のものなのかを明らかにするために、シロイヌナズナ培養細胞に EF-Tu-a、EF-Tu-a 1-200、EF-Tu-a 201-396、EF-Tu-a 101-300 と EFa50 をそれぞれ終濃度 300 nM となるように処理して、活性酸素の発生について調べた。その結果、シロイヌナズナにおける EF-Tu 認識領域である elf18 領域を含む EF-Tu-a と EF-Tu-a 1-200 を処理した

シロイヌナズナ培養細胞は活性酸素の発生が認められたが、EFa50 とこれを含む EF-Tu-a 101–300、EF-Tu-a 201–396 を処理したシロイヌナズナ培養細胞ではこの様な活性酸素発生を誘導しなかった (Figure 29)。このことは、シロイヌナズナには EFa50 を認識して PTI を誘導するシステムは存在しないか、存在していても機能していないことを示す。

5) EF-Tu-a 101–300 によるイネの病害抵抗性誘導

EF-Tu-a 認識領域である EF-Tu-a 101–300 によって誘導される PTI が、イネの病害抵抗性に寄与するのか明らかにするために、EF-Tu-a 101–300 を非病原性 N1141 菌株または病原性 K1 菌株をイネの葉に共接種し、接種 1、3、5 日後の菌体数を測定した。それぞれの菌体 1×10^6 cfu と EF-Tu-a 101–300 300 pmol をイネの葉に共接種し、1、3、5 日後の葉を摩砕して固体培地にプレーティングすることで生育した菌体数を計数した。その結果、水と一緒に接種した N1141 菌株の菌体数は接種 1 日後に約 1×10^7 cfu まで増加し、その後徐々に減少した。一方、EF-Tu-a 101–300 と共接種した N1141 菌株の菌体数は、接種 1 日後から減少しはじめ接種 5 日後には水との共接種に比べて 1/30 まで減少していた。また、K1 菌株は水との共接種および EF-Tu-a 101–300 共接種とも、接種 1 日後に菌体数が約 1×10^8 cfu まで増加し、その後も増加し続けて 5 日後には約 1×10^{10} cfu まで増加した (Figure 30)。この結果から、EF-Tu-a 101–300 処理によって誘導されるイネの PTI は、非病原性菌に対する病害抵抗性に寄与するが、病原性菌に対しては病害抵抗性を発揮しないことが明らかとなった。

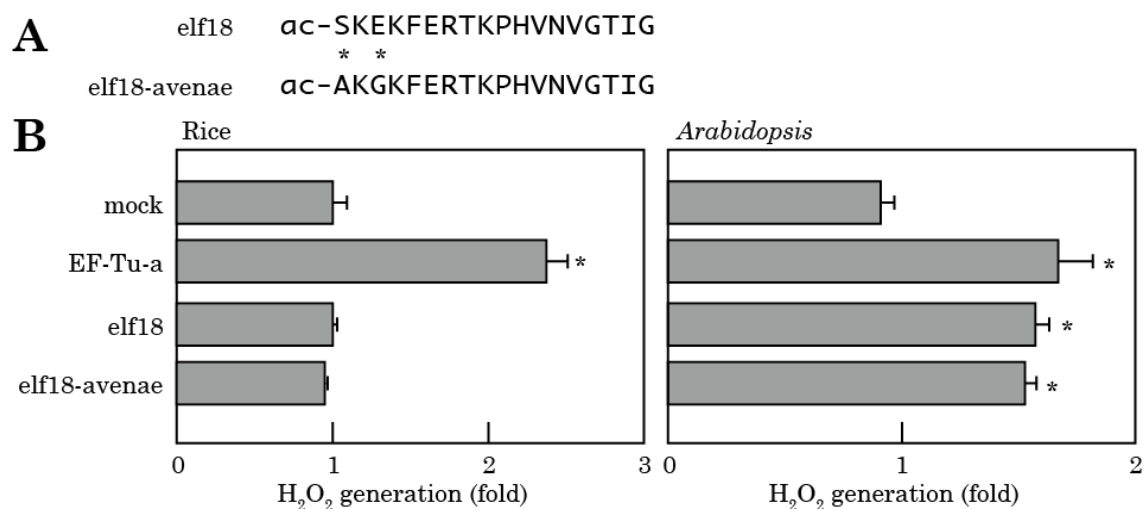


Figure 24. elf18 を処理したイネまたはシロイヌナズナ培養細胞における活性酸素の発生

A, elf18 と elf18-avenae のアミノ酸配列。アスタリスク (*) は elf18 と elf18-avenae 間で異なるアミノ酸を示している。

B, イネ培養細胞 (左) とシロイヌナズナ培養細胞 (右) に EF-Tu-a、elf18、elf18-avenae をそれぞれ終濃度 300 nM となるように処理した。イネは処理 1.5 時間後、シロイヌナズナは処理 0.5 時間後の活性酸素の発生量をルミノールを用いた化学発光によって検出した。横軸は活性物質発生量を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。アスタリスク (*) は *t* 検定により $p < 0.01$ で有意な差を示した。

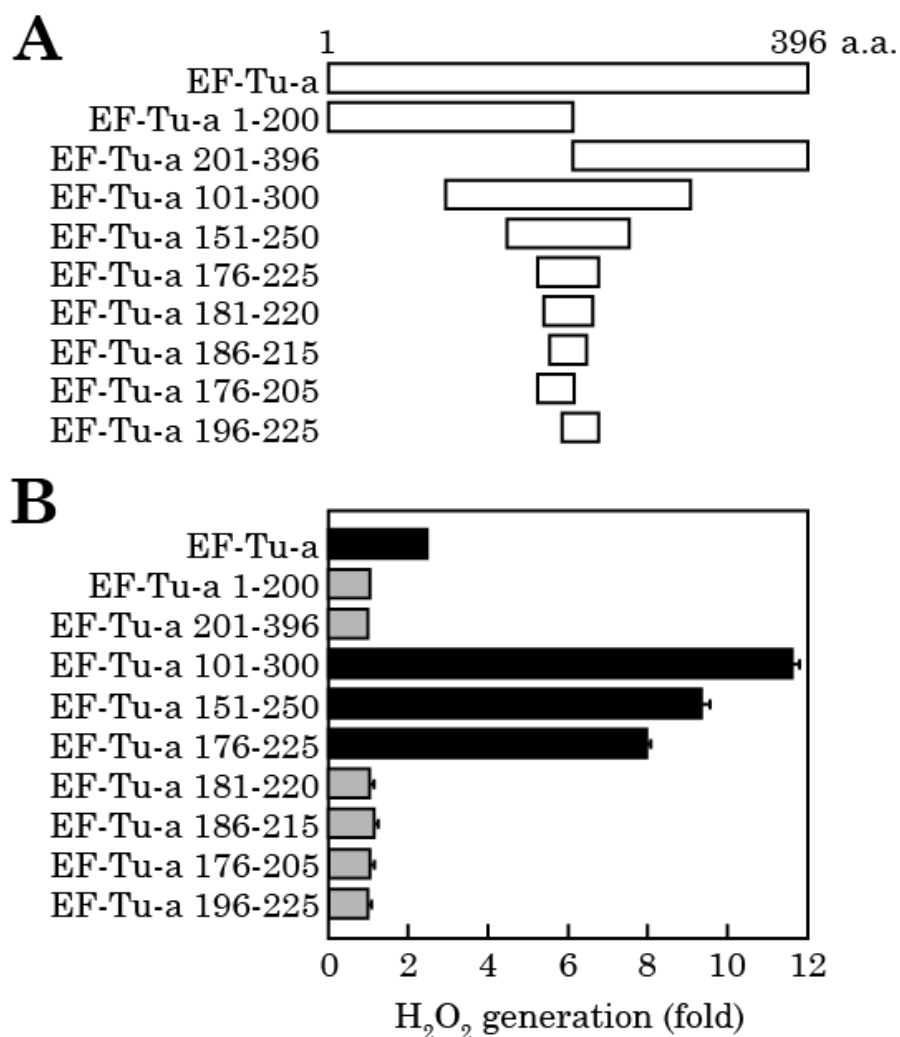


Figure 25. EF-Tu-a ペプチドを処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

A, EF-Tu-a と EF-Tu-a ペプチド。EF-Tu-a ペプチドは EF-Tu-a のアミノ酸残基番号をもとに名付けた。

B, イネ培養細胞に EF-Tu-a と EF-Tu-a ペプチドをそれぞれ終濃度 300 nM となるように処理した。処理 1.5 時間後の活性酸素の発生量をルミノールを用いた化学発光によって検出した。横軸は活性物質発生量を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。黒のバーは t 検定により $p < 0.01$ で有意な差を示した。

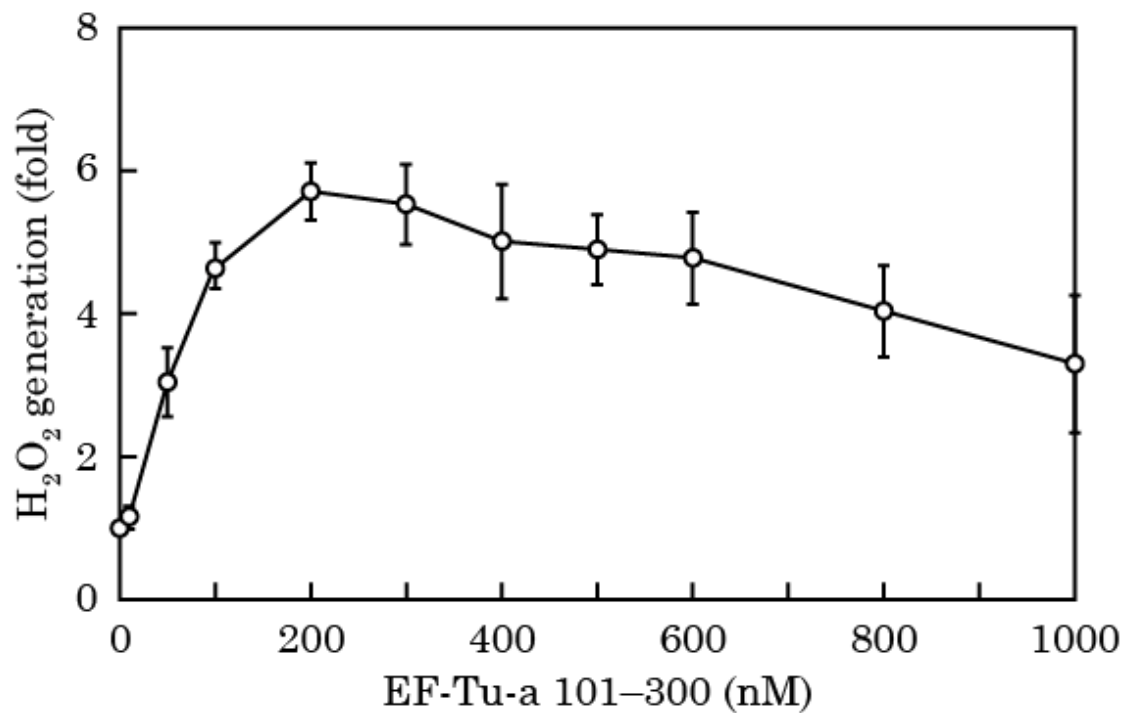


Figure 26. EF-Tu-a 101-300 を処理したイネ培養細胞における活性酸素の発生

横軸に示した終濃度となるように EF-Tu-a 101-300 をイネ培養細胞に処理し、処理後 1.5 時間後のイネ培養細胞における活性酸素の発生量を測定した。活性酸素の発生はルミノールを用いた化学発光によって検出した。縦軸は活性物質発生量、横軸は処理濃度を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。

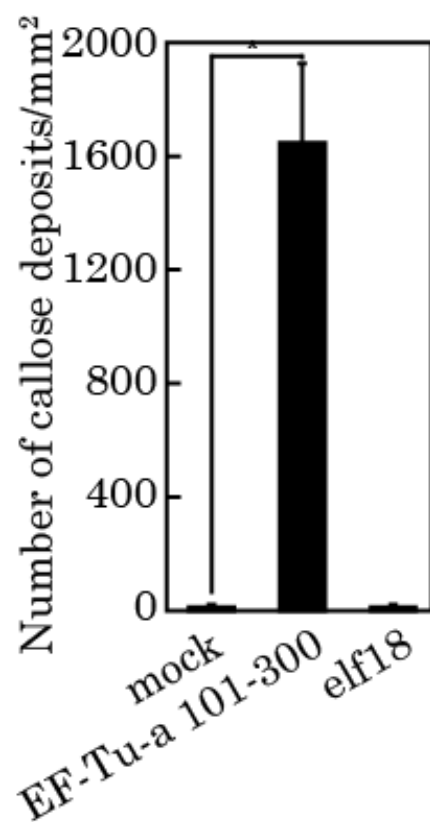


Figure 27. EF-Tu-a 101-300 と elf18 を処理したイネ葉におけるカロースの沈着

EF-Tu-a 101-300 と elf18 は終濃度 300 nM となるようにイネ葉に処理した。カロースの沈着はアニリンブルー染色によって検出した。縦軸は 1 mm² 当たりのカロースの沈着数を示している。値は 9 回の実験の平均で示した。アスタリスク (*) は t 検定により $p < 0.01$ で有意な差を示した。

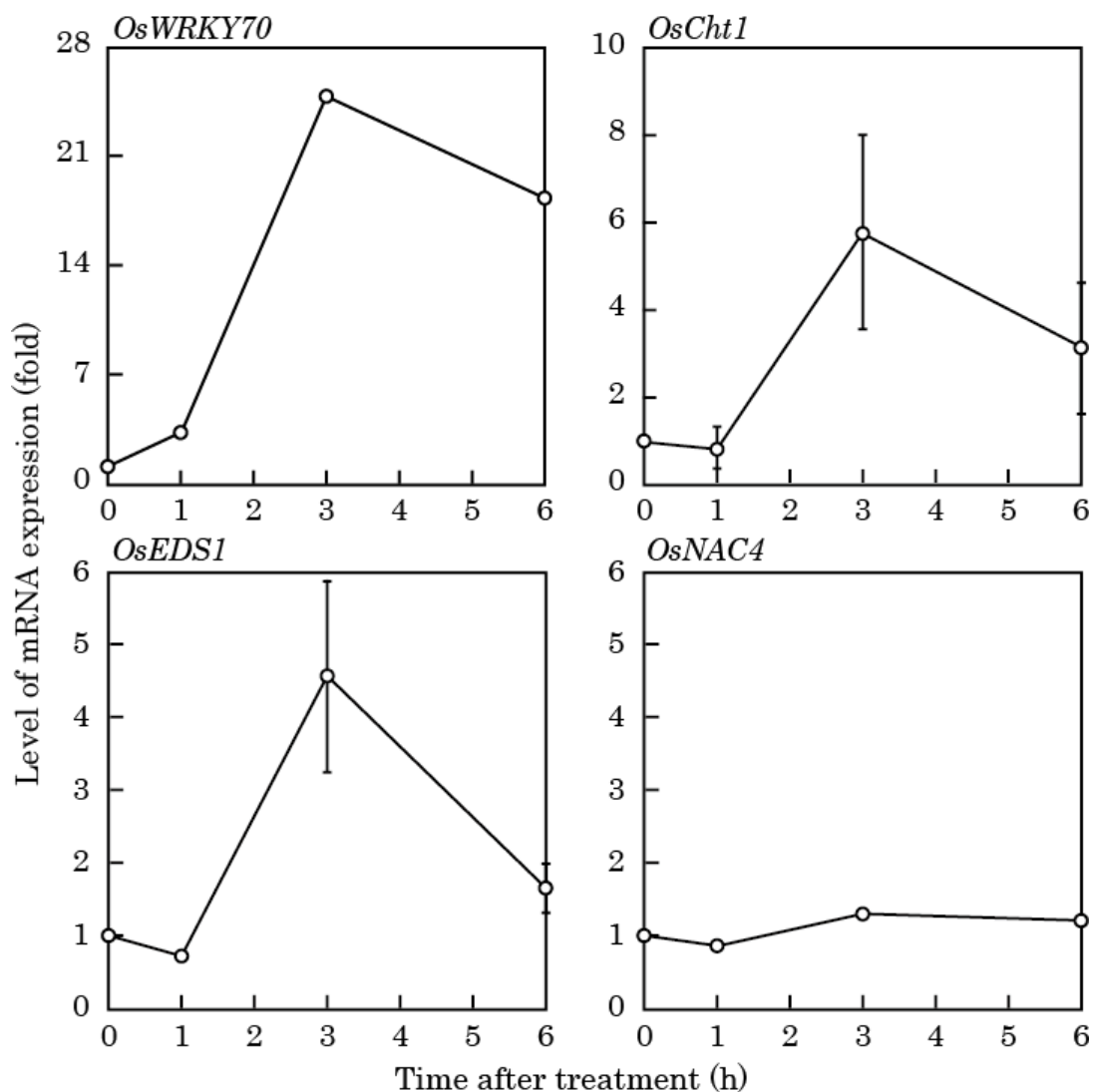


Figure 28. EFa50 を処理したイネ培養細胞における免疫関連遺伝子の発現

EFa50 を終濃度 300 nM となるように処理したイネ培養細胞から抽出した RNA に含まれる *OsWRKY70*、*OsCht1*、*OsEDS1*、*OsNAC4* の mRNA レベルを測定した。mRNA レベルは RT-PCR の対数増幅期における閾値点から計算した。縦軸は mRNA レベル、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。

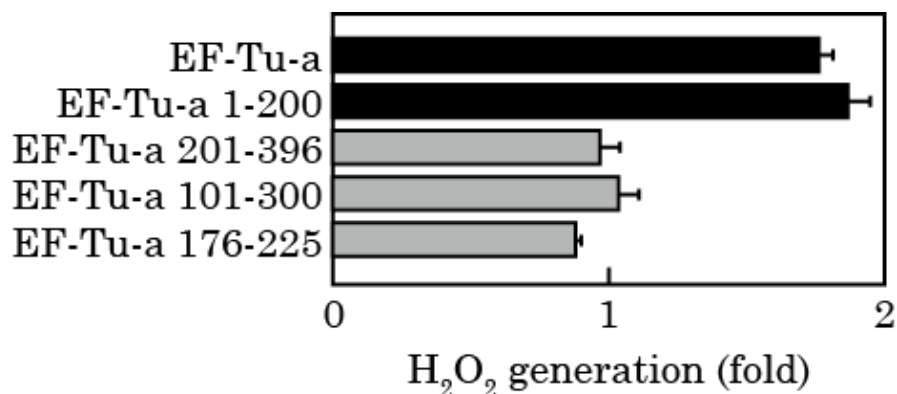


Figure 29. EF-Tu-a ペプチドを処理したシロイヌナズナ培養細胞における活性酸素の発生

シロイヌナズナ培養細胞に EF-Tu-a と EF-Tu-a ペプチドをそれぞれ終濃度 300 nM となるように処理した。処理 0.5 時間後の活性酸素の発生量をルミノールを用いた化学発光によって検出した。横軸は活性物質発生量を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。黒のバーは t 検定により $p < 0.01$ で有意な差を示した。

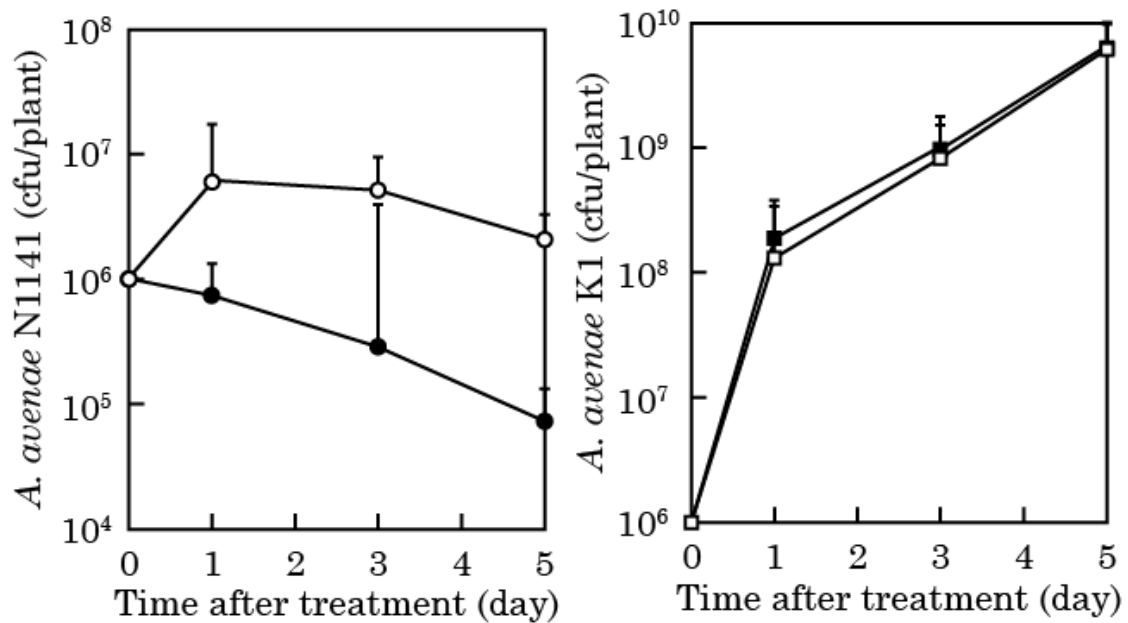


Figure 30. EF-Tu-a 101-300 共接種による *A. avenae* の生育への影響

○: N1141 菌株+mock、●: N1141 菌株+EF-Tu-a 101-300、□: K1 菌株+mock、■: K1 菌株+EF-Tu-a 101-300。 1×10^6 cfu のイネ非病原性 *A. avenae* N1141 菌株 (左) とイネ病原性 *A. avenae* K1 菌株 (右) を EF-Tu-a 101-300 300 pmol と混合し、イネ葉鞘に針状接種した。接種 1、3、5 日目の葉に含まれる菌体数を計測した。縦軸は菌体数、横軸は処理後の経過時間を示している。値は 3 回の実験の平均で示した。

第二章 考察

これまでに、シロイヌナズナを含むアブラナ科植物は EF-Tu の N 末端 18 アミノ酸 elf18 を PAMP として認識して PTI を誘導することが明らかとなっている。また、合成した様々な elf18 類縁体を用いた詳細な解析によって、elf18 は acetyl-xKxKxFxR という N 末端構造をもつ場合に最大の PTI 誘導能を発揮することが報告されている (Kunze et al., 2004)。第一章で同定した *A. avenae* の EF-Tu-a の N 末端においても xKxKxFxR が保存されていたので、EF-Tu-a 由来の elf18-avenae をイネとシロイヌナズナに処理したところ、イネは elf18-avenae を認識して免疫反応を誘導しないが、シロイヌナズナは PTI を誘導することが明らかとなった (Figure 24B)。序論にも述べたが、イネにはシロイヌナズナの elf18 を認識する EFR という受容体のオーソログが存在していないことが明らかになっている (Boller and Felix, 2009)。このことから、イネが elf18-avenae を認識して免疫反応を誘導しないのは、elf18 の受容体がイネには存在していないからであろう。

この様に、同一の PAMP であっても植物種によってその認識部位が異なることがフラジェリンで近年報告されている。シロイヌナズナはフラジェリンの N 末端側に存在する flg22 という 22 アミノ酸で構成されるペプチドを FLS2 という受容体型キナーゼで認識して PTI を誘導する (Felix et al., 1999, Gómez-Gómez and Boller, 2000)。しかし、ナス科植物のトマトは、FLS2 ホモログによって flg22 を認識することに加えて、flg22 とは異なる N 末端側領域 flgII-28 と名付けられたペプチドを認識していることが報告されている (Clarke et al., 2013)。また、単子葉植物であるイネは FLS2 ホモログを有しているが、主にフラジェリンの C 末端側を認識しているという知見も得られている (Takai et al., unpublished data)。このようなことから、トマトやイネには、それぞれ flgII-28 や C 末端領域を認識する FLS2 とは異なる受容体が存在すると考えられている。イネの EF-Tu 認識機構がシロイヌナズナの EF-Tu 認識機構と異なっているという今回の結果は、植物種における PAMP 認識機構の多様性の一例なのかもしれない。

イネにおける EF-Tu-a 認識領域を調べたところ、イネは EF-Tu-a の中央 50

アミノ酸からなる EFa50 を認識していることが明らかとなった (Figure 25)。EF-Tu は 3 つのドメインで構成されていることがわかっており、N 末端から GDP/GTP 結合と GTPase 活性をもつ EF-Tu 1 ドメイン、触媒機能をもたないが EF-Tu 1 ドメインの活性を調節する EF-Tu 2 および 3 ドメインが存在する (Heffron et al., 2006、Jonák, 2007)。さらに、EF-Tu は、EF-Tu 1 ドメインに GTP と結合した状態でアミノアシル-tRNA と結合し、EF-Tu 2 ドメインと EF-Tu 3 ドメインがアミノアシル-tRNA を抱える様に小さく閉じた状態となる。そして、GTP を GDP に変換するとアミノアシル-tRNA をリボソームの A 部位へ収め、リボソームから EF-Tu は離れ、閉じていた EF-Tu 2 および 3 ドメインが開くと考えられている。本論文でイネにおける EF-Tu-a 認識領域として同定した EFa50 は、EF-Tu 1 ドメインと EF-Tu 2 ドメインをつなぐ領域であり、この領域は EF-Tu とアミノアシル-tRNA の結合と解離に伴う結合ポケットの開閉によって構造が変化すると予想されている。実際、結晶構造が明らかとなっている EF-Tu 分子の EFa50 領域を調べると、GTP とアミノアシル-tRNA の結合の有無によって構造が変化していた (PDB ID: 1B23, 1EFT, 1TTT)。また、EFa50 領域は GTP とアミノアシル-tRNA の結合の有無に係わらず、アミノアシル-tRNA 結合領域とは反対側の分子表面に位置していた。一方、EFa50 領域は菌種間でのアミノ酸配列の保存性の低い領域であることも報告されている (Jared and Olke, 2011)。これらのことから、イネは EFa50 領域を特定のアミノ酸配列で認識しているというよりは、その構造的特徴を認識している可能性が考えられる。事実、本章でアセトニトリルを用いた逆相クロマトグラフィーで EFa50 を精製すると、その PAMP 活性が失われることが示されており、イネによる EFa50 領域の認識にはその立体構造が重要であると思われる。今後、この点を明らかにするためには、EFa50 のアミノ酸配列をプロリンのような極端に構造的な変化をもたらすアミノ酸に置換し、その PTI 活性を測定することなどが必要となるであろう。

イネの EFa50 認識による PTI 誘導能は、今のところイネに特異的であり、シロイヌナズナは EFa50 を認識しない。その一方で、イネは EFR を持たず、elf18 を認識して免疫反応を誘導することが出来ない。このことは、イネとシロイヌナズナの EF-Tu 認識機構は、単子葉植物と双子葉植物が進化の過程で分岐した後それぞれが独自に獲得してきたと推定される。さらに、両者が細菌を認識するために共通して EF-Tu を PAMP として利用するということは、EF-Tu が細菌の

生存において非常に重要な物質であり細菌間で高度に保存されていることに加え、細菌に多量に存在するタンパク質であることによるのであろう。すなわち、結果的に EF-Tu を認識することが両者とも細菌に対する防御に最も有利になる表現型であったため、EF-Tu を認識するという点に収束した形でそれぞれが進化したと考えられる。さらに、このことは、イネに存在している EFa50 を認識する受容体は、イネに特異的に存在する分子である可能性を示すものである。

本章では、EF-Tu-a 101-300 をイネに対して非病原性の *A. avenae* N1141 菌株と共接種するとイネの病害抵抗性を強く誘導することも明らかにした。一方、イネに対して病原性の K1 菌株と EF-Tu-a 101-300 の共接種では病害抵抗性が発揮されなかった。これまでに、シロイヌナズナに対して flg22 や elf18 を前処理すると病原性である *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 菌株の生育を制限することが報告されている (Kunze et al., 2004, Zipfel et al., 2004)。しかし、flg22 を *P. syringae* pv. *tomato* DC300 菌株と同時にシロイヌナズナに接種すると生育の制限は前処理した時と比べて明らかに弱くなることも知られている

(Zipfel et al., 2004)。このことから、イネにおいても EF-Tu の前処理はイネに有効な病害抵抗性を付与する可能性がある。一方、イネに対して病原性の K1 菌株と EF-Tu-a 101-300 の共接種では K1 菌株の生育が影響されなかった。EF-Tu 共接種によって PTI 反応が誘導されているにもかかわらず、病原性菌 K1 菌株の生育を抑制できなかった理由は現在のところ、明らかではない。しかし、K1 菌株にはタイプ III 分泌装置が存在しており、この分泌装置を介してイネの PTI を抑制するエフェクターを分泌することが明らかになっている。そこで、K1 菌株を接種し、接種 2 時間後のイネ培養細胞に対してフラジェリンや EF-Tu を処理したところ、PTI が誘導されなかった (吉田裕貴、私信)。このことから、イネに対して病原性の K1 菌株と EF-Tu-a 101-300 の共接種では、EF-Tu により誘導される PTI を K1 菌株がエフェクターを用いて抑制したため、K1 菌株の生育が阻害されなかった可能性がある。現在、このような K1 菌株の持つ PTI 阻害型エフェクターは同定されていないが、このエフェクターが明らかになれば、EF-Tu が誘導する PTI がこのエフェクターによって阻害されるかどうかを明らかにすることが出来るであろう。

第三章

イネによる EF-Tu の受容とその情報伝達機構の解析

第三章 緒言

前章でイネの EF-Tu 認識部位は、シロイヌナズナの EF-Tu 認識部位とは異なることを明らかにした。さらに、イネにはシロイヌナズナの EF-Tu 受容体である EFR のオーソログが存在しないことも明らかになり、イネには EFa50 を認識する未知の受容体が存在することが示唆された。これは同時にこの受容体からの情報伝達系も存在することを示している。EF-Tu によるイネの免疫反応誘導機構の全貌を明らかにするためには、イネにおける EF-Tu の受容機構とその情報伝達機構に関する分子レベルでの知見を得ることが必要となる。そこで、本章では、イネオリゴマイクロアレイを用いてイネ EF-Tu 受容機構と EF-Tu 受容情報の伝達機構について解析した。

第三章 材料と方法

1) マイクロアレイ解析

継代 4 日目のイネ培養細胞に終濃度 300 nM となるように EF-Tu-a 101–300 を処理し、経時的にイネ培養細胞懸濁液 1 mL を先切りチップで回収し 1.5 mL チューブに入れ、培地を取り除いた後、液体窒素で凍結した。凍結した培養細胞から RNeasy Plant Mini kit を用いて Total RNA を抽出し、Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて Cy3 標識 cDNA を合成し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて Cy3 標識 cDNA を精製した。精製された Cy3 標識 cDNA は、Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用いて Rice Gene Expression Microarray, 4 × 44k マイクロアレイスライド (Agilent Technologies) に 65°C で 17 時間ハイブリダイゼーションした。反応後、Gene Expression Wash Pack (Agilent Technologies) を用いてマイクロアレイスライドを洗浄した。マイクロアレイスライドは Scan Array 4000XL (GSI Lumonics) でスキャンし、得られたデータは GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies) で解析した。

2) シロイヌナズナ EF-Tu 受容体 EFR 発現ベクターの作製

継代 7 日目のシロイヌナズナ T87 培養細胞懸濁液 1 mL を先切りチップで回収し 1.5 mL チューブに入れ、培地を取り除いた後、液体窒素で凍結した。凍結した培養細胞から RNeasy Plant Mini kit を用いて Total RNA を抽出し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートとして *EFR* 遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットを用いて PCR 反応を行い、アガロースゲル電気泳動で特異的な増幅を確認した。目的の増幅産物を pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit (Life Technologies) を用いて *pENTR/D-TOPO* にライゲーションし、大腸菌 (DH5α) に形質転換した。得

られたコロニーのうち目的のインサートが組み込まれたベクターをもつ形質転換体をコロニーPCRで選抜した。この大腸菌からプラスミドを単離し、*EFR-FLAG/pENTR/D-TOPO*と名付けた。*EFR-FLAG/pENTR/D-TOPO*は、植物細胞内で発現させるための35Sプロモーター、Gateway® Recombination Cloning Technology用ccdBカセット (Life Technologies)、蛍光タンパク質をコードする *Venus* 遺伝子を有する *Gw-Venus/pBI221* と混合し、Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Life Technologies) を用いて LR 反応を行うことで、35S プロモーターの下流で *EFR-Venus* タンパク質を発現する *EFR-Venus/pBI221* を作製した。

【PCR 反応に用いたプライマーセット】

EFR-F (5'-CACCATGAAGCTGTCCTTTTCACTTG-3')

EFR-FLAG-R

(5'-CTTATCATCATCATCCTTGTAATCTCCTCCTCCCATAGTATGCATGT
CCGTATTTA-3')

3) イネプロトプラストの調製と形質転換

継代4日目のイネ培養細胞から培地を除去し、使用直前に調製した15 mLの酵素液(1% Cellulase RS (Yakult), 0.5% Macerozyme R10 (Yakult), 0.1% Pectolyase Y23 (Kyowa Chemical), 0.6 M mannitol, 10 mM CaCl₂, 0.1% BSA, 5 mM MES-KOH [pH 5.7])をフィルター(MILLEX®-GS)で濾過し、培養細胞に処理した。30℃、3時間、暗所で静置培養した後、100 µm径のセルストレーナー(Beckton Dickinson Labware)で濾過し、100 g、25℃で5分間遠心分離することでプロトプラストを集めた。上清を取り除いた後、15 mLのKMC solution(117 mM KCl, 82 mM MgCl₂, 85 mM CaCl₂, [pH 6.0])を加えて緩やかに混合し、再度同条件で遠心分離して上清を除去した。この操作を二回繰り返した後、3 mLのMMg solution(400 mM Mannitol, 15 mM MgCl₂, 4mM MES-KOH, [pH 5.7])を加え、緩やかに混合後、血球計算板を用いて顕微鏡観察下で0.1 mm³当たりの細胞数を数えた。細胞密度を算出した後、細胞密度2×10⁵ cells/mLのプロトプラスト液を得た。エッペンドルフチューブにプラスミド

(pOsWRKY70-luc 2.5 µg、 pRluc 3 ng、 *EFR-Venus/pBI221* 2 µg) を入れ、プロトプラスト液 200 µL (4×10^4 cells) を加え、さらに 210 µL の PEG solution (40% [v/v] PEG 4000 (Fluka) , 200 mM mannitol, 100 mM CaCl₂) を加えて、先切りチップを用いて緩やかにピペッティングを行った。25°C で 30 分間静置した後、800 µL の KMC solution を加えて 100 g、25°C で 5 分間遠心分離して上清を除去し、200 µL の KMC solution に懸濁して 30°C、暗所で 15 時間静置培養した (Takai et al., 2008)。

4) ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ

形質転換したプロトプラストに終濃度 300 nM となるように elf18 を処理し、30°C、暗所で 3 時間静置した。200 g、25°C で 5 分間遠心分離して上清を除去した後、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) を用いてレポーターアッセイを行った。化学発光の検出には、PHELIOS AB-2350 (ATTO) を使用した。

5) イネ EF·Tu 受容体候補タンパク質発現ベクターの作製

継代 4 日目のイネ培養細胞に終濃度 300 nM となるように EF·Tu-a 101–300 を処理した。1 時間後、Total RNA を抽出し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した。EF·Tu 受容体候補 (*EF·Tu Receptor Candidate; ERC*) 遺伝子の全長を特異的に増幅するプライマーセットを用いて PCR 反応でそれぞれ増幅した。正しい増幅断片が得られたら、それぞれの増幅断片を *pENTR/D-TOPO* にライゲーションし、大腸菌 (DH5α) に形質転換した。得られたコロニーのうち目的のインサートが組み込まれたベクターをもつ形質転換体をコロニーPCR で選抜した後、それぞれの大腸菌からプラスミドを単離した。単離したプラスミドは、*Gw-Venus/pBI221* と混合後、Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix を用いて LR 反応を行い、35S プロモーターの下流で各イネ EF·Tu 受容体候補と Venus を融合したタンパク質を発現するベクターを作製した。作製

したベクター名とイネ EF-Tu 受容体候補遺伝子のクローニングに用いたプライマーセットを以下に示す。

【*ERC1-Venus/pBI221*】

ERC1-F (5'-CACCATGGAAACCATGGCAAAAGCAC -3')

ERC1-R (5'-GACAATGGAATCGAAATCGCTCCT -3')

【*ERC2-Venus/pBI221*】

ERC2-F (5'-CACCATGATCCGCTTGTTTGCTCCAT-3')

ERC2-R (5'-CACTACTTTTCCTCCACTGGAAAGC-3')

【*ERC3-Venus/pBI221*】

ERC3-F (5'-CACCATGAACACCCTCACCGGAAGC-3')

ERC3-R (5'-TTGGCTTGATGTTTCCTTCATTGGA-3')

【*ERC4-Venus/pBI221*】

ERC4-F (5'-CACCATGGCATGTGCAGCTCTGG-3')

ERC4-R (5'-AGAAACTTCGGAAGATAAATTCGGCA-3')

【*ERC5-Venus/pBI221*】

ERC5-F (5'-CACCATGGAGAGGAATAAATTTGCAAGCAAAA-3')

ERC5-R (5'-GTCTTCTCCGACGAGCTTGC-3')

【*ERC6-Venus/pBI221*】

ERC6-F (5'-CACCATGGGGACGAGGAGGAGGA-3')

ERC6-R (5'-TGATGTGATGATCTCAAGTTCAGCC-3')

【*ERC7-Venus/pBI221*】

ERC7-F (5'-CACCATGCAGCTGCCCAATTTGC-3')

ERC7-R (5'-CATCTGCACCTGCAGGTCTG-3')

【*ERC8-Venus/pBI221*】

ERC8-F (5'-CACCATGCCGCGTGCGGCGGTC-3')

ERC8-R (5'-CTGAGAAACGCTGTCGAAATCGT-3')

【*ERC9-Venus/pBI221*】

ERC9-F (5'-CACCATGTTTACTATTCTGAAATTGCTTCCAATGC-3')

ERC9-R (5'-ATCCATCACTGAACATGTCATGTGTAG-3')

【*ERC10-Venus/pBI221*】

ERC10-F (5'-CACCATGCCGCGGAGACACGAC-3')

ERC10-R (5'-CTTCTGGTAGTCTGTAGCTTGCTAATT-3')

6) シロイヌナズナプロトプラストの調製と形質転換

継代 6～8 日目のシロイヌナズナ培養細胞から培地を除去し、使用直前に調製した 15 mL の酵素液 (0.75% Cellulase RS, 0.03% Pectolyase Y23, 0.5 M Sorbitol, 1 mM CaCl₂, 10 mM MES-KOH [pH 5.7]) をフィルター

(MILLEX®-GS) で濾過し、培養細胞に添加して室温で 30 分間静置した。その後 22°C、90 分、暗所、70 rpm で振盪培養した後、100 μm 径のセルストレイナーで濾過し、濾液を 130 g、4°C で 3 分間遠心分離することでプロトプラストを集めた。上清を取り除いた後、4 mL の W5 solution (5 mM KCl, 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM Glucose, 1.5 mM MES-KOH [pH 5.7]) を加えて緩やかに混合し、再度同条件で遠心分離を行い上清を除去した。この操作を二回繰り返した後、3 mL の SoMg solution (400 mM Sorbitol, 15 mM MgCl₂, 4mM MES-KOH, [pH 5.7]) を加え、緩やかに混合後、血球計算板を用いて顕微鏡観察下で 0.1 mm³ 当たりの細胞数を数えた。細胞密度を算出した後、細胞密度 2×10⁵ cells/mL のプロトプラスト液を得た。エッペンドルフチューブにプラスミド (pAtWRKY29-luc 2.5 μg, pRluc 10 ng, *ERC1-Venus/pBI221* 2 μg) を入れ、プロトプラスト液 200 μL (4×10⁴ cells) を加え、さらに 210 μL の PEG solution (40% [v/v] PEG 4000, 400 mM Sorbitol, 100 mM CaCl₂) を加えて、先切りチップを用いて緩やかにピペッティングを行った。25°C で 15 分間静置した後、800 μL の W5 solution を加えて 200 g、25°C で 5 分間遠心分離して上清を除去し、100 μL の W5 solution に懸濁して 23°C、暗所で 15 時間静置培養した。

第三章 結果

1) イネオリゴマイクロアレイを用いたイネ EF-Tu 認識シグナル情報伝達系の解析

第二章では、イネが EF-Tu の EFa50 を認識することを明らかにした。このことから、イネには EFa50 認識シグナルを伝える情報伝達系の存在が示された。そこで、EF-Tu によるイネの PTI 誘導機構を明らかにするために、EF-Tu 認識下流で制御される遺伝子群を解析することにした。

イネ EF-Tu 認識下流で制御される遺伝子群を同定するために、イネゲノムに存在する約 42,000 個の遺伝子すべてを解析できるイネ 44 k オリゴ DNA マイクロアレイを使用して、EF-Tu-a 101-300 処理後に発現変動する遺伝子を網羅的に解析することにした。EF-Tu-a 101-300 を終濃度 300 nM となるようにイネ培養細胞に加え、0、1、3、6 時間後のイネ培養細胞から抽出した RNA を用いて各遺伝子の発現量をマイクロアレイで解析した。マイクロアレイ解析によって得られた EF-Tu-a 101-300 処理 1、3、6 時間後の発現量データを EF-Tu-a 101-300 処理 0 時間の発現量データで Per Chip Normalization を行った。その後、Per Gene Analysis を行うことで、EF-Tu-a 101-300 処理後の発現量が、少なくとも 1 点以上で 4 倍以上変動した遺伝子を抽出したところ、5,451 遺伝子が選抜された。これらの遺伝子を階層的クラスター解析で 6 つのクラスターに分類した (Figure 31)。その結果、EF-Tu-a 101-300 処理によって発現量が減少する 2,065 遺伝子がクラスター A、B、C に分類された。クラスター D には、EF-Tu-a 101-300 処理 1 時間後から強く発現誘導される 618 遺伝子が分類された。クラスター E には、EF-Tu-a 101-300 処理 1 時間後から 6 時間後にかけて徐々に強く発現誘導される 1,315 遺伝子が分類された。特に、このクラスター E の中に含まれる遺伝子は、イネにフラジェリンを処理したときに発現量が上昇する抗菌性物質合成酵素である PR-1a や Phenylalanine ammonia lyase、抗菌性タンパク質である Endochitinase、Thaumatococcus 糖が含まれていた (Tanaka et al., 2003、Fujiwara et al., 2004)。さらに、ここに含まれていた Probenazole-inducible protein PBZ1

は、フラジェリン認識下流で発現誘導されることに加えてサリチル酸の下流で制御されていることも報告されている (Nakashita et al., 2001)。最後に、クラスターFには EF-Tu-a 101–300 処理 1 時間後がもっとも強く発現誘導され、その後徐々に発現量が減少する 1,433 遺伝子が分類された。このなかにはフラジェリンの下流で制御されていることが報告されている転写因子、Zinc finger transcription factor、RING-type domain containing protein、WRKY transcription factor 1、情報伝達因子 EF-hand Ca^{2+} -binding protein CCD1 や機能未知ではあるがフラジェリン認識下流で制御される EL2 protein、DUF family protein 等の多くのフラジェリン認識下流制御遺伝子が認められた (Fujiwara et al., 2004)。一方で、ETI に含まれる過敏感細胞死を誘導する転写因子 OsNAC4 の発現量の変化は認められなかった。これらのことから、EF-Tu-a 認識によって発現誘導される遺伝子の多くはフラジェリンを認識した後に発現上昇する遺伝子と共通であることが示された。

2) イネオリゴマイクロアレイを用いたイネ EF-Tu 受容体候補遺伝子の選抜

次に、イネにおける EF-Tu 認識の機構を明らかにするため、イネに存在するであろう EF-Tu 受容体の同定を試みた。

植物の膜存在型受容体をコードする遺伝子は、この受容体が一時的に認識後に発現誘導される場合が多いことが報告されている (Zipfel et al., 2006)。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、EF-Tu-a 101–300 処理後に発現が上昇する遺伝子を網羅的に解析することにした。EF-Tu-a 101–300 処理後の発現量が、3 点それぞれで 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。これら 3 つの遺伝子群にどの程度の重複があるか調べたところ、処理 1 時間後に発現量が上昇した 2,453 遺伝子うち、約 6 割の遺伝子が処理 3 時間後にも発現量が 4 倍以上であり、また、約 5 割の遺伝子が処理 6 時間後にもその発現量が 4 倍であることが明らかとなった (Figure 32)。この様に、処理 1 時間後に上昇した遺伝子の多くがその後の処理時間においても発現量が増加していることから、まずは、処理

1 時間後に 4 倍以上の発現上昇が認められた 2,453 遺伝子について解析を行った。まず、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様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 遺伝子が得られたので、これらをイネ EF-Tu 受容体候補 (*EF-Tu Receptor Candidate; ERC*) 遺伝子とした (Figure 33)。興味深いことに、これらイネ EF-Tu 受容体候補遺伝子の EF-Tu-a 101-300 を処理した後の発現パターンは、10 遺伝子とも EF-Tu-a 101-300 処理 1 時間後に最も発現量が上昇し、その後の発現量は減少するというほぼ同じパターンであることが明らかになった (Figure 34)。

3) EFR 過剰発現イネの elf18 認識能の獲得

これまでに、植物種間で PAMP 受容体を異種発現させるとその PAMP 認識能を獲得し、PTI が誘導されることが報告されている (Lacombe et al., 2010)。そこで、イネ EF-Tu 受容体の同定を EF-Tu-a 101-300 認識能を持たないシロイヌナズナを用いて行うことが可能か検討することにした。まず、イネにシロイヌナズナ EF-Tu 受容体 EFR を発現させて、イネ EF-Tu 応答遺伝子 *OsWRKY70* の転写が活性化されるかを調べた。EFR を過剰発現するベクターをイネプロトプラストに導入し、導入 15 時間後に elf18 を終濃度 300 nM となるように処理して、処理 3 時間後のイネ EF-Tu 応答遺伝子 *OsWRKY70* のプロモーター活性を測定した。その結果、EFR 過剰発現イネプロトプラストに elf18 を処理すると水処理に比べて約 1.3 倍の *OsWRKY70* プロモーター活性の上昇が認められた (Figure 35)。この時、コントロールとして Empty vector を導入したプロトプラストでは elf18 処理を行っても水処理したものと同程度の *OsWRKY70* プロモーター活性しか認められなかった。このことから、シロイヌナズナ EFR はイネの EF-Tu 受容シグナル伝達系を利用して elf18 受容シグナルを伝達できることが明らかとなった。このことは同時に、イネ EF-Tu 受容体はシロイヌナズナ EF-Tu 受容シグナル伝達系を使って EF-Tu-a 101-300 認識シグナルを伝達できる可能性をも示唆する。

4) イネ EF-Tu 受容体候補の選抜

イネ EF-Tu 受容体はシロイヌナズナ EF-Tu 受容シグナル伝達系を使って EF-Tu-a 101-300 認識シグナルを伝達できる可能性が示された。そこで、イネ EF-Tu 受容体候補 10 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 認識能を獲得するかどうか調べた。シロイヌナズナ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 を終濃度 300 nM となるように処理して、処理 3 時間後のシロイヌナズナ PTI 関連遺伝子 *AtWRKY29* プロモーター活性を測定した。ポジティブコントロールとして EFR を過剰発現したプロトプラストも同時に試験した。その結果、ERC1 と ERC7 を発現するベクターを導入したシロイヌナズナプロトプラストにおいて 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 (Figure 36)。また、ポジティブコントロールとした EFR 過剰発現シロイヌナズナプロトプラストにおいて elf18 処理によって mock 処理に比べて約 1.8 倍の *AtWRKY29* プロモーター活性の上昇が認められた (Figure 37)。これらのことから、ERC1 と ERC7 はイネ EF-Tu 受容体として機能している可能性が示された。

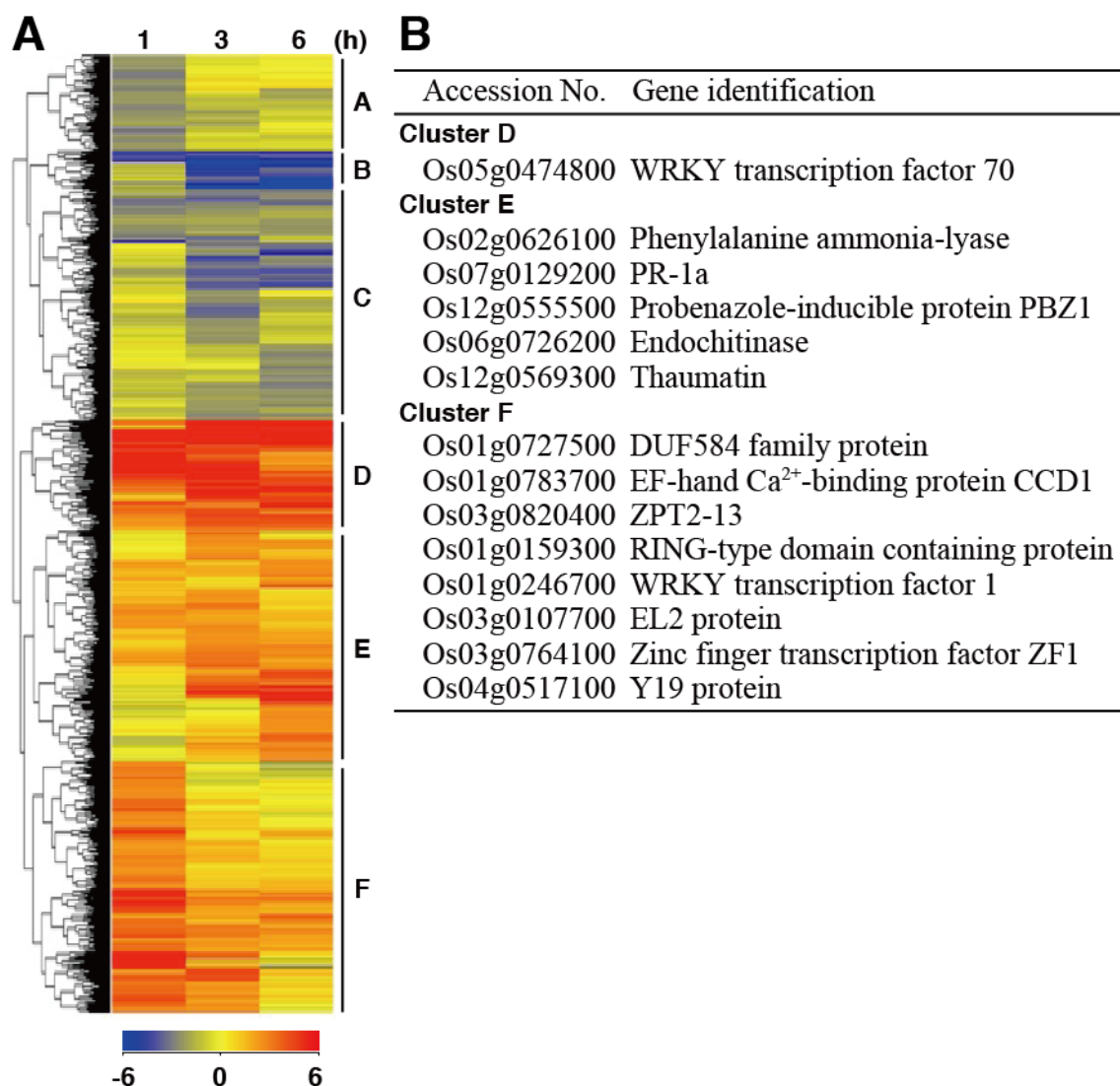


Figure 31. EF-Tu-a 101-300 処理で 4 倍以上発現変動する遺伝子の階層的クラスタ解析

(A)、終濃度 300 nM となるように EF-Tu-a 101-300 処理したイネ培養細胞から抽出した RNA をイネ 44 k マイクロアレイによって mRNA レベルを測定した。処理 1、3、6 時間後に処理前の 4 倍以上の発現量の変動が認められた 5,451 遺伝子を階層的クラスタ解析した。(B)、A に含まれていたフラジェリン下流制御遺伝子。

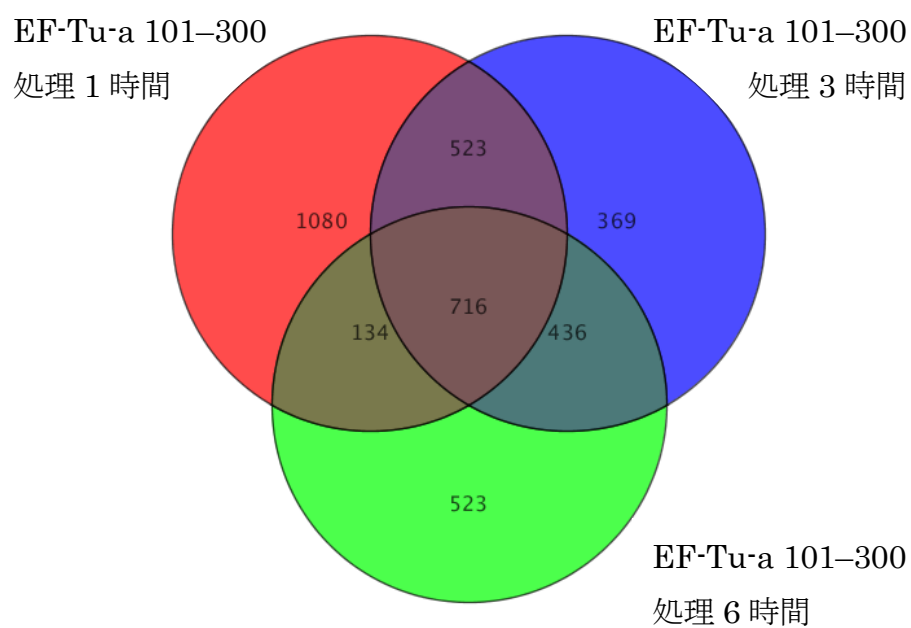


Figure 32. EF-Tu-a 101-300 処理で 4 倍以上発現上昇する遺伝子数

赤色: EF-Tu-a 101-300 処理 1 時間、青色: EF-Tu-a 101-300 処理 3 時間、緑色: EF-Tu-a 101-300 処理 6 時間。

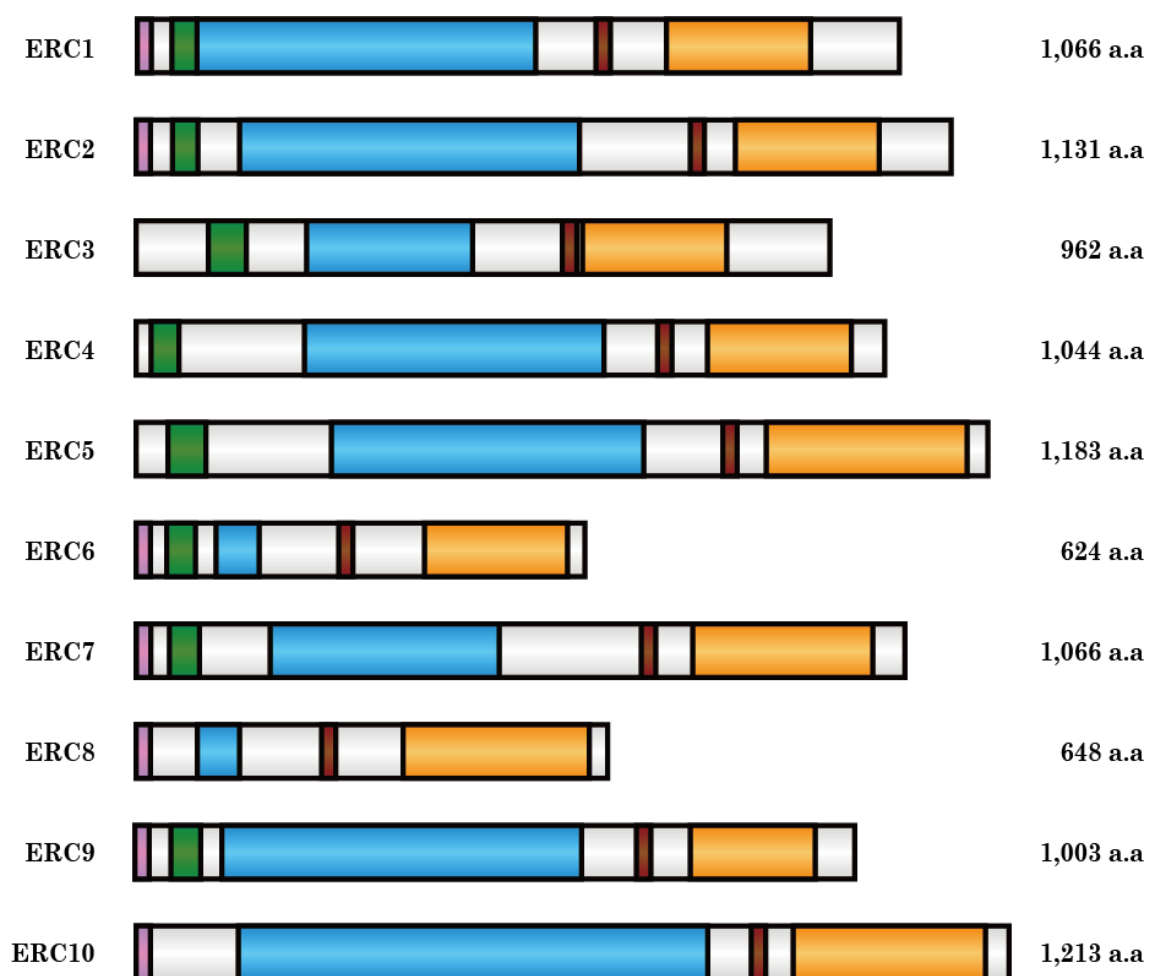


Figure 33. イネ EF-Tu 受容体候補タンパク質の推定構造

桃色: シグナルペプチド、緑色: ロイシンリッチリピート (LRR) N 末端ドメイン、水色: LRR ドメイン、茶色: 膜貫通ドメイン、橙色: セリン/スレオニンキナーゼドメイン。

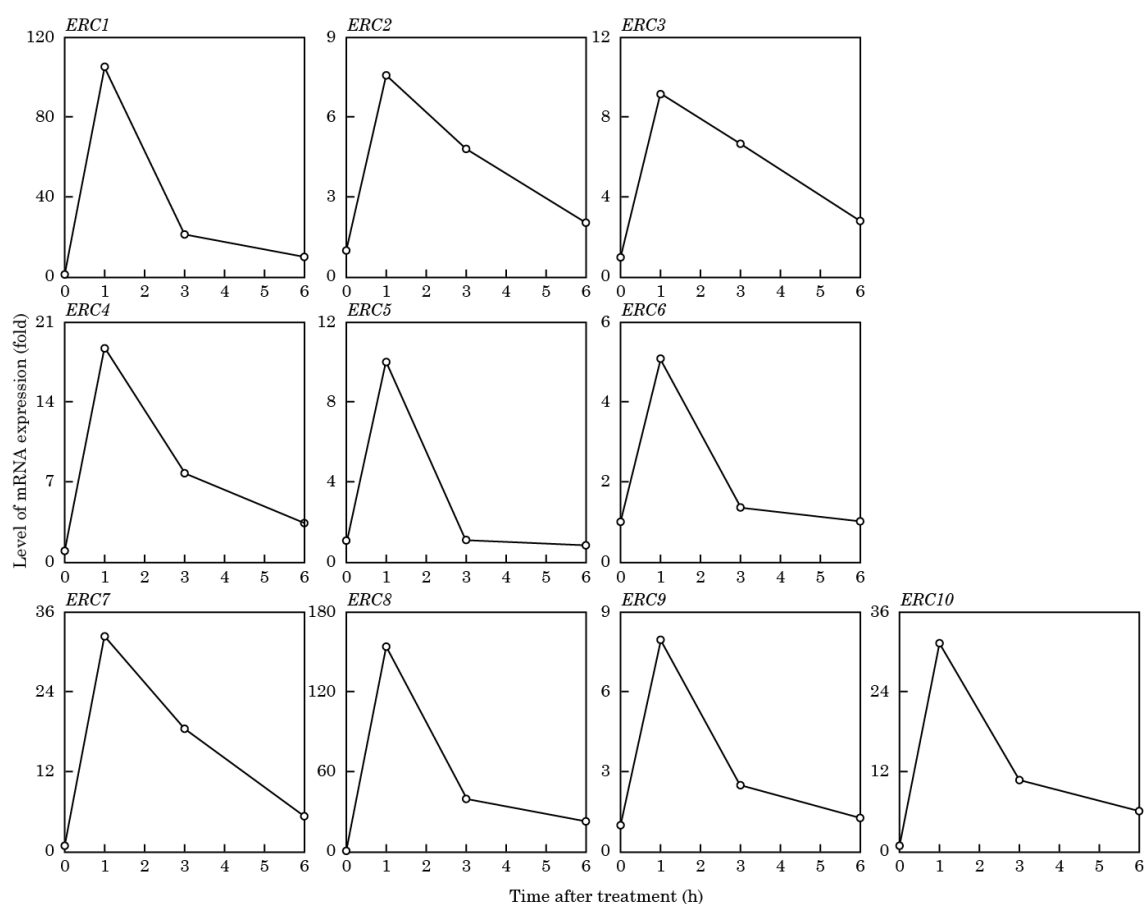


Figure 34. EF-Tu-a 101-300 処理したイネ培養細胞におけるイネ EF-Tu 受容体候補遺伝子の発現パターン

終濃度 300 nM となるように EF-Tu-a 101-300 処理したイネ培養細胞から抽出した RNA をイネ 44 k マイクロアレイによって mRNA レベルを測定した。処理 1 時間後に処理前の 4 倍以上の発現量の上昇が認められた 1 回膜貫通型受容体キナーゼ様遺伝子をイネ EF-Tu 受容体候補遺伝子とし、遺伝子発現パターンを示した。縦軸は mRNA レベル、横軸は処理後の経過時間を示している。

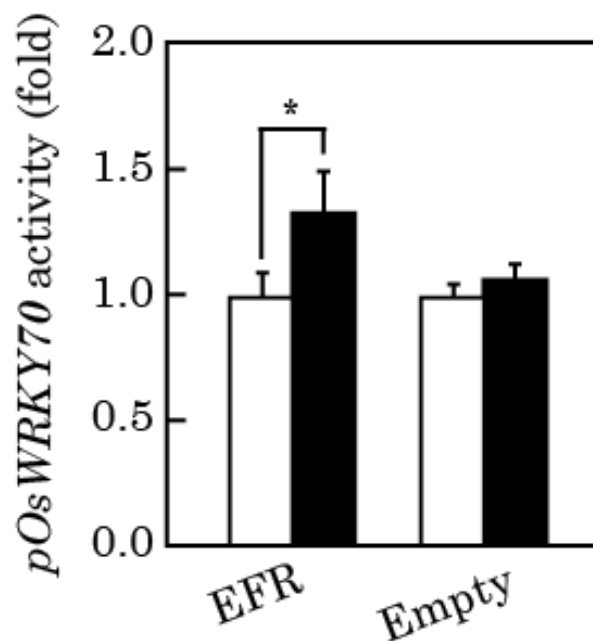


Figure 35. EFR 過剰発現イネプロトプラストにおける elf18 認識能

□: 水処理、■: elf18 処理。シロイヌナズナの EF-Tu 受容体である EFR を過剰発現させたイネプロトプラストに終濃度 300 nM となるように elf18 を処理し、処理 3 時間後のイネ PTI 関連遺伝子 *OsWRKY70* のプロモーター活性をルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイによって測定した。縦軸はプロモーター活性を示している。値は 6 回の実験の平均で示した。アスタリスク (*) は *t* 検定により $p < 0.05$ で有意な差を示した。

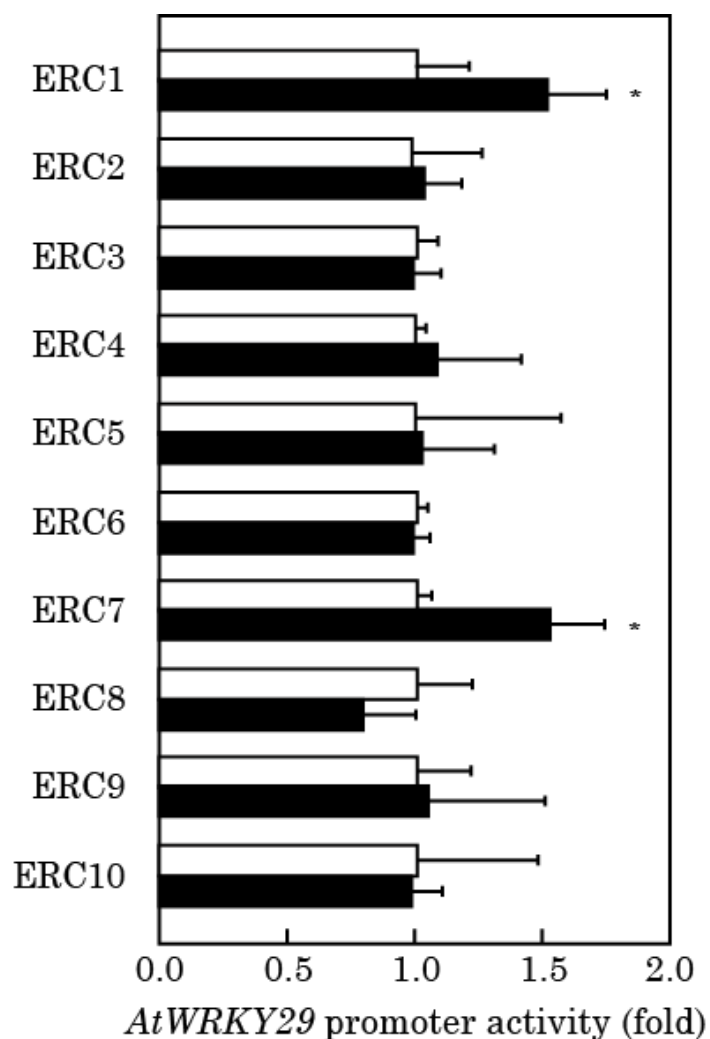


Figure 36. イネ EF-Tu 受容体候補過剰発現シロイヌナズナプロトプラストにおける EF-Tu-a 101-300 認識能

□: 水処理、■: EF-Tu-a 101-300 処理。イネ EF-Tu 受容体候補を過剰発現させたシロイヌナズナプロトプラストに終濃度 300 nM となるように EF-Tu-a 101-300 を処理し、処理 3 時間後のシロイヌナズナ PTI 関連遺伝子 *AtWRKY29* のプロモーター活性をルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイによって測定した。横軸はプロモーター活性を示している。値は 4 回の実験の平均で示した。アスタリスク (*) は *t* 検定により $p < 0.05$ で有意な差を示した。

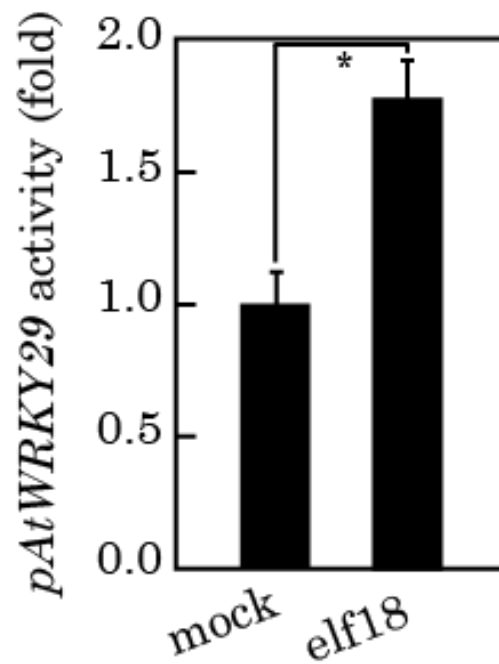


Figure 37. EFR 過剰発現シロイヌナズナプロトプラストにおける elf18 認識能

シロイヌナズナの EF-Tu 受容体である EFR を過剰発現させたシロイヌナズナプロトプラストに終濃度 300 nM となるように elf18 を処理し、処理 3 時間後のシロイヌナズナ PTI 関連遺伝子 *AtWRKY70* のプロモーター活性をルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイによって測定した。縦軸はプロモーター活性を示している。値は 6 回の実験の平均で示した。アスタリスク (*) は *t* 検定により $p < 0.05$ で有意な差を示した。

第三章 考察

本章では、イネにおける EF-Tu の受容と情報伝達機構を明らかにするため、EF-Tu-a 101-300 を処理したイネにおける遺伝子の発現変動をイネオリゴマイクロアレイによって網羅的に解析した。これまでに、イネにおいて PAMP として機能するフラジェリン認識情報の下流で発現変動する遺伝子が明らかとなっている (Tanaka et al., 2003、Fujiwara et al., 2004、Takai et al., 2007)。階層的クラスター解析の結果、フラジェリン認識下流制御遺伝子と EF-Tu を認識後に発現誘導される遺伝子が一部共通していることが明らかとなった。このことは、イネにおいて異なる PAMP の認識情報が、共通の情報伝達系を使って伝達されている可能性を示唆する。このような例は、シロイヌナズナに対する PAMP である flg22 と elf18 でも認められている。これら PAMP は、それぞれ FLS2 と EFR という異なる受容体によって認識されるにもかかわらず、その認識情報によって発現誘導される遺伝子の多くが共通である (Zipfel et al., 2006)。イネもシロイヌナズナと同様に、様々な PAMPs に対応できるようにその受容体は多様化させたが、その認識情報伝達経路は共通のシステムを使用しているのかもしれない。

これまでに、シロイヌナズナにおいて報告されているタンパク質性 PAMP であるフラジェリンと EF-Tu の受容体は、FLS2 と EFR であり、両受容体とも細胞外にロイシンリッチリピートドメイン、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼドメインを持つ 1 回膜貫通型受容体キナーゼである (Gómez-Gómez and Boller, 2000、Zipfel et al., 2006)。これらは LRR-RK ファミリーに属しており、シロイヌナズナにおいては約 200 個のファミリータンパク質が存在する (Shiu et al., 2004)。イネにも 300 個以上の LRR-RK ファミリータンパク質が存在していることが明らかとなっており、タンパク質性の PAMP である EFa50 を認識する受容体もこのファミリー内に存在する可能性が高いと考えられる。そこで、マイクロアレイ解析によって得られた EF-Tu-a 101-300 処理によって発現誘導される遺伝子の中から、10 個のイネ EF-Tu 受容体候補遺伝子を選抜した。これらの遺伝子の発現パターンは、EF-Tu-a 101-300 処理 1 時間後に最も発現量が上昇する共通のパターンを示すことを明らかになった。シロイヌナズナにおいて、FLS2 が

リガンドである **flg22** 認識 30 分後には、受容体のキナーゼ活性依存的にエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、認識 60 分後にはリソソームで **FLS2** が分解される。その一方で **flg22** 認識 90 分後には、細胞膜上に **FLS2** が補充される。このことから、**flg22** 認識 30 分後に **FLS2** 遺伝子の発現量が増加することは、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた **FLS2** 受容体を補充するためのものであると考えられている (Robatzek et al., 2006、Zipfel et al., 2006)。興味深いことに、**flg22** 認識後には **FLS2** だけでなく **EFR** 遺伝子の発現も誘導され、また、**elf18** 認識後にも **EFR** 遺伝子だけでなく **FLS2** 遺伝子の発現誘導も認められる (Zipfel et al., 2006)。これは、その受容体がりガンドを認識後、エンドサイトーシスで取り込まれるとき、近傍に存在する他の種類の受容体も同時に取り込むためであると考えられている。このことから、EF-Tu-a 101–300 処理 1 時間後に増加する 10 個の LRR-RK 分子のうち、EF-Tu-a 101–300 の認識に関与する受容体は 1～数個であり、その他は同時に取り込まれた近傍に存在するタンパク質由来であると考えられる。

シロイヌナズナの **elf18** 受容体 **EFR** をイネプロトプラストに過剰発現させ、**elf18** を処理するとイネ EF-Tu 応答遺伝子である *OsWRKY70* のプロモーター活性の上昇が認められた (Figure 34)。このことから、シロイヌナズナ **EFR** はイネの EF-Tu 受容シグナル伝達系を利用して **elf18** 受容シグナルを伝達できることが明らかとなった。これまでも、**EFR** ホモログを持たないトマトやタバコに **EFR** を発現させると **elf18** 認識能を獲得し、PTI が誘導されることが報告されている (Lacombe et al., 2010)。これらをまとめると、**elf18** 受容体 **EFR** のシグナル伝達系は、シロイヌナズナ、イネ、トマト、タバコの間で保存されていると考えられる。同様なことはフラジェリンでも報告されており、イネ **FLS2** ホモログである *OsFLS2* をシロイヌナズナ *fls2* 変異体に発現させると **flg22** 認識能を獲得する (Takai et al., 2008)。このことは、様々な植物種には多様な PAMP 受容体が存在しているが、その情報伝達系は共通である可能性が考えられる。

シロイヌナズナプロトプラストでのイネ EF-Tu 受容体候補の発現により、**ERC1** と **ERC7** 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。**ERC1** の推定構造は、全長 1,066 アミノ酸で N 末端に膜輸送シグナルペプチド、22 個のロイシンリッチリピート領域を持ち、膜貫通領域を挟んで、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ領域を持つ。一方、**ERC7** の推定構造は、全長 1,066 アミ

ノ酸で N 末端に膜輸送シグナルペプチド、14 個のロイシンリッチリピート領域を持ち、膜貫通領域を挟んで、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ領域を持つ。それぞれのタンパク質を用いて相同性解析を行ったところ、シロイヌナズナには明確なオーソログと呼べる分子は存在しなかった。このことから、**ERC1** と **ERC7** はともにイネ特異的な受容体型キナーゼであると考えられる。今後、イネの *ERC1* 遺伝子破壊株と *ERC7* 遺伝子破壊株を用いて **EF-Tu** 認識能を調べることで、これら遺伝子が本当にイネ **EF-Tu** 受容体をコードするかどうか明らかになるであろう。今後の研究によってイネ **EF-Tu** 受容体が同定されれば、イネの **EF-Tu** 認識による免疫反応誘導の分子メカニズムが明らかになると期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、興味深いテーマと素晴らしい研究環境を与えてくださり、丁寧にご指導くださいました、長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科 植物分子環境生理学研究室 蔡晃植教授に謹んで御礼申し上げます。

日々の研究を進めていく中で、ご助言をいただきました、長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 木下哲客員教授、同助手 高井亮太博士、近藤真千子博士、同植物分子環境生理学研究室 研究員 久保健一博士、平井洋行博士、森井宏美さんには深く感謝致します。

本論文作成に当たり、審査員として多くのご助言をいただきました、長浜バイオ大学大学院 河合靖教授、同 白井剛教授、同（現 広島大学大学院 生態機能物質化学研究室）太田伸二教授には謹んで感謝致します。

本研究を進めていく上で、長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科植物分子環境生理学研究室に在籍された諸先輩方を含め、迷惑をかけ、お世話になった皆様に感謝致します。

最後に、私の大学院での長い研究生生活を支えてくださった両親に心から感謝いたします。

引用文献

Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A.: Mol Plant Microbe Interact. 2003 Dec;16(12):1118-28.

Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P.: Science. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.

CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.

Boller T, Felix G.: Annu Rev Plant Biol. 2009;60:379-406.

A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors.

Bollivar DW, Clauson C, Lighthall R, Forbes S, Kokona B, Fairman R, Kundrat L, Jaffe EK.: BMC Biochem. 2004. Nov 22;5:17.

Rhodobacter capsulatus porphobilinogen synthase, a high activity metal ion independent hexamer.

Che FS, Iwano M, Tanaka N, Takayama S, Minami E, Shibuya N, Kadota I, Isogai A.: Plant Cell Physiol. 1999. 40:1036-1045.

Biochemical and morphological features of rice cell death induced by *Pseudomonas avenae*.

Che FS, Nakajima Y, Tanaka N, Iwano M, Yoshida T, Takayama S, Kadota I, Isogai A.: J Biol Chem. 2000 Oct 13;275(41):32347-56.

Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells.

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T.: Nature 2007 Jul 26;448(7152): 497-500.

A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence.

Clarke CR, Chinchilla D, Hind SR, Taguchi F, Miki R, Ichinose Y, Martin GB, Leman S, Felix G, Vinatzer BA.: New Phytol. 2013 Nov;200(3):847-60.

Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility.

Dallo SF, Zhang B, Denno J, Hong S, Tsai A, Haskins W, Ye JY, Weitao T.: ScientificWorldJournal. 2012;2012:128705.

Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin.

Dunning FM, Sun W, Jansen KL, Helft L, Bent AF.: Plant Cell. 2007 Oct;19(10):3297-313.

Identification and mutational analysis of *Arabidopsis* FLS2 leucine-rich repeat domain residues that contribute to flagellin perception.

D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D. Biochim Biophys Acta. 2004 Feb 12;1696(2):237-44.

Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions.

Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GM, Rotstein SH.: *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):122-45.

Structure-function relationships of glutamine synthetases.

Eschen-Lippold L, Bethke G, Palm-Forster MA, Pecher P, Bauer N, Glazebrook J, Scheel D, Lee J.: *Plant Signal Behav*. 2012 Sep 1;7(9):1203-5.
MPK11-a fourth elicitor-responsive mitogen-activated protein kinase in *Arabidopsis thaliana*.

Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T.: *Plant J*. 1999 May;18(3):265-76.

Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin.

Felix G, Regenass M, Boller T.: *Plant J*. 1993 Aug;4(2):307-316.

Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state.

Fujiwara S, Tanaka N, Kaneda T, Takayama S, Isogai A, Che FS.: *Mol Plant Microbe Interact*. 2004. 17:986-998.

Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells.

Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che FS.: *Mol Plant Microbe Interact*. 2014 Feb;27(2):113-24.

Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*.

Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T. *Plant J.* 1999 May;18(3):277-84.

A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*.

Gómez-Gómez L, Boller T.: *Mol Cell.* 2000 Jun;5(6):1003-11.

FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*.

Gómez-Gómez L, Boller T.: *Trends Plant Sci.* 2002 Jun;7(6):251-6.

Flagellin perception: a paradigm for innate immunity.

Greenberg JT, Yao N.: *Cell Microbiol.* 2004 Mar;6(3):201-11.

The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions.

Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nürnberger T.: *J Biol Chem.* 2007 Nov 2;282(44):32338-48.

Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*.

Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE.: *PLoS Comput Biol.* 2005 Nov;1(6):e60.

A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes.

Hann DR, Rathjen JP.: Plant J. 2007 Feb;49(4):607-18.

Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*.

Heffron SE, Moeller R, Journak F.: Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006 Apr;62(Pt 4):433-8.

Solving the structure of *Escherichia coli* elongation factor Tu using a twinned data set.

Hirai H, Takai R, Iwano M, Nakai M, Kondo M, Takayama S, Isogai A, Che FS.: 2011. J Biol Chem. 286:25519-25530.

Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by *Acidovorax avenae* flagellin.

Iwano M, Che FS, Goto K, Tanaka N, Takayama S, Isogai A.: Mol Plant Pathol. 2002 Jan 1;3(1):1-8.

Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells.

Jared M. Schrader and Olke C. Uhlenbeck.: Nucleic Acids Res. 2011 December; 39(22): 9746–9758.

Is the sequence-specific binding of aminoacyl-tRNAs by EF-Tu universal among bacteria?

Jonák J.: J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Apr 15;849(1-2):141-53.

Bacterial elongation factors EF-Tu, their mutants, chimeric forms, and domains: isolation and purification.

Jones JD, Dangl JL.: Nature. 2006. Nov 16;444(7117):323-9.

The plant immune system.

Kadota I, Mizuno A, and Nishiyama K.: Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 1996. 62:425-428.

Detection of a protein specific to the strain of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 pathogenic to rice.

Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N.: Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. 103:11086-11091.

Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor.

Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P.: Genome Biol. 2007;8(4):R61.

Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G.: Plant Cell. 2004 Dec;16(12):3496-507. Epub 2004 Nov 17.

The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants.

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BP, Staskawicz B, Jones JD, Zipfel C.: Nat Biotechnol. 2010 Apr;28(4):365-9.

Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance.

Laquitaine L, Gomès E, François J, Marchive C, Pascal S, Hamdi S, Atanassova R, Delrot S, Coutos-Thévenot P.: Mol Plant Microbe Interact. 2006. 19:1103-1112.

Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against botrytis cinerea: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression.

Lathe WC 3rd, Bork P.: FEBS Lett. 2001 Aug 3;502(3):113-6.

Evolution of tuf genes: ancient duplication, differential loss and gene conversion.

Laursen RA, L'Italien JJ, Nagarkatti S, Miller DL.: J Biol Chem. 1981 Aug 10;256(15):8102-9.

The amino acid sequence of elongation factor Tu of Escherichia coli. The complete sequence.

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C.: Cell. 1994 Nov 18;79(4):583-93.

H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response.

Liu B, Li JF, Ao Y, Qu J, Li Z, Su J, Zhang Y, Liu J, Feng D, Qi K, He Y, Wang J, Wang HB.: *Plant Cell*. 2012 Aug;24(8):3406-19.

Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity.

Nakashita H, Yoshioka K, Takayama M, Kuga R, Midoh N, Usami R, Horikoshi K, Yoneyama K, Yamaguchi I.: *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001 Jan;65(1):205-8.

Characterization of PBZ1, a probenazole-inducible gene, in suspension-cultured rice cells.

Robatzek S, Chinchilla D, Boller T.: *Genes Dev*. 2006 Mar 1;20(5):537-42.

Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*.

Robatzek S, Bittel P, Chinchilla D, Köchner P, Felix G, Shiu SH, Boller T.: *Plant Mol Biol*. 2007 Jul;64(5):539-47.

Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of *Arabidopsis* FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities.

Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tör M, de Vries S, Zipfel C.: *Plant Cell*. 2011 Jun ;23(6):2440-55.

The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens.

Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, Ntoukakis V, Sklenar J, Jones A, Zipfel C.: PLoS Genet. 2011 Apr;7(4):e1002046.

Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1.

Shetty A, Chen S, Tocheva EI, Jensen GJ, Hickey WJ.: PLoS One. 2011;6(6):e20725.

Nanopods: a new bacterial structure and mechanism for deployment of outer membrane vesicles.

Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, Tzeng YH, Mayer KF, Li WH.: Plant Cell. 2004 May;16(5):1220-34.

Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice.

Silipo A, Molinaro A, Sturiale L, Dow JM, Erbs G, Lanzetta R, Newman MA, Parrilli M.: J Biol Chem. 2005. 280:33660-33668.

The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*.

Sidhu VK, Vorhölter FJ, Niehaus K, Watt SA.: BMC Microbiol. 2008 Jun 2;8:87.

Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Takai R, Kaneda T, Isogai A, Takayama S, Che FS.: Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Feb;71(2):590-3

A new method of defense response analysis using a transient expression system in rice protoplasts.

Takai R, Isogai A, Takayama S, Che FS.: Mol Plant Microbe Interact. 2008 Dec;21(12):1635-42.

Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice.

Tanaka N, Nakajima Y, Kaneda T, Takayama S, Che FS, Isogai A.: Plant Biotech. 2001. 18:295-299.

DNA laddering during hypersensitive cell death in cultured rice cell induced by an incompatible strains of *Pseudomonas avenae*.

Tanaka N, Che FS, Watanabe N, Fujiwara S, Takayama S, Isogai A.: Mol Plant Microbe Interact. 2003. 16:422-428.

Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of *PAL*, *Cht-1*, and *PBZ1*, but not of *Lox* in rice.

Torres MA, Jones JD, Dangl JL.: Nat Genet. 2005 Oct;37(10):1130-4. Epub 2005 Sep 18.

Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*.

Wilson DR, Beveridge TJ.: Can J Microbiol. 1993 May;39(5):451-72.

Bacterial flagellar filaments and their component flagellins.

Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., Namba, K.: Nature. 2003 Aug
7;424(6949):643-50.

Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron
cryomicroscopy.

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T.:
Nature. 2004 Apr 15;428(6984):764-7.

Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G.: Cell.
2006 May 19;125(4):749-60.

Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts
Agrobacterium-mediated transformation.

論文目録

Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*.

Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che FS. (2013, Accepted) Mol. Plant Microbe Interact.